

**Entwicklung einer RNAi-basierten Screeningmethode zur
Charakterisierung der Trockenstressantwort bei Gerste
(*Hordeum vulgare* L.)**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr.rer.nat.)

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Dipl.-Biol. Stephan Marzin
geb. am: 23.02.1979 in Wernigerode

Gutachter:

1. Prof. Dr. Klaus Humbeck
2. Priv.-Doz. Dr. habil. Andreas Börner
3. Dr. habil. Patrick Schweizer

Halle (Saale), den 23. November 2010

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 RESISTENZMECHANISMEN GEGEN TROCKENSTRESS | 4 |
| 1.1.1 Anpassung der Entwicklung | 4 |
| 1.1.1.1 Die Flucht vor Stress (<i>Escape</i>) | 4 |
| 1.1.1.2 Die Vermeidung von Stress (<i>Avoidance</i>) | 5 |
| 1.1.2 Mechanismen für die Toleranz von Stress | 6 |
| 1.1.2.1 <i>Osmotic adjustment</i> und <i>compatible solutes</i> | 6 |
| 1.1.2.2 Pflanzenhormone | 10 |
| 1.1.2.3 Reaktive Sauerstoffspezies (<i>Reactive Oxygen Species</i>) | 16 |
| 1.1.3 Gene und Proteine (Molekulare Mechanismen) | 20 |
| 1.1.3.1 Transkriptionsfaktoren und Regulons | 20 |
| 1.1.3.2 Proteine mit Schutzwirkung | 27 |
| 1.2 ZIELE DER ARBEIT | 32 |
| | |
| 2. MATERIAL UND METHODEN | 33 |
| 2.1 PFLANZENMATERIAL | 33 |
| 2.2 ANZUCHT DER PFLANZEN | 33 |
| 2.3 BAKTERIENSTÄMME | 33 |
| 2.4 VEKTOREN | 34 |
| 2.5 OLIGONUKLEOTIDE | 34 |
| 2.5.1 Primer für die Sequenzierung | 34 |
| 2.5.2 Primer für RNAi Konstrukte | 35 |
| 2.5.3 Primer für die <i>Frameshift</i> Mutagenese | 37 |
| 2.5.4 Primer für die GFP-Fusionsklonierung | 37 |
| 2.5.5 Primer für die qRT-PCR Experimente | 37 |
| 2.6 VERWENDETE KITS UND ENZYME | 38 |
| 2.7 HERSTELLUNG CHEMISCH KOMPETENTER ZELLEN | 38 |
| 2.8 TRANSFORMATION CHEMISCH KOMPETENTER ZELLEN | 40 |
| 2.9 ISOLATION VON NUKLEINSÄUREN | 41 |
| 2.9.1 Isolation von Plasmid DNA | 41 |
| 2.9.2 Isolation genomischer DNA aus Blattmaterial | 42 |
| 2.9.3 RNA Isolation aus Blattmaterial | 43 |

| | | |
|-----------|----------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.10 | POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR) | 44 |
| 2.10.1 | Amplifikation von Zielsequenzen | 44 |
| 2.10.2 | qRT-PCR | 45 |
| 2.10.2.1 | Herstellung der cDNA | 46 |
| 2.10.2.2 | <i>Real-time</i> Experiment | 47 |
| 2.10.2.3 | Auswertung der <i>Real-time</i> PCR | 48 |
| 2.11 | <i>TRANSIENT- INDUCED GENE SILENCING</i> (TIGS) | 49 |
| 2.11.1 | Klonierung der RNAi Vektoren | 49 |
| 2.11.2 | Biolistische Transformation | 51 |
| 2.11.2.1 | Herstellung der Goldsuspension | 51 |
| 2.11.2.2 | Beschichtung der Goldpartikel und Transformation | 51 |
| 2.11.3 | Mikroskopie der fluoreszierenden Zellen | 53 |
| 2.11.4 | Stressapplikation | 54 |
| 2.11.5 | Berechnung der Fluoreszenz-Verhältnisse | 55 |
| 2.11.6 | Statistik | 57 |
| 2.12 | GFP-FUSIONSKLONIERUNG (RNAi <i>OFF-TARGET</i>) | 57 |
| 2.12.1 | Klonierung von <i>HvDREB1</i> in den Vektor pIPKTA40 | 58 |
| 2.12.2 | Klonierung von <i>HvDRF1</i> in den Vektor pIPKTA40 | 59 |
| 2.12.3 | Ortsgerichtete Mutagenese (<i>Site-Directed Mutagenesis</i>) | 62 |
| 2.13 | BESTIMMUNG DES <i>RELATIVE WATER CONTENT</i> (RWC) | 62 |
| 2.14 | DAB FÄRBUNG (H ₂ O ₂ DETEKTION) | 63 |
| 2.15 | SOFTWARE UND DATENBANKEN | 64 |
| 3. | ERGEBNISSE | 67 |
| 3.1 | TIGS | 67 |
| 3.1.1 | Das TIGS Testsystem für Gene der Trockenstresstoleranz | 69 |
| 3.1.2 | Die Akkumulation von DsRED und GFP | 69 |
| 3.2 | AUSWAHL DER KANDIDATEN FÜR DEN RNAi <i>SCREEN</i> | 73 |
| 3.3 | <i>SCREENING I (PROOF OF CONCEPT)</i> | 78 |
| 3.4 | <i>SCREENING II (HAUPTSCREEN)</i> | 81 |
| 3.4.1 | TIGS in unterschiedlichen Sorten der Gerste | 89 |
| 3.5 | GFP FUSIONSKONSTRUKTE | 91 |
| 3.5.1 | Test auf <i>Cross-Silencing</i> Effekte | 93 |

| | | |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.5.2 | Weitere Überprüfung der <i>Target</i> -Spezifität | 94 |
| 3.5.3 | Effektivität der RNAi Konstrukte gegen <i>HvDRF1</i> | 95 |
| 3.6 | ERMITTLUNG DER TRANSKRIPTMENGE VON <i>HvDRF1</i> , <i>HvDHN6</i> , <i>HvHVA1</i> UND <i>HvNHX1</i> UNTER STRESSBEDINGUNGEN | 96 |
| 3.7 | LOKALISIERUNG VON H ₂ O ₂ MITTELS DAB FÄRBUNG | 100 |
| 3.8 | RWC..... | 101 |
| 4. | DISKUSSION | 102 |
| 4.1 | DAS TESTSYSTEM..... | 102 |
| 4.1.1 | „ <i>Proof of Concept</i> “..... | 107 |
| 4.2 | ÜBERPRÜFUNG DER <i>TARGET</i> -SPEZIFITÄT DES TIGS SYSTEMS | 109 |
| 4.3 | GENEXPRESSION UNTER STRESS DURCH DEHYDRIERUNG..... | 110 |
| 4.4 | NEUE KANDIDATENGENE DER STRESSANTWORT..... | 112 |
| 4.4.1 | Die LEA D11 Familie (Dehydrine)..... | 118 |
| 4.5 | AUSBLICK..... | 123 |
| 5. | LITERATURVERZEICHNIS | 124 |
| 6. | ZUSAMMENFASSUNG | 144 |
| 7. | SUMMARY | 146 |
| 8. | DANKSAGUNG..... | 148 |
| 9. | CURRICULUM VITAE | 149 |
| 10. | ERKLÄRUNG..... | 151 |

TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Tabelle 1: Synthetische Oligonukleotide bereitgestellt durch den Sequenzierservice (IPK-PGRC)..... | 34 |
| Tabelle 2: Synthetische Oligonukleotide für die Entwicklung und Etablierung der Screeningmethode. | 35 |
| Tabelle 3: Synthetische Oligonucleotide für die Untersuchung von Kandidatengen. ... | 35 |
| Tabelle 4: Synthetische Oligonukleotide für die Korrektur des Leserasters (ORF) im Gen <i>HvDRF1</i> | 37 |
| Tabelle 5: Synthetische Oligonukleotide für die Klonierung der Gene <i>HvDREB1</i> und <i>HvDRF1</i> | 37 |
| Tabelle 6: Synthetische Oligonukleotide zur Ermittlung der Expression verschiedener Gene unter Trockenstressbedingungen..... | 37 |
| Tabelle 7: Kandidatengene, welche für die Entwicklung des RNAi <i>Screens</i> aus der Literatur ausgewählt und in Gerste cv. Golden Promise getestet wurden..... | 74 |
| Tabelle 8: Kandidatengene, welche der Publikation von Talamé et al. (2007) entnommen und in Gerste cv. Golden Promise im RNAi <i>Screen</i> untersucht wurden..... | 75 |
| Tabelle 9: Kandidaten der LEA D11 Genfamilie (Dehydrine). | 76 |
| Tabelle 10: Kandidatengene, welche durch ein persönliches Gespräch mit L. Cativelli in die Testserie zusätzlich miteinbezogen wurden. | 77 |
| Tabelle 11: Ergebnisse des RNAi <i>Screens</i> mit Kandidaten der Literaturrecherche..... | 79 |
| Tabelle 12: Ergebnisse der Wiederholung des RNAi <i>Screens</i> mit Kandidatengen, welche einen signifikanten Einfluss auf das DsRED/GFP Verhältnis hatten. | 80 |
| Tabelle 13: Relativer DsRED/GFP Wert (in %) der Kandidaten ohne erkennbaren Effekt. | 83 |
| Tabelle 14: Mittelwerte der zusätzlich getesteten Kandidaten des Hauptscreens (Serie III). | 87 |
| Tabelle 15: Ergebnisse aller Kandidaten mit signifikantem Effekt im TIGS <i>Screen</i> | 88 |
| Tabelle 16: Zielgerichtetes <i>Silencing</i> des GFP:: <i>HvDRF1</i> ::GFP Fusionskonstruktes. | 94 |
| Tabelle 17: Kandidaten die einen signifikanten Effekt im <i>Screen</i> zeigten. | 114 |
| Tabelle 18: Ergebnisse des RNAi <i>off-target Scans</i> unter Verwendung der Software si-Fi. | 119 |
| Tabelle 19: Übersicht der Ergebnisse für Mitglieder der LEA D11 Genfamilie (Dehydrine). | 120 |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Abbildung 1: Biosynthese- und Abbauwege der Abscisinsäure (ABA) in Pflanzen. | 14 |
| Abbildung 2: Entstehung von Reaktiven Sauerstoff Spezies. | 17 |
| Abbildung 3: Transkriptionelle Kontrolle der Genexpression unter abiotischen und biotischen Stressbedingungen. | 21 |
| Abbildung 4: Darstellung der Berechnung der Verhältnisse. | 56 |
| Abbildung 5: Expressionskassette des HvDREB1::GFP-Fusionsproteins. | 59 |
| Abbildung 6: Expressionskassette des GFP::HvDRF1::GFP-Fusionsproteins. | 61 |
| Abbildung 7: Darstellung der Kinetik der beiden Fluoreszenzmarker GFP und DsRED unter Kontrollbedingungen. | 70 |
| Abbildung 8: Schema der Idee zur Akkumulation von DsRED unter Stressbedingungen. | 71 |
| Abbildung 9: Schematische Darstellung des Experimentablaufs des RNAi Screens. .. | 72 |
| Abbildung 10: Einfluss der RNAi Konstrukte auf das DsRED/GFP Verhältnis relativ zur Kontrolle pPKTA30. | 80 |
| Abbildung 11: RNAi Konstrukte, welche auch in der Wiederholung einen signifikanten Effekt auf das DsRED/GFP Verhältnis hatten. | 81 |
| Abbildung 12: Schematische Darstellung der Auswahl der final zu testenden Kandidaten. | 82 |
| Abbildung 13: RNAi Konstrukte, welche nur in drei Wiederholungen getestet wurden. | 84 |
| Abbildung 14: Darstellung der Ergebnisse aller RNAi Konstrukte, welche gegen verschiedene Vertreter der Dehydrin Familie gerichtet sind. | 85 |
| Abbildung 15: RNAi Konstrukte, die das DsRED/GFP Verhältnis signifikant beeinflussten. | 86 |
| Abbildung 16: Zusätzlich getestete RNAi Konstrukte (Hauptscreen, Serie III), welche jedoch keinen signifikanten Einfluss auf das DsRED/GFP Verhältnis hatten. | 87 |
| Abbildung 17: Einfluss des leeren RNAi Vektors pPKTA30 auf das DsRED/GFP Verhältnis unter Stressbedingungen. | 90 |
| Abbildung 18: Einfluss der RNAi Konstrukte <i>HvDRF1</i> und <i>HvDHN6</i> auf das relative DsRED/GFP Verhältnis unter Stressbedingungen, in verschiedenen Sorten der Gerste. | 90 |
| Abbildung 20: Einfluss der RNAi Konstrukte <i>HvDRF1</i> und <i>HvDREB1</i> auf das GFP/DsRED Verhältnis. | 94 |
| Abbildung 21: Signifikante Verminderung des relativen DsRED/GFP Verhältnisses durch RNAi Konstrukte, welche gegen unterschiedliche Regionen von <i>HvDRF1</i> gerichtet sind. | 95 |
| Abbildung 22: Zielregionen der drei gegen <i>HvDRF1</i> gerichteten RNAi Konstrukte. | 96 |
| Abbildung 23: <i>Real-time</i> PCR Ergebnisse zur Expression von <i>HvDRF1</i> , <i>HvDHN6</i> , <i>HvHVA1</i> und <i>HvNHX1</i> in transformierten und nicht-transformierten Proben. | 97 |
| Abbildung 25: Vergleich der H ₂ O ₂ Akkumulation unter Kontroll- und Stressbedingungen. | 100 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-------|--------------------------------------------------------------------------|
| cDNA | <i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA) |
| cv. | <i>cultivar</i> (Sorte) |
| DNA | <i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure) |
| EST | <i>expressed sequence tag</i> |
| GFP | <i>green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein) |
| GP | Golden Promise |
| GUS | β- Glucuronidase |
| ID | Identifikationskode |
| LEA | <i>late embryogenesis abundant (proteins)</i> |
| mRNA | <i>messenger RNA</i> (Boten-RNA) |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| nt | Nukleotide |
| ORF | <i>open reading frame</i> (offener Leseraster) |
| p.B. | <i>post bombardment</i> (nach Beschuss) |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion) |
| PPFD | <i>Photosynthetic Photon Flux Density</i> |
| psi | <i>pounds per square inch</i> (Pfund pro Quadrat Zoll) |
| QTL | <i>Quantitative trait locus</i> |
| RFP | <i>red fluorescent protein</i> (rot fluoreszierendes Protein bzw. DsRED) |
| RFW | <i>relative fresh weight</i> (relatives Frischgewicht) |
| RNA | <i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure) |
| RNAi | RNA Interferenz |
| rpm | <i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute) |
| ROS | <i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies) |
| RT | Raumtemperatur |
| RWC | <i>relative water content</i> (relativer Wassergehalt) |
| TC | <i>tentative consensus</i> |
| TF | Transkriptionsfaktor |
| TIGS | <i>Transient-induced gene silencing</i> |
| WUE | <i>water use efficiency</i> (Wassernutzungseffizienz) |
| X-Gal | 5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid |

1. Einleitung

Die beständige Erwärmung der Erde durch den Klimawandel und die damit verbundenen Veränderungen von landwirtschaftlich nutzbaren Anbauflächen haben bedeutende Auswirkungen auf das Wachstum von Kulturpflanzen wie Weizen (*Triticum* L.), Reis (*Oryza* L.), Mais (*Zea mays* L.) oder Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Diese müssen immer häufiger auf immer extremere Klimabedingungen reagieren und durch spezielle Schutzmechanismen oder Anpassungen an schlechtere Bedingungen ihr Überleben sichern.

Auf die Erhöhung der durchschnittlichen Temperatur, welche allein im letzten Jahrhundert um etwa 0,8 °C anstieg (<http://data.giss.nasa.gov/gistemp>) und die damit verbundenen Stressarten wie Trockenheit, können Pflanzen allgemein jedoch auf sehr unterschiedliche Weise reagieren. Neben einer strukturellen Veränderung z.B. der Pflanzenzellen, durch Auflagerung von zusätzlichen Wachsschichten oder eines besonderen Wurzelwachstums zur Sicherung der Wasserversorgung, ist es ebenso möglich den Blühzeitpunkt zu verschieben oder den Stoffwechsel anzupassen. Mit der Zunahme der Durchschnittstemperatur wird neben der Vergrößerung der ariden Zonen allerdings noch ein anderes Problem generiert, dessen sich die Pflanzen erwehren müssen. Infolge der Erwärmung kann es zu einer weiteren Verbreitung von wärmeliebenden Schädlingen [z. B. Borkenkäfern (*Scolytinae*)] in Regionen kommen, die heute für diese noch zu kühl sind. Auf der anderen Seite ist es ebenfalls möglich, dass durch das sich ändernde Wetter in bestimmten Regionen der Erde überdurchschnittlich hohe Niederschläge zu verzeichnen sind, was wiederum zur Folge hat, dass bestimmte Schadpilze wie z.B. *Septoria tritici* (*Septoria* Blattdürre) zu größeren Missernten führen. Auch andere Vertreter der Abteilung der Schlauchpilze (*Ascomycota*), wie der echte Mehltau (*Blumeria graminis*) oder *Fusarium*, der Verursacher von Fusariosen (Ährentaubheit), tragen maßgeblich zur Verringerung des Ernteertrages bei und stellen ein ernstzunehmendes Problem dar. Aber nicht nur extreme Klimabedingungen und die mit ihnen verbundenen abiotischen (Hitze, Kälte, hohe Salzkonzentrationen usw.) und biotischen (Insekten, pathogene Viren, Bakterien, Pilze) Faktoren spielen eine Rolle, sondern auch die steigende Welt-

bevölkerung und damit verbunden die zunehmende Nahrungsknappheit besonders in den Ländern der Dritten Welt. Die UNO erwartet bis zum Jahr 2025 eine Bevölkerung von ca. 8 Milliarden Menschen (<http://esa.un.org/unpp/>). Dies bedeutet, dass etwa 1,25 Milliarden Menschen zusätzlich mit den bereits heute knappen Kapazitäten versorgt werden müssten.

Um daher den steigenden Bedarf an resistenten und widerstandsfähigen Sorten zu decken und gleichzeitig das Problem der Versorgung mit Nahrungsmitteln zu lösen ist es zwingend notwendig exakte Kenntnisse über die Gene zu haben, welche einen gewünschten Phänotyp charakterisieren. Mit diesem Wissen wäre es möglich Pflanzen hinsichtlich ihrer Anbaueigenschaften zu verbessern und die Toleranz gegenüber abiotischem, als auch biotischem Stress zu erhöhen.

Im Zeitalter der modernen Molekularbiologie ist die Entschlüsselung von Genomen und das Verständnis von natürlichen Abwehrmechanismen Grundlage der Pflanzenbiotechnologie. Zwei der wohl populärsten Beispiele hierfür sind die Entwicklung von *Bt*-Mais (Koziel et al., 1993) und die Erschaffung des sogenannten *Golden Rice* (*Oryza sativa*)(Ye et al., 2000; Paine et al., 2005).

Die Idee, welche sich dabei hinter *Bt*-Mais verbirgt ist, dass sich Maispflanzen gegen den natürlichen Schädling *Ostrinia nubilalis* (dem Maiszünsler) zur Wehr setzen können, indem sie ein Toxin produzieren, das diesem schadet. Bei dem Toxin handelt es sich um ein sogenanntes δ -Endotoxin. Das entsprechende kodierende Gen, *cryIA(b)*, wurde dazu aus dem gram positiven Bakterium *Bacillus thuringiensis* gewonnen und für die Expression in Pflanzen angepasst (Koziel et al., 1993). Wird dieses Gen durch die Pflanze exprimiert entsteht ein Protoxin, das im Verdauungstrakt des Insekts durch proteolytische Spaltung in ein Toxin umgewandelt wird. Dieses Toxin bindet dann an einen Rezeptor in der Plasmamembran der Darmzellen und führt zur Bildung von Poren und großflächigen Läsionen. Dadurch wird die zelluläre Integrität zerstört, was wiederum die Lyse der Zelle zur Folge hat und mit der Zerstörung des Darmes endet (Knowles und Dow, 1993).

Das zweite Beispiel betrifft die Veränderung bestimmter Inhaltsstoffe von Reiskörnern (β -Carotingehalt) und damit die Verbesserung der Nahrungsmittel-

qualität. In den Bevölkerungsreichsten Regionen der Erde (Südostasien, Afrika und Lateinamerika), wo Reis eines der Hauptnahrungsmittel ist, wird der Mangel an Vitamin A zunehmend zum Problem. Die mit dem Vitaminmangel verbundenen Symptome betreffen dabei meist Kinder und ältere Erwachsene und manifestieren sich in der Verschärfung von Durchfall- und Atemwegserkrankungen. Darüber hinaus führen sie bei Kindern sehr häufig zur Erblindung. Um dieses Problem in seinen Auswirkungen zu begrenzen hat man sich dazu entschlossen, durch die Insertion von Genen, welche für Schlüsselenzyme des Betacarotin-Syntheseweges kodieren [Phytoensynthase (PSY) und Carotindesaturase (CRTI); Ye et al., 2000], den Gehalt an Provitamin A (Betacarotin) im Endosperm von Reiskörnern zu erhöhen. Die resultierende erhöhte Anwesenheit von Carotinoiden verleiht den Reiskörnern schließlich ihre charakteristische gelbe Farbe, was zur Bezeichnung *Golden Rice* führte.

Es wird also ersichtlich, dass das Wissen über die Bildung und Wirkungsweise von Toxinen bzw. die Möglichkeit bestimmte Inhaltsstoffe (aufgrund exakter Kenntnisse von Stoffwechselwegen) anreichern zu können, enorme Vorteile für das Bestreben zur Verbesserung von Nahrungsmitteln und Lebensqualität mit sich bringt. Im Mittelpunkt des Interesses stehen aber nicht nur diese beiden Aspekte, sondern auch das Potential sich gegenüber abiotischem Stress zur Wehr zu setzen. Die Erforschung von Resistenzen gegen Kälte, Trockenheit, Hitze, hohem Salzgehalt im Boden oder etwa Schwermetallbelastungen sind ebenfalls von enormer Bedeutung. Eine der häufigsten Ursachen für einen verminderten Ernteertrag ist Stress durch Trockenheit. Das Fehlen von Wasser hat dabei aber nicht nur Auswirkungen auf den Ertrag einer Anbaukultur, weil Photosyntheseleistung oder Nährstoffaufnahme limitiert sind und benötigte Metabolite nicht mehr in ausreichender Form zur Verfügung stehen, sondern auch auf das Wachstum der jeweiligen Pflanze (Zeid und Shedeed, 2006). Sowohl der reduzierte Turgordruck, als auch die eingeschränkte Mitose führen häufig zu einem verkümmerten Wachstum oder zu einer beeinträchtigten Keimung. Allerdings haben Pflanzen verschiedene Mechanismen entwickelt, die es ihnen ermöglichen mit dieser Art von Stress fertig zu werden. Im Folgenden soll nun ein kurzer Überblick gegeben werden, welcher den aktuellen Stand der Forschung widerspiegelt.

1.1 Resistenzmechanismen gegen Trockenstress

Resistenz gegenüber Trockenstress bedeutet nicht nur auf verschlechterte Bedingungen durch Anpassung physiologischer Prozesse zu reagieren, sondern auch auf molekularer (biochemischer) und physikalischer Ebene eine Gegenwehr einleiten zu können (Farooq et al., 2009). Pflanzen haben zu diesem Zweck eine Reihe von unterschiedlichen Strategien entwickelt, die sich vereinfacht in drei Kategorien einteilen lassen. Die erste Möglichkeit besteht darin, dem Stress durch entwickelte *escape* Mechanismen, wie der Verlegung des Blühzeitpunktes, zu entgehen. Die zweite Möglichkeit ist die Vermeidung von Stress (*avoidance*), durch Änderung von morphologischen Merkmalen, wie der Anpassung des Wurzelcharakters oder Erhöhung der *water use efficiency* (WUE). Die dritte Maßnahme führt schließlich zur Ausbildung von Toleranz bzw. Resistenz und wird durch vielfältige molekulare und physiologische Anpassungsreaktionen erreicht (Mundree et al., 2002).

1.1.1 Anpassung der Entwicklung

1.1.1.1 Die Flucht vor Stress (*Escape*)

Die einfachste Methode dem Trockenstress zu entgehen ist ein verkürzter Lebenszyklus, der es der Pflanze erlaubt sich zu reproduzieren, bevor die Bedingungen dafür schlechter werden (Araus et al., 2002). Aktuelle Studien demonstrieren, dass mit der zunehmenden Erwärmung der Erde der Blühzeitpunkt für bestimmte Pflanzenarten immer früher einsetzt (Parmesan, 2003). Das Team um Steven Franks konnte zum Beispiel zeigen, dass die Verschiebung des Blühzeitpunktes aufgrund von Trockenstress, bei *Brassica rapa* (die Rübsaat) als ein relativ schneller Prozess der Adaptation generell möglich ist. Sie untersuchten in einem Zeitraum von 7 Jahren Pflanzen, welche an einem feuchten Standort bzw. an einem trockenen Standort gestanden hatten und einer Trockenstressperiode ausgesetzt waren. Es gelang ihnen nachzuweisen, dass die Pflanzen des trockenen Standortes aufgrund der Anpassung eine höhere Fitness besaßen (*escape* durch frühzeitiges Blühen) und dass Pflanzen des feuchten Standortes verbesserte Eigenschaften ebenfalls aufwiesen, wenn deren vorherige Generationen jeweils dem Stress durch Trockenheit unterlagen (Franks et al., 2007).

Chromosomenbereiche, welche mehrere Gene enthalten können, die nachweisbar für eine Eigenschaft wie z.B. dem Blühzeitpunkt verantwortlich sind, werden als sogenannter QTL (*Quantitative trait locus*) bezeichnet. Durch moderne Assoziationsstudien können diese QTLs direkt mit der Toleranz gegenüber Trockenstress in Verbindung gebracht werden (Lanceras et al., 2004), was ebenfalls dazu führt, dass auch unterschiedliche Strategien der Anpassung erfasst werden können. Xu et al. (2005) identifizierten bei ihren Untersuchungen von verschiedenen Reis Introgressionslinien insgesamt 36 QTLs, welche unter anderem mit dem Blühzeitpunkt, dem Ertrag oder der Pflanzenhöhe im Zusammenhang standen. Dabei fiel auf, dass bei Vorhandensein der Allele des einen Elter (Lemont) der Zeitpunkt des Ährenschiebens unter Stress deutlich früher einsetzte, was im Einklang mit dessen Anpassungsstrategie (*escape*) an Trockenstress steht.

1.1.1.2 Die Vermeidung von Stress (*Avoidance*)

Nicht nur die „Flucht“ vor schlechten Lebensbedingungen, durch frühzeitigere Beendigung des Lebenszyklus, stellt eine wirkungsvolle Maßnahme dar, sondern auch die Möglichkeit zur Vermeidung (*avoidance*) von Stress durch Veränderung des Wurzelcharakters, Anpassung der Blattoberfläche oder der Pflanzenzellen selbst. Untersuchungen von verschiedenen Genotypen des Hartweizens (*Triticum durum*) zeigten zum Beispiel, dass die Ausbildung eines dichten und tiefen Wurzelsystems ein besonders wichtiger Aspekt ist, wenn es darum geht, ein tiefer gelegenes Wasserreservoir zu erreichen und die Nährstoffversorgung für einen besseren Ertrag sicherzustellen (Motzo et al., 1993). Auch Zheng et al. (2000) berichten über die Wichtigkeit des Wurzelsystems. Sie haben im Zusammenhang mit Trockenstress mehrere QTLs identifiziert, die den Charakter der Wurzeln z.B. die Dicke oder die Fähigkeit den Boden penetrieren zu können, bestimmen. Neben der Verbesserung der Wasseraufnahme sind aber ebenso *avoidance* Mechanismen wie die Verkleinerung der Blattoberfläche oder eingesenkte Stomata (z.B. bei Xerophyten) bekannt und von Vorteil um den Verlust von Wasser zu minimieren. Hegazy und El Amry (2002) diskutieren darüber hinaus die Auswirkungen auf die Blatttemperatur.

Durch zusätzliche Auflagerung einer dünnen Wachsschicht, der sogenannten Kutikula, auf die Oberfläche der Epidermis, ist es ebenfalls möglich einfallendes Licht zusätzlich zu reflektieren und somit eine Absenkung der Temperatur in den Blättern zu bewirken (Richard et al., 1986). Auch die Zellwände können z.B. durch Lignifizierung in Geweben verstärkt werden, die dem Stress ausgesetzt sind (Nonami und Boyer, 1990).

1.1.2 Mechanismen für die Toleranz von Stress

Außer der morphologischen Anpassung an hohe Temperaturen und Wasserknappheit oder der Flucht vor deren Folgen, sind Pflanzen zusätzlich in der Lage Substanzen zu synthetisieren, mit deren Hilfe sie die Auswirkungen des Stresses abmildern können oder die sie benötigen um eine Abwehrreaktion einzuleiten. Die hier vorgestellten physiologischen Prozesse bilden somit zusammen mit den molekularen Mechanismen eine dritte Möglichkeit, nämlich die der Toleranz, im Umgang mit Stress.

1.1.2.1 *Osmotic adjustment* und *compatible solutes*

Die Synthese und Anreicherung von sogenannten kompatiblen Substanzen (*compatible solutes*), welche den normalen Stoffwechsel in der Zelle nicht stören, dient einerseits der Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichts und andererseits dem direkten Schutz von Membranen und Proteinen. Dabei handelt es sich um Verbindungen wie Mannitol, Sorbitol, Sucrose, Trehalose, Glutamat, Prolin, Glycinbetain oder *myo*-Inositol (Smirnoff, 1998; Ramanjulu und Bartels, 2002; Wang et al., 2003; Mahajan und Tuteja, 2005). Aber auch Citrullin, Gamma-Aminobuttersäure und Ionen wie Ca^{2+} , K^{+} und Cl^{-} spielen eine Rolle (Farooq, 2009).

Die Aminosäure **Prolin** ist sehr weit verbreitet bei Tieren, Pflanzen und Bakterien und die Akkumulation in Pflanzen unter abiotischen Stressbedingungen wurde bereits mehrfach bestätigt (Delauney und Verma, 1993). Sie wird hauptsächlich über zwei Zwischenprodukte, dem Glutamat- γ -semialdehyd und dem Δ^1 -Pyrrolin-5-carboxylat, aus Glutamat gebildet. Die Überexpression eines der Enzyme des Syntheseweges, der P5C Synthase, in Tabak (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) führte in der Tat zu einer extrem gesteigerten Bildung von Prolin (10 bis 18 fach höhere Menge gegenüber den

Kontrollpflanzen). Daraus resultierend zeigten die transgenen Pflanzen unter Trockenstress eine stark verbesserte Leistungsfähigkeit (*performance*). Neben der Erhöhung der Wurzelbiomasse waren ebenfalls die Blütenentwicklung und das osmotische Potential der Blätter positiv beeinflusst (Kishor et al., 1995). Unter Stressbedingungen durch Dehydration wird das für die P5C Synthase kodierende Gen hochreguliert, während die Expression des Gens für die Prolin-Dehydrogenase verhindert wird. Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung von Prolin zu Δ^1 -Pyrrolin-5-carboxylat durch Oxidation und dient der Kontrolle des Prolinlevels in der Zelle (Peng et al., 1996; Yoshiba et al., 1997). Nanjo et al. gelang es durch Einsatz von *antisense*-RNA dieses Gen gezielt auszuschalten und so die Menge an synthetisiertem Prolin noch weiter zu steigern (Nanjo et al., 1999). Neben der Aufgabe der Stabilisierung von Makromolekülen und Membranen, wird ebenfalls vermutet, dass Prolin dazu dient das osmotische Gleichgewicht zu beeinflussen, die für die Pflanze gefährlichen Hydroxylradikale (OH^\bullet) zu neutralisieren oder als Quelle Kohlenstoff und Stickstoff bereitzustellen (Bartels und Sunkar, 2005).

Auch Zuckeralkohole wie Trehalose, Mannitol oder *myo*-Inositol scheinen eine bedeutende Rolle zu spielen. **Trehalose**, einem nicht-reduzierenden Disaccharid der Glucose, wird nach aktuellem Stand der Schutz von Membranen, Enzymen und anderen Makromolekülen nachgewiesen. Des Weiteren wird die Bedeutung bei der Abwehr von aggressiven Sauerstoffradikalen und die Resistenz von Zellen gegen Wasserstoffperoxid (H_2O_2) diskutiert (Elbein et al. 2003). Als multifunktionelles Molekül unterstützt es zusätzlich die Photosynthese durch Schutz des Photosystem II unter Stressbedingungen (Garg et al., 2002). Die Überexpression eines der Schlüsselenzyme des Syntheseweges, Trehalose-6-phosphat Synthase, in transgenen Pflanzen führte zu einer gesteigerten Bildung von Trehalose und daraus resultierend zu einer erhöhten Toleranz gegenüber Trockenstress (Karim et al., 2007).

Mannitol, ein so genannter nicht-zyklischer Zuckeralkohol hat neben der Stabilisierung von Enzymen, durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, ebenfalls die Aufgabe als Radikalfänger. Insbesondere Hydroxylradikale (OH^\bullet) scheinen dabei durch Mannitol neutralisiert zu werden. Die Expression von Enzymen des Syntheseweges wie z.B. der Mannitol-1-

Phosphat Dehydrogenase aus *Escherichia coli* (*mtfD*) führte in Weizen zu einem verbesserten Wachstum und einem erhöhten Widerstand gegenüber Salz- und Trockenstress (Abebe et al., 2003). Auch die Expression dieses Gens in Tabak (Tarczynski et al., 1993; Shen et al., 1997) hatte den Effekt, dass durch verstärkte Akkumulation von Mannitol eine Erhöhung der Toleranz gegenüber osmotischem Stress (Salzstress) beobachtet werden konnte.

Neben nicht-zyklischen Zuckeralkoholen existieren aber auch noch einige zyklische Verbindungen. Dabei handelt es sich um zyklische Polyole wie *myo*-Inositol und dessen Derivate. **D-Ononitol** (1D-4-O-methyl-*myo*-Inositol) ist eines dieser Derivate, welches direkt aus *myo*-Inositol durch Methylierung entsteht. Der Methylierungsschritt wird dabei von der S-Adenosyl-L-Methionin-abhängigen O-Methyl-Transferase katalysiert (Vernon und Bohnert, 1992). Die Expression dieses Gens aus *Mesembryanthemum crystallinum*, einem Vertreter der Halophyten, führte in Tabak zu einer erhöhten Akkumulation von D-Ononitol. Transgene Pflanzen die dieses Gen exprimierten zeigten eine verbesserte Photosyntheserate, sowohl unter Trockenstress als auch unter Salzstress, da die CO₂ Fixierung weniger in Mitleidenschaft gezogen wurde. Außerdem erholten sich die Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollen nach Beendigung des Stresses deutlich schneller (Sheveleva et al., 1997). Eine weitere zyklische Polyolverbindung ist das **D-Pinitol** (1D-3-O-methyl-chiro-inositol), welches durch eine Epimerase aus D-Ononitol gebildet wird. Diese Verbindung wird im Gegensatz zum D-Ononitol jedoch nur mit osmotischem Stress durch hohe Salzkonzentrationen in Verbindung gebracht (Vernon und Bohnert, 1992; Bohnert et al., 1995).

Eine weitere Verbindung die sich positiv auf das osmotische Gleichgewicht auswirkt ist das **Glycinbetain**, ein Derivat der Aminosäure Glycin, dessen Stickstoffatom vollständig methyliert ist. Man spricht hierbei von einer quaternären Ammoniumverbindung. Pflanzen bilden Glycinbetain im Stroma der Chloroplasten mit Hilfe der Enzyme Cholinmonooxygenase (CMO) und Betinaldehyd-Dehydrogenase (BADH), aus Cholin (McNeil et al., 1999). Das Ferredoxin-abhängige Enzym CMO, welches den ersten Schritt vom Cholin zum Betain-Aldehyd katalysiert, kann dabei nachweislich durch Salz- und Trockenstress induziert werden (Russell et al., 1998). Auch andere Organismen haben ähnliche Wege entwickelt um Glycinbetain herzustellen. *Arthrobacter*

globiformes benötigt z.B. nur ein Enzym, die Cholinoxidase, zur Synthese während *Actinopolyspora halophila* und *Ectothiorhodospira holochloris* Glycinbetain durch Methylierung aus Glycin (Chen and Murata, 2002) synthetisieren. Obwohl es in vielen Pflanzen nachgewiesen werden kann und unter unterschiedlichen abiotischen Stressbedingungen die Synthese stark induziert ist (Rhodes and Hanson, 1993), enthalten bedeutende Vertreter wie *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* oder *Nicotiana tabacum* kein Glycinbetain (McNeil et al., 1999). Sie zählen damit zu den Nicht-Akkumulierern. Da Glycinbetain aber wahrscheinlich durch Stabilisierung der Quartärstruktur von Proteinen und die Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichtes zwischen Zelle und Umgebung einen positiven Einfluss auf das Überleben einer Pflanze hat, wurde versucht den Biosyntheseweg in diese Nicht-Akkumulierer zu integrieren (Sakamoto and Murata, 2000; Chen and Murata, 2002). Transgene Pflanzen zeigten zwar ein breites Spektrum an abiotischer Stresstoleranz, z.B. gegenüber hohen Salzkonzentrationen, niedrigen Temperaturen, Trockenheit oder intensiver Lichtstrahlung, produzierten jedoch deutlich geringere Konzentrationen an Glycinbetain im Vergleich zu Pflanzen, welche von Natur aus zu den Akkumulierern zählen. Mögliche Erklärungen die in diesem Zusammenhang diskutiert werden sind zum einen die schlechtere Verfügbarkeit von Cholin in Nicht-Akkumulierern (Nuccio et al., 1998; Huang et al., 2000), sowie der fehlende Transport von Glycinbetain von den Chloroplasten in das Cytosol (Chen and Murata, 2002). Schwacke et al. (1999) berichten jedoch von einem Transporter (LeProT1), welcher nur im Pollen der Tomate exprimiert wird und in der Lage ist mit einer niedrigen Affinität gegenüber Prolin und γ -Amino-buttersäure, sowie mit hoher Affinität gegenüber Glycinbetain einen Transport der Substanzen zu bewerkstelligen (Schwacke et al., 1999).

Eine letzte Gruppe von kompatiblen Substanzen die hier erwähnt werden soll sind die **Polyamine**. Dabei handelt es sich um kleine polykationische aliphatische Amine wie Putrescin, Spermidin und Spermin. Urano et al. (2003) konnten insgesamt acht Gene in *Arabidopsis thaliana* identifizieren, welche für Enzyme des Syntheseweges von Polyaminen kodieren. Hierzu gehören unter anderem die Arginin-Decarboxylase (ADC), die S-Adenosylmethionin-Decarboxylase (SAMDC), die Spermidin-Synthase (SPDS) und die Spermin-

Synthase (SPMS). Unter Salz- und Trockenstressbedingungen, aber auch nach Behandlung mit Abscisinsäure (ABA) waren z.B. die Gene für *AtADC2* und *AtSPMS* deutlich induziert und die Menge an Putrescin in den Pflanzen erhöht. Die Expression des *Datura stramonium* ADC Gens in Reis führte ebenfalls zu einer Erhöhung des Putrescinlevels unter Trockenstress, welcher durch PEG Behandlung simuliert wurde (Capell et al., 2004). Die Gabe von Putrescin während der Keimung von *Alfalfa* Samen, die PEG-Stress ausgesetzt waren, hatte den Effekt, dass verschiedene Wachstumskriterien (Hypokotyllänge, Frisch- und Trockengewichte der Wurzel), sowie die Keimrate deutlich verbessert werden konnten (Zeid und Shedeed, 2006). Obwohl es einige Hinweise auf die Funktion von Polyaminen innerhalb der Entwicklungsprozesse von Pflanzen gibt und deren Schutzfunktion während abiotischem Stress nachweisbar ist wird bis heute dieses Thema, auch in Hinblick auf die Toxizität der Verbindungen, kontrovers diskutiert.

1.1.2.2 Pflanzenhormone

Als Reaktion der Pflanze auf Stressbedingungen werden nicht nur kompatible Substanzen zum direkten Schutz bestimmter Proteine bereitgestellt, sondern auch Verbindungen erzeugt, welche die physiologischen Prozesse tiefgreifender beeinflussen. Diese Verbindungen können bereits in sehr niedrigen Konzentrationen ihre Wirkung entfalten. Die Rede ist von Phytohormonen wie Ethylen, Auxinen, Giberellinen, Jasmonaten, Salicylsäure oder der wohl am besten untersuchten Abscisinsäure (ABA).

Bei der ersten Verbindung, dem **Ethylen**, handelt es sich um ein gasförmiges Pflanzenhormon. Die eigentliche Aufgabe besteht in der Unterstützung und Auslösung des Blattfalls, der Alterung (Seneszenz) von Pflanzenorganen, der Reifung von Früchten oder der Entwicklung des Wurzelhaarsystems. Über die Auswirkungen von Ethylen unter Trockenstressbedingungen ist bisher bekannt, dass dessen Synthese unter Stress induziert wird und dass es als Gegenspieler der Abscisinsäure die Schließung der Stomata verhindert (Tanaka et al., 2005). Die Autoren ziehen außerdem noch eine weitere mögliche physiologische Rolle in Betracht. Sie vermuten nicht nur, dass Ethylen dafür verantwortlich ist, die Versorgung mit CO₂ und damit die Fortführung der Photosynthese, durch teilweises öffnen halten der Spaltöffnungen, auf einem niedrigen Niveau zu

sichern, sondern sie denken auch, dass es die Alterung der Blätter unter Trockenstress induziert. Young et al. (2004) diskutieren ebenfalls den Einfluss von Ethylen auf die unter Trockenstress induzierte Seneszenz in Mais. Sie betrachten hierbei jedoch im speziellen die ACC Synthase, die den ersten Schritt des Ethylenbiosyntheseweges katalysiert.

Jasmonate sind eine Gruppe von Phytohormonen, die nach der Jasmonsäure, von der sich alle Derivate ableiten, benannt werden. Jasmonsäure wird aus der ungesättigten Fettsäure, α -Linolensäure, gebildet (Vick und Zimmermann, 1984). Neben der Regulation des vegetativen Wachstums sind sie ebenfalls für die Abwehr von abiotischen Stress durch UV Licht oder Ozon verantwortlich (Katsir et al., 2008). Es wird zudem vermutet, dass sie außerdem eine Rolle bei der Schließung der Spaltöffnungen unter Trockenstress spielen (Suhita et al., 2003). In Keimlingen der Gerste konnte nach Behandlung mit Jasmonat eine deutlich gesteigerte Akkumulation von Abscisinsäure beobachtet werden, was die Vermutung zulässt, dass Jasmonat unter Stress durch Dehydration eine Rolle in der ABA Biosynthese spielt (Bandurska et al., 2003). Des Weiteren ist bekannt, dass viele Trockenstress-induzierte Gene, auch durch Methyljasmonat (MeJA) und durch ABA induziert werden können (Huang et al., 2008). Ein anderes Forscherteam berichtet, dass die Akkumulation von MeJA in Erdbeerpflanzen nicht nur eine Absenkung der Transpirationsrate zur Folge hatte, sondern darüber hinaus ein positiver Effekt auf den Fettmetabolismus und detoxifizierende Enzyme wie z.B. Katalase und Superoxid-Dismutase (Wang et al., 1999) beobachtet werden konnte.

Über die **Salicylsäure** (o-Hydroxybenzoesäure) ist in Bezug auf Stress durch Dehydration oder Trockenheit kaum etwas bekannt. Die Bildung von Salicylsäure wird hauptsächlich eher mit der Pathogenabwehr in Verbindung gebracht (Durner et al., 1997). Hinweise auf eine mögliche Involvierung in der Bewältigung von osmotischem Stress liefern aber z.B. Borsani et al. (2001). Sie diskutieren in ihren Untersuchungen die Verstärkung des Stresses durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in *Arabidopsis thaliana* Keimlingen. Die Behandlung mit 100 mM NaCl führte dazu, dass die Keimblätter von Wildtyppflanzen nekrotisch wurden und sich nicht weiter entwickelten, während die transgenen Pflanzen, die nicht in der Lage waren Salicylsäure zu bilden, nicht nur Keimblätter, sondern auch „richtige“ Blätter ausbildeten. Eine genau-

ere Betrachtung zeigte zudem, dass das photosynthetisch aktive Gewebe vom osmotischen Stress besonders betroffen war.

Ebenfalls wenige Aussagen können zu Vertretern der **Auxine**, **Cytokinine** oder der **Giberelline** getroffen werden. Zu den Auxinen gehören unter anderem Verbindungen wie die Indol-3-essigsäure (IAA) oder die Indol-3-buttersäure (IBA). Allgemein fördern diese Substanzen die Wurzelbildung, die Apikaldominanz, die Zellteilung oder die Abszission. Ludwig-Müller et al. (2007) konnten jedoch in einer Studie mit *Arabidopsis* Mutanten auch beweisen, dass ein für die Synthese benötigtes Enzym, die IBA-Synthetase, durch Trockenstress induziert werden kann.

Bei den **Giberellinen** handelt es sich wiederum um sogenannte Diterpene, welche aus vier Isopreneinheiten, die zu einem Viererringsystem zusammengesetzt sind, bestehen. Bis zum heutigen Zeitpunkt hat man bereits über 120 Verbindungen identifiziert von denen aber nur wenige biologisch aktiv sind. Anfängliche Untersuchungen zeigten, dass unter dem Einfluss von Trockenstress der Gehalt an Giberellinen in der Pflanze eher gering bis überhaupt nicht verändert wird (Hubick et al., 1986) oder er in bestimmten Entwicklungsstadien wie der Kornfüllung (Yang et al., 2001), in Abhängigkeit von Stress, schwanken kann. Eine der aktuellsten Studien stellt jedoch eine Verbindung zwischen dem Anstieg der Synthese von Salicylsäure und der Gabe von Gibberellinsäure (GA₃) her (Ramírez et al., 2009). In Samen, welche mit GA₃ behandelt wurden, stieg die Expressionsrate zweier Gene, die in die Synthese und den Wirkungsmechanismus von Salicylsäure involviert sind (Isochorismat-Synthase 1 und *Nonexpressor of PR1*) deutlich an. Zudem zeigte die Isochorismat-Synthase 1 Mutante, die empfindlicher gegenüber Salzstress war, unter diesen Bedingungen eine verbesserte Keimfähigkeit nach Applikation von GA₃. Die Überexpression eines Gens aus *Fagus sylvatica* (*FsGASA4*) in *Arabidopsis* führte darüber hinaus nicht nur zu einem Anstieg des Salicylsäuregehalts, sondern damit verbunden auch zu einer erhöhten Toleranz gegenüber Salz-, Oxidativem- und Hitzestress. Auch Ko et al. (2007) konnten nach Überexpression von *GASA4* die Resistenz gegenüber Hitzestress bestätigen.

Cytokinine umfassen eine Reihe von Adeninderivaten, bei denen das Stickstoffatom des Adenins (N^6) mit einer isoprenoiden C_5 -Seitenkette verbunden ist. Die häufigsten Substanzen, die zu dieser Gruppe zählen, sind (*cis*-)*trans*- Zeatin, Zeatinribosid, Dihydrozeatin oder Isopentenyladenin. Cytokinine spielen eine Rolle bei der Keimung, der Wurzel- und Sprossentwicklung, der Akkumulation von Chlorophyll oder der Verzögerung der Seneszenz. Unter Trockenstress wird die Synthese von Cytokininen reduziert und der Transport von der Wurzel in den Spross ist deutlich eingeschränkt (Shashidhar et al., 1996). In *Vitis vinifera* (cv. Sultana bzw. cv. Cabernet Sauvignon) führt die partielle Austrocknung der Wurzel, einer neuen Bewässerungstechnik, ebenfalls zu einer Verminderung des Cytokininegehalts (Stoll et al., 2000). Die Applikation von Cytokininen führte hingegen in Tabak zur Bildung von Prolin, einer Aminosäure die wie bereits erwähnt zu den kompatiblen Substanzen zählt (Thomas et al., 1992; 1995).

Eine andere Gruppe von Phytohormonen, die **Brassinosteroide**, sind hinsichtlich ihrer Rolle unter Trockenstressbedingungen ebenfalls noch weitestgehend unerforscht. Bis heute sind etwa 70 Verbindungen bekannt, die in diese Gruppe eingeordnet werden. Man weiß jedoch, dass sie eine Rolle bei der Zellteilung und der Vergrößerung der Zellen, der Seneszenz, der Differenzierung des Gefäßsystems, der Keimung, der Genregulation oder der Signaltransduktion spielen (Clouse and Sasse, 1998). Ein Mitwirken bei der Stressantwort gegenüber abiotischem Stress (z.B. durch Trockenheit) konnte jedoch durch Untersuchungen z.B. an der Erbse (*Pisum sativum* L.) nicht eindeutig nachgewiesen werden (Jager et al., 2008). Die Behandlung von unterschiedlichen Weizensorten, mit einer Homobrassinolidlösung, führte allerdings zu einer Erhöhung der Trockenstresstoleranz (Sairam, 1994). Und auch Dhaubhadel et al. (1999; 2002) konnten an Keimlingen der Tomate (*Lycopersicum*) und des Raps (*Brassica napus*) eine Erhöhung der Thermotoleranz, nach Behandlung mit dem 24-epi-Brassinolid, feststellen. Die genauere Analyse ergab zudem, dass die Menge an gebildeten Hitzeschockproteinen in behandelten Keimlingen deutlich höher war als in unbehandelten und dass die Behandlung möglicherweise auch einen Einfluss auf die Translation ausübte. Die Forschergruppe um Kagale et al. (2007) beobachtete nach Gabe des 24-epi-Brassinolids eine Erhöhung der Expressionsrate Trockenstress indu-

zierbarer Gene. Sowohl in *Arabidopsis thaliana* (RD22, RD29A und ERD10) als auch in *Brassica napus* (BNPIP1 und *BnD22*) war die Transkriptmenge der untersuchten Markergene deutlich erhöht.

Das wichtigste Phytohormon scheint aber die **Abcisinsäure** (ABA) zu sein. Sie spielt nicht nur eine bedeutende Rolle in Entwicklungsprozessen der Pflanze (Zellteilung, Samenruhe, Keimung etc.), sondern auch bei der Reaktion auf verschiedenste abiotische Stressbedingungen (Trockenheit, Hitze, Kälte, Salz, UV-Strahlung, Pathogene) (Leung and Giraudat, 1998; Rock, 2000; Finkelstein et al., 2002).

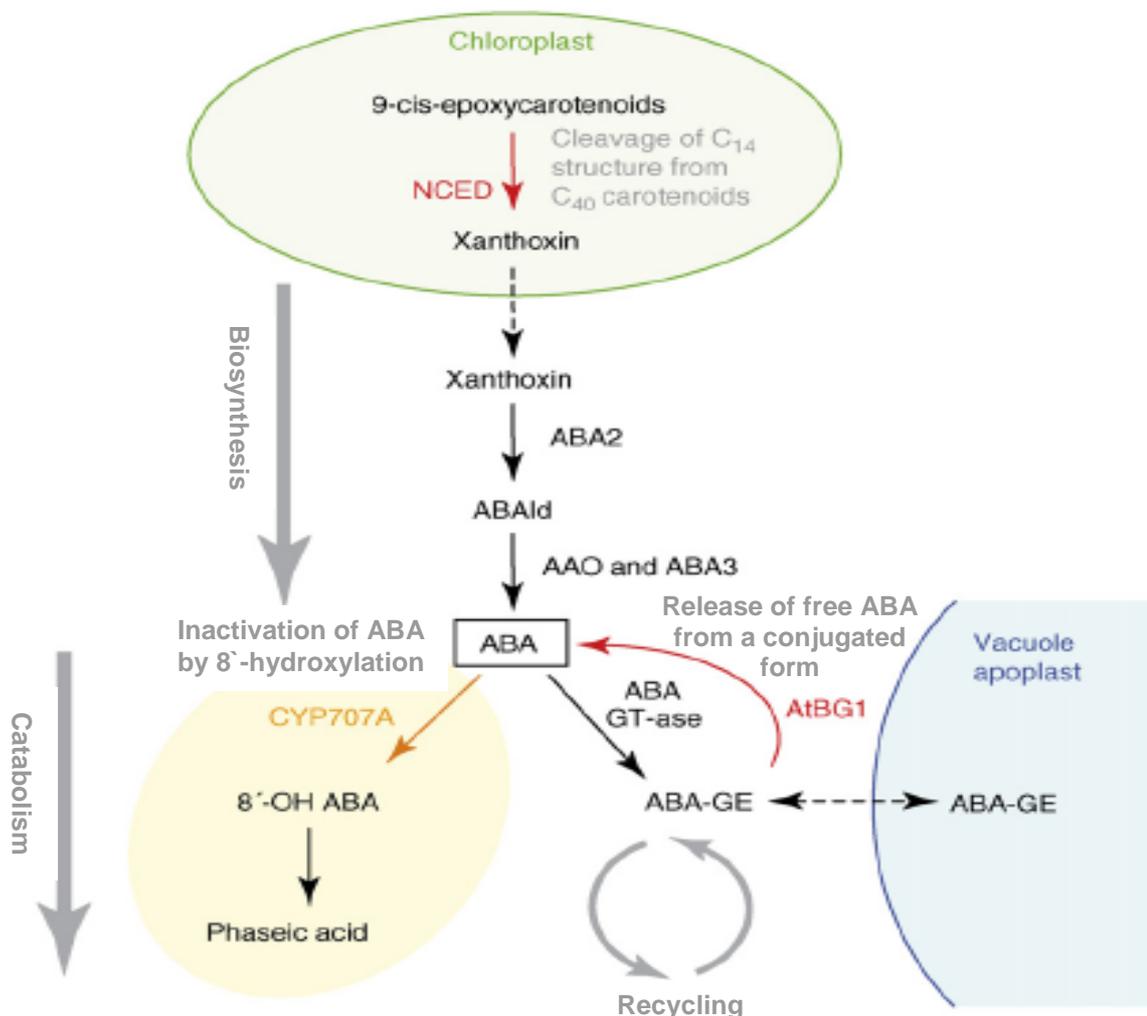


Abbildung 1: Biosynthese- und Abbauwege der Abscisinsäure (ABA) in Pflanzen.

9-cis-Epoxy-carotenoid-Dioxygenase (NCED), (*short-chain*) Dehydrogenase/Reduktase (ABA2), Molybdän-Cofaktor-Sulfurase (ABA3), ABA-Aldehyd Oxidase (AAO), ABA Glucosyltransferase (ABA-GTase), ABA-Glucoseester (ABA-GE), *Arabidopsis thaliana* β -Glucosidase (*AtBG1*), Cytochrom P450 Monooxygenase (8'-Hydroxylase, CYP707A) (Abbildung entnommen aus Seki et al., Current Opinion in Plant Biology 10: 296-302, 2007)

Abcisinsäure wird unter Trockenstress durch oxidative Spaltung aus den β -Carotenoiden 9'-cis-Neoxanthin und 9'-cis-Violaxanthin über mehrere Zwischenstufen gebildet (Abbildung 1). Durch die Analyse von ABA-Mangel Mutanten in *Arabidopsis* konnten die an der Umwandlung beteiligten Enzyme eindeutig identifiziert werden (Schwartz et al., 2003). Der erste und gleichzeitig entscheidende Schritt in der Synthese ist die Bildung von Xanthoxin. Das dafür notwendige Enzym, die 9-cis-Epoxycarotenoid-Dioxygenase (NCED), kann unter Stress induziert werden, wie Untersuchungen in der Tomate (Thompson et al., 2000) und in *Arabidopsis* (Iuchi et al., 2001) zeigten. Des Weiteren führte die Überexpression dieses Gens in *Arabidopsis* zu einer Erhöhung der ABA Menge in transgenen Pflanzen und als Folge zu einer Reduktion der Transpirationsrate und Erhöhung der Toleranz gegenüber Stress. Die Verringerung des Wasserverlusts durch Transpiration wird hierbei natürlich durch das Schließen der Spaltöffnungen erreicht (Cornic und Massacci, 1997). Dafür wird der Turgordruck in den Schließzellen gesenkt, indem K^+ , Cl^- und $Malat^{2-}$ Ionen aus den Zellen transportiert werden und parallel dazu die Ca^{2+} Konzentration im Cytoplasma steigt (Luan S, 2002; Tanaka et al., 2006; Acharya und Assmann, 2009). Gegenspieler der ABA-induzierten Schließung der Stomata sind Cytokinine und Auxine. Es wird diskutiert, dass sie durch die Beschleunigung und Beeinflussung der Ethylensynthese die Wirkung der Abscisinsäure hemmen und so ein Schließen der Spaltöffnungen verhindern (Tanaka et al., 2006). Ist die Stressphase überstanden und die Rehydrierung eingeleitet, muss der Level an gebildeter Abscisinsäure wieder gesenkt werden. Hierfür wurden bisher zwei Wege identifiziert. Zum einen ist es möglich ABA durch Übertragung eines Moleküls Glucose zu inaktivieren und für eine spätere Reaktivierung in der Vakuole zu lagern und zum anderen kann ABA durch Hydroxylierung in Phaseinsäure (PA) umgewandelt werden (Christmann et al., 2006; Seki et al., 2007). Dieser Oxidationsschritt wird durch die 8'-Hydroxylase CYP707A, eine Cytochrom P450 Monooxygenase, katalysiert. In *Arabidopsis* sind bisher vier Mitglieder der CYP707A Familie bekannt (Saito et al., 2004). Erste Studien bewiesen, dass deren Gene sowohl während der Dehydration, als auch der Rehydration exprimiert werden (Umezawa et al., 2006) und das CYP707A3 von besonderer Bedeutung in vegetativen Geweben zu sein scheint, welche dem Stress ausgesetzt sind. Mutanten in denen diese Gene

ausgeschaltet wurden hatten einen deutlich höheren ABA Gehalt und waren toleranter gegenüber Austrocknung. Die Überexpression von CYP707A3 führte zu einem eingeschränkten Wachstum, höherer Transpirationsrate und verstärkter Welke. Außerdem konnte nach Applikation von Trockenstress ein rapider Anstieg der ABA- Katabolite Phaseinsäure (PA) und Dihydrophaseinsäure (DPA) beobachtet werden.

1.1.2.3 Reaktive Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species*)

Als Begleiterscheinung von abiotischen Stressbedingungen kommt es zur vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und damit zusätzlich zum so genannten oxidativen Stress. Hierbei werden hauptsächlich in den Chloroplasten, den Mitochondrien, aber auch in den Peroxisomen, Singulett-Sauerstoffmoleküle ($^1\text{O}_2$), Superoxidanionenradikale ($^*\text{O}_2^-$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Hydroxylradikale (OH^\cdot) angereichert (Mittler, 2002; Apel und Hirt, 2004). Nach Beginn des Trockenstress werden, wie bereits im vorherigen Abschnitt (1.1.2.2.) erwähnt, durch ABA die Spaltöffnungen geschlossen um die Transpirationsrate zu senken. Dies hat zur Folge, dass jetzt weniger CO_2 aufgenommen und fixiert werden kann. Das Enzym Ribulose-1,5-bis-phosphat-Carboxylase (Rubisco), welches für die CO_2 Fixierung verantwortlich ist, ist aber auch in der Lage anstelle des Kohlenstoffdioxids Sauerstoff als Elektronenakzeptor zu verwenden. In einem Oxygenierungsschritt werden somit aus Ribulose-1,5-bis-phosphat jeweils ein Molekül Phosphoglykolat und ein Molekül 3-Phosphoglycerat generiert. Das Phosphoglykolat wird nach Abspaltung des Phosphats in die Peroxisomen transportiert und dort in Glyoxylat umgewandelt. Dabei entsteht durch die Glykolatoxidase H_2O_2 (Dat et al., 2000). Die Bildung von H_2O_2 durch den als Photorespiration bezeichneten Stoffwechselweg ist aber nicht die einzige Möglichkeit der Entstehung von ROS. In den Chloroplasten können durch die Übertragung von Elektronen auf Sauerstoff zudem zusätzlich Superoxidradikale ($^*\text{O}_2^-$) entstehen, die dann durch eine Cu/Zn-Superoxid-Dismutase (SOD) in H_2O_2 umgewandelt werden. In der als Mehler-Reaktion bezeichneten Reduktion von Sauerstoff wird dabei durch die Autoxidation des Ferredoxins im Photosystem I (PSI) ein Elektron übertragen, welches normalerweise der Reduktion von NADP^+ dient.

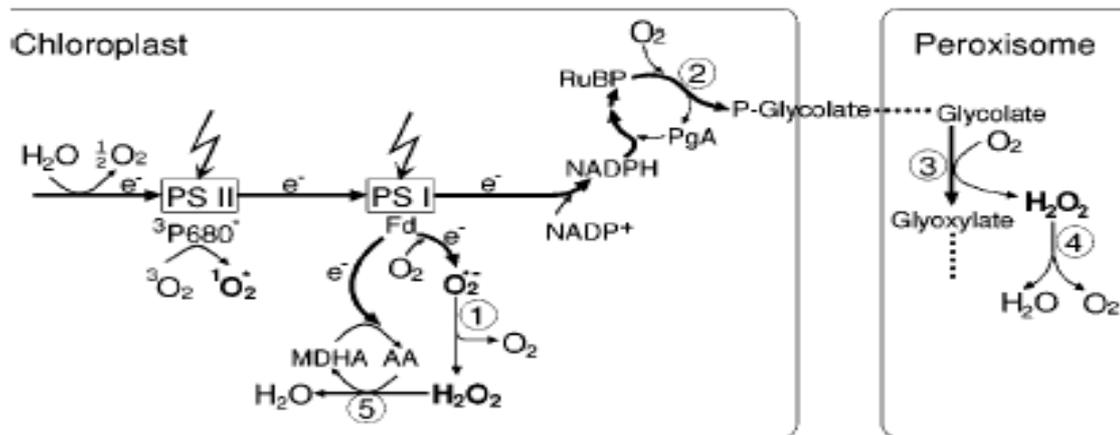


Abbildung 2: Entstehung von reaktiven Sauerstoff Spezies.

Die schematische Darstellung des Elektronentransportweges zeigt die Bildung von ROS im Chloroplasten und in den Peroxisomen, sowie die daran beteiligten Enzyme. (1) Superoxid-Dismutase (2) Rubisco (3) Glykolatoxidase (4) Katalase (5) Ascorbat-Peroxidase (Abbildung entnommen aus Apel und Hirt, Annual Review of Plant Biology 55: 373-399, 2004)

Neben der Bildung von Superoxidradikalen durch das PSI kommt es unter Stressbedingungen zusätzlich zu einer vermehrten Bildung von Singulett-Sauerstoff am Photosystem II (PSII) (Apel und Hirt, 2004)(siehe auch Abbildung 2). Die vierte reaktive Sauerstoffspezies die erwähnt werden soll sind die Hydroxylradikale. Diese sind extrem reaktionsfreudig und entstehen in der Haber-Weiss/Fenton-Reaktion. In der durch Metallionen, wie z.B. Eisen ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$), katalysierten Reaktion werden aus Wasserstoffperoxid Hydroxylradikale gebildet, deren Halbwertszeit unter $1\mu\text{s}$ liegt (Dat et al., 2000). ROS üben ihren schädigenden Einfluss auf eine Vielzahl von Zellbestandteilen aus. Superoxidradikale sind z.B. in der Lage Aminosäuren wie Histidin oder Methionin zu oxidieren und so die Proteinstruktur und Funktion zu beeinträchtigen. Sie führen auch zu einer Peroxidation von Lipiden, die Bestandteil von Zellmembranen sind und als Folge zu einer Destabilisierung. Die gesteigerte Akkumulation von H_2O_2 bzw. der aus der Haber-Weiss Reaktion hervorgehenden Hydroxylradikale kann bewirken, dass Enzyme durch Oxidation ihrer Thiolgruppen inaktiviert werden. ROS können aber auch eine positive Rolle in der Signaltransduktion übernehmen. Es wird z.B. diskutiert, dass die Bildung von H_2O_2 in direktem Zusammenhang mit der ABA induzierten Schließung der Spaltöffnungen unter Stress steht (Neill et al., 2002; Hung et al., 2005; Acharya und Assmann, 2009).

Für die Entgiftung und Beseitigung der reaktiven Sauerstoffspezies stehen den Pflanzen eine Reihe von Abwehrmechanismen zur Verfügung, welche man grob in enzymatische und nicht-enzymatische unterteilen kann. Zu den nicht-enzymatischen zählen unter anderem Vitamin C (Ascorbinsäure) und als dessen ionisierte Form das Ascorbat, Vitamin E (α -Tocopherol), Glutathion (ein Tripeptid bestehend aus γ -Glutamat, Cystein und Glycin ; mit einer freien Sulfhydrylgruppe), Alkaloide, Flavonoide und Carotenoide (Foyer et al., 1994; Apel und Hirt, 2004 ; Munné-Bosch, 2005). Ascorbat als eines der wichtigsten Agentien reagiert in einer Peroxidase (APX)- katalysierten Reaktion mit H_2O_2 zu Wasser und Monodehydroascorbat (Abbildung 2), welches einerseits durch eine Reduktase oder andererseits im Ascorbat-Glutathion-Zyklus anschließend wieder in Ascorbat umgesetzt wird. Glutathion, ebenfalls bedeutend in der Entgiftung, kann selbst auch direkt mit H_2O_2 reagieren. In dieser Reaktion entsteht dann durch Oxidation des Glutathions ebenfalls Wasser (Noctor und Foyer, 1998).

Die enzymatische Beseitigung von ROS wird z.B. von Superoxid-Dismutasen (SOD), Peroxidasen oder Katalasen (KAT) durchgeführt. Während SOD Superoxidanionenradikale ($*O_2^-$) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umwandeln, kann dieses wiederum durch KAT zu Sauerstoff und Wasser abgebaut werden (Noctor und Foyer, 1998; Apel und Hirt, 2004). Studien in Tabak zeigten, dass transgene Pflanzen die keine Katalase bilden konnten, unter Lichtstressbedingungen schnell nekrotisch wurden und außerdem nicht mehr in der Lage waren genügend Ascorbat und Glutathion zur Neutralisierung von H_2O_2 bereitzustellen. Trotzdem belegen die Ergebnisse auch, dass wichtige Enzyme wie Ascorbat-Peroxidase und Glutathion-Peroxidase induziert werden, um alternative Mechanismen zur H_2O_2 Eliminierung bereitzustellen (Willekens et al., 1997). Auch Rizhsky et al. (2002) haben Beweise dafür, dass transgene Pflanzen, welche *antisense*-RNA gegen APX und KAT exprimieren, die Induktion von Enzymen alternativer Neutralisierungswege zur Folge haben. Sie zeigen aber auch, dass das Ausschalten von mehreren Genen nicht zu einer noch höheren Anfälligkeit gegenüber Stress führt. Es wird daher vermutet, dass neben der Induzierung alternativer enzymatischer Mechanismen auch die Möglichkeit besteht die Photosyntheseaktivität zu reduzieren, womit weniger

ROS generiert werden. Ihre Daten lassen, im Hinblick auf frühere Publikationen, den Schluss zu, dass der Elektronenfluss zwischen dem PSI und PSII durch eine Oxidase zusätzlich unterbrochen werden kann. Bei diesem Schritt werden die Elektronen dann auf Sauerstoff als Akzeptor übertragen und wiederum Wasser gebildet. Das die Induktion von Enzymen sogar durch Pflanzenhormone beeinflusst werden kann verdeutlicht ein anderes Beispiel. In Gegenwart von Salicylsäure kommt es während der Keimung von *Arabidopsis* Samen zu einer verstärkten Akkumulation von Superoxid-Dismutasen (Rajjou, 2006). Dabei wird die Konzentration der Proteine im Vergleich zur Kontrolle zusätzlich gesteigert bzw. deren Abbau verhindert.

Am Schutz von wichtigen Strukturen wie den Photosystemen oder Membranen sind neben Enzymen und Antioxidantien (Vitamin C) aber auch Proteine wie z.B. CDSP32 (*chloroplastic drought-induced stress protein of 32 kD*) beteiligt. Bei diesem Protein handelt es sich um ein Thioredoxin, das durch oxidativen Stress induziert wird und in der Lage ist Disulfidbrücken an Proteinen zu reduzieren (Broin et al., 2002). Aktuelle Funktionsstudien offenbarten einige Interaktionspartner die Aufgaben in Photosyntheseprozessen wahrnehmen (z.B. die γ -Untereinheit der ATPase) oder ebenfalls zum Schutz gegen oxidativen Stress (PrxQ und Bas1) beitragen (Rey et al., 2005). PrxQ und Bas1 gehören zu den Peroxiredoxinen von denen in Pflanzen insgesamt vier Familien bekannt sind (Dietz, 2003). Es wird vermutet, dass CDSP32 als Elektronendonator für beide Peroxiredoxine dient und so zur Detoxifizierung von Alkyl-Hydroperoxiden, Phospholipid-Peroxiden oder Cholesterol-Peroxiden beiträgt. Bas1 ein Mitglied der 2-Cys Familie liegt als Homodimer vor und schützt in Verbindung mit CDSP32 wahrscheinlich direkt den Photosyntheseapparat (Broin et al., 2002; Broin und Rey, 2003; Rey et al., 2005). Pflanzen die kein CDSP32 bilden konnten waren deutlich anfälliger gegenüber oxidativen Stress durch Methylviologen. Überraschender Weise konnte die Überexpression des Gens jedoch nicht den gegenteiligen Effekt erzielen, sondern hatte ähnliche Auswirkungen wie CDSP32 negative Pflanzen, allerdings in abgeschwächter Form. Die Autoren vermuten deshalb, dass die vermehrte Bildung von CDSP32 die Zerstörung des Redoxstatus zur Folge hatte.

1.1.3 Gene und Proteine (Molekulare Mechanismen)

Pflanzen reagieren auf abiotischen Stress, wie Trockenheit, hohe oder niedrige Temperaturen, Frost, Schwermetalle oder extreme Salzkonzentrationen, mit der Induktion einer Vielzahl von Proteinen, die es ihnen ermöglichen diese Bedingungen zu tolerieren oder deren Auswirkungen zu mildern bzw. zu neutralisieren. Die Analyse des Transkriptom in zahlreichen *Microarray* Experimenten (Seki et al., 2001; Seki et al., 2002; Oono et al., 2003; Rabbani et al., 2003; Talamé et al., 2007) förderte eine Vielzahl von Genen zu Tage, deren Produkte grob in zwei Gruppen eingeteilt werden können (Nakashima und Yamaguchi-Shinozaki, 2005; Shinozaki und Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Die erste Gruppe beinhaltet regulatorische Proteine zu denen Transkriptionsfaktoren (bZIP, DREB, MYC usw.), Proteinkinasen (z.B. MAPK), Enzyme für die Synthese von ABA, Enzyme des Phospholipidmetabolismus oder andere Signalmoleküle (z.B. *calmodulin-binding-protein*) zählen. Die zweite Gruppe umfasst funktionelle Proteine, von denen die Enzyme zur Detoxifikation und einige Schlüsselenzyme der Biosynthese von Osmolyten (siehe 1.1.2.1; *compatible solutes*) bereits besprochen wurden. In diese Gruppe gehören jedoch außerdem Proteine die für den Wassertransport durch Membranen verantwortlich sind, Proteine zum Schutz von Makromolekülen (Chaperone, LEA Proteine, mRNA Bindeproteine usw.) sowie verschiedene Proteasen.

1.1.3.1 Transkriptionsfaktoren und Regulons

Die Kontrolle der Expression von Genen durch einen Transkriptionsfaktor erfolgt durch die Bindung an konservierte *cis*-aktive Elemente innerhalb deren Promotorregionen. Kontrolliert ein Transkriptionsfaktor (TF) dabei mehr als ein Gen spricht man allgemein von einem Regulon (Nakashima und Yamaguchi-Shinozaki, 2005). Bisher wurden vier verschiedene Regulons identifiziert die unter abiotischen Stressbedingungen aktiviert werden. Die Aktivierung erfolgt bei zwei der vier Regulons in Abhängigkeit von ABA (AREB/ABF und MYC/MYB) während die anderen zwei unabhängig davon induziert werden (DREB1/CBF, DREB2 und NAC/ZF-HD) (siehe Abbildung 3).

Die Existenz des **DREB1/CBF und DREB2 Regulons** wurde erstmals während Untersuchungen des Promotors eines durch Trockenheit, Kälte und hohen Salzkonzentrationen induzierten Gens erwähnt. Die Analyse ergab, dass der Promotor des Gens RD29A (*responsive to dehydration 29A*) zwei *cis*-aktive Sequenzen enthält, das *ABA-responsive element* (ABRE) und das *dehydration-responsive element* (DRE) (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki, 1994), welche für eine schnelle Antwort bzw. im Falle von ABRE für die „langsamere“ ABA vermittelte Reaktion auf Stress, benötigt werden.

Das *dehydration-responsive element* (DRE) in diesem Promotor umfasst eine 9 bp lange konservierte Sequenz TACCGACAT, welche in ähnlicher Form auch in

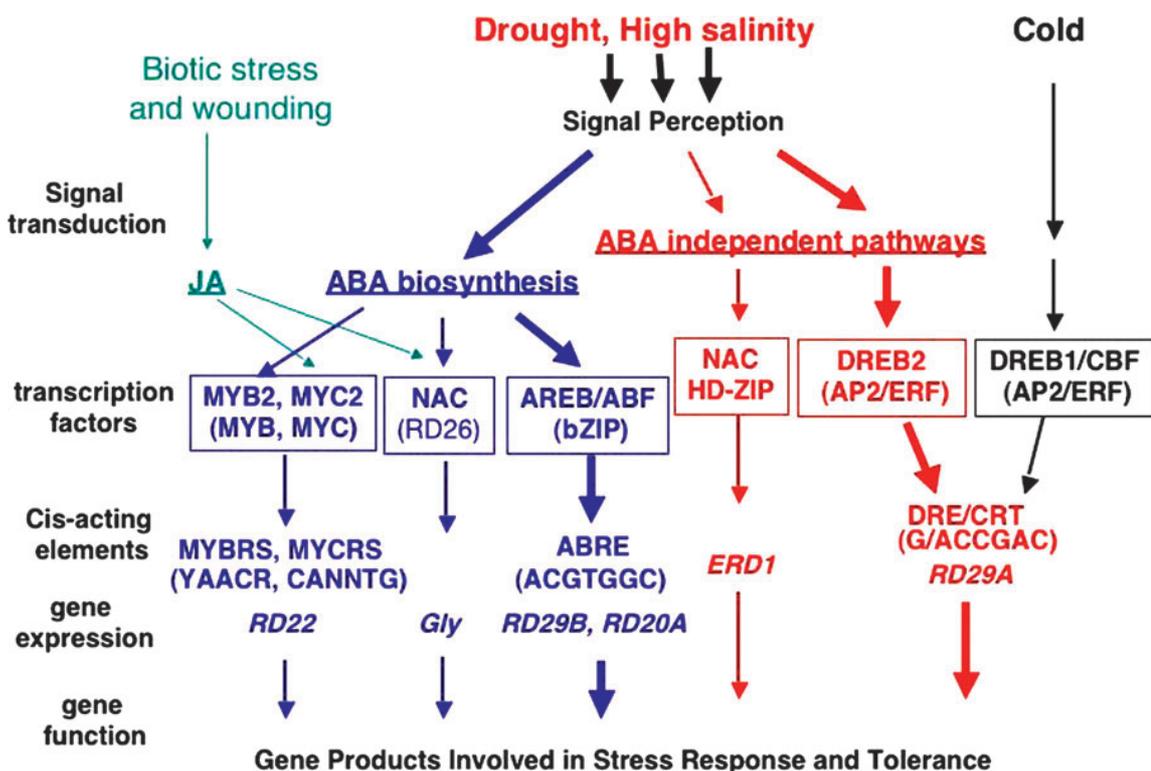


Abbildung 3: Transkriptionelle Kontrolle der Genexpression unter abiotischen und biotischen Stressbedingungen. (Entnommen aus Shinozaki und Yamaguchi-Shinozaki, *Journal of Experimental Botany* Vol. 58(2):221–227, 2007).

anderen Promotoren von Kälte- und Trockenstress-induzierten Genen vorhanden ist [C-repeat (CRT), TGGCCGAC; *low-temperature-responsive element* (LTRE), CCGAC](Liu et al., 1998). Unter Verwendung der *yeast-one-hybrid* Technologie konnten einige *trans*-aktive Elemente (Transkriptionsfakto-

ren, TF) identifiziert werden, die mit dem Kernmotiv der DRE/CRT Sequenz (CCGAC) direkt interagieren. Diese TF werden daher als *CRT-binding factor* (CBF) bzw. *DRE-binding protein* (DREB) bezeichnet (Stockinger et al., 1997; Liu et al., 1998). Sie gehören zur APETALA2 (AP2)/*ethylene-responsive element binding factor* (ERF) Familie von denen in *Arabidopsis* bisher etwa 145 Mitglieder bekannt sind. Insgesamt wurden in *Arabidopsis* bisher sechs DREB1/CBF Gene und acht DREB2 Gene entdeckt (Sakuma et al., 2002). DREB1A/CBF3, DREB1B/CBF1 und DREB1C/CBF2 werden dabei ausschließlich unter Kältestress aktiviert, während DREB2A und DREB2B durch hohe Salzkonzentrationen und Dehydration induziert werden, nicht aber durch Kälte (Liu et al., 1998; Nakashima et al., 2000). Eine Ausnahme bildet zudem DREB1D/CBF4, das als einziges Gen in Abhängigkeit von ABA unter Trockenstress exprimiert wird. Eine Überexpression dieses Faktors in *Arabidopsis* hatte nicht nur die Expression Trockenstress-regulierter Gene zur Folge, sondern ebenfalls die Aktivierung von Genen die der Anpassung an Kälte dienen (Haake et al., 2002). Auch die Überexpression anderer DREB1/CBF Gene resultierte in einer erhöhten Anpassungsfähigkeit an Kälte, hatte aber in allen Fällen den großen Nachteil, dass die transgenen Pflanzen einen stark ausgeprägten Zwergwuchs als Phänotyp aufwiesen (Nakashima und Yamaguchi-Shinozaki, 2005). Im Gegensatz dazu konnten keine Veränderungen am Phänotyp von Pflanzen beobachtet werden, die DREB2A überexprimierten. Diese zeigten jedoch auch keine Erhöhung der Toleranz obwohl geringe Mengen der mRNA gebildet wurden. Dies lässt die Vermutung zu, dass wahrscheinlich zuerst eine post-transkriptionelle Aktivierung des Proteins erfolgen muss (Liu et al., 1998). Die Theorie kann durch neuere Ergebnisse von Sakuma et al. (2006) auch in der Tat bestätigt werden. Die Überexpression einer konstitutiv aktiven Form DREB2A-CA, bei der die Aminosäuren 136-165 entfernt wurden, erhöhte dessen Aktivität um etwa das 30fache und führte zu einer deutlich gesteigerten Toleranz gegenüber Trockenstress. Außerdem konnten hierbei 14 weitere Gene identifiziert werden, die direkte Zielgene von DREB2A darstellen. Aktuellste Studien haben ebenfalls Proteine entdeckt, die für den Abbau von DREB2A von entscheidender Wichtigkeit sind. Bei den sogenannten DRIPs (DREB2A-interacting proteins) handelt es sich um Ring E3 Ligasen, die durch Ubiquitinierung den Abbau von

DREB2A durch das 26S Proteasom fördern. Es wird diskutiert, dass dies ein wichtiger Regulationsmechanismus unter Nicht-Stressbedingungen ist (Qin et al., 2008).

Dass noch ein weiterer Weg zur ABA-unabhängigen Aktivierung von Genen existiert wurde mit der Entdeckung des **NAC und ZF-HD Regulons** bekannt. Die Akkumulation der mRNA von ERD1 (*early-responsive to dehydration 1*), einem Protein das Ähnlichkeiten zur Regulatorischen ATPase Untereinheit (ClpA) der Caseinolytischen Protease (Clp) aus *E.coli* aufweist (Kiyosue et al., 1993), spielte dabei eine große Rolle. Unter Stressbedingungen durch Dehydrierung, kommt es nämlich noch bevor messbare Mengen an ABA in den gestressten Pflanzen vorhanden sind, zu einer gesteigerten Bildung der ERD1 mRNA. Die Untersuchungen der Promotorstruktur offenbarten zwei neue *cis*-aktive Sequenzen, die von unterschiedlichen TF erkannt werden. *Yeast-one-hybrid* Experimente führten als erstes zur Entdeckung von drei NAC (NAM, ATAF1, 2, CUC2) Transkriptionsfaktoren, die spezifisch an eine der *cis*-Sequenzen, das CATGTG Motiv, binden. Eine Überexpression dieser TF zeigte zwar, dass viele Stress-induzierbare Gene hochreguliert wurden und dass diese transgenen Linien toleranter gegenüber Trockenstress waren, sie zeigten jedoch auch, dass ERD1 nicht zu den exprimierten Genen gehörte (Tran et al., 2004). Dies führte zu der Annahme, dass die zweite *cis*-Sequenz ebenfalls von Bedeutung sein muss. Erneute *yeast-one-hybrid* Versuche führten auch hier wiederum zum Erfolg und ergaben eine neue Klasse von Zinkfinger-Homöodomänen-TF (ZFHD). Einer der Kandidaten ZFHD1 bindet an die 14 bp lange RPS1 *site-1 like* Sequenz (CACTAAATTGTCAC) und aktiviert in Kooperation mit NAC TF die Expression von ERD1 (Tran et al., 2006). Die Menge an gebildeten ERD Protein war allerdings nicht so hoch wie in Pflanzen die gestresst wurden. Die Autoren vermuten daher, dass noch andere Faktoren an der Expressionsregulation beteiligt sein könnten oder es einer post-transkriptionellen Regulation bedarf. Einer der im Zusammenhang mit der Aktivierung von ERD1 getesteten NAC Transkriptionsfaktoren RD26 (ANAC072) ist nicht nur durch Trockenheit, sondern auch durch ABA, Methyl-Jasmonat und H₂O₂ induzierbar (Fujita et al., 2004; Tran et al., 2004). Daher nimmt man an, dass er eine Schlüsselstellung innerhalb der Stressantwort

einnehmen könnte, was die Überexpression von RD26 durch Induzierung einer Reihe von Stress-regulierten Genen, die z.B. in der Abwehr von ROS eine Rolle spielen (Fujita et al., 2004), untermauert.

NAC Transkriptionsfaktoren sind jedoch nicht nur auf Vertreter von Dikotylen (wie *Arabidopsis thaliana*) beschränkt, sondern kommen auch in Monokotylen vor. In Reis fand man kürzlich SNAC1 (*stress-responsive NAC 1*) das hauptsächlich in den Schließzellen der Spaltöffnungen durch Trocken- und Salzstress induziert wird (Hu et al., 2006). Nach Überexpression von SNAC1 stellte man eine deutlich erhöhte Widerstandsfähigkeit der Pflanzen gegenüber Stress fest, ohne dass dabei Einbußen im Ertrag oder Auswirkungen auf den Phänotyp zu beobachten waren. Im Gegensatz dazu hatte die Überexpression von OsNAC6, einem weiteren Vertreter der NAC TF in Reis, durchaus negative Auswirkungen auf diese beiden Parameter (Nakashima et al., 2007).

Neben den ABA-unabhängigen Wegen der Genaktivierung sind noch zwei weitere Möglichkeiten bekannt, die allerdings die Synthese von ABA voraussetzen. Hierzu gehört unter anderem der Weg, der zur Expression des RD22 Gens führt und ein Beispiel für das **MYC/MYB Regulon** in Pflanzen ist. In der Promotorregion des Gens befinden sich *cis*-aktive Sequenzen die durch unterschiedliche Transkriptionsfaktoren erkannt werden. AtMYC2 (rd22BP), ein *basic helix-loop-helix*-ZIP (bHLH-ZIP) Transkriptionsfaktor (TF), erkennt die Sequenz CANNTG, genauer gesagt CACATG und AtMYB (AtMYB2) erkennt C/TAACNA/G. Experimente mit Reporter Plasmiden, die das Gen für die β -Glucuronidase (GUS) tragen zeigten zwar, dass die Bindung eines der Transkriptionsfaktoren genügt um die Expression von RD22 zu initiieren, jedoch durch Kooperation mit dem zweiten TF die Expressionsrate bis zu dreimal höher war (Abe et al., 1997). Die Überexpression beider TF führte dazu, dass die transgenen Pflanzen sensitiver gegenüber ABA, zwergwüchsig, aber resistenter gegen osmotischen Stress waren. Zusätzliche *Microarray* Studien identifizierten außerdem eine Reihe von ABA induzierbaren Genen z.B. AtADH1 (Alkoholdehydrogenase), KIN2 (*cold-regulated protein* COR6.6), Chlorophyll a/b *binding protein* oder das Gen für die Saccharose Synthase 1, die durch die Überexpression hochreguliert wurden (Abe et al., 2003).

Ein anderes Beispiel für diese Art der Regulation von Genen unter Stress sind die MYB Transkriptionsfaktoren *HvMYB1* und *HvMYB2* die notwendig sind, um die volle Expression von CAB (*chlorophyll a/b binding protein*) Proteinen des PSII zu erhalten (Churin et al., 2003). Wird abiotischer Stress (in Form von osmotischem oder oxidativem Stress) appliziert, kommt es zu einer Verringerung der Expressionrate dieser beiden Gene, die damit nicht mehr in ausreichender Menge zur Verfügung stehen. Daraus resultiert dann eine verringerte Bildung der CAB Proteine.

Eines der bedeutensten *cis*-aktiven Elemente in der ABA-abhängigen Aktivierung von Genen ist das sogenannte *ABA-responsive element* (ABRE) des **AREB/ABF Regulons**. Dieses Element wird von *basic-leucin-zipper* (bZIP) Transkriptionsfaktoren, den *ABA-responsive element binding proteins* (AREB) oder auch *ABA-responsive element binding factors* (ABF), erkannt und umfasst die Konsensussequenz C/TACGTGGC. Die ABRE Sequenz wurde erstmals im Weizen Gen *Em* (*early-methionine-labeled protein*), als Em1a Element identifiziert. Das Kernelement dieser Sequenz ist ebenfalls in anderen *cis*-aktiven regulatorischen Promotorelementen zu finden, die als „G-Box“ bekannt sind und durch die Basenfolge CACGTG definiert werden (Menkens et al., 1995; Busk und Pages, 1998; Choi et al., 2000). Es existieren jedoch auch ABRE ähnliche Sequenzen die kein eindeutiges ACGT Motiv aufweisen. Ein Beispiel hierfür ist das „*coupling element 3*“ (CE3), ACGCGTGCCTC, des LEA Gens HVA1 aus Gerste (Choi et al., 2000). Dieses Element wurde durch Untersuchungen der Promotorstruktur von *HvHVA1* entdeckt und ist von fundamentaler Bedeutung für die maximale Expression, da die vorhandenen drei ABRE Sequenzen dafür nicht ausreichen. Mutationsanalysen bewiesen zudem, dass nur ABRE2 und ABRE3 wichtig für die Regulation sind (Straub et al., 1994). Der Promotor des Gens HVA22 enthält ebenfalls solch ein Element, dort bezeichnet als „*coupling element 1*“ (CE1). Die Kombination aus ABRE Sequenz und CE bildet eine Einheit, genannt ABRC (*abscisic acid response complex*). Die beiden *coupling* Elemente CE1 und CE3 sind mit leichten Einschränkungen sogar zwischen ABCR1 (HVA22) und ABCR3 (HVA1) austauschbar, was eine Änderung der Aktivität des Promotors zur Folge hat. Die Anwesenheit beider *coupling* Elemente in Verbindung mit der ABRE Se-

quenz scheint darüber hinaus einen synergistischen Effekt auf die absolute Expressionsrate, sowie die Induktion durch ABA zu haben (Shen et al., 1996). Dass für die ABA-vermittelte Expression eine ABRE Sequenz nicht ausreichend ist, wird auch am Beispiel von RD29A und RD29B deutlich. Der Promotor von RD29A enthält neben der ABRE Sequenz auch noch zwei DRE/CRT Sequenzen. Wie bereits besprochen wird RD29A durch Bindung von DREB1/CBF und DREB2 Transkriptionsfaktoren infolge von Trockenstress, Kälte oder hohen Salzkonzentrationen ohne die Beteiligung der ABRE Sequenz induziert und eine schnelle Antwort generiert (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki, 1994). Narusaka et al. (2003) haben jedoch in Transaktivierungsexperimenten auch beweisen können, dass die DRE/CRT Sequenzen als *coupling element* dienen können. Somit ist eine ABA-vermittelte Aktivierung von RD29A ebenfalls möglich. Der Promotor von RD29B enthält im Gegensatz zu RD29A neben einer MYB Erkennungssequenz zwei ABRE Elemente, aber keine DRE/CRT Sequenzen. Hier dient vermutlich eine der ABRE Sequenzen als *coupling element*.

Durch *yeast-one-hybrid* Experimente konnten einige Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die mit den ABRE Sequenzen des RD29B Promotors direkt interagieren (Uno et al., 2000; Choi et al., 2000). So z.B. AREB1/ABF2, AREB2/ABF4 und ABF3/DPBF5, die hauptsächlich in Folge von hohen Salzkonzentrationen und Stress durch Dehydration bzw. ABA-vermittelt in vegetativen Geweben gebildet werden (Fujita et al., 2005). Um die Expression von RD29B initiieren zu können, müssen AREB1 und AREB2 jedoch zuvor post-transkriptionell durch eine 42 kDa Proteinkinase aktiviert werden (Uno et al., 2000). Bei dieser Kinase handelt es sich um OST1/SRK2E, eine SNF1-related protein kinase (SnRK2), die nicht nur durch ABA, sondern auch durch Dehydrationsstress induziert wird (Yoshida et al., 2002; Furihata et al., 2006). OST1/SRK2E wird vor allem in den Schließzellen, aber auch in den Wurzeln und Samen gebildet und ist nachweislich an der ABA-regulierten Schließung der Stomata beteiligt (Mustilli et al., 2002). Furihata et al. bewiesen, dass ebenfalls andere Vertreter der SnRK2 Familie (SRK2C SRK2D SRK2E SRK2F und SRK2I) in der Lage sind AREB1 zu phosphorylieren. Transgene Pflanzen die eine konstitutiv aktive Form von AREB1 exprimierten reagierten toleranter auf Trockenstress und waren hypersensitiv gegenüber ABA (Fujita et al., 2005;

Furihata et al., 2006). Außerdem wurden Gene hochreguliert, die zur Gruppe der LEA Proteine (*late embryogenesis abundant*) gehören, darunter RD29B. Auch für die beiden Gersten Gene *HvHVA1* und *HvHVA22* wurden Transkriptionsfaktoren ermittelt, welche mit den ABRE Sequenzen interagieren. Die bZIP Transkriptionsfaktoren *HvABI5* und *HWP1* aktivieren kooperativ die Expression; wie jedoch dabei die Rolle von ABA aussieht kann nur vermutet werden (Casaretto und Ho, 2003). Die Autoren postulieren auch hier, dass *HvABI5* durch Phosphorylierung post-transkriptionell aktiviert wird und dies ein ABA-vermittelter Prozess ist.

1.1.3.2 Proteine mit Schutzwirkung

Die Expression von Genen unter Trockenstress hat die Bildung einer Reihe von Proteinen zur Folge, die aufgrund ihrer Funktion der Pflanze die Möglichkeit zur Toleranz und damit zum Überleben geben. Solche funktionellen Proteine sind unter anderem **Aquaporine**. Hierbei handelt es sich um integrale Membranproteine, die praktisch als Wasserkanäle fungieren und somit die Diffusion von Wasser durch die Membran ermöglichen. Für gewöhnlich liegen Aquaporine als Tetramer vor, von denen jedes Monomer unabhängig eine voll funktionstüchtige Pore bildet (Maurel, 1997). Aquaporine werden durch sechs Helix-Domänen charakterisiert, die die gesamte Membran durchspannen. Diese sind durch drei extra- und zwei intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden, und der N und C Terminus befindet sich im Cytosol. Außerdem enthalten Aquaporine zwei hochkonservierte Asn-Pro-Ala Boxen und einen konservierten Histidinrest in der D-Schleife, der zur Ermittlung des pH Wertes in der Zelle dient. Neben dem Transport von Wasser sind Aquaporine ebenfalls in der Lage kleinere Verbindungen wie Alkohole, kompatible Substanzen, H₂O₂ oder Gase z.B. CO₂ zu transportieren (Tyerman et al., 2002). In *Arabidopsis* sind bis heute etwa 35 Aquaporine bekannt, die in insgesamt vier Gruppen eingeteilt werden können. Man unterscheidet *tonoplast intrinsic proteins* (TIP), *plasma membrane intrinsic proteins* (PIP), *nodulin-26-like intrinsic proteins* (NIP) und *small basic intrinsic proteins* (SIP) (Johanson et al., 2001). Untersuchungen aller PIP's per *real-time* PCR zeigen in *Arabidopsis*, dass deren Expression von verschiedenen abiotischen Stressbedingungen, sowie durch das Phytohormon ABA beeinflusst werden kann (Jang et al., 2004).

Auch in *Nicotiana glauca* wird die MIP (*major intrinsic proteins*) Expression durch abiotischen Stress reguliert. Der mRNA Level der homologen TIP Gene *NgMIP2* und *NgMIP3*, sowie des homologen PIP Gens *NgMIP4* sinkt unter Trockenstressbedingungen dramatisch und kann teilweise nicht mehr detektiert werden (Smart et al., 2001). Lian et al. (2004) identifizierten in Reis ebenfalls ein PIP homologes Aquaporin, *RWC3*, dass unter Trockenstressbedingungen induziert wird. Dessen Überexpression führt in Stress-sensitiven Reissorten zu einer Erhöhung der Toleranz. Transgene Pflanzen zeigten eine Verbesserung des Wachstums und einen veränderten Wassergehalt in den Blättern aufgrund einer höheren Transpirationsrate.

Zellmembranen enthalten neben Aquaporinen aber auch noch andere Transportsysteme, um spezifische Moleküle oder Ionen aus den Zellen heraus bzw. in die Zellen hinein befördern zu können. Ein exzellentes Beispiel hierfür ist der **Na⁺/H⁺ Antiporter NHX1**, der sich im Tonoplasten befindet und für den Transport von Na⁺, im Austausch gegen H⁺, in die Vakuole verantwortlich ist. In *Arabidopsis* wurden bisher neben *AtNHX1* noch fünf andere homologe Gene entdeckt (Yokoi et al., 2002). Von den insgesamt sechs Genen sind *AtNHX1*, *AtNHX2* und *AtNHX5* nachweislich durch osmotischen bzw. Salz (NaCl) Stress induzierbar. Darüber hinaus scheint die Expression von *AtNHX1* und *AtNHX2* ABA-abhängig zu sein. Promotoranalysen lassen allerdings keine ABRE Sequenzen erkennen. Hingegen sind Konsensussequenzen für MYC/MYB Transkriptionsfaktoren vorhanden, was die Vermutung eines ABA-regulierten Aktivierungsweges nahe legt. Transgene Pflanzen, die *AtNHX1* überexprimieren sind widerstandsfähiger gegenüber osmotischem Stress und entwickeln sich normal im Gegensatz zu den Kontrollen (Apse et al., 1999). Auch transgene Weizenpflanzen waren toleranter gegenüber Salzstress. Sie bildeten im Gegensatz zu den Kontrollen größere Blätter aus und akkumulierten deutlich höhere Mengen an Na⁺ und K⁺. Der Wasserverlust wurde unter den gegebenen Stressbedingungen ebenfalls verringert (Brini et al., 2007). Ein homologes Gen zu *AtNHX1* wurde unter anderem auch in Reis gefunden. Der Transkriptlevel von *OsNHX1* stieg nach Behandlung mit NaCl und KCl stark an. Auch hier resultierte die Überexpression in einer erhöhten Toleranz gegenüber Salzstress (Fukuda et al., 2004).

Eine andere wichtige und umfangreiche Gruppe, die hier zum Abschluss erwähnt werden soll, sind die **LEA Proteine (*Late Embryogenesis Abundant Proteins*)**. Viele Mitglieder dieser Familie werden als Antwort auf abiotischen Stress induziert und unterstützen die Pflanze bei verschiedenen Schutzmechanismen. Obwohl ihre direkte Aufgabe noch weitestgehend unklar ist, kann man aufgrund ihrer strukturellen charakteristischen Eigenschaften, ihrer Induktion unter Stressbedingungen und ihrer Bildung während der späten Phase der Embryonalentwicklung einige Rückschlüsse ziehen. LEA Proteine können wahrscheinlich spezifische Zellstrukturen (wie z.B. Membranen) und Enzyme direkt schützen, da sie durch die Fähigkeit der zufälligen Knäuelbildung (*random coil structure*) sich den Zielstrukturen anpassen und so eine Schutzschicht (*cohesive layer*) aufbauen. Sie scheinen aber auch eine Rolle bei der Bindung von Wasser zu haben, da es sich um äußerst hydrophile Moleküle handelt, die zahlreiche geladene und ungeladene polare Aminosäuren enthalten. LEA Proteine können auch im Sinne von kompatiblen Substanzen funktionieren, ähnlich wie Zuckermoleküle, und z.B. die Aufrechterhaltung der Cytoplasmastruktur unter Stressbedingungen übernehmen. Es wird ebenfalls vermutet, dass sie in der Lage sind Ionen zu binden und auf diese Weise den schädigenden Effekt der steigenden Ionenstärke unter Trockenstress zu mindern oder vollständig zu neutralisieren (Ingram and Bartels, 1996; Shih et al., 2008).

Nach heutigem Stand der Forschung werden LEA Proteine allgemein in fünf Gruppen unterteilt (Dure III et al., 1989; Bray et al., 2000; Ramanjulu und Bartels, 2002; Shih et al., 2008). Die Mitglieder der ersten Gruppe, LEA I (LEA D19 Familie), enthalten alle ein charakteristisches konserviertes 20 Aminosäuren umfassendes Motiv am C-Terminus [(R/G)S(R/K)GGQTRKEQL GXEGTXEM]. Diese Gruppe beinhaltet unter anderem einen äußerst prominenten Vertreter, das Weizen *Em* Gen (*early methionine-labeled protein*). Die zweite Gruppe, LEA II (LEA D11 Familie), ebenfalls bekannt als Dehydrine, sind die wohl am besten untersuchte Gruppe der LEA Proteine. Sie werden durch mehrere konservierte Sequenzen charakterisiert. Zum einen besitzen alle Dehydrine ein sogenanntes K-Segment (15-mer; EKKGIMDKIKEKLP) in der Nähe des C-Terminus, das bis zu 11-mal innerhalb eines Polypeptids wiederholt werden kann. Ein weiteres Motiv, das Y-Segment (VTDEYGNP),

befindet sich am N-Terminus. Dieses Motiv kann in 1-3 Kopien auftreten, ist aber nicht bei jedem Dehydrin vorhanden. Das S-Segment ist ebenfalls nicht in jedem Dehydrin anwesend, wenn es jedoch vorkommt befindet es sich vor oder hinter K-Segmenten. Diese generellen Erkennungsmotive liegen alle innerhalb amorpher Wiederholungen von Glycin-reichen, im Falle von SK₃ Dehydrinen Alanin- oder Prolin-reichen, Sequenzen genannt Φ -Segmente. Basierend auf der Anwesenheit und Anzahl der Wiederholungen pro Motiv unterteilt man die Dehydrine in fünf Untergruppen: Y_nSK₂, K_n, K_nS, SK_n und Y_nK_n (Close, 1997; Allagulova et al., 2003). In Gerste wurden bisher insgesamt 13 Dehydrine identifiziert (Choi et al., 1999; Choi und Close, 2000; Rodríguez et al., 2005), die unter abiotischen Stressbedingungen unterschiedlich stark in verschiedenen Geweben induziert werden (Tommasini et al., 2008). Die Vertreter der nächsten Gruppe, LEA III (LEA D7/D29 Familie), besitzen eine Sequenz aus 11 Aminosäuren, die in einem Tandem angeordnet ist und zwischen 5 und 30-mal wiederholt werden kann. In diese Gruppe gehört unter anderem das Gersten Gen *HMVA1*. Transgene Reislinien, die *HMVA1* überexprimierten, hatten ein deutlich höheres Wasserpotential (RWC, *relative water content*) in den Blättern und zeigten zudem ein besseres Wachstum unter Trockenstressbedingungen. Die Autoren vermuten, dass HVA1 wahrscheinlich die Zellmembran schützt und somit die Pflanzen in der Lage sind den RWC zu halten (Babu et al., 2004). Auch in Weizen (Patnaik und Khurana, 2003), Hafer (Oraby et al., 2005) oder Keimlingen der Maulbeere (Lal et al., 2007) führte die Überexpression zu einer Erhöhung der Toleranz gegenüber Salz und Wasserstress. Lal et al. konnten außerdem eine erhöhte Zellmembranstabilität, eine gesteigerte Photosyntheseleistung und eine verbesserte WUE (*water use efficiency*) beobachten.

Die Mitglieder der vorletzten Gruppe, LEA IV (LEA D113 Familie), sind gekennzeichnet durch einen konservierten N-Terminus, der kleine geladene Aminosäuren enthält und einen C-Terminus, der viele nicht-polare Aminosäuren aufweist. Die fünfte und letzte Gruppe, LEA V (LEA D34/D73/D95), enthält Mitglieder, die sich vor allem durch einen hohen Grad an hydrophoben Aminosäuren auszeichnen.

Battaglia et al. (2008) beschränken sich jedoch nicht nur auf diese fünf Gruppen, sondern definieren darüber hinaus noch zwei weitere. Die LEA Gruppen LEA VI (PVLEA18), in die sie das namensgebende Protein aus der Bohne *Phaseolus vulgaris* (PvLEA18), zusammen mit weiteren 35 Mitgliedern gruppierten und LEA VII (ASR1), die kleine, hitzestabile Proteine umfasst. ASR Proteine, die in diese Gruppe gehören, wurden zwar in vielen Monokotylen und Dikotylen gefunden, allerdings sind bisher keine aus *Arabidopsis* bekannt. Die Überexpression des ASR1 Gens aus der Tomate in Tabak erzeugte nicht nur salztolerante Pflanzen sondern führte ebenfalls zur Induktion einer Reihe von Stress-regulierten Genen unter Nicht-Stress Bedingungen (Kalifa et al., 2004).

1.2 Ziele der Arbeit

Ziel der Dissertation war die Etablierung eines Testsystems basierend auf RNA Interferenz, zur Untersuchung der Trockenstressantwort der Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Mit Hilfe eines revers-genetischen Ansatzes sollten so zum einen bereits bekannte, für die Abwehr von Stress relevante, Gene getestet und zum anderen neue Kandidaten, deren Beteiligung an der Stressantwort noch nicht nachgewiesen wurde, funktionell charakterisiert werden. Die Analyse und Auswertung sollte dabei durch den Einsatz von zwei Fluoreszenzmarkern (GFP und DsRED) erfolgen.

Einige der für das *proof of concept* verwendeten Gene sollten als Ergänzung der RNAi Resultate ebenfalls mittels qRT-PCR untersucht werden. Außerdem sollte abschließend das Analyseverfahren so angepasst werden, dass ein Durchsatz von etwa 40-50 Genen pro Person und Monat möglich ist.

Während der Etablierung des *Screens* ergaben sich aufgrund des Experimentaufbaus und -ablaufs weitere Fragestellungen, die beantwortet werden sollten. Die mögliche Stummschaltung von Genen, die nicht als Ziel ausgewählt worden waren, sogenannte *off-targets*, sollte durch den Einsatz von GFP-Fusionskonstrukten mit entsprechender Zielsequenz tiefergehend analysiert werden. Die Frage, ob zielgerichtetes Stummschalten von Genen möglich ist ohne die Expression anderer zu beeinflussen, wurde dabei nicht nur auf experimentelle Art, sondern auch durch *in silico* Analysen mittels zweier Softwarelösungen (si-RNA *Scan*, si-Fi) untersucht. Des Weiteren ergaben sich Fragen, die die Stärke des im *Screen* verursachten Dehydrationsstresses betrafen. Für die nähere Charakterisierung der Stressintensität sollten daher weitere wichtige Parameter wie der relative Wassergehalt (RWC) und der Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) erfasst werden.

2. Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden ausschließlich mit drei verschiedenen Sorten der Sommergerste (*Hordeum vulgare* L. ssp. *vulgare*) durchgeführt. Dabei handelt es sich zum einen um die zweizeilige Gerstensorte ‚Golden Promise‘ [eine Mutante der Sorte Maythorpe (Forster et al., 1994)] und zum anderen um die Eltern einer Kartierungspopulation, die sechszeilige Braugerstensorte ‚Morex‘ und die sechszeilige Futtergerstensorte ‚Steptoe‘ (Kleinhofs et al., 1993).

2.2 Anzucht der Pflanzen

Die Gerstenpflanzen wurden in einem Phytoschrank der Firma Sanyo unter Langtagbedingungen (16h Tag/8h Nacht) bei 65% relativer Luftfeuchte und einer Temperatur von 20°C kultiviert. Für die Beleuchtung kamen Fluoreszenzlampen vom Typ Toshiba FL40SSW/37 zum Einsatz. Die Lichtstärke während der Aufzucht betrug ca. 8000 Lux [100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD (*Photosynthetic Photon Flux Density*)].

2.3 Bakterienstämme

Für die Klonierung der RNAi-Konstrukte, der GFP-Fusionskonstrukte sowie der Fragmentklonierung in den pCR[®]2.1-TOPO[®] Vektor (Invitrogen[™], Carlsbad, Kalifornien) wurden folgende Organismen verwendet:

Escherichia coli:

| | |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DH10B | F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 <i>ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG deoR</i> (Invitrogen) |
| DB3.1 | F ⁻ <i>gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20</i> (<i>rB-</i> , <i>mB-</i>) <i>supE44 ara14 galU galK2 lacY1 proA2</i> <i>rpsL20 (Str^R) xy5 Δleu mtl1</i> (Invitrogen) |
| Top10 | F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 <i>ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i> (Invitrogen) |

2.4 Vektoren

Die Entwicklung der Screeningmethode erforderte den Einsatz von zwei verschiedenen Fluoreszenzmarkern, dem grün fluoreszierenden Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*, sowie des rot fluoreszierenden Proteins aus Korallen der Gattung *Discosoma*. Des Weiteren kamen diverse RNAi-Konstrukte, welche unterschiedliche Gene der Gerste als Ziel (*target*) hatten zum Einsatz. Diese wurden über einen Zwischenvektor (pIPKTA38, *entry vector*) und der Rekombination in den finalen Vektor pIPKTA30 (*destination vector*) hergestellt (Douchkov et al., 2005). Für die Klonierung der GFP-Fusionskonstrukte wurden der TOPO[®] Vektor der Firma Invitrogen[™] (Carlsbad, Kalifornien) sowie der Vektor pIPKTA40 verwendet.

| | | |
|----------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|
| pUbi-DsRED-NOS | (Panstruga et al., 2003) | amp ^r |
| pGFP | (Schweizer et al., 1999) | amp ^r |
| pIPKTA30 | (Douchkov et al., 2005) | amp ^r |
| pIPKTA40 | (nicht publiziert) | amp ^r |
| pIPKTA38 | (Douchkov et al., 2005) | kan ^r |
| pCR [®] 2.1-TOPO [®] | (Invitrogen [™]) | amp ^r kan ^r |

2.5 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide, mit Ausnahme der Primer für die Sequenzierung, wurden von der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) bzw. der Firma Operon Biotechnologies (Köln, Deutschland) bezogen. Die Konzentration der in bidestilliertem Wasser gelösten Primer betrug jeweils 100 pmol μl^{-1} und die für die Amplifikation verwendete Arbeitskonzentration 1 pmol μl^{-1} .

2.5.1 Primer für die Sequenzierung

Tabelle 1: Synthetische Oligonukleotide bereitgestellt durch den Sequenzierservice (IPK-PGRC).

| Primer-bezeichnung | Sequenz 5' - 3' |
|--------------------|-------------------------------|
| T3 | AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG |
| T7 | GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C |
| M13-21uni | TGT AAA ACG ACG GCC AGT |
| M13-21rev | GGA AAC AGC TAT GAC CAT G |
| 35Sprom | CAC TGA CGT AAG GGA TGA CG |
| 35Sterm | CTG GGA ACT ACT CAC ACA |

2.5.2 Primer für RNAi Konstrukte

Tabelle 2: Synthetische Oligonukleotide für die Entwicklung und Etablierung der Screeningmethode.

| Klon-ID (CR-EST) | Sequenz Vorwärts-Primer 5' - 3' | Sequenz Rückwärts-Primer 5' - 3' |
|------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| HO01L05 | CTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAG | TGTCCATGATCTTGCCCAGT |
| HO33D09 | | TGACCTTGACGAACTCCTCG |
| HG01K10 | | GGTCGTAGATGCGGTGCTC |
| HO10E23 | | TGTGGCAGTCAGAGCCTTTC |
| HV09A17 | | GGACTCCTTGGTGTACTGCG |
| HR01K17 | | CCTCGAACTCGTTCATGCC |
| HO36E09 | | ACGGTGGGGTAGACCTTGAC |
| HZ41I22 | | ATCCCTGGCATGCAACATTT |
| HO16L13 | | GTCTCGAAAGGATATGCC |
| HU05J23 | | TTGAGCAGCAACTTCAGCAG |
| HS08A22 | | GCGCACTTTCTTCGTCCTTT |
| HO32M03 | | GCTTCTATGGGTTGGGTTG |
| HI09P16 | | AGGCTGCGGTACGAGGAG |
| HS03E24 | | CAAACCTTGATCACGGCAGGT |
| HV04I10 | | CCGGGAAGCTTCTCCTTGAT |
| HC02P10 | | CAGGAGGAAGAAAGGCATGAA |
| HQ01K06 | TGTTGGGATGGATGCACTGG | AGGCTGGAGGGCCTGACAAT |

Tabelle 3: Synthetische Oligonucleotide für die Untersuchung von Kandidatengen.

| Klon-ID (CR-EST) | Sequenz Vorwärts-Primer 5' - 3' | Sequenz Rückwärts-Primer 5' - 3' |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| HS05D05 | GGCACGAGGGTTCAACACTTACACAG | CGCCGGCGTGTGATGCTGC |
| HS06D03 | GGAACACACCACATTTCTGAGGC | GTGTCCGTGCTGCCCATAGG |
| HS01P15 | TCGACGAGTACGGCAACCCTGTG | GCGGTGCCATGTGCCCC |
| HV09N15 | GAAGCCATATTCAAGTCCACAAAACCG | CATGGGCGGGAGGAGGAAGAAG |
| HT13P04 | GGATCCAGCCGGCCAAAGAGG | GCCACACACCAACTCGAACTACCCC |
| HT08A04 | CGATCGCGGGCATCTTATTTATTCAGC | CGGCACGGAGGAGCGTAAAACC |
| HC03N09 | CGTCTACTATTTCGCCATTTTCCTCC | CGCAGCCCAGCCGGTTATTACATC |
| Cativelli 1 | Vertraulich, für weitere Informationen: schweiz@ipk-gatersleben.de | |
| Cativelli 2 | Vertraulich, für weitere Informationen: schweiz@ipk-gatersleben.de | |
| Cativelli 3 | Vertraulich, für weitere Informationen: schweiz@ipk-gatersleben.de | |
| Cativelli 4 | Vertraulich, für weitere Informationen: schweiz@ipk-gatersleben.de | |

Tabelle 3 : Fortsetzung von Seite 35

| Klon-ID (CR-EST) | Sequenz Vorwärts-Primer 5' - 3' | Sequenz Rückwärts-Primer 5' - 3' |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Cativelli 5 | Vertraulich, für weitere Informationen: schweiz@ipk-gatersleben.de | |
| Cativelli 6 | Vertraulich, für weitere Informationen: schweiz@ipk-gatersleben.de | |
| Cativelli 7 | Vertraulich, für weitere Informationen: schweiz@ipk-gatersleben.de | |
| Cativelli 8 | Vertraulich, für weitere Informationen: schweiz@ipk-gatersleben.de | |
| Cativelli 9 | Vertraulich, für weitere Informationen: schweiz@ipk-gatersleben.de | |
| Cativelli 10 | Vertraulich, für weitere Informationen: schweiz@ipk-gatersleben.de | |
| Cativelli 11 | Vertraulich, für weitere Informationen: schweiz@ipk-gatersleben.de | |
| Cativelli 12 | Vertraulich, für weitere Informationen: schweiz@ipk-gatersleben.de | |
| HP07N03 | GACGATAGAGGCGCTGGAGAAAATGG | CCGACGTCGGCGGTAAAGGTGT |
| HY01C17 | TCCAACCTCAACACGCTCAACGAC | TCCATCTTCTCCAGCGCCTCTATCG |
| HI04N04 | GCAAGAGCATCAACCCGACGAG | TTCTTGGCGTCCACCTTCTTCTTG |
| HX09N14 | TCCGGCTCCGAGACGACC | GCGTCCTCGGCTGTGTCC |
| HD14L03 | GGCCGACAAGCGAAGTGAGAGC | GAGAAAGAAACCACGGTGACAAAGACA |
| HM12I15 | TTACGCTCCTCCGCACCCGC | GCTCGGAGCACTCAGCTCATCTACAAG |
| HW01P08 | AGTCCGGTCTCTCTCCCCCTACA | CCGACGACTCCGAGGTGCTTCC |
| HP07O19 | TGCAGGGCAACGGGTACGAGAAC | CGGCCCTCCCACGAACACC |
| HC15K08 | CATCAGTAGCGATCGGGTGTITTTTGTG | AGCACAGACGCCGCGGAGATG |
| HF24J18 | CTGTCTGTCTATCCGAAGTCCAAAGC | GGCAGCTTCTCCTTGATCTTGTCCAT |
| HV04H17 | GTGATGACGGACCGGTACGATGAG | GACAACATCGCTACCAATACCACCG |
| HI13G08 | CAGCAGGGGAAGGGGAGACC | CCCGCGGGAAGAAGTCATC |
| HC11F15 | CAACAATACATAATCACACGGACATCCACTAC | CGTGAAGAAGACGTTGCGCTGCTA |
| HO18J04 | GGAAGGCACACGAGGACGGAAC | CGAGGGAGATGTCGTGCTGCG |
| HC08N16 | GGACGACGAAAATGGACAGAGGAAC | CCCACGCGTCCGCACCTCTA |
| HD13D11 | CCCAGCGGCACCATCTCTTTC | GCAGCGGCAAGGCGAGTG |
| HD03E20 | ACGAGGCTAGAAACGATCAAGTCACACG | CATTACATAACACATCCATACTCCCCGC |
| HV13L15 | CGGCACGAGGACAGCAAGAATC | GCGCGACGAGCATGTTGGAGT |
| HO07G09 | GCCGCGTCGAGCCAATCAG | GCGCCTCAAGCTCTGGGAAATCA |
| HC07O17 | TCAAGAAGGATACCGGCGACACC | ACTCAAACCACCGGCTCATCTTCC |
| HC15F23 | ACCGCGGCCCGACTGG | GACCAGGTGGAAGATCTCAAAGTGC |
| HC09A11 | GAGCAGGTCCAAGTAGAAGGCAAGAG | GGAACGAGGGAAAAACAGAAATACATAAC |
| HT05L11 | CCAGAACTGAACATGTCGTCGGAG | CCGAGGTGCGACCCAGAGC |
| HU09M03 | GCCTGCGCCTTGTGGTTGAC | TCGTGGTTGCATTGGCGGG |
| HH04C09 | CACATCCTGCCGAGAAACAACCTACC | CACGACCCAGATCCACACCCAC |
| HO06J11 | GTGCATGCCGCATTAATTCCTGAC | GGATCGCCAACGTGAACCCCTTACA |

Tabelle 3 : Fortsetzung von Seite 36

| Klon-ID (CR-EST) | Sequenz Vorwärts-Primer 5' - 3' | Sequenz Rückwärts-Primer 5' - 3' |
|------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| HP11024 | GGCACGAGGCAGCACACAGC | GGTGTGGCTCCACGTCTTCTCGC |
| HM14H10 | GCAGCAGCAGGAGGAGGAGGTTT | GACCCCTGAAAGTAGTTGCTGGAAGAAG |
| HS17B20 | ATTACAAACCGGTACCTCACATCCC | AACCTTCTTGGTGCAGATAATTTTGTGG |
| <i>HvDHN5</i> | GCGGCGCCTACGGACAACA | GCCCTTCTTCTCGCCGGTGTGTA |
| <i>HvDHN10</i> | CGACCGGCGGCCCTCACTAC | GGTTGCCGTGGTCCCGTGTG |

2.5.3 Primer für die *Frameshift* Mutagenese

Tabelle 4: Synthetische Oligonukleotide für die Korrektur des Leserasters (ORF) im Gen *HvDRF1*.

| Primer-bezeichnung | Sequenz 5' - 3' |
|----------------------|---------------------------------------------------|
| <i>HvDRF1_MUTA_F</i> | GGA GTC ATG TTC TCG TCG AAA CCA ATA GGA AAA AGC G |
| <i>HvDRF1_MUTA_R</i> | CGC TTT TTC CTA TTG GTT TCG ACG AGA ACA TGA CTC C |

2.5.4 Primer für die GFP-Fusionsklonierung

Tabelle 5: Synthetische Oligonukleotide für die Klonierung der Gene *HvDREB1* und *HvDRF1*.

| Primer-bezeichnung | Sequenz 5' - 3' |
|------------------------|---------------------------------------------------------|
| DREB1_GFP_F | ACG AGG CGC GCC GAG ATC TCT CTC TCC CTT CCT CCC TCC TC |
| DREB1_GFP_R | CAA ATC CTG CAG GCA TTT CGG TTT CAC CTT AAG GCC CAC AGT |
| <i>HvDRF1_GFP_F</i> | AGA AGG CGC GCC GCG CGA TTG CGA GCT CTA GAT ACC TC |
| <i>HvDRF1_MODIFY_1</i> | CCA TAC ATT GCT CTG GCT GGT CGA CCA TAA GC |
| <i>HvDRF1_MODI_3</i> | CCT CTC GGT CAG ATT GTC GAC AGT CCA CCC |
| <i>HvDRF1_GFP_R</i> | GGC CAC CTG CAG GCA CAA CCC CTC AAA GAA CTC GCT CAT CTC |
| GFP_SmaI_F | GGA GCC CGG GTC ACC ATG GTG AGC AAG G |
| GFP_AscI_R_2 | GCG GCG CGC CCT GCA GTA ACT TGT AC |

2.5.5 Primer für die qRT-PCR Experimente

Tabelle 6: Synthetische Oligonukleotide zur Ermittlung der Expression verschiedener Gene unter Trockenstressbedingungen.

| Gen | Sequenz Vorwärts-Primer 5' - 3' | Sequenz Rückwärts-Primer 5' - 3' |
|---------------|---------------------------------|----------------------------------|
| <i>HvHVA1</i> | GCGCAGTACACCAAGGAGTC | GGTGGTGGTGGTGTCTTGA |
| <i>HvDRF1</i> | CTTATGATGAAGCAGCCAGAGCAA | TCGGAGTGGTGGATGTTGTAGTC |

Tabelle 6 : Fortsetzung von Seite 37

| Gen | Sequenz Vorwärts-Primer 5' - 3' | Sequenz Rückwärts-Primer 5' - 3' |
|---------------|---------------------------------|----------------------------------|
| <i>HvDHN6</i> | GGCGGTAACAAGGAGCAGAC | GTGTGCGGCGGGTTGTTCTTG |
| <i>HvNHX1</i> | GCCCGCGTCGAGCAATG | GTGGGTCGGCTTGGTGATGA |

2.6 Verwendete Kits und Enzyme

| | |
|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| versch. Restriktionsenzyme | (NEB [®] Inc., Ipswich, MA, USA) |
| versch. Restriktionsenzyme | (Fermentas*, St.Leon-Rot, Dt.) |
| T4 DNA Ligase | (Fermentas*, St.Leon-Rot, Dt.) |
| O´Gene Ruler (100bp DNA Ladder) | (Fermentas*, St.Leon-Rot, Dt.) |
| SmartLadder | (Eurogentec, Köln, Dt.) |
| JETstar Kit (DNA Präparation) | (Genomed*, Löhne, Dt.) |
| QIAprep [®] Spin Miniprep Kit | (Qiagen*, Hilden, Dt.) |
| QIAquick [®] Gel Extraction Kit | (Qiagen*, Hilden, Dt.) |
| Taq PCR Master Mix Kit | (Qiagen*, Hilden, Dt.) |
| QuantiTect [®] SYBR [®] Green PCR Kit | (Qiagen*, Hilden, Dt.) |
| QIAvac 96 | (Qiagen*, Hilden, Dt.) |
| NucleoSpin [®] Multi-96 Plus Plasmid Kit | (Macherey-Nagel**, Düren, Dt.) |
| TOPO TA Cloning [®] Kit | (Invitrogen, Paisley, UK) |
| Gateway [®] LR Clonase [™] II Enzyme Mix | (Invitrogen, Paisley, UK) |
| ThermalAce [™] DNA Polymerase Kit | (Invitrogen, Paisley, UK) |
| QuickChange [®] Site-Directed Mutagenesis Kit | (Stratagene, La Jolla, CA, USA) |
| DNA-free [™] Kit | (Ambion Inc., Austin, TX, USA) |
| iScript [™] cDNA Synthesis Kit | (Bio-Rad L., Hercules, CA, USA) |

* GmbH ** GmbH & Co KG

2.7 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Für die Transformation von DNA in *Escherichia coli* Bakterien war es notwendig, vorher kompetente Zellen (Top 10, Invitrogen) zu erzeugen. Dies wurde mit einer nach Hanahan (1983) modifizierten Methode erreicht.

Aus einer Einzelzell-Vorkultur wurden 0,6 ml entnommen und in einem 1 l Kolben mit 100 ml LB Medium gegeben. Dieser wurde bei 37°C unter ständigem schütteln (220 rpm) inkubiert bis die Bakterienkultur eine optische Dichte von $OD_{600nm} = 0,4$ erreicht hatte. Danach wurden die Zellen in bereits vorgekühlte 50 ml Röhren (Cellstar®, PP, Greiner Bio-One GmbH) überführt und für 35 min im Eisbad heruntergekühlt, bevor sie anschließend für 15 min zentrifugiert wurden [3000 rpm (1942 g), 4°C]. Der flüssige Überstand wurde verworfen und das Präzipitat in 10 ml Transformationspuffer 1 aufgenommen. Das vollständig resuspendierte Präzipitat wurde für 2 h im Eisbad inkubiert und erneut zentrifugiert [3000 rpm (1942 g), 4°C]. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Präzipitat in 4 ml Transformationspuffer 2, so vorsichtig wie möglich, aufgenommen. Die chemisch kompetenten Zellen wurden im letzten Schritt zu Aliquots von jeweils 200 µl aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80°C.

LB Medium für Hauptkultur* (pH 7,0) :

| | | |
|----------------------|------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 10 g l ⁻¹ | Bacto™ Trypton (pankr.verd.) | (OTTO Nordwald, Hamburg, Dt.) |
| 10 g l ⁻¹ | NaCl | (Roth, Karl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland) |
| 5 g l ⁻¹ | Hefeextrakt | (Merck, Darmstadt, Dt.) |
| 1,25 mM | MgSO ₄ | (Merck, Darmstadt, Dt.) |
| 1,25 mM | MgCl ₂ | (Merck, Darmstadt, Dt.) |

* LB Medium für Vorkultur ohne MgSO₄ und MgCl₂

Transformationspuffer 1 (pH 5,4)*:

| | | |
|--------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 30 mM | K-acetat (C ₂ H ₃ KO ₂) | (Roth, Karl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland) |
| 100 mM | RbCl | (Roth) |
| 50 mM | MnCl ₂ | (Riedel de Häen AG, Hannover, Dt.) |
| 10 mM | CaCl ₂ | (Roth) |

* Der pH Wert 5,4 wurde mit verdünnter Essigsäure (ROTIPURAN®, Roth) eingestellt.

Transformationspuffer 2 (pH 7,0):

| | | |
|-------|-------------------|-----------------------------------------------------|
| 10 mM | MOPS | (USB, Cleveland, Ohio, USA) |
| 10 mM | RbCl | (Roth, Karl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland) |
| 75 mM | CaCl ₂ | (Roth) |
| 15 % | Glycerin | (Roth) |

* Der pH Wert 7,0 wurde mit 0,1 M NaOH (≥99% p.a., ISO, Roth) eingestellt.

2.8 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Die Transformation der *Escherichia coli* Zellen erfolgte nach einer leicht modifizierten Methode von Cohen et al. (1972). Basierend auf der Behandlung mit einer Salzlösung unter Einwirkung eines Hitzeschocks wird dabei DNA in die Zellen aufgenommen.

Die kompetenten Zellen wurden als erstes zusammen mit der Plasmid DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Hierzu wurden vorsichtig 50 µl der Zellen in ein Eppendorfreaktionsgefäß, welches sich bereits im Eisbad befand gegeben und anschließend 5 µl der DNA zugefügt. Im Anschluss an diese Inkubationsphase fand die Hitzeschockbehandlung statt. Dabei wurden die Reaktionsgefäße in ein auf 42°C aufgeheiztes Wasserbad gegeben und für 20 sek inkubiert. Danach wurden sie zurück in das Eisbad gestellt und für mindestens 2 min inkubiert. Nun erfolgte die Zugabe von 200 µl SOC Medium. Die Zellen wurden vorsichtig gemixt und bei 37°C für 1 h auf einem Plattenschüttler bei 750 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurden 100 µl des Gesamtansatzes auf Platten mit LB Medium ausgestrichen, welches alternativ je nach Erforderlichkeit Kanamycin oder Ampicillin zur Selektion beinhaltet.

SOC Medium (pH 7,0):

| | | |
|-----------------------|------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 20 g l ⁻¹ | Bacto™ Trypton (pankr.verd.) | (OTTO Nordwald, Hamburg, Dt.) |
| 5 g l ⁻¹ | Hefeextrakt | (Merck, Darmstadt, Dt.) |
| 0,5 g l ⁻¹ | NaCl | (Roth, Karl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland) |
| 2,5 mM | KCL | (Roth) |
| 10 mM | MgCl ₂ * | (Roth) |
| 20 mM | A-D(+)-Glukose-Monohydrat* | (Roth) |

* Die Lösungen wurden sterilfiltriert und nach dem autoklavieren hinzugefügt

LB Medium (pH 7,0) :

| | | |
|----------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 10 g l ⁻¹ | Bacto™ Trypton (pankr.verd.) | (OTTO Nordwald, Hamburg, Dt.) |
| 10 g l ⁻¹ | NaCl | (Roth, Karl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland) |
| 5 g l ⁻¹ | Hefeextrakt | (Merck, Darmstadt, Dt.) |
| 15 g l ⁻¹ | Bacto™ Agar | (OTTO Nordwald, Hamburg, Dt.) |
| Zusätzlich Antibiotikum* zur Selektion | | |

* Verwendung entweder von Ampicillin Natriumsalz ≥99% (Endkonzentration 100 µg ml⁻¹) oder Kanamycin (Endkonzentration 50 µg ml⁻¹). Beide Antibiotika wurden von der Firma Roth (Karl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Dt.) bezogen.

2.9 Isolation von Nukleinsäuren

Für die Klonierung der unterschiedlichen RNAi-Konstrukte, der Vektoren für die GFP-Fusionsproteine, sowie für die PCR Analysen zur Transkripthäufigkeit bestimmter Gene unter Stressbedingungen, war es notwendig sowohl DNA als auch RNA zu isolieren. Hierfür wurden verschiedene Methoden angewendet.

2.9.1 Isolation von Plasmid DNA

Die für die biolistische Transformation benötigte Plasmid DNA wurde mit dem JETstar Kit (Genomed GmbH, Löhne, Deutschland) laut Protokoll des Herstellers extrahiert und auf eine Konzentration von $1 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ mit destilliertem Wasser (Millipore) eingestellt.

Sowohl die verschiedenen Zwischenschritte zur Klonierung der GFP-Fusionskonstrukte, als auch die Überprüfung der Zwischenvektoren (pIPKTA38) für die Erstellung der RNAi Bank, d.h. das Testen positiver Transfomanten, erforderten eine geringere Menge an DNA. Aus diesem Grund wurde Ressourcen schonend mit zwei unterschiedlichen Kits sowie der STET Methode (Holmes und Quigley, 1981), je nach Probenanzahl, gearbeitet. Das QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Dt.) wurde hauptsächlich für die Isolation von DNA aus Einzelproben verwendet, während das NucleoSpin[®] Multi-96 Plus Plasmid Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Düren, Deutschland) bei der Erstellung der RNAi Bank zur Anwendung kam.

Die ebenfalls verwendete STET Methode, für eine schnelle DNA Isolation, wurde in einer leicht modifizierten Fassung eingesetzt:

Das Präzipitat der Übernacht Kultur wurde in 350 μl STET Puffer resuspendiert und die Zellen anschließend mit 25 μl Lysozym (10 mg ml^{-1} in 1 M TrisHCL) für 30 sek bei RT inkubiert. Danach folgte die Hitzeinaktivierung im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 99°C für 40 sek. Der Zentrifugation des Lysates bei 13000 rpm (15700 g) folgte die Entfernung des Präzipitates mit einer Pipettenspitze. Der verbleibende Überstand wurde mit 40 μl 2,5 M NaOAc (pH 5,2) und 420 μl Isopropanol versetzt und die DNA durch mehrmaliges wenden gefällt. Nach erneuter Zentrifugation bei 13000 rpm (15700 g) folgte ein Waschschrift mit 0,7 ml 70% Ethanol und die finale Aufnahme der DNA in 50 μl destilliertem Wasser (Millipore).

STET Puffer (pH 8,0)* :

| | | |
|-----------|--------------|-----------------------------------------------------|
| 8 %(w/v) | Saccharose | ApplieChem |
| 5 % (v/v) | Triton X-100 | (Roth, Karl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland) |
| 50 mM | EDTA | (Roth) |
| 50 mM | Tris | (Invitrogen, Paisley, UK) |

* Der STET Puffer wurde mit HCL auf den pH Wert von 8,0 eingestellt.

Die Isolation von einzelnen DNA Banden aus einem Agarosegel erfolgte unter Verwendung des QIAquick® Gel Extraction Kits (Qiagen GmbH, Hilden, Dt.). Alle für die Isolationen verwendeten Kits wurden den Herstellerangaben folgend benutzt.

2.9.2 Isolation genomischer DNA aus Blattmaterial

Die Herstellung der RNAi Bank erforderte in einigen Fällen die Amplifikation einzelner Gene bzw. Genabschnitte aus genomischer DNA. Dazu wurde diese nach Doyle und Doyle (1987, 1990) aus Gerste (cv. Golden Promise) isoliert:

Als erstes wurden einige Primärblattsegmente zusammen mit zwei kleinen Stahlkugeln (sogn. *Beads*) in einem Eppendorfreaktionsgefäß bei -80°C für zwei Tage inkubiert. Anschließend wurde das Blattmaterial in einer Retsch-Schwingmühle (MM300) für 2x30 sek (bei 30 Schwingungen pro sek) gemahlen und zu der Blattmasse danach 700 µl heißer Extraktionspuffer (65°C) gegeben. Der Ansatz wurde solange gemixt, bis eine homogene grüne Mischung entstanden war. Nun wurden die Proben im Wasserbad (65°C) für 45 min inkubiert und dabei alle 10 min durch invertieren gut vermengt.

Nach erfolgter Inkubation im Wasserbad wurde unter dem Abzug jeweils 700 µl CIA Puffer zu den Proben gegeben und durch vorsichtiges schwenken gemischt. Diesem Schritt folgte eine 15 minütige Zentrifugation bei 8000 rpm (5900 g, 4°C), die Überführung des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß und die Wiederholung der Behandlung mit CIA Puffer.

Der Überstand wurde wiederum nach erfolgter Zentrifugation in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und mit 85 µl eines 6:5-Mixes von 3 M NaOAc (pH 5,5) und 10 M NH₄OAc versetzt. Zusätzlich wurde 0,5 ml Isopropanol hinzugefügt und der gesamte Ansatz vorsichtig geschüttelt um eine gleichmäßige Verteilung zu erreichen. Die jetzt bereits sichtbare DNA wurde

30 min bei 13000 rpm (15700 g) zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Präzipitat mit 1 ml Ethanol (70%) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet für 10 min bei RT getrocknet und in TE Puffer aufgenommen. Nach Aufnahme der DNA wurde nochmals 1 h bei RT inkubiert und die Lösung final im Kühlschrank (4°C) gelagert.

Extraktionspuffer :

| | | |
|-----------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 1,4 M | NaCl | (Roth, Karl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland) |
| 100 mM | Tris/HCL (pH 8,0) | (Roth) |
| 20 mM | EDTA (pH 8,0) | (Roth) |
| 1 % (w/v) | Na ₂ S ₂ O ₃ | (Roth) |

Der Lösungsansatz betrug 450 ml. Der Puffer wurde nach der Zusammenführung der einzelnen Chemikalien mit Wasser (Millipore) aufgefüllt und anschließend autoklaviert. Danach wurde der Puffer durch folgende Komponenten ergänzt:

| | | |
|-------------|-------------------|--------|
| 2 % (w/v) | CTAB | (Roth) |
| 0,2 % (v/v) | β-Mercaptoethanol | (Roth) |

Der Puffer wurde nach der Vervollständigung auf ein finales Volumen von 500 ml mit Wasser (Millipore) aufgefüllt.

CIA-Lösung (Chloroform :Isoamylalkohol 24:1):

| | | |
|------------|----------------|--------|
| 96 % (v/v) | Chloroform | (Roth) |
| 4 % (v/v) | Isoamylalkohol | (Roth) |

TE-Puffer (pH 8,0):

| | | |
|-------------------------|-------------------|------------------------------------|
| 10 mM | Tris/HCL (pH 8,0) | (Roth) |
| 1 mM | EDTA (pH 8,0) | (Roth) |
| 100 µg ml ⁻¹ | RNaseA | (Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Dt.) |

2.9.3 RNA Isolation aus Blattmaterial

Für die Bestimmung der Transkripthäufigkeit unter Trockenstressbedingungen war es notwendig die Gesamt-RNA aus dem zur Verfügung stehenden behandelten Blattmaterial zu isolieren. Hierbei wurde auf das *Total RNA isolation reagent* von Biomol (Hamburg, Dt.) zurückgegriffen, um eine qualitativ hochwertige Menge an RNA zu erhalten.

Sowohl das gestresste (dehydrierte) als auch das unbehandelte Blattmaterial wurde unter Verwendung von Flüssigstickstoff zu feinem Pulver verarbeitet und

in Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Diese wurden bis zur Hälfte mit dem Pulver befüllt und sofort 1 ml der *Total RNA isolation reagent* Flüssigkeit (Biomol GmbH, Hamburg, Dt.) zugegeben. Nach sorgfältigem Mixen der Flüssigkeit wurde das Reaktionsgefäß für 10 min im Kühlschrank inkubiert. Nach diesem Inkubationsschritt wurden 200 µl Chloroform (Roth, Karl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Dt.) zu der gleichmäßig grünen Masse gegeben, für 15 sek gemixt und nach 5 min Abkühlung auf Eis bei 13000 rpm (15700 g) zentrifugiert. Die Zentrifugation für 15 min war dabei ausreichend, um eine Trennung des Gemisches in eine wässrige und eine organische Phase zu bewirken. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit der äquivalenten Menge an Isopropanol (Roth) aufgefüllt. Nach dem Durchmischen der Flüssigkeit folgte eine 10 minütige Inkubationsphase im Kühlschrank. Anschließend wurde erneut für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das entstandene Präzipitat mit 0,5 ml 70% Ethanol gewaschen. Das Präzipitat wurde zum Schluss für 5 min bei RT getrocknet und danach in 50 µl DEPEC Wasser (Roth) aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.10.1 Amplifikation von Zielsequenzen

Sowohl die Erstellung der RNAi Bank, als auch die Konstruktion der Fusionsprodukte, welche sich aus Sequenzinformationen des jeweils untersuchten Gens und der Sequenz für das grün fluoreszierende Protein zusammensetzten, machten eine Amplifikation mittels *Polymerase Chain Reaction* (PCR) erforderlich. Die Anwendung der PCR war ebenfalls notwendig während der Korrektur des Leserahmens für das Gen *HvDRF1* (siehe 2.12.3, Ortsgerichtete Mutagenese), sowie für die Überprüfung auf das Vorhandensein von spezifischen Sequenzen nach Insertion in einen Vektor, mittels Kolonie-PCR.

Der Ablauf der Reaktion, d.h. das Temperatur-Zeit Schema der einzelnen Phasen wurde mit Ausnahme der *Annealing* Temperatur der jeweils eingesetzten Primer nicht verändert. Für alle Amplifikationen wurde somit folgendes Profil verwendet:

Start der PCR mit einer Denaturierungsphase (5 min, 95°C), um den DNA Doppelstrang aufzuspalten. Dieser Phase schlossen sich 35 Zyklen aus Denaturierung der DNA (1 min, 95°C), *Annealing* der Primer (30 sek, X°C) und Verlängerung der Primer d. h. DNA Synthese (90 sek, 74°C) an. Zum Abschluss wurden alle DNA-Doppelstränge nochmals für 10 min (74°C) komplettiert. Die auf diese Weise erhaltenen Syntheseprodukte wurden je nach Verwendungszweck entweder auf einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt oder im Falle der Amplifikation mit Thermal Ace™ Polymerase über eine NucleoFast 96 PCR Platte (Macherey Nagel GmbH & Co KG, Düren, Dt.) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Die Amplifikation erfolgte jeweils in einem Gesamtvolumen von 20 µl und beinhaltete mehrere Komponenten. Neben 10 µl PCR Mastermix aus dem Taq PCR Master Mix Kit der Firma Qiagen wurden jeweils 2 µl für den Vorwärts bzw. Rückwärts Primer (1 pmol/µl), 5 µl destilliertes Wasser (Millipore) sowie 1 µl der zu untersuchenden DNA eingesetzt. Für eine Kolonie-PCR wurde anstelle der DNA Wasser (Millipore) eingesetzt und ein Einzelklon mit einer Pipettenspitze aufgenommen, auf eine neue LB Platte (mit entsprechendem Antibiotikum) übertragen und anschließend im PCR Ansatz nochmals ausgestrichen.

Die Verwendung der Thermal Ace™ Polymerase (Invitrogen, Paisley, UK) erforderte eine Anpassung des PCR Ansatzes. Pro Reaktion wurden hierbei je 8,5 µl des Vorwärts bzw. Rückwärts Primers (1 pmol/µl), 2 µl des Thermal Ace™ Puffers, 1 µl DNA (100 ng) sowie 0,5 µl dNTP's und 0,25 µl der Polymerase eingesetzt. Das PCR Profil blieb jedoch unverändert und wurde wie zuvor beschrieben verwendet.

Für alle PCR Reaktionen wurden folgende Geräte eingesetzt:

- *PCR-cycler* T-gradient Thermoblock von Biometra (biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Dt.)
- Gene Amp® PCR System 9700 von Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

2.10.2 qRT-PCR

Um eine Aussage über die relative Transkripthäufigkeit verschiedener Gene unter Trockenstressbedingungen treffen zu können, wurde ein *Real-time* PCR Experiment durchgeführt. Hierzu wurden Blätter dem Stress durch Dehydration

unterzogen (siehe 2.11.4) und anschließend die Gesamt-RNA zu verschiedenen Zeitpunkten isoliert, um sie mit der ungestressten Kontrolle zu vergleichen. Im ersten Experiment wurden die Zeitpunkte 1h, 6h, 24h, 48h und 4d nach Erreichen des RFW (55%) betrachtet, während in der Wiederholung der Fokus nur noch auf drei Zeitpunkten 1h, 6h und 24h lag. Außerdem wurde die Situation mit und ohne erfolgter biologischer Transformation (siehe 2.11.2) untersucht, um einen möglichen Einfluss ausschließen zu können. Dazu wurden die Blattsegmente zusätzlich zum Stress mit den Vektoren pPKTA30, pUbi-DsRED-NOS und pGFP (Referenz siehe 2.4) gleichzeitig transformiert.

2.10.2.1 Herstellung der cDNA

Die mittels Biomol isolierte RNA (siehe 2.9.3) wurde mit DNase behandelt, um reine RNA Proben für die Analyse zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde das DNA-free™ Kit von Ambion (Ambion Inc., Austin, TX, USA) eingesetzt. Der Reaktionsansatz beinhaltete 5 µl DNase Puffer (10x), 1 µl DNase I (2U/µl) und 10 µg RNA. Alle Ansätze wurden mit RNase freiem Wasser, welches ebenfalls im Kit enthalten war, auf 50 µl aufgefüllt und anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen wurde danach zu jedem Ansatz 5 µl DNase Inaktivierungsreagenz gegeben und für 2 min bei RT inkubiert. Diesem Schritt folgten die Zentrifugation bei 13000 rpm (15700 g) und die Übertragung des Überstandes in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß.

Die behandelten RNA Proben konnten nun für die Umwandlung in cDNA verwendet werden. Für diese Reaktion benötigt man das Enzym Reverse Transkriptase, welches die vorliegende mRNA in DNA „umschreibt“. Für die Umsetzung stand das iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad L., Hercules, CA, USA) zur Verfügung. Pro Ansatz wurde 1 µg RNA (DNA frei) mit 4 µl iScript Reaktionsmix (5x) vereint und mit Wasser (RNase und DNase frei) auf 19 µl aufgefüllt, bevor im Anschluss daran 1 µl Reverse Transkriptase die Reaktion komplettierte. Das kurze PCR Programm: 5 min 25°C, 30 min 42°C, 5 min 85°C, genügte für die vollständige Umwandlung der RNA in cDNA. Die fertige cDNA wurde mit Wasser (ebenfalls RNase und DNase frei) auf ein finales Volumen von 150 µl aufgefüllt und bei -20°C gelagert.

2.10.2.2 *Real-time Experiment*

Für die PCR Reaktion wurde das QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit von Qiagen verwendet, dessen *Mastermix* den Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green I enthielt. Dieser lagert sich ähnlich dem Etidiumbromid in die DNA ein (Interkalation) und dient der Quantifizierung. Eine Zunahme des Fluoreszenzsignals resultierte somit aus der Zunahme der Menge an DNA. Das für die qRT-PCR verwendete HT7900 *Fast Real-time* Gerät von Applied Biosystems Inc. (Foster City, CA, USA) konnte dieses Signal detektieren und der Auswertung durch die mitgelieferte Software zur Verfügung stellen.

Jeder Reaktionsansatz enthielt 5 µl SYBR® Green *Mastermix* (2x), 1 µl des genspezifischen Vorwärts und 1 µl des genspezifischen Rückwärts Primers (1 pmol/µl), 2 µl Aq.bidest (RNase und DNase frei) und 1 µl cDNA. Alle Proben wurden zur Analyse auf einer MicroAmp™ Optical 384-Well Reaktionsplatte (Applied Biosystems Inc.) aufgetragen und folgendem Profil im PCR Gerät unterzogen:

| | | |
|---------------------|-------------------------------|--------------|
| | Initiation | 2 min, 50°C |
| | Denaturierung | 10 min, 95°C |
| 40 Zyklen | Denaturierung | 15 sek, 95°C |
| | <i>Annealing</i> und Synthese | 1 min, 58°C |
| Dissoziationschritt | Denaturierung | 15 sek, 95°C |
| | <i>Annealing</i> | 15 sek, 60°C |
| | Denaturierung | 15 sek, 95°C |

Das Ergebnis wurde anschließend mit der Software SDS 2.2.1 von Applied Biosystems ausgewertet und die Menge an amplifizierter DNA berechnet.

Mit dem finalen Dissoziationschritt wurde eine Schmelzkurve erstellt, deren Analyse einen Aufschluss über die Qualität des PCR Produktes gab. Hiermit war es möglich unspezifische PCR Produkte wie z.B. Primerdimere zu identifizieren.

Jedes Experiment umfasste sowohl Verdünnungsreihen zur Erstellung der Standardkurven, welche für die Berechnung der Transkriptmenge der analysierten Gene benötigt wurden, als auch die zu testenden cDNA Proben. Pro betrachteten Zeitpunkt konnten jeweils vier cDNA Proben untersucht werden:

- Kontrolle nicht biolistisch transformiert
- Kontrolle biolistisch transformiert
- Stress (55% RFW) nicht biolistisch transformiert
- Stress (55% RFW) biolistisch transformiert

Somit war es möglich, die relative Transkripthäufigkeit der Gene *HvDRF1*, *HvNHX1*, *HvHVA1* sowie *HvDHN6* unter Stress- bzw. Nicht-Stressbedingungen, zu 5 verschiedenen Zeitpunkten nach Stressbeginn zu ermitteln. Um die Möglichkeit eines Pipettierfehlers ausschließen zu können oder einen solchen zu erkennen, wurden jeweils 3 Wiederholungen pro Reaktionsansatz ausgeführt. Das bedeutet, dass für jedes Primerpaar 3 Wiederholungen pro Verdünnungsschritt und 3 Wiederholungen pro untersuchter cDNA angesetzt wurden. Um Kontaminationen der einzelnen Komponenten der Reaktion (Primer, Puffer, cDNA etc.) zu erkennen, wurden für jedes Primerpaar zusätzlich Wasserkontrollen mitgeführt.

2.10.2.3 Auswertung der Real-time PCR

Für eine bessere statistische Auswertung der Daten wurde jedes Experiment zweimal durchgeführt. Das Softwareprogramm SDS 2.2.1 von Applied Biosystems berechnete dabei jedes Mal automatisch die Konzentration der amplifizierten DNA Menge basierend auf den Standardkurven der untersuchten Gene. Die erhaltenen Daten mussten anschließend noch normalisiert werden. Zu diesem Zweck wurde die Transkriptmenge des *house keeping* Gens UBC (*Ubiquitin-conjugating enzyme*, Accession Nummer NCBI: AAP04430), welches konstitutiv exprimiert wird, herangezogen und mit der Transkriptmenge der jeweils betrachteten Gene verrechnet. Nach erfolgter Normalisierung wurde ein Mittelwert aus beiden Experimenten gebildet und die relative Menge an Transkript in einem Diagramm gegen die Zeit aufgetragen.

Um ausschließen zu können, das ein Reaktionsansatz möglicherweise eine höhere bzw. geringere Menge an cDNA enthielt und somit das Ergebnis verfälschen würde, wurde die PCR zusätzlich auf einem 1% Agarosegel kontrolliert.

2.11 *Transient- Induced Gene Silencing (TIGS)*

2.11.1 Klonierung der RNAi Vektoren

Das Erstellen von RNAi Bibliotheken beruht auf dem mehrstufigen Prozess der Gateway[®] Technologie (Invitrogen[™], Carlsbad, Kalifornien). Diese nutzt die ortsspezifische Rekombination von DNA Molekülen durch Rekombinationsproteine des Bakteriophagen Lamda (Integrase und Excisionase) sowie des *Integration Host* Faktors aus *Escherichia coli*. Alle für die Klonierung von RNAi-Konstrukten erforderlichen Schritte wurden gemäß dem Protokoll von Douchkov et al. (2005) durchgeführt. Daher soll diese Methode hier nur noch einmal kurz erläutert werden.

In einem ersten Schritt wurde die Sequenz des Zielgens aus der cDNA-Bank des IPK (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/est/index.php>) mittels der ThermalAce[™] Polymerase (Invitrogen[™]) amplifiziert und über eine NucleoFast 96 PCR Platte (Macherey Nagel, Düren, Dt.) aufgereinigt. Hierbei wurde besonders darauf geachtet, dass das Amplikon eine Länge von ca. 500 Basenpaaren aufwies und vom 3' Ende der Ausgangssequenz amplifiziert wurde. Die auf diese Weise gewonnenen *blunt-end* PCR Produkte wurden anschließend in einen Gateway kompatiblen Vektor, pIPKTA38 (*entry vector*), durch Restriktion mit dem Enzym *SwaI* und gleichzeitiger Ligation durch die T4-Ligase kloniert. Der Gesamtansatz für diesen Schritt wurde für 1 h bei RT inkubiert und die Reaktion durch die Erhitzung auf 65°C (für 10 min) im PCR-Zykler gestoppt. Durch Zugabe des *SwaI*-Mix (siehe unten) und Inkubation für 1 h bei RT, erfolgte eine nochmalige Restriktion die sicherstellen sollte, dass Vektoren die kein PCR Produkt aufgenommen hatten linearisiert wurden und somit die Zahl an möglichen falsch positiven Kolonien reduziert werden konnte. Nach diesem Schritt wurden 7,5 µl des kompletten Ansatzes für die Transformation verwen-

det und die Selektion der Transformanten auf LB Medium, welches Kanamycin als Antibiotikum enthielt, durchgeführt (siehe auch Abschnitt 2.8).

Der Isolation der Plasmid DNA aus positiven Klonen, mittels der STET Methode (Holmes und Quigley, 1981) bzw. dem QIAprep MiniprepKit (Qiagen, Hilden, Dt.) (siehe auch Abschnitt 2.9.1), schloss sich ein Kontrollverdau mit *EcoRI*, zur Identifikation der Insertbande in Größe des PCR Produkts, an.

Die Überführung der Zielsequenz vom *entry vector* (pIPKTA38) in den *destination vector* (pIPKTA30), durch Rekombination, erfolgte durch das Enzym LR-Klonase (Invitrogen™). Für die LR-Reaktion wurden 1 µl pIPKTA30 (150 ng), 1 µl pIPKTA38::EST DNA und 2 µl LR-Klonase II Mix in einem 10 µl Ansatz über Nacht bei RT inkubiert und am darauffolgenden Tag transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf LB-Ampicillin Medium.

Die finalen RNAi Konstrukte wurden durch die Restriktion mit dem Enzym *EcoRV* kontrolliert (Ansatz laut Herstellerangaben).

Ligationsmix für die Klonierung in pIPKTA38:

1 µl H₂O (Millipore)
1 µl Ligationspuffer (10x)
1 µl 50% PEG₄₀₀₀
1 µl NaCl (0,5 M)
1 µl pIPKTA38 (150 ng/µl)
1 µl PCR Produkt (aufgereinigt, siehe Abschnitt PCR 2.10.1)
0,5 µl *SwaI* (10U/µl)*
0,5 µl T4 Ligase (5U/µl)*

SwaI-Mix:

0,5 µl *SwaI* (10U/µl)*
0,5 µl *SwaI* Puffer
1 µl NaCl (0,5 M)
1 µl H₂O (Millipore)

EcoRI-Mix :

0,1 µl *EcoRI* (10U/µl)*
1 µl *EcoRI* Puffer
1 µl pIPKTA38 ::EST DNA
1 µl H₂O (Millipore)

LR-Mix für die Rekombination in pIPKTA30N:

2 µl LR-Klonase II Mix
1 µl pIPKTA30 (150ng/µl)
1 µl pIPKTA38 ::EST DNA
6 µl H₂O (Millipore)

* Die für die Restriktion/Ligation verwendeten Enzyme und Puffer wurden alle von der Firma Fermentas (St.Leon Rot, Deutschland) bezogen.

2.11.2 Biolistische Transformation

Die Transformation der Gerstenblätter erfolgte in einem *detached leaf assay*. Hierzu wurden jeweils 5 Primärblattsegmente pro Petrischale (d= 9 cm), von 7 Tage alten Pflanzen (Anzucht siehe 2.2), mit einer durchschnittlichen Länge von 6 cm, auf 0,5 % Phytoagar (Duchefa Biochemie) gelegt und mittels Magnetrührern an den Enden fixiert. Alle Blattsegmente wurden dabei mit der abaxialen Seite auf dem Phytoagar parallel zueinander ausgerichtet. Um den Einfluss von Seneszenz auf das Experiment zu minimieren, wurde dem Agar zusätzlich 0,001% (w/v) Benzimidazol (Fluka) beigefügt (Schweizer et al., 1999).

2.11.2.1 Herstellung der Goldsuspension

Unter Verwendung von Goldpartikeln (Durchmesser 1,0 µm, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), als Trägermaterial für die DNA, sollten Zellen der Blattepidermis transient transformiert werden.

Bevor die DNA jedoch auf das Gold gefällt und somit fixiert werden konnte, mussten die Partikel entsprechend präpariert werden. Für die Präparation wurden 27,5 mg der Goldpartikel abgewogen und zweimal mit 1 ml destilliertem Wasser (Millipore) sowie einmal mit Ethanol (>96%) gewaschen [30 s im Ultraschallbad; 30 s Zentrifugation mit 13000 rpm (15700 g)]. Nach jedem Waschschrift wurde der Überstand verworfen.

Im Anschluss daran folgte die Trocknung der Partikel für 10-15 min bei 50°C im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Dt.), die Aufnahme in 1 ml Glycerol (50%, v/v) und die Lagerung bei – 20°C.

2.11.2.2 Beschichtung der Goldpartikel und Transformation

Die zuvor präparierten Goldpartikel wurden vor dem jeweiligen Experiment mit Plasmid DNA, die mittels dem JETstar Kit isoliert worden war (siehe Abschnitt 2.9.1), beschichtet. Der Ansatz pro Doppelschuss bestand aus 175 µl Goldsuspension, je 14 µg DNA pro Reporterkonstrukt (GFP und DsRED) sowie 14 µg DNA - entweder für das entsprechend zu testende RNAi Konstrukt oder für die mitgeführte Kontrolle (d.h. leerer pIPKTA30 Vektor, welcher sonst die RNAi Kassetten trägt). Diesem Ansatz wurde unter kontinuierlichem durchmischen tröpfchenweise eine 1 M Ca(NO₃)₂ Lösung (pH 10) zugegeben

(Endkonzentration 0,5 M) und durch Inkubation für 10 min bei RT die DNA auf die Goldpartikel gefällt. Diesem Schritt schloss sich eine Zentrifugation bei 13000 rpm (15700 g) an. Der Überstand wurde verworfen und das präzipitierte Gold einmal mit 70% Ethanol und einmal mit 96% Ethanol gewaschen. Zum Schluss erfolgte die Aufnahme in 60 µl 96% Ethanol.

Ansatz für die Fällung der DNA:

175 µl Goldsuspension (Doppelschuss)
14 µl GFP-Plasmid DNA (1 µg/µl)
14 µl DsRED-Plasmid DNA (1 µg/µl)
14 µl RNAi (Zielgen) bzw. 14 µl Kontrolle (pIPKTA30)*
217 µl Ca(NO₃)₂ (1 M, Roth, Karlsruhe, Dt.)

* Die Konzentration des Vektors pIPKTA30 bzw. des RNAi Konstrukts betrug 1µg/µl.

Die Transformation der Gerstenblätter wurde unter Verwendung des *Biolistic Particle Delivery Systems* (Model PDS-1000/He) von BioRad (Hercules, CA, USA) durchgeführt. Vor dem Beschuss der Blätter wurden alle benötigten *Macrocarrier* und *Zerreischeiben (Rupture Disks)* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in Ethanol (reinst, >96%) gewaschen und getrocknet.

Da sowohl für die Kontrolle als auch für die RNAi Konstrukte zwei Schüsse pro Experiment erfolgten, wurden jeweils 7 *Macrocarrier* in die beiden zur Verfügung stehenden BioRad Hepta-Adapter eingesetzt und der vorbereitete Gesamtansatz der mit DNA beschichteten Goldpartikel geteilt. Je 30 µl des Ansatzes wurden gleichmäßig auf allen 7 *Macrocarrier* aufgetragen und bei RT getrocknet.

Während der Trocknung wurde eine Petrischale mit den auf Phytoagar fixierten Blättern (siehe 2.11.2) auf der zweiten Ebene von unten in der Kammer der Partikelkanone positioniert und eine *Zerreischeibe* (900 psi, BioRad) in den dafür vorgesehenen Sprühkopf eingesetzt. Danach wurde der Hepta-Adapter zusammen mit einem Stoppgitter in der vierten Ebene von unten platziert. Der Abstand zwischen Stoppgitter und Blättern betrug somit etwa 5 cm. Mittels einer Membranvakuumpumpe wurde jetzt die Luft aus der Kammer evakuiert (Vakuum von 27 mm Hg) und gleichzeitig ein Überdruck an der *Zerreischeibe*

erzeugt. Für den Druckaufbau wurde das Edelgas Helium benutzt, da dieses chemisch inert ist. Nach Erreichen eines Druckes von 900 psi (± 100 psi) brach die Zerreischeibe und die *Macrocarrier* wurden in Richtung der Petrischale beschleunigt und durch das Stoppgitter abgefangen. Den Trägheitsgesetzen folgend beschleunigten die Goldpartikel durch das Gitter weiter, wo sie im Bruchteil einer Sekunde später die Epidermis der Primärblattsegmente erreichten und die Zellen penetrierten. Aufgrund der gewählten spezifischen Parameter (d.h. Größe der Goldpartikel, Zerreischeibe, Abstand zw. Blättern und Stoppgitter) sind nur Zellen der Blattepidermis transformiert worden.

Im Anschluss an den Beschuss wurden alle Petrischalen geschlossen und in einem klimatisierten Raum (18°C) mit natürlichem indirektem Tageslicht inkubiert. Die vorhandene Lichtstärke betrug hier $30 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ PPF (Photosynthetic Photon Flux Density). Diese Lichtverhältnisse (Qualität) erwiesen sich als optimal um die Seneszenz der Blattsegmente zu minimieren.

2.11.3 Mikroskopie der fluoreszierenden Zellen

Nach Inkubation der Blätter für 24 h im klimatisierten Raum erfolgte die Auswertung der Fluoreszenz des ersten Reporterproteins (GFP) mit dem Axioplan 2 Mikroskop der Carl Zeiss AG (Jena, Deutschland). Die Detektion von grün fluoreszierenden Epidermiszellen wurde unter Verwendung des Filtersets 10 (Anregung: BP450-490, Strahlteiler: FT510, Emission: BP515-565) durchgeführt. Für die Auszählung der Zellen wurde jeweils ein Blatt mit der adaxialen Seite nach oben auf einen Objektträger gelegt und mit einem zweiten Objektträger bedeckt, so dass sich das Blatt nicht aufwölben konnte. Dann wurde sofort zügig mikroskopiert, um die Zeit zu minimieren, in der das Blatt aufgrund der warmen Lichtquelle (Auflichtfluoreszenz) bereits einem Stress ausgesetzt war. Im Anschluss daran wurde das Blatt sofort zurück auf Phytoagar gelegt. Pro Blatt wurde jeweils eine Gesichtsfeldbreite, welche sich von der Spitze bis zum unteren Ende entlang der Blattmitte erstreckte, unter 100facher Vergrößerung ausgewertet. Auf diese Weise wurden alle Blätter des Experiments untersucht. Nach Ermittlung der fluoreszierenden Zellen wurde ein Teil der Blätter dem Stress durch Dehydration ausgesetzt (siehe 2.11.4).

Vier Tage nach Beginn des Stresses wurde die Fluoreszenz des zweiten Reporterproteins (DsRED) analysiert. Hierfür wurden die Blätter vor der Auswertung mit einer 1 % Tween Lösung (Fluka) bedeckt und erneut mit 100facher Vergrößerung mikroskopiert. Dabei wurde dieses Mal nicht nur ein bestimmtes Gesichtsfeld ausgewertet, sondern das gesamte Blatt betrachtet. Für die mikroskopische Betrachtung der rot fluoreszierenden Zellen wurde das Filterset 15 (Anregung: BP546/12, Strahlteiler: FT580, Emission: BP590) verwendet (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland).

Aus den ermittelten Daten konnte zum Abschluss das Verhältnis zwischen GFP und DsRED Zellen ermittelt werden (siehe 2.11.5). Die Dokumentation der GFP bzw. DsRED exprimierenden Zellen erfolgte unter Verwendung einer Digitalkamera (AxioCam, Carl Zeiss AG, Deutschland), welche am Mikroskop installiert war.

2.11.4 Stressapplikation

Nach Auszählung der GFP Zellen wurden die Petrischalen mit den Kontrollen auf Phytoagar (erster Schuss) wieder in den klimatisierten Raum (18°C) zurückgebracht, während die restlichen Blätter (zweiter Schuss) der Stressbehandlung unterzogen wurden.

Hierfür wurde Filterpapier (Typ 813, Macherey-Nagel, Düren, Dt.) entsprechend der Form des Deckels einer Petrischale angepasst und zusammen mit diesem gewogen. Nachdem das Gewicht bekannt war wurden die Blätter (pro Schuss und Konstrukt 5) auf dem Filter mit der adaxialen Seite nach oben platziert und erneut das Gewicht ermittelt. Aus beiden Gewichten konnte somit das Frischgewicht berechnet werden, welches für den Dehydrationsschritt von großer Bedeutung ist. Während die Blätter bei RT dehydrierten, wurde der Wert für das relative Frischgewicht berechnet, welcher erreicht werden musste. Dabei wurde festgesetzt, dass die Blätter bis auf ein relatives Frischgewicht (RFW) von ~60% dehydriert werden sollten. Abhängig von der Art des Experiments wurde das Gewicht der Blätter auch auf 55% oder 50% RFW reduziert.

Nach Erreichen des finalen RFW wurde tröpfchenweise 350 µl Aq.dest., versetzt mit Benzimidazol (Endkonz. 5 ppm, Fluka), auf dem Filterpapier verteilt und der Boden der jeweiligen Petrischale in den Deckel gesetzt. Die Petrischale

wurde zusätzlich mit Parafilm (Pechiney, Chicago, IL, USA) versiegelt, um den Wasserverlust und damit verbunden die Verringerung der Luftfeuchte innerhalb der Schale über die gesamte Stressperiode zu reduzieren.

Vier Tage nach Beginn der Stressperiode wurde vor der Auswertung der Fluoreszenz erneut das Gewicht der Blätter jeder Schale bestimmt, um zu ermitteln, ob eine Gewichtszunahme oder eine weitere Abnahme erfolgt war. Hierzu wurde wieder das Ausgangsgewicht mit dem Endgewicht verrechnet, um das endgültige relative Frischgewicht zu erhalten.

Benzimidazol Stammlösung:

40 mg/ml in 96% Ethanol (reinst)

2.11.5 Berechnung der Fluoreszenz-Verhältnisse

Die Verrechnung der aus der mikroskopischen Analyse erhaltenen Daten sollte einen Aufschluss über die Wirkung eines RNAi Konstrukts, das gegen ein bestimmtes Gen gerichtet war, geben. Zu diesem Zweck wurden die mittels GFP normalisierten Zahlen DsRED-fluoreszierender Zellen in Abhängigkeit von RNAi Konstrukten betrachtet.

Für beide Reporter wurden als erstes jeweils alle benötigten Mittelwerte pro Schuss berechnet. Diese setzten sich aus den 5 ermittelten Einzelwerten der 5 Blätter pro Schale (bzw. Schuss) zusammen. Danach wurde der Mittelwert für das rotfluoreszierende Protein (DsRED) auf den Mittelwert für das grün fluoreszierende Protein (GFP), sowohl unter Kontrollbedingungen (Phytoagar) als auch unter Stressbedingungen (Filter), normalisiert. Im Anschluss daran wurde der unter Kontrollbedingungen ermittelte Wert auf 100% und der Wert unter Stressbedingungen mit diesem ins Verhältnis gesetzt. Das Ergebnis war also ein relativer Wert, der auf dem Verhältnis zwischen Kontrolle und Stressbehandlung basierte. Dieser Wert wurde für jedes Konstrukt inklusive der leeren Vektorkontrolle pIPKTA30 berechnet.

Um jetzt einen Rückschluss auf die Wirksamkeit eines RNAi Konstruktes ziehen zu können, mussten wiederum die berechneten relativen Werte der Kontrollen mit den relativen Werten der RNAi Konstrukte erneut ins Verhältnis gesetzt werden (siehe auch Abbildung 4).

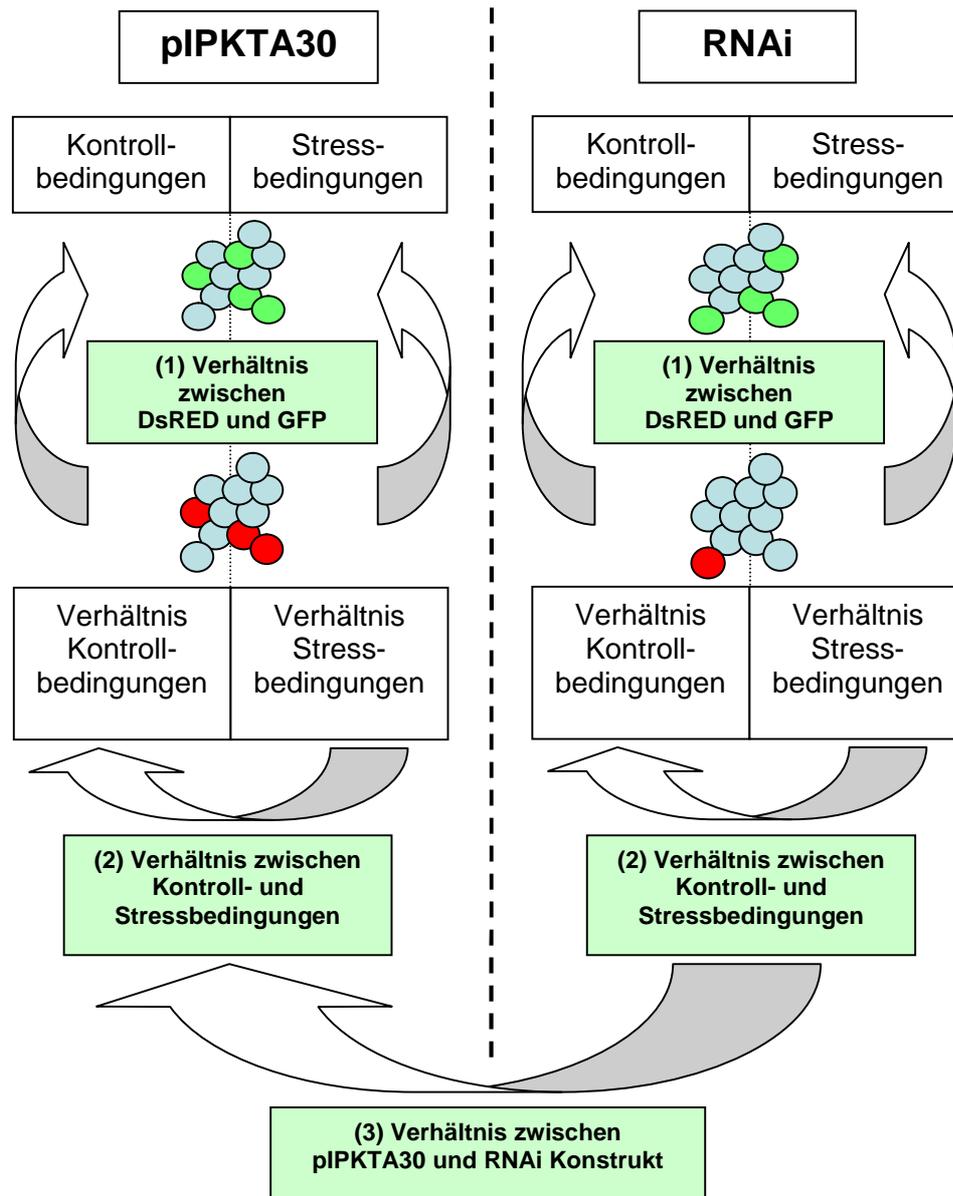


Abbildung 4: Darstellung der Berechnung der Verhältnisse.

(1) Das Verhältnis von DsRED- zu GFP fluoreszierenden Zellen wurde unter Kontroll- (Phytoagar) und Dehydrationsstressbedingungen bestimmt. **(2)** Der Wert des Kontrollverhältnisses wurde auf 100% und der Wert des unter Stress ermittelten Verhältnisses zu diesem in Relation gesetzt. Der sich daraus ergebende relative Wert wurde **(3)** wiederum auf 100% und mit dem relativen Wert des RNAi Konstruktes ins Verhältnis gesetzt. (pIPKTA30 = leerer Kontrollvektor)

Das finale Ergebnis beinhaltet damit eine Relation zwischen RNAi Konstrukten und Kontrollen unter Stressbedingungen (Berechnung der relativen Werte siehe Absatz zuvor).

2.11.6 Statistik

Für die Auswertung der Experimente war es wichtig, die Daten statistisch abzusichern. Aus diesem Grund wurden alle Konstrukte der ersten Serie (insgesamt 17 Zielgene), welche für die Entwicklung des Konzepts und die Verbesserung der Experimentparameter verwendet wurden, in mindestens fünf Wiederholungen getestet. Anschließend wurde die t-Verteilung nach Student (« *one sample t-test* ») zur Berechnung der Signifikanz herangezogen. Hierbei wurden die ermittelten Werte gegen den hypothetischen Wert 100 zweiseitig getestet. Für Kandidaten, deren Ergebnis signifikant war, wurde der Stichprobenumfang durch weitere Experimente auf 10 unabhängige Wiederholungen erhöht und das Ergebnis in einem gepaarten « *two-sample t-test* » erneut überprüft.

Die Auswertung der verbleibenden 46 Kandidaten erfolgte auf ähnliche Art und Weise. Diese wurden zuerst in zwei unabhängigen Experimenten untersucht und anschließend nur jene herausgefiltert, die den relativen DsRED/GFP Wert (Berechnung siehe 2.11.5) unter die festgelegte Grenze von 85% reduzierten bzw. über 115% erhöhten. Für alle verwendeten Konstrukte die dieses Kriterium erfüllten wurde ein drittes Experiment realisiert. Auf Basis von drei Wiederholungen wurde anschließend das t-Quantil berechnet und der Datensatz nach dem höchsten Wert sortiert. Die « besten » 50% der Kandidaten, welche die höchsten Werte aufwiesen, wurden für zwei weitere Experimente ausgewählt. Das Gesamtergebnis von 5 unabhängigen Wiederholungen pro RNAi Konstrukt wurde wiederum in einem « *one sample t-test* » gegen 100 zweiseitig getestet. Für alle Berechnungen wurde die Software GraphPad InStat 3.06 verwendet.

2.12 GFP-Fusionsklonierung (RNAi *off-target*)

Die Zuverlässigkeit der RNAi vermittelten zielgerichteten Stummschaltung von Genen sollte unter Verwendung von GFP-Fusionskonstrukten am Beispiel zweier DREB2-*like* Gene getestet werden. Hierzu wurde sowohl die Sequenz des *HvDRF1* Gens als auch die Sequenz des *HvDREB1* Gens jeweils in den GFP-Fusionsvektor pIPKTA40 kloniert. Dazu wurden die Sequenzen N-terminal im korrekten Leseraster (*in frame*) translationell mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) fusioniert.

2.12.1 Klonierung von *HvDREB1* in den Vektor pIPKTA40

Um sicherzustellen, dass die größtmögliche Sequenzinformation für das zu untersuchende Gen zur Verfügung stand, wurde vor der Amplifikation eine BLASTN Suche mit dem Klon HS08A23 in der TIGR Datenbank durchgeführt (siehe auch Abschnitt 2.15). Anschließend wurde aus dem ermittelten *Tentative Consensus* (TC) TC150388 ein anderer Klon gewählt, welcher im Unterschied zum Klon HS08A23, mit dessen Sequenz die Suche durchgeführt worden war, einen größeren Bereich des Konsensus erfasste.

Der ausgewählte neue Klon (HX12I08) wurde nun aus der cDNA Datenbank (CR-EST) des IPK herausgesucht und die Zielsequenz mittels ThermalAce™ PCR unter Verwendung der Primer DREB1_GFP_F bzw. DREB1_GFP_R (siehe Tabelle 5, Abschnitt 2.5.4) amplifiziert. Das Produkt wurde über eine NucleoFast 96 PCR Platte gereinigt und anschließend in den pCR®2.1-TOPO® Vektor (Invitrogen) durch folgenden Schritt überführt:

Vom aufgereinigten Amplikon wurden 4 µl zusammen mit 1 µl Salzlösung und 1 µl TOPO® Vektor bei RT für 30 min inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Daran schloss sich die Transformation in chemisch kompetente *E.coli* Top 10 Zellen an (siehe Abschnitt 2.8). Hierfür wurde der komplette Ligationsansatz benutzt.

Durch die Verwendung von LB Platten, die zusätzlich zum Antibiotikum (Ampicillin) auch X-Gal enthielten, konnte ein Blau-Weiß Test zur schnelleren Identifikation von positiven Transformanten, durchgeführt werden. Nach Isolation der DNA aus positiven Kolonien (siehe Abschnitt 2.9.1) wurde 1 µg des TOPO® Vektors mit den Enzymen *Ascl* und *SbfI* laut Herstellerangaben verdaut und der gesamte Restriktionsansatz gelelektrophoretisch in einem 1% Agarosegel aufgetrennt.

LB-Medium (pH 7,0) für Blau-Weiß Test:

| | | |
|----------------------|------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 10 g l ⁻¹ | Bacto™ Trypton (pankr.verd.) | (OTTO Nordwald, Hamburg, Dt.) |
| 10 g l ⁻¹ | NaCl | (Roth, Karl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland) |
| 5 g l ⁻¹ | Hefeextrakt | (Merck, Darmstadt, Dt.) |
| 15 g l ⁻¹ | Bacto™ Agar | (OTTO Nordwald, Hamburg, Dt.) |
| 50 µg/ml | X-Gal | (Fermentas) |
| 50 µg/ml | Ampicillin | (Roth) |

Die Fragmentbande mit der erwarteten Größe wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA unter Verwendung des QIAquick® Gel Extraction Kits daraus (Qiagen GmbH, Hilden, Dt.) eluiert (Abschnitt 2.9.1). Außer dem Fragment wurde ebenfalls 1 µg des Vektors pIPKTA40 mit beiden Enzymen verdaut und die Vektorbande analog isoliert. Im finalen Schritt wurden schließlich 3 µl des geschnittenen PCR Produkts mit 1 µl der linearisierten Vektor DNA mittels T4 Ligase (Fermentas) nach Herstellerprotokoll ligiert. Das fertige Fusionskonstrukt bestehend aus PCR Sequenz und GFP Sequenz wurde durch eine Sequenzierung nochmals überprüft.

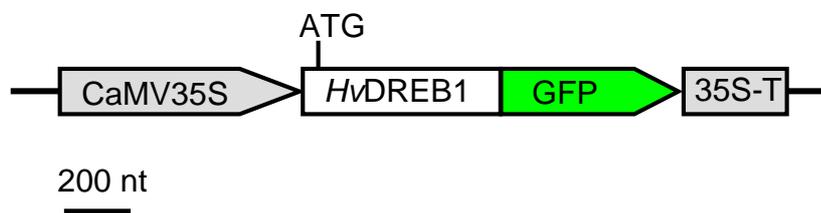


Abbildung 5: Expressionskassette des HvDREB1::GFP-Fusionsproteins.

Blumenkohl-Mosaik-Virus-Promotor (CaMV35S), Blumenkohl-Mosaik-Virus-Terminator (35S-T), DRE binding protein 1 (HvDREB1), Grün Fluoreszierendes Protein (GFP), ATG (Startcodon)

2.12.2 Klonierung von HvDRF1 in den Vektor pIPKTA40

Für das zweite DREB2-like Gen wurde ebenfalls eine BLASTN Suche in der TIGR Datenbank durchgeführt. Hierfür wurde die Sequenz des Klons HU05J23 verwendet. Die anschließende Analyse des ermittelten *Tentative Consensus* (TC) TC147554 ergab, dass der Klon HT08C24 ein größeres Insert enthält. Somit wurde dieser für die Amplifikation mittels ThermalAce™ PCR ausgewählt. Das Fragment wurde mit den Primern HvDRF1_GFP_F und HvDRF1_GFP_R (Tabelle 5, Abschnitt 2.5.4) synthetisiert und ebenfalls in den pCR®2.1-TOPO® Vektor ligiert um ein exaktes Ausschneiden zu garantieren. Die Überführung des PCR Fragments vom TOPO® Vektor in den Zielvektor (pIPKTA40) wurde wie unter 2.12.1 beschrieben durchgeführt.

Sowohl die Auswertung der Sequenzierung des fertigen Konstrukts, als auch eine zusätzlich durchgeführte BLASTX Suche auf der NCBI Internet Seite (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) deckten eine Punktmutation innerhalb der kodierenden Sequenz auf. Da diese Mutation den offenen Leseraster zerstörte und daraus folgend kein funktionstüchtiges Protein gebildet werden

konnte, wurde dies durch eine ortsgerichtete Mutagenese korrigiert (siehe Abschnitt 2.12.3).

Das resultierende *HvDRF1::GFP* Fusionsprotein fluoreszierte allerdings nicht, so dass weitere Maßnahmen ergriffen wurden. Basierend auf der Veröffentlichung von Sakuma et al. (2006), demzufolge ein bestimmter Sequenzabschnitt zur Instabilität des Fusionsproteins führt, wurde dieser aus der zur Verfügung stehenden Sequenz entfernt. Zusätzlich wurde die kodierende Sequenz des grün fluoreszierenden Proteins aus dem Vektor pIPKTA40 amplifiziert und als zweite Kopie vor die Sequenz des Fusionsproteins *in frame* eingefügt, um eventuell ein stärkeres Fluoreszenzsignal zu erhalten.

Hierfür wurden mehrere PCR Reaktionen (siehe Abschnitt 2.10.1) mit unterschiedlichen Primerpaaren durchgeführt und die erhaltenen Fragmente anschließend in den pCR[®]2.1-TOPO[®] Vektor überführt und in chemisch kompetente *E.coli* Top 10 Zellen transformiert. Nach Isolation der DNA (siehe Abschnitt 2.9.1) wurden alle drei Fragmente für die sich anschließenden Ligationen nach Herstellerangaben wie folgt verdaut:

Primerpaar (1) : *HvDRF1_GFP_F* und *HvDRF1_MODIFY_1* mit *Ascl* und *SalI*,
Primerpaar (2) : *HvDRF1_GFP_R* und *HvDRF1_MODI_3* mit *SalI* und *SbfI*,
Primerpaar (3) : *GFP_Smal_F* und *GFP_AscI_R_2* mit *XmaI* und *Ascl*.

In einer ersten Ligrationsreaktion wurden dann die PCR Fragmente der geschnittenen Primerpaare (1) und (2) gleichzeitig in den mit *Ascl* und *SbfI* linearisierten Zielvektor pIPKTA40 transferiert, so dass ein Fusionsprotein bestehend aus der gekürzten Gensequenz und der Sequenz für das grün fluoreszierende Protein entstand.

Ligationsmix (1):

1 µl H₂O (Millipore)
2,5 µl Ligationspuffer (10x)
2,5 µl 50% PEG₄₀₀₀
1 µl pIPKTA40 linearisiert (150 ng/µl)
6 µl PCR Produkt (Primerpaar 1) (aufgereinigt, siehe Abschnitt 2.10.1)
10 µl PCR Produkt (Primerpaar 2) (aufgereinigt, siehe Abschnitt 2.10.1)
2 µl T4 Ligase (5U/µl)

Der Ligationsansatz (Mix 1) wurde dazu für ca. 1,5 h bei RT inkubiert und anschließend in *E.coli* Top 10 Zellen transformiert. Die Isolation der Plasmid DNA wurde wie unter 2.9.1 beschrieben durchgeführt und die nun kürzere Gensequenz mit den Primern HvDRF1_GFP_F und HvDRF1_GFP_R für eine folgende Sequenzierung amplifiziert.

Die zweite Ligationsreaktion bestand darin, das PCR Produkt des dritten Primerpaares (GFP-Amplikon) und das für die Sequenzierung gebildete PCR Produkt (*HvDRF1* gekürzt) zu vereinen und in einen noch unveränderten pIPKTA40 Vektor zu ligieren. Dafür wurde wiederum zuerst der Zielvektor (pIPKTA40), dem Herstellerprotokoll folgend, mit den Restriktionsenzymen *Xma*I und *Sbf*I linearisiert und anschließend das PCR Produkt mit *Asc*I und *Sbf*I verdaut. Die Ligation (Mix 2) wurde dann für ca. 2 h bei RT durchgeführt und 10 µl des Gesamtansatzes in chemisch kompetente *E.coli* Top 10 Zellen transformiert.

Ligationsmix (2):

- 2 µl H₂O (Millipore)
- 2 µl Ligationspuffer (10x)
- 2 µl 50% PEG₄₀₀₀
- 1 µl pIPKTA40 linearisiert (150 ng/µl)
- 6 µl PCR Produkt (Primerpaar 3) (aufgereinigt, siehe Abschnitt 2.10.1)
- 6 µl PCR Produkt (Sequenzierung) (aufgereinigt, siehe Abschnitt 2.10.1)
- 1 µl T4 Ligase (5U/µl)

Das Resultat der zwei Ligationsreaktionen war ein Fusionskonstrukt, gebildet aus zwei GFP Sequenzen und einer kürzeren Version der kodierenden Sequenz für das *HvDRF1* Gen.

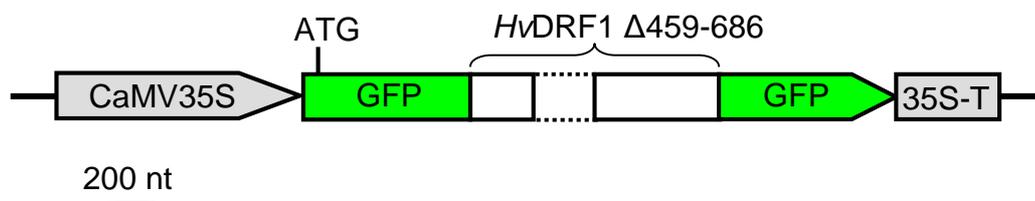


Abbildung 6: Expressionskassette des GFP::*HvDRF1*::GFP-Fusionsproteins.

Blumenkohl-Mosaik-Virus-Promotor (CaMV35S), Blumenkohl-Mosaik-Virus-Terminator (35S-T), *Dehydration-responsive factor 1* (*HvDRF1*), Grün Fluoreszierendes Protein (GFP), ATG (Startcodon), $\Delta 459-686$ (Deletion der kodierenden Sequenz des Gens *HvDRF1*)

2.12.3 Ortsgerichtete Mutagenese (*Site-Directed Mutagenesis*)

Die Korrektur des Leserasters durch die Einführung einer Punktmutation in die kodierende Sequenz des *HvDRF1* Gens erfolgte durch die Verwendung des QuickChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Als Matrize für die PCR Reaktion diente der Vektor pIPKTA40, welcher bereits die Sequenz von *HvDRF1* enthielt (siehe 2.12.2). Für die Amplifikation wurden insgesamt 5 ng Plasmid DNA eingesetzt. Der gesamte Ansatz enthielt außer den speziell entwickelten Primern (siehe Tabelle 4, Abschnitt 2.5.3) die *PfuTurbo* DNA Polymerase, einen dNTP Mix sowie den für die Reaktion erforderlichen Puffer.

PCR-Reaktionsansatz:

19 µl H₂O (Millipore)
2,5 µl Reaktionspuffer (10x)
1 µl pIPKTA40 (5 ng/µl)
1 µl Mutageneseprimer Vorwärts (*HvDRF1_MUTA_F*)
1 µl Mutageneseprimer Rückwärts (*HvDRF1_MUTA_R*)
0,5 µl dNTP
0,5 µl *PfuTurbo* DNA Polymerase (5U/µl)

Im Unterschied zu der im Abschnitt 2.10.1 beschriebenen PCR wurde im ersten Schritt für 30 sek der DNA Doppelstrang bei 95°C denaturiert. Daran schlossen sich 12 Zyklen mit folgendem Ablauf an:

Denaturierung (bei 95°C, 30 sek), Primeranlagerung (bei 50°C, 1 min), Primer Verlängerung (bei 68°C, 5 min 30 sek). Nach Beendigung der PCR wurde der Ansatz auf Eis für 2 min gekühlt und anschließend 0,5 µl *DpnI* Enzym (10U/µl) direkt in das PCR Reaktionsgefäß gegeben.

Nach vorsichtigem mixen und der Zentrifugation bei 330 rpm wurde er für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend 5 µl daraus in chemisch kompetente *E.coli* Top 10 Zellen transformiert (siehe Abschnitt 2.8).

2.13 Bestimmung des *Relative Water Content* (RWC)

Während der Experimente wurde das relative Frischgewicht (RFW, *relative fresh weight*) bestimmt, um zu kontrollieren, ob eine weitere Gewichtsabnahme oder -zunahme in Folge des Stresses stattfand. Diese Überprüfung konnte keine Aussage über den tatsächlichen Wassergehalt geben, so dass weitere Messparameter ermittelt werden mussten.

Hierzu wurden die gestressten Blätter am Ende eines Experiments nach der Ermittlung des Gewichts in Petrischalen mit destilliertem Wasser (Millipore) gelegt und für 24 h im Kühlschrank rehydriert. Am nächsten Tag wurde das Gewicht gemessen und die Blätter für 48 h bei 65°C vollständig getrocknet. Das Gewicht wurde wiederum bestimmt und alle Daten für die Berechnung des relativen Wassergehalts in folgende Formel eingesetzt:

$$\text{RWC (\%)} = [(\text{FW}-\text{DW}) / (\text{TW}-\text{DW})] \times 100$$

FW = *Fresh Weight* (Frischgewicht)

TW = *Turgid Fresh Weight* (vollständig turgides Blattmaterial)

DW = *Dry Weight* (Trockengewicht)

2.14 DAB Färbung (H₂O₂ Detektion)

Um das in dieser Arbeit beschriebene Testsystem, bestehend aus biolistischer Transformation und anschließender partieller Dehydrierung, noch näher zu charakterisieren, wurde eine Färbung mit 3,3'- Diaminobenzidin (DAB) zur Detektion von reaktiven Sauerstoffspezies durchgeführt. Es wird vermutet, dass diese eine Reihe von Prozessen beeinflussen können (siehe Einleitung). Höchstwahrscheinlich spielen sie nicht nur eine wichtige Rolle in der Regulation der Genexpression durch Änderung der Aktivität von Transkriptionsfaktoren, sondern sind auch an der Signalübertragung während der Schließung der Stomata beteiligt.

Neben der Signaltransduktion können sie ebenfalls zur Einleitung des programmierten Zelltods beitragen oder übernehmen eine Funktion bei der Ausbildung des Gravitropismus (Apel und Hirt, 2004).

Die Färbung wurde nach der Methode von Vallélian-Bindschedler et al. (1998) durchgeführt und dabei leicht modifiziert. Die transformierten und gestressten Blätter wurden 1 h, 24 h und 96 h nach Beginn des Stresses gefärbt. Dazu wurden sie in einer DAB Lösung (1 mg/ml) im Exsikkator unter Vakuum infiltriert und anschließend 3 h bei RT inkubiert. Die DAB Lösung wurde vor jedem Experiment frisch angesetzt und mit KOH auf einen pH Wert von 4,3 eingestellt.

Die Blätter wurden dabei jeweils so lange infiltriert, bis sie automatisch auf den Boden des verwendeten PVC Röhrchens absanken und keine Luft mehr in ihnen enthalten war.

Nach erfolgter Inkubation wurden die Blätter der Lösung entnommen und die Reaktion, durch entfärben in Chloralhydrat (2,5 g/ml) ü.N., gestoppt. Am darauffolgenden Tag waren die Blätter vollständig entfärbt, so dass Aufnahmen mit der Spiegelreflexkamera EOS 300D Digital von Canon angefertigt werden konnten.

2.15 Software und Datenbanken

Die Anfertigung dieser Arbeit erforderte die Anwendung verschiedener Softwareprogramme (z.B. zur statistischen Auswertung der Datensätze), die Verwendung von Datenbanken (z.B. zur Durchführung von Nukleotidsequenzvergleichen), als auch die Nutzung diverser frei verfügbarer Internetdienste zur Identifikation geeigneter Kandidaten und Analyse der im *Screen* erhobenen Daten:

- Verwendung der NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) Datenbank zur Recherche von Publikationen.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Verwendung der (NCBI) BLAST Funktion (*Basic Local Alignment Search Tool*) zum Vergleich von Nukleotidsequenzen, sowie der Identifikation von Genen, welche für die Untersuchungen der Trockenstressantwort bei Gerste relevant waren.
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Nutzung des ISI (*Institute for Scientific Information*) *Web of Knowledge*SM zur Recherche von Informationen, insbesondere von Publikationen zum Thema Trockenstress.
<http://www.isiwebofknowledge.com/>

- Verwendung der CR-EST (*Crop EST Database*, Version 1.5) Datenbank zur Identifikation von cDNA Klonen.
<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/cr-est/index.php>
- Suche nach *Contigs* sowie ESTs (*expressed sequence tags*) in der HarvEST (Barley 1.68, Assembly 35) Datenbank.
<http://www.harvest-web.org/>
- Identifikation von *Tentative Consensi* (TC) und Suche nach ESTs im TIGR Gersten – Genindex 9.0 (September 2004). J.Craig Venter™ Institut
Jetzt: *The Gene Index Project*
Computational Biology and Functional Genomics Laboratory
Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA
<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>
- Verwendung der PLEXdb (*Plant Expression Database*) Datenbank zur Identifikation von Genen und deren möglicher Expression (Affymetrix Barley1 22k GeneChip).
<http://www.plexdb.org/>
- Verwendung von Lasergene (Version 6, DNASTAR Inc., Madison, USA) für das Design von Primerpaaren, die vergleichende Analyse von Sequenzen sowie das Erstellen von Vektorkarten und Expressionkassetten (Visualisierung).
- Berechnung der Statistik mittels der Software GraphPad InStat 3.06 (Graphpad Software Inc., La Jolla, CA, USA).
- Auswertung der *Real-time* PCR, Berechnung der Standardkurven und der gebildeten Transkriptmenge mit der Software SDS 2.2.1 (**S**equen**D**etection **S**ystems, Applied Biosystems)

- Analyse der für die RNAi Konstrukte verwendeten Sequenzen, Überprüfung von *off-target* Effekten mit dem RNAi Scan (Xu et al., 2006)

<http://bioinfo2.noble.org/RNAiScan.htm>

bzw. Verwendung der Beta-Version des Softwaretools si-Fi

<http://www.Labtools.ipk-gatersleben.de>

Dieses Tool beinhaltet die HarvEST Datenbank (Barley 1.68, Assembly 35).

- Microsoft Windows XP und Excel 2003

3. Ergebnisse

Pflanzen haben im Laufe der Evolution unterschiedliche Mechanismen entwickelt, um extremen Umwelteinflüssen widerstehen zu können. Neben einer Vielzahl von abiotischen Faktoren (Kälte, Trockenheit, Schwermetalle, hohe Salzkonzentrationen etc.) spielen ebenso biotische, wie zum Beispiel Fraßfeinde, eine große Rolle.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es ein Testsystem zu entwickeln, das es ermöglicht Kandidatengene der Trockenstresstoleranz zu identifizieren. Dazu wurden mittels transienter RNA Interferenz Kandidatengene stummgeschaltet. Während der Analysen konnten auf diese Weise insgesamt 19 Gene gefunden werden, deren Stummschaltung einen signifikanten phänotypischen Effekt unter Trockenstressbedingungen erzeugte.

3.1 TIGS

Die revers-genetische Methode der Ausschaltung eines Genes mittels RNA-Interferenz (RNAi) und der sich anschließenden Untersuchung des daraus hervorgehenden Phänotyps, wurde ursprünglich zur Analyse der Pathogenabwehr im Gerste-Mehltau System entwickelt (Schweizer et al. 2000; Panstruga, 2004). Die Analyse basiert auf der biolistischen Transformation von Epidermiszellen mit Goldpartikeln, welche ein RNAi Konstrukt sowie ein Reporterkonstrukt (β -Glucuronidase, GUS) tragen. Im Anschluss erfolgt die Inokulation und Inkubation mit Pilzmaterial sowie die GUS-Färbung zur Detektion der transformierten Zellen. Die mikroskopische Analyse und statistische Auswertung kann aus den Ergebnissen resultierend Rückschlüsse auf die Funktion des untersuchten Kandidatengens geben.

Eine Weiterentwicklung dieser Technologie brachte den Einsatz von zwei Fluoreszenzmarkern, die es möglich machten, effektiv und schnell die Leistungsfähigkeit des Systems abzuschätzen (Panstruga et al. 2003). Die Co-Transformation mit einem Reporterkonstrukt bestehend aus einer GFP::Gen::DsRED Kasette und einem Effektorkonstrukt (RNAi) erlaubte eine exakte Aussage darüber, wie effizient die Methode war. 97% der Zellen zeigten eine gleich starke Fluoreszenz beider Fluoreszenzmarker, wenn nur mit dem Reporterkonstrukt transformiert wurde. Wohingegen dieser Effekt bei

gleichzeitiger Transformation von Reporter- als auch Effektor-konstrukt nur in 4% der Zellen zu beobachten war, d.h. es fand eine auf Homologie basierende « Stummschaltung » des Zielgens statt.

Die Grundidee dieses revers-genetischen Ansatzes als auch seine Verbesserung durch Nutzung zweier fluoreszierender Proteine sollte in der aktuellen Arbeit für die Untersuchung von Trockenstress, herbeigeführt durch Dehydration, angewandt werden.

Die Reaktion der Pflanze auf Stress durch Dehydration erfordert eine Vielzahl von Genen, die über ein komplexes Netzwerk miteinander interagieren. Bisher sind jedoch erst wenige Komponenten dieses Netzwerkes bekannt (siehe Einleitung). Mit Hilfe der Methode des vorübergehenden Stummschaltens (*Transient-induced gene silencing*, TIGS) sollten einzelne Gene gezielt ausgeschaltet werden, um zu ermitteln, ob sie eine Rolle innerhalb dieses Netzwerkes spielen oder vielleicht sogar eine Schlüsselrolle einnehmen. Dazu wurden Primärblätter der Gerste (cv. Golden Promise) mittels Partikel-Bombardement mit RNAi-Konstrukten transformiert, nach deren Expression es zur Bildung doppelsträngiger RNA-Haarnadelstrukturen in der Zelle kommt. Diese führen zum Abbau sequenzidentischer oder ähnlicher mRNA Moleküle. Eine weitere interessante Frage die sich im Laufe der Arbeit stellte war, ob es unterschiedliche TIGS Effekte in anfälligen und resistenten Sorten (cv.) der Gerste gibt. Für diese Frage wurden neben Golden Promise ebenfalls Morex und Steptoe untersucht. Man würde erwarten, dass durch die Stummschaltung von Genen die Resistenz einer Sorte beeinflusst werden kann und sich dies auf den Phänotyp auswirken würde.

Der dritte wichtige Aspekt dieser Arbeit ergab sich aus den beobachteten Ergebnissen. Das RNAi-Testsystem sollte breiter eingesetzt werden können, so dass eine Adaption auch auf andere Pflanzenarten (von besonderem Interesse sind weitere Vertreter der Poaceae wie Weizen, Mais und Reis) mit geringfügigen Änderungen möglich wäre. Außerdem sollte das System so angepasst werden, dass im Hochdurchsatzverfahren mehrere hundert Gene getestet werden könnten.

3.1.1 Das TIGS Testsystem für Gene der Trockenstresstoleranz

Jedes TIGS Experiment wurde mit dem Beschuss (biolistische Transformation, siehe 2.11.2) von Primärblattsegmenten der Gerstensorte Golden Promise begonnen. Die Beschussparameter waren dabei so gewählt worden, dass nur die Blattepidermis transformiert werden konnte. Ein Experiment umfasste zwei Schüsse pro untersuchtem RNAi Konstrukt, sowie zwei Schüsse für den Vektor pIPKTA30, der als Negativkontrolle diente. Später wurden drei Kontrollen pro Experiment mitgeführt, da sich herausgestellt hatte, dass es zu Schwankungen des DsRED/GFP Wertes infolge der Dehydration kommen kann. Dies hatte nicht nur Auswirkungen auf den Wert der Kontrolle, sondern auch auf den DsRED/GFP Wert des RNAi Konstruktes. War der Kontrollwert zu niedrig, konnte der Effekt des RNAi Konstruktes nicht mehr beobachtet werden. Das Schwanken der Kontrollen sollte durch die Bildung des Mittelwertes aus drei Einzelwerten kompensiert werden.

3.1.2 Die Akkumulation von DsRED und GFP

Die Visualisierung des RNAi Effektes und die damit verbundene Auswertung erfolgt über den Einsatz von zwei Fluoreszenzmarkern. Hierbei dient das innerhalb weniger Stunden sichtbare grün fluoreszierende Protein (GFP) zur Identifikation der transformierten Zellen und damit verbunden der Einschätzung der Transformationseffizienz. Basierend auf der Kinetik der Anzahl GFP-fluoreszierender Zellen schien der Zeitpunkt 24h (p.B.) für eine Normalisierung der DsRED-Zellzahl, gemessen nach 120 h (p.B.), am geeignetsten.

Im Unterschied zum GFP wird das rot fluoreszierende Protein (RFP bzw. DsRED) deutlich langsamer gebildet. Es ist bekannt, dass die Faltung des Proteins zu einem Homotetramer komplex ist und längere Zeit in Anspruch nehmen kann (Baird et al., 2000; Gross et al., 2000).

Während meiner Untersuchungen zur Kinetik der Reporterproteine konnten die ersten rot fluoreszierenden Zellen frühestens nach 48 h (p.B.) beobachtet werden (Abbildung 7). In etwa 50% der GFP Zellen wurde 120 h (p.B.) ebenfalls DsRED gebildet. Für die Untersuchungen der Trockenstresstoleranz war dieses Protein jedoch nicht nur aufgrund dessen Kinetik interessant, sondern auch hinsichtlich der Anfälligkeit unter denaturierenden Bedingungen.

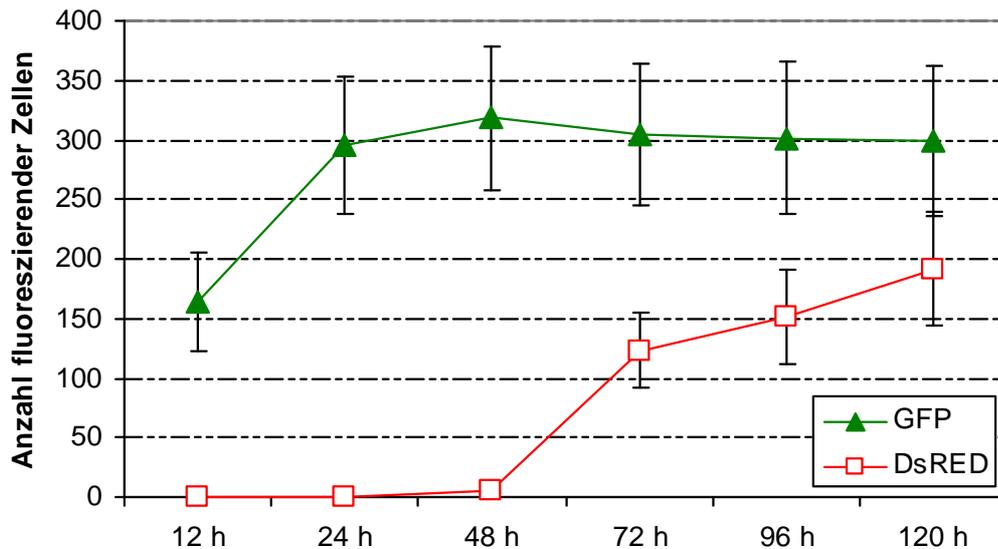


Abbildung 7: Darstellung der Kinetik der beiden Fluoreszenzmarker GFP und DsRED unter Kontrollbedingungen.

Im Diagramm wird die Anzahl an fluoreszierenden Zellen pro Zeitpunkt, für beide Reporter, dargestellt. Es wurden jeweils 5 Blätter ausgewertet, indem zuerst die GFP exprimierenden Zellen und anschließend die DsRED exprimierenden Zellen für dasselbe Blatt gezählt und die Mittelwerte gebildet wurden. Die Streuungsbalken geben den Fehler der Standardabweichung wieder.

Dehydrationsstress führt erwartungsgemäß zur Zerstörung des Chromophors durch Denaturierung und damit zum Verlust der Fluoreszenz (Gross et al., 2000). Des Weiteren ist es möglich, dass bereits gebildete Homomeruntereinheiten proteolytisch abgebaut werden. Neben der Zerstörung des Chromophors und dem proteolytischen Abbau kann es außerdem zur Störung der Assemblierung der Untereinheiten des Homotetramers kommen. Es ist ferner auch möglich, dass die Fluoreszenz infolge von Zelltod verloren geht (Abbildung 8).

Wie bereits in Abschnitt 2.11.5 (Berechnung der Verhältnisse) erwähnt, wurden für die Auswertung, ob ein RNAi Konstrukt eine Auswirkung auf die Dehydratationstoleranz einer Zelle hat, Verhältnisse zwischen DsRED Zellen und GFP Zellen gebildet und zwischen leerer Vektorkontrolle (pIPKTA30) und RNAi Vektor verglichen. Diese Methode basiert auf der Annahme, dass, wenn das entsprechende Zielgen für die Abwehr der negativen Folgen des Stresses benötigt wird, wie z.B. die Beseitigung von ROS, dieser die Assemblierung von DsRED stärker stört, was sich in der Absenkung der Anzahl an DsRED Zellen manifestiert.

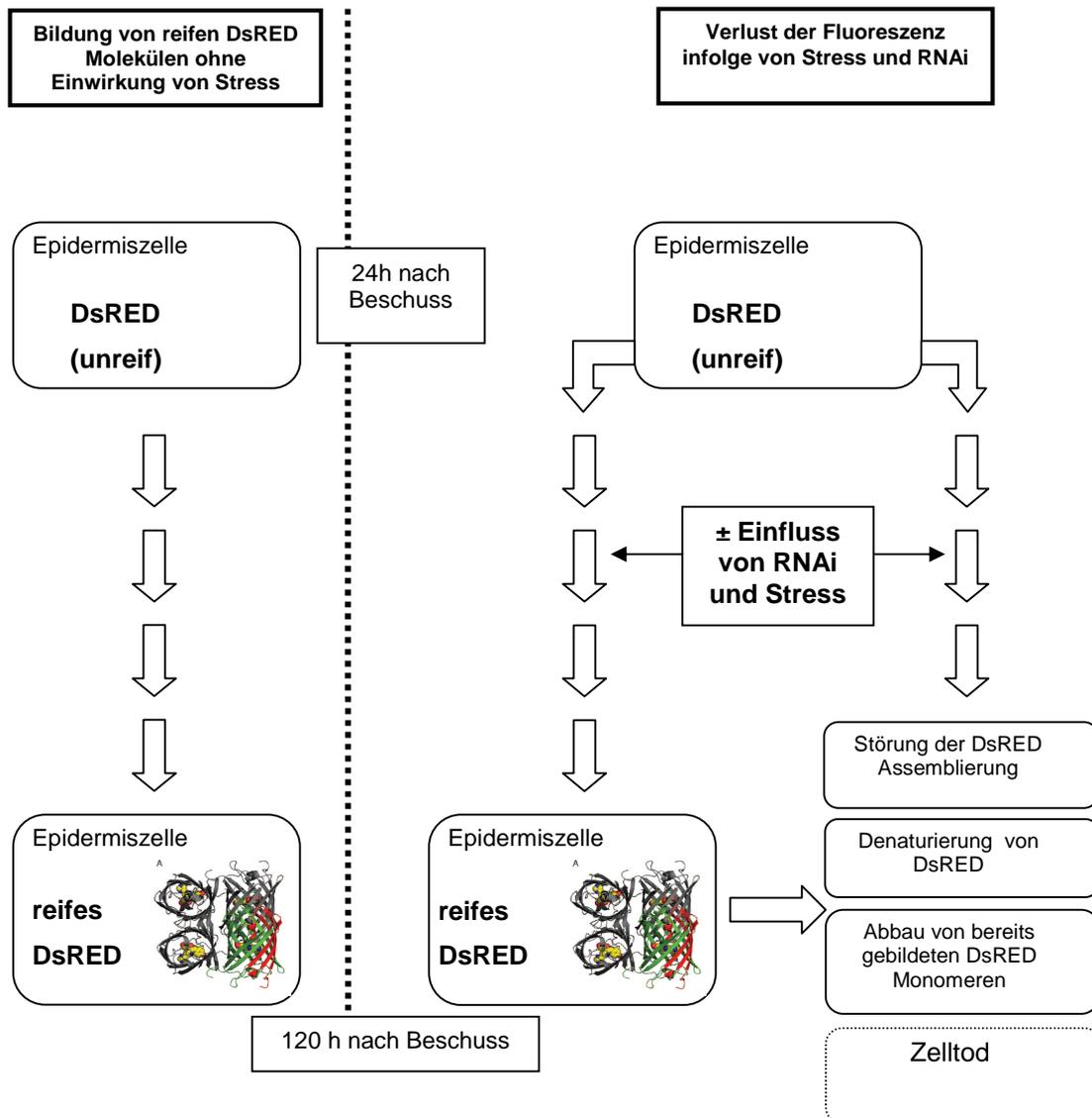


Abbildung 8: Schema der Idee zur Akkumulation von DsRED unter Stressbedingungen.

Die Übersicht stellt die Möglichkeiten des Verlustes der Fluoreszenz, sowohl in Abhängigkeit des applizierten Dehydrationsstresses, als auch in Gegenwart eines RNAi Konstruktes dar. Der Einfluss des RNAi Konstruktes kann über den Stress hinaus zu einer zusätzlichen Absenkung der Anzahl DsRED fluoreszierender Zellen führen.

Tatsächlich konnte in allen durchgeführten Experimenten gezeigt werden, dass im Vergleich zur Kontrolle unter Stressbedingungen weniger Zellen fluoreszierendes DsRED bilden (Abbildung 17).

Durch den Einsatz eines RNAi Konstruktes war es möglich, die DsRED Zahlen und damit verbunden das Verhältnis von DsRED- zu GFP fluoreszierenden Zellen bei 19 der insgesamt 63 getesteten Kandidaten, im Verhältnis zur Kontrolle, signifikant weiter zu reduzieren (siehe 3.3 und 3.4).

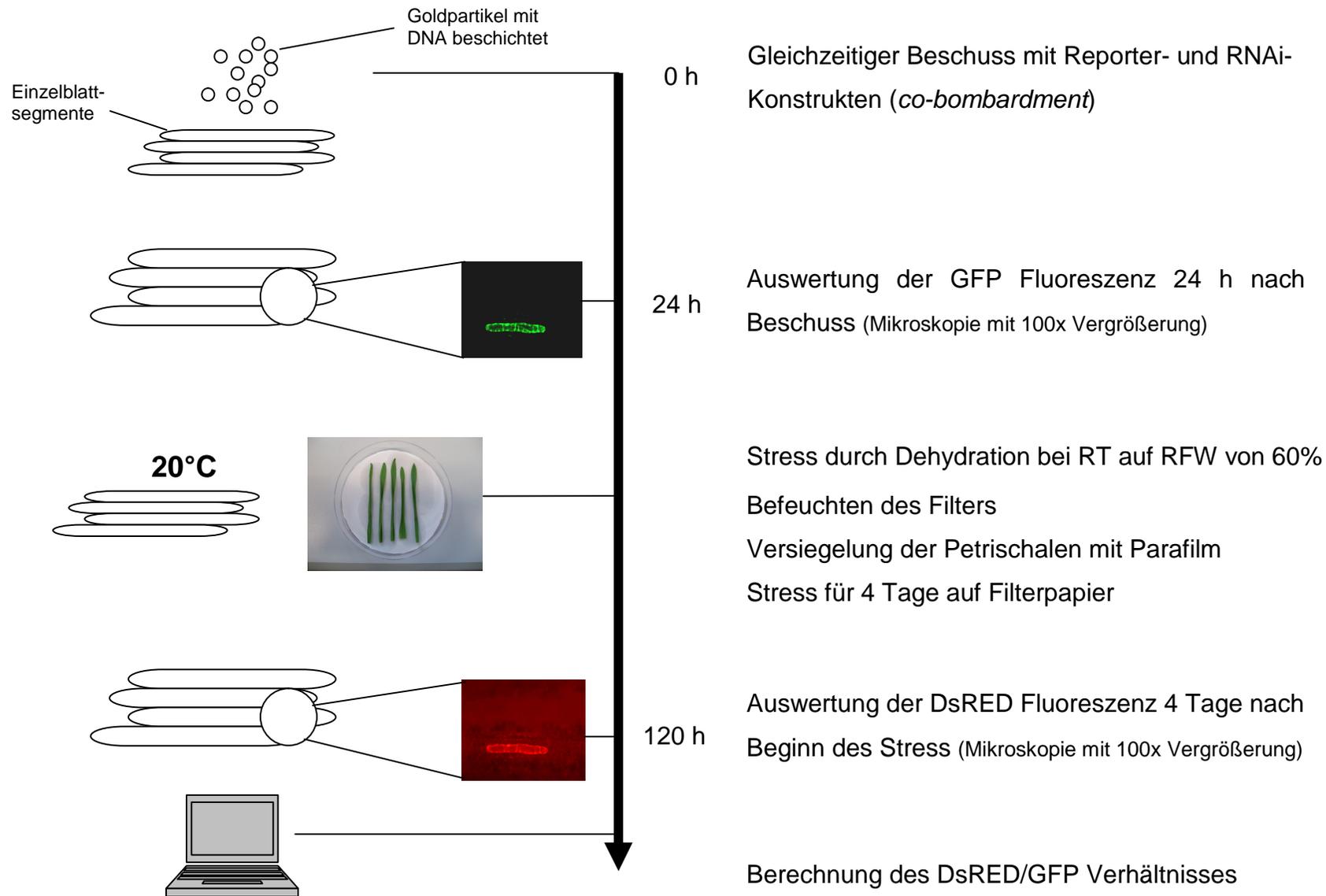


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Experimentablaufs des RNAi Screens.

3.2 Auswahl der Kandidaten für den RNAi Screen

Die Konzeption des RNAi Screens (Ablauf siehe Abbildung 9) und die anschließende Überprüfung seiner Funktionalität erforderte als erstes die Zusammenstellung eines Satzes an Genen (Tabelle 7), die in der Literatur hinsichtlich ihrer Bedeutung unter Trockenstressbedingungen, in unterschiedlichen Pflanzen (z.B. *Arabidopsis thaliana*) bereits beschrieben worden sind. Hierzu wurde eine Literatur-recherche in der NCBI Datenbank PubMed durchgeführt.

Mit den ermittelten Nukleotidsequenzen wurde im Anschluss eine BlastN Suche in der Gersten-EST-Datenbank des IPK (Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung), unter Verwendung der Funktion *Blast against CR-EST*, ausgeführt und aus der sich ergebenden Trefferliste ein geeigneter Klon ausgewählt.

Die verwendete CR-EST Datenbank umfasst zum jetzigen Zeitpunkt (Stand Februar 2009) 37 cDNA Bibliotheken, die insgesamt wiederum etwa 206640 *expressed sequence tags* enthalten.

Darüber hinaus liefert CR-EST ebenfalls BlastX Ergebnisse, welche eine gezielte Stichwortsuche nach bestimmten Genen ermöglicht.

Für die Auswahl der Klone war von besonderer Bedeutung, dass die Länge der Fragmente der cDNA Insertionen ca. 500 Basenpaare betrug, was eine hinreichend gute RNAi Effizienz erwarten lässt. Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass die Sequenzidentität zum jeweiligen Zieltranskript mindestens 90% betrug, um sicherzustellen, dass dieses wirklich stummgeschaltet wurde. Basierend auf der Sequenz der EST Klone wurden anschließend Primer mit der Software Lasergene (*PrimerSelect*) entworfen und für die Fertigung der RNAi Konstrukte der entsprechende cDNA Abschnitt amplifiziert (siehe 2.10.1).

Aufgrund von fehlerhaften Informationen zu annotierten Genen in der NCBI Datenbank, sowie der darauf verweisenden Publikation (Talamé et al. 2007) wurden für die in der Tabelle 8 aufgeführten Gene zwei weitere Datenbanken (HarvEST, TIGR) herangezogen. Mit Hilfe dieser Datenbanken konnten die entsprechenden Klone schließlich eindeutig *Unigene* Nummern (HarvEST) zugeordnet werden.

Ein weiteres Problem ergab sich für die beiden Gene Dehydrin 5 und Dehydrin 10, für die keine cDNA Klone in der Gersten-Datenbank des IPK existierten. Diese mussten aus genomischer DNA (*Hordeum vulgare* cv. Golden Promise) amplifiziert werden. Für die PCR wurden daher Primer entworfen, welche auf den Nukleotidsequenzen basierten, die unter den für die Gene entsprechenden *Accession* Nummern AF043096 (*HvDHN 5*) und AF043095 (*HvDHN 10*) [NCBI Datenbank GenBank] angegeben waren.

Tabelle 7: Kandidatengene, welche für die Entwicklung des RNAi Screens aus der Literatur ausgewählt und in Gerste cv. Golden Promise getestet wurden.

Die Gene wurden in der Datenbank des ^(a) NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) identifiziert und anschließend geeignete cDNA Klone, basierend auf Sequenzhomologie, in der *Hordeum vulgare* Datenbank des IPK [^(c) *Crop EST Database* (CR-EST)] mit der Funktion *Blast against CR-EST* ermittelt.

| Referenz | GeneBank Accession ^(a) | Funktion ^(a) | Klon-ID (BlastN) ^(c) |
|--------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| (Christmann et al. 2006) | CAA55484 | ABI1 (<i>Arabidopsis thaliana</i>) | HO32M03 |
| (Perruc et al. 2004) | M27303 | Calmodulin (<i>Hordeum vulgare</i>) | HO33D09 |
| (Skinner et al. 2005) | AAX23701 | <i>HvCBF6</i> | HI09P16 |
| (Suprunova et al. 2004) | AAF01689 | <i>HvDhn1</i> (Dehydrin 1) | HV04I10 |
| (Suprunova et al. 2004) | AAF01694 | <i>HvDhn6</i> (Dehydrin 6) | HC02P10 |
| (Choi et al. 1999) | AAD02259 | <i>HvDhn8</i> (Dehydrin 8) | HO01L05 |
| (Sakuma et al. 2006a) | AAY25517 | <i>HvDREB1</i> (DREB2-like) | HS08A22 |
| (Xue & Loveridge 2004) | AAO38211 | <i>HvDRF1</i> (DREB2-like) | HU05J23 |
| (Babu et al. 2003) | CAA55041 | <i>HvHVA1</i> | HV09A17 |
| (nicht publiziert) | CAA34641 | <i>PRPX</i> (<i>Hordeum vulgare</i>) | HG01K10 |
| (Yamauchi et al. 2002) | BAB61736 | <i>HvPKABA1</i> (SAPK1-like Kinase) | HO16L13 |
| (Radchuk et al. 2006) | CAA07813 | <i>SnRK1-Type protein kinase</i> (<i>Hordeum vulgare</i>) | HS03E24 |
| (Fukuda et al. 2004) | BAC56698 | <i>HvHNX1</i> | HQ01K06 |
| (Broin & Rey 2003) | BAC75581 | Thioredoxin CDSP32 (<i>Oryza sativa</i>) | HO36E09 |
| (Peng et al. 2007) | ABI96816 | TIP (<i>Triticum aestivum</i>) | HR01K17 |
| (Karim et al. 2007) | ABO61742 | Trehalose-6-phosphat Synthase 1 (<i>S.lycop.</i>) | HZ41I22 |
| (Park et al. 2005) | BAB18681 | Vakuoläre Pyrophosphatase (<i>Hordeum vulgare</i>) | HO10E23 |

Tabelle 8: Kandidatengene, welche der Publikation von Talamé et al. (2007) entnommen und in Gerste cv. Golden Promise im RNAi Screen untersucht wurden.

Diese zuvor im *Microarray* getesteten Gene wurden unter Stressbedingungen (Dehydration) als differentiell reguliert beschrieben. Identifikation geeigneter cDNA Klone für die Erstellung der RNAi Bank unter Verwendung folgender Ressourcen: ^(a) NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) und ^(b) HarvEST für die Ermittlung der homologen Gene in Gerste, sowie die ^(c) *Crop EST Database* (CR-EST) mit der Funktion *Blast against CR-EST* zur Auswahl der cDNA Klone.

Quellenangabe der Gene die nicht der Publikation von Talamé et al. 2007 entstammen: * (Skinner et al. 2005) ** (Choi et al. 1999) *** persönliche Kommunikation mit S. Henkes (Metanomics GmbH, Berlin, Dt.)

| GeneBank Accession ^(a) | Unigene-ID ^(b) | Funktion ^(b) | Klon-ID (BlastN) ^(c) | E-Wert ^(c) | Identität ^(c) |
|--------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| BM816277 | 35_856 | Allenoxid-Synthase (<i>H.vulgare</i>) | HP07N03 | | |
| BM816404 | 35_857 | Allenoxid-Synthase (<i>H.vulgare</i>) | HY01C17 | 6.2e-133 | 98% |
| AF005993 | 35_469 | 70 kDa Hitzeschock Protein (<i>S.lycop.</i>) | HI04N04 | 1.8e-124 | 97% |
| AY785864 | 35_4932 | <i>HvCBF7</i> (<i>H.vulgare</i>)* | HX09N14 | 2.8e-112 | 100% |
| BM816383 | 35_14649 | Protease-Inhibitor (<i>H.vulgare</i>) | HD14L03 | 4.2e-115 | 98% |
| BM816822 | 35_3420 | nicht charakterisiertes konserviertes Protein (<i>O.sativa</i>) | HM12I15 | 4.4e-38 | 100% |
| BM816589 | 35_405 | NAC Transkriptionsfaktor (<i>T.aestivum</i>) | HI13G08 | 2.1e-130 | 98% |
| BM816425 | 35_16332 | ABA-responsive Protein (<i>H.vulgare</i>) | HC11F15 | 7.2e-111 | 99% |
| BQ739812 | 35_14934 | Metallothionein Typ 2 (<i>H.vulgare</i>) | HO18J04 | 1.6e-130 | 98% |
| BM816707 | 35_16695 | Subtilisin-Chymotrypsin Inhibitor 2 (<i>H.vulgare</i>) | HD03E20 | 1.9e-89 | 100% |
| BQ740210 | 35_15531 | Aleuron-Ribonuklease (<i>H.vulgare</i>) | HO07G09 | 1.7e-30 | 100% |
| BM816266 | 35_397 | UDP-glucose-6-Dehydrogenase (<i>G.max</i>) | HC07O17 | 2.2e-132 | 95% |
| BM816282 | 35_798 | Glutaminabhängige Asparagin Synthetase (<i>T.aestivum</i>) | HC15F23 | 1.3e-145 | 98% |
| BM816278 | 35_509 | Blattspezifisches Thionin (<i>H.vulgare</i>) | HC09A11 | 3.2e-120 | 97% |
| BM816911 | 35_2367 | Glutathion-S-Transferase (<i>Z.mays</i>) | HT05L11 | 7.3e-127 | 98% |
| BQ739947 | 35_18006 | plastidäre (P)ppGpp Synthase (<i>O.sativa</i>) | HU09M03 | 3.8e-59 | 100% |
| BQ739968 | 35_14376 | Methionin Synthase 2 (<i>H.vulgare</i>) | HH04C09 | 1.6e-130 | 97% |
| BM816230 | 35_15555 | Haloacid-Dehalogenase-ähnliche Hydrolase (<i>O.sativa</i>) | HO06J11 | 1.4e-119 | 99% |

Tabelle 8: Fortsetzung von Seite 75

| | | | | | |
|----------|----------|------------------------------------------------------------------------|---------|----------|------|
| BM817129 | 35_1093 | WSI76 Protein (<i>O.sativa</i>) | HP11O24 | 1.6e-94 | 99% |
| BM817168 | 35_21442 | Serin/Threonin-Proteinkinase SAPK3 (<i>O.sativa</i>) | HM14H10 | 3.0e-131 | 99% |
| AF043094 | 35_14540 | Dehydrin 9 (<i>H.vulgare</i>)** | HF24J18 | 1.8e-94 | 100% |
| BM816224 | 35_1207 | 60 kDa Jasmonat-induziertes Protein (<i>H.vulgare</i>) | HV04H17 | 2.1e-58 | 95% |
| BM816054 | 35_15458 | LTI6B (<i>P.glaucum</i>) | HC08N16 | 8.4e-118 | 100% |
| BM815987 | 35_1209 | 60 kDa Jasmonat-induziertes Protein (<i>H.vulgare</i>) | HD13D11 | 1.5e-141 | 98% |
| | 35_1107 | putative Cinnamylalkoholdehydrogenase (<i>O.sativa</i>)*** | HW01P08 | 6.5e-149 | 98% |
| | 35_5935 | Protein (<i>O.sativa</i>)*** (putative Mannitoldehydrogenase) | HP07O19 | 1.4e-126 | 99% |
| | 35_21527 | Protein (<i>O.sativa</i>)*** (putative Mannitoldehydrogenase) | HC15K08 | 6.6e-136 | 99% |
| | 35_6652 | Protein (<i>O.sativa</i>)*** (putative Mannitoldehydrogenase) | HV13L15 | 7.1e-110 | 97% |
| | 35_2863 | Protein (<i>O.sativa</i>)*** (putative Cinnamylalkoholdehydrogenase) | HS17B20 | 2.8e-116 | 99% |

Tabelle 9: Kandidaten der LEA D11 Genfamilie (Dehydrine).

Um alle bisher bekannten Mitglieder im RNAi *Screen* testen zu können, wurden geeignete cDNA Klone identifiziert. Die Identifikation der Gene in Gerste (*H.vulgare*) wurde mittels ^(a) NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) und ^(b) HarvEST (BlastX UniPROT) möglich. Durch einen Sequenzabgleich mit der ^(c) *Crop EST Database* (CR-EST) des IPK gelang die Auswahl von EST Klonen (Funktion *Blast against CR-EST*) für den anschließenden Test in Golden Promise.

* Isolation genomischer DNA aus Gerste cv. Golden Promise, ** BlastN Resultat der Sequenzsuche in NCBI

| GeneBank Accession ^(a) | Unigene-ID ^(b) | Funktion ^(b) | Klon-ID (BlastN) ^(c) | E-Wert ^(c) | Identität ^(c) |
|--------------------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| AF043088 | 35_14541 | <i>HvDHN2</i> (Dehydrin 2) | HS05D05 | 3.8e-63 | 100% |
| AF043089 | 35_14537 | <i>HvDHN3</i> (Dehydrin 3) | HS06D03 | 1.2e-48 | 96% |
| AF043090 | 35_14532 | <i>HvDHN4</i> (Dehydrin 4) | HS01P15 | 4.3e-135 | 99% |
| AF043096 | 35_14539 | <i>HvDHN5</i> (Dehydrin 5) | genom.DNA* | | |
| AF043092 | 35_14536 | <i>HvDHN7</i> (Dehydrin 7)** | HV09N15 | 3.4e-90 | 95% |

Tabelle 9: Fortsetzung von Seite 76

| | | | | | |
|----------|----------|-------------------------|------------|---------|------|
| AF043095 | | HvDHN10 (Dehydrin 10) | genom.DNA* | | |
| AF043086 | 35_4418 | HvDHN11 (Dehydrin 11) | HT13P04 | 4.7e-85 | 98% |
| AF155129 | 35_7787 | HvDHN12 (Dehydrin 12) | HT08A04 | 1.2e-65 | 98% |
| AY681974 | 35_15654 | HvDHN13 (Dehydrin 13)** | HC03N09 | 4.5e-68 | 100% |

Tabelle 10: Kandidatengene, welche durch ein persönliches Gespräch mit L. Cativelli in die Testserie zusätzlich miteinbezogen wurden.

Identifikation von cDNA Klonen, basierend auf Sequenzhomologie, durch Abgleich der ^(a) NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), ^(b) HarvEST (BlastX UniPROT) sowie ^(c) *Crop EST Database* (CR-EST). Durchführung des RNAi Screens in Gerste cv. Golden Promise.

| GeneBank Accession ^(a) | Unigene-ID ^(b) | Funktion ^(b) | anonym. Klon-ID ^{(c)(*)} | E-Wert ^(c) | Identität ^(c) |
|--------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| anonymisiert (*) | anonymisiert (*) | Hypothetisches Protein (<i>O.sativa</i>) | Cativelli 1 | 3.7e-96 | 100% |
| anonymisiert (*) | anonymisiert (*) | C3H2C3 RING-Fingerprotein-ähnlich (<i>O.sativa</i>) | Cativelli 2 | 2.7e-138 | 100% |
| anonymisiert (*) | anonymisiert (*) | Ribokinase (<i>T.turgidum</i>) | Cativelli 3 | 6.9e-128 | 100% |
| anonymisiert (*) | anonymisiert (*) | Hypothetisches Protein (<i>O.sativa</i>) | Cativelli 4 | 5.0e-153 | 100% |
| anonymisiert (*) | anonymisiert (*) | Hypothetisches Protein (<i>O.sativa</i>) | Cativelli 5 | 2.6e-127 | 99% |
| anonymisiert (*) | anonymisiert (*) | E2 SUMO Konjugase (<i>T.turgidum</i>) | Cativelli 6 | 6.3e-143 | 99% |
| anonymisiert (*) | anonymisiert (*) | HvCBF3 (<i>H.vulgare</i>) | Cativelli 7 | 1.2e-128 | 99% |
| anonymisiert (*) | anonymisiert (*) | CCCH-Typ Zinkfinger-ähnliches Protein (<i>O.sativa</i>) | Cativelli 8 | 1.4e-147 | 100% |
| anonymisiert (*) | anonymisiert (*) | MYB4-Transkriptionsfaktor (<i>H.vulgare</i>) | Cativelli 9 | 2.1e-138 | 99% |
| anonymisiert (*) | anonymisiert (*) | Phospholipase A2 (<i>O.sativa</i>) | Cativelli 10 | 3.9e-149 | 99% |
| anonymisiert (*) | anonymisiert (*) | Phospholipase A2 (<i>O.sativa</i>) | Cativelli 11 | 1.3e-137 | 100% |
| anonymisiert (*) | anonymisiert (*) | Phospholipase A2 (<i>O.sativa</i>) | Cativelli 12 | 7.9e-131 | 100% |

^(*) Für weitere Informationen: schweiz@ipk-gatersleben.de

In drei aufeinanderfolgenden experimentellen Serien konnten auf diese Weise insgesamt 63 Kandidatengene untersucht werden. Die erste Serie umfasste 17 Gene (Tabelle 7) und diente dem *proof of concept* des RNAi Screens. Aus dieser Serie wurden 4 Gene, welche statistisch signifikante Ergebnisse geliefert hatten, wiederholt. Diese zweite Wiederholungsserie, mit weiteren fünf unabhängigen Experimenten, bestätigte das Ergebnis der ersten Serie (siehe 3.3 Tabelle 11 und 12). In weiteren Serien wurden hauptsächlich Gene aus der Publikation von Talamé et al. (2007), welche unter Schockdehydration bzw. Rehydratation hochreguliert worden waren (Tabelle 8), getestet.

Ferner wurden 10 noch nicht getestete Dehydrine (der insgesamt 13) der Gerste (Choi et al. 1999, Choi et al. 2000, Rodríguez et al. 2005) in das *Screening* mit einbezogen, um umfassende Ergebnisse für die gesamte Genfamilie zu erhalten (Tabelle 9).

Durch persönliche Gespräche und Kooperationen mit anderen Wissenschaftlern konnten außerdem potentielle, für die Stressantwort möglicherweise relevante Gene genauer betrachtet werden, die bisher nicht aus der Literatur bekannt waren.

3.3 Screening I (Proof of concept)

Basierend auf EST Sequenzen der Gerstendatenbank, wurden insgesamt 17 RNAi Konstrukte generiert und in der Gerstensorte Golden Promise getestet. Für jedes Experiment wurde ebenfalls eine Kontrolle des leeren RNAi Vektors pIPKTA30 zum Vergleich mitgeführt. Das Verhältnis zwischen DsRED- und GFP fluoreszierenden Zellen wurde für alle eingesetzten Konstrukte berechnet (siehe 2.11.5) und anschließend überprüft, ob diese eine Auswirkung unter Stressbedingungen im Vergleich zur Kontrolle hatten.

Aus der Gruppe konnten 4 Kandidaten ermittelt werden, welche das Verhältnis zwischen DsRED und GFP Zellen zu Gunsten der GFP Zellen signifikant negativ beeinflussten (siehe Abbildung 10). Das bedeutet, dass unter Stressbedingungen durch den Einsatz des Konstruktes die Zahl der DsRED Zellen im Vergleich zur Kontrolle deutlich geringer war. Am deutlichsten konnte dies mit dem RNAi Konstrukt, welches gegen *HvDRF1* gerichtet war, beobachtet werden. Dieses Konstrukt bewirkte eine Reduktion des Verhältnisses von bis zu 35% gegenüber der Kontrolle pIPKTA30.

Tabelle 11: Ergebnisse des RNAi Screens mit Kandidaten der Literaturrecherche.

Die relativen DsRED/GFP Werte wurden berechnet, indem der Mittelwert der Kontrolle pIPKTA30 auf 100% gesetzt wurde und die Mittelwerte der RNAi-Konstrukte zu diesem ins Verhältnis. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad InStat. Mit Hilfe der Software wurden die p-Werte in einem zweiseitigen t-Test berechnet.

^(c) *Crop EST Database* (CR-EST) des IPK * $p \leq 0,05$

| Klon-ID ^(c) | Funktion (Genabkürzung) | relativer DsRED/GFP Wert (in%) | Fehler der Standardab- weichung | Signifikanz (p-Wert)* |
|------------------------|----------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| HO36E09 | OsCDSP32 | 108,34 | 6,5115 | 0,2696 |
| HO32M03 | AtABI1 | 88,71 | 9,8684 | 0,3165 |
| HU05J23 | HvDRF1 | 64,95 | 4,3128 | 0,0012 |
| HS08A22 | HvDREB1 | 100,79 | 8,0666 | 0,9264 |
| HO33D09 | HvCam | 90,36 | 11,9635 | 0,4654 |
| HZ41I22 | S/TPS | 108,48 | 6,9601 | 0,2901 |
| HO10E23 | HVP1 | 117,86 | 15,4290 | 0,3115 |
| HR01K17 | TaTIP | 99,89 | 11,8430 | 0,9930 |
| HI09P16 | HvCBF6 | 99,85 | 11,5395 | 0,9902 |
| HG01K10 | HvPRPX | 86,20 | 9,4874 | 0,2195 |
| HV04I10 | HvDHN1 | 106,19 | 8,1772 | 0,4914 |
| HO16L13 | HvPKABA1 | 98,82 | 5,0761 | 0,8273 |
| HS03E24 | HvSnRK1 | 86,84 | 7,7593 | 0,1650 |
| HO01L05 | HvDHN8 | 81,62 | 11,9670 | 0,1993 |
| HC02P10 | HvDHN6 | 78,68 | 4,6509 | 0,0102 |
| HV09A17 | HvHVA1 | 66,93 | 9,5930 | 0,0261 |
| HQ01K06 | HvNHX1 | 81,29 | 5,2194 | 0,0231 |

Die Kandidaten *HvDHN6*, *HvHVA1* und *HvNHX1* zeigten ebenfalls eine deutliche Reduktion des Verhältnisses, wobei das RNAi Konstrukt gegen *HvHVA1* einen ähnlich starken Einfluss wie das Konstrukt gegen *HvDRF1* erkennen ließ (Abbildung 10, Tabelle 11).

Vier der getesteten Kandidaten zeigten keine bzw. eine äußerst geringe Absenkung des DsRED/GFP Verhältnisses im Vergleich zur Kontrolle. Hier wurde der Wert des Verhältnisses in nur einem Fall um etwa 10% reduziert. Weitere vier Kandidaten reduzierten das DsRED/GFP Verhältnis zwar über 10% hinaus, jedoch nicht stärker als 20%. Die statistische Überprüfung der Ergebnisse dieser 4 Konstrukte durch einen zweiseitigen t-Test ergab keine signifikante Abweichung von der Kontrolle. Fünf RNAi Konstrukte bewirkten im Gegensatz zu den restlichen Kandidaten eine Erhöhung des Verhältnisses von DsRED- zu GFP fluoreszierenden Zellen.

Unter ihnen befand sich ein Konstrukt, welches gegen eine Pyrophosphatase gerichtet war (*HVP1*). Dieses Konstrukt erhöhte das Verhältnis zwischen

DsRED und GFP um fast 20%. Die statistische Auswertung ergab allerdings auch in diesem Fall, dass es sich nicht um eine signifikante Erhöhung handelte.

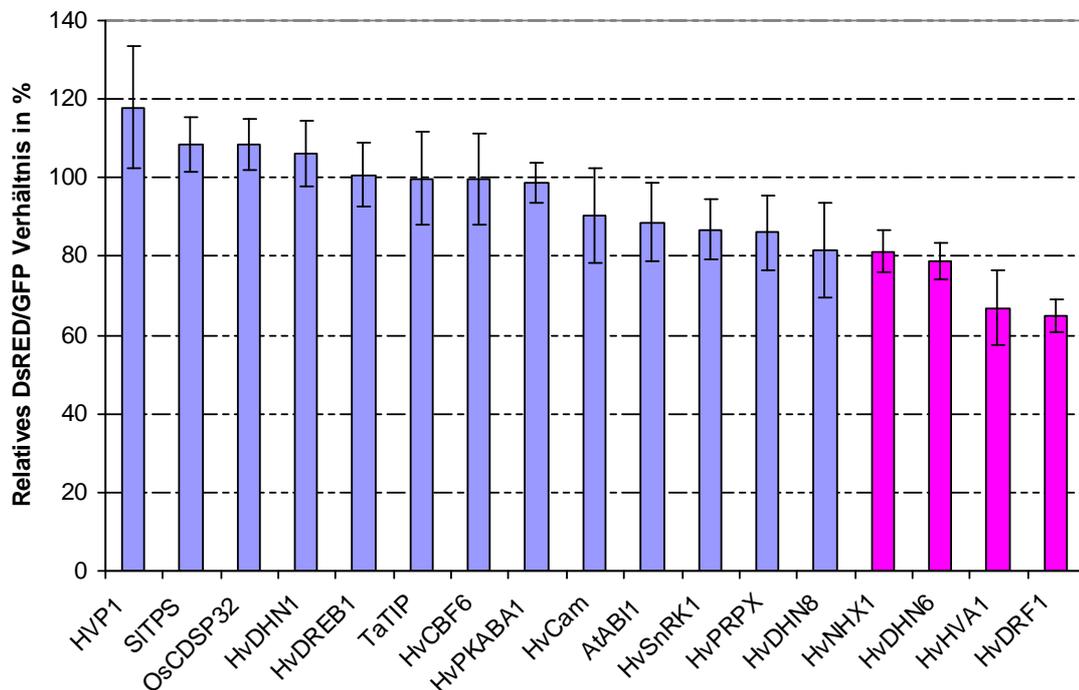


Abbildung 10: Einfluss der RNAi Konstrukte auf das DsRED/GFP Verhältnis relativ zur Kontrolle pIPKTA30.

Im Diagramm sind die relativen Mittelwerte aus 5 unabhängigen Experimenten für jedes RNAi Konstrukt dargestellt. Der Mittelwert der Experimente mit dem leeren RNAi-Vektor (pIPKTA30) wurde auf 100% gesetzt und die Mittelwerte der Konstrukte zu diesem ins Verhältnis. Die Streuungsbalken geben den Fehler der Standardabweichung wieder. Alle benötigten Werte können der Tabelle 11 entnommen werden. RNAi Konstrukte, welche das DsRED/GFP Verhältnis signifikant beeinflussten, sind hervorgehoben (■).

Alle vier Kandidaten die ein signifikantes Ergebnis lieferten, wurden in weiteren fünf Experimenten getestet, so dass insgesamt 10 Experimente pro Konstrukt für die finale Auswertung vorlagen (Tabelle 12 und Abbildung 11).

Tabelle 12: Ergebnisse der Wiederholung des RNAi Screens mit Kandidatengenen, welche einen signifikanten Einfluss auf das DsRED/GFP Verhältnis hatten.

Der relative DsRED/GFP Wert spiegelt das Verhältnis des Mittelwertes des Konstruktes zum Mittelwert der Kontrolle pIPKTA30, welche auf 100% gesetzt wurde, wieder. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad InStat mit deren Hilfe die Ergebnisse in einem zweiseitigen t-Test überprüft wurden. ^(c) Crop EST Database (CR-EST) des IPK * p≤0,05

| Klon-ID ^(c) | Funktion (Genabkürzung) | relativer DsRED/GFP Wert (in%) | Fehler der Standardabweichung | Signifikanz (p-Wert)* |
|------------------------|-------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| HU05J23 | HvDRF1 | 76,27 | 5,4853 | 0,0124 |
| HC02P10 | HvDHN6 | 78,61 | 2,1094 | 0,0005 |
| HV09A17 | HvHVA1 | 74,75 | 3,5015 | 0,0020 |
| HQ01K06 | HvNHX1 | 78,16 | 2,7303 | 0,0013 |

Die Ergebnisse aus den Wiederholungen konnten die vorhergehenden Resultate ausnahmslos bestätigen. Während die Mittelwerte für *HvDHN6* und *HvNHX1* mit den vorhergehenden nahezu identisch waren, lagen sie für *HvDRF1* und *HvHVA1* um etwa 10 % höher. Die statistische Auswertung ergab sowohl für die ersten 5 Experimente als auch für die zweiten, insgesamt bzw. separat betrachtet, dass sie signifikant von der Kontrolle abwichen.

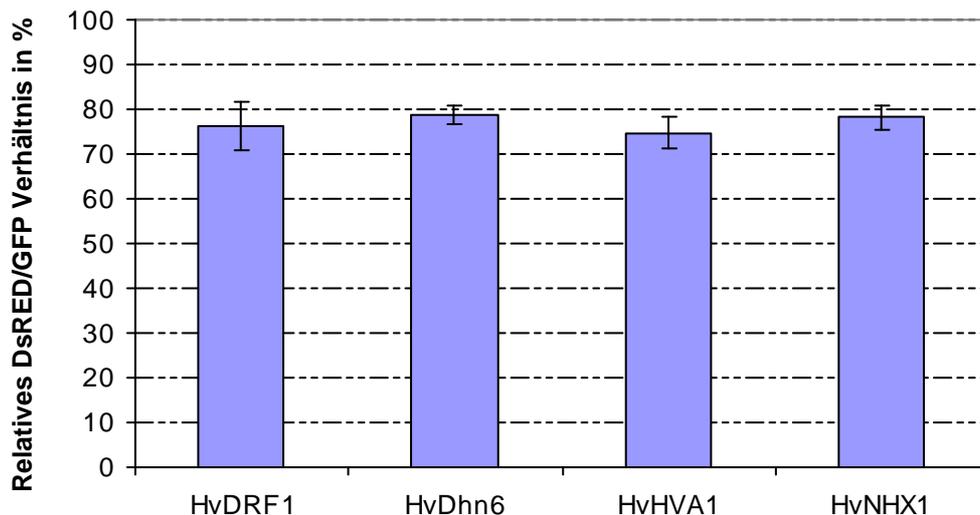


Abbildung 11: RNAi Konstrukte, welche auch in der Wiederholung einen signifikanten Effekt auf das DsRED/GFP Verhältnis hatten.

Im Diagramm sind die Mittelwerte für jedes RNAi Konstrukt in Relation zum leeren RNAi-Vektor pIPKTA30 (Kontrolle) dargestellt. Der Mittelwert der Kontrolle wurde auf 100% gesetzt und die Mittelwerte der Konstrukte zu diesem ins Verhältnis. Der Mittelwert wurde aus 5 unabhängigen Experimenten gebildet. Die Streuungsbalken geben den Fehler der Standardabweichung wieder. Alle Werte können ebenfalls der Tabelle 12 entnommen werden.

3.4 Screening II (Hauptscreen)

In Analogie zur ersten Serie wurden basierend auf EST Sequenzen der Gerstendatenbank weitere RNAi Konstrukte generiert (siehe Tabelle 8 bis 10) und in der Gerstensorte Golden Promise getestet. Für jedes Experiment wurde wiederum das relative DsRED/GFP Verhältnis der Kontrolle (pIPKTA30) auf 100% gesetzt und mit dem relativen DsRED/GFP Verhältnis der Konstrukte verglichen (Berechnung siehe 2.11.5). Im Unterschied zur ersten Testserie wurde jedoch anstelle von einer Kontrolle mit leerem Vektor pIPKTA30 der Mittelwert aus drei Kontrollen für den Vergleich herangezogen.

Die zeitintensive Auswertung der insgesamt 46 Kandidaten (Serie II und III), machte jedoch eine Optimierung in Bezug auf die Filterung der Kandidaten und

den damit verbundenen Durchsatz erforderlich. Hierzu wurden folgende Entscheidungsparameter festgelegt, welche sicherstellen sollten, dass die Zahl der in fünf unabhängigen Experimenten zu testenden RNAi Konstrukte effizient minimiert wurde (siehe Abbildung 12).

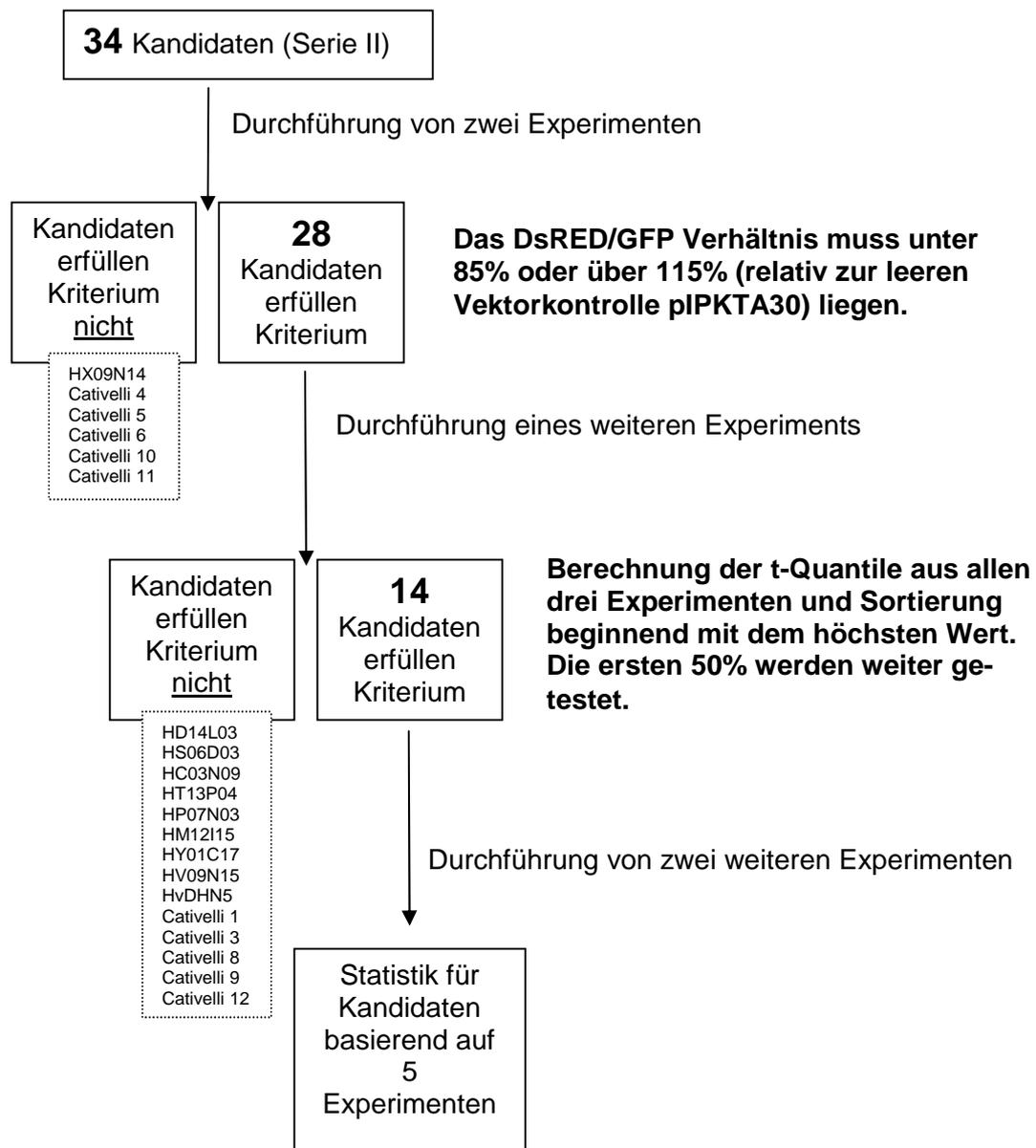


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Auswahl der final zu testenden Kandidaten.

Im Flussdiagramm werden die einzelnen Selektionsschritte am Beispiel der zweiten Experimentserie des Hauptscreens erläutert. Die Analyse der zusätzlich in Serie III getesteten Konstrukte wurde gemäß dem Schema analog durchgeführt. Hervorgehoben sind die jeweiligen Auswahlkriterien auf der rechten Seite und die Konstrukte die diese nicht erfüllen als Box auf der linken Seite. Ebenfalls hervorgehoben ist die Anzahl an Kandidaten, welche die nächste Teststufe erreicht hat.

Gleichzeitig sollten die für die Stressantwort relevanten Gene sicher erkannt werden, ohne zu viele falsch positive oder negative Ergebnisse zu erzeugen. Als erstes wurden zu diesem Zweck alle vorhandenen RNAi Konstrukte (insgesamt 34 in der Serie II) in zwei unabhängigen Experimenten getestet und anschließend überprüft, ob der relative DsRED/GFP Wert (es wurde der Mittelwert aus beiden Experimenten gebildet) unter bzw. über der vorher definierten Grenze von 85% bzw. 115% lag. Von sechs Konstrukten (Tabelle 13) konnte dieses Kriterium nicht erfüllt werden, so dass diese aus der Testserie ausgeschlossen wurden.

Tabelle 13: Relativer DsRED/GFP Wert (in %) der Kandidaten ohne erkennbaren Effekt.

Der relative DsRED/GFP Wert spiegelt das Verhältnis des Mittelwertes des Konstruktes zum Mittelwert der Kontrolle pPKTA30, welche auf 100% gesetzt wurde, wieder. Die RNAi Konstrukte wurden in zwei unabhängigen Experimenten getestet.

^(b) HarvEST (BlastX UniPROT); ^(c) *Crop EST Database* (CR-EST) des IPK ; * anonym. Klon-ID

| Funktion ^(b) | Klon-ID (BlastN) ^(c) | Experiment 1 | Experiment 2 | Mittelwert |
|--------------------------------------------|---------------------------------|--------------|--------------|------------|
| Hypothetisches Protein (<i>O.sativa</i>) | Cativelli 4* | 130,48 | 92,92 | 111,70 |
| Hypothetisches Protein (<i>O.sativa</i>) | Cativelli 5* | 127,78 | 96,96 | 112,37 |
| E2 SUMO Konjugase (<i>T.turgidum</i>) | Cativelli 6* | 94,64 | 127,83 | 111,24 |
| Phospolipase A2 (<i>O.sativa</i>) | Cativelli 10* | 106,13 | 119,13 | 112,63 |
| Phospolipase A2 (<i>O.sativa</i>) | Cativelli 11* | 114,75 | 91,93 | 103,34 |
| <i>HvCBF7</i> (<i>H.vulgare</i>) | HX09N14 | 86,72 | 103,64 | 95,18 |

Die verbleibenden 28 RNAi Konstrukte wurden erneut in einem dritten Experiment, hinsichtlich ihrer Auswirkungen unter Stressbedingungen, überprüft. Anschließend wurde aus allen drei Experimenten der Mittelwert sowie das jeweilige t-Quantil des *one-sample* t-Tests berechnet $[(\text{Mittelwert} - 100) / \text{Fehler der Standardabweichung}]$. Die Ergebnisse wurden danach in abfallender Reihenfolge, nach Höhe des Quantilwertes geordnet und gemäß dem nächsten Auswahlkriterium entsprechende Konstrukte zur weiteren Verwendung selektiert.

Als Auswahlgrenze wurde festgelegt, dass die « besten » 50% der insgesamt 28 Kandidaten, mit dem höchsten Quantilwert, in zwei weiteren Experimenten final getestet werden sollten. Auf diese Weise reduzierte sich der Umfang der im Test eingesetzten Konstrukte am Schluss nochmals um die Hälfte.

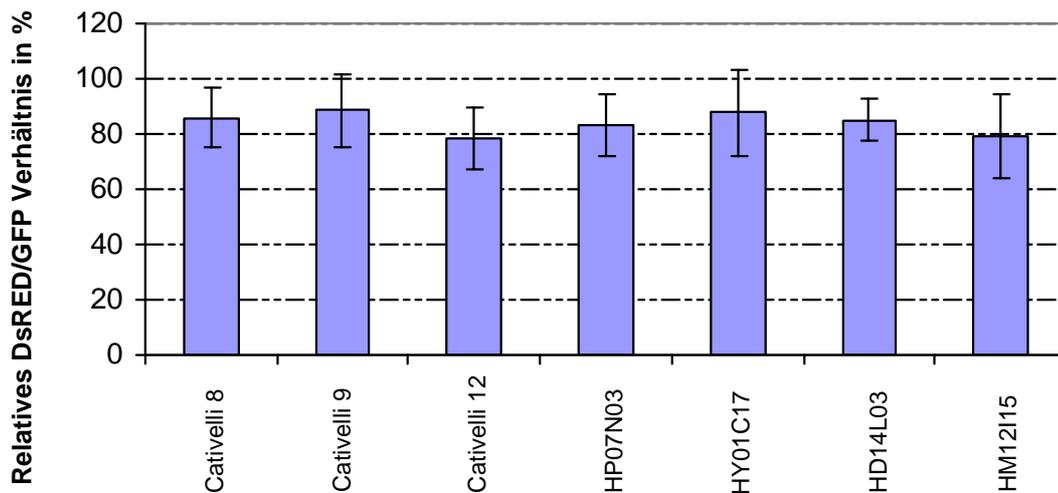


Abbildung 13: RNAi Konstrukte, welche nur in drei Wiederholungen getestet wurden.

Im Diagramm sind die Mittelwerte für jedes RNAi Konstrukt in Relation zum leeren RNAi-Vektor pIPKTA30 (Kontrolle, entspricht 100%) dargestellt. Die Streuungsbalken geben den Fehler der Standardabweichung wieder. Die Kandidaten wurden aussortiert, da sie nicht zu den besten 50% mit dem höchsten t -Wert gehörten (siehe Erklärung Text).

Neben den in der Abbildung 13 gezeigten Konstrukten waren ebenfalls *HvDHN 3*, *HvDHN 5*, *HvDHN 7*, *HvDHN 11* sowie *HvDHN 13* ausgeschlossen worden, was jedoch zu einem späteren Zeitpunkt teilweise revidiert werden musste, da es sinnvoll schien eine bekannte Genfamilie als Ganzes im RNAi Screen betrachten zu können.

Somit sind letztendlich alle RNAi Konstrukte gegen Vertreter der in der Gerste bekannten Dehydrine (insgesamt 13) in mindestens fünf unabhängigen Experimenten getestet worden (Abbildung 14). Es zeigten jedoch lediglich vier eine signifikante Reduktion des relativen Verhältnisses von DsRED- zu GFP fluoreszierenden Zellen. Das Ergebnis der Dehydrine 1, 6 und 8 (*proof of concept*) basiert dabei auf dem Vergleich mit einem Kontrollwert, während das Ergebnis der restlichen Dehydrine (*Screening II*) auf dem Vergleich mit dem Mittelwert aus drei Kontrollwerten beruht. Das Ergebnis der Tests mit einem gegen Dehydrin 9 gerichteten Konstrukt konnte nicht in die Auswertung einfließen, da die entsprechenden Experimente mit einer zu hohen Dehydrierung der Blätter einhergingen. Ebenfalls davon betroffen waren die Konstrukte der EST's HF24J18, HV04H17, HC08N16 sowie HD13D11. Die Ergebnisse dieser Konstrukte wurden daher ebenfalls von der Auswertung ausgeschlossen.

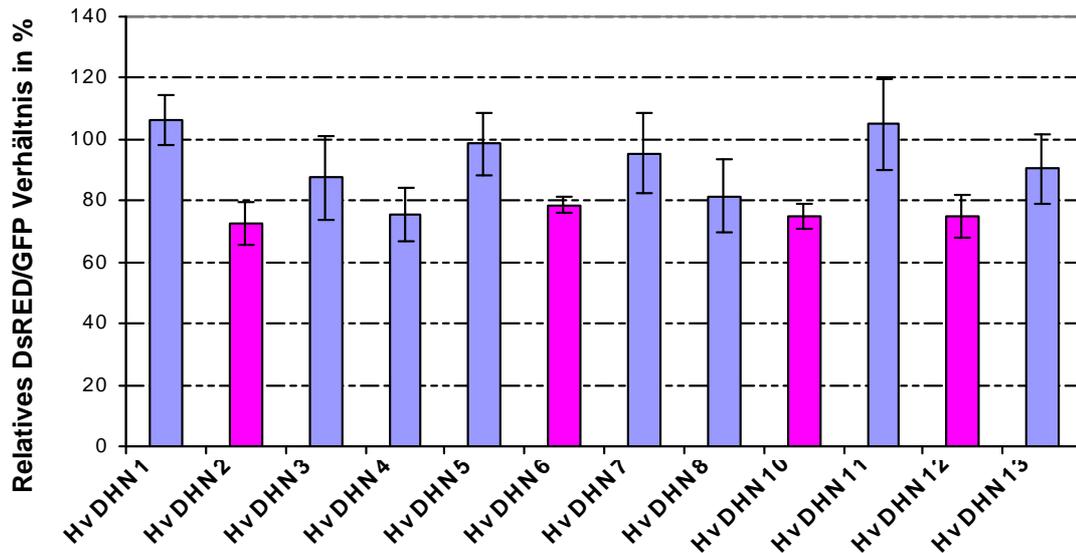


Abbildung 14: Darstellung der Ergebnisse aller RNAi Konstrukte, welche gegen verschiedene Vertreter der Dehydrin Familie gerichtet sind.

Im Diagramm sind die Mittelwerte für jedes RNAi Konstrukt in Relation zum leeren RNAi-Vektor pIPKTA30 (Kontrolle) dargestellt. Der Mittelwert der Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Die Streuungsbalken geben den Fehler der Standardabweichung wieder. RNAi Konstrukte, welche das DsRED/GFP Verhältnis signifikant beeinflussten sind hervorgehoben (pink). Die Dehydrine 1, 6 und 8 stammen aus dem ersten *Screening* (Abschnitt 3.3) und sind zum Zwecke des Vergleiches in der Abbildung mit dargestellt. Der Mittelwert für Dehydrin 6 basiert auf 10 Experimenten. Dehydrin 9 wurde nicht in die Grafik integriert, da das Ergebnis nicht ausgewertet werden konnte.

Die aus der Testserie bereits ausgeschlossenen Dehydrine wurden gemeinsam mit zwei weiteren RNAi Konstrukten, Cativelli 3 und Cativelli 1 (Sequenzen vertraulich, für weitere Informationen: schweiz@ipk-gatersleben.de), in einem separaten *Screening* nochmals überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass Cativelli 3 und Cativelli 1, nach Auswertung der fünf unabhängigen Experimente, einen signifikanten Einfluss auf das relative DsRED/GFP Verhältnis ausübten [Cativelli 3 (p-Wert= 0,029) und Cativelli 1 (p-Wert= 0,039)] und somit ursprünglich falsch negative Ergebnisse darstellten (Abbildung 15). Im Gegensatz dazu zeigten die gegen die Dehydrine 3, 5, 7, 11 und 13 gerichteten Konstrukte unter Stressbedingungen wie erwartet keine Beeinflussung (Abbildung 14) des Verhältnisses.

Die verbliebenen 14 Kandidaten, welche nach zwei bestimmten Parametern aus ursprünglich 34 herausgefiltert worden sind (siehe Abbildung 12), wurden in zwei weiteren Experimenten getestet. Die statistische Auswertung mit der Software GraphPad InStat bestätigte mit Ausnahme von Dehydrin 4 (p-Wert =

0,052), dass alle einen signifikanten Einfluss auf das relative DsRED/GFP Verhältnis hatten ($p \leq 0,05$; Tabelle 15). Obwohl in einigen Fällen das relative DsRED/GFP Verhältnis nur um etwa 20% reduziert werden konnte, war dies für die statistische Signifikanz ausreichend (Abbildung 15). Der Test deutete ebenfalls auf eine Wirkung der Konstrukte gegen *HvDHN 2*, *HvDHN 10* sowie *HvDHN 12* hin. Damit haben 4 der 13 eingesetzten RNAi Konstrukte (Abbildung 14), im Vergleich zur Kontrolle, unter Stressbedingungen (Dehydration) einen signifikanten Einfluss auf das Verhältnis von DsRED zu GFP Zellen.

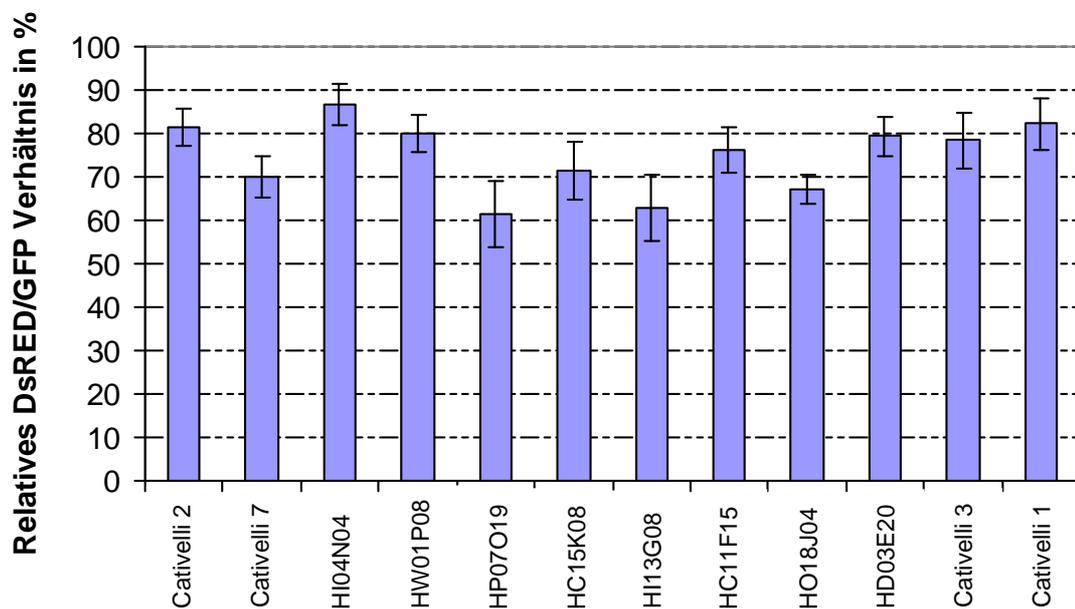


Abbildung 15: RNAi Konstrukte, die das DsRED/GFP Verhältnis signifikant beeinflussen.

Im Diagramm sind die Mittelwerte, gebildet aus 5 Experimenten, für jedes RNAi Konstrukt in Relation zum leeren RNAi-Vektor pIPKTA30 (Kontrolle) dargestellt. Der Mittelwert der Kontrolle wurde auf 100% und die Mittelwerte der Konstrukte zu diesem ins Verhältnis gesetzt. Die Streuungsbalken geben den Fehler der Standardabweichung wieder.

In der letzten Phase des Projektes bot sich die Gelegenheit noch zusätzliche RNAi Vektoren zu klonieren und im etablierten Testverfahren einzusetzen. Insgesamt wurden entsprechend der Publikation von Talamè et al. (2007) weitere 12 Trockenstress induzierte Kandidaten ausgewählt. Diese hatten im sich anschließenden *Screening* jedoch kaum einen Einfluss auf das relative DsRED/GFP Verhältnis (Abbildung 16 und Tabelle 14).

Die Mehrzahl der Konstrukte bewegte sich auf dem Niveau der Kontrolle und übte weder einen positiven noch negativen Einfluss auf das Verhältnis aus.

Eine Ausnahme bildete allerdings das Konstrukt HO06J11, welches gegen ein Haloacid-dehalogenase-*like* Hydrolase Familienprotein gerichtet ist. Unter Stressbedingungen erhöhte es die Anzahl an rot fluoreszierenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle deutlich. Infolge dessen steigerte sich der Wert des DsRED/GFP Verhältnisses um etwa 40 % gegenüber der Kontrolle. Die statistische Überprüfung ergab allerdings, dass es sich nicht um ein signifikantes Ergebnis handelt.

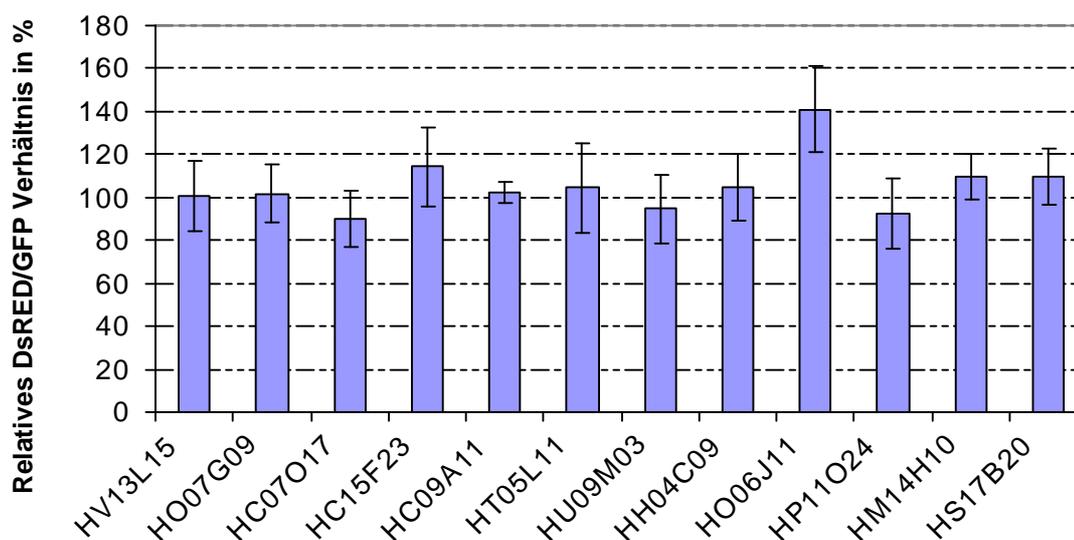


Abbildung 16: Zusätzlich getestete RNAi Konstrukte (Hauptscreen, Serie III), welche jedoch keinen signifikanten Einfluss auf das DsRED/GFP Verhältnis hatten.

Weitere 12 RNAi Konstrukte konnten in der letzten Phase des *PlantResource* Projektes in Gerste (Golden Promise) getestet werden. Im Diagramm sind die Mittelwerte für jedes RNAi Konstrukt in Relation zum leeren RNAi-Vektor pIPKTA30 (Kontrolle) dargestellt. Der Mittelwert der Kontrolle wurde dazu auf 100% gesetzt und die Mittelwerte der Konstrukte zu diesem ins Verhältnis. Die Mittelwerte setzen sich aus drei unabhängigen Experimenten zusammen. Die Streuungsbalken geben den Fehler der Standardabweichung wieder.

Tabelle 14: Mittelwerte der zusätzlich getesteten Kandidaten des Hauptscreens (Serie III).

Der Mittelwert wurde aus drei unabhängigen Experimenten berechnet. Er spiegelt das relative DsRED/GFP Verhältnis, im Vergleich zur Kontrolle pIPKTA30, unter Stressbedingungen wieder.

^(b) HarvEST (BlastX UniPROT); ^(c) *Crop EST Database* (CR-EST) des IPK; * *Standard Error of the Mean*

| Klon-ID (BlastN) ^(c) | Funktion ^(b) | Mittelwert | SEM [*] |
|---------------------------------|----------------------------------------------------------------------|------------|------------------|
| HV13L15 | Protein (<i>O.sativa</i>); (putative Mannitoldehydrogenase) | 100,54 | 16,59 |
| HO07G09 | Aleuron Ribonuklease | 101,73 | 13,75 |
| HC07O17 | UDP-Glucose 6-Dehydrogenase (<i>Glycine max</i>) | 90,13 | 13,09 |
| HC15F23 | Glutamin-abhängige Asparagin Synthetase (<i>Triticum aestivum</i>) | 114,26 | 18,14 |
| HC09A11 | Blatt-spezifischer Thionin Vorläufer | 102,51 | 4,81 |
| HT05L11 | Glutathion S-transferase (<i>Zea mays</i>) | 104,45 | 20,71 |

Tabelle 14: Fortsetzung von Seite 87

| | | | |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------|--------|-------|
| HU09M03 | plastidäre (P)ppGpp Synthase (<i>Oryza sativa</i>) | 94,54 | 16,22 |
| HH04C09 | Methionin Synthase 2 | 104,89 | 15,64 |
| HO06J11 | Haloacid Dehalogenase-like Hydrolase-familien Protein (<i>O.sativa</i>) | 140,77 | 20,08 |
| HP11O24 | WSI76 Protein (<i>O.sativa</i>) | 92,49 | 16,59 |
| HM14H10 | Serine/Threonin-Proteinkinase SAPK3 (<i>O.sativa</i>) | 109,99 | 10,68 |
| HS17B20 | Protein (<i>O.sativa</i>); (putative Cinnamylalkoholdehydrogenase) | 109,77 | 13,20 |

Tabelle 15: Ergebnisse aller Kandidaten mit signifikantem Effekt im TIGS Screen.

In der Übersicht sind alle Klone auf denen die RNAi Konstrukte basieren mit der jeweiligen putativen Funktion des Zielgens dargestellt. Es wurden insgesamt fünf unabhängige Experimente in Golden Promise für eine Analyse durchgeführt. Der Grenzwert für die Verwerfung der Nullhypothese lag bei $p \leq 0,05$.

^(b) HarvEST (BlastX UniPROT); ^(c) Crop EST Database (CR-EST) des IPK; *Wert basiert auf 10 Experimenten

| CR-EST Klon-ID ^(c) | Funktion ^(b) | DsRED/ GFP (relat. %) | p-Wert im TIGS Screen |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| HP07O19 | Protein (<i>Oryza sativa</i>); putative Mannitoldehydrogenase | 61,41 | 0,0068 |
| HI13G08 | NAC Domänen Transkriptionsfaktor (<i>Triticum aestivum</i>) | 62,81 | 0,0076 |
| HO18J04 | Metallothionein Typ 2 (<i>Hordeum vulgare</i>) | 67,32 | 0,0006 |
| Cativelli 7 ^{**} | C-repeat binding factor 3-like Protein (<i>HvCBF3</i>) | 69,90 | 0,0032 |
| HC15K08 | Hypot. Protein (<i>Oryza sativa</i>); putative Mannitoldehydrogenase | 71,53 | 0,0134 |
| HS05D05 | Dehydrin 2 (<i>HvDHN2</i>) | 72,70 | 0,0163 |
| genom. DNA | Dehydrin 10 (<i>HvDHN10</i>) | 75,03 | 0,0042 |
| HT08A04 | Dehydrin 12 (<i>HvDHN12</i>) | 75,10 | 0,0234 |
| HC11F15 ^{**} | ABA-responsive Protein (<i>Hordeum vulgare</i>) | 76,02 | 0,0104 |
| Cativelli 3 ^{**} | Ribokinase (<i>Triticum turgidum</i>) | 78,45 | 0,0292 |
| HD03E20 | Subtilisin-Chymotrypsin Inhibitor 2 (<i>Hordeum vulgare</i>) | 79,35 | 0,0107 |
| HW01P08 ^{**} | putative Cinnamylalkoholdehydrogenase (<i>Oryza sativa</i>) | 79,90 | 0,0095 |
| Cativelli 2 ^{**} | RING-Finger E3 Ubiquitin-Ligase-like Protein (<i>Oryza sativa</i>) | 81,55 | 0,0137 |
| Cativelli 1 ^{**} | Hypot. Protein (<i>Oryza sativa</i>); putativer Zinkfinger Constans-like Transkriptionsfaktor | 82,27 | 0,0395 |
| HI04N04 | 70 kDa Hitzeschock Protein (<i>Solanum lycopersicum</i>) | 86,58 | 0,0447 |
| HU05J23 | Dehydration-responsive factor 1 (<i>HvDRF1</i>) | 70,61* | 2,84E-05* |
| HV09A17 | <i>HvHVA1</i> | 70,84* | 0,00024* |
| HC02P10 | Dehydrin 6 (<i>HvDHN6</i>) | 78,65* | 9,6E-06* |
| HQ01K06 | Na ⁺ /H ⁺ Antiporter (<i>HvNHX1</i>) | 79,73* | 5,2E-05* |

** Vertraulich, für weitere Informationen: schweiz@ipk-gatersleben.de

3.4.1 TIGS in unterschiedlichen Sorten der Gerste

Die Anwendung des *Screens* in der Sorte Golden Promise, welche relativ resistent gegenüber Trockenstress ist, ließ einige Fragen aufkommen, unter anderem wie sich das System in anderen Gerstensorten verhält.

Hat die Anwendung in einer anderen resistenten Sorte (z.B. Morex) die gleichen Ergebnisse zur Folge? Sind sie ähnlicher Natur oder völlig verschieden? Was passiert in einer anfälligen Sorte wie Steptoe? Kann man den RNAi Effekt hier überhaupt detektieren? Zur Beantwortung dieser und anderer Fragen wurden mehrere Experimente mit der leeren Vektorkontrolle pIPKTA30 als auch mit zwei der signifikanten RNAi Konstrukte der ersten Testserie (siehe 3.3) durchgeführt.

Für einen Vergleich der bestehenden Methode wurden jeweils fünf unabhängige Experimente für die Sorten Steptoe und Morex durchgeführt. Nach Auswertung der Ergebnisse stellte sich heraus, dass das relative Verhältnis von DsRED zu GFP fluoreszierenden Zellen in Morex auf ähnlich hohem Niveau wie in Golden Promise liegt (Morex 86%, GP 84%), wenn man ausschließlich die Kontrolle (pIPKTA30) betrachtet. In Steptoe hingegen sinkt dieser Wert auf knapp 54%. Damit ergibt sich eine Differenz, zum Niveau der beiden anderen Sorten, von etwa 30% (Abbildung 17).

Vergleicht man jetzt zusätzlich die RNAi Konstrukte *HvDRF1* und *HvDHN6*, so stellt man fest, dass es hier ebenfalls große Unterschiede zwischen den Sorten gibt. Während das Konstrukt gegen Dehydrin 6 in Golden Promise den relativen DsRED/GFP Wert auf etwa 79% statistisch signifikant senken kann, ist dies in Steptoe nicht zu beobachten ($105,86 \pm 18,71\%$)(Abbildung 18).

In Morex hingegen spiegelt sich ein deutlich höherer Anteil an rot fluoreszierenden Zellen im höheren DsRED/GFP Wert wieder. Die Erhöhung des Verhältnisses gegenüber der Kontrolle um 17% ist jedoch nicht signifikant ($p\text{-Wert} = 0,51; p \leq 0,05; n=4$).

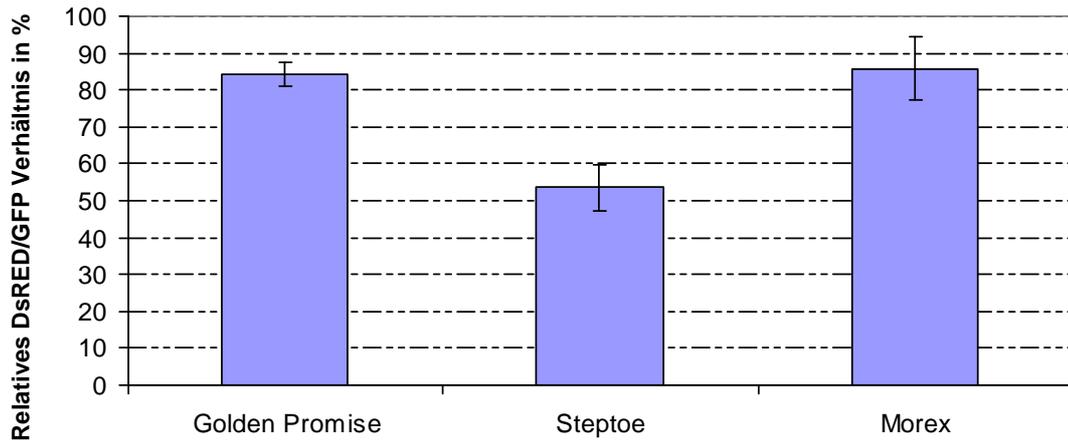


Abbildung 17: Einfluss des leeren RNAi Vektors pIPKTA30 auf das DsRED/GFP Verhältnis unter Stressbedingungen.

Das Diagramm zeigt die Mittelwerte des relativen DsRED/GFP Wertes unter Verwendung des Konstrukts pIPKTA30. Für die Berechnung wurde das DsRED/GFP Verhältnis unter Kontrollbedingungen auf 100% gesetzt und das DsRED/GFP Verhältnis unter Stressbedingungen dazu in Relation. Die Streuungsbalken geben den Fehler der Standardabweichung wieder. Die Mittelwerte für Steptoe und Morex basieren auf 5 Experimenten, während der Mittelwert für Golden Promise auf der Grundlage von allen 30 Experimenten des ersten *Screenings* berechnet wurde.

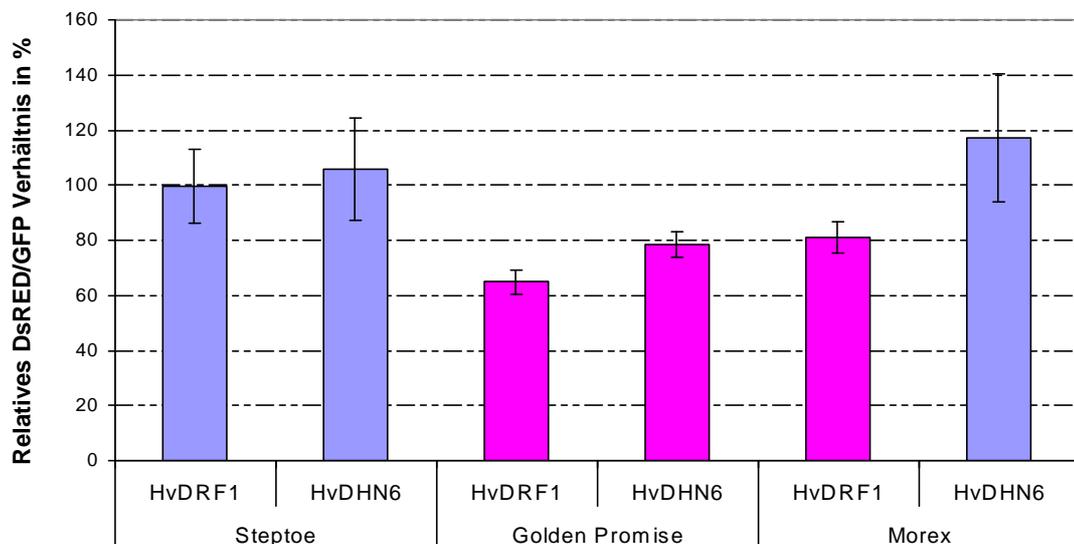


Abbildung 18: Einfluss der RNAi Konstrukte *HvDRF1* und *HvDHN6* auf das relative DsRED/GFP Verhältnis unter Stressbedingungen, in verschiedenen Sorten der Gerste.

Im Diagramm sind die Mittelwerte für beide RNAi Konstrukte in Relation zum Mittelwert des leeren RNAi-Vektors pIPKTA30 (Kontrolle, auf 100% gesetzt) dargestellt. Der Test wurde mit den Sorten Golden Promise, Steptoe und Morex durchgeführt. Die Streuungsbalken geben den Fehler der Standardabweichung wieder. Eine statistisch signifikante Reduzierung des DsRED/GFP Verhältnis gegenüber der Kontrolle ist farblich hervorgehoben (■). Die Werte für *HvDRF1* und *HvDHN6*, getestet in Golden Promise, stammen aus dem ersten *Screening* (Abschnitt 3.3) und sind zum Zwecke des Vergleiches in der Abbildung mit dargestellt. Sie wurden basierend auf den ersten fünf Experimenten berechnet. Die Mittelwerte für Morex wurden aus insgesamt 4 Experimenten ermittelt.

Ein ähnliches Bild zeigt sich unter der Verwendung des RNAi Konstruktes gegen *HvDRF1*. Während in Steptoe der relative DsRED/GFP Wert unter Stressbedingungen nahezu identisch mit der Kontrolle ist sinkt er in Golden Promise um ca. 35% ($65 \pm 4,31\%$, Abbildung 18).

In Morex konnte mit diesem Konstrukt ebenfalls ein signifikantes Ergebnis erzielt werden. Im Vergleich zur Kontrolle lag der relative DsRED/GFP Wert hier 20% niedriger. Dieses Resultat wurde jedoch erst erhalten, nachdem basierend auf einem Ausreißertest (Nalimow), das Ergebnis aus dem fünften Experiment eliminiert worden war.

3.5 GFP Fusionskonstrukte

Die Verwendung der Konstrukte HS08A22 und HU05J23 (Tabelle 7, *Screening I*), welche unterschiedliche *DREB2-like* Gene zum Ziel hatten, offenbarte voneinander abweichende Ergebnisse während des ersten *Screens*. Um zu kontrollieren, ob das auf RNA Interferenz basierende Testsystem zielgenspezifisch funktionierte, wurden die Zielsequenzen mit der Sequenz für das grün fluoreszierende Protein fusioniert (siehe 2.12).

Im Falle des Fusionskonstruktes *HvDREB1::GFP* konnte auf diese Weise ein starkes Fluoreszenzsignal detektiert werden, dass sich nur im Zellkern befand (Abbildung 19, Bilder C,D). Im Gegensatz zum Fusionsprotein war die Fluoreszenz beim Wildtyp jedoch nicht nur auf den Zellkern beschränkt, sondern über die gesamte Zelle verteilt. Dabei hoben sich insbesondere die Zellwand sowie die einzelnen Zellplasmastränge vom sonst dunklen Hintergrund ab.

Im Unterschied zum Wildtyp und dem *HvDREB1::GFP* Fusionsprotein war es allerdings zuerst nicht möglich, ein Signal für das zweite Konstrukt, *HvDRF1::GFP*, zu erhalten. Daher wurde versucht, als erstes einen destabilisierenden Abschnitt zu entfernen (Sakuma et al., 2006), welcher in unmittelbarer Nähe der AP2 Domäne lag. Dies führte jedoch noch nicht zum gewünschten Ergebnis, so dass die kodierende Sequenz für das GFP Protein nochmals vor die bereits bestehende Fusionssequenz kloniert wurde. Die

GFP::Gen::GFP Kasette bildete folglich einen durchgehenden Leserahmen, dessen Expression ein doppeltes GFP-Fusionsprotein erzeugte.

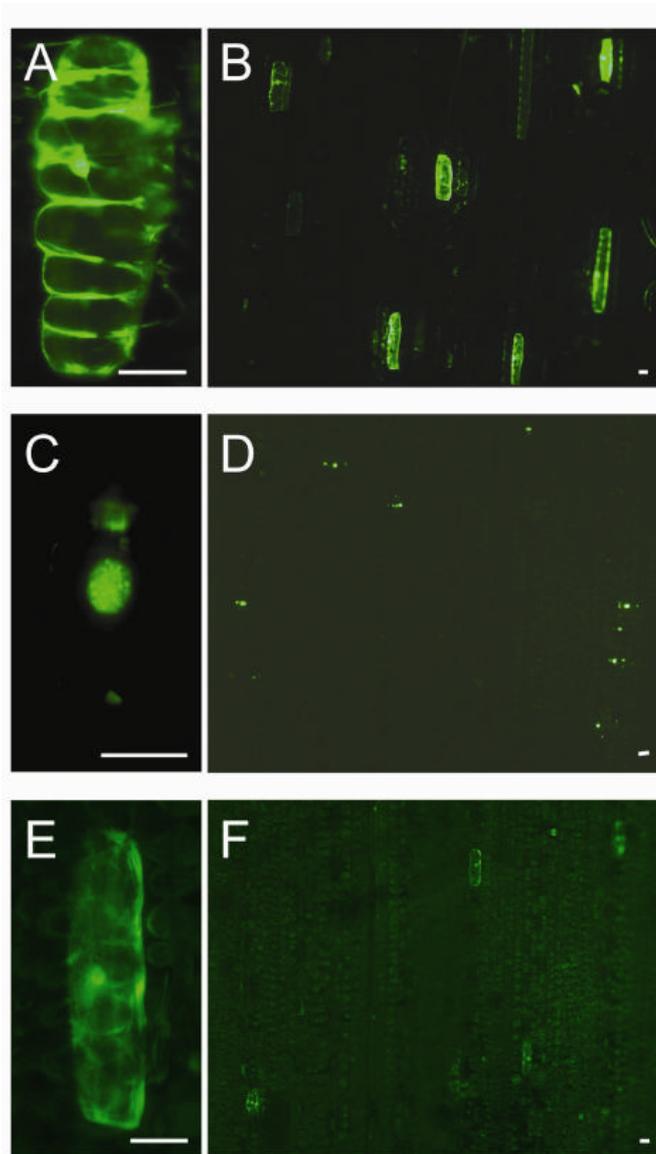


Abbildung 19: Detektion der GFP Fluoreszenzsignale in den Zellen der Blattepidermis.

Die Darstellung zeigt fluoreszierende Zellen, welche entweder mit pGFP (A, B) oder mit den Fusionskonstrukten HvDREB1::GFP (C, D) bzw. GFP::HvDRF1::GFP (E, F) transformiert worden sind. Die Auswertung erfolgte 24 h nach dem Beschuss der Gerstenblätter (Golden Promise). Die Bilder A, C und E stellen typische Zellen in einer höheren Vergrößerung dar. Der Größenmaßstab beträgt 20 μm und ist in jedem Bild durch eine horizontale weiße Linie gekennzeichnet.

Die Untersuchung der mit diesem Fusionskonstrukt transformierten Zellen ergab, dass diese eine schwache Fluoreszenz, die sich deutlich vom Wildtyp abgrenzen lässt, aufwiesen (Abbildung 19, Bilder E, F). Obwohl es sich bei dem

Gen *HvDRF1* um einen Transkriptionsfaktor handelt (Xue et al., 2004), konnte das Fusionsprotein in der gesamten Zelle detektiert werden und war weder auf den Zellkern noch auf die Mitochondrien beschränkt. Das Ergebnis stand somit im Gegensatz zum erwarteten Phänotyp, der dem des *HvDREB1::GFP* Fusionsproteins ähneln müsste.

3.5.1 Test auf *Cross-Silencing* Effekte

Nachdem die Fusionskonstrukte, hinsichtlich ihrer Fluoreszenz, erfolgreich getestet worden waren, konnten mit ihnen die *Silencing* Experimente durchgeführt werden. Dazu wurde der *detached leaf assay* in einer leicht abgeänderten Form verwendet (siehe auch 2.11). Zum Beispiel wurden in jedem Ansatz jeweils der Vektor für das DsRED Reporterprotein, der Vektor für ein GFP-Fusionsprotein (*HvDREB1::GFP* bzw. *GFP::HvDRF1::GFP*), sowie ein RNAi Konstrukt (*HvDRF1*, *HvDREB1* oder die Kontrolle *PIP3TA30*) gemischt und in die Zellen der Blattepidermis co-transformiert. Die Primärblattsegmente wurden nach der Auswertung der GFP Fluoreszenz auch nicht wie sonst üblich dem Stress durch Dehydration ausgesetzt, da die Auswertung der DsRED Zellen für die Normalisierung des Experiments benötigt wurde, sondern für 4 Tage auf Phytoagar belassen.

Nach Auswertung der DsRED Zellen wurden die entsprechenden GFP Zellen auf diese normalisiert und das Verhältnis zwischen den RNAi Konstrukten und der Kontrolle (*PIP3TA30*) verglichen. Um ein besseres statistisch signifikantes Ergebnis erhalten zu können wurden die Experimente blattweise ausgewertet und analysiert. Wie aus der Abbildung 20 hervorgeht, werden weniger GFP Zellen detektiert, wenn das entsprechende gegen die Zielsequenz gerichtete RNAi Konstrukt verwendet wird. Damit wird klar, dass beide Konstrukte gegen ihre Zielsequenz wirken, obwohl das RNAi Konstrukt gegen *HvDREB1* im RNAi Screen für Trockenstresstoleranz keinen Effekt gezeigt hatte (siehe Abbildung 10). Wie aus den Experimenten ebenfalls hervorgeht, kann zwischen einzelnen Familienmitgliedern exakt unterschieden werden und ein *cross-silencing* findet zumindest im Falle dieser beiden untersuchten Konstrukte nicht statt.

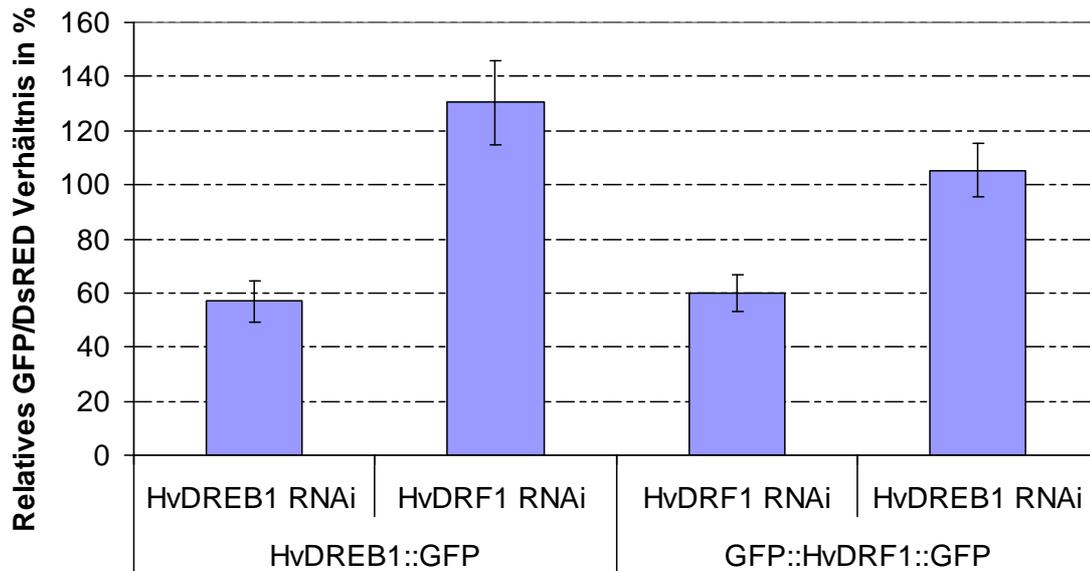


Abbildung 20: Einfluss der RNAi Konstrukte *HvDRF1* und *HvDREB1* auf das GFP/DsRED Verhältnis.

Im Diagramm sind die Mittelwerte für beide RNAi Konstrukte in Relation zum Mittelwert des leeren RNAi-Vektors pIPKTA30 (Kontrolle, auf 100% gesetzt) dargestellt. Für den Beweis der Spezifität der RNAi Konstrukte wurden zwei verschiedene GFP-Fusionskonstrukte eingesetzt (siehe Text). Die Streuungsbalken geben den Fehler der Standardabweichung wieder.

3.5.2 Weitere Überprüfung der *Target*-Spezifität

Um sogenannte *off-target* Effekte zusätzlich ausschließen zu können wurden zwei weitere RNAi Konstrukte generiert, welche gegen andere Bereiche der mRNA von *HvDRF1*, einem der Zielgene gerichtet waren (siehe Abbildung 22). Dabei wird deutlich, dass alle drei gegen *HvDRF1* gerichteten RNAi Konstrukte die Anzahl an grün fluoreszierenden Zellen, die GFP::*HvDRF1*::GFP co-exprimierten, signifikant senken konnten (Tabelle 16).

Tabelle 16: Zielgerichtetes *Silencing* des GFP::*HvDRF1*::GFP Fusionskonstruktes.

In der Übersicht sind die relativen GFP Zellzahlen nach Verwendung unterschiedlicher RNAi Konstrukte zusammengestellt. Die Auswertung der GFP Expression erfolgte 24 h nach dem Beschuss. Im Gegensatz dazu wurde DsRED 5 Tage nach Beschuss detektiert um anschließend eine Normalisierung der GFP Zellzahl auf pUbi-DsRED-Nos durchzuführen. Es wurden insgesamt vier Experimente in Golden Promise für eine Analyse durchgeführt und blattweise ausgewertet.

^(a) Relativ zum leeren RNAi Vektor pIPKTA30 (Kontrolle) ^(b) Anzahl ausgewerteter Blattsegmente

| | GFP-Expression in % ^(a) | Fehler der Standard- abweichung | p-Wert ($p \leq 0,05$) | n ^(b) |
|----------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|------------------|
| <i>HvDRF1</i> _RNAi1 | 59,96 | 5,84 | 1,5341E-06 | 20 |
| <i>HvDRF1</i> _RNAi2 | 67,59 | 4,53 | 8,5072E-07 | 20 |
| <i>HvDRF1</i> _RNAi3 | 71,82 | 4,11 | 1,5043E-06 | 20 |
| <i>HvDREB1</i> _RNAi | 105,27 | 9,82 | 0,59738545 | 20 |

Das *HvDREB1* Konstrukt hatte erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die Anzahl an fluoreszierenden Zellen und lag auf gleichem Niveau mit der Kontrolle (pIPKTA30, entspricht 100 %).

3.5.3 Effektivität der RNAi Konstrukte gegen *HvDRF1*

Betrachtet man alle drei gegen *HvDRF1* gerichteten RNAi Konstrukte, im « normalen » *Screening*, d.h. deren Auswirkung auf das DsRED/GFP Verhältnis unter Trockenstressbedingungen und vergleicht dies mit der leeren Vektorkontrolle pIPKTA30, dann werden nur minimale Unterschiede in der Effizienz zwischen ihnen sichtbar.

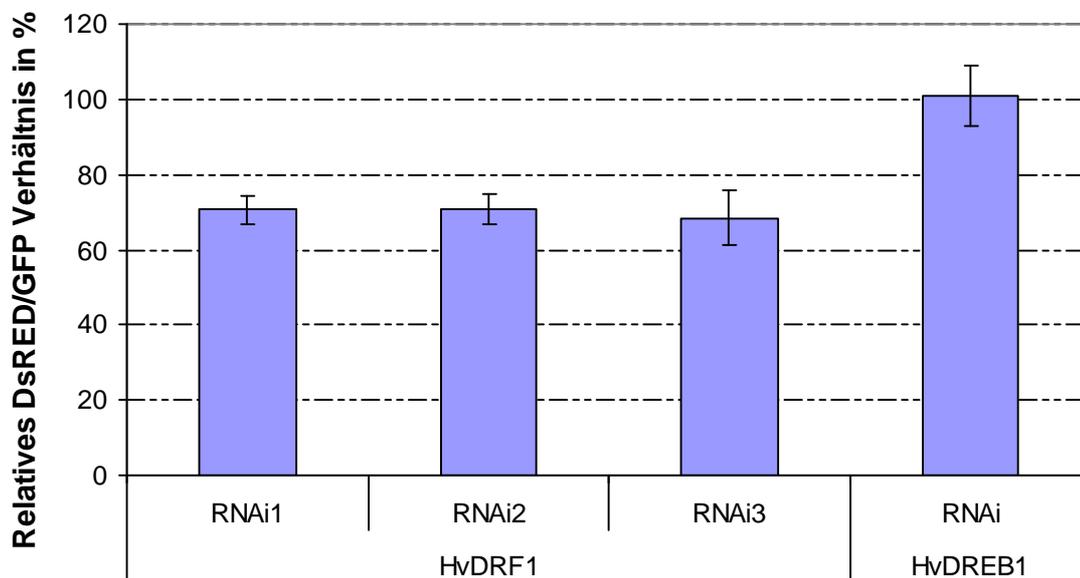


Abbildung 21: Signifikante Verminderung des relativen DsRED/GFP Verhältnisses durch RNAi Konstrukte, welche gegen unterschiedliche Regionen von *HvDRF1* gerichtet sind.

Im Diagramm sind die Mittelwerte für drei RNAi Konstrukte in Relation zum Mittelwert des leeren RNAi-Vektors pIPKTA30 (Kontrolle, auf 100% gesetzt) dargestellt. Das Konstrukt gegen *HvDREB1*, ebenfalls ein *DREB2-like* Gen, zeigte nur einen Effekt gegen das *DREB1::GFP* Fusionskonstrukt (siehe 3.5.1), hatte jedoch keine Auswirkungen auf das relative DsRED/GFP Verhältnis unter Stressbedingungen im RNAi *Screen*. Die Streuungsbalken geben den Fehler der Standardabweichung wieder.

Die Resultate für das erste und zweite RNAi Konstrukt, welche einen Bereich abdecken, der die charakteristische AP2 Bindedomäne beinhaltet, sind nahezu identisch. Das dritte Konstrukt, welches gegen das 3' Ende der mRNA gerichtet ist, kann das DsRED/GFP Verhältnis zwar um 2 % stärker senken (Abbildungen 21 und 22), dies dürfte jedoch innerhalb der Fehlertoleranz liegen.

Alle drei RNAi Konstrukte erniedrigten das Verhältnis von DsRED- zu GFP fluoreszierenden Zellen signifikant (Abbildung 22).

Das gegen HvDREB1 gerichtete, als Negativkontrolle verwendete, RNAi Konstrukt zeigte hingegen keinen Effekt.

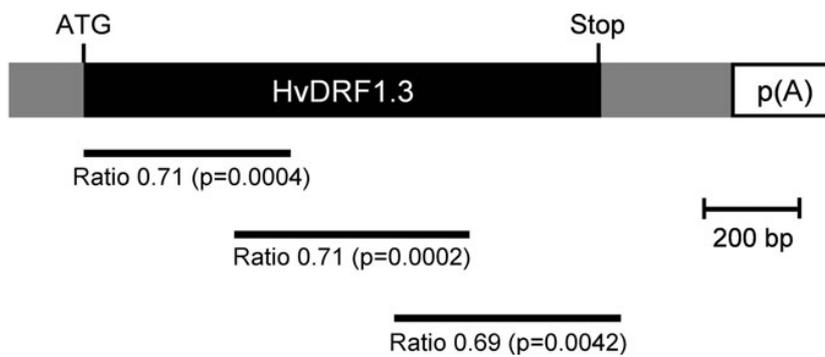


Abbildung 22: Zielregionen der drei gegen *HvDRF1* gerichteten RNAi Konstrukte.

Die Zielregionen der drei gegen die mRNA von *HvDRF1* gerichteten RNAi Konstrukte sind durch schwarze horizontale Linien gekennzeichnet. Darunter befinden sich die erreichten relativen DsRED/GFP Werte im Vergleich zur Kontrolle [diese entspricht dem Wert 1 (bzw. 100%)]. In Klammern werden die Ergebnisse des gepaarten *two-sample t-test* (es wurde zweiseitig getestet) wiedergegeben. [Darstellung wurde entnommen aus Marzin et al., *Journal of Experimental Botany* 59(12): 3359-3369 (2008)]

3.6 Ermittlung der Transkriptmenge von *HvDRF1*, *HvDHN6*, *HvHVA1* und *HvNHX1* unter Stressbedingungen

In der ersten Phase des *Screenings* konnten vier Konstrukte ermittelt werden, die einen signifikanten Einfluss auf das DsRED/GFP Verhältnis hatten. Daher stellte sich die Frage, wie die Expression dieser Kandidaten während der Stressphase aussieht und ob das beobachtete Ergebnis nicht von anderen Faktoren beeinflusst wurde.

Für die Analyse wurde Blattmaterial sowohl von nicht beschossenen Proben als auch von beschossenen Proben aufgearbeitet und RNA isoliert (siehe 2.9.3). Zusätzlich wurde zwischen Proben der Kontrolle auf Phytoagar und Proben, die dem Stress ausgesetzt waren, unterschieden. Die nicht beschossenen Blattsegmente wurden dabei auf die gleiche Weise behandelt wie die Blattsegmente, welche mit einem Gemisch aus den Vektoren pGFP, pUbi-DsRED-Nos und pIPKTA30 transformiert worden waren. Im Anschluss an die Isolation wurde die RNA in cDNA umgeschrieben und in zwei technischen Wiederholungen per qRT-PCR untersucht (siehe 2.10.2).

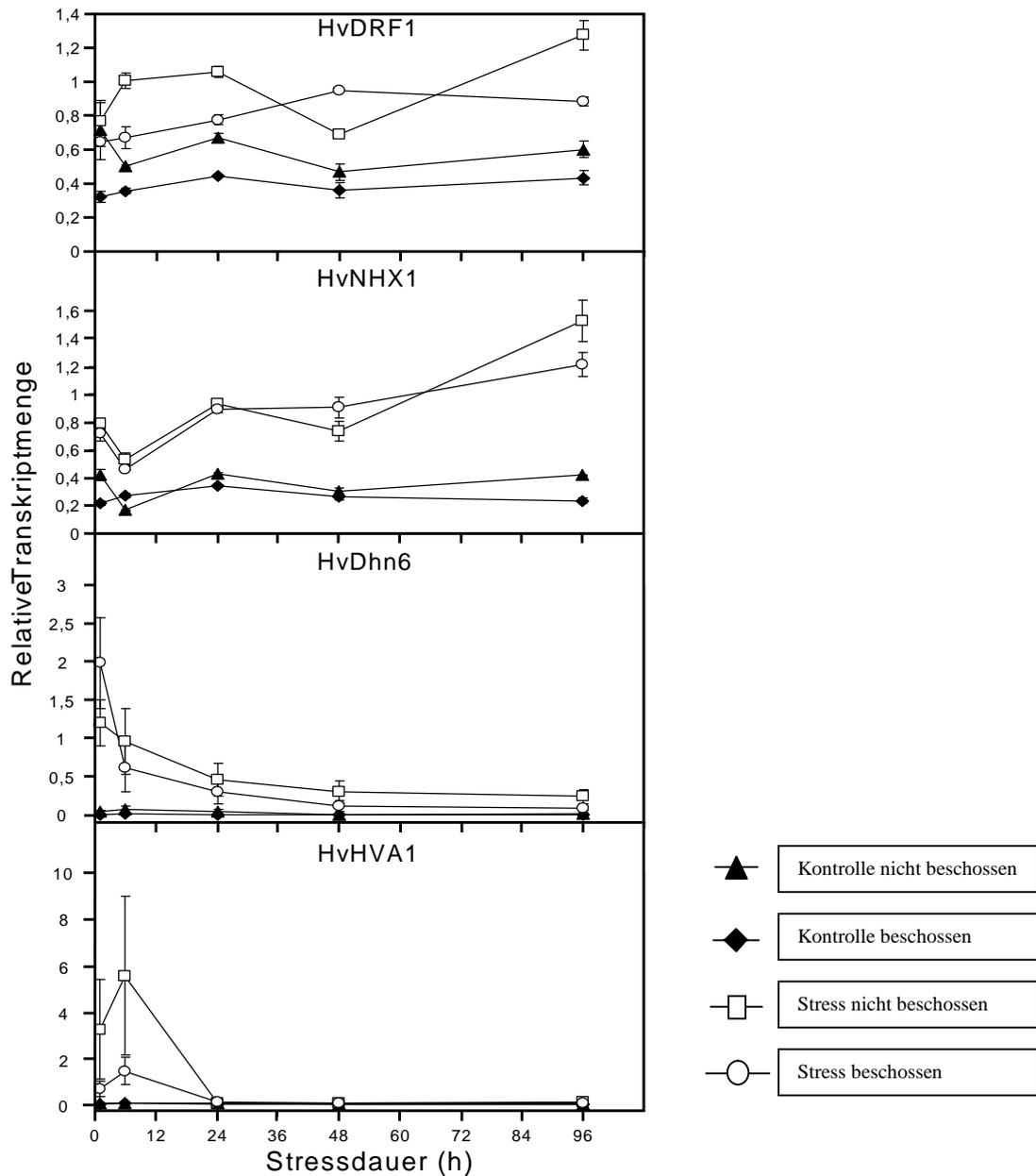


Abbildung 23: Real-time PCR Ergebnisse zur Expression von *HvDRF1*, *HvDHN6*, *HvHVA1* und *HvNHX1* in transformierten und nicht-transformierten Proben.

Die Ergebnisse wurden für die Zeitpunkte 1 h, 6 h, 24 h, 48 h sowie 96 h nach Stressbeginn für alle Kandidaten ermittelt und auf die Transkriptmenge des Gens UBC normalisiert (siehe 2.10.2.3). Die Datenpunkte setzen sich aus zwei technischen Wiederholungen der qRT-PCR zusammen. Die Streuungsbalken geben die Minimum- und Maximumwerte wieder. Die Ergebnisse der Kontrollen werden durch ausgefüllte Symbole dargestellt und die Ergebnisse der gestressten Proben durch leere Symbole. Die Experimente wurden mit Golden Promise durchgeführt.

Die Transkriptmenge der vier getesteten Gene wurde durch die Software von Applied Biosystems (siehe 2.15) mittels einer zuvor erstellten Standardkurve berechnet und auf die Transkriptmenge des UBC Gens aus Gerste (siehe 2.10.2.3) normalisiert. Die daraus resultierenden Ergebnisse zeigen je nach

untersuchtem Transkript ein unterschiedliches Expressionsmuster (siehe Abbildung 23).

Das LEA Transkript *HvHVA1* wurde bereits 1 h nach Beginn des Stresses induziert und erreichte nach 6 h das Abundanz-Maximum. Nach 24 h war die Menge wieder auf dem Niveau der Kontrolle angelangt und verblieb dort bis zum Ende des Experiments.

Dehydrin 6 wurde ebenfalls 1 h nach Stressbeginn stark hochreguliert. Wahrscheinlich passierte dies aber schon früher, da die Transkriptmenge bereits zu diesem Zeitpunkt das Maximum erreichte. Die Expression von *HvDHN6* war, ähnlich wie die von *HvHVA1*, nur transient.

Das Transkript für den Na^+/H^+ Antiporter *HvNHX1* war bereits zum Anfang der Stressperiode induziert, und diese Induktion wurde während der gesamten Laufzeit von 4 Tagen noch weiter verstärkt. In den Proben der Kontrolle war ebenfalls eine geringe Induktion zu erkennen, jedoch bleibt der Transkriptlevel annähernd gleich hoch bis zum Ende.

Auch das Transkript des Transkriptionsfaktors *HvDRF1* war, ähnlich wie *HvNHX1*, bereits von Anfang an in niedriger Konzentration vorhanden und wurde während der Stressphase noch weiter verstärkt.

Um die Replizierbarkeit der erzeugten Daten zu beweisen wurde ein zweites biologisches Experiment durchgeführt und in Analogie zum ersten Experiment RNA isoliert. Da die bedeutendsten Unterschiede während der ersten drei Zeitpunkte (1 h, 6 h, 24 h) im ersten Experiment zu beobachten waren, wurden in der Wiederholung nur noch diese betrachtet (Abbildung 24). Auch zwischen beschossenem und nicht-beschossenem Material zeigten sich im ersten Experiment keine Unterschiede, so dass dies in der Wiederholung ebenfalls nicht erneut betrachtet wurde.

Der Vergleich beider biologischer Experimente lässt größtenteils praktisch keine Unterschiede erkennen. Für alle drei untersuchten Zeitpunkte gibt es nur wenige Abweichungen. Unterschiede lassen sich nur in der Transkriptmenge für *HvNHX1* und *HvDRF1* unter Stressbedingungen beobachten.

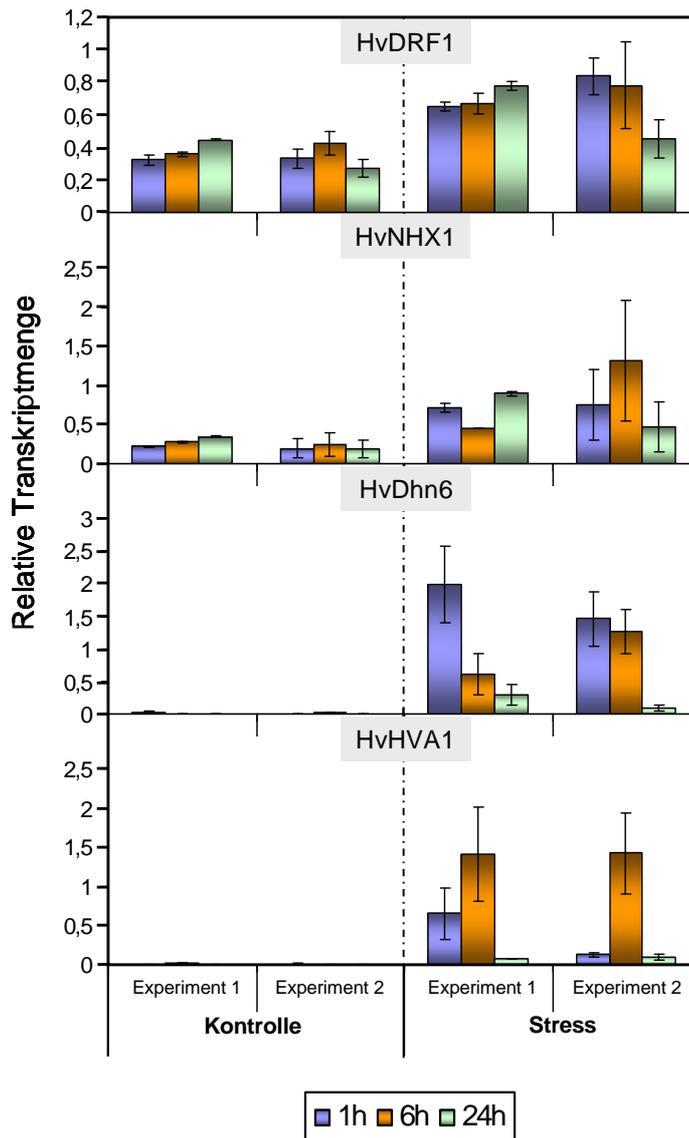


Abbildung 24: Vergleich der *Real-time* PCR Ergebnisse von *HvDRF1*, *HvDHN6*, *HvHVA1* und *HvNHX1* unter Stressbedingungen, aus zwei unabhängigen Experimenten.

Die Ergebnisse wurden für die Zeitpunkte 1 h, 6 h und 24 h nach Stressbeginn für alle Kandidaten ermittelt und auf die Transkriptmenge des Gens UBC normalisiert (siehe 2.10.2.3). Die Datenpunkte setzen sich aus jeweils zwei Experimenten zusammen. Die Streuungsbalken geben die Minimum- und Maximumwerte wieder. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse mit transformierten (pIPKTA30, pUBI-DsRED-Nos, pGFP) Pflanzenmaterial.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass alle vier untersuchten Gene unter den gegebenen Experimentbedingungen des RNAi Screens für Trockentoleranz normal induzierbar sind und der beobachtete Effekt nicht auf die biolistische Transformation zurückzuführen ist.

3.7 Lokalisierung von H₂O₂ mittels DAB Färbung

Um das TIGS Testsystem näher zu charakterisieren wurde bestimmt wie stark die ROS Bildung in gestressten Blättern ist. Zu diesem Zweck wurden die behandelten Proben und Kontrollen mit DAB gefärbt (siehe 2.14). Diese Verbindung bildet bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxid (Peroxidaseaktivität) ein bräunliches Präzipitat und ist mit bloßem Auge sichtbar.

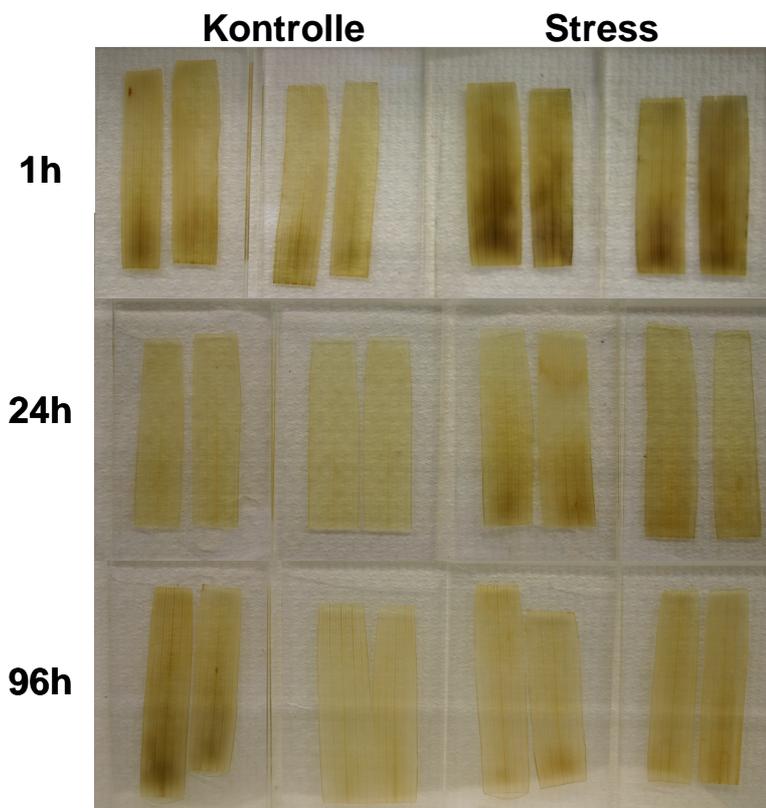


Abbildung 25: Vergleich der H₂O₂ Akkumulation unter Kontroll- und Stressbedingungen.

Die Blätter wurden 1 h, 24 h und 96 h nach Stressbeginn für 3 h mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) gefärbt und zur besseren makroskopischen Beurteilung anschließend mit Chloralhydrat ü.N. entfärbt. Für das Experiment wurden die Blätter mit den Vektoren pIPKTA30, pUBI-DsRED-Nos, pGFP co-transformiert (siehe 2.14).

Wie in Abbildung 25 deutlich zu erkennen ist, lassen sich im Unterschied zu den Kontrollen, höhere Konzentrationen von H₂O₂ in gestressten Blättern feststellen. Bereits 1 h nach Beginn des Stress werden große Mengen, über das gesamte Blatt verteilt, freigesetzt. Nach 24 h war die H₂O₂ Bildung wieder niedriger und verschwand bis zum Ende des Experiments nach 96 h vollständig.

Allerdings zeigten auch die Kontrollen eine basale H_2O_2 Bildung, was auf den Beschuss mit Goldpartikeln und den somit applizierten Stress zurückzuführen sein kann.

3.8 RWC

Für die Beurteilung des vorliegenden Stresses und um einen Vergleich der erzielten Ergebnisse mit Felddaten vornehmen zu können, bedarf es einer Größe zur Charakterisierung des Zustandes der Blätter. Eine für diesen Zweck geeignete Größe ist der relative Wassergehalt (*Relative Water Content, RWC*). Er wird bestimmt durch die Verrechnung des Frischgewichts von geernteten Blättern mit der Gewichtsmasse von vollständig turgiden Blättern, als auch mit deren Trockengewicht nach zweitägiger Trocknung (siehe 2.13)(Barrs und Weatherley, 1962).

Betrachtet man unter diesem Gesichtspunkt die Kontrollen, so stellt man fest, dass diese im Verlaufe des Experiments kaum an Gewicht verlieren. Sie erhöhen im Gegenteil noch etwas ihre Masse, was durch einen um 3,39% gesteigerten RWC Wert reflektiert wird. Dieser steigt von anfänglich $94,24 \pm 1,06\%$ nach 4 Tagen, zum Ende eines Versuches, auf $97,63 \pm 0,73\%$.

Im Kontrast dazu wird das Gewicht der gestressten Blätter zu Beginn erheblich gesenkt. Durch die Dehydration bei Raumtemperatur auf ein Frischgewicht von 60%, wird der relative Wassergehalt der Blätter auf $66,38 \pm 2,4\%$ reduziert. Im Laufe des Experiments nehmen die Blätter wieder etwas Wasser auf. Infolge dessen steigt der RWC Wert auf durchschnittlich $73,44 \pm 3,47\%$ an.

4. Diskussion

Das Wachstum und die Entwicklung von Pflanzen, sowie die Produktivität d. h. der Ertrag, werden durch unterschiedliche abiotische Faktoren negativ beeinflusst. Einer der wichtigsten Einflüsse, der deshalb Gegenstand dieser Arbeit war, ist der Stress durch Trockenheit. Pflanzen haben eine Reihe von unterschiedlichen Strategien entwickelt um mit Bedingungen fertig zu werden, die nicht dem Normalzustand entsprechen. Extreme Temperaturen, Austrocknung in Folge von Wasserverlust oder Begleiterscheinungen wie oxidativer Stress sind dabei nur einige Situationen, die gemeistert werden müssen. Abwehrmaßnahmen, welche Pflanzen ergreifen können sind dabei äußerst vielfältig und reichen von der „Flucht“ (*escape*) vor schlechteren Lebensbedingungen durch Verlegung des Blühzeitpunktes, über die Vermeidung von Stress (*avoidance*) durch Ausbildung eines tieferen Wurzelsystems oder Veränderung der Blattmorphologie, bis hin zur Toleranz und Resistenz (Mundree et al, 2002).

Ziel dieser Arbeit war es wichtige Gene zu identifizieren, die maßgeblich an der Toleranz der Pflanze gegenüber Trockenstress beteiligt sind. Zu diesem Zweck sollte ein revers-genetischer Ansatz, basierend auf RNA Interferenz genutzt werden, der hochdurchsatztauglich ist. Einen ersten Hinweis auf ein mögliches Testsystem gab die Arbeit von Panstruga et al. (2003), in der ein Reportersystem bestehend aus den beiden Fluoreszenzmarkern GFP und DsRED eingesetzt wurde, wobei GFP als Normalisierungsfaktor für DsRED diente. Im Unterschied zu Panstruga et al. (2003) wurde DsRED in meiner Arbeit aber nicht eingesetzt um die RNAi Targeteffizienz eines Fusionspartners zu bestimmen, sondern um Stress verstärkende oder mildernde Effekte von RNAi Konstrukten bei Wassermangel nachzuweisen.

4.1 Das Testsystem

Zu Beginn der Arbeit stand die Entwicklung eines transienten Testsystems im Mittelpunkt. Das System sollte dabei so einfach wie möglich in der Handhabung als auch der Auswertung sein, um später leichter Verbesserungen implementieren zu können, welche sich dann z.B. auf die Erhöhung der Effizienz d.h. die Erhöhung des Durchsatzes der zu untersuchenden Gene,

auswirken würden. Grundlegend musste jedoch erst entschieden werden, in welcher Art und Weise Pflanzen oder Pflanzenteile dem Stress ausgesetzt werden sollten. Es wurde letztendlich beschlossen, ausschließlich die Blätter von 7 Tage alten Pflanzen zu untersuchen. Ein wesentlicher Grund dafür ist die Erhöhung des Durchsatzes im Testverfahren. Innerhalb kurzer Zeit können so mehrere Untersuchungen durchgeführt werden. Ein weiterer Vorteil der sich hieraus ergibt betrifft die Homogenität des eingesetzten Materials. Alle Pflanzen sind gleichmäßig gewachsen und somit werden Unterschiede wie etwa verschiedene Entwicklungsstände vermieden, die sich auf das Testsystem auswirken könnten.

Während der Dehydration wurde mehrmals das Gesamtgewicht von 5 Blättern pro Schale kontrolliert (siehe Material und Methoden), um sicherzustellen, dass das gewünschte relative Frischgewicht (RFW) nicht unterschritten wurde. In diesem Zusammenhang war es wichtig, Primärblätter mit möglichst homogenem Frischgewicht (hauptsächlich bedingt durch die Blattbreite) auszuwählen. Betrachtet man rückwirkend alle durchgeführten Experimente, so fällt auf, dass die verwendeten Blätter trotz festgelegter Auswahlkriterien, eine unterschiedlich lange Zeit für das Erreichen des RFW von 60% benötigten (90 ± 30 min).

Neben den Überlegungen zur Applikation des Trockenstresses mussten auch wichtige Parameter festgelegt werden, die es ermöglichten die Auswirkungen der RNA Interferenz unter Trockenstress zu erkennen. Für die Auswertung wurde deshalb entschieden, ein *read out* System zu etablieren, welches auf zwei in der Forschung bereits bestens bekannten Fluoreszenzmarkern basiert. Für eine Normalisierung der Daten und aufgrund der schnellen Akkumulation des Reporters, wurde das grün fluoreszierende Protein (GFP) eingesetzt. Damit war es bereits nach 24 h möglich, nahezu 100% der transformationspositiven Epidermiszellen zu identifizieren (siehe auch 3.1.2 DsRED/GFP Akkumulation), noch bevor eine Fluoreszenz des zweiten Markers sichtbar wurde. Der zweite Reporter, das sogenannte rot fluoreszierende Protein (RFP oder DsRED) besteht aus vier gleichen Untereinheiten und ist bekannt dafür, dass dessen « Reifung » (d.h. die Bildung des Chromophors und der Zusammenbau der Untereinheiten) mehrere Tage dauert. Nachdem es dann vollständig

assembliert worden ist und fluoresziert, ist es absolut unempfindlich gegenüber Veränderungen des pH Wertes im Bereich von 5 bis 12 (Baird et al., 2000).

Darüber hinaus ist bekannt, dass das Proteinerückgrat, welches das Chromophor im Zentrum schützt, äußerst anfällig gegenüber denaturierenden Prozessen ist, welche z.B. durch Trockenstress ausgelöst werden. Bei Denaturierung des Proteinerückgrates wird dann das Chromophor einem nukleophilen Angriff ausgesetzt. Die Auflösung der C=N Doppelbindungen, innerhalb der als Acylimine bezeichneten Chromophorpeptide, durch Anlagerung von Wasser, führt zum Verlust der charakteristischen Struktur und damit der Fluoreszenz (Gross et al., 2000; Baird et al., 2000). Ein Verlust der Fluoreszenz würde jedoch auch erfolgen, wenn es aufgrund des applizierten Stresses zur Störung des Assemblierungsprozesses der einzelnen Homomere käme. Die langsame Bildung von « reifen » DsRED Molekülen könnte z.B. durch entstehende reaktive Sauerstoffradikale gestört werden, was die Zahl der DsRED Zellen mindern würde.

Es ist bekannt, dass ROS wie z.B. Hydroxyl-Radikale (OH^\cdot) oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2) neben der Teilnahme am Zellwachstum und der Entwicklung der Pflanze (Laloi et al., 2004), auch eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion spielen bzw. von essentieller Bedeutung während der Pflanzen-Pathogen-Interaktion sind (Levine et al., 1994; Brisson et al., 1994). Unter Trockenstress haben ROS jedoch überwiegend negative Auswirkungen auf zellinterne Abläufe. Die Peroxidierung von Membranlipiden oder Oxidierung von Thiolgruppen von Enzymen und Proteinen führt zur Instabilität und daraus folgend zum Verlust der Strukturintegrität bzw. Funktionalität. Das Testsystem wurde daher zum Zweck der näheren Charakterisierung verschiedenen Nachweisen unterzogen, welche die Identifikation von zwei ROS Spezies zum Ziel hatten. Zum einen sollte der Nachweis von Superoxidanionen mittels NBT-Färbung (Nitroblautetrazoliumsalz) erfolgen und zum anderen der Nachweis von H_2O_2 mittels Diaminobenzidin (DAB). NBT bildet infolge der Reaktion mit Superoxiden eine unlösliche blau-violette Formazanverbindung, die bereits mit dem bloßen Auge sichtbar wird. Da jedoch keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Stressbehandlung sichtbar waren, kann dieser Nachweis nicht in die Diskussion miteinbezogen werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich beim Nachweis von H_2O_2 eine deutliche stressinduzierte Intensivierung (siehe

Abbildung 25). Das ebenfalls in den Kontrollen nachweisbare H_2O_2 , könnte im Gegensatz dazu eher auf den Stress durch den Beschuss mit Goldpartikeln zurückzuführen sein. Für die Beseitigung von ROS sind neben der enzymatischen Neutralisierung auch sogenannte kompatible Substanzen verantwortlich (siehe Einleitung). Bedenkt man diese Tatsache, so ergeben sich hieraus einige zu testende Genkandidaten, die z.B. für Enzyme des Syntheseweges von kompatiblen Substanzen kodieren oder für Enzyme, welche die Folgeschäden von ROS beseitigen. Es wäre zu erwarten, dass die Stummschaltung dieser Gene einen signifikanten Effekt im TIGS Screen für Trockenstress hätte.

Neben der Möglichkeit der Störung des DsRED Assemblierungsprozesses oder der Denaturierung des DsRED Proteins, gibt es auch noch die Möglichkeit des Verlustes der Fluoreszenz durch den Zelltod. Die Auswirkungen aller benannten Möglichkeiten den Verlust der Fluoreszenz betreffend konnten in den Experimenten der *proof of concept* Phase mit dem Kontrollvektor pIPKTA30 nachgewiesen werden. So reduzierte sich das Verhältnis von DsRED zu GFP fluoreszierenden Zellen unter Stress im Vergleich zu den Kontrollbedingungen um etwa 15% (Mittelwert: $84,52 \pm 3,42\%$, $n=29$, $p=0,0001$). Dieser Effekt war auch in allen weiteren durchgeführten Experimenten zu beobachten. Da für die Durchführung des RNAi (oder TIGS) Screenings die Gerstensorte Golden Promise verwendet wurde, stellte sich die Frage, ob die durch Dehydrierungsstress induzierte Reduktion der DsRED Fluoreszenz in weiteren Genotypen ebenfalls beobachtet werden kann. Zum Vergleich wurden die Sorten Steptoe und Morex getestet, die sich in ihrer Anfälligkeit gegenüber Trockenstress unterscheiden. Das Ergebnis zeigte in der Tat, dass Morex, welche resistent gegenüber Dehydration ist, ähnliche Werte des Verhältnisses aufweist wie Golden Promise (Mittelwert: $85,87 \pm 8,72\%$, $n=5$, $p=0,18$). In Steptoe hingegen bricht die Anzahl an DsRED Zellen stärker ein, was die erhöhte Anfälligkeit dieser Sorte auf Trockenstress widerzuspiegeln scheint. Würde man in Steptoe RNAi Konstrukte für Kandidaten der Stresstoleranz testen wollen, so wäre ein möglicher Effekt vielleicht nicht zu beobachten, da die Anzahl an DsRED Zellen bereits in der Kontrolle stark erniedrigt ist. Aus diesem Grund scheint die Sorte Steptoe wahrscheinlich eher für die

Überexpression von Kandidaten geeignet zu sein, was eine Stabilisierung der Anzahl DsRED-fluoreszierender Zellen bewirken würde.

Die Reduktion der Anzahl an DsRED Zellen ergibt sich somit nicht nur infolge zellintern ablaufender proteolytischer Prozesse oder Störung der Assemblierung, sondern wird auch durch den genetischen Hintergrund der verwendeten Sorte beeinflusst, wie die Experimente mit den Sorten Steptoe und Morex andeuteten.

Abschließend ist zu sagen, dass das hier vorgestellte Testsystem jedoch nur begrenzt Informationen über Gene der Trockenstresstoleranz der Gerste liefern kann. An erster Stelle steht die Tatsache, dass es sich um eine Untersuchung von Einzelzellen handelt, welche nicht die Möglichkeit bietet, das komplexe System Pflanze als Ganzes zu beurteilen. D.h. mit Rücksicht auf die Experimentbedingungen können z.B. keine Gene der *escape* oder *avoidance* Mechanismen untersucht werden. Das Umgehen von Stressperioden, durch Verschiebung des Blühzeitpunktes oder die Vermeidung von Stress durch strukturelle Änderung der Blattoberfläche, sind ebenso wenig zu erfassen, wie die Ausbildung eines tieferen Wurzelsystems oder der Transport von kompatiblen Substanzen. Das Einzelzellsystem scheint jedoch geeignet zur Charakterisierung der Stressantwort innerhalb der Zelle. Gene, die zur Aktivierung von verschiedenen Schutzmaßnahmen auf regulatorischer Ebene agieren oder Gene, die notwendig für den Schutz von Proteinen oder Lipiden sind, können in gleichem Maße erfasst werden, wie Gene die zur Entgiftung der Zelle durch Beseitigung von Abfallstoffen oder ROS beitragen. Mit den derzeitigen Experimentparametern und den zur Verfügung stehenden technischen Möglichkeiten können so von einer einzelnen Person etwa 40 Gene pro Monat getestet werden. Eine weitere Steigerung der Durchsatzrate könnte man eventuell durch die Automatisierung der Fluoreszenzanalyse erreichen. Diese Art der Phenomics-Analyse steht zwar noch am Anfang, wurde allerdings bereits erfolgreich in Untersuchungen des Gerste-Mehltau Pathosystems eingesetzt (Ihlow et al., 2008).

Neben der Analyse der an der Trockenstressantwort beteiligten Faktoren wäre es ebenfalls denkbar, das System anzupassen und zu erweitern, um andere Fragestellungen bearbeiten zu können. Im Blickpunkt stehen hier vor allem weitere abiotische Stressfaktoren wie z.B. Kältestress oder Stress durch hohe

Salzkonzentrationen. Man könnte anstelle des Filterpapiers ein entsprechendes Osmotikum einsetzen oder den Stress in einer Klimakammer unter konstanten Bedingungen von beispielsweise 4°C durchführen. Dieses System könnte auch zum Einsatz kommen, wenn es darum geht z.B. eine *loss-of-function* Mutante mit dem entsprechenden funktionellen Gen zu komplementieren oder durch Überexpression eine Stabilisierung der DsRED/GFP Zellrate zu bewirken.

4.1.1 „Proof of Concept“

Um zu testen, ob das auf RNA Interferenz basierende Testsystem tatsächlich korrekte Aussagen zur Wirkung Trockenstress-relevanter Gene liefern kann, wurde die NCBI Datenbank nach Kandidaten durchsucht, von denen bereits Expressionsdaten unter Trockenstress vorlagen bzw. die in verschiedenen Mutations- und Überexpressionsstudien eine Veränderung der Toleranz gezeigt hatten. Darunter befanden sich Gene die z.B. der zweiten Gruppe der LEA Proteine (LEA D11, Dehydrine) zugeordnet werden und dem Schutz von Membranen und Proteinen dienen. Es wurden ebenfalls Gene ausgewählt, die in die ABA Signaltransduktion involviert sind (ABI1) oder eine Rolle in der Genregulation spielen (*HvDRF1*). Ferner wurden Gene für transmembrane Transportproteine wie *HvNHX1* oder TIP (*Tonoplast intrinsic protein*), Gene für Proteine zum Schutz gegen oxidativen Stress (CDSP32) und Gene die für die Synthese von kompatiblen Substanzen wie Trehalose notwendig sind, in die Untersuchung miteinbezogen. Neben weiteren Kandidaten (Vergleich Tabelle 7) war es allerdings auch nötig Negativkontrollen einzuschließen, von denen anzunehmen war, dass sie keine Änderungen des Verhältnisses zwischen DsRED- und GFP fluoreszierenden Zellen unter Stressbedingungen bewirken würden. Hierzu zählten einerseits das Protein PRPX und andererseits eine Proteinkinase vom SnRK1 Typ. SnRK1 besitzt eine katalytische Domäne, die eine Ähnlichkeit zu SNF1 (*Sucrose non-fermenting 1*) aufweist, welches aus der Hefe bekannt ist. Von SNF1 weiß man, dass dieses Protein in den Kohlenstoffmetabolismus involviert ist und direkt durch Veränderung des Phosphorylierungsgrades der Zielproteine auf deren Aktivität einen Einfluss ausübt (Laurie et al., 2003). Es kann jedoch auch auf die Regulation von Genen einwirken, deren Expression durch Glucose gehemmt wird. PRPX hingegen steht im Zusammenhang mit der Pathogenabwehr. Wie der Name

Pathogenesis-related protein bereits verrät, wird es infolge der Infektion mit Bakterien, Viren oder auch Pilzen gebildet und trägt möglicherweise dazu bei, die Anfälligkeit gegenüber Pathogenen zu senken. Somit haben diese beiden Kandidaten keine direkte Bedeutung unter Trockenstressbedingungen und dienten neben dem leeren Vektor pIPKTA30 als Negativkontrollen.

Mit Hilfe des TIGS Screens konnten vier von insgesamt 17 Genen identifiziert werden, die das Verhältnis von DsRED- zu GFP fluoreszierenden Zellen signifikant beeinflussten und die Anzahl an DsRED Zellen unter Stress gegenüber den Kontrollen signifikant senkten. Hierzu zählten das LEA Protein *HvHVA1*, das zu den Dehydrinen gehörende Dehydrin 6 (*HvDHN6*), der Natrium/Wasserstoff Protonen Antiporter *HvNHX1*, sowie der Transkriptionsfaktor *HvDRF1*. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen, wurde im Anschluss an die erste Experimentserie von 5 unabhängigen Experimenten eine zweite durchgeführt, die in der Tat die Signifikanz der ersten Ergebnisse bestätigte (siehe Tabellen 11 und 12). Die RNAi Konstrukte für die Gene *HvDHN6* und *HvDRF1* wurden außerdem ebenfalls in den Sorten Morex und Steptoe getestet, um die Auswirkungen eines anderen genetischen Hintergrunds auf das Testresultat zu überprüfen. Interessanterweise hatte der Einsatz beider RNAi Konstrukte in Steptoe keinerlei Auswirkungen, was wahrscheinlich in der ohnehin schon hohen Basisanfälligkeit der Sorte begründet ist. In Morex hingegen konnte zwar für *HvDHN6* kein positives Ergebnis erreicht werden, allerdings ergab der Einsatz des RNAi Konstruktes gegen *HvDRF1*, dass dies ähnlich wie in Golden Promise die Anzahl an DsRED Zellen signifikant senkte. Da sowohl Morex als auch Golden Promise eher tolerante Sorten sind, kann das Ergebnis als Bestätigung dafür gesehen werden, dass es möglich ist, mittels des TIGS Systems einen funktionellen Nachweis zuverlässig und reproduzierbar führen zu können. Dass Dehydrin 6 keinen Einfluss auf das Verhältnis von DsRED- zu GFP fluoreszierenden Zellen hatte liegt möglicherweise daran, dass ein anderer Vertreter der Dehydrinfamilie in Morex wichtiger war, oder dass anstelle der Dehydrine andere Proteine mit Chaperonfunktion, wie z.B. Hitzeschockproteine, zum Einsatz gelangten. Abschließend betrachtet erscheint es somit prinzipiell möglich, den Test mit dem hier vorgestellten System in unterschiedlichen Genotypen durchführen zu können.

4.2 Überprüfung der *Target*-Spezifität des TIGS Systems

Unter den Kandidaten des ersten Screens (siehe Tabelle 7) befanden sich ebenfalls zwei Vertreter der AP2/EREBP (APETALA2/ETHYLENE-RESPONSE-BINDING PROTEIN) Superfamilie. Zum einen handelt es sich um *HvDRF1* (*D*ehydration-*r*esponsive *f*actor 1) und zum anderen um *HvDREB1* (*D*RE-*b*inding *p*rotein). Beide Gene werden innerhalb der AP2/EREBP Familie der DREB Unterfamilie zugeordnet (Sakuma et al., 2002). Vergleicht man jedoch deren Ähnlichkeit zueinander, so zeigt sich, dass auf Aminosäureebene eine Übereinstimmung von lediglich etwa 26,4% besteht (Xu et al., 2009). Dies lässt einen *target*-spezifischen RNAi Effekt erwarten. Während *HvDRF1* in den RNAi Experimenten signifikant das Verhältnis von DsRED- zu GFP-fluoreszierenden Zellen unter Stressbedingungen senken konnte, war *HvDREB1* dazu nicht in der Lage und bewirkte keine Veränderung des Verhältnisses. Nun stellte sich die Frage, da es sich um zwei Mitglieder derselben Familie handelte, ob das *HvDREB1* Konstrukt ineffizient war oder ob *HvDREB1* tatsächlich nicht in die hier untersuchte Stressantwort involviert ist. Gleichzeitig ergab sich die Möglichkeit zu testen, inwieweit es zu einem genspezifischen *Silencing* kam. Für die Überprüfung der Konstruktwirksamkeit wurden GFP-Fusionskonstrukte zusammen mit den RNAi Konstrukten und dem Vektor für das DsRED Protein co-transformiert (siehe Material und Methoden) und das Verhältnis zwischen GFP Fluoreszenz und DsRED Fluoreszenz ausgewertet. In allen Experimenten konnte nur eine signifikante Änderung des GFP/DsRED Verhältnisses erreicht werden, also eine Verringerung der GFP Zellzahl, wenn das jeweilige RNAi Konstrukt mit dem entsprechenden Fusionskonstrukt, das die richtige Zielsequenz trug, co-transformiert wurde (siehe Abbildung 20). Das bedeutet einerseits, dass die Sequenzidentität zwischen beiden DREB Familienmitgliedern zu gering war, um beide mit nur einem Konstrukt effizient auszuschalten, und andererseits, dass somit die Möglichkeit gegeben ist, zwischen einzelnen Mitgliedern einer Familie gezielt unterscheiden zu können. Damit wäre es möglich funktionelle Aussagen zu einem spezifischen Mitglied einer Genfamilie zu treffen und dessen Funktionalität innerhalb der Trockenstressantwort nachzuweisen, ohne das weitere Gene der Familie der RNA Interferenz unterliegen würden.

Parallel dazu wurden zwei weitere RNAi Konstrukte, welche sich ebenfalls gegen die Sequenz von *HvDRF1* richteten, generiert und getestet ob sie im normalen *Screen* auf Trockenstress, gleiche Resultate lieferten wie das erste Konstrukt. Wie aus den Abbildungen 21 und 22 hervorgeht, werden mit den neuen, gegen unterschiedliche Transkriptregionen von *HvDRF1* gerichteten RNAi Konstrukten, ähnliche Ergebnisse erzielt wie mit dem bereits in der *proof of concept* Phase verwendeten Vektor. Das lässt darauf schließen, dass der im ersten Screening beobachtete Effekt einer signifikanten Reduktion des Verhältnisses von DsRED- zu GFP fluoreszierenden Zellen wirklich auf die Reduktion der *HvDRF1* mRNA und nicht eines unbekanntes *off-targets* zurückzuführen ist.

4.3 Genexpression unter Stress durch Dehydrierung

Mit der Identifikation von Kandidatengenen, die das Verhältnis von DsRED- zu GFP fluoreszierenden Zellen signifikant senkten, kam die Frage auf, zu welchem Zeitpunkt der Stressantwort diese in den bombardierten Blattsegmenten exprimiert werden und wie hoch die Transkriptmengen sind. Um diese Frage beantworten zu können, wurde ein qRT-PCR Experiment durchgeführt. Dazu wurden Proben zu verschiedenen Zeitpunkten des Stressexperimentes entnommen und einer Analyse unterzogen, die sowohl nicht beschossenes Material, als auch mit beiden Reporterkonstrukten und pIPKTA30 Kontrolle transformiertes Material umfasste. Die Unterscheidung zwischen transformierten und nicht transformierten Proben sollte zeigen, ob der Beschuss die erwartete Trockenstressregulation der Gene stört.

Erwartungsgemäß zeigten alle vier Kandidaten ein unterschiedliches Expressionsmuster. Bereits 1 Stunde nach Beginn des Dehydrierungsstress kam es zum abrupten Anstieg der Transkriptmenge von Dehydrin 6, was wahrscheinlich dem direkten Schutz wichtiger Proteine dient. Auch Suprunova et al. (2004) konnten in verschiedenen resistenten Sorten der Wildgerste (*Hordeum spontaneum*) einen Anstieg des mRNA Levels von *HvDHN6* innerhalb von 12 Stunden beobachten, was die hier erhaltenen Ergebnisse untermauert. Über die Zeit nimmt jedoch die *HvDHN6* Transkriptmenge ab und wird möglicherweise durch mRNA anderer Schutzproteine ersetzt, die nicht per qRT-PCR getestet wurden. Ähnlich verhält es sich mit *HvHVA1*, einem Protein

das in die dritte LEA Gruppe gehört (siehe Einleitung). Die Transkriptmenge ist im Verhältnis zur Kontrolle etwa sechsmal höher und erreicht den Spitzenwert bereits 6 Stunden nach Beginn des Stresses. Auch Qian et al. (2007) verzeichneten einen rasanten Anstieg des Transkripts innerhalb von 12 Stunden bei Untersuchungen von Gerste (*Hordeum vulgare ssp. vulgare*). Sie konnten zudem feststellen, dass die Menge an mRNA in toleranten Sorten, im Vergleich zu anfälligen Sorten, früher ansteigt (2-4 Stunden nach Stressbeginn). Dies deutet auf die Wichtigkeit des Gens in der ersten Reaktionsphase auf den Stress hin. Nach etwa 24 Stunden ist der Wert der Transkriptmenge jedoch auf das Niveau der Kontrolle, welche nicht dem Stress unterlag, zurückgefallen. Damit gehören beide Kandidaten (*HvDHN6* und *HvHVA1*) vermutlich zur schnellen Antwort auf den applizierten Stress. Im Gegensatz zu *HvHVA1* und *HvDHN6* (siehe Abbildung 23) steigen die relativen Transkriptmengen von *HvDRF1* und *HvNHX1* langsamer über die bereits vorhandene beträchtliche Basalexpression an. Die Induktion von *HvNHX1* ist möglicherweise in der Notwendigkeit der Aufrechterhaltung des Turgordruckes innerhalb der Zelle begründet. Der Anstieg der *HvDRF1* mRNA passt ebenfalls insofern ins Bild, da dieser neben einer Reihe weiterer stressrelevanter Gene ebenfalls die Expression von *HvHVA1* induziert (Xue und Loveridge, 2004; Egawa et al., 2006). Es muss jedoch beachtet werden, dass posttranslational eine Modifizierung mittels Phosphorylierung erfolgen muss, um eine Aktivierung von *HvDRF1* zu erhalten (Liu et al., 1998; Sakuma et al., 2006a).

Obwohl aus *HvDRF1* durch alternatives Spleißen drei unterschiedliche mRNAs hervorgehen können, wurde das Gen dennoch effektiv durch die im Test verwendeten RNAi Konstrukte ausgeschaltet. Ein Grund dafür ist, dass sich die Spleißvarianten *HvDRF1.1* und *HvDRF1.3* nur in den Exons 2 und 3 unterscheiden (Xue und Loveridge, 2004), was aber immer noch zu einer Identität von 88% führt. Die mRNA von *HvDRF1.2* kann wohl von den Betrachtungen ausgenommen werden, da sie nur einen sehr kurzen ORF enthält und eventuell nicht translatiert wird. Trotzdem wurden die Primer für die qRT-PCR Analyse so gewählt, dass sie im Exon 4 liegen, welches bei allen drei Spleißvarianten vorhanden ist. Somit kann der Anstieg der relativen Transkriptmenge nicht explizit auf ein bestimmtes Spleißprodukt zurückgeführt werden. Es ist aber bekannt, dass beide Spleißvarianten *HvDRF1.1* und

HvDRF1.3 nach Trockenstressinduktion die Expression von *HvHVA1* induzieren (Egawa et al., 2006).

4.4 Neue Kandidatengene der Stressantwort

Für die Analyse einer größeren Anzahl an Kandidaten wurden cDNA Klone aus einem *Microarray* ausgewählt, die unter Stressbedingungen (Schock-Dehydration) bzw. unter Rehydrationsbedingungen signifikant hochreguliert waren (Talamé et al., 2007). Des Weiteren wurden Kandidaten in die Untersuchungen miteinbezogen, die basierend auf Experimenten von Cattivelli et al. unter Verdacht stehen eine wichtige Position innerhalb der Trockenstressantwort einzunehmen (persönliche Kommunikation mit Luigi Cattivelli). Das Datenset bestand somit vorwiegend aus Genen, für die bereits gezeigt wurde, dass z.B. die Menge an gebildeter mRNA unter Stress zunahm oder die entsprechenden Proteine (darunter auch Enzyme) vermehrt gebildet wurden. Zusätzlich zu den bereits erwähnten Kandidaten (*proof of concept* Experimente: *HvDRF 1*, *HvDHN6*, *HvNHX1* und *HvHVA1*) konnten weitere 15 Gene mit einem signifikanten RNAi Effekt identifiziert werden (siehe Tabelle 17). Unter ihnen sind auch zwei Kandidaten, deren Aufgabe unter Trockenstressbedingungen, aufgrund ihrer putativen Funktion, nicht ganz eindeutig ist. Hierbei handelt es sich zum einen um eine Ribokinase und zum anderen um einen Zinkfinger Constans-*like* Transkriptionsfaktor. Ribokinasen werden in einer aktuellen Analyse zu den Rossmann-*like* Kinasen gezählt (Cheek et al., 2002) und sind für die Phosphorylierung von D-Ribose zu Ribose-5-phosphat verantwortlich, welches dann der Zelle zum Aufbau von Aminosäuren wie Tryptophan und Histidin oder der Synthese von Nukleotiden zur Verfügung steht. Es kann aber auch im Pentosephosphatweg zur Bildung von Reduktionsäquivalenten (NADPH) genutzt werden. Der zweite Kandidat, (Cattivelli 1, Für weitere Informationen: schweiz@ipk-gatersleben.de) ein Transkriptionsfaktor der eher in die Blühinduktion (Robson et al., 2001; Griffiths et al., 2003) involviert ist, zeigte bereits in Analysen mit Hartweizen (*Durum wheat*), dass es zum Anstieg der mRNA Menge unter verschiedenen Dehydrationsbedingungen kam (De Leonardis et al., 2007). Die Ergebnisse im TIGS *Screen* für Trockenstress deuten ebenfalls darauf hin, dass beide Gene eine Rolle unter den im Testsystem gewählten Bedingungen spielen.

Im Gegensatz zur unklaren Relevanz der gerade erwähnten Genkandidaten, können die beobachteten RNAi Effekte der folgenden Konstrukte direkt mit der Toleranz von Stress zu erklären sein. Das Konstrukt gegen HO18J04, einem Metallothionein vom Typ 2, zeigte eine sehr signifikante Reduktion des DsRED/GFP Verhältnisses. Es wird diskutiert, dass Metallothioneine wichtig bei der Entgiftung der Zelle, durch Beseitigung des oxidativen Stresses, sind. Methallothioneine können durch das im aktiven Zentrum vorhandene Cystein z.B. Hydroxylradikale binden, was zu deren Inaktivierung führt und sie damit unschädlich macht (Palmiter et al., 1998).

Es wird ebenfalls diskutiert, dass sie in der Lage sind Schwermetalle wie Kupfer zu binden und so zu neutralisieren (Cobbett und Goldsbrough, 2002). Ein weiterer Kandidat ist H113G08, ein NAC Domänen Transkriptionsfaktor. Für einige Mitglieder dieser Familie ist, wie in der Einleitung bereits erwähnt, nachgewiesen worden, dass sie unter abiotischen Stressbedingungen z.B. in die Signaltransduktion und die Aktivierung von Genen eingreifen (Fujita et al., 2004; Tran et al., 2006). Daher scheint die Reduktion des DsRED/GFP Verhältnisses, aufgrund des Ausschaltens dieser Regulationsfaktoren durchaus nachvollziehbar.

Die Konstrukte gegen HP07O19 und HC15K08 waren ebenfalls wirksam und zielten auf putative Mannitol Dehydrogenasegene. Das Ergebnis spricht einerseits für die Wichtigkeit des Enzyms, wirft aber andererseits die Frage auf, ob das jeweils eingesetzte Konstrukt die Zielsequenz des Anderen erkennt und daher ebenfalls dessen Zielgen ausschaltet. Aus diesem Grund wurde das RNAi *target prediction tool* si-Fi (siRNA-Finder, <http://www.Labtools.ipk-gatersleben.de>) eingesetzt, dass die verwendeten RNAi Sequenzen analysiert und mögliche Zieltranskripte innerhalb einer vorgegebenen Datenbank (in diesem Fall HarVEST) anzeigt. Das Ergebnis der Analyse erbrachte zwei wichtige Erkenntnisse. Zum einen sind beide RNAi Vektoren in der Lage die Zielsequenz des jeweils anderen zu erkennen und damit ein *off-target Silencing* zu bewirken, und zum anderen werden möglicherweise nicht nur Mannitoldehydrogenasen (MDH) mittels RNA Interferenz ausgeschaltet, sondern auch Gene die für Cinnamylalkoholdehydrogenasen (CAD) kodieren.

Tabelle 17: Kandidaten die einen signifikanten Effekt im Screen zeigten.

In der Übersicht sind alle Klone auf denen die RNAi Konstrukte basieren mit der jeweiligen putativen Funktion des Zielgens dargestellt. Es wurden insgesamt fünf unabhängige Experimente in Golden Promise für eine Analyse durchgeführt. Der Grenzwert für die Verwerfung der Nullhypothese lag bei $p \leq 0,05$.

^(a) De Leonardis et al., Plant Science 172: 1005-1016 (2007); ^(b) Datenbank PLEXdb; ^(c) Tommasini et al., Functional & Integrative Genomics 8(4): 387-405 (2008)

^(d) Talamè et al., Journal of Experimental Botany 58(2): 229-240 (2007); *Wert basiert auf 10 Experimenten; ns= nicht signifikant reguliert

| CR-EST Klon-ID | putative Funktion | p-Wert im TIGS Screen | Regulation unter Trockenstress | Affymetrix Barley1 22k Contig ID ^(b) | Kartenposition | Referenz |
|----------------------------|------------------------------------------------------------------------|-----------------------|--------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------------------|
| Cativelli 7 ^(*) | <i>C-repeat binding factor 3-like Protein (HvCBF3)</i> | 0,0032 | hoch ^(a) | anonymisiert ^(*) | anonymisiert ^(*) | Close et al. (2009) Choi et al. (2002) |
| HO18J04 | Metallothionein Typ 2 (<i>Hordeum vulgare</i> var. <i>Distichum</i>) | 0,0006 | hoch ^(d) | 1456_at | - | - |
| HS05D05 | Dehydrin 2 (<i>HvDHN2</i>) | 0,0163 | hoch ^(c) | 1721_at | 5H | Tondelli et al. (2006) |
| HC02P10 | Dehydrin 6 (<i>HvDHN6</i>) | 9,60E-06* | ns ^(c) | 1707_at | 4H | Tondelli et al. (2006) |
| HU05J23 | <i>Dehydration-responsive factor 1 (HvDRF1)</i> | 2,80E-05* | hoch ^(c) | 6727_at | - | - |
| HC11F15 | <i>ABA-responsive Protein (Hordeum vulgare)</i> | 0,0104 | hoch ^(d) | 26644_at | - | - |
| Cativelli 2 ^(*) | RING-Finger E3 Ubiquitin-Ligase-like Protein (<i>Oryza sativa</i>) | 0,0137 | hoch ^{(a)(c)} | anonymisiert ^(*) | - | - |
| genom.DNA | Dehydrin 10 (<i>HvDHN10</i>) | 0,0042 | hoch ^(c) | 13753_at | 3H (120,59cM) | Close et al. (2009) Tondelli et al. (2006) |
| HI04N04 | 70 kDa Hitzeschock Protein (<i>Solanum lycopersicum</i>) | 0,0447 | hoch ^{(c)(d)} | 873_s_at | - | - |

^(*) Vertraulich, für weitere Informationen: schweiz@ipk-gatersleben.de

Tabelle 17: Fortsetzung von Seite 114

| | | | | | | |
|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| HD03E20 | Subtilisin-Chymotrypsin Inhibitor 2 (<i>Hordeum vulgare</i>) | 0,0107 | hoch ^{(c)(d)} | 3381_s_at | 2H (61,9418cM) | Potokina et al. (2008) |
| HW01P08 | putative Cinnamylalkoholdehydrogenase (<i>Oryza sativa</i>) | 0,0095 | ns ^(c) | 4260_at | 5H (53,0516cM) | Potokina et al. (2008) |
| HP07O19 | Protein (<i>O.sativa</i>); putative Mannitoldehydrogenase | 0,0068 | hoch ^(c) | 13997_at | - | - |
| HI13G08 | NAC Domänen Transkriptionsfaktor (<i>Triticum aestivum</i>) | 0,0076 | hoch ^(d) | 3361_at | 5H (161,58cM) | Close et al. (2009) |
| HT08A04 | Dehydrin 12 (<i>HvDHN12</i>) | 0,0234 | ns ^(c) | 15845_s_at | 6H | Choi et al. (2000) |
| HC15K08 | Hypothetisches Protein (<i>Oryza sativa</i>); putative Mannitoldehydrogenase | 0,0134 | hoch ^(c) | 7292_s_at | - | - |
| Cativelli 3 ^(*) | Ribokinase (<i>Triticum turgidum</i>) | 0,0292 | hoch ^{(a)(c)} | anonymisiert ^(*) | anonymisiert ^(*) | Close et al. (2009) |
| HQ01K06 | Na ⁺ /H ⁺ Antiporter (<i>HvNHX1</i>) | 5,20E-05* | hoch ^(c) | 17085_at | - | - |
| HV09A17 | <i>HvHVA1</i> (<i>Late embryogenesis abundant protein</i>) | 0,00024* | hoch ^(c) | 2407_s_at | 1H (108,7cM) | Wenzl et al. (2006) Korff et al. (2008) Tondelli et al. (2006) |
| Cativelli 1 ^(*) | Hypothetisches Protein (<i>Oryza sativa</i>); putativer Zinkfinger Constans-like Transkriptionsfaktor | 0,0395 | hoch ^(a) | anonymisiert ^(*) | - | - |

^(*) Vertraulich, für weitere Informationen: schweiz@ipk-gatersleben.de

Die höchste Ähnlichkeit, welche durch si-Fi ermittelt werden konnte ergab sich zu einem Gen, welches homolog zu dem *Pathogenesis-related protein* ELI3-1 aus *Arabidopsis* ist. Obwohl einige Publikationen diesem Protein eine Mannitol-Dehydrogenasefunktion, aufgrund der Ähnlichkeit zu einer MDH aus Sellerie, unterstellen (Williamson et al., 1995; Stoop et al., 1996; Jennings et al., 1998), postulieren aktuelle Studien wiederum, dass es sich hierbei doch eher um eine CAD handeln könnte (Kim et al., 2007). Somssich et al. (1996) gehen noch einen Schritt weiter und schlagen aufgrund ihrer Untersuchungen einen alternativen Namen, Benzylalkohol-Dehydrogenase (BAD), für dieses Protein vor. Die Annotation der Gene scheint jedoch nicht eindeutig, da z.B. die AtCADs 2, 3, 7 und 8 in der TIGR Datenbank in putative Mannitoldehydrogenasen umbenannt wurden, obwohl bisher dafür keine gesicherten funktionellen Daten vorliegen (Kim et al., 2007). Eine Erklärung der Ergebnisse ist daher sehr schwierig und muss von zwei Standpunkten aus diskutiert werden.

Mannitol wird für die Abwehr von ROS benötigt und die Ausschaltung des Gens für die Mannitoldehydrogenase müsste infolge dessen zu einer Erhöhung der Toleranz führen und vermutlich das Verhältnis von DsRED- zu GFP fluoreszierenden Zellen stabilisieren. Dies war in den TIGS Experimenten jedoch nicht zu beobachten. Andererseits ist es jedoch auch möglich, dass auf diesem Wege die Menge an Mannitol reguliert wird, um eine Störung oder Behinderung der ROS Neutralisierung durch zu hohe Konzentrationen zu vermeiden. Daher kann es sein, dass es aufgrund des *Silencing* des MDH Gens zu einer Beeinträchtigung der ROS Neutralisierung kommt, was die Störung des Assemblierungsprozesses des DsRED Proteins zur Folge haben kann. Betrachtet man die vorliegenden Resultate im Hinblick auf CADs, so ergibt sich eine weitere mögliche Erklärung des negativen Einflusses auf das DsRED/GFP Verhältnis. CADs sind involviert in die Lignifizierung der Zellwand. In Mais konnte nachgewiesen werden, dass diese unter Trockenstressbedingungen in tolerantan Sorten induziert werden (Hu et al., 2009). Schaltet man die Gene über RNAi Konstrukte aus wäre es möglich, dass eine Verstärkung der Zellwand unter Dehydrationsbedingungen gestört ist und dies Auswirkungen auf die Zellintegrität und den Turgordruck in der Zelle hat. Das Konstrukt basierend auf dem cDNA Klon HW01P08 gibt möglicherweise einen ersten Hinweis für die

Richtigkeit dieser Hypothese, denn es hat eine CAD als Ziel. Im Screen konnte mit diesem Konstrukt ein signifikanter Effekt beobachtet werden. Es scheint daher möglich, dass der Schockdehydration durch Lignifizierung der Zellwand entgegengewirkt werden soll und die Zellstruktur verstärkt wird.

Die Stummschaltung der homologen Gene DREB1A/CBF3, durch das RNAi Konstrukt basierend auf Cattivelli 7 und die daraus resultierende signifikante Reduktion des DsRED/GFP Verhältnisses erscheint nicht unerwartet, wenn man bedenkt, dass dieser Transkriptionsfaktor unter abiotischen Stressbedingungen verschiedene Gene der Stressantwort induziert (Seki et al., 2001 ; Seki et al., 2002). Mit der Überexpression des Transkriptionsfaktors konnte ebenfalls bereits der Nachweis erbracht werden, dass die Toleranz gegenüber abiotischem Stress (Trockenheit, Salz, Kälte) deutlich erhöht wird (Kasuga et al., 1999). Choi et al. (2002) waren auch in der Lage dessen Expression in Dehydratationsexperimenten nachweisen.

Neben einem Serinprotease Inhibitor, Subtilisin-Chymotrypsin Inhibitor 2 (HD03E20) und einem ABA-*responsive* Protein (HC11F15), konnte im *Screen* auf Trockenstresstoleranz ebenfalls ein Vertreter der Hitzeschockproteine identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um ein *Heat shock cognate* 70 kDa Protein (HI04N04), welches konstitutiv in der Zelle vorliegt und nicht erst durch Hitze induziert wird. HSC70 Proteine sind vor allem an der Faltung von neu synthetisierten Proteinen, als auch am Transport von Vorläuferproteinen (*precursor*) beteiligt (Wang et al., 2004). Unter Stressbedingungen nehmen sie Funktionen bei der Rückfaltung denaturierter Proteine wahr bzw. sind am proteolytischen Abbau beteiligt.

Der letzte Kandidat der mittels RNA Interferenz ermittelt werden konnte gehört zu den RING Finger E3 Ubiquitin Ligasen (Cattivelli 2). Diese Proteinfamilie ist nicht nur wichtiger Bestandteil von post-transkriptionellen oder post-translationellen Regulationsmechanismen, sondern auch unverzichtbar bei der Markierung der für den Abbau durch das 26S Proteasom bestimmten Proteine (Mazzucotelli et al., 2006 ; Zeng et al., 2006). Die Vielfältigkeit und Anzahl der Mitglieder der Familie lässt zudem auf eine hohe Substratspezifität schließen. Ein interessantes Beispiel für den Abbau von Proteinen unter Stressbedingungen ist die negative Regulation des Transkriptionsfaktors ICE1. Die Anwesenheit des Transkriptionsfaktors führt zur Aktivierung verschiedener

DREB1/CBF Gene die unter Kältestressbedingungen benötigt werden. Er wird jedoch selbst durch die E3 Ligase HOS1 (*high expression of osmotically responsive gene 1*) nachweislich mit Ubiquitin markiert und so dem Abbau zugeführt (Dong et al., 2006). Die Überexpression des HOS1 Gens führte zu einer verringerten Expression von CBF Genen, als auch von *downstream* aktivierten Genen wie RD29A. Auch für DREB2A, dem homologen Gen zu HvDRF1 aus Gerste, wurden kürzlich Proteine entdeckt, die den E3 Ubiquitin Ligasen angehören und direkt mit DREB2A interagieren. Sowohl das DREB2A-*interacting protein 1* (DRIP1) als auch DRIP2 kontrollieren offensichtlich die Menge an vorhandenem DREB2A und hemmen somit die Expression von Trockenstress-relevanten Genen (Qin et al., 2008).

4.4.1 Die LEA D11 Familie (Dehydrine)

Während der Untersuchungen ergab sich die Möglichkeit, eine komplette Genfamilie testen zu können. Hierbei handelt es sich um die LEA D11 Familie, auch bekannt als Dehydrine, mit 13 bekannten Mitgliedern in der Gerste. Unter den gegebenen experimentellen Parametern zeigten jedoch nicht alle Konstrukte einen signifikanten Einfluss auf das Verhältnis von DsRED- zu GFP fluoreszierenden Zellen. Nur die RNAi Vektoren, die gegen HvDHN2, HvDHN6, HvDHN10 und HvDHN12 gerichtet waren, hatten Auswirkungen auf die Anzahl rot fluoreszierender Zellen. Wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt, wurde die si-Fi Software eingesetzt, um zu untersuchen, ob eine mögliche Stummschaltung mehrerer Dehydrine vorlag oder ob jeweils nur das anvisierte Gen der RNA Interferenz unterlag. Dazu wurden die zur Klonierung der RNAi Konstrukte eingesetzten Sequenzen von der Software *in silico* in siRNA Fragmente zerlegt und einzeln gegen die HarvEST Datenbank getestet. In Abhängigkeit von den zuvor festgelegten Parametern wurden Ergebnisse generiert, die in Tabelle 18 zusammengefasst sind und ein komplexes Bild ergaben. Dennoch kann festgestellt werden, dass ein Kandidat besonders hervorsticht: Dehydrin 10 zeigte einen signifikanten RNAi Effekt, und konnte in der si-Fi Analyse als ausschließliches Ziel determiniert werden. Das lässt darauf schließen, dass dieses Gen unter Trockenstressbedingungen wahrscheinlich eine Rolle spielt.

Tabelle 18: Ergebnisse des RNAi off-target Scans unter Verwendung der Software si-Fi.

Die für die Klonierung der RNAi Konstrukte verwendeten cDNA Sequenzen wurden durch die Software in 21 nt lange Fragmente zerlegt und einzeln gegen die HarvEST Datenbank (Barley 1.68, Assembly 35) getestet. In der Tabelle werden alle positiven Hits, die das entsprechende Gen ausschalten könnten, dargestellt. Alle Zahlen in Klammern und dunkelgrau unterlegte Felder geben die Anzahl vorhergesagter effizienter Treffer wieder, hellgraue Felder und Zahlen, die nicht in Klammern erscheinen, stellen alle Treffer aufgrund von Sequenzidentität dar. Weiße Felder bedeuten keine Übereinstimmung und damit keine Treffer in der Datenbank. Die Parameter für effiziente Treffer waren: der GC Gehalt der siRNA muss zwischen 35% und 60% liegen; drei der ersten 7 Nukleotide des 5' Endes des Antisensestranges müssen A/U sein; der Antisensestrang muss mit A/U starten; die Länge der siRNA beträgt 21 nt (Xu et al., 2006).

(* Länge der getesteten Sequenzen ** Signifikanz wurde aus 10 Experimenten ermittelt)

| bp* | 481 | 393 | 373 | 430 | 467 | 508 | 484 | 530 | 533 | 470 | 453 | 380 | 518 |
|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|---------------|----------------|----------------|---------------|---------------|----------------|----------------|
| p-Wert | 0,491 | 0,016 | 0,413 | 0,0515 | 0,903 | 9,61E-06 | 0,746 | 0,199 | - | 0,004 | 0,76 | 0,023 | 0,451 |
| | Dhn 1 | Dhn 2 | Dhn 3 | Dhn 4 | Dhn 5 | Dhn 6** | Dhn 7 | Dhn 8 | Dhn 9 | Dhn 10 | Dhn 11 | Dhn 12 | Dhn 13 |
| Dhn 1 | 460(14) | 43(1) | 4 | 12 | | 17 | 2 | | 25 | | 4 | 2 | |
| Dhn 2 | 60(2) | 352(8) | 7 | 16 | 1 | 16 | | 2 | 26 | | 4 | 4 | |
| Dhn 3 | 11 | 6 | 300(10) | 12 | 6 | 6 | 26 | 3 | 25 | | | 38 | |
| Dhn 4 | 17 | 16 | 16 | 413(2) | 16 | 17 | 26 | 1 | 26 | | 14 | 2 | |
| Dhn 5 | 20 | 13 | 19 | 29 | 583(12) | 37 | 11 | | 17 | | 9 | 4 | 1 |
| Dhn 6 | 17 | 19 | 6 | 16 | | 532(7) | 3 | 1 | 33 | | 20 | | 5(2) |
| Dhn 7 | 2 | 3 | 59 | 23 | 10 | 3 | 311(4) | | 8 | | 3 | 15 | |
| Dhn 8 | | 2 | | 1 | | | | 470(17) | 1 | | | 3 | |
| Dhn 9 | 25 | 21 | 6 | 16 | 1 | 26 | 4 | 1 | 513(11) | | 4 | 12 | |
| Dhn 10 | 6 | 5 | | 43(2) | | 2 | | | 5 | 454(5) | 5 | | |
| Dhn 11 | 4 | 4 | | 11 | | 20 | 3 | | 8 | | 433(8) | | |
| Dhn 12 | 2 | 2 | 6 | | | | 13 | 3 | 12 | | | 360(13) | |
| Dhn 13 | | | | | | 5(2) | | | | | | | 478(26) |

Tabelle 19: Übersicht der Ergebnisse für Mitglieder der LEA D11 Genfamilie (Dehydrine).

^(a) Tommasini et al., Functional & Integrative Genomics 8(4): 387-405 (2008) ^(b) Talamè et al., Journal of Experimental Botany 58(2): 229-240 (2007) ^(c) Datenbank PLEXdb
(ns= nicht signifikant reguliert; RWC= *relative water content*; OA= *osmotic adjustment*)

| CR-EST Klon-ID | putative Funktion | p-Wert im Screen | Regulation unter Trockenstress | Affymetrix Barley1 22k Contig ID ^(c) | Kartenposition | Kolokalisation mit QTL | Referenz |
|----------------|--------------------------------|------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------|---------------------------------|------------------------------------------------|
| HV04I10 | Dehydrin 1 (<i>HvDHN1</i>) | 0,4914 | hoch ^(a) | 1725_s_at | 5H | Kältestress- bzw. Frosttoleranz | Tondelli et al. (2006) |
| HS05D05 | Dehydrin 2 (<i>HvDHN2</i>) | 0,0163 | hoch ^(a) | 1721_at | 5H | | |
| HS06D03 | Dehydrin 3 (<i>HvDHN3</i>) | 0,4136 | hoch ^(a) | 1724_s_at | 6H | RWC und OA | Tondelli et al. (2006) Teulat et al. (2003) |
| HS01P15 | Dehydrin 4 (<i>HvDHN4</i>) | 0,0515 | hoch ^(a) | 1713_s_at | 6H | | |
| genom.DNA | Dehydrin 5 (<i>HvDHN5</i>) | 0,9038 | hoch ^(a) | 1717_s_at | 6H | | |
| HC02P10 | Dehydrin 6 (<i>HvDHN6</i>) | 9,60E-06 | ns ^(a) | 1707_at | 4H | - | - |
| HV09N15 | Dehydrin 7 (<i>HvDHN7</i>) | 0,7464 | hoch ^(a) | 1710_at | 6H | RWC und OA | Tondelli et al. (2006) |
| HO01L05 | Dehydrin 8 (<i>HvDHN8</i>) | 0,1993 | ns ^(a) hoch ^(b) | 2855_at | 6H | - | - |
| HF24J18 | Dehydrin 9 (<i>HvDHN9</i>) | Daten nicht auswertbar | hoch ^{(a)(b)} | 1718_s_at | 5H | Trockenstress | Tondelli et al. (2006) |
| genom.DNA | Dehydrin 10 (<i>HvDHN10</i>) | 0,0042 | hoch ^(a) | 13753_at | 3H | - | - |
| HT13P04 | Dehydrin 11 (<i>HvDHN11</i>) | 0,7603 | ns ^(a) | 10207_s_at | 3H | - | - |
| HT08A04 | Dehydrin 12 (<i>HvDHN12</i>) | 0,0234 | ns ^(a) | 15845_s_at | 6H | - | - |
| HC03N09 | Dehydrin 13 (<i>HvDHN13</i>) | 0,4510 | ns ^(a) | 4809_at | 4H | - | - |

In Expressionsstudien wurde zudem nachgewiesen, dass die Transkriptmenge infolge der Abnahme der Bodenfeuchtigkeit steigt (Tommasini et al., 2008). Obwohl man weiß, dass Dehydrin 10 auf dem Gerstenchromosom 3H lokalisiert ist, konnte das Gen bisher nicht mit einem QTL in Verbindung gebracht werden (Tondelli et al., 2006).

Im Gegensatz dazu konnte Dehydrin 4 einem QTL für den relativen Wassergehalt (RWC) zugeordnet werden (Choi et al., 2003; Teulat et al., 2003). Allerdings erzielte das RNAi Konstrukt in den Experimenten, wenn auch nur knapp, keinen signifikanten Effekt ($p=0,0515$). Betrachtet man das Ergebnis der si-Fi Analyse so stellt man fest, dass das RNAi Konstrukt auch gegen Dehydrin 10 gewirkt haben kann (Tabelle 18). Daraus resultierend stellt sich die Frage, ob es sich bei dem erzielten Ergebnis eventuell um einen schwachen *off-target* Effekt gegen Dehydrin 10 handelte. Aufschluss darüber könnte lediglich ein qRT-PCR Experiment für Dehydrin 10 liefern. Dehydrin 4 kolokalisiert mit *HvDHN3*, *HvDHN5* und *HvDHN7* auf derselben Kopplungsgruppe, an der gleichen Position (Tondelli et al., 2006). Diese drei Konstrukte zeigten jedoch keinerlei Auswirkungen auf das DsRED/GFP Verhältnis, so dass davon auszugehen ist, dass sie keine Rolle unter den experimentellen Trockenstressbedingungen des TIGS Systems spielen.

Ein Anstieg der *HvDHN5* mRNA konnte nur unter Kältestressbedingungen nachgewiesen werden. Ähnlich wie für *HvDHN8* und *HvDHN9* wurde eine Steigerung infolge einer Frostbehandlung gemessen (Tommasini et al., 2008). *HvDHN8* ließ in meinen Experimenten ebenfalls keinen Effekt auf das DsRED/GFP Verhältnis erkennen, was bedeuten könnte, dass dieses Dehydrin wichtiger für Kältestress und Frosttoleranz ist. Dies steht allerdings im Widerspruch mit den Ergebnissen von Talamè et al. (2007), die *HvDHN8* als eindeutig durch Trockenstress reguliert identifizierten. Dies könnte auf die verwendete Sorte Er/Apm zurückzuführen sein, die speziell an besonders trockene Standorte angepasst ist.

Für die Dehydrine *HvDHN6*, *HvDHN11* und *HvDHN12* wurde in den Untersuchungen von Tommasini et al. (2008) gezeigt, dass deren mRNA nur in embryonalem Gewebe exprimiert wird. Dies kann in meinen Experimenten, zumindest für *HvDHN6* nicht bestätigt werden. Dieses Gen wurde ebenfalls in den durch Dehydration gestressten Blättern des jungen Keimlings transkribiert.

Neben dem signifikanten RNAi Effekt auf das Verhältnis von DsRED- zu GFP fluoreszierenden Zellen können aber auch die erfassten qRT-PCR Daten Aufschluss über dessen Funktionalität geben. Da die mRNA Menge von *HvDHN6* unmittelbar nach Beginn des Stresses stark ansteigt, könnte es zum schnellen und direkten Schutz beitragen. Die Steigerung der Expressionsrate innerhalb der ersten 6 Stunden nach Stressbeginn konnte ebenfalls in Untersuchungen von *Hordeum spontaneum* nachgewiesen werden (Suprunova et al., 2004). Betrachtet man jedoch das negative RNAi Ergebnis für *HvDHN6* in Morex (siehe Abbildung 18), wäre eine mögliche Erklärung, dass *HvDHN6* abhängig vom Genotyp exprimiert wird. Dies stimmt auch mit den negativen Ergebnissen der Expressionsstudien von Tommasini et al. (2008) überein. Interessanterweise konnte für das RNAi Konstrukt gegen *HvDHN13*, welches ebenfalls gegen *HvDHN6* wirken sollte (siehe Tabelle 18), kein positives Resultat das DsRED/GFP Verhältnis betreffend erzielt werden. Die Ursache hierfür ist unbekannt, es ist aber möglich, dass es sich um ein schlechtes *off-target* gegen *HvDHN6* handelt. Betrachtet man abschließend die Ergebnisse des RNAi Screens und der Expressionsanalysen, so kann man erkennen, dass es sich bei den Dehydrinen um eine wichtige Genfamilie handeln muss, die für die Toleranz von abiotischen Stress und Dehydrationsstress im Speziellen, essentiell zu sein scheint. Dies äußert sich insofern, dass mehrere Mitglieder der LEA D11 Familie ein signifikantes Ergebnis im Test lieferten. Der Schutz von Proteinen scheint dabei bereits zu Beginn der Stressphase zum Teil von Dehydrinen übernommen zu werden, worauf die qRT-PCR Ergebnisse von *HvDHN6* hindeuten.

4.5 Ausblick

Mit der hier vorgestellten Methode, welche auf RNA Interferenz basiert, war es möglich, für spezifische Genkandidaten funktionelle Daten unter Trockenstressbedingungen zu erhalten. Der Einsatz eines solchen *Screens* könnte sich, betrachtet man auch die mögliche Zeitersparnis durch Einsatz eines Roboters (zur automatisierten Zählung fluoreszierender Zellen), als Vorteil gegenüber Mutationsanalysen wie z.B. dem TILLING Verfahren erweisen. Der erwartete Durchsatz des RNAi *Screens* liegt bei mindestens 40 Genen pro Monat und pro Person, ungeachtet der Automatisierung und dürfte damit deutlich über dem Durchschnitt von TILLING Analysen liegen. Des Weiteren ist es nicht notwendig eine große Anzahl an Pflanzen untersuchen zu müssen, um stichhaltige Ergebnisse zu generieren, wie es für Mutationsanalysen der Fall ist.

Eine Option des hier vorgestellten Testsystems ist die Anpassung an andere zu testende Getreidearten, wie Mais oder Reis und die Erweiterung der Analysen auf andere abiotische Stressfaktoren. Hierbei dürften hauptsächlich der Stress durch Kälte und Frost, als auch Salzstress im Mittelpunkt des Interesses stehen. Die erhaltenen Daten könnten für weitere Untersuchungen im Sinne eines funktionellen *Vor-Screenings* genutzt werden und darauf aufbauend als Auswahlkriterium für transgene Pflanzen, die das entsprechende Gen z.B. überexprimieren, dienen. Man könnte jedoch auch die Expression des als « verdächtig » geltenden Genkandidaten mittels qRT-PCR unter verschiedenen abiotischen Stressbedingungen näher untersuchen oder eine Charakterisierung auf Proteinebene vornehmen.

Mit der Identifikation von einzelnen funktionellen Genen wäre es sicherlich auch interessant zu wissen, wie deren Kartenposition im Genom ist (Kartierungsanalyse) und ob sich vielleicht eine Verbindung zu bekannten abiotischen Stress QTL ergibt.

5. Literaturverzeichnis

Abebe T, Guenzi AC, Martin B and Cushman JC. 2003. Tolerance of Mannitol-Accumulating Transgenic Wheat to water Stress and Salinity. *Plant Physiology* 131(4): 1748-1755

Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K. 2003. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) Function as Transcriptional Activators in Abscisic Acid Signaling. *The Plant Cell* 15: 63-78

Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D and Shinozaki K. 1997. Role of Arabidopsis MYC and MYB Homologs in Drought- and Abscisic Acid-Regulated Gene Expression. *The Plant Cell* 9: 1859-1868

Acharya BR, Assmann SM. 2009. Hormone interactions in stomatal function. *Plant Molecular Biology* 69: 451-462

Allagulova CR, Gimalov FR, Shakirova FM, and Vakhitov VA. 2003. The Plant Dehydrins: Structure and Putative Functions. *Biochemistry (Moscow)* 68(9): 945-951

Alonso-Ramírez A, Rodríguez D, Reyes D, Jiménez JA, Nicolas G, López-Climent M, Gómez-Cadenas A, and Nicolás C. 2009. Evidence for a Role of Gibberellins in Salicylic Acid-Modulated Early Plant Responses to Abiotic Stress in Arabidopsis Seeds. *Plant Physiology* 150: 1335-1344

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, and Lipman DJ. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410

Apel K and Hirt H. 2004. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399

Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E. 1999. Salt Tolerance Conferred by Overexpression of a Vacuolar Na⁺/H⁺ Antiport in *Arabidopsis*. *Science* 285: 1256-1258

Araus JL, Slafer GA, Reynolds MP and Royo C. 2002. Plant Breeding and Drought in C₃ Cereals: What Should We Breed For? *Annals of Botany* 89: 925-940

Atienza SG, Faccioli P, Perrotta G, Dalfino G, Zschiesche W, Humbeck K, Stanca AM, Cativelli L. 2004. Large scale analysis of transcripts abundance in barley subjected to several single and combined abiotic stress conditions. *Plant Science* 167: 1359-1365

Babu RC, Zhang J, Blum A, Ho THD, Wu R, Nguyen HT. 2004. *HVA1*, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. *Plant Science* 166: 855-862

Bahieldin A, Mahfouz HT, Eissa HF, Saleh OM, Ramadan AM, Ahmed IA, Dyer WE, El-Itriby HA, Madkour MA. 2005. Field evaluation of transgenic wheat plants stably expressing the *HVA1* gene for drought tolerance. *Physiologia Plantarum* 123: 421-427

- Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY.** 2000. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, Vol. 97(22): 11984-11989
- Bandurska H, Stroinski A, Kubis J.** 2003. The effect of jasmonic acid on the accumulation of ABA, proline and spermidine and its influence on membrane injury under water deficit in two barley genotypes. Acta Physiologiae Planta 25: 279-285
- Barrs HD and Weatherley PE.** 1962. A Re-Examination of the Relative Turgidity Technique for Estimating Water Deficits in Leaves. Australian Journal of Biological Science 15: 413-428
- Bartels D and Sunkar R.** 2005. Drought and Salt Tolerance in Plants. Critical Reviews in Plant Sciences 24: 23-58
- Battaglia M, Olvera-Carillo Y, Garcarrubio A, Campos F, and Covarrubias AA.** 2008. The Enigmatic LEA Proteins and Other Hydrophilins. Plant Physiology 148: 6-24
- Bohnert HJ, Nelson DE and Jensen RG.** 1995. Adaptations to Environmental Stresses. The Plant Cell 7: 1099-1111
- Borsani O, Valpuestra V, and Botella M.** 2001. Evidence for a Role of Salicylic Acid in the Oxidative Damage Generated by NaCl and Osmotic Stress in Arabidopsis Seedlings. Plant Physiology 126: 1024-1030
- Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E.** 2000. Responses to Abiotic Stress. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Buchanan B, Gruissem R, Jones R Eds., American Society of Plant Physiologists: 1158-1203
- Brini F, Hanin M, Mezghani I, Berkowitz GA and Masmoudi K.** 2007. Overexpression of wheat Na⁺/H⁺ antiporter *TNHX1* and H⁺-pyrophosphatase *TVP1* improve salt- and drought-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* plants. Journal of Experimental Botany 58(2): 301-308
- Brisson LF, Tenhaken R and Lamb C.** 1994. Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. Plant Cell 6: 1703-1712
- Broin M, Rey P.** 2003. Potato Plants Lacking the CDSP32 Plastidic Thioredoxin Exhibit Overoxidation of the BAS1 2-Cysteine Peroxiredoxin and Increased Lipid Peroxidation in Thylakoids under Photooxidative Stress. Plant Physiology 132: 1335-1343
- Broin M, Cuiné S, Eymery F, and Rey P.** 2002. The Plastidic 2-Cysteine Peroxiredoxin is a Target for a Thioredoxin Involved in the Protection of the Photosynthetic Apparatus against Oxidative Damage. The Plant Cell 14: 1417-1432
- Busk PK and Pagès M.** 1998. Regulation of Abscisic Acid-induced transcription. Plant Molecular Biology 37: 425-435

- Capell T, Bassie L and Christou P.** 2004. Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 101: 9909-9914
- Casaretto J and Ho THD.** 2003. The Transcription Factors HvABI5 and HvVP1 Are Required for the Abscisic Acid Induction of Gene Expression in Barley Aleurone Cells. *The Plant Cell* 15: 271-284
- Cheek S, Zhang H and Grishin NV.** 2002. Sequence and Structure Classification of Kinases. *Journal of Molecular Biology* 320: 855-881
- Chen THH and Murata N.** 2002. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 250-257
- Choi DW, Zhu B, Close TJ.** 1999. The barley (*Hordeum vulgare* L.) dehydrin multigene family: sequences, allele types, chromosome assignments, and expression characteristics of 11 Dhn genes of cv Dicktoo. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1234-1247
- Choi DW and Close TJ.** 2000. A newly identified barley gene, *Dhn12*, encoding a YSK₂ DHN, is located on chromosome 6H and has embryo-specific expression. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1234-1247
- Choi DW, Rodriguez EM and Close TJ.** 2002. Barley *Cbf3* Gene Identification, Expression Pattern, and Map Location. *Plant Physiology* 129: 1781-1787
- Choi HI, Hong JH, Ha JO, Kang JY, and Kim SY.** 2000. ABFs, a Family of ABA-responsive Element Binding Factors. *The Journal of Biological Chemistry* 275(3): 1723-1730
- Christmann A, Moes D, Himmelbach A, Yang Y, Tang Y, Grill E.** 2006. Integration of Abscisic Acid Signalling into Plant Responses. *Plant Biology* 8: 314-325
- Churin Y, Adam E, Kozma-Bognar L, Nagy F, Börner T.** 2003. Characterization of two Myb-like transcription factors binding to CAB promoters in wheat and barley. *Plant Molecular Biology* 52: 447-462
- Close TJ.** 1997. Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiologia Plantarum* 100: 291-296
- Close TJ, Bhat PR, Lonardi S, Wu Y, Rostoks N, Ramsay L, Druka A, Stein N, Svensson JT, Wanamaker S, Bozdag S, Roose ML, Moscou MJ, Chao S, Varshney RK, Szűcs P, Sato K, Hayes PM, Matthews DE, Kleinhofs A, Muehlbauer GJ, Deyoung J, Marshall DF, Madishetty K, Fenton RD, Condamine P, Graner A and Waugh R.** 2009. Development and implementation of high-throughput SNP genotyping in barley. *BioMed Central Genomics* 10, Article: 582
- Clouse SD, Sasse JM.** 1998. BRASSINOSTEROIDS: Essential Regulators of Plant Growth and Development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 427-451

- Cobbett C and Goldsbrough P.** 2002. Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxifikation and Homeostasis. Annual Review of Plant Biology 53: 159-182
- COHEN SN, CHANG ACY and HSU L.** 1972. Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, Vol. 69(8): 2110-2114
- Cornic G and Massacci A.** 1997. Leaf Photosynthesis under drought stress. In: Baker N.R., (Ed.), Advances in Photosynthesis and Respiration, Vol.5: Photosynthesis and the Environment, Springer Netherlands
- Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, Van Montagu M, Inze D and Van Breusegem F.** 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. Cellular and Molecular Life Sciences 57: 779-795
- Delauney A and Verma DPS.** 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. Plant Journal 4: 215-223
- De Leonardis AM, Marone D, Mazzucotelli E, Neffar F, Rizza F, Di Fonzo N, Cattivelli L, Mastrangelo AM.** 2007. Durum wheat genes up-regulated in the early phases of cold stress are modulated by drought in a developmental and genotype dependent manner. Plant Science 172: 1005-1016
- Dhaubhadel S, Chaudhary S, Dobinson KF, Krishna P.** 1999. Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and tomato seedlings. Plant Molecular Biology 40: 333-342
- Dhaubhadel S, Browning KS, Gallie DR, Krishna P.** 2002. Brassinosteroid functions to protect the translational machinery and heat-shock protein synthesis following thermal stress. Plant Journal 29: 681-691
- Dietz KJ.** 2003. Plant Peroxiredoxins. Annual Review of Plant Biology 54: 93-107
- Dong CH, Agarwal M, Zhang Y and Zhu JK.** 2006. The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 103(21): 8281-8286
- Douchkov D, Nowara D, Zierold U, Schweizer P.** 2005. A High-Throughput Gene-silencing System for the Functional Assessment of Defense-Related Genes in Barley Epidermal Cells. Molecular Plant-Microbe Interactions 18: 755-761
- Doyle JJ and Doyle JL.** 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. Focus 12: 13-15
- Doyle JJ and Doyle JL.** 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19: 11-15

- Dure III L, Crouch M, Harada J, Ho THD, Mundy J, Quatrano R, Thomas T and Sung ZR.** 1989. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology* 12: 475-486
- Durner J, Shah J and Klessig DF.** 1997. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends in Plant Science* 2(7): 266-274
- Egawa C, Kobayashi F, Ishibashi M, Nakamura T, Nakamura C and Takumi S.** 2006. Differential regulation of transcript accumulation and alternative splicing of a *DREB2* homolog under abiotic stress conditions in common wheat. *Genes and Genetic Systems* 81: 77-91
- Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, and Carroll D.** 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13(4): 17R-27R
- Farooq M, Wahid A, Kobayashi D, Fujita D and Basra SMA.** 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development* 29: 185-212
- Finkelstein RR, Gampala SSL and Rock CD.** 2002. Abscisic Acid Signaling in Seeds and Seedlings. *The Plant Cell* 14: S15-S45
- Forster BP, Pakniyat H, Macaulay M, Matheson W, Phillips MS, Thomas WTB & Powell W.** 1994. Variation in the leaf sodium content of the *Hordeum vulgare* (barley) cultivar Maythorpe and its derived mutant cv. Golden Promise. *Heredity* 73: 249-253
- Foyer CH, Descourvieres P & Kunert KJ.** 1994. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment* 17: 507-523
- Franks SJ, Sim S and Weis AE.** 2007. Rapid evolution of flowering time by an annual plant in response to a climate fluctuation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 104(4): 1278-1282
- Fukuda A, Chiba K, Maeda M, Nakamura A, Maeshima M, Tanaka Y.** 2004. Effect of salt and osmotic stresses on the expression of genes for the vacuolar H⁺-pyrophosphatase, H⁺-ATPase subunit A, and Na⁺/H⁺ antiporter from barley. *Journal of Experimental Botany* 55: 585-594
- Fukuda A, Nakamura A, Tagiri A, Tanaka H, Miyao A, Hirochika H and Tanaka Y.** 2004. Function, Intracellular Localization and the Importance in Salt Tolerance of a Vacuolar Na⁺/H⁺ Antiporter from Rice. *Plant Cell Physiology* 45(2): 146-159
- Fujita M, Fujita Y, Maruyama K, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Tran LSP, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K.** 2004. A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *The Plant Journal* 39: 863-876

- Fujita Y, Fujita M, Satoh R, Maruyama K, Parvez MM, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Shinozaki K, and Yamaguchi-Shinozaki K.** 2005. AREB1 Is a Transcription Activator of Novel ABRE-Dependent ABA Signaling That Enhances Drought Stress Tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 17: 3470-3488
- Furihata T, Maruyama K, Fujita Y, Umezawa T, Yoshida R, Shinozaki K, and Yamaguchi-Shinozaki K.** 2006. Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 103(6): 1988-1993
- Garg AK, Kim JK, Owens TG, Ranwala AP, Choi YD, Kochian RJ, Wu RJ.** 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 99: 15898-15903
- Griffiths S, Dunford RP, Coupland G and Laurie DA.** 2003. The Evolution of CONSTANS-Like Gene Families in Barley, Rice, and *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 131: 1855-1867
- Gross LA, Baird GS, Hoffman RC, Baldrige KK, Tsien RY.** 2000. The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, Vol. 97(22):* 11990-11995
- Haake V, Cook D, Riechmann JL, Pineda O, Thomashow MF, and Zhang JZ.** 2002. Transcription Factor CBF4 Is a Regulator of Drought Adaptation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 130: 639-648
- Hanahan D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166(4): 157-180
- Hegazy AK and El Amry MI.** 1998. Leaf temperature of desert sand dune plants: perspectives on the adaptability of leaf morphology. *African Journal of Ecology* 36: 34-43
- Holmes DS, Quigley M.** 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry* 114: 193-197
- Hong Z, Lakkineni K, Zhang K, Verma DPS.** 2000. Removal of Feedback Inhibition of Δ^1 -Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Results in Increased Proline Accumulation and Protection of Plants from Osmotic Stress. *Plant Physiology* 122: 1129-1136
- Hu H, Dai M, Yao J, Xiao B, Li X, Zhang Q, and Xiong L.** 2006. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, Vol. 103(35):* 12987-12992
- Hu Y, Li WC, Xu YQ, Li GJ, Liao Y, Fu FL.** 2009. Differential expression of candidate genes for lignin biosynthesis under drought stress in maize leaves. *Journal of Applied Genetic* 50(3): 213-223

- Huang D, Wu W, Abrams SR and Cutler A.** 2008. The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. *Journal of Experimental Botany* 59(11): 2991-3007
- Huang J, Hirji R, Adam L, Rozwadowski KL, Hammerlindl JK, Keller WA.** 2000. Genetic Engineering of Glycinebetaine Production toward Enhancing Stress Tolerance in Plants: Metabolic Limitations. *Plant Physiology* 122: 747-756
- Hubick KT, Taylor JS and Reid DM.** 1986. The effect of drought on levels of abscisic acid, cytokinins, gibberellins and ethylene in aeroponically-grown sunflower plants. *Plant Growth Regulation* 4: 139-151
- Hung SH, Yu CW and Lin CH.** 2005. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 46: 1-10
- Ihlow J, Schweizer P, Seiffert U.** 2008. A high-throughput screening system for barley/powdery mildew interactions based on automated analysis of light micrographs. *BioMed Central Plant Biology* 8: 1-9
- Ingram J, Bartels D.** 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 377-403
- Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki M, Kato T, Tabata S, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K.** 2001. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 27(4): 325-333
- Jach G, Binot E, Frings S, Luxa K and Schel J.** 2001. Use of red fluorescent protein from *Discosoma* sp. (dsRED) as a reporter for plant gene expression. *The Plant Journal* 28(4): 483-491
- Jager CE, Symons GM, Ross JJ and Reid JB.** 2008. Do brassinosteroids mediate the water stress response? *Physiologia Plantarum* 133: 417-425
- Jang JY, Kim DG, Kim YO, Kim JS and Kang H.** 2004. An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 54: 713-725
- Jennings DB, Ehrenshaft M, Pharr DM, and Williamson JD.** 1998. Roles for mannitol and mannitol dehydrogenase in active oxygen-mediated plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95: 15129-15133
- Johanson U, Karlsson M, Johansson I, Gustavsson S, Sjövall S, Fraysse L, Weig AR, and Kjellbom P.** 2001. The Complete Set of Genes Encoding Major Intrinsic Proteins in *Arabidopsis* Provides a Framework for a New Nomenclature for Major Intrinsic Proteins in Plants. *Plant Physiology* 126: 1358-1369
- Kagale S, Divi UK, Krochko JE, Keller WA, Krishna P.** 2007. Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses. *Planta* 225: 353-364

Kalifa Y, Perlson E, Gilad A, Konrad Z, Scolnik PA & Bar-Zvi D. 2004. Over-expression of the water and salt stress-regulated *Asr1* gene confers an increased salt tolerance. *Plant, Cell and Environment* 27: 1459-1468

Karim S, Aronsson H, Ericson H, Pirhonem M, Leyman B, Welin B, Mäntylä E, Palva ET, Dijck PV, Holmström K. 2007. Improved drought tolerance without undesired side effects in transgenic plants producing trehalose. *Plant Molecular Biology* 64: 371-386

Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K. 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology* 17: 287-291

Katsir L, Chung HS, Koo AJ, Howe GA. 2008. Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 428-435

Kim SJ, Kim KW, Cho MH, Franceschi VR, Davin LB, Lewis NG. 2007. Expression of cinnamyl alcohol dehydrogenases and their putative homologues during *Arabidopsis thaliana* growth and development: Lessons for database annotations? *Phytochemistry* 68: 1957-1974

Kishor PBK, Hong Z, Miao GH, Hu CAA and Verma DPS. 1995. Overexpression of Δ^1 -Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Increases Proline Production and Confers Osmotolerance in Transgenic Plants. *Plant Physiology* 108: 1387-1394

Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K. 1993. Characterization of cDNA for a Dehydration-Inducible Gene that encodes a Clp A, B-like Protein in *Arabidopsis thaliana* L. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 196(3): 1214-1220

Kleinhofs A, Kilian A, Saghai Maroof MA, Biyashev RM, Hayes P, Chen FQ, Lapitan N, Fenwick A, Blake TK, Kanazin V, Ananiev E, Dahleen L, Kudrna D, Bollinger J, Knapp SJ, Liu B, Sorrells M, Heun M, Franckowiak JD, Hoffman D, Skadsen R, Steffenson BJ. 1993. A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. *Theoretical and Applied Genetics* 86: 705-712

Knowles BH and Dow JAT. 1993. The Crystal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: Models for their Mechanism of Action on the Insect Gut. *BioEssays* 15(7): 469-476

Ko CB, Woo YM, Lee DJ, Lee MC, Kim CS. 2007. Enhanced tolerance to heat stress in transgenic plants expressing the GASA4 gene. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 722-728

Korff M, Grando S, Del Greco A, This D, Baum M, Ceccarelli S. 2008. Quantitative trait loci associated with adaptation to Mediterranean dryland conditions in barley. *Theoretical and Applied Genetics* 117: 653-669

Koziel MG, Beland GL, Bowman C, Carozzi NB, Crenshaw R, Crossland L, Dawson J, Desai N, Hill M, Kadwell S, Launis K, Lewis K, Maddox D, McPherson K, Meghji R, Merlin E, Rhodes R, Warren GW, Wright M and Evola SV. 1993. Field Performance of Elite Transgenic Maize Plants Expressing an Insecticidal Protein Derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology* 11: 194-200

Lal S, Gulyani V, Khurana P. 2004. Overexpression of HVA1 gene from barley generates tolerance to salinity and water stress in transgenic mulberry (*Morus indica*). *Transgenic Research* 17(4): 651-663

Laloi C, Apel K and Danon A. 2004. Reactive oxygen signalling: the latest news. *Current opinion in plant biology* 7: 323-328

Lanceras JC, Pantuwan G, Jongdee B, Toojinda T. 2004. Quantitative trait loci associated with drought tolerance at reproductive stage in rice. *Plant Physiology* 135: 384-399

Laurie S, McKibbin RS and Halford NG. 2003. Antisense SNF1-related (SnRK1) protein kinase gene represses transient activity of an α -amylase (α -Amy2) gene promoter in cultured wheat embryos. *Journal of Experimental Botany* 54(383): 739-747

Leung J and Giraudat J. 1998. Abscisic Acid Signal Transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 199-222

Levine A, Tenhaken R, Dixon R and Lamb C. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593

Lian HL, Yu X, Ye Q, Ding XS, Kitagawa Y, Kwak SS, Su WA and Tang ZC. 2004. The Role of Aquaporin RWC3 in Drought Avoidance in Rice. *Plant Cell Physiology* 45(4): 481-489

Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K . 1998. Two Transcription Factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP DNA Binding Domain Separate Two Cellular Signal Transduction Pathways in Drought- and Low- Temperature-Responsive Gene Expression, Respectively, in Arabidopsis. *The Plant Cell* 10: 1391-1406

Luan S. 2002. Signalling drought in guard cells. *Plant, Cell and Environment* 25: 229-237

Ludwig-Müller J. 2007. Indole-3-butyric acid synthesis in ecotypes and mutants of *Arabidopsis thaliana* under different growth conditions. *Journal of Plant Physiology* 164: 47-59

Mackay M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *CMI* 10(3): 190-212

Mahadjan S, Tuteja N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444: 139-158

- Mandel M and Higa A.** 1970. Letter to the Editor. Calcium-dependent Bacteriophage DNA-Infection. *Journal of Molecular Biology* 53: 159-162
- Marttila S, Tenhola T, Mikkonen A.** 1996. A barley (*Hordeum vulgare* L.) LEA3 protein, HVA1, is abundant in protein storage vacuoles. *Planta* 199: 602-611
- Marzin S, Mihaly R, Pauk J and Schweizer P.** 2008. A transient assay system for the assessment of cell-autonomous gene function in dehydration-stressed barley. *Journal of Experimental Botany* 59(12): 3359-3369
- Matsukura S, Mizoi J, Yoshida T, Todaka D, Ito Y, Maruyama K, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K.** 2010. Comprehensive analysis of rice *DREB2*-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. *Molecular Genetics and Genomics* 283: 185-196
- Maurel C.** 1997. Aquaporins and Water Permeability of Plant Membranes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 399-429
- Mazzucotelli E, Belloni S, Marone D, Leonardis AMD, Guerra D, Fonzo ND, Cattivelli L and Mastrangelo AM.** 2006. The E3 Ubiquitin Ligase Gene Family in Plants: Regulation by Degradation. *Current Genomics* 7: 509-522
- McNeil SD, Nuccio ML, Hanson AD.** 1999. Betaines and Related Osmoprotectants. Targets for Metabolic Engineering of Stress Resistance. *Plant Physiology* 120: 945-949
- Menkens AE, Schindler U and Cashmore AR.** 1995. The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. *Trends in Biochemistry Science* 20: 506-510
- Mittler R.** 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *TRENDS in Plant Science* 7(9): 405-410
- Motzo R, Attene G and Deidda M.** 1993. Genotypic variation in durum wheat root systems at different stages of development in a Mediterranean environment. *Euphytica* 66: 197-206
- Mundree SG, Baker B, Mowla S, Peters S, Marais S, Willigen CV, Govender K, Maredza A, Muyanga S, Farrant JM and Thomson JA.** 2002. Physiological and molecular insights into drought tolerance. *African Journal of Biotechnology* 1(2): 28-38
- Munné-Bosch S.** 2005. The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *Journal of Plant Physiology* 162: 743-748
- Mustilli AC, Merlot S, Vavasseur A, Fenzi F, and Giraudat J.** 2002. Arabidopsis OST1 Protein Kinase Mediates the Regulation of Stomatal Aperture by Abscisic Acid and Acts Upstream of Reactive Oxygen Species Production. *The Plant Cell* 14: 3089-3099

Nakashima K, Shinwari ZK, Sakuma Y, Seki M, Miura S, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K. 2000. Organization and expression of two *Arabidopsis DREB2* genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. *Plant Molecular Biology* 42: 657-665

Nakashima K, Tran LSP, Nguyen DV, Fujita M, Maruyama K, Todaka D, Ito Y, Hayashi N, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K. 2007. Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *The Plant Journal* 51: 617-630

Nakashima K and Yamaguchi-Shinozaki K. 2005. Molecular Studies on Stress-Responsive Gene Expression in *Arabidopsis* and Improvement of Stress Tolerance in Crop Plants by Regulon Biotechnology. *Japan Agricultural Research Quarterly* 39(4): 221-229

Nanjo T, Kobayashi M, Yoshiba Y, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K. 1999. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letter* 461: 205-210

Narusaka Y, Nakashima K, Shinwari ZK, Sakuma Y, Furihata T, Abe H, Narusaka M, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K. 2003. Interaction between two *cis*-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *The Plant Journal* 34: 137-148

Neill S, Desikan R and Hancock J. 2002. Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 388-395

Noctor G and Foyer CH. 1998. Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249-279

Nonami H and Boyer JS. 1990. Wall extensibility and cell hydraulic conductivity decrease in enlarging stem tissues at low water potentials. *Plant Physiology* 93: 1610-1619

Nuccio MI, Russell BL, Nolte KD, Rathinasabapathi B, Gage DA. 1998. The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco expressing choline. *Plant Journal* 16: 487-496

Oh SJ, Kwon CW, Choi DW, Song SI, Kim JK. 2007. Expression of barley HvCBF4 enhances tolerance to abiotic stress in transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal* 5: 646-656

Oono Y, Seki M, Nanjo T, Narusaka M, Fujita M, Satoh R, Satou M, Sakurai T, Ishida J, Akiyama K, Iida K, Maruyama K, Satoh S, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K. 2003. Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* gene expression during rehydration process after dehydration using ca. 7000 full-length cDNA microarray. *The Plant Journal* 34: 868-887

Oraby HF, Ransom CB, Kravchenko AN, and Sticklen MB. 2005. Barley HVA1 Gene Confers Salt Tolerance in R3 Transgenic Oat. *Crop Science* 45: 2218-2227

Paine JA, Shipton CA, Chaggar S, Howells RM, Kennedy MJ, Vernon G, Wright SY, Hinchliffe E, Adams JL, Silverstone AL and Drake R. 2005. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nature Biotechnology* 23(4): 482-487

Palmiter RD. 1998. The elusive function of metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 8428-8430

Panstruga R, Chul Kim M, Je Cho M & Schulze-Lefert P. 2003. Testing the efficiency of dsRNAi constructs *in vivo*: A transient expression assay based on two fluorescent proteins. *Molecular Biology Reports* 30: 135-140

Panstruga R. 2004. A golden shot: how ballistic single cell transformation boosts the molecular analysis of cereal–mildew interactions. *Molecular Plant Pathology* 5: 141-148

Park S, Li JS, Pittman JK, Berkowitz GA, Yang HB, Undurraga S, Morris J, Hirschi KD, Gaxiola RA. 2005. Up-regulation of a H⁺-pyrophosphatase (H⁺-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 18830-18835

Parmesan C and Yohe GA. 2003. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature* 421: 37-42

Patnaik D and Khurana P. 2003. Genetic transformation of Indian bread (*T.aestivum*) and pasta (*T.durum*) wheat by particle bombardment of mature embryo-derived calli. (*BioMed Central*) *Plant Biology* 3(5)

Peng Z, Lu Q, Verma DPS. 1996. Reciprocal regulation of Δ^1 -Pyrroline-5-Carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. *Molecular and General Genetics* 253: 334-341

Peng YH, Lin WL, Cai WM, Arora R. 2007. Overexpression of a Panax ginseng tonoplast aquaporin alters salt tolerance, drought tolerance and cold acclimation ability in transgenic Arabidopsis plants. *Planta* 226: 729-740

Perruc E, Charpentreau M, Ramirez BC, Jauneau A, Galaud JP, Ranjeva R, Ranty B. 2004. A novel calmodulin-binding protein functions as a negative regulator of osmotic stress tolerance in Arabidopsis thaliana seedlings. *Plant Journal* 38: 410-420

Phean-o-pas S, Punteeranurak P and Buaboocha T. 2005. Calcium Signaling-Mediated and Differential Induction of Calmodulin Gene Expression by Stress in *Oryza sativa* L. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 38(4): 432-439

- Potokina E, Druka A, Luo Z, Wise R, Waugh R and Kearsley M.** 2008. Gene expression quantitative trait locus analysis of 16000 barley genes reveals a complex pattern of genome-wide transcriptional regulation. *The Plant Journal* 53: 90-101
- Qian G, Han Z, Zhao T, Deng G, Pan Z and Yu M.** 2007. Genotypic variability in sequence and expression of *HVA1* gene in Tibetan hulless barley, *Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*, associated with resistance to water deficit. *Australian Journal of Agricultural Research* 58: 425-431
- Quackenbush J, Cho J, Lee D, Liang F, Holt I, Karamycheva S, Parvizi B, Perteau G, Sultana R and White J.** 2001. The TIGR Gene Indices: analysis of gene transcript sequences in highly sampled eukaryotic species. *Nucleic Acids Research* 29(1): 159-164
- Quackenbush J, Liang F, Holt I, Perteau G and Upton J.** 2000. The TIGR Gene Indices: reconstruction and representation of expressed gene sequences. *Nucleic Acids Research* 28(1): 141-145
- Qin F, Sakuma Y, Tran LSP, Maruyama K, Kidokoro S, Fujita Y, Fujita M, Umezawa T, Sawano Y, Miyazono KI, Tanokura M, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K.** 2008. *Arabidopsis* DREB2A-Interacting Proteins Function as RING E3 Ligases and Negatively Regulate Plant Drought Stress-Responsive Gene Expression. *The Plant Cell* 20: 1693-1707
- Rabbani MA, Maruyama K, Abe H, Khan MA, Katsura K, Ito Y, Yoshiwara K, Seki M, Shinozaki K, and Yamaguchi-Shinozaki K.** 2003. Monitoring Expression Profiles of Rice Genes under Cold, Drought, and High-Salinity Stresses and Abscisic Acid Application Using cDNA Microarray and RNA Gel-Blot Analyses. *Plant Physiology* 133: 1755-1767
- Radchuk R, Radchuk V, Weschke W, Borisjuk L, Weber H.** 2006. Repressing the expression of the SUCROSE NONFERMENTING-1-RELATED PROTEIN KINASE gene in pea embryo causes pleiotropic defects of maturation similar to an abscisic acid-insensitive phenotype. *Plant Physiology* 140: 263-278
- Rajjou L, Belghazi M, Huguet R, Robin C, Moreau A, Job C and Job D.** 2006. Proteomic Investigation of the Effect of Salicylic Acid on *Arabidopsis* Seed Germination and Establishment of Early Defense Mechanisms. *Plant Physiology* 141: 910-923
- Ramanjulu S and Bartels D.** 2002. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant, Cell and Environment* 25: 141-151
- Ramírez AA, Rodríguez D, Reyes D, Jiménez JA, Nicolás G, López-Climent M, Gómez-Cadenas A, and Nicolás C.** 2009. Evidence for a Role of Gibberellins in Salicylic Acid-Modulated Early Plant Responses to Abiotic Stress in *Arabidopsis* Seeds. *Plant Physiology* 150: 1335-1344

- Rey P, Cuiné S, Eymery F, Garin J, Court M, Jacquot JP, Rouhier N and Broin M.** 2005. Analysis of the proteins targeted by CDSP32, a plastidic thioredoxin participating in oxidative stress responses. *The Plant Journal* 41: 31-42
- Rhodes D and Hanson AD.** 1993. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44: 357-384
- Richards RA, Rawson HM, Johnson DA.** 1986. Glaucousness in wheat: its development, and effect on water-use efficiency, gas exchange and photosynthetic tissue temperatures. *Australian Journal of Plant Physiology* 13(4): 465-473
- Rizhsky L, Hallak-Herr E, Van Breusegem F, Rachmilevitch S, Barr JE, Rodermel S, Inze D and Mittler R.** 2002. Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. *The Plant Journal* 32: 329-342
- Robson F, Costa MMR, Hepworth SR, Vizir I, Piñeiro M, Reeves PH, Putterill J and Coupland G.** 2001. Functional importance of conserved domains in the flowering-time gene *CONSTANS* demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants. *The Plant Journal* 28(6): 619-631
- Rock CD.** 2000. Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytologist* 148: 357-396
- Rodríguez EM, Svensson JT, Malatrasi M, Choi DW, Close TJ.** 2005. Barley *Dhn13* encodes a KS-type dehydrin with constitutive and stress responsive expression. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 852-858
- Russell BL, Rathinasabapathi B, Hanson AD.** 1998. Osmotic stress induces expression of cholinemonooxygenase in sugar beet and amaranth. *Plant Physiology* 116: 859-865
- Saibo NJM, Lourenço T and Oliveira MM.** 2009. Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Annals of Botany* 103: 609-623
- Sairam SK.** 1994. Effects of homobrassinolide application on plant metabolism and grain yield under irrigated and moisture-stress conditions of two wheat varieties. *Plant Growth Regulation* 14: 173-181
- Saito S, Hirai N, Matsumoto C, Ohigashi H, Ohta D, Sakata K, and Mizutani M.** 2004. Arabidopsis CYP707As Encode (+)-Abscisic Acid 8'-Hydroxylase, a Key Enzyme in the Oxidative Catabolism of Abscisic Acid. *Plant Physiology* 134: 1439-1449
- Sakamoto A, Murata N.** 2000. Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. *Journal of Experimental Botany* 51: 81-88

Sakamoto A, Murata N. 2002. The role of glycinebetaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant Cell Environment* 25: 163-171

Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Qin F, Seki M, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K. 2006a. Functional Analysis of an Arabidopsis Transcription Factor, DREB2A, Involved in Drought-Responsive Gene Expression. *The Plant Cell* 18: 1292-1309

Sakuma Y, Maruyama K, Qin F, Osakabe Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2006b. Dual Function of an Arabidopsis Transcription Factor DREB2A in Water-stress-responsive and Heat-stress-responsive Gene Expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 103: 18822-18827

Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, Abe H, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K. 2002. DNA-Binding Specificity of the ERF/AP2 Domain of *Arabidopsis* DREBs, Transcription Factors Involved in Dehydration- and Cold-Inducible Gene Expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290: 998-1009

Schaub P, Al-Babili S, Drake R and Beyer P. 2005. Why Is Golden Rice Golden (Yellow) Instead of Red? *Plant Physiology* 138: 441-450

Schwacke R, Grallath S, Breitzkreuz KE, Stransky E, Stransky H, Frommer WB and Rentsch D. 1999. LeProT1, a Transporter for Proline, Glycine Betaine, and γ -Amino Butyric Acid in Tomato Pollen. *The Plant Cell* 11: 377-391

Schwartz SH, Qin X, and Zeevaart JAD. 2003. Elucidation of the Indirect Pathway of Abscisic Acid Biosynthesis by Mutants, Genes, and Enzymes. *Plant Physiology* 131: 1591-1601

Schweizer P, Pokorny J, Abderhalden O, Dudler R. 1999. A Transient Assay System for the Functional Assessment of Defense-Related Genes in Wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 647-654

Schweizer P, Pokorny J, Schulze-Lefert P, Dudler R. 2000. Double-stranded RNA interferes with gene function at the single-cell level in cereals. *Plant Journal* 24(6): 895-903

Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Hayashihide Y, and Shinozaki K. 2001. Monitoring the Expression Pattern of 1300 Arabidopsis Genes under Drought and Cold Stresses by Using a Full-length cDNA Microarray. *The Plant Cell* 13: 61-72

Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, FUJITA m; Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, and Shinozaki K. 2002. Monitoring the Expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA Microarray. *The Plant Journal* 31(3): 279-292

- Seki M, Umezawa T, Urano K and Shinozaki K.** 2007. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 296-302
- Shashidhar VR, Prasad TG, Sudharshan L.** 1996. Hormone signals from roots to shoots of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Moderate soil drying increases delivery of abscisic acid and depresses delivery of cytokinins in xylem sap. *Annals of Botany* 78: 151-155
- Shen B, Jensen RG, Bohnert HJ.** 1997. Mannitol protects against Oxidation by Hydroxyl Radicals. *Plant Physiology* 115: 527-532
- Shen B, Jensen RG, Bohnert HJ.** 1997. Increased Resistance to Oxidative Stress in Transgenic Plants by Targetting Mannitol Biosynthesis to Chloroplasts. *Plant Physiology* 113: 1177-1183
- Shen Q, Zhang P, and Ho THD.** 1996. Modular Nature of Abscisic Acid (ABA) Response Complexes: Composite Promoter Units that are necessary and sufficient for ABA Induction of Gene Expression in Barley. *The Plant Cell* 8: 1107-1119
- Sheveleva E, Chmara W, Bohnert HJ and Jensen RG.** 1997. Increased Salt and Drought Tolerance by D-Ononitol Production in Transgenic *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiology* 115: 1211-1219
- Shih MD, Hoekstra FA, and Hsing YIC.** 2008. Late Embryogenesis Abundant Proteins. *Advances in Botanical Research* 48: 211-255
- Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K.** 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58(2): 221-227
- Skinner JS, Zitzewitz J, Szűcs P, Marquez-Cedillo L, Filichkin T, Amundsen K, Stockinger EJ, Thomashow MF, Chen THH and Hayes PM.** 2005. Structural, functional, and phylogenetic characterization of a large *CBF* gene family in barley. *Plant Molecular Biology* 59(2): 533-551
- Smart LB, Moskal WA, Cameron KD and Bennett AB.** 2001. *MIP* Genes are Down-regulated Under Drought Stress in *Nicotiana glauca*. *Plant Cell Physiology* 42(7): 686-693
- Smirnoff N.** 1998. Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology* 9: 214-219
- Somssich IE, Wernert P, Kiedrowski S, and Hahlbrock K.** 1996. *Arabidopsis thaliana* defense-related protein ELI3 is an aromatic alcohol:NADP⁺ oxidoreductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 93: 14199-14203
- Stockinger EJ, Gilmour SJ, and Thomashow MF.** 1997. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 94: 1035-1040

- Stoll M, Loveys B, and Dry P.** 2000. Hormonal changes induced by partial rootzone drying of irrigated grapevine. *Journal of Experimental Botany* 51(350): 1627-1634
- Stoop JMH, Williamson JD and Pharr DM.** 1996. Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends in Plant Science* 1(5): 139-144
- Straub PF, Shen Q and Ho THD.** 1994. Structure and promoter analysis of an ABA- and stress-regulated barley gene, HVA1. *Plant Molecular Biology* 26: 617-630
- Suhita D, Kolla VA, Vavasseur A, Raghavendra AS.** 2003. Different signaling pathways involved during the suppression of stomatal opening by methyl jasmonate or abscisic acid. *Plant Science* 164: 481-488
- Suprunova T, Krugman T, Fahima T, Chen G, Shams I, Korol A, Nevo E.** 2004. Differential expression of dehydrin genes in wild barley, *Hordeum spontaneum*, associated with resistance to water deficit. *Plant Cell and Environment* 27: 1297-1308
- Talamè V, Ozturk NZ, Bohnert HJ, Tuberosa R.** 2007. Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis. *Journal of Experimental Botany* 58: 229-240
- Tanaka Y, Sano T, Tamaoki M, Nakajima N, Kondo N, and Hasezawa S.** 2005. Ethylene Inhibits Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 138: 2337-2343
- Tanaka Y, Sano T, Tamaoki M, Nakajima N, Kondo N, and Hasezawa S.** 2006. Cytokinin and auxin inhibit abscisic acid-induced stomatal closure by enhancing ethylene production in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 57(10): 2259-2266
- Tarczyński MC, Jensen RG, Bohnert HJ.** 1993. Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science* 259: 508-510
- Teulat B, Zoumarou-Wallis N, Rotter B, Ben Salem M, Bahri H, This D.** 2003. QTL for relative water content in field-grown barley and their stability across Mediterranean environments. *Theoretical Applied Genetics* 108: 181-188
- Thomas JC, McElwain EF, Bohnert HJ.** 1992. Convergent Induction of Osmotic Stress-Responses. Abscisic Acid, Cytokinin, and the Effects of NaCl. *Plant Physiology* 100: 416-423
- Thomas JC, Smigocki AC, Bohnert HJ.** 1995. Light-induced expression of *ipt* from *Agrobacterium tumefaciens* results in cytokinin accumulation and osmotic stress symptoms in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology* 27: 225-235
- Thompson AJ, Jackson AC, Parker RA, Morpeth DR, Burbidge A and Taylor IB.** 2000. Abscisic acid biosynthesis in tomato: regulation of zeaxanthin epoxidase and 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase mRNAs by light/dark cycles, water stress and abscisic acid. *Plant Molecular Biology* 42: 833-845

- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y and Collinge DB.** 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal* 11(6): 1187-1194
- Tommasini L, Svensson JT, Rodriguez EM, Wahid A, Malatrasi M, Kato K, Wanamaker S, Resnik J, Close TJ.** 2008. Dehydrin gene expression provides an indicator of low temperature and drought stress: transcriptome-based analysis of Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Functional & Integrative Genomics* 8(4): 387-405
- Tondelli A, Francia E, Barabaschi D, Aprile A, Skinner JS, Stockinger EJ, Stanca AM, Pecchioni N.** 2006. Mapping regulatory genes as candidates for cold and drought stress tolerance in barley. *Theoretical Applied Genetics* 112: 445-454
- Tran LSP, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson SD, Fujita Y, Maruyama K, Fujita M, Seki M, Shinozaki K, and Yamaguchi-Shinozaki K.** 2004. Isolation and Functional Analysis of Arabidopsis Stress-Inducible NAC Transcription Factors that Bind to a Drought-Responsive *cis*-Element in the *early responsive to dehydration stress 1* Promoter. *The Plant Cell* 16: 2481-2498
- Tran LSP, Nakashima K, Sakuma Y, Osakabe Y, Qin F, Simpson SD, Maruyama K, Fujita Y, Shinozaki K, and Yamaguchi-Shinozaki K.** 2006. Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the ERD1 gene in Arabidopsis. *The Plant Cell* 49: 46-63
- Tyerman SD, Niemietz CM & Bramley H.** 2002. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant, Cell and Environment* 25: 173-194
- Umezawa T, Okamoto M, Kushiro T, Nambara E, Oono Y, Seki M, Kobayashi M, Koshiba T, Kamiya Y and Shinozaki K.** 2006. CYP707A3, a major ABA 8'-hydroxylase involved in dehydration and rehydration response in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 46: 171-182
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K.** 2000. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 97(21): 11632-11637
- Urano K, Yoshiba Y, Nanjo T, Igarashin Y, Seki M, Sekiguchi F, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K.** 2003. Characterization of *Arabidopsis* genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages. *Plant, Cell & Environment* 26: 1917-1926
- Vallélian-Bindschedler L, Schweizer P, Mosinger E and Mettraux JP.** 1998. Heat-induced resistance in barley to powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) is associated with a burst of active oxygen species. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52: 185-199

- Vernon DM and Bohnert HJ.** 1992. A novel methyl transferase induced by osmotic stress in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. The EMBO Journal 11(6): 2077-2085
- Vick BA and Zimmerman DC.** 1984. Biosynthesis of Jasmonic Acid by Several Plant Species. Plant Physiology 75: 458-461
- Wang SY.** 1999. Methyl jasmonate reduces water stress in strawberry. Journal of Plant Growth Regulation 18: 127-134
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O and Altman A.** 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. TRENDS in Plant Science 9(5): 244-252
- Wang W, Vinocur B, Altman A.** 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. Planta 218: 1-14
- Wenzl P, Li H, Carling J, Zhou M, Raman H, Paul E, Hearnden P, Maier C, Xia L, Caig V, Ovesná J, Cakir M, Poulson D, Wang J, Raman R, Smith KP, Muehlbauer GJ, Chalmers KJ, Kleinjohs A, Huttner E, and Kilian A.** 2006. A high-density consensus map of barley linking DArT markers to SSR, RFLP and STS loci and agricultural traits. BioMed Central Genomics 7, Article: 206
- Williamson JD, Stoop JMH, Massel MO, Conkling MA, and Pharr DM.** 1995. Sequence analysis of a mannitol dehydrogenase cDNA from plants reveals a function for the pathogenesis-related protein ELI3. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 92: 7148-7152
- Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inze D and Van Camp W.** 1997. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants. The EMBO Journal 16(16): 4806-4816
- Wingler A.** 2002. The function of trehalose biosynthesis in plants. Phytochemistry 60: 437-440
- Xu JL, Lafitte HR, Gao YM, Fu BY, Torres R, Li ZK.** 2005. QTLs for drought escape and tolerance identified in a set of random introgression lines of rice. Theoretical Applied Genetics 111: 1642-1650
- Xu P, Zhang Y, Kang L, Roossinck MJ and Mysore KS.** 2006. Computational estimation and experimental verification of off-target silencing during post-transcriptional gene silencing in plants. Plant Physiology 142: 429-440
- Xu ZS, Ni ZY, Li ZY, Li LC, Chen M, Gao DY, Yu XD, Liu P, Ma YZ.** 2009. Isolation and functional characterization of *HvDREB1* – a gene encoding a dehydration-responsive element binding protein in *Hordeum vulgare*. Journal of Plant Research 122: 121-130

- Xue GP, Loveridge CW.** 2004. HvDRF1 is involved in abscisic acid-mediated gene regulation in barley and produces two forms of AP2 transcriptional activators, interacting preferably with a CT-rich element. *Plant Journal* 37: 326-339
- Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K.** 1994. A Novel *cis*-Acting Element in an *Arabidopsis* Gene Is Involved in Responsiveness to Drought, Low-Temperature, or High-Salt Stress. *The Plant Cell* 6: 251-264
- Yamauchi D, Zentella R, Ho TH.** 2002. Molecular analysis of the barley (*Hordeum vulgare* L.) gene encoding the protein kinase PKABA1 capable of suppressing gibberellin action in aleurone layers. *Planta* 215: 319-326
- Yang F, Moss LG, Phillips GN.** 1996. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology* 14: 1246-1251
- Yang JC, Zhang JH, Wang ZQ, Zhu QS, Wang W.** 2001. Hormonal Changes in the Grains of Rice Subjected to Water Stress during Grain Filling. *Plant Physiology* 127: 315-323
- Ye X, Al-Babili S, Klöti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P and Potrykus I.** 2000. Engineering the Provitamin A (β -Carotene) Biosynthetic Pathway into (Carotenoid-Free) Rice Endosperm. *Science* 287: 303-305
- Yokoi S, Quintero FJ, Cubero B, Ruiz MT, Bressan RA, Hasegawa PM and Pardo JM.** 2002. Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na^+/H^+ antiporters in the salt stress response. *The Plant Journal* 30(5): 529-539
- Yoshida Y, Kiyosue T, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K.** 1997. Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant Cell Physiology* 38: 1095-1102
- Yoshida R, Hobo T, Ichimura K, Mizoguchi T, Takahashi F, Aronso J, Ecker JR and Shinozaki K.** 2002. ABA-Activated SnRK2 Protein Kinase is required for Dehydration Stress Signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology* 43(12): 1473-1483
- Young TE, Meeley RB and Gallie DR.** 2004. ACC synthase expression regulates leaf performance and drought tolerance in maize. *The Plant Journal* 40: 813-825
- Zeid IM and Shedeed ZA.** 2006. Response of alfalfa to putrescine treatment under drought stress. *Biologia Plantarum* 50(4): 635-640
- Zeng LR, Vega-Sánchez ME, Zhu T, Wang GL.** 2006. Ubiquitination-mediated protein degradation and modification: an emerging theme in plant-microbe interactions. *Cell Research* 16: 413-426
- Zheng HG, Babu RC, Pathan MS, Ali L, Huang N, Courtois B and Nguyen HT.** 2000. Quantitative trait loci for root-penetration ability and root thickness in rice: Comparison of genetic backgrounds. *Genome* 43: 53-61

6. Zusammenfassung

Das sich rapide ändernde Weltklima stellt zahlreiche Pflanzenpopulationen vor neue Herausforderungen und zwingt sie sich an immer extremere Umweltverhältnisse anzupassen. Neben einem erhöhten biotischen Selektionsdruck, durch massiveres Auftreten von Schädlingen, müssen sich Pflanzen ebenfalls gegen verschiedene abiotische Faktoren zur Wehr setzen. Infolge dessen haben sie unterschiedliche Abwehrmechanismen entwickelt, die es ihnen einerseits ermöglichen Stress zu vermeiden bzw. andererseits ihn zu tolerieren.

Einer der bedeutendsten abiotischen Faktoren, der gleichzeitig die Hauptursache für steigende Ernteverluste darstellt, ist der Stress durch Trockenheit. Dabei wirken auf die Pflanze nicht nur extreme Temperaturen ein, sondern es entsteht auch ein Wassermangel, der zur Austrocknung und damit zum Tod führen kann. Ziel dieser Arbeit war es, ein Testsystem zu etablieren mit Hilfe dessen die Gene identifiziert werden können, die zur Toleranz des Stresses benötigt werden. Hierfür wurde ein bei der Untersuchung der Gerste-Mehltau Interaktion erstmals eingesetztes System zur transienten Ausschaltung von Genen adaptiert und für die Analyse der Trockenstressantwort optimiert. Mit Hilfe des TIGS (*Transient-induced gene silencing*) und der Verwendung bekannter Gene, deren Beteiligung an der Stressantwort durch verschiedene Überexpressions- und Mutationsstudien schon erwiesen wurde, konnten im Sinne eines *proof of concept* vier Kandidaten (*HvDRF1*, *HvNHX1*, *HvDHN6* und *HvHVA1*) identifiziert werden, die das Verhältnis zwischen den zur Beurteilung eingesetzten Fluoreszenzmarkern in gestressten Blättern signifikant beeinflussten. Die genauere Analyse des Expressionsmusters dieser Gene zu verschiedenen Zeitpunkten des Stresses zeigte darüber hinaus, dass *HvDHN6* und *HvHVA1* unmittelbar nach Beginn der Stressperiode stark exprimiert wurden, während *HvDRF1* und *HvNHX1* Transkripte über die gesamte Stressphase hinweg präsent waren. Eine Frage, die sich ferner stellte, war die Übertragbarkeit der in der Sorte Golden Promise erhaltenen Resultate auf andere Genotypen. Der Vergleich von drei verschiedenen Gerstensorten (Golden Promise, Steptoe und Morex) brachte die Erkenntnis, dass es einerseits möglich scheint mit diesem Testsystem anfällige von resistenten Sorten zu unterscheiden und andererseits, dass der Einsatz von RNAi oder

Überexpressionsvektoren im Hinblick auf den genetischen Hintergrund sehr gut überlegt werden muss. Die zweite zu klärende Frage betraf *off-target* Effekte gegen Gene, die nicht als direktes Ziel ausgewählt wurden. Dazu wurden die Sequenzen zweier Mitglieder der DREB Familie mit GFP fusioniert und überprüft, ob das jeweils gegen die Zielsequenz gerichtete RNAi Konstrukt ebenfalls in der Lage war die Translation des anderen Fusionsproteins durch Abbau der mRNA zu beeinflussen. In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass nur das Fusionsprotein mit der anvisierten Zielsequenz der RNA Interferenz unterlag. Nach Optimierung im Sinne einer weiteren Durchsatzerhöhung konnten insgesamt 19 aus 63 untersuchten Kandidaten als signifikant wirkend identifiziert werden.

Um das Gesamtergebnis besser mit Felddaten vergleichen zu können wurden zusätzlich Bestimmungen zum relativen Wassergehalt (RWC) der Blätter unter Stress durchgeführt. Hier zeigte sich, dass der Stresslevel in den Experimenten mit ~60% RWC relativ stringent ist, und eher extrem trockenen Standortbedingungen entspricht.

Abschließend betrachtet konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass es möglich ist Kandidaten der Trockenstressantwort mit dem hier vorgestellten Testsystem, unabhängig vom verwendeten Genotyp, funktionell zu charakterisieren. Gleichzeitig bietet der Test die Möglichkeit der Erweiterung auf andere abiotische Stressformen und stellt somit eine attraktive Methode der revers-genetischen Analyse dar.

7. Summary

Over the past 50 years the world climate is changing very fast, which confronts many plant species with new challenges and forces them to cope with extreme environmental conditions. Biotic as well as abiotic stresses therefore negatively influence not only the plants reproducibility and biomass production but also the survival under unfavourable terms. Due to the development of diverse resistance mechanisms plants were able during evolution to accommodate to many stresses and either circumvent or tolerate them.

Drought as one of the most serious problems among abiotic stresses is also the main reason for yield loss. High temperatures are accompanied by water scarcity and long-term periods of desiccation that leads finally to plant death. One of the tasks of this work was to establish a test system that can be used for exploring the genes that are behind drought tolerance mechanisms. For this purpose, an already established reverse genetic tool that has been used for investigations of barley powdery mildew interaction was adapted to the requirements of drought research. With the aid of TIGS (*Transient-induced gene silencing*) well known candidate genes already confirmed to be important for drought tolerance by mutational or overexpression experiments were tested in order to obtain proof of concept. In total 4 genes (*HvDRF1*, *HvNHX1*, *HvDHN6* und *HvHVA1*) had a significant effect on the ratio of the two applied fluorescence marker GFP and DsRED, whereas reduced DsRED fluorescence was taken as a measure for dehydration stress. For detailed analysis qRT-PCR Experiments were carried out of all 4 significant genes at different time points of stress application. The results revealed that *HvDHN6* and *HvHVA1* were highly induced right after the onset of stress while *HvDRF1* and *HvNHX1* mRNA levels increased more slowly above a basal expression. In addition the question was addressed if the results obtained in cv. Golden Promise can be transferred to other cultivars. For this reason two additional cultivars (Steptoe and Morex) were tested and the comparison with Golden Promise revealed that the TIGS assay might also distinguish between resistant and susceptible cultivars.

I also checked whether off-target effects appeared by fusing the coding sequence of two DREB family members, *HvDRF 1* and *HvDREB1*, were fused to the coding region of the green fluorescent protein (GFP). Testing the corresponding RNAi constructs for cross-silencing clearly showed that only the

construct with the appropriate target sequence was able to silence expression of the GFP-fusion constructs. By changing some of the experimental parameters the assay was improved with respect to a higher throughput. Finally 63 candidate genes were tested and 19 of them caused a significant reduction of the DsRED/GFP ratio under dehydration-stress conditions.

For a better comparison with field data some additional analyses were made. One of those analyses was the measurement of the relative water content (RWC) of leaves during desiccation. The RWC of stressed leaves was reduced to ~60% compared to control, which means that the parameter used were more stringent and corresponded to severe drought under field conditions.

With the presented work I was able to demonstrate the reliable functional testing of candidate genes under dehydration stress conditions in barley. Therefore the RNAi based assay might also be applicable for investigation of further abiotic stresses such as cold or salt stress and presented hence a powerful reverse genetics tool.

8. Danksagung

Ich möchte mich als erstes bei Prof. Dr. Klaus Humbeck für die Bereitschaft bedanken, meine Arbeit zu begutachten und als betreuender Hochschullehrer das Prüfungsverfahren zu begleiten. In diesem Sinne danke ich ebenfalls Herrn Priv.-Doz. Dr. habil. Andreas Börner, der mich während meiner Zeit am IPK als Co-Mentor unterstützt hat und ebenfalls bereit war meine Arbeit zu begutachten.

Ich möchte mich hiermit aber vor allem bei den Mitarbeitern und Kollegen der Arbeitsgruppe « Transkriptomanalyse », die einen positiven Einfluss auf meine Arbeit hatten, ganz herzlich bedanken.

Besonderer Dank gilt dabei Dr. habil. Patrick Schweizer, der mir die Möglichkeit gab diese Arbeit anfertigen zu können. Als begleitender Mentor bin ich ihm dankbar für seine zahlreichen wertvollen Anregungen, Diskussionen und Hilfestellungen zu auftauchenden Problemen. Ich möchte Ihm vor allem auch für das Korrekturlesen meiner Arbeit und die dafür aufgebrauchte Zeit danken.

Ich möchte mich ebenfalls bei den technischen Assistentinnen Gaby, Manuela und Stefanie als erstes für die angenehme und oftmals lustige Atmosphäre bedanken und darüber hinaus für die sehr gute Unterstützung bei der technischen Umsetzung und Vermittlung des « Know-hows » während der Arbeit. Des Weiteren danke ich Gaby im Speziellen für die Bereitschaft der Weiterführung der Experimente nach Beendigung meiner Arbeit.

Ich möchte auch die exzellente Mitarbeit von Karin hervorheben, die während Ihrer Ausbildung mich bei der Klonierung unterstützt hat und stets daran interessiert war Neues zu lernen.

Nicht vergessen möchte ich auch alle Co-Doktoranden der Arbeitsgruppe, Doreen, Annika, Daniela, Ernst und Luo mit denen ich sehr viel Spaß hatte und die mich mit anregenden Diskussionen und manchmal außergewöhnlichen Sichtweisen auf verschiedene Problemstellungen während der gesamten Promotion begleiteten.

Abschließend möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung des Projektes bei allen Kostenträgern (Land Sachsen-Anhalt; BMBF; IPK) bedanken, die dieses Projekt erst möglich machten.

9. Curriculum Vitae

Persönliche Daten :

Name : Stephan Marzin
Geburtsdatum : 23. Februar 1979
Geburtsort : Wernigerode
Geschlecht : männlich
Familienstand : ledig, keine Kinder
Staatsangehörigkeit : Deutsch

Ausbildung und beruflicher Werdegang :

- 1985 - 1991 Besuch der Grundschule «Martin-Luther» in Blankenburg(Harz), Sachsen Anhalt
- 1991 - 1997 Gymnasium «Am Thie» in Blankenburg(Harz), Sachsen Anhalt
Abschluss : Allgemeine Hochschulreife
- 1997 - 1998 Wehrdienst im Panzergrenadierbataillon 212 in Augustdorf, Nordrhein-Westfalen
- 1998 - 2002 Grundstudium der Biologie an der FSU Jena, Thüringen
- 2002 - 2005 Hauptstudium der Biologie an der FSU Jena, Thüringen
Hauptfach : Mikrobiologie; Nebenfächer : Biochemie und Genetik
Abschluss : Diplombiologe mit der Abschlussnote «gut»
- 2004 - 2005 Diplomarbeit an der FSU, am Pilzreferenzzentrum Jena bei Prof. Dr. J. Wöstemeyer mit dem Thema : Charakterisierung einer Adenin-auxotrophen Mutante des Zygomyceten *Parasitella parasitica* und Entwicklung eines Transformationsprotokolls zur Bildung stabiler integrativer Transformanten.
- 2005 - 2009 Doktorarbeit am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben, in der Arbeitsgruppe «Transkriptomanalyse» unter der Betreuung von Dr. habil. P. Schweizer mit dem Thema : Entwicklung einer RNAi-basierten Screeningmethode zur Charakterisierung der Trockenstressantwort bei Gerste (*Hordeum vulgare* L.).

seit 2010 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Leibniz-Institut für Pflanzen-
genetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben, in der
Arbeitsgruppe «Gen- und Genomkartierung»

Publikation :

Marzin S, Mihaly R, Pauk J and Schweizer P. 2008.

A transient assay system for the assessment of cell-autonomous gene function
in dehydration-stressed barley.

Journal of Experimental Botany 59(12): 3359-3369

Poster :

Transient-induced gene silencing as a tool for elucidation of genes involved in
dehydration tolerance.

2nd Workshop, TritiGen COST action FA0604: Triticeae genomics for the
advancement of essential European crops; Albena, Bulgarien, September 2008

7. Plant Genomics European Meeting; Albena, Bulgarien, September 2008

10. Erklärung

Gemäß §5 Abs. 2 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vom 03.02.2004 erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe und die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel habe ich dabei nicht verwendet. Die wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen benutzter Werke sind als solche explizit kenntlich gemacht.

Gatersleben, April 2010