

DNA-Array-Technologie:

**Entwicklung von DNA-Arrays mit 13.000 cDNA-Klonen des
Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* und Anwendung in der
Genexpressionsanalyse pflanzlicher Pathogenabwehr**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

"Doktor der Naturwissenschaften"

dem Fachbereich Chemie und Pharmazie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Marcel Scheideler

geboren in Essen

Mainz 2000

Prüfungstermin:

06. Februar 2001

Diese Arbeit wurde von März 1996 bis August 2000 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Dose am Institut für Biochemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz und am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. J. D. Hoheisel durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bei Herrn Prof. Dr. K. Dose für die ausgezeichnete Betreuung und hilfreiche Unterstützung meiner Promotionsarbeit bedanken.

Mein herzlichster Dank gilt ebenso Herrn Dr. J. D. Hoheisel für die hervorragende Zusammenarbeit, sein außerordentlich großes Engagement für die Durchführung und das Gelingen dieser Arbeit. Dazu gehörte die Ermöglichung von nationalen und internationalen Gastaufenthalten im Rahmen des 'Plant Plasma Membrane Database' Projektes und weiterer Kooperationen.

Für die technische Unterstützung bei den zahlreichen Hybridisierungsexperimenten möchte ich mich ganz besonders bei Yvonne Reile, Marita Schrenk, Michael Eichler und Jürgen Bastian bedanken. Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die positive Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima.

Bei Herrn Dr. N. Schlaich der RWTH Aachen möchte ich mich für die ausgezeichnete und sehr aktive Kooperation sowie für das Probenmaterial zur Untersuchung der Pathogenantwort bedanken. Frau Dr. A. Krapp des Botanischen Instituts der Universität Heidelberg gilt mein Dank für viele praktische und hilfreiche Ratschläge. Im Rahmen des 'Plant Plasma Membrane Database' Projektes möchte ich mich für die gute Kooperation und die Bereitstellung weiterer pflanzlicher Gewebeproben bei Herrn Dr. P. Dupree der University of Cambridge in Cambridge, England, bei Herrn Dr. M. Rossignol und Herrn Dr. P. Dumas von INRA in Montpellier, Frankreich, und bei Dr. K. Palme vom MPI für Züchtungsforschung in Köln bedanken.

Inhaltsverzeichnis

I.	EINLEITUNG	1
1.1	Einführung	1
1.2	Genomanalyse	2
1.2.1	Strukturelle Genomanalyse	3
1.2.2	Funktionelle Genomanalyse	5
1.3	DNA-Array Technologie	9
1.3.1	Grundlagen und Prinzip	9
1.3.2	Integrierte Systemkomponenten der DNA-Array-Technologie	11
1.3.3	Anwendungsgebiete	16
1.4	Befall von Pflanzen durch Pathogene	18
1.4.1	Krankheitserreger bei Pflanzen	18
1.4.2	Wirt-Parasit-Interaktion	19
1.5	Konstitutive Abwehrmechanismen von Pflanzen	20
1.5.1	Strukturresistenz	20
1.5.2	Abwehrtoxine	21
1.6	Induzierte Abwehrmechanismen von Pflanzen	23
1.6.1	Frühe Phase der pflanzlichen Pathogenantwort	24
1.6.1.1	Allgemeine Pathogenerkennung	24
1.6.1.2	Spezifische Pathogenerkennung	24
1.6.1.3	Änderungen des Membranpotentials, Ionenströme und Phosphorylierungen	26
1.6.2	Mittlere Phase der pflanzlichen Pathogenantwort	27
1.6.2.1	Induktion endogener Sekundärsignale	27
1.6.2.2	"Oxidative Burst"	30
1.6.2.3	Transkriptionelle Aktivierungen im Shikimat- und Phenylpropanoid- Syntheseweg	31
1.6.3	Späte Phase der pflanzlichen Pathogenantwort	34
1.6.3.1	Hypersensitive Reaktion	34
1.6.3.2	Phytoalexinsynthese	35

1.6.3.3	Induktion von PR-Proteinen	36
1.6.3.4	Induzierte Genexpression der Glutathion-S-Transferasen	37
1.6.3.5	Lignifizierung	37
1.6.3.6	Kohlenhydrateinlagerung	38
1.6.4	Systemische Resistenz	39
1.7	Modellorganismus <i>Arabidopsis thaliana</i> als Untersuchungsobjekt	40
1.8	Aufgabenstellung	44
II.	MATERIAL UND METHODEN	45
2.1	Material	45
2.1.1	Chemikalien	45
2.1.2	Enzyme	46
2.1.3	Anzuchtmedien und Pufferlösungen	46
2.1.4	Materialien	51
2.1.5	Geräte und Hilfsmittel	52
2.1.6	Software	52
2.1.7	Die Pflanze <i>Arabidopsis thaliana</i>	53
2.1.8	cDNA-Bibliothek von <i>Arabidopsis thaliana</i>	53
2.2	Methoden	54
2.2.1	Anzucht und Replikation der cDNA-Klon-Bibliothek	54
2.2.2	PCR-Amplifikation von cDNA- und genomischen Sequenzen	55
2.2.2.1	Herstellung der <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	56
2.2.2.2	PCR-Amplifikation in 96er Mikrotiterplatten	57
2.2.2.3	PCR-Amplifikation in 384er Mikrotiterplatten	58
2.2.2.4	PCR-Amplifikation heterologer Kontrollsequenzen	59
2.2.2.5	Nachweis der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese	60
2.2.3	Produktion genomischer <i>Arabidopsis</i> -Arrays	60
2.2.3.1	Der Roboter "Biogridder"	60
2.2.3.2	Spotraster und Orientierung im genomischen <i>Arabidopsis</i> -Array	62
2.2.3.3	Herstellung von DNA-Arrays auf Nylonmembranen	64
2.2.3.4	Herstellung von DNA-Arrays auf Polypropylenmembranen	64
2.2.3.5	DNA-Fixierung auf Membranen	65
2.2.3.6	Bestimmung der Menge an membrangebundenem PCR-Produkt	65
2.2.4	Herstellung von Northern Blots	67

2.2.5 Herstellung neuer Vektorkonstrukte für die <i>in vitro</i> Transkription	67
2.2.5.1 Herstellung des doppelsträngigen DNA-Fragments poly (A-T) ₅₀	67
2.2.5.2 Heterologe Sequenzen zum Genom von <i>Arabidopsis thaliana</i>	68
2.2.5.3 Restriktionsverdau	69
2.2.5.4 Dephosphorylierung	70
2.2.5.5 Ligation	70
2.2.5.6 Transformation	70
2.2.5.7 Plasmidpräparation	71
2.2.5.8 <i>In vitro</i> Transkription	71
2.2.6 Gewebeproben der Pflanze <i>Arabidopsis thaliana</i>	72
2.2.7 Isolation von genomischer DNA aus Pflanzen	74
2.2.8 Isolation von Gesamt-RNA aus Pflanzen	74
2.2.9 Herstellung von DNA-Sonden für Hybridisierungen	76
2.2.9.1 Markierung von DNA-Oligonucleotiden durch 5'-OH-Phosphorylierung	76
2.2.9.2 Markierung von DNA-Sonden durch 'Random Hexamer Priming'	76
2.2.9.3 Markierung von cDNA durch reverse Transkription von RNA	77
2.2.9.4 Bestimmung der Einbaurate von Radionucliden	77
2.2.9.5 Längenbestimmung radioaktiv markierter, einzelsträngiger cDNA	78
2.2.10 Hybridisierungen	79
2.2.10.1 Hybridisierung von DNA-Oligonucleotiden	79
2.2.10.2 Hybridisierung von DNA-Sonden ab einer Länge von 100 Bp	79
2.2.10.3 Exposition der DNA-Arrays	79
2.2.10.4 Bilderstellung am Phosphor-/Fluoroimager Storm 860	80
2.2.10.5 Regeneration der DNA-Arrays	81
2.2.11 Spot- und Hintergrunddetektion zur Erstellung eines komplexen Transkriptionsprofils	81
2.2.12 Vergleich und Analyse komplexer Transkriptionsprofile	84
2.2.12.1 Normalisierung komplexer Transkriptionsprofile	84
2.2.12.2 Datenanalyse mit bildanalytischen und statistischen Methoden	84
2.2.12.3 Datenanalyse im biologisch-funktionellem Ansatz	86
2.2.13 Fehlerbetrachtung	87
III. ERGEBNISSE	89
3.1. DNA-Arrays	89
3.1.1 PCR-Amplifikation von 13.800 cDNA-Klonen	89
3.1.2 Optimierung der DNA-Array-Herstellung	90

3.1.3	Fixierung der DNA auf Nylonmembranen	91
3.1.4	Vergleich der Fluoreszenzhybridisierung auf Nylon- und Polypropylenmembran	93
3.1.5	Vergleich radioaktiv- und fluoreszenzmarkierter Hybridisierung auf Membranen	95
3.1.6	Einfluß der Expositionszeit	96
3.1.7	Bestimmung der Menge an membrangebundenem PCR-Produkt	97
3.2.	Qualitätssicherung komplexer Transkriptionsprofile	98
3.2.1.	Kontrolle der Array-Produktion durch Oligonucleotid-Hybridisierung	99
3.2.2.	Kontrolle der RNA-Qualität	100
3.2.3.	Kontrolle der cDNA-Länge der Sonde	100
3.2.4.	Kontrolle der Einbaurate	101
3.2.5.	Vergleich von Primär- und Sekundärspot	101
3.3	Qualitätssicherung beim Vergleich komplexer Transkriptionsprofile	102
3.3.1	Limit der detektierbaren differentiellen Transkription	103
3.3.2	Reproduzierbarkeit von Hybridisierungen	103
3.3.3	Vergleichende Hybridisierung auf Northern Blot und DNA-Array	104
3.3.4	Zusammenfassende Übersicht zum genomischen <i>Arabidopsis</i> -Array	105
3.4	Diverse Arten von Ankerpunkten für die Bestimmung der differentiellen Transkription beim Vergleich komplexer Transkriptionsprofile	106
3.4.1	Statistische Auswahl von Genen als Ankerpunkt	107
3.4.2	Konstitutiv transkribierte Gene von <i>Arabidopsis thaliana</i>	108
3.4.3	Heterologe Kontrollsequenzen	109
3.4.3.1	Bestimmung heterologer Kontrollsequenzen	109
3.4.3.2	Herstellung heterologer mRNA-Kontrollen	110
3.4.4	Anwendung und vergleichende Analyse der verschiedenen Arten von Ankerpunkte	113
3.5	Analyse der differentiellen Genregulation von <i>Arabidopsis thaliana</i> während der Abwehr des avirulenten Pathogens <i>Pseudomonas syringae</i>	115
3.5.1	Hypersensitive Reaktion als makroskopischer Marker der pflanzlichen induzierten Pathogenabwehr	115
3.5.2	Strategie zur Analyse der pflanzlichen Pathogenabwehr	116
3.5.3	Vergleich komplexer Transkriptionsprofile für die Analyse der induzierten Pathogenabwehr	117

3.5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zur differentiellen Genregulation verschiedener Stoffwechselwege als pathogen-induzierte Antwort der Pflanze <i>A. thaliana</i>	120
IV. DISKUSSION	127
4.1 Diskussion der Methoden	127
4.1.1 cDNA-Bibliothek der Pflanze <i>Arabidopsis thaliana</i> als Resource zur Herstellung genomischer DNA-Arrays	127
4.1.2 PCR-Amplifikation von cDNA-Insertionen im Hochdurchsatz für die Herstellung von DNA-Arrays	128
4.1.3 Herstellung genomischer <i>Arabidopsis</i> -Arrays	130
4.1.4 Northern Blot: eine Technik zur Analyse der Genexpression	130
4.1.5 Molekularbiologische Herstellung heterologer mRNA-Kontrollen als externer Standard	131
4.1.6 Gewebeproben der Pflanze <i>Arabidopsis thaliana</i>	135
4.1.7 Isolation von DNA aus der Pflanze <i>Arabidopsis thaliana</i>	135
4.1.8 Isolation von RNA aus der Pflanze <i>Arabidopsis thaliana</i>	136
4.1.9 Herstellung von DNA-Sonden für die Hybridisierung auf DNA-Arrays	138
4.1.10 Hybridisierungen, Exposition und Regeneration der genomischen <i>Arabidopsis</i> -Arrays	139
4.1.11 Spot- und Hintergrunddetektion auf hybridisierten DNA-Arrays	140
4.1.12 Analyse und Vergleich komplexer Transkriptionsprofile	141
4.2 Diskussion der Ergebnisse	143
4.2.1 Der genomische <i>Arabidopsis</i> -Array der Pflanze <i>Arabidopsis thaliana</i> : Herstellung und Signaldetektion	143
4.2.2 Einfluß der DNA-Array-Systemkomponenten auf die Qualität komplexer Transkriptionsprofile	146
4.2.3 Diskussion der Qualitätskontrollen beim Vergleich komplexer Transkriptionsprofile	148
4.2.4 Diskussion der Ankerpunkte für die Bestimmung des differentiellen Transkriptionsfaktors	150
4.2.5 Diskussion der differentiellen Genregulation verschiedener Stoffwechselwege in <i>Arabidopsis thaliana</i> während der Pathogenabwehr von <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	153

4.2.5.1	Transkriptionelle Induktion von Genen der frühen Phase der pflanzlichen Pathogenantwort	154
4.2.5.2	Transkriptionelle Aktivierung von Genen verschiedener Stoffwechselwege während der pflanzlichen Pathogenantwort	155
4.3	Schlußfolgerung	162
V.	ZUSAMMENFASSUNG	163
VI.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	164
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	166
VIII.	PUBLIKATIONSLISTE	179

I. Einleitung

1.1 Einführung

Im 20. Jahrhundert wurden die Grundlagen für den Aufbruch ins Zeitalter der Genomforschung gelegt. Oswald Avery, Colin MacLeod und MacLyn McCarty lieferten 1944 mit ihren Transformationsversuchen den Beweis für Desoxyribonucleinsäure (DNA) als den Träger der Erbinformation (**Avery, MacLeod und McCarty 1944**). Ein Meilenstein war die Aufklärung der molekularen Struktur der DNA von James Watson und Francis Crick im Jahr 1953, der durch Vorarbeiten von Erwin Chargaff und Rosalind Franklin möglich wurde (**Watson und Crick 1953**).

Mit der Verfügbarkeit molekularer Werkzeuge und der Entwicklung von gentechnischen Methoden begann die Molekularbiologie. Dazu gehörte im Jahre 1970 die Isolierung der ersten Restriktionsendonuclease (**Smith und Wilcox 1970**). Im gleichen Jahr synthetisierten Khorana und Mitarbeiter zum ersten Mal ein vollständiges tRNA-Gen (**Agarwal et al. 1970**). Im Jahre 1973 führten Boyer und Cohen die DNA-Rekombinationstechnik ein (**Cohen et al. 1973**). Nur wenige Jahre später entwickelten erstmals Allan Maxam und Walter Gilbert sowie Frederick Sanger unabhängig voneinander Techniken zur Bestimmung der DNA-Sequenz (**Maxam und Gilbert 1977, Sanger et al. 1977**).

Mit Hilfe der DNA-Rekombinationstechnik gelang im Jahr 1979 der Biotechnologiefirma Genentech ein zukunftsweisender Durchbruch mit der Produktion von humanem Insulin in *E. coli*-Bakterien. Dies war für die damalige Zeit eine technische Meisterleistung, die ein Jahrzehnt zuvor noch für unmöglich gehalten wurde, nach heutigem Stand der Gentechnik jedoch als Alltäglichkeit betrachtet wird. Diese Errungenschaft wurde damals wohl auch zum ersten Mal durch einen überragenden Erfolg an der Börse begleitet (**Goeddel et al. 1979, Glick und Pasternak 1995**).

Im Jahr 1981 wurde die erste automatisierte DNA-Synthesemaschine in den Markt eingeführt (**Alvarado-Urbina et al. 1981**). Zwei Jahre später wurden für die Transformation von Pflanzen erstmals gentechnisch veränderte Ti-Plasmide eingesetzt (**Fraley et al. 1983**). Ein weiterer Meilenstein in der Geschichte der molekularen Biotechnologie war die von Kary Mullis im Jahr

1985 entwickelte Polymerase-Kettenreaktion, häufig als PCR ("polymerase chain reaction") bezeichnet. Sie ermöglicht es, geringste DNA-Mengen zu amplifizieren und somit vielen Anwendungen überhaupt erst zugänglich zu machen (**Saiki et al. 1985, Saiki et al. 1988, Mullis 1990**). Im Jahr 1986 folgte die von Leroy Hood und Wilhelm Ansorge entwickelte, erste automatische DNA-Sequenzierung, ein wichtiger Grundstein für Genomprojekte (**Ansorge et al. 1986, Smith et al. 1986**). Im Jahr 1990 wurden das internationale Humangenomprojekt 'HUGO' ("Human Genome Organisation") als auch das Genomprojekt für die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* ins Leben gerufen.

Das Grundprinzip der DNA-Array-Technologie wurde erstmals vorgestellt, als vier Forschergruppen unabhängig voneinander das Konzept der DNA-Sequenzierung durch Hybridisierung auf DNA-Oligonucleotid-Arrays entwickelten, auch kurz SBH ("sequencing by hybridisation") genannt (**Khrapko et al. 1989, Drmanac et al. 1989, Bains und Smith 1988, Southern et al. 1992**). Ein technologischer Durchbruch auf diesem Gebiet war zum einen die kombinatorische Synthesestrategie von Stephen Fodor zur Herstellung von DNA-Oligonucleotid-Arrays mit photolabilen Schutzgruppen (**Fodor et al. 1991**). Zum anderen trug dazu die Entwicklung und Anwendung von Robotern bei, die mit hoher Präzision Proben auf einem festen Träger in hoher Dichte anordnen. Dies ebnete auch cDNAs den Weg zur DNA-Array-Technologie (**Lennon und Lehrach 1991**). Erst mit der Zeit wurde das Potential der DNA-Array-Technologie immer klarer und die technischen Barrieren des Projektes 'SBH' offensichtlicher, so daß die DNA-Array-Technologie zunächst Anwendung in der parallelen Analyse der Genexpression fand (**Augenlicht et al. 1991, Schena et al. 1995**).

1.2 Genomanalyse

Die Entwicklungen auf dem Gebiet der DNA-Sequenzierung und Genexpressionsanalyse läuteten zum Ende des 20. Jahrhunderts die Ära der Genomforschung ein. Das Prinzip der Genomforschung basiert auf der Kombination einer hochparallelen und genomweiten Analyse, die den Fokus von der individuellen Genanalyse zur globalen Genomanalyse verlagert (**Michelson 2000**). Dabei werden zwei Phasen der Genomanalyse unterschieden: die frühe Phase der "**strukturellen Genomanalyse**" untersucht die Genomstruktur auf Sequenzebene und ebnet damit den Weg für die neue Phase der "**funktionellen Genomanalyse**", die die Funktion der Gene fokussiert (**Hieter und Boguski 1997**).

1.2.1 Strukturelle Genomanalyse

Man kann das letzte Jahrzehnt des 20. Jahrhunderts mit den Entwicklungen, die auf dem Gebiet der DNA-Sequenzierung in den letzten Jahren mit enormer Geschwindigkeit vorangingen, als die erste Phase der Ära der Genomforschung bezeichnen **(Lee und Lee 2000)**. Der technologische Fortschritt auf dem Gebiet der DNA-Sequenzierung, der besonders durch die Automatisierung von Ansorge und Hood im Jahr 1986 angestoßen wurde, erlaubte den Ausbau der DNA-Sequenzierung zu einer Hochdurchsatztechnik im genomweiten Maßstab. Dabei sind zwei Ansätze der DNA-Sequenzierung zu unterscheiden: die cDNA-Sequenzierung und die genomische Sequenzierung.

Bei vielen Organismen codiert nur ein kleiner Teil des Genoms für Proteine, der Rest hat, wenn überhaupt, eine bisher unbekannte Funktion. Wenn also eine Zelle Proteine herstellt, wird nur ein kleiner Teil der gesamten, nucleären DNA dazu verwendet, die benötigte Information in mRNA umzuschreiben. Diese mRNA-Kopie wird dann in Protein übersetzt. Nach Isolierung der mRNA aus dem Gewebe kann diese mit Hilfe des Enzyms "Reverse Transkriptase" wieder in komplementäre DNA, sogenannte cDNA ("complementary DNA"), umgeschrieben werden. Diese cDNA-Moleküle werden in Vektoren ligiert und in *E. coli*-Bakterien transformiert. Diese transgenen cDNA-Klone werden voneinander getrennt und aufbewahrt. Die Gewinnung von cDNAs aus verschiedenen Geweben, zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien und unter verschiedenen Bedingungen erlaubt es, eine cDNA-Bibliothek zu erstellen, die fast alle codierenden DNA-Abschnitte eines Organismus repräsentiert **(Grausz und Auffray 1993, Dresselhaus et al. 1994)**. Da diese cDNAs nur codierende Bereiche beinhalten, erhält man durch deren Ansequenzierung entsprechende exprimierte 5' oder 3'-Teilsequenzen, auch ESTs genannt ("expressed sequence tag"). Dies nutzten zum Beispiel Craig Venter beim Menschen sowie Thomas Newman und Herman Höfte bei der Pflanze *Arabidopsis thaliana* zur cDNA-Sequenzierung im großen Maßstab, um schnell einen Großteil aller Gene zu identifizieren **(Adams et al. 1993, Höfte et al. 1993, Newman et al. 1994, Rounsley et al. 1996)**.

Mit dem weiteren technischen Fortschritt der parallelen DNA-Sequenzierung rückte auch die Möglichkeit der Sequenzierung ganzer Genome in greifbare Nähe. Und so wurden erstmals im letzten Jahrzehnt des 20. Jahrhunderts Genomprojekte von Modellorganismen als langfristige Forschungsziele formuliert. Im Jahr 1990 wurde das 'Humangenomprojekt' durch Gründung von HUGO offiziell aus der Taufe gehoben. Auch die Pflanzenforschung trat im gleichen Jahr mit

der Bekanntgabe des Genomprojekts zur Sequenzierung von *Arabidopsis thaliana* in die Genomforschung ein. Craig Venter verfolgte zuerst das Ziel, mit einer gut organisierten Sequenziereinheit über Kapazitäten zu verfügen, um in naher Zukunft ganze Bakteriengenome zu sequenzieren, und gründete im Jahr 1992 zu diesem Zweck "The Institute for Genome Research" (TIGR, Rockville, MD, USA). Weitere Genomprojekte zu Modellorganismen wie der Hefepilz *Saccharomyces cerevisiae*, das Bakterium *E. coli*, der Nematode *Caenorhabditis elegans* und die Taufliege *Drosophila melanogaster* folgten (**Nitcholl 1995**).

Im Jahr 1995 war es soweit, TIGR präsentierte die erste komplette Sequenz eines freilebenden Organismus, *Haemophilus influenzae*, mit einer Größe von 1,83 Mb (**Fleischmann et al. 1995**). Im Jahre 1997 folgte die Sequenz des Genoms der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* mit 13 Mb (**Goffeau et al. 1997**). Mittlerweile liegt die vollständige Genomsequenz von weiteren 23 Mikroorganismen vor (**Loferer et al. 2000, Niermann et al. 2000**).

Für die Genomsequenzierung der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* wurde im Jahr 1996 die "Arabidopsis Genome Initiative" (AGI) gegründet (**Bevan et al. 1997**). Als Ergebnis liegen seit Ende 1999 die Sequenzen der Chromosomen 2 und 4 vollständig vor (**Lin et al. 1999, Mayer et al. 1999**). Und schon Ende des Jahres 2000 wird das Genom der Pflanze *Arabidopsis thaliana* mit 130 Mb komplett sequenziert sein, d.h. drei Jahre früher als geplant (**Kaiser 2000**).

Beim Modellorganismus 'Mensch' wurden die Anstrengungen des Humanen Genomprojektes HUGO noch zusätzlich angetrieben durch die im Jahr 1998 entstandene Konkurrenz durch Craig Venter, der in Kooperation mit Perkin Elmer die Biotechnologiefirma Celera Genomics Inc. (Rockville, Maryland, USA) gründete. Dies führte dazu, daß HUGO und Celera Genomics am 26. Juni 2000 gemeinsam verkündeten, daß die Sequenz des menschlichen Genoms zu 85 % vorliegt, entsprechend ca. 2.550 Mb. Damit hat das Humane Genomprojekt seine eigenen Erwartungen über den Abschluß der Sequenzierung des menschlichen Genoms bis zum Jahr 2005 sogar übertroffen (**Pennisi 2000**).

Die erste Phase der Genomforschung, initiiert durch das Human- und das Pflanzengenomprojekt, kann mit dem Ergebnis der routinemäßigen Sequenzierung mit hohem Durchsatz ganzer Genome für abgeschlossen erklärt werden. Die Genomforschung entwickelt sich dahin, die Biologie mit einem Äquivalent, wie es in der Chemie das Periodensystem der Elemente darstellt, zu versorgen: einer Bestandsliste an Genen, aus denen sich das Leben zusammensetzt. Damit

gelangt die Biologie an den Punkt, an dem die Chemie zu Beginn des 20. Jahrhunderts stand (**Lander 1999**).

1.2.2 Funktionelle Genomanalyse

In der zweiten Phase der Genomforschung, der "**funktionellen Genomanalyse**", werden die Gene in Bezug auf ihre regulatorischen Funktionen untersucht. Bei der parallelen Analyse des genregulatorischen Netzwerks ganzer biologischer Systeme kann die Funktion eines Gens aus verschiedenen Blickwinkeln betrachtet werden: die biochemische Funktion eines einzelnen Gens in Form der Proteinfunktion, die zelluläre Funktion innerhalb einer Signaltransduktionskaskade und eines Stoffwechselweges, die entwicklungsbiologische Funktion der Musterbildung in bestimmten Entwicklungsstadien und die adaptive Funktion als Antwort auf Änderungen in der Umgebung (**Bouchez und Höfte 1998**).

Eine Grundlage für die Bestimmung der Funktion von Genen stellt ihre Sequenz dar. Die Sequenzierung von ESTs als auch ganzer Genome erlaubt es, eine mögliche biochemische Funktion vielen Genen durch Sequenzvergleich zuzuschreiben, denn ca. 50 % aller neu sequenzierten Gene weisen Sequenzhomologien zu bereits beschriebenen Genen auch anderer Organismen auf (**Bouchez und Höfte 1998, Somerville und Somerville 1999**).

Die Flut von Sequenzdaten im genomischen Maßstab allein kann jedoch keine Auskunft darüber geben, welche biologischen Prozesse über die Regulation bestimmter Gene kontrolliert werden. Techniken zur parallelen Bestimmung der Genexpression auf der Ebene der Transkription und Translation für eine große Anzahl an Genen können Informationen über räumliche und zeitliche Expressionsmuster liefern und damit in neuer Form wesentlich zur Aufklärung der biologischen Funktion von Genen beitragen (**Bouchez und Höfte 1998**). Die quantitative Analyse der Genexpression und damit die Stoffwechselregulation ist heute eine der interessantesten Fragen, die in der Biochemie untersucht werden (**Stryer 1991**).

Methoden, die dafür bisher zur Verfügung standen, sind "**Northern Blot**" und "**Reportergene**". Beim "**Northern Blot**" wird RNA aus Gewebe isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf einer Membran immobilisiert. Diese RNA kann dann auf die Existenz bestimmter transkribierter Sequenzen qualitativ und quantitativ untersucht werden (**Alwine et al. 1977, White und**

Bancroft 1982). "**Reportergene**" werden durch chimäre Gene von Promotor und Reporter hergestellt und in die zu untersuchenden Zellen transformiert. In Abhängigkeit von der Regulation des Promotors wird das Reportergen exprimiert. Als Marker der Genexpression und Proteinlokalisierung *in vivo* finden Reportergene, wie das GFP-Gen ("green fluorescent protein"), die β -Glucuronidase (GUS), β -Galactosidase (LacZ), Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) und Luciferase (LUC), eine breite Anwendung (**Sheen et al. 1995**). Beide Techniken sind jedoch nicht dazu geeignet, mehrere tausend Gene parallel auf ihre Regulation zu analysieren.

Die zweite Phase der Genomforschung, der "**funktionellen Genomanalyse**", erfordert die Entwicklung effizienter Techniken, um die Expression mehrerer tausend Gene parallel zu identifizieren. Dies ist nicht nur eine Frage der Entwicklung neuer Softwarepakete, um die Sequenzdaten handhaben zu können, sondern vor allem eine Suche nach neuen Methoden, die es erlauben, über die Sequenzdaten hinaus die Biologie eines Organismus zu verstehen. Diese werden es ermöglichen, Gene nicht nur individuell zu analysieren, sondern auch das genregulatorische Netzwerk ganzer biologischer Systeme zu erfassen (**Hieter und Boguski 1997, Nierman et al. 2000**).

Für die genomweite und hochparallele Genexpressionsanalyse haben sich während des letzten Jahrzehnts neue Methoden etabliert. Die Abbildung 1.1 gibt eine Übersicht über die in der strukturellen und funktionellen Genomanalyse entwickelten Hochdurchsatztechniken.

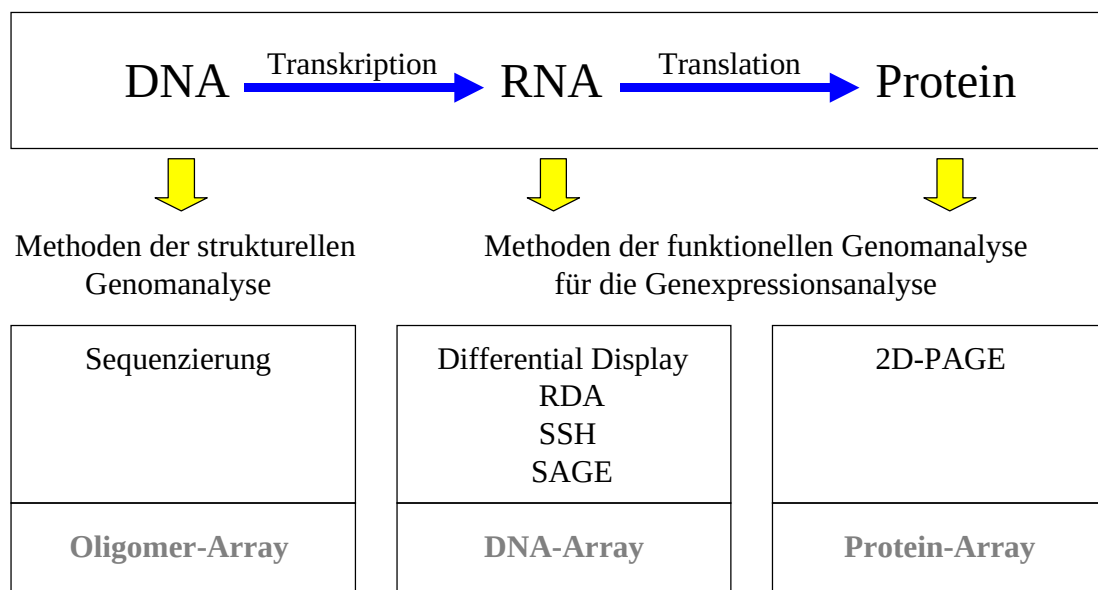


Abb. 1.1: Übersicht über Methoden der strukturellen und funktionellen Genomanalyse. In allen Bereichen der Genomanalyse finden Arrays Verwendung. Arrays sind miniaturisierte, in hoher Zahl auf einem festen Träger gebundene Proben wie Nucleinsäuren und Peptide.

Aufgrund der Tatsache, daß die Nucleinsäuren RNA und DNA wegen ihrer ähnlichen physikalischen Eigenschaften in ihrer Gesamtheit wesentlich leichter zugänglich sind als Proteine, sind bisher mehr Techniken zur Genexpressionsanalyse auf Transkriptionsebene entwickelt worden. Dazu zählt die Methode "**Differential Display**" sowie die subtraktiven Methoden "**RDA**", "**SSH**", "**SAGE**" und "**DNA-Arrays**".

"**Differential Display**", auch bekannt als "RNA Fingerprinting", geht von einer mRNA-Population aus, von der cDNAs hergestellt, amplifiziert und im Polyacrylamidgel längenabhängig aufgetrennt werden. Die Bestimmung der differentiellen Genexpression erfolgt dabei indirekt über die Signalintensität der Bande (**Liang und Pardee 1992, Welsh et al. 1992, Carulli et al. 1998**).

"**RDA**" ("representational difference analysis") basiert auf einer durch Restriktionsverdau und PCR-Amplifikation erstellten Repräsentation von cDNA-Fragmenten, die ursprünglich aus mRNA hergestellt wurden. In aufeinanderfolgenden, subtraktiven Hybridisierungen zweier Repräsentationen, gefolgt von einer differentiellen PCR-Amplifikation, findet eine progressive Anreicherung von cDNA-Fragmenten statt, die differentiell exprimiert sind. Diese subtraktiven RDA-Produkte können anschließend kloniert und sequenziert werden (**Lisitsyn et al. 1993, Hubank und Schatz 1994, Geng et al. 1998**).

"**SSH**" ("suppressive subtractive hybridization") basiert auf einer spezifischen Form der PCR, die eine exponentielle Amplifikation von cDNAs erlaubt, die in zwei mRNA-Populationen differentiell exprimiert sind. Dabei wird gleichzeitig die Amplifikation von Sequenzen gleicher Häufigkeit unterdrückt (**Diatchenko et al. 1996**). Die subtraktiven Methoden für sich können allerdings nur qualitative, aber keine quantitativen Daten der differentiellen Genexpression liefern. Quantitative Daten lassen sich bisher nur in Kombination mit der DNA-Array-Technologie generieren (**von Stein et al. 1997, Welford et al. 1998, Yang et al. 1999**).

"**SAGE**" ("serial analysis of gene expression") stellt eine weitere Methode zur parallelen Analyse der Transkription dar. Sie entwickelte sich als eine logische Konsequenz aus der EST-Sequenzierung, bei der eine Bestandsliste von Transkripten auf der Basis sehr kurzer cDNA-Sequenzabschnitte von 9 bis 11 Basenpaaren etabliert wird. Diese Sequenzen vom 3'-Ende der mRNA-Moleküle werden vor der Sequenzierung miteinander verknüpft und kloniert. Die Expressionsmuster für verschiedene Gene werden durch die Häufigkeit individueller

Sequenzabschnitte reflektiert (**Velculescu et al. 1995 und 1997, Polyak et al. 1997**). Die SAGE-Technik hat das Potential einer Hochdurchsatztechnik, aber ein Nachteil ist noch immer der hohe technische Aufwand für die Herstellung von SAGE-Bibliotheken von guter Qualität und die Datenanalyse (**Carulli et al. 1998**).

Die "**DNA-Array-Technologie**" erweist sich als vielversprechende Methode zur Analyse der Genexpression, da sie aufgrund ihres Potentials für die hochparallele Analyse, die Miniaturisierung und Automatisierung im Fokus der funktionellen Genomanalyse steht. Auf sie wird im nächsten Kapitel näher eingegangen (**Bouchez und Höfte 1998, Hauser et al. 1999**).

Auf der Ebene der Translation wurden die Methoden "**2D-PAGE**" und "**Protein-Arrays**" entwickelt. Zur Zeit ist für die parallele Analyse der Proteinexpression "**2D-PAGE**" ("2-dimensional polyacrylamid gel electrophoresis") die Methode der Wahl (**Humphery-Smith und Blackstock 1997**). Datenbanken für Proteindaten werden aufgebaut, die nicht nur das Auftreten von Proteinen und ihre posttranslationalen Modifikationen beinhalten, sondern auch die intrazelluläre Lokalisation für einige Proteine. Dies ist im Fall der Pflanze *Arabidopsis thaliana* mit der PPMdb ("plant plasma membrane database") realisiert worden (**Sahnoun et al. 2000**). Allerdings blieb diese Methode bisher auf die Analyse einiger tausend Proteine limitiert. Von anderen Techniken wie der Massenspektroskopie erhofft man sich für die Zukunft die Analyse des gesamten Proteinrepertoires (**Bouchez und Höfte 1998**).

"**Protein-Arrays**" werden für die Analyse der Genexpression und für molekulare Interaktionsstudien verwendet, indem Proteine auf einer Membran in hoher Dichte immobilisiert werden. Diese Technik bietet in Zukunft die Möglichkeit zur Untersuchung des gesamten Proteinrepertoires, das vom Genom exprimiert wird, des Proteoms (**Walter et al. 2000**).

1.3 DNA-Array Technologie

1.3.1 Grundlagen und Prinzip

Die DNA-Array-Technologie ist eine Methode, die sich von einer schon im Jahr 1975 beschriebenen Technik ableitet. Damals entwickelte Ed Southern die Technik, mit der man markierte Nucleinsäuremoleküle dazu benutzen konnte, an einen festen Träger gebundene Nucleinsäuren zu adressieren. Der sogenannte "**Southern Blot**" mit trägergebundener DNA bildete die Grundlage zur Entwicklung der DNA-Array-Technologie (**Southern 1975, Lander 1999**).

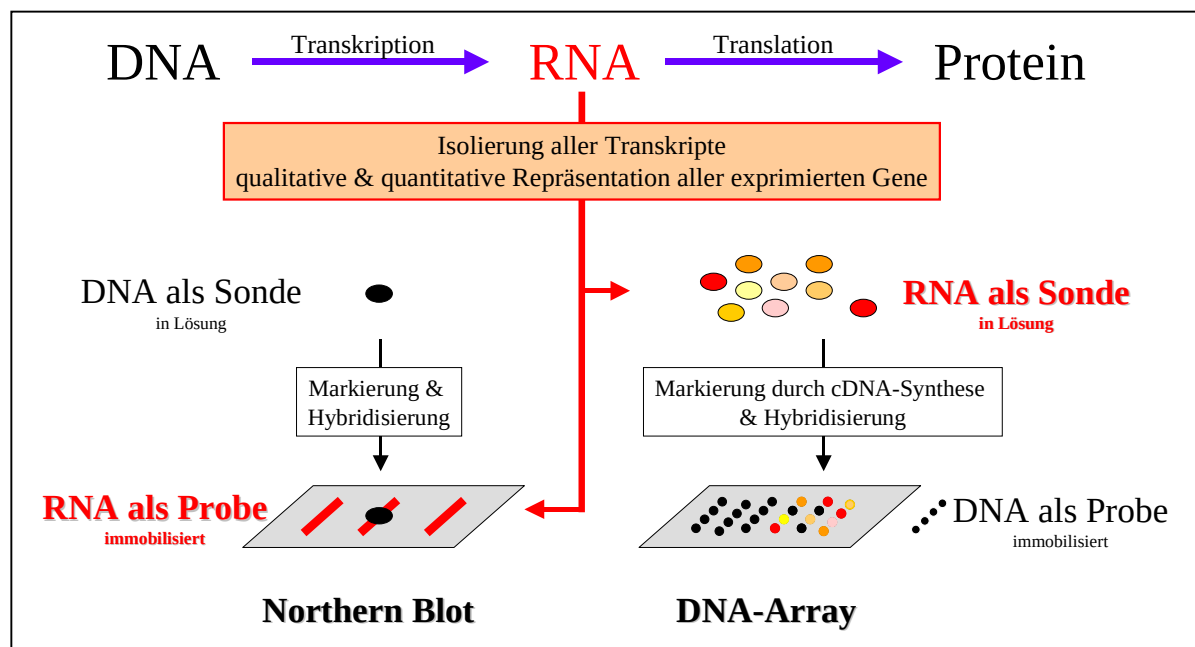


Abb. 1.2: Prinzip von Northern Blot und DNA-Array als 'reverser Northern Blot'. Im Northern Blot wird die RNA auf einer Membran immobilisiert und jede zu untersuchende DNA-Sonde einzeln markiert und hybridisiert. Beim DNA-Array werden alle zu untersuchenden DNA-Proben auf einem festen Träger immobilisiert, so daß RNA-Moleküle als Sonde markiert und hybridisiert werden. Damit können mehrere DNA-Proben mit einer komplexen RNA-Sonde parallel untersucht werden.

Der DNA-Array in Verbindung mit RNA als Sonde entspricht einem "**reversen Northern Blot**" (siehe Abb. 1.2). Beim Northern Blot wird die RNA, die alle zum Zeitpunkt der Isolation exprimierten Gene des untersuchten Gewebetyps repräsentiert, als Probe verwendet und auf einer Membran fixiert. Jede DNA-Sonde muß einzeln hybridisiert werden. Beim DNA-Array wird dieser Versuchsaufbau umgekehrt. Alle DNA-Sequenzen, die zur Verfügung stehen und

eingesetzt werden sollen, werden auf einem festen Träger immobilisiert. Die aus dem zu untersuchenden Gewebe isolierte, komplexe RNA-Population wird markiert und hybridisiert. Dabei können mehrere tausend DNA-Proben zur Untersuchung der RNA parallel eingesetzt werden. Diese Umkehrung von RNA als Probe im Northern Blot zur Sonde beim DNA-Array ermöglicht die Miniaturisierung und Parallelisierung der Analysen.

Ein DNA-Array ist ein fester Träger aus Nylon, Polypropylen oder Glas mit vielen, mikroskopisch kleinen Spots. Je nach Dichte der Spots spricht man von Macroarrays, Microarrays oder Biochips. In jedem dieser Spots befinden sich identische, einzelsträngige Nucleinsäuremoleküle, die auf dem Träger immobilisiert wurden. Jeder Spot trägt viele Kopien einer bestimmten Sequenz, die ein Gen repräsentiert. Die Länge der Sequenz kann von 10 oder 20 Basen (Oligonucleotide) bis zu mehreren tausend Basen (cDNAs) variieren. Die Länge der immobilisierten Nucleinsäuren macht den Unterschied zwischen den beiden grundlegenden Systemen der DNA-Array-Technologie aus, dem "cDNA-Array" und dem "Oligomer-Array" **(Graves 1999, DeRisi und Iyer 1999)**.

Der DNA-Array dient bei der Hybridisierung einer markierten Sonde als Detektionsmedium. Dabei werden zwei biochemische Grundprinzipien ausgenutzt. Wenn man den DNA-Array zu Genexpressionsstudien einsetzt - der zur Zeit häufigsten Anwendung der DNA-Array-Technologie - dann verwendet man mRNA, die für die Markierung in cDNA revers transkribiert wird. Dabei nutzt man die mRNA des zu untersuchenden Gewebe- oder Zelltyps als qualitativen und quantitativen Informationsvermittler auf dem Weg von der DNA als initialem Informationsträger und dem Protein als seinem Produkt, gemäß dem Dogma der Molekulargenetik. Bei der Hybridisierung lagern sich einzelsträngige Nucleinsäuren, die komplementär zueinander sind, zu Doppelsträngen zusammen, d.h. die Sonde in Lösung bindet an die jeweils komplementäre, trägergebundene Nucleinsäure und markiert damit den korrespondierenden Spot. Die Lokalisation des Signals gibt eine qualitative Information über das jeweils exprimierte Gen. Die Intensität des Signals ist proportional zur gebundenen Sondenmenge und trägt damit die quantitative Information der Transkriptionsrate. Die rasterförmige Anordnung von DNA-Sequenzen, die im Idealfall das gesamte Genom repräsentieren, ermöglicht einen globalen Überblick über dynamische, biologische Prozesse durch gleichzeitiges Auslesen aller beteiligten Gene **(Duggan et al. 1999, Lander 1999)**.

1.3.2 Integrierte Systemkomponenten der DNA-Array-Technologie

Für den Einsatz der DNA-Array-Technologie bedarf es einer ganzen Reihe von Einzelkomponenten, die erst zu einem Gesamtsystem integriert werden müssen (siehe Abb. 1.3). Die Integration beginnt bei der Resource Gensequenzdaten für kurze DNA-Moleküle mit bis zu 100 Bp oder der Resource cDNA-Bibliothek für DNA-Moleküle ab 100 Bp sowie ausreichende Mengen an Gewebeproben. Für die experimentellen Arbeiten sind Gerätschaften wie Hochdurchsatz-Thermocycler, Spotting-Roboter zur Array-Herstellung als auch Phosphorimager oder Laserscanner zur Signaldetektion erforderlich. Für die bioinformatische Auswertung eine speziell auf die DNA-Array-Technologie abgestimmte Software für die Quantifizierung, Qualitätskontrolle und Auswertung der Datenmengen absolut notwendig. Die Hauptaufgabe vieler Anwender besteht in der Integration dieser Einzelkomponenten zu einem funktionierenden Gesamtsystem.

Das Design eines Arrays wird stark durch die biologisch-medizinische Fragestellung und die zu Verfügung stehenden Ressourcen beeinflusst. In der Diagnostik werden kleinere Arrays mit gut definierten Zielsequenzen Anwendung finden, während die Untersuchung von Stoffwechselwegen oder die Suche nach noch unbekannten Genen ("gene discovery") größere Arrays benötigen. Da mit Hilfe der DNA-Arrays die Expression eines großen Gensatzes gleichzeitig bestimmt werden kann und einige Organismen schon komplett sequenziert sind, können bereits genomweite Expressionsanalysen durchgeführt werden, wie am Beispiel der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Wodicka et al. 1997, Hauser et al. 1998). Für noch nicht vollständig sequenzierte Organismen wie die Pflanze *Arabidopsis thaliana* werden die cDNA-Bibliotheken eine wichtige Resource bleiben (van Hal et al. 2000). So sind mit cDNA-Bibliotheken der Pflanze *Arabidopsis thaliana* Genexpressionsstudien mit bis zu 1.400 Klonen durchgeführt worden (Desprez et al. 1998, Ruan et al. 1998). Die Abbildung 1.3 stellt ein Schema der zu integrierenden Systemkomponenten für die Genexpressionsanalyse dar.

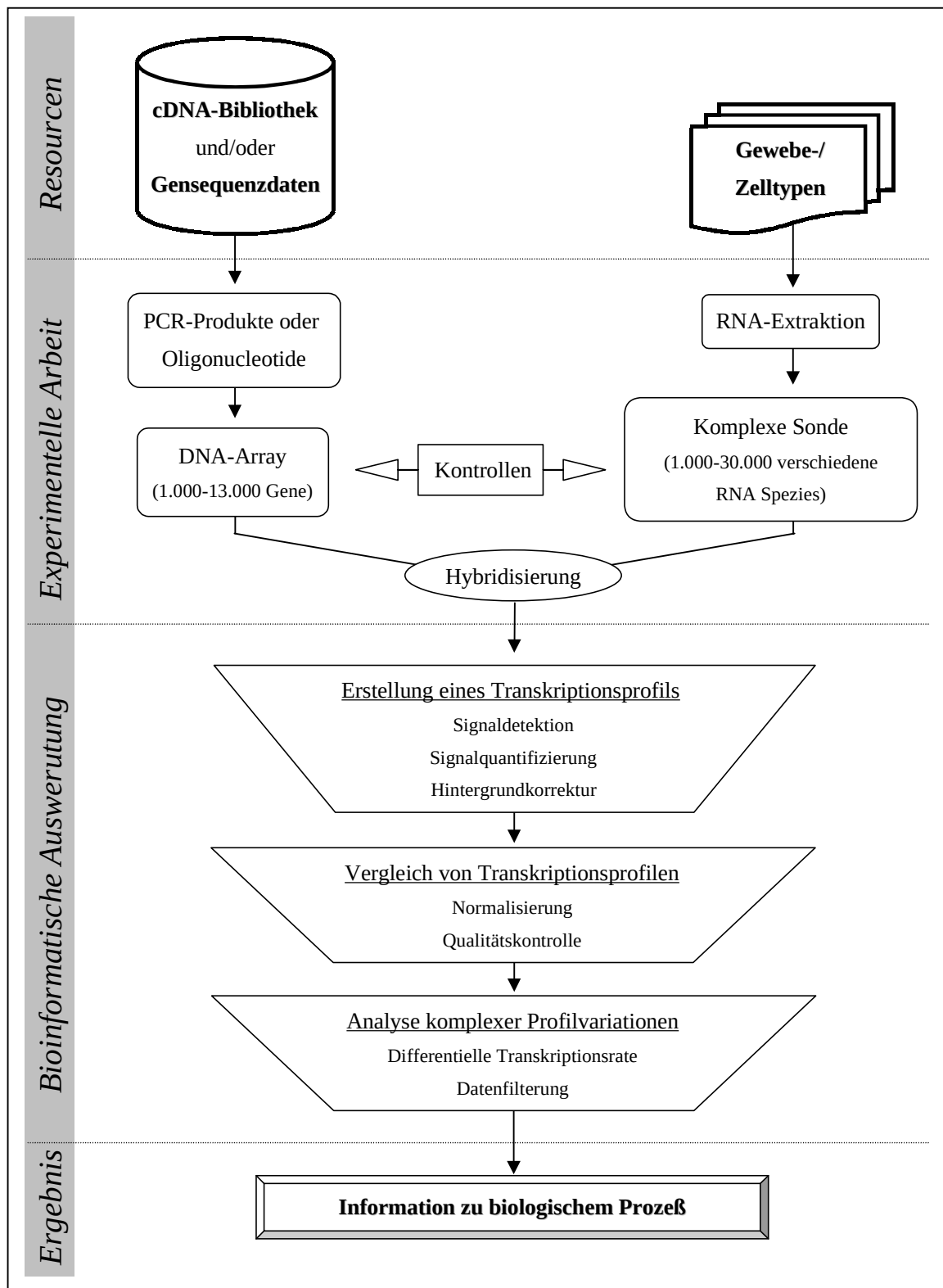


Abb. 1.3: Übersicht über die Systemkomponenten der DNA-Array-Technologie. Für die hochparallele Analyse der Transkription mehrerer tausend Gene ist eine Integration mehrerer Prozesse mit vielen Systemkomponenten erforderlich. Die Integration der Einzelkomponenten fängt an bei den Ressourcen, reicht über die experimentelle Arbeit bis hin zur bioinformatischen Auswertung.

Zwei grundlegende Systeme der DNA-Array-Technologie basieren auf unterschiedlichen Herstellungsverfahren. Für die Oligomer-Arrays gibt es zum einen die direkte Synthese von Oligonucleotiden auf einem Glasträger. Die bekannteste *in situ*-Synthesestrategie basiert auf der Photolithographie, bei der photolabile Schutzgruppen mit Belichtung durch eine Maske an gezielten Positionen abgespalten werden, so daß dort das nächste Nucleotid, ebenfalls mit einer Photoschutzgruppe versehen, angebunden werden kann (siehe Abb. 1.4). Diese Methode wird sehr komplex durch die Herstellung der Photomasken, die sehr hohe Genauigkeit in Ausmaß und Ausrichtung auf dem Träger bei einer Dichte von 300.000 Spots pro 1,28 x 1,28 cm benötigen, wie sie zum Beispiel die Firma Affymetrix (Santa Clara, CA, USA) herstellt (**Lipshutz et al. 1999, Beier und Hoheisel 2000**).

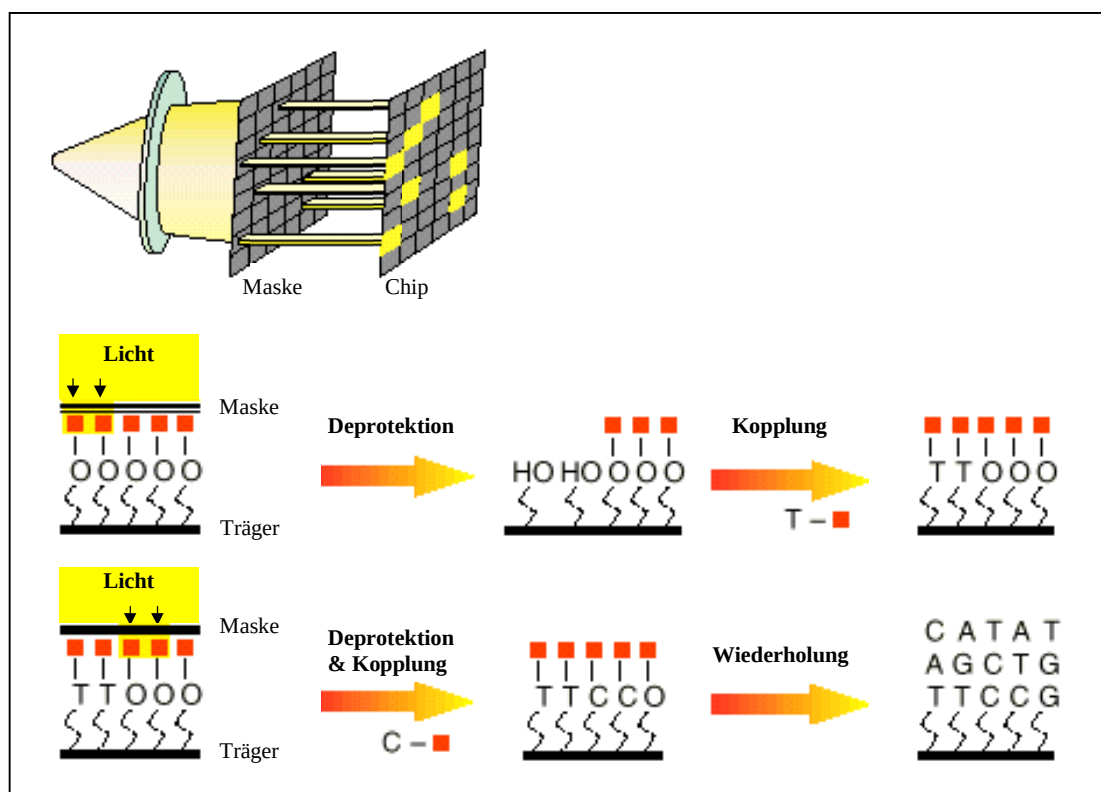


Abb. 1.4: Prinzip der *in situ*-Synthese-Strategie zur Herstellung von Oligomer-Arrays (**Lipshutz et al. 1999**).
 Bild oben: prinzipielle Anordnung von Lichtquelle, Maske und Array für die *in situ*-Synthese.
 Bild unten: Prinzip der photolithographischen, trägergebundenen Oligonucleotid-Synthese mit der gezielten Abspaltung photolabiler Schutzgruppen an definierten Positionen und anschließender Kopplung des nächsten Nucleotids.

Alternativ können auch bereits synthetisierte DNA-Moleküle durch Microdispensierung entweder passiv, d.h. durch Kontakt mit der Oberfläche, oder aktiv, d.h. über ein Nicht-Kontakt-Verfahren mit Piezoelementen oder Microventilen übertragen werden. Dabei können minimale Volumina von bis zu 50 Pikoliter auf den Träger transferiert werden (**van Hal et al. 2000**). Dafür benutzte Glasträger sind im allgemeinen mit einer positiv geladenen poly-L-Lysin-Schicht

überzogen, die dazu benutzt wird, die negativ geladene DNA an der Oberfläche zu binden (**Schena et al. 1995, Shalon et al. 1996**). Alternativ dazu können die DNA-Moleküle auch mit einer 5'-Modifikation versehen werden, die sich dann kovalent an reaktive Gruppen der Trägoberfläche binden lässt (**Schena et al. 1996, Rogers et al. 1999, Beier und Hoheisel 1999**).

Die Microdispensierung wird ebenfalls bei der Herstellung der cDNA-Arrays eingesetzt. Dabei werden Roboter mit parallel angeordneten Dispensiervorrichtungen verwendet (**Duggan et al. 1999**).

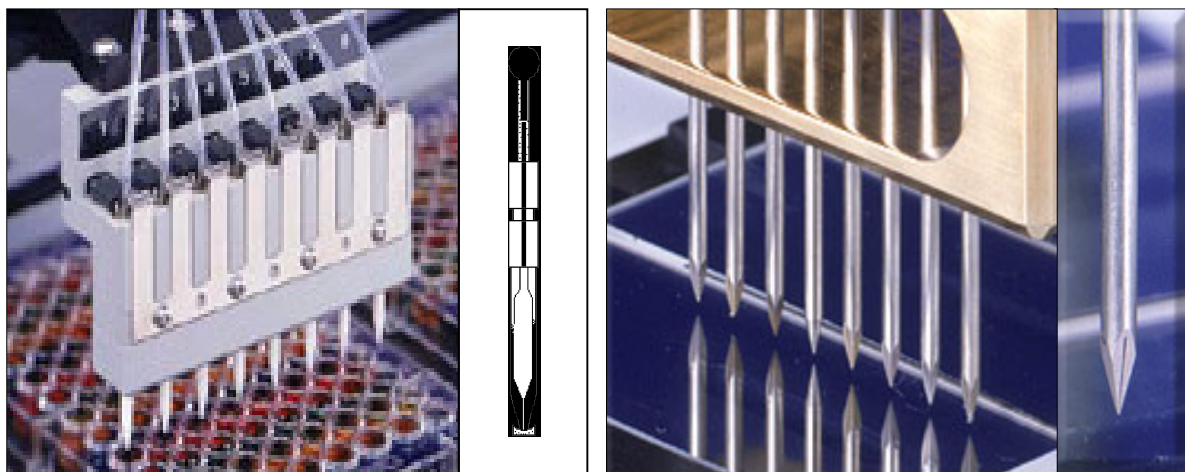


Abb. 1.5: Microdispensierung (Bsp. von Cartesian Technologies Inc., Irvine, CA, USA).
Bild links: aktive Microdispensiervorrichtung mit 8 parallelen Piezonadeln
Bild rechts: passive Microdispensiervorrichtung mit 8 parallelen Transfernadeln

Als Träger für längere DNA-Moleküle stehen hauptsächlich Polymere wie Nylon- und Polypropylenmembranen als auch Objektträger aus Glas zur Auswahl. Polymermembranen bieten zur Probenanbindung eine dreidimensionale Matrix an, die häufig wegen des Vorteils der mehrfachen Wiederverwendbarkeit und wegen eines besseren Signal/Hintergrund-Verhältnisses durch höhere Ladekapazität genutzt werden (**Proudnikov et al. 1998, Beier und Hoheisel 1999**).

In Expressionsstudien ist die mRNA-Population des zu untersuchenden Gewebes die eingesetzte komplexe Sonde. Sie kann als GesamtRNA oder auch als mRNA isoliert werden. Ihre Qualität ist von entscheidender Bedeutung für die Aussagekraft des Experiments. Die Probenmarkierung findet üblicherweise mit Hilfe eines Oligo-dT-Primers in einer reversen Transkription statt. In jedem Fall entsteht dabei eine cDNA-Sonde, die durch den Einbau modifizierter Nucleotide fluoreszenz- oder radioaktivmarkiert wird. Bei der Fluoreszenzmarkierung handelt es sich

zumeist um das mit den Cyaninfarbstoffen Cy3 und Cy5 markierte Nucleotid dCTP, während für die Radioaktivmarkierung gewöhnlich [α - ^{33}P]-dCTP eingesetzt wird (**Duggan et al. 1999**).

Für die radioaktiv markierte Hybridisierung auf Polymermembranen wird aus ca. 25 μg total RNA bzw. 0,5 - 1,0 μg mRNA hergestellte cDNA in 5 - 20 ml Hybridisiervolumen eingesetzt. Dies entspricht einer Sondenkonzentration von 0,005 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$. Um eine fluoreszenzmarkierte Sonde nach der Hybridisierung auf Glaträger noch detektieren zu können, müssen ca. 50 - 200 μg total RNA bzw. ca. 2 - 5 μg mRNA markiert und in 10 - 100 μl Reaktionsvolumen hybridisiert werden, das entspricht einer Sondenkonzentration von 2 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$. Für die Fluoreszenzhybridisierung auf Glaträger bedarf es damit einer um Größenordnungen höheren Konzentration der markierten Sonde (**siehe Kap. 2.2.8 und 2.2.9, Duggan et al. 1999, Cheung et al. 1999**).

Die qualitative Detektion der Radioaktivmarkierung kann mittels Autoradiographie durchgeführt werden, aber eine hochsensitive Signalquantifizierung erreicht man nur mit Bildplatten eines Phosphorimagers. Letztere determinieren die Auflösung des Phosphorimagers, welche zur Zeit auf 50 μm limitiert ist (**siehe Kap. 2.2.10, Granjeaud et al. 1999**). Die Fluoreszenzdetektion kann wahlweise mit CCD-Kamera oder Laserscanner erfolgen, die jeweils eine Auflösung von ca. 10 μm pro Pixel erreichen (**van Hal et al. 2000**).

Bei Genexpressionsstudien werden Datenmengen von gewaltigem Ausmaß generiert, deren Speicherung, Handhabung und Auswertung eine anspruchsvolle Herausforderung darstellen. Die Bioinformatik ist dabei von zentraler Bedeutung und unterscheidet zwischen der Bildanalyse und der Auswertungssoftware. Die Bildanalyse umfaßt die Signalquantifizierung und Spotzuordnung (**Bowtell 1999**). Für eine schnelle Auswertung großer Rohdatensätze zu korrigierten und normalisierten Expressionsdaten ist eine speziell auf die Anforderungen zugeschnittene Software unerlässlich (**Granjeaud et al. 1999, Bassett et al. 1999**). Diese Art der integrierten Software schließt die Normalisierung, d.h. die korrekte Anpassung zweier Datensätze im Vergleich zueinander und die Qualitätskontrolle der Datensätze ein. Zusätzlich sollte die Software über analytische Werkzeuge verfügen, die aus der Datenflut die interessanten Daten herausfiltert. Diese Art der integrierten, softwaregestützten Datenauswertung befindet sich erst am Anfang, so daß noch wesentliche Verbesserungen auf diesem Gebiet in naher Zukunft zu erwarten sind (**van Hal et al. 2000**).

1.3.3 Anwendungsgebiete

Wie die Länge der auf dem Träger immobilisierten DNA zwischen den beiden prinzipiellen DNA-Array-Systemen, den Oligonucleotid-Arrays und den cDNA-Arrays, unterscheidet, so gibt es für jedes System unterschiedliche Anwendungsgebiete, wie es folgende Abbildung verdeutlicht.

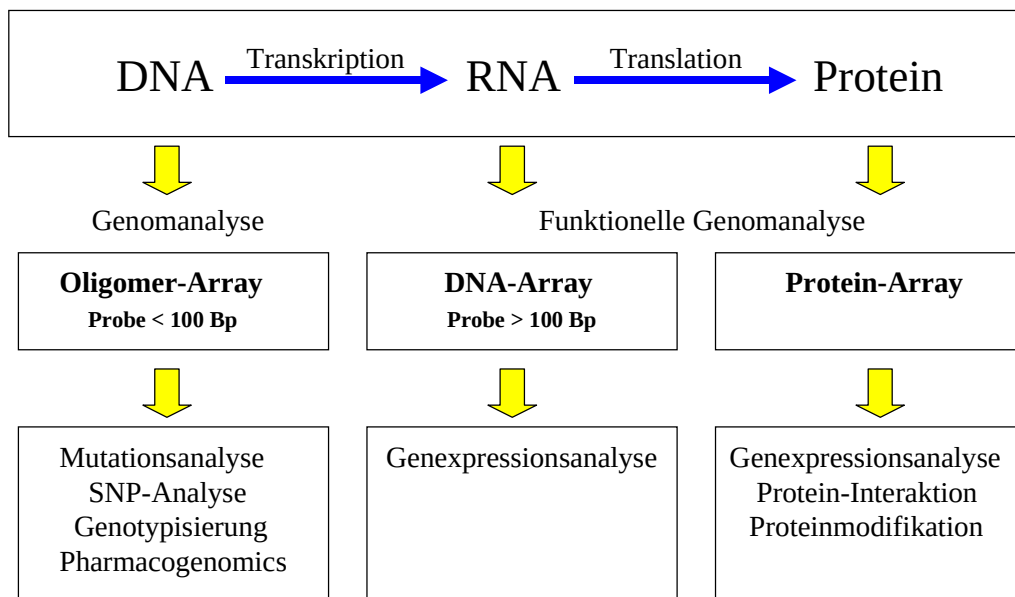


Abb. 1.6: Entwicklung und Anwendung von Arrays in der Genomforschung. Ein Array besteht aus einer rasterförmigen Anordnung von bis zu mehreren tausend Proben in hoher Dichte auf einem festen Träger. Dabei wird je nach Anwendung eine Molekülklasse, z. B. Nucleinsäuren kleiner bzw. größer als 100 Bp oder Peptide, als Probe auf dem Träger immobilisiert.

"Oligomer-Arrays" werden hauptsächlich in der Sequenzanalytik eingesetzt. Dazu gehören die Mutationsanalyse, die Bestimmung von Einzelnucleotid-Polymorphismen, auch SNPs ("single nucleotide polymorphisms") genannt, die im Rahmen von Genotyp-Phänotyp-Korrelationen untersucht werden, und der Bereich "Pharmacogenomics", in dem untersucht wird, inwieweit Polymorphismen die individuelle Antwort auf Medikamente beeinflussen (**Drmanac 1998, Marshall 1997**). Weitere Anwendungsgebiete sind die Identifizierung von Straftätern und Blutsverwandtschaften als auch die Gewebetypisierung in der Organspenderauswahl. Auch außerhalb der medizinischen Wissenschaften finden Oligomer-Arrays Anwendung in Evolutionsstudien und Verwandtschaftsuntersuchungen zwischen Spezies (**Graves 1999**). So konnte an einem Array mit Sequenzen des Pathogens *Mycobacterium tuberculosis* eine Genotypisierung verschiedener Spezies durchgeführt und in Clustern repräsentiert werden

(Gingeras et al. 1998). Weiterhin dehnt sich die Oligomer-Array-Technologie in den Bereich der Genexpressionsanalyse aus (Lockhart et al. 1996). In diesem Rahmen sind z. B. Untersuchungen an allen Genen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und des Bakteriums *Escherichia coli* sowie an mehreren tausend Genen der Maus und des Menschen durchgeführt worden (Wodicka et al. 1997, Cho et al. 1998, Lipshutz et al. 1999).

Die "**cDNA-Arrays**" finden überwiegend Anwendung in der Analyse der Genexpression und damit in der Erstellung komplexer Transkriptionsprofile. Dieser Forschungsbereich umfaßt die Aufnahme von Genexpressionsmustern in einzelnen Geweben bei der Suche nach gewebespezifischen Genen und die Analyse differentieller Genexpression bei der Suche nach molekularen Ursachen von Krankheiten und Streßzuständen (Debouck und Goodfellow 1999). Weiterhin eröffnet sich mit der DNA-Array-Technologie die Möglichkeit, die Arzneimittelwirkung in Abhängigkeit der Dosierung zu studieren (Gray et al. 1998, Marton et al. 1998). In der Grundlagenforschung findet die DNA-Array-Technologie bei der Genexpressionsanalyse ganzer Stoffwechselwege breite Anwendung, wenn eine cDNA-Bibliothek zur Verfügung steht. Daher beschränkt sich diese Art der Anwendung noch auf einige Modellorganismen. Dazu zählen der Mensch, bei dem Tumore analysiert und entzündungsassoziierte Gene identifiziert und validiert wurden (DeRisi et al. 1996, Wang et al. 1999, Heller et al. 1997). An allen 6.200 Genen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurden genomweite Expressionsstudien unter anderem zur Sporulation, zur Mutationsanalyse für die Aufklärung von Genfunktionen und zur Analyse von Stoffwechselwegen durchgeführt (Wodicka et al. 1997, DeRisi et al. 1997, Chu et al. 1998, Hauser et al. 1998). An der Taufliege *Drosophila melanogaster* wurde die Entwicklung während der Metamorphose untersucht (White et al. 1999). Auch die Pflanze *Arabidopsis thaliana* wurde als Modellorganismus für Analysen der Genexpression mit Hilfe der DNA-Array-Technologie verwendet. Dabei wurden sowohl verschiedene Gewebetypen als auch äußere Einflüsse wie Licht und Dunkelheit untersucht (Ruan et al. 1998, Desprez et al. 1998). Weiterhin können Genexpressionsstudien an Pathogenen zur Identifizierung von Virulenzgenen als auch an Wirtszellen nach Pathogeninfektion zur Aufklärung der Abwehrmechanismen durchgeführt werden (Debouck und Goodfellow 1999). Auf Letzteres wird in den nächsten Kapiteln näher eingegangen.

Die "**Protein-Arrays**", bei denen Peptide als Proben auf dem Träger zur Anwendung kommen, erlauben die Analyse der Genexpression auf Translationsebene sowie das Studium molekularer Protein-Interaktionen und Protein-Modifikationen. Die Protein-Arrays sind noch sehr jung, werden aber in Zukunft an Bedeutung gewinnen (Walter et al. 2000).

1.4 Befall von Pflanzen durch Pathogene

1.4.1 Krankheitserreger bei Pflanzen

Pflanzenkrankheiten vernichten jedes Jahr etwa 20 % des Ernteertrags weltweit. Die Pflanzen werden dabei durch phytopathogene Mikroorganismen aus dem Bereich der Viren, Bakterien und Pilze infiziert. Bakterien bilden dabei die Hauptklasse der Pflanzenpathogene und können eine sehr große Zahl von Pflanzenarten befallen. Doch ist wenig bekannt über die bakterielle Pathogenese bei Wildpflanzen im Gegensatz zu den Getreidesorten, die schon immer eine besondere Beachtung fanden, da sie eine wesentliche Rolle bei der Ernährung des Menschen spielen.

Die bakteriellen Pflanzenerreger lassen sich grob in zwei Klassen einteilen. Dies sind zum einen die relativ gut untersuchten, gram-negativen Arten wie *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* und *Xanthomonas*. Die Klasse der gram-positiven Arten schließt wichtige Pathogene wie *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Rhodococcus*, *Spiroplasma* und *Phytoplasma* ein, sind aber gegenüber den gram-negativen Bakterien nur wenig untersucht (**Williams, Ketley und Salmond 1998**).

Bakterien haben im Gegensatz zu Pilzen nicht die Möglichkeit, eine intakte Epidermis, überzogen mit einer Cuticula, zu penetrieren. Sie benutzen daher natürliche Öffnungen, wie Stomata an der Blattunterseite und Wunden, als Eintrittsstellen. Haben sie ihren Wirt infiziert, verursachen sie vielfältige Schäden. So verursachen Arten von *Pseudomonas* und *Xanthomonas* progressive und extensive Gewebenekrosen, die sich von der Infektionsstelle ausbreiten. *Ralstonia*, einige Arten von *Xanthomonas*, *Pseudomonas* und *Erwinia*, sowie *Clavibacter* und *Curtobacterium* befallen bevorzugt das Gefäßsystem der Pflanze und induzieren Welke, gefolgt von Nekrosen. Einige Spezies von *Erwinia* und einige von *Pseudomonas* produzieren pektolytische und andere zellwanddegradierende Enzyme und zerstören Pflanzengewebe. *Agrobacterium tumefaciens* und *Agrobacterium rhizogenes*, zwei relativ gut untersuchte Beispiele, werden über phenolische Substanzen, die durch verwundetes Gewebe freigesetzt werden, angelockt und treten über die Wunde ein. Die Infektion verursacht Hypertrophie und eine genetische Transformation durch T-DNA. Einige andere Bakterien wie *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* und *Rhodococcus fascians* verursachen ebenfalls Hypertrophie, aber keine Transformation (**Williams, Ketley und Salmond 1998**).

Im Vergleich zur großen Anzahl bekannter Mikroorganismen sind nur wenige in der Lage, lebende Pflanzen zu befallen. Nur ein paar Spezialisten ist es im Verlauf der Koevolution mit Pflanzen gelungen, eine oder wenige Spezies erfolgreich zu befallen. Daraus kann man schließen, daß Pflanzen über gut funktionierende und breitgefächerte Abwehrreaktionen verfügen, die in mehreren Stufen zeitlich versetzt ablaufen können, so daß Pflanzen auf diese Weise eine wirksame Schutzkette gegenüber den meisten Pathogenen besitzen.

1.4.2 Wirt-Parasit-Interaktion

Generell unterscheidet man zwischen der kompatiblen und inkompatiblen Wirt-Parasit-Beziehung sowie der Wirt- und Nicht-Wirt-Resistenz. Viele Pflanzen können den Befall einiger Krankheitserreger nicht erfolgreich abwehren. Die befallenen Pflanzen sind suszeptibel gegenüber dem aggressiven, virulenten Pathogen und werden dadurch geschädigt oder gehen zugrunde. Diese Interaktion zwischen Wirt und Pathogen bezeichnet man als "*kompatible*" Wirt-Parasit-Beziehung. Führt dagegen der Pathogenbefall zu nekrotischem Gewebe, so kommt es während der Infektion zum Abtöten des Pathogens durch die Wirtspflanze, d.h. die Pflanze ist gegenüber dem avirulenten Pathogen resistent und reagiert "*hypersensitiv*". Diese spezifische Resistenzreaktion zwischen Wirt und Pathogen heißt "*inkompatible*" Wirt-Parasit-Beziehung oder auch "*Wirt-Resistenz*". Viele höhere Pflanzen können von der Mehrzahl der bekannten Mikroorganismen nicht befallen werden, weil sie keine Wirte sind. Man bezeichnet diese Tatsache als "*Nicht-Wirt-Resistenz*" (**Hock und Elstner 1988, Somerville und Meyerowitz 1994**) .

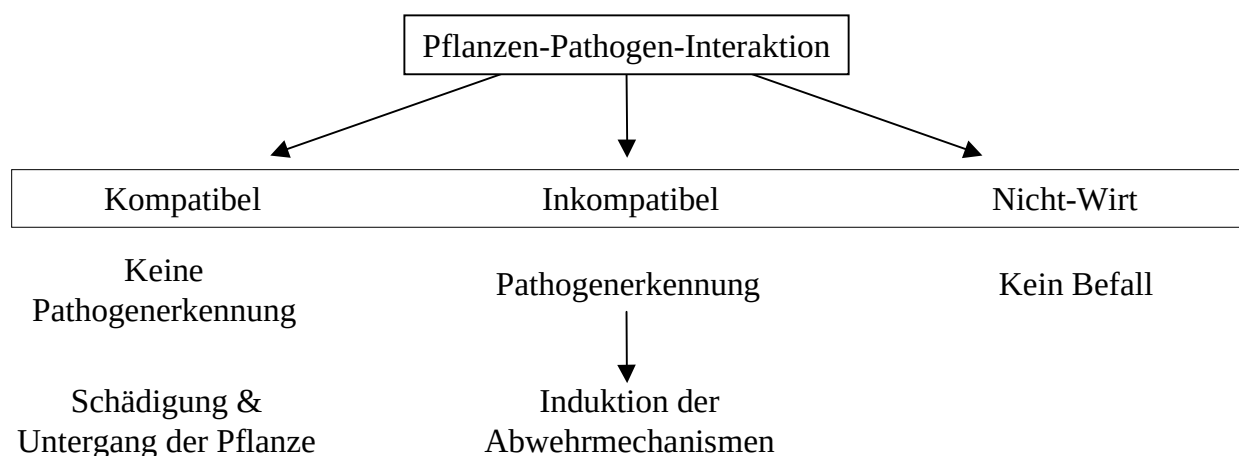


Abb. 1.7: Die Pflanzen-Pathogen-Interaktion läßt sich in drei Klassen einteilen: die kompatible und inkompatible Wirt-Parasit-Interaktion sowie die Nicht-Wirt-Interaktion.

Einzelne Teilaspekte der pflanzlichen Pathogenabwehr sind durch Experimente an jeweils verschiedenen Pflanzen entdeckt worden. Viele Regulationswege sind noch unvollständig untersucht. Daher ist noch kein umfassender Überblick über die Pathogenantwort einer Pflanzenspezies möglich. Übereinstimmende Ergebnisse an verschiedenen Pflanzen lassen jedoch die Vermutung zu, daß die pflanzliche Pathogenantwort und Resistenz mittels allgemeiner, molekularer Mechanismen vermittelt wird. Diese erlauben es, im weiteren Verlauf die Abwehrmaßnahmen allgemein und unabhängig von der Pflanze, an der dieser Mechanismus untersucht wurde, zu beschreiben, um einen Gesamteindruck über alle möglichen Abwehrmaßnahmen der Pflanze zu erhalten. Spezielle Verhaltensweisen verschiedener Pflanzenspezies und besonders herausragende Beispiele sind im Text entsprechend angemerkt (**Meinke und Tanksley 2000, Schmidt 2000**).

1.5 Konstitutive Abwehrmechanismen von Pflanzen

Pflanzen können einer Vielzahl potentieller Krankheitserreger widerstehen. Die Resistenz gegen ein Pathogen ist nicht auf eine einzige Abwehrreaktion zurückzuführen, sondern liegt vor allem in der Kombination verschiedener Abwehrreaktionen begründet. Vor einer Infektion der Pflanze gibt es bereits vorhandene, präformierte Barrieren, deren Gesamtheit unter dem Begriff konstitutive Abwehr zusammengefaßt wird. Unter den konstitutiven Barrieren versteht man sowohl strukturelle Hindernisse als auch verschiedene Substanzen mit hemmender Wirkung gegen die Ausbreitung von Pathogenen (**Brunold, Rügsegger und Brändle 1996**).

1.5.1 Strukturrestistenz

Unter Strukturrestistenz versteht man die Oberflächenbeschaffenheiten der Wirtspflanze, mit denen Infektionen durch Pathogene verhindert werden können. Die Benetzbarkeit der Blätter hat einen starken Einfluß darauf, ob Wassertropfen, die eventuell Pathogene enthalten, an der Blattober- oder Blattunterseite haften bleiben oder abperlen. Lipophile Überzüge, wie z.B. Wachsschichten, setzen die Benetzbarkeit stark herab, die Tropfen perlen ab und eine mögliche Infektion wird verhindert. So zeigen Weizenarten ohne Wachsüberzüge stärkeren Pathogenbefall der Blätter als solche mit Überzug. Auch die Behaarung der Blätter kann zur Resistenz beitragen. Haare verhindern, daß Tautropfen mit der Epidermis in Kontakt treten. Weiterhin kann eine

Strukturresistenz durch die Anzahl der Stomata auf der Blattoberfläche und durch ihre Struktur hervorgerufen werden. Je weniger Stomata vorhanden sind, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit des Befalls. So ist z.B. das Ausmaß des Befalls bei verschiedenen Maisvarietäten gegenüber *Puccinia sorghi* proportional zur Stomatadichte. Die Bedeutung der Struktur der Stomata für die Resistenz wird bei der Wirt-Parasit-Beziehung zwischen Citrusarten und *Pseudomonas citri* ersichtlich. Bei der resistenten Art *Citrus nobilis* ist der Porus der Stomata durch stark ausgebildete Cuticularleisten extrem verkleinert im Gegensatz zur anfälligen Art *Citrus grandis*. Generell kann man sagen, daß konstitutive, strukturelle Barrieren das Eindringen von Pathogenen stark erschweren und somit eine Resistenz vermitteln können (**Hock und Elstner 1988**).

1.5.2 Abwehrtoxine

Pflanzeneigene Substanzen bilden eine weitere konstitutive Barriere. Pflanzen enthalten verschiedene Stoffe, welche entweder die vom Pathogen produzierten, hydrolytischen Enzyme inaktivieren können oder eine antibiotische Wirkung besitzen (**Brunold, Rüeßegger und Brändle 1996**).

"**Cyanogene Glycoside**" wurden in etwa 800 Arten nachgewiesen. Für sich gesehen sind diese Stoffe ungiftig und werden erst nach Kontakt mit einer zweiten Komponente, einer spezifischen Glycosidase, in Blausäure umgewandelt. Cyanogene Glycoside und das Enzym werden in getrennten Kompartimenten in der Pflanze gelagert und illustrieren somit das Prinzip des Zweikomponenten-Giftes. Nach Verlust der zellulären Kompartimentierung, z.B. nach Verletzung oder Infektion, kommen Substrat und Enzym zusammen, und erst dann entsteht das Gift. Die Ablagerung antimikrobieller Abwehrstoffe in inaktiver Form findet man bei vielen anderen Verbindungen, welche in der aktiven Form die Wirtszellen schädigen können.

"**Terpenoide**" gehören zu einer der größten Substanzklassen des Sekundärstoffwechsels, in dem durch Konjugationsreaktionen speziesspezifische Verbindungen synthetisiert werden. Ihre Aktivität beruht auf einem membranlytischen Effekt. So bildet Saponin, eines der meistverbreiteten Terpenoide in Pflanzen, mit dem Sterin der Zellmembran einen Komplex, der die selektive Membranpermeabilität zerstört. Auch Saponine kommen als Glycoside vor und werden erst nach Hydrolyse durch spezifische β -Glucosidasen aktiv.

"Phenolische Verbindungen" kommen in verschiedenster Form in der Mehrzahl der Pflanzen vor. Strukturell unterscheidet man zwischen einfachen Phenolen, Cumarinen und Flavonoiden, sowie komplexen Phenol-Polymeren wie Tannine und Lignin. Viele phenolische Verbindungen zeigen antibiotische Wirkung durch Enzyminaktivierung, indem sie an Proteine binden, diese denaturieren und ausfällen.

"Hydroxamische Säuren" kommen in Gräsern inklusive Getreide vor, mit Ausnahme von Reis, Hafer und Gerste. Sie entstehen, wenn Peptide oder Ester mit Hydroxylamin reagieren und wirken als Komplexbildner für Metallionen. Als Glycoside abgelagert, werden sie nach Verletzung freigesetzt. Bei Getreide konnte für diese Verbindungen eine Abwehrfunktion gegen pilzliche Erreger nachgewiesen werden. Durch Hemmung der virenübertragenden Blattläuse wirken diese Verbindungen auch gegen Viruskrankheiten.

"Antimikrobielle Samenproteine" findet man immer häufiger bei Pflanzen. Sie sollen junge Keimlinge vor Infektion durch Pathogene schützen. Einige dieser Proteine gehören zu Proteinfamilien, die bei Infektion im Sproß akkumulieren und daher PR (engl. "pathogenesis related")-Proteine genannt werden (**Brunold, Rüeßegger und Brändle 1996**).

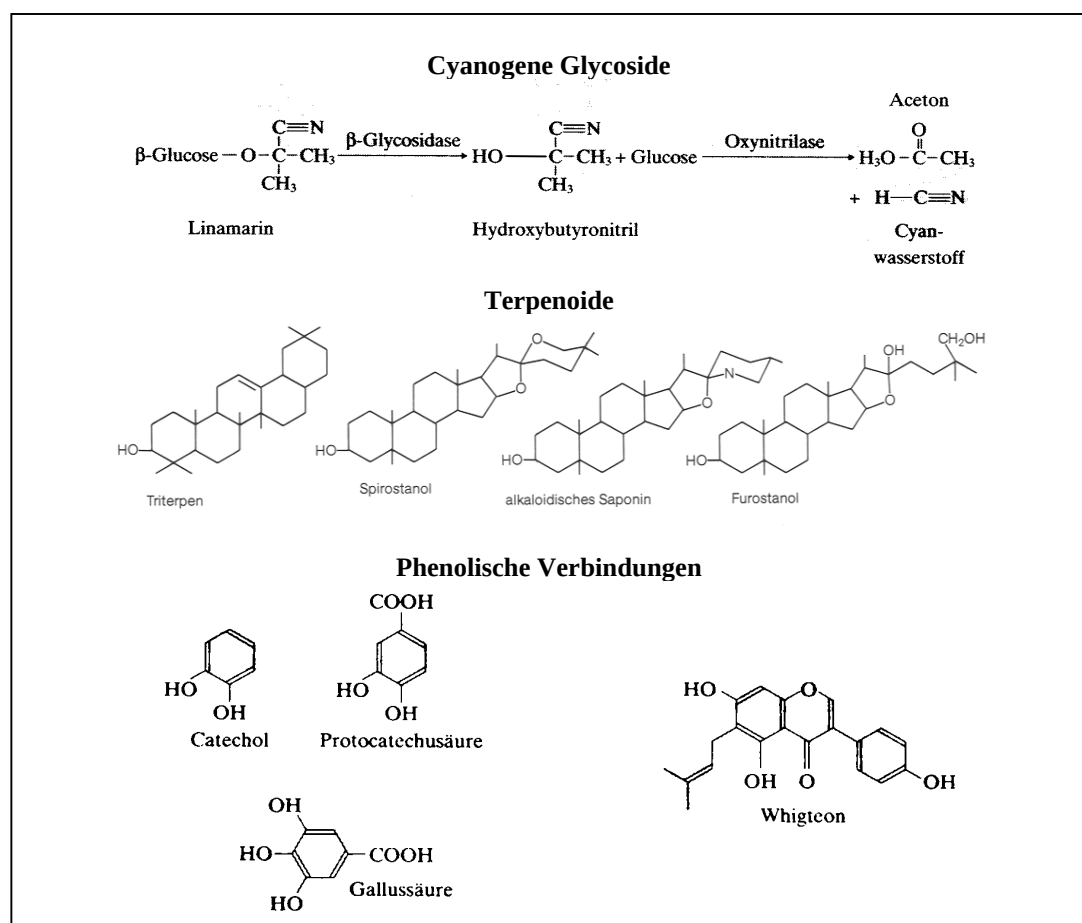


Abb. 1.8: Beispiele konstitutiver Abwehrtoxine (**Brunold, Rüeßegger und Brändle 1996**).

1.6 Induzierte Abwehrmechanismen von Pflanzen

Neben konstitutiven Abwehrbarrieren besitzen Pflanzen ein umfangreiches Arsenal induzierbarer Schutzmechanismen gegen Pathogene. Zu den induzierbaren Abwehrreaktionen zählen sowohl biochemische als auch strukturelle Barrieren, die einen Erreger am Ort des Angriffes blockieren oder abtöten. Abbildung 1.9 zeigt eine Übersicht über die verschiedenen Phasen der induzierten Abwehrmechanismen.

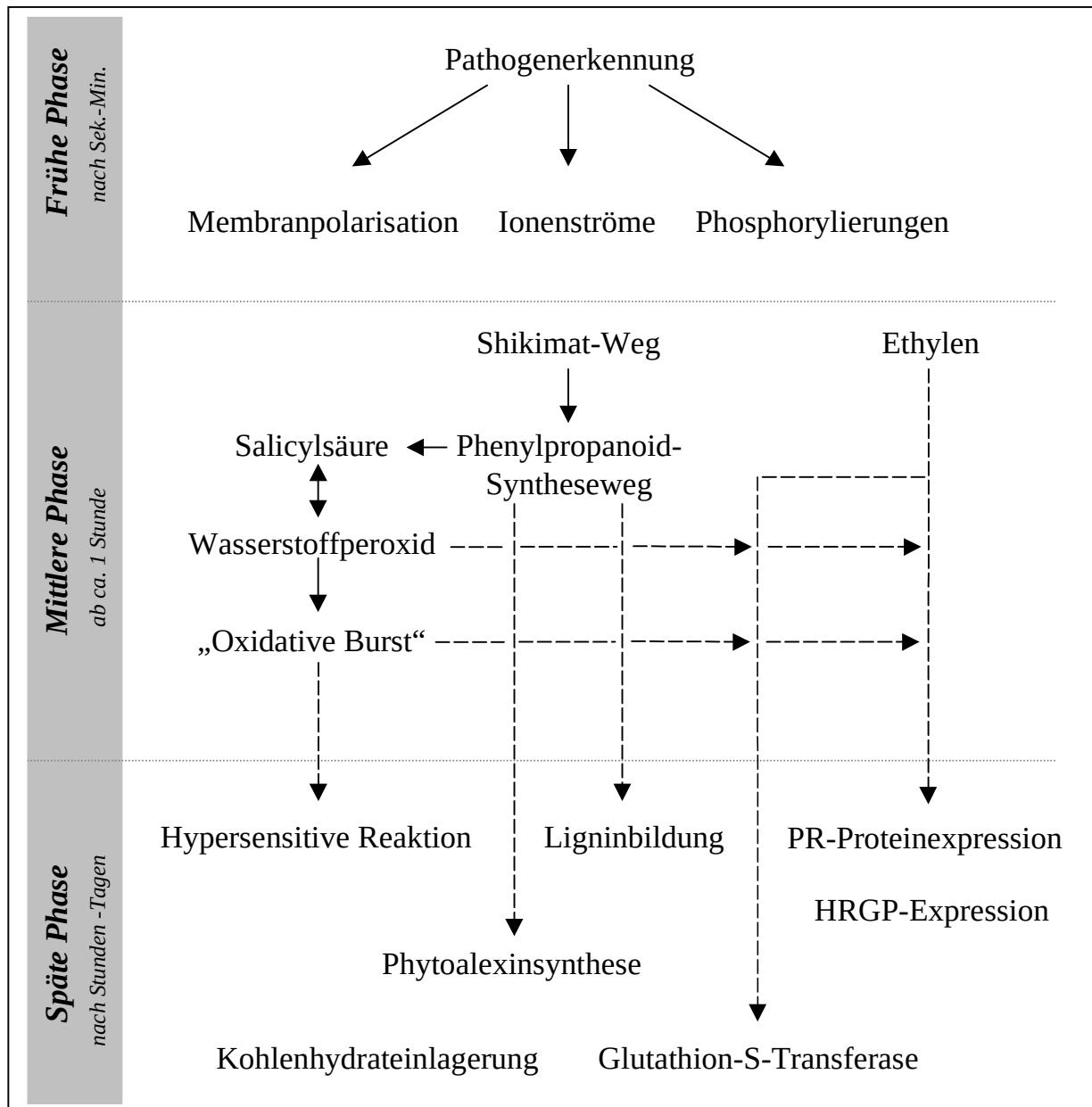


Abb. 1.9: Die Übersicht stellt den zeitlichen Verlauf und teilweise den kausalen Zusammenhang der Induktion pflanzlicher Abwehrreaktionen dar und unterteilt die eingeleiteten Reaktionen in drei Phasen: die frühe Phase nach Sekunden und Minuten, die mittlere Phase ab etwa einer Stunde und die späte Phase mit induzierten Reaktionen erst nach mehreren Stunden bis Tagen (siehe auch Kap. 1.6 ff.).

1.6.1 Frühe Phase der pflanzlichen Pathogenantwort

Am Anfang der Signaltransduktion steht die Pathogenerkennung. Dabei werden Elicitoren erkannt, die während der Pflanzen-Pathogen-Interaktion freigesetzt werden. Elicitoren sind Oligo- und Polysaccharide, die Resistenzreaktionen induzieren, wie z. B. die Phytoalexinbiosynthese oder die PR-Proteinakkumulation. Vergleichbar mit der Wirkungsweise von Hormonen werden Elicitoren von der Pflanze durch einen Rezeptor wahrgenommen und führen damit zur Induktion von Abwehrmechanismen (**Hock und Elstner 1988**).

1.6.1.1 Allgemeine Pathogenerkennung

Es existieren im wesentlichen zwei Klassen von Elicitoren: Pathogenrassen-unspezifische und -spezifische. Unspezifische Elicitoren werden von vielen Nichtwirts- und Wirtspflanzen erkannt und führen so zu der allgemeinen Pathogenerkennung. Diese ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Pathogenabwehr durch resistente Nichtwirts- und Wirtspflanzen. Zu den unspezifischen Elicitoren gehören Oligo- und Polysaccharide der pflanzlichen und mikrobiellen Zellwand, Enzyme, Polypeptide, Glycoproteine sowie Lipide. So setzt zum Beispiel der Abbau des pflanzlichen Pektins durch pilzliche oder bakterielle Enzyme wie Endopolygalacturonase Oligogalacturonsäure-Fragmente frei, die Elicitoraktivität haben. Freigesetzte Elicitoren pflanzlicher Herkunft werden endogene Elicitoren genannt. Andererseits können auch pflanzliche, extrazelluläre Enzyme die Zellwand des Pathogens abbauen, und die entstandenen Oligo- und Polysaccharide weisen ebenfalls Elicitoraktivität auf. In diesem Fall spricht man von exogenen Elicitoren mikrobieller Herkunft (**Hock und Elstner 1988**).

1.6.1.2 Spezifische Pathogenerkennung

Eine Schlüsselfunktion der pflanzlichen Pathogenabwehr liegt in dem Vermögen der Pflanze, das Pathogen spezifisch zu erkennen und damit eine ganze Reihe von induzierbaren Abwehrmechanismen möglichst rasch einzuleiten (**Lamb et al. 1989**). Eine spezifische Erkennung des avirulenten Pathogens erfolgt dabei entsprechend des "Gen-für-Gen-Modells" (**Flor 1971**).

Das Gen-für-Gen-Modell beschreibt die Interaktion eines spezifischen Elicitors aus dem Pathogen mit einem Akzeptor der Pflanze, der über noch nicht aufgeklärte

Signaltransduktionswege zur Expression der Resistenzmechanismen führt. Dabei geht man davon aus, daß mikrobielle Pathogene Avirulenzgene (*avr*) exprimieren, für die die Pflanzen komplementäre Resistenzgene (*R*) besitzen. Durch Expression der *avr*-Gene wird im Pathogen eine hochspezifische Substanz synthetisiert, die nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip auf einen spezifischen Akzeptor des Wirtes paßt. Die Struktur des Akzeptormoleküls soll im *R*-Gen des Wirtes kodiert sein. Nur wenn es zur Wechselwirkung dieser beiden Moleküle kommt, können spezifische Abwehrreaktionen wie zum Beispiel die Phytoalexinbildung und die Induktion der PR-Proteine ausgelöst werden (**Flor 1971, Hock und Elstner 1988, Keen 1990**).

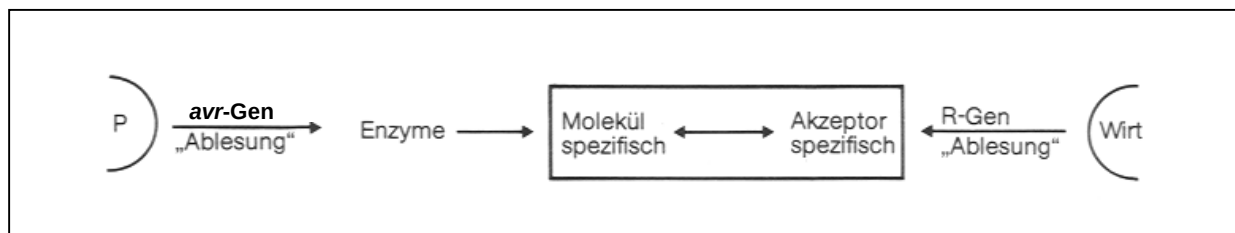


Abb. 1.10: Das „Gen-für-Gen-Modell“ zur Erklärung der inkompatiblen Wirt-Pathogen-Interaktion. Das Ablesen eines Avirulenz-Gens (*avr*) des Pathogens führt zur Synthese eines spezifischen Moleküls, das mit einem Akzeptormolekül des Wirtes in Wechselwirkung tritt. Das Akzeptormolekül ist das Produkt des Resistenz-Gens (*R*) des Wirtes (**Hock und Elstner 1988, Keen 1990**).

Dieses Gen-für-Gen-Modell von Flor aus dem Jahr 1956 wurde seitdem durch eine große Anzahl Wirt-Pathogen-Interaktionen bestätigt. Das erste klonierte *R*-Protein war die Serin/Threonin-Proteinkinase *Pto* der Tomate, die für die Erkennung von *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Stämmen, die das *avrPto*-Gen exprimieren, verantwortlich ist (**Martin et al. 1993**). Ein direktes Binden des Avirulenzproteins des Pathogens an das korrespondierende *R*-Protein des Wirtes konnte für das Pathosystem *Pto-avrPto* im Jahre 1996 gezeigt werden (**Tang et al. 1996**). Diese spezifische Erkennung des Pathogens durch die Pflanze führt zu schnellen induzierbaren Abwehrmechanismen, die der Pflanze letztendlich die Resistenz verleihen.

Neben Elicitoren wurden auch Suppressoren gefunden, welche die Wirkung von Elicitoren hemmen. Das „Elicitor-Suppressor-Modell“ geht davon aus, daß es bei einer kompatiblen Reaktion primär zu einer Bindung zwischen einem Suppressor und dem spezifischen Akzeptor kommt. Diese Wechselwirkung führt aber nicht zur Freisetzung von endogenen Elicitoren.

Die Abbildung 1.11 zeigt das Prinzip des Elicitor-Suppressor-Modells.

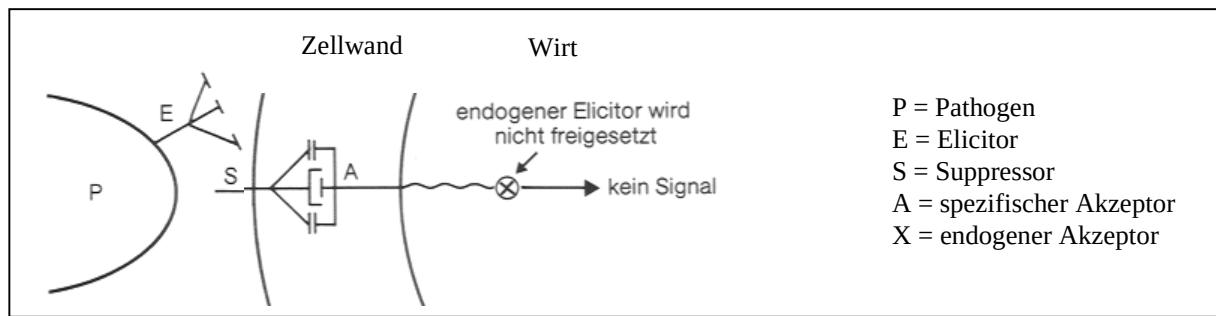


Abb. 1.11: Das „Elicitor-Suppressor-Modell“ beschreibt die hemmende Wirkung von Suppressoren auf die Wirkung von Elicitoren. Durch Bindung eines Suppressors an das spezifische Akzeptormolekül des Wirtes kommt es nicht zur endogenen Signalweiterleitung (**Hock und Elstner 1988**).

Solche Suppressoren der hypersensitiven Reaktion (HR), auch HIF ("hypersensitivity inhibiting factor") genannt, die anstelle von Elicitoren binden, konnten zum Beispiel bei der Wirt-Parasit-Beziehung zwischen der Kartoffelsorte Kennebec und dem Pathogen *Phytophthora infestans* nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich ebenfalls um Oligosaccharide (**Hock und Elstner 1988**).

1.6.1.3 Änderungen des Membranpotentials, Ionenströme und Phosphorylierungen

Das Primärsignal des Signaltransduktionsweges wird durch die Bindung des Avirulenzproteins des Pathogens, des Elicitors, an das korrespondierende Resistenzprotein, den pflanzlichen Rezeptor, ausgelöst. Die endogene Weiterleitung des Elicitorsignals kann in den ersten Minuten der Pathogenantwort über verschiedene Mechanismen erfolgen. Einige Studien lassen erkennen, daß eine Änderung des Plasmamembranpotentials innerhalb weniger Minuten mit der Weiterleitung des Elicitorsignals korreliert (**Dixon et al. 1994**).

Diese Änderung des Plasmamembranpotentials bewirkt eine Änderung von Ionenströmen. An transgenen Pflanzen konnte ein schneller Anstieg der Calciumkonzentration aufgrund eines Elicitorsignals nachgewiesen werden. Eine erhöhte Konzentration an zellulären Calciumionen induziert die Phytoalexinsynthese und den "Oxidative Burst" (**Kurosaki et al. 1987, Dixon et al. 1994**). Das Calcium-bindende Protein Calmodulin ist in einigen untersuchten Fällen ebenfalls an der Phytoalexinsynthese beteiligt (**Kurosaki et al. 1993, Vogeli et al. 1992**).

Die zelluläre Calciumionenkonzentration spielt auch eine Rolle bei der Aktivierung der Signaltransduktion mittels Phosphorylierung (**Dietrich et al. 1990**). So werden Proteinphosphorylierungen durch Calcium und Ethylen vermittelt und führen damit zur Expression von PR-Proteinen und Induktion von Microläsionen (**Raz und Fluhr 1992, Raz und Fluhr 1993**).

1.6.2 Mittlere Phase der pflanzlichen Pathogenantwort

1.6.2.1 Induktion endogener Sekundärsignale

Die Induktion der Abwehrmechanismen geht oft mit der transkriptionellen Aktivierung einer ganzen Reihe von pflanzlichen Abwehrgenen in den ersten Stunden der Pathogenantwort einher (**Dixon et al. 1994**). Die Induktion der Abwehrmechanismen erfordert die Synthese endogener Sekundärmoleküle an der Infektionsstelle, auch Stresshormone genannt. Sie schalten Signaltransduktionskaskaden an, die zur Aktivierung der für die Pathogenantwort verantwortlichen Gene führen. Diese endogenen Sekundärsignale dienen dazu, nach der initialen Pathogenerkennung die pflanzliche Reaktion zu verstärken und breit zu fächern (**Penninckx et al. 1998**). Einige sekundäre Signalmoleküle sind bereits isoliert und charakterisiert worden, unter anderem Salicylsäure, Wasserstoffperoxid und Ethylen (**Vernooij et al. 1994, Alvarez et al. 1998, Raz und Fluhr 1993**).

Salicylsäure wird aus Phenylalanin über Zimtsäure und Benzoessäure gebildet. Dabei wird Phenylalanin über den Shikimatweg synthetisiert. Durch induzierte Synthese an der Infektionsstelle akkumuliert Salicylsäure, inhibiert damit SABP, eine Catalase, so daß es zu einem drastischen Anstieg von Wasserstoffperoxid und ROIs ("reactive oxygen intermediates") kommt (**Shirasu et al. 1997, Chen et al. 1995**). Die Salicylsäure-Akkumulation bewirkt schließlich als diffuses, interzelluläres Signal an der Infektionsstelle die Induktion von Abwehrgenen wie PR-1-Gen (**Chen et al. 1995, Ward 1991**). Weiterhin wird Salicylsäure auch im Rahmen der systemischen Resistenz in nicht infizierten Geweben synthetisiert, so daß die gleichen Resistenzmechanismen, wie bei der lokalen Resistenz, induziert werden (**Vernooij et al. 1994**).

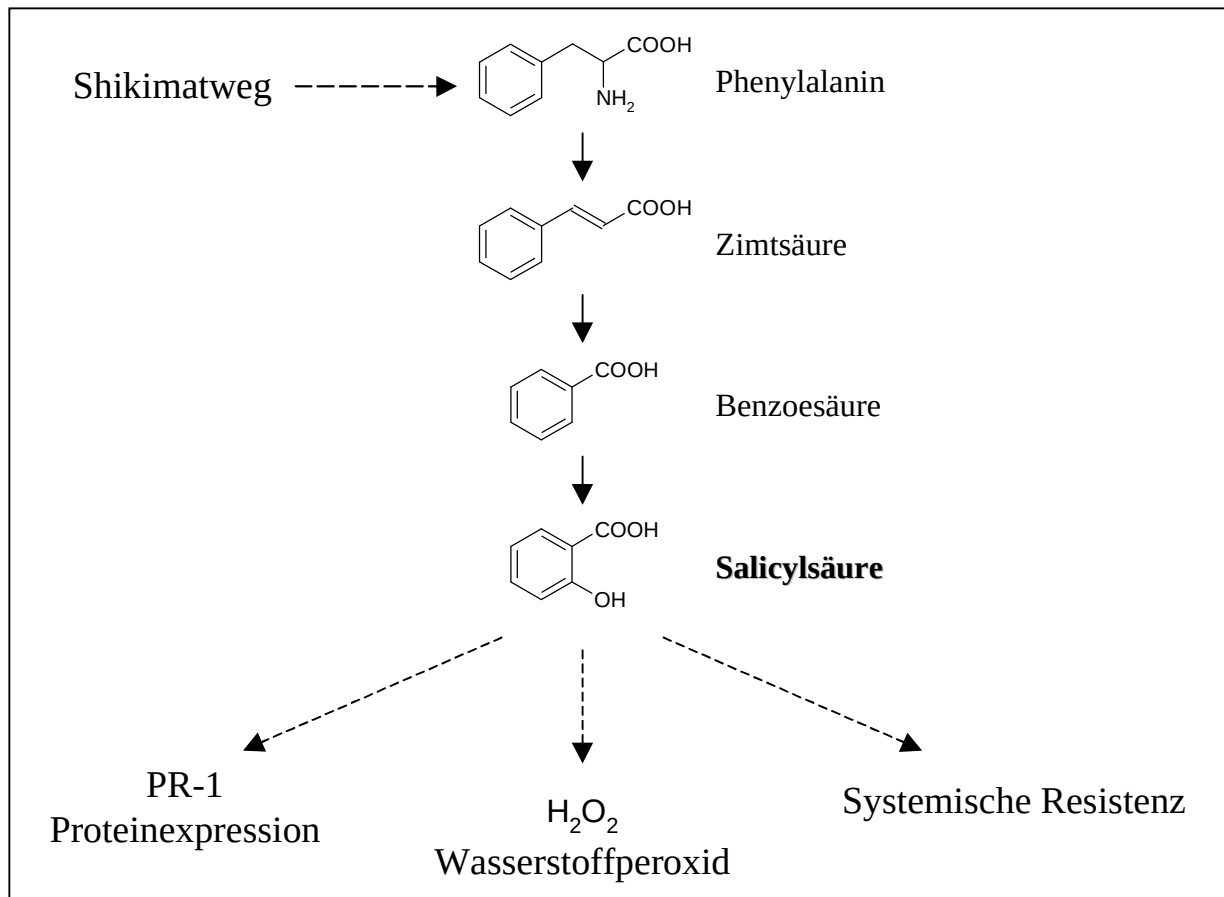


Abb. 1.12: Induktion und Wirkung von Salicylsäure als endogenes Sekundärmolekül für die Signalweiterleitung und breite Fächerung der pflanzlichen Pathogenabwehr.

Der Sekundärbotenstoff Wasserstoffperoxid wiederum stimuliert die Salicylsäure-Synthese (**Neuenschwander et al. 1995, Summermatter et al. 1995, Léon et al. 1995, Wu et al. 1997**). Zusätzlich verstärkt es multiple Abwehrmechanismen wie die oxidative Vernetzung eines hydroxyprolinreichen Glycoproteins (HRGP), eines der am häufigsten vertretenen Proteine der Zellwand, zur Stärkung struktureller Barrieren und die Expression der Glutathion-S-Transferase als Oxidationsschutz für das an die Infektionsstelle und damit auch an die Läsion angrenzende Gewebe (**Bradley et al. 1992, Brisson et al. 1994, Levine et al. 1994**). Weiterhin fungiert Wasserstoffperoxid als Sekundärbotenstoff für verschiedene Cytokine und Wachstumsfaktoren (**Lo und Cruz 1995**). Und es ist wie die Salicylsäure ebenfalls an der Aktivierung von Abwehrgenen, wie das Protein PR-1, und an der Vermittlung der systematischen Resistenz beteiligt (**Chen et al. 1995, Ward 1991, Alvarez 1998**).

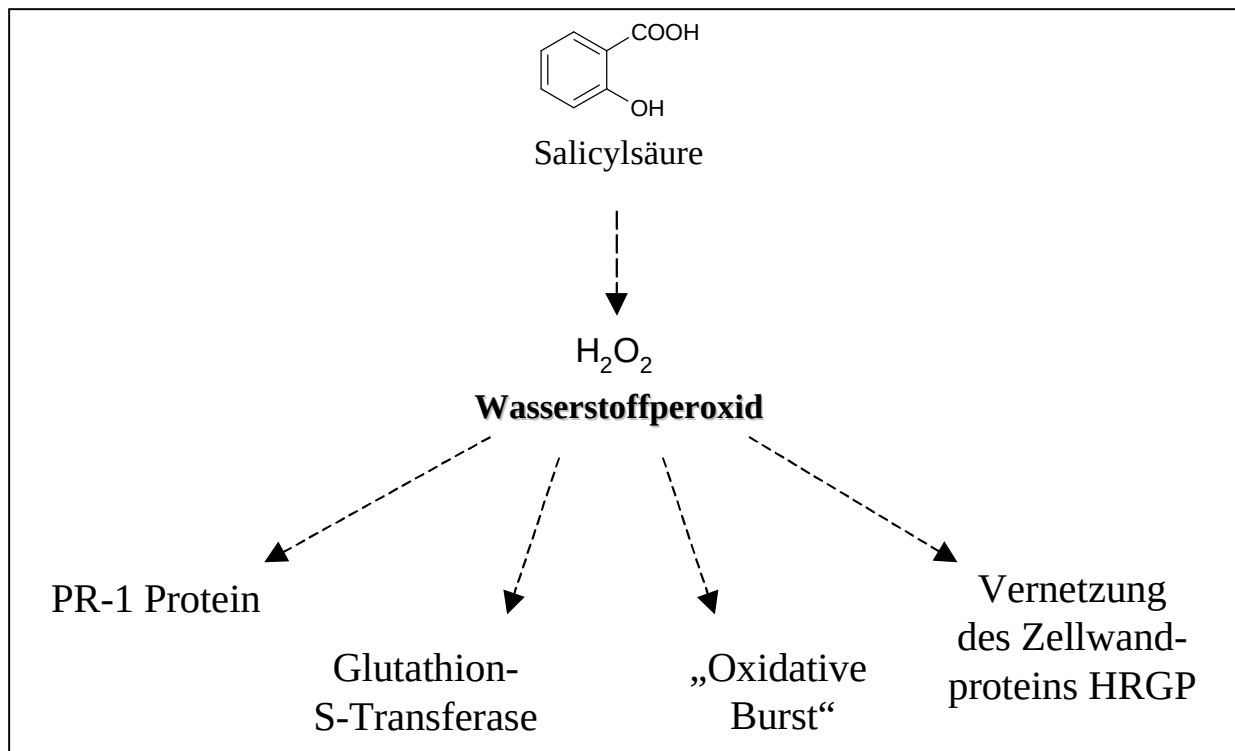


Abb. 1.13: Induktion und Wirkung von Wasserstoffperoxid als endogenes Sekundärsignal für die Einleitung diverser Abwehrmechanismen.

Ethylen ist ein gasförmiges Pflanzenhormon und nimmt eine wichtige Rolle bei der Pflanzenentwicklung, der Fruchtreife und der Pathogenantwort ein. Die Ethylenbiosynthese steigt sehr schnell während der inkompatiblen Pflanzen-Pathogen-Interaktion als auch bei der Anwendung von Elicitoren wie α -Aminobutyrat (α -AB), das die Ethylenproduktion fördert und für dessen Reaktionen Ethylen erforderlich ist, an (**Ecker und Davis 1987, Lotan und Fluhr 1990**). Dabei wird die Ausgangssubstanz S-Adenosylmethionin mittels der Aminocyclopropan-Carboxylat-Synthase, abgekürzt ACC-Synthase, zu Aminocyclopropancarboxylat gespalten. Durch eine ACC-Oxidase zerfällt das Cyclopropan oxidativ zu Ethylen, Kohlendioxid, Blausäure und Wasser. Die gebildete Blausäure reagiert sofort weiter zu β -Cyanoalanin und wird damit entgiftet (**Heldt 1996**). Ethylen induziert sowohl über freigesetztes Calcium im Cytosol als auch durch schnelle Polypeptidphosphorylierungen die Genexpression von PR-Proteinen und die Entstehung von Microläsionen (**Raz und Fluhr 1992**). Ethylen hat weiterhin Einfluß auf die Induktion der Genexpression einiger Isoformen des Enzyms Glutathion-S-Transferase und von hydroxyprolinreichen Glycoproteinen (HRGP), eines der am häufigsten vertretenen Proteine der Zellwand (**Zhou und Goldsbrough 1993, García-Muniz et al. 1998**).

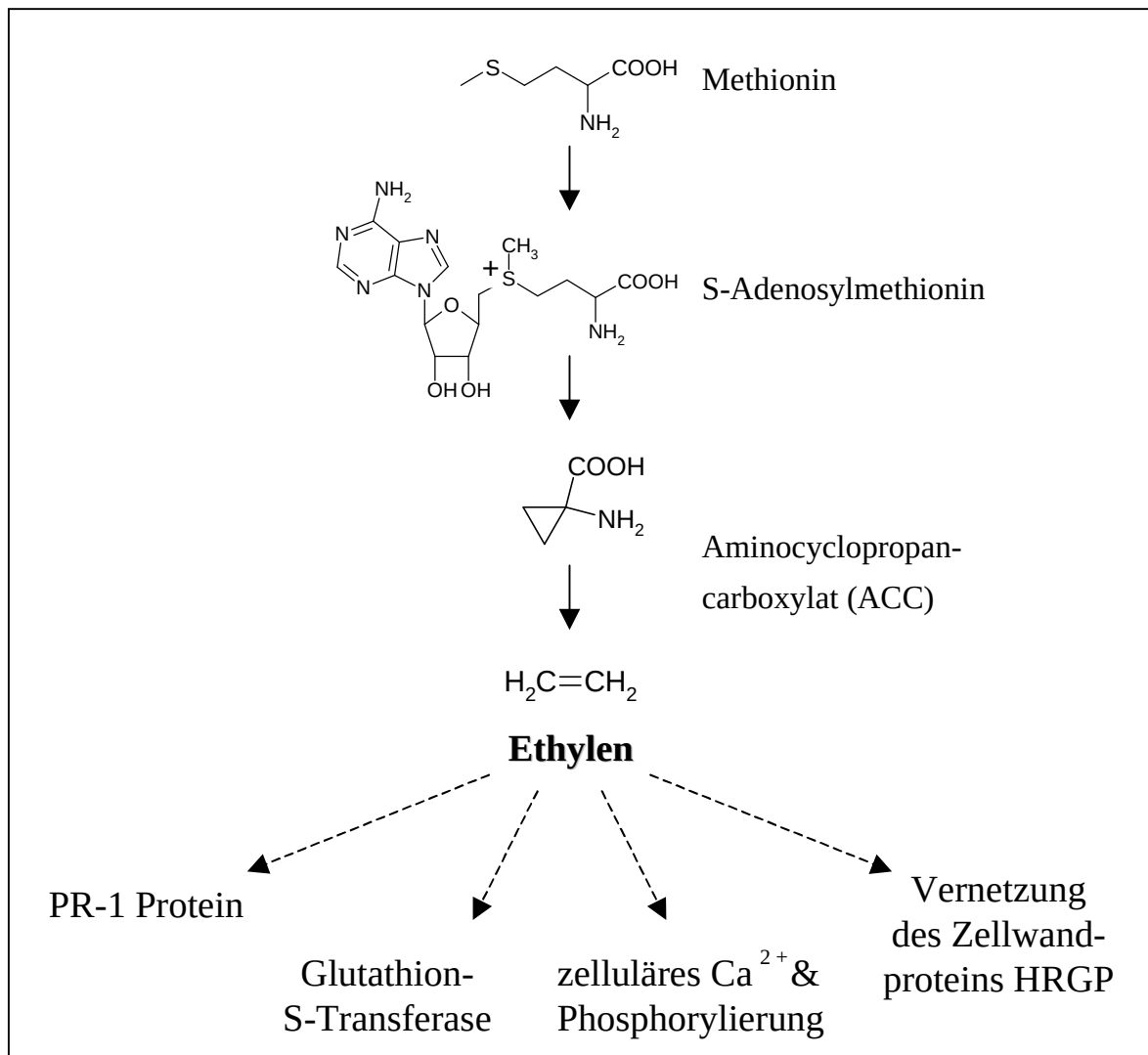


Abb. 1.14: Synthese von Ethylen und seine Wirkung als Sekundärbotenstoff.

1.6.2.2 "Oxidative Burst"

Durch die Vermittlung von Salicylsäure wird die Peroxidation stimuliert. Durch eine rasche Synthese von reaktiven Sauerstoffintermediaten kommt es an der Infektionsstelle zu einer Akkumulation von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Superoxid-Anionen (O_2^-). Diese Akkumulation reaktiver Sauerstoffintermediate wird "Oxidative Burst" genannt. Dieser "Oxidative Burst" induziert ein Muster von zellulären Abwehrgenen, wie der Phytoalexin-Akkumulation, dient aber auch als lokaler Auslöser des programmierten Zelltods, auch Apoptose genannt (**Levine et al. 1994**). Dabei konnten typische Merkmale wie Kernkondensation und DNA-Fragmentierung beobachtet werden, die zu Microläsionen führen (**Alvarez et al. 1998**).

1.6.2.3 Transkriptionelle Aktivierungen im Shikimat- und Phenylpropanoidsyntheseweg

Der Shikimatweg ist ein essentieller Stoffwechselweg der Pflanze, der nicht nur Vorstufen für die Synthese von aromatischen Aminosäuren zur Verfügung stellt, sondern auch eine große Vielfalt von Sekundärmetaboliten (**Hermann 1995**). Zu diesen Sekundärmetaboliten gehören auch einige Substanzen der pflanzlichen Pathogenabwehr.

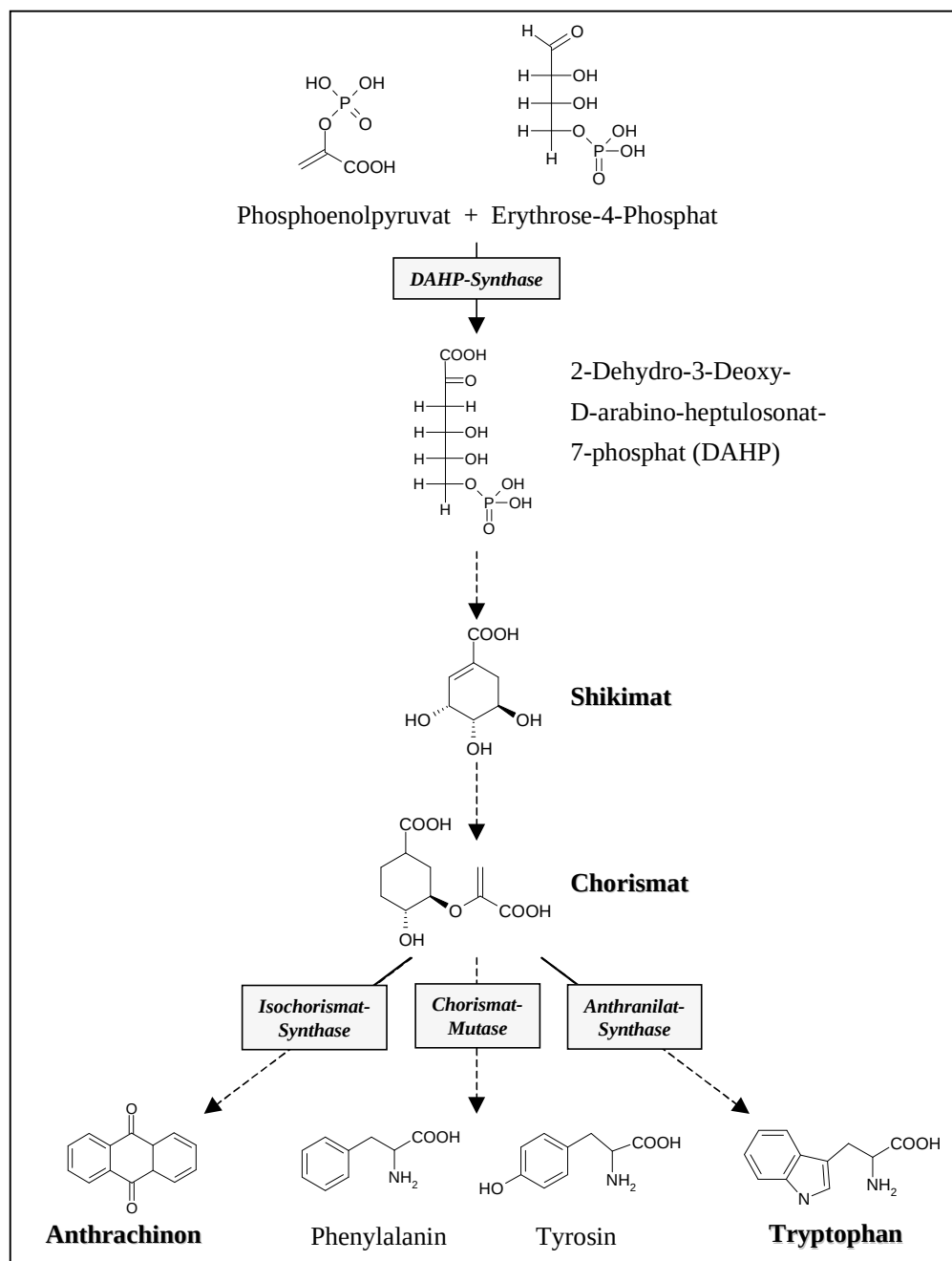


Abb. 1.15: Schematische Übersicht über den Shikimatweg und die bisher bekannten, durch Pathogeninfektion transkriptionell aktivierten Enzyme.

Die Biosynthese der Shikimisäure beginnt mit der Bildung von 3-Deoxy-2-dehydro-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat (DAHP) mit Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-Phosphat aus dem Pentosephosphat-Cyclus. Ihr Kondensationsprodukt wird cyclisiert und durch die Bildung einer Doppelbindung entsteht Shikimat. Durch die Einführung eines weiteren Moleküls Phosphoenolpyruvat entsteht Chorismat. Chorismat ist ein Verzweigungspunkt für verschiedene Reaktionswege, die über die Isochorismat-Synthase zu Anthrachinon und Phyllochinon, über die Anthranilat-Synthase zu Tryptophan und über die Chorismat-Mutase zu Phenylalanin und Tyrosin führen können.

Die Transkription der DAHP-Synthase konnte durch pilzliche Elicitoren stimuliert werden (**McCue et al. 1989, Henstrand et al. 1992**). Ebenso konnte dies für die Isochorismat-Synthase, die Chorismat-Mutase und die Anthranilat-Synthase gezeigt werden (**van Tegelen et al. 1999, Eberhard et al. 1996, Bohlmann et al. 1995**). Der Stoffwechselweg von Tryptophan konnte durch Aminosäuremangel, oxidativen und abiotischen Streß aktiviert werden. Dies zeigt, daß die Enzyme des Tryptophan-Stoffwechsels nicht nur der Regulation zur Synthese aromatischer Aminosäuren, sondern auch der Regulation zur Biosynthese von Sekundärmetaboliten für Abwehrmechanismen unterliegen (**Zhao et al. 1998**).

Phenylpropanoide ist der Sammelbegriff für eine große Zahl pflanzlicher Moleküle, die sich von Phenylalanin ableiten. Phenylalanin stellt die Ausgangsverbindung für den Phenylpropanoid-Syntheseweg dar, aus dem die Vorstufen einer Vielzahl von Substanzen hervorgehen, die unter anderem für die pathogen-induzierte Immunantwort gebraucht werden. Zu diesen pathogen-induzierten Substanzen gehört unter anderem Salicylsäure (**Vernooij et al. 1994**). Die Abspaltung von Ammoniak durch die Phenylalanin-Ammonia-Lyase (PAL) führt zu *trans*-Zimtsäure. Dieses Enzym wird durch Licht oder Infektion induziert und durch sein Produkt über eine Rückkopplung inhibiert (**Michal 1999, Kuhn et al. 1984**). Verschiedene phenolische Verbindungen werden aus Zimtsäure synthetisiert. Biosynthesevorstufen des Lignins sind Coniferyl-, Sinapyl- und p-Cumarylalkohol. Flavonoide und Phytoalexine wie Tannine stammen ebenfalls aus diesem Biosyntheseweg. Die kondensierten Tannine werden aus Flavonoiden und die hydrolysierbaren Tannine aus Gallussäure, die wiederum aus Shikimat hergestellt wird, gebildet (**Heldt 1996**). Es findet eine koordinierte Induktion von Phenylalanin-Ammonia-Lyase, Cumarat-CoA-Ligase und Chalcon-Synthase statt, die ihr Maximum nach ca. 5 - 15 Stunden nach Pilzbefall oder Bestrahlung erreicht (**Ragg et al. 1981**). Durch 2-Hydroxylierung von 4-Cumarat entsteht 2,4-Dihydroxyzimtsäure, eine Cumarinvorstufe, die für die Synthese von

Phytoalexinen verwendet wird (**Hahlbrock und Scheel 1989**). Der Phenylpropanoid-Syntheseweg stellt damit einen wichtigen Knotenpunkt in den pathogen-induzierten Abwehrmechanismen dar (**Michal 1999**). Die Abbildung 1.16 gibt eine schematische Übersicht über den Phenylpropanoidsyntheseweg und die darin durch Pathogeninfektion transkriptionell induzierten Enzyme.

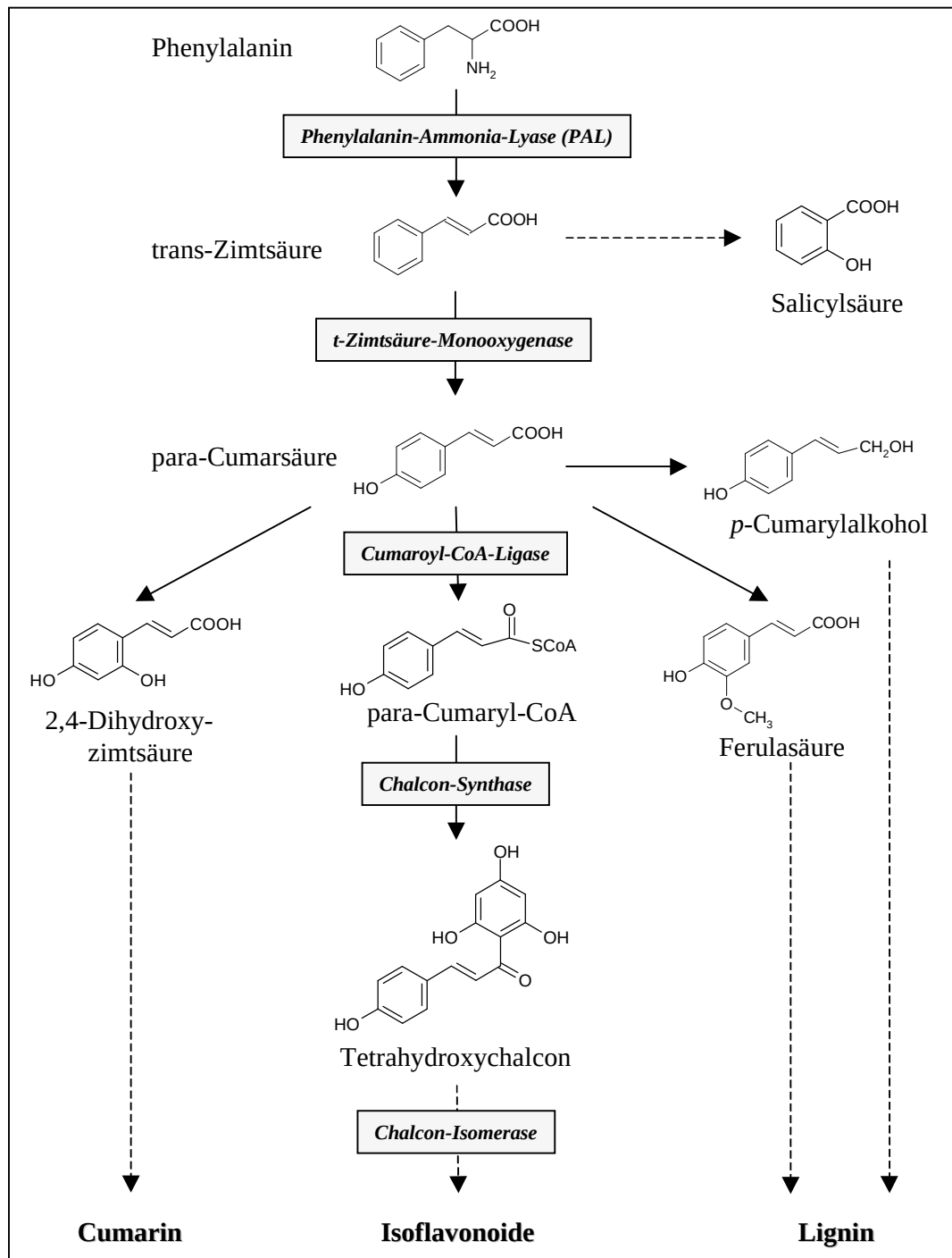


Abb. 1.16: Schematische Übersicht über den Phenylpropanoidsyntheseweg und die bisher bekannten, durch Pathogeninfektion transkriptionell aktivierten Enzyme.

1.6.3 Späte Phase der pflanzlichen Pathogenantwort

1.6.3.1 Hypersensitive Reaktion

Eine sehr weit verbreitete Strategie der induzierten Pathogenabwehr liegt bei der hypersensitiven Reaktion vor. Sie geht aus dem "Oxidative Burst" hervor und stellt die wichtigste induzierte Abwehrmaßnahme dar, da sie gegen fast alle Arten von biotrophen Pathogenen wirkt. Die Wirtszellen an der Infektionsstelle sterben durch programmierten Zelltod ab, um den Erreger an einer weiteren Ausbreitung zu hindern (**Brunold, Rügsegger und Brändle 1996**). Es bildet sich in fortgeschrittenem Stadium des "Oxidative Burst" ein Hof toten Gewebes um die Eindringstelle des Erregers. Diese induzierte Abwehrreaktion wird "Abwehrnekrose", "Läsion" oder auch "hypersensitive Reaktion" (HR für "hypersensitive response") genannt. Diese hypersensitive Reaktion an der Angriffsstelle des Pathogens ist klar vom umgebenden, gesunden Gewebe abgegrenzt (siehe Abb. 1.17) (**Alvarez et al. 1998**).



Abb. 1.17: Hypersensitive Reaktion von *A. thaliana* als Antwort auf den Befall des avirulenten Bakteriums *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Abbildung von Nikolaus Schlaich).

Die exakte Regulation der Läsionen ist noch unklar, aber sie lassen erkennen, daß das Pathogen erkannt und weitere Abwehrmechanismen eingeleitet wurden. So wurde eine Korrelation zwischen hypersensitiver Reaktion und Phytoalexin-Akkumulation gefunden (**Brunold, Rügsegger und Brändle 1996**).

1.6.3.2 Phytoalexinsynthese

Eine weitere spezifisch induzierte Reaktion der Pflanze auf Pathogenbefall ist die Synthese von Phytoalexinen. Zum ersten Mal wurde diese Substanzklasse im Jahre 1940 von Müller und Böger beschrieben, die feststellten, daß der Erreger der Kartoffelfäule *Phytophthora infestans* in Kartoffelpflanzen einige Zeit nach der Infektion die Bildung eines Stoffes induziert, der das Wachstum des Pathogens hemmt. Sie nannten diesen Abwehrstoff Phytoalexin. Heute gehören zu dieser Gruppe über 350 niedermolekulare Verbindungen mit antimikrobieller Wirkung (**Mohr und Schopfer 1992**). Starke Hinweise auf eine tragende Rolle der Phytoalexine bei der pflanzlichen Pathogenabwehr sind die zeitliche, räumliche und quantitative Übereinstimmung zwischen Phytoalexingehalt und Position des Pathogens im infizierten Gewebe. Phytoalexine sind hauptsächlich in folgenden Sekundärmetabolitenklassen zu finden: Phenolische Verbindungen, Terpenoide und Polyacetylene. Sie werden durch eine erhöhte Synthese der jeweilige Vorstufen gebildet. Diese Aussage wird bestätigt durch eine erhöhte Aktivität der an der Phytoalexin-Biosynthese beteiligten Enzyme, welche kurz nach Infektion *de novo* gebildet werden (**Tsuji et al. 1992, Brunold, Rügsegger und Brändle 1996**). Über die genaue Wirkungsweise der Phytoalexine ist aber noch immer sehr wenig bekannt.

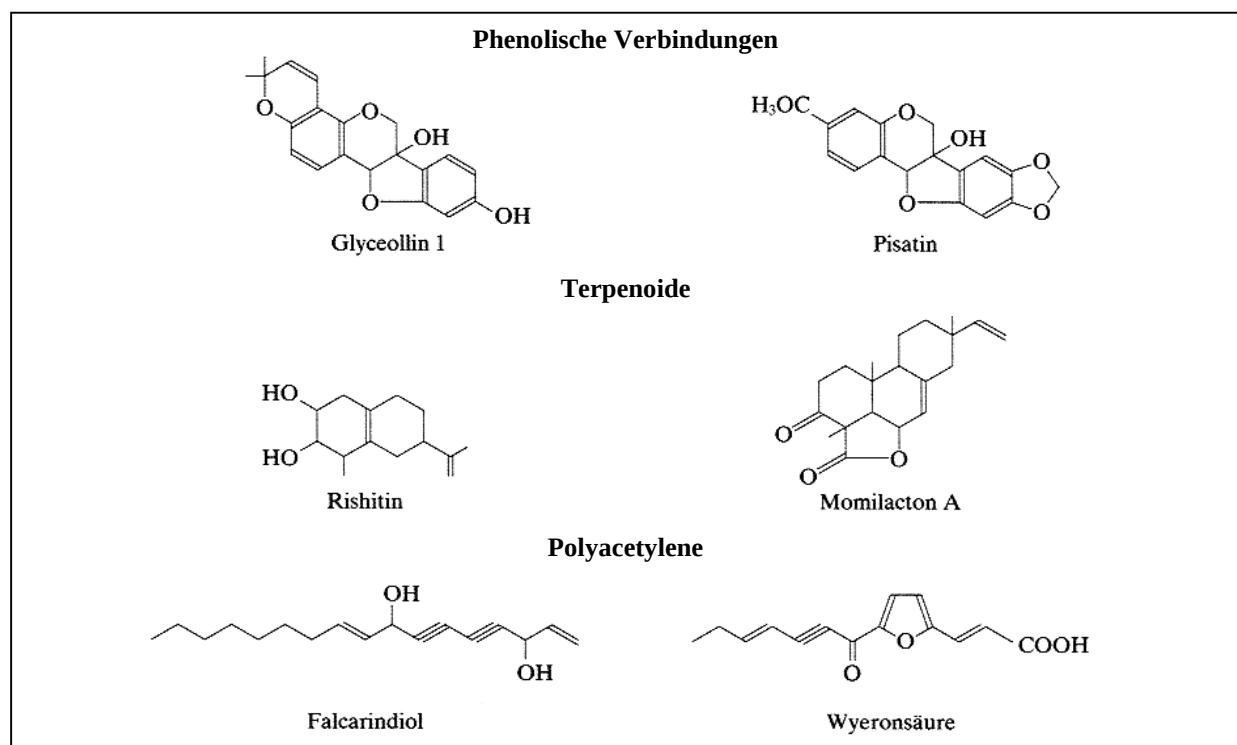


Abb. 1.18: Phytoalexine: Glyceollin (*Glycine max*), Pisatin (*Pisum sativum*), Rhishitin (*Solanum tuberosum*), Momilacton A (*Oryza sativa*), Falcarrindiol (*Lycopersicon esculentum*), Wyeronsäure (*Vicia faba*) (**Brunold, Rügsegger und Brändle 1996**).

1.6.3.3 Induktion von PR-Proteinen

Sehr oft werden von der Pflanze neue Proteine nach Infektion eines Pathogens gebildet. Diese Proteine stehen offenbar in einem Zusammenhang mit der Pathogenabwehr, und man bezeichnet sie deshalb als PR-Proteine ("pathogenesis related"). Aminosäuresquenzvergleiche von PR-Proteinen aus verschiedenen Pflanzen erlaubten eine Klassifizierung in Familien, wie sie in Tabelle 1.1 aufgelistet sind (**Brunold, Rügsegger und Brändle 1996**).

<i>Name der PR-Familie</i>	<i>Funktion</i>	<i>Aktivität</i>
PR1	Unbekannt	z. T. antifungal
PR2	β -1,3-Glucanase	z. T. antifungal
PR3	Chitinase/Lysozym	z. T. antifungal
PR4	Unbekannt	z. T. antifungal
PR5	Unbekannt	z. T. antifungal
Andere PR-Proteine	Proteaseinhibitoren, Peroxidase, Thionine, α -Amylase	z. T. antifungal

Tab. 1.1: PR-Proteinfamilien z. B. beim Tabak (**Brunold, Rügsegger und Brändle 1996**).

Den meisten bisher identifizierten PR-Proteinen konnte noch keine biologische Funktion zugeordnet werden. Zu den wenigen PR-Proteinen mit bekannter Funktion gehören unter anderem das PR-2-Protein 1,3- β -Glucanase (**Kauffmann et al. 1987**) und das PR-3-Protein Chitinase (**Legrand et al. 1987**), zwei Hydrolasen, die spezifisch gegen das Chitin und die Callose pilzlicher Zellwände gerichtet sind (**Mauch et al. 1988**). *In vitro* Wachstumstests haben gezeigt, daß Mischungen von Chitinasen und Glucanasen eine fungitoxische Wirkung haben können (**Zhu et al. 1994**). Transgene Pflanzen, die Chitinase konstitutiv exprimieren, zeigten eine erhöhte Resistenz gegenüber pathogenen Pilzen (**Broglie et al. 1991**). Auch das PR-1-Protein verleiht gegenüber zwei verschiedenen Pathogenen Resistenz, wenn es in transgenem Tabak exprimiert wird (**Alexander et al. 1993**). Die Synthese von Peroxidasen wird verständlich, wenn man eine oxidative Schädigung des Pathogens durch die hypersensitive Reaktion annimmt, jedoch einen optimalen Schutz des angrenzenden Pflanzengewebes voraussetzt (**Hock und Elstner 1988**). PR-Proteine werden daher bei Untersuchungen oft als Marker für die pflanzliche Pathogenabwehr verwendet. Wie die meisten PR-Proteine zu einem Schutz der Pflanze beitragen, ist noch nicht aufgeklärt.

1.6.3.4 Induzierte Genexpression der Glutathion-S-Transferasen

Glutathion-S-Transferasen katalysieren die Thioetherbildung der stark reaktiven SH-Gruppe des Glutathions mit aktiven Kohlenstoffverbindungen, Carbonylgruppen sowie anderen reaktiven Gruppen. Diese Glutathionkonjugate können über einen Glutathion-Translokator unter ATP-Verbrauch in Vakuolen gepumpt werden. Damit werden giftige Substanzen, die die Zelle gebildet oder aufgenommen hat (Xenobiotika), unschädlich gemacht (**Heldt 1996**). Glutathion-S-Transferase ist somit im zellulären Metabolismus an Detoxifizierungsreaktionen beteiligt (**Pickett und Lu 1989**). Die Genexpression dieses Enzyms wird durch Ethylen und Wasserstoffperoxid induziert. Der genaue Mechanismus ist allerdings noch unklar (**Zhou et al. 1993, Itzhaki und Woodson 1993, Levine 1994**).

1.6.3.5 Lignifizierung

Eine ausgeprägte strukturelle Antwort auf den Befall durch Mikroorganismen ist eine erhöhte Ligninbildung in der Zellwand der Zellen, die sich ringförmig um das befallene Gewebe befinden.

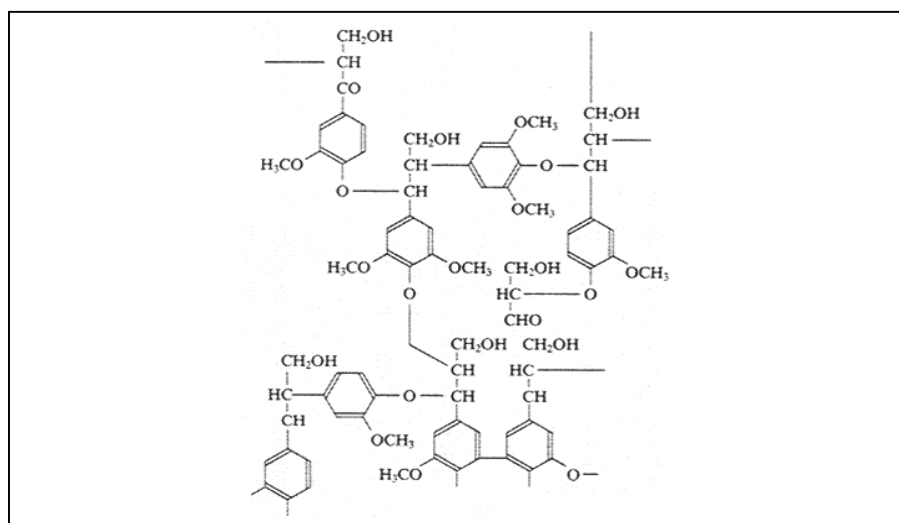


Abb. 1.19: Strukturausschnitt des Lignins, das aus Substanzen des Phenylpropanoidsyntheseweges gebildet wird und die zelluläre Zellwand mechanisch verstärkt.

Dabei wird im Shikimatweg aus Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-phosphat Phenylalanin und Tyrosin gebildet. Durch Desaminierung des Phenylalanins entsteht Zimtsäure und anschließend durch Hydroxylierung p-Cumarsäure, die auch direkt aus Tyrosin durch Desaminierung gebildet werden kann. Aus p-Cumarsäure entstehen Ferulasäure und

Sinapinsäure. Durch Reduktion dieser Säuren entstehen die Bausteine der Ligninbiosynthese, Coniferyl-, Sinapyl- und p-Cumarylalkohol. Der Angriff von Peroxidasen und Wasserstoffperoxid wandelt diese Alkohole zu mesomerie-stabilisierten Alkyl-Radikalen um, die dann in vielfältiger Weise zu einem dreidimensionalen Netzwerk, dem Lignin, polymerisieren. Wie die Ligninbildung die Pathogenabwehr genau unterstützt, ist immer noch unklar. Eine mögliche Erklärung liegt darin, daß Lignin die Zellwand mechanisch verstärkt, so daß die Durchdringung oder der enzymatische Abbau der Zellwand stark abgebremst wird. Weiterhin wirkt Lignin hydrophob und kann so die Diffusion von pathogeninduzierten Angriffsenzymen oder Toxinen auf dem Weg zur Zellmembran stoppen. Drittens wirken unpolymersierte Ligninvorstufen wie z. B. Coniferyl-Alkohol giftig auf Pilze (**Brunold, Rüeßegger und Brändle 1996**).

1.6.3.6 Kohlenhydrateinlagerung

Ein weiterer induzierbarer, struktureller Abwehrmechanismus ist die Kohlenhydrateinlagerung, vor allem von Callose und Cellulose. Diese Polyglucane werden z. B. nach Penetration eines Pilzes zwischen Zellwand und Plasmalemma eingelagert und können kugel- oder papillenförmiges Aussehen annehmen. Die der Eindringstelle des Pathogens benachbarten Zellen sind ebenfalls in der Lage, durch neu gebildete Kohlenhydrate ihre Sekundärwände zu verdicken. So kann bei resistenten Bohnen z. B. die Zellwand das fünffache ihrer normalen Dicke erreichen (**Hock und Elstner 1988**).

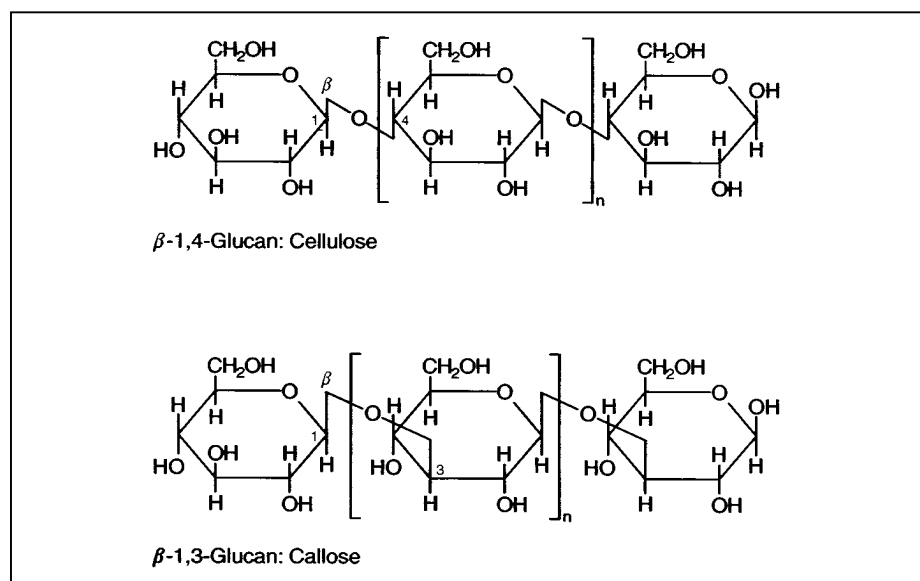


Abb. 1.20: Die nach Infektion eingelagerten Kohlenhydrate Cellulose und Callose (**Heldt 1996**).

1.6.4 Systemische Resistenz

Die bisher erwähnten induzierten Abwehrmechanismen werden meistens an der Angriffsstelle des Pathogens ausgelöst und somit räumlich gezielt durch die Pflanze angewendet. Diese **"lokale Resistenz"** ist bei natürlichen Infektionen häufig durch mikroskopische Läsionen gekennzeichnet, erst unter Laborbedingungen mit unnatürlich hohen Pathogendosen treten makroskopische Nekrosen auf. Diese Abwehrreaktion der Pflanze läßt erkennen, daß das Pathogen von der Pflanze erkannt wurde.

Die **"systemische Resistenz"** ist ein integraler und wichtiger Bestandteil der pflanzlichen Pathogenabwehr. Dabei lösen nekrotisierende Infektionen eine Schutzreaktion aus, die nicht nur im unmittelbar infizierten Pflanzenteil, sondern auch in nichtinfizierten Gewebeteilen wirkt (**Gaffney et al. 1993**). Die systemisch erworbene Pathogenresistenz wird durch eine vorausgegangene Primärinfektion eingeleitet. Eine aus der Pathogenerkennung resultierende Nekrose induziert Salicylsäure, die ebenso wie Wasserstoffperoxid das Pathogen zuerst lokal an seiner Verbreitung hindert. Ein endogenes Signalmolekül, abgekürzt LDS (engl. "long distance signal"), transportiert die Information einer Infektion in weiter entfernte, nichtinfizierte Gewebe. Dort wird nun wieder die Salicylsäure-Akkumulation stimuliert, und die gleichen Abwehrmechanismen wie bei der lokalen Resistenz werden induziert. Als ein solches LDS werden Wasserstoffperoxid und ROIs beschrieben, die parallel zur lokalen Pathogenantwort auch systemisch in micro-hypersensitiven Reaktionen gefunden werden. Sie werden in einem iterativen Prozeß über einen längeren Zeitraum immer wieder neu synthetisiert und erhalten damit die systemisch erworbene Resistenz über einen Zeitraum von mehreren Wochen und leiten damit auch das Signal weiter (**Vernooij et al. 1994**).

Ein Paradebeispiel für diese systemisch induzierte Resistenz ist die Gurke, an der gezeigt wurde, daß die Infektionen eines unteren Blattes mit pilzlichen, bakteriellen oder viralen Pathogenen einen breiten Schutz in den oberen Blättern gegen pilzliche, bakterielle oder virale Pathogene auslöst (**Métraux et al. 1990**). Der Schutz ist somit von der Natur des resistenz-induzierenden Erregers unabhängig. Ähnliche Beispiele von systemisch induzierter Resistenz sind auch bei Tabak, Tomate, Kartoffel, Bohne, Arabidopsis und Reis bekannt (**Brunold, Rügsegger und Brändle 1996**). Die systemische Resistenz korreliert dabei streng mit der koordinierten Expression sogenannter SAR-Gene, die auch für PR-Proteine kodieren (**Ward et al. 1991, Uknes et al. 1993**). Diese Proteine scheinen also eine tragende Rolle in der Aufrechterhaltung der Krankheitsresistenz zu spielen.

1.7 Die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* als Untersuchungsobjekt

Arabidopsis thaliana ist eine Blütenpflanze, die seit über 50 Jahren Anwendung als Studienobjekt in der klassischen Pflanzengenetik findet. Bereits 1943 sprach Laibach die Vorzüge dieser Pflanze für die Arbeit im Laboratorium an, und schon 1946 wurde sie von Whyte als "botanische Drosophila" bezeichnet (**Laibach 1943, Whyte 1946, Meyerowitz 1989**).

Arabidopsis thaliana wird im Volksmund häufig auch als Gänsekresse bzw. Ackerschmalwand bezeichnet. Sie ist eine dikotyle, zu den Kreuzblütlern (Cruciferae, Brassicaceae) gehörende, weltweit verbreitete Blütenpflanze. Damit gehört *Arabidopsis thaliana*, die selbst keine Nutzpflanze ist, zur Familie der Cruciferae, die als Quelle von Gemüsesorten wie Kohl, Rettich und Meerrettich, von Ölsorten wie Raps sowie von Gewürzen wie verschiedenen Senfsorten von ökonomischem Gewicht ist (**Meyerowitz und Somerville 1994**).

Arabidopsis thaliana besitzt viele Eigenschaften, die sie zum attraktiven Modellorganismus in der Pflanzengenetik gemacht haben. Die Pflanze ist von geringer Größe, leicht zu kultivieren und hat eine schnelle Generationszeit von ca. 4 - 6 Wochen. Sie lässt sich in großer Anzahl auf engstem Raum anzüchten und bringt damit beste Voraussetzungen für die Anzucht im Gewächshaus mit. Die Befruchtung von *Arabidopsis thaliana* erfolgt durch Selbstbestäubung, die zu einer Samenproduktion von bis zu 10.000 Samen pro Pflanze führen kann, und erlaubt damit neue homozygote Mutationen mit minimalem Aufwand (**Redei 1975, Meyerowitz und Pruitt 1985**).



Abb. 1.21: Die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*

Das haploide Genom der Pflanze weist fünf Chromosomen auf und ist mit ca. 130 Mbp das kleinste bekannte Genom unter den Blütenpflanzen. Dies erleichtert die Handhabung von genetischen Screens zur Identifizierung interessanter Gene. Im Vergleich zu anderen Pflanzen enthält das Genom von *Arabidopsis thaliana* sehr wenige repetitive DNA-Sequenzen. Genfamilien sind gewöhnlich einfach organisiert, und die Gene haben in der Regel wenige und kleine Introns und liegen relativ dicht nebeneinander (**Leutwiler et al. 1984, Meyerowitz und Pruitt 1985, Pruitt und Meyerowitz 1986, Goodman et al. 1995, Wambutt et al. 2000**).

Im Jahr 1990 trat die *Arabidopsis*-Forschung in die neue Ära der Genomanalyse ein. Da die Pflanze genetischen und molekularbiologischen Methoden gegenüber leicht zugänglich ist, entstanden viele Mutanten, YAC- und BAC-Bibliotheken sowie DNA-Banken. So konnten durch die Entwicklung einfacher und effizienter Methoden zur chemischen Mutagenese und zur Insertionsmutagenese mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* bereits mehrere tausend *Arabidopsis*-Mutanten hergestellt werden. Die Auswirkungen bestimmter Gene im Genom können damit phänotypisch und molekularbiologisch bestimmt werden (**Martinez-Zapater und Salinas 1998, Chang et al. 1994**). YAC- und BAC-Bibliotheken konnten erstellt werden, die als ein Satz überlappender Klone ganze Chromosomen repräsentieren und die bei der Sequenzierung und Genidentifizierung Verwendung finden (**Schmidt et al. 1995, Zachgo et al. 1996, Schmidt et al. 1997, Camilleri et al. 1998, Mozo et al. 1999**).

Weiterhin sind EST-Sequenzierungsprojekte durchgeführt worden, die eine wichtige Resource für die Genomforschung darstellen. Dazu wurden verschiedene cDNA-Bibliotheken von *Arabidopsis thaliana* erstellt, die insgesamt über 40.000 cDNA-Klone umfassen und nur den codierenden Bereich des Genoms repräsentieren. Diese Klone werden nach Ansequenzierung als ESTs ("expressed sequence tag") bezeichnet (**Rounsley et al. 1996**). Durch Sequenzvergleich der ESTs untereinander kann ein minimaler Satz an EST-cDNA-Klonen, der einen größtmöglichen Sequenz- und Genbereich abdeckt, zu einer nicht-redundanten cDNA-Bibliothek zusammengestellt werden. Eine solche nicht-redundante cDNA-Bibliothek von *Arabidopsis thaliana* wurde freundlicherweise von Herman Höfte am INRA in Versailles, Frankreich, und vom *Arabidopsis* Biological Resource Center der Ohio State University, USA, zur Verfügung gestellt und im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Durch Sequenzvergleich in öffentlichen Datenbanken konnte einer signifikanten Anzahl an ESTs eine mögliche Funktion zugeordnet werden (**Höfte et al. 1993, Newman et al. 1994**).

Im Jahre 1996 wurde die internationale "Arabidopsis Genome Initiative" (AGI) gegründet, um die Sequenzierung des Genoms von *Arabidopsis thaliana* zwischen verschiedenen Sequenzierprojekten in den USA, Japan und der Europäischen Union zu koordinieren (**Bevan et al. 1997, Meinke et al. 1998**). Die zusammenhängenden Sequenzen der Chromosomen 2 und 4 wurden bereits Ende des Jahres 1999 veröffentlicht (**Lin et al. 1999, Mayer et al. 1999**). Die Sequenzierung des gesamten Genoms von *A. thaliana*, d.h. der noch verbleibenden Chromosomen 1, 3 und 5, sollte bis zum Ende des Jahres 2000 abgeschlossen sein.

In naher Zukunft wird *Arabidopsis thaliana* die erste Pflanze mit vollständig sequenziertem Genom sein. Sie erhält damit weitere Attribute, die sie zu einem unentbehrlichen Modellorganismus für die Untersuchung nahezu aller Aspekte der Pflanzenbiologie, sowohl der klassischen Genetik als auch der Pflanzenphysiologie, Biochemie und Entwicklungsbiologie, und insbesondere auch der modernen Molekularbiologie und Genomforschung, machen. Denn Innovationen auf technischem Gebiet, wie die Anwendung der DNA-Array-Technologie für die Untersuchung komplexer Muster der Genexpression, werden durch eine Sequenzierung einer cDNA-Bibliothek und des gesamten Genoms erst möglich und damit gleichzeitig weiter vorangetrieben (**Schena et al. 1995, Marshall und Hodgson 1998, Desprez et al. 1998**).

In den letzten Jahren wurde *Arabidopsis thaliana* auch in Wirt-Pathogen-Interaktionen als Modellorganismus studiert (**Glazebrook et al. 1994**). Mit über 150 verfügbaren Wildtypisolaten (Ökotypen) liefert *A. thaliana* ausreichend Material für die genetische Analyse von resistenten Phänotypen (**Kunkel 1996**). Mittlerweile ist ein breites Spektrum von Pflanzenpathogenen bekannt, die auf ökonomisch wichtigen Nutzpflanzen vorkommen. Das Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ist ein solches Pflanzenpathogen und befällt Kreuzblütler (Cruciferae) wie *A. thaliana*, aber auch die Nutzpflanze Tomate (**Somerville und Meyerowitz 1994**). Bei den Untersuchungen der Wirt-Pathogen-Interaktion zwischen *A. thaliana* und *P. syringae* stand meist die Charakterisierung und Identifizierung der Kontrollgene für die Pathogenerkennung, die Signaltransduktion und die Genexpression der Abwehrantwort im Mittelpunkt. Das erste Kontrollgen, das bei *A. thaliana* identifiziert wurde und ebenfalls mit dem Gen-für-Gen-Modell beschrieben werden kann, ist RPS2 im Ökotyp Columbia, das Resistenz gegenüber *avrRpt2* exprimierendem *P. syringae* verleiht (**Flor 1971, Kunkel et al. 1993**). Das Protein von RPS2 besitzt eine nucleotidbindende Domäne, abgekürzt mit NBS ("nucleotide binding site"), am N-Terminus und eine Leucin-reiche Wiederholungssequenz, auch LRR ("leucine-rich repeat") genannt, am C-Terminus. Die nucleotidbindende Domäne besteht aus Motiven, die an

ATP/GTP-Bindungsstellen verschiedener Kinasen vorkommen, so daß der Funktion von RPS2 vermutlich eine Kinaseaktivität zugeschrieben werden kann (**Mindrinos et al. 1994**). Die Leucin-reiche Domäne ist weit verbreitet bei Proteinen, die in anderen Pflanzen ebenfalls Resistenz vermitteln können und wahrscheinlich in Protein-Protein-Interaktionen involviert sind (**Rothberg et al. 1990, Kobe und Deisenhofer 1993**). So verleiht das LRR-tragende N-Gen in *Nicotiana tabacum* Resistenz gegenüber dem Tabakmosaikvirus (**Whitham et al. 1994**). Trotzdem stellen sie neben den Resistenzgenen, die für eine Serin/Threonin-Kinase wie das *Pto*-Gen kodieren, eine neue Klasse von Resistenzgenen dar, die konform mit dem Gen-für-Gen-Modell sind (**Martin et al. 1993, Bent et al. 1994**). Das legt die Vermutung nahe, daß beide Resistenzgenklassen in einem Zweikomponentenmodell als unabhängige, primäre Rezeptoren für *avr*-generierte Signale fungieren, die auf dem weitergeleiteten Signaltransduktionsweg schnell konvergieren, um eine allgemeine Resistenzantwort zu induzieren (**Mindrinos et al. 1994**). Diese Beobachtungen unterstützen die zu Anfang erhobene Hypothese, daß Resistenzmechanismen zwischen *Arabidopsis thaliana* und anderen Pflanzen konserviert sind (siehe Kapitel 1.4.2).

Die Kombination aus gut untersuchtem Modellorganismus wie *Arabidopsis thaliana* und neuen Technologien wie die DNA-Array-Technologie wird weitere, wichtige Erkenntnisse im Rahmen der funktionellen Genomanalyse liefern, die auch vertikal auf andere Pflanzen, insbesondere Nutzpflanzen, übertragen werden können.

1.8 Aufgabenstellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die DNA-Array-Technologie an der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* etabliert und auf die Analyse der differentiellen Transkription von *Arabidopsis thaliana* während der Abwehr des avirulenten, bakteriellen Pathogens *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* angewendet werden.

Zur Herstellung von DNA-Arrays für eine transkriptionelle Untersuchung der globalen Genexpression mußte eine nicht-redundante, 13.000 Klone umfassende cDNA-Bibliothek von *Arabidopsis thaliana* PCR-amplifiziert und in einem dichten, hochgeordneten Raster ("high density array") auf einem festen Träger immobilisiert werden. Dieser Herstellungsprozeß sollte für eine ausreichende Zahl an DNA-Arrays etabliert werden.

Für die Qualitätssicherung der Ergebnisse sollten die gewonnenen Transkriptionsprofile sowohl einzeln wie auch im Vergleich auf technisch bedingte Variationen untersucht und außerdem verschiedene Normalisierungsmethoden entwickelt und miteinander verglichen werden.

Die etablierte DNA-Array-Technologie sollte auf die Untersuchung der transkriptionell induzierten Pathogenantwort der Pflanze *Arabidopsis thaliana* angewendet werden. Dazu wurden Blattproben von *Arabidopsis thaliana*, Ökotyp Columbia, verwendet. Für das Studium der Pathogenabwehr in *Arabidopsis thaliana* wurde mit dem Resistenz auslösenden, *avrRpt2* exprimierenden, pathogenen Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* gearbeitet. Dazu sollten die Blätter von *Arabidopsis thaliana* mit dem avirulenten, bakteriellen Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* bzw. mit Pufferkontrolle infiltriert werden. Die Resultate sollten einen Einblick in die koordinierte differentielle Transkription pathogeninduzierter Gene verschiedener Stoffwechselwege gewähren und damit das Potential dieser Methode für die globale Analyse der Genregulation demonstrieren.

II. Material und Methoden

2.1 Material

Folgende Chemikalien, Enzyme, Pufferlösungen, Materialien und Hilfsmittel wurden für die Versuche verwendet und von den angegebenen Firmen bezogen:

2.1.1 Chemikalien

[α - ³³ P]-dCTP	Amersham-Pharmacia-Biotech, Freiburg
[α - ³² P]-dCTP	Amersham-Pharmacia-Biotech, Freiburg
[γ - ³³ P]-ATP	Amersham-Pharmacia-Biotech, Freiburg
[γ - ³² P]-ATP	Amersham-Pharmacia-Biotech, Freiburg
Adenosin-5'-triphosphat (ATP)	Roche, Mannheim
Agarose, Typ I	Sigma, Deisenhofen
Albumin aus Rinderserum (BSA)	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Bacto Agar	Difco, Detroit, Mi, USA
Bacto Tryptone	Difco, Detroit, Mi, USA
Bacto Yeast Extract	Difco, Detroit, Mi, USA
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
Glycerol (86 %)	Roth, Karlsruhe
Hexamer-Nukleotidgemisch, Nr. 27-2166-01	Amersham-Pharmacia-Biotech, Freiburg
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Sarcosyl NL-30	Serva, Heidelberg
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma, Deisenhofen
Trizma-Hydrochlorid	Sigma, Deisenhofen
tRNA	Roche, Mannheim
Xylencyanol FF	Serva, Heidelberg
TCA	Sigma, Deisenhofen

Alle weiteren hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Serva oder Sigma bezogen und hatten mindestens "p.a."-Qualität.

2.1.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase CIP	Roche Diagnostics, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Eigenproduktion (siehe Seite 11)
BamHI	MBI Fermentas, Wilna, Litauen
EcoRI	MBI Fermentas, Wilna, Litauen
HindIII	MBI Fermentas, Wilna, Litauen
DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment	Amersham-Pharmacia-Biotech, Freiburg
Proteinase K	Promega, Heidelberg
Reverse Transcriptase RT II	Life Technologies, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	Life Technologies, Karlsruhe
T3-RNA-Polymerase	Promega, Heidelberg
T4-Polynucleotid-Kinase	New England Biolabs, Schwalbach

2.1.3 Anzuchtmedium und Pufferlösungen

Folgende Medien und Pufferlösungen wurden für die Anzucht von *E.coli*-Klonen verwendet:

Lösung	Menge	Zusammensetzung	Endkonzentration
2YT-Medium:	1,6 g	Bacto Tryptone	(1,6 %)
	1,0 g	Bacto Yeast Extract	(1,0 %)
	0,5 g	NaCl	(0,5 %)
	96,9 g	Wasser	
10x H.M.F.M.:	0,76 g	MgSO ₄ (7 · H ₂ O)	(4 mM)
	4,50 g	Tri-Natriumcitrat (2 · H ₂ O)	(17 mM)
	9,00 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	(68 mM)
	440 g	Glycerol	(44 %)
	Puffer mit Wasser auf 800 ml auffüllen und autoklavieren.		
	18,0 g	KH ₂ PO ₄	(360 mM)
	47,0 g	K ₂ HPO ₄	(132 mM)
	Puffer mit Wasser auf 200 ml auffüllen und autoklavieren.		
	Beide Lösungen zu 1 L 10x H.M.F.M. mischen.		
2YT-F-A-Medium:	89 ml	2YT-Medium	(89 %)
	10 ml	10x H.M.F.M.	(10 %)
	1 ml	10 mg/ml Ampicillin-Lösung	(100 µg/ml)
	Medium frisch ansetzen und verwenden.		

0,5 M EDTA-Puffer:	16,9 g	EDTA	(0,5 M)
	1,9 g	NaOH	(1,9 %)
	81,2 g	Wasser	
Substanzen lösen, pH 8,0 einstellen und mit Wasser auffüllen.			

LB-Medium:	1,0 g	Bacto Tryptone	(1,0 %)
	0,5 g	Bacto Yeast Extract	(0,5 %)
	1,0 g	NaCl	(1,0 %)
	97,5 g	Wasser	

Folgende Pufferlösungen wurden für die Herstellung der Taq-DNA-Polymerase verwendet:

<u>Lösung</u>	<u>Menge</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Endkonzentration</u>
Puffer A:	5 ml	1 M Tris-HCl pH 7,9	(50 mM)
	5 ml	1 M Dextrose	(50 mM)
	200 µl	0,5 M EDTA	(1 mM)
	89,8 ml	Wasser	
Lyse-Puffer:	1 ml	1 M Tris-HCl pH 7,9	(10 mM)
	5 ml	1 M KCl	(50 mM)
	200 µl	0,5 M EDTA	(1 mM)
	500 µl	0,2 M PMSF (in DMSO)	(1 mM)
	500 µl	Tween	(0,5 %)
	500 µl	Nonidet P40	(0,5 %)
	92,3 ml	Wasser	
Prälyse-Puffer:	100 ml	Puffer A	
	400 mg	Lysozym	(4 mg/ml)

Folgende Pufferlösungen wurden für die Herstellung der DNA-Arrays verwendet:

<u>Lösung</u>	<u>Menge</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Endkonzentration</u>
Denaturierungs-Puffer:	1,87 g	NaOH	(0,5 M)
	8,15 g	NaCl	(1,5 M)
	89,98 g	Wasser	
Neutralisierungs-Puffer:	1322 g	Trizma-Hydrochlorid	(1 M Tris-HCl)
	194 g	Trizma-Base	
	876,6 g	NaCl	(1,5 M)

Folgende Pufferlösungen wurden für die PCR-Amplifikation verwendet:

<u>Lösung</u>	<u>Menge</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Endkonzentration</u>
10x PCR-Puffer I:	10 ml	1 M Tris-HCl pH 8,3	(100 mM)
	50 ml	1 M KCl	(500 mM)
	40 ml	Wasser	

<i>Taq</i> -Verdünnungs-Puffer:	5 ml	1 M Tris-HCl pH 8,0	(50 mM)
	5 ml	1 M KCl	(50 mM)
	20 µl	0,5 M EDTA	(0,1 mM)
	1 ml	1 M DTT	(1 mM)
	57,5 ml	87 % Glycerol	(50 %)
	250 µl	0,2 M PMSF (in DMSO)	(0,5 mM)
	31,23 ml	Wasser	

Folgende Pufferlösungen wurden für die Gelelektrophorese verwendet:

<i>Lösung</i>	<i>Menge</i>	<i>Zusammensetzung</i>	<i>Endkonzentration</i>
25x TAE-Puffer:	11,8 g	Trizma-Base	(1 M)
	3,1 g	Essigsäure	(0,5 M)
	0,8 g	EDTA	(21,5 mM)
	84,3 g	Wasser	
Gelladepuffer:	25 ml	Glycerol	(50 %)
	25 ml	Wasser	
	4 mg	Bromphenolblau	(5,8 µM)
Färbebad:	5 µl	10mg/ml Ethidiumbromid	(0,5 µg/ml)
	100 ml	Wasser	
Alk. Elektrophorese-Puffer:	2,5 ml	10 N NaOH	(50 mM))
	1 ml	0,5 M EDTA pH 8,0	(1 mM)
	496,5 ml	Wasser	
Alk. Gelladepuffer:	30 ml	10 N NaOH	(300 mM)
	1,2 ml	0,5 M EDTA pH 8,0	(6 mM)
	18 g	Ficoll (Typ 400)	(18 %)
	150 µg	Bromcresolgrün	(0,15 %)
	250 µg	Xylencyanol FF	(0,25 %)
	50,4 ml	Wasser	

Folgende Pufferlösungen wurden für die Hybridisierungen verwendet:

<i>Lösung</i>	<i>Menge</i>	<i>Zusammensetzung</i>	<i>Endkonzentration</i>
Church-Puffer:	49,75 g	1 M Na-Phosphat pH 7,2	(0,5 M)
	6,95 g	Natriumdodecylsulfat (SDS)	(7 %)
	0,20 g	0,5 M EDTA	(1 mM)
	43,1 g	Wasser	
	Immer über 25 °C aufbewahren (ansonsten Präzipitation von SDS!)		
SSarc-Puffer:	1000 ml	20x SSC-Puffer	
	1200 ml	30 % Natriumlauroylsarcosinat (SLS)	
	2800 ml	Wasser	
	Puffer ist bei Temperaturen ab 4 °C aufwärts verwendbar.		

Waschpuffer:	40,0 ml	1 M Na-Phosphat pH 7,2	(40 mM)
	0,5 ml	20 % SDS-Lösung	(0,1 %)
	959,5 ml	Wasser	
Regenerations-Puffer:	5,0 ml	1 M Na-Phosphat pH 7,2	(5 mM)
	0,5 ml	20 % SDS-Lösung	(0,1 %)
	994,5 ml	Wasser	
20x SSC-Puffer:	15,36 g	NaCl	(2,6 M)
	7,73 g	Tri-Natriumcitrat	(0,3 M)
	76,91 g	Wasser	

Folgende Pufferlösungen wurden für die Herstellung von Northern Blots verwendet:

<u>Lösung</u>	<u>Menge</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Endkonzentration</u>
10x MOPS-Puffer:	41,85 g	Mops	(200 mM)
	4,10 g	Na-Acetat	(50 mM)
	3,72 g	EDTA	(10 mM)
	Der Puffer wird mit Wasser auf 1 L aufgefüllt.		
RNA-Gelladepuffer:	900 µl	Formamid	
	100 µl	10x MOPS-Puffer	
	10 µl	10 mg/ml Ethidiumbromid	
	100 µl	Bromphenolblau-Lösung	

Folgende Pufferlösungen wurden für die Isolation genomischer DNA und total RNA verwendet:

<u>Lösung</u>	<u>Menge</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Endkonzentration</u>
CTAB-Puffer:	12,8 g	Sorbitol	(140 mM)
	110 ml	1 M Tris-HCl pH 8,0	(220 mM)
	22 ml	0,5 M EDTA	(22 mM)
	80 ml	5 M NaCl	(800 mM)
	16 ml	30 % Na-Sarcosyl	(1 %)
	4 g	CTAB	(0,8 %)
4 M LiCl-Puffer:	16,96 g	LiCl	(4 M)
	83,04 ml	Wasser	
4 M Li-Acetat-Puffer:	40,80 g	Li-Acetat	(4 M)
	59,20 g	Wasser	

Folgende Pufferlösungen wurden für molekularbiologische Arbeiten zur Konstruktion neuer Vektoren verwendet:

<u>Lösung</u>	<u>Menge</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Endkonzentration</u>
Puffer R (Hochsalzpuffer):	1 ml	1 M Tris-HCl pH 8,5	(10 mM)
	1 ml	1 M MgCl ₂	(10 mM)
	10 ml	1 M KCl	(100 mM)
	1 ml	10 mg/ml BSA	(0,1 mg/ml)
	87 ml	Wasser	
TE-Puffer:	1 ml	1 M Tris-HCl pH 8,0	(10 mM)
	20 µl	0,5 M EDTA	(0,1 mM)
	98,98 ml	Wasser	
5x T4-DNA-Ligase-Puffer:	25 ml	1 M Tris-HCl pH 7,6	(250 mM)
	5 ml	1 M MgCl ₂	(50 mM)
	5 ml	100 mM ATP	(5 mM)
	5 ml	100 mM DTT	(5 mM)
	25 ml	PEG-8000	(25 %)
	35 ml	Wasser	
IPTG-Lösung:	20 g	IPTG	(20 %)
	80 ml	Wasser	
X-Gal-Lösung:	2 g	X-Gal	(2 %)
	98 ml	Wasser	
Puffer 1:	1 ml	1 M Tris-HCl pH 7,5	(10 mM)
	200 µl	0,5 M EDTA	(1 mM)
	10 ml	1 M NaOH	(0,1 M)
	2,5 ml	20 % SDS	(0,5 %)
	87,3 ml	Wasser	
Puffer 2:	24,61 g	Na-Acetat	(3 M)
	75,39 ml	Wasser	
Puffer 3:	1 ml	1 M Tris-HCl pH 8,5	(10 mM)
	99 ml	Wasser	

Darüber hinaus kamen folgende Pufferlösungen zum Einsatz:

<u>Lösung</u>	<u>Menge</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Endkonzentration</u>
LS-Puffer:	5 µl	OL	(45 OD/ml Primer d(N) ₆) (1 mM Tris-HCl pH 8,0) (1 mM EDTA pH 8,0)
	175 µl	TM	(250 mM Tris-HCl pH 8,0) (25 mM MgCl ₂) (50 mM β-Mercaptoethanol)
	175 µl	1 M Hepes pH 6,6	
1 M Hepes-Puffer:	23,83 g	HEPES	(1 M)
	76,17 g	Wasser	

2.1.4 Materialien

Agarplatten 12 x 8 cm	Nunc, Wiesbaden
Agarplatten 22 x 22 cm	Nunc, Wiesbaden
Autoradiographiefilm Hyperfilm-MP	APBiotech, Freiburg
Phosphorscreen	Molecular Dynamics, Sunnyvale CA, USA
Phosphorscreen-Kassetten	Molecular Dynamics, Sunnyvale CA, USA
Hybond N ⁺ -Membran, 12 x 8 cm	Amersham-Pharmacia-Biotech, Freiburg
Pall B-Membran, 12 x 8 cm	Pall, Dreieich
Whatman 3MM-Papier	Bender und Hobein, Bruchsal
Mikrotiterplatte, 96er	Genetix, Christchurch, UK
Mikrotiterplatte, 384er	Genetix, Christchurch, UK
Mikrotiterplatte, 96er	Nunc, Wiesbaden
Mikrotiterplatte, 384er	Nunc, Wiesbaden
PCR-Mikrotiterplatte, 96er	Biozym, Hess. Oldendorf
PCR-Mikrotiterplatte, 384er	MJ Research, Waltham MA, USA
PCR-Purification-Kit	Qiagen, Hilden
Falcon, 50 ml und 15 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Eppendorfgefäße, 1,5 ml und 2,0 ml	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Oligonucleotide	Interactiva, Ulm
Omnitray-Schalen, 12 x 8 cm	Nunc, Wiesbaden
RNA-Clean	AGS, Heidelberg
Whatman Glasfiberfilter	Bender und Hobein, Bruchsal
Whatman 3MM Papier	Bender und Hobein, Bruchsal

2.1.5 Geräte und Hilfsmittel

96-Proben-Gelmaske	MadgeBio Ltd, Nottingham, UK
Biomek 2000	Beckman Coulter, Unterschleissheim-Lohhof
Gelelektrophoresesystem RAGE	a1-Biotech GmbH, Martinsried
Heizblock	Grant Instruments, Cambridge, UK
PCR-Platten Verschußklebefolien	ABgene, Hamburg
Phosphor/FluoroImager Storm 860	APBiotech, Freiburg
Photometer Ultrospec 2000	APBiotech, Freiburg
Roboter "Biogridder"	BioRobotics, Cambridge, UK
Rotationsofen	H. Saur Laborbedarf, Reutlingen
Scintillationszähler LS1801	Beckman Coulter, Unterschleissheim-Lohhof
Sparc-V-Computer	Sun Microsystems, Langen
Stratalinker 2400 UV-Gerät	Stratagene, Heidelberg
Thermocycler PTC-200	MJ Research, Waltham MA, USA
Thermomixer 5436	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Vacuum Concentrator	Bachofer, Reutlingen
Videosystem Geldoc 1000	Biorad, München
Zentrifuge, Sorval RC2-B	Dupont Instruments, Bad Homburg
Zentrifuge "Megafuge 1.0R"	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge "Biofuge pico"	Heraeus Instruments, Hanau

2.1.6 Software

AIS-Array Vision 4.0 Rev 1.7	Imaging Research Inc., Toronto, Canada
Matlab Version 5	The Math Works Inc., Natick, USA
Biogrid Version 1.32	BioRobotics, Cambridge, UK

2.1.7 Die Pflanze *Arabidopsis thaliana*

Für die Versuche wurde Gewebe der Pflanze *Arabidopsis thaliana* verwendet. *Arabidopsis thaliana* ist systematisch folgendermaßen einzuordnen:

System: *Eukaryota*
 Abteilung: *Spermatophyta*
 Unterabteilung: *Magnoliophyta (Angiospermae)*
 Klasse: *Magnoliatae (Dicotyledoneae)*
 Unterklasse: *Dilleniidae*
 Überordnung: *Violanae*
 Ordnung: *Capparales*
 Familie: *Brassicaceae (Cruciferae)*
 Gattung: *Arabidopsis thaliana*

2.1.8 cDNA-Bibliothek von *Arabidopsis thaliana*

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Resource zur Herstellung von DNA-Arrays war eine cDNA-Bibliothek von *Arabidopsis thaliana* (siehe auch Kap. 1.3.2, Abb. 1.3). Diese cDNA-Bibliothek bestand aus vier cDNA-Subbibliotheken mit insgesamt 13.800 cDNA-Klonen, die freundlicherweise von Herman Höfte, „Institut National de la Recherche Agriculture“ (INRA, Versailles, Frankreich) und vom „*Arabidopsis Biological Resource Center*“ (ABRC, Ohio State University, USA) zur Verfügung gestellt wurden.

Subbibliothek	Hersteller	Typ. Klonnamen
VB/VC/VD	H. Höfte, INRA, Versailles	VBVAC11
λPRL2	T. Newman, Michigan State University, Michigan	230N18T7
λPRL1	Novagen, Madison, Wisconsin	G11H12T7
AT-NHC	N.H. Chua, Rockefeller University, New York	E4F9T7

Tab .2.1: Herkunft der cDNA-Klon-Subbibliotheken mit typischen ID-Nummern. Die Namen der Subbibliotheken wurden willkürlich gewählt und stammen entweder vom Herkunftsort (V = Versailles), vom Vektor (λ = Vektorname, siehe auch Tab. 2.2) oder vom Hersteller (AT-NHC = *Arabidopsis thaliana* – N.H. Chua).

Die Herstellung der cDNA-Bibliotheken erfolgte durch Anzucht von *Arabidopsis thaliana*-Sämlingen unter verschiedenen Bedingungen. Die aus verschiedenen Geweben isolierte mRNA

wurde in einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben, in den jeweiligen Vektor ligiert und in *E. coli*-Bakterien transformiert (**siehe auch Kap. 1.2.1, Höfte et al. 1993, Newman et al. 1994**). Die Länge der einklonierten cDNA-Fragmente im Vektor der *E. coli*-Klone variierte von 500 bis 2.500 Bp. Der Durchschnitt lag bei 1.000 Bp.

Subbibliothek	<i>λPRL2</i>	<i>λPRL1</i>	<i>AT-NHC</i>	<i>VB/VC/VD</i>
Vektor	λShlox-1	λZipLox1	pBluescript	pHD-1
Insertionsstelle	Sal I - Not I	EcoRI - HindIII	EcoRI - EcoRI	NotI - NotI

Tab. 2.2: Die zu einer cDNA-Gesamtbibliothek zusammengesetzten Subbibliotheken mit dem jeweils verwendeten Vektor und der Restriktionsschnittstelle, in die das cDNA-Fragment einkloniert wurde (**Höfte et al. 1993, Newman et al. 1994**).

Bei den cDNA-Klonen dieser Gesamtbibliothek handelte es sich um ansequenzierte EST-Klone (meist mit T7-Primer), d.h. ein codierender Sequenzabschnitt ist bekannt und in der Datenbank TIGR (Rockville, MD, USA) per Internetzugriff abrufbar (<http://www.tigr.org/tdb/agi/>). Damit war es möglich, durch Sequenzvergleich einen nicht-redundanten Satz an cDNA-Klonen zusammenzustellen. Jeder cDNA-Klon lag in einem eigenen Anzuchtvolumen von 200 µl, separiert von den anderen cDNA-Klonen, vor. Sie befanden sich in Mikrotiterplatten mit je 96 separaten Probenkammern, d.h. für die Aufbewahrung dieser cDNA-Gesamtbibliothek waren 145 Mikrotiterplatten im 96er-Format erforderlich.

2.2 Methoden

2.2.1 Anzucht und Replikation der cDNA-Klon-Bibliothek

Die separate Anzucht der 13.800 individuellen *E. coli*-Klone der cDNA-Bibliothek erfolgte durch Animpfen der Klone in 2YT-F-Medium in 145 Mikrotiterplatten im 96er-Format oder in 36 Mikrotiterplatten im 384er-Format. Dem Medium wurden 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt, da die *E. coli*-Klone eine Ampicillinresistenz als Selektionsmarker besaßen. Nach Animpfen des Mediums wurden die Bakterienkulturen bei 37 °C über Nacht inkubiert. Nach erfolgreicher Anzucht wurden die Mikrotiterplatten bei - 80 °C eingefroren (**Maniatis et al. 1982**).

Zu Anfang befand sich die cDNA-Bibliothek von *Arabidopsis thaliana* im 96er Mikrotiterplatten-Format. Für die Replikation der cDNA-Gesamtbibliothek sowohl von 96er als auch von 384er in 384er Mikrotiterplatten kam der Roboter des Typs "Biogridder" (BioRobotics, Cambridge, UK) zum Einsatz (siehe Kap. 2.2.3.1). Für eine partielle Replikation der cDNA-Bibliothek wurden manuell bedienbare Metallreplikatoren, jeweils kompatibel zur benutzten 96er oder 384er Mikrotiterplatte, verwendet. Dabei wurden jeweils Nadeln mit einem Durchmesser von 0,7 mm eingesetzt.

2.2.2 PCR-Amplifikation von genomischen und cDNA-Sequenzen

Da die cDNA-Klon-Bibliothek aus verschiedenen Subbibliotheken besteht und jede mit einem eigenen Vektorsystem erstellt wurde, erfolgte die PCR-Amplifikation in Abhängigkeit des verwendeten Vektors mit verschiedenen Primerpaarkombinationen. Die Tabelle 2.2 zeigt eine Übersicht über die zu jeder Bibliothek bzw. jedem Vektor verwendbaren Primerpaare.

Subbibliothek	<i>λPRL2</i>	<i>λPRL1</i>	<i>AT-NHC</i>	<i>VB/VC/VD</i>
Vektor	pShlox-1	pZL1	pBluescript	pHD-1
Insertionsstelle	Sal I - Not I	EcoRI - HindIII	EcoRI - EcoRI	NotI - NotI
Primerpaar	EST for - rev T7 - SP6 Sport5 - Sport3	EST for - rev T7 - SP6	T7 - T3	EST for - rev T7 - T3 HD1for - HD1rev

Tab. 2.3: Die für jede Subbibliothek verwendbaren Primerpaare zur PCR-Amplifikation der cDNA-Inserts.

Die für die PCR-Amplifikation der cDNA-Insertionen notwendige Menge an *Taq*-DNA-Polymerase konnte durch Induktion der Expression in einem rekombinanten *E. coli*-Klon, der das pTaq-Plasmid trägt, mit anschließender Aufreinigung erhalten werden (siehe Kap. 2.2.2.1). Die PCR-Amplifikation der cDNA-Insertionen aus dem Vektor der *E. coli*-Klone wurde im Thermocycler PTC-200 (MJ Research) durchgeführt. Als Reaktionsgefäße dienten 96er bzw. 384er-PCR-Platten (MJ Research) aus hitzebeständigem Polypropylen, die es erlaubten, 96 bzw. 384 PCR-Reaktionen parallel durchzuführen. Die PCR-Platten wurden für die PCR-

Amplifikation mit einer Klebefolie versiegelt, die sich anschließend wieder abziehen ließ. Die Thermocycler waren mit einer Deckelheizung ausgestattet, so daß auf eine Überschichtung der PCR-Ansätze mit Mineralöl verzichtet werden konnte.

2.2.2.1 Herstellung der *Taq*-DNA-Polymerase

Die Herstellung der *Taq*-DNA-Polymerase erfolgte mit Hilfe eines *E. coli*-Klons mit pTaq-Plasmid, der das *Taq*-Gen trägt und unter der Kontrolle des *Taq*-Promoters exprimiert. 500 ml-LB-Medium mit Ampicillin (80 mg/l) wurden mit 250 µl einer Übernachtskultur dieses *E. coli*-Klons angeimpft. Die Inkubation der Kultur erfolgte bei 37 °C mit 200 Upm, bis bei einer OD₆₀₀ von 0.8 nach ca. 11 Stunden durch Zugabe von IPTG mit 125 mg/l die Induktion der *Taq*-DNA-Polymerase-Synthese eingeleitet wurde. 12 Stunden nach der Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation (15 min, 4000 Upm, 4 °C) abgeerntet und in 50 ml Puffer A (1 ml pro 10 ml Kultur) gewaschen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (15 min, 4000 Upm, 4 °C) abgetrennt, in 25 ml Prälyse-Puffer resuspendiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe des Lyse-Puffer im gleichen Volumenverhältnis lysierten die Zellen für eine Stunde bei 75 °C. Der Lyse-Mix wurde zentrifugiert (20 min, 10.000 Upm, 4 °C) und das klare Lysat in einen sauberen Erlenmeyerkolben überführt. Die Ausfällung der *Taq*-DNA-Polymerase gelang durch langsame Zugabe von 15 g gemörsertem Ammoniumsulfat-Pulver (30 g pro 100 ml Lysat) unter Rühren bei Raumtemperatur und anschließender Inkubation bei 4 °C über Nacht. Das Protein wurde zentrifugiert (20 min, 10.000 Upm, 4 °C), in 10 ml Puffer A (1 ml pro 5 ml Lysat) resuspendiert und für 2 x 12 Stunden in *Taq*-Verdünnungs-Puffer bei 4 °C dialysiert. Das dialysierte und aufgereinigte Protein wurde im gleichen Volumen *Taq*-Verdünnungs-Puffer aufgenommen und bei - 70 °C gelagert (**Pluthero 1993**).

2.2.2.2 PCR-Amplifikation in 96er Mikrotiterplatten

Die PCR-Amplifikation in 96er-Mikrotiterplatten wurde mit je 100 µl Reaktionsvolumen durchgeführt. Die folgenden Tabellen geben die Nucleotidsequenz der verwendeten Primer und die Zusammensetzung der PCR-Ansätze an.

Primer	Nucleotidsequenz
1. SP6-FW	ATT TAG GTG ACA CTA TAG
1. T3-FW	AAT TAA CCC TCA CTA AAG
2. T7-RV	TAA TAC GAC TCA CTA TAG

Tab. 2.4: Nukleotidsequenz der Primer für die 96er-PCR.

Reagenzien	Konz.	Vol.-Einheit	1 x 100 µl	100 x 100 µl	Endkonz.
ddH ₂ O		µl	80,4	8040	-
d(A,G,C,T)TP-Mix	je 25 mM	µl	0,8	80	0,2 mM
10x PCR-Puffer I	10 x	µl	10	1000	1 x
MgCl ₂	37,5 mM	µl	6	600	2,25 mM
Taq-DNA-Polymerase	1 U/µl	µl	2	200	-
Primer 1	100 µM	µl	0,4	40	0,4 µM
Primer 2	100 µM	µl	0,4	40	0,4 µM
Gesamtvolumen		µl	100	10000	

Tab. 2.5: Zusammensetzung der 100 µl PCR-Ansätze für 96er Mikrotiterplatten

Jeder 100 µl PCR-Ansatz wurde mit 0,2 µl der jeweiligen *E. coli*-cDNA-Klon-Kultur angeimpft. Das dabei verwendete PCR-Programm zeigt die folgende Tabelle:

96er MTP: SP6-T7 Primerpaar			
Schritt	Reaktionsbedingungen		
1	94 °C	04:00 min	Denaturierung
2	94 °C	00:30 min	Denaturierung
3	51 °C	00:45 min	Anlagerung
4	72 °C	02:00 min	Verlängerung
5	Schritt 2-4, 36 mal wdh.		Temperaturzyklen
6	72 °C	10:00 min	
7	4 °C	10:00 min	
8	Ende	Deckeltemperatur konstant 105 °C	

Tab. 2.6: Temperaturzyklen für PCR in 96er Mikrotiterplatten für SP6/T3-T7 Primerpaar

Nach erfolgreicher PCR-Amplifikation wurden die 100 µl PCR-Produkt aus den 96er Mikrotiterplatten mit Hilfe des Roboters Biomek 2000 (Beckman), der freundlicherweise vom

Resourcenzentrum des Deutschen Humanen Genomprojektes (RZPD) zur Verfügung gestellt wurde, in 384er Mikrotiterplatten transferiert.

2.2.2.3 PCR-Amplifikation in 384er Mikrotiterplatten

Die PCR-Amplifikation in 384er-Mikrotiterplatten wurde mit je 25 µl Reaktionsvolumen durchgeführt. Die folgenden Tabellen geben die Nucleotidsequenz der verwendeten Primer und die Zusammensetzung der PCR-Ansätze an.

Primer	Nucleotidsequenz
1. EST-FW	CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG
2. EST-RV	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG

Tab. 2.7 : Nucleotidsequenz der Primer für die 384er-PCR.

Reagenzien	Konz.	Vol.-Einheit	1 x 25 µl	400 x 25 µl	Endkonz.
ddH ₂ O		µl	15,2	6080	-
d(A,G,C,T)TP-Mix	je 25 mM	µl	0,2	80	0,2 mM
10x PCR-Puffer I	10 x	µl	2,5	1000	1 x
MgCl ₂	37.5 mM	µl	1,5	600	2,25 mM
Glycerin	99,5 %	µl	5	2000	10%
Taq-DNA-Polymerase	1 U/µl	µl	0,4	160	-
Primer 1	100 µM	µl	0,1	40	0,4 µM
Primer 2	100 µM	µl	0,1	40	0,4 µM
Gesamtvolumen		µl	25	10000	

Tab. 2.8: Zusammensetzung der 25 µl PCR-Ansätze für 384er Mikrotiterplatten.

Jeder 25 µl PCR-Ansatz wurde mit 0,2 µl der jeweiligen *E. coli*-cDNA-Klon-Kultur angeimpft.

Das dabei verwendete PCR-Programm zeigt die folgende Tabelle:

384er MTP: EST-Primerpaar			
Schritt	Reaktionsbedingungen		
1	92 °C	03:00 min	Denaturierung
2	92 °C	00:20 min	Denaturierung
3	60 °C	00:45 min	Anlagerung
4	72 °C	02:00 min	Verlängerung
5	Schritt 2-4, 36 mal wdh.		Temperaturzyklen
6	72 °C	10:00 min	
7	4 °C	10:00 min	
8	Ende	Deckeltemperatur konstant 85 °C	

Tab. 2.9: Temperaturzyklen für PCR in 384er Mikrotiterplatten für das EST-Primerpaar.

2.2.2.4 PCR-Amplifikation heterologer Kontrollsequenzen

Die PCR-Amplifikation der heterologen Kontrollsequenzen erfolgte von genomischer DNA der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* mit Hilfe ORF-spezifischer Primer und von cDNA des α - und β -Globins des Kaninchens (Life Technologies, Karlsruhe). Die PCR-Amplifikation wurde in 96er-Mikrotiterplatten mit je 100 μ l Reaktionsvolumen durchgeführt. Die folgenden Tabellen zeigen die Nucleotidsequenz der verwendeten Primer und die Zusammensetzung der PCR-Ansätze.

Primer	Nucleotidsequenz
α -globin (rabbit)_SP6 α -globin (rabbit)_T7	ATT TAG GTG ACA CTA TAG - TCT CCC GCT GAC AAG ACC AA TAA TAC GAC TCA CTA TAG - AGC AGG CAG TGG GAC AGG A
β -globin (rabbit)_SP6 β -globin (rabbit)_T7	ATT TAG GTG ACA CTA TAG - GTG GGG CAA GGT GAA TGT G TAA TAC GAC TCA CTA TAG - TAG CCA GAA GTC AGA TGC TCA AG
YGR059W (yeast_B4)_SP6 YGR059W (yeast_B4)_T7	ATT TAG GTG ACA CTA TAG - AAG TCA AAA GGG AGT CGG TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG - CTA CCT TTT GAT GTG AAC GTT TAC T
YHR066W (yeast_B5)_SP6 YHR066W (yeast_B5)_T7	ATT TAG GTG ACA CTA TAG - GCC AAG AGA AGA CAA AAG AAA A TAA TAC GAC TCA CTA TAG - TTA TTC GAC CTC ACT AAA TAA GTC AC
YHR139C (yeast_B6)_SP6 YHR139C (yeast_B6)_T7	ATT TAG GTG ACA CTA TAG - AAA TTC ACA TCA GTG CTA GCA T TAA TAC GAC TCA CTA TAG - TTA TTG TTG ACT AAC AGG GAA GAT TT
YJL170C (yeast_B10)_SP6 YJL170C (yeast_B10)_T7	ATT TAG GTG ACA CTA TAG - AAA AAA TAC TGT TGC CAA TGC AA TAA TAC GAC TCA CTA TAG - CTA ACG GCT TTT CTT ACA TAG GAG A
YJR053W (yeast_B11)_SP6 YJR053W (yeast_B11)_T7	ATT TAG GTG ACA CTA TAG - TCA ATT AGG CCT CTC ACG TTA A TAA TAC GAC TCA CTA TAG - CTA ATC TTT TGT CGA ATT GAT TAC CA
YJR094C (yeast_C2)_SP6 YJR094C (yeast_C2)_T7	ATT TAG GTG ACA CTA TAG - CAA GCG GAT ATG CAT GGA AAA TAA TAC GAC TCA CTA TAG - TTA AGA ATA GGT TTT ACT AAA CTT GTA G
YNL204C (yeast_C9)_SP6 YNL204C (yeast_C9)_T7	ATT TAG GTG ACA CTA TAG - CGT TTG TTT GAA AAT AGT AAA GAT TAA TAC GAC TCA CTA TAG - CTA ATT GAA TTC TGG AGG GAG AAT G

Tab. 2.10: Nucleotidsequenz der Primer für die heterologen Kontrollsequenzen.

Die Zusammensetzung der 100 μ l PCR-Ansätze für die PCR-Amplifikation heterologer Kontrollsequenzen erfolgte gemäß der Tabelle 2.5. Jeder 100 μ l PCR-Ansatz wurde mit 10 ng DNA angeimpft. Das dabei verwendete PCR-Programm zeigt die folgende Tabelle:

96er MTP: Primerpaare heterologer Kontrollsequenzen			
Schritt	Reaktionsbedingungen		
1	95 °C	03:00 min	Denaturierung
2	95 °C	01:00 min	Denaturierung
3	50 °C	00:50 min	Anlagerung
4	72 °C	03:30 min	Verlängerung
5	Schritt 2-4, 34 mal wdh.		Temperaturzyklen
6	72 °C	10:00 min	
7	4 °C	10:00 min	
8	Ende	Deckeltemperatur konstant 105 °C	

Tab. 2.11: Temperaturzyklen für PCR-Amplifikation der heterologen Kontrollsequenzen.

2.2.2.5 Nachweis der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese

Für den Nachweis der PCR-Produkte wurde die Gelelektrophorese eingesetzt. Dabei kam das Diagonal-Gelelektrophoresesystem (MadgeBio Ltd., Nottingham, UK) zum Einsatz, das mit 96 Proben pro Gel der Größe 8 x 12 cm einen hohen Probendurchsatz gewährleistete. Als Gelmatrix diente Agarose in einer Konzentration von 1,5 %. Vom 100 µl PCR-Ansatz wurden je 5 µl abgenommen, mit je 3 µl Gelladepuffer gemischt und in die Geltasche pipettiert. Die Auftrennung erfolgte in 1x TAE-Puffer pH 8,2 bei 8 V/cm für 45 Minuten. Der Nachweis der PCR-Produkte wurde über die Anfärbung in einem Färbebad mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid erbracht. Weiterhin kam das Gelelektrophoresesystem RAGE (Rapid Agarose Gel Electrophoresis) von a1-Biotech GmbH (München) zum Einsatz, um sowohl geringere Mengen an PCR-Produkt für den Nachweis einzusetzen als auch die Nachweisprozedur zu beschleunigen. Hierzu wurden 2 µl eines 25 µl PCR-Ansatzes verwendet, um ein PCR-Produkt in Form einer scharfen und gut sichtbaren Bande nachzuweisen. Bei diesem Gelelektrophoresesystem konnte ebenfalls ein Durchsatz bis zu 96 Proben pro Gel erreicht werden. Dabei erfolgte die Auftrennung in 1x TAE-Puffer pH 8,2 bei 20 V/cm für 12 Minuten.

2.2.3 Produktion genomischer *Arabidopsis*-Arrays

2.2.3.1 Der Roboter "Biogridder"

Zum punktgenauen Auftragen der PCR-Produkte in einem Raster hoher Dichte als auch zum Replizieren der cDNA-Bibliothek wurde der Roboter "Biogridder" (BioRobotics Ltd., Cambridge, UK) verwendet (siehe Abb. 2.1). Dieser Roboter arbeitet beim Probentransfer nach dem Nadelkopfprinzip mit 96er und 384er Nadelköpfen, die zu den jeweiligen Mikrotiterplatten kompatibel sind. Für den Transfer der PCR-Proben aus 96er Mikrotiterplatten wurden Nadelköpfe mit 0,7 mm Nadeldicke und für PCR-Proben aus 384er Mikrotiterplatten Nadelköpfe mit einem Nadeldurchmesser von 0,4 mm verwendet. Die minimale Schrittgröße der Motoren betrug 200 µm. Die zum Spotten der PCR-Produkte notwendigen Einstellungen für die Probenquelle (Art des Probenmaterials, Mikrotiterplattenformat und Hersteller, Konsistenz des Inhalts, Füllhöhe und verwendeter Nadelkopf), die Membranen (Anzahl, Größe, Spotdichte, Raster, Transferwiederholungen, Höhe der Membran) als auch die Wasch- und Trockenzeiten für den Nadelkopf sind in der Abbildung 2.2 wie in der Software "Biogrid" angewählt dargestellt.



Abb.2.1: A) Roboter "Biogridder" mit Steuerungseinheit der Firma BioRobotics, Cambridge UK für die Herstellung von DNA-Arrays. B) Nadelkopf überträgt 384 Proben parallel auf einen festen Träger. C) Druckkopf des Roboters mit 384 Nadeln für den Proben transfer.

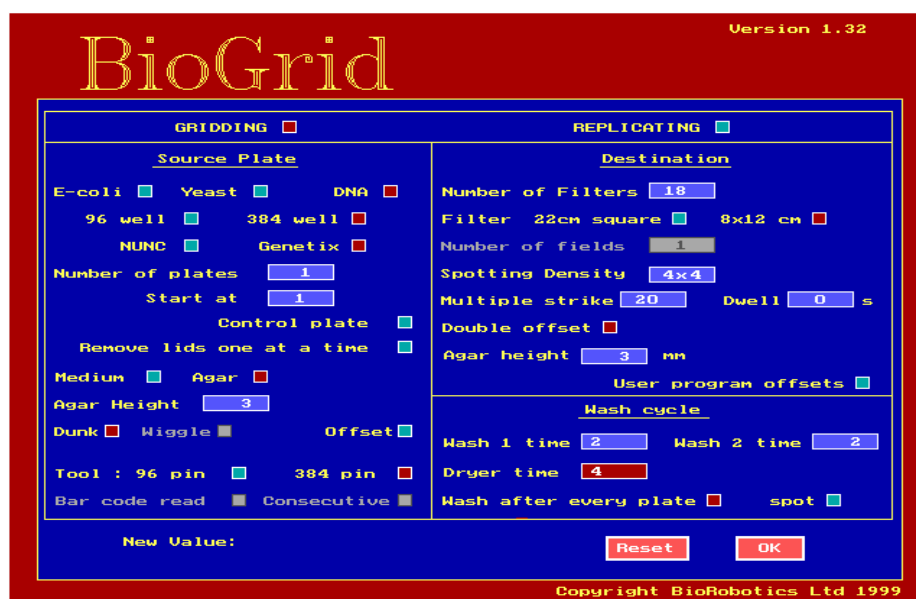


Abb. 2.2: Software BioGrid für die Herstellung von DNA-Arrays auf Polymermembranen mit dem Roboter „Biogridder“. Definiert wurde das Format der Quellplatten mit den PCR-Produkten, das Format des Arrays als auch die Waschschr itte für den Nadelkopf.

2.2.3.2 Spotraster und Orientierung im genomischen *Arabidopsis*-Array

Das Spotmuster ist durch ein Raster mit zwei Ebenen definiert. Die erste Ebene bestimmt das Spotmuster innerhalb der Quadranten, für die ein 4 x 4 -Muster gewählt wurde, bei dem auf einer Kantenlänge von 4,5 mm 4 Spots lagen. Die mit dem Biogridder typischerweise produzierten Spots hatten einen Durchmesser von ca. 0,7 mm. Damit war ein ausreichender Abstand von Spot zu Spot gewährleistet, um jeden Spot eindeutig von seinen Nachbarspots abzugrenzen. Innerhalb dieses 4 x 4 -Musters wurde jedes PCR-Produkt im Duplikat als Primär- und Sekundärspot aufgebracht, um bei der Signalauswertung Artefakte auszuschließen. Die zweite Ebene definiert die Position des Quadranten, in dem sich das Signal befindet, und ist analog zu einer 384er Mikrotiterplatte numeriert (A, B, ..., P und 1, 2, ..., 24). Dieses Raster mit zwei Ebenen ist in der Abbildung 2.3 schematisch dargestellt.

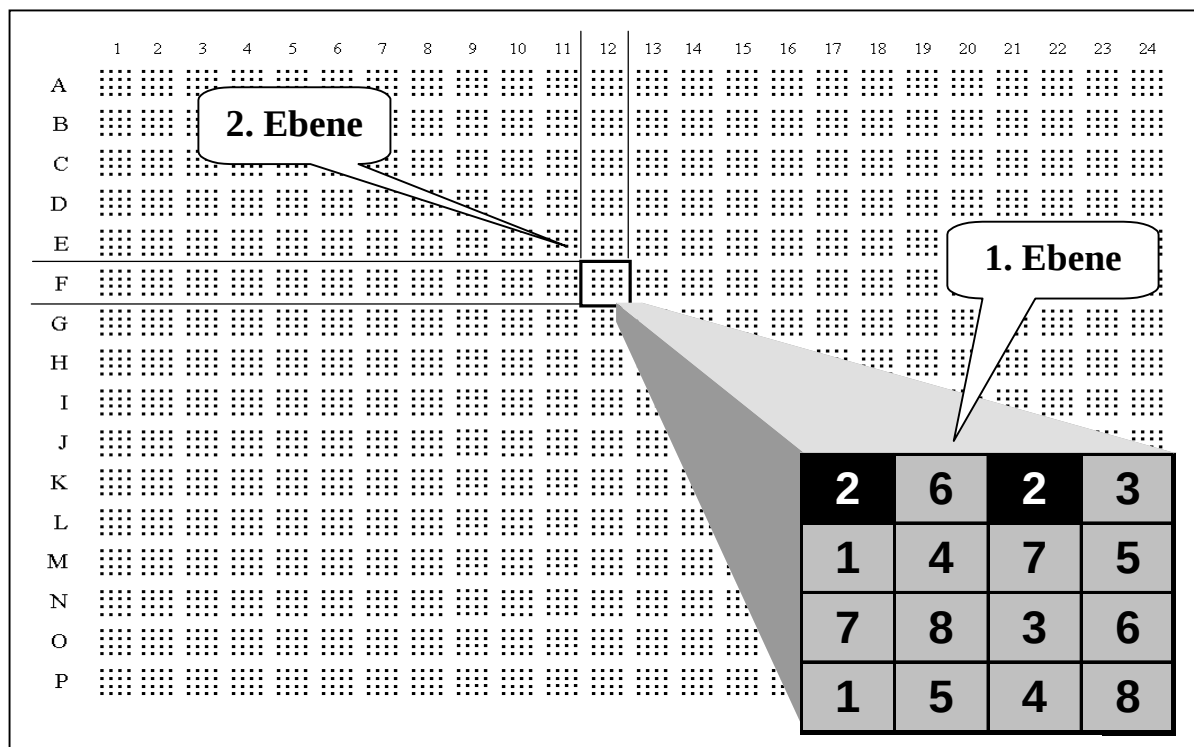


Abb. 2.3: Spotraster mit zwei Ebenen: die erste Ebene beschreibt die Position des Signals innerhalb des Quadranten und definiert gleichzeitig die PCR-Platte, aus der das PCR-Produkt an dieser Position kommt, während die zweite Ebene die Position des Quadranten innerhalb des Feldes definiert; daraus ergibt sich in diesem Beispiel für das Signal das PCR-Produkt aus PCR-Platte 2 in der Position F12.

Die erste Ebene bezeichnet gleichzeitig die PCR-Mikrotiterplatte, aus der das entsprechende PCR-Produkt an dieser Stelle stammt. Die zweite Ebene zeigt die Position an, in der sich das PCR-Produkt in der PCR-Mikrotiterplatte befindet.

Damit konnten in diesem Raster hoher Dichte insgesamt 6.144 Spots bzw. 3.072 PCR-Produkte untergebracht werden. Da insgesamt 13.800 PCR-Produkte in ein Array passen sollten, wurden fünf Felder dieser Art produziert. Dies entspricht einer Kapazität von 30.720 Spots bzw. 15.360 möglichen Positionen für PCR-Proben, die im Duplikat aufgebracht werden. Die Abbildung 2.4 zeigt die Orientierung im genomischen *Arabidopsis*-Array.

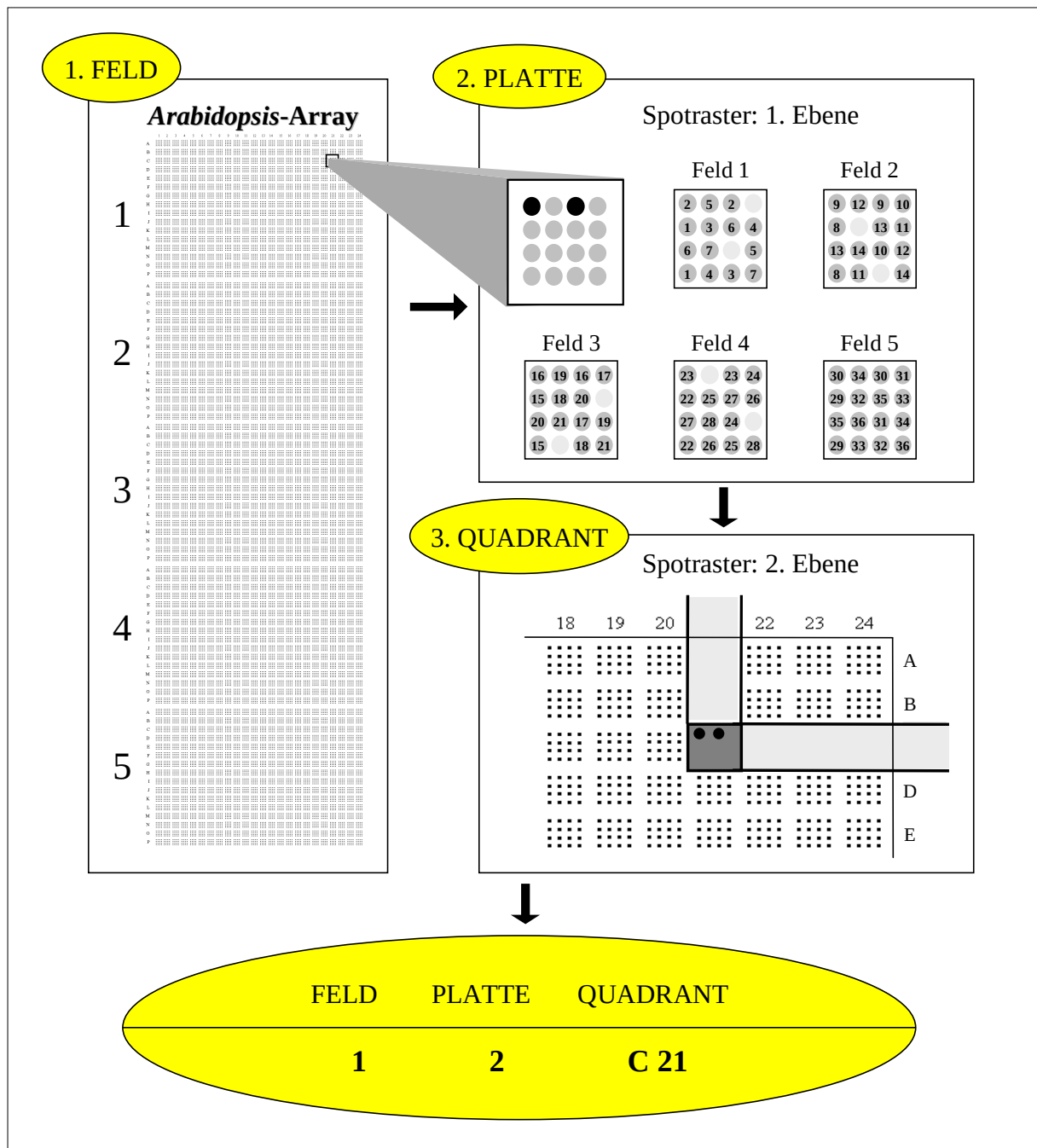


Abb. 2.4: Orientierung und Positionierung der Spots im Raster des genomischen *Arabidopsis*-Array.

1. Feld: definiert das Feld, indem sich das Spotduplikat befindet.
2. Platte: bestimmt die Position und Orientierung der gespotteten PCR-Platten im 384er-Format.
3. Quadrant: definiert die Position des individuellen PCR-Produkts innerhalb der PCR-Platte.

2.2.3.3 Herstellung von DNA-Arrays auf Nylonmembranen

Für die Herstellung der DNA-Arrays auf Nylon wurden Biodyne B Membranen der Firma Pall eingesetzt. Dazu kamen Omnitrays-Schalen mit einer Auflagefläche von 13 x 8 cm als roboterkompatible Membranträger zum Einsatz. Diese wurden mit mehreren Lagen 3MM Whatman Papier, die zuvor in Denaturierungspuffer getränkt worden waren, luftblasenfrei ausgelegt. Die Nylonmembranen wurden für mindestens 20 Minuten in Denaturierungspuffer äquilibriert und in den vorbereiteten Omnitrays-Schalen exakt rechtwinklig positioniert. Die Membran ließ man soweit antrocknen, bis die Oberfläche tropffrei war und einen matten Glanz erhielt. Die zu spottenden, PCR-Produkt enthaltenden Mikrotiterplatten wurden aufgetaut und abzentrifugiert (2 min, 1000 Upm, RT). Der Roboter für die Herstellung der DNA-Arrays "Biogridder" wurde mit den mit Membranen beladenen Omnitrays-Schalen und den aufgetauten PCR-Mikrotiterplatten bestückt, die Spot-Parameter eingestellt (siehe 2.2.3.1) und die Herstellung der DNA-Arrays gestartet. Anschließend neutralisierten die Membranen auf mit Neutralisierungspuffer getränktem 3MM Whatman Papier und trockneten über Nacht.

2.2.3.4 Herstellung von DNA-Arrays auf Polypropylenmembranen

Zur Herstellung der DNA-Arrays auf Polypropylen dienten Membranen der Größe 13 x 8 cm, die mit einem Linkersystem mit Dendrimerstruktur mit funktionellen Aminogruppen analog zu **Beier und Hoheisel (1999)** versehen waren.

Die derivatisierten Polypropylenmembranen wurden für 5 Minuten in 50 ml 1,2 Dichlorethan, 22 µl N-Methylimidazol (NMI) und mit einer Endkonzentration von 7,2 mM N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid (EDC) als wasserbindendem Substrat in Omnitrays-Schalen bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Abgießen der Aktivierungslösung wurde die Herstellung der DNA-Arrays am Biogridder mit den Parametern gemäß Kapitel 2.2.3.1 durchgeführt. Nach dem Spotten trockneten die Polypropylenmembranen zwei Stunden lang bei 65 °C.

2.2.3.5 DNA-Fixierung auf Membranen

Um die hergestellten DNA-Arrays möglichst häufig wiederverwenden zu können, wurde die DNA an der Membran zusätzlich fixiert. Hierzu wurden die verschiedenen Membrantypen auf 80 °C für 30 bis 120 Minuten erhitzt und einer UV-Bestrahlung bei $\lambda = 254 \text{ nm}$ von 0,01 bis 0,12 J/cm² mit Hilfe des UV Crosslinker Stratalinker 2400 (Stratagene) ausgesetzt.

2.2.3.6 Bestimmung der Menge an membrangebundenem PCR-Produkt

Für die Bestimmung der Menge an membrangebundener DNA wurde ein DNA-Array hergestellt, der 6 PCR-Produkte (A bis F) enthielt. Diese PCR-Produkte hatten folgende Konzentrationen, wie sie üblicherweise bei der in Kapitel 2.2.2 verwendeten PCR-Amplifikation auftraten:

PCR-Produkt	Konzentration	PCR-Produkt	Konzentration
A	1,6 µg/100 µl	D	0,8 µg/100 µl
B	1,4 µg/100 µl	E	1,8 µg/100 µl
C	0,8 µg/100 µl	F	1,0 µg/100 µl

Tab. 2.12: Konzentration der verwendeten PCR-Produkte für die DNA-Array-Herstellung zur Bestimmung der Menge an membrangebundenem PCR-Produkt.

Diese PCR-Produkte wurden zum einen mittels Pipette in drei bekannten Volumina aufgetragen, zum anderen mit dem Roboter in drei noch zu ermittelnden Volumina. Dabei wurden drei verschiedene Pindurchmesser, die zur Verfügung standen, gewählt und der Volumentransfer durch 0 bis 19 Transferwiederholungen auf den gleichen Spot variiert. Die dabei verwendeten Parameter sind in Tab 2.13 wiedergegeben.

Spotherstellung	Roboter			Pipette		
Spotspalte	1	2	3	4	5	6
Pindurchmesser	2 mm	0,7 mm	0,4 mm	-	-	-
Spotvolumen	?	?	?	1 μ l	0,5 μ l	0,25 μ l
Volumentransfer	1 x	10 x	20 x	1 x	1 x	1 x

Tab. 2.13: Parameter zur Herstellung des DNA-Arrays für die Bestimmung des Spotvolumens und damit der Menge an gespottetem PCR-Produkt. Mit der Pipette wurden die sechs PCR-Produkte in definierten Spotvolumina aufgetragen, um bei den verwendeten Nadelköpfen unterschiedlicher Pingröße die übertragenen Spotvolumina zu bestimmen.

Eine Hybridisierung mit dem ^{33}P -markierten Oligonucleotid T7 (siehe Kapitel 2.2.9) machte die Spots sichtbar. Die hintergrundkorrigierten Signalintensitäten (siehe Kapitel 2.2.10) der mit Pipette hergestellten Spots wurden zur Erstellung einer Eichgeraden verwendet. Für die Auswertung wurden alle 6 PCR-Produkte separat behandelt, d.h. für jedes PCR-Produkt wurde eine eigene Eichgerade aufgestellt. An diesen Eichgeraden konnten über die Signalintensitäten der übrigen Spots die Spotvolumina ermittelt werden. Mit dem gespotteten Volumen konnte über die Konzentration der PCR-Produktlösung somit die Menge an gespottetem PCR-Produkt in Abhängigkeit von dem gewählten Pindurchmesser und dem Volumentransfer ermittelt werden.

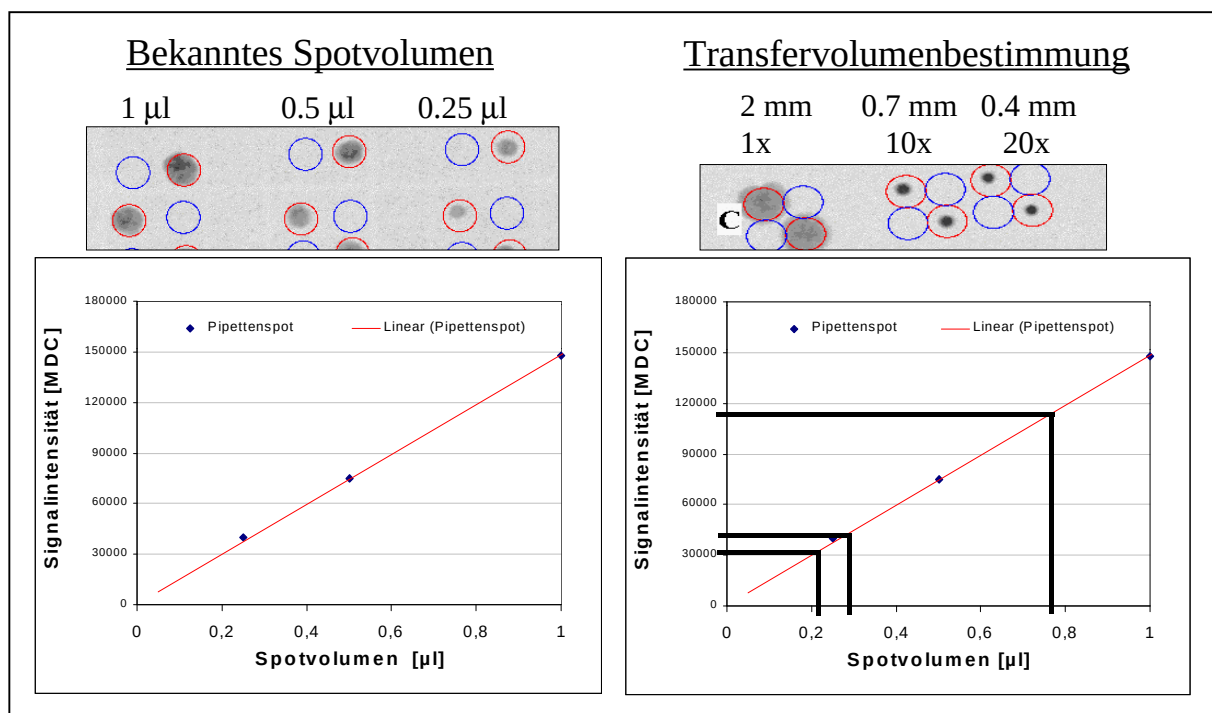


Abb. 2.5: Bestimmung des Transfervolumens der verschiedenen Pingrößen über eine Eichgerade, die mit den Spots bekannter Volumina erstellt wurde.

2.2.4 Herstellung von Northern Blots

Für die Herstellung eines Northern Blot wurden alle verwendeten Geräte wie Gelkammer, Schlitten und Kamm, die mit dem RNA-haltigen Gel in Berührung kommen und nicht einem mehrstündigem Backen bei 150 °C unterzogen werden konnten, mit 0,5 % SDS gereinigt und mit DEPC-behandeltem Wasser sowie mit Ethanol gut gespült. Danach wurden sie für 10 Minuten in 3 % H₂O₂ inkubiert und mit DEPC-behandeltem Wasser gut gespült.

Ein Formaldehyd-Gel wurde aus 2,1 g Agarose (1,4 %), 120 ml Wasser, 15 ml 10x MOPS-Puffer und 15 ml 37%-iger Formaldehydlösung gegossen. 15 µg total RNA wurden mit 2 µg RNA-Gelladepuffer versetzt, 5 Minuten bei 65 °C denaturiert und auf Eis gestellt. Die Größenauftrennung erfolgte in vorgekühltem 1x MOPS-Puffer mit 6 V/cm 5 Stunden lang bei 4 °C.

Für den Northern Blot lag das Formaldehyd-Gel luftblasenfrei auf mehreren Lagen 3MM-Whatman Papier, deren Enden über einen Block in 10 x SSC als Laufpuffer eintauchten. Auf weitere Lagen 3MM-Whatman Papier folgte ein Stapel Papiertücher, der für eine verbesserte Kapillarwirkung mit einer Glasplatte bedeckt und beschwert wurde. Dieser Blot wurde über Nacht durchgeführt. Danach wurde die Membran kurz in 5 x SSC gewaschen, getrocknet und die RNA mittels UV-Bestrahlung (0,12 µJ/cm²) kovalent an die Membran gebunden.

2.2.5 Herstellung neuer Vektorkonstrukte für die *in vitro* Transkription

2.2.5.1 Herstellung des doppelsträngigen DNA -Fragments poly (A-T)₅₀

Die Herstellung des doppelsträngigen DNA-Fragments poly (A-T)₅₀ gelang mittels Hybridisierung zweier komplementärer, von der Firma Interactiva synthetisierter Oligonucleotide zu einem Doppelstrang (siehe Abb. 2.6). Hierzu wurden in einem 100 µl-Ansatz 20 µl Oligomer AATTC-(A)₅₀-A (100 µM), 20 µl Oligomer AGCTT-(T)₅₀-G (100 µM), 27 µl MgCl₂ (37,5 mM), 2,5 µl Tris-HCl (1 M, pH 8,2) und 30,5 µl Wasser 30 Minuten auf 95 °C erhitzt und in einer Thermobox über Nacht langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

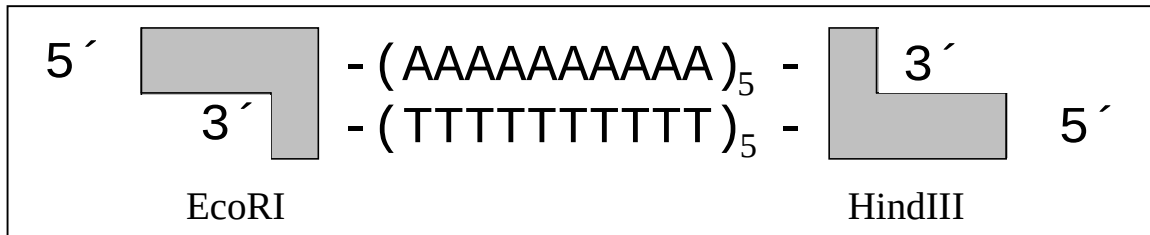


Abb. 2.6: Doppelsträngiges DNA-Fragment poly (A-T)₅₀ mit 5'-überhängenden Enden, passend für die Ligation an die EcoRI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen des Vektors *pBluescript II SK+*.

2.2.5.2 Heterologe Sequenzen zum Genom von *Arabidopsis thaliana*

Für die *in vitro* Transkription wurden Sequenzen gebraucht, die orthogonal zum Genom von *Arabidopsis thaliana* sind. Dazu wurde zum einen die mRNA von α - und β -Globin des Kaninchens (Life Technologies, Karlsruhe) eingesetzt. Zum anderen wurde im Genom der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nach Genen gesucht, die keine homologe Sequenz in *Arabidopsis* haben sollten. Hierzu wurde unter den Stichworten "Sporulation" und "Mating" in der MIPS-Hefe-Datenbank ("Munich Information Center for Protein Sequences", München/Martinsried) nach Genen gesucht. Diese wurden mit Primern, die spezifisch für das offene Leseraster der Hefegene waren, aus genomischer Hefe-DNA mittels PCR amplifiziert (siehe Kap. 2.2.2.4). Diese PCR-Produkte wurden neben genomischer *Arabidopsis*- und Hefe-DNA gespottet und mit genomischer *Arabidopsis*-DNA, die mittels Random Hexamer Priming mit ³²P markiert worden war, hybridisiert. Die Sequenzen, die später eine Verwendung als externe Kontrollen fanden, sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Nr.	Genname		Funktion	PCR-Produktlänge
1			rabbit α -globin	311 bp
2			rabbit β -globin	471 bp
3	YGR059W	B4	sporulation-specific septin	1539 bp
4	YHR066W	B5	protein with potential in mating	1362 bp
5	YHR139C	B6	sporulation specific protein involved in spore wall formation	981 bp
6	YJL170C	B10	protein expressed only in cells of mating type a	552 bp
7	YJR053W	B11	protein involved in efficiency of mating	1725 bp
8	YJR094C	C2	transcription factor required for sporulation	1083 bp
9	YNL204C	C9	sporulation specific zinc finger protein involved in sporulation activation	903 bp

Tab. 2.14: Kontrollsequenzen: zu *Arabidopsis thaliana* heterologe Sequenzen für eine vom zu untersuchenden Organismus unabhängige Normalisierung beim Vergleich komplexer Transkriptionsprofile.

2.2.5.3 Restriktionsverdau

Für die Linearisierung des Vektors *pBluescript II SK+* wurde ein Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonucleasen EcoRI und HindIII angesetzt. Dabei wurden 50 µg *pBluescript II SK+* in 240 µl Wasser und 30 µl Puffer R (Hochsalzpuffer, MBI Fermentas) mit 15 µl EcoRI (10 U/µl, MBI Fermentas) und 15 µl HindIII (10 U/µl, MBI Fermentas) vier Stunden lang bei 37 °C hydrolysiert. 20 minütiges Erhitzen auf 65 °C inaktivierte die Restriktionsendonucleasen. Für die Präparation des modifizierten Vektors *pBluescript II SK+*, der das poly (A-T)₅₀-Fragment trug, sowie der in diesen Vektor zu klonierenden PCR-Produkte von Genen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde ein Restriktionsverdau mit EcoRI und BamHI durchgeführt. Hierzu wurden 40 µg DNA in 238,5 µl Wasser, 30 µl EcoRI-Puffer (MBI, Fermentas) und 1,5 µl BSA (20 mg/ml) mit 15 µl EcoRI (10 U/µl) und 15 µl BamHI (10 U/µl) 4 Stunden lang bei 37 °C hydrolysiert.

Die neu erstellten Vektorkonstrukte, bei denen in *pBluescript II SK+* das poly (A-T)₅₀-Fragment und jeweils ein PCR-Produkt eines Gens der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* inseriert war, wurden mit der Restriktionsendonuclease HindIII linearisiert, wodurch gleichzeitig das Ende des zu transkribierenden Stücks für die spätere *in vitro* Transkription festgelegt wurde, die mit diesen Konstrukten durchgeführt wurde (siehe 2.2.5.7). Hierzu wurden 10 µg DNA in 43,5 µl Wasser mit 5 µl Puffer R, 0,5 µl BSA (10 mg/ml) und 1 µl HindIII (10 U/µl) 2 Stunden lang bei 37 °C verdaut.

Je ein Aliquot von 5 µl dieser Restriktionsansätze wurde mit 5 µl Gelladepuffer versetzt und auf ein 0,8 %-iges Agarosegel in 1x TAE-Puffer aufgetragen und für eine Stunde mit 6 V/cm aufgetrennt. Die Färbung der DNA erfolgte 10 Minuten lang in Ethidiumbromid-Lösung.

Die Aufreinigung nach dem Restriktionsverdau des Vektors mit EcoRI/HindIII als auch von Vektor und PCR-Produkten mit EcoRI/BamHI erfolgte jeweils mit dem "PCR Purification Kit" der Firma Qiagen (Hilden). Hierzu wurden 100 µl DNA-Präparation (10 µg) mit 10 µl Natriumacetat (3 M, pH 5,0) und 500 µl PB-Puffer versetzt, auf eine Trennsäule aufgetragen und zentrifugiert (60 s, 13.000 Upm, RT). Es wurde mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und zweimal zentrifugiert (60 s, 13.000 Upm, RT). Nach Überführung der Säule in ein neues Eppendorfgefäß wurde die DNA mit 2 x 30 µl Tris-HCl (10 mM, pH 8,5) resuspendiert und durch Zentrifugation (60 s, 13.000 Upm, RT) eluiert.

2.2.5.4 Dephosphorylierung

Der jeweils aus dem Doppelrestriktionsverdau mit EcoRI/HindIII und EcoRI/BamHI erhaltene Vektor wurde mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Dazu wurden jeweils 50 µg DNA in 300 µl Wasser mit 30 µl CIP-Puffer (10x) und 1 µl alkalischer Phosphatase (1 U/µl) versetzt und eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Ein 10 minütiges Erhitzen auf 75 °C beendete die Reaktion. Zur vollständigen Inaktivierung der Phosphatase wurden je 8,25 µl EDTA (0,5 M, pH 8,0), SDS (20 %) und Proteinase K (2 mg/ml) zugegeben und 30 Minuten lang bei 56 °C inkubiert. Nach Extraktion mit gleichen Volumina von Phenol (300 µl) und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, 300 µl) wurde die DNA mit 2 Volumina Ethanol (600 µl) und 0,1 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 5,3, 30 µl) versetzt, für 15 Minuten auf Eis gefällt, zentrifugiert (10 min, 12.000g, RT) und in 500 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.2.5.5 Ligation

Zum einen wurde das doppelsträngige DNA-Fragment poly (A-T)₅₀ in die EcoRI-HindIII-Schnittstelle, zum anderen die PCR-Produkte von Genen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* in die EcoRI-BamHI-Schnittstelle des Vektors *pBluescript II SK+* ligiert. Hierzu wurden jeweils im Verhältnis 3:1 1,5 µl DNA-Fragment (150 fmol) und 1 µl Vektor (50 fmol) mit 6 µl Wasser, 1 µl T4-DNA-Ligase-Puffer (10x), 0,5 µl T4-DNA-Ligase (200 U) über Nacht bei 16 °C ligiert. Bei der Ligation von PCR-Produkten von Genen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* in die EcoRI-BamHI-Schnittstelle des Vektors *pBluescript II SK+* wurden das zu ligierende Fragment und der Vektor im gleichen Verhältnis eingesetzt und wie oben beschrieben verfahren.

2.2.5.6 Transformation

Jeweils 1 µl Ligationsansatz wurden zu 40 µl frisch aufgetauten, elektroporationskompetenten Zellen (XL1-Blue der Firma Stratagene, Heidelberg) in einer vorgekühlten Elektroporationskuvette gegeben und eine Minute lang auf Eis inkubiert. Die Elektroporation wurde mit 14 kV/cm durchgeführt und der Elektroporationsansatz sofort mit 1 ml 2YT-Medium gemischt, 45 Minuten bei 37 °C in Eppendorfgefäß inkubiert und auf 2YT-Platten (50 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen, die mit 40 µl X-Gal (2 %) und 4 µl IPTG (20 %) vorbehandelt waren. Die Platten inkubierten bei 37 °C 12 bis 20 Stunden lang, bis die Bakterienkolonien eine Größe von ca. 1 - 2 mm erreicht hatten und eine Blau/weiß-Selektion durchgeführt werden konnte.

2.2.5.7 Plasmidpräparation

Die transformierten *E. coli*-Klone wurden in 2 ml 2YT-A-Medium übergeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Zellen erhielt man durch Zentrifugation (30 s, 4.000 Upm, RT). Der Überstand wurde bis auf 100 µl verworfen und das Pellet mit dem Restüberstand im Thermoschüttler gevortext (10 min, 1400 Upm, RT). Nach Zugabe von 300 µl Puffer 1 mit Vortexen für 5 Sekunden sowie 150 µl Puffer 2 mit 5 Sekunden Vortexen wurde der Ansatz zweimal invertiert und zentrifugiert (10 min, 13.000 Upm, RT). Der Überstand wurde zu 1 ml bei - 20 °C vorgekühltem Ethanol gegeben, gemischt und zentrifugiert (2 min, 13.000 Upm, RT). Nach Abdekantieren des Ethanols wurde das DNA-Pellet für 2 Minuten an der Vakuumpumpe von restlichem Ethanol befreit. Durch Zugabe von 20 µl Puffer 3 wurde die isolierte Plasmid-DNA resuspendiert und auf Eis bzw. bei - 20 °C gelagert.

2.2.5.8 *In vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkription wurde mit den neu erstellten Vektorkonstrukten, bei denen in *pBluescript II SK+* das poly (A-T)₅₀-Fragment und jeweils ein PCR-Produkt eines Gens der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* inseriert war und die mit HindIII linearisiert waren, durchgeführt (siehe Kap. 2.2.5.1 bis 2.2.5.6 und Kap. 3.4.3.2). Hierzu wurden sie mit jeweils 1 Volumen Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) aufgereinigt, mit 2 Volumina Ethanol und 0,1 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 5,3) 20 Minuten lang bei - 20 °C ausgefällt, zentrifugiert (10 min, 13.000 Upm, RT) und das Pellet in 100 µl DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen.

Für *in vitro* Transkription wurden dazu 5 µg Vektor-DNA in 35 µl Wasser mit 20 µl Transkriptions-Puffer (5x), 30 µl (A,C,G,U)TP-Mix (jeweils 25 mM) und 15 µl T3-RNA-Polymerase (200 U/µl) versetzt und 4 Stunden lang bei 37 °C inkubiert. Zum Verdau der DNA-Vorlage wurde der Reaktionsansatz mit 5 µl DNase (1 U/µg DNA) 15 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Nach einer Aufreinigung mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und Ausfällung mit 1 Volumen Isopropanol und 0,1 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 5,3) 5 Minuten lang auf Eis wurde die RNA durch Zentrifugation (10 min, 13.000 Upm, RT) abgetrennt, in 100 µl DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen und bei - 70 °C gelagert.

2.2.6 Gewebeproben der Pflanze *Arabidopsis thaliana*

Freundlicherweise wurden Gewebeproben der Pflanze *Arabidopsis thaliana* von Wurzel, Sprosse, Blüte und Stamm im Rahmen des 'Plant Plasma Membrane Database'-Projektes von Dr. Klaus Palme, MPI für Züchtungsforschung in Köln, Blattgewebe von Dr. Michel Rossignol, INRA in Montpellier (Frankreich), und Callusgewebe von Dr. Paul Dupree, University of Cambridge in Cambridge (England), zur Verfügung gestellt.

Die verschiedenen Gewebeproben wurden von der Pflanze *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia erhalten. Dabei erfolgte die Anzucht der Sämlinge in mit Torfkompost gefüllten Plastikschaalen der Größe 30 x 30 x 7 cm, die in 1,5 l Nährlösung pro Woche stehen. Die Schalen werden für die ersten 5-6 Tage mit einer Glassplatte bedeckt. Alle Kulturanzuchten wurden in einer computergesteuerten Phytokammer bei 20 °C Tag und Nacht, 8 Stunden Neon- und Weißlicht pro Tag mit einer Fluenz von 150 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ und bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70 % durchgeführt. Die Gewebeproben wurden 50 Tage nach Aussaat geerntet, eingefroren und bei -70 °C gelagert (**Santoni et al. 1998, Santoni et al. 1999**).

Callusgewebe wurde aus Flüssigkultur gewonnen. Dazu wurden sterile Samen auf MS-Platten bei 4 °C für 2 Tage, danach für 10 - 14 Tage bei 25 °C und 12 Stunden Licht am Tag zum Keimen gebracht. Dann wurden die Wurzeln entfernt, in Scheiben geschnitten und auf Callus-Induktionsmedium gebracht. Nach 3 - 4 Wochen bei schwachem Licht, 12 Stunden pro Tag, und 25 °C sind kleine Calli gewachsen. Nach zwei weiteren Kultivierungen für 3-4 Wochen kann die Anzucht in Flüssigkeit erfolgen. Dazu wurde Callus in 250 ml-Flaschen in 50 ml Gamborg's Medium angeimpft. Bei 110 Upm, 25 °C in Licht einer Osram 77/36 W Lampe für 12 Stunden am Tag kann das Medium nach einer Woche entfernt und eine Spatelspitze zu einer frischen Flasche mit Medium geimpft werden (**Wee et al. 1998, Sherrier et al. 1999**).

Die Anzucht der Gewebeproben und die genaue Zusammensetzung der Medien sind auch im Internet auf der Homepage des 'Plant Plasma Membrane Database'-Projektes dokumentiert (<http://sphinx.rug.ac.be:8080>).

Für die Untersuchung der Pathogenabwehr von *Arabidopsis thaliana* wurden mit dem avirulenten Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* infiltrierte Blätter freundlicherweise von Dr. Nikolaus Schlaich, RWTH Aachen, zur Verfügung gestellt. Die Anzucht der

Arabidopsis-Sämlinge erfolgte für 6 Wochen in klimakontrollierten Wachstumskammern mit einem Tag/Nacht-Rhythmus von 8,5/15,5 Stunden, bei einer Temperatur von 21 °C bei Tag und 19,5 °C bei Nacht, mit einer Lichtintensität von 150 $\mu\text{E}/\text{m}^2 \text{ s}$ und bei einer Luftfeuchtigkeit von 60 % (siehe Abb. 2.7 A). *Arabidopsis*-Pflanzen wurden für die Infiltration des Pathogens zuvor mit Leitungswasser besprüht und so für eine Stunde einer erhöhten Luftfeuchtigkeit ausgesetzt, die eine Öffnung der Stomata an der Blattunterseite zur Folge hat (siehe Abb. 2.7 B). Für die Infiltration der Blätter wurde eine 10 mM MgCl_2 -Lösung mit 5×10^6 cfu/ml des avirulenten Bakteriums *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, das das Avirulenzgen *avrRpt2* exprimiert (Pst *avrRpt2*), verwendet. Die Bakterien stammten aus dem Labor von Dr. Barbara Kunkel, Washington University, St. Louis, USA. Als Infiltrationskontrolle diente 10 mM MgCl_2 -Lösung ohne Pathogen. Die Infiltration der Blätter erfolgte durch die Benetzung beider Hälften der Blattunterseite mit der Infiltrationslösung mit einer Plastikspritze ohne Nadel (siehe Abb. 2.7 C und D). Dabei werden ca. 10 μl Infiltrationslösung pro Blathälfte verbraucht (Dong et al. 1991).

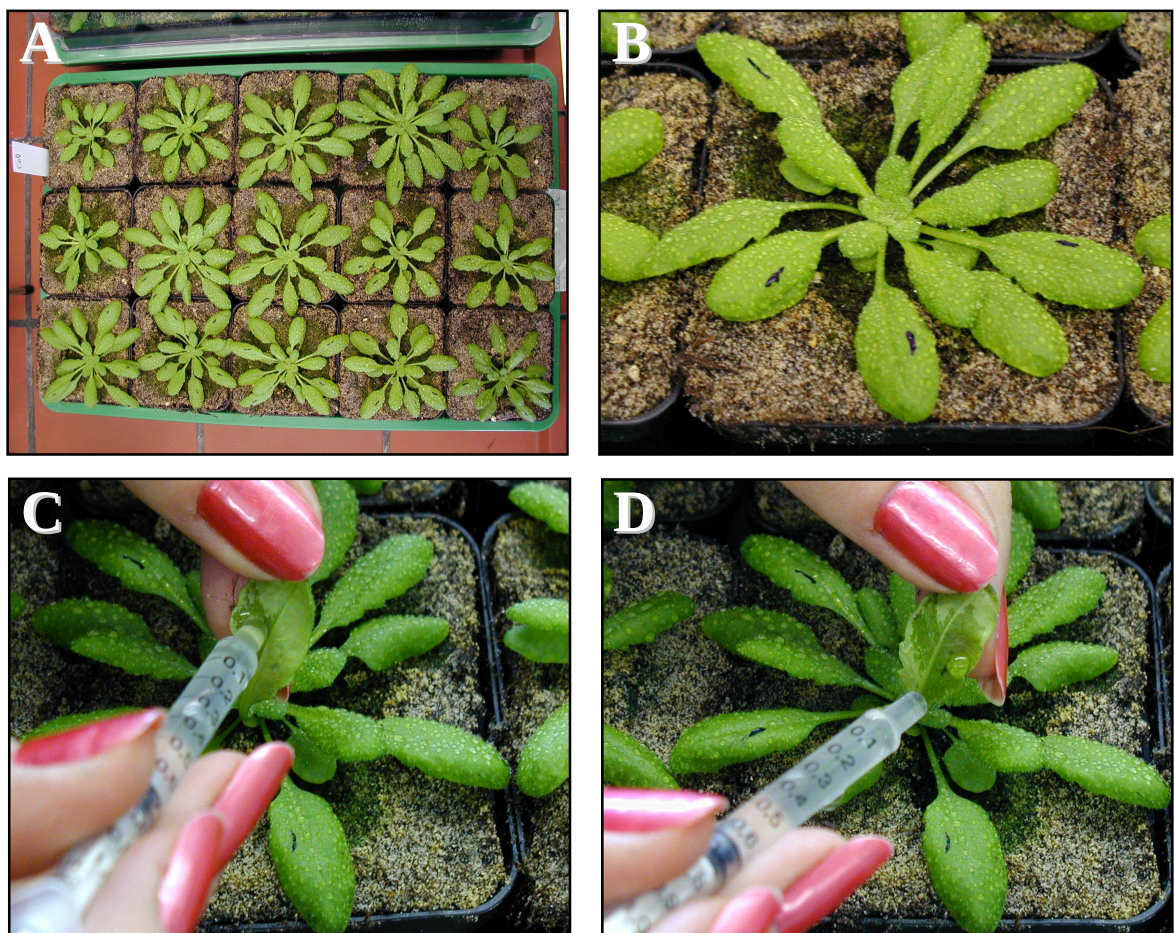


Abb. 2.7: Anzucht von *Arabidopsis thaliana* und Infiltration mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst *avrRpt2*).

A) Pflanzenanzucht in Schalen

B) Vorbereitung für Infiltration

C) Infiltration der linken Blattunterseite

D) Infiltration der rechten Blattunterseite

2.2.7 Isolation von genomischer DNA aus Pflanzen

Für die Isolation von genomischer DNA wurden 2 x 2,5 g Pflanzengewebe in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörsert, in je 25 ml CTAB-Puffer aufgenommen und 20 Minuten lang bei 65 °C inkubiert. Mit 10 ml Chloroform, 20 Minuten lang bei Raumtemperatur auf einem Rolltisch gemischt und zentrifugiert (5 min, 3.000 Upm, RT), wurden die Nucleinsäuren zweimal extrahiert. Die obere, wäßrige Phase wurde mit 17 ml Isopropanol gut gemischt, 10 Minuten auf Eis ausgefällt und durch Zentrifugation (5 min, 3.000 Upm, RT) abgetrennt. Das Pellet wurde in 4 ml 0,1x TE-Puffer aufgenommen und die RNA durch 4 ml Lithiumacetat (4 M), 10 Minuten lang auf Eis inkubiert, präzipitiert und durch Zentrifugation (10 min, 3.000 Upm, RT) abgetrennt. Aus dem Überstand wurde danach mit 16 ml Ethanol, für 20 Minuten auf Eis inkubiert, die DNA ausgefällt, zentrifugiert (5 min, 3.000 Upm, RT) und in 1 ml 0,1x TE-Puffer aufgenommen. Durch Zugabe von 1 µl RNase (15 µg/ml) und 15 minütiger Inkubation bei 37 °C verdaute noch vorhandene RNA. 100 µl Natriumacetat wurden zugegeben, die Reaktionsmischung auf zwei Eppendorfgefäße aufgeteilt, mit je 0,5 ml Phenol, Phenol/Chloroform und Chloroform extrahiert, zentrifugiert (15 s, 12.000 g, RT) und anschließend mit 2 Volumina (ca. 900 µl) Ethanol die DNA 5 Minuten lang auf Eis ausgefällt und zentrifugiert (5 min, 12.000 g, RT). Das DNA-Pellet lagerte nach Aufnahme in 100 µl 0,1x TE-Puffer bei -70 °C.

2.2.8 Isolation von Gesamt-RNA aus Pflanzen

Für die Isolation von Gesamt-RNA (auch total RNA genannt) aus tiefgefrorenem Gewebe von *Arabidopsis thaliana* wurden für den Gewebeaufschluß mit Mörser und Homogenisator 500 mg Gewebe eingesetzt. Für die Lyse wurde RNA-Clean (AGS, Heidelberg) eingesetzt. Die Separation von organischer und wässriger Phase erfolgte durch Zugabe von Chloroform. Die farblose, wässrige Phase enthält die RNA. Sie wurde abdekantiert und durch Zugabe von Isopropanol die RNA präzipitiert. Das RNA-Pellet wurde mit Ethanol gewaschen, in RNase-freiem Wasser resuspendiert und mittels einer LiCl-Präzipitation weiter aufgereinigt. Nach wiederholtem Waschen mit Ethanol und Resuspension in RNase-freiem Wasser konnte aus Pflanzengewebe total RNA gewonnen werden. Die genaue Vorschrift zur Isolierung von RNA aus Pflanzengewebe ist in Abbildung 2.8 schematisch dargestellt.

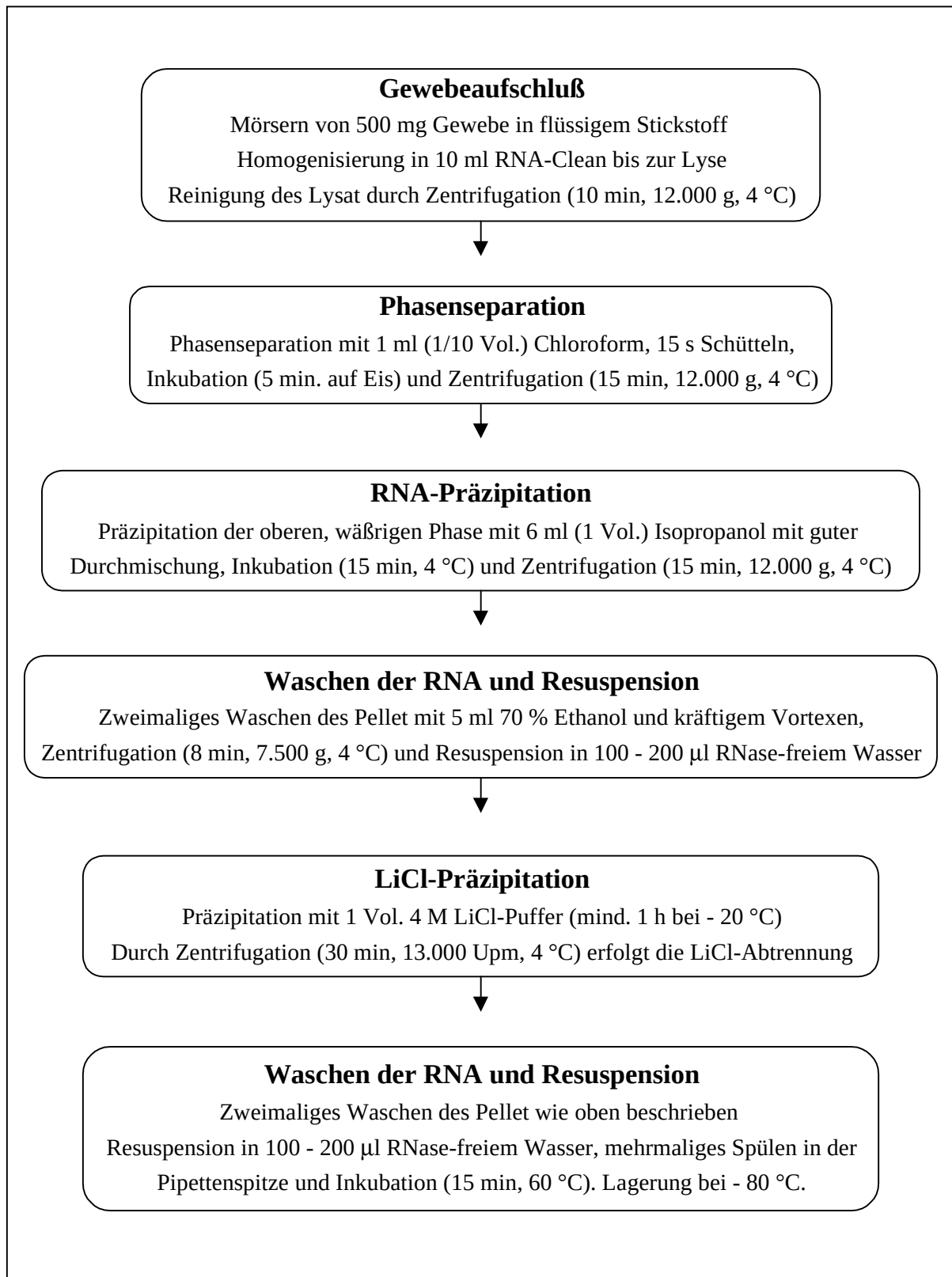


Abb. 2.8: Übersicht über Teilschritte zur Isolierung von RNA aus Pflanzengewebe. Zur Freisetzung der RNA werden Zellwand und Zellmembran durch Scherkräfte aufgeschlossen. Die freigesetzte RNA, die sich in der wäßrigen Phase anreichert, wird abgetrennt, mit Isopropanol ausgefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen, nochmals mit einer LiCl-Präzipitation aufgereinigt und in RNase-freiem Wasser resuspendiert und gelagert.

2.2.9 Herstellung von DNA-Sonden für Hybridisierungen

Für die Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden wurde das Isotop ^{33}P verwendet. Dabei kamen drei verschiedene Markierungsmethoden zur Anwendung:

- 1) Markierung von DNA-Oligonucleotiden durch 5'-OH-Phosphorylierung
- 2) Markierung von DNA-Sonden durch 'Random Hexamer Priming'
- 3) Markierung von cDNA durch reverse Transkription von RNA

Bei der Verwendung von fluoreszenzmarkierten Sonden kamen Oligonucleotide zum Einsatz, an deren 5'-OH-Ende vom Hersteller (Interactiva, Ulm) der Fluoreszenzfarbstoff Cy5 gekoppelt war.

2.2.9.1 Markierung von DNA-Oligonucleotiden durch 5'-OH-Phosphorylierung

Oligonucleotide wurden durch Phosphorylierung der 5'-OH-Position mit $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]$ ATP radioaktiv markiert. Hierzu inkubierten 20 pmol Oligonucleotid mit 1 μl T4 PNK-Puffer (10x), 1 μl $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]$ ATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) und 1 μl T4 Polynucleotid-Kinase (10 U/ μl) in einem Volumen von 10 μl eine Stunde lang bei 37 °C. Der Ansatz wurde direkt für die Hybridisierung eingesetzt (**Maniatis et al. 1982**).

2.2.9.2 Markierung von DNA-Sonden durch 'Random Hexamer Priming'

DNA-Moleküle größer als 100 Bp wurden durch Replikation unter Einbau von $[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]$ dCTP für die Hybridisierung auf DNA-Arrays und unter Einbau von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP für die Hybridisierung auf Northern Blots radioaktiv markiert. Als Startpunkt der Replikation diente dabei ein Hexamer-Primergemisch mit allen 4.096 möglichen Hexamersequenzen. Hierzu wurden 20 - 500 ng DNA in 15 μl Wasser für 5 min bei 96 °C denaturiert, auf Eis gekühlt und mit einem Gemisch aus 18 μl LS-Mischung (700 nM Hexamer-Primergemisch pDN6), 1,5 μl BSA (10 mg/ml), 1 μl d(A,G,T)TP-Mix (je 0.5 mM), 1 μl $[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]$ dCTP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) und 1,5 μl Klenow-Fragment (5 U/ μl) mindestens zwei Stunden lang bei 37 °C inkubiert. Zur Abtrennung nicht eingebauter Radionucleotide wurden der Lösung 4 μl Wasser, 2 μl tRNA (10 mg/ml), 4 μl

EDTA (0,5 M), 10 µl Natriumacetat (3 M) und 60 µl Isopropanol zugesetzt. Nach 15 minütiger Präzipitation bei - 70 °C und Zentrifugation (15 min, 13.000 Upm, RT) konnte das Pellet in 100 µl Wasser aufgenommen werden (**Maniatis et al. 1982**).

2.2.9.3 Markierung von cDNA durch reverse Transkription von RNA

RNA-Proben wurden durch reverse Transkription in eine DNA-Sonde umgeschrieben und dabei unter Einbau von [α -³³P] dCTP radioaktiv markiert. Als Startpunkt der cDNA-Erststrang-Synthese diente dabei ein dT₁₈-Oligomer. Hierzu wurden 10 µl total RNA (2,5 µg/µl) mit 1 µl Oligo(dT)₁₈ (500 ng/µl) 10 Minuten lang bei 70 °C inkubiert und danach bei 43 °C äquilibriert. Unter Zugabe von 6 µl RT-Puffer (5x), 3 µl DTT (0,1 M), 3 µl d(A,G,T)TP-Mix (je 10 mM), 3 µl [α -³³P] dCTP (10 µCi/µl) und 2 µl Superscript RT II (200 U/µl) erfolgte die reverse Transkription innerhalb einer Stunde bei 43 °C. Eine RNA-Hydrolyse gelang durch 30 minütige Inkubation mit 1 µl SDS (1 %), 1 µl EDTA (0,5 M) und 3 µl NaOH (3 M) bei 65 °C und weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur. Zur Neutralisation wurden 10 µl Tris-HCl pH 8,3 und 3 µl 2N HCl zugegeben. Für die Bestimmung der Einbaurate mit Glasfibrfiltern (siehe 2.2.5.4) wurde ein Aliquot von 4 µl abgenommen. Der Rest der cDNA-Suspension wurde unter Zugabe von 5 µl Na-Acetat pH 5,3 (3 M), 5 µl tRNA (10mg/ml) und 60 µl Isopropanol 30 Minuten lang bei - 20 °C ausgefällt und das cDNA-Pellet durch Zentrifugation (30 min, 13.000 Upm, RT) erhalten (**Nguyen et al. 1995**).

2.2.9.4 Bestimmung der Einbaurate von Radionucliden

Für die Bestimmung der Einbaurate von eingesetzten Radionucleotiden wurde die cDNA-Aktivität mit der Radioaktivität nicht inkorporierter Radionucleotide ins Verhältnis gesetzt. Dafür stehen folgende zwei Methoden zur Auswahl:

a) Präzipitation von Nucleinsäuren mit TCA

Das abgenommene Aliquot der markierten cDNA-Suspension (siehe Kap. 2.2.9.3) wurde auf zwei Glasfibrfilter zu je 2 µl der cDNA-Suspension nach RNA-Hydrolyse und Neutralisation gespottet und getrocknet. Ein Filter unterlag der dreimaligen Inkubation für fünf Minuten mit 10 % eiskaltem TCA, gefolgt von einem Waschschrift von zwei Minuten mit 95 % Ethanol. Der Filter wurde an der Luft getrocknet und mit dem unbehandelten Glasfibrfilter in

Szintillationslösung gelegt und im Szintillationszähler vermessen. Die Einbaurate errechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{Einbaurate [\%]} = \frac{\text{Szintillationscounts gewaschener Filter}}{\text{Szintillationscounts ungewaschener Filter}} \times 100$$

Abb. 2.9: Formel zur Berechnung der prozentualen Einbaurate (Methode a).

b) Vergleich der Aktivität von cDNA-Pellet und Überstand

Nach Präzipitation der cDNA und Überführung des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß können Überstand und cDNA-Pellet getrennt im Szintillationszähler vermessen werden. Die Einbaurate konnte nach folgender Formel ermittelt werden:

$$\text{Einbaurate [\%]} = \frac{\text{Szintillationscounts cDNA-Pellet}}{\text{Szintillationscounts cDNA-Pellet + Überstand}} \times 100$$

Abb. 2.10: Formel zur Berechnung der prozentualen Einbaurate (Methode b).

2.2.9.5 Längenbestimmung radioaktiv markierter, einzelsträngiger cDNA

Die Länge der radioaktiv markierten, einzelsträngigen cDNA wurde durch eine alkalische Gelelektrophorese bestimmt. Hierzu wurde ein 1,4 % iges alkalisches Agarosegel mit 2,1 g Agarose in 150 ml Wasser mit 750 µl NaOH (10 N) und 300 µl EDTA (0,5 M, pH 8,0) gegossen und für mindestens 30 Minuten in vorgekühltem, alkalischem Elektrophorese-Puffer äquilibriert. Die zu analysierende cDNA wurde als 5 µl Aliquot vom aufgereinigten cDNA-Erststrang-Synthese-Ansatz abgenommen, mit 5 µl Wasser und 2 µl alkalischem Gelladepuffer versetzt und bei 1 V/cm 16 Stunden lang bei 4 °C elektrophoretisch aufgetrennt. Als Längenstandard diente mit Sau3A verdaute λ-DNA, die zuvor durch 5'-OH-Phosphorylierung radioaktiv markiert worden war (siehe 2.2.8.1). Das Gel mit den radioaktiven Proben wurde für mehrere Stunden zwischen 3MM Whatman Papier gelegt, überschichtet mit einem Stapel Papiertücher und beschwert, getrocknet, in Folie gewickelt und auf einem Phosphorscreen über Nacht exponiert (siehe 2.2.9.3 und 2.2.9.4).

2.2.10 Hybridisierungen

Die Hybridisierung auf DNA-Membranen der Größe 13 x 8 cm erfolgte in Glasflaschen der Länge 150 mm (für max. zwei Membranen) und 300 mm (für max. fünf Membranen). Für die Hybridisierung lagen die Filter in den Hybridisierflaschen an der Gefäßwand. Die Deckel waren für den Druckausgleich mit einem kleinen Loch versehen. Die Hybridisierröhren wurden während der Vorhybridisierung, der eigentlichen Hybridisierung und der Waschschrte in einem Rotationsofen permanent horizontal gedreht, um trotz eines kleinen Volumens (10 ml für kleine und 20 ml für große Glasflaschen) eine homogene Benetzung der Membranen mit der Sondenlösung zu ermöglichen.

Bei der Hybridisierung von DNA-Sonden auf DNA-Arrays ist die Hybridisierungstemperatur entscheidend von der Länge der zu hybridisierenden DNA-Sonden abhängig. Daher wurde die Hybridisierung prinzipiell nach kurzen DNA-Oligonucleotiden und DNA-Sonden ab einer Länge von 100 Bp unterschieden.

2.2.10.1 Hybridisierung von DNA-Oligonucleotiden

Die DNA-Membranen wurden in 10 ml vorgekühltem (4 °C) SSarc-Puffer bei 10 °C äquilibriert. Nach Zugabe der markierten Oligonucleotid-Sonde wurde über Nacht (mind. 10 Std.) bei 10 °C hybridisiert. Die Hybridisierlösung wurde danach abdekantiert und die Membranen mit 10 ml vorgekühltem SSarc-Puffer 10 Minuten lang bei 10 °C gewaschen.

2.2.10.2 Hybridisierung von DNA-Sonden ab einer Länge von 100 Bp

Die DNA-Membranen wurden in 20 ml Church-Puffer äquilibriert und nach Zugabe von 200 µl tRNA (10 mg/ml) für 0,5 bis 2 Stunden bei 65 °C vorhybridisiert. Nach Zugabe der für fünf Minuten bei 95 °C denaturierten DNA-Sonde wurde über Nacht (mind. 10 Std.) bei 65 °C hybridisiert. Die Membranen wurden mit vortemperiertem (65 °C) Waschpuffer kurz gespült und dann mit 20 ml vortemperiertem Waschpuffer 15 Minuten lang bei 65 °C gewaschen.

2.2.10.3 Exposition der DNA-Arrays

Für die Exposition der hybridisierten DNA-Arrays wurden Phosphorscreens verwendet, die die Strahlungsenergie während der Exposition im Kristallgitter einfangen. Dazu wurden die DNA-

Membranen einzeln in dünne Folie luftblasenfrei verpackt, auf einen Phosphorscreen gelegt und in einer lichtdichten Kassette bei Raumtemperatur exponiert. Nach einer Expositionszeit von zwei bzw. drei Tagen wurde der Phosphorscreen am Phosphorimager eingelesen. Bevor ein Phosphorimager zur Verfügung stand, wurden radioaktiv hybridisierte DNA-Arrays und Northern Blots auf Autoradiographie-Filmen exponiert. Hierzu wurden die Membranen in dünne Folie luftblasenfrei verpackt, auf einen Hyperfilm-MP-Film und in einer Autoradiographie-kassette mit Verstärkerfolie gelegt. Die Exposition erfolgte über Nacht bei - 70 °C. Die Entwicklung erfolgte manuell.

2.2.10.4 Bilderstellung am Phosphor-/Fluoroimager Storm 860

Für die Bilderstellung wurden die Phosphorscreens nach der Exposition an dem Phosphorimager Storm 860 (Molecular Dynamics, APBiotech, Freiburg) eingelesen. Hierzu wurde der Phosphorscreen mit einer Absorptionswellenlänge von 635 nm angeregt. Dadurch erfolgte die Emission der in Form von Gitterenergie gespeicherten Information des radioaktiv hybridisierten DNA-Arrays als blaues Licht, das bei etwa $\lambda = 390$ nm detektiert wurde. Die Detektion erfolgte bei der höchsten Auflösung von 50 μm pro Kantenlänge eines Pixels, und das so erhaltene Bild wurde als 16-bit-Datei abgespeichert (siehe Abb. 2.11).

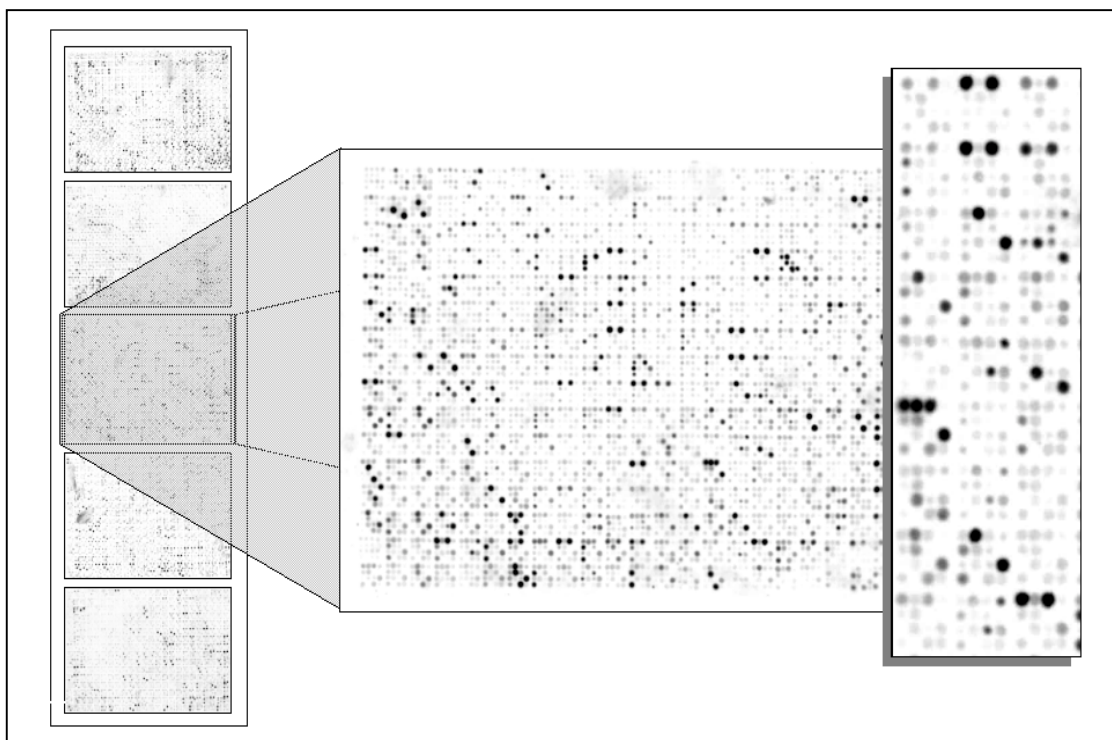


Abb. 2.11: Typisches Bild einer komplexen, auf den genomischen *Arabidopsis*-Array hybridisierten, radioaktiv markierten cDNA-Probe.

Für die Bilderstellung von Fluoreszenzhybridisierungen wurde der DNA-Array direkt am Fluoroimager Storm 860 eingelesen. Dabei wurde mit der auch für den Fluoreszenzfarbstoff Cy5 geeigneten Absorptionswellenlänge von 635 nm angeregt und die Emission ab einer Wellenlänge von 650 nm detektiert. Die Detektion erfolgte bei der höchsten Auflösung von 50 µm pro Kantenlänge eines Pixels, und das so erhaltene Bild wurde als 16-bit-Datei abgespeichert.

2.2.10.5 Regeneration der DNA-Arrays

Die Regeneration der DNA-Arrays erfolgte durch dreimaliges Waschen mit Regenerationspuffer. Dazu wurden zweimal 100 ml siedender Regenerationspuffer über die DNA-Membranen gegossen, kurz geschwenkt und die Lösung abdekantiert. In weiteren 200 ml siedendem Regenerationspuffer wurden die DNA-Membranen inkubiert, bis die Waschlösung Raumtemperatur erreichte. Für kurze Wartezeiten zwischen zwei Hybridisierungen lagerten die Membranen in Hybridisierungspuffer bei Raumtemperatur. Für Aufbewahrungszeiten von Wochen bis Monaten wurden die Membranen nach mehrmaligem Waschen mit Niedrigsalzpuffer getrocknet und bei 4 °C gelagert.

2.2.11 Spot- und Hintergrunddetektion zur Erstellung eines komplexen Transkriptionsprofils

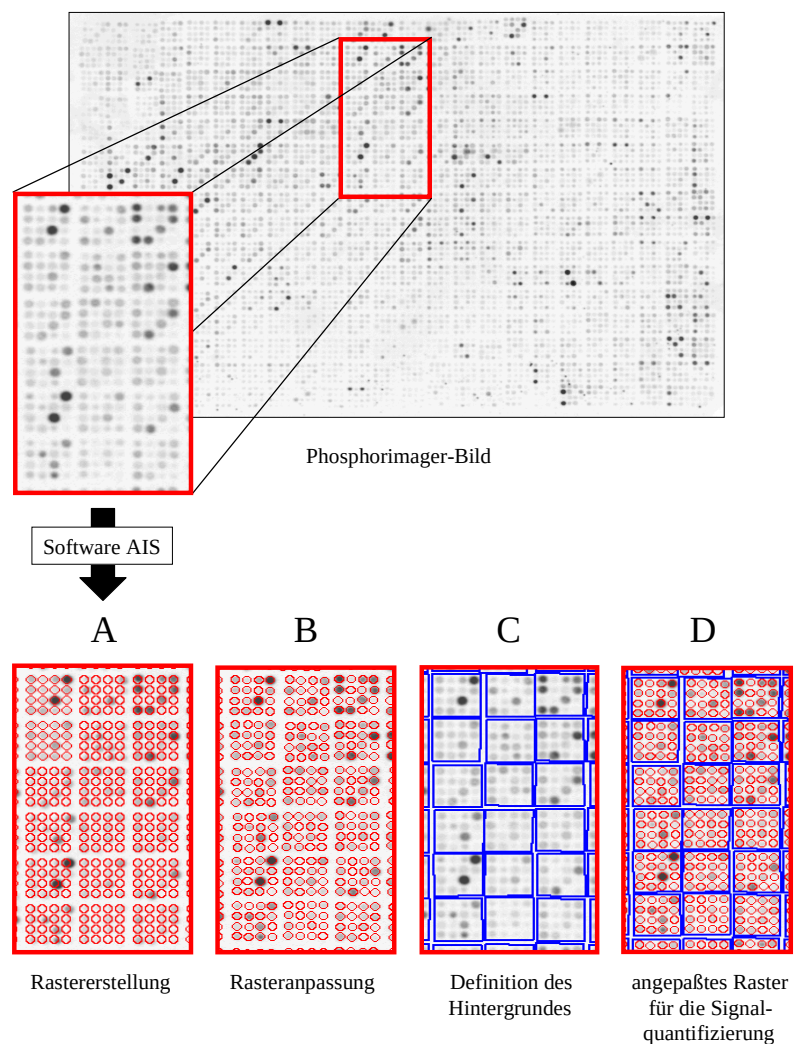
Für die Erstellung eines komplexen Transkriptionsprofils mußte die am Phosphorimager erzeugte, visuelle Information in Form von Grauwerten durch Quantifizierung in einen Datensatz mit Signalintensitäten konvertiert werden. Dazu wurde mit Hilfe des Moduls "*Array Vision (High Density Grids)*" des Softwarepakets "*Array Imaging Station*" (AIS, Imaging Research Inc., Toronto, Canada) ein Datensatz erzeugt, der Position, Signalintensität und lokalen Hintergrund eines jeden Spots beinhaltete. Dazu wurde das Hybridisierungsbild in die Software eingelesen und ein ideelles Raster mit zwei Ebenen erstellt, das dem wirklich gespotteten Array entsprach. Die dabei eingestellten Parameter sind in folgender Tabelle 2.15 ersichtlich:

Rasterkonfiguration	Zeilen	Spalten	Zeilen	Spalten
Spotdurchmesser	0,7 mm			
1. Ebene	4	4	2. Ebene	80
Intervall	1,0 mm	1,0 mm	Intervall	4,5 mm
PCR-Platten in Feld 1	1 - 7		Quadrant in Feld 1	1A - P
Feld 2	8 - 14		Feld 2	2A - P
Feld 3	15 - 21		Feld 3	3A - P
Feld 4	22 - 28		Feld 4	4A - P
Feld 5	29 - 36		Feld 5	5A - P

Tab. 2.15: Einstellungen der Rasterkonfiguration für den genomischen *Arabidopsis*-Array
(siehe Kap. 2.2.3.2).

Dabei wurde das Raster so definiert, daß die Verknüpfung der Spotposition mit der PCR-Quellplatte erhalten blieb (siehe auch 2.2.3.2). Dieses ideell erstellte Raster wurde über das Bild gelegt und konnte dort visuell an das wirklich gespottete Raster angepaßt werden. Diese Anpassung erfolgte sowohl manuell wie auch automatisch. Für die Messung des lokalen Hintergrundes wurde um jeden Quadranten ein Doppelrahmen definiert, der einen Abstand zum Quadranten von 5 Pixeln (250 µm) und eine Dicke von 1 Pixel hatte. In der Abbildung 2.12 ist eine Übersicht über die Auswertung mit der Software AIS dargestellt.

Abb. 2.12:
Software AIS für die Bildanalyse:
Rasteranpassung und
Spotdetektion als Voraussetzung
für die Quantifizierung der
Spotsignale.



Die Software AIS führte nach Rasterkonfiguration und Anpassung eine mehrere Minuten dauernde Signalquantifizierung durch. Das Ergebnis wurde in einer Tabelle dargestellt, in der jede Spotposition mit ihrer zugehörigen absoluten Signalintensität (DxA für "*Density x Area*") als Integration des Signals über die Fläche, gemessen in MDC: "*Molecular Dynamic Counts*"), dem lokalen Hintergrund (Bkgd für "*Background*") und der hintergrundkorrigierten Signalintensität (sDxA für "*subtracted DxA*") aufgeführt wurde. Wie in Abbildung 2.13 zu sehen ist, kann man in dieser Software bereits Spotintensitäten in einfachster Form miteinander vergleichen.

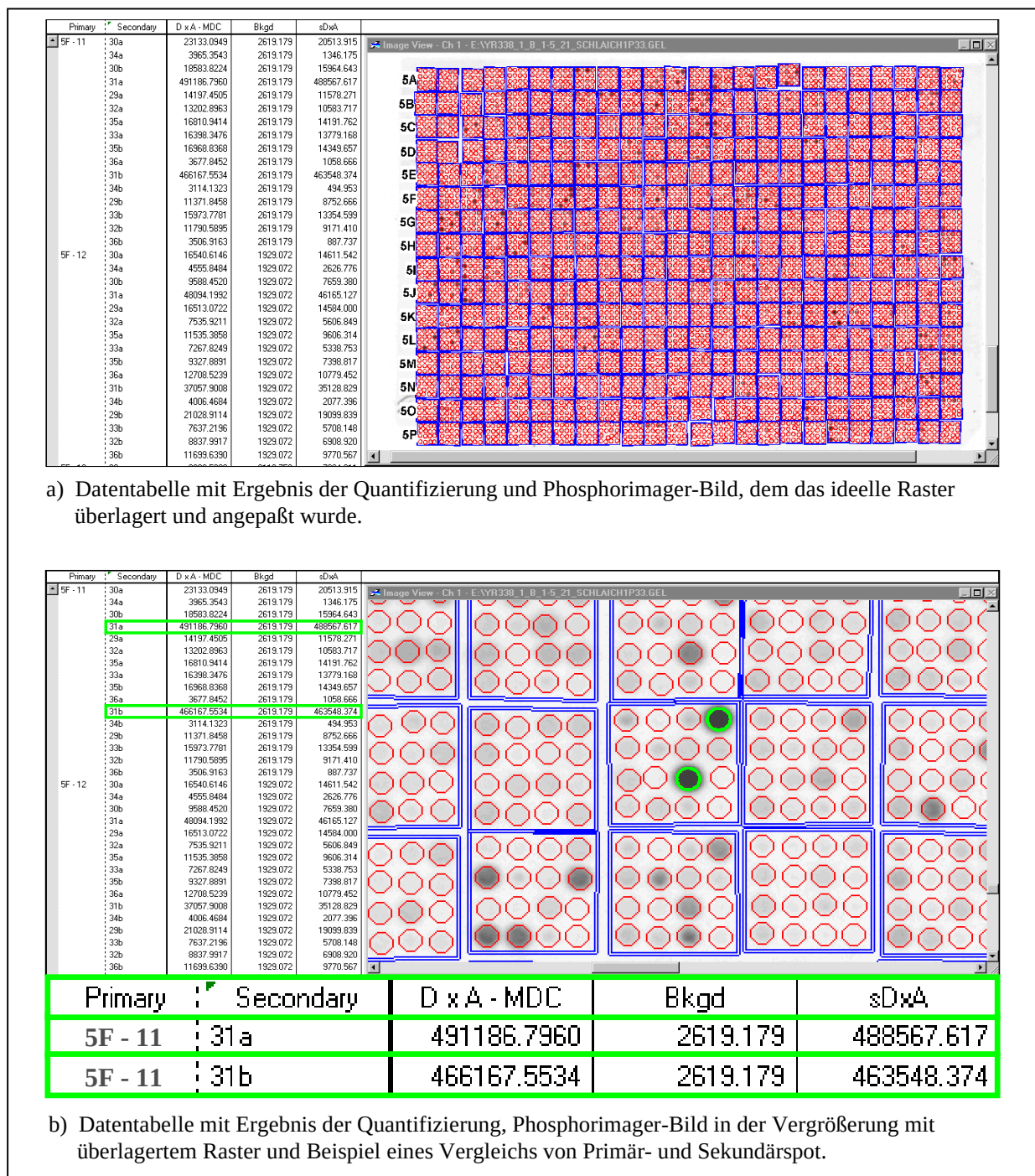


Abb. 2.13: Datentabelle mit Ergebnis der Quantifizierung von Signal und Hintergrund mit zugehörigem Phosphorimager-Bild für die Erstellung eines Transkriptionsprofils.

2.2.12 Vergleich und Analyse komplexer Transkriptionsprofile

Der Vergleich und die Analyse komplexer Transkriptionsprofile wurde mit der Software Matlab (The Math Works Inc., Natick, USA) durchgeführt, die von Tim Beißbarth und Kurt Fellenberg, Abteilung "Theoretische Bioinformatik" von Dr. Martin Vingron (DKFZ, Heidelberg), speziell auf die Anforderungen zur Visualisierung und Auswertung komplexer Transkriptionsprofile programmiert wurde. Matlab behandelt den Datensatz eines komplexen Transkriptionsprofils, das aus der Bildanalyse kommt, als Matrix, in der jeweils die Position, die Signalintensität und der Hintergrund eines Elements des DNA-Arrays in einer Zeile stehen (siehe Kap. 2.2.11, Abb. 2.13). Diese Eingangsmatrix wurde mit einer separaten Matrix verknüpft, die die cDNA-Klon-Identitäten und EST-Identitäten jedes Spots enthält.

2.2.12.1 Normalisierung komplexer Transkriptionsprofile

Um nach dem Einlesen von zwei Datenmatrizen und der Verbindung mit der Namensmatrix zwei komplexe Transkriptionsprofile miteinander vergleichen zu können, mußten beide Datensätze aufeinander normiert werden. Dazu wurde von Matlab zum einen der lokale Hintergrund abgezogen (siehe Kap. 2.2.11). Zum anderen wurde für den Vergleich zweier Hybridisierungen, die aufgrund verschieden effizienter Sondenmarkierungsraten oder Expositionszeiten am Phosphorimager unterschiedliche Signalintensitäten aufweisen können, ein konstanter Normalisierungsfaktor bestimmt. Dieser multiplikative Faktor adaptiert die Steigung beider Datensätze auf den Wert 1, indem der Median für die Intensitätsunterschiede der Gene auf 1 normiert wird ("Adjust Values"). Die Gene bzw. Spots, die zur Bestimmung des Faktors der differentiellen Transkription verwendet wurden, konnten nach unterschiedlichen Kriterien und in Abhängigkeit vom Design des DNA-Arrays zusammengestellt werden (siehe Kap. 3.4).

2.2.12.2 Datenanalyse mit bildanalytischen und statistischen Methoden

Zur Visualisierung des Vergleichs zweier Hybridisierungen wurde der Scatterplot gewählt. Im Scatterplot wird die Intensität jedes Gens in Experiment 1 seiner Intensität in Experiment 2 gegenübergestellt. Dabei werden die Intensitäten in einer logarithmischen Skala angegeben, wie es in Abbildung 2.15 dargestellt ist. Dabei liegt das Interesse auf dem relativen Signalverhältnis der Gene in verschiedenen Proben, nicht in ihren absoluten Signalunterschieden.

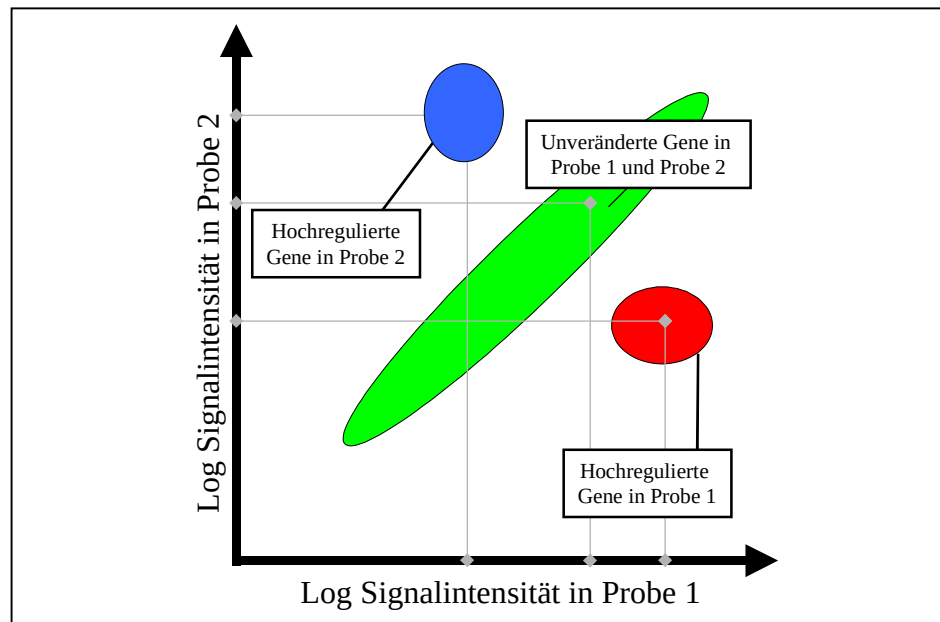


Abb. 2.14: Prinzip des Scatterplots für den Vergleich von zwei Transkriptionsprofilen. Die Gene auf der Diagonalen zeigen gleiche Signalintensität in beiden Proben. Differenziell regulierte Gene weichen von dieser Diagonalen ab. Der Abstand zur Diagonalen gibt dabei die Stärke der differentiellen Regulation wieder.

Für die Analyse der komplexen Variationen zwischen Transkriptionsprofilen standen mehrere bildanalytische, interaktive Funktionen zur Verfügung (siehe Abb. 2.16).

Zur besseren Übersicht konnten definierte Spotkategorien wie leere Hintergrundspots und Kontrollgene angezeigt und eingefärbt oder ausgeblendet werden ("*Display of Categories*"). Auch eine Zoomfunktion wurde dafür implementiert ("*Zoom*"). Diagrammbereiche, die aufgrund schwacher Signalintensitäten nur schwer reproduzierbare Signalverhältnisse bildeten, konnten vor der Datenselektion markiert und extrahiert werden ("*Cutoff*"). Auch Gene, die in Primär- und Sekundärspot eine wählbare Standardabweichung überschritten, konnten von der weiteren Datenanalyse ausgeschlossen werden.

Differenziell transkribierte Gene konnten in Abhängigkeit ihres Intensitätsverhältnisses zwischen Probe 1 und Probe 2 gefiltert, sortiert und exportiert werden ("*Select by Factor*"). Weiterhin bestand die Möglichkeit, in einem selbstdefinierten Diagrammbereich Gene von Interesse zu selektieren und die entsprechenden Daten zu exportieren ("*Select*" und "*Export Values*"). Es bestand auch die Möglichkeit, durch Eingabe einer Liste von Genen oder einzelner cDNA-Klon-Identitäten gezielt nach Genen von Interesse zu suchen ("*Import List*" und "*Find Gene*").

Bei der Suche nach einzelnen Genen, die sich durch stark differentielle Regulation hervorheben, erlaubt die statistische Datenanalyse eine erste schnelle und effektive Datenfilterung.

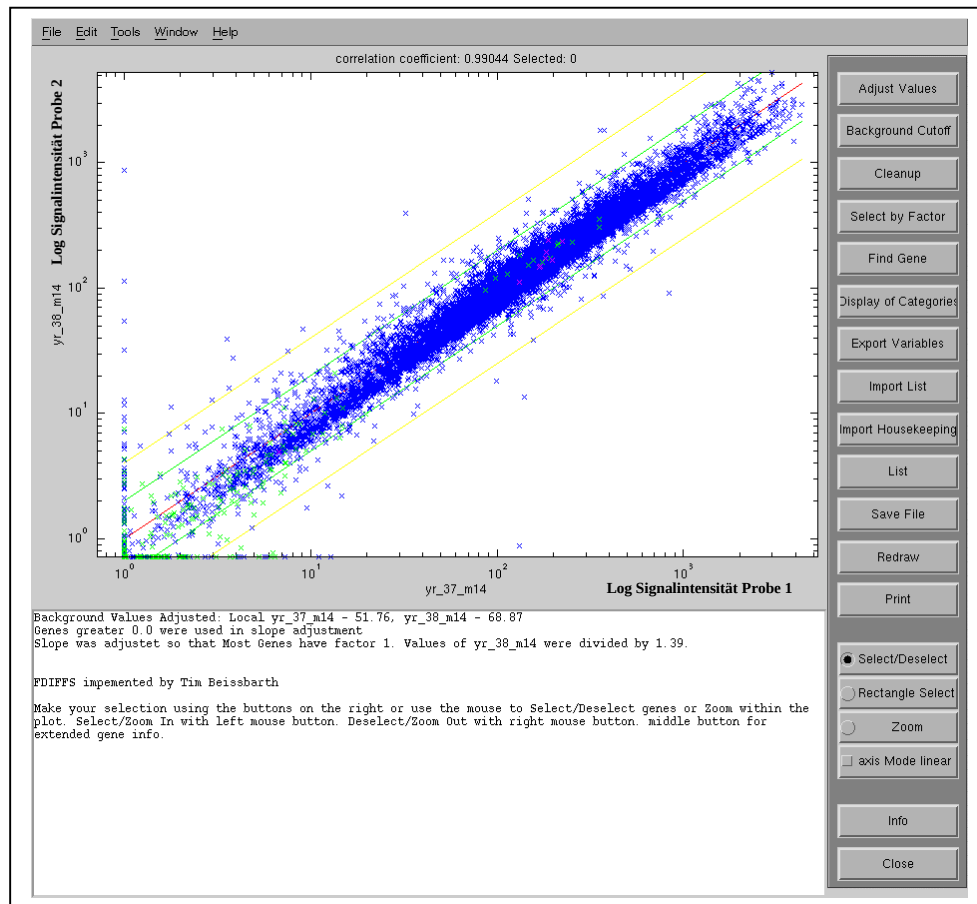


Abb. 2.15: Software Matlab bietet die Möglichkeit der Visualisierung und statistischen Datenanalyse für den Vergleich von zwei Transkriptionsprofilen.

2.2.12.3 Datenanalyse im biologisch-funktionellen Zusammenhang

Bei der Analyse kompletter Stoffwechselwege genügt die Filterung stark differentiell regulierter Gene allein nicht. Die Identifizierung dieser Gene durch eine erste statistische Auswertung definierte die Stoffwechselwege von Interesse für weitere Analysen. Für die zweite Phase der Datenanalyse wurden Listen von Genen generiert. Das Auswahlkriterium dafür war die Zugehörigkeit des Gens zu dem Stoffwechselweg von Interesse und damit die Genfunktion. Diese Verknüpfung vom Gen und seiner Funktion konnte durch Datenbankrecherche in "EMBL" und "SwissProt" mit Hilfe der EST-Sequenzen für 44 % aller 13.800 cDNA-Klone erreicht werden. Aus den annotierten cDNA-Klonen konnten Genlisten für ganze Stoffwechselwege zusammengestellt werden. Diese Genlisten konnten dann anhand der Funktion "Import List" in verschiedenen Vergleichen von komplexen Transkriptionsprofilen selektiert und die Daten exportiert werden. Diese Datensätze konnten durch vergleichende Analysen ausgewertet werden.

2.2.13 Fehlerbetrachtung

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen systematischen und zufälligen Fehlern. Alle Fehlerarten können absolut (Δx), relativ ($\Delta x/x$) oder prozentual ($\Delta x/x \cdot 100$) angegeben werden. Bevorzugt wird jedoch die prozentuale Darstellung, weil sie die größte Aussagekraft über die Qualität der Daten besitzt.

Systematische Fehler können hervorgerufen werden durch das Meßverfahren wie Scannen der Phosphorscreens und Quantifizierung der Signalintensitäten, vernachlässigte Einflüsse wie Druck und Luftfeuchtigkeit oder durch Verunreinigung der verwendeten Substanzen. Wird eine Messung unter gleichen Bedingungen wiederholt, so tritt ein systematischer Fehler in gleichbleibender Größe und mit gleichem Vorzeichen auf. Können systematische Fehler nicht vermieden oder klein gehalten werden, so sind sie im Meßergebnis durch eine entsprechende Korrektur zu berücksichtigen. Systematische Fehler sind jedoch nicht Gegenstand einer Fehlerberechnung.

Zufällige Fehler entstehen durch ungenaues Messen und Ablesen und statistisch wirkende äußere Einflüsse wie z. B. Temperaturschwankungen. Zufällige Fehler haben einen statistischen Charakter mit beiderlei Vorzeichen. Wird die Messung mehrmals durchgeführt, so streuen die Meßwerte um einen Mittelwert. Dieser Mittelwert ist mit dem wahren Wert im allgemeinen nicht identisch, nähert sich diesem aber mit zunehmender Zahl von Messungen immer weiter an.

Wird eine Größe x immer wieder unter völlig gleichen Bedingungen gemessen, so liegen die Meßwerte in einem bestimmten Bereich und der am häufigsten vorkommende Meßwert etwa in der Mitte dieses Bereiches (sofern nur zufällige Fehler auftreten). Wird die Häufigkeit n , mit der die einzelnen Meßwerte auftreten, über dem Meßwert x aufgetragen, so ergibt sich eine Verteilungskurve, die bei einer großen Anzahl von Messungen in eine Glockenkurve, die Gaußsche Normalverteilung, übergeht. Das Maximum dieser Kurve, also der häufigste Wert, ist der wahrscheinlichste Wert und entspricht dem **arithmetischen Mittel** $\bar{x}$:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i$$

x_i : einzelner Meßwert

n : Anzahl der Messungen

Die Gaußsche Normalverteilungskurve zeigt, wie weit sich die Meßwerte vom Mittelwert $\bar{x}$ entfernen können.

Als mittleren Fehler der Einzelmessung bezeichnet man die durchschnittliche Abweichung der Meßwerte vom Mittelwert $\bar{x}$, auch **Standardabweichung s** genannt:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

$\bar{x}$: arithmetisches Mittel
 x_i : einzelner Meßwert
 n : Anzahl der Messungen

Mit $\bar{x} \pm s$ wird in der Gaußverteilung der Bereich zwischen den Wendepunkten der Verteilungskurve erfaßt. Bei der Fehlerbetrachtung ist zu berücksichtigen, daß eine Vergrößerung der Zahl der Messungen zwar zu einer Verbesserung des Mittelwertes $\bar{x}$, nicht aber zu einer Verkleinerung des mittleren Fehlers der Einzelmessung s führt, weil mit der Zahl der Messungen die Genauigkeit der einzelnen Messungen nicht steigen kann.

Aus dem arithmetischen Mittel $\bar{x}$ und der Standardabweichung s ergibt sich dann der relative Fehler, der auch als **prozentualer Fehler m** angegeben werden kann.

$$m = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

s : mittlerer Fehler der Einzelmessung
 $\bar{x}$: arithmetisches Mittel

Die Bestimmung der Signalintensitäten und die regulatorische Veränderung der Transkriptionsrate der untersuchten Gene erfolgte in der Regel durch Mittelung der Datensätze von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Die im Ergebnisteil angegebenen Daten sind die jeweiligen Mittelwerte. Zur besseren Übersicht ist bei den abgebildeten Diagrammen auf Fehlerbalken verzichtet worden.

III. Ergebnisse

3.1 DNA-Arrays

3.1.1 PCR-Amplifikation von 13.800 cDNA-Klonen

Die PCR-Amplifikation der 13.800 cDNA-Klone der Gesamtbibliothek wurde in einem Hochdurchsatz-Verfahren durchgeführt. Dabei konnten entsprechend dem 96er und 384er Mikrotiterplattenformat zunächst 96, später durch Nachrüstung der Thermocycler auch 384 cDNA-Insertionen parallel pro Thermocycler amplifiziert werden. Dazu wurden universelle Primer ausgewählt, die in verschiedenen Kombinationen alle cDNA-Subbibliotheken abdeckten und zusätzlich die T7-Sequenz beinhalteten oder mitamplifizierten (siehe Kap. 2.2.2.2 und 2.2.2.3). Das Prinzip der PCR-Amplifikation mit universellen Primerpaaren, die Gelelektrophorese und die Ausbeute sind in Abbildung 3.1 dokumentiert.

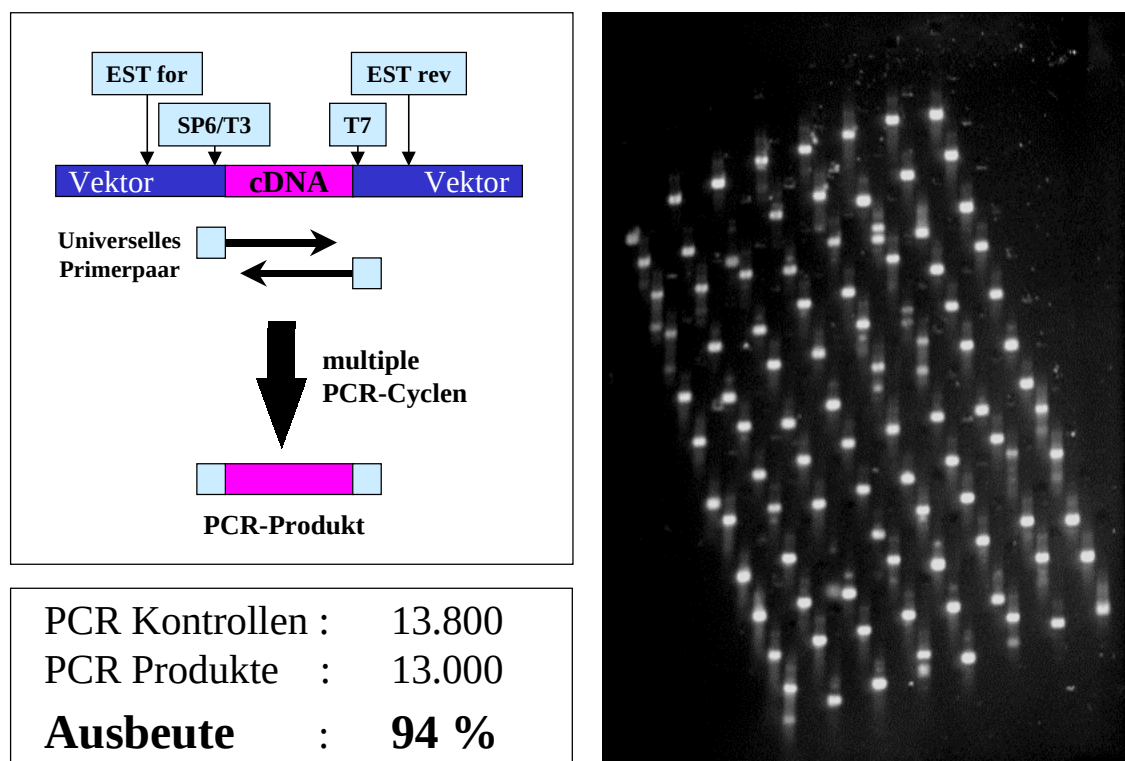


Abb. 3.1: Prinzip der PCR-Amplifikation mittels universeller Primerpaare, die an Sequenzen beider Vektorenden hybridisieren und damit die PCR-Amplifikation verschiedener Insertionen mehrerer tausend cDNA-Klone erlauben. Der Nachweis einer erfolgreichen PCR-Amplifikation erfolgte mittels Detektion einer eindeutigen PCR-Produktbande im Diagonalgel (MadgeBio Ltd., Nottingham, UK). Die Ausbeute ergab sich aus dem Quotienten von PCR-Produktbanden und ausgeführten PCR-Amplifikationen.

Der Nachweis der PCR-Produkte wurde mittels der Diagonal-Gelelektrophorese erbracht. Bei 13.800 kontrollierten PCR-Amplifikationen konnten 13.000 PCR-Produkte nachgewiesen werden, das entspricht einer Ausbeute von 94 %.

3.1.2 Optimierung der DNA-Array-Herstellung

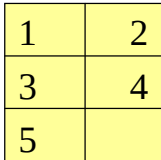
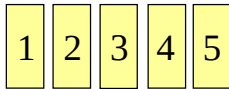
Im Rahmen dieser Arbeit konnten insgesamt 66 genomische *Arabidopsis*-Arrays hergestellt werden. Die 13.000 PCR-Produkte aus dem ersten Durchgang der PCR-Amplifikation mußten zunächst aus den 96er in 384er Mikrotiterplatten transferiert werden. Für dieses Umpipettieren kam der Roboter "Biomek 2000" (Beckman Coulter, Unterschleissheim-Lohhof) zum Einsatz. Aus den 384er Mikrotiterplatten konnte mit Hilfe des Roboters "Biogridder" (BioRobotics, Cambridge, UK) der genomische *Arabidopsis*-Array produziert werden. Dazu wurden alle PCR-Produkte im 4 x 4 -Raster auf fünf von sechs Felder einer Membran der Größe 22 x 22 cm gespottet. Damit war die Produktion der genomischen *Arabidopsis*-Arrays aus technischen Gründen auf 4 Membranen pro Lauf limitiert.

Eine Umstellung der DNA-Array-Herstellung von einer 22 x 22 cm großen auf 5 kleine Membranen mit den Ausmaßen 8 x 12 cm steigerte die Zahl der DNA-Arrays pro Produktionslauf von 4 auf maximal 24. Nach diesem neuen Verfahren konnten aus dem ersten PCR-Durchgang mit je 96 parallelen PCR-Reaktionen pro Thermocycler insgesamt 30 genomische *Arabidopsis*-Arrays hergestellt werden.

Mit der herstellerbedingten Weiterentwicklung der Thermocycler für die parallele PCR-Amplifikation von 96 auf 384 PCR-Proben fiel das Umpipettieren von 96er in 384er Mikrotiterplatten komplett weg. Damit entstammten weitere 36 DNA-Arrays zwei PCR-Durchläufen mit je 384 parallelen PCR-Reaktionen pro Thermocycler.

Die Produktionsumstellung der PCR-Produkte wie der DNA-Arrays brachte einige Vorteile mit sich. Da die Membranen in feuchtem Zustand gespottet wurden, konnte auf den kleinen Membranen eine gleichmäßige Befeuchtung erreicht werden als auf der 22 x 22 cm Membran. Dies führte zu gleichmäßig gut abgegrenzten Spots. Der Gebrauch von nur noch 8 x 384er PCR-Platten für die Produktion eines Membranfeldes, auch als Subarray bezeichnet, konnte den Produktionslauf verkürzen. Dies führte dazu, daß aus den Platten weniger Probe evaporieren

konnte. Die Vorteile der PCR-Amplifikation mit höherem Durchsatz und der geänderten *Arabidopsis*-Array-Herstellung sind noch einmal in Tabelle 3.1 zusammengestellt.

	bisherige Bedingungen	Verbesserungen
PCR-Amplifikation:	• 100 µl Reaktionsansätze • 96 PCR-Proben parallel • Probentransfer von 96er in 384er MTP	• 25 µl Reaktionsansätze • 384 PCR-Proben parallel • kein Probentransfer • weniger Kreuzkontaminationen • weniger Pipettierfehler • mehr PCR-Produkte unter identischen Bedingungen bei höherer Ausbeute
<i>Arabidopsis</i>-Array:	• 1 Membran zu 22 x 22 cm • 6 Felder pro Membran • 5 Felder werden benötigt  • Membran muß in einem Arbeitsschritt mit Array belegt werden • max. 4 Membranen pro Durchlauf • bei Fehlproduktion unnötig viele PCR-Produkte verbraucht • Membranen pro Phosphorscreen: 1 schritt mit Array belegt werden	• 5 Membranen zu 13 x 8 cm • 1 Feld pro Membran • 5 Felder werden benötigt  • Subarrays können unabhängig voneinander produziert werden • max. 24 Membranen pro Durchlauf • bei Fehlproduktion weniger PCR-Produkte verbraucht • Membransets pro Phosphorscreen: 3 • Probenverdunstung geringer • Spots exakter und definierter

Tab. 3.1: Vor- und Nachteile unter bisherigen und nun verbesserten Bedingungen für die Hochdurchsatz-PCR-Amplifikation und Herstellung der genomischen *Arabidopsis*-Arrays.

3.1.3 Fixierung der DNA auf Nylonmembranen

Die Fixierung der DNA auf der Nylonmembran Biotodyne B der Firma Pall wurde zuerst nach Empfehlung des Herstellers mit Backen bei 80 °C für 30 Minuten durchgeführt. Da diese Art der Fixierung aufgrund nur schwacher Hybridisierungssignale unzureichend war, wurde die Fixierung der DNA durch Backen bei 80 °C für verschiedene Zeitintervalle, durch UV-Strahlung bei einer Wellenlänge von 254 nm bei variierter Fluenz und die Kombination beider Fixierungsarten untersucht. Dazu wurden identische DNA-Arrays hergestellt, in Streifen geschnitten und der jeweils angegebenen Fixierung unterzogen. Durch Hybridisierung mit dem

durch 5'-OH-Phosphorylierung ^{33}P -markierten Oligonucleotid T7 konnte die Menge an gebundener DNA sichtbar gemacht werden (siehe Abb. 3.2).

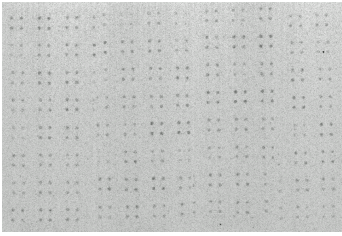
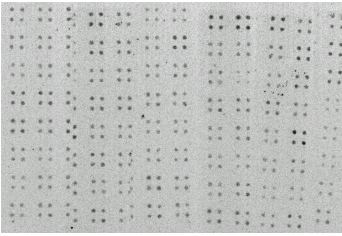
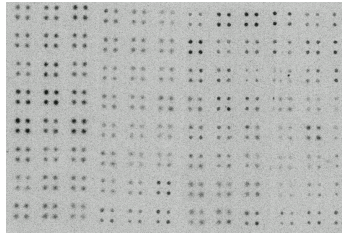
	Backen bei 80 °C	UV-Bestrahlung bei 254 nm	Backen & UV-Bestrahlung
DNA-Array			
UV [J/cm²]	- - - -	0.01 0.03 0.05 0.07 0.09 0.11 	0.025 0.05 0.075 0.10 
80 °C [min]	30 60 90 120 	- - - - - -	120 90 60 30 

Abb. 3.2: Fixierung der DNA auf der Nylonmembran Biodyne B der Firma Pall durch Backen bei 80 °C und UV-Bestrahlung bei 254 nm. DNA-Arrays wurden in Streifen geschnitten und nach den angegebenen Kombinationen fixiert. Eine Hybridisierung mit dem radioaktiv markierten Oligonucleotid T7 machte die Menge an gebundener DNA sichtbar.

Eine quantitative Auswertung der Hybridisierungssignale erfolgte mit dem Mittelwert der hintergrundkorrigierten Signalintensitäten, die auf dem gleichen Array-Streifen unter identischen Bedingungen fixiert waren. Mit dem Backen bei 80 °C für 120 Minuten und der UV-Bestrahlung bei 254 nm mit einer Fluenz von 0,025 J/cm² konnte eine Vernetzung zwischen Nucleinsäure und Membran mit einer Signalverstärkung um den Faktor 3 erreicht werden, wenn man sie mit der vom Hersteller empfohlenen Fixierung mit 30 Minuten Backen bei 80 °C vergleicht (siehe Abb. 3.3). Stärkere UV-Bestrahlungen führten zu einer Signalverschlechterung und deuten damit auf DNA-Schädigungen hin, die die Hybridisierung beeinträchtigen (siehe Kap. 4.2.1).

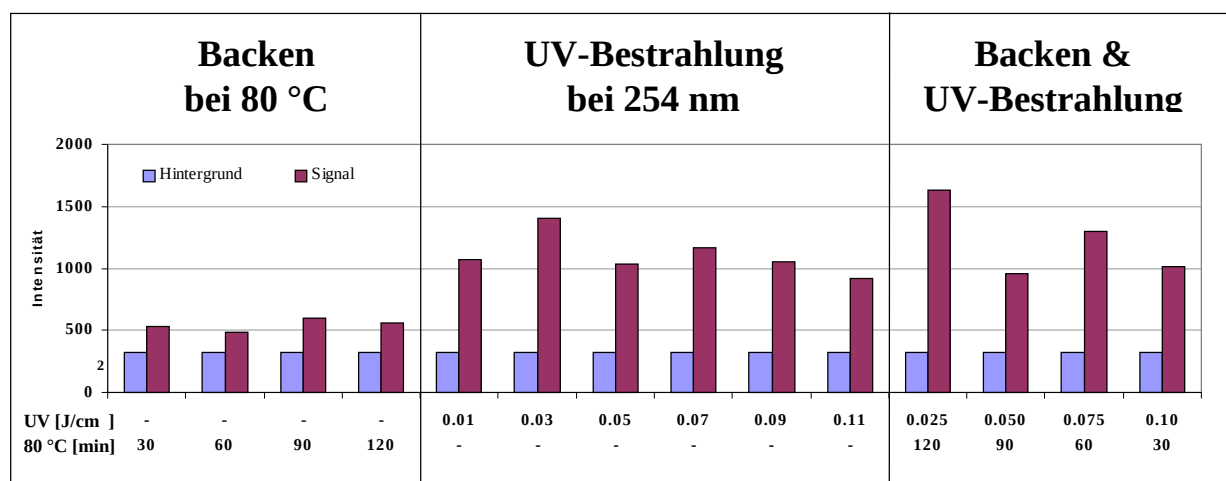


Abb. 3.3: Die im Balkendiagramm dargestellten Signalintensitäten ergeben sich aus dem Mittelwert aller hintergrundkorrigierten Signalintensitäten, die unter identischen Bedingungen fixiert wurden. Die relative Standardabweichung der einzelnen Hybridisierungssignale beträgt ca. 20 %.

Die in den folgenden Kapiteln dargestellten Ergebnisse sind mit DNA-Arrays erzielt worden, bei denen die DNA jeweils durch 2-stündiges Backen bei 80 °C und UV-Bestrahlung mit $\lambda = 254$ nm bei einer Fluenz von 0,025 J/cm² fixiert wurden.

3.1.4 Vergleich der Fluoreszenzhybridisierung auf Nylon- und Polypropylenmembran

Für die Fluoreszenzhybridisierung wurde das Oligonucleotid T7 verwendet, dessen 5'-Ende mit dem Farbstoff Cy5 gekoppelt war. Die DNA-Arrays auf Nylon- und Polypropylenmembran wurden aus der identischen PCR-Charge im gleichen Lauf hergestellt und nach der in Kapitel 3.1.1 ermittelten, verbesserten Methode fixiert. Die Hybridisierung erfolgte für jeweils eine Stunde bei 10 °C, das Einlesen am Fluoroimager erfolgte für Nylon- und Polypropylenmembran im gleichen Scan, um für den Vergleich möglichst viele Parameter identisch zu halten. Wie in Abbildung 3.4 und 3.5 zu sehen ist, konnten in mindestens 15 aufeinanderfolgenden Hybridisierungen mit anschließender Regeneration der Membranen auswertbare Signalintensitäten sowohl auf Nylon- als auch auf Polypropylenmembranen detektiert werden. Damit konnte zum einen gezeigt werden, daß auf der Polypropylenmembran in etwa die gleiche Bindungskapazität vorhanden war und zum anderen, daß die DNA genauso stabil fixiert werden konnte wie auf der Nylonmembran. Wie im Hybridisierungsbild schon visuell gut zu erkennen ist, zeigte die Polypropylenmembran gegenüber der Nylonmembran einen geringeren Hintergrund. Dieses Ergebnis bestätigte sich insbesondere nach der quantitativen Auswertung der absoluten Signal- und Hintergrundintensitäten (siehe Abb. 3.4 und 3.5).

Um die Reduzierung des Hintergrundes durch die Verwendung der Polypropylenmembran zu verdeutlichen, wurde das Signal/Hintergrund-Verhältnis beider Membranen berechnet und in Abbildung 3.6 miteinander verglichen.

Dabei zeigte sich, daß die Polypropylenmembran bei allen Hybridisierungen ein besseres Signal/Hintergrund-Verhältnis aufwies. Diese Verbesserung lag bis auf zwei Ausnahmen in allen Hybridisierungen bei Faktor 2. Dieses Ergebnis bedeutet, daß sich die Polypropylenmembran besser als die Nylonmembran für Fluoreszenzhybridisierungen eignet, da sich schwache Signale besser vom Hintergrund abheben.

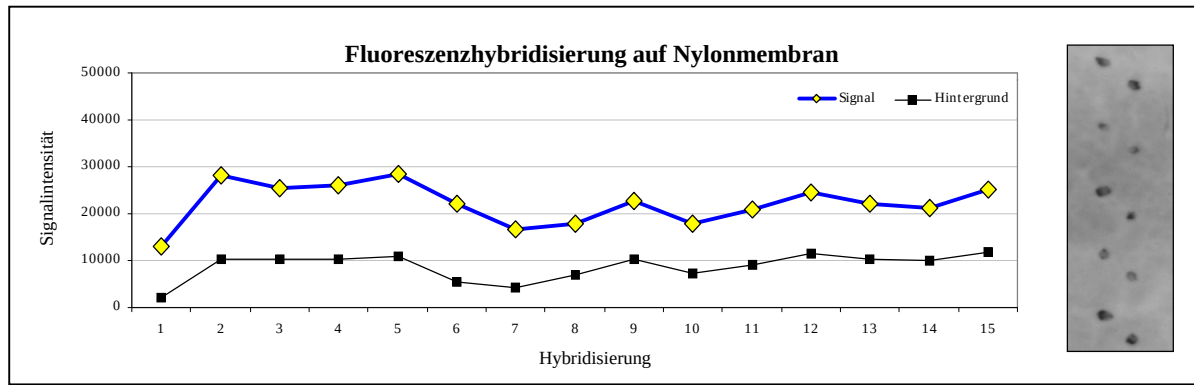


Abb. 3.4: Bild der 5. Hybridisierung auf DNA-Arrays mit quantitativer Auswertung von gemittelten Signalintensitäten und Hintergrundwerten von 15 aufeinanderfolgenden, fluoreszenzmarkierten Hybridisierungen auf Nylonmembran mit anschließender Regeneration.

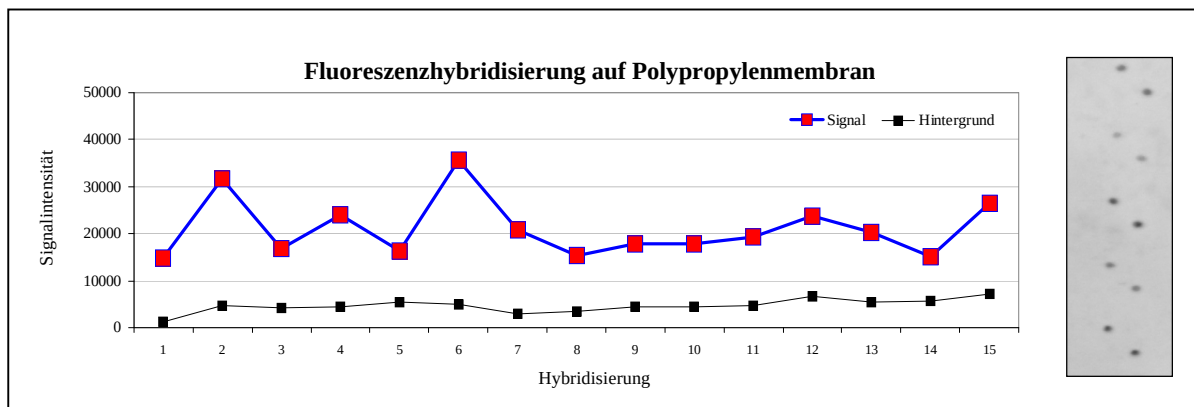


Abb. 3.5: Bild der 5. Hybridisierung auf DNA-Arrays mit quantitativer Auswertung von gemittelten Signalintensitäten und Hintergrundwerten von 15 aufeinanderfolgenden, fluoreszenzmarkierten Hybridisierungen auf Polypropylenmembran mit anschließender Regeneration.

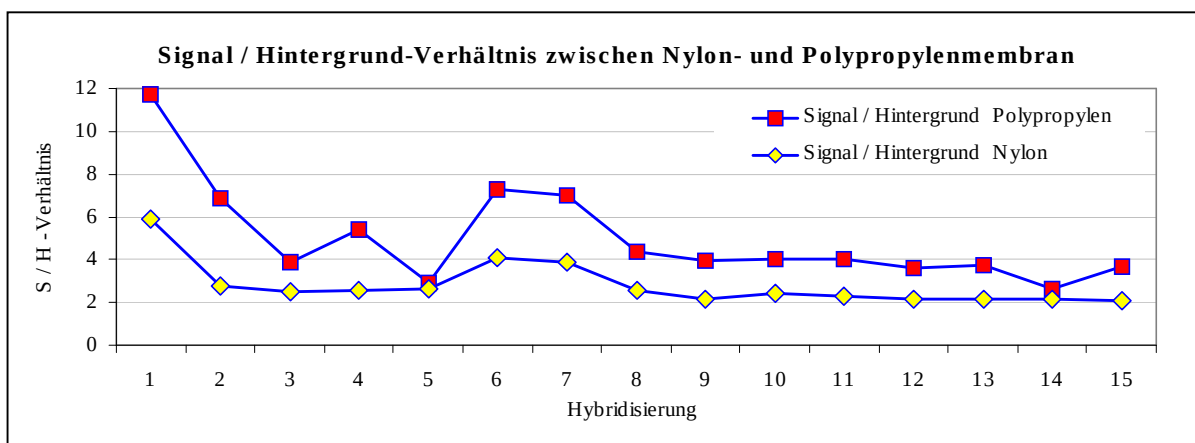


Abb. 3.6: Signal/Hintergrund-Verhältnis zwischen Nylon- und Polypropylenmembran bei 15 aufeinanderfolgenden Hybridisierungen. Im Mittel ist dabei das S/H-Verhältnis der Polypropylenmembran um den Faktor 2 besser als bei der Nylonmembran.

3.1.5 Vergleich radioaktiv- und fluoreszenzmarkierter Hybridisierung auf Membranen

Im Vergleich der Fluoreszenz- und Radioaktivhybridisierung auf Nylon- und Polypropylenmembran kam wiederum das Oligonucleotid T7, am 5'-OH-Ende entweder mit Cy5 fluoreszenzmarkiert oder ^{33}P radioaktivmarkiert, zum Einsatz. Wie in Abbildung 3.7 deutlich wird, erreichte die über alle Spots gemittelte Signalintensität auf der Polypropylenmembran bei Fluoreszenzhybridisierung etwa 92 % und bei der Radioaktivhybridisierung 100 % der Signalstärke der Nylonmembran. Dies dokumentiert, daß beide Membrantypen die gleiche Beladungskapazität besitzen.

Das Signal/Hintergrund-Verhältnis variiert bei der Fluoreszenzdetektion aufgrund der unterschiedlichen Autofluoreszenz des Trägermaterials stark mit der Wahl der Membran (siehe Kap. 3.1.4). Bei der Radioaktivdetektion gibt es zwischen beiden Membranen keinen Unterschied im Signal/Hintergrund-Verhältnis. Im Vergleich zwischen Radioaktiv- und Fluoreszenzdetektion ergibt sich jedoch ein um den Faktor 10 besseres Signal/Hintergrund-Verhältnis für die Radioaktivhybridisierung, wie in Abbildung 3.7 zu sehen ist.

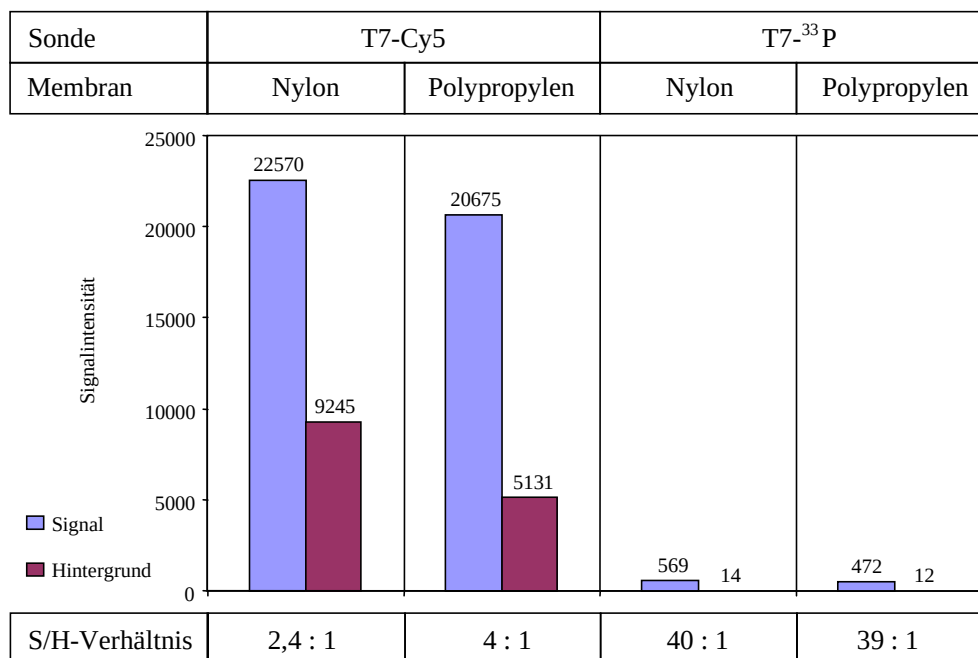


Abb. 3.7: Vergleich der Hybridisierung mit fluoreszenz- (Cy5) und radioaktivmarkierter (^{33}P) Oligonucleotidsonde T7 auf Nylon- und Polypropylenmembran. Die Signalintensitäten sind über alle Spots des Arrays gemittelt. Die Beladungskapazität der verschiedenen Membranen ist vergleichbar anhand der sehr ähnlichen Signalintensitäten. Im Vergleich von Radioaktiv- zu Fluoreszenzdetektion ergibt sich allerdings ein um den Faktor 10 besseres S/H-Verhältnis für die Radioaktivhybridisierung, so daß diese für alle weiteren Versuche eingesetzt wurde.

3.1.6 Einfluß der Expositionszeit

Um den Einfluß der Expositionszeit, die typischerweise zwei bis drei Tage betrug, bestimmen zu können, wurde ein *Arabidopsis*-Array mit einer komplexen, ^{33}P -markierten, einzelsträngigen cDNA-Probe aus Callus-Gewebe hybridisiert, für jeweils zwei und drei Tage auf einem Phosphorscreen exponiert, am Phosphorimager eingelesen und die Spotdetektion mit Hilfe der AIS-Auswertesoftware durchgeführt (siehe Kap. 2.2.9 bis 2.2.11). Der Vergleich beider Transkriptionsprofile fand im Scatterplot statt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.8 dokumentiert.

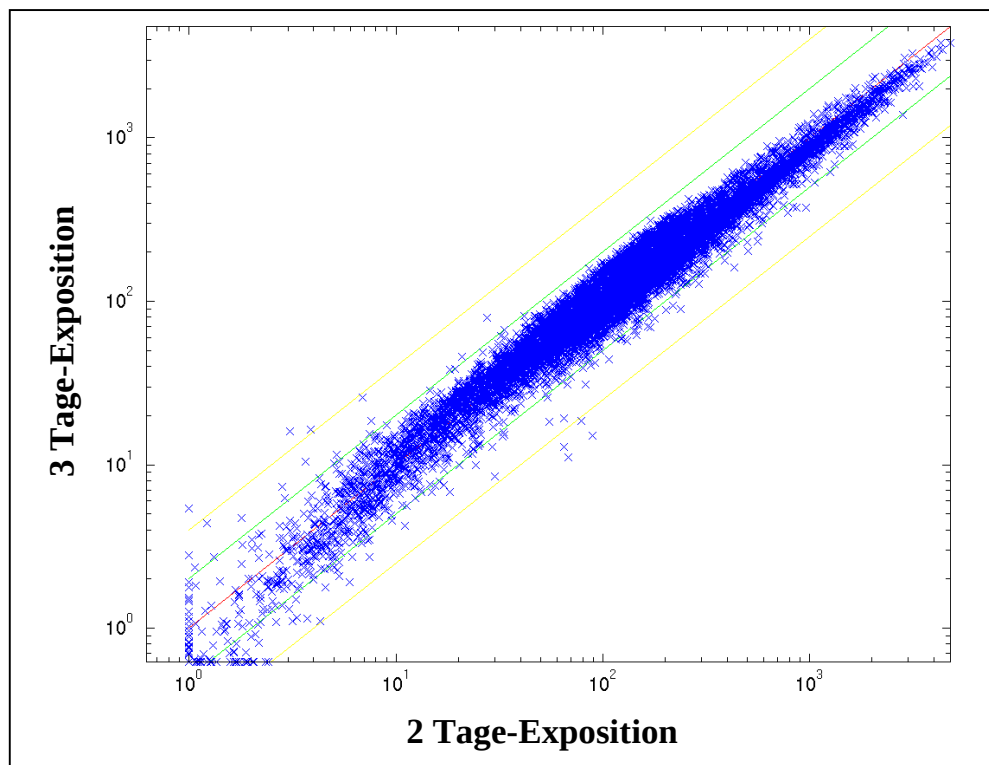


Abb. 3.8: Bestimmung des Einflusses der Expositionszeit auf die Vergleichbarkeit komplexer Transkriptionsprofile durch Vergleich einer 2- und 3-Tages-Exposition eines genomischen *Arabidopsis*-Arrays im Scatterplot. Dabei zeigen sich expositionsbedingte Variationen vor allem im Bereich geringer Signalintensitäten, da dort ein absoluter Variationswert prozentual stärker ins Gewicht fällt als bei starken Signalintensitäten. Daher wurde dieser Bereich von weiteren Analysen ausgeschlossen (siehe Kap. 2.2.12.2).

Die Steigung der Transkriptionsprofile liegt exakt auf der Diagonalen, d.h. die Software konnte durch die Normalisierung die Steigung beider Datensätze auf den Wert 1 adaptieren und somit den Effekt durch unterschiedliche Expositionszeiten eliminieren. Damit entspricht die Zunahme der Signalintensität von der 2-Tage-Exposition zur 3-Tage-Exposition für den gesamten dynamischen Detektionsbereich einem konstanten multiplikativen Faktor.

3.1.7 Bestimmung der Menge an membrangebundenem PCR-Produkt

Untersucht wurde die Menge an gespottetem PCR-Produkt in Abhängigkeit von den verwendeten Pindurchmessern. In Abbildung 3.9 ist der hybridisierte DNA-Array sowie die verwendeten Parameter dargestellt.

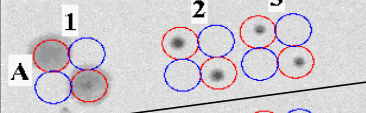
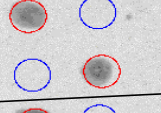
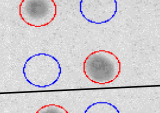
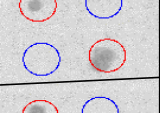
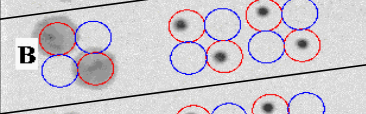
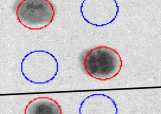
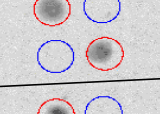
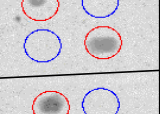
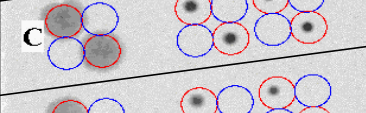
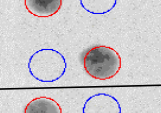
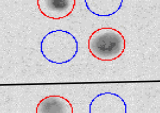
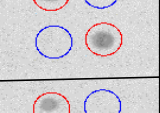
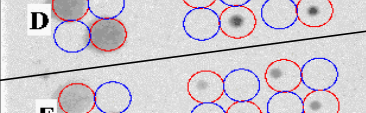
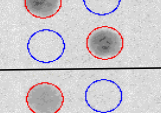
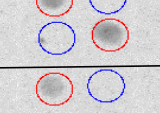
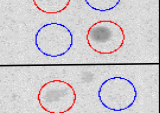
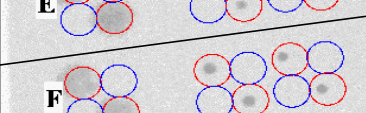
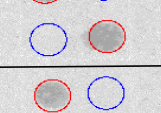
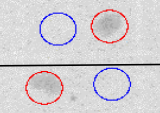
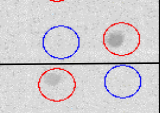
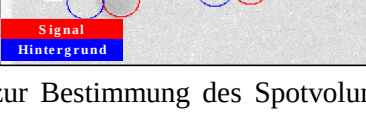
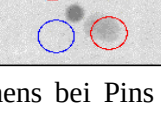
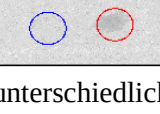
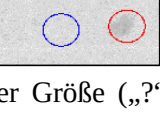
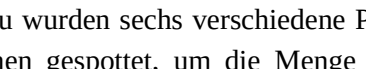
Spotherstellung	Roboter			Pipette		
Spotspalte	1	2	3	4	5	6
Pindurchmesser	2 mm	0,7 mm	0,4 mm	-	-	-
Spotvolumen	?	?	?	1 µl	0,5 µl	0,25 µl
Volumentransfer	1 x	10 x	20 x	1 x	1 x	1 x
PCR-Produkt				4	5	6
A						
B						
C						
D						
E						
F						
						

Abb. 3.9: DNA-Array zur Bestimmung des Spotvolumens bei Pins unterschiedlicher Größe („?“ in Tabelle). Dazu wurden sechs verschiedene PCR-Produkte für eine Eichgerade in bekannten Konzentrationen gespottet, um die Menge der durch die verschiedenen Pins gespotteten PCR-Produkte zu messen (siehe Kap. 2.2.3.6). In den rot umrandeten Bereichen wurden die Signalintensitäten, in den blau umrandeten Flächen der Hintergrund gemessen und von der Signalintensität subtrahiert. Über die Signale in den Spalten 4 bis 6 konnten Eichgeraden aufgestellt werden, anhand derer die Konzentration und damit auch die Menge an membrangebundenem PCR-Produkt bestimmt werden konnte.

Die Signale auch der dünnen Pins unterschieden sich eindeutig vom Hintergrund und waren daher gut auswertbar. Beim Vergleich der Pins 0,7 mm und 0,4 mm zeigte sich, daß die Spots

der 0,7 mm Pins mit der Hälfte der Volumentransfers eine vergleichbare Signalintensität zu den Spots der 0,4 mm Pins aufwiesen. Gleichzeitig waren die Spotgrößen sehr ähnlich.

Eine quantitative Auswertung der Signalintensitäten und die Bestimmung der gespotteten Volumina mittels einer Eichgeraden (siehe Kapitel 2.2.3.6) führte zu den Ergebnissen, die in der Tabelle 3.2 zusammengefaßt sind.

Transfer		Spotvolumen			Vol./Transfer & Pin	PCR-Produkt / Spot
Pin	Transfer	Mittelwert	abs. Fehler	rel. Fehler	Mittelwert	Intervall
2,0 mm	1 x	698 µl	91 µl	13 %	698 µl	5,0 - 12,2 ng
0,7 mm	10 x	244 µl	52 µl	21 %	24 µl	2,0 - 4,8 ng
0,4 mm	20 x	161 µl	39 µl	24 %	8 µl	1,0 - 2,9 ng

Tab. 3.2: Über Eichgeraden ermittelte Werte für das gespottete Volumen in Abhängigkeit des Pindurchmessers und der Transferwiederholungen (siehe Kap. 2.2.3.6). Daraus ergibt sich anhand bekannter PCR-Produktkonzentrationen die Menge an PCR-Produkt pro Spot. Für die Herstellung von DNA-Arrays wurde der 384er Nadelkopf mit Pingrößen von 0,7 mm bei 20 Transferwiederholungen verwendet, um 5 – 10 ng pro Spot zu erhalten.

Man erkennt, daß mit geringerem Pindurchmesser auch die übertragenen Volumina pro Transfer als auch insgesamt und damit auch die Mengen der PCR-Produkte pro Spot abnehmen. Der Nadelkopf mit einem Pindurchmesser von 2,0 mm erwies sich als zu groß, um ein Raster mit 26.000 Spots auf einer möglichst kleinen Fläche zu spotten. Da die Nadelköpfe mit je 0,7 mm Durchmesser fast so kleine Spots produzierten wie die Pins mit 0,4 mm Durchmesser, bot sich dieser Pindurchmesser für die Produktion der genomischen Arabidopsis-Arrays an. Da bei der Verwendung des 0,7 mm Nadelkopfes ein 20-facher Volumentransfer in einem vertretbaren Zeitrahmen lag, konnten pro Spot des genomischen *Arabidopsis*-Arrays in etwa 5 bis 10 ng DNA aufgetragen werden.

3.2 Qualitätssicherung komplexer Transkriptionsprofile

Die Voraussetzung für den Vergleich komplexer Transkriptionsprofile ist die Qualitätssicherung jedes einzelnen Datensatzes, der ein Transkriptionsprofil ergibt. Diese Qualitätskontrolle erfolgte durch Überprüfung der Ausgangsmaterialien wie das Vorhandensein definierter Spots auf dem DNA-Array, die undegradierete RNA-Probe, die markierte cDNA-Sonde und nach der Hybridisierung die Vergleichbarkeit von Primär- und Sekundärspot eines jeden PCR-Produkts, das als Spotduplikat auf dem Array vorhanden ist.

3.2.1 Kontrolle der Array-Herstellung mittels Oligonucleotid-Hybridisierung

Durch die PCR-Amplifikation der cDNA-Bibliothek mit universellen Primerpaaren existierte damit in jedem PCR-Produkt die universelle Sequenz des Primers T7. Damit konnte im *Arabidopsis*-Array jeder Spot durch die Hybridisierung mit nur einer Sonde einer optischen Qualitätskontrolle unterzogen werden.

Die Abbildung 3.10 demonstriert eine solche Kontrollhybridisierung mit dem Oligonucleotid T7. Die Signalintensitäten der Spots heben sich deutlich vom Hintergrund ab und weisen damit ausreichend PCR-Produkt für weitere Hybridisierungen nach. Weiterhin sind die Spots in einem geordneten Raster hoher Dichte gepostet und klar voneinander abgegrenzt. Damit ist der Spotdurchgang durch den Roboter ordnungsgemäß durchgeführt worden. Als Orientierungspunkte dienen die gut zu erkennenden leeren Spots in jedem Quadranten des Arrays. Diese sind auf jedem der fünf Felder in einer anderen Position und Orientierung vorhanden. Aufgrund dessen kann man diesen Subarray eindeutig als Feld 2 identifizieren (siehe Kap. 2.2.3.2).

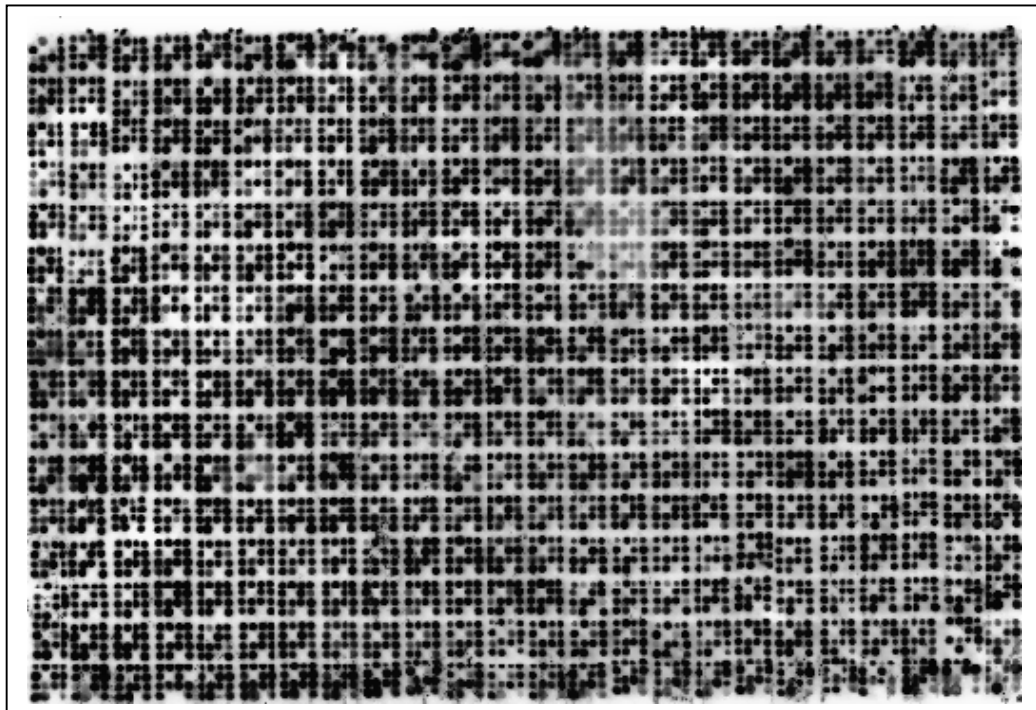


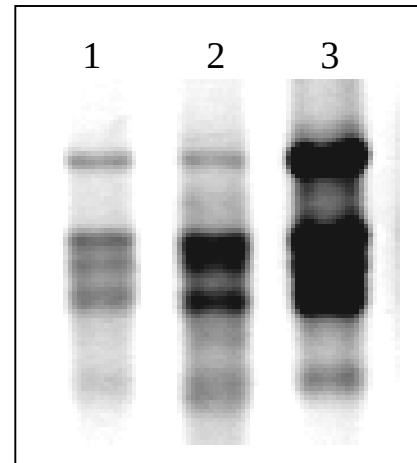
Abb. 3.10: Die Hybridisierung des Oligonucleotides T7 auf Subarray 2 des *Arabidopsis*-Arrays zeigt in der optischen Qualitätskontrolle eine gleichmäßige PCR-Produktkonzentration für die große Mehrheit der auf die Membran aufgetragenen Proben. Die „Wasserflecken“ auf dem Array stammen nicht von der DNA-Array-Herstellung, sondern vom Waschen der Membran.

3.2.2 Kontrolle der RNA-Qualität

Um die Qualität der isolierten Gesamt-RNA zu untersuchen, wurde die Gesamt-RNA in einem denaturierenden Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Abbildung 3.11 zeigt ein Gel mit Ethidiumbromid-gefärbter RNA. Gut zu erkennen sind die scharfen ribosomalen Banden, die keine Degradation in Form von niedermolekularem Schmier erkennen lassen.

Abb. 3.11: Qualitätskontrolle der RNA durch gelelektrophoretische Auftrennung denaturierter Gesamt-RNA aus Blattgewebe in verschiedenen Konzentrationen. Die ribosomalen RNA-Banden sind ohne niedermolekulare Intensitätsverteilung, die auf degradierte RNA schließen lassen könnte, eindeutig erkennbar.

Spur: 1) 5 µg
2) 10 µg
3) 15 µg

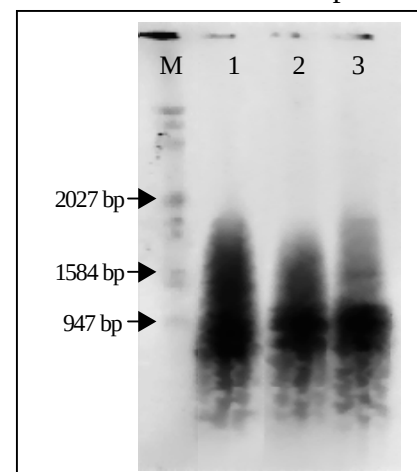


3.2.3 Kontrolle der cDNA-Länge der Sonde

Die RNA wurde für die Sondenmarkierung revers transkribiert. Die daraus hervorgehende cDNA wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und die radioaktiv markierte cDNA-Sonde durch Exposition auf einem Phosphorscreen detektiert. Die Abbildung 3.12 zeigt ein Gel zur Größenbestimmung von drei unabhängig voneinander hergestellten cDNA-Sonden von Blattgewebe. Die gelelektrophoretische Auftrennung dokumentiert die Synthese einzelsträngiger, ³³P-markierter cDNA-Sonden aus der reversen Transkription der mRNA, wie sie in Kap. 2.2.9.3 beschrieben ist. Die Länge der Sondenmoleküle variiert dabei von 500 bis zu 2000 Basenpaaren.

Abb. 3.12: Gelelektrophoretische Auftrennung ³³P-markierter cDNA-Sonden. Man erkennt eine kontinuierliche cDNA-Längenverteilung von 500 – 2000 Bp.

Spur: M) λ-DNA, verdaut mit EcoRI/Hind III
1) cDNA-Erststrangsynthese 1
2) cDNA-Erststrangsynthese 2
3) cDNA-Erststrangsynthese 3



3.2.4 Kontrolle der Einbaurate

Zur Bestimmung der Einbaurate von Radionucliden standen zwei Methoden zur Auswahl, die Präzipitation von Nucleinsäuren mit TCA und die Trennung von cDNA-Pellet und Überstand. Mit beiden Methoden wurden vergleichbare Einbauraten gemessen. Die Einbaurate betrug bei der cDNA-Erststrangsynthese von RNA 50 - 90 %, bei der Markierung von DNA-Fragmenten durch 'Random Hexamer Priming' 70 -90 % und bei der Markierung von Oligonucleotiden durch 5'-OH-Phosphorylierung üblicherweise 90 %.

3.2.5 Vergleich von Primär- und Sekundärspot

Der nach der Hybridisierung erstellte Datensatz eines komplexen Transkriptionsprofils konnte durch den Vergleich von Primär- und Sekundärspot eines jeden PCR-Produkts, das als Spotduplikat auf dem Array vorhanden ist, untersucht werden. Die Abbildung 3.13 stellt einen Vergleich von Primär- und Sekundärspot dar. Am Korrelationskoeffizienten von 0,98904 als auch an der Verteilung der Spots kann man erkennen, daß die Variation zwischen Primär- und Sekundärspot sehr gering ist. Dies deutet auf ausreichend hohe Stringenz bei der Hybridisierung hin.

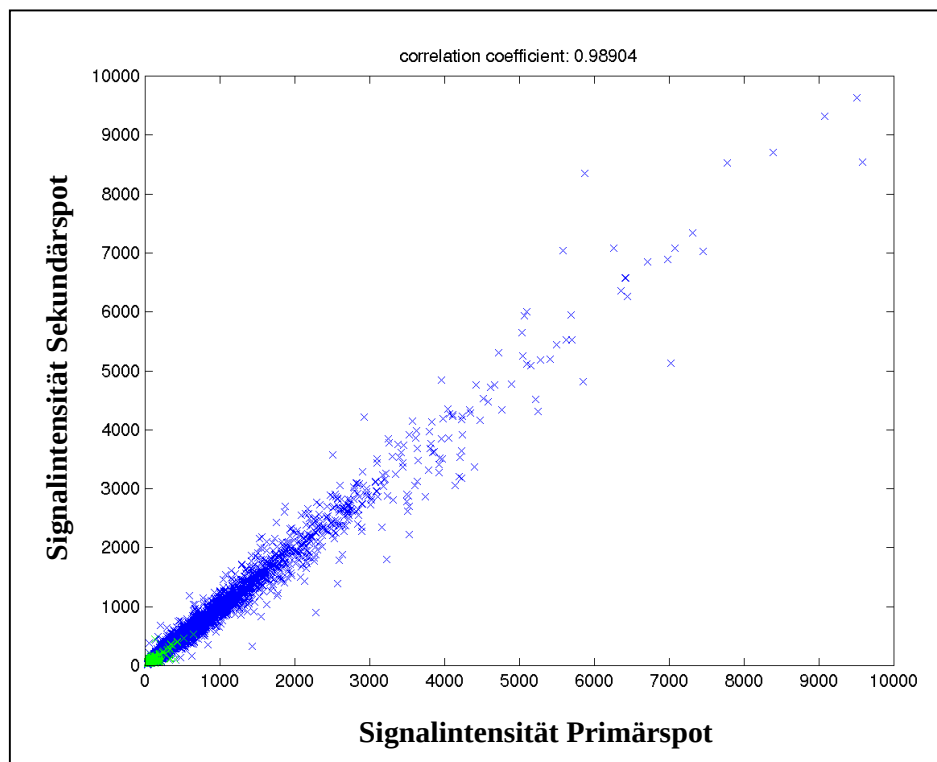


Abb. 3.13: Scatterplot mit Vergleich von Primär- und Sekundärspot mit der identischen Sequenz.

3.3 Qualitätssicherung beim Vergleich komplexer Transkriptionsprofile

Für die Qualitätssicherung beim Vergleich komplexer Transkriptionsprofile wurde zunächst die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse untersucht. Damit wurden Signalvariationen mit technischen und methodischen Ursachen von der biologischen Variation unterschieden, die es in Form der differentiellen Transkription der Gene zu messen galt.

Dazu wurden Experimente mit aliquotierten RNA-Proben durchgeführt, die alle aus der gleichen Gewebeprobe und RNA-Extraktion stammen. Der Vergleich von zwei Hybridisierungen mit der gleichen Probe ist in Abbildung 3.14 dargestellt.

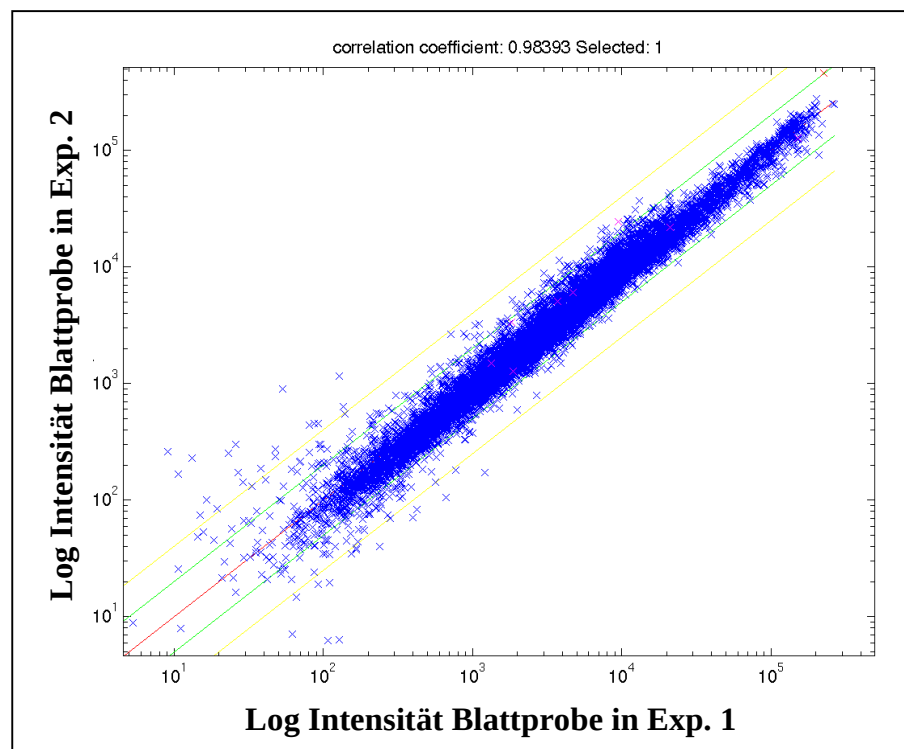


Abb. 3.14: Vergleich zweier komplexer Transkriptionsprofile der identischen Probe im Scatterplot, die in voneinander unabhängigen Experimenten von der gleichen Probe erstellt wurden. Man erkennt, daß die Gene, die stärker von der Diagonalen abweichen, im Quadranten links unten bei schwacher Signalintensität zu finden sind.

Man erkennt, daß die große Mehrheit der Spots mit einer noch zu bestimmenden Variation um die Diagonale streut. Dies bedeutet, daß in beiden identischen Experimenten die Signale mit nur geringer Variationsbreite differieren. Der Korrelationskoeffizient von 0,98393 bestätigt dies.

Mit diesen Datensätzen wurde zum einen die Detektionsgrenze der differentiellen Transkription bestimmt, zum anderen die Reproduzierbarkeit der Hybridisierungen anhand der Variation der Signalintensitäten bei identischen Experimenten untersucht und der prozentuale Fehler aller Verhältnisse ermittelt.

3.3.1 Limit der detektierbaren differentiellen Transkription

Die Detektionsgrenze der differentiellen Transkription wird definiert durch einen Schwellenwert, der auf einer statistischen Auswertung beruht und zwischen methodischer und biologischer Variation unterscheidet. Unterhalb dieses Schwellenwerts führen technische und methodische Ursachen zur Streuung, oberhalb des Grenzwertes kann die biologisch relevante Variation, d.h. die differentielle Transkription, detektiert werden.

Zur Bestimmung der Detektionsgrenze der differentiellen Transkription wurde ein Variationsintervall definiert, das 99,5 % aller Signalintensitätsverhältnisse einschließen soll. Dieses Variationsintervall schloß in drei Vergleichen mit jeweils identischen Proben alle Signalintensitätsverhältnisse ein, die im Mittel zwischen einem Differenzfaktor von - 1,80 bis + 1,80 lagen. Damit liegt das Limit der detektierbaren differentiellen Transkription bei Faktor $\pm 1,80$.

3.3.2 Reproduzierbarkeit von Hybridisierungen

Für die Bestimmung der Reproduzierbarkeit von Hybridisierungen wurde aus dem arithmetischen Mittel der Signalintensitäten, die zu einem Spot gehören, und der Standardabweichung, die den mittleren Fehler einer Einzelmessung definiert, der prozentuale Fehler der Intensitätsfaktoren ermittelt (siehe Kap. 2.2.13). Diese prozentuale Variation beträgt über alle Spots gemittelt 25 %.

3.3.3 Vergleich zwischen der Hybridisierung auf DNA-Array und Northern Blot

Um die Resultate der differentiellen Genregulation unter Einsatz der DNA-Array-Technologie zu validieren, wurden sie mit den Ergebnissen der bisherigen Standardmethode, dem Northern Blot, verglichen. Dazu wurden für die DNA-Array-Hybridisierungen RNA-Proben von Blättern als Sonde eingesetzt, die einem typischen Tag/Nacht-Rhythmus von 8/16-Stunden unterlagen. Dabei wurde die Tagesprobe nach 4 Stunden Belichtung, die Nachtprobe nach 8 Stunden Dunkelheit von der Pflanze abgenommen und eingefroren. Für den Northern Blot wurden zwei spezifische cDNA-Sonden ausgewählt, die kleine Untereinheit des Enzyms Ribulosebisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RubisCO: Klon-ID 174M11T7, Array-Pos. 12C06) für die differentielle Regulation, da RubisCO das Schlüsselenzym des lichtinduzierten Calvincyclus ist. Der Elongationsfaktor EF-1 α (Klon-ID 232A19T7, Array-Pos. 20D10) diene als konstitutiv exprimierte Kontrolle. Die Abbildung 3.15 dokumentiert die Hybridisierungen auf Northern Blot und DNA-Array und zeigt die Ergebnisse der Intensitätsverhältnisse im Vergleich.

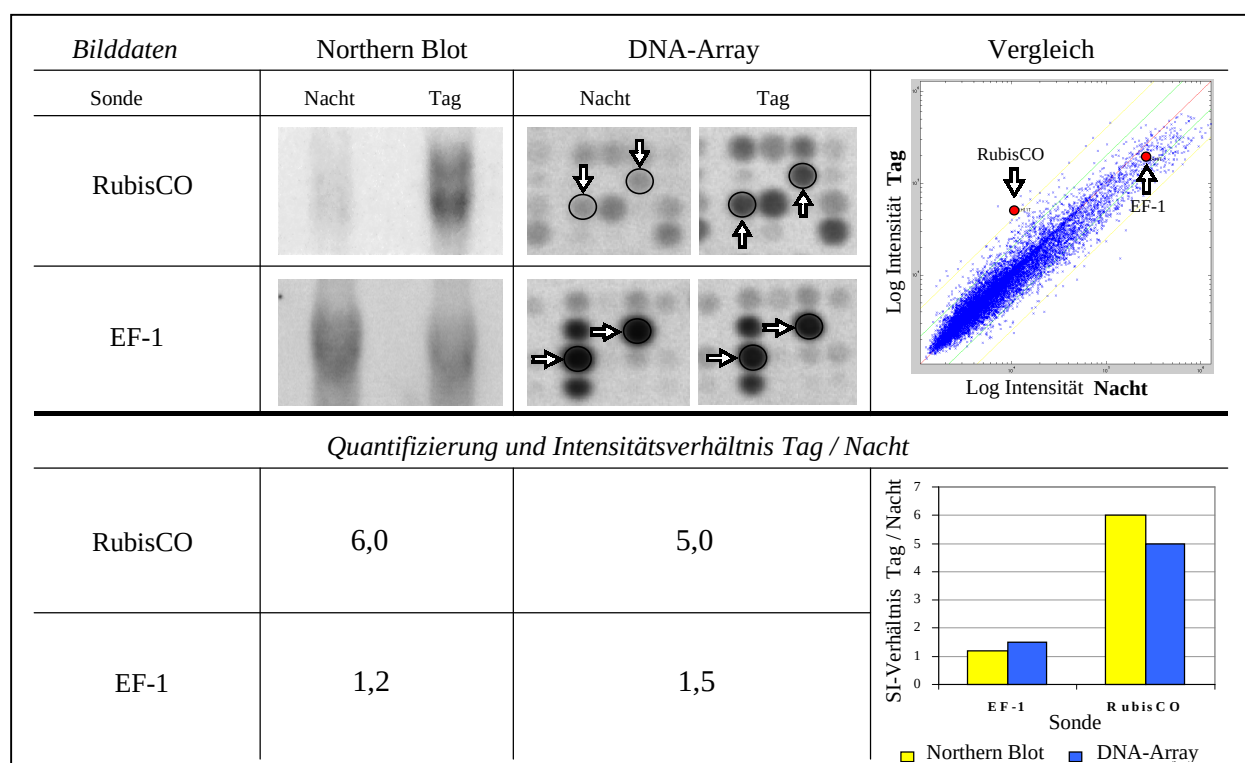


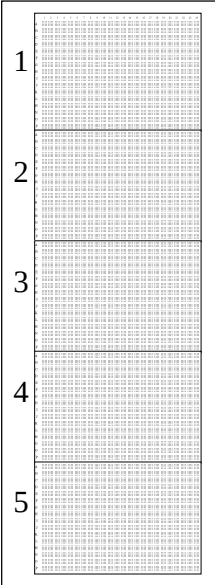
Abb. 3.15: Vergleich der Ergebnisse aus Northern Blot- und DNA-Array-Hybridisierung. Beide Techniken zeigen ein konstantes RNA-Niveau für EF-1 bei Nacht und Tag. Für RubisCO ergibt sich ebenfalls mit beiden Methoden ein Anstieg der RNA-Menge von Nacht auf Tag um den Faktor 5 bzw. 6. Die Quantifizierung für die DNA-Array-Daten ist im Scatterplot (oben) und für den Vergleich mit dem Northern Blot im Diagramm (unten) dargestellt.

Man erkennt im Northern Blot eine konstitutive Transkription für EF-1 und eine differentielle Transkription zwischen Tag- und Nachtprobe. Zum gleichen qualitativen Ergebnis kommt man bei der DNA-Array-Hybridisierung, für die zum einen die entsprechenden Spotausschnitte unabhängig voneinander gezeigt sind, zum anderen der Scatterplot mit allen Spots im Vergleich. Für die kleine Untereinheit von RubisCO zeigt sich dagegen eine wesentlich stärkere Transkription in der Tagesprobe gegenüber der Nachtprobe bei beiden Methoden.

Dieses qualitative Ergebnis wird durch die Quantifizierung noch bestätigt. Der Faktor der differentiellen Transkription für EF-1 beträgt 1,2 im Northern Blot und 1,5 im DNA-Array, der Faktor für RubisCO liegt bei 6 bzw. 5. Das Diagramm, das die ermittelten Daten aus Northern Blot und DNA-Array noch einmal graphisch vergleicht, zeigt eine gute Korrelation der Daten aus beiden Methoden mit einem prozentualen Fehler von etwa 20 %.

3.3.4 Zusammenfassende Übersicht zum genomischen *Arabidopsis*-Array

In Tabelle 3.3 sind noch einmal die Ergebnisse der Herstellung und der Reproduzierbarkeit der Anwendung des genomischen *Arabidopsis*-Arrays zusammengestellt.

Genomischer <i>Arabidopsis</i> -Array		
	• max. Spotanzahl	: 30.720
	• Subarrays	: 5
	• Subarray-Elemente	: (4 x 4) x 384
	• Trägermaterial	: Nylon-/Polypropylenmembran
	• gespottete PCR-Produkte	: 13.000
	• PCR-Produkt-Länge	: 500 - 2.500 bp
	• DNA / Spot	: 5 - 10 ng
	• Wiederverwendbarkeit	: 15 x
	• Probenmaterial	: 25 µg total RNA
	• Reproduzierbarkeit der Hybridisierung	
	Kor.-Koeffizient Primär-/Sekundärspot	: ca. 0,99
	Kor.-Koeffizient Probe Exp. 1/Exp. 2	: ca. 0,98
	99,5 % aller relativen Faktoren zwischen	: -1,80 und +1,80
	mittlere Std.-Abweichung aller Verhältnisse	: 25 %

Tab. 3.3: Zusammenfassende Übersicht zum genomischen *Arabidopsis*-Array.

3.4 Diverse Arten von Ankerpunkten für die Bestimmung der differentiellen Transkription beim Vergleich komplexer Transkriptionsprofile

Für den Vergleich komplexer Transkriptionsprofile ist eine Normalisierung notwendig, wie sie in Kapitel 2.2.12.1 beschrieben ist. Dazu wurde jeder Datensatz durch Abzug des lokalen Hintergrunds korrigiert und die Steigung der Transkriptionsprofile über eine statistische Auswahl von Genen auf 1 normiert. Die Bestimmung des Faktors der differentiellen Transkription konnte mit verschiedenen Ankerpunkten durchgeführt werden. Für solche Ankerpunkte bietet sich zum einen eine Genauswahl an (siehe Abb. 3.16 A). Zum anderen gibt es die Möglichkeit, nur einige Spots auf dem DNA-Array als Ankerpunkte zu definieren, die einen sehr hohen Korrelationskoeffizienten ergeben. Diese Spots können entweder von konstitutiv exprimierten Genen stammen, die im Vergleich verschiedener Transkriptionsprofile eine sehr ähnliche Signalintensität und damit Transkription aufweisen. Oder man hat Kontrollspots mit *Arabidopsis*-orthogonalen Sequenzen auf den DNA-Array gespottet, die, in exakt gleicher Menge den zu vergleichenden Hybridisierproben schon vor der Sondenmarkierung zugesetzt, im Vergleich von zwei Transkriptionsprofilen ein Signalintensitätsverhältnis von 1 ergeben (siehe Abb. 3.16 B). Diese werden im folgenden als heterologe Kontrollsequenzen bezeichnet.

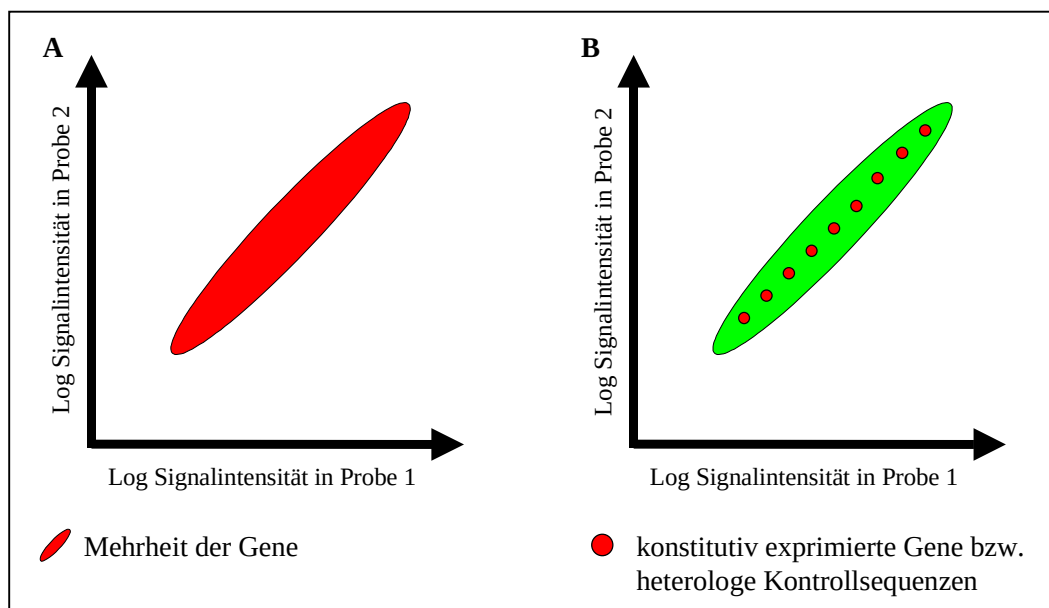


Abb. 3.16: Auswahl verschiedener Ankerpunkte für die Normalisierung komplexer Transkriptionsprofile.

A) statistische Auswahl von Genen

B) konstitutiv exprimierte Gene bzw. heterologe Kontrollsequenzen

3.4.1 Statistische Auswahl von Genen als Ankerpunkt

Für die Bestimmung des Faktors der differentiellen Transkription beim Vergleich komplexer Transkriptionsprofile im Scatterplot konnte eine statistische Auswahl von Genen als Ankerpunkt verwendet werden. Diese Genauswahl wurde bei jedem Vergleich automatisch neu bestimmt. Dazu wurden Gene hoher Signalintensität ausgewählt, um den linearen Korrelationskoeffizienten zu berechnen. Durch Hinzunahme von Genen geringerer Signalintensität nähert sich der Wert des Korrelationskoeffizienten weiter an den Wert 1 an, bis der Wendepunkt erreicht wird, an dem durch Hinzunahme von Genen noch geringerer Signalintensität der lineare Korrelationskoeffizient anfängt zu fallen. Dies ist der Schwellenwert, der die Genauswahl bestimmt und in gleicher Weise für die Normierung angewendet wurde. Abbildung 3.17 zeigt ein Beispiel, bei dem die Blaufärbung die ausgewählten Gene darstellt. Der Schwellenwert, der diese Auswahl an Genen limitiert, liegt an der Grenze zwischen Blau- und Schwarzfärbung.

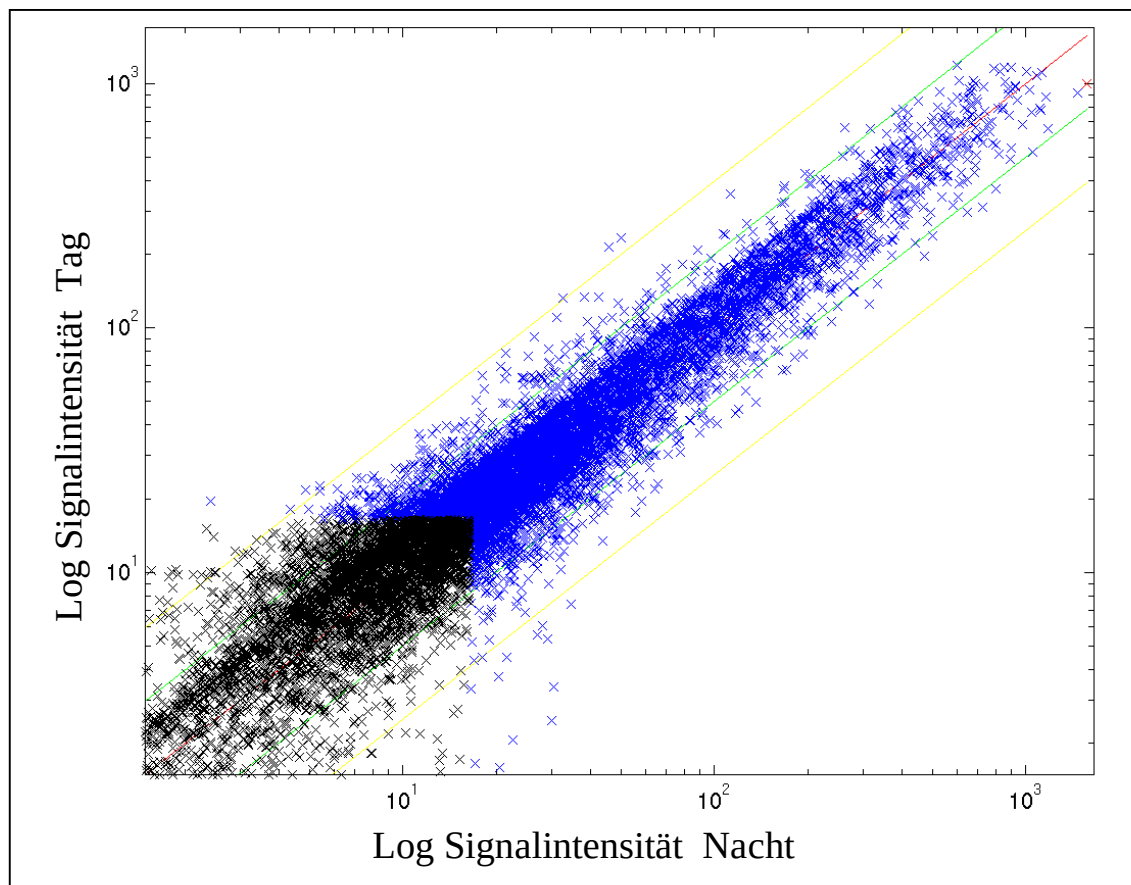


Abb. 3.17: Die statistische Auswahl von Genen für die Bestimmung des Differenzfaktors der Transkription ist in blau dargestellt. Die Gene mit niedriger Signalintensität werden aufgrund der starken Variation im Differenzfaktor für die Normalisierung zweier Transkriptionsprofile ausgenommen.

3.4.2 Konstitutiv transkribierte Gene von *Arabidopsis thaliana*

Um den Faktor der differentiellen Transkription im Vergleich komplexer Transkriptionsprofile zu finden, konnten auch einige ausgewählte, konstitutiv exprimierte Gene verwendet werden. Diese Gene sollten auf einem konstanten Niveau konstitutiv exprimiert werden, unabhängig von den Bedingungen des Experiments. Dazu wurden mittels eines iterativen Verfahrens im Vergleich komplexer Transkriptionsprofile verschiedene Gewebe - Blatt, Blüte, Wurzel, Sprosse, Callus und Stamm - miteinander verglichen und Gene selektiert, die im Faktor der differentiellen Transkription mit maximal einer Ausnahme den Wert 2 nicht überschritten. Diese selektierten Gene wurden daraufhin in den übrigen Geweben überprüft und weiter selektiert. Tabelle 3.4 zeigt die abschließende Übersicht über 29 Gene mit nur teilweise bekannter Annotation, die bei den genannten Geweben als konstitutiv exprimierte Gene auf konstantem Niveau gefunden werden konnten und damit potentielle Ankerpunkte für die Bestimmung des Faktors der differentiellen Transkription darstellen.

Nr.	Annotation	Klon_ID	EST_ID	TC
1	actin 1 isolog	168H2T7	P_13774	TC8901
2	alpha-6 tubulin, TUA6	216M18T7	P_19268	TC8187
3	elongation factor 1-alpha, EF-1 alpha A1	164I7T7	P_12649	TC13982
4	glycine rich protein A3	153I12T7	P_11256	
5	histone H2A isolog	194G1T7	P_18127	TC9532
6	histone H2B isolog	119E17T7	P_15997	TC11332
7	histone H3 isolog	169N8T7	P_13309	TC9515
8	NAM gene product [Petunia hybrida]	151G21T7	P_11561	
9	peptide methionine sulfoxide reductase	226P20T7	P_20134	
10	plasma membrane intrinsic protein 1C	226O13T7	P_20383	
11	polyubiquitin, ubq10	210K12T7	P_18603	TC8649
12	polyubiquitin, ubq3	149D4T7	P_11154	TC8630
13	PSI-H precursor [Nicotiana sylvestris]	150M14T7	P_11510	
14	rice GOS2 protein isolog	173D6T7	P_14068	TC9225
15	-	108J18T7	P_15970	TC10796
16	-	153K12T7	P_11645	TC11302
17	-	138L5T7	P_11944	
18	-	161C5T7	P_12046	
19	-	171P4T7	P_13630	TC46312
20	-	176K24T7	P_14765	
21	-	181P10T7	P_15173	
22	-	182K18T7	P_15644	TC9266
23	-	192N15T7	P_16712	
24	-	213F20T7	P_19131	TC11227
25	-	214H8T7	P_19386	TC8998
26	-	215L4T7	P_19615	TC9789
27	-	219H23T7	P_19349	TC8342
28	-	220H9T7	P_19813	
29	-	237E2T7	P_20836	

Tab. 3.4: In den Geweben Blatt, Blüte, Wurzel, Sprosse, Callus und Stamm konstitutiv transkribierte Gene auf konstantem Niveau als potentielle Ankerpunkte für die Bestimmung des transkriptionellen Differenzfaktors.

3.4.3 Heterologe Kontrollsequenzen

3.4.3.1 Bestimmung heterologer Kontrollsequenzen

Zur Bestimmung des Faktors der differentiellen Transkription konnten auch einige ausgewählte Spots verwendet werden, deren DNA heterolog und zu Sequenzen von *Arabidopsis* orthogonal waren. Um zu *Arabidopsis* orthogonale Sequenzen zu finden, wurden einige Gene der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gesucht, die an der Sporulation und der Zellverschmelzung beteiligt sind (siehe Kap. 2.2.5.2). Diese Gene wurden mit ORF-spezifischen Primern PCR-amplifiziert und mittels Random Hexamer Priming mit ^{32}P markiert. Damit wurden Hybridisierungen auf Membranen durchgeführt, die jeweils ein Spotduplikat von genomischer Hefe-DNA links und von genomischer *Arabidopsis*-DNA rechts trugen. Wie man in Abbildung 3.17 links erkennt, bindet als Positivkontrolle genomische Hefe-DNA als Sonde sowohl an Hefe- als auch an *Arabidopsis*-Sequenzen. Bei der Hybridisierung der Hefe-PCR-Produkte in Abbildung 3.18 rechts binden die Sonden an die Spots mit genomischer Hefe-DNA als Positivkontrolle, aber nicht an die Spots mit genomischer *Arabidopsis*-DNA. Die sichtbaren Spots auf der linken Seite zeigen, daß die Hybridisierung erfolgreich stattgefunden hat. Damit erfüllten die untersuchten Gene die Bedingung einer zu *Arabidopsis* orthogonalen und heterologen Sequenz und können damit für die Herstellung heterologer Kontrollen dienen.

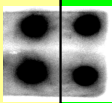
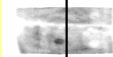
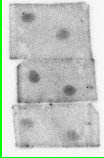
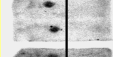
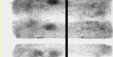
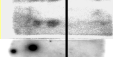
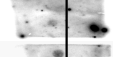
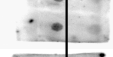
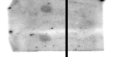
Sonde	Zielsequenz		Sonde	Zielsequenz	
Positivkontrolle	gen. Yeast DNA	genomische <i>Arabidopsis</i> DNA	Heterologe Sequenzen	gen. Yeast DNA	genomische <i>Arabidopsis</i> DNA
genomische Hefe DNA			YGR059W B4		
<i>Arabidopsis</i> Actin			YCR066W B5		
			YHR139C B6		
			YJL170C B10		
			YJR053W B11		
			YJR094C C2		
			YNL204C C9		

Abb. 3.18: Hybridisierungen zur Bestimmung heterologer Kontrollsequenzen. Die linke Spalte (gelb & grün) zeigt die Kontrollsignale, die zeigen, daß die Hybridisierung funktioniert hat. Die ausgewählten Hefesequenzen in der rechten Spalte zeigen bis auf die Positivkontrollen (gelb) keine Hybridisierungssignale (grün), d.h. diese verwendeten Sequenzen sind potentielle, zu *Arabidopsis* heterologe Kontrollen.

3.4.3.2 Herstellung heterologer mRNA-Kontrollen

Um die heterologen Kontrollsequenzen auch als Ankerpunkte im Vergleich komplexer Transkriptionsprofile verwenden zu können, mußten sie mit der komplexen RNA-Probe im gleichen Ansatz markiert werden. Um sie in einer reversen Transkription mittels dT₁₈-Oligomer einsetzen zu können, mußten sie wie die Proben-mRNA ein 3'-polyA-Ende besitzen, am 5'-Ende jedoch die zu *Arabidopsis* heterologe Kontrollsequenz. Die Herstellung heterologer mRNA-Kontrollen ist in Abbildung 3.19 dargestellt.

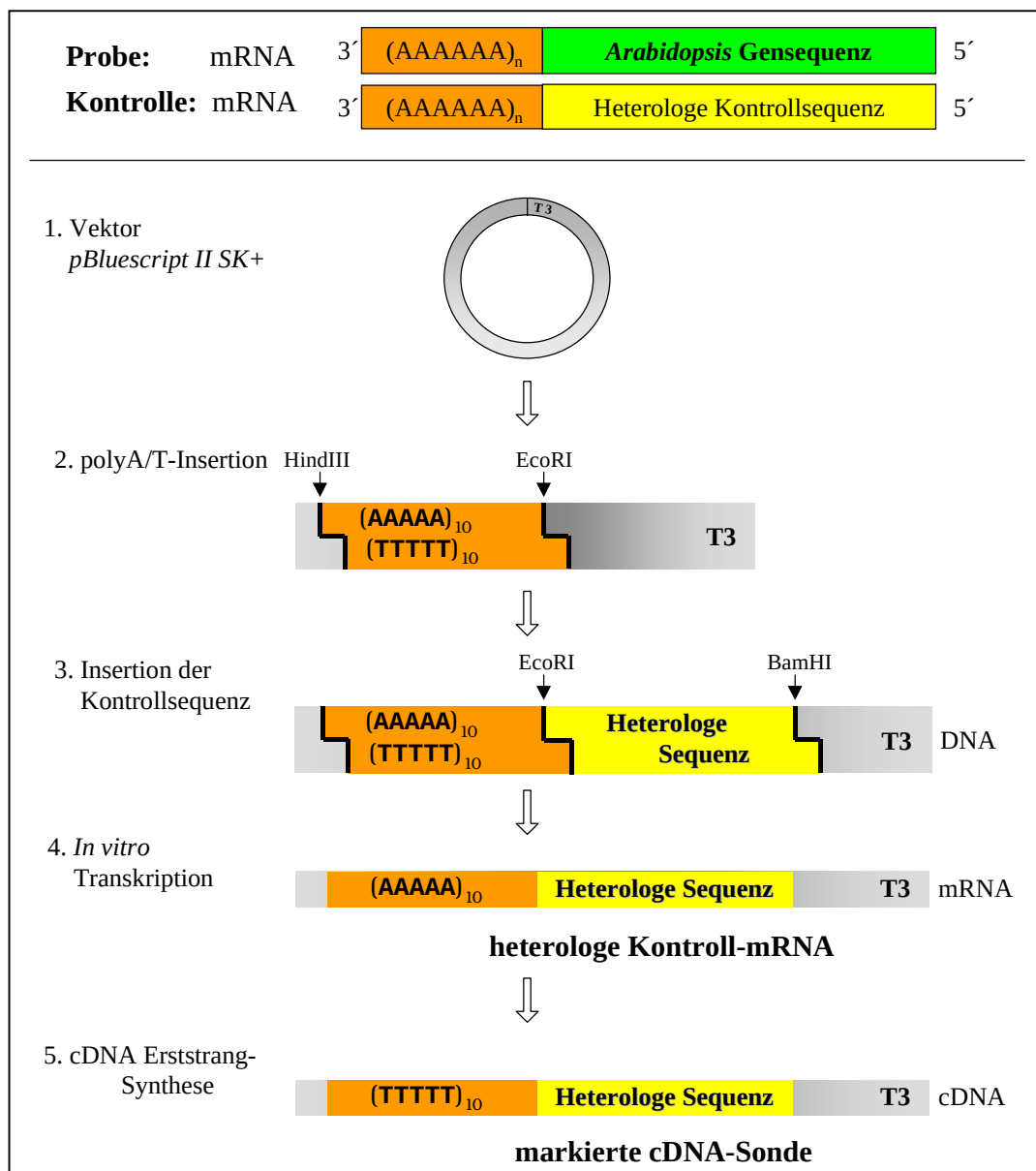


Abb. 3.19: Strategie zur Herstellung heterologer Kontrollsequenzen. Durch Insertion eines polyA/T-Fragmentes und einer heterologen Kontrollsequenz wird ein neues Vektorkonstrukt erstellt, aus dem sich mittels *in vitro* Transkription eine heterologe Kontroll-mRNA herstellen läßt. Diese Kontroll-mRNA kann dann zur komplexen Probe in definierter Menge zugegeben werden, um in der späteren Auswertung als Ankerpunkt zu dienen.

Wie in Abbildung 3.20 dargestellt, wurde zuerst ein poly (A/T)₅₀-Fragment in der geeigneten Orientierung in den Vektor *pBluescript II SK+* kloniert und in *E.coli*-Zellen mittels Elektroporation transformiert (siehe Kapitel 2.2.5). Aus mehreren transformierten Zellen wurde Plasmid-DNA isoliert, das poly (A/T)₅₀-Fragment durch Restriktionsverdau herausgeschnitten, ³²P-markiert und gelelektrophoretisch nachgewiesen. Die Abbildung 3.20 A zeigt den gelelektrophoretischen Nachweis des poly (A-T)₅₀-Fragmentes in vier transformierten *E. coli*-Klonen. Anschließend wurde in diese Transformanten jeweils eine heterologe Kontrollsequenz kloniert. Der Nachweis der Insertion und Transformation der heterologen Kontrollsequenzen konnte über eine PCR-Amplifikation mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung des Insertionsfragmentes erbracht werden. Dies ist in Abbildung 3.20 B dargestellt.

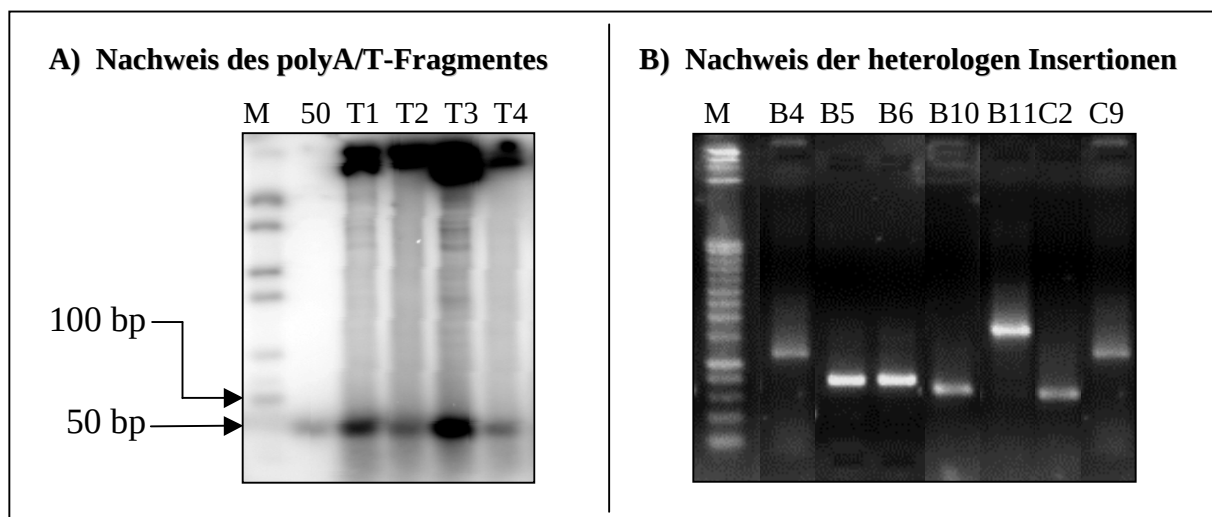


Abb. 3.20: Nachweis der Insertion des poly (A-T)₅₀-Fragmentes und der heterologen Sequenzen.

- A) Isolation des 50 Basenpaar langen poly (A-T)₅₀-Fragmentes durch Restriktionsverdau mit EcoRI/HindIII, ³²P-Markierung mittels 5'-Phosphorylierung und gelelektrophoretische Auftrennung im 3 %-igen Agarosegel.

M: Längenstandard mit 100 und 50 Basenpaaren.

50: für die Klonierung verwendetes poly (A-T)₅₀-Fragment.

T1-T4: Nachweis des klonierten poly (A-T)₅₀-Fragmentes in vier transformierten *E. coli*-Klonen.

- B) Isolation der heterologen Kontrollsequenzinsertionen durch PCR-Amplifikation mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung im 1,5 %-igen Agarosegel.

Mit diesen Vektorkonstrukten konnten in einer *in vitro* Transkription mittels T3-RNA-Polymerase sieben verschiedene heterologe Kontroll-mRNAs hergestellt werden. Zusätzlich konnte die mRNA von α - und β -Globin vom Kaninchen von der Firma Gibco Life Technologies, Karlsruhe, kommerziell erworben werden.

Diese insgesamt 9 heterologen Kontroll-mRNAs konnten einer komplexen RNA-Probe vor der Markierung zu je 100 ng zugesetzt werden. Ein Transkriptionsprofil mit zugesetzten heterologen Kontrollsequenzen zeigt Abbildung 3.21 A, in der die Kontrollsignale, rot umrandet und mit Pfeilen markiert, gut zu erkennen sind. Die Anhäufung rot markierter Signale geringer Intensität stellen leere Spots dar, die als Negativkontrollen verwendet wurden.

In Abbildung 3.21 B ist die Hybridisierung markierter, heterologer Kontroll-cDNAs auf Kontrollspots dokumentiert. In der ersten Spalte wurde das T7-Oligomer als Positivkontrolle auf alle Kontrollspots hybridisiert. In den Spalten 1 bis 5 wurde jeweils eine Kontroll-mRNA markiert und hybridisiert. Dabei ist keine Kreuzhybridisierung der Kontrollen untereinander zu erkennen.

Die Abbildung 3.21 C demonstriert ein Transkriptionsprofil, bei dessen Herstellung keine heterologe Kontrolle zugesetzt worden war. Die rot markierten Kontrollspots liegen mit sehr geringer Signalintensität im Hintergrundbereich wie die leeren Spots in Abbildung 3.21 A und weisen damit auch keine Kreuzhybridisierung mit der komplexen *Arabidopsis*-Sonde auf.

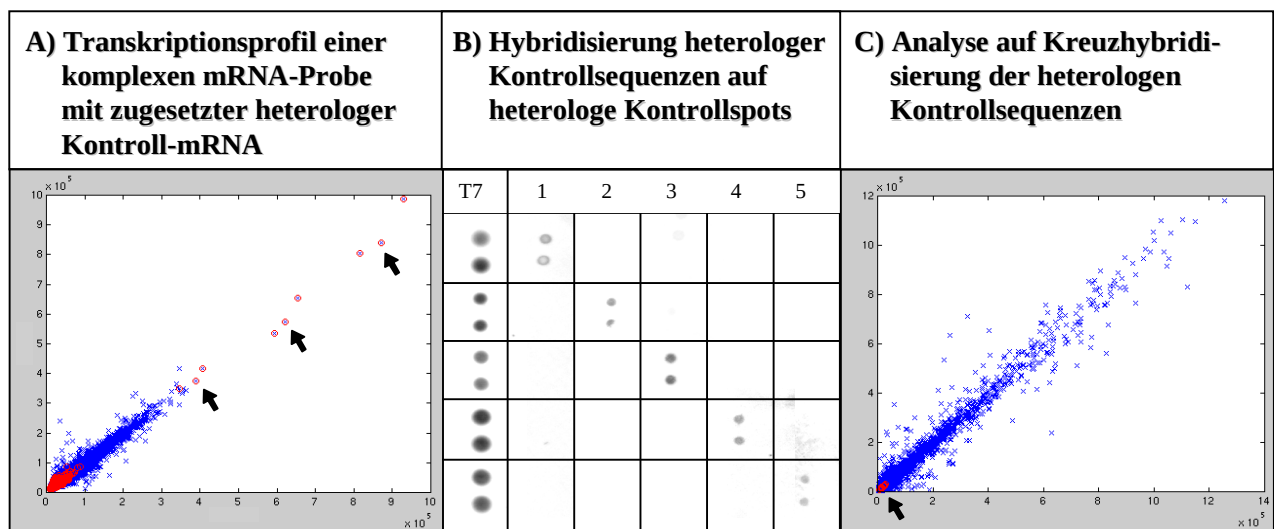


Abb. 3.21: Hybridisierungen zur Verifikation der Kontrollsequenzen.

- A) Transkriptionsprofil mit zugesetzten, heterologen Kontrollsequenzen, die rot umrandet und mit Pfeilen markiert sind. Die roten Spots geringer Intensität sind leere Spots als Negativkontrolle.
- B) Hybridisierung heterologer Kontroll-cDNAs auf Kontrollspots. Die erste Spalte zeigt eine Kontrollhybridisierung mit dem T7-Oligomer. Die Spalten 1 bis 5 zeigen die spezifische Hybridisierung jeweils einer heterologen Kontrollsequenz.
- C) Transkriptionsprofil ohne Zusatz heterologer mRNA-Kontrollen. Die rot umrandeten und mit Pfeil markierten, heterologen Kontrollspots liegen im Hintergrundbereich geringer Signalintensität und demonstrieren, daß keine Kreuzhybridisierung zwischen Kontrollspots und komplexer *Arabidopsis*-Sonde auftritt.

3.4.4 Anwendung und vergleichende Analyse der verschiedenen Arten von Ankerpunkten

Für die Bestimmung des differentiellen Transkriptionsfaktors standen drei verschiedene Arten von Ankerpunkten zur Verfügung:

- A) statistische Auswahl von Genen
- B) konstitutiv exprimierte Gene mit konstantem Transkriptionsniveau
- C) heterologe Kontrollsequenzen

Um den Einfluß und die Stabilität dieser Ankerpunkte auf die Bestimmung des Faktors der differentiellen Transkription zu analysieren, wurden Ergebnisse aus dem Vergleich komplexer Transkriptionsprofile mit jedem Ankerpunkttyp normalisiert. Für die Bewertung der Stabilität der verschiedenen Ankerpunkttypen wurden zwei Fallbeispiele ausgewählt. Der Fall 1 repräsentiert eine nur geringe differentielle Transkription zwischen zwei Transkriptionsprofilen und wird am Beispiel des Tag-Nacht-Vergleiches von Blattproben von *Arabidopsis thaliana* dargestellt. Der Fall 2 repräsentiert eine große differentielle Transkription zwischen zu vergleichenden Transkriptionsprofilen. Dieser Fall wird anhand der Untersuchung der Pathogenantwort mit dem avirulenten Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* 7 Stunden nach versuchter Infektion demonstriert (siehe Abb. 3.22).

Die Abbildung 3.22 dokumentiert die Scatterplots in beiden Fallbeispielen mit der Normalisierung mittels der drei genannten Ankerpunkttypen (A-C). Man erkennt im Fall 1 für geringe differentielle Variationen im Transkriptionsmuster, daß die drei Scatterplots nach Anwendung aller drei Arten von Ankerpunkten keine Änderung zeigten. Die drei verschiedenen Ankerpunkttypen (A-C) führen zum gleichen differentiellen Transkriptionsfaktor, d.h. es gibt keine Verschiebung der Masse der Signalintensitäten parallel zur Diagonalen. Der Fall 2 für große differentielle Variationen im Transkriptionsprofil weist dagegen eine Verschiebung auf. Die konstitutiv exprimierten Gene (B) aus diversen Gewebevergleichen zeigten zum Teil eine erhöhte Transkription 7 Stunden nach Pathogeninfiltration der Pflanze und veränderten damit als Ankerpunkte den differentiellen Transkriptionsfaktor für jedes Gen um den Wert - 1,0, gemessen an dem Transkriptionsfaktor, der durch die statistische Auswahl von Genen als Ankerpunkt (A) erhalten wurde. Mit den heterologen Kontrollsequenzen als Ankerpunkte (C) veränderte sich der differentielle Transkriptionsfaktor für jedes Gen im Vergleich zur Mehrheit der Gene als Ankerpunkt um den Wert + 1,0.

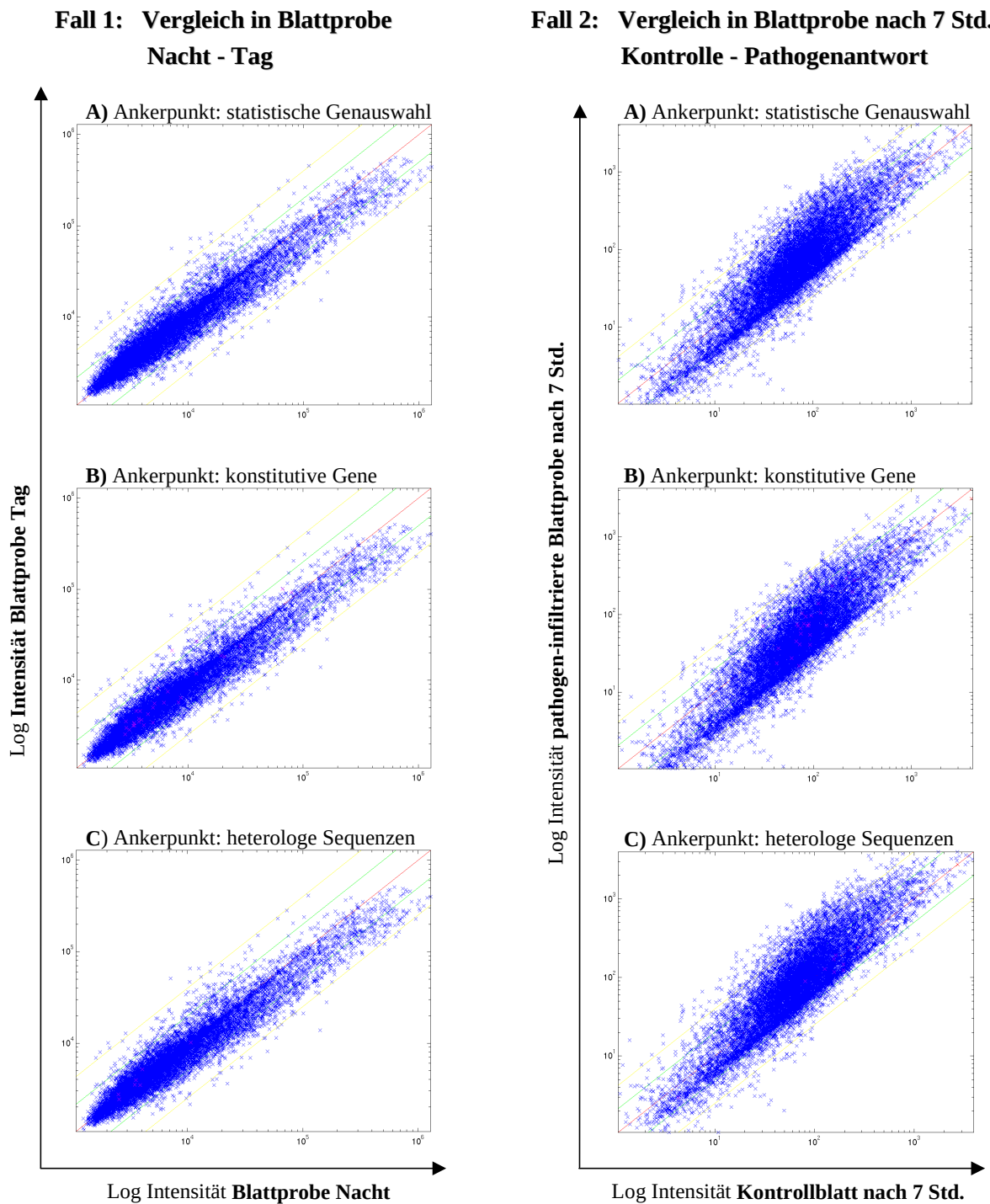


Abb. 3.22: Vergleich der Stabilität verschiedener Ankerpunkttypen für die Normalisierung komplexer Transkriptionsprofile. Für Fall 1 und 2 sind die Scatterplots nach der Normalisierung des transkriptionellen Differenzfaktors mit dem jeweiligen Ankerpunkttyp (A-C) dokumentiert. Man erkennt im Fall 1 für eine geringe differentielle Transkription keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Ankerpunkttypen, d.h. die Masse der Signalintensitäten weist keine Verschiebungen parallel zur Diagonalen auf. Im Fall 2 ist die Masse der Signalintensitäten bei der Normalisierung mit konstitutiven Genen (B) im Vergleich zu der statistischen Auswahl von Genen (A) um den Wert $-1,0$ verschoben, für die Normalisierung mit heterologen Kontrollsequenzen (C) im Vergleich zu der statistischen Auswahl von Genen (A) um den Wert $+1,0$ verschoben. Damit stellt die statistische Auswahl von Genen auch für große differentielle Änderungen im Transkriptionsmuster den Ankerpunkttyp mit der höchsten Stabilität dar.

Damit schwankt der durch die Normalisierung mit konstitutiv exprimierten Genen (B) und mit heterologen Kontrollsequenzen (C) erhaltene Transkriptionsfaktor im Fall 2 für große differentielle Änderungen im Transkriptionsmuster um den Faktor, der durch die Normalisierung mit der statistischen Auswahl von Genen (A) erhalten wurde. Dies zeigt, daß mit der Wahl unterschiedlicher Ankerpunkte auch unter Umständen verschiedene Transkriptionsfaktoren erhalten werden können. Um diese Variation auszuschließen, wurde in allen weiteren Vergleichen die statistische Auswahl von Genen (A) als Ankerpunkt für die weitere Auswertung der differentiellen Transkription gewählt.

3.5 Analyse der differentiellen Genregulation von *Arabidopsis thaliana* während der Abwehr des avirulenten Pathogens *Pseudomonas syringae*

3.5.1 Hypersensitive Reaktion als makroskopischer Marker der pflanzlichen, induzierten Pathogenabwehr

Um die Pathogenabwehr der Pflanze *Arabidopsis thaliana* untersuchen zu können, wurden Pflanzenblätter auf der Unterseite, an der die Stomata liegen, durch Infiltration beider Blatthälften mit dem avirulenten, pathogenen Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, das das Avirulenzgen *avrRpt2* exprimiert und daher auch abgekürzt mit *Pst avrRpt2* bezeichnet wird, in Kontakt gebracht (siehe Kapitel 2.2.6). Fand eine Pathogenerkennung mit anschließender Induktion pflanzlicher Abwehrmechanismen statt, so trat als Folge der Induktion der pflanzlichen Pathogenabwehr eine hypersensitive Reaktion auf. Diese führte in fortgeschrittenem Stadium zu einem Hof toten Gewebes um die Infektionsstelle, auch Abwehrnekrose genannt. Die hypersensitive Reaktion stellt somit einen makroskopisch sichtbaren Marker der induzierten Pathogenabwehr dar.

Eine sichtbar ausgeprägte hypersensitive Reaktion an der lokalen Infektionsstelle schon 24 Stunden nach Infiltration von üblicherweise 5×10^6 cfu/ml *Pst avrRpt2* dokumentiert die Abbildung 3.23. Um die transkriptionelle Genregulation der induzierten Pathogenantwort zu untersuchen, wurden Blattproben auch zu früheren Zeitpunkten geerntet und analysiert.

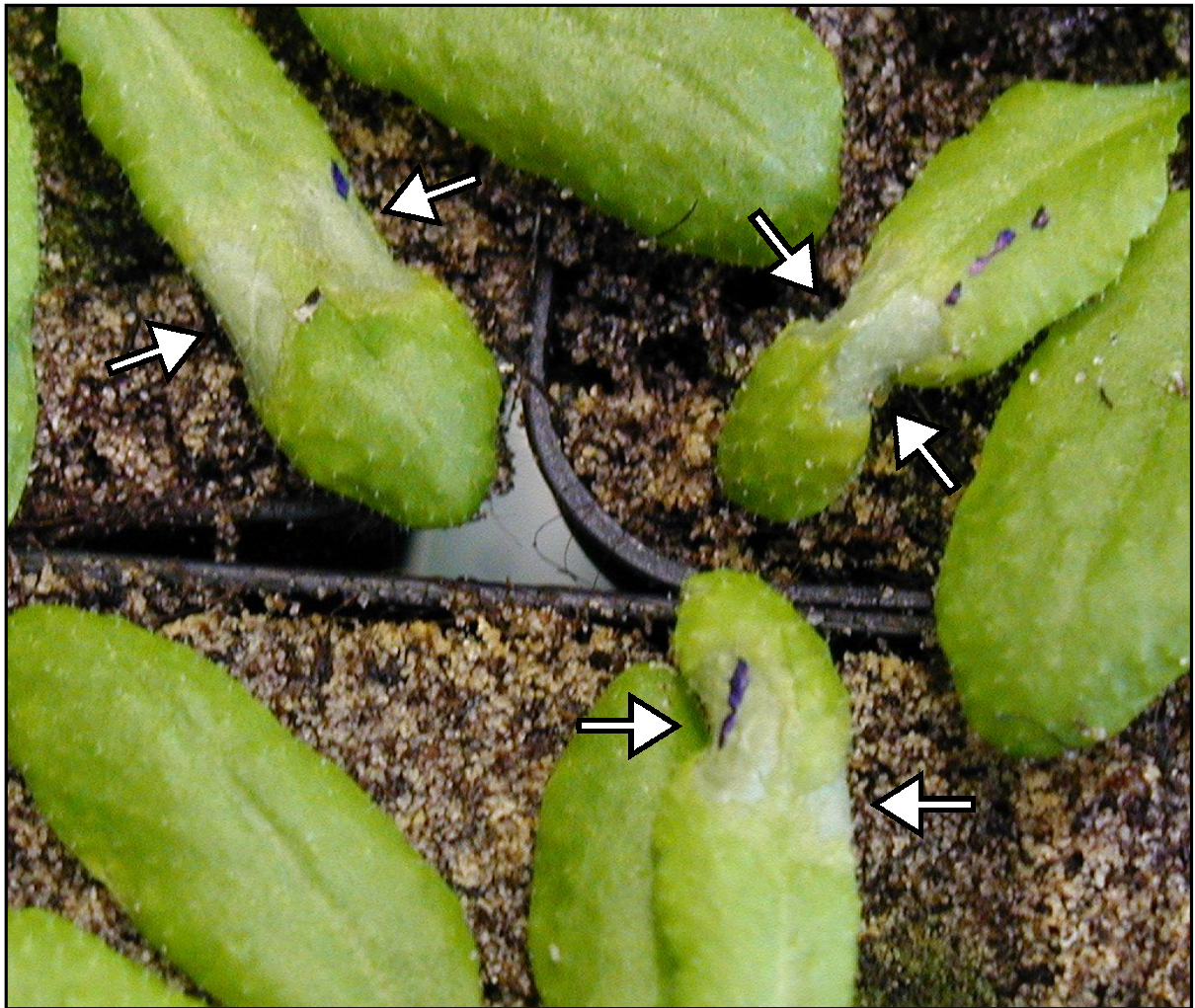


Abb. 3.23: Hypersensitive Reaktion der Pflanze *Arabidopsis thaliana* nach 24 Stunden als makroskopische Auswirkung pathogen-induzierter Abwehrmechanismen.

3.5.2 Strategie zur Analyse der pflanzlichen Pathogenabwehr

Für die Analyse der differentiellen Transkription der Abwehrmechanismen der Pflanze *Arabidopsis thaliana* während der Infektion des avirulenten Pathogens *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst avrRpt2*) wurden Pflanzenblätter als Kontrolle mit 10 mM MgCl_2 -Lösung und die Pathogenprobe mit 5×10^6 cfu/ml *Pst avrRpt2* infiltriert. Die Probenentnahme erfolgte unmittelbar sowie 2, 7 und 24 Stunden nach der Infiltration. Die Untersuchung wurde an Gewebeproben vorgenommen, die aus drei unabhängigen Anzuchten mit beschriebener Behandlung und innerhalb jeder Anzucht von mehreren Pflanzen stammten. Verglichen wurden immer Kontrollprobe und pathogen-infiltrierte Probe zum jeweiligen Zeitpunkt. Damit wurde sichergestellt, daß pflanzenspezifische und zeitabhängige, äußere Umwelteinflüsse von der

Analyse ausgeschlossen wurden und die erhaltenen Resultate allein auf die Pathogenantwort zurückzuführen waren. Die Strategie zur Analyse der pflanzlichen Pathogenabwehr ist noch einmal in Abbildung 3.24 übersichtlich dargestellt.

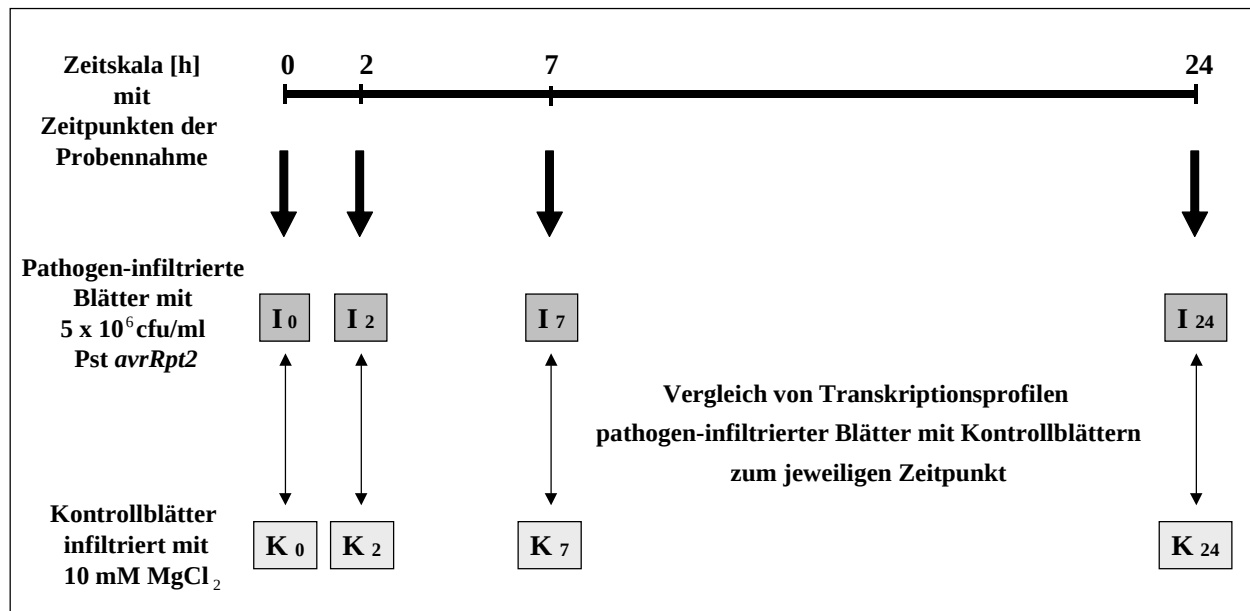


Abb. 3.24: Versuchsaufbau der Probenentnahme und Vergleich von Transkriptionsprofilen pathogen-infiltrierter Blätter (I_t) mit $MgCl_2$ -infiltrierten Kontrollblättern (K_t) zu den Zeitpunkten $t = 0$ [10 Minuten], 2, 7 und 24 Stunden nach Infiltration.

3.5.3 Vergleich komplexer Transkriptionsprofile für die Analyse der induzierten Pathogenabwehr

Von jeder Probe wurde eine RNA-Isolation, wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben, durchgeführt, je 3 Sonden hergestellt und auf insgesamt 6 genomische *Arabidopsis*-Arrays aus einem Produktionslauf hybridisiert (siehe Kapitel 2.2.2-3 und 2.2.9-10). Durch Exposition auf Phosphorscreens, Einlesen der Bilddaten am Phosphorimager sowie Zuordnung und Quantifizierung der Signalintensitäten konnten 2 unabhängige, komplexe Transkriptionsprofile für die Probe I₂ und je 3 für alle übrigen Proben erstellt werden (siehe Kapitel 2.2.10-11). Damit konnten für den Zeitpunkt 2 Stunden nach Infiltration 6 Vergleiche und für alle weiteren Zeitpunkte je 9 Vergleiche analysiert und ausgewertet werden (siehe Kapitel 2.2.12). Die Abbildung 3.25 stellt mit den Scatterplots A bis D einige Kontrollvergleiche zur Qualitätssicherung der Resultate und mit den Scatterplots E - H die Ergebnisse der Untersuchung der transkriptionell induzierten Pathogenabwehr an 13.000 Genen der Pflanze *Arabidopsis thaliana* dar.

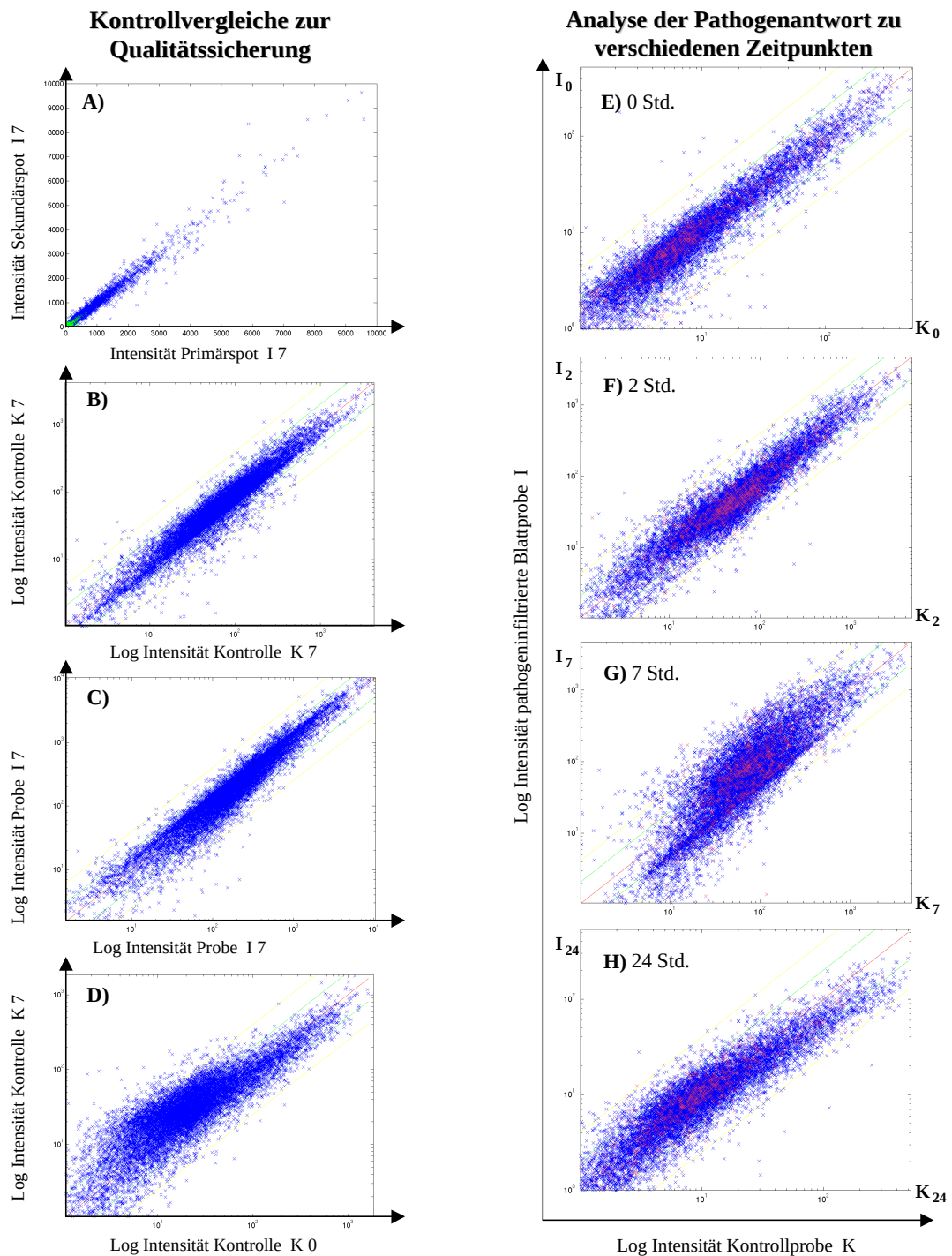


Abb. 3.25: Vergleich komplexer Transkriptionsprofile zur Qualitätssicherung (A-D) und zur Analyse der pathogen-induzierten Abwehrmechanismen (E-H). Scatterplot A) zeigt im Vergleich zwischen Primär- und Sekundärspot identischer Sequenz nur geringe Abweichungen. B) stellt den Vergleich zweier Transkriptionsprofile der gleichen Kontrollprobe zum Zeitpunkt 7 Std. vor, C) gleichermaßen für die pathogen-induzierte Probe zum Zeitpunkt 7 Std. D) dokumentiert die transkriptionellen Änderungen im Transkriptionsmuster der Kontrolle zwischen den Zeitpunkten 0 und 7 Stunden. Die Variationen in D) sind auf den Streß der Infiltration, nicht aber auf die Pathogenabwehr zurückzuführen und werden bei der Analyse der pathogen-induzierten Abwehrmechanismen durch den Vergleich von Kontroll- und pathogen-infiltrierter Probe zum jeweiligen Zeitpunkt von vornherein ausgeschlossen. E) und F) zeigen keine großen Variationen im Transkriptionsmuster. G) mit 7 Stunden nach der Pathogeninfiltration weist für etwa 10 % aller untersuchten Gene eine erhöhte Transkriptionsrate auf. H) zeigt wieder eine Beruhigung der transkriptionellen Aktivität.

Zur Qualitätssicherung der Datensätze wurden von jedem Transkriptionsprofil die Signalintensitäten von Primär- und Sekundärspot in einem Scatterplot gegenübergestellt, wie dies Abbildung 3.23 A für ein Beispiel mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,99 dokumentiert. Die Scatterplots B und C stellen jeweils den Vergleich komplexer Transkriptionsprofile mit Datensätzen der Proben I₇ und K₇ dar. Dabei wurden je zwei unabhängig voneinander erstellte Transkriptionsprofile der gleichen Probe miteinander verglichen. Sie zeigen mit wenigen Ausnahmen für einige Gene die typischerweise geringen Variationen im Transkriptionsprofil für den Vergleich identischer Proben mit einem Korrelationskoeffizient von 0,981 für die Probe K₇ und 0,977 für die Probe I₇. Sie dienen als Kontrollvergleiche für den Scatterplot G, in dem genau diese beiden Proben, I₇ und K₇, einander gegenübergestellt werden. Der Scatterplot D läßt die Variation im Zeitverlauf von 0 auf 7 Stunden nach der Infiltration mit MgCl₂-Lösung erkennen. Diese Variation im Transkriptionsprofil demonstriert, daß die Pflanze auf zeitabhängige, äußere Einflüsse reagiert, die nicht unmittelbar in die Pathogeninfektion involviert sind. Und diese Einflüsse werden gerade durch den Vergleich von MgCl₂- und pathogen-infiltrierter Probe zum jeweils gleichen Zeitpunkt ausgeschlossen.

In den Scatterplots E bis H sind die Vergleiche für die Analyse der induzierten Pathogenabwehr von *Arabidopsis thaliana* zu den Zeitpunkten 0, 2, 7 und 24 Stunden nach der Infiltration mit dem avirulenten Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst avrRpt2*) dargestellt. Man erkennt eine leichte Zunahme der differentiellen Transkription vom Zeitpunkt 0 zu 2 Stunden, die sich wesentlich stärker beim Übergang zum Zeitpunkt 7 Stunden ausprägt. Für den Zeitpunkt 24 Stunden nimmt die differentielle Transkription wieder ab, erreicht aber in ihrer Gesamtheit noch nicht die Ausgangslage bei 0 Stunden. Damit ergibt sich bei den untersuchten Zeitfenstern ein Maximum der differentiellen Transkription bei 7 Stunden nach der Infiltration. Die Kontrollvergleiche B und C, in denen die beiden Proben I₇ und K₇ jeweils mit sich selbst verglichen werden, demonstrieren, daß es sich im Scatterplot G nicht um systembedingte Variationen, sondern um eine drastische differentielle Transkription handelt. Sie deutet in diesem makroskopischen Überblick über die Gesamtheit der differentiellen Regulation von 13.000 Genen auf die Aktivierung einiger pathogen-induzierte Abwehrmechanismen hin. Eine weitere Aussage über die gezielte Regulation nicht nur einzelner Gene, sondern auch ganzer Stoffwechselwege läßt sich nicht mit dem durch bildanalytische Auswertung ermöglichten globalen Überblick treffen, sondern über den in Kapitel 2.2.12.3 beschriebenen, weitergehenden Ansatz der funktionellen Analyse.

3.5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zur differentiellen Genregulation verschiedener Stoffwechselwege als pathogen-induzierte Antwort der Pflanze *Arabidopsis*

Die parallele Genexpressionsanalyse von 13.000 Genen mit den eigens hergestellten genomischen *Arabidopsis*-Arrays produziert eine solche Fülle an Daten, die unmöglich alle zu diskutieren sind. Daher mußte aus der Gesamtmenge an vorhandenen Daten, wie sie in den Scatterplots der Abbildung 3.23 im Prinzip enthalten sind, für eine weitergehende, detaillierte Analyse und Diskussion eine Auswahl an Genen getroffen werden. Es wurden Gene aufgrund ihrer Annotation und damit ihrer Zugehörigkeit zu einem Stoffwechselweg selektiert (siehe Kapitel 2.2.12.3) . Es wurden folgende Stoffwechselwege ausgewählt:

1. Glycolyse
2. Krebs-/Citrat-Cyclus
3. Pentosephosphat-Cyclus
4. Shikimatweg, Tryptophansyntheseweg
5. Phenylpropanoidsyntheseweg
6. Ethylensynthese
7. Glyoxylat-Metabolismus

Mit diesen Stoffwechselwegen sollte die Genregulation auf Transkriptionsebene der induzierten Pathogenabwehr der Pflanze *Arabidopsis thaliana* nach Infiltration mit dem avirulenten Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst avrRpt2*) untersucht werden. Mit dem genomischen *Arabidopsis*-Array wurden 84 % aller Enzyme, die an diesen genannten Stoffwechselwegen beteiligt sind, erfaßt. Damit wurde es erstmals unter Einsatz der DNA-Array-Technologie möglich, ein globales Gesamtbild der differentiellen Transkription ganzer Stoffwechselwege in einem Experimentansatz zu erstellen.

Die Resultate der differentiellen Genexpressionsanalyse sind in Tabelle 3.5 dokumentiert. Tabelle 3.6 stellt eine zusätzliche Auswahl differentiell transkribierter Gene vor, die nicht direkt in die genannten Stoffwechselwege fallen, aber Auswirkungen der pathogen-induzierten Abwehrmechanismen der Pflanze *Arabidopsis thaliana* darstellen. Die Abbildung 3.26 zeigt die Ergebnisse der Tabellen 3.5 und 3.6 im funktionellen Zusammenhang.

Nr.	Annotation	Klon_ID	0 Std.	2 Std.	7 Std.	24 Std.
1.1	Hexokinase	201B5T7	2,2	1,0	1,4	
1.2	Glucose-6-Phosphat-Isomerase	198H11T7	1,6	1,2	1,3	2,6
1.3	Phosphofructokinase beta-Untereinheit	G8H11T7	-1,2	-1,5	-1,2	1,1
1.4	Fructose-Bisphosphat-Aldolase	221P5T7	1,5	1,0	1,2	1,2
1.5	Triosephosphat-Isomerase	110L11T7	1,5	-1,3	1,1	1,1
1.6	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	185B10T7	-1,5	-1,6	2,9	1,2
1.7	Phosphoglycerat-Kinase	108M8T7	1,4	1,3	1,4	-1,5
1.8	Phosphoglycerat-Mutase	146O11T7	-1,6	1,1	1,0	1,8
1.9	Enolase	241P8T7	-1,2	-1,2	-1,1	1,8
1.10	Pyruvat-Kinase	204D3T7	1,6	1,0	1,5	1,1
2.1	Pyruvat-Dehydrogenase E1-Komponente, beta-Untereinheit	F10F12T7	1,9	-1,1	2,3	2,0
2.2	Citrat-Synthase	185J6T7	1,1	1,0	2,4	-1,3
2.3	Aconitase Isolog	177L13T7	-1,1	-1,4	4,1	-1,5
2.4	NADP-spezif. Isocitrat-Dehydrogenase Isolog	VBVEA08	-2,2	1,1	-1,6	-2,0
2.5a	α -Ketoglutarat-Dehydrogenase	184I14T7	-1,5	-1,4	2,5	1,2
2.5b	Dihydrolipoamid-Dehydrogenase-Precursor	120K5T7	1,3	1,0	-1,1	1,1
2.5c	Dihydrolipoamid-Succinyltransferase-Komponente E2	240E21T7	1,3	1,7	-1,2	1,5
2.6	Succinat-CoA-Ligase	178B19T7	1,1	1,3	1,7	2,0
2.7	Succinat-Dehydrogenase	105N23T7	1,7	1,1	-1,1	1,9
2.9	NAD-Malat-Dehydrogenase	226H24T7	1,2	-1,1	1,5	1,0
3.1	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	70E9T7	1,2			
3.3	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase Isolog	VBVBG01	-1,2	1,0	-1,2	-1,3
3.4	Ribose-5-Phosphat-Isomerase	171F23T7	-1,3	1,2	1,3	2,3
3.5	Transketolase	121C14T7	-1,4	-1,2	-1,4	1,0
3.6	Transaldolase	221M23T7	1,5	1,2	1,1	-1,4
4.2	Dehydrochinat-Synthase	64B5T7				
4.4	Shikimat-Dehydrogenase	98G7T7		1,2		
4.5	Shikimat-Kinase	126G8T7	-1,1	-1,3	-1,2	
4.6	3-Phosphoshikimat-1-Carboxyvinyl-Transferase Precursor	G2C8T7	1,4	1,0	1,5	2,2
4.7	Chorismat-Synthase	143K6T7	1,1	-1,2	2,5	2,2
4.8	Anthranilat-Synthase-Komponente I-1 Precursor	240I16T7	1,3	-1,3	1,8	2,7
4.9	Anthranilat-Phosphoribosyl-Transferase	172G16T7	-1,3	-1,4	1,9	-1,4
4.12	Tryptophan-Synthase beta-Kette1 Precursor	F4E1T7	1,7	-1,4	2,0	3,3
4.13	Chorismat-Mutase Precursor CM-1	145F17T7	-1,2	-1,3	3,1	-1,7
4.14	Prephenat-Dehydratase	145F17T7	-1,2	-1,3	3,1	-1,7
4.15	Tyrosin-Aminotransferase	158C18T7	-1,2	-1,2	2,3	1,0
5.1	Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL)	128N22T7	1,3	1,2	1,7	-1,7
5.2	4-Cumarat/trans-Zimtsäure-Monooxygenase	172O5T7	1,1	1,1	1,4	2,9
5.3	4-Cumarat-CoA-Ligase	G9F10T7	-1,5	1,0	-1,4	1,2
5.4	Chalcon-Synthase	177N23T7	1,2	-1,2	4,7	-1,6
5.5	Chalcon-Flavanon-Isomerase	177A20T7	-1,5	1,1	-1,1	1,4
5.6	4-Cumarat-Hydroxylase Isolog	240A11T7	1,9	-1,1	1,9	1,6
5.7	Kaffeesäure/5-Hydroxyferulat-O-Methyltransferase Isolog	154J19T7	1,4	1,1	1,3	
6.1	S-Adenosylmethionin-Synthetase 2	177J14T7	1,3	-1,3	2,1	1,4
6.2	1-Aminocyclopropan-1-Carboxylat (ACC)-Synthase Isolog	240L12T7	1,0	1,2	1,6	1,0
6.3	1-Aminocyclopropan-1-Carboxylat (ACC)-Oxidase	F2A1T7	1,7	1,8	1,8	1,5
7.1	Isocitrat-Lyase	G11H12T7	-1,5	-1,1	-1,1	2,0
7.3	Oxalyl-CoA-Decarboxylase	162G21T7	-1,3	-1,6	1,2	3,1

Tab. 3.5: Liste der analysierten Gene mit Transkriptionsraten aus selektierten Stoffwechselwegen. Angegeben sind Enzymnummer (bildet die Verknüpfung zu Text und Abb. 3.26), Annotation, Klon-Identifikation und die differentielle Transkriptionsrate für die Zeitpunkte 0 (10 Min.), 2, 7 und 24 Std. nach Infiltration mit dem avirulenten Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst avrRpt2*). Zur Erläuterung der Farbcodierung siehe nächste Seite.

Nr.	Annotation	Klon_ID	0 Std.	2 Std.	7 Std.	24 Std.
1	PR-Protein 1 Precursor	178B9T7	-1,3	-1,6	3,0	-1,8
2	PR-Protein 3 (Chitinase)	145B23T7	1,0	-1,3	3,9	-1,6
3	Glutathion-S-Transferase ERD 11	206N21T7	1,9	1,8	4,1	4,0
4	Glutathion-S-Transferase PM24	229O2T7	1,3	1,8	2,5	5,6
5	Glutathion-S-Transferase Isolog	83B5T7	1,1	1,3	3,1	1,5
6	Calmodulin	196D17T7	1,8	1,6	1,6	2,2
7	Calmodulin, ACaM4	187F5T7	-1,7	-1,2	2,6	1,1
8	Calmodulin-ähnliches Protein	175A5T7	-1,1	-1,3	3,0	1,6
9	Calcium-transportierende ATPase 3 (Calcium-Pumpe)	169A23T7	1,0	-1,1	-1,1	2,2
10	Calcium-bindendes Protein Isolog	155M12T7	-1,5	-1,2	2,3	-1,1
11	Calcium-abhängige Protein-Kinase Isolog	181C21T7	-1,6	1,3	2,5	1,2
12	Protein-Kinase	223N1T7	1,2	-1,3	2,0	-1,1
13	Protein-Kinase APK1B	110I2T7	1,9	1,4		2,2
14	Protein-Kinase PkpA	179D10T7	1,2	1,0	3,1	-1,1
15	Protein-Kinase SNF1	F10E2T7	2,6	1,2	1,4	1,6
16	Catalase	154N18T7	1,2	-1,7	3,7	-1,7
17	Catalase	227F4T7	1,6	1,0	1,8	2,6
18	Catalase	227H7T7	1,3	1,5	1,8	2,4
19	Peroxidase prxCb Isolog	180H7T7	1,2	1,0	2,3	3,2
20	kationische Peroxidase	F3F2T7	1,7	1,5	2,3	2,4
21	Glutathion-Peroxidase	139F9T7	-1,3	-1,2	2,7	-1,1
22	L-Ascorbinsäure-Peroxidase	155A13T7	-1,2	-1,1	2,9	
23	Peroxidase Precursor	183P23T7	-1,1	1,0	1,3	3,2
24	Peroxidase	183P17T7	-1,1	1,2	-1,4	2,4
25	Peroxidase	225D23T7	1,7	1,3	2,5	3,4
26	Peroxidase C1A Precursor	169L7T7	1,0	2,0	5,9	2,6
27	Peroxidase Isolog	188C18T7	-1,1	-1,3	2,6	1,6

Tab. 3.6: Liste von Genen aus selektierten Stoffwechselwegen. Angegeben sind Gennummer (bildet die Verknüpfung zum Text), Annotation, Klon-Identifikation und die differentielle Transkriptionsrate für die Zeitpunkte 0 (10 Min.), 2, 7 und 24 Std. nach Infiltration der Pflanze *Arabidopsis thaliana* mit dem avirulenten Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst avrRpt2*). Zur Erläuterung der Farbcodierung siehe unten.



konstitutive Transkription eines Gens in der Mehrheit der Vergleiche; der angegebene Faktor gibt das Transkriptionsverhältnis zwischen Kontrolle und pathogeninfiltrierter Probe zum jeweiligen Zeitpunkt wieder.



nach Pathogeninfiltration hochregulierte Transkription eines Gens (Faktor > 2) in der Mehrheit der Vergleiche; der angegebene Faktor entspricht dem Mittelwert aller Vergleichsfaktoren zwischen Kontrolle und pathogeninfiltrierter Probe zum jeweiligen Zeitpunkt.



nach Pathogeninfiltration reprimierte Transkription eines Gens (Faktor < - 2) in der Mehrheit der Vergleiche; der angegebene Faktor entspricht dem Mittelwert aller Vergleiche zwischen Kontrolle und pathogen-infiltrierter Probe zum jeweiligen Zeitpunkt.



keine gesicherten Daten aufgrund zu geringer Signalintensität ($SI < 2 \times$ Hintergrundintensität) mit einhergehender, technisch bedingter starker Variation des differentiellen Transkriptionsfaktors.

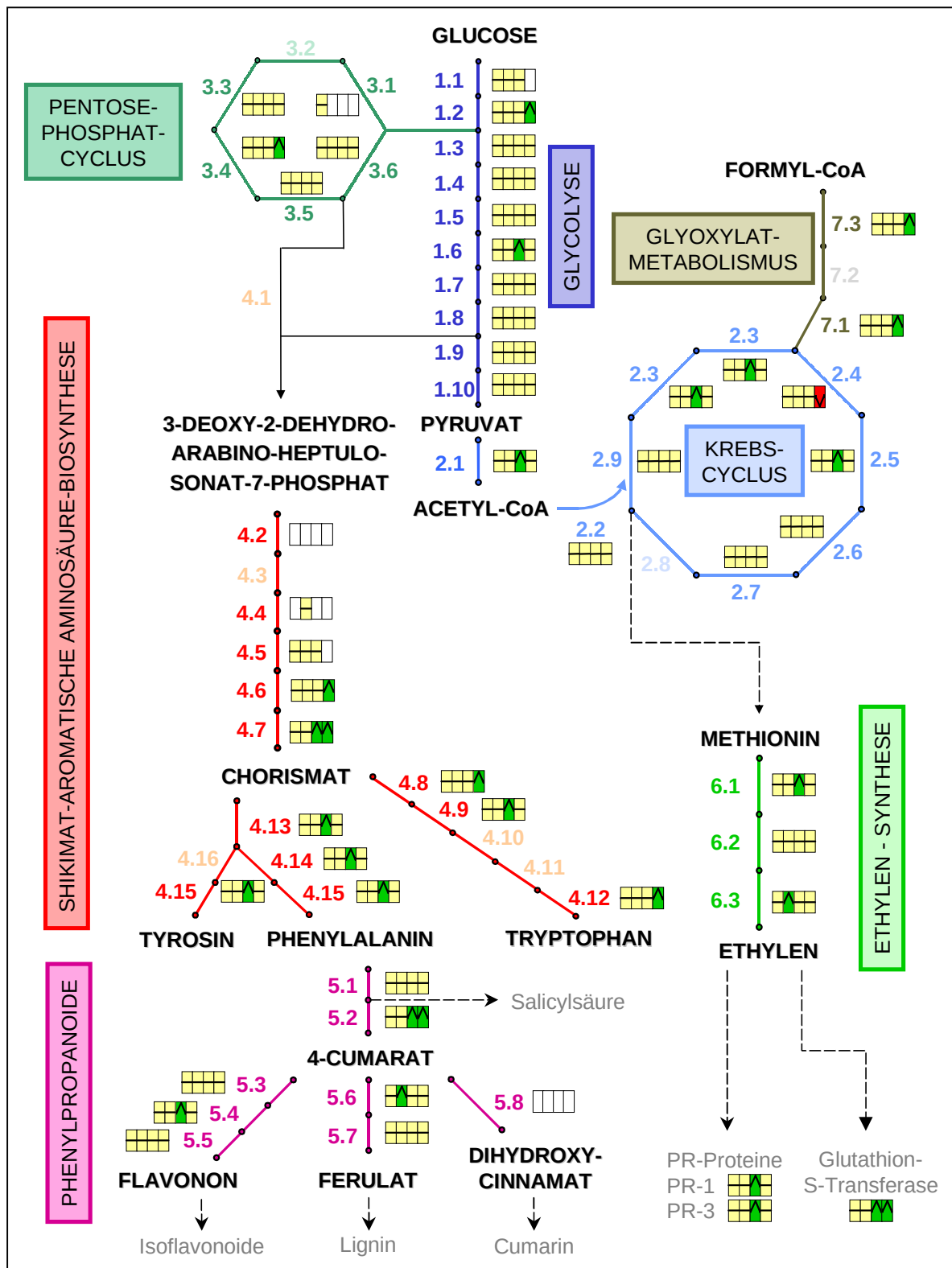


Abb. 3.26: Globale Übersicht über das koordinierte differentielle Transkriptionsmuster der Gene verschiedener Stoffwechselwege. Jeder Stoffwechselweg hat seine eigene Farbcodierung. Biochemische Stoffwechselprodukte werden als Punkte dargestellt. Die Enzyme zur Umsetzung dieser Substrate, werden über eine farbige Enzymnummer definiert und verbinden als farbige Linie Edukt mit Produkt (siehe auch Gen-Nr. und Farbcodierung in Datentabelle 3.5). Die differentielle Transkription zu den Zeitpunkten 0 (10 Min.), 2, 7 und 24 Std., dokumentieren die Zeitfenster

0	2	7	24
---	---	---	----

 (siehe auch Erläuterungen zur Farbcodierung der Zeitfenster auf vorheriger Seite).

Die Abbildung 3.26 läßt erkennen, daß nach Infiltration der Pflanze *Arabidopsis thaliana* mit dem avirulenten Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in den Stoffwechselwegen Glycolyse, Krebs- bzw. Citrat-Cyclus und Pentosephosphat-Cyclus 25 % der Gene transkriptionell aktiviert wurden. Dabei zeigte sich in diesen Stoffwechselwegen keine konzertierte Aktivierung, sondern die differentielle Regulation einzelner Gene, wie die Glucose-6-Isomerase (1.2) in der Glycolyse, die Ribose-6-Phosphat-Isomerase (3.4) im Pentosephosphat-Cyclus und die Aconitase (2.3) im Citrat-Cyclus. Dies bedeutet in diesen Stoffwechselwegen in Bezug auf das Gesamtbild der Genregulation, daß vereinzelt eine aktivierte Genexpression auf Transkriptionsebene stattfand.

Eine interessante Änderung des Stoffwechselverlaufs vom Citrat-Cyclus zum Glyoxylatmetabolismus erkennt man 24 Stunden nach Infiltration an deren Verzweigungspunkt. Dort tritt eine transkriptionelle Deaktivierung der Isocitrat-Dehydrogenase (2.4) auf, die parallel einhergeht mit der Aktivierung des Glyoxylatmetabolismus, beobachtet an einer erhöhten Transkriptionsrate der Isocitrat-Lyase (7.1) und der Oxalyl-CoA-Decarboxylase (7.3). Damit wurde ein Stoffwechselweg aktiviert, der nur in Pflanzen und Bakterien existiert.

Dagegen konnte eine Aktivierung der Transkription von 50 % der Gene in den Stoffwechselwegen Shikimatweg, Phenylpropanoid- und Ethylensynthese festgestellt werden. Eine aktivierte Stoffwechselkaskade beginnt mit der Phosphoshikimat-1-Carboxyvinyl-Transferase (4.6). Es folgt die Chorismat-Synthase (4.7), die vom Zeitpunkt 7 Stunden an bis 24 Stunden nach der Infiltration einen erhöhten Transkriptionsfaktor aufweist. Das dabei entstehende Chorismat ist ein Knotenpunkt, an dem sich die Wege für die Synthese von Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin verzweigen. Alle drei Wege werden deutlich transkriptionell aktiviert. Die Tryptophansynthese wird eingeleitet durch eine kontinuierlich steigende Transkription der Anthranilat-Synthase (4.8) und setzt sich über die Aktivierung der Anthranilat-Phosphoribosyl-Transferase (4.9) bis zur Tryptophan-Synthase (4.12) fort. Die transkriptionelle Aktivierung der Chorismat-Mutase (4.13), die zu Prephenat führt, hat ein der Chorismat-Synthase vergleichbares Profil. Sie bildet den Knotenpunkt für die Tyrosin- und Phenylalaninsynthese. In diesen beiden Synthesewegen ist für den Zeitpunkt 7 Stunden nach Infiltration eine durchgehende Steigerung der Transkription der Enzyme Prephenat-Dehydratase (4.14) und Tyrosin-Aminotransferase (4.15) zu beobachten. Die erhöhte Aktivität der Transkription setzt sich im Phenylpropanoidweg fort. Während die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (5.1) konstitutiv exprimiert bleibt, kommt es für die nachgeschaltete trans-Zimtsäure-

Monooxygenase (5.2) zu einem kontinuierlichen Anstieg der Transkription von 7 Stunden bis 24 Stunden nach der Infiltration. Das aus der trans-Zimtsäure hervorgehende Produkt ist 4-Cumarat, das einen Knotenpunkt für mehrere pflanzliche Abwehrmechanismen darstellt. In dem vom 4-Cumarat gespeisten Syntheseweg zu den Isoflavonoiden beobachtet man für die Chalcon-Synthase (5.4) eine stark erhöhte Transkriptionsrate 7 Stunden nach Infiltration. Der Syntheseweg zur Vorstufe des Lignins, dem Ferulat, und zum Dihydroxycinnamat, weist einen erhöhten Transkriptionsfaktor für die 4-Cumarat-Hydroxylase (5.6) auf.

Weiterhin wird eine verstärkte Produktion von Transkripten beobachtet, die für Enzyme der Ethylensynthese codieren. Dies drückt sich in einer erhöhten Transkriptionsrate schon 2 Stunden nach Infiltration für die 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylat-(ACC)-Oxidase (6.3) und 7 Stunden nach Infiltration für die S-Adenosylmethionin-Synthetase (6.1) aus. Auch für die PR-Proteine PR-1 (1) und PR-3 (2), eine Chitinase, mehrere Glutathion-S-Transferasen (3-5), Kinasen (12-15), Catalasen (16-18) und diverse Peroxidasen (19-27) ist ab 7 Stunden nach Infiltration eine aktivierte Genregulation festgestellt worden.

In Abbildung 3.27 sind für einige Schlüsselgene die Entwicklungsprofile des differentiellen Transkriptionsfaktors für die ersten 24 Stunden nach der Infiltration der Pflanze *Arabidopsis thaliana* mit dem avirulenten Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* dargestellt. Man erkennt z. B. eine lange anhaltende Induktion der Chorismat-Synthase (4.7) als Knotenpunkt im Shikimatweg. Eine stark aktivierte Transkriptionsrate wird für die Chalcon-Synthase (5.4) zur Synthese von Flavonon beobachtet. Eine Induktion der Transkriptionsrate konnte ebenfalls für die S-Adenosylmethionin-Synthetase (6.1) festgestellt werden. Sie ist an der Synthese von Ethylen beteiligt, das als vielfältiges Pflanzenhormon ebenfalls von Interesse ist. Die PR-Gene 1 (1) und 3 (2) sind typische Marker für die Induktion der Pathogenabwehr und weisen ebenfalls eine erhöhte Transkriptionsrate auf, ebenso wie eine Glutathion-S-Transferase (3), die an Detoxifizierungsreaktionen in der Zelle beteiligt ist.

Bei Betrachtung der Transkriptionsprofile in Abbildung 3.27 lassen sich prinzipiell drei verschiedene Aktivierungsmuster erkennen. Die für die Anthranilat-Synthase (4.8) und trans-Zimtsäure-Monooxygenase (5.2) codierenden Gene weisen eine kontinuierlich ansteigende Transkriptionsrate innerhalb der ersten 24 Stunden nach Pathogeninfektion auf. Die Gene für Chorismat-Mutase (4.13), Chalcon-Synthase (5.4), PR-1 (1), PR-3 (2) und S-Adenosylmethionin-Synthetase (6.1) zeigen eine maximale Transkriptionsrate bei 7 Stunden, die

anschließend wieder abfällt. Das dritte Transkriptionsmuster mit einem Anstieg der Transkriptionsrate bei 7 Stunden nach Pathogeninfektion auf ein erhöhtes Niveau, das auch nach 24 Stunden noch vorliegt, zeigen die Chorismat-Synthase (4.7) und eine Glutathion-S-Transferase (3).

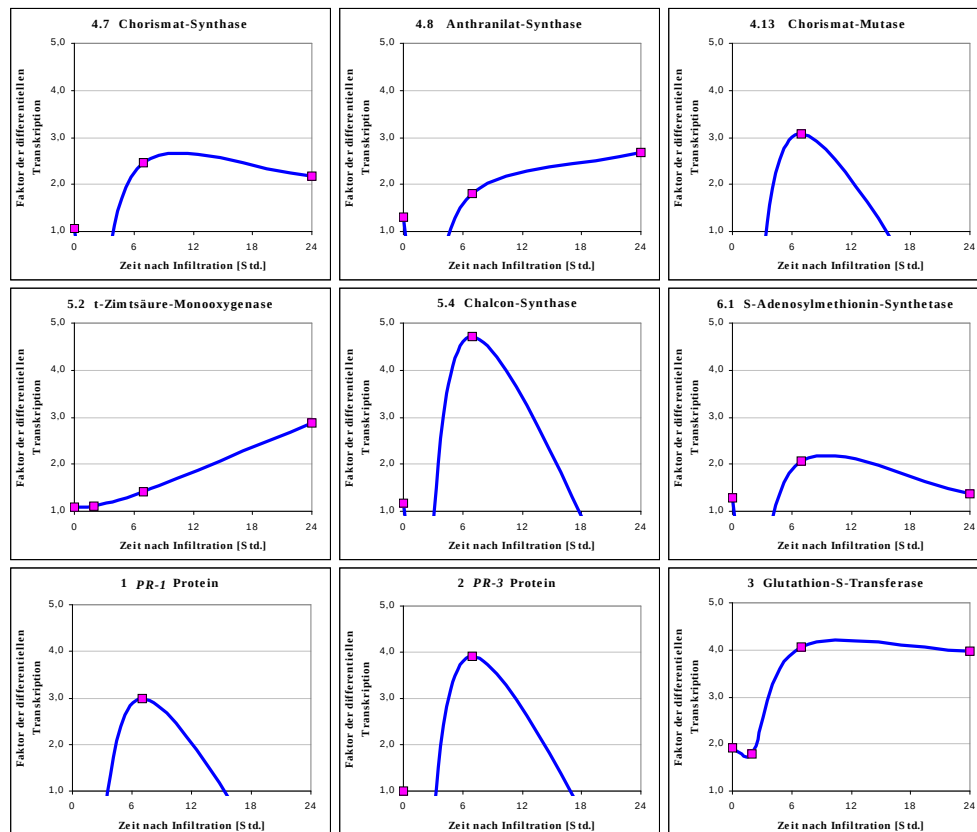


Abb. 3.27: Verlauf der Transkriptionsrate einiger Schlüsseldene innerhalb der ersten 24 Stunden nach Infiltration der Pflanze *Arabidopsis thaliana* mit dem avirulenten Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Dazu zählen im Shikimatweg die Chorismat-Synthase (4.7), Anthranilat-Synthase (4.8), Chorismat-Mutase, im Phenylpropanoidsyntheseweg die trans-Zimtsäure-Monooxygenase (5.2), Chalcon-Synthase (5.4), für die Ethylensynthese die S-Adenosylmethionin-Synthetase (6.1), als Marker für die Pathogenabwehr die Proteine PR-1 (1) und PR-3 (2), und eine Glutathion-S-Transferase (3).

Diese Resultate geben eine Übersicht über die differentielle Transkription von Genen für die Induktion der Pathogenabwehr der Pflanze *Arabidopsis thaliana* und deuten darauf hin, daß es sich um ein koordiniertes regulatorisches Netzwerk handelt, das nicht nur einzelne Gene, sondern ganze Stoffwechselwege umfaßt.

IV. Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 cDNA-Bibliothek der Pflanze *Arabidopsis thaliana* als Resource zur Herstellung genomischer DNA-Arrays

Dem Modellsystem *Arabidopsis thaliana* kommt in der Pflanzengenomforschung eine Schlüsselposition zu. Für *Arabidopsis thaliana* existiert die drittgrößte Sammlung von EST-Sequenzen, nur kleiner als die der Modellorganismen Mensch und Maus (**Ruan et al. 1998**). Die systematische EST-Sequenzierung von cDNAs war ein ausgesprochen erfolgreicher Ansatz zur Erfassung von Sequenzen exprimierter Gene, die einer signifikanten Zahl an EST-Klonen die Annotation möglicher Funktionen erlaubte (**Höfte et al. 1993, Newman et al. 1994**). Die Größe der cDNA-Insertionen betrug 500 bis 2.500 Basenpaare, die einer PCR-Amplifikation unmittelbar zur Verfügung standen. Dies waren Eigenschaften der cDNA-Bibliothek der Pflanze *Arabidopsis thaliana*, die ihren Einsatz zur Entwicklung genomischer DNA-Arrays prädestinierte.

Eine wesentliche Voraussetzung für die Entwicklung und Herstellung genomischer DNA-Arrays der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* im Rahmen dieser Arbeit war die Existenz und Verfügbarkeit verschiedener cDNA-Bibliotheken für die bestmögliche Abdeckung aller Gene dieses Organismus. Eine kleine Auswahl von 500 cDNA-Klonen der λ PRL2-Bibliothek stand zu Beginn dieser Arbeit zur Verfügung, weitere 1.300 cDNA-Klone aus Versailles komplettierten nach 16 Monaten den Bestand auf vorläufig 1.800 cDNA-Klone. Erst zwei Jahre nach Beginn dieser Arbeit standen unter Einsatz von Projektmitteln in Höhe von 20.000,- DM auch die drei nordamerikanischen Subbibliotheken mit insgesamt 12.000 cDNA-Klonen zur Verfügung. Diese cDNA-Gesamtbibliothek, die damit für diese Arbeit zur Verfügung stand, enthielt vier Subbibliotheken, die insgesamt 13.800 cDNA-EST-Klone umfaßte (siehe auch Kapitel 2.1.8). Die cDNA-Klone wurden aufgrund der EST-Sequenzen zu einer redundanz-reduzierten cDNA-Bibliothek zusammengestellt. Wenn das Genom der Pflanze *Arabidopsis thaliana* ca. 20.000 Gene enthält, dann repräsentierte damit der genomische *Arabidopsis*-Array über 50 % aller Gene dieses Organismus (**Meinke et al. 1998**).

Man spricht von einer redundanz-reduzierten cDNA-Bibliothek, da die EST-Sequenz eines cDNA-Klons nicht die gesamte Sequenz, sondern nur eine Teilsequenz der cDNA-Insertion zur Verfügung stellt. Damit bleibt offen, ob EST-Klone mit hoher, aber nicht identischer Sequenzhomologie zum gleichen Gen gehören und damit redundant wären, oder ob sie verschiedene Mitglieder einer Genfamilie repräsentieren und damit die Vielfalt im Genom zum Ausdruck kommt. Diese Frage lässt sich wohl erst nach Veröffentlichung der kompletten genomischen Sequenz von *Arabidopsis thaliana* abschließend beantworten.

Eine besondere Sorgfalt beim Umgang mit Bakterien aller Art, insbesondere aber der Handhabung großer Klonbibliotheken ist in Bezug auf das Risiko von Kreuzkontaminationen notwendig. Daher wurden mehrere Kopien der cDNA-Bibliothek angelegt, um diesem Risiko vorzubeugen. Eine weitere Voraussetzung für die Vermeidung von Kreuzkontaminationen war die Replikation der Klone mit Hilfe des Roboters "Biogridder" (BioRobotics Inc., Cambridge, England). Dieser Roboter erlaubte die Änderung des Formates der cDNA-Bibliothek von ursprünglich 96er auf 384er Mikrotiterplatten. Damit konnte Zeit und Platz gespart werden und gleichzeitig die Kompatibilität zwischen Klon- und PCR-Amplifikationsformat gewährleistet werden.

4.1.2 PCR-Amplifikation von cDNA-Insertionen im Hochdurchsatz für die Herstellung von DNA-Arrays

Die zur Zeit am häufigsten eingesetzten Detektormoleküle, die für die Herstellung von DNA-Arrays auf einem festen Träger immobilisiert werden, sind DNA-Fragmente von cDNA-Klonkolonien, PCR-Produkte von cDNA-Insertionen oder direkt von genomischer DNA. Die Anwesenheit großer Mengen von *E. coli*-DNA als Teil der trägergebundenen DNA von Klonkolonien stellt bei der Genexpressionanalyse ein Problem aufgrund spezifischer und unspezifischer Interaktionen mit der Sonde dar. Dies hat einen signifikanten Anstieg der Hintergrundintensität zur Folge und erschwert damit die Analyse seltener Transkripte mit geringer Signalintensität. Durch Verwendung von PCR-Produkten auf DNA-Arrays können solche Probleme verhindert werden (**Hauser et al. 1999**).

Die Anwendung von PCR-Produkten für die Herstellung von DNA-Arrays wurde auch durch das Fehlen von Hochdurchsatztechniken für die Plasmidpräparation eine notwendige Voraussetzung

für die genomweite Genexpressionsanalyse. Auch eine Probenaufreinigung gewährleistete die PCR-Amplifikation. Daher wurde die PCR-Amplifikation im Hochdurchsatz für anfänglich parallel 96 Proben, später sogar für 384 Proben entwickelt und routinemäßig angewendet (siehe Kapitel 2.2.2.2 und 2.2.2.3). Da mit dem Protokoll für die 96er PCR-Amplifikation kein PCR-Produkt in der 384er PCR-Amplifikation nachgewiesen werden konnte, mußte das PCR-Protokoll modifiziert werden. Ein Grund liegt vermutlich in der besseren Temperaturdurchdringung der Probenansätze in der 384er PCR-Amplifikation bei Reaktionsvolumina von nur 25 µl anstelle von 100 µl bei der 96er PCR-Amplifikation. Zu den Modifikationen gehörte zum einen die Verkürzung der Denaturierungsschritte sowie deren Temperaturabsenkung um 2 °C. Weiterhin waren die 384er PCR-Platten flacher, so daß die Deckeltemperatur einen stärkeren Einfluß auf die Reaktionstemperatur in der Probe hatte. Daher wurde die Deckeltemperatur von 105 °C in der 96er PCR auf 85 °C in der 384er PCR abgesenkt. Eine weitere Protokollmodifikation war eine Zugabe von Glycerin mit einer Endkonzentration von 10 %. Damit konnte eine Steigerung der PCR-Produktausbeute erzielt werden. Die Ursache dafür sind vermutlich Sekundärstrukturen der DNA, die durch Glycerin vermindert werden konnten (**Newton und Graham 1995**). Speziell die Hochdurchsatz-PCR-Amplifikation in PCR-Platten für parallel 384 Proben machte den aufwendigen Arbeitsschritt des Umpipettierens von 13.800 PCR-Ansätzen aus 145 x 96er in 36 x 384er Mikrotiterplatten für die DNA-Array-Herstellung überflüssig. Dadurch konnte das mögliche Auftreten von Pipettierfehlern sowie das Risiko von Kreuzkontaminationen deutlich verringert werden. Darüber hinaus sparte es Zeit und Aufwand.

Die Größe der cDNA-Insertionen von 500 bis 2.500 Basenpaaren erlaubte eine PCR-Amplifikation im Hochdurchsatz ohne zusätzliche Protokollspezifikationen für die Amplifikation besonders langer cDNA-Fragmente. Eine weitere Vereinfachung der PCR-Amplifikation stellte die Animpfung der PCR-Ansätze mit einem Aliquot der Klon-Kultur dar, so daß auf eine Plasmidpräparation von 13.800 cDNA-Klonen verzichtet werden konnte.

Für eine spätere qualitative Kontrolle der DNA-Arrays wurde bei der PCR-Amplifikation berücksichtigt, daß jede amplifizierte cDNA eine universelle Sequenz beinhaltete, die vom Vektor des jeweiligen *E. coli*-Klons stammte. Diese universelle Sequenz entsprach der T7-Promotorsequenz (siehe Kapitel 2.2.2.2). Dies konnte sowohl mit den Primern T3, SP6 und T7 in der 96er PCR als auch mit den EST-Primern für die 384er PCR-Amplifikation erzielt werden.

4.1.3 Herstellung genomischer *Arabidopsis*-Arrays

Für die Herstellung der genomischen DNA-Arrays von *Arabidopsis thaliana* fand der Roboter "Biogridder" (BioRobotics Inc., Cambridge, England) Verwendung (siehe Kap. 2.2.3.1). Dieser Roboter arbeitete nach dem Kontakt-Verfahren und erlaubte mit der parallelen Übertragung von 384 Proben einen hohen Probendurchsatz. Er ermöglichte es, die große Zahl von PCR-Produkten mit hoher Präzision in einem definierten Raster hoher Dichte von etwa 80 Spots/cm² reproduzierbar auf einem festen Träger abzulegen (**Hauser et al. 1998**). Dabei war von entscheidender Bedeutung die Zuordnung und Verknüpfung der Spotposition mit der Mikrotiterplatte und der Position des cDNA-Klons, über dessen Klon- bzw. EST-Identifikation die Sequenzinformation und Annotation definiert war, und über die auch eine weitergehende Datenbankrecherche durchgeführt werden konnte. Diese Zuordnung wurde durch ein Spotraster mit zwei Ebenen gewährleistet, wie es in Kapitel 2.2.3.2 beschrieben ist. Das Auftragen der PCR-Produkte im Duplikat erlaubte bei der Auswertung der Signalintensitäten den Ausschluß von Artefakten.

Bei der Auswahl des festen Trägers wurden zwei Arten von Polymermembranen untersucht: Nylon und Polypropylen. Diese Membranen besitzen eine poröse, 3-dimensionale Struktur und erlauben daher eine hohe Ladekapazität, die zu einem besseren Signal/Hintergrund-Verhältnis führt. Durch die Fixierung auf dem festen Träger wird eine mehrfache Wiederverwendbarkeit gewährleistet (**van Hal et al. 2000**). Dies bietet zwei Vorteile: zum einen kann dadurch der hohe Aufwand für die DNA-Array-Produktion in Grenzen gehalten werden, zum anderen erlaubt die Verwendung des identischen DNA-Arrays oder zumindest von DNA-Arrays aus dem gleichen Produktionslauf den Ausschluß von Variationen, die durch die Filterproduktion entstehen (**Beißbarth et al. 2000**).

4.1.4 Northern Blot: eine Technik zur Analyse der Genexpression

Der Northern Blot ist eine der zur Verfügung stehenden Techniken zur Analyse der Genexpression (siehe Kap. 2.2.4). Mit dieser Methode können Vergleiche über die relative Häufigkeit bestimmter RNA-Spezies in verschiedenen Zelltypen durchgeführt werden. Dazu wird RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und durch Hybridisierung spezifischer Sonden quantitativ bestimmt (**Alwine et al. 1977, Maniatis et al. 1982**).

Zwei charakteristische Eigenschaften der RNA erfordern eine besondere Behandlung. Zum einen ist RNA sehr anfällig gegenüber den RNA-abbauenden RNasen, die endogen wie exogen vorkommen und extrem stabil sind, so daß sie selbst durch Kochen nicht inaktiviert werden. Daher ist steriles Arbeiten besonders wichtig und verwendete Lösungen werden üblicherweise mit Diethylpuyrocarbonat (DEPC), einem Inhibitor für RNasen, behandelt und autoklaviert. Zum anderen bildet RNA als einzelsträngige Nucleinsäure intra- und intermolekulare Basenpaarungen aus, die zu Sekundärstrukturen und einer Aggregation von RNA führen. Um dies zu vermeiden, werden Denaturierungsreagenzien wie Formamid und Formaldehyd eingesetzt. Formamid bricht die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaarungen auf, so daß Formaldehyd kovalente Bindungen mit den Basen eingehen kann. Außerdem unterstützt Formaldehyd die Inaktivierung von RNasen, da es mit Proteinen Quervernetzungen eingeht. MOPS und Natriumacetat, Bestandteile des Puffers, puffern das Gel. EDTA komplexiert zweiwertige Ionen und inhibiert damit Nucleasen. Mit Hilfe des interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid wird die RNA im Gel angefärbt, wenn auch schwächer als doppelsträngige DNA. Somit kann die RNA im Gel vor dem Transfer auf die Membran als auch nach dem Transfer mittels Kapillarkräften auf der Membran nachgewiesen werden (**Darling und Brickell 1996**).

Diese Methode hat jedoch durch aufwendige Arbeitsschritte den Nachteil, nicht als Hochdurchsatztechnik anwendbar zu sein. Sie ermöglicht aber, in Einzelfällen DNA-Array-basierende Ergebnisse zu validieren.

4.1.5 Molekularbiologische Herstellung heterologer mRNA-Kontrollen als externer Standard

Für die Markierung komplexer RNA-Sonden fand üblicherweise die reverse Transkription mittels eines dT₁₈-Oligomers Anwendung (siehe Kap. 2.2.9.3). Um Variationen in der reversen Transkription, Probenaufreinigung, Hybridisierung und Exposition für die Bestimmung des differentiellen Transkriptionsfaktors zwischen zwei Experimenten kontrollieren zu können, mußte zuvor eine Kontroll-RNA mit der gleichen Struktur zugesetzt werden, d.h. eine ebenfalls polyadenylierte RNA, die eine zu dem zu untersuchenden Organismus *Arabidopsis thaliana* heterologe Sequenz besitzt, um Kreuzhybridisierungen zu vermeiden. Ein solcher externer Standard wurde erstmals 1996 von Catherine Nguyen beschrieben (**Bernard et al. 1996, Hauser**

et al. 1998). In Abbildung 4.1 ist die Markierung von cDNA durch reverse Transkription von RNA dargestellt.

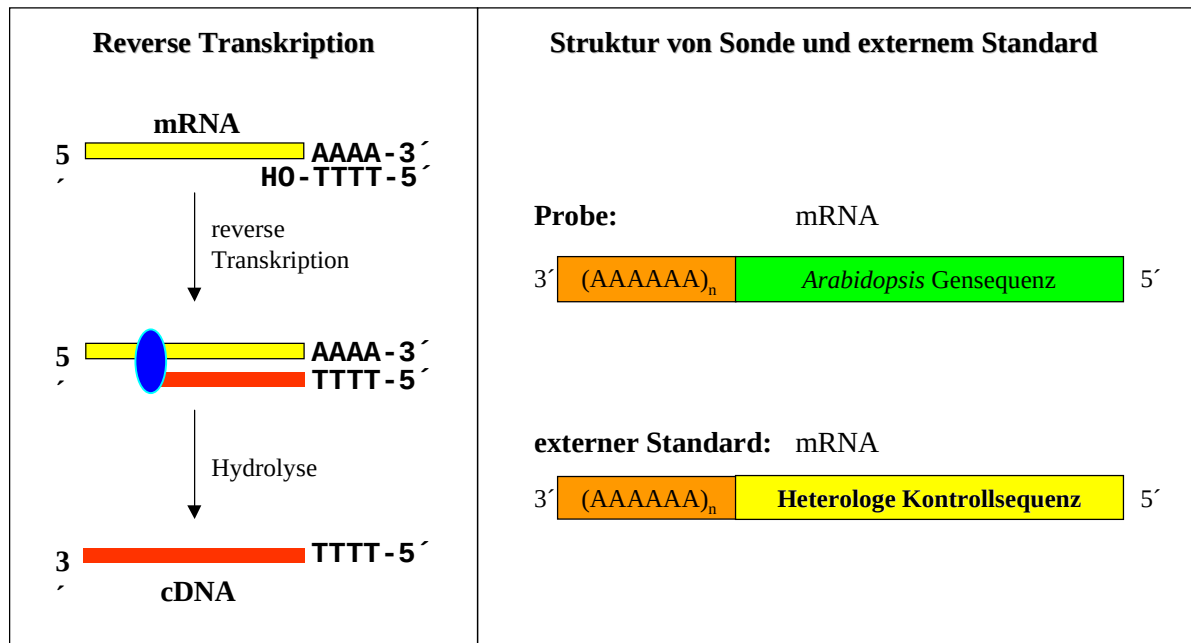


Abb. 4.1: Die Herstellung einer Sonde erfolgte mittels reverser Transkription von RNA mit einem dT₁₈-Oligomer und dem Enzym „Reverse Transkriptase“. Durch Hydrolyse der RNA erhält man die cDNA-Sonde (links). Um auf die gleiche Weise und im identischen Ansatz einen externen Standard zu markieren, muß der externe Standard wie die Probe über eine polyA-Sequenz am 3'-Ende verfügen (rechts).

Bis auf die kommerziell erhältliche mRNA von α - und β -Globin des Kaninchens stand keine spezifische Sequenz als polyadenylierte RNA zu Verfügung. Damit war für den Einsatz mehrerer heterologer Kontrollsequenzen als externer Standard für die Bestimmung der differentiellen Transkription die molekularbiologische Herstellung polyadenylierter RNA-Moleküle notwendig, deren Sequenzen orthogonal zum Genom der Pflanze *Arabidopsis thaliana* sein sollten (siehe Kapitel 2.2.5).

Die Kontrollen wurden auf ihre heterologe Sequenz hin geprüft, indem sie auf genomische *Arabidopsis*-DNA hybridisiert wurden und kein Signal aufwiesen. Dafür wurden Sequenzabschnitte der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* verwendet. Der Grund dafür lag in der Verfügbarkeit der spezifischen Primerpaare für die PCR-Amplifikation eines jeden offenen Leserasters der Hefe im Rahmen des "European Functional Analysis Network" (EUROFAN). Die für die PCR-Amplifikation notwendige genomische Hefe-DNA wurde freundlicherweise von Nicole Hauser zur Verfügung gestellt (Hauser et al. 1998).

Zur Herstellung von Kontroll-mRNAs wurde der Vektor *pBluescript II SK+* zuerst durch den Verdau mit den Restriktionsendonucleasen EcoRI und HindIII linearisiert. Es schloß sich eine Dephosphorylierung der 5'-Enden an, um eine Religation ohne Insertion zu vermeiden. Ein durch Hybridisierung von zwei komplementären Einzelsträngen hergestelltes, doppelsträngiges DNA-Fragment poly (A-T)₅₀, das passend zur Klonierungsstelle des Vektors entsprechende überstehende 5'-Enden besaß, wurde in die Restriktionsschnittstelle EcoRI-HindIII des Vektors ligiert. Dieses Vektorkonstrukt I mußte für die weitere Verwendung in größerer Mengen produziert werden. Dazu wurde das Vektorkonstrukt mittels Elektroporation, d. h. mit einem kurzen elektrischen Impuls, in *E. coli*-Zellen transformiert. Als genetischer Selektionsmarker dienten die Ampicillinresistenz und die Insertionsinaktivierung der β -Galactosidase, die die blau/weiß-Selektion ermöglichte. Dabei macht man sich zum einen zunutze, daß der *E. coli*-Klon durch das neue Vektorkonstrukt auf Ampicillin-haltigen Nährböden wachsen kann. Zum anderen wurde durch die gezielte Insertion der heterologen Kontrollsequenz im Vektorkonstrukt die codierende Sequenz für das Enzym β -Galactosidase zerstört. Dadurch ist es diesen Zellen nicht mehr möglich, die farblose Chemikalie X-Gal in ein Indoxyl-Derivat zu spalten, das an der Luft zum blauen Dibrom-dichlor-Derivat oxidiert (Nitcholl et al. 1995).

Einige weiße Kolonien konnten auf das Vorhandensein des Vektorkonstruktes untersucht und anschließend in einer Kultur vermehrt werden, um durch eine Plasmidpräparation ausreichende Mengen des Vektors mit dem integrierten poly (A-T)₅₀ -Fragment zu erhalten. Die Abbildung 4.2 stellt schematisch die molekularbiologische Herstellung des Vektorkonstruktes I, *pBluescript II SK+* mit dem integrierten poly (A-T)₅₀ -Fragment, dar.

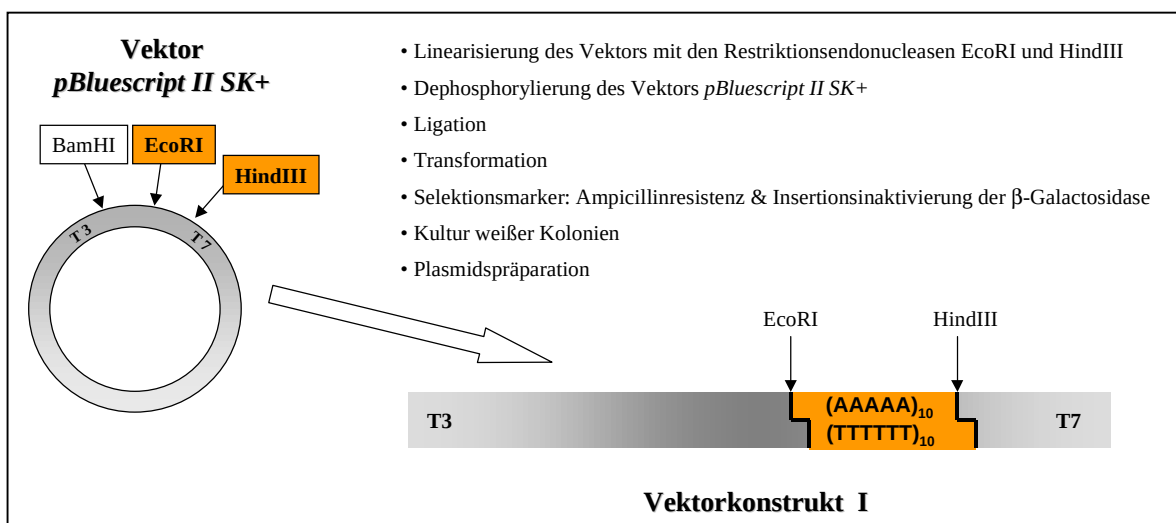


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der molekularbiologischen Herstellung ausreichender Mengen des Vektorkonstruktes I. Über die angegebenen Schritte (siehe auch Kap. 2.2.5) wird ein poly (A-T)₅₀ -Fragment in die Restriktionsschnittstelle EcoRI - HindIII inseriert.

In einem zweiten Klonierungsschritt konnten diese definierten heterologen Kontrollsequenzen in das zuvor beschriebene Vektorkonstrukt I mit dem poly (A-T)₅₀-Fragment integriert werden. Dazu ist das Vektorkonstrukt I durch den Verdau mit den Restriktionsendonucleasen BamHI und EcoRI linearisiert und mit Hilfe der alkalischen Phosphatase dephosphoryliert worden. Die heterologen Kontrollsequenzen wurden ebenfalls mit diesen Restriktionsendonucleasen behandelt, um die zum Vektor passenden überstehenden 5'-Enden zu erzeugen. Diese konnten dann in den Vektor ligiert und das neue Vektorkonstrukt II wiederum mittels Elektroporation in *E. coli*-Zellen transformiert werden. Eine Auswahl weißer Kolonien wurde kultiviert und nach PCR-Amplifikation der Klonierungsstelle auf das Vorhandensein der Insertion überprüft. Die Abbildung 4.3 stellt die Herstellung des zweiten Vektorkonstruktes schematisch dar.

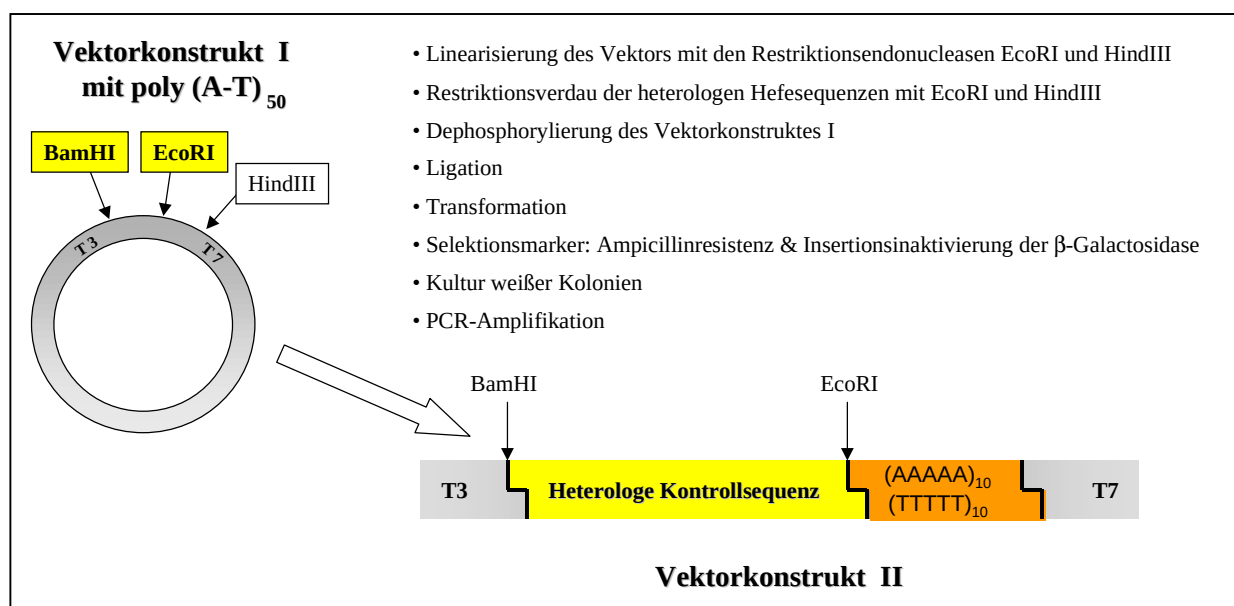


Abb. 4.3: Schematische Darstellung der molekularbiologischen Herstellung ausreichender Mengen des Vektorkonstruktes II. Über die angegebenen Schritte (siehe auch Kap. 2.2.5) erfolgte die Insertion einer zu *Arabidopsis* heterologe Sequenz in die Restriktionsschnittstelle BamHI - EcoRI.

Dieses Vektorkonstrukt II konnte für 7 heterologe Kontrollsequenzen hergestellt werden. Damit war es möglich, mittels *In vitro* Transkription polyadenylierte RNA-Kontrollen herzustellen, die der komplexen RNA aus dem zu untersuchenden Gewebe vor der Sondenmarkierung zugesetzt werden konnten. Eine alternative Methode, die zur Herstellung externer Kontrollen von einer PCR-Amplifikation der Kontrollsequenz Primer verwendet, die am 5'-Ende eine T7-Promotersequenz für die Anreicherung des Transkripts und am 3'-Ende eine (A)₃₀-Sequenz für die reverse Transkription tragen, wurde 1999 erstmals beschrieben (**Eickhoff et al. 1999**). Sie bietet die Möglichkeit, externe Kontrollen schneller herzustellen, aber die Gefahr der unspezifischen PCR-Amplifikation aufgrund der langen Primersequenz ist sehr hoch.

4.1.6 Gewebeproben der Pflanze *Arabidopsis thaliana*

Proben verschiedener Gewebe der Pflanze *Arabidopsis thaliana* wurde freundlicherweise von nationalen und internationalen Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt (siehe Kapitel 2.2.6). Sie wurden, wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben, angezüchtet, unmittelbar nach der Ernte in flüssigem Stickstoff eingefroren und, in Trockeneis verpackt, zugesandt. Im Labor wurden sie bei - 70 °C gelagert und bei Bedarf für die RNA-Isolation aufgetaut. Die RNA konnte im direkt eingefrorenen Gewebe über längere Zeiträume als im freien Zustand gelagert werden. Eine entscheidende Voraussetzung für die Qualität der RNA war eine von der Ernte des Gewebes bis zum Einsatz der RNA in die reverse Transkription reichende, ununterbrochene Kühlkette.

4.1.7 Isolation von DNA aus der Pflanze *Arabidopsis thaliana*

Für die Isolation von DNA aus Gewebe von *Arabidopsis thaliana* müssen Zellwand und Zellmembran aufgebrochen werden. Die Zellwand wird durch mechanische Kräfte mittels Mörser zerstört. Die Zell- wie auch Kernmembran werden durch Detergentien wie Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) aufgelöst. Ist die DNA aus den Zellen freigesetzt, muß sie vor endogenen Nucleasen geschützt werden. Dazu wird üblicherweise solange mit dem Auftauen gewartet, bis der Extraktionspuffer, der das Detergens und eine hohe Konzentration von EDTA beinhaltet, zugegeben wurde (**Martínez-Zapater und Salinas 1998**). Die weitere Aufreinigung der genomischen DNA von *Arabidopsis thaliana* erfolgte nach einem von Janice Keller und Ian Bancroft modifizierten Protokoll (siehe Kapitel 2.2.7). Mit Lithiumacetat trennte man durch Präzipitation der einzelsträngigen RNA die doppelsträngige DNA ab, die weiter in Lösung blieb. Die erhaltene DNA konnte bei - 20 °C für mehrere Monate gelagert werden. Aus *Arabidopsis thaliana* gewonnene DNA wurde hauptsächlich für Kontrollhybridisierungen eingesetzt.

4.1.8 Isolation von RNA aus der Pflanze *Arabidopsis thaliana*

RNA besteht zu mindestens 95 % aus ribosomaler RNA und bis zu 5 % aus polyadenylierter mRNA. Die Präparation qualitativ hochwertiger, d. h. nichtdegraderter mRNA aus Gewebeproben ist die erste Stufe der Genexpressionsanalyse. Sie verbindet die experimentelle Beeinflussung des lebenden Systems mit der nachfolgenden Analyse der induzierten Effekte durch molekularbiologische Methoden. Die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* bietet geradezu ideale Voraussetzungen für die Genexpressionsanalyse. Große Mengen an Pflanzenmaterial sind durch die günstigen Anzuchtbedingungen der Pflanze leicht zugänglich (**Martínez-Zapater und Salinas 1998**).

Verschiedene Methoden zur Isolation von Gesamt-RNA und poly(A)⁺-mRNA standen zur Verfügung. Dabei wurde entweder von Gesamt-RNA oder von Gewebe ausgegangen. Die folgende Abbildung 4.4 stellt die verschiedenen Methoden zur Isolation von RNA vor.

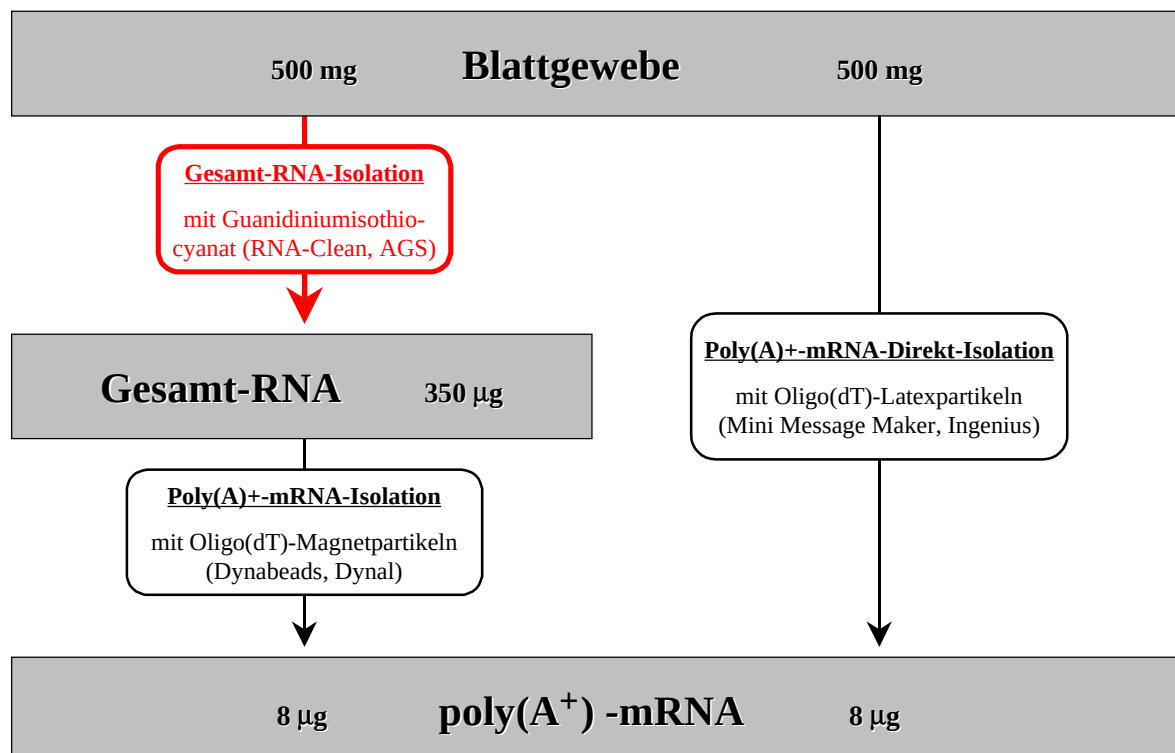


Abb. 4.4: Methoden zur Isolation von Gesamt-RNA und poly(A)⁺-mRNA. Die Isolation von poly(A)⁺-mRNA kann über eine Gesamt-RNA-Isolation als Zwischenschritt oder direkt aus Gewebe erfolgen.

Mit dem 'RNA-Clean Kit' (AGS, Heidelberg) nach der Methode von Chirgwin konnten mit Guanidiniumisothiocyanat als denaturierendem Reagenz, wie in Kapitel 2.2.8 beschrieben, ausreichende Mengen an Gesamt-RNA aus verschiedenen Gewebeproben isoliert werden

(Chirgwin et al. 1979, Chomczynski und Sacchi 1987). Eine Präzipitation mit Isopropanol und anschließend mit Lithiumchlorid ermöglichte schnell und effizient die Aufreinigung qualitativ hochwertiger RNA, die in der nachfolgenden cDNA-Erststrangsynthese mittels reverser Transkription hohe Einbauraten erlaubte.

Die Isolation von polyadenylierter mRNA, die etwa 1-5 % der Gesamt-RNA ausmacht, konnte über zwei Methoden erreicht werden. Mit Hilfe magnetischer Partikel (Dynabeads von Dynal, Hamburg), an deren Oberfläche Oligo(dT) gebunden war, konnte aus Gesamt-RNA angereicherte Poly(A)⁺-mRNA mit einer Ausbeute von 3 % isoliert werden. Dies erforderte allerdings einen weiteren Aufreinigungsschritt nach der Gesamt-RNA-Isolation. Eine Poly(A)⁺-mRNA-Isolation direkt aus Gewebe konnte nach Zellaufschluß mit Hilfe von Oligo(dT)-Latexpartikeln (Ingenius, Wiesbaden) mit der gleichen Ausbeute durchgeführt werden. Diese Methode war aber nur auf kleine Gewebemengen adaptiert und daher nicht flexibel einsetzbar. Bei der Anwendung der verschiedenen RNA-Isolate mit einem Reinheitsgrad von OD_{260/280} 1,9 bis 2,0 für die Markierung und Hybridisierung waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen, so daß für alle weiteren Versuche die schnelle, effiziente und auf verschiedene Gewebemengen adaptierbare Methode nach Chirgwin zur Gewinnung qualitativ hochwertiger Gesamt-RNA, die die polyadenylierte mRNA enthält, zur Anwendung kam (siehe Kap. 2.2.8).

Es konnten in Abhängigkeit vom Gewebetyp unterschiedliche Ausbeuten erzielt werden. Die Tabelle 4.1 stellt die RNA-Ausbeute für einige Gewebe vor.

Gewebe 100 mg	Gesamt-RNA-Ausbeute µg
Blatt	72
Callus	250
Stamm	78
Sprosse	140
Wurzel	24

Tab. 4.1: Ausbeute von RNA-Isolationen aus verschiedenen Gewebe von *Arabidopsis thaliana*. Man erkennt große Variationen in der Ausbeute in Abhängigkeit vom eingesetzten Gewebe.

Die Tabelle 4.1 verdeutlicht, wie stark die Ausbeute vom jeweiligen Gewebetyp abhängt. So läßt sich aus Callus- und Sprossengewebe wesentlich mehr Gesamt-RNA gewinnen als aus Blatt-, Stamm- und Wurzelgewebe.

4.1.9 Herstellung von DNA-Sonden für die Hybridisierung auf DNA-Arrays

Die DNA-Sonden wurden üblicherweise mit dem radioaktiven ^{33}P markiert. Ausnahmen wurden bei der Hybridisierung auf Northern Blots mit ^{32}P und bei der Fluoreszenzmarkierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 gemacht.

Die Markierung von DNA-Oligonucleotiden durch 5'-OH-Phosphorylierung mit Hilfe der T4-Polynucleotid-Kinase konnte routinemäßig bei einer Einbaurate von 90 % durchgeführt werden (siehe Kapitel 2.2.9.1).

Die Markierung von DNA-Fragmenten größer als 100 Bp durch 'Random Hexamer Priming' erlaubte typische Einbauraten von 80 % (siehe Kapitel 2.2.9.2). Damit war es möglich, durch Einbau mehrerer Markierungsbausteine die spezifische Aktivität der Sonde zu erhöhen.

Eine sehr effiziente Methode für die Herstellung von DNA-Sonden ist die cDNA-Erststrangsynthese mittels reverser Transkription von RNA. Sie hatte einen entscheidenden Einfluß auf die Qualität der Ergebnisse aus der DNA-Array-Hybridisierung (siehe Kapitel 2.2.9.3) (**Hauser et al. 1999**). Sie erforderte frisch aufgereinigte, nicht degradierte RNA mit einem $\text{OD}_{260/280}$ -Verhältnis von 1,9 bis 2,0. Weiterhin war von entscheidender Bedeutung das Enzym 'Reverse Transkriptase'. Beim Vergleich der 'Reversen Transkriptase' verschiedener Hersteller ergab die 'Superscript RT II' von Gibco Life Technologies (Karlsruhe) die höchsten Einbaurate von 50 bis 90 %. Die reverse Transkription ermöglichte es ebenfalls, durch Inkorporation mehrerer Markierungsbausteine die spezifische Aktivität der Sonde zu erhöhen und damit das Signal/Hintergrund-Verhältnis positiv zu beeinflussen (**Nguyen et al. 1995**).

Die Bestimmung der Einbaurate von Radionucleotiden erfolgte über die Bestimmung des Verhältnisses von inkorporierter zu eingesetzter Radioaktivität (siehe Kapitel 2.2.9.4). Die Bestimmung durch Präzipitation des cDNA-Pellets ergab eine Einbaurate, die systematisch etwa 5 % über der Bestimmung mit der Ausfällung auf Glasfaserfiltern lag. Diese höher gemessene Einbaurate läßt sich damit erklären, daß bei der Ausfällung des cDNA-Pellets noch nicht inkorporierte Radionucleotide mitgerissen wurden, während die Methode mit den Glasfaserfiltern dies durch mehrmaliges Waschen vermied.

4.1.10 Hybridisierung, Exposition und Regeneration der genomischen *Arabidopsis*-Arrays

Für Hybridisierungen auf DNA-Arrays werden im allgemeinen Church- und Ssarc-Puffer verwendet (siehe Kapitel 2.2.10). Beide Puffer enthielten eine Konzentration von mindestens 0,5 M Natriumionen, die als monovalente Kationen die sich bildenden DNA-Doppelstränge stabilisieren. Beim Waschpuffer setzte man diese Konzentration auf 40 mM herab, um die Stringenz zu erhöhen und damit die Basenfehlpaarungen zu minimieren. Daher wurde beim Regenerationspuffer die Natriumionenkonzentration noch einmal drastisch auf 5 mM reduziert. Natriumdodecylsulfat (SDS) und Natriumlauroylsarcosinat (SLS) erleichtern als benetzendes Mittel das Eindringen der Sonde in die Membran und beschleunigen damit die Hybridisierungsgeschwindigkeit. Der Unterschied in der Verwendung beider Substanzen liegt darin, daß SDS unter 18 °C ausfällt, so daß es bei Oligonucleotid-Hybridisierungen durch SLS ersetzt wird. Bei der Verwendung komplexer cDNA-Sonden, die länger als 100 Bp sind, wird eine Vorhybridisierung mit tRNA durchgeführt, um die Hybridisierung der Sonde mit unspezifischen Sequenzen zu vermeiden (**Hoheisel et al. 1991, Leitch et al. 1994, Cheung et al. 1999**). Mit der hohen Hybridisierungstemperatur von 65 °C für komplexe Sonden mit einer Länge von bis zu 2.000 Bp wird zum einen eine hohe Stringenz bei der Bildung von Doppelsträngen erreicht, zum anderen werden Sekundärstrukturen der Sonde verhindert. Für Oligonucleotid-Sonden wurde eine Hybridisierungstemperatur von 10 °C verwendet. Dies hängt mit der Länge der Oligonucleotid-Sonde von ca. 20 Bp und mit der damit nur geringen Anzahl an möglichen Wasserstoffbrückenbindungen zusammen (**Leitch et al. 1994**).

Um die Stringenz der Hybridisierung beurteilen zu können, wurden daher zum einen innerhalb einer Hybridisierung die Signalintensitäten von Primär- und Sekundärspot der gleichen Sequenz miteinander verglichen (siehe Kapitel 3.2.5). Zum anderen wurden wiederholte Hybridisierungen mit Sonden aus dem identischen Gewebe durchgeführt (siehe Kapitel 3.3). Aufgrund der nicht komplett vorhandenen Sequenz der cDNA-Insertionen konnten Kreuzhybridisierungen auf dem verwendeten DNA-Array nicht explizit untersucht werden, doch konnte für mehrere DNA-Spots, die sehr ähnliche Gene repräsentieren, eine differentielle Transkription nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.5.4).

Für die Detektion der Hybridisierungssignale wurden Phosphorscreens (siehe Kap. 2.2.10.3) verwendet, die einen höheren dynamischen Bereich zur Vermeidung von Sättigungseffekten und

eine höhere Linearität bei der Signalquantifizierung besitzen als eine Autoradiographie. Sie bestehen aus feinen Kristallen von BaFBr:Eu^{+2} in einer organischen Matrix. Wenn der Phosphorscreen einer radioaktiven Probe ausgesetzt wird, wird Eu^{+2} zu Eu^{+3} oxidiert und BaFBr zu BaFBr^- reduziert. Diese Ionen bleiben auch nach Entfernung der radioaktiven Probe bis zu mehreren Wochen oxidiert und reduziert, solange sie vor Licht geschützt bleiben.

Die Regeneration der Membranen wurde wiederholt durchgeführt, falls die Signalintensitäten der DNA-Arrays mehr als 5 % der ursprünglichen Signalintensität der Hybridisierung betrug.

4.1.11 Spot- und Hintergrunddetektion auf hybridisierten DNA-Arrays

Für das Einscannen eines Phosphorscreens benutzte der Phosphorimager eine Anregungswellenlänge von 635 nm. Diese Anregung führte in Zusammenhang mit der von der ionisierenden Strahlung stammenden, im Kristallgitter gespeicherten Energie zur Emission von blauem Licht, dessen Intensität proportional zur Radioaktivität der exponierten Probe ist. Dieses blaue Licht detektierte der Phosphorimager und stellte die Intensität in einer Grauskalierung dar. Dabei wurde die höchste Auflösung von 50 μm pro Kantenlänge eines Pixels gewählt. Das so erhaltene Bild eines hybridisierten *Arabidopsis*-Arrays wurde als 16-bit-Datei abgespeichert und benötigte damit 60 MB Speicherplatz. Es mußte also für die Bearbeitung die Bilddateien dieses Ausmaßes leistungsfähiges Computernetzwerk eingerichtet und unterhalten werden.

Bei der Erstellung eines komplexen Transkriptionsprofils war eine wesentliche Voraussetzung die korrekte Zuordnung von Spotsignal und seiner Position. Dazu konnte dem Hybridisierungsbild ein ideelles Raster mit Hilfe des Softwarepaketes AIS (Imaging Research Inc., Toronto, Canada) aufgesetzt werden, daß sich an das reale Spotraster anpassen ließ (siehe Abbildung 2.13 in Kapitel 2.2.11). Leere Ankerspots, die auf jedem Subarray in einer spezifischen Position angelegt worden waren, schlossen Vertauschung und falsche Orientierung der separaten Felder des *Arabidopsis*-Arrays aus (siehe Abb. 2.4 in Kapitel 2.2.3.2). Damit konnte eine fehlerfreie Zuordnung und Quantifizierung von über 26.000 Spots in weniger als einer Stunde erreicht werden.

4.1.12 Analyse und Vergleich komplexer Transkriptionsprofile

Bei den meisten Genexpressionsanalysen mittels DNA-Array-Technologie werden nicht absolute Transkriptmengen gemessen, sondern relative RNA-Niveaus in verschiedenen Proben miteinander verglichen (**Bowtell 1999**). Für die Bestimmung absoluter Transkriptmengen hätte ein wesentlich höherer Aufwand betrieben werden müssen, um die Abhängigkeit der Signalintensität von den unterschiedlichen PCR-Produktmengen und der Markierungsrate auszuschalten. Dazu hätte eine Angleichung der DNA-Mengen aller 26.000 Spots in möglichst hoher Konzentration, der Länge wie auch der Markierungsrate aller Sondenmoleküle erreicht werden müssen (**Bertucci et al. 1999**). Dieser technische Aufwand war mit den vorhandenen Mitteln und Gerätschaften in der gegebenen Zeit in dieser Größenordnung nicht realisierbar. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit durch relative Vergleiche komplexer Transkriptionsprofile die differentielle Genregulation untersucht.

Ein wesentliche Voraussetzung für die Bestimmung des differentiellen Transkriptionsfaktors war die Bestimmung des Hintergrundes. Die Erfahrung zeigte, daß die Intensität des Hintergrundes eines Arrays inhomogen verteilt sein kann (siehe Abb. 3.10). Daher mußte ein lokaler Hintergrund definiert, detektiert und von der Signalintensität subtrahiert werden. Dies konnte, wie in Kapitel 2.2.12.1 beschrieben, realisiert werden. Gespottete heterologe DNA, wie im Fall der heterologen Kontrollsequenzen, konnte dazu genutzt werden, den Grad der unspezifischen Hybridisierung zu bestimmen (siehe Abb. 3.19 C in Kapitel 3.4.3.2) (**Beißbarth et al. 2000**).

Für die Visualisierung eines Vergleichs komplexer Transkriptionsprofile wurde der Scatterplot gewählt (siehe Abb. 2.15 in Kapitel 2.2.12.2). Mit Hilfe des lokalen Hintergrundabzugs und der Standardisierung der Steigung auf den Wert 1 konnten die komplexen Transkriptionsprofile normiert werden (siehe Kapitel 2.2.12.1) (**Beißbarth et al. 2000**).

Für die Bestimmung des differentiellen Transkriptionsfaktors konnte eine beliebige Anzahl von Spots als Ankerpunkt definiert werden (siehe Kapitel 2.2.12.1). Zur Auswahl stand erstens eine Mehrheit von Genen, die in jedem Vergleich in Abhängigkeit vom Beitrag zu einem hohen Korrelationskoeffizienten automatisch bestimmt wurde, zweitens konstitutiv transkribierte Gene von *Arabidopsis thaliana* und drittens heterologe Kontroll-RNAs als externer Standard (**Beißbarth et al. 2000**).

Für die Auswertung eines Vergleichs komplexer Transkriptionsprofile standen bildgestützte statistische Analysemethoden zur Verfügung, die in Kollaboration mit Kurt Fellenberg und Tim Beißbarth, Abteilung 'Theoretische Bioinformatik' von Martin Vingron, DKFZ Heidelberg, entwickelt und in die Auswertesoftware integriert wurden (siehe Kapitel 2.2.12.2). Damit konnte der Scatterplot in gewichtete Regionen von unterschiedlichem Interesse aufgeteilt werden, wie dies in Abbildung 4.5 dargestellt ist.

Datenpunkte in Region a repräsentieren Gene, die auf Transkriptionsebene inaktiv oder nur gering aktiv sind. Dies ist nach eigenen Erfahrungswerten eine nicht geringe Zahl an Genen. In den Regionen b liegen Gene, die nur in einer Probe exprimiert und deren Intensitäten nur schwer reproduzierbar sind. Die Gene, die in Region c liegen, befinden sich in einem Korridor um die Diagonale und werden in beiden Experimenten auf einem konstantem Niveau exprimiert. Dies drückt sich in einem Transkriptionsfaktor innerhalb des Intervalls von $-2,0$ bis $+2,0$ aus. Die Region d und e repräsentieren Gene, die in dem einen Experiment reproduzierbar stärker exprimiert werden als in dem anderen. Die differentielle Transkription dieser Gene drückt sich in einem Differenzfaktor von unter $-2,0$ (Repression) und über $+2,0$ (Überexpression) aus (**Beißbarth et al. 2000**).

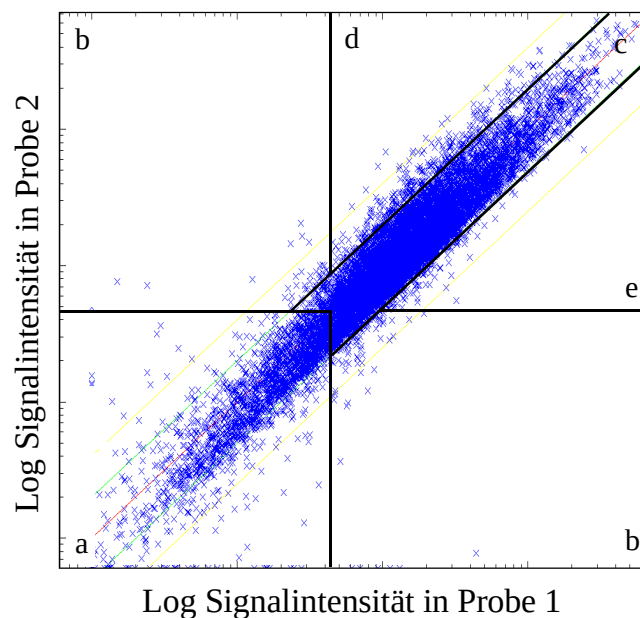


Abb. 4.5: Scatterplot mit Regionen unterschiedlicher Interpretation. Region a präsentiert Gene von geringer Transkription. In Region b liegen Gene, deren Intensitäten häufig nur schwer reproduzierbar sind. Die Region c in einem engen Korridor um die Diagonale mit Transkriptionsraten zwischen -2 und $+2$ enthält konstitutiv transkribierte Gene. Die Regionen d und e umfassen Gene, die differentiell transkribiert sind (**Beißbarth et al. 2000**).

Für eine bessere Auswertung und Interpretation der experimentellen Daten wurden die Ergebnisse der statistischen Analyse in einen biologischen Zusammenhang eingeordnet (siehe Kapitel 2.2.12.3). Erst die Analyse im physiologischen Zusammenhang erlaubte die Auswertung der differentiellen Transkription zusammenhängender Stoffwechselwege, die eine Einsicht in die globale Regulation der Genexpression ermöglichte.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Der genomische DNA-Array der Pflanze *Arabidopsis thaliana*: Herstellung und Signaldetektion

DNA-Array basierende, hochparallele Genexpressionsanalysen an der Pflanze *Arabidopsis thaliana* sind erstmals 1995 mit 48 PCR-Produkten, 1998 mit 864 bzw. 1.400 PCR-Produkten beschrieben worden (Schena et al. 1995, Desprez et al. 1998, Ruan et al. 1998). Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte genomische *Arabidopsis*-Array mit 13.000 PCR-Produkten, der ca. 50 % aller Gene dieses Organismus repräsentiert, ist damit mindestens um den Faktor 10 größer als bisher entwickelte *Arabidopsis*-Arrays und damit der erste dieser Größenordnung. Er bietet mit seinem genomweiten Ausmaß den Vorteil, eine Vielfalt verschiedener Versuchsbedingungen untersuchen zu können, ohne einen neuen DNA-Array, mit speziell für die Versuchsbedingungen ausgesuchten Spotsequenzen, herstellen zu müssen.

Die Herstellung der genomischen *Arabidopsis*-Arrays unterlag einer ständigen technischen Weiterentwicklung des Produktionsablaufs (siehe Kapitel 3.1.1 und 3.1.2). Die Änderung der PCR-Amplifikation von 96 auf 384 parallele Proben pro Thermocycler verringerte die Volumina der Probenansätze von 100 µl auf 25 µl. Dieser scheinbare Nachteil wurde jedoch mehr als ausgeglichen durch die Tatsache, einen kompletten PCR-Durchlauf in wesentlich kürzerer Zeit beenden zu können. Der Zeitvorteil erhöhte sich noch durch das Wegfallen des Umpipettierens von 13.000 PCR-Produkten aus 145 x 96er in 36 x 384er Mikrotiterplatten. Damit werden eventuell auftretende Pipettierfehler mit der Konsequenz möglicher Fehlzusammenordnungen und Kreuzkontaminationen ausgeschlossen.

Die Umstellung der Array-Herstellung von einer großen Membran auf fünf separate Membranfelder hatte mehrere Vorteile. Erstens konnten die Subarrays völlig unabhängig voneinander produziert, kontrolliert und erst dann zu einem kompletten Array-Set zusammengesetzt werden. Dies verkürzte die Zeit, in der die Proben in den PCR-Platten während der Array-Produktion verdunsten konnten, erheblich. Zweitens konnte mit der Produktion von Subarrays die Zahl der genomischen *Arabidopsis*-Arrays von 4 auf maximal 24 pro Spotdurchgang gesteigert werden. Dies ist nicht nur eine quantitative Verbesserung des Produktionsprozesses, sondern enthält auch eine zeitbedingte und qualitative Komponente. Wenn eine Genexpressionsanalyse mit mehreren Proben geplant ist, kann mit mehreren DNA-Arrays aus einem Produktionslauf eine größere Anzahl an Proben parallel bearbeitet werden, so daß die experimentellen Daten schneller zur Verfügung stehen. Bei einer Probenzahl, die mehr als 4 DNA-Arrays erfordern, müßten bei großen Membranen DNA-Arrays aus mehreren Produktionsläufen eingesetzt werden, die zu technisch bedingten Variationen der differentiellen Transkription führen. Dies ist möglichst zu vermeiden. Drittens konnten mit der Benutzung der Subarrays durch eine variable Anordnung der Membranfelder statt vorher einem jetzt drei genomische *Arabidopsis*-Arrays zur gleichen Zeit auf einem Phosphorscreen exponiert werden. Diese effizientere Nutzung der Phosphorscreens erlaubte eine höhere Parallelität der Probenbearbeitung. Für die Genexpressionsanalyse der pflanzlichen Pathogenantwort wurden daher *Arabidopsis*-Arrays verwendet, die aus der 384er PCR-Amplifikation stammten und auf fünf Subarrays verteilt waren.

Die geeignete Fixierung der DNA war eine entscheidende Voraussetzung für die hohe Wiederverwendbarkeit der Membranen von bis zu 15 Wiederholungen als auch für gut quantifizierbare Signale mit hohem Signal/Hintergrund-Verhältnis (siehe Kapitel 3.1.3). Die Ergebnisse der verschiedenen Fixierungsvarianten lassen vermuten, daß der Entzug von Wasser durch Backen bei 80 °C allein nicht ausreicht, die DNA kovalent an die Membran zu binden. Erst durch UV-Bestrahlung bei 254 nm tritt eine drastische Verstärkung der Bindung der DNA an die Membran ein. Dies läßt sich damit erklären, daß kovalente Quervernetzungen von DNA-Strängen durch Bildung von Thymindimeren und anderen Photoprodukten ein DNA-Netzwerk bilden, das durch zusätzlich ausgebildete kovalente Bindungen zwischen DNA und Membran zu einem stabilen Halt auf der Membran führen (**Hartley et al. 1993**). Bei immer stärkerer UV-Bestrahlung wird ein Maximum durchlaufen, nach dem die Hybridisierungssignale wieder abnehmen. Dieser Effekt wird vermutlich durch eine verstärkte DNA-Quervernetzung durch Photoprodukte hervorgerufen, die zu einer so starken Schädigung der DNA führen, daß die

Hybridisierungseigenschaften im Mitleidenschaft gezogen werden. Ein Problem bei der Interpretation der Ergebnisse ist allerdings, daß die Hersteller der Membranen nur sehr vage Angaben über die reaktiven Gruppen der Membranoberfläche machen.

In den letzten Jahren ist ein Trend zu beobachten, zur Signaldetektion anstelle von Radioaktivität auf Membranen auch Fluoreszenz bei Membran- oder Glasträgern einzusetzen. Die Detektion von Radioaktivität bietet den Vorteil hoher Sensitivität und die Verwendung von Membranen eine mehrmalige Wiederverwendbarkeit. Ein hohes Signal/Hintergrund-Verhältnis bei der Radioaktivdetektion erlaubt es, nur ca. 0,5 µg mRNA für die Markierung und Hybridisierung einsetzen zu können (**Granjeaud et al. 1999, van Hal et al. 2000**). Die Fluoreszenzdetektion bietet den Vorteil, die Detektion zu beschleunigen aufgrund wegfallender Expositionszeiten, als auch zwei mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Sonden in einer Hybridisierung parallel auf einem Träger detektieren zu können (**Duggan et al. 1999**). Der Nachteil der Fluoreszenzdetektion liegt in der Notwendigkeit, wesentlich höhere absolute mRNA-Mengen von bis zu 10 µg in die Markierung und Hybridisierung einsetzen zu müssen. Dabei liegt die Konzentration der Sonde für vergleichbare Sensitivität um mehrere Größenordnungen höher als in der Radioaktivhybridisierung (**Granjeaud et al. 1999, Duggan et al. 1999**).

Für eine mögliche Umstellung der Detektion von Radioaktivität auf Fluoreszenz mußten einige Vorbedingungen untersucht werden. Dazu gehörte die Auswahl eines geeigneten Trägers und eines geeigneten Rasters hoher Dichte in Übereinstimmung mit der Kapazität des Spotroboters. Die Auflösung des Roboters "Biogridder" mit Motorschritten von 200 µm genügte den Ansprüchen, die vom zu erstellenden Raster gefordert wurden. Als Trägermaterial schied Glas aus mehreren Gründen aus: erstens sollten die produzierten DNA-Arrays in einer Dichte produziert werden, die den geringeren Spezifikationen vorhandener Detektionsgeräte der Kollaborationspartner genügte. Zweitens stand zu Beginn dieser Arbeit kein Linkersystem für Glasoberflächen zur Verfügung, das eine kovalente Bindung der DNA auf der Glasoberfläche und damit eine mehrmalige Wiederverwendung der DNA-Arrays erlaubt hätte, wie dies erst 1999 von Beier beschrieben wurde (**Beier und Hoheisel 1999**). Damit kamen als Träger nur Membranen wie Nylon und Polypropylen in Frage. Auf Nylon konnte die DNA für eine mehrmalige Wiederverwendung geeignet fixiert werden (siehe Kapitel 3.1.3). Die Nylonmembran wies jedoch eine starke Autofluoreszenz auf, so daß für den Einsatz in der Genexpressionsanalyse nur Signale mit äußerst starker Intensität hätten detektiert und analysiert werden können (siehe Abb. 3.4 in Kapitel 3.1.4). Daher wurde als Alternative Polypropylen

untersucht. Die erfolgreiche Immobilisierung von DNA auf der Polypropylenmembran zeigte sich in klar abgegrenzten Signalen mit einer Intensität, wie sie auch auf Nylonmembranen erreicht wurde. Dabei wurde ein Signal/Hintergrund-Verhältnis bestimmt, das gegenüber der Nylonmembran um den Faktor 2 besser war (siehe Abb. 3.6 in Kapitel 3.1.4). Diese Verbesserung im Signal/Hintergrund-Verhältnis der Fluoreszenzdetektion erreichte allerdings bei weitem nicht die Werte der Radioaktivdetektion auf den gleichen Trägern (siehe Abb. 3.7 in Kapitel 3.1.5). Damit stand kein geeigneter Träger für die Fluoreszenzdetektion der differentiellen Transkription zur Verfügung, so daß alle weiteren Versuche mit Radioaktivmarkierung durchgeführt wurden.

Bei der Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Expositionszeiten auf die Differenz komplexer Transkriptionsprofile ergaben sich Variationen, die zwar für die große Mehrheit der Spots geringer als Faktor 2, aber doch signifikant waren. Diese technisch bedingte Variation ergibt sich vermutlich nicht allein aus der Expositionszeit, sondern vor allem aus der Detektion der Spotsignale. Dies ist ein technischer Variationsfaktor, der maßgeblich nur durch die Weiterentwicklung von Algorithmen für die Spoterkennung weiter minimiert werden kann.

Die Menge an membrangebundenem PCR-Produkt, die mit Radioaktivdetektion zu einem ausreichend guten Signal/Hintergrund-Verhältnis auf Nylon und Polypropylenmembranen führte, betrug 5 bis 10 ng pro Spot. Diese membrangebundene DNA-Menge liegt im Rahmen bisher beschriebener DNA-Arrays mit 2,5 bis 20 ng pro Spot. Diese Mengen reichen aus, um über die relativen Verhältnisse der Signalintensität bestimmter RNA-Spezies die differentielle Transkription zu bestimmen, wie es im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde.

4.2.2 Einfluß der DNA-Array-Systemkomponenten auf die Qualität komplexer Transkriptionsprofile

Für die Qualitätssicherung komplexer Transkriptionsprofile wurden die Systemkomponenten untersucht, die für die Erstellung eines Datensatzes Verwendung fanden (siehe Kapitel 3.2). Zu diesen Systemkomponenten gehörten der hergestellte DNA-Array, die aus dem zu untersuchenden Gewebe isolierte RNA, die durch cDNA-Erststrangsynthese hergestellte Sonde und die Hybridisierung als Kombination von komplexer Sonde und DNA-Array (siehe Abb. 1.3 in Kapitel 1.3.2).

Zuerst wurden die hergestellten DNA-Arrays untersucht (siehe Kapitel 3.2.1). Hierbei kam die universelle Sequenz des Primers T7, die alle PCR-Produkte besaßen, zum Einsatz. Da die PCR-Produkte vor dem Transfer auf die Membran nicht aufgereinigt wurden, transferierte man zwangsläufig aus dem PCR-Ansatz auch unverbrauchte Primer. Um diese Primer bei einer Kontrollhybridisierung auszuschließen, das gebildete PCR-Produkt aber nachzuweisen, wurde der Primer T7 als Kontrollsonde verwendet. Damit konnte nur die komplementäre Sequenz des neu synthetisierten PCR-Produktes nachgewiesen werden, nicht jedoch der Primer selbst. Dies erlaubte eine optisch-qualitative Kontrolle der DNA-Arrays. Die Form aller Spots und ihre Abgrenzung voneinander wurde sichtbar und gab damit Auskunft über den korrekten Ablauf des Spotvorganges. Die Stärke der Spotsignale und ihre Varianz lassen zwar erkennen, daß die PCR-Amplifikation im Hochdurchsatz für den Großteil der cDNA-Klone einwandfrei funktioniert, daß es aber dennoch in wenigen Fällen zu cDNA-spezifischen PCR-Ausfällen kommt (siehe Abb. 3.10). Die Hybridisierung mit Kontrollsonde erlaubte auch die korrekte Bestimmung des einzelnen Membranfeldes über die für jedes Feld typische Position und Orientierung der leeren Spotduplikats in allen 4 x 4 -Quadranten. Zusätzlich konnte mit der Visualisierung aller Spots für jeden Subarray ein vorangepaßtes Raster in der Spotdetektionssoftware 'AIS' (Imaging Research Inc., Toronto, Canada) erstellt und abgespeichert werden. Diese beschleunigte die Auswertung komplexer Hybridisierungen, in denen wesentlich weniger Spotsignale zu sehen waren und damit die Rasteranpassung schwieriger wurde.

Als nächste Systemkomponente wurde die vom zu untersuchenden Gewebe isolierte RNA kontrolliert (siehe Kapitel 3.2.2). Die Reinheit der RNA konnte anhand der optischen Dichte und die Qualität durch den Nachweis eventuell vorhandener Degradation bestimmt werden. Die Degradation hat entscheidenden Einfluß auf die Markierung der RNA durch cDNA-Erststrangsynthese, indem entweder die RNA verkürzt wird, so daß kürzere Sonden mit geringerer Markierung entstehen, oder die Polyadenylierung fehlt, so daß die RNA mit einem dT₁₈-Oligmer überhaupt nicht mehr revers transkribiert werden kann. Die Degradation der Gesamt-RNA inklusive mRNA wurde über den Degradationsgrad der ribosomalen Banden, die im Gel gut sichtbar waren, festgestellt. Bei frisch aufgereinigter RNA konnte keine Degradation detektiert werden (siehe Abb. 3.11), während die tiefgefrorene und für mehrere Monate gelagerte RNA eine Degradation erkennen ließ. Dabei war in einigen Fällen eine Korrelation zwischen Degradationsgrad und Markierungsrate festzustellen.

Aus der RNA wird die Sonde hergestellt (siehe Kapitel 3.2.3). Kurze DNA-Fragmente als Sonde bilden weniger leicht Sekundärstrukturen, die die Hybridisierung behindern könnten. Dagegen sind die in dieser Arbeit hergestellten cDNA-Sondenmoleküle mit einer Länge von 500 und 2.500 Bp, in mehreren unabhängigen cDNA-Synthesen reproduziert, verhältnismäßig lang (siehe Abb. 3.12). Der Vorteil der langen Sondenmoleküle ist jedoch eine hohe spezifische Aktivität, die zu einem besseren Signal/Hintergrund-Verhältnis führt. Dieser Parameter bedarf noch weiterer Untersuchungen, da bisher noch keine optimale Sondenlänge ermittelt werden konnte (**Graves 1999**). Nach Markierung und Hybridisierung konnte jedoch eine direkte Korrelation zwischen Sondenmarkierungsrate und absoluter Signalintensität sowie Signal/Hintergrund-Verhältnis festgestellt werden. Die Einbaurate bei der Sondenmarkierung gab somit Aufschluß über die Qualität der RNA und damit über die technische Qualität der anschließenden Hybridisierung (**Hauser et al. 1999**).

Eine konventionelle Methode, variable Daten zu validieren, besteht darin, ein Experiment zu wiederholen. Eine erste Ebene zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit war die Herstellung von DNA-Arrays mit einem Spotduplikat für jedes PCR-Produkt. Primär- und Sekundärspot fanden nach Hybridisierung, Exposition und Detektion dazu Verwendung, die technisch bedingten Variationen innerhalb eines komplexen Transkriptionsprofils zu überprüfen. Dazu wurden Primär- und Sekundärspot in einem Scatterplot verglichen. Auf diese Weise ließ sich eine falsche Rasteranordnung der Software, eine fehlerhafte Positionierung der PCR-Produkte bei der DNA-Array-Herstellung und eine unspezifische Hybridisierung aufdecken (**Beißbarth et al. 2000**).

4.2.3 Diskussion der Qualitätskontrollen beim Vergleich komplexer Transkriptionsprofile

Eine zweite Ebene zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit bestand in der Wiederholung von Experimenten im Ganzen oder einzelner Abschnitte. Zur Untersuchung der technischen Variation von Markierung, Hybridisierung und Bestimmung der Signalintensität gehörte die wiederholte Hybridisierung mit Sonden aus der identischen RNA-Probe (siehe Kapitel 3.3). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Bestimmung der detektierbaren differentiellen Transkription wurde einer Reproduzierbarkeitsstudie für DNA-Arrays der Firma Incyte Pharmaceuticals Inc. (Palo Alto, CA, USA) entnommen. Wie die Ergebnisse in Kapitel 3.3

zeigen, führten technische Einflüsse zu Meßwerten mit einer über alle Spots gemittelten prozentualen Variation von 25 %. Dieser für den verwendeten *Arabidopsis*-Array berechnete Wert erreichte damit nicht ganz die von der Studie für den GEM-Array von Incyte Pharmaceuticals Inc. ermittelte geringe Variation von 15 %. Bei der Bestimmung des Differenzfaktors variierten 99,5 % aller Spots im Intervall - 1,80 bis + 1,80 und kamen damit den Ergebnissen der Studie mit einem Variationsintervall von $\pm 1,74$ sehr nahe (**Incyte 1999**). Damit liegt das Limit der detektierbaren differentiellen Transkription bei $\pm 1,80$. Darüber hinaus wurde noch eine Toleranz von $\pm 0,20$ gewährt, so daß die Transkriptionsfaktoren mit einem Betrag von über 2,00 als differentiell transkribiert definiert wurden. Die Ergebnisse der Reproduzierbarkeit zeigen damit insgesamt, daß, wenn auch nicht ganz die Werte für den GEM-Array der Firma Incyte Pharmaceuticals Inc. erreicht wurden, mit dem genomischen *Arabidopsis*-Array Daten mit hinreichender Qualität für signifikante Aussagen erstellt werden können.

Einen starken Einfluß auf die Ergebnisse übt auch die Variabilität der biologischen Probe aus. Bei der Wiederholung eines gesamten Experimentes, angefangen bei der Verwendung einzelner Pflanzen aus der gleichen Anzucht, lassen sich die Variationen der biologischen Probe untersuchen. Die auf diesem Wege gewonnenen Erfahrungen weisen auf große Variationen im komplexen Transkriptionsprofil von Pflanze zu Pflanze trotz gleicher Anzucht hin, so daß für alle Untersuchungen die biologische Probe aus drei unabhängigen Anzuchten, jede Anzucht aus 15 Pflanzen bestehend, zusammengesetzt wurde. Damit konnten Anzucht- und Spezies-bedingte Variationen über die Mischung nivelliert werden, während Effekte, die Spezies-übergreifend auftraten, erhalten blieben und einer Detektion zur Verfügung standen.

Es stehen mittlerweile verschiedene Methoden der Genexpressionsanalyse zur Verfügung (**Duggan et al. 1999**). Dabei bietet die Genexpressionsanalyse mittels Northern Blot die Möglichkeit, die Daten der DNA-Array-Analyse mit Hilfe einer anderen Methode zu validieren. Für den Vergleich der Daten aus beiden Methoden sind in einem Vergleich von Tag- und Nachtprobe die Transkriptionsrate zweier Proteine untersucht worden: des konstitutiv transkribierten Elongationsfaktors EF-1 (**Nguyen et al. 1995**) und der differentiell transkribierten kleinen Untereinheit der Ribulosebisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RubisCO) (**Desprez et al. 1998**). Wie der Vergleich zeigt, korrelieren die Ergebnisse von Northern Blot und DNA-Array sehr gut miteinander. Der Transkriptionsfaktor für das stark differentiell transkribierte Enzym RubisCO weist bei Ermittlung mittels DNA-Array einen etwa 15 % geringeren Wert als

bei Ermittlung mittels Northern Blot auf. Diese Differenz wurde schon häufig festgestellt und ist damit vermutlich eine systematische, technisch bedingte Variation (**Nguyen et al. 1995**).

Dieser Vergleich zur Reproduzierbarkeit der DNA-Array-Daten bietet eine Grundlage für validierte Ergebnisse der hochparallelen Genexpressionsanalyse. Die Anwendung der DNA-Array-Technologie am Beispiel der Pflanze *Arabidopsis thaliana* eröffnet damit einer Vielzahl bisher unbeantworteter Fragen den Zugang zu genomweiten Untersuchungen der differentiellen Genregulation auf Transkriptionsebene.

4.2.4 Diskussion der Ankerpunkte für die Bestimmung des differentiellen Transkriptionsfaktors

Es gibt im wesentlichen zwei Strategien, den Faktor der differentiellen Transkription über Gene, die nicht differentiell reguliert und damit als Ankerpunkte im Vergleich komplexer Transkriptionsprofile dienen, zu bestimmen (siehe Kapitel 3.4). Die eine Strategie basiert auf der Betrachtung der Mehrheit aller Gene in einer Probe. Die zweite Strategie definiert eine kleine Gruppe von Genen, die zu den untersuchten Bedingungen unverändert bleiben soll (**Duggan et al. 1999**). Diese kleine Gruppe unveränderter Gene kann aus einem internen Standard, d.h. konstitutiv exprimierten Genen, oder einem externen Standard, d.h. zugesetzten heterologen Kontrollsequenzen, bestehen (**Beißbarth et al. 2000**). Damit ergeben sich aus den zwei Strategien drei verschiedene Ankerpunkttypen.

Diese drei Ankerpunkttypen zur Bestimmung des differentiellen Transkriptionsfaktors wurden in zwei Scatterplots, im Fall des Tag/Nacht-Vergleichs mit nur schwachen Variationen im komplexen Transkriptionsprofil, im Fall der Pathogeninfiltration jedoch mit einer massiven Änderung in der transkriptionellen Regulation, angewandt und miteinander verglichen (siehe Kapitel 3.4).

Bei der automatischen Auswahl einer Mehrheit von Genen, deren Median der Intensitäten als Anpassungsfaktor dient, um die Verhältnisse der Intensitäten auf den Wert 1 zu bringen, werden für die Bestimmung des differentiellen Transkriptionsfaktors mehrere tausend Gene ausgewählt, so daß ein sehr stabiler Differenzfaktor bestimmt werden kann, der durch wenige Ausreißer nicht aus dem Gleichgewicht gebracht wird (siehe Abb. 3.22 in Kapitel 3.4.4).

Beim internen Standard wurden durch ein iteratives Suchverfahren insgesamt 29 Gene identifiziert, die in verschiedenen Geweben der Pflanze *Arabidopsis thaliana* konstitutiv exprimiert wurden (siehe Kapitel 3.4.2). Durch Datenbankrecherche auf Sequenzhomologien konnte 14 von 29 Genen eine Annotation zugeordnet werden (siehe Tab. 3.4). Trotz der Tatsache, daß bisher sehr wenig bekannt ist über Pflanzengene, die ubiquitär exprimiert werden, konnten einige Gene identifiziert werden, die bereits als konstitutiv exprimierte Gene beschrieben wurden. Dazu zählt Actin 1, eine essentielle Komponente aller eukaryotischen Kontraktionssysteme und des pflanzlichen Cytoskeletts (**Drouin und Dover 1990, McDowell et al. 1996, An et al. 1996**). Der Actin 1-Promoter steuert eine stark konstitutive Expression auch in transgenem Reis (**Mc Elroy et al. 1990**). Das Gen für α -Tubulin 6 (TUA6) gehört zur Genfamilie der α -Tubuline, die für Arabidopsis aus mindestens sechs verschiedenen Mitgliedern besteht. Sie codieren für konservierte Strukturproteine der Microtubuli, die eine zentrale Rolle in mehreren grundlegenden Prozessen von eukaryotischen Zellen spielen. Das TUA6-Gen wurde in verschiedenen vegetativen Geweben als konstitutiv exprimiert nachgewiesen (**Kopczak et al. 1992**). Das EF-1 α -Gen, das für den Elongationsfaktor EF-1 α codiert, ist ein gut untersuchtes, konstitutiv exprimiertes Gen in allen eukaryotischen Zellen und spielt eine wichtige Rolle im Translationsprozeß der Proteinbiosynthese (**Liu et al. 1996**). Histon 1 gehört zur Familie der Histone, einer Hauptproteinkomponente des eukaryotischen Chromatins. Es wurde ebenfalls als konstitutiv transkribiert beschrieben (**Hochmuth und Doenecke 1990**). Die Gene UBQ10 und UBQ3 gehören zur Multigenfamilie der Ubiquitine mit bisher 14 identifizierten Mitgliedern, die in allen bisher untersuchten eukaryotischen Zellen gefunden wurden (**Callis et al. 1995**). Sie fungieren als selektive Markierung von Proteinen für die Proteolyse, sind aber auch an der Streßantwort der Pflanze beteiligt (**Burke et al. 1988**). Die Regulation für das Gen UBQ3 ist bisher nicht eindeutig beschrieben. Während das UBQ3-mRNA-Niveau für verschiedene Gewebe als wechselhaft beschrieben ist, konnte der UBQ3-Promoter für die konstitutive Expression in transgenen Pflanzen eingesetzt werden (**Sun und Callis 1997, Norris et al. 1993**). Auch die Identifizierung des GOS2-Gens bei der Suche nach konstitutiv exprimierten Genen in verschiedenen Geweben von *Arabidopsis thaliana* ließ sich bestätigen, indem GOS2-mRNA auch in einer anderen Untersuchung in verschiedenen Geweben detektiert wurde (**de Pater et al. 1992**).

Die Identifizierung dieser Gene bestätigt das iterative Suchverfahren, um im Vergleich diverser Proben eine Schnittmenge an Genen, die eine unveränderte Transkription aufweisen, zu

charakterisieren. Diese Auswahl an Genen muß jedoch genau für die zu untersuchenden Probenbedingungen ausgesucht sein, da eine unerwartete differentielle Transkription nie ganz ausgeschlossen werden kann (**Beißbarth et al. 2000**). Denn diese Gene wurden im Vergleich verschiedener Gewebe ermittelt. Sie wurden als Ankerpunkte zur Bestimmung des differentiellen Transkriptionsfaktors bei zwei verschiedenen Bedingungen, dem Tag/Nacht-Vergleich und der Untersuchung der Pathogeninfiltration des Blattes angewandt (siehe Abb. 3.22 B und E in Kapitel 3.4.4). Während im Tag/Nacht-Vergleich in Blattgewebe keine Variation im differentiellen Transkriptionsfaktor im Vergleich zur Mehrheit der Gene auftrat, führte eine transkriptionelle Aktivierung einiger dieser internen Standardgene, initiiert durch Pathogeninfiltration, dazu, daß sich die Bestimmung des Transkriptionsfaktors gegenüber der Methode mit der Mehrheit der Gene um den Wert - 1,0 reduzierte.

Beim externen Standard sind insgesamt 9 heterologe Kontrollsequenzen, für 7 Kontrollen über die Herstellung neuer Vektorkonstrukte für die *in vitro* Transkription, als polyadenylierte RNA für die Bestimmung des differentiellen Transkriptionsfaktors bereitgestellt und eingesetzt worden. Damit ist die Zahl bisher in der Literatur beschriebener externer Kontrollen von maximal 2 auf 9 wesentlich gesteigert und dadurch der Einfluß eventueller Ausreißer verringert worden (**Bernard et al. 1996, Eickhoff et al. 1999**). Der externe Standard lieferte im Vergleich mit den beiden anderen Ankerpunkttypen, der Mehrheit der Gene und der internen Standardgene, im Tag/Nacht-Vergleich reproduzierbare Werte des differentiellen Transkriptionsfaktors. In der Untersuchung der Pathogeninfiltration differierte die Faktorbestimmung gegenüber der Mehrheit der Gene um den Wert + 1,0, im Vergleich zu den definierten internen Standardgenen um den Wert + 2,0.

Abschließend läßt sich sagen, daß die Wahl des geeigneten Standards zur Bestimmung des differentiellen Transkriptionsfaktors stark von den Variationen in den komplexen Transkriptionsprofilen abhängt. Bei geringen Variationen ist die Wahrscheinlichkeit für den internen Standard höher, nicht von der differentiellen Transkription betroffen zu sein. Bei großen Variationen im Transkriptionsprofil ist die Wahrscheinlichkeit geringer, so daß sie entweder sehr gut ausgesucht werden müssen oder ihre Zahl drastisch erhöht wird, um eventuellen Ausreißern ihr Gewicht zu nehmen. Der externe Standard hat den Vorteil, nicht von den Probenbedingungen abhängig zu sein. Jedoch ist die Herstellung der heterologen Kontrollsequenzen sehr aufwendig und der Einsatz als RNA speziell bei der Lagerung ist extrem empfindlich gegenüber RNasen, so daß auch sie nicht alleine als Ankerpunkte robust genug sind.

Die Mehrheit der Gene ermittelte in beiden beschriebenen Vergleichen einen Transkriptionsfaktor, der im Fall geringer Variationen im Transkriptionsprofil identisch mit dem der anderen Ankerpunkte war und der im Fall großer Variationen im Transkriptionsprofil den Mittelwert der beiden andern Ankerpunkttypen lieferte. Alle drei Ankerpunkttypen liefern Variationen im Transkriptionsfaktor, die im Intervall $\pm 1,0$ liegen. Der Einsatz von allen drei Ankerpunkttypen in Kombination erlaubt jederzeit die Überprüfung des jeweils gewählten Standards durch die anderen als unabhängige Kontrolle, ist allerdings auch sehr aufwendig. Für den routinemäßigen Einsatz mit einem minimalen Aufwand empfiehlt sich daher die Mehrheit der Gene für die Bestimmung des differentiellen Transkriptionsfaktors.

Aufgrund der noch sehr jungen DNA-Array-Technologie stand bisher die Etablierung der Methode im Vordergrund, wie die Verwendung von 48 Genen bei der Untersuchung von Wurzel- und Blattgewebe (**Schena et al. 1995**), von 864 Genen im Vergleich von in Licht und Dunkelheit gewachsenen Pflanzen (**Desprez et al. 1998**) und von 1.400 Genen beim Vergleich verschiedener Gewebe beweisen (**Ruan et al. 1998**). Daher sind bisher kaum Ankerpunkte für die Bestimmung des differentiellen Transkriptionsfaktors entwickelt bzw. in der Literatur beschrieben. Insofern erfolgte ein Vergleich dieser Standards erstmalig im Rahmen dieser Arbeit, so daß sich eine Diskussion mit der Literatur erübrigte.

4.2.5 Diskussion der differentiellen Genregulation verschiedener Stoffwechselwege in *Arabidopsis thaliana* während der Pathogenabwehr von *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Allgemeine Mechanismen zur Regulation der enzymatischen Aktivität von Zellen stellen die Proteinbiosynthese und posttranslationale Modifikationen vorhandener Proteine dar. Die letztere Variante umfaßt die Bildung und Dissoziation von Proteinkomplexen, reversible kovalente Modifikationen und Spaltung von Proenzymen. Metabolische Änderungen in Pflanzenzellen, verursacht durch bakterielle Infektion, werden schon seit mehreren Jahrzehnten untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß Pflanzenzellen auf eine Infektion mit einer erhöhten Respirationsrate, einem erhöhten Umsatz von Hexosen im Pentosphosphatcyclus sowie einer aktivierten Produktion aromatischer Aminosäuren und Sekundärmetabolite reagieren (**Goodman, Kiraly und Wood 1986**). Um zu untersuchen, ob und wann welche Reaktionen

auch durch transkriptionelle Regulation vermittelt werden, wurden die mit 13.000 EST-Klonen eigens hergestellten, genomischen *Arabidopsis*-Arrays verwendet (siehe Kapitel 3.1 und 4.2.1).

4.2.5.1 Transkriptionelle Induktion von Genen der frühen Phase der pflanzlichen Pathogenantwort

Bei der versuchten Infektion von *Arabidopsis thaliana* durch das mikrobielle Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* werden pflanzliche Abwehrmechanismen durch die Pathogenerkennung rasch eingeleitet (**Lamb et al. 1989**). Dies belegt die frühe Ausprägung der hypersensitiven Reaktion der Pflanze schon 24 Stunden nach der Pathogeninfiltration (siehe Abb. 3.23 in Kapitel 3.5.1). Die Erkennung des Pathogens kann dabei mit der Interaktion des bakteriell exprimierten Proteins *Rpt2* mit dem Resistenzprotein RPS2 von *Arabidopsis thaliana*, Ökotyp Columbia, gemäß dem Gen-für-Gen-Modell nach Flor erklärt werden. Dies führt zu einer inkompatiblen Pflanzen-Pathogen-Interaktion, die eine ganze Reihe von Abwehrmechanismen induziert (**Kunkel et al. 1993**).

Für die frühe Phase der induzierten Pathogenantwort wird eine erhöhte Konzentrationen von zellulärem Calcium unter Beteiligung von Calmodulin beschrieben (**Kurosaki et al. 1987, Vogeli et al. 1992, Kurosaki et al. 1993, Dixon et al. 1994**). Diese Aktivierung konnte mit zeitlicher Verzögerung auf transkriptioneller Ebene durch Beobachtung einer erhöhten Transkriprate ab 7 Stunden nach Pathogeninfiltration für Calcium-bindende Proteine, wie Calmodulin, und Calcium-abhängige Enzyme, wie eine Kinase und ATPase, bestätigt werden, wie in Tabelle 4.2 zu sehen ist.

Nr.	Annotation	0 Std.	2 Std.	7 Std.	24 Std.
6	Calmodulin	1,8	1,6	1,6	2,2
7	Calmodulin, ACaM4	-1,7	-1,2	2,6	1,1
8	Calmodulin-ähnliches Protein	-1,1	-1,3	3,0	1,6
9	Calcium-transportierende ATPase 3 (Calcium-Pumpe)	1,0	-1,1	-1,1	2,2
10	Calcium-bindendes Protein Isolog	-1,5	-1,2	2,3	-1,1
11	Calcium-abhängige Protein-Kinase Isolog	-1,6	1,3	2,5	1,2
12	Protein-Kinase	1,2	-1,3	2,0	-1,1
13	Protein-Kinase APK1B	1,9	1,4		2,2
14	Protein-Kinase PkpA	1,2	1,0	3,1	-1,1
15	Protein-Kinase SNF1	2,6	1,2	1,4	1,6

Tab. 4.2: Induktion der differentiellen Transkription von Calmodulin und Calcium-abhängigen Genen sowie einigen Kinasen (siehe auch Kap. 3.5.4).

Der Calcium/Calmodulin-Komplex aktiviert zahlreiche Enzyme, vor allem Kinasen (**Michal 1999**). Auch schon beschriebene, vermehrte Proteinphosphorylierungen zu verschiedenen Zeitpunkten spiegeln sich in einem erhöhten Transkriptionsfaktor für einige Kinasen wider (siehe Tab. 4.2) (**Raz und Fluhr 1992 und 1993**).

4.2.5.2 Transkriptionelle Aktivierung von Genen verschiedener Stoffwechselwege während der pflanzlichen Pathogenantwort

Die Glycolyse ist eine Schlüsselreaktion des Metabolismus für die Bereitstellung von Energie in Form von ATP und Reduktionsäquivalenten in Form von NADH (**Michal 1999**). Die Umsetzung von einem Molekül Glucose zu zwei Molekülen Pyruvat geschieht unter Beteiligung von 10 Enzymen (siehe Abb. 4.6).

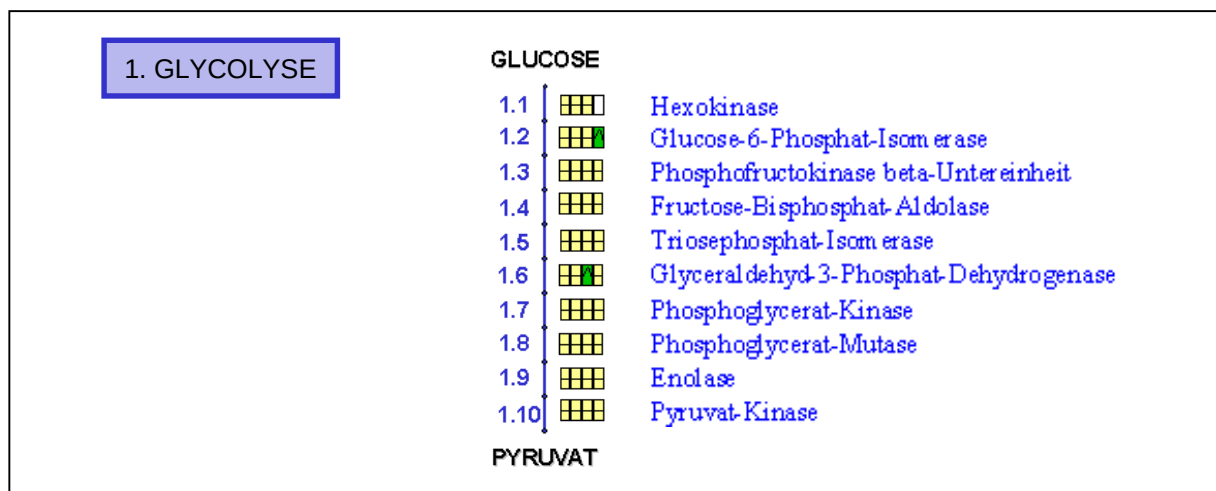


Abb. 4.6: Glycolyse mit den beteiligten Enzyme und ihre transkriptionelle Regulation innerhalb der ersten 24 Stunden nach Pathogeninfiltration (siehe auch Kap. 3.5.4).

Von diesen Enzymen werden nur zwei, die Glucose-6-Phosphat-Isomerase (1.2) und die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (1.6) transkriptionell aktiviert. Alle anderen Enzyme werden während der ersten 24 Stunden nach Pathogeninfiltration weiterhin konstitutiv exprimiert.

Unter aeroben Bedingungen wird Pyruvat weiter zu Acetyl-CoA umgesetzt, das in den Krebs-Cyclus eintritt und dort vollständig zu Kohlendioxid oxidiert wird. Diese Reaktionen werden von 9 verschiedenen Enzymen umgesetzt, von denen 8 auf dem DNA-Array präsent waren (siehe Abb. 4.7).

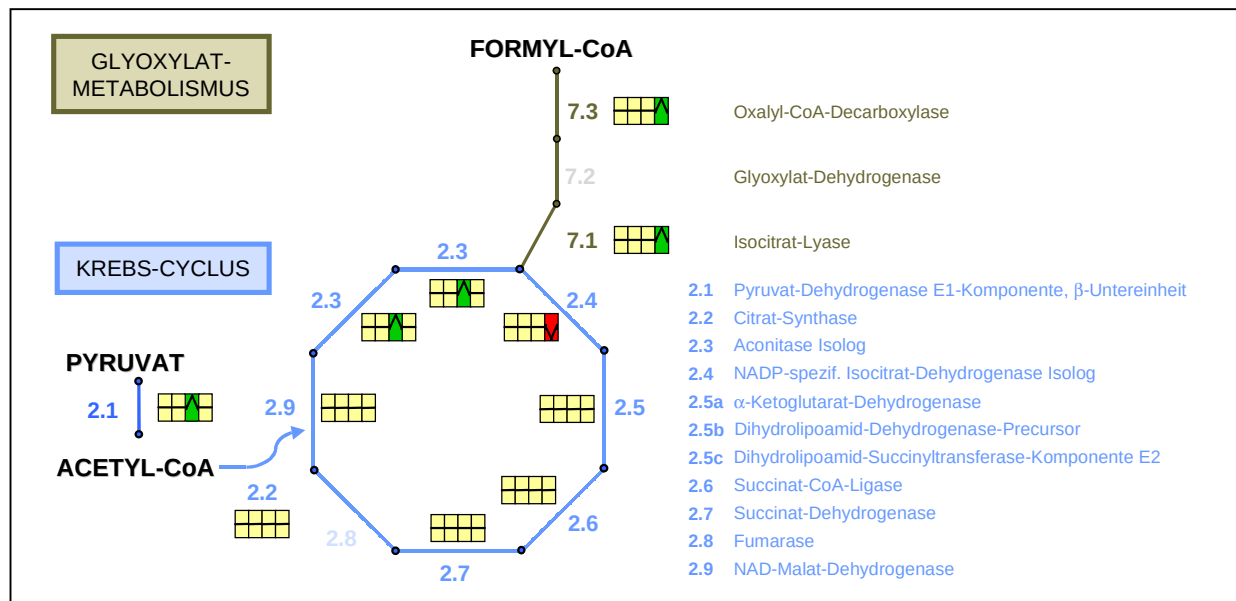


Abb. 4.7: Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und Eintritt in den Citrat-Cyclus mit insgesamt 9 Enzymen. Dargestellt ist die transkriptionelle Regulation der Pflanze *Arabidopsis* innerhalb der ersten 24 Stunden nach Pathogeninfiltration (siehe auch Kap. 3.5.4).

Zwei Enzyme des Citrat-Cyclus, die Pyruvat-Dehydrogenase (2.1) und Aconitase (2.3), werden 7 Stunden nach Pathogeninfiltration hochreguliert. Interessanterweise findet sich im Citrat-Cyclus der einzige Fall einer signifikant negativen Transkriptionsrate 24 Stunden nach Pathogeninfiltration. Dieser Genabschaltung geht mit der Aktivierung der Isocitrat-Lyase (7.1) und der Oxalyl-CoA-Decarboxylase (7.3) einher, die dem Glyoxylatmetabolismus angehören. Dieses beobachtete Umschalten des Stoffwechselverlaufs findet genau an dem Knotenpunkt statt, an dem beide Stoffwechselwege um das Isocitrat konkurrieren. Im Glyoxylatmetabolismus wird es möglich, aus Acetyl-CoA aus dem Fettabbau schließlich wieder Glucose zu bilden. Dabei kommt es zu einer Umwandlung von Fett zu Kohlehydraten unter ATP-Verbrauch (**Stryer 1991, Michal 1999**). Dieses Umschalten von Citrat- auf Glyoxylatstoffwechsel ist eine bei der Pathogenantwort von Pflanzen bisher nicht bekannte Reaktion.

Der Pentosephosphat-Cyclus ist ein wichtiger Stoffwechselweg für die Erzeugung von Reduktionsäquivalenten und Pentosephosphat (**Michal 1999**). Von den 6 Enzymen, die erforderlich sind, diesen Stoffwechselkreislauf zu schließen, waren 5 Enzyme auf dem DNA-Array präsent (siehe Abb. 3.26).

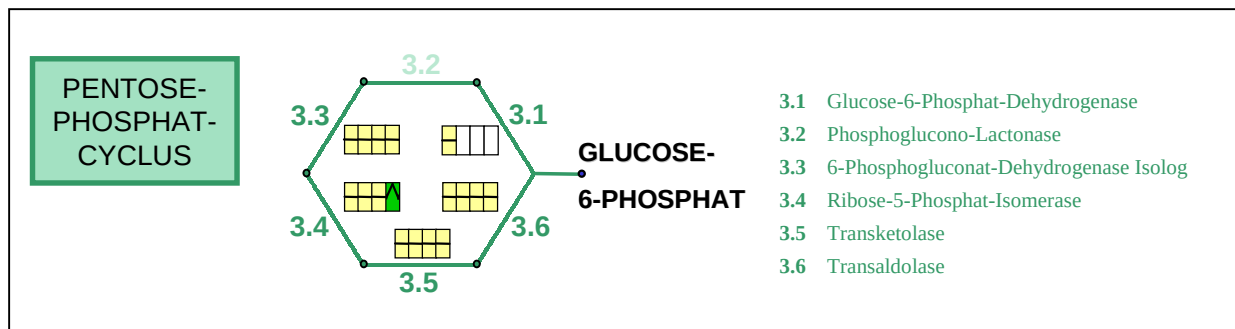


Abb. 4.8: Pentosephosphat-Cyclus mit 6 Enzymen und ihre transkriptionelle Regulation innerhalb der ersten 24 Stunden nach Pathogeninfiltration (siehe auch Kap. 3.5.4).

Für das Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (3.1) konnte aufgrund zu schwacher Signalintensitäten der Transkriptionsfaktor nur für den Zeitpunkt 0 Stunden nach Pathogeninfiltration bestimmt werden. Nur ein Enzym, die Ribose-6-Phosphat-Isomerase, wird 24 Stunden nach Pathogeninfiltration transkriptionell aktiviert.

Insgesamt werden in den Stoffwechselwegen Glycolyse, Citrat-Cyclus und Pentosephosphat-Cyclus 25 % der untersuchten Gene auf Transkriptionsebene differentiell reguliert. Diese differentiell regulierten Gene sind unter Pathogenbefall der Pflanze noch nicht untersucht worden, so daß noch keine zu diskutierenden Vergleichsdaten vorliegen. Aus der erhöhten Transkriptionsrate einiger Gene dieser Stoffwechselwege kann geschlossen werden, daß die Pflanze in den ersten Stunden der Pathogenabwehr einen erhöhten Energiebedarf hat. Interessant ist dabei die Änderung des Stoffwechselweges vom Citrat-Cyclus zum Glyoxylatmetabolismus 24 Stunden nach Pathogeninfiltration, die es ermöglicht, unter Verbrauch von ATP aus Acetyl-CoA aus dem Fettabbau wieder Glucose zu bilden.

Der Shikimatweg ist ein essentieller Teil des Pflanzenstoffwechsels, der nicht nur Vorstufen für die Synthese von aromatischen Aminosäuren zur Verfügung stellt, sondern auch eine große Vielfalt von Sekundärmetaboliten (**Hermann 1995**). Der Shikimatweg setzt sich aus insgesamt 16 verschiedenen Enzymen zusammen, von denen 11 durch EST-Klone auf dem DNA-Array repräsentiert wurden. Für 10 Enzyme konnte eine Aussage zur differentiellen Transkription gemacht werden (siehe Abb. 4.9).

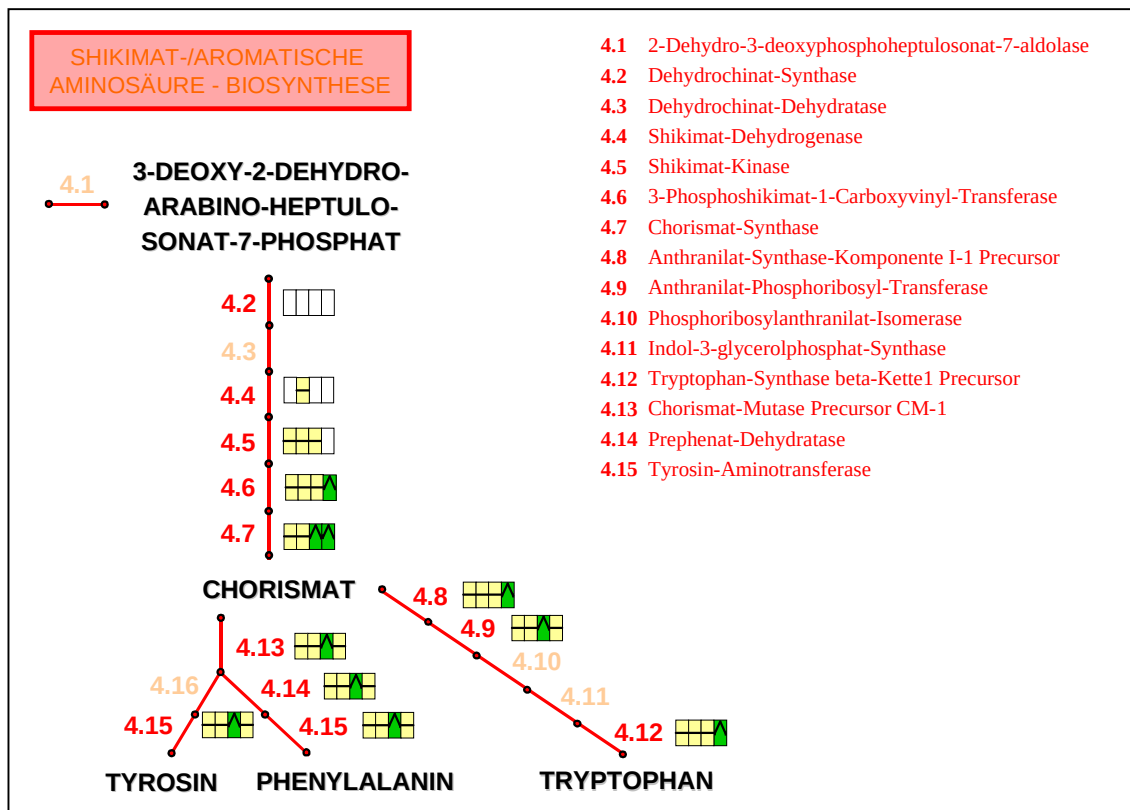


Abb. 4.9: Shikimat- und aromatische Aminosäure-Biosynthese mit 16 Enzymen, von denen 10 in ihrer transkriptionellen Regulation untersucht wurden (siehe auch Kap. 3.5.4).

Interessanterweise zeigen 8 der 10 Enzyme eine aktivierte Transkription. Mit der 3-Phosphoshikimat-1-Carboxyvinyl-Transferase (4.6) beginnt eine Kaskade von Enzymen mit erhöhter Transkriptionsrate. In dieser Kaskade folgt die Chorismat-Synthase (4.7) mit der differentiellen Transkription für die Zeitpunkte 7 und 24 Stunden nach Pathogeninfiltration. Alle weiteren untersuchten Enzyme, die in zwei Verzweigungen von Chorismat ausgehend zu den Endprodukten Tryptophan und Phenylalanin führen, werden vornehmlich 7 Stunden nach Pathogeninfiltration aktiviert. Bisher wurde eine verstärkte Transkription im Shikimatweg nach Pathogeninfektion nur für die DAHP-Synthase (4.1) in *Petroselinum crispum* und *Arabidopsis thaliana*, die Anthranilat-Synthase (4.8) in *Ruta graveolens* und *Arabidopsis thaliana*, die Tryptophan-Synthase (4.12) und die Chorismat-Mutase (4.13) in *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen (McCue et al. 1989, Henstrand et al. 1992, Niyogi und Fink 1992, Eberhard et al. 1996, Bohlmann et al. 1995, Zhao et al. 1998). Mit Hilfe des genomischen *Arabidopsis*-Arrays konnte in den Stoffwechselverzweigungen des Shikimatweges weiteren Genen mit bisher nicht bekannter Regulation eine aktivierte Transkription zugeschrieben werden. Dazu gehören die Anthranilat-Phosphoribosyl-Transferase (4.9) für die Synthese von Tryptophan, die Prephenat-Dehydratase (4.14) und die Tyrosin-Aminotransferase (4.15) für die Synthese von Tyrosin und Phenylalanin. Diese Ergebnisse stützen damit zum einen die bisher in der Literatur

beschriebenen Beobachtungen der differentiellen Transkription einiger Gene während der pflanzlichen Pathogenabwehr. Zum anderen ermöglichen die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse ein umfassendes Bild der koordinierten transkriptionellen Regulation ganzer Stoffwechselwege.

Der Phenylpropanoidsyntheseweg bildet aus den Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin wichtige Vorstufen für phenolische Sekundärmetabolite, die eine Reihe wichtiger Komponenten der pflanzlichen Pathogenabwehr darstellen (siehe Abb. 4.10). Der Phenylpropanoidsyntheseweg setzt sich aus 8 Enzymen zusammen. Für 3 Enzyme ist eine erhöhte Transkriptionsfaktor nachgewiesen worden.

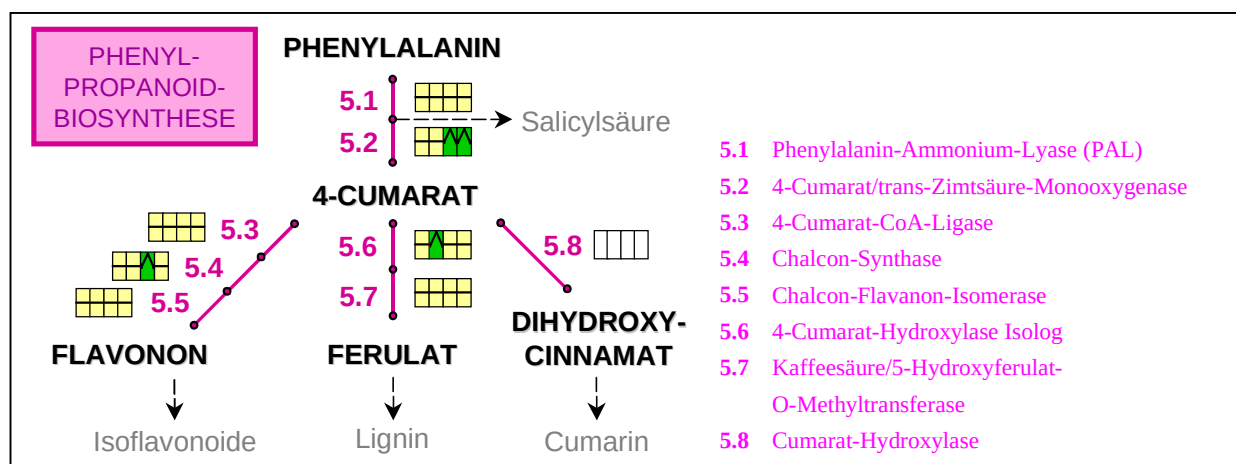


Abb. 4.10: Phenylpropanoidsyntheseweg mit 8 Enzymen, von denen 6 in ihrer transkriptionellen Regulation untersucht wurden (siehe auch Kap. 3.5.4).

Für das Eingangsenzym des Phenylpropanoidsyntheseweges, die Phenylalanin-Ammonia-Lyase PAL (5.1), konnte keine erhöhte Transkriptionsrate festgestellt werden. Damit konnten die Ergebnisse verschiedener Studien mit Pilzenfektion über PAL nicht bestätigt werden, die eine transkriptionelle Induktion von PAL sowohl bei *Arabidopsis thaliana* als auch bei *Petroselinum crispum* zeigten (Davis et al. 1988, Henstrand et al. 1992). Für die 4-Cumarat-CoA-Ligase (5.3), die Chalcon-Synthase (5.4) und die Chalcon-Flavanon-Isomerase (5.5) konnte dagegen in Übereinstimmung mit vorherigen Studien eine erhöhte Transkriptionsrate bestätigt werden (Davis et al. 1988, Hahlbrock und Scheel 1989, Michal 1999). Die differentielle Transkription des Enzyms trans-Zimtsäure-Monooxygenase (5.2) für 7 und 24 Stunden nach Pathogeninfiltration, das die Synthese von 4-Cumarat als einem weiteren Knotenpunkt katalysiert, und 4-Cumarat-Hydroxylase (5.6) für 7 Stunden nach Pathogeninfiltration, das die Synthese der Ligninvorstufen einleitet, sind Regulationen, die bisher noch nicht beschrieben wurden. Lignifizierung ist eine ausgeprägte pflanzliche Pathogenantwort zur Bildung

struktureller Barrieren (**Brunold, Rügsegger und Brändle 1996**). Flavonoide werden synthetisiert, um als Phytoalexine mit antimikrobieller Wirkung und als Tannine mit Schutzfunktion eine Rolle bei der Pathogenabwehr zu spielen. Der Phenylpropanoid-syntheseweg stellt damit einen wichtigen Knotenpunkt in den pathogeninduzierten Abwehrmechanismen dar (**Michal 1999**).

Ethylen spielt als Pflanzenhormon eine wichtige Rolle bei pathogeninduzierten Abwehrmechanismen der Pflanze (**Heldt 1996**). Für die Ethylensynthese sind 3 Enzyme zuständig, die mittels des verwendeten DNA-Arrays auch untersucht werden konnten (siehe Abb. 4.11).

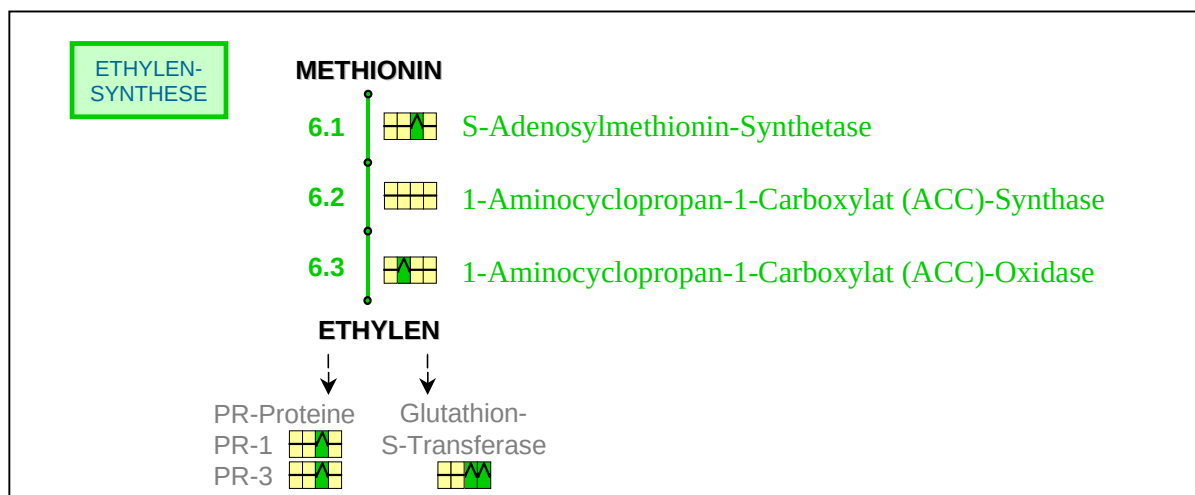


Abb. 4.11: Ethylensynthese. Es wurden 3 Enzyme für die Ethylensynthese und einige von Ethylen induzierte Gene auf ihre transkriptionelle Regulation untersucht (siehe auch Kap. 3.5.4).

Es wurde eine konstitutive Transkription für das Enzym ACC-Synthase (6.2) beobachtet. Eine erhöhte Transkriptionsrate konnte für die S-Adenosylmethionin-Synthetase (6.1) 7 Stunden nach Pathogeninfiltration und für die ACC-Oxidase (6.3) bereits 2 Stunden nach Pathogeninfiltration nachgewiesen werden. Diese transkriptionelle Aktivierung für die Synthesestufen von Ethylen sind Ergebnisse, die bisher auf Transkriptionsebene nicht untersucht bzw. in der Literatur beschrieben wurden. Auch die Auswirkungen von exogen appliziertem Ethylen sind nicht bei *Arabidopsis thaliana*, sondern bei der Tabakpflanze untersucht worden. So führt bei der Tabakpflanze die Freisetzung von Calcium im Cytosol über Proteinphosphorylierungen zur Genexpression von PR-Proteinen (**Raz und Fluhr 1992 und 1993**). Diese ethyleninduzierte Reaktion kann in einen direkten Zusammenhang zu den mit Hilfe des *Arabidopsis*-Arrays gewonnenen Ergebnissen gesetzt werden. Dabei treten in *Arabidopsis thaliana* erhöhte Transkriptionsraten für die PR-Gene 1 (1) und 3 (2) für den Zeitpunkt 7 Stunden nach Pathogeninfiltration auf (siehe Abb. 4.11 und Tab. 4.3).

Nr.	Annotation	0 Std.	2 Std.	7 Std.	24 Std.
1	PR-Protein 1 Precursor	-1,3	-1,6	3,0	-1,8
2	PR-Protein 3 (Chitinase)	1,0	-1,3	3,9	-1,6
3	Glutathion-S-Transferase ERD 11	1,9	1,8	4,1	4,0
4	Glutathion-S-Transferase PM24	1,3	1,8	2,5	5,6
5	Glutathion-S-Transferase Isolog	1,1	1,3	3,1	1,5
16	Catalase	1,2	-1,7	3,7	-1,7
17	Catalase	1,6	1,0	1,8	2,6
18	Catalase	1,3	1,5	1,8	2,4
19	Peroxidase prxCb Isolog	1,2	1,0	2,3	3,2
20	kationische Peroxidase	1,7	1,5	2,3	2,4
21	Glutathion-Peroxidase	-1,3	-1,2	2,7	-1,1
22	L-Ascorbinsäure-Peroxidase	-1,2	-1,1	2,9	
23	Peroxidase Precursor	-1,1	1,0	1,3	3,2
24	Peroxidase	-1,1	1,2	-1,4	2,4
25	Peroxidase	1,7	1,3	2,5	3,4
26	Peroxidase C1A Precursor	1,0	2,0	5,9	2,6
27	Peroxidase Isolog	-1,1	-1,3	2,6	1,6

Tab. 4.3: Transkriptionelle Regulation von PR-Proteinen, Glutathion-S-Transferasen und Peroxidasen (siehe auch Kap. 3.5.4).

Die Funktion des PR-Proteins 1 ist noch unbekannt. Das PR-Protein 3 codiert für eine Chitinase, die gegen das Chitin pilzlicher Zellwände gerichtet ist (**Legrand et al. 1987, Mauch et al. 1988**). Die transkriptionelle Aktivierung verschiedener Glutathion-S-Transferasen (3-5) konnte im Einklang mit der Literatur für *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen werden (**Zhou und Goldsborough 1993**). Die Glutathion-S-Transferase ist aktiv an der Neutralisierung toxischer Verbindungen (Xenobiotica) beteiligt und beitet damit Schutz vor Oxidation (**Levine et al. 1994, Michal 1999**). Für einige Catalasen (16-18) und Peroxidasen (19-27) konnte eine erhöhte Transkriptionsrate nachgewiesen werden. Catalasen und Peroxidasen können reaktive Sauerstoffspezies abbauen und somit ebenfalls einen lebenswichtigen Oxidationsschutz bereitstellen (**Michal 1999**).

Bei Betrachtung des Gesamtbildes der transkriptionellen Aktivitäten dieser analysierten Stoffwechselwege unter der Berücksichtigung, daß die gezeigten Daten nur eine kleine Auswahl dessen sind, was mittels des genomischen *Arabidopsis*-Arrays vorliegt, wird noch einmal deutlich, welche Möglichkeiten die DNA-Array-Technologie für die parallele Analyse der Regulation der Genexpression ganzer Stoffwechselwege bietet, wie sie im Rahmen dieser Arbeit für die Pflanze *Arabidopsis thaliana* etabliert und angewendet wurde.

4.3 Schlußfolgerung

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Resultate der Genexpressionsanalyse pflanzlicher Abwehrmechanismen mit Hilfe der DNA-Array-Technologie bestätigen bereits in der Literatur beschriebene Erkenntnisse in beeindruckender Weise. Dabei ist zu erwähnen, daß die Resultate mittels Anwendung des genomischen *Arabidopsis*-Arrays in einem einzigen Versuchsansatz ermittelt werden konnten, während die in der Literatur beschriebenen Resultate in vielen, voneinander unabhängigen Studien gewonnen wurden. Zusätzlich konnte die transkriptionelle Aktivität mehrerer Gene aufgeklärt werden, deren Regulation nach Pathogenbefall bisher nicht bekannt war. Man erkennt, daß die Stoffwechselwege, die für die Synthese aromatischer Aminosäuren und Sekundärmetabolite verantwortlich sind, auf Transkriptionsebene zwar nicht mit extrem erhöhten Transkriptionsfaktoren, aber dafür in großer Breite reguliert werden. Diese Ergebnisse zeichnen ein Gesamtbild, in dem eine spezifische Pathogenerkennung mittels Elicitor-Akzeptor-Interaktion über die Aktivierung von endogenen Sekundärsignalen, wie Ethylen, und aufeinanderfolgenden Stoffwechselwegen eine Signaltransduktionskaskade induziert, die die pflanzliche Pathogenabwehr verstärkt und breit fächert (**Penninckx et al. 1998**).

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte und etablierte DNA-Array-Technologie ermöglichte eine umfassende Genexpressionsanalyse im Hochdurchsatz. Für die detaillierte Auswertung der Stoffwechselwege Glycolyse, Citrat-Cyclus, Pentosephosphat-Cyclus, Glyoxylatmetabolismus, Shikimat-, Tryptophan- und Phenylpropanoidsyntheseweg in einem biologisch-funktionellen Zusammenhang wurden 75 Gene ausgewählt. Wenn man bedenkt, daß der genomische *Arabidopsis*-Array insgesamt 13.000 Gene repräsentiert, wird deutlich, welches Potential die DNA-Array-Technologie besitzt, um unterschiedlichste biologische Fragestellungen an die globale Genexpression innerhalb der Zelle beantworten zu können (**Manger and Relman 2000**).

Mit der Möglichkeit, große Datenmengen für die Genexpressionsanalyse in kürzester Zeit zu generieren, wird es auch immer aufwendiger, in dieser Datenflut die interessanten Veränderungen zu erkennen. Daher wird in Zukunft bei der Verarbeitung der Daten die Bioinformatik mit wachsender Bedeutung eine entscheidende Rolle spielen (**Zweiger 1999**). Dies gilt insbesondere für die Speicherung von Ergebnissen der Genexpressionsanalyse in Datenbanken und für die Bereitstellung von neuen und umfassenden Analysewerkzeugen, die es erlauben, in der Datenflut die entscheidenden Veränderungen im Transkriptionsmuster zu erkennen.

V. Zusammenfassung

Es wurde ein genomischer DNA-Array mit einer 13.800 EST-Klone umfassenden cDNA-Bibliothek der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* entwickelt und in der Genexpressionsanalyse der pflanzlichen Pathogenabwehr eingesetzt.

Dazu sind 13.800 PCR-Amplifikationen in je drei Durchläufen mit einer Ausbeute von 94 % durchgeführt worden. Mit den PCR-Produkten konnten insgesamt 66 genomische *Arabidopsis*-Arrays mit je 13.000 PCR-Produkten hergestellt werden. Im Vergleich von Nylon und Polypropylen als Trägermaterialien bei gleicher Beladung von 5 bis 10 ng DNA pro Spot wies die Fluoreszenzdetektion auf Polypropylen ein um den Faktor 2 besseres Signal/Hintergrund-Verhältnis auf, das jedoch mit Radioaktivdetektion auf beiden Membranen noch um den Faktor 10 übertroffen wurde. Bei der Validierung der Systemkomponenten der DNA-Array-Technologie einzeln und in Kombination ließen sich die erhaltenen Ergebnisse bei hohem Korrelationskoeffizienten reproduzieren. Für die Bestimmung des differentiellen Transkriptionsfaktors sind erstmals drei unterschiedliche Arten von Ankerpunkten, die Mehrheit der Gene, interne Standardgene und externe mRNA-Kontrollen, entwickelt und miteinander verglichen worden. Dabei erwies sich die Mehrheit der Gene unter den gegebenen Bedingungen großer Variationen im Transkriptionsprofil als die robusteste Standardisierungsmethode.

Mit der etablierten DNA-Array-Technologie ist untersucht worden, welche pathogeninduzierten Abwehrmechanismen der Pflanze *Arabidopsis thaliana* in den ersten 24 Stunden nach Infektion mit dem avirulenten Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* transkriptionell reguliert sind. In einer gezielten Auswahl von 75 Genen, die 85 % der Gene der untersuchten Stoffwechselwege repräsentieren und die einer detaillierten Auswertung unterzogen wurden, konnte in den Stoffwechselwegen Glycolyse, Citrat-Cyclus, Pentosephosphat-Cyclus und Glyoxylatmetabolismus für 25 % der Gene, im Shikimat-, Tryptophan- und Phenylpropanoid-syntheseweg für 60 % der Gene eine erhöhte Transkriptionsrate nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit experimentellen Daten verschiedener unabhängiger Studien zur pflanzlichen Pathogenantwort in beeindruckender Weise überein. Darüberhinaus sind erstmals Transkriptionsprofile von bisher auf Transkriptionsebene nicht untersuchten Genen erstellt worden. Diese Ergebnisse bestätigen die transkriptionelle Aktivierung ganzer Stoffwechselwege und gewähren erstmals einen Einblick in die koordinierte differentielle Transkription der genannten Stoffwechselwege während der Pathogenabwehr.

VI. Abkürzungsverzeichnis

2D-PAGE	2-dimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Abb.	Abbildung
ABRC	Arabidopsis Biological Resource Center
ACC	Aminocyclopropancarboxylat
AGI	Arabidopsis Genome Initiative
<i>A. thaliana</i>	Pflanze <i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
<i>avrRpt2</i>	Avirulenzgen <i>Rpt2</i>
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
Bp	Basenpaare (engl. "base pairs")
BSA	Rinderserumalbumin (engl. "bovine serum albumin")
bzw.	beziehungsweise
cDNA	DNA-Kopie einer RNA nach reverser Transkription (engl. "copy DNA" oder "complementary DNA")
CIP	alkalische Phosphatase (engl. "calf intestinal alkaline phosphatase")
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
dCTP	2'-Deoxycytidin-5'-Triphosphat
DNA-Array	im Raster hoher Dichte angeordnete DNA-Proben
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dUTP	2'-Deoxyuridin-5'-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	bekannter, codierender Sequenzabschnitt einer cDNA (engl. "expressed sequence tag")
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure
INRA	Institut National de la Recherche Agriculture
IPTG	Isopropylthiogalactosid
Kbp	Kilobasenpaare
Mbp	Megabasenpaare
mM	10 ⁻⁶ mol/L
MOPS	(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MPI	Max-Planck-Institut
mRNA	Boten-RNA (engl. "messengerRNA")
MTP	Mikrotiterplatte
ORF	offenes Leseraster (engl. "open reading frame")

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. "polymerase chain reaction")
PP	Polypropylen
PR	pathogenesis related
<i>Pst</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pathovar <i>tomato</i>
<i>Pst avrRpt2</i>	avirulentes Bakterium <i>P. syringae</i> pv. <i>Tomato</i> ; exprimiert das Avirulenzgen <i>avrRpt2</i>
<i>P. syringae</i>	Bakterium <i>Pseudomonas syringae</i>
pv.	pathovar
RDA	Representational Difference Analysis
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAGE	Serial Analysis of Gene Expression
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SLS	Sodiumlauroylsarcosinat
SSH	Suppressive Subtractive Hybridization
Std.	Stunde
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Termus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
TIGR	The Institute for Genome Research
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA (engl. "transferRNA")
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
YAC	Yeast Artificial Chromosome
z. B.	zum Beispiel

VII. Literaturverzeichnis

A

1. Adams M.D., Soares MB, Kerlavage A.R., Fields C., Venter J.C., **Rapid cDNA sequencing (expressed sequence tags) from a directionally cloned human infant brain cDNA library**, Nat-Genet. 4(4), 373-80 (1993).
2. Agarwal K.L., Buchi H., Caruthers M.H., Gupta N., Khorana H.G., Kleppe K., Kumar A., Ohtsuka E., Rajbhandary U.L., Van de Sande J.H., Sgaramella V., Weber H., Yamada T., **Total synthesis of the gene for an alanine transfer ribonucleic acid from yeast**, Nature 227, 27-34 (1970).
3. Alexander D., Goodman R.M., Gutrella M., Glascock C., Weymann K., Friedrich L., Maddox D., Ahlgoy P., Luntz T., Ward E., Ryals J., **Increased tolerance to two oomycetopathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein-1a**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7327-7331 (1993).
4. Alvarado-Urbina G., Sathe G.M., Liu W.C., Gillen M.F., Duck P.D., Bender R., Ogilvie K.K., **Automated synthesis of gene fragments**, Science 214, 270-4 (1981).
5. Alvarez M.E., Pennell R.I., Meijer P.-J., Ishikawa A., Dixon R.A., Lamb C., **Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity**, Cell 92, 773-784 (1998).
6. Alwine J.C., Kemp D.J., Stark G.R., **Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5350-4 (1977).
7. An Y.-Q., McDowell J.M., Huang S., McKinney E.C., Chambliss S., Meagher R.B., **Strong, constitutive expression of the Arabidopsis ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues**, The Plant Journal 10(1), 107-121 (1996).
8. Ansorge W., Sproat B.S., Stegemann J., Schwager C., **A non-radioactive automated method for DNA sequence determination**, J Biochem Biophys Methods 13(6), 315-23 (1986).
9. Augenlicht L.H., Taylor J., Anderson L., Lipkin M., **Patterns of gene expression that characterise the colonic mucosa in patients at the genetic risk for colonic cancer**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 3286-3289 (1991).
10. Avery O.T., MacLeod C.M., McCarty M., **Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types**, J. Exp. Med. 79, 137-158 (1944).

B

11. Bains W., Smith G., **A novel method for nucleic acid sequence determination**, J. Theor. Biol. 135, 303-307 (1988).
12. Bassett D.E., Jr., Eisen M.B., Boguski M.S., **Gene expression informatics: it's all in your mind**, Nature Genetics Suppl. 21, 51-55 (1999).
13. Beier M., Hoheisel J., **Production by quantitative photolithographic synthesis of individually quality checked DNA microarrays**, Nucleic Acids Research 28, e11, 1-6 (2000).
14. Beier M., Hoheisel J.D., **Versatile derivatisation of solid support media for covalent bonding on DNA-microchips**, Nucleic Acids Research 27(9), 1970-1977 (1999).

15. Beißbarth T., Fellenberg K., Brors B., Arribas-Prat R., Boer J., Hauser N.C., Scheideler M., Hoheisel J.D., Schütz G., Poustka A., Vingron M., **Comparison and quality measures of DNA array hybridization data**, Bioinformatics (2000, im Druck).
16. Bent A.F., Kunkel B.N., Dahlbeck D., Brown K.L., Schmidt R., Giraudat J., Leung J., Staskawicz B.J., **RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes**, Science 265, 1856-1860 (1994).
17. Bernard K., Auphan N., Granjeaud S., Victorero G., Schmitt-Verhulst A.-M., Jordan B.R., Nguyen C., **Multiplex messenger assay: simultaneous, quantitative measurement of expression of many genes in the context of T cell activation**, Nucleic Acids Research 24(8), 1435-1442 (1996).
18. Bertucci F., Bernard K., Loriod B., Chang Y.-C., Granjeaud S., Birnbaum D., Nguyen C., Peck K., Jordan B.R., **Sensitivity issues in DNA-array-based expression measurements and performance of nylon microarrays for small samples**, Human Molecular Genetics 8(9), 1715-1722 (1999).
19. Bevan M., Ecker J., Theologis S., Federspiel N., Davis R., McCombie D., Martienssen R., Chen E., Waterston B., Wilson R., Rounsley S., Venter C., Tabata S., Salanoubat M., Quetier F., Cherry M., Meinke D., **Objective: the complete sequence of a plant genome**, Plant Cell 9, 476-478 (1997).
20. Bohlmann J., DeLuca V., Eilert U., Martin W., **Purification and cDNA cloning of anthranilate synthase from *Ruta Graveolens*: modes of expression and properties of native and recombinant enzymes**, Plant Journal 7, 491-501 (1995).
21. Bouchez D., Höfte H., **Functional genomics in plants**, Plant Physiol. 118, 725-832 (1998).
22. Bowtell D.D.L., **Options available - from start to finish - for obtaining expression data by microarray**, Nature Genetics Suppl. 21, 25-32 (1999).
23. Bradley D.J., Kjellbom P., Lamb C.J., **Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel rapid defense response**, Cell 70, 21-30 (1992).
24. Brisson L.F., Tenhaken R., Lamb C., **Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance**, The Plant Cell 6, 1703-1712 (1994).
25. Broglie K., Chet I., Holliday M., Cressman R., Biddle P., Knowlton S., Mauvis C.J., Broglie R., **Transgenic plants with enhanced resistance to fungal pathogen *Rhizoctonia solani***, Science 254, 1194-1197 (1991).
26. Brunold Ch., Rügsegger A., Brändle R., **Stress bei Pflanzen**, UTB für Wissenschaft, 325-343 (1996).
27. Burke T.J., Callis J., Vierstra R.D., **Characterization of a polyubiquitin gene from *Arabidopsis thaliana***, Mol. Gen. Genet. 213, 435-443 (1988).

C

28. Callis J., Carpenter T., Sun C.-W., Vierstra R.D., **Structure and evolution of genes encoding polyubiquitin and ubiquitin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia**, Genetics 139, 921-939 (1995).
29. Camilleri C., Lafleurriel J., Macadré C., Varoquaux F., Parmentier Y., Picard G., Caboche M., Bouchez D., **A YAC contig map of *Arabidopsis thaliana* chromosome 3**, Plant Journal 14, 633-642 (1998).
30. Carulli J.P., Artinger M., Swain P.M., Root C.D., Chee L., Tulig C., Guerin J., Osborne M., Stein G., Lian J., Lomedico P.T., **High throughput analysis of differential gene expression**, J. Cell. Biochem. Suppl. 30/31, 286-296 (1998).
31. Chang S.C., Park S.K., Kim B.C., Kang B.J., Kim D.U., Nam H.G., **Stable genetic transformation of *Arabidopsis thaliana* by *Agrobacterium* inoculation in planta**, Plant Journal 5, 551-558 (1994).

32. Chen Z.X., Malamy J., Henning J., Conrath U., Sanchescasas P., Silva H., Ricigliano J., Klessig D.F., **Induction, modification, and transduction of the salicylic acid signal in plant defense responses**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 4134-4137 (1995).
33. Cheung V.G., Morley M., Aguilar F., Massimi A., Kucherlapati R., Childs G., **Making and reading microarrays**, Nature Genetics Suppl. 21, 15-19 (1999).
34. Chirgwin J.M., Przybyla A.E., MacDonald R.J., Rutter W.J., **Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease**, Biochemistry 18(24), 5294-5299 (1979).
35. Cho R.J., Campbell M.J., Winzler E.A., Steinmetz L., Conway A., Wodicka L., Wolfsberg T.G., Gabrielian A.E., Landsman D., Lockhart D.J., Davis R.W., **A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle**, Mol. Cell 2, 65-73 (1998).
36. Chomczynski P., Sacchi N., **Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction**, Anal. Biochem. 162, 156-159 (1987).
37. Chu S., DeRisi J., Eisen M., Mulholland J., Botstein D., Brown P.O., Herskowitz I., **The transcriptional program of sporulation in budding yeast**, Science 282, 699-705 (1998).
38. Cohen S.N., Chang A.C., Boyer H.W., Helling R.B., **Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70(11):3240-4 (1973).

D

39. Darling D.C., Brickell P.M., **Nucleinsäure-Blotting**, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg (1996).
40. Davis K.R., Ausubel F.M., **Characterization of elicitor and pathogen induced gene expression in *Arabidopsis thaliana***, J. Cell. Biochem. Suppl. 12C, 264 (1988).
41. Debouck C., Goodfellow P.N., **DNA microarrays in drug discovery and development**, Nature Genetics Suppl. 21, 48-50 (1999).
42. de Pater B.S., van der Mark F., Rueb S., Katagiri F., Chua N.-H., Schilperoort R.A., Hensgens L.A.M., **The promoter of the rice gene GOS2 is active in various different monocot tissues and binds rice nuclear factor ASF-1**, The Plant Journal 2(6), 837-844 (1992).
43. DeRisi J., Iyer V.R., Brown P.O., **Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale**, Science 278, 680-686 (1997).
44. DeRisi J., Penland L., Brown P.O., Bittner M.L., Meltzer P.S., Ray M., Chen Y., Su Y.A., Trent J.M., **Use of cDNA microarrays to analyse gene expression patterns in human cancer**, Nature Genetics 14, 457-460 (1996).
45. DeRisi J.L., Iyer V.R., **Genomics and array technology**, Curr. Opin. Oncology 11, 76-79 (1999).
46. Desprez T., Amselem J., Caboche M., Höfte H., **Differential gene expression in *Arabidopsis* monitored using cDNA arrays**, The Plant Journal 14(5), 643-652 (1998).
47. Diatchenko L., Lau Y.-F.C., Campbell A.P., Chenchik A., Moqadam F., Huang B., Lukyanov S., Lukyanov K., Gurskaya N., Sverdlov E., Siebert P.D., **Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 6025-6030 (1996).
48. Dixon R.A., Harrison M.J., Lamb C.J., **Early events in the activation of plant defense responses**, Annu. Rev. Phytopathol. 32, 479-501 (1994).
49. Dong X., Mindrinos M., Davis K.R., Ausubel F.M., **Induction of *Arabidopsis* defense genes by virulent and avirulent *Pseudomonas syringae* strains and by a cloned avirulence gene**, The Plant Cell 3, 61-72 (1991).

50. Dresselhaus T., Lörz H., Kranz E., **Representative cDNA libraries from few plant cells**, Plant J. 5(4), 605-610 (1994).
51. Drmanac S., Kita D., Labat I., Hauser B., Schmidt C., Burczak J.D., Drmanac R., **Accurate sequencing by hybridization for DNA diagnostics and individual genomics**, Nature Biotechnology 16, 54-58 (1998).
52. Drmanac R., Labat I., Brukner I., Crkvenjakov R., **Sequencing of megabase plus DNA by hybridization: theory of the method**, Genomics 4, 114-128 (1989).
53. Drmanac S., Kita D., Labat I., Hauser B., Schmidt C., Burczak J.D., Drmanac R., **Accurate sequencing by hybridization for DNA diagnostics and individual genomics**, Nature Biotechnology 16, 54-58 (1998).
54. Drouin G., Dover G.A., **Independent gene evolution in the potato actin gene family demonstrated by phylogenetic procedures for resolving gene conversions and the phylogeny of angiosperm actin genes**, J. Mol. Evol. 31, 132-150 (1990).
55. Duggan D.J., Bittner M., Chen Y., Meltzer P., Trent J.M., **Expression profiling using cDNA microarrays**, Nature Genetics Suppl. 21, 10-14 (1999).

E

56. Eberhard J., Ehrler T.T., Epple P., Felix G., Raesecke H.R., Amrhein N., Schmid J., **Cytosolic and plastidic chorismate mutase isozymes from *Arabidopsis thaliana*: molecular characterization and enzymatic properties**, Plant Journal 10, 815-821 (1996).
57. Ecker J.R., Davis R.W., **Plant defense genes are regulated by ethylene**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 5202-5206 (1987).
58. Eickhoff B., Korn B., Schick M., Poustka A., van der Bosch J., **Normalization of array hybridization experiments in differential gene expression analysis**, Nucleic Acids Research 27(22), e33, 1-3 (1999).
59. Epstein C.B., Butow R.A., **Microarray technology - enhanced versatility, persistent challenge**, Curr. Opin. Biotechnology 11, 36-41 (2000).

F

60. Feinbaum R.L., Ausubel F.M., **Transcriptional regulation of the *Arabidopsis thaliana* chalcone synthase gene**, Mol. Cell. Biol. 8, 1985-1992 (1988). EMBL/DKFZ QH301Z:139
61. Fleischmann R.D., Adams M.D., White O., Clayton R.A., Kirkness E.F., Kerlavage A.R., Bult C.J., Tomb J.F., Dougherty B.A., Merrick J.M. et al., **Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd**, Science 269, 496-512 (1995).
62. Flor H.H., **Current status of gene-for-gene concept**, Annu. Rev. Phytopathol. 9, 275-296 (1971).
63. Fodor S.P.A., Read J.L., Pirrung M.C., Stryer L., Lu A.T., Solas D., **Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis**, Science 261, 767-773 (1991).
64. Fraley R.T., Rogers S.G., Horsch R.B., Sanders P.R., Flick J.S., Adams S.P., Bittner M.L., Brand L.A., Fink C.L., Fry J.S., Galluppi G.R., Goldberg S.B., Hoffmann N.L., Woo S.C., **Expression of bacterial genes in plant cells**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80(15), 4803-7 (1983).

G

65. Gaffney T., Friedrich L., Vernooij B., Negrotto D., Nye G., Uknes S., Ward E., Kessmann H., Ryals J., **Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance**, Science 261, 754-756 (1993).

66. García-Muniz N., Martínez-Izquierdo J., Puigdoménech P., **Induction of mRNA accumulation corresponding to a gene encoding a cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein by fungal elicitors**, Plant Mol. Biol. 38, 623-632 (1998).
67. Geng M., Wallrapp C., Müller-Pillasch F., Frohme M., Hoheisel J.D., Gress T.M., **Isolation of differentially expressed genes by combining representationally difference analysis (RDA) and cDNA library arrays**, BioTechniques 25(3), 434-438 (1998).
68. Gingeras, T., Ghandour G., Wang E., Berno A., Small P.M., Drobniewski, Alland D., Desmond E., Holodniy M., Drenkow J., **Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic *Mycobacterium* DNA arrays**, Genome Research 8, 435-448 (1998).
69. Glazebrook J., Ausubel F.M., **Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 8955-8959 (1994).
70. Glick B.R., Pasternak J.J., **Molekulare Biotechnologie**, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg (1995).
71. Goeddel D.V., Kleid D.G., Bolivar F., Heyneker H.L., Yansura D.G., Crea R., Hirose T., Kraszewski A., Itakura K., Riggs A.D., **Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76(1):106-110 (1979).
72. Goffeau A. et al., **The yeast genome directory**, Nature 387 (Suppl.), 1-105 (1997).
73. Goodman H.M., Ecker J.R., Dean C., **The genome of *Arabidopsis thaliana***, PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 92, 10831-10835 (1995).
74. Granjeaud S., Bertucci F., Jordan B.R., **Expression profiling: DNA arrays in many guises**, BioEssays 21, 781-790 (1999).
75. Grausz J.D., Auffray C., **Strategies in cDNA programs**, Genomics 17, 530-532 (1993).
76. Graves D.J., **Powerful tools for genetic analysis come of age**, Trend. Biotechnology 17, 127-134 (1999).
77. Gray N.S., Wodicka L., Thunnissen A.M.W.H., Norman T.C., Kwon S., Espinoza F.H., Morgan D.O., Barnes G., LeClerc S., Meijer L., Kim S.H., Lockhart D.J., Schultz P.G., **Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors**, Science 281, 533-538 (1998).

H

78. Hahlbrock K., Scheel D., **Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism**, Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 40, 347-369 (1989).
79. Hartley J.A., Souhami R.L., Berardini M.D., **Electrophoretic and chromatographic separation methods used to reveal interstrand crosslinking of nucleic acids**, J. Chromatography 618, 277-288 (1993).
80. Hauser N.C., Scheideler M., Matysiak S., Vingron M., Hoheisel J.D., **DNA Arrays for Transcriptional Profiling**, Methods in Microbiology, Volume 28, 193-204 (1999).
81. Hauser N.C., Vingron M., Scheideler M., Krems B., Hellmuth K., Entian K.-D., Hoheisel J.D., **Transcriptional profiling on all open reading frames of *Saccharomyces cerevisiae***, Yeast 14, 1209-1221 (1998).
82. Heldt H.-W., **Pflanzenbiochemie**, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg (1996).
83. Heller R.A., Schena M., Chai A., Shalon D., Bedilion T., Gilmore J., Woolley D.E., Davis R.W., **Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 2150-2155 (1997).

84. Henstrand J.M., McCue K.F., Brink K., Handa A.K., Herrmann K.M., Conn E.E., **Light and fungal elicitor induce 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase mRNA in suspension cultured cells of Parsley (*Petroselinum crispum* L.)**, Plant Physiol. 98,761-763 (1992).
85. Herrmann K.M., **The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism**, Plant Physiology 107, 7-12 (1995).
86. Hieter P., Boguski M., **Functional genomics: it's all how you read it**, Science 278, 601-602 (1997).
87. Hochmuth C., Doenecke D., **The expression of the histone H1° gene in the human hepatoma cell line HepG2 is independent of the state of cell proliferation**, Differentiation 43, 212-219 (1990).
88. Hock B., Elstner E.F., **Schadwirkungen auf Pflanzen**, Lehrbuch der Pflanzentoxikologie, Wissenschaftsverlag, 241-282 (1988).
89. Höfte H. et al., **An inventory of 1152 expressed sequence tags obtained by partial sequencing of cDNAs from Arabidopsis thaliana**, The Plant Journal 4 (6), 1051-1061 (1993).
90. Hoheisel J.D., Lennon G.G., Zehetner G., Lehrach H., **Use of high coverage reference libraries of Drosophila melanogaster for relational data analysis**, J. Mol. Biol. 220, 903-914 (1991).
91. Hubank M., Schatz D.G., **Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA**, Nucleic Acids Research 22(25), 5640-5648 (1994).
92. Humphery-Smith I., Blackstock W., **Proteome analysis: genomics via the output rather than the input code**, J. Protein Chem. 16, 537-544 (1997).

I

93. Incyte Technical Survey, **GEM microarray reproducibility study**, Incyte Pharmaceutical Inc., 1-6 (1999).
94. Itzhaki H., Woodson W.R., **Characterization of an ethylene-responsive glutathione S-Transferase gene cluster in carnation**, Plant Mol. Biol. 22, 43-58 (1993).

K

95. Kaiser J., **From genome to functional genomics**, Science 288, 1715 (2000).
96. Kauffmann S., Legrand M., Geoffrey P., Fritig B., **Biological function of 'pathogenesis-related' proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3-β-glucanase activity**, EMBO J. 6, 3209-3212 (1987).
97. Keen N.T., **Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions**, Annu. Rev. Genet. 24, 447-463 (1990).
98. Khrapko K., Lysov Y., Khorlyn A., Shick V., Florentiev V., Mirzabekov A., **An oligonucleotide hybridization approach to DNA sequencing**, FEBS Letters 256, 118-122 (1989).
99. Kobe B., Deisenhofer J., **Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats**, Nature 366, 751-756 (1993).
100. Kopcak S.D., Haas N.A., Hussey P.J., Silflow C.D., Snustad D.P., **The small genome of Arabidopsis contains at least six expressed α-tubulin genes**, The Plant Cell 4, 539-547 (1992).
101. Kuhn D.N., Chappel J., Boudet A., Hahlbrock K., **Induction of phenylalanine ammonia-lyase and 4-coumarate:CoA ligase mRNAs in cultured plant cells by UV light or fungal elicitor**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1102-1106 (1984).
102. Kunkel B.N., **A useful weed put to work: genetic analysis of disease resistance in Arabidopsis thaliana**, Trends Genet. 12(2), 63-69 (1996).

- 103.Kunkel B.N., Bent A.F., Dahlbeck D., Innes R.W., **RPS2, an *Arabidopsis* disease resistance locus specifying recognition of *Pseudomonas syringae* strains expressing the avirulence gene *avrRpt2***, The Plant Cell 5, 865-875 (1993).
- 104.Kurosaki F., Tsurusawa Y., Nishi A., **The elicitation of phytoalexins by Ca^{2+} and cyclic AMP in carrot cells**, Phytochemistry 26, 1919-1923 (1987).
- 105.Kurosaki F., Nishi A., **Stimulation of calcium influx and calcium cascade by cyclic AMP in cultured carrot cells**, Arch. Biochem. Biophys. 302, 144-151 (1993).

L

- 106.Laibach F., ***Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. als Objekt für genetische und entwicklungs-physiologische Untersuchungen**, Bot. Arch. 44, 439-455 (1943).
- 107.Lamb C.J., Lawton M.A., Dron M., Dixon R.A., **Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack**, Cell 56, 215-224 (1989).
- 108.Lander E., **Array of hope**, Nature Genetics Suppl. 21, 3-4 (1999).
- 109.Lee T.S., Lee K.H., **Genomic analysis**, Curr Opin Biotechnology 11, 171-175 (2000).
- 110.Legrand M., Kauffmann S., Geoffrey P., Fritig B., **Biological function of pathogenesis-related proteins: four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases**, PROC. NATL. ACAD. SCI. USAUSA 84, 6750-6754 (1987).
- 111.Leitch A.R., Schwarzacher T., Jackson D., Leitch I.J., **In situ-Hybridisierung**, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg (1994).
- 112.Lennon G.G., Lehrach H., **Hybridisation analyses of arrayed cDNA libraries**, Trends Genet. 7, 314-317 (1991).
- 113.León J., Lawton M.A., Raskin I., **Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco**, Plant Physiol. 108, 1673-1678 (1995).
- 114.Leutwiler L.S., Hough-Evans B.R., Meyerowitz E.M., **The DNA of *Arabidopsis thaliana***, Mol. Gen. Genet. 194, 15-23 (1984).
- 115.Levine A., Tenhaken R., Dixon R.A., Lamb C., **H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response**, Cell 79, 583-593 (1994).
- 116.Liang P., Pardee A.B., **Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction**, Science 257, 967-970 (1992).
- 117.Lin X. et al., **Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana***, Nature 402, 761-768 (1999).
- 118.Lipshutz R.J., Fodor S.P.A., Gingeras T.R., Lockhart D.J., **High density synthetic oligonucleotide arrays**, Nature Genetics Suppl. 21, 20-24 (1999).
- 119.Lisitsyn N., Lisitsyn N., Wigler M., **Cloning the differences between two complex genomes**, Science 259, 946-950 (1993).
- 120.Liu Q.Y., Baldauf S.L., Reith M.E., **Elongation factor 1a genes of the red alga *Porphyra purpurea* include a novel, developmentally specialized variant**, Plant Mol. Biol. 31, 77-85 (1996).
- 121.Lo Y.Y.C., Cruz T.F., **Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes**, J. Biol. Chem. 270, 11727-11730 (1995).

- 122.Lockhart D.J., Dong H., Byrne M.C., Follettie M.T., Gallo M.V., Chee M.S., Mittmann M., Wang C., Kobayashi M., Horton H., Brown E.L., **Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays**, Nature Biotechnology 14, 1675-1680 (1996).
- 123.Loferer H., Jacobi A., Posch A., Gauss C., Meier-Ewert S., Seizinger B., **Integrated bacterial genomics for the discovery of novel antimicrobials**, Drug Discovery Today 5, 107-114 (2000).
- 124.Lotan T., Fluhr R., **Xylanase, a novel elicitor of pathogenesis-related proteins in tobacco, uses a non-ethylene pathway for induction**, Plant Physiol. 93, 811-817 (1990b).

M

- 125.Manger I.D., Relman D.A., **How the host 'sees' pathogens: global expression responses to infection**, Curr. Opin. Immunology 12, 215-218 (2000).
- 126.Manias T., Fritsch E.F., Sambrook J., **Molecular cloning: a laboratory manual**, Cold Spring Harbor Laboratory Press New York (1982).
- 127.Marshall A., **Getting the right drug into the right patient**, Nature Biotechnology 15, 1249-1252 (1997).
- 128.Marshall A., Hodgson J., **DNA chips: an array of possibilities**, Nature Biotechnology 16, 27-31 (1998).
- 129.Martinez-Zapater J.M., Salinas J., **Arabidopsis Protocols**, Methods in Molecular Biology 82 (1998).
- 130.Martin G.B., Brommonschenkel S.H., Chunwongse J., Frary A., Ganai M.W., Spivey R., Wu T., Earle E.D., Tanksley S.D., **Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato**, Science 262, 1432-1436 (1993).
- 131.Marton M.J., DeRisi J.L., Bennet H.A., Iyer V.R., Meyer M.R., Roberts C.J., Stoughton R., Burchard J., Slade D., Dai H., Basett D.E., Hartwell L.H., Brown P.O., Friend S.H., **Drug target validation and identification of secondary drug target effects using cDNA microarrays**, Nature Medicine 4, 1293-1301 (1998).
- 132.Mauch F., Mauch-Mani L.A., Boller T., **Antifungal hydrolases in pea tissue. II Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase**, Plant Physiol. 88, 936-942 (1988).
- 133.Maxam A.M., Gilbert W., **A new method for sequencing DNA**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74(2), 560-4 (1977).
- 134.Mayer K. et al., **Sequence and analysis of chromosome 4 of the plant *Arabidopsis thaliana***, Nature 402, 769-777 (1999).
- 135.McCue K.R., Conn E.E., **Induction of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase activity by fungal elicitor in cultures of *Petroselinum crispum***, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 7374-7377 (1989).
- 136.McDowell J.M., An Y.-A., Huang S., McKinney E.C., Meagher R.B., **The Arabidopsis ACT7 actin gene is expressed in rapid developing tissues and responds to several external stimuli**, Plant Physiology 111, 699-711 (1996).
- 137.McElroy D., Zhang W., Cao J., Wu R., **Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation**, The Plant Cell 2, 163-171 (1990).
- 138.Meinke D.W., Cherry J.M., Dean C. Rounsley S.D., Koorneef M., **Arabidopsis thaliana: a model plant for genome analysis**, Science 282, 662-682 (1998).
- 139.Meinke D., Tanksley S., **Genome studies and molecular genetics. The maturation and specialization of plant genomics**, Curr. Opin. Plant. Biol. 3, 95-96 (2000).
- 140.Métraux J.P., Singer H., Ryals J., Ward E., Wyss-Benz M., Gaudin J., Rashdorf K., Schmid E., Blum W., Inverardi B., **Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber**, Science 250, 1004-1006 (1990).

141. Meyerowitz E.M., **Arabidopsis, a useful weed**, Cell 56, 263-269 (1989).
142. Meyerowitz E.M., Somerville C.R., **Arabidopsis**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Monograph 27 (1994).
143. Meyerowitz E.M., Pruitt R.E., **Arabidopsis thaliana and plant molecular genetics**, Science 229, 1214-1218 (1985).
144. Michal G. (Hrsg.), **Biochemical Pathways**, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg (1999).
145. Michelson R., **Genomic approaches to plant disease resistance**, Curr. Opin. Plant Biol. 3, 125-131 (2000).
146. Mohr H., Schopfer P., **Pflanzenphysiologie**, Springer-Verlag Heidelberg, 585-592 (1992).
147. Mozo T., Dewar K., Dunn P., Ecker J.R., Fischer S., Kloska S., Lehrach H., Marra M., Martienssen R., Meier-Ewert S., Altmann T., **A complete BAC-based physical map of the Arabidopsis thaliana genome**, Nature Genetics 22, 271-275 (1999).
148. Mullis K.B., **Eine Nachtfahrt und die Polymerase-Kettenreaktion**, Spektrum der Wissenschaft Juni, 60-67 (1990).

N

149. Neuenschwander U., Vernooij B., Friedrich L., Uknes S., Kessmann H., Ryals J., **Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance?**, Plant Journal 8, 227-233 (1995).
150. Newman T., de Bruijn F.J., Green P., Keegstra K., Kende H., McIntosh L., Ohlrogge J., Raikhel N., Somerville S., Thomashow M., Retzel E., Somerville C., **Genes galore: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous Arabidopsis cDNA clones**, Plant Physiology 106, 1241-1255 (1994).
151. Newton C.R., Graham A., **PCR**, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg (1994).
152. Nguyen C., Rocha D., Granjeaud S., Baldit M., Bernard K., Naquet P., Jordan B.R., **Differential gene expression in the murine thymus assayed by quantitative hybridization of arrayed cDNA clones**, Genomics 29, 207-216 (1995).
153. Nierman W.C., Eisen J.A., Fleischmann R.D., Fraser C.M., **Genome data: what do we learn?**, Curr. Opin. Struct. Biol. 10, 343-348 (2000).
154. Nitcholl D.S.T., **Gentechnische Methoden**, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg (1995).
155. Niyogi K.K., Fink G.R., **Two anthranilate synthase genes in Arabidopsis: defense-related regulation of the tryptophan pathway**, The Plant Cell 4, 721-733 (1992).
156. Norris S.R., Meyer S.E., Callis J., **The intron of Arabidopsis thaliana polyubiquitin genes is conserved in location and is a quantitative determinant of chimeric gene expression**, Plant Mol. Biol. 21, 895-906 (1993).

P

157. Penninckx I.A.M.A., Thomma B.P.H.J., Buchala A., Métraux J.-P., Broekaert W.F., **Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis**, The Plant Cell 10, 2103-2113 (1998).
158. Pennisi E., **Finally, the book of life and instructions for navigating it**, Science 288, 2304-2307 (2000).
159. Pickett C.B., Lu A.Y.H., **Glutathione S-transferase: gene structure, regulation and biological function**, Annu. Rev. Biochem 58, 743-764 (1989).

- 160.Pluthero F.G., **Rapid purification of high-activity *Taq* DNA polymerase**, Nucleic Acids Research 21(20), 4850-4851 (1993).
- 161.Polyak K., Xia Y., Zweier J.L., Kinzler K.W., Vogelstein B., **A model for p53-induced apoptosis**, Nature 389, 300-305 (1997).
- 162.Proudnikov D., Timofeev E., Mirzabekov A., **Immobilization of DNA in polyacrylamide gel for the manufacture of DNA and DNA-oligonucleotide microchips**, Anal. Biochem. 259, 34-41 (1998).
- 163.Pruitt R.E., Meyerowitz E.M., **Characterization of the genome of *Arabidopsis thaliana***, J. Mol. Biol. 187, 169-183 (1986).

R

- 164.Ragg H., Kuhn D.N., Hahlbrock K., **Coordinated regulation of 4-coumarate:CoA ligase and phenylalanine ammonia-lyase mRNA in cultured plant cells**, J. Biol. Chem. 10, 10061-10065 (1981).
- 165.Ramsay G., **DNA chips: state-of-the-art**, Nature Biotechnology 16, 40-44 (1998).
- 166.Raz V., Fluhr R., **Calcium requirement for ethylene-dependent responses**, The Plant Cell 4, 1123-1130 (1992).
- 167.Raz V., Fluhr R., **Ethylene signal is transduced via protein phosphorylation events in plants**, The Plant Cell 5, 523-530 (1993).
- 168.Redei G.P., **Arabidopsis as a genetic tool**, A. Rev. Genet. 9, 111-127 (1975).
- 169.Rogers Y.H., Jiang-Baucom P., Huang Z.J., Bogdanov V., Anderson S., Boyce-Jacino M.T., **Immobilization of oligonucleotides onto a glass support via disulfide bonds: a method for preparation of DNA microarrays**, Anal. Biochem. 266, 23-30 (1999).
- 170.Rothberg J.M., Jacobs J.R., Goodman R.S., Artavanis-Tsakonas S., **slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF und LRR domains**, Genes Development 4, 2169-2187 (1990).
- 171.Rounsley S.D., Glodek A., Sutton G., Adams M.D., Somerville C.R., Venter J.C., Kerlavage A.R., (1996), **The construction of Arabidopsis EST assemblies: A new resource to facilitate gene identification**, Plant Physiol. 112, 1179-1183 (1996).
- 172.Rounsley S.D., Glodek A., Sutton G., Adams M.D., Somerville C.R., Venter J.C., Kerlavage A.R., **The construction of Arabidopsis expressed sequence tag assemblies**, Plant Physiology 112, 1177-1183 (1996).
- 173.Ruan Y., Gilmore J., Conner T., **Towards Arabidopsis genome analysis: monitoring expression profiles of 1400 genes using cDNA microarrays**, The Plant Journal 15(6), 821-833 (1998).

S

- 174.Sahnoun I., Déhais P., Van Montagu M., Rossignol M., Rouzé P., **PPMdb: a plant plasma membrane database**, J. Biotechnology 78, 235-246 (2000).
- 175.Saiki R.K., Scharf S.J., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N., **Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia**, Science 230, 1350-1354 (1985).
- 176.Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S. Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A., **Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase**, Science 239, 487 (1988).
- 177.Sanger F., Nicklen S., Coulson AR, **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74(12), 5463-7(1977).

- 178.Santoni V., Dumas P., Rouquie D., Mansion M., Rabilloud T., Rossignol M., **Large scale characterization of plant plasma membrane proteins**, Biochimie 81(6), 655-61 (1999).
- 179.Santoni V., Rouquie D., Dumas P., Mansion M., Boutry M., Degand H., Dupree P., Packman L., Sherrier J., Prime T., Bauw G., Posada E., Rouze P., Dehais P., Sahnoun I., Barlier I., Rossignol M., **Use of a proteome strategy for tagging proteins present at the plasma membrane**, Plant Journal 16(5), 633-41 (1998).
- 180.Shalon D., Smith S.J., Brown P.O., **A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization**, Genome Res. 6, 639-645 (1996).
- 181.Sheen J., Hwang S., Niwa Y., Kobayashi H., Galbraith D.W., **Gree-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells**, The Plant Journal 8(5), 777-784 (1995).
- 182.Sherrier D.J., Prime T.A., Dupree P., **Glycosylphosphatidylinositol-anchored cell-surface proteins from Arabidopsis**, Electrophoresis 20(10):2027-35 (1999).
- 183.Shirasu K., Dixon R.A., Lamb C., **Signal transduction in plant immunity**, Curr. Opin. In Immunology 8, 3-7 (1996).
- 184.Shirasu K., Nakajima H., Rajasekhar V.K., Dixon R.A., Lamb C., **Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms**, Plant Cell 9, 261-270 (1997).
- 185.Smith H.O., Wilcox K.W., **A restriction enzyme from Hemophilus influenzae. I. Purification and general properties**, J Mol Biol. 51, 379-91 (1970).
- 186.Smith L.M., Sanders J.Z., Kaiser R.J., Hughes P., Dodd C., Connell C.R., Heiner C., Kent S.B., Hood L.E., **Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis**, Nature 321(6071), 674-9 (1986).
- 187.Somerville C.R., Meyerowitz E.M., **Arabidopsis**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1994).
- 188.Somerville C., Somerville S., **Plant functional genomics**, Science 285, 30-33 (1999).
- 189.Southern E.M., **Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis**, J. Mol. Biol. 98, 503-517 (1975).
- 190.Southern E.M., Maskos U., Elder J.K., **Analyzing and comparing nucleic acid sequencing by habrisization to arrays of oligonucleotides: evaluation using experimental models**, Genomics 13, 1008-1017 (1992).
- 191.Stryer L., **Biochemie**, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 337 (1991).
- 192.Summermatter K., Sticher L., Métraux., **Systemic responses in Arabidopsis thaliana infected and challenged with Pseudomonas syringae pv syringae**, Plant Physiol. 108, 1379-1385 (1995).
- 193.Sun C.-W., Callis J., **Independent modulation of Arabidopsis thaliana polyubiquitin mRNAs in different organs and in response to environmental changes**, The Plant Journal 11(5), 1017-1027 (1997).

SCH

- 194.Schena M., Heller R.A., Theriault T.P., Konrad K., Lachenmeier E., Davis R.W., **Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics**, Trends in Biotechnology 16, 301-306 (1998).
- 195.Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O., **Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray**, Science 270, 467-470 (1995).
- 196.Schena M., Shalon D., Heller R., Chai A., Brown P.O., Davis R.W., **Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 10614-10619 (1996).

197. Schmidt R., Love K., West J., Lenehan Z., Dean C., **Description of 31 YAC contigs spanning the majority of Arabidopsis thaliana chromosome 5**, Plant Journal 11, 563-572 (1997).
198. Schmidt R., **Synten: recent advances and future prospects**, Curr. Opin. Plant. Biol. 3, 97-102 (2000).
199. Schmidt R., West J., Love K., Lenehan Z., Lister C., Thompson H., Bouchez D., Dean C., **Physical map and organization of Arabidopsis thaliana chromosome 4**, Science 270, 480-483 (1995).

T

200. Tang X., Frederick R.D., Zhou J., Haltermann D.A., Jia Y., Martin G.B., **Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase**, Science 274, 2060-2063 (1996).
201. Thiellement H., Bahrman N., Damerval C., Plomion C., Rossignol M., Santoni V., de Vienne D., Zivy M., **Proteomics for genetic and physiological studies in plants**, Electrophoresis 20(10), 2013-26 (1999).

U

202. Uknes S., Mauch M.B., Moyer M., Potter S., Williams S., Dincher S., Chandler D., Slusarenko A., Ward E., Ryals J., **Acquired resistance in Arabidopsis**, Plant Cell 4, 645-656 (1992).
203. Uknes S., Dincher S., Friedrich L., Negrotto D., Williams S., Thompson-Taylor H., Potter S., Ward E., Ryals J., **Regulation of pathogenesis-related protein-1a gene expression in tobacco**, The Plant Cell 5, 159-169 (1993).

V

204. van Hal N.L.W., Vorst O., van Houwelingen A.M.M.L., Kok E.J., Peijnenburg A., Aharoni A., van Tunen A.J., Keijer J., **The application of microarrays in gene expression analysis**, J. Biotechnology 78, 271-280 (2000).
205. van Tegelen L.J.P., Bongaerts R.J.M., Croes A.F., Verpoorte R., Wullems G.J., **Isochorismate synthase isoforms from elicited cell cultures of Rubia tinctorum**, Phytochemistry 51, 263-269 (1999).
206. Vaux D.L., Haecker G., Strasser A., **An evolutionary perspective on apoptosis**, Cell 76, 777-779 (1994).
207. Velculescu V.E., Zhang L., Vogelstein B., Kinzler K.W., **Serial analysis of gene expression**, Science 270, 484-487 (1995).
208. Velculescu V.E., Zhang L., Zhou W., Vogelstein J., Basrai M.A., Bassett D.E. Jr., Hieter P., Kinzler J., Vogelstein B., Kinzler K.W., **Characterization of the yeast transcriptome**, Cell 88, 243-251 (1997).
209. Vernooij B., Uknes S., Ward E., Ryals J., **Salicylic acid as a signal molecule in plant-pathogen interactions**, Curr. Opin. Cell Biology 6, 275-279 (1994).
210. Vogeli U., Vogeli-Lange R., Chappel J., **Inhibition of phytoalexin biosynthesis in elicitor-treated tobacco cell suspension cultures by calcium/calmodulin antagonists**, Plant Physiol. 100, 1369-1376 (1992).
211. von Stein O.D., Thies W.-G., Hofmann M., **A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes**, Nucleic Acids Research 25(13), 2598-2602 (1997).

W

212. Walter G., Büsow K., Cahill D., Lueking A., Lehrach H., **Protein arrays for gene expression and molecular interaction screening**, Curr. Opin. Microbiology 3, 298-302 (2000).
213. Wambutt R. et al., **Progress in Arabidopsis genome sequencing and functional genomics**, J. Biotechnology 78, 281-292 (2000).

214. Wang K., Gan Lu., Jeffery E., Gayle M., Gown A.M., Skelly M., Nelson P.S., Ng W.V., Schummer M., Hood L., Mulligan J., **Monitoring gene expression profile changes in ovarian carcinomas using cDNA microarrays**, *Gene* 229, 101-108 (1999).
215. Ward E.R., Uknes S.J., Williams S.C., Dincher S.S., Wiederhold D.L., Alexander D.C., Ahl-Goy P., Métraux J.P., Ryals J.A., **Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance**, *Plant Cell* 3, 1085-1094 (1991).
216. Watson J.D., Crick F.H.C., **Molecular structure of nucleic acids: a structure of deoxyribose nucleic acid**, *Nature* 171, 737-738 (1953).
217. Wee G.-T., Sherrier D.J., Prime T.A., Dupree P., **Targeting of active Sialyltransferase to the plant golgi apparatus**, *Plant Cell* 10, 1759-1768 (1998).
218. Welford S.M., Gregg J., Chen E., Garrison D., Sorensen P.H., Denny C.T., Nelson S.F., **Detection of differentially expressed genes in primary tumor tissues using representational differences analysis coupled to microarray hybridization**, *Nucleic Acids Research* 26(12), 3059-3065 (1998).
219. Welsh J., Chada K., Dalal S.S., Cheng R., McClelland M., **Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA**, *Nucleic Acids Research* 20, 4965-4970 (1992).
220. White B.A., Bancroft F.C., **Cytoplasmic dot hybridization**, *J. Biol. Chem.* 257(15), 8569-8572 (1982).
221. White K.P., Rifkin S.A., Hurban P., Hogness D.S., **Microarray analysis of Drosophila development during metamorphosis**, *Science* 286, 2179-2184 (1999).
222. Whitham S., Dinesh-Kumar S.P., Choi D., Hehl R., Corr C., Baker B., **The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to Toll and the interleukin-1 receptor**, *Cell* 78, 1101-1115 (1994).
223. Williams P., Ketley J., Salmond G., **Bacterial Pathogenesis**, *Methods in Microbiology* Vol. 27(1998).
224. Wodicka L., Dong H., Mittman M., Ho M.H., Lockhart D.J., **Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae***, *Nature Biotechnology* 15, 1359-1367 (1997).
225. Wu G., Shortt B.J., Lawrence E.B., Levine E.B., Fitzsimmons K.C., Shah D.M., **Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants**, *Plant Cell* 7, 1357-1368 (1995).

Y

226. Yang G.P., Ross D.T., Kuang W.W., Brown P.O., Weigel R.J., **Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes**, *Nucleic Acids Research* 27(6), 1517-1523 (1999).

Z

227. Zachgo E.A., Wang M.L., Dewdney J., Bouchez D., Camilleri C., Belmonte S., Huang L., Dolan M., Goodman H.M., **A physical map of chromosome 2 of *Arabidopsis thaliana***, *Genome Research* 6, 19-25 (1996).
228. Zhao J., Williams C.C., Last R.L., **Induction of *Arabidopsis* tryptophan pathway enzymes and camalexin by amino acid starvation, oxidative stress, and an abiotic elicitor**, *The Plant Cell* 10, 359-370 (1998).
229. Zhou J., Goldsbrough P.B., **An *Arabidopsis* gene with homology to glutathione S-transferase is regulated by ethylene**, *Plant Mol. Biol.* 22, 517-523 (1993).
230. Zhu Q., Maher E.A., Masoud S., Dixon R.A., Lamb C.J., **Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco**, *Bio/Technology* 12, 807-812 (1994).
231. Zweiger G., **Knowledge discovery in gene-expression-microarray data: mining the information output of the genome**, *TIBTECH* 17, 429-436 (1999).

VIII. Publikationsliste

M. Frohme, N. Hauser, M. Scheideler, F. Diehl, M. Beier, S. Würtz, J.D. Hoheisel

Chips, arrays and other hybridisation based techniques for genome and transcriptome characterisation

Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer (Editor: T.M. Gress), IOS, Amsterdam, Netherlands

M. Beier, S. Matysiak, N. Hauser, M. Scheideler, S. Würtz, K. Fellenberg, M. Vingron, J.D. Hoheisel

DNA Microchips: Transcriptional Profiling and Beyond

Chimia 54, No. 1/2, 29-30 (2000).

T. Beißbarth, K. Fellenberg, B. Brors, R. Arribas-Prat, J. Boer, N.C. Hauser, M. Scheideler, J.D. Hoheisel, G. Schütz, A. Poustka, M. Vingron

Comparison and quality measures of DNA array hybridisation data

Bioinformatics 16, 1014-1022 (2000).

N.C. Hauser, M. Scheideler, S. Matysiak, M. Vingron, J.D. Hoheisel

DNA Arrays for Transcriptional Profiling

Methods in Microbiology, Volume 28, 193-204 (1999).

N.C. Hauser, M. Vingron, M. Scheideler, B. Krems, K. Hellmuth, K.D. Entian, J.D. Hoheisel

Transcriptional Profiling on all Open Reading Frames of *Saccharomyces cerevisiae*

Yeast, Volume 14, 1209-1221 (1998).

N. Hauser, M. Scheideler, J.D. Hoheisel

DNA-Chip Technology as a Tool for Gene Expression Studies

DKFZ Current Cancer Research 1998, 185-187 (1998).

N. Hauser, M. Scheideler, J.D. Hoheisel

DNS-Chip-Technologie zur Untersuchung von Genaktivität

DKFZ Krebsforschung heute, 190-193 (1998).