

Lehrstuhl für Botanik  
der Technischen Universität München

Untersuchungen zur Transkriptionsänderung in *Arabidopsis thaliana*  
nach Cäsium- und Radiocäsium-Applikation

Tobias Michael Sahr

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für  
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur  
Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. W. Höll

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. E. Grill  
2. Priv.-Doz. Dr. J. Durner

Die Dissertation wurde am 21.07.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung  
und Umwelt am 30.10.2003 angenommen.



## Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	1
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	3
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	6
<i>Zusammenfassung</i>	8
<b>1. Einleitung</b>	<b>10</b>
<b>1.1 Cäsium – Chemische Eigenschaften und Verwendung</b>	<b>13</b>
<b>1.2 Cäsium – Vorkommen und Aufnahme</b>	<b>14</b>
<b>1.3 Cäsium – Anreicherung in der Nahrungskette und Wirkung im Organismus</b>	<b>18</b>
<b>1.4 Strahlenbiophysik und Strahlenschutz</b>	<b>20</b>
1.4.1 <i>Strahlenarten und Dosimetrie</i>	20
1.4.2 <i>Biologische Strahlenwirkung und Reparaturprozesse</i>	23
1.4.3 <i>Strahlenschäden beim Menschen und Strahlenschutz</i>	27
<b>1.5 Tschernobyl und die Folgen</b>	<b>28</b>
<b>1.6 Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>31</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>32</b>
<b>2.1 Chemikalien</b>	<b>32</b>
<b>2.2 Geräte</b>	<b>34</b>
<b>2.3 Bakterienstämme und Plasmide</b>	<b>35</b>
<b>2.4 Pflanzenanzucht</b>	<b>37</b>
<b>2.5 Cäsiumbehandlung</b>	<b>39</b>
<b>2.6 Isolierung von RNA</b>	<b>40</b>
2.6.1 <i>LiCl-Methode (nach Russell and Nurse, 1986)</i>	41
2.6.2 <i>TRIzol-Methode</i>	41
2.6.3 <i>Poly(A)<sup>+</sup>-RNA Isolierung</i>	42
<b>2.7 Gelelektrophorese</b>	<b>42</b>
2.7.1 <i>Nicht-denaturierende Agarose-Gele</i>	42
2.7.2 <i>Denaturierende Agarose-Gele</i>	43
2.7.3 <i>Isolierung von DNA aus Agarosegelen</i>	43
<b>2.8 Enzymatische Modifikationen an Nucleinsäuren</b>	<b>44</b>
2.8.1 <i>cDNA-Synthese</i>	44
2.8.2 <i>Restriktionsanalyse</i>	45
2.8.3 <i>Ligation</i>	45
<b>2.9 Transformation und Plasmid-Isolierung</b>	<b>46</b>
2.9.1 <i>Herstellung kompetenter Zellen</i>	46
2.9.2 <i>Transformation kompetenter Zellen</i>	46
2.9.3 <i>Isolierung von Plasmid-DNA</i>	47
<b>2.10 Polymerasekettenreaktion (PCR)</b>	<b>47</b>
2.10.1 <i>Allgemeine PCR</i>	47
2.10.2 <i>Semiquantitative PCR mit pAW109 Standard</i>	48
2.10.3 <i>Quantitative real time (RT)-PCR</i>	50
2.10.4 <i>In-situ PCR</i>	52

<b>2.11 RNA-Blotting</b>	<b>53</b>
2.11.1 Northern-Blotting	53
2.11.2 Slot-Blotting	54
2.11.3 Hybridisierung der RNA-Blots	54
<b>2.12 Subtraktive-Suppressions-Hybridisierung (SSH)</b>	<b>54</b>
2.12.1 Herstellung der Tester und Driver	57
2.12.2 Subtraktive Hybridisierung	58
2.12.3 Suppressions-PCR	59
<b>2.13 Screening der subtraktiven cDNA-Bank mit Hilfe der Array-Technologie</b>	<b>60</b>
2.13.1 Herstellung der Makroarray-Membranen	61
2.13.2 Radioaktive Markierung der cDNA-Sonden	62
2.13.3 Hybridisierung der Makroarray Membranen	63
2.13.4 Analyse der radioaktiven Signale	63
2.13.5 Sequenzanalysen	64
<b>2.14 RNA-Interferenz (RNAi) und Überexpression von Genen</b>	<b>64</b>
2.14.1 Herstellung der Expressionsvektoren	66
2.14.2 Transformation von Arabidopsis-Pflanzen	69
2.14.3 DNA-Isolierung aus Pflanzen (CTAB-Methode)	69
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>70</b>
<b>3.1 Bestimmung des toxischen Schwellenwertes</b>	<b>70</b>
<b>3.2 Aufnahme von Cäsium und Kalium</b>	<b>73</b>
<b>3.3 Untersuchungen zur Transkriptionsänderung</b>	<b>76</b>
3.3.1 Ergebnisse der Subtraktive-Suppressions-Hybridisierung	76
3.3.2 Selektion positiver Klone mit Hilfe von Makroarrays	78
3.3.3 Reproduzierbarkeit der Hybridisierung	79
<b>3.4 Differenziell exprimierte Gene</b>	<b>80</b>
3.4.1 Induktion/Repression durch Cäsium-133 Stress	80
3.4.2 Induktion/Repression durch ionisierende Strahlung (Cs-134)	99
3.4.3 SSH-Vergleich von Wildtyp und csi52-Transportermutante	108
3.4.4 Ergänzende Analyse ausgewählter Gene mittels RT-PCR	108
3.4.5 Vergleich von Cäsium-133 und Radiocäsium-Experimenten	111
3.4.6 Transkriptionsverhalten verschiedener Kalium-Aufnahmesysteme	115
<b>3.5 Ergebnisse der In-situ PCR</b>	<b>118</b>
<b>3.6 RNAi und Überexpression verschiedener Kalium-Kanäle in Arabidopsis thaliana</b>	<b>119</b>
<b>4. Diskussion</b>	<b>123</b>
<b>5. Literaturverzeichnis</b>	<b>145</b>
<b>6. Anhang</b>	<b>157</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1- 1	Stresskonzept nach Beck und Lüttge, 1990.....	11
Abbildung 1- 2	Vereinfachte Zerfallsschemata von Cäsium-137 und Cäsium-134 .....	14
Abbildung 1- 3	Vergleich wichtiger chemischer Parameter für die Aufnahme von Ionen in die Zelle.....	15
Abbildung 1- 4	Kalium-Aufnahme am Beispiel eines Kalium/Protonen-Transporters .....	16
Abbildung 1- 5	Prinzip eine Kalium-Kanals .....	17
Abbildung 1- 6	Transferfaktoren für Cäsium (Quelle: IFEU-Bericht Nr. 43) .....	19
Abbildung 1- 7	Wechselwirkungen der Wellenstrahlung mit der Materie .....	21
Abbildung 1- 8	Strahlen- und Gewebegewichtungsfaktoren (nach StrlSchV, 1989).....	22
Abbildung 1- 9	Schematische Darstellung der wichtigsten Reparatursysteme bei der Behebung von Schäden an der DNA durch ionisierende Strahlen.....	26
Abbildung 1- 10	Grenzwerte der Körperdosen für beruflich strahlenexponierte Menschen pro Jahr (StrlSchV, 1989) .....	28
Abbildung 1- 11	Geschätzte durchschnittliche effektive Dosis der Bevölkerung kontaminierter Gebiete (1986-1995).....	29
Abbildung 1- 12	Normalisierte effektive Dosis von Radiocäsium durch interne Exposition auf die ländliche Bevölkerung der Ukraine unter Berücksichtigung der Bodenbeschaffenheit.....	29
Abbildung 1- 13	Durchschnittliche effektive Dosis durch interne Exposition in Abhängigkeit der Depositionsdichte von Cäsium-137 in Weißrussland .....	30
Abbildung 2- 1	<i>Arabidopsis thaliana</i> .....	37
Abbildung 2- 2	Anzucht in Erlenmeyerkolben (links), Phytatray (rechts).....	39
Abbildung 2- 3	Verlauf der sigmoidalen Sättigungskurve einer PCR-Reaktion .....	49
Abbildung 2- 4	Beispiel: Induktionsbestimmung mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR.....	49
Abbildung 2- 5	Pipettierschema in der Mikrotiterplatte (links); rechts: Amplifikationsplot .....	51
Abbildung 2- 6	Aufbau eines Kapillarblots .....	53
Abbildung 2- 7	Grundprinzip der Subtraktiven-Hybridisierung .....	55
Abbildung 2- 8	Ablauf der Suppressions-PCR.....	56
Abbildung 2- 9	Ausschnitt aus einer Array-Membran: Vergleich zwischen <i>ssh-</i> (rechts) und <i>ssh+</i> (links) Hybridisierung; die Pfeile zeigen unterschiedlich exprimierte Gene an.....	60
Abbildung 2- 10	Anordnung der Spots auf einem Makroarray-Filter .....	61
Abbildung 2- 11	Hypothetisches RNAi-Modell .....	65
Abbildung 2- 12	Prinzip der GATEWAY-Technologie: Synthese des Entry-Vektors .....	67
Abbildung 2- 13	LR-Klonierung: Integration des Genes in den entsprechenden Vektors durch.....	68
Abbildung 3- 1	Blattrosetten von <i>Arabidopsis thaliana</i> nach Anzucht auf Medien mit unterschiedlichen Cäsium-Konzentrationen.....	71
Abbildung 3- 2	Cäsium-Aufnahme in die Blätter (Anzucht auf 25% MS-Medium).....	71
Abbildung 3- 3	Blattrosetten und Infloreszenz von <i>Arabidopsis thaliana</i> nach Anzucht auf Medien mit unterschiedlichen Cäsium-134-Aktivitäten (in Bq/cm <sup>3</sup> ) .....	72
Abbildung 3- 4	Kalium- und Cäsium-Aufnahme unter physiologischen Kaliumbedingungen (0,7mM) ...	73
Abbildung 3- 5	Cäsium-Aufnahme in verschiedene Transportermutanten .....	74
Abbildung 3- 6	Radiocäsium-Aufnahme in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	75
Abbildung 3- 7	Ligations- und Subtraktions-Test der SSH mit Hilfe der Glycerinaldehydphosphat- Dehydrogenase (GapDH).....	76
Abbildung 3- 8	Beispiele für subtraktive cDNA-Banken.....	77
Abbildung 3- 9	Arrays nach der Hybridisierung mit den verschiedenen radioaktiv-markierten Sonden .	78
Abbildung 3- 10	Reproduzierbarkeit der Array-Hybridisierungen (b: Steigung, r <sup>2</sup> : Bestimmtheitsmaß) ...	79
Abbildung 3- 11	Alphabetische Liste differentiell exprimierter Gene nach Cäsium-Behandlung (rot markierte Klone wurden durch RT-PCR verifiziert).....	81
Abbildung 3- 12	Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): Δ-1-Pyrrolin-5-carboxylat-Synthase (At3g55610).....	83
Abbildung 3- 13	Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw): ATP Sulfurylase/APS Kinase (At3g22890).....	83
Abbildung 3- 14	Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): Limonen-Cyclase (At3g25830).....	84
Abbildung 3- 15	Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw): HAT7 (At3g01220) .....	85

Abbildung 3- 16	Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw): Eukaryotischer Translations Initiationsfaktor 3 subunit 8 (At3g56150) .....	86
Abbildung 3- 17	Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): putativer AP2 Domäne Transkriptionsfaktor (At1g72360) .....	87
Abbildung 3- 18	Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw): c2h2-Typ Zink-Finger Domäne Transkriptionsfaktor (At1g72050).....	88
Abbildung 3- 19	Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): Chaperon hsc70.1 (At5g02500).....	88
Abbildung 3- 20	Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw): Peptidylprolyl Isomerase – Cyclophilin (At4g34870).....	89
Abbildung 3- 21	Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): putativer Kupfer-Chaperon der SOD (At1g12520) .....	90
Abbildung 3- 22	Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw): Dr4 putativer Protease Inhibitor (At1g73330).....	91
Abbildung 3- 23	Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw): high affinity Nitrat-Transporter (At1g08090).....	92
Abbildung 3- 24	Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): Dehydratation-induziertes Protein (Erd15) (At2g41430).....	92
Abbildung 3- 25	Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): Osmotin Präcursor (at4g11650).....	93
Abbildung 3- 26	Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): Aquaporin – Plasma intrinsic Protein PiP2b (At2g37170).....	94
Abbildung 3- 27	Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): $\beta$ -1,3-Glucanase I Präcursor (At4g16260) .....	95
Abbildung 3- 28	Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): putative Endochitinase (At2g43570) .....	96
Abbildung 3- 29	Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw): Glutathion-S-Transferase (At1g02920) .....	97
Abbildung 3- 30	Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): Superoxid Dismutase (AtAt1g08830).....	97
Abbildung 3- 31	Alphabetische Liste differentiell exprimierter Gene nach Radiocäsium-Behandlung (rot markierte Klone wurden durch RT-PCR verifiziert).....	100
Abbildung 3- 32	Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): Zellzyklus-Kontrolle crn-like Protein (At5g41770) .....	102
Abbildung 3- 33	Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): Mitose-spezifisches CyclinB1 (At5g09150) .....	102
Abbildung 3- 34	Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): Profilin 2 (At4g29350).....	103
Abbildung 3- 35	Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): Tubulin alpha-5 Untereinheit (At5g19780).....	103
Abbildung 3- 36	Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): putatives Auxin-reguliertes Protein (At2g33830).....	105
Abbildung 3- 37	Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): DNA-Excisions-Reparatur Protein (At5g46890).....	105
Abbildung 3- 38	Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): Thioredoxin (At5g42980).....	106
Abbildung 3- 39	Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw): Stress-induziertes kin1/kin2-Protein (At5g15970/60).....	107
Abbildung 3- 40	RT-PCR Transkriptionsfaktor Dreb2a (At5g054190) .....	109
Abbildung 3- 41	RT-PCR Transkriptionsfaktor Dreb1a (At4g25481) .....	109
Abbildung 3- 42	RT-PCR Transkriptionsfaktor AtMyb4 (At5g26660).....	110
Abbildung 3- 43	RT-PCR DNA-Reparatur und Meiose Protein Mre11 (At5g54260).....	111
Abbildung 3- 44	VENN-Diagramm: Vergleich der Stressoren Cäsium-133 und Radiocäsium (Cs-134) .	112
Abbildung 3- 45	Beispiele einiger Gene, die entweder durch Cäsium-133 oder durch Radiocäsium induziert bzw. repimiert werden .....	113
Abbildung 3- 46	Dosisabhängige Genexpression der Superoxid Dismutase und Zeitabhängige Genexpression des Thioredoxin.....	114
Abbildung 3- 47	Synergistische Effekte von Cäsium-133 und ionisierender Strahlung (R2+) .....	114
Abbildung 3- 48	Geninduktion verschiedener Kalium-Transporter nach Behandlung mit Cäsium-133, Vergleich von Wildtyp und Cäsium-toleranter csi52- Mutante .....	116

Abbildung 3- 49	Zeitabhängige Geninduktion verschiedener Kalium-Kanäle nach Behandlung mit Cäsium-133, Vergleich von Wildtyp und Cäsium-toleranter <i>csi52</i> - Mutante.....	117
Abbildung 3- 50	Konzentrationsabhängige Geninduktion zweier Kalium-Kanäle in <i>Arabidopsis</i> -Wildtyp118	
Abbildung 3- 51	Wurzelquerschnitt; In-situ PCR der Kontrollen und der verschiedenen Kalium-Kanäle ( <i>ATKC</i> , <i>ACBK1</i> , <i>KCO</i> ) und -Transporter ( <i>AtKup1</i> ).....	119
Abbildung 3- 52	<i>AttB</i> -Volllänge-PCR der Gene <i>KCO</i> und <i>ATKC</i> (roter Pfeil) .....	120
Abbildung 3- 53	Ausschnitt aus dem Sequenzvergleich des Entry-Klones und dem Gen des <i>ACBK1</i> Kaliumkanal .....	121
Abbildung 3- 54	Überprüfung des korrekten Einbaus der Inserts für die Gene für die Kalium-Kanäle durch Restriktionsverdau .....	122
Abbildung 4- 1	Durchschnittliche relative Induktionswerte der ATP-Sufurylase, Glutathion-S-Transferase und der Superoxid-Dismutase .....	127
Abbildung 4- 2	Vergleich der Transkriptionsänderung einiger Gene des Protein-Metabolismus.....	129
Abbildung 4- 3	Vergleich des zeitlichen Verlaufs der relativen Induktionen der Gene für ein Excisions-Reparatur Protein und des <i>Mre11</i> Protein (Teil der Rekombinations-Reparatur) .....	130
Abbildung 4- 4	Schematische Darstellung des Zellzyklus .....	135
Abbildung 4- 5	Vorgänge in einer Säugerzelle nach Strahlenwirkung.....	137
Abbildung 4- 6	Vergleich Cäsium und ionisierende Strahlung.....	140

## **Abkürzungsverzeichnis**

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewicht pro Volumenprozent
+	Vierwöchige Applikation von 150µM Cäsium-133
°C	Grad Celsius
µCi	Mikro-Curie
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
1,5w	Eineinhalbwöchige Applikation von 150µM Cäsium-133
100	Applikation von 100µM Cäsium-133
200	Applikation von 200µM Cäsium-133
300	Applikation von 200µM Cäsium-133
3d	Dreitägige Applikation von 150µM Cäsium-133
a	Jahre
bp	Basenpaare
Bq	Becquerel
c	Kontroll-Experiment
cDNA	komplementäre DNA
d	Tage
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	2'-Desoxynucleotid-5'-Triphosphat
eV	Elektronenvolt
F	Farad
FG	Frischgewicht
GST	Glutathion-S-Transferase
Gy	Gray
h	Stunde
kb	Kilobasenpaare
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
m	Meter
M	molar (mol/l)
mA	Milliamper
min	Minuten
MIPS	Munich Information Center for Protein Sequences OD Optische Dichte



Ω	Ohm
p.a.	pro analysi
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	pondus hydrogenii
R1	Applikation von 10Bq/cm <sup>3</sup> Cäsium-134
R2	Applikation von 20Bq/cm <sup>3</sup> Cäsium-134
R2+	Applikation von 20Bq/cm <sup>3</sup> Cäsium-134 + 100μM Cäsium-133
R3	Applikation von 60Bq/cm <sup>3</sup> Cäsium-134
RNA	Ribonucleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SSH	Subtraktive-Suppressions-Hybridisierung
ssh-	vorwärts-subtrahierte cDNA-Bank
ssh+	rückwärts- subtrahierte cDNA-Bank
ssh1,2-	vorwärts-nicht-subtrahierte cDNA-Bank
ssh1,2+	rückwärts-nicht-subtrahierte cDNA-Bank
Sv	Sievert
TF	Transkriptionsfaktor
TG	Trockengewicht
U	Unit
V	Volt
W	Watt
w	Wochen
WT	Wildtyp

## **Zusammenfassung**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, anhand des Transkriptionsmusters von zahlreichen Stressgenen die Wirkungsweise von Cäsium und ionisierender Strahlung auf den Stoffwechsel von *Arabidopsis thaliana* zu charakterisieren. Die Kombination der Subtraktiven-Suppressions-Hybridisierung und der Makroarray-Technologie erwies sich als eine sehr sensitive Methode, um eine Vielzahl von differentiell exprimierten Genen mit hoher Reproduzierbarkeit und hohem Durchsatz zu analysieren. Mit der quantitativen und semiquantitativen PCR bestand zudem die Möglichkeit, auch schwach induzierte oder reprimierte Gene effektiv verifizieren zu können.

Cäsium- und Kalium-Ionen besitzen große chemische Gemeinsamkeiten. Während Kalium jedoch für die Pflanze essentiell ist, besitzt Cäsium keine bekannten physiologischen Funktionen.

Folgende Reaktionen der Pflanze auf erhöhte Cäsium-133 Konzentrationen (150µM) in der Umgebung konnten auf Transkriptionsebene nachgewiesen werden:

- Eine verstärkte Transkription von Redoxenzymen (Superoxid-Dismutase, Thioredoxin, Peroxidase) und die Induktion der Schwefelaufnahme bzw. die Synthese schwefelhaltiger Verbindungen.
- Induktion und Repression von Enzymen auf Genebene, die sowohl bei der Stabilisierung (Chaperone, Heat-shock Proteine) als auch beim Abbau von Proteinen (Peptidasen, Protease-Inhibitoren) eine Rolle spielen.
- Eine erhöhte Transkriptionsrate von Genen, deren Produkte als Schutzstoffe für Makromoleküle oder als osmotisch wirksame Substanzen fungieren können (Prolin, Osmotin, LEA-Proteine, etc.). Parallel wurde die Expressionsrate verschiedener Aquaporin-Gene verringert.

Radiocäsium (Cäsium-134) wurde nur in sehr geringen Konzentrationen und Aktivitäten (30Bq/cm<sup>3</sup>) in den Versuchen eingesetzt, da vor allem die Langzeitwirkung schwacher ionisierender Strahlung auf Genebene untersucht werden sollte. Dementsprechend waren deutliche Unterschiede in der Stressantwort der Pflanze im Vergleich zu den Cäsium-133 Experimenten zu erkennen:

- Verstärkte Transkription von Genen des Excisions-Reparatur-Systems und der Rekombination-Reparatur.
- Beeinflussung der Zellteilung durch Induktion des Genes des CylinB1 und anderer Zellzyklus-kontrollierender Gene. Zudem wurden einige Enzyme des Cytoskelett-Stoffwechsels auf Transkriptionsebene beeinträchtigt (Profilin2, putativer Actin-depolymerisierender Faktor,  $\alpha$ -5 Tubulin).

- Analog zu den Cäsium-133 Versuchen wurde eine Induktion von Enzymen des oxidativen Stresses gefunden (Superoxid-Dismutase, Thioredoxin, Katalase).

Genfunktion	Cäsium induziert (reprimiert)	Radiocäsium induziert (reprimiert)
1. Metabolismus	9 (5)	3 (2)
2. Energie	2	1
3. Zellwachstum, Zellteilung und Entwicklung	1 (2)	7
4. Kontrolle der Transkription und Translation	7 (2)	3 (1)
5. Proteinsynthese, Proteinfaltung und Modifikation	6 (2)	1
6. Transport und Homöostase	11 (4)	1
7. Zelluläre Kommunikation und Signaltransduktion	2	2
8. Zellabwehr, Stressantwort und Detoxifikation	16	10
9. Unbekannte und hypothetische Proteine	11 (1)	17 (2)

Aufnahmeexperimente mit Cäsium und Radiocäsium zeigten, dass das Alkalimetall in der Pflanze in Abhängigkeit zur externen Konzentration akkumuliert wurde; gleichzeitig nahm die Kaliumkonzentration in *Arabidopsis* ab. Bei hohen Cäsiumkonzentrationen traten an den Blättern Welkeerscheinungen und nekrotische Veränderungen auf. Zudem wurde bei *Arabidopsis thaliana* das Wachstum von Wurzeln und später von Blättern reduziert. Diese Symptome waren dabei stark von der Kaliumkonzentration im Medium abhängig, weshalb der toxische Schwellenwert als Cäsium/Kalium-Verhältnis angegeben werden sollte. Er schwankte zwischen 500µM (bei 0,7mM Kalium) und 1mM (bei 2mM Kalium). Bei Kalium-Konzentrationen von 8mM waren die Pflanzen sogar noch bis 2mM Cäsium lebensfähig.

Schwache Strahlung hatte keine Auswirkungen auf den Phänotypen. Erst bei Aktivitäten von 60Bq/cm<sup>3</sup> im Medium wurde ein reduziertes Wachstum festgestellt.

Ein Vergleich verschiedener Kalium-Transportermutanten mit dem Wildtyp ergab keine Erkenntnisse über das Aufnahmeverhalten von Cäsium. Ausnahme hiervon war eine AKT1 Knockout-Mutante, die bereits bei Konzentrationen von 250µM Cäsium (bei 0,7mM Kalium) das Wachstum im Keimlingsstadium einstellte und abstarb. Bei der *csi52*-Mutante konnte eine reduzierte Cäsium-Aufnahme beobachtet werden; parallel dazu wurde auf Genebene eine verstärkte Transkription verschiedener Kaliumkanäle (KCO, ATKC) im Vergleich zum Wildtyp festgestellt.

Zur Klärung des Phänomens wurden erste Versuche unternommen, Gene verschiedener Kanäle in *Arabidopsis thaliana* überzuexprimieren bzw. auszuschalten (RNAi); die Transformanten könnten dabei als Grundlage für zukünftige Studien zur Cäsium-Aufnahme in Pflanzen dienen.

### **1. Einleitung**

Pflanzen sind sesshafte Organismen, die – um den Bedarf an Nährstoffen decken zu können – eine starke Oberflächenvergrößerung erfahren haben. Aus diesem Grund kommunizieren sie auf besonders intensive Art und Weise mit ihrer Umgebung; umgekehrt wirken zu jeder Zeit zahlreiche Umweltfaktoren auf einen Organismus ein. Diese Umweltfaktoren können biotischer und abiotischer Art sein. Biotische Faktoren bei Pflanzen sind z.B. Infektionen oder Parasiten, Wechselwirkungen mit Tieren, aber auch andere, um Nährstoffe oder Licht konkurrierende Pflanzen. Zu den wichtigsten abiotischen Faktoren zählen das Wasserangebot, Temperaturschwankungen, veränderte Salzkonzentrationen und Lichtmangel.

Weichen diese Faktoren von ihrem physiologischen Optimum ab, so wirken sie schädigend auf den Organismus und führen zu einer Beeinträchtigung des Stoffwechsels und der Entwicklung. Diese suboptimalen inneren und äußeren Reize werden als Stressoren bezeichnet. Demgegenüber stehen die Umwelttoxine, von denen es keine optimalen Konzentrationen und Intensitäten gibt, wie z.B. Schwermetalle, Ozon, ionisierende Strahlen und auch Cäsium. Sie sind meist anthropogenen Ursprungs und können bereits in geringen Mengen Pflanzen, Tiere und Menschen schädigen.

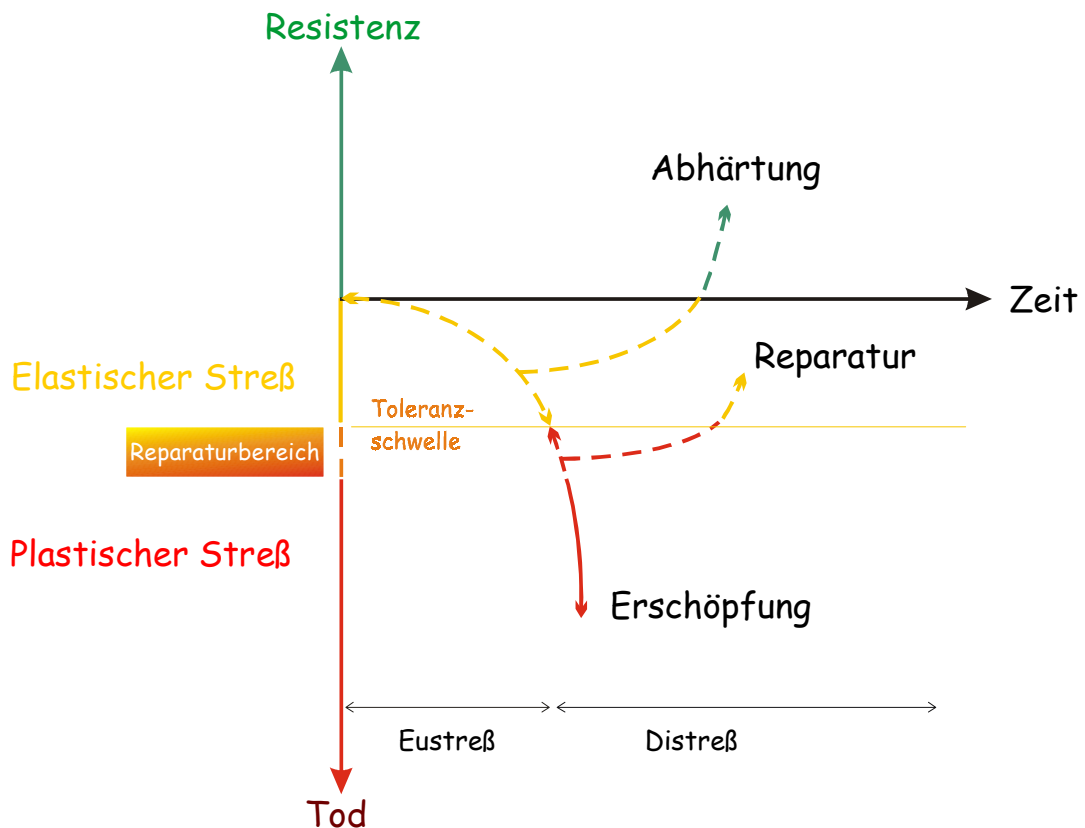
Unter Stress versteht man die vielfältige physiologische Anpassung (Adaptation) an die Stressfaktoren (Selye, 1936). Dieses als „Allgemeines Stresssyndrom“ bezeichnete Symptom wurde von Levitt (1980) weiterentwickelt, wobei er elastischen Stress, der reversible Schäden verursacht, und irreversibel wirkenden plastischen Stress unterschied.

Auf biologische Systeme ist dieses Konzept jedoch nach wie vor nur bedingt anwendbar, da wichtige Parameter wie die Dauer des Stresses (Zeitfaktor) und Reparaturprozesse nicht berücksichtigt werden. Dadurch kann zum Beispiel ursprünglich elastischer Stress zu irreversiblen Schäden führen, aber auch irreversible Schäden können durch Reparatur wieder in elastischen übergehen. Zudem sind Pflanzen in der Lage sich den veränderten Situationen anzupassen und Resistenzen zu entwickeln. Das kann zum einen durch Vermeidung des Stresses (z.B. durch Ausbildung von Morphosen wie Sukkulenz gegen Wassermangel oder Dornen und chemische Abwehrstoffe gegen Fraßfeinde) oder auch durch molekulare und biochemische Anpassung (echte Toleranz) geschehen.

Von Larcher (1987) wurden daher das allgemeine Anpassungssyndrom in drei Phasen unterteilt:

1. Alarmreaktion (Destabilisierung des Systems)
2. Widerstandsstadium (Restitution: Adaptation, Reparatur, Toleranz)
3. Erschöpfungsphase (chronische Schädigung und Absterben)

Liegt die Abweichung von der optimalen Situation im tolerierbaren Bereich, so erfolgt eine Abhärtung der Pflanze. Wird in der Alarmphase jedoch eine kritische Toleranzschwelle erreicht, so wird Schaden verursacht, der – falls er das Reparaturvermögen der Pflanze überschreitet – zu Erschöpfung und zum Tod des betroffenen Organs oder des ganzen Organismus führt.



**Abbildung 1- 1 Stresskonzept nach Beck und Lüttge, 1990**

Von Eustress spricht man, wenn es sich um stimulierenden Stress handelt, der konstruktive Wirkung auf die pflanzliche Entwicklung ausübt; dies härtet den Organismus ab und kann so die Prädisposition der Pflanze gegenüber anderen Stressoren beeinflussen. Demgegenüber steht der Distress, der zu Schädigungen führt und ausschließlich destruktiv auf die Entwicklung wirkt. In Abbildung 1-1 ist der Zusammenhang zwischen Stress und der Beanspruchung des Metabolismus graphisch zusammengefasst.

Wie die Stressperzeption abläuft, darüber ist noch relativ wenig bekannt. Für das Überleben der Pflanze ist es aber essentiell, dass entsprechende Stimuli schnell erkannt und beantwortet werden können. Bei biotischem Stress wird die Anpassung vor allem durch Abbauprodukte des Pathogens oder der pflanzlichen Zellwand und Zellmembran induziert.

Bei abiotischem Stress können feedforward- oder feedback-Signale auslösend wirken. Vorauseilende Signale treten bei regelmäßig erscheinenden Stressoren auf, die zum Beispiel jahreszeitlichen Schwankungen unterliegen. Eine Regelung durch Rückkopplung erfolgt hingegen bei spontanem Stress und wird unter anderem durch Veränderung des Zellvolumens, des Turgordruckes oder durch Abbauprodukte zelleigener Makromoleküle hervorgerufen. Als Reaktion der Pflanze werden meist Verbindungen verstärkt gebildet, die in einem unbelasteten Organismus gar nicht oder nur in geringem Umfang auftreten. So konnte z.B. gezeigt werden, dass bei starker UV-Strahlung unter anderem DNA-Reparaturenzyme (Photolyase) und absorbierende Schutzpigmente bzw. durch erhöhte Ozon-Konzentrationen verschiedene antioxidative Enzyme und Metabolite verstärkt gebildet werden; zudem kommt es zu einer aktiven Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in Ozon-empfindlichen Pflanzen unter Ozon-Exposition (Zinser *et al.*, 2000; van Camp *et al.* 1994; Ries *et al.*, 2000; Langebartels *et al.*, 2002). Bei Schwermetallbelastung wird unter anderem die Synthese von Phytochelatinen, einer Gruppe von metallbindenden Peptiden, induziert (Grill *et al.*, 1987; Heidenreich *et al.*, 1999). Als Folge von osmotischem Stress durch Salzbelastung, Dürre oder Frost werden von der Pflanze osmotisch wirksame Substanzen wie Glycerin, Prolin oder quarternäre Ammonium-Verbindungen produziert (Ginzberg *et al.*, 1998; Hasegawa *et al.*, 2000).

Auch das Cäsium – vor allem die Untersuchungen der Verbreitung in der Umwelt und sein Einfluß auf das Ökosystem – ist in diesem Zusammenhang von großer ökonomischer und umweltpolitischer Bedeutung. Vor allem das radioaktive Cäsium-137 wurde aufgrund des Reaktorunfalles in Tschernobyl 1986 über weite Bereiche Europas verteilt und belastet nach wie vor große Regionen Weissrusslands und der Ukraine sehr stark (vgl. Kapitel 1.5).

Unterschiedliche Stressoren können dabei ähnliche Effekte auslösen, weshalb eine Stressantwort meist nicht spezifisch ist. Das Gleichgewicht von Oxidantien und Antioxidantien in der Zelle wird z.B. von einer Vielzahl biotischer und abiotischer Stressfaktoren – wie Schwermetallbelastung, Ozon-Exposition, UV-B-Strahlung, Xenobiotika oder Kältestress – gleichsam gestört, und es kommt zu oxidativem Stress (Allen, 1995; Dat *et al.*, 2000, Surplus *et al.*, 1998).

Diese Stressoren können also synergistisch wirken; es kann aber auch vorkommen, dass ein vorangegangener Stress die Pflanzen durch „cross protection“ gegen andere Stressfaktoren abhärtet (Ryu *et al.*, 1995).

Zudem wirkt oft nicht nur ein spezifischer Stress auf einen Organismus, sondern verschiedene Stressoren gleichzeitig (multipler Stress). Dies erfordert eine konzertierte Reaktionsantwort der Pflanze, in der Vermeidungsstrategien und Toleranzentwicklung zusammenspielen müssen. Die Anpassungsstrategien sind dementsprechend komplex, und es ist schwierig, sie einer spezifischen Stressfaktor-abhängigen Veränderung im Metabolismus zuzuordnen. So kann Hitze- und Dürrestress zeitgleich auf die Pflanze einwirken oder ein Wassermangel führt zum Schließen der Spaltöffnungen und damit zu

CO<sub>2</sub>-Mangel. Das Cäsium hat auch hier eine besondere Stellung inne, da es – wie in den nun folgenden Kapiteln aufgezeigt werden soll – in zweifacher Hinsicht negativ auf einen Organismus einwirken kann: Einerseits in seiner Eigenschaften als toxisches Metall, andererseits als Quelle ionisierender Strahlung.

### 1.1 Cäsium – Chemische Eigenschaften und Verwendung

Cäsium ist ein Element der 1. Hauptgruppe des Periodensystems (Symbol Cs, Ordnungszahl 55). Es handelt sich um ein gelbliches, sehr reaktionsfreudiges Metall mit einer Dichte von  $1,90\text{gcm}^{-3}$ . Das schwere Alkalimetall erhielt seinen Namen aufgrund der blauen Spektrallinie (lat.: caesius = himmelblau) und gehört mit einem Anteil von  $7 \cdot 10^{-4}\%$  an der festen Erdkruste und 0,002ppm Wasseranteil zu den seltenen Elementen.

Das einsame Elektron der äußersten Elektronenschale ist nur sehr leicht gebunden und bereits geringe Energie ist ausreichend, um es von dem Atom abzulösen. Cäsium zählt daher zu den stärksten bekannten chemischen Reduktionsmitteln und Basen. Es kann andere Metalle aus deren Bindungen lösen und geht seinerseits kationische, edelgasartige Bindungen ein.

Neben dem natürlich vorkommenden Isotop Cäsium-133, gibt es zahlreiche radioaktive Isotope, wobei Cäsium-134 und Cäsium-137 zu den häufigsten künstlichen Radionucliden zählen. Die physikalischen Halbwertszeiten der Isotope sind 2,1a bzw. 30,2a, die biologische Halbwertszeit beträgt beim Menschen abhängig von dem Organ 70 bis 140 Tage. Die Aufnahme des Cäsiums erfolgt über Inhalation und über die Nahrung (vor allem Milch, Fleisch und Gemüse). Wie alle andere Alkalimetalle wird es dabei vom Verdauungstrakt effektiv resorbiert und verteilt sich über den ganzen Körper, wobei es besonders in die Muskulatur, das Gehirn und bei Kleinkindern auch in das Knochengewebe eingelagert wird. Die Radioisotope besitzen aufgrund ihres Inkorporationsverhaltens und ihrer schädigenden Strahlenwirkung auf Organe eine besonders hohe Radiotoxizität.

Für Cäsium-137 gibt es zwei mögliche  $\beta$ -Zerfälle mit Energien von 0,51 und 1,18 MeV. Dabei laufen 92% der Zerfälle über den Anregungszustand des metastabilen Barium-137 ab; dieser geht unter Gammaemission (0,662 MeV) mit einer Halbwertszeit von 2,6min in den Grundzustand über. In 8% der Fälle wird der Grundzustand direkt erreicht. Cäsium-134 zerfällt mit nahezu hundertprozentiger Wahrscheinlichkeit unter Aussendung von Beta- und Gammastrahlen in Ba-134, in ca. 0,0003% der Fälle wird es durch Einfangen eines Elektrons zu dem stabilen Xenon-134.

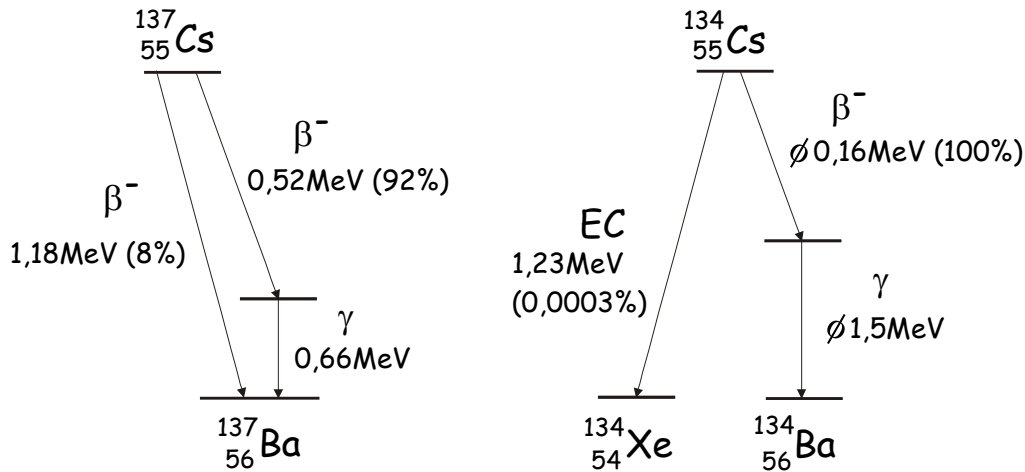


Abbildung 1- 2 Vereinfachte Zerfallsschemata von Cäsium-137 und Cäsium-134

Cäsium wird bei der Herstellung von Photozellen, Photomultipliern und anderen elektronischen Elementen verwendet. Cäsium-137 wird in der Medizin zur Strahlenbehandlung eingesetzt, zur Sterilisierung von medizinischen Geräten, bzw. bei der Bestrahlung von Lebensmitteln benutzt. Ein weiteres Einsatzgebiet ist die Werkstoffprüfung. Das Cäsium wird dabei aus Atommüll und bei der Wiederaufbereitung von Brennelementen aus Kernkraftwerken gewonnen. Die Radionuclide sind typische Folgeprodukte der Kernspaltung (z.B. von Uran-235) und wurden in großem Maße bei Tests von nuclearen Massenvernichtungswaffen oder auch Reaktorunfällen wie Tschernobyl 1986 in die Umwelt freigesetzt (vgl. dazu Kapitel 1.5).

## 1.2 Cäsium – Vorkommen und Aufnahme

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel erwähnt, ist Cäsium-133 nur in sehr geringen Mengen in der Umwelt vorhanden. Das Vorkommen und die Verfügbarkeit hängt dabei stark von der Art und der Beschaffenheit des Bodens ab. Die höchsten Konzentrationen an natürlichem Cäsium findet man in Granit, Sedimentgestein und Kohle, wo Werte von  $0,3$  bis  $25\mu\text{gg}^{-1}$  nachgewiesen werden konnten (White and Broadley, 2000).

Die höchsten Aktivitäten an radioaktivem Cäsium kommen vor allem um Tschernobyl vor, aber auch in Gebieten, die für Atombombentests oder zur Lagerung von radioaktiven Abfällen verwendet wurden. In großen Bereichen Russlands, der Ukraine und Weißrussland konnten Aktivitäten von über  $30\text{Bqcm}^{-3}$  im Boden gemessen werden (Fesenko and Lissiansky, 1997).

Der Eintritt der Radionuclide in das Ökosystem erfolgt durch Deposition, wobei zwischen der trockenen und nassen Deposition unterschieden werden kann: Unter trockener Deposition versteht man den Übergang von Gasen und luftgetragenen Partikeln aus der Luft in den Boden oder auf Pflanzenober-



flächen. Besonders großen Einfluss auf die Ablagerung hat dabei die Dichte des Pflanzenbewuchses (je dichter der Pflanzenbestand, um so größer ist die Depositionsgeschwindigkeit).

Von größerer Bedeutung für die Kontamination von Pflanzen ist aber die Nassdeposition. Dabei kommt es vor allem auf die Aktivität und Menge des Regenwassers an, das von der Pflanze zurückgehalten wird. Diese so genannte Interzeption ist vom Entwicklungsstadium der Pflanzen abhängig, wobei insbesondere die Größe und Oberflächenbeschaffenheit der Blätter oder auch die Blattneigung als Einflussfaktoren eine wichtige Rolle spielen. Das Durchdringen der Blattoberfläche kann durch Diffusion gelöster Ionen und Moleküle erfolgen.

Der Boden und damit die Aufnahme über das Wurzelsystem ist jedoch die wichtigste Quelle für den Eintritt von Radionucliden in die Nahrungskette. Die Beweglichkeit des Cäsiums und seine biologische Verfügbarkeit sind dabei stark von den physikalischen und chemischen Eigenschaften des Bodens abhängig. Cäsium besitzt eine hohe Affinität zu Humus- und Tonteilchen und bildet mit zahlreichen Mineralien Komplexe, z.B. Pollucite  $(Cs,Na)(AlSi_2O_6) \cdot nH_2O$  (Szerbin *et al.*, 1999). Ferner wirkt sich der pH-Wert auf die Wanderungsfähigkeit des Cäsiums im Boden aus. Bei Werten von schwach sauer bis alkalisch wird Cäsium physikalisch an Ton und Huminstoffe gebunden und so nahezu immobilisiert. Umgekehrt wird das Cäsium in saurem Milieu und bei sehr hohem Anteil an organischer Materie (z.B. Torfböden) mehr und mehr aus seinen Bindungen gelöst und dadurch für Pflanzen und Mikroorganismen zugänglich (Valcke and Cremers, 1994).

Die Mobilität im Boden ist in der Regel sehr gering, so dass auch noch zehn Jahre nach dem Unfall von Tschernobyl ein Großteil der Aktivität des Radiocäsium in Bodenschichten oberhalb von 7cm lag (Schimmack and Bunzl, 1996).

Für die Aufnahme in die Pflanze spielen zudem die Anwesenheit von konkurrierenden Ionen eine wichtige Rolle, da diese zum einen den Grad der Bindung an Bodenbestandteile und die Komplexbildung des Cäsiums, aber auch direkt oder indirekt dessen Transport in die Pflanze beeinflussen können. Als Konkurrenz-Ion ist hierbei vor allem Kalium zu nennen, weil es chemisch und physikalisch Cäsium am nächsten steht (Abbildung 1-3). Vor allem die Größe der Hydrathülle und die Hydratationsenthalpie – also die Energie, die nötig ist, um die Hydrathülle vom Ion abzulösen – sind wichtige Faktoren bei der Aufnahme über die Transportsysteme in die Zelle.

Ion	Ionenradius	Hydrathülle	Hydratationsenthalpie
$Cs^+$	0,167nm	0,23nm	-277kJ/mol
$K^+$	0,133nm	0,27nm	-322kJ/mol
$Na^+$	0,097nm	0,37nm	-406kJ/mol
$Ca^+$	0,099nm	0,55nm	-304kJ/mol

**Abbildung 1- 3 Vergleich wichtiger chemischer Parameter für die Aufnahme von Ionen in die Zelle**

So erkannte Collander 1941, dass Kalium und Cäsium über dieselben Aufnahmesysteme in die Pflanze gelangen. Es konnte gezeigt werden, dass Pflanzen Cäsium gegenüber Kalium weniger stark akkumulieren, wenn beide Ionen zusammen im Medium zur Verfügung gestellt werden, und es wurden anhand von Michaelis-Menten-Kinetiken zwei verschiedene Formen der Aufnahme des Kaliums mit unterschiedlichen Affinitäten zum Substrat identifiziert (Epstein *et al.*, 1963).

Man unterscheidet heute zwischen Transportern mit hoher Affinität zum Substrat und Kaliumkanälen mit niedriger Affinität, wobei sich letztere wiederum in drei verschiedene Gruppen unterteilen: die inward-rectifying und outward-rectifying Kanäle (beides spannungsabhängige Kanäle) bzw. die spannungsunabhängigen Kanäle (Schachtmann, 2000).

Im Folgenden soll kurz auf die Eigenschaften der einzelnen Aufnahmesysteme eingegangen werden.

### 1. Kalium-Transporter

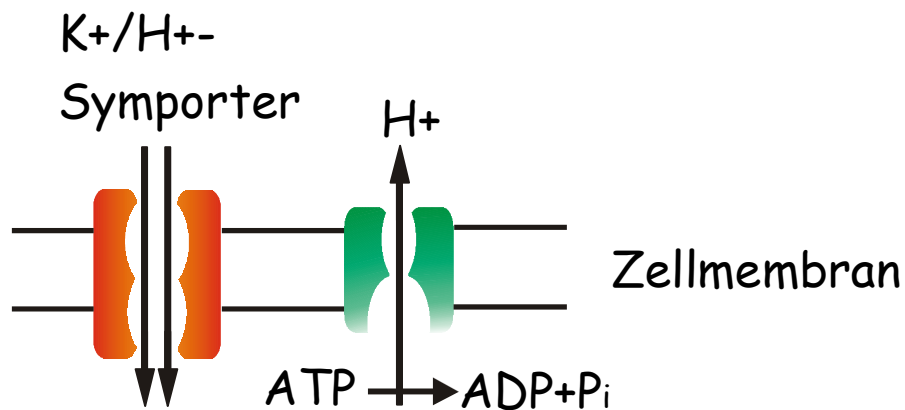
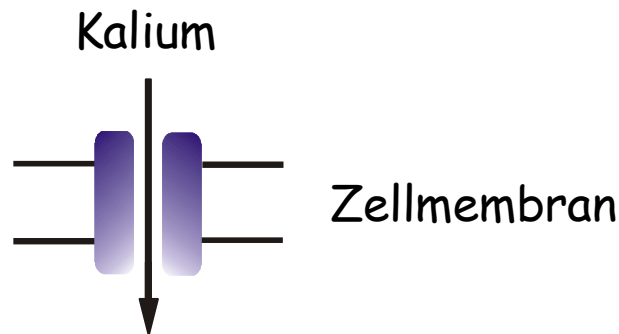


Abbildung 1-4 Kalium-Aufnahme am Beispiel eines Kalium/Protonen-Transporters

Es handelt sich hierbei im Wesentlichen um K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>- oder K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-Symporter, aber auch K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-Antiporter wurden bereits in Pflanzen gefunden. Die Transporter sind direkt an die Hydrolyse von ATP gekoppelt oder werden durch Abbau eines elektrochemischen Protonen-Gradienten angetrieben. Sie sind daher energieabhängig und können Kalium-Ionen auch gegen eine Konzentrations- und Ladungsgefälle in die Zelle transportieren (Anreicherung). Dieser Aufnahmetyp besitzt hohe Affinität ( $K_m = 10\text{-}20\mu\text{M}$ ) zum Substrat und dominiert bei Kalium-Konzentrationen von  $< 0,3\text{mM}$  in der Umgebung. Die Cäsium-Aufnahme erfolgt durch Verdrängung des Kalium-Ions von der Bindungsstelle des Enzyms (White and Broadley, 2000).

Die Höhe der Selektivität zwischen Kalium und Cäsium ist nicht gesichert und hängt wohl von dem jeweiligen Transportertypus ab (Zhu and Smolders, 2000). Hohe extrazelluläre Cäsium-Konzentrationen (bzw. ein niedriges  $K_{\text{ext.}}/C_{\text{ext.}}$ -Verhältnis) beschleunigen die Cäsium-Aufnahme in die Zelle.

## 2. Kalium-Kanäle



**Abbildung 1- 5 Prinzip eine Kalium-Kanals**

Bei den Kanälen folgt der Einstrom der Ionen dem elektrochemischen Gradienten und ist nicht an den ATP-Verbrauch gekoppelt; es ist demzufolge keine Anreicherung in den Zellen möglich. Die Affinität dieser Aufnahmesysteme ist mit einem  $K_m$ -Wert von 4-16mM im Vergleich zu den Transportern sehr gering, weshalb die Kanäle erst bei höheren Kalium-Konzentrationen ( $> 0,3\text{mM}$ ) im Medium den Großteil des Ionentransportes übernehmen. Wie schon erwähnt, unterscheidet man spannungsabhängige von spannungsunabhängigen Kanälen. Erste werden durch Hyperpolarisation der Zelle aktiviert und besitzen eine hohe Selektivität zwischen Cäsium und Kalium, was sich im Verhältnis der Permeabilität der beiden Ionen ausdrückt ( $P_{\text{Cs}}/P_{\text{K}} = 0,1-0,4$ ). Cäsium wird zwar in geringen Mengen durch diese Kanäle aufgenommen, gleichzeitig aber hemmt es bei erhöhten extrazellulären Konzentrationen die Aufnahme und Abgabe des Kaliums, ohne selbst verstärkt transportiert zu werden.

Die spannungsunabhängigen Kanäle werden über Calcium-Ionen und Nucleotidmonophosphate reguliert; nur bei extrem niedrigen Spannungen werden sie auch von der Ladungsverteilung beeinflusst. Es besteht eine sehr hohe Permeabilität für Cäsium-Ionen ( $P_{\text{Cs}}/P_{\text{K}} \approx 0,85$ ), wobei Auswirkungen auf den Öffnungszustand des Kanals bisher nicht nachgewiesen werden konnten.

Von White and Broadley (2000) wurde daher postuliert, dass unter physiologische Bedingungen 30 bis 90% des Cäsium-Einstromes über die spannungsunabhängigen Kanäle erfolgt und der Rest grobenteils von den Transportern erbracht wird. Diese Ergebnisse hängen allerdings stark von dem Polarisationszustand der Zelle und den externen Cäsium- und Kalium-Konzentrationen ab.

Der letzte wichtige Parameter, der bei der Aufnahme von Cäsium in die Pflanze eine Rolle spielt, ist der Organismus selbst. Es wurde gezeigt, dass zwischen verschiedenen Taxa die Cäsium-Aufnahme stark variieren kann (Broadley and Willey, 1997). Aber auch innerhalb einer Art kann die Aufnahmekapazität in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums und dem Grad der Vergesellschaftung mit anderen Bodenorganismen (Mykorrhiza) unterschiedlich sein (Smolders and Shaw, 1995; Zhu and Shaw, 2000). So nehmen z.B. Keimlinge nur sehr geringe Mengen an Radionucliden auf, da sie ihre Ressourcen hauptsächlich aus ihren sameneigenen Speicherstoffen beziehen. Im Allgemeinen lässt sich sagen, je schneller einer Pflanze wächst, desto höher ist auch die aufgenommene Cäsium-Konzentration.

Daher könnten aus genannten Gründen bereits einige Methoden eine Verringerung des Cäsiumtransfers in die Pflanze bewirken:

- Durchmischung der Erde vor allem mit tieferen Bodenschichten, um die Radionuclide stärker zu verdünnen
- Erhöhung des pH-Wertes der Böden durch Aufkalkung saurer Standorte
- Düngung von Böden mit Kalium, die von sich aus geringen Kaliumgehalt aufweisen
- Anbau von langsam wachsenden Pflanzen auf kontaminierten Böden.

### 1.3 Cäsium – Anreicherung in der Nahrungskette und Wirkung im Organismus

Unter natürlichen Bedingungen werden weniger als 3% der Gesamtmenge an Cäsium aus dem Boden entzogen (Lasat *et al.*, 1998). Da Cäsium-Ionen in biologischen Systemen keine bekannte physiologische Bedeutung haben, werden sie von den Organismen ausgeschieden oder aber in Zellen und Geweben eingelagert. Das schwere Alkalimetall kann so bei Pflanzen unter anderem auch in Samen und Früchte gelangen und an die Nachfolgegeneration weitergegeben werden (Witherspoon and Brown, 1965); vor allem die Isotope Cäsium-134 und Cäsium-137 können auf diese Weise radiologische Langzeitschäden in den Organismen verursachen.

Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, beeinflussen zahlreiche Faktoren den Transfer von Cäsium aus dem Boden in die Pflanzen. Der Transferfaktor gibt dabei das Verhältnis der Nuclidkonzentration in der Pflanze zur Nuclidkonzentration des Bodens an. Liegt der Faktor über 1, kommt es

zur Anreicherung des betreffenden Isotops in der Pflanze (z.B. T-Faktor = 2 → doppelte Anreicherung).

Wurzelgemüse	0,0025 - 0,15
Kartoffeln	0,023 - 0,16
Blattgemüse	0,075 - 0,9
Gras	0,0011 - 14
Klee	0,004 - 33

**Abbildung 1- 6 Transferfaktoren für Cäsium (Quelle: IFEU-Bericht Nr. 43)**

Bei der Verdauung wird das Cäsium nahezu vollständig vom Darmepithel resorbiert und in der Nahrungskette weiter angereichert. Besonders hohe Transferfaktoren sind dabei in aquatischen Systemen zu beobachten: Für Fische geht man bei Cäsium-134 und Cäsium-137 von einer Anreicherung um den Faktor 50 - 100 aus (GSF-Information Umwelt).

Im Organismus kann das Cäsium auf unterschiedliche Art und Weise in den Metabolismus eingreifen, wobei auch hier die Ähnlichkeit zu Kalium einen wichtigen Einfluss auf die Wirkungsweise hat. Aufgrund des großen Ionenradius von Cäsium ist das einzelne Außenelektron nahezu frei beweglich, wodurch Cäsium stark mit Sauerstoff und Wasser unter Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies reagiert. In diesem Zusammenhang konnte bereits nachgewiesen werden, dass in Pflanzen Peroxidasen und Katalasen durch das Kation aktiviert werden. Auch wichtige Antioxidantien, wie das Glutathion, sind in erhöhten Konzentrationen in den Zellen anzufinden (Ghosh *et al.*, 1993).

Des Weiteren stört Cäsium den Einfluss von Kalium-Ionen in die Zelle. Kalium ist das quantitativ wichtigste intrazelluläre Kation und besitzt große Bedeutung bei der Aufrechterhaltung des Osmotischen Potentials (Turgordruck bei Pflanzen) bzw. bei der Regulation des Ionenhaushaltes. Zudem ist es an der Aktivierung zahlreicher Enzyme des Stoffwechsels beteiligt.

Bei Versuchen mit Fröschen konnte gezeigt werden, dass durch die Gabe von Cäsium der Wasserhaushalt unter anderem in Erythrocyten gestört wurde (Ermakova, 1970); dies zog zusätzlich eine Beeinträchtigung des Herzmuskels und der Herzrhythmusleistung nach sich. Bei Mäusen konnten aufgrund von hohen Cäsium-Konzentrationen Chromosomenabberationen und eine Verlangsamung der mitotischen Zellteilung beobachtet werden (Ghosh *et al.*, 1993). Im Gewebe von Rattenlebern wurde bereits durch geringe Cäsium-Konzentrationen die 60S ribosomale Untereinheit inaktiviert (Arpin *et al.*, 1972).

In Pflanzen wirkt sich das schwere Alkalimetall negativ auf das Wachstum aus und erhöht die Photosensitivität, indem es neben strukturellen Veränderungen des Chlorophylls auch dessen Biosynthese hemmt (Ghosh *et al.*, 1993). Generell ist aber über die Wirkung von Cäsium-133 bei Pflanzen bisher nur wenig bekannt.

Es ist anzunehmen, dass Cäsium wie auch alle anderen Alkalimetalle nicht frei im Organismus anzutreffen ist, sondern an verschiedene negativ geladene Gruppen von Aminosäuren, Nucleinsäuren oder Zellwandbestandteilen gebunden ist. Es kann so die Strukturbildung und Aktivität vieler Proteine negativ beeinflussen und verändert durch Bindung an Membranproteine und Phospholipide die Fluidität von Zellmembranen (Ghosh *et al.*, 1993).

Cäsium steht im Verdacht, beim Menschen einige neuronale Krankheiten auszulösen, da es das Gleichgewicht der einfach geladenen Kationen im Gehirn verändert (Thompson *et al.*, 1988).

Neben den direkten Einflüssen des Cäsiums auf die Zelle, treten bei Radioisotopen zusätzliche Schädigungen durch Strahlenwirkung und Radikalbildung auf. Diese werden im nächsten Kapitel näher erläutert, wobei außerdem auf einige physikalische Begriffe und auch den Strahlenschutz eingegangen werden soll (Hoppe *et al.*, 1982):

### 1.4 Strahlenbiophysik und Strahlenschutz

#### 1.4.1 Strahlenarten und Dosimetrie

In der Strahlenbiophysik werden die Wirkungen von ionisierenden Strahlen auf biologische Systeme untersucht. Ionisierend nennt man alle Strahlenarten, deren Quantenenergie hoch genug ist ( $E > 10\text{eV}$ ), um Elektronen aus dem Molekül- oder Atomverband herauszulösen.

Man unterscheidet zwischen hochfrequenter elektromagnetischer Wellenstrahlung ( $\gamma$ - oder Röntgenstrahlung) und der Korpuskularstrahlung (geladene oder ungeladene Teilchen hoher Geschwindigkeit). Die Energieübertragung erfolgt durch Absorption der Strahlungsenergie und durch Abbremsen der Teilchen in der Materie. Bei hoch-energetischer Strahlung ist es möglich, dass beim Durchgang durch Materie eine Vielzahl von Ionisationen oder Anregungen ausgeführt werden, die ihrerseits wieder zu chemischen und biologischen Folgereaktionen führen können.

Die Wechselwirkung von  $\gamma$ - oder Röntgenstrahlung mit den Atomelektronen erfolgt in Abhängigkeit der Strahlungsenergie und der Ordnungszahl des Absorbers (Abbildung 1-7) nach dem

- **Photoeffekt**, bei dem die gesamte Energie eines einfallenden Quants auf das Hüllelektron übertragen wird. Der Effekt überwiegt im Bereich niedriger Energien, seine Wahrscheinlichkeit steigt mit der Ordnungszahl des Absorbers. Die Energiebilanz lautet  $E_{\text{kin}} = h\nu - \text{Ablösearbeit}$ , wobei  $E_{\text{kin}}$  die kinetische Energie des freigesetzten Elektrons und  $h\nu$  die Quantenenergie der Strahlung ist.

- **Compton-Effekt**, einem Stoßprozess zwischen Quant und Elektron, bei dem nur ein Teil der Gesamtenergie abgegeben wird:  $E_{\text{kin}} + hv' = hv - \text{Ablösearbeit}$ ;  $hv'$  entspricht der Quantenenergie der Strahlung nach dem Stoß. Der Compton-Effekt überwiegt bei niedrigen Ordnungszahlen, also auch in biologischen Geweben.
- **Paarbildungsprozess**, hierbei materialisiert ein  $\gamma$ -Quant im Kernfeld zu einem Elektron-Positron-Paar. Die Paarbildung kann nur stattfinden, wenn die Quantenenergie mindestens dem Energieäquivalent der doppelten Elektronenmasse entspricht:  $E_0 = mc^2 = 0,51\text{MeV} \Rightarrow E_{e^+} + E_{e^-} = hv - 1,02\text{MeV}$ . Das Elektron und das Positron verlieren ihrerseits ihre Energie durch Ionisation und Anregung. Das Positron rekombiniert letztlich mit einem Elektron unter Emission so genannter Vernichtungsstrahlung (2  $\gamma$ -Quanten mit je 0,51MeV); das Elektron kann unter anderem von einem Kern eingefangen werden (electron capture EC).

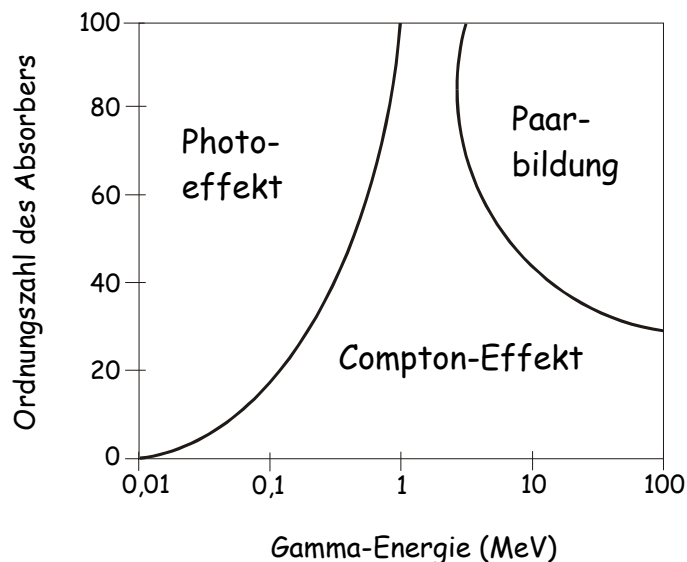


Abbildung 1-7 Wechselwirkungen der Wellenstrahlung mit der Materie

Bei geladenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Teilchen gibt es im Wesentlichen drei Prozesse der Wechselwirkung. Bei der **Anregung** werden durch Stöße Elektronen der Atomhülle auf eine äußere Bahn höherer Energie angehoben. Ist die Anregungsenergie hoch genug, kann das Elektron vollständig aus dem Atomverband gelöst werden, wobei ein positives Ion zurückbleibt; man spricht von **Ionisation**. Je nach Energie kann das herausgelöste Elektron weitere Ionisationsprozesse auslösen, bevor es von einem Atom unter Bildung eines negativen Ions eingefangen wird (EC). Bei besonders hohen Teilchenenergien und hoher Ordnungszahl des absorbierenden Materials kann beim Abbremsen des geladenen Teilchens **Bremsstrahlung** (elektromagnetische Strahlung) auftreten. Die Masse des Teilchens hat hingegen keinen Einfluss auf die übertragene Energie. Allgemein lässt sich sagen, dass sich die Energieabgabe pro Weglänge (Massenbremsvermögen) mit steigender Ladung und Ordnungszahl und bei niedrigen Geschwindigkeiten erhöht.

Korpuskular- und Gammastrahlen entstehen u.a. bei der spontanen Umwandlung instabiler Nuclide. Die Teilchenemission tritt beim  $\alpha$ -Zerfall (He-Atom) und  $\beta$ -Zerfall (Elektron oder Positron) auf. Bleibt dabei ein angeregter Kern zurück, so wird bei dessen Übergang in den Grundzustand die Energie in Form von Gammastrahlung freigesetzt. Der Zerfall der Kerne ist spontan und wird durch das Zerfallsgesetz beschrieben:

$$N(t) = N_0 \cdot e^{-\lambda \cdot t}$$

Die Zerfallskonstante  $\lambda$  ist ein Maß für die Zerfallswahrscheinlichkeit und eine charakteristische Größe für jedes Radionuclid.  $N(t)$  ist die Anzahl der zum Zeitpunkt  $t$  vorhandenen Atome und  $N_0$  die Zahl der Atome zur Zeit  $t = 0$ . Die Halbwertszeit gibt an, zu welchem Zeitpunkt die ursprünglich vorhandenen Kerne durch Zerfall um die Hälfte abgenommen haben. Die Aktivität gibt die Anzahl der Kernzerfälle pro Zeiteinheit an; die Einheit ist Becquerel, dies entspricht einem Zerfall pro Sekunde.

Die biologische Strahlenwirkung wird durch die Energiedosis quantifizierbar. Sie gibt Auskunft über die pro Masseneinheit absorbierte Strahlenenergie; ihre Einheit ist Gray ( $1\text{Gy} = 1\text{J}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).

Da die Strahlenwirkung nicht nur von der Dosis, sondern auch von der Dauer der Exposition abhängig ist, wird die Dosisleistung  $\text{Gy}\cdot\text{s}^{-1}$  eingeführt. Die Organdosis gibt die Energiedosis in Abhängigkeit von der Masse des Gewebes an.

Daneben haben verschiedene Strahlenarten unterschiedliche Auswirkungen in biologischen Systemen. Die Energiedosis wird aus diesem Grund mit einem Gewichtungsfaktor, der so genannten „relativen biologischen Wirksamkeit“, multipliziert; die Äquivalentdosis wird in Sievert (Sv) angegeben.

Ein weiteres Maß berücksichtigt die unterschiedliche Wirkung der Strahlung auf verschiedene Gewebe und Organe. Die effektive Dosis ist die Summe der gewichteten Äquivalentdosen in allen Geweben und Organen des Körpers.

Strahlenart	Gewichtungsfaktor	Gewebe und Organe	Gewichtungsfaktor
Röntgen, $\gamma$	1	Keimdrüsen	0,25
Elektronen	1	Knochenmark	0,12
Protonen	5	Lunge	0,12
$\alpha$ -Teilchen	20	Magen, Darm, Gehirn	0,06

Abbildung 1- 8 Strahlen- und Gewebegewichtungsfaktoren (nach StrlSchV, 1989)



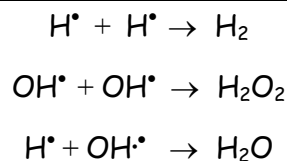
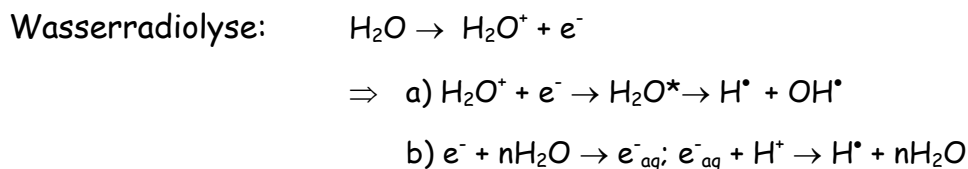
Zur Messung von Dosis und Dosisleistung stehen verschiedene Messgeräte zur Verfügung, z.B. die Ionisationskammer, das Filmdosimeter oder das Fricke-Dosimeter. Zur quantitativen Beschreibung biologischer Strahlenwirkung werden Dosiseffektcurven errechnet, bei denen messbare Strahleneffekte wie die Überlebensrate von Bakterienkulturen, die Aktivität von Enzymen oder das Wachstum bzw. der Ertrag bei Nutzpflanzen gegen die Dosis aufgetragen werden.

### 1.4.2 Biologische Strahlenwirkung und Reparaturprozesse

Die eigentliche strahlenbiologische Reaktion beginnt mit der Veränderung eines biologisch relevanten Moleküls, wie eines Enzyms oder der DNA. Es kann entweder zu einer direkten Schädigung von Makromolekülen kommen oder zu einer indirekten über die Wirkung auf benachbarte Moleküle und Bildung freier Radikale.

Pflanzen enthalten 80 bis 90% Wasser, weswegen die ionisierende Strahlung hauptsächlich mit Wassermolekülen wechselwirkt. Dabei entstehen verschiedene Zerfallsprodukte, welche ihrerseits mit Molekülen (z.B. Aminosäuren oder Sauerstoff) reagieren können.

Im Folgenden sind die wichtigsten Effekte der Strahlenabsorption des Wassers und die Reaktion der Folgeprodukte mit organischen Molekülen und Sauerstoff dargestellt:



Das Wasser wird in Hydroxyl-, Wasserstoffradikale und hydratisierte Elektronen gespalten. Die Produkte sind jedoch sehr kurzlebig und reagieren zu  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Sie können aber auch mit Sauerstoff oder anderen wassergelösten organischen Molekülen interagieren, wobei zum Teil sehr reaktive Produkte gebildet werden, die erhebliche Schäden in der Zelle verursachen können:

Reaktionen mit organischen Molekülen:	Sauerstoffeffekte:
$RH + OH^\bullet \rightarrow R^\bullet + H_2O$	$H^\bullet + O_2 \rightarrow HO_2^\bullet ; HO_2^\bullet + H \rightarrow H_2O_2$
$RH + H^\bullet \rightarrow R^\bullet + H_2$	$e^-_{aq} + O_2 \rightarrow O_2^{\cdot -} + nH_2O$
$RH + e^-_{aq} \rightarrow RH^\bullet + nH_2O$	
$RH + H^\bullet \rightarrow RH_2$	$R^\bullet + O_2 \rightarrow RO_2^\bullet$
$RH + OH^\bullet \rightarrow RHOH$	$\rightarrow RO_2^\bullet + RH \rightarrow RO_2H + R^\bullet$
$RH + H_2O_2 \rightarrow ROH + H_2O$	(Kettenreaktion!)

Strahleninduzierte Veränderungen hängen aus diesem Grund stark von der Zusammensetzung des Gewebes ab, insbesondere von dessen Sauerstoffgehalt.

Bei den **Proteinen und Aminosäuren** reagieren besonders schnell die aromatischen und schwefelhaltigen Seitenketten mit den Radikalen und den hydratisierten Elektronen. Bei direkter Strahleneinwirkung kommt es häufig zu Desaminierung und Decarboxylierung. Vor allem die Empfindlichkeit der schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein wirkt sich auf die Strukturbildung und Enzymaktivität aus, indem Disulfidbrücken gespalten oder die SH-Gruppen oxidiert werden können. Dies kann zu Veränderungen der Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur oder zu Molekülbrüchen bzw. Molekülvernetzungen führen.

Weil aber die Proteine in großer Vielfalt vorkommen und ständig neu synthetisiert, ist der Ausfall einiger Enzyme daher meist zu vernachlässigen. Darüber hinaus liegen die Schädigungsdosen für Enzyme mit einigen 10Gray weit über den anderer Makromolekülen, so dass der Tod der Zelle bereits viel eher eintritt.

Bestimmendes Element für Strahlenschäden in biologischen Systemen sind die **Nucleinsäuren**; als DNA sind sie Träger der genetischen Information und als RNA besitzen sie entscheidende Übertragungsfunktion bei der Proteinsynthese. Durch indirekte und direkte Strahlenwirkung treten Strangbrüche durch Zerstörung der Phosphatdiesterbindungen auf, und es kommt zu Basenverlusten (z.B. oxidativer Abbau von Guanin). Darüber hinaus kann es zu Quervernetzungen zwischen Nucleinsäuren, zu DNA-Protein-Vernetzungen oder zu Chromosomenabberationen (Abweichung vom normalen Chromosomenbild) führen. Man unterscheidet zwei Arten von Mutationen: die direkte Schädigung von Nucleinsäuren und Schäden, die sich erst infolge der Replikation manifestieren.

Durch die Verbindung mit Histonen werden die indirekten Strahlenschäden der DNA reduziert, da offenbar durch diese Proteine eine Abschirmung der Nucleinsäure gegenüber der Radikalwirkung erfolgt.

Auch physikalischen Eigenschaften von **Membranen** werden durch Strahlung beeinflusst, wobei membrangebundene Proteine und Phospholipidschichten betroffen sein können. Durch Oxidation kann zum Beispiel die Permeabilität und die Membranfusion bzw. -abschnürung (Exo- und Endocytose) gestört werden. Als besonders sensitiv erweisen sich die Membranen der Mitochondrien und Chloroplasten, was zur Reduktion der oxidativen Phosphorylierung bzw. der Photosyntheserate führen kann.

Nach der Bestrahlung mit hohen Dosen von einigen 10Gray erleiden alle Zellen den sogenannten Interphasetod, bei dem der gesamte Zellmetabolismus zusammenbricht. Die Strahlenempfindlichkeit hängt dabei in hohem Maße von dem Entwicklungs- und Differenzierungsstadium ab, aber auch Nährstoffversorgung oder Alter und Gesundheitszustand des Organismus spielen eine Rolle.

Andere Umweltgifte können zudem kombinierte Effekte auslösen, die unabhängig oder synergistisch wirken, also zu einer Verstärkung oder Verminderung der Gesamtwirkung führen.

Bei teilungsfähigen Zellen tritt eine Schädigung bereits bei viel niedrigeren Dosen auf, während ausdifferenzierte Zellen relativ strahlenunempfindlich sind. Auch innerhalb des Zellzyklus ist eine Variation der Strahlensensitivität zu beobachten. Zwischen den Teilungen durchlaufen die Zellen eine Reihe von biochemischen Prozessen, wobei man den Zellzyklus in die vorsynthetische G1-, eine Synthese S- und eine postsynthetische G2-Phase unterteilt. In der S-Phase findet die Verdopplung des genetischen Materials statt, die Mitose erfolgt zwischen der G2- und G1-Phase. Die größere Strahlenempfindlichkeit der G2-Phase erklärt sich aus der vorangehenden Verdopplung der DNA-Menge. Bereits bei subletalen Dosen ist eine Verzögerung des Zellzyklus durch Verlängerung der G2-Phase feststellbar. Ursache hierfür sind wohl prämitotische Reparaturprozesse (Evans and Van't Hof, 1975). Genetische Strahlenschäden in den Keimzellen sind von weit reichender Bedeutung, da sie an die Folgegeneration weitergegeben und nicht wie die somatische Mutation mit dem Tod des Trägers ausgelöscht werden.

Bei höheren Dosen kann es also auf verschiedene Art und Weise zu Störungen des Zellmetabolismus und auch Zellabtötungen kommen, was zu erkennbaren Veränderungen in der Morphologie führen kann. So wurden Wachstumsstörungen, Tumorbildungen, aber auch Sterilität und vorzeitige Alterung bei chronischer Strahlenbehandlung beobachtet. Die Strahleneffekte bei Pflanzen sind auf zellulärer und genetischer Ebene sehr ähnlich. In stark kontaminierten Gebieten konnte eine Reduktion der Samenkeimung bzw. der Biomasseproduktion und eine Abnahme der Abwehrfähigkeit gegenüber Schädlingen nachgewiesen werden (Proceedings from the International Conference of Radioactivity in the Environment, 2002).

Bei niedrigen Strahlendosen zeigten sich zum Teil positive Strahleneffekte (Hormesis), was sich in einer Stimulation u.a. des Wachstums und der Photosynthese ausdrückte (Kuzin, 1986).

Der Zelle stehen aber verschiedene Mechanismen zur Verfügung, mit denen sie die Strahlenwirkung auf der Ebene der Radikale und der Makromoleküle mindern kann. Substanzen, die gefährliche Radikale abfangen können, werden als Strahlenschutzstoffe bezeichnet. Zu ihnen zählen u.a. die Aminosäuren Histidin und Verbindungen mit freien SH-Gruppen. Letztgenannte reagieren nicht nur mit Radikalen, sondern besitzen zudem die Fähigkeit, strahleninduzierte Schäden auszuheilen, indem sie die oxidierende Wirkung von Radikalen auf Moleküle durch Reduktion neutralisieren.

Haupteffekte sind jedoch DNA-Schäden, weshalb alle Organismen Mechanismen zur Reparatur von Nucleinsäuren entwickelt haben. Die wichtigsten werden kurz erläutert:

- **Photoreparatur:** ein Mechanismus, der auf Schäden durch Pyrimidin-Dimerbildung durch UV-Licht spezialisiert ist. Die Photolyase bindet an das Dimer und spaltet sie in zwei Schritten in die beiden Pyrimidinbasen.
- Bei der **Excisions-Reparatur** werden Basenveränderungen, Einzelstrangbrüche oder Quervernetzungen aus dem Strang geschnitten und die entstehende Lücke wieder aufgefüllt (Abbildung 1-9A). Eine Endonuclease spaltet das DNA-Rückgrad, bevor die DNA-Polymerase I ein Oligonucleotid ausschneidet und gleichzeitig neu synthetisiert; die Ligase verknüpft es letztlich kovalent mit dem DNA-Strang.
- **Rekombinations-Reparatur:** Sind beide Stränge beschädigt (Doppelstrangbruch) oder wurde die DNA repliziert, bevor ein Schaden behoben werden konnte, so werden die entsprechenden Abschnitte der DNA-Schwesterstränge durch Rekombination ausgetauscht (Abbildung 1-9B). Es liegt danach ein vollständiger und ein schadhafter Strang vor, der durch die Excisions-Reparatur behoben werden kann.

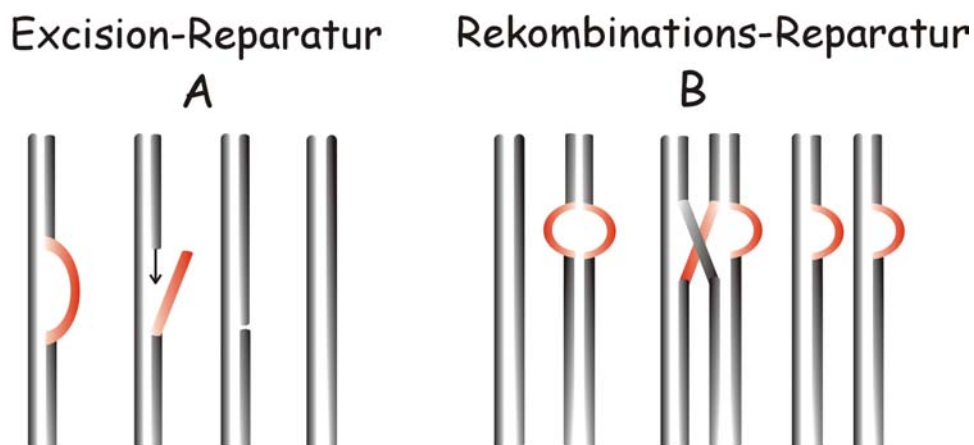


Abbildung 1-9 Schematische Darstellung der wichtigsten Reparatursysteme bei der Behebung von Schäden an der DNA durch ionisierende Strahlen

### 1.4.3 Strahlenschäden beim Menschen und Strahlenschutz

Im Zusammenhang mit der Auswirkung von Strahlen auf den Menschen, werden zwei weitere Begriffe eingeführt:

**Deterministische Strahlenschäden** – die auch schon im vorherigen Kapitel betrachtet wurden – treten als Folge der Abtötung von Zellen auf, was zu Schäden an Geweben und Organen führen kann. Es ergeben sich daraus verschiedene Schwellenwerte, deren Höhe von der Schwere des Schadens definiert wird. Beim Menschen führen Ganzkörperbestrahlungen von über 0,5Sv zur Strahlenkrankheit, die in Abhängigkeit der Dosis und der Zeit in folgende Gruppen unterteilt wird:

Dosisabhängigkeit

1. Hämato-logische Dosis (1-10Sv): Veränderung des Blutbildes
2. Intestinale Dosis (10-50Sv): Zerstörung des Darmepithels, Geschwüre; Tod nach Tagen
3. Toxische Dosis (50-100Sv): Kreislaufversagen, Tod durch toxische Abbauprodukte
4. Cerebrale Dosis (>100Sv): Tod nach kurzer Zeit durch Nekrosenbildung im Nervensystem

Zeitabhängigkeit

1. Primärphase: Appetitlosigkeit, Mattigkeit, Kopfschmerzen, Übelkeit
2. Latenzphase: Veränderung des Blutbildes
3. Gipfelphase: Fieber, Geschwüre im Mundraum, Haarausfall, innere Blutungen

Bei letalen Dosen führt dies zum Tod, bei subletalen Dosen kommt es zur Genesung. Jedoch treten meist Spätschäden auf wie Anämie, verschiedene Krebsarten, Schwächung des Immunsystems oder Unfruchtbarkeit.

Die **stochastischen Strahlenschäden** führen zu zufälligen Mutationen in den Zellen. Es gibt keinen Schwellenwert, so dass auch geringste Strahlendosen zu einer Schädigung führen können. Die Zellen sind weiterhin lebensfähig, wobei es aber zu Fehlentwicklungen infolge der Veränderungen des Erbgutes kommen kann. Die Schäden treten meist erst nach einigen Jahren auf (v.a. Krebs) und können bei Schädigung von Keimzellen auch an die nächste Generation weitergegeben werden.

Aus diesem Grund ist es nötig, die Strahlenbelastung möglichst zu minimieren und die Umwelt vor übermäßiger Strahlung zu bewahren. Die allgemeinen Grundsätze des Strahlenschutzes (ICRP: International Commission on Radiological Protection) beruhen auf der Rechtfertigung und der Optimierung von Dosisgrenzwerten. Danach darf keine Anwendung ionisierender Strahlung erlaubt werden, die nicht ausreichend Nutzen erzielt, welcher den verursachten Schaden rechtfertigt. Die Dosen und die Anzahl der exponierten Personen müssen so niedrig wie möglich gehalten werden und dürfen auf keinen Fall oberhalb festgelegter Grenzwerte liegen. Die einzelnen Vorschriften für Grenzwerte, den

Umgang mit radioaktiven Stoffen und deren Aufbewahrung sind in der Strahlenschutzverordnung (StrlSchV) und der Röntgenverordnung zusammengefasst.

Körperdosis	Personen Kategorie A	Personen Kategorie B
Effektive Dosis	50mSv	15mSv
Teilkörperdosen (Keimdrüsen, Gebärmutter, Knochenmark)	50mSv	15mSv
Teilkörperdosen (Hände, Arme, Füße, Beine)	500mSv	150mSv
Teilkörperdosen (Schilddrüse, Haut, Knochenoberfläche)	300mSv	90mSv
Teilkörperdosen (alle anderen Organe)	150mSv	45mSv

**Abbildung 1- 10 Grenzwerte der Körperdosen für beruflich strahlenexponierte Menschen pro Jahr (StrlSchV, 1989)**

Jeder Organismus ist ionisierender Strahlung ausgesetzt. Die natürliche Strahlenexposition setzt sich aus der kosmischen, der terrestrischen und der internen Strahlung zusammen. Die effektive Dosis beträgt im Mittel pro Jahr ca. 2,4mSv. Die Strahlenexposition eines nicht-strahlenexponierten Menschen darf eine effektive Jahresdosis von 5mSv nicht überschreiten. Die Grenzwerte der jährlichen Belastung der Bevölkerung durch radioaktive Stoffe liegen bei einer effektiven Dosis von 0,3mSv/a.

### 1.5 Tschernobyl und die Folgen

[aus UNSCEAR 2000/01 Report, Berichten der Internationalen Atomenergie-Organisation (IAEA), der Nuclear Energy Agency und der Gesellschaft für Umwelt und Gesundheit (GSF)]

Bei dem Unfall in Tschernobyl am 26. April 1986 traten große Mengen radioaktiver Stoffe aus (ca.  $85 \cdot 10^{15}$  Bq allein an Cäsium-137, wobei als Faustregel gilt, dass 80kBq Radiocäsium einer Strahlenexposition von etwa 1mSv entsprechen), die in der Luft über ein Gebiet von vielen tausend Quadrat-Kilometern verfrachtet wurden. Der Großteil der Strahlung in den ersten Wochen wurde hauptsächlich durch Jod-131 und Cäsium-137 verursacht; Cäsium-134 und Cäsium-137 sind aufgrund ihrer Langlebigkeit bis heute Hauptursache interner und externer Strahlungsbelastungen.

Die Freisetzung und Verlagerung bedeuteten eine Gefährdung der Bevölkerung durch das Einatmen kontaminierter Luft. Die Arbeiter waren externen Dosen von 2 bis über 500mSv ausgesetzt, in der etwa 4 km entfernten Kleinstadt Pripyat lag die effektive Dosis am Tag nach dem Unfall bei ca. 6mSv pro Stunde. In der Luft war die durchschnittliche Jahreskonzentration von Cäsium - 137 im Jahre 1986 in einer Entfernung von 70km vom Reaktor  $3,2 \cdot 10^{-2}$  Bq/m<sup>3</sup>, in Minsk noch  $3,8 \cdot 10^{-3}$  Bq/m<sup>3</sup> (vor dem Unfall  $<10^{-6}$ ). Die Selbstdekontaminierung der Luft geschieht sehr langsam (bei Radiocäsium 25-30

Monate).

Langfristig spielt die Deposition von Radionucliden im Boden bzw. in Grund- und Oberflächenwasser eine entscheidende Rolle, da sie auf diesen Wegen auch in die Nahrungsmittel gelangen. Große Flächen an Ackerland mussten stillgelegt werden und zahlreiche Personen (vor allem aus der 30km-Zone um Tschernobyl) wurden evakuiert. Die maximale Kontamination in dieser Zone liegt für Cäsium-137 heute noch bei 55000 kBq/m<sup>2</sup>.

Aber auch in weiter entfernten Regionen sind sehr starke Kontamination von 2000-5000 kBq/m<sup>2</sup> zu finden. Zudem wurden zahlreiche Einzugsgebiete großer Flüsse stark verseucht; vor allem im Bodenschlamm ist eine hohe Aktivität nachweisbar. Die Verseuchung des Grundwassers in kontaminierten Gebieten ist um das 10 bis 100fache angestiegen.

In vielen Landstrichen der Ukraine, Weißrusslands und Russlands sind nach wie vor Aktivitäten von über 200 kBq Cäsium-137/m<sup>2</sup> zu messen; insgesamt sind 150.000km<sup>2</sup> mit 37kBq/m<sup>2</sup> und mehr radioaktiv belastet.

Die Radionuclide werden aus dem Boden und dem Wasser durch Mikroorganismen, Pflanzen und Pilze aufgenommen, wodurch sie vor allem in Wildtieren und Fischen angereichert werden. Bei einigen Wildarten in der 30km-Zone wurden bereits genetische und hämatologische Veränderungen, aber auch eine verminderte Reproduktionsfähigkeit festgestellt.

Region	Cäsium Deposition (kBq/m <sup>2</sup> )	Bevölkerung	durchschnittliche effektive Dosis (mSv)		
			extern	intern	total
Belarus	37- >555	1880612	5,1	2,9	8
Rußland	37- >555	1983275	4,3	2,5	6,8
Ukraine	37- >555	1295800	4,7	6,1	10,8

Abbildung 1- 11 Geschätzte durchschnittliche effektive Dosis der Bevölkerung kontaminierter Gebiete (1986-1995)

Bodenart	Transferfaktor von Boden in Milch (Bq/l pro kBq/m <sup>2</sup> )	Normalisierte Dosis (µSv pro kBq/m <sup>2</sup> )		
		1986	1987-1995	gesamt
I	<1	9	26	35
II	1-5	42	144	186
III	5-10	95	320	415
IV	>10	176	591	767

Abbildung 1- 12 Normalisierte effektive Dosis von Radiocäsium durch interne Exposition auf die ländliche Bevölkerung der Ukraine unter Berücksichtigung der Bodenbeschaffenheit

Ort	Altersgruppe	Normalisierte effektive Dosis ( $\mu\text{Sv pro kBq/m}^2$ )		
		1986	1987-1990	1991-1995
Land	0-6 Jahre	3-17	6-32	3-7
	7-17 Jahre	5-19	8-45	2-6
	>18 Jahre	5-24	12-62	3-10
Stadt	0-6 Jahre	2	5	2
	7-17 Jahre	2	4	2
	>18 Jahre	3	7	4

**Abbildung 1- 13 Durchschnittliche effektive Dosis durch interne Exposition in Abhängigkeit der Depositionsdichte von Cäsium-137 in Weißrussland**

Die durchschnittliche effektive Dosis, welche die Einwohner durch Radiocäsium-Kontamination erhielten, liegt bei ungefähr 10mSv. Allein die direkten Verluste Weißrusslands werden durch Stilllegung von Ackerflächen bis zum Jahr 2015 auf 15,2 Mrd.\$ geschätzt, die Verluste der Forstwirtschaft auf etwa 4 Mrd.\$.

Über die möglichen Folgen einer Langzeit-Exposition mit geringen Dosen ist noch wenig bekannt. Die Krebsrate wurde zwar bisher nicht signifikant erhöht, jedoch konnte bereits eine erhöhte Mutationsrate, eine Schwächung des Immunsystems und eine Verbreitung von mittleren bis schweren Anämien bei Kindern festgestellt werden.

Da die Strahlenbelastung durch externe Dosen inzwischen vernachlässigbar ist und hauptsächlich durch Ingestion über die Nahrung zustande kommt, ist es notwendig, die Aufnahme des Radiocäsiums aus dem Boden in die Pflanze und damit in die Nahrungskette zu beseitigen.

Dies kann zum Beispiel durch die Remediation der kontaminierten – vor allem von landwirtschaftlich genutzten – Gebiete geschehen, entweder durch Abtragen der Erde oder durch Immobilisierung der Radionuclide im Boden durch Gabe von Mineralien, chemische Verbindungen oder Kalkung. Diese Methoden sind jedoch sehr kostenintensiv und zum Teil äußerst aufwendig und schwierig durchzuführen. Die Phytoextraktion von Radionucliden durch bestimmte Pflanzen ist eine weitere Möglichkeit; nach heutigem Wissenstand ist diese Methode jedoch sehr langwierig. Aufgrund der geringen Effizienz und der Problematik, dass große Mengen an kontaminierter Biomasse als radioaktiver Abfall entgelagert werden müssen, ist dies zur Zeit ebenfalls nicht praktikabel (Zhu and Shaw, 2000; Zhu and Smolders, 2000).



## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

In diesem Gemeinschaftsprojekt des Institutes für Strahlenschutz und des Institutes für Biochemische Pflanzenpathologie sollte die Reaktion und die Anpassungsfähigkeit von *Arabidopsis thaliana* auf Stress durch Cäsium und ionisierende Strahlung aufgezeigt werden.

Des weiteren sollte die Cäsium-Aufnahme über Kalium-Transporter und -Kanäle unter Einsatz verschiedener Mutanten (u.a. Sheahan *et al.*, 1993; Gaymard *et al.*, 1998) untersucht werden. Es stellt sich die Frage, ob in diesem Zusammenhang eventuell eine Möglichkeit besteht, eine effektivere, oder umgekehrt, eine verminderte Aufnahme von Cäsium in die Pflanze zu erreichen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Alle Lösungen, Puffer, Medien und sonstigen Utensilien (wie Pipettenspitzen, Glaswaren etc.) wurden für 20min bei 125°C und 1,4bar autoklaviert. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden durch Membranfilter mit 0,2µm Porengröße sterilfiltriert.

#### Lösungen und Puffer

1M Tris	1	M	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	
TE-Puffer	10	mM	Tris/HCl	pH 8,0
	1	mM	EDTA	
TBE-Puffer	45	mM	Tris/HCl	pH 8,0
	45	mM	Borsäure	
	1	mM	EDTA	
10% SDS	10	% (w/v)	Natriumdodecylsulfat in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	
20x SSC	0,3	M	Natriumcitrat/HCl	pH 7,0
	3	M	NaCl	
20x SSPE	0,2	M	Natriumdihydrogenphosphat	pH 7,4
	3,6	M	NaCl	
	20	mM	EDTA	
50x Denhardt's Lösung (auf 500 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> )	1	g	Ficoll	
	5	g	Polyvinylpyrrolidon	
	5	g	Rinderserum Albumin	
Hybridisierungslösung (Makroarray)	5	x	SSC	
	5	x	Denhardt's Lösung	
	0,5	% (v/v)	SDS	
	100	µg/ml	denaturiertes Heringssperm-DNA	
Hybridisierungslösung (Northern Blot)	5	x	SSPE	
	5	x	Denhardt's Lösung	
	50	% (v/v)	Formamid	
	0,5	% (v/v)	SDS	
	100	µg/ml	denaturiertes Heringssperm-DNA	
Waschlösung 1	2	x	SSC	
	0,1	% (v/v)	SDS	
Waschlösung 2	0,2	x	SSC	
	0,1	% (v/v)	SDS	
10x DNA-Ladepuffer	50	% (v/v)	TE-Puffer	
	50	% (v/v)	Glycerin	
	0,1	% (w/v)	Bromphenolblau	
RNA-Ladepuffer	20	mM	MOPS	pH 7,5
	5	mM	Natriumacetat	
	1	mM	EDTA	
	1,5	% (v/v)	Formaldehyd	
	25	% (v/v)	deionisiertes Formamid	

## 2. Material und Methoden

	10 % (v/v)	Glycerin	
	0,1 % (w/v)	Bromphenolblau	
10x PCR-Puffer	750 mM	Tris/HCl	pH 8,4
	200 mM	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
	0,1 % (v/v)	Tween20	
	15 mM	MgCl <sub>2</sub>	
10x MOPS	0,2 M	3-( <i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure	
	50 mM	Natriumacetat	pH 7,0
	10 mM	EDTA	
TLE-Puffer	0,2 M	Tris/HCl	pH 8,2
	0,1 M	LiCl	
	5 mM	EDTA	
RNA-Extraktionspuffer	0,18 M	Tris/HCl	pH 8,2
	0,09 M	LiCl	
	4,5 mM	EDTA	
	1 % (v/v)	SDS	
CTAB-Extraktionspuffer	2 % (w/v)	CTAB	
	100 mM	Tris/Cl	pH 8,0
	20 mM	EDTA 1	
	1 % (v/v)	β-Mercaptoethanol	
TfB I-Puffer	30 mM	Kaliumacetat	pH 5,8
	10 mM	CaCl <sub>2</sub>	
	50 mM	MnCl <sub>2</sub>	
	100 mM	KCl	
	15 % (v/v)	Glycerin	
TfB II-Puffer	10 mM	MOPS/NaOH	pH 7,0
	10 mM	KCl	
	75 mM	CaCl <sub>2</sub>	
	15 % (v/v)	Glycerin	
FAA	63 % (v/v)	Ethanol	
	5 % (v/v)	Eisessigsäure	
	2 % (v/v)	Formalin	
1x PBS-Puffer	10 mM	Natriumphosphat	pH 7,5
	130 mM	NaCl	
In-situ-Blockierungspuffer	0,1 % (w/v)	acetyliertes BSA	
	1 x	PBS-Puffer	
In-situ-Waschlösung	0,1 M	Tris/HCl	pH 9,5
	0,15 M	NaCl	
In-situ-Färbelösung	0,1 M	Tris/HCl	pH 9,5
	0,15 M	NaCl	
	150 µg/ml	4-nitro-blue-tetrazoliumchlorid (NBT)	
	370 µg/ml	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP)	

### Molekularbiologische Reagenzien und Verbrauchsmaterial

α-[ <sup>33</sup> P]-dATP	Amersham Pharmacia
Agarose Gel DNA Extraktion	Quiagen
Antibiotika	Sigma-Aldrich, Fluka
Anti-DIG-AP Fab fragments	Roche Applied Science
cDNA-Synthese	
Superscript <sup>TM</sup> II	Invitrogen

## 2. Material und Methoden

SMART™ Synthesis Kit	Clontech
Clonase™ Enzym Mix (BP/LR)	Invitrogen
DNA Taq-Polymerase	Eurogentec, Clontech
DNA-Längenstandard	Invitrogen, Promega
DNase I	Amersham Pharmacia
Elektroporationsküvetten (1mm)	EquiBio
Enhancer	Hydroluma
Digoxigenin-11dUTP	Roche Applied Science
Heringsperm-DNA	Sigma
Fuji BAS-IIIS-Bildplatten	Fuji Photo Film
Hybond™-N <sup>+</sup> Membranen	Amersham Pharmacia
T4-DNA-Ligase	Promega
MicroAmp® Optical Plates/Caps	Applied Biosystems
MicroSpin™ S-400 HR Columns	Amersham Pharmacia
96well Mikrotiterplatten	Nunc
MS-Salze	Serva
Oligotex™ mRNA Kit	Quiagen
GeneAmp® RNA pAW109	Applied Biosystems
PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit	Clontech
pGEM®-T Vector	Promega
QIAprep Spin Miniprep Kit	Quiagen
QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit	Quiagen
Random Priming Kit	Invitrogen
Restriktionsendonucleasen	Amersham Pharmacia, Promega, Invitrogen
RNase H	Amersham Pharmacia
RNase Inhibitor	Invitrogen
RNase ZAP	Biohit
Silwet L-77	Lehle Seeds
TRIzol® Reagent	Invitrogen

## 2.2 Geräte

Analysenwaage	Sartorius
Gamma-Spektrometer	Canberra Nuclear
Klimakammern	Raab Thiele Kühl-und Klimatechnik
Autoklav	H&P Labortechnik GmbH, Systec
DNA-Spotter Microgrid II	Biorobotics
Elektrophorese-Apparatur	PeqLab
Hybridisierungsöfen	UniEquip
Transilluminator GelDoc 2000	BioRad
Gene Pulser™	BioRad
IKA-Vibrax VXR	Janke & Kunkel
Inkubationsschrank	Memmert
Rotationsschüttler	New Brunswick Scientific
Mikroskop (Axioskop)	Zeiss
Milli-Q Water System	Millipore
PCR-Maschinen	
MJ Research PTC-200	MJ Research
PCR Express	Thermo Hybaid
Taqman® ABI 7700	Perkin Elmer
pH Meter	Knick
Phosphor Imaging System FLA-3000	Fuji Photo Film

Photometer Ultrospec 3100pro	Amersham Pharmacia
Pipetten	Eppendorf, Gilson
Sterilbank	Gelaire® Flow Laboratories
Szintillationszähler LS 1801	Beckman
UV-Crosslinker Stratalinker 1800	Stratagen
Vibratome® Series1000	Sectioning Systems
Wasserbad	Bachhofer
Zentrifugen	Beckman, Hettich

### 2.3 Bakterienstämme und Plasmide

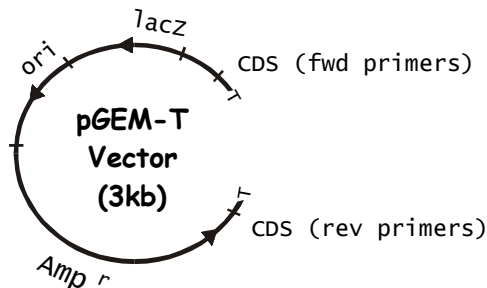
#### Escherichia coli DH5α

*deoR endA1 gyrA96 hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>+</sup>) recA1 relA1 supE44 thi-1 Δ(lacZYA-argF) Φ80lacZΔM15F<sup>-</sup>λ<sup>-</sup>*

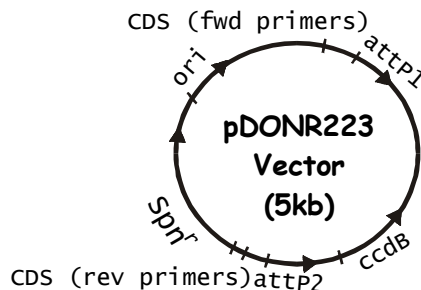
#### Escherichia coli JM109

*endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>+</sup>) relA1 supE44 λ<sup>-</sup> Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15]*

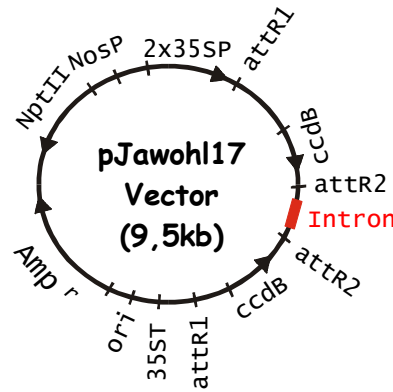
#### Agrobacterium tumefaciens pGV3101 (pMP90RK)



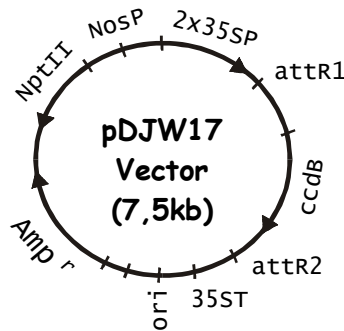
**pGEM<sup>®</sup>-T** (3kb großer linearisierter Klonierungsvektor mit 3'-Thymidinüberhang zur Subklonierung von Taq DNA-Polymerase amplifizierter DNA-Fragmente mit 3'-Desoxyadenosinüberhang; multiple Klonierungstelle, lacZ-Gen, Selektionsmarker: Ampicillin-Resistenz)



**pDonr 223** (5kb großer Vector mit attP Sequenzen zur Klonierung von attB flankierten PCR-Produkten und Genen durch Rekombination → Entry Klone; *ccdB*-Gen inhibiert die *E. coli* gyrase und verhindert dadurch das Wachstum der Zellen; Selektion durch Spectinomycin-Resistenz)



**pJawohl 17** (9,5kb großer Vector mit attR Sequenzen zur rekombinanten Klonierung mit Entry Klonen; zur Konstruktion von hpRNA mit sense/antisense Sequenzen und dazwischenliegendem Intron → RNA-Interferenz (RNAi); *ccdB* Gene; 2 x 35S Promotor; 35S Termination; Selektionsmarker: Ampicillin-Resistenz in Bakterien, Kanamycin-Resistenz in Pflanzen)



**pDJW 17** (7,5kb großer Vector mit attR Sequenzen zur rekombinanten Klonierung mit Entry Klonen; zur Überexpression von Genen in Pflanzen; *ccdB* Gene; 2 x 35S Promotor; 35S Termination; Selektionsmarker: Ampicillin-Resistenz in Bakterien, Kanamycin-Resistenz in Pflanzen)

Die Kultivierung von Bakterien erfolgte auf agarhaltigem Nährmedium in Petrischalen oder als Suspensionskulturen in Reagenzgläsern und Erlenmeyerkolben auf Rotationsschüttlern mit 250rpm bei der jeweiligen optimalen Temperatur von 37°C (*E. coli*) bzw. 28°C (*A. tumefaciens*). Zur Selektion wurden nach dem Autoklavieren sterilfiltrierte Antibiotika-Lösungen zugesetzt. Bei der Herstellung von Dauerkulturen wurden die Bakterienklone über Nacht in LB-Glycerin-Medium in 96well-Mikrotiterplatten angezogen und konnten anschließend bei -80°C aufbewahrt werden.

Luria-Bertani (LB)-Medium (Maniatis <i>et al.</i> , 1982)	1	% (w/v)	Bacto-Trypton	pH 7,0
	0,5	% (w/v)	Bacto-Hefeextrakt	
	1	% (w/v)	NaCl	
	(1,5	% (w/v)	Agar)	
LB-Glycerin-Medium	1	% (w/v)	Bacto-Trypton	pH 7,0
	0,5	% (w/v)	Bacto-Hefeextrakt	
	1	% (w/v)	NaCl	
	36	mM	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
	13,2	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
	0,4	mM	MgSO <sub>4</sub>	
	1,7	mM	Natriumcitrat	

## 2. Material und Methoden

	6,8	mM	(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	
	4,4	% (v/v)	Glycerin	
SOC-Medium (Maniatis <i>et al.</i> , 1982)	2	% (w/v)	Bacto-Trypton	pH 7,0
	0,5	% (w/v)	Bacto-Hefeextrakt	
	0,05	% (w/v)	NaCl	
	2,5	mM	KCl	
	10	mM	MgCl <sub>2</sub>	
	10	mM	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	
	20	mM	Glucose	
Ampicillin	50	µg/ml		
Kanamycin	50	µg/ml		
Gentamycin	50	µg/ml		
Rifampicin	100	µg/ml		
Spectinomycin	50	µg/ml		

### 2.4 Pflanzenanzucht

*Arabidopsis thaliana* gehört zur Gattung der Kreuzblütler und ist die Modellpflanze in der Molekularbiologie. Ihre Vorteile sind die geringe Größe, kurze Generationszeit und die Verfügbarkeit zahlreicher Mutanten. Sie kann sowohl fremd- als auch eigenbestäubt werden und lässt sich in Klimakammern einfach anziehen.



Abbildung 2-1 *Arabidopsis thaliana*

*Arabidopsis* ist eine der genetisch am besten charakterisierten Pflanzen. Das relativ kleine Genom ist inzwischen vollständig sequenziert worden: Es besteht haploid aus 5 Chromosomen mit ca. 25.000 Genen ( $1,3 \cdot 10^8$  Basenpaaren) und besitzt nur sehr wenige repetitive Sequenzen. Außerdem ist *Arabidopsis* durch Agrobakterien transformierbar, d.h. es lassen sich Gene stabil in das Genom einfügen.

## 2. Material und Methoden

Alle molekularbiologischen Experimente wurden mit *Arabidopsis thaliana* Columbia (Col-0) Wildtyp durchgeführt; die Samen wurden von Lehle Seeds (Round Rock, USA) bezogen.

Für die Untersuchungen zur Cäsium-Aufnahme wurden zudem verschiedene Mutanten verwendet; die jeweiligen Samen kamen vom Nottingham Arabidopsis Stock Center:

csi52	nicht-sensitiv gegenüber Cäsium-Konzentrationen von bis zu 2mM; reduzierte Aufnahme von Rb-86 und P-32 (stock number N6197)
akt1-1	Kalium-Kanal AKT1 Knockout-Mutante (N3762)
skor-1	Reduzierter Kaliumtransport von der Wurzel in den Sproß durch Ausschalten des SKOR-Kanals (N3816)
KAT1:GUS	Überexpression des Kalium-Transportergens kat1 in Schließzellen, Wurzeln und Blüten (N3763)

Die Pflanzen wurde in einer Nährsalzlösung (nach Gibeaut *et al.*, 1997) kultiviert. Die Anzucht erfolgte in Phytatray<sup>TM</sup> II Gefäßen oder in 250ml Erlenmeyerkolben. Als Alternativmedium wurde ein 25% MS-Medium (nach Murashige and Skoog, 1962) verwendet.

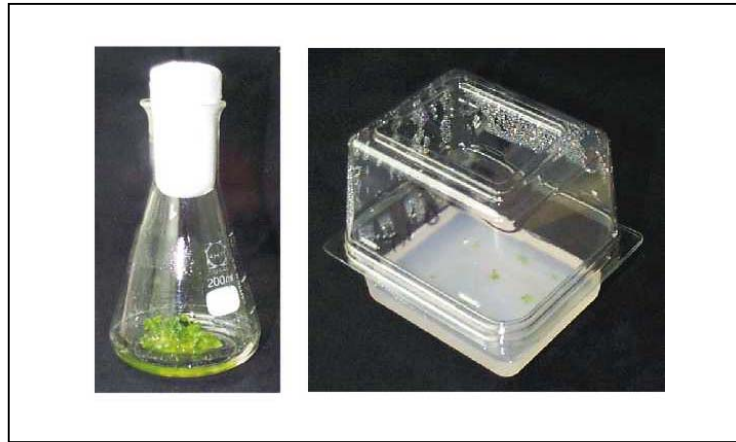
Pflanzenmedium (nach Gibeaut <i>et al.</i> , 1997)	1,5	mM	Ca(NO <sub>3</sub> )	pH 5,7
	0,75	mM	MgSO <sub>4</sub>	
	0,4	mM	KNO <sub>3</sub>	
	0,2	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
	72	µM	Fe-Sequestrin	
	50	µM	KCl	
	50	µM	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	
	10	µM	MnSO <sub>4</sub>	
	2	µM	ZnSO <sub>4</sub>	
	1,5	µM	CuSO <sub>4</sub>	
	75	nM	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	
(10	g/l	Agar)		
25% MS-Medium (auf 1l H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> )	1,15	g	MS-Salze	pH 5,7
	5	g	Saccharose	
	0,5	g	MES	
	10	g	Agar	

Zur Oberflächensterilisation wurden die Samen für eine Minute in 75% EtOH gegeben, abzentrifugiert und in Natriumhypochlorit : H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> (1:3, v/v) aufgenommen. Anschließend für 10min geschüttelt und 5mal – unter zwischenzeitlichem Zentrifugieren – mit sterilisiertem Wasser gewaschen. Die Samen wurden zuletzt in 0,1%iger Agarose gegeben, für einen Tag bei 4°C in Dunkelheit stratifiziert (Brechen der Samenruhe) und danach auf 25% MS-Medium ausgesät.

Die weitere Anzucht für die jeweiligen Experimente erfolgte in festem bzw. flüssigem Pflanzenmedium mit oder ohne Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen an Cäsium (siehe Kapitel 2.5). Drei Tage alte Keimlinge wurden in Phytatrays (100ml Agar-Pflanzenmedium) oder Erlenmeyerkolben (30ml Flüssigmedium) überführt und in klimatisierten Anzuchtskammern bei einer 14 h Lichtpe-



riode (Lichtintensität  $120\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) bei  $20^\circ\text{C}$  kultiviert; die Flüssigkulturen wurden zusätzlich mit 60rpm geschüttelt. Die Pflanzen wurden nach fünf bis sechs Wochen geerntet.



**Abbildung 2- 2 Anzucht in Erlenmeyerkolben (links), Phytatray (rechts)**

Die Anzucht auf Erde fand unter identischen Anzuchsbedingungen statt. Nach einer eintägigen Stratifikation in 0,1%iger Agarose bei  $4^\circ\text{C}$  wurden die Samen auf einer Mischung von 4:1 (v/v) Floraton-1 Erde (Floragard) und Sand (Quarzsand: Schweissersand (dorsilit) 3:1, v/v) ausgesät. Nach der Keimung wurden die Pflanzen zu je fünf pro Töpfchen (5x5cm) pikiert.

### 2.5 Cäsiumbehandlung

#### Versuche mit nicht-radioaktivem Cäsium

Bei allen Versuchen wurde das Cäsium-133 dem Medium als 1M wässrige CsCl-Stammlösung zugegeben. Für die Ermittlung der Toxizitätsschwelle wurden die Pflanzen auf 25% MS-Medium mit  $0\mu\text{M}$  (Kontrolle),  $50\mu\text{M}$ ,  $100\mu\text{M}$ ,  $250\mu\text{M}$ ,  $500\mu\text{M}$ ,  $700\mu\text{M}$ ,  $850\mu\text{M}$ ,  $1\text{mM}$  Cäsium-133 in Phytatrays kultiviert. Die Anzucht der Pflanzen für die Cäsiumaufnahme-Experimente erfolgte auf Agar-Pflanzenmedium bei  $0\mu\text{M}$ ,  $50\mu\text{M}$ ,  $100\mu\text{M}$ ,  $150\mu\text{M}$ ,  $200\mu\text{M}$ ,  $250\mu\text{M}$  und  $500\mu\text{M}$  Cäsium-133 ebenfalls in Phytatrays. Für die Messungen wurden ausschließlich die Blätter geerntet und gründlich mit destilliertem Wasser gereinigt, damit eine Oberflächenkontamination mit Cäsium möglichst ausgeschlossen werden konnte. Die Cäsium- und Kaliumkonzentrationen wurden am Institut für Analytische Chemie (GSF) massenspektroskopisch gemessen.

Für die molekularbiologischen Arbeiten wurde *Arabidopsis* in Schüttelkulturen mit flüssigem Pflanzenmedium angezogen. Bei der Subtraktiven-Suppressions-Hybridisierung erfolgte die Anzucht bei  $0\mu\text{M}$  (Kontrolle) bzw.  $150\mu\text{M}$  Cäsium (behandelte Pflanze).

Für die Experimente mit semiquantitativer PCR und quantitativer RT-PCR wurden folgende Cäsium-Konzentrationen verwendet:

C	= 0 $\mu\text{M}$ $^{133}\text{Cs}$ (Kontrolle)
100	= 100 $\mu\text{M}$
200	= 200 $\mu\text{M}$
300	= 300 $\mu\text{M}$
3d	= 150 $\mu\text{M}$ , 3 Tage
1,5w	= 150 $\mu\text{M}$ , 1,5 Wochen
+	= 150 $\mu\text{M}$ , 4 Wochen

### Versuche mit ionisierender Strahlung

Die Strahlungsexperimente wurden mit Cäsium-134 durchgeführt ( $t_{1/2} = 754.28 \pm 0.22$  days;  $\beta^-$ , EC (97,6%: 604,7keV); Zerfallsreihe: Ba-134, Xe-134). Die Anzucht fand nicht in Klimakammern statt, sondern wurde im Isotopenlabor bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Aufnahmeexperimente erfolgten in Phytatrays bei Zugabe von 0, 10, 20, 30 und 60 Bq/cm<sup>3</sup>. Die abgeschnittenen Blattrossetten der Pflanzen wurden in Analyseküvetten gegeben, das Frischgewicht bestimmt und im Detektor ( $\gamma$ -Spektrometer) vermessen.

Für die subtraktive cDNA-Bank wurde aus einer Stammlösung eine Aktivität von 30 Bq/cm<sup>3</sup> zu den Flüssigmedien zugesetzt. In den Experimenten mit semiquantitativer PCR und quantitativer RT-PCR wurden folgende Aktivitäten verwendet:

C	= 0 Bq/cm <sup>3</sup> $^{134}\text{Cs}$ (Kontrolle)
R1	= 10 Bq/cm <sup>3</sup>
R2	= 20 Bq/cm <sup>3</sup>
R3	= 60 Bq/cm <sup>3</sup>
R2+	= 20 Bq/cm <sup>3</sup> $^{134}\text{Cs}$ + 100 $\mu\text{M}$ $^{133}\text{Cs}$

### 2.6 Isolierung von RNA

Alle molekularbiologischen Arbeiten wurden ausschließlich mit Wurzelmaterial durchgeführt. In einem Mörser wurden die Pflanzenwurzeln aus fünf parallelen Anzuchten unter flüssigem Stickstoff fein zermahlen und zu 100-150mg Portionen in ein steriles 2ml Eppendorfgefäß abgewogen. Die Proben konnten bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert werden.

### 2.6.1 LiCl-Methode (nach Russell and Nurse, 1986)

Zu den zerriebenen Wurzeln wurden 300µl Extraktionspuffer und 100µl TLE-gesättigtes Phenol gegeben und mehrmals durch Vortexen geschüttelt. Nach Zugabe von 100µl Chloroform wurde die Lösung erneut kräftig gemischt und bei 55°C für 10min in einem Wasserbad inkubiert. Nach der Lyse wurden die Zellfragmente durch Zentrifugation (10min, 14000rpm, RT) abgetrennt und die wässrige Phase in ein Eppendorfgesäß überführt. Um die Proteine vollständig aus dem Gemisch zu entfernen, wurde ein weiteres Mal mit Phenol-Chloroform extrahiert, zur Phasentrennung 15min mit 14000rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert und die wässrige Phase abgezogen. Durch Zugabe von 200µl Chloroform und unter erneutem Schütteln und Abzentrifugieren wurde das restliche Phenol aus der RNA-haltige Phase entfernt. Auch dieser Schritt wurde einmal wiederholt.

Nach der Chloroform-Extraktion wurde die RNA mit 1/3 Volumenanteil 8M LiCl bei -20°C für 2h gefällt, durch Zentrifugieren (15min, 14000rpm, 4°C) pelletiert und in 2M LiCl-Lösung gewaschen. Die RNA wurde in 90µl sterilem H<sub>2</sub>O gelöst und erneut durch Zugabe von 30µl 8M LiCl bei -20°C für 2h präzipitiert, danach abzentrifugiert und erneut mit 150µl 2M LiCl vorsichtig gewaschen. Das Pellet wurde in 50µl sterilem H<sub>2</sub>O gelöst und die Nucleinsäuren mit 5µl 3M Natriumacetat (pH 5,2) und 100µl EtOH p.a. für 1h bei -80°C ausgefällt. Nach einer anschließenden 20minütigen Zentrifugation bei 14000rpm und 4°C wurde die RNA mit 75% EtOH gewaschen und in 20µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gelöst.

### 2.6.2 TRIzol-Methode

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurde 1ml der TRIzol-Reagenz (Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothicyanat) zu dem gemörserten Pflanzenmaterial gegeben und unter zwischenzeitlichem Schütteln für 10min bei 50°C inkubiert. Die Proben wurden bei 14000rpm für 10min zentrifugiert, um Zellbruchstücke abzutrennen. Durch zweimalige Zugabe von Chloroform zu dem wässrigen RNA-Extrakt wurde die Lösung vom Phenol gereinigt. Anschließend wurde die RNA mit 0,5ml iso-Propanol 30min bei 4°C präzipitiert, abzentrifugiert (14000, 15min, 4°C) und mit 75% EtOH gewaschen. Zuletzt wurde sie in 50 µl sterilem H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Um die letzten DNA-Verunreinigungen zu entfernen, wurde die RNA-Lösung mit DNase versetzt und für 10min bei 37°C inkubiert. Danach wurde mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) und einem anschließenden Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) Schritt gewaschen. Der wässrigen Phase wurden 5µl 3M Natriumacetat und 100µl Volumenanteil EtOH p.a. zugegeben und das Gemisch 2h bei -20°C aufbewahrt. Nach Zentrifugation und einem 75% EtOH Waschschrift konnte das Pellet in der gewünschten Menge H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> resuspendiert werden.

Zur Bestimmung der Extinktion wurde die Nucleinsäure in geeigneter Verdünnung in einem Photometer bei  $\lambda = 230, 260$  und  $280\text{nm}$  vermessen.

Die Berechnung der RNA-Konzentration erfolgte durch die Näherung  $1 \text{ OD}_{260} = 40\mu\text{gml}^{-1}$ . Aussagen über die Reinheit der Probe konnten durch Ermittlung der Quotienten  $E_{260}/E_{280}$  ( $\approx 1,8$ ) und  $E_{260}/E_{230}$  ( $\approx 2,2$ ) gemacht werden.

Um die Integrität der ribosomalen Banden zu überprüfen, wurde die RNA zusammen mit Ladepuffer auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (vgl. Kapitel 2.7.1). Die Gelapparatur wurde vor dem Gebrauch mit RNase ZAP gereinigt, damit eine Kontamination mit RNasen weitgehend verhindert werden konnte. Um die Konzentration der RNA präziser zu bestimmen, wurden zusätzlich die ribosomalen Banden mit der ImageMaster 1D Elite Software quantifiziert. Die erhaltenen Werte wurden mit den photometrischen Ergebnissen verrechnet und daraus die Endkonzentration der RNA ermittelt.

### 2.6.3 Poly(A)<sup>+</sup>-RNA Isolierung

Aus der Gesamt-RNA-Lösung wurde mit Hilfe des Oligotex mRNA Kits die mRNA isoliert. Oligotex-dT ist eine Affinitätsmatrix für poly(A)<sup>+</sup>-RNA, durch die mRNA selektiv von den übrigen Nucleinsäuren abgetrennt werden kann. Dazu sind d(T)30-Oligonucleotide an Latexkügelchen gekoppelt, die mit der carboxyterminalen Poly(A)-Sequenz der mRNA hybridisieren.

Nach Herstellerangaben wurden zu der RNA verschiedene Puffern gegeben und zusammen mit der Oligotex-dT-Suspension vermischt. Die Sekundärstruktur der Nucleinsäure musste durch einen 5minütigen  $70^{\circ}\text{C}$ -Schritt zerstört werden. Anschließend wurde das Gemisch bei Raumtemperatur inkubiert (wobei die Hybridisierung stattfinden kann) und auf Säulchen durch mehrmaliges Waschen mit Hochsalz-Puffern gereinigt. Die Elution der mRNA erfolgt durch Zugabe einer erhitzten Pufferlösung.

Die Konzentration und die Qualität der poly(A)<sup>+</sup>-Isolierung wurde durch photometrische Messung und Elektrophorese ermittelt.

## 2.7 Gelelektrophorese

### 2.7.1 Nicht-denaturierende Agarose-Gele

Unter Elektrophorese versteht man die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Die Beweglichkeit wird dabei durch die unterschiedliche Ladung und Größe definiert und bewirkt in einer geeigneten Matrix eine Auftrennung eines Substanzgemisches in einzelne Fraktionen. Die DNA

und RNA besitzen negativ geladene Phosphatgruppen, was sie für die elektrophoretische Analyse zugänglich macht.

Die Nucleinsäuren wurden zusammen mit Ladepuffer auf ein 1-2%iges Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt; als Puffersystem diente TBE. Zur Gellösung wurde  $0,1\mu\text{gml}^{-1}$  Ethidiumbromid gegeben, um die Nucleinsäuren später unter UV-Licht ( $\lambda=302\text{nm}$ ) sichtbar machen zu können. Als Längenstandard wurden 50bp-, 100bp- und 500bp-Leitern von Invitrogen verwendet. Die Elektrophorese erfolgte je nach Gelgröße mit einer Spannung von 80-120 Volt über 1-4 h. Zur Dokumentation wurden die Gele in einem Transilluminator photographiert.

### 2.7.2 Denaturierende Agarose-Gele

Zu analytischen Zwecken wurde die RNA unter denaturierenden Bedingungen in einem 1,2%igen Agarosegel aufgetrennt. Der hierzu verwendete Gelpuffer enthielt:

---

20	mM	MOPS	pH 7,0
3	% (v/v)	37% Formaldehyd	
5	mM	Natriumacetat	
1	mM	EDTA	

---

Die Agarose wurde in der Mikrowelle geschmolzen und das Formaldehyd nach Abkühlen auf ca.  $50^{\circ}\text{C}$  unter dem Abzug zugegeben. Um eine Kontamination mit RNasen zu verhindern, wurde die Gelapparatur vor dem Gießen mit RNase ZAP gereinigt. Die Proben wurden mit RNA-Ladepuffer versetzt und für 10min bei  $65^{\circ}\text{C}$  denaturiert. Anschließend wurden sie kurz auf Eis gegeben, bevor sie auf das Gel aufgetragen werden konnten. Als Laufpuffer diente eine Lösung aus 20 mM MOPS, 5 mM Natriumacetat und 1mM EDTA (pH 7,0). Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 70 Volt für ca. 3h durchgeführt. Das Gel wurde abschließend im Transilluminator kontrolliert.

### 2.7.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die entsprechende Bande wurde unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des Gel-Extraktionskits von Quiagen eluiert. Dabei wurde das Agarosegel in einem Puffer bei  $50^{\circ}\text{C}$  unter zwischenzeitlichem Vortexen aufgelöst und die freigesetzte DNA an die Affinitätsmatrix eines Zentrifugations-Säulchens gebunden. Die DNA musste abschließend mit Hochsalz-Puffern gereinigt und mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  wieder von der Matrix entfernt werden.

## 2.8 Enzymatische Modifikationen an Nucleinsäuren

### 2.8.1 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgt mit Hilfe von Reversen Transkriptasen. Es handelt sich hierbei um RNA-abhängige Polymerasen, die die Synthese eines zur RNA-Matrize komplementären DNA-Einzelstranges katalysieren. Diese können in Folgereaktionen – zum Beispiel in der PCR (siehe Kapitel 2.10) – eingesetzt werden.

#### Superskript™ II Reverse Transcriptase

Die Versuche wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Ausgangsmaterial wurde 1-5µg Gesamt-RNA oder mRNA verwendet. Die RNA wurde zusammen mit den Oligo(dT)<sub>12-18</sub> Primern bei 70°C für 10min erhitzt, um die Sekundärstrukturen zu zerstören. Anschließend wurden die Reaktionsansätze für 2min auf Eis abgekühlt und nach Zugabe des Enzyms 1,5h bei 42°C inkubiert. Die Proben konnten danach bei -20°C gelagert werden.

cDNA-Ansatz:

---

2µg	Gesamt-RNA
1µl	Oligo(dT) <sub>12-18</sub> (500µgml <sup>-1</sup> )
1µl	10mM dNTP-Mix
auf 12µl mit H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	
4µl	5x First-Strand Buffer
2µl	0,1M DDT
1µl	Reverse Transkriptase

---

#### SMART-Methode

Um aus sehr geringen RNA-Mengen (> 25ng) in ausreichenden Mengen cDNA herstellen zu können, wurde die SMART-Technologie von Clontech eingesetzt. Hierzu werden bei der Synthese der cDNA an den 5'- und 3'-Enden spezifische Oligonucleotide angelagert, an die komplementäre Primer bei einer nachfolgenden PCR hybridisieren; so kann die gebildete Einzelstrang-cDNA beliebig vervielfältigt werden. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

### 2.8.2 Restriktionsanalyse

Typ II-Restriktionsendonucleasen sind Enzyme, die in Doppelstrang-DNA meist palindrome Sequenzen erkennen, an diese binden und sie spezifisch spalten. Die entstehenden Restriktionsfragmente haben folglich je nach Häufigkeit und Lage der Schnittstellen eine definierte Länge und können durch Gelelektrophorese (vgl. Kapitel 2.7) aufgetrennt werden.

Beispiele für verwendete Restriktionsendonucleasen:

SpeI	A↓CTAGT
HindIII	A↓AGCTT
RsaI	GT↓AC

Die Restriktionsenzyme können unter anderem zur Identifikation von DNA-Molekülen oder zur Klonierung verwendet werden.

Ein Standard-Restriktionsansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

---

1-10 µg	DNA
1 Uµg <sup>-1</sup> DNA	Restriktionsendonucleasen
1 µl	10x Restriktionspuffer

---

auf 10µl mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

Der Ansatz wurde je nach Temperaturoptimum des Enzyms 1-3h inkubiert.

### 2.8.3 Ligation

Unter Ligation versteht man die Verknüpfung der Enden von DNA-Doppelsträngen mit Hilfe von Ligasen. Die Ligase katalysiert dabei die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe mit einer 3'-OH-Gruppe derselben oder einer anderen Nucleinsäure.

Ein Ligationsansatz hat zum Beispiel folgende Zusammensetzung:

---

5 µl	2x Ligationspuffer
3,5 µl	PCR-Produkt
0,5 µl	Vektor-DNA
1 µl	T4-DNA-Ligase

---

Die Reaktion wurde über Nacht bei 12°C durchgeführt; die so erhaltenen Plasmide konnten danach in kompetente Zellen transformiert werden (siehe Kapitel 2.9.2).

### 2.9 Transformation und Plasmid-Isolierung

#### 2.9.1 Herstellung kompetenter Zellen

Die Transformation ist ein Prozess, bei dem DNA-Fragmente oder Gene aus der Umgebung in eine Zelle aufgenommen werden. Dazu werden speziell behandelte Zellen, sogenannte kompetente Zellen, benötigt. Diese Zellen wurden entweder von Promega bezogen oder selber nach der  $\text{CaCl}_2$ -Methode (Hanahan, 1985) hergestellt.

Einzelne Kolonien der benötigten Bakterien wurden in 3ml SOC-Medien angeimpft und über Nacht angezogen. 10 $\mu\text{l}$  der Übernachtskultur wurden in 100ml SOC-Medium gegeben und inkubiert, bis eine optische Dichte von  $\text{OD}_{550}=0,28$  erreicht wurde. Die Zellsuspension konnte nun bei 4°C für 5min bei 3000rpm abzentrifugiert und in 1,5ml eiskaltem Tfb I-Puffer resuspendiert werden. Nach einem 10minütigen Eisschritt wurde erneut zentrifugiert und das Pellet innerhalb von ca. 45min auf Eis in 4ml eiskaltem Tfb II-Puffer vorsichtig gelöst. Die nun kompetenten Zellen wurden in 100 $\mu\text{l}$  Fraktionen aliquotiert, in flüssigen Stickstoff gegeben und bei -80°C aufbewahrt. Zuletzt musste noch die Transformationseffizienz ( $10^6$ - $10^7$  Kolonien/ $\mu\text{g}$  Plasmid) überprüft werden.

Zur Herstellung elektrokompenter Agrobakterien wurden 300ml Kulturen bis zu einer OD von 0,5-0,7 bei 28°C in LB-Medium (+ Rifampicin, Kanamycin, Gentamycin) angezogen und für 30min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden sie zentrifugiert (20min, 4000rpm, 4°C) und das Pellet dreimal mit je 125ml eiskaltem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  gewaschen. Zwischen den Waschschritten mussten die Zellen jeweils für 30min auf Eis gelagert werden. Zuletzt wurden das Pellet vorsichtig in 1ml 10%igem Glycerin resuspendiert, in 100 $\mu\text{l}$  Fraktionen portioniert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die kompetenten Agrobakterien mussten bei -80°C gelagert werden.

#### 2.9.2 Transformation kompetenter Zellen

##### Chemisch kompetente Zellen

Die kompetenten Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Jeweils 50 $\mu\text{l}$  der Zellsuspension wurden zusammen mit einem 10 $\mu\text{l}$  Ligationsansatz in ein 2ml Eppendorfgefäß unter vorsichtigem Mischen vereinigt. Der Reaktionsansatz wurde für 30min auf Eis gelagert, bevor die Aufnahme des Plasmids durch einen Hitzeschock von 42°C für 50s erfolgte. Anschließend wurden die Zellen für 2min auf Eis gekühlt und mit 950 $\mu\text{l}$  SOC-Medium versetzt. Damit sich die Zellwand regenerieren konnte, wurden die Zellen 1h bei 37°C und 150rpm in einen Inkubationsschüttler gegeben. Die Suspension wurde



danach auf einer LB-Platte mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C gelagert.

Am nächsten Morgen konnten die einzelnen Klone gepickt und als Überdauerungskultur (siehe Kapitel 2.3) gelagert oder direkt in einer PCR eingesetzt und analysiert werden.

### **Elektrokompetente Zellen**

Alle Gefäße und Lösungen wurden gekühlt, bevor sie verwendet wurden. Etwa 50ng an DNA wurden zu den auf Eis aufgetauten elektrokompetenten Zellen hinzugefügt. Das Gemisch wurde in die 1mm Elektroporationsküvetten pipettiert und im Gerät mit einem elektrischen Impuls von 1,8 Volt, 200Ω und 25μF für 4,8s behandelt. Sofort danach wurde 950μl eiskaltes SOC-Medium dazugegeben, die Zellen in ein 2ml Eppendorfgefäß überführt und bei 28°C und 150rpm für 2h geschüttelt. Schließlich wurde das Gemisch auf LB-Medium (mit Ampicillin, Kanamycin, Gentamycin und Rifampicin) ausplattiert. Nach ca. drei Tagen waren die ersten Kolonien sichtbar und konnten gepickt werden.

### **2.9.3 Isolierung von Plasmid-DNA**

Aus einer Überdauerungskultur wurden 5μl in eine 4ml LB-Flüssigkultur mit entsprechenden Antibiotika bei optimaler Temperatur und 250rpm über Nacht vermehrt.

Die Isolierung der Plasmid-DNA wurde nach der Anleitung des QIAprep Spin-Miniprep Kit-Protokolls von Quiagen durchgeführt: Die pelletierten Bakterien werden dabei alkalisch hydrolysiert und an einer Säule mit Anionenaustauschermatrix gebunden. Nach mehreren Waschschritten erfolgt die Elution mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch gemessen.

## **2.10 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

### **2.10.1 Allgemeine PCR**

Die Polymerasekettenreaktion wurde Mitte der 80er Jahre entwickelt (Mullis and Fallona, 1987; Saiki *et al.*, 1985). Diese Methode zur in vitro-Amplifikation definierter DNA-Abschnitte beruht auf der Verwendung von komplementären, antiparallelen Oligonucleotiden (Primer) und thermostabiler DNA-Polymerase. Zur exponentiellen Vermehrung des gewünschten Fragmentes werden drei Einzelschritte in zyklischer Folge mehrmals wiederholt: Hitzedenaturierung der DNA-Doppelhelix, die Primeranlagerung und die Verlängerung der Primer in 5'-3'-Richtung. Die entstehenden DNA-Stränge dienen als Matrize in den darauf folgenden Zyklen.

## 2. Material und Methoden

---

Beispiel: 100µl Versuchsansatz

---

10	µl	10x PCR-Puffer
2	µl	10mM dNTP-Mix
3	µl	Primer sense
3	µl	Primer antisense
0,1	µl	500U Taq-Polymerase
81,9	µl	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>

---

Allgemeiner Reaktionszyklus:

1	95°C	5	min	Denaturierung
2	95°C	1	min	Denaturierung
3	50-65°C	30	sec	Annealing
4	72°C	1-5	min	Extension
5	72°C	10	min	Extension

Der Thermocycler wurde so programmiert, dass die Ansätze die Schritte 2-4 in 35 Zyklen durchliefen. Zum Schluss wurden die Eppendorfgefäße auf 4°C abgekühlt und dadurch die PCR beendet. Eine Liste der verwendeten Primer ist im Anhang dargestellt.

In den folgenden Kapiteln werden nun verschiedene PCR-Ansätze und methodische Varianten näher beschrieben, die im Rahmen der Arbeit angewandt wurden.

### 2.10.2 Semiquantitative PCR mit pAW109 Standard

Bei der semiquantitativen RT-PCR wird 0,5-1µl artifiziell klonierter pAW109 RNA (10<sup>6</sup>Kopien/µl) als interner Standard zu dem cDNA-Synthese Reaktionsansatz dazugegeben. Diese wird parallel mit den zu untersuchenden Proben in cDNA umgeschrieben und dient später bei der Amplifikation durch die PCR als Bezugsgröße.

Die Vervielfältigung von DNA-Fragmenten folgt einer sigmoidalen Sättigungskurve (Abbildung 2-3). Um die Transkriptionsrate verschiedener Gene bei unterschiedlichen Bedingungen vergleichen zu können, ist es nötig, die Analyse der Banden im linearen Bereich (logarithmische Phase) der Amplifikation zu untersuchen; im Sättigungsbereich ist keine Quantifizierung mehr möglich.

Zu Beginn musste also die optimale Zyklenzahl ermittelt werden, wobei gilt: Je stärker ein Gen exprimiert wird, desto eher wird die Sättigungsphase erreicht.

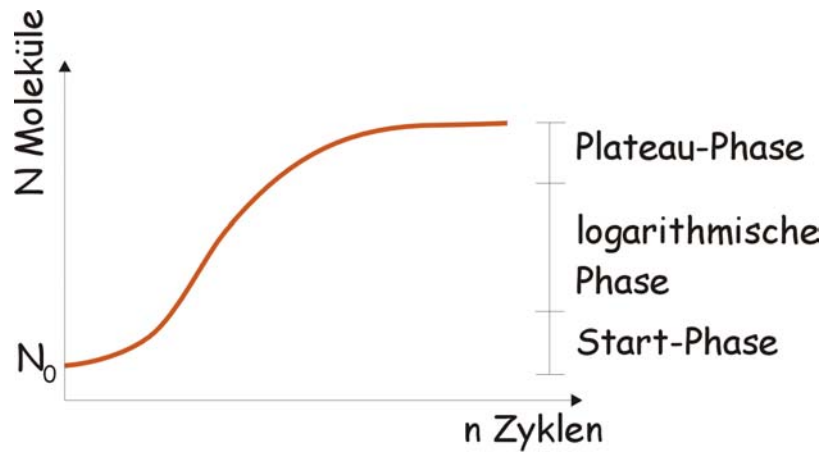


Abbildung 2-3 Verlauf der sigmoidalen Sättigungskurve einer PCR-Reaktion

Für die Amplifikation der artifiziellen cDNA wurde das Primerpaar DM151/DM152 verwendet. Die Primer besitzen eine Schmelztemperatur von 50-55°C und schließen ein Fragment von ca. 300bp ein. Entsprechend wurden die Primer für die zu untersuchenden Gene so gewählt, dass sie mindestens um 50bp von dieser Länge abwichen, damit das Gemisch noch in einem 2%igen Agarosegel analysiert werden konnte. Die Annealingtemperatur war 53°C; je nach Gen wurden zwischen 33 und 39 Zyklen durchlaufen.

5µl der PCR-Produkte wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die Banden im Transilluminator mit der dazugehörigen Software (MultiAnalyst) quantifiziert. Aus dem Ergebnis wurde der Quotient der Bandenintensitäten des spezifischen Genes und des internen Standards gebildet und die Induktion berechnet (Abbildung 2-4).

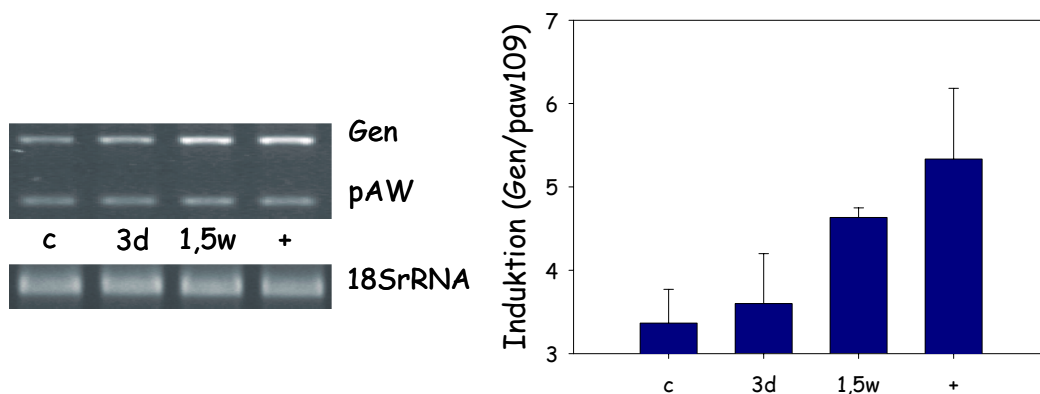


Abbildung 2-4 Beispiel: Induktionsbestimmung mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR

Die Experimente wurden pro Gen mehrfach wiederholt, wobei die cDNA für jeden Ansatz neu synthetisiert wurde. Als Ausgangsmaterial wurden RNA-Isolate aus mehreren unabhängigen Pflanzenanzuchten verwendet; die RNA-Konzentration wurde vor der cDNA-Synthese immer neu vermessen.

### 2.10.3 Quantitative real time (RT)-PCR

Ein anderes Nachweisverfahren zur quantitativen Nucleinsäureanalyse ist das TaqMan-System. Hierbei erfolgen die Amplifikation und der Nachweis des PCR-Produktes simultan in einem Reaktionsgefäß. Durch die Interkalation von DNA-Doppelstrang bindenden Farbstoffen wie SYBR Green kann mit Hilfe eines Lasers während der PCR ein Fluoreszenzsignal erzeugt werden, welches sich proportional zur Zunahme des PCR-Produktes verhält ( $R_n$ -Wert). Dies erlaubt ein Verfolgen der Reaktion in der logarithmischen Phase der PCR, wodurch eine Quantifizierung möglich wird. Zur Standardisierung wurde die pAW109 RNA (vgl. Kapitel 2.10.2) bzw. ein „housekeeping“-Gen – also ein Gen, dessen Transkriptionsrate sich aufgrund der Stresseinwirkung nicht verändert (CyclinB1 bei Cäsium-133 Stress; durch Vorversuche ermittelt) – als endogene Kontrolle eingesetzt.

Da der Farbstoff unspezifisch bindet, würden auch Fehlamplikate in die Quantifizierung eingehen und das Ergebnis verfälschen. Daher wurden die Primer in einer möglichst geringen Konzentration eingesetzt, und es musste zuvor geprüft werden, ob sie optimal arbeiten.

Der Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

---

12,5	µl	2x QuantiTect SYBR Green PCR Puffer
9,5	µl	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
0,5	µl	je Primer (10µM)
2	µl	cDNA

---

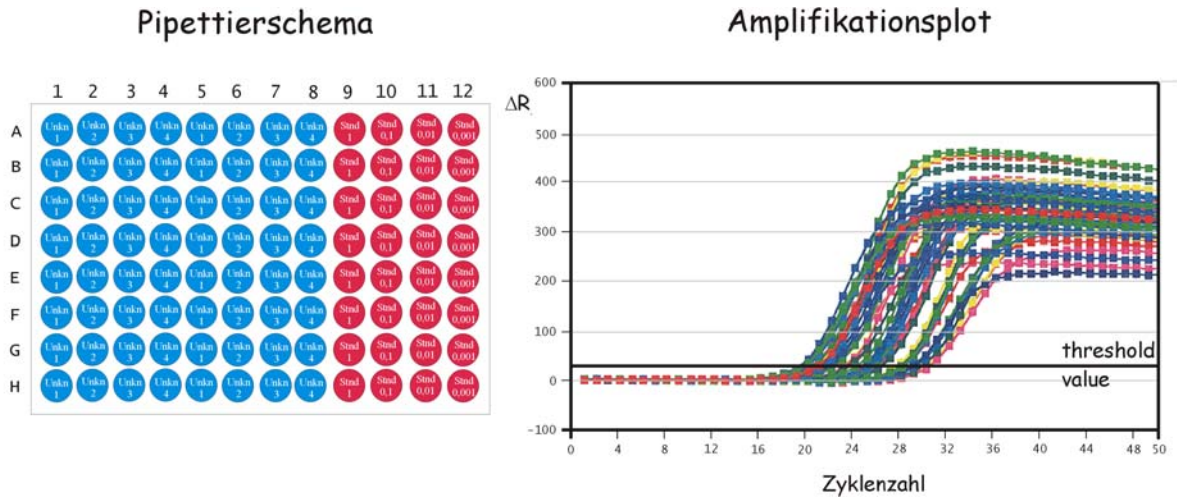
Für jedes zu analysierende Gen und für den Standard wurden zwei Wiederholungen pro Ansatz durchgeführt. Zudem wurde für jedes Primerpaar eine Verdünnungsreihe von 1:1; 1:10, 1:100 und 1:1000 angesetzt und ebenfalls amplifiziert. Das Pipettierschema eines Versuches ist in Abbildung 2-5 aufgezeigt. Auf eine Leerprobe wurde zugunsten einer höheren Durchsatzrate verzichtet; stattdessen wurden die Primer und die RNA in Vorversuchen ausgiebig auf mögliche Verunreinigungen getestet.

Die fertigen Ansätze wurden in den vorbereiteten TaqMan gegeben und unter folgenden Bedingungen für 50 Zyklen (Schritte 2-4) inkubiert:

1	95°C	15	min
2	95°C	1	min
3	53°C	30	sec
4	72°C	1	min

## 2. Material und Methoden

Die Datenaquisition fand während des Extensionschrittes bei 72°C statt. Primerdimere sind in der Regel bei diesen Temperaturen einzelsträngig und gehen somit nicht in die Quantifizierung ein. Nach Beendigung des Laufes wurden die ermittelten Daten von der Software (Sequence Detector v1.6.3) analysiert und in einem Amplifikationsplot (vgl. Abbildung 2-5) dargestellt.



**Abbildung 2- 5 Pipettierschema in der Mikrotiterplatte (links); rechts: Amplifikationsplot**

Je nach Beginn der logarithmischen Phase eines Genes musste die Basislinie und der Schwellenwert (threshold value) definiert werden.

Anschließend wurden die Ct-Werte vom Computer ermittelt. Der Ct-Wert ist dabei als der Zyklus definiert, bei dem zum ersten Mal ein signifikant erhöhter  $R_n$ -Wert detektiert werden konnte. Die Berechnung der relativen Induktion der Gene erfolgte mit Hilfe eines mathematischen Modells nach Pfaffl (2001):

$$\text{ratio} = \frac{E_{\text{eff}}(\text{target})^{\Delta C_{t_{\text{target}}(\text{control sample})}}}{E_{\text{eff}}(\text{standard})^{\Delta C_{t_{\text{standard}}(\text{control sample})}}}$$

Die Expressionsrate der Kontrolle ist demnach 1 und die Raten der übrigen Versuche sind im Verhältnis zur Kontrolle angegeben. Die PCR-Effizienzen ( $E_{\text{eff}}$ ) der Zielgene und des Standards ergeben sich aus der Steigung der Regressionsgeraden der Verdünnungsreihen:  $E_{\text{eff}} = 10^{(-1/\text{Steigung})}$ , sie liegen im Allgemeinen bei Werten zwischen 1 (keine Amplifikation) und 2 (Verdopplung bei jedem Zyklus).

Die statistische Auswertung erfolgte mittels der einfaktoriellen Varianzanalyse ( $P < 0,05$ ) bzw. durch Ablehnung der Nullhypothese beim Zweistichproben t-Test einzelner Werte mit gleicher Varianz.

### 2.10.4 In-situ PCR

Bei der In-situ PCR findet die Amplifikation von DNA-Abschnitten innerhalb einer Zelle, z.B. an histologischen Schnitten statt, d.h. man kann direkt im Gewebe Untersuchungen auf Transkriptebene durchführen.

Zuerst mussten die Wurzelquerschnitte präpariert werden. Dazu wurde die Wurzel von vier Wochen alten Pflanzen in ca. 5mm große Fragmente geschnitten und diese für 48h in FAA-Fixierlösung bei 4°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Gewebestücke dreimal für 10min in 63% Ethanol (in PBS), sowie einmal in PBS-Puffer gewaschen. Zwischen den Schritten wurden die Wurzelfragmente kurz abzentrifugiert und die Waschlösung mit der Pipette abgezogen.

Danach wurden die Gewebestücke in 5%iger *low melting* Agarose (w/v in PBS) eingebettet und gekühlt. In diesem Zustand konnten die Wurzeln für etwa zwei Wochen bei 4°C aufbewahrt werden.

Kleine Agaroseblöcke wurden auf den Probenhalter eines Vibratoms befestigt und 30µm Schnitte angefertigt; die Gewebeschnitte wurden in sterilem Wasser mit 1000U/ml RNase-Inhibitor aufgefangen. Die Proben mussten für 10min bei 65°C erhitzt und anschließend dreimal in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gewaschen werden. Zur Kontrolle wurden sie unter dem Mikroskop untersucht und geeignete histologische Schnitte für die nachfolgende Reverse Transkription und PCR-Amplifizierung ausgewählt.

Ein 20µl RT-Mix (1x RT-Puffer, 1mM dNTPs, 10µM reverser genspezifischer Primer) wurde zu den Wurzelquerschnitten gegeben und bei 65°C für 5min denaturiert. Nach kurzem Abkühlen auf Eis konnte der RNase-Inhibitor (1000U/ml) und die Reverse Transkriptase (500U/ml) hinzupipettiert und der Ansatz für 1,5h bei 37°C inkubiert werden. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte bei 95°C für 5min.

Der 20µl-Ansatz der PCR setzte sich aus 1x PCR-Puffer, 200µM dNTPs, je 10µM der genspezifischen Primer und der Taq-Polymerase zusammen. Zudem wurde 10µM Digoxigenin-11dUTP (DIG) als Farbstoff zur späteren Detektion der PCR-Produkte in das Eppendorfgefäß pipettiert. Die Amplifikation erfolgte in 30 Zyklen unter folgenden Bedingungen:

In-situ PCR:

95°C	30sec
53°C	30sec
72°C	1,5min

Parallel zu den zu untersuchenden Genen wurde eine Negativ-Kontrolle (keine cDNA-Synthese) und eine Positiv-Kontrolle mit 18S-rRNA spezifischen Primern (58°C) durchgeführt.

Nach der Beendigung wurden die Proben zweimal in PBS gewaschen und zum Abblocken von unspezifischen Bindungsstellen für 30min in 100µl Blockierungspuffer gegeben. Die Gewebeschnitte konnten nun in 50µl einer 1:500 verdünnten Anti-DIG-AP-Lösung (in Blockierungspuffer) für 1h inkubiert werden. Zuletzt wurden die sekundären Antikörper entfernt und die Schnitte zweimal je 15min mit In-situ Waschlösung gereinigt.

Zur Untersuchung unter dem Mikroskop wurde zu den Wurzelschnitte 50µl Färbelösung pipettiert und die Entwicklung der Färbung verfolgt. Die Reaktion konnte durch Spülen mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gestoppt und das Ergebnis photographiert werden.

### 2.11 RNA-Blotting

Mit Hilfe des Blot-Verfahrens kann die Expression eines bestimmten Genes auf der Ebene der Transkription ermittelt werden. Dazu transferiert man die Nucleinsäuren auf eine feste Membran und fixiert sie unter UV-Licht. Danach kann man die RNA durch Hybridisierung näher untersuchen und identifizieren.

#### 2.11.1 Northern-Blotting

Das Verfahren der denaturierenden Elektrophorese ist in Kapitel 2.7.2 beschrieben. Nach dem Lauf wurde das Gel photographiert, 20min lang mit 20x SSC gewaschen und die aufgetrennten Nucleinsäuren über Nacht mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran übertragen (Abbildung 2-6). Dabei wurde das Gel luftblasenfrei auf 20x SSC getränktem Whatman® Papier gelegt und mit der Membran und mehreren Lagen saugfähigem Papier überschichtet; als Transferpuffer wurde ebenfalls 20x SSC verwendet.

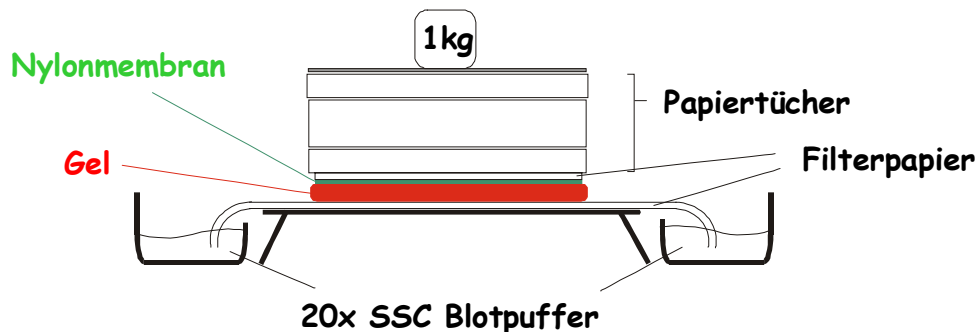


Abbildung 2-6 Aufbau eines Kapillarblots

Die Filter wurden anschließend getrocknet und zur Quervernetzung der RNA mit der Membran unter UV-Licht fixiert. Nachdem der Transfer im Transilluminator überprüft und dokumentiert wurde, konnten die Membranen in Folie eingeschweißt im Kühlschrank aufbewahrt werden.

### 2.11.2 Slot-Blotting

Im Vergleich zum Northern-Blot handelt es sich hierbei um eine sehr einfache und schnelle Anwendung der Filterhybridisierung.

Die RNA wurde bei 70°C für 10min denaturiert und ohne vorhergehende Auftrennung auf einem Gel mit Hilfe einer Slotapparatur direkt auf die Membran pipettiert. Die Nucleinsäuren wurden nun durch Anlegen eines Vakuums auf die Nylonmembran gesaugt und anschließend mit 20x SSC-Puffer gewaschen. Nachdem sie getrocknet und unter UV-Licht fixiert worden waren, konnten sie für die Hybridisierung verwendet werden oder alternativ in Folie eingeschweißt im Kühlschrank aufbewahrt werden.

### 2.11.3 Hybridisierung der RNA-Blots

Die Hybridisierung wurde mit  $\alpha$ -<sup>33</sup>P-markierten Oligonucleotiden durchgeführt. Die Herstellung der Sonden durch „random priming“ ist in Kapitel 2.13.2 näher beschrieben.

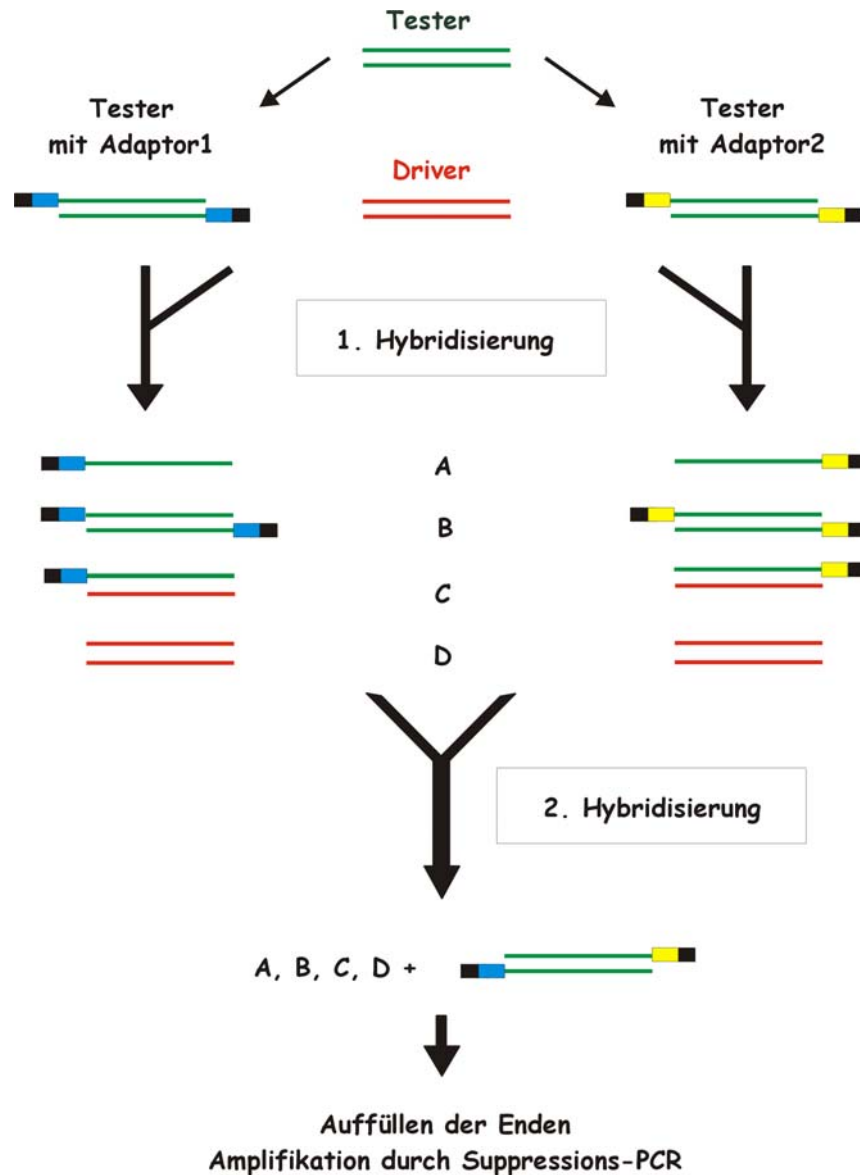
Die Membranen wurden zusammen mit 10ml RNA-Hybridisierungslösung in ein Hybridisierungsröhrchen gegeben und in einem Rotationsofen bei 42°C für mindestens 3h prähybridisiert. Die eigentliche Hybridisierung erfolgte nach Zugabe der denaturierten Sonden über Nacht bei 42°C. Anschließend wurde die Lösung abgegossen und die Membran zweimal für fünf Minuten bei Raumtemperatur mit 10ml Waschlösung 1 und einmal für 20 Minuten bei 42°C mit 10ml Waschlösung 2 gespült. Nachdem so die überschüssigen und unspezifisch gebundenen Oligonucleotide entfernt werden konnten, wurde der Blot in Folie eingeschweißt und auf einer Bildplatte exponiert. Die Detektion erfolgte nach 3 bis 48h mit dem Fuji Phosphor Imager System.

## 2.12 Subtraktive-Suppressions-Hybridisierung (SSH)

Die Identifizierung von Genen, die durch Cäsium oder ionisierende Strahlung in unterschiedlichem Maße exprimiert werden, erfolgte durch die Subtraktive-Suppressions-Hybridisierung (Diatchenko *et al.*, 1996). Durch die Verknüpfung der Subtraktiven Hybridisierung und der Suppressions-PCR ist die Methode im Vergleich zu anderen Strategien sehr sensibel und in Kombination mit der Makroarray-Technologie (vgl. Kapitel 2.13) gut geeignet, um schnell und mit hohem Durchsatz die Transkriptionsprofile zweier Proben miteinander vergleichen zu können. Der zu analysierende cDNA-Pool wird dabei als Tester bezeichnet, die Referenz als Driver. Je nach Ziel der Untersuchungen ist die



cDNA aus der unbehandelten Kontrollpflanze einmal der Driver (Analyse der Induktion von Genen aufgrund Cäsium/ionisierender Strahlung) oder der Tester (Identifizierung von stress-bedingter Genrepression); man spricht in diesem Zusammenhang auch von Vorwärts- bzw. Rückwärts-Subtraktion.



**Abbildung 2-7 Grundprinzip der Subtraktiven-Hybridisierung**

Ausgangsmaterial ist mRNA, die in zwei Schritten in doppelsträngige cDNA umgeschrieben wird. Da die Effizienz der Subtraktion von der Länge der Fragmente abhängig ist, wird die cDNA vor der Hybridisierung durch ein Restriktionsenzym geschnitten. Die Tester-cDNA wird in zwei identische Fraktionen aufgeteilt und mit jeweils unterschiedlichen Adaptoren ligiert. Diese besitzen eine identische 5'-Region, variieren aber in der 3'-Region; die Driver-cDNA wird nicht mit Adaptoren ligiert.

**Adaptor 1** 5'- CTAATACGACTCACTATAGGGC TCGAGCGGCCCGCCGGGCAGGT - 3'  
 TCGAGCGGCCCGCCGGGCAGGT

**PCR-Primer 1** CTAATACGACTCACTATAGGGC **Nested PCR-Primer 1**

**Adaptor 2R** 5'- CTAATACGACTCACTATAGGGC AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT - 3'  
 AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT

**Nested PCR-Primer 2R**

Im Anschluss daran werden zwei Hybridisierungsschritte durchgeführt, in denen jeweils der Driver im Überschuss zur Tester cDNA zugegeben wird. In der ersten Hybridisierung werden beide Testerfraktionen getrennt voneinander inkubiert. Der Schritt führt zu einer Normalisierung des Genpools, d.h. einer Angleichung der Kopienzahl von häufig und selten vorkommenden cDNA-Fragmenten. Die beiden Ansätze werden vereinigt und ein zweitesmal hybridisiert. Es kommt dabei unter anderem zur Bildung von doppelsträngigen Fragmenten, die am 5'- und am 3'-Ende unterschiedliche Adaptoren besitzen, da sich im Driverpool keine oder nur in wesentlich geringerer Zahl komplementäre cDNA-Sequenzen befinden. Es handelt sich hierbei also um Fragmente, die in den zu vergleichenden Geweben differentiell exprimiert werden. Diese ds-cDNAs werden durch die so genannte Suppressions-PCR (Abbildung 2-8) im Vergleich zu anderen Kombinationen stark angereichert.

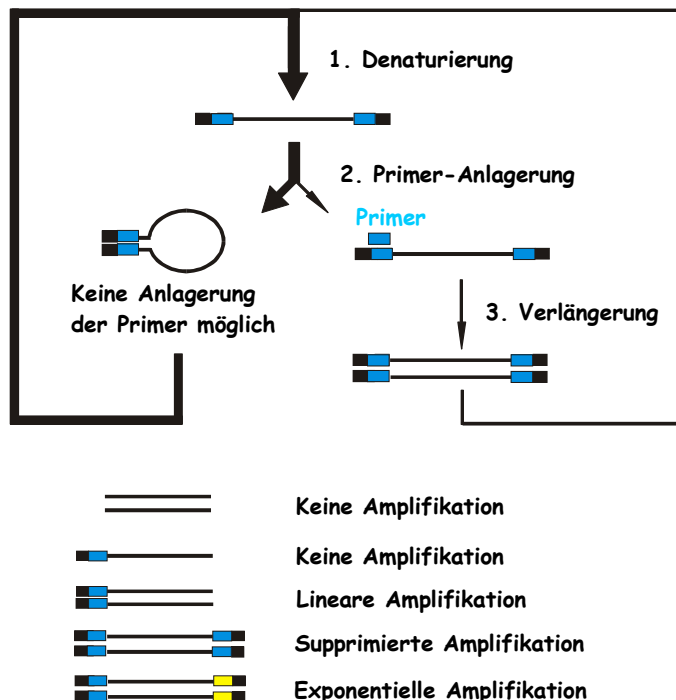


Abbildung 2- 8 Ablauf der Suppressions-PCR

Die Enden werden aufgefüllt und die Fragmente in zwei PCR-Durchgängen mit den jeweiligen Primern amplifiziert. Einzelsträngige cDNA und doppelsträngiger Driver werden dabei nicht, die Hybride aus Tester- und Driver-cDNA nur linear vervielfältigt. Die Fragmente mit identischen Adaptoren an beiden Ende werden aufgrund der bevorzugten Schleifenbildung (self-priming) in der Amplifikation stark supprimiert. Nur Fragmente mit unterschiedlichen Adaptoren werden im Laufe der PCR exponentiell amplifiziert.

### 2.12.1 Herstellung der Tester und Driver

#### cDNA-Synthese und *RsaI*-Verdau

Die Anzuchtbedingungen der behandelten und unbehandelten Pflanzen sind in Abschnitt 2.5 beschrieben, die RNA Isolierung und die Aufreinigung der mRNA werden in Kapitel 2.6 erläutert. Aus je 2µg mRNA wurden gemäß dem Protokoll des PCR Select-cDNA Subtraction-Kits eine cDNA-Erststrang-Synthese durchgeführt. Dazu wurde die poly(A)<sup>+</sup>-RNA mit 1µl Oligo-dT Synthese Primer versetzt, bei 70°C für 5min denaturiert und danach für 2min auf Eis gegeben. Nun konnten in jeden Ansatz 2µl 5x Erststrang-Puffer, 1µl dNTPs, 1µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> und 1µl Reverse Transkriptase pipettiert werden; die Reaktion wurde für 2h bei 42°C durchgeführt. Nach Abschluss der Synthese des Erststranges wurden folgende Lösungen ins Eppendorfgefäß gegeben:

---

48,4	µl	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
16	µl	Zweitstrang-Puffer
1,6	µl	dNTPs
4	µl	Enzym-Cocktail (DNA-Polymerase I, RNase H, DNA-Ligase)

---

Innerhalb von 2h bei 16°C – und nach Zugabe von 2µl T4 DNA-Polymerase für weitere 30min – wurde der komplementäre Zweitstrang der cDNA synthetisiert. Die Reaktion wurde mit 4µl einer 20x EDTA/Glykogen-Mischung gestoppt und die Enzyme durch einen Phenol:Chloroform:IAA-Schritt entfernt. Nachdem mit 100µl Chloroform:IAA das Phenol vollständig aus dem Ansatz entfernt wurde, konnte die ds-cDNA aus der wässrigen Phase mit 4M NH<sub>4</sub>OAcetat und EtOH p.a. ausgefällt und in 20min mit 14000rpm abzentrifugiert werden. Nach einem Waschschriff mit 75% EtOH wurde das Pellet getrocknet und in 50µl sterilem Wasser resuspendiert.

Jeder Ansatz musste mit der *RsaI*-Restriktionsendonuclease verdaut werden. Dazu wurde zu 43,5µl ds-cDNA 5µl 10x Restriktionspuffer und 25Units *RsaI* zugegeben und das Gemisch bei 37°C für 3h inkubiert. Wie im Arbeitsprotokoll beschrieben, wurden die Reaktionen anschließend mit je 2,5µl 20x EDTA/Glykogen versetzt, gereinigt und nach Fällung und Zentrifugation das Präzipitat in 5,5µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gelöst.

Abhängig von der Zielsetzung des Experimentes wurde der eine Teil der so erhaltenen cDNA-Fragmente – aus Kontrolle oder behandelte Pflanze – mit den Adaptoren ligiert und diente im Versuch als Tester. Der andere Ansatz wurde dementsprechend in der subtraktiven Hybridisierung (vgl. Kapitel 2.12.2) als Driver eingesetzt.

### Adaptoren-Ligation

Die als Tester definierte cDNA musste 1:6 mit destilliertem Wasser verdünnt und in zwei gleiche Fraktionen aufgeteilt werden; die beiden Aliquots wurden entsprechend mit dem Adaptor1 bzw. mit Adaptor2R versetzt. Es wurden 2µl der beiden Testeransätze 1 und 2R vereinigt, sodass hier an die cDNA beide Adaptoren ligiert wurden. Die Ligation fand über Nacht bei 16°C statt.

Am nächsten Morgen wurden die Reaktionen mit EDTA/Glykogen gestoppt und die Ligase durch Hitzedenaturierung (72°C, 5min) inaktiviert. Die beiden Testeransätze konnten direkt für die folgenden Hybridisierungsschritte verwendet werden. Aus der nicht-subtrahierten Kontrolle wurde 1µl entnommen und mit 1ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> verdünnt und bei -20°C gelagert; sie diente später bei der Suppressions-PCR und beim Screenen der subtraktiven cDNA-Bank als nicht-subtrahierte Kontrolle (siehe auch Kapitel 2.12.3 und Kapitel 2.13.3).

Um die Effizienz der Adaptorligation zu überprüfen, musste eine Kontroll-PCR nach Herstellerangaben durchgeführt werden. Hierfür wurden zwei PCR-Ansätze pro Tester pipettiert: Der eine enthielt ein spezifisches Primerpaar für die pflanzliche Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH), der andere eine Kombination aus GAPDH sense und PCR-Primer1. Nach der Durchführung wurden die Produkte auf einem 2%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die Intensität der Banden verglichen.

### 2.12.2 Subtraktive Hybridisierung

Die Reaktionsansätze des ersten Hybridisierungsschrittes setzten sich folgendermaßen zusammen:

	Ansatz1	Ansatz2R
Tester-Adaptor1-cDNA	1,5µl	–
Tester-Adaptor2R-cDNA	–	1,5µl
Driver-cDNA	1,5µl	1,5µl
4x Hybridisierungspuffer	1,0µl	1,0µl

Alle Ansätze wurden für 3min bei 98°C denaturiert, die 1. Hybridisierung fand anschließend bei 68°C für 8h statt.

## 2. Material und Methoden

Für die zweite Hybridisierung wurden die beiden Ansätze des vorherigen Schrittes vereinigt und mit 1µl eines Gemisches aus 1µl frisch denaturierter Driver-cDNA, 2µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> und 1µl 4x Hybridisierungspuffer versetzt. Die Reaktion erfolgte über Nacht bei 68°C.

Nach der Hybridisierung wurden die Proben durch Zugabe von 200µl Verdünnungspuffer und einer daran anschließenden 7-minütigen Inkubation bei 68°C für die nachfolgende PCR vorbereitet.

### 2.12.3 Suppressions-PCR

In den beiden PCR-Reaktionen werden nun die differentiell exprimierten Gene im Vergleich zu den anderen Fragmenten stark angereichert, indem nur diejenige ds-cDNA exponentiell amplifiziert wird, die mit unterschiedlichen Adaptoren an den Enden versehen ist (Abbildung 2-8).

Die Reaktionen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Allein die Zyklenzahl wurde modifiziert und den Versuchsbedingungen angepasst.

	Reaktionsmix für 1. PCR	Reaktionsmix für 2. PCR
10x Reaktionspuffer	2,5µl	2,5µl
dNTP-Mix (10mM)	0,5µl	0,5µl
PCR-Primer1 (10µM)	1,0µl	–
Nested PCR-Primer (10µM)	–	1,0µl
Nested PCR-Primer2R (10µM)	–	1,0µl
Advantage Taq Polymerase Mix	0,5µl	0,5µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	19,5µl	18,5µl

Als Template für die erste PCR dienten je 1µl der verdünnten cDNA der subtrahierten Hybridisierung und der unsubtrahierten Tester-Kontrolle aus der Vorwärts- und der Rückwärtshybridisierung. Um die Enden aufzufüllen, wurde der Mix für 5min bei 75°C inkubiert. Danach wurden die vier Ansätze für 5min bei 94°C denaturiert und folgendes Programm 25x zyklisch durchlaufen.

Programm der 1. PCR:

95°C	1 min	Denaturierung
66°C	30 sec	Annealing
72°C	2 min	Extension

Nach Abschluss der ersten PCR wurden die Reaktionsansätze 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. 1µl davon diente als Matrize in der zweiten PCR.

Programm der 2. PCR:

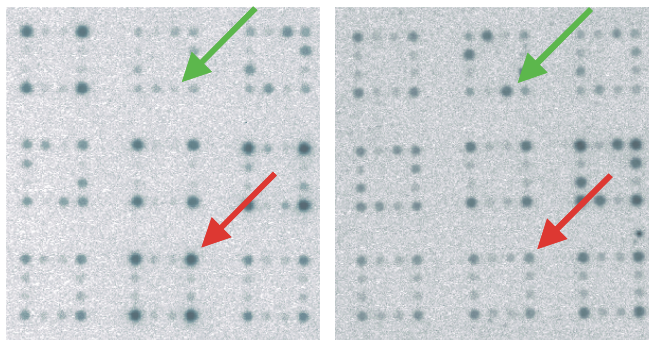
95°C	1 min	Denaturierung
68°C	30 sec	Annealing
72°C	2 min	Extension

Die zweite PCR wurde in 12-15 Zyklen durchlaufen und das Ergebnis elektrophoretisch überprüft. Die Suppressions-PCR wurde mehrmals vollständig ausgeführt und verschiedene Reaktionsprodukte aus der PCR der subtrahierten Vorwärts- und Rückwärts-Hybridisierung vereinigt. Diese wurden dann, wie in den Kapiteln 2.8.3 und 2.9.2 beschrieben, kloniert. Die einzelnen Klone konnten als Überdauerungskulturen in 96well Mikrotiterplatten angezogen werden und dienten als Ausgangsmaterial für die Herstellung der Makroarrays (vgl. Kapitel 2.13).

Die Produkte aus zusätzlichen Reaktionen der zweiten PCR der vorwärts-subtrahierten cDNA (ssh+) bzw. vorwärts-unsubtrahierten Kontrolle (ssh1,2+) und rückwärts-subtrahierten cDNA (ssh-) bzw. rückwärts-unsubtrahierten Kontrolle (ssh1,2-) wurden bei -20°C aufbewahrt und später für das Screenen nach positiv induzierten bzw. reprimierten Klonen verwendet (vgl. Kapitel 2.13.2).

### 2.13 Screening der subtraktiven cDNA-Bank mit Hilfe der Array-Technologie

Um möglichst viele, unterschiedlich exprimierte Transkripte aus der subtraktiven cDNA-Bank zu identifizieren, muss eine entsprechend große Anzahl an Genen untersucht werden. Mit Makroarrays ist es möglich, einige hundert bis tausend Klone aus der SSH in einem einzigen Hybridisierungsansatz zu erfassen.



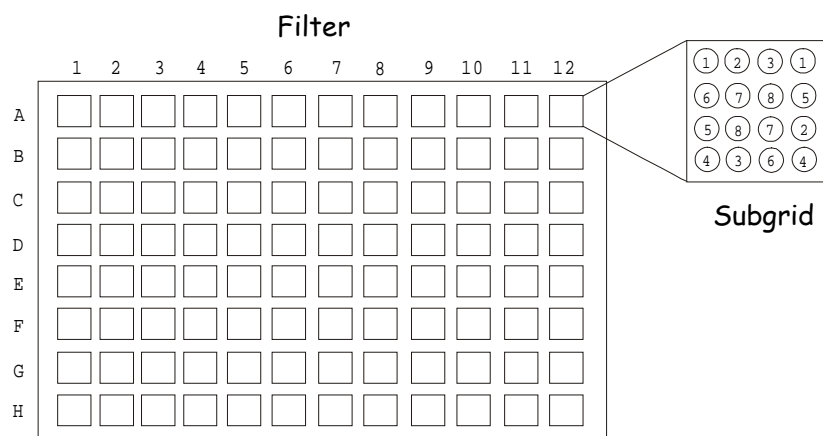
**Abbildung 2- 9 Ausschnitt aus einer Array-Membran: Vergleich zwischen ssh- (rechts) und ssh+(links) Hybridisierung; die Pfeile zeigen unterschiedlich exprimierte Gene an**

Dazu werden die PCR-Produkte der Genfragmente mit Hilfe eines Laborroboters auf eine Nylonmembran transferiert (spotten). Dies geschieht mit sehr hoher Genauigkeit und Reproduzierbarkeit, sodass beliebig viele identische Filter produziert werden können. Anschließend werden diese mit radioaktiv markierter subtrahierter und nicht-subtrahierter cDNA hybridisiert, wobei die markierten Gensequenzen an komplementäre Regionen der immobilisierten DNA-Fragmente binden; die dadurch erhaltenen Signale werden mit dem PhosphoImager detektiert. Anhand des Musters und der Intensität der Spots kann man die Stärke der Expression einer Vielzahl individueller Gene gleichzeitig identifizieren. Um

die Datenmengen verarbeiten und auswerten zu können, werden computergestützte Bildverarbeitungs- und Analyseprogramme verwendet.

### 2.13.1 Herstellung der Makroarray-Membranen

Zuerst mussten die Inserts der einzelnen Klone mittels PCR amplifiziert werden. Dafür wurden 2µl der auf LB/Glycerin-Medien gewachsenen Bakterienkulturen aus der Mikrotiterplatte in eine 96well PCR-Platte überführt und mit je 98µl PCR Master-Mix versetzt (siehe Kapitel 2.10.1). Als Primer wurden die innerhalb der Vektorsequenz bindenden M13 sense/antisense Oligonucleotide verwendet; als Annealing-Temperatur wurde 56°C gewählt. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1%igen Agarosegel überprüft; danach wurden diejenigen Klone aussortiert, die Doppelbanden ergaben oder kein Insert enthielten. Zur Reinigung der Nucleinsäuren wurden jeweils zwei 100µl Ansätze vereinigt und auf die Membran einer Millipore-Filterplatte pipettiert. Die Flüssigkeit wurde durch Anlegen eines Vakuums zusammen mit überschüssigen Primern und Enzymen abgesaugt und die zurückgehaltenen DNA-Fragmente in 50µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> resuspendiert. Anschließend wurden die gereinigten PCR-Produkte wieder in eine 96well Mikrotiterplatte überführt. Sie dienten als Ausgangspunkt für den DNA-Transfer auf Nylonmembranen mit Hilfe des Microgrid-Spotters.



**Abbildung 2- 10 Anordnung der Spots auf einem Makroarray-Filter**

Die gelöste DNA wurde in festgelegter Reihenfolge und Anordnung aus verschiedenen Mikrotiterplatten mittels eines 96-Nadel-Tools auf die Nylonmembran aufgebracht. Ein Spot entsprach dabei einem Genfragment aus einer definierten Position (A1-H12) der jeweiligen Mikrotiterplatte. Jedes Gen war zweifach auf der Nylonmembran repräsentiert. Auf diese Weise ergaben sich bei acht verschiedenen Mikrotiterplatten und 4x4 Positionen pro Subgrid insgesamt 1536 einzelne Spots aus 768 unterschiedlichen Genen. Das Auftragsmuster ist in Abbildung 2-10 dargestellt.

## 2. Material und Methoden

---

Die Nadeln des Stempels besaßen einen Durchmesser von 400µm, sodass bei jedem Transfer ca. 15nl der DNA-Lösung auf die Membran übertragen wurden. Pro Spot wurde der Vorgang zehnmal wiederholt; zwischen den Plattenwechseln wurde das Tool gewaschen und getrocknet.

Nachdem die Übertragung abgeschlossen war, wurde die DNA durch UV-Licht mit der Membran quervernetzt. Daran schloß sich die Denaturierung der gespotteten PCR-Produkte an, wobei die Filter nacheinander für 5min in folgenden Lösungen inkubiert wurden:

---

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

---

Die Membranen wurden auf Whatman-Papier getrocknet und nochmals mit UV-Licht bestrahlt. Die so präparierten Makroarrays konnten bis zur Hybridisierung bei Raumtemperatur gelagert werden.

### 2.13.2 Radioaktive Markierung der cDNA-Sonden

Die Nucleinsäuren wurden mit dem Random Priming-System radioaktiv markiert. Dabei binden nach DNA-Hitzedenaturierung hexamere Oligonucleotide an die Einzelstränge. Das Klenow-Fragment – ein nach proteolytischer Spaltung entstandenes Teilfragment der DNA-Polymerase I ohne 5'→3' Exonuclease-Aktivität – synthetisiert unter Verwendung von  $\alpha$ -<sup>33</sup>P-dATP den komplementären Zweitstrang. Die Inkubation erfolgte bei 25°C für 2h.

Ein Ansatz setzte sich im Einzelnen aus folgenden Substanzen zusammen:

---

20 µl	denaturierte cDNA
15 µl	Random Primer-Puffer
5 µl	$\alpha$ - <sup>33</sup> P-dATP (10mCi/ml)
2 µl	je dCTP, dGTP, dTTP
1 µl	Klenow-Fragment
3 µl	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>

---

Als Matrize für die Hybridisierung der Northern- oder Slot-Blots (vgl. Kapitel 2.11) dienten die PCR-Produkte verschiedener Gen-Fragmente.

Bei der Hybridisierung der Makroarrays wurden PCR-Fragmente aus der SSH verwendet (vgl. Kapitel 2.12.3): rückwärts-subtrahierte PCR (ssh-), vorwärts-subtrahierte PCR (ssh+) und die jeweilige nicht-subtrahierten Kontrollen (ssh1,2-; ssh1,2+).

Um nicht inkorporierte  $\alpha$ -<sup>33</sup>P-dATP Nucleotide zu entfernen, musste die radioaktiv markierte DNA anschließend gereinigt werden. Der Ansatz wurde dazu auf MikroSpin-Säulchen gegeben und bei 3500rpm für 1min zentrifugiert. 1µl des Eluates wurde mit 10ml Enhancer vermischt und die Aktivität



im Flüssigkeits-Szintillationszähler ermittelt. Für die Hybridisierungsreaktionen wurden Aktivitäten zwischen  $1 \times 10^8$  und  $5 \times 10^8$  cpm verwendet.

### 2.13.3 Hybridisierung der Makroarray Membranen

Zur Analyse differentiell exprimierter Gene aus der SSH wurden jeweils die subtrahierten bzw. die unsubtrahierten cDNA-Lösungen der Vorwärts- und Rückwärts-Experimente miteinander verglichen – dementsprechend wurden pro Ansatz vier Makroarrays parallel behandelt.

Vor der Hybridisierung mit der radioaktiv markierten cDNA, mussten die Membranen prähybridisiert werden, um durch Blockierung eine unspezifische Bindung der Sonden zu vermeiden. Die Filter wurden einzeln in Hybridisierungsröhrchen gegeben und mit 3ml denaturierter Prähybridisierungslösung für mindestens 4h bei 68°C im Rotationsofen inkubiert.

Nachdem die Sekundärstrukturen durch einen 5-minütigen 95°C-Schritt gelöst wurden, konnte die markierte cDNA zu den Filtern in die Lösung pipettiert werden. Die Hybridisierung erfolgte bei 68°C über Nacht.

Am nächsten Tag musste die radioaktive Lösung abgegossen werden, bevor die Membranen je zweimal für 20min in Waschlösung 1 bzw. Waschlösung 2 bei 68°C gespült wurden. Die Filter wurden in Folie eingeschweißt und zwischen 3 und 24 Stunden auf Imaging Platten exponiert. Die Platten konnten mit einem Scanner eingelesen werden, und die erhaltenen Bilddateien wurden mit der Array-Vision-Software (Version 6.0) ausgewertet.

### 2.13.4 Analyse der radioaktiven Signale

Die Intensität der Bildpunkte spiegelt die Menge an hybridisierter cDNA und damit die Genexpression wider. Die Quantifizierung der Signale erfolgte in mehreren Schritten. Zuerst wurden die einzelnen Spots in einem Raster lokalisiert und ausgerichtet. Dies geschah mit Hilfe der Software, musste aber – aufgrund der zum Teil unterschiedlichen Geometrien der Arrays – manuell überprüft werden. Dadurch, dass um jeden Spot ein definierter Bereich festgelegt wurde, konnte der Hintergrundwert individuell ermittelt werden. Dieser Background wurde anschließend von der Intensität des zugehörigen Bildpunktes abgezogen. Danach erfolgte eine interne Normalisierung, wobei von allen auf dem Filter determinierten Signalen der Mittelwert gebildet wurde und das Auswertungsprogramm die einzelnen Intensitäten durch diesen Wert dividierte. Auf diese Weise konnten Unterschiede in der eingesetzten RNA-Menge und der Effizienz der radioaktiven Markierung ausgeglichen werden. Die so erhaltenen Intensitätswerte wurden in Form einer Excel-Tabelle dokumentiert und das Verhältnis der jeweils korrespondierenden Spots der vorwärts- und rückwärts-subtrahierten cDNA ermittelt. Sofern der Quotient in drei unabhängigen Hybridisierungsexperimenten mindestens 2 bzw. weniger als 0,5 betrug, konnte angenommen werden, dass es sich hierbei mit hoher Signifikanz um ein differentiell

exprimiertes Gen handelte. Als Kontrolle wurden die Signalintensitäten aus der Hybridisierung des Filters mit nicht-subtrahierter cDNA miteinander verglichen. Da hier keine spezifische Anreicherung des Genfragmentes stattgefunden hatte, waren nur sehr geringe Unterschiede in den Intensitäten zu erwarten.

Klone der Gene, die in allen drei Wiederholungen eine deutliche Induktions- oder Repressions-Tendenz aufwiesen, wurden für eine Minipräparation angezogen und die isolierten Plasmide durch Sequenzbestimmung charakterisiert.

### 2.13.5 Sequenzanalysen

Die Sequenzierarbeiten wurden von der Firma Medigenomix durchgeführt. Als Primer wurden die Vektor-spezifischen Oligonucleotide M13 sense und antisense gewählt.

Die Blast-Analyse der Daten erfolgte mit den Datenbanken von MIPS (<http://mips.gsf.de/proj/thal>) und TIGR (<http://www.tigr.org/tdb/tgi/agi/>).

### 2.14 RNA-Interferenz (RNAi) und Überexpression von Genen

Pflanzen können gentechnisch verändert werden, indem man Gene oder Genfragmente in die Pflanzen transformiert. Auf diese Weise können entweder die korrespondierenden Proteine extrem angehäuft oder ihre Synthese durch Ausschalten der Gene gehemmt werden.

Bei der Überexpression werden Expressionsvektoren in den Wirtsorganismus eingeschleust, in die das gewünschte Gen eingefügt ist. Die vorgeschalteten Promotoren – wie z.B. der 35S-Promotor des cauliflower mosaik virus – bewirken eine entsprechend starke Anreicherung des jeweiligen Transkriptes.

Durch die RNAi-Technik (Abbildung 2-11) ist es möglich, Gene gezielt zu inhibieren (Weseley *et al.*, 2001). Hierbei handelt es sich um ein „post-transkriptionales gene silencing“ (PTGS), welches in der Natur als Abwehrmechanismus gegen doppelsträngige RNA-Viren und möglicherweise auch zur Regulation der Transkription in der Zelle eingesetzt wird.

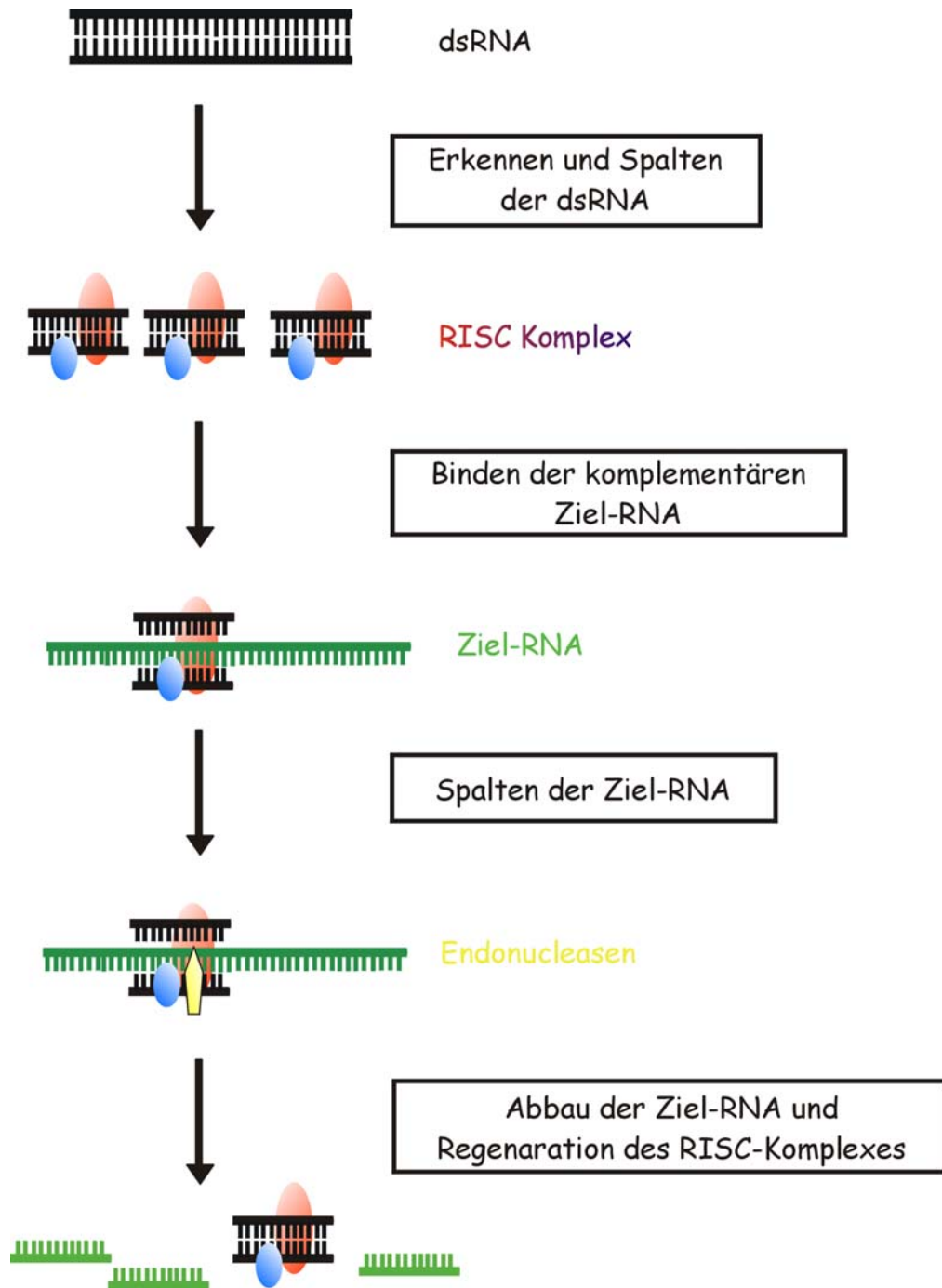


Abbildung 2- 11 Hypothetisches RNAi-Modell

Die doppelsträngige RNA (ds-RNA) wird von einem Proteinkomplex erkannt und in Fragmente von 21-23 Nucleotiden geschnitten. Der Doppelstrang wird aufgeschmolzen, sodass die komplementäre Ziel-RNA hybridisieren kann; Endo- bzw. Exonucleasen verdauen daraufhin die endogene RNA. Das Zielgen wird also auf Transkriptebene zerstört und kann nicht mehr durch Translation in Protein umgeschrieben werden.

## 2. Material und Methoden

---

Für die Bildung der ds-RNA wird eine 100-800bp großes Fragment des Genes in sense und antisense Orientierung – nur durch ein Intron voneinander getrennt – hinter einen starken Promotor in einen Expressionsvektor eingebaut.

Im Rahmen der Arbeit sollten auf diese Weise verschiedene Kalium-Kanäle analysiert werden:

---

ATKC	(At4g32650)	inward rectifying K <sup>+</sup> -Kanal	Überexpression
ACBK1	(At1g01340)	CaM-regulierter Kanal	RNAi
KCO	(At5g55630)	outward rectifying K <sup>+</sup> -Kanal	Überexpression, RNAi

---

Die Transformation der Pflanze erfolgt mit dem gramnegativen Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens*. Diese Phytopathogene sind in der Lage, extrachromosomale DNA-Elemente in die Pflanzenzelle zu übertragen und stabil in das pflanzliche Genom einzubauen.

### 2.14.1 Herstellung der Expressionsvektoren

Die Konstrukte wurden über Rekombinationssysteme (sog. Gateway-Technologie) erzeugt. Für die Integration in den Donor-Vektor müssen die PCR-Fragmente mit „attachment sites“ (att) flankiert werden. Zwei homologe DNA-Sequenzen des PCR-Produktes (attB) und des Plasmides (attP) rekombinieren in der anschließenden Reaktion miteinander, wobei leichte Veränderungen in der Region entstehen. Diese so entstandenen attR-Stellen können dazu genutzt werden, das Gen aus dem Entry-Vektor durch Rekombination wieder freizusetzen und es in einen beliebigen anderen Vektor mit homologen Attachment-Stellen (attL) zu integrieren.

Für die Herstellung des Entry-Vektors wurde das System von Invitrogen verwendet. Die Primer wurden mit den entsprechenden attB Sequenzen synthetisiert.

---

attB1-Sequenzen: 5' - GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTNN-sense Primer - 3'

attB2-Sequenzen: 5' - GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTN-antisense Primer - 3'

---

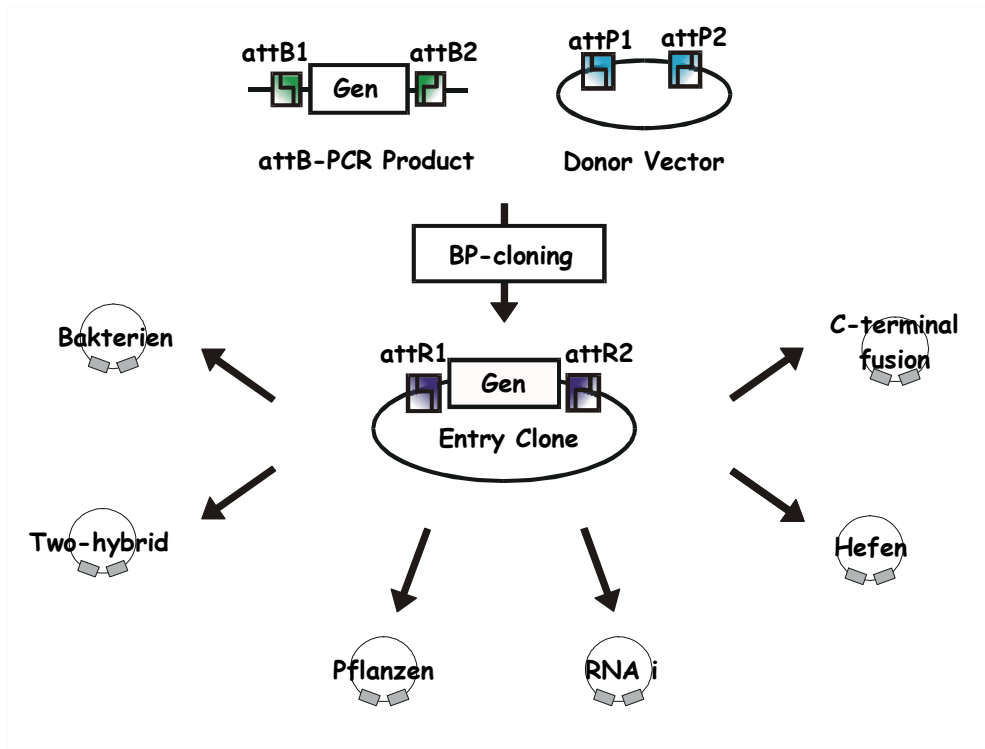


Abbildung 2- 12 Prinzip der GATEWAY-Technologie: Synthese des Entry-Vektors

Nach der PCR wurde das Produkt gereinigt, um die überschüssigen attB Primer aus dem Ansatz zu entfernen. Dazu wurde die PCR-Reaktion auf 150µl mit TE-Puffer aufgefüllt und mit 100µl 30% PEG8000/30mM MgCl<sub>2</sub> versetzt. Das Gemisch wurde gründlich gemischt und bei Raumtemperatur für 15min bei 14000rpm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde in 30µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> resuspendiert und die Konzentration photometrisch vermessen.

Für die BP-Klonierung wurde folgender Ansatz zusammenpipettiert:

1µl	attB-PCR 35ng/Reaktion
1µl	pDonr223 Vector 35ng/Reaktion
1µl	TE-Puffer
1µl	5x BP-Reaktionspuffer
1µl	BP-Clonase Enzym-Mix

Die Reaktion wurde über Nacht bei 25°C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde 0,5µl Proteinase K zugesetzt und der Ansatz 10min bei 37°C inkubiert. Für die anschließende Transformation in *E. coli* wurden 2µl davon mit 50µl kompetenten Zellen vermischt und die Integration – wie in Kapitel 2.9.2 beschrieben – durchgeführt. Einzelne Klone wurden gepickt und das Insert durch Sequenzieren analysiert.

## 2. Material und Methoden

An diesem Punkt war es nun möglich, durch eine nachfolgende LR-Klonierung das Gen in einen Expressionsvektor zur Überexpression (pDJW17) oder für die RNA-Interferenz (pJawohl17) zu überführen (vgl. Abbildung 2-14).

LR-Klonierung:

1 µl	pEntry 25ng/Reaktion
1 µl	pJawohl17-bzw. PDJW17-Vector 25ng/Reaktion
1 µl	TE-Puffer
1 µl	5x LR-Reaktionspuffer
1 µl	LR-Clonase Enzym-Mix

Durch eine Minipräparation wurde der Entry-Klon aus dem Bakterium isoliert und zusammen mit den anderen Komponenten bei 25°C über Nacht inkubiert.

Nach Zugabe von 0,5 µl Proteinase K (10min, 37°C) wurde der Vektor in *E. coli* transformiert (siehe Kapitel 2.9.2). Der Vektor wurde erneut durch Minipräparation aus den gewachsenen Klonen gewonnen und mittels PCR oder Restriktionsverdau (XhoI, HindIII, SpeI) auf seine Richtigkeit überprüft.

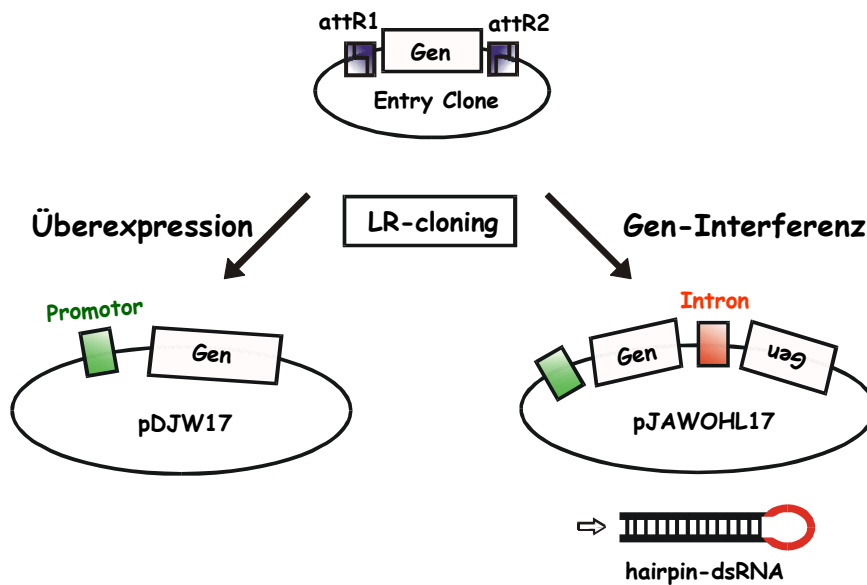


Abbildung 2- 13 LR-Klonierung: Integration des Genes in den entsprechenden Vektors durch

Zuletzt wurde das Plasmid durch Elektroporation (vgl. Kapitel 2.9.2) in Agrobakterien eingeschleust und ein weiteres Mal durch eine PCR mit den entsprechenden Primern analysiert.

### 2.14.2 Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen

*Arabidopsis thaliana* wurde zu diesem Zweck auf Erde (vgl. Kapitel 2.4) für ungefähr vier Wochen in der Klimakammer angezogen. Nachdem die Pflanzen die Anlagen für Stiel und Blüten gebildet hatten, wurden sie nach dem Floral-Dip-Verfahren (Clough and Bent, 1998) mit *Agrobacterium tumefaciens* infiziert.

Die Agrobakterien wurden vorher in einem entsprechendem LB-Medium für zwei Tage in einer 300ml Flüssigkultur bei 28°C angezogen. Die optische Dichte wurde vermessen, und die Zellen bei einem Wert von ungefähr  $OD_{600}=1,6$  in Zentrifugationsgefäße überführt und 20min bei 4500rpm pelletiert. Die Agrobakterien wurden bis zu einer End- $OD_{600}$  von 0,8 in Infiltrationsmedium aus 5% Saccharose + 0,05% Silwet L-77 gelöst und die einzelnen Pflanzen für ca. 20s in das Medium getaucht. Anschließend mussten diese für 24h im Dunkeln und bei hoher Luftfeuchtigkeit gelagert werden, bevor sie am nächsten Tag zurück in die Klimakammern gestellt werden konnten. Dieser Vorgang wurde nach fünf Tagen wiederholt.

Die Samen der transformierten Pflanzen wurden geerntet und steril auf ein Kanamycin-Selektionsmedium ausgebracht. Mehrere Tage alte Keimlinge, die keine Schädigungen durch das Antibiotika zeigten (grüne Blätter, gut entwickelte Wurzeln), wurden aussortiert und auf einem Pflanzenmedium mit 250 $\mu$ M Cäsium weiter angezogen. Bei ihnen wurde einerseits die Cäsium-Aufnahme im Vergleich zu Kontrollpflanzen untersucht, auf der anderen Seite wurde aus einzelnen Blättern RNA gewonnen, um die Effizienz der Geninterferenz bzw. der Überexpression auf Transkriptebeine mittels RT-PCR zu überprüfen.

### 2.14.3 DNA-Isolierung aus Pflanzen (CTAB-Methode)

Die DNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe der CTAB-Methode (nach Rogers and Bendich, 1985). Dazu wurden ca. 100mg homogenisiertes Pflanzenmaterial abgewogen, mit 200 $\mu$ l CTAB-Extraktionspuffer versetzt und unter zwischenzeitlichem Vortexen bei 68°C für mindestens 5min inkubiert. Es wurde 200 $\mu$ l Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) zugegeben und das Gemisch kräftig geschüttelt. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde die obere Phase in ein frisches Eppendorfcup überführt und die Nucleinsäuren nach Zugabe von 300 $\mu$ l Isopropanol bei -20°C für 1h ausgefällt. Das Pellet wurde in 75% Ethanol gewaschen und zuletzt in 50 $\mu$ l destilliertem Wasser gelöst.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Bestimmung des toxischen Schwellenwertes

Zuerst sollte die Toleranz von *Arabidopsis thaliana* Col-0 WT auf steigende Cäsium-Konzentrationen im Medium untersucht werden. Dazu wurden die Pflanzen auf 25% MS-Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cäsium-133 angezogen:

Kontrolle	0	μM
C1	50	μM
C2	100	μM
C3	250	μM
C4	500	μM
C5	700	μM
C6	850	μM
C7	1	mM

Nach fünf Wochen wurden die Pflanzen geerntet und der Cäsiumgehalt in der Blattrosette bestimmt. In Abbildung 3-1 sind die Pflanzen bei den jeweiligen Konzentrationen dargestellt.

Es zeigte sich, dass die Samenkeimung und auch die Keimrate der Pflanzen bis 700μM Cs-133 im Medium nicht beeinflusst waren. Auch die Entwicklung der Pflanzen C1 (50μM) bis C5 (700μM) verlief ähnlich wie bei der Kontrolle; in den ersten zwei Wochen konnten keine phänotypischen Unterschiede festgestellt werden. Bei C6 (850μM) war hingegen eine deutliche Verzögerung der Entwicklung erkennbar und die Keimrate war drastisch gesunken. Im Versuch C7 (1mM) waren zwar einige Samen keimfähig, jedoch starben die Keimlinge nach wenigen Tagen ab.

Nach ca. drei Wochen waren an den Primärblättern der C5- und C6-Pflanzen die ersten Schädigungen (Nekrosen) sichtbar und die Folgeblätter waren im Vergleich zu denen der Kontrollpflanze dunkler gefärbt. Die Blätter (vor allem bei der Anzucht auf 700μM Cs-Medium) verwelkten im Laufe der Zeit zusehends, und auch das Wachstum der Wurzeln war mehr und mehr beeinträchtigt.

Nach fünf Wochen wurde der Versuch beendet und die Cäsium-Konzentrationen in den verschiedenen *Arabidopsis*-Anzuchten bestimmt (Abbildung 3-2).

Einige Pflanzen wurden weiter beobachtet: Es zeigte sich, dass das Erreichen der reproduktiven Phase nur bei den C6-Pflanzen signifikant verzögert war; eine Untersuchung der Keimrate der Folgegeneration wurde nicht durchgeführt.



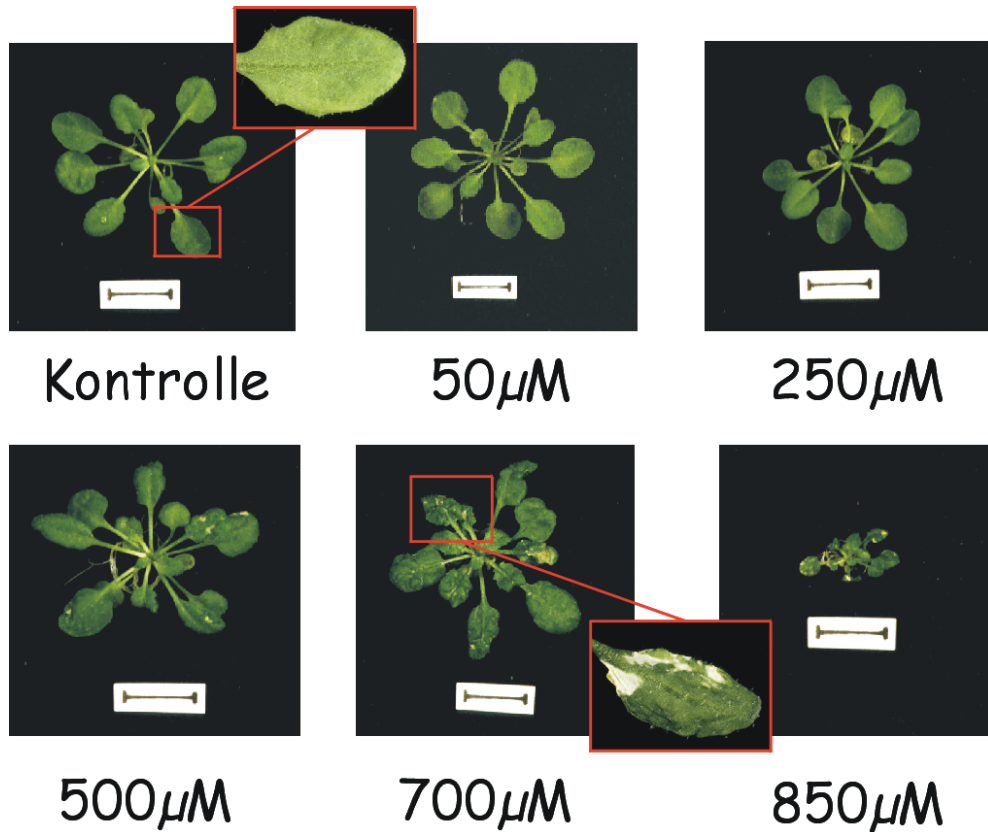


Abbildung 3-1 Blattrosetten von *Arabidopsis thaliana* nach Anzucht auf Medien mit unterschiedlichen Cäsium-Konzentrationen

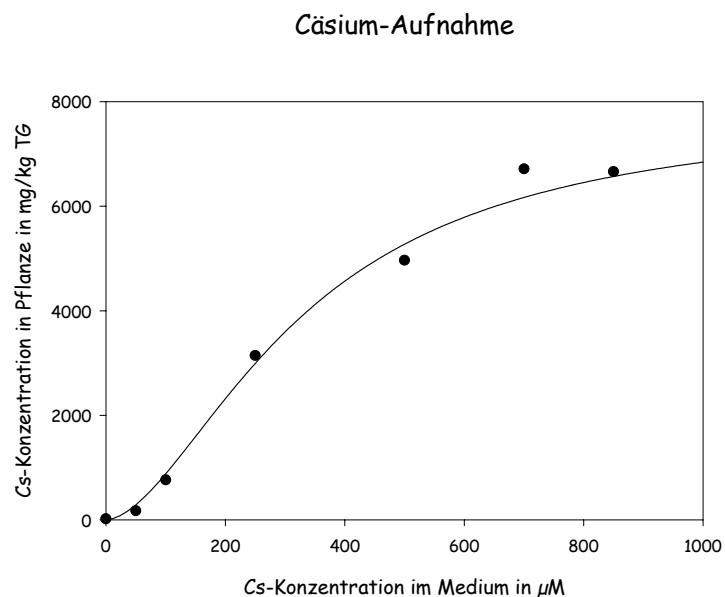
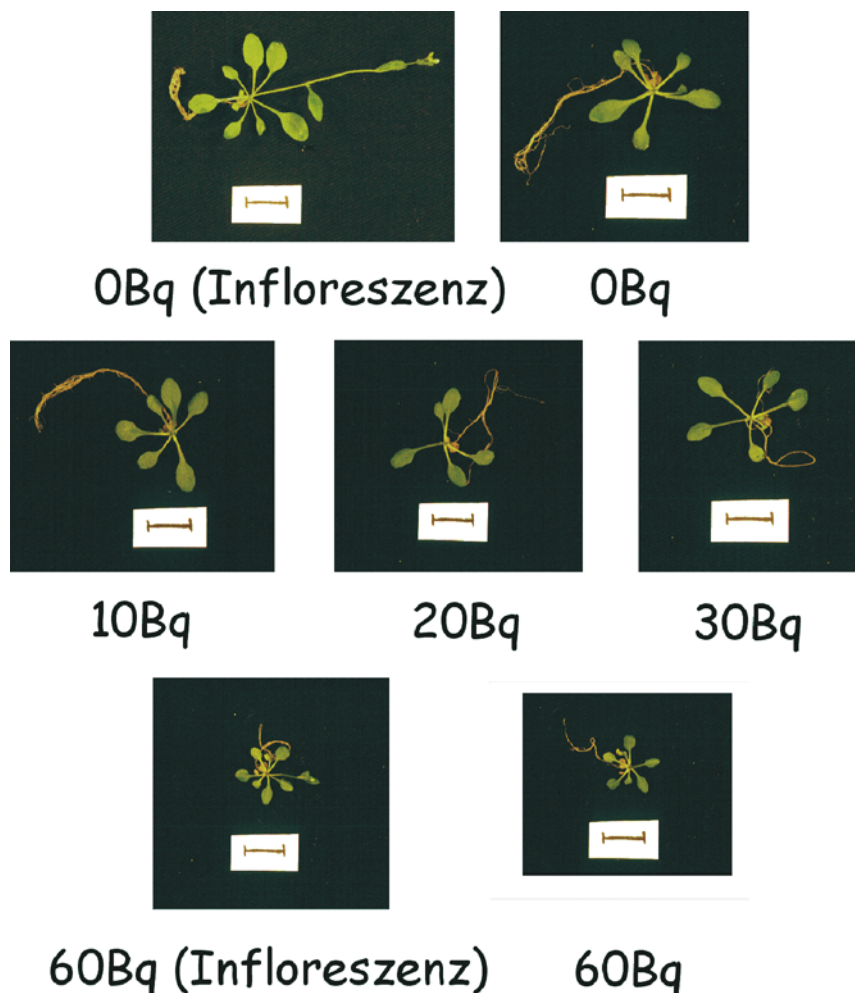


Abbildung 3-2 Cäsium-Aufnahme in die Blätter (Anzucht auf 25% MS-Medium)

Die Aufnahme des Cäsiums in die Pflanze folgte dabei einem sigmoidalen Kurvenverlauf. Die erhaltenen Messwerte der Nullprobe wurden durch Verunreinigungen im Medium, v.a. aus dem zugegebenen Agar, hervorgerufen. Die Experimente mit 25% MS-Medium wurden nur einmal durchgeführt, für

die näheren Untersuchungen zur Cäsium- und Kalium-Aufnahme unter physiologischen Bedingungen wurde ein Pflanzenmedium (modifiziert nach Gibeaut *et al.*, 1997; siehe Kapitel 2.4) mit einer definierten Kaliumzugabe von 0,7mM verwendet.

Für die Versuche mit ionisierender Strahlung nach Cäsium-134-Behandlung wurden ebenfalls vergleichenden Untersuchungen angestellt (Abbildung 3-3). Im Rahmen der Arbeit wurden jedoch nur sehr geringe Aktivitäten und Konzentrationen an Radiocäsium eingesetzt, sodass bis 30Bq/cm<sup>3</sup> keinerlei phänotypischen Unterschiede zu beobachten waren. Lediglich bei einer Aktivität von 60Bq/cm<sup>3</sup> war eine Reduktion im Wachstum von Stengel, Blättern und Wurzeln festzustellen; die Fertilität wurde davon nicht beeinträchtigt. Die Experimente zur Aufnahme von Cäsium-134 in *Arabidopsis* sind in Kapitel 3.2 dargestellt.



**Abbildung 3-3 Blattrosetten und Infloreszenz von *Arabidopsis thaliana* nach Anzucht auf Medien mit unterschiedlichen Cäsium-134-Aktivitäten (in Bq/cm<sup>3</sup>)**

### 3.2 Aufnahme von Cäsium und Kalium

Der Cäsium- und Kaliumgehalt in den Blättern wurde bei Col-0 Wildtyp und verschiedenen Mutanten (siehe Kapitel 2.4) bestimmt. Die hier dargestellten Experimente mit Cäsium-133 wurden mehrmals wiederholt, mit Ausnahme der Messungen der Mutanten akt1-1, skor1 und GUS:KAT, die nur ein einziges Mal durchgeführt werden konnten. Die Cäsium-134-Werte wurden in drei unabhängigen Versuchen ermittelt.

Die Akkumulation der beiden Kationen in den Wildtyp-Pflanzen ist in Abbildung 3-4 dargestellt. Wie auch schon im vorigen Kapitel angedeutet, lässt sich erkennen, dass die Cäsium-Konzentration in der Pflanze in Abhängigkeit zur Konzentration im Medium sigmoidal ansteigt. Umgekehrt nimmt die Aufnahme an Kaliumionen bei steigender Cäsiumkonzentration stetig ab.

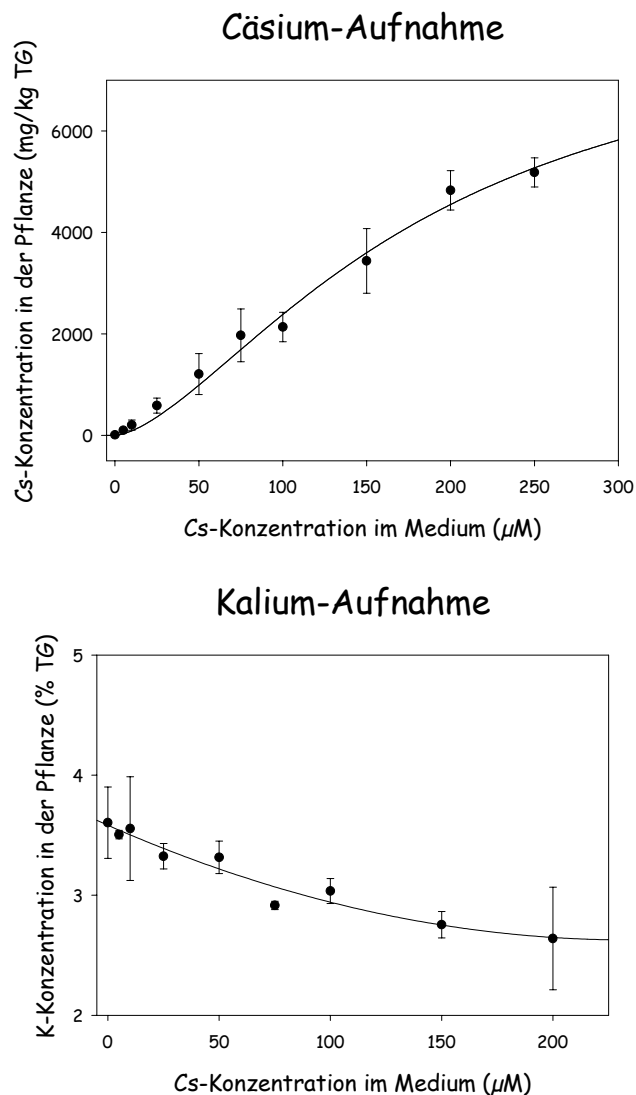


Abbildung 3-4 Kalium- und Cäsium-Aufnahme unter physiologischen Kaliumbedingungen (0,7mM)

### 3. Ergebnisse

In Vorversuchen mit 100% MS-Medium (entspricht ungefähr  $8\text{mM K}^+$ ) konnte festgestellt werden, dass in diesen Experimenten die Pflanzen bis  $2\text{mM Cs-133}$  im Medium überleben und wachsen konnten. In dem Versuch mit 25% MS-Medium – bei einem Kaliumgehalt von ungefähr  $2\text{mM}$  – waren die Pflanzen nur noch bis  $850\mu\text{M}$  wachstumsfähig (siehe Kapitel 3.1). Bei den Pflanzen unter physiologischen Bedingungen ( $\text{K}^+ \approx 0,7\text{mM}$ ) konnte ein Wachstum bis  $500\mu\text{M}$  nachgewiesen werden.

Als Ergebnis lässt sich daher festhalten, dass die Cäsiumaufnahme mit steigenden Cäsiumkonzentrationen im Medium zunimmt. Zusätzlich hängt der Cäsiumtransport in die Pflanze – und damit auch der toxische Schwellenwert – von der Kaliumkonzentration im Medium ab. Bei höheren Kaliumwerten steigt die Toleranz von *Arabidopsis thaliana* gegenüber Cäsium, und die Pflanze ist in der Lage, auf Medien mit höheren Cäsium-Konzentrationen zu wachsen.

Das Aufnahmeverhalten von Wildtyp und den aufgeführten Transport-Mutanten war nahezu identisch (Abbildung 3-5); auch das Wachstumsverhalten der Mutanten unterschied sich kaum von dem des Wildtyps.

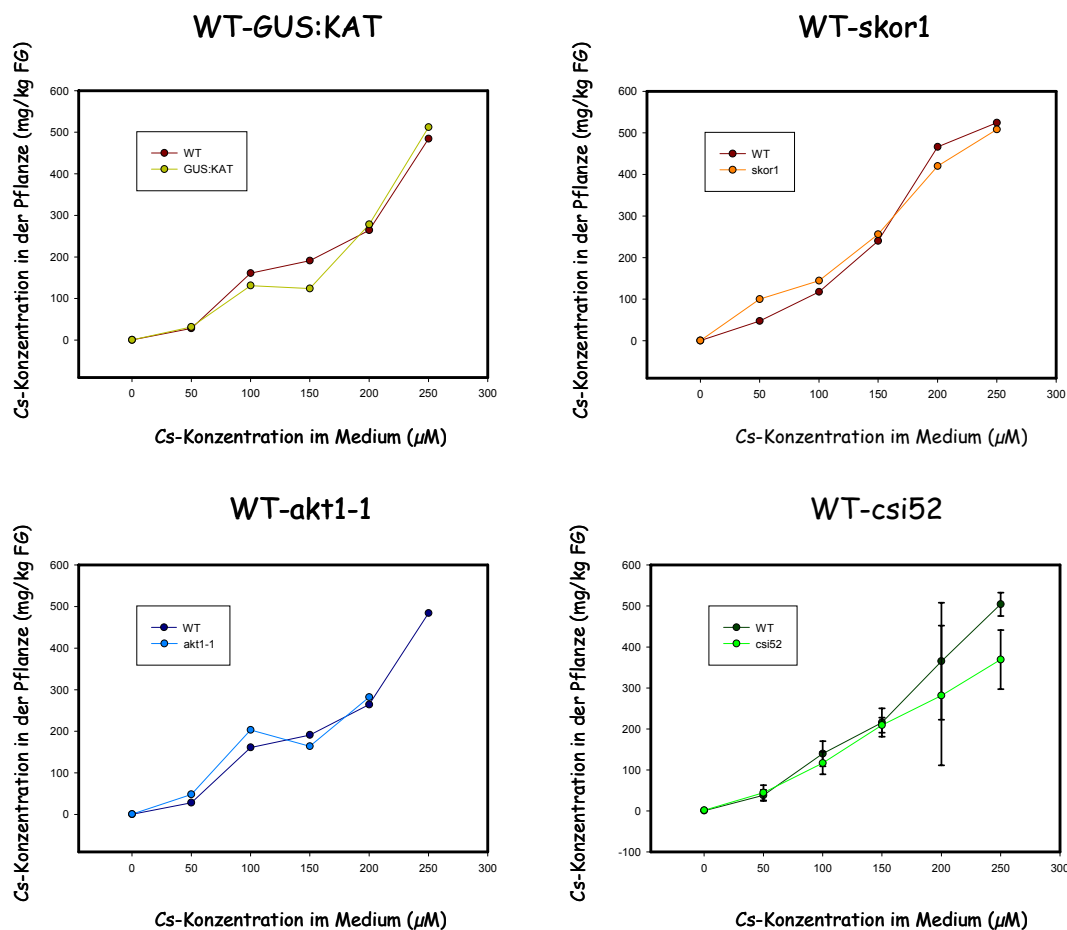


Abbildung 3- 5 Cäsium-Aufnahme in verschiedene Transportermutanten

Einzig die akt1-1 und csi-52 Mutanten zeigten ein reduziertes Wachstum und ein leicht verändertes Cäsium-Aufnahmeverhalten.

Bei akt1-1 konnte kein 250µM Wert ermittelt werden, da die Keimlinge bei dieser Cäsium-Konzentration im Medium nicht mehr lebensfähig waren. In den Pflanzen wurde durch Mutation ein wichtiger Kaliumkanal ausgeschaltet, was vermutlich zu dieser höheren Sensitivität gegenüber Cäsium führt.

Das Aufnahmeverhalten der csi-52 unterscheidet sich insofern von dem der anderen Mutanten, als es hier bei Cäsium-Konzentrationen über 150µM anscheinend zu einer Verringerung des Cäsium-Transportes in die Pflanze kommt. Allerdings war dies nur äußerst schwach ausgeprägt; es bedarf noch weiterer Untersuchungen, um diese tendenzielle Entwicklung zu überprüfen.

Die Untersuchung der Cäsium-134-Aufnahme ist in Abbildung 3-6 dargestellt. Hier konnte keine Unterscheidung zwischen Wildtyp und csi-52 gezeigt werden. Die Konzentrationen an eingesetztem Cäsium waren mit ca.  $5 \cdot 10^{-6} \mu\text{gCs/g}$  Medium (zum Vergleich  $100 \mu\text{M} \approx 15 \mu\text{gCs/g}$  Medium) jedoch sehr gering, sodass die Werte mit den Cäsium-133-Versuchen – analoges Verhalten bei Werten  $< 150 \mu\text{M}$  – übereinstimmen würden. Ein Vergleich zwischen Cs-134 und Cs-134 +  $100 \mu\text{M}$  Cs-133 zeigte ebenfalls, dass die Aufnahme des Cäsiums mit erhöhter Konzentration im Medium proportional ansteigt.

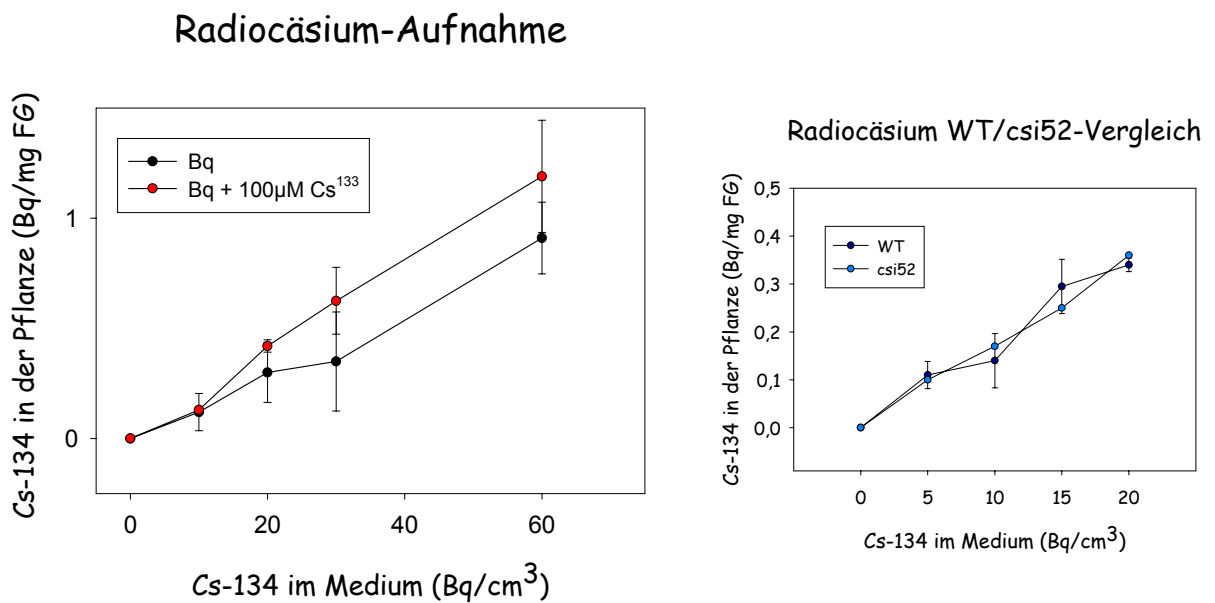


Abbildung 3- 6 Radiocäsium-Aufnahme in *Arabidosis thaliana*

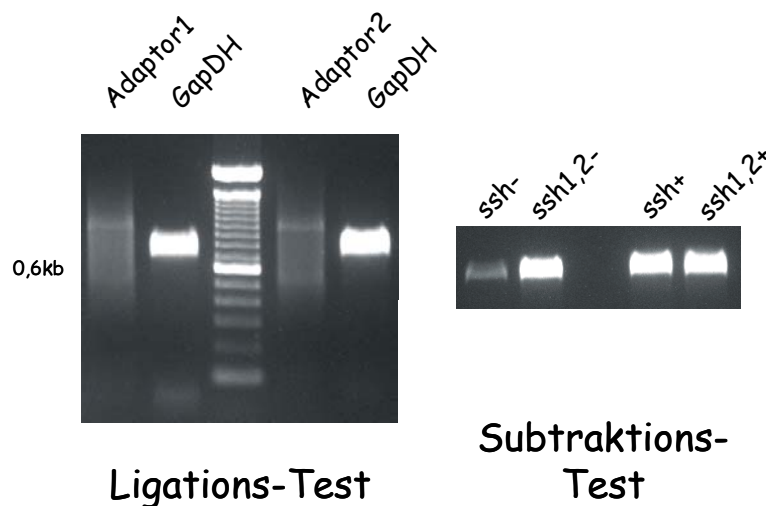
### 3.3 Untersuchungen zur Transkriptionsänderung

#### 3.3.1 Ergebnisse der Subtraktive-Suppressions-Hybridisierung

Wie reagieren aber nun die Pflanzen auf die erhöhten Konzentrationen an Cäsium in ihrer Umgebung bzw. wie wirken sich bei der Cäsium-134 Behandlung die ionisierenden Strahlen auf den Metabolismus aus?

Um entsprechende Gene identifizieren zu können, die durch diese Stressoren verstärkt bzw. vermindert stark transkribiert werden, wurde die Subtraktive-Suppressions-Hybridisierung (SSH) angewandt (vgl. Kapitel 2.12); bei Cäsium-133 wurden 150µM eingesetzt, bei den Radiocäsium-Experimenten 30Bq/cm<sup>3</sup>.

Bevor eine subtraktive cDNA-Bank in Bakterien kloniert werden konnte, mussten verschiedene Tests durchgeführt werden, um die Effizienz der einzelnen Schritte dieser Methode überprüfen zu können: Zum einen musste die Adaptor-Ligation überprüft werden. Dazu wurde die PCR mit zwei spezifischen Primern für das Gen der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und die PCR mit dem spezifischen reversen GAPDH-Primer und einem Adaptor-spezifischen Primer miteinander verglichen. Da der Adaptor-Primer an alle vorhandenen Adaptern binden kann, sollte sich ein Schmier ergeben, der die verschiedenen Fragmentgrößen der cDNA repräsentiert. Daneben sollte eine definierte GapDH-Bande erkennbar sein, die jedoch im Vergleich zu der spezifischen Bande der Kontroll-PCR deutlich schwächer ausgeprägt ist. Ein Beispiel ist in Abbildung 3-7 (links) dargestellt.

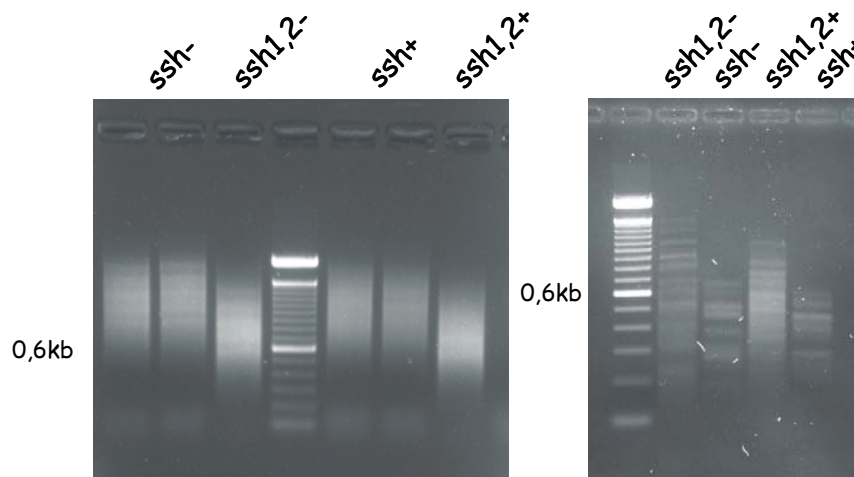


**Abbildung 3- 7 Ligations- und Subtraktions-Test der SSH mit Hilfe der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GapDH)**

ssh-	vorwärts-subtrahierte cDNA-Bank
ssh+	rückwärts- subtrahierte cDNA-Bank
ssh1,2-	vorwärts-nicht-subtrahierte cDNA-Bank
ssh1,2+	rückwärts-nicht-subtrahierte cDNA-Bank

Zum anderen war es nötig, die Effektivität der Subtraktion zu kontrollieren. Auch hier wurde eine PCR mit GAPDH-spezifischen Primern durchgeführt. Nach Abschluss der Suppressions-PCR wurde dazu 1 µl aus dem Reaktionsgefäß genommen und verdünnt; dieser Ansatz diente als Matrize für die anschließende Kontroll-PCR. Wenn die GAPDH in Tester- und Driver-cDNA in gleicher Menge vorhanden ist, sollte durch die Subtraktion das Gen im Vergleich zur unsubtrahierten Kontrolle nur eine sehr schwache Bande ergeben. Wie Abbildung 3-7 (rechts) zeigt, war die GAPDH in der Rückwärts-Subtraktion auch kaum mehr vorhanden, in der Vorwärts-Subtraktion jedoch ergab sich eine starke Bande. (Dies war der erste Hinweis auf ein unterschiedlich exprimiertes Gen aufgrund von Cäsium-Stress.)

Schließlich wurde noch das Ergebnis der Suppressions-PCR elektrophoretisch überprüft. Dies diente vor allem dazu, eine optimale Anzahl an Zyklen zu gewährleisten (Abbildung 3-8).



**Abbildung 3- 8 Beispiele für subtraktive cDNA-Banken**

Stress-SSH (links): Vergleich des Expressionsmusters einer behandelten Pflanze mit der unbehandelten Kontrollpflanze; csi-SSH (rechts): Vergleich zwischen dem Col-0 Wildtyp und der Cäsium-insensitiven csi52-Mutante

ssh-	vorwärts-subtrahierte cDNA-Bank
ssh+	rückwärts- subtrahierte cDNA-Bank
ssh1,2-	vorwärts-nicht-subtrahierte cDNA-Bank
ssh1,2+	rückwärts-nicht-subtrahierte cDNA-Bank

Die amplifizierten cDNA-Fragmente wurden in pGEM-T Plasmidvektoren kloniert und die Konstrukte in kompetente *E. coli* Zellen transformiert.

Über 3300 Klone aus 7 verschiedenen subtraktiven cDNA-Banken wurden isoliert: je drei SSH-Banken aus Cäsium-133 behandelten Pflanzen (Kapitel 2.5) und aus den Strahlungs-Experimenten mit Cäsium-134 (Kapitel 2.5). Eine weitere subtraktive cDNA-Bank wurde erstellt, um das Transkripti-

onsmuster von Arabidopsis-Wildtyp mit der csi52-Mutante nach Zugabe von 150 $\mu$ M Cäsium-133 zu vergleichen.

Die Klone wurden gepickt und in 96well-Mikrotiterplatten mit LB-Glycerin-Medium kultiviert.

Bevor die PCR-Produkte gereinigt und auf den Filter aufgebracht werden konnten, musste das Insert kontrolliert werden. Dazu wurde ein Teil der amplifizierten DNA-Fragmente auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Leere Plasmide und Plasmide mit Doppelinsertionen wurden aussortiert.

#### 3.3.2 Selektion positiver Klone mit Hilfe von Makroarrays

Da bei der Suppressions-PCR nicht nur differentiell exprimierte Gene vervielfältigt werden können, sondern auch Gene, die in beiden cDNA-Pools gemeinsam vorkommen (Kapitel 2.12), mussten die Klone durch vergleichende Hybridisierung überprüft werden.

Für jedes Experiment wurden vier identische Filter hergestellt, die mit Vorwärts-subtrahierten Sonden (ssh+), Rückwärts-subtrahierten Sonden (ssh-) und den jeweiligen nicht-subtrahierten Sonden (ssh1,2+; ssh1,2-) hybridisiert wurden (Kapitel 2.12.3). Die Adaptorsequenzen wurden von den Genfragmenten nicht entfernt. Die dadurch entstehenden Hintergrundsignale konnten durch die Normalisierung der Arrays verrechnet werden.

Die Sonden wurden durch „random priming“ radioaktiv markiert und die Filter anschließend hybridisiert.

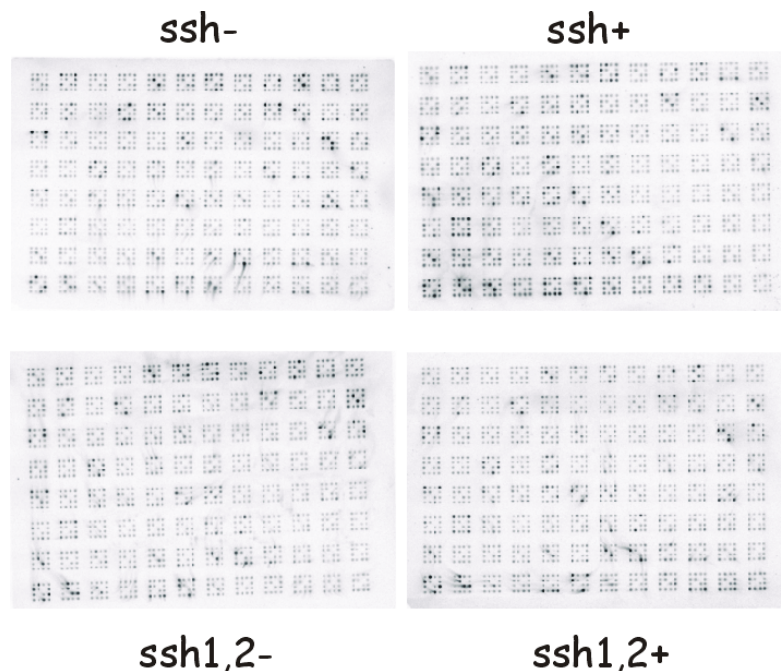


Abbildung 3-9 Arrays nach der Hybridisierung mit den verschiedenen radioaktiv-markierten Sonden



Dieser Vorgang wurde für jede Sonde in drei unabhängigen Versuchen wiederholt, sodass – zusammen mit der internen Wiederholung auf dem Makroarray (vgl. Kapitel 2.13.1) – jedes Gen sechsmal untersucht wurde.

Als positive Klone wurden Spots definiert, die in allen unabhängigen Wiederholungen bei der Berechnung des Verhältnisses zwischen ssh- und ssh+ um mindestens den Faktor 2 bzw. 0,5 voneinander abwichen. Beim Vergleich der nicht-subtrahierten PCR-Produkte durfte der Wert der Signalintensität sich nicht gegenteilig zu den subtrahierten Werten verhalten (z.B.  $\text{ssh}_{1,2-}/\text{ssh}_{1,2+} > 1$ , wenn das Verhältnis  $\text{ssh-}/\text{ssh+} < 0,5$  ist). Außerdem wurden diejenigen Spots nicht berücksichtigt, deren Intensität nach der Normalisierung nicht deutlich über dem lokalen Hintergrund lagen.

Von den ursprünglich über 3300 Klonen wurden auf diese Weise ca. 650 Klone ausgewählt und deren Sequenz bestimmt.

#### 3.3.3 Reproduzierbarkeit der Hybridisierung

Da die Einbaurrate bei der radioaktiven Markierung oder auch die DNA-Menge auf den Membranen (z.B. aufgrund von Unregelmäßigkeiten beim Spotten) variieren können, wurden die Hybridisierungsergebnisse normalisiert und ihre Reproduzierbarkeit überprüft.

Die Normalisierung wurde bei der Auswertung automatisch ausgeführt (siehe Kapitel 2.13.4). Dabei erfolgt die Verrechnung mit dem lokalen Background und die Division jedes einzelnen so abgeglichenen Spots durch den Mittelwert der Signalintensität aller Werte.

Die Reproduzierbarkeit der Hybridisierungen wurde ermittelt, indem die Signalintensitäten der internen Wiederholung bzw. die Signalintensitäten von zwei unabhängigen Arrays miteinander verglichen wurden.

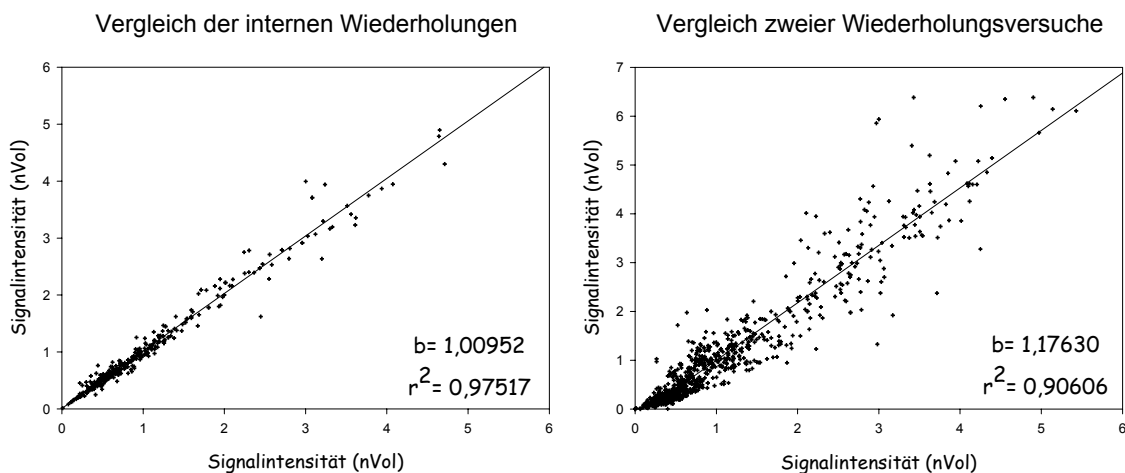


Abbildung 3- 10 Reproduzierbarkeit der Array-Hybridisierungen (b: Steigung,  $r^2$ : Bestimmtheitsmaß)

Die Steigung  $b$  der Regressionsgeraden ist ein Maß für die Korrelation der Genaktivitäten der Daten. Bei einer Steigung  $b = 1$  sind die Genaktivitäten gleich und alle Werte liegen auf einer Geraden. Das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  drückt den Anteil der aufgeklärten Varianz an der Gesamtvarianz aus. Es ist also ein Maß für die Güte der ermittelten Regressionsgerade und verdeutlicht die Streuung der Signalintensitäten. Es zeigte sich, dass beim Vergleich der doppelt aufgetragenen PCR-Produkte die Abweichungen der Steigung und des Bestimmtheitsmaßes nur sehr gering waren (Abbildung 3-10). Vergleicht man die Signalintensitäten der Punkte von zwei unterschiedlichen Arrays miteinander, so weichen beide Werte etwas deutlicher von dem Optimum ab, da hier – neben Fluktuationen in der Menge der aufgetragenen PCR-Produkte – auch die unterschiedliche Effizienz der radioaktiven Markierung in die Berechnung mit eingehen.

#### 3.4 Differentiell exprimierte Gene

Aus den 650 sequenzierten Klonen der unterschiedlichen SSH-Banken konnten insgesamt 119 verschiedene Gene ermittelt werden. In den anschließenden Kapiteln werden diese näher beschrieben und die Auswirkungen der Stressoren auf das Transkriptionsmuster von *Arabidopsis thaliana* erläutert.

##### 3.4.1 Induktion/Repression durch Cäsium-133 Stress

Wie bereits erwähnt, wurden hierzu drei unterschiedliche subtraktive cDNA-Banken erstellt, wobei jede SSH aus je fünf unabhängige *Arabidopsis*-Anzuchten hergestellt wurde. Ein Teil der Pflanzen wurde mit 150 $\mu$ M Cäsium behandelt (100 $\mu$ M wurden von Beginn an zugegeben, weitere 50 $\mu$ M drei Tage vor der Ernte, damit auch relativ kurzfristig induzierte Gene erfasst werden konnten); die Kontrolle wurde auf identischem Medium ohne Cäsium-Zugabe angezogen.

Die Pflanzen wurden parallel geerntet, um mögliche tageszeitliche Schwankungen im Expressionsmuster der Gene zu vermeiden. Die Wurzeln der verschiedenen Kulturen wurden vereinigt und die RNA isoliert. Anschließend wurde die SSH (vgl. Kapitel 2.12) durchgeführt, wobei die Kontrolle und die behandelten Pflanzen wechselweise als Driver oder Tester eingesetzt wurden. Aus den Array-Hybridisierungen und der anschließenden Sequenzierung ergaben sich 73 verschiedene Gene, die sich als differentiell exprimiert erwiesen haben. Aus diesen wurden stichprobenartig einige ausgewählt, welche zusätzlich mit Hilfe der semiquantitativen PCR und der RT-PCR verifiziert wurden.

In der folgenden Aufzählung sind alle identifizierten Klone aufgeführt (Abbildung 3-11). Die verifizierten Genfragmente sind rot hervorgehoben.

## ssh "Cäsium-133" (0,7 mM Kalium, 100µM Cäsium)

induziert	reprimiert
A.t. vacuolar sorting receptor homolog (At2g14720)	actin2 (At3g18780)
adenosylhomocysteinase (At4g13940)	aquaporin (plasma membrane intrinsic protein PIP 2b (At2g37170)
anthranilate synthase component I-1 precursor (At5g05730)	aquaporin (plasma membrane intrinsic protein PIP1b (At2g45960)
ATP sulfurylase precursor (At5g43780)	betaglucoosidase (At1g66270)
ATP sulfurylase/APS kinase (AT3g22890)	cycloartenol synthase (At5g42600)
beta 1,3-glucanase I precursor (At4g16260)	Dr4 putative protease inhibitor (At1g73330)
Ca2+-dependent membrane-binding protein - annexin (At1g35720)	glutamin-dependent asparagin synthetase (At3g47340)
cytochrome c (At1g22840)	Kalium transporter HAK5 (At4g13420)
cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase (At4g14880)	known protein - C2H2-type zinc finger domain (At1g72050)
dehydration-induced protein (ERD15) (At2g41430)	limonene cyclase-like (At3g25830)
delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (At3g55610)	NADP-specific isocitrate DH (At1g65930)
DNAJ-like protein (At4g36040)	putative homeobox-leucine zipper protein, HAT7 (At3g01220)
dnaK-type molecular chaperone hsc70.1 (At5g02500)	putative ribosomal protein L19 (At4g02230)
EF1 alpha A1 elongation factor (At5g60390)	putative trypsin inhibitor (At1g73260)
extensin3 (At1g213130)	salt-stress induced tonoplast intrinsic protein (At3g26520)
feebly-protein (At3g01420) - haem peroxidase motif	unknown protein (At3g15450) - GATase domain (asparagin synthase
glutathion-S-transferase (At1g02920)	
glutathion-S-transferase (At3g03190)	
glutathion-S-transferase (At4g02520)	
H+-transporting ATP synthase beta-chain (mitochondrial) (At5g08680)	
H+-transporting ATPase type2 (plasma membrane) (At4g30190)	
high affinity nitrate transporter (At1g08090)	
leucine aminopeptidase (At2g24200)	
luminal binding protein/dnaK-type chaperone hsc70 (At5g28540)	
osmotin precursor (At4g11650)	
pathogenesis related protein 1 (At4g33720)	
pectinesterase-like protein (At3g29090)	
peptidylprolyl isomerase (cyclophilin) (At4g34870)	
peroxidase (At2g38390)	
peroxidase prxr1 (At4g21960)	
phi1-like protein (At5g64260) - phosphate-induced protein 1 conserved region	
predicted prolin-rich protein (At4g28300)	
probable eucaryotic translation initiations factor 3 subunit 8 (At3g56150)	
proteinkinase-like/serin-threonin kinase (At5g03320)	
putative AP2 domain transcription factor (At1g72360)	
putative calcium binding protein (At3g47480)	
putative carboxylesterase (At1g68620)	
putative carnitine/acylcarnitine translocase (At1g79900)	
putative copper chaperone (At1g12520)	
putative copper/zinc superoxide dismutase (At2g28190)	
putative cytochrome P450 monooxygenase (At2g24180)	
putative endochitinase (At2g43570)	
putative glyceraldehydphosphat DH (At1g13440)	
putative glycin-rich protein (At2g05440)	
putative polyA-binding protein (At1g49760)	
putative protein (At1g54320) - LEM3 family / CDC50 family	
putative protein (At5g27710) - arginase family signature	
putative tropinone reductase (At2g29350)	
superoxide dismutase - copper/zinc signatures (At1g08830)	
UDP-GlcNAc: dolichol phosphate N-acetylglucosamine 1-phosphate transferase (At2g41490)	
unknown protein (At1g03220)	
unknown protein (At1g10140)	
unknown protein (At1g26250) - extensin-like region	
unknown protein (At2g05260) - lipase block	
unknown protein (At3g13460) - VT521-B-like family (alternative splicing)	
unknown protein (At5g41520) - Plectin/S10 domain (RNA binding)	
unknown protein (At5g45350)	

Abbildung 3- 11 Alphabetische Liste differentiell exprimierter Gene nach Cäsium-Behandlung (rot markierte Klone wurden durch RT-PCR verifiziert)

Die wichtigsten Gene werden im Folgenden näher erläutert, wobei sie nach ihrer Funktion in neun Gruppen aufgeteilt wurden. Es wird ausschließlich auf die Gene eingegangen, die durch die SSH-

Banken gefunden werden konnten. Auf die Untersuchungen z.B. des Transkriptionsverhaltens verschiedener Kalium-Transporter mit Hilfe der RT-PCR wird in Kapitel 3.4.6 eingegangen.

Die cDNA für die Verifikation wurde aus zwei verschiedenen – von den SSH-Experimenten unabhängig gewachsenen – Pflanzen-Anzuchten gewonnen. Es wurde dabei sowohl eine zeitliche Kinetik der Genexpression ermittelt als auch eine konzentrationsabhängige Veränderung untersucht:

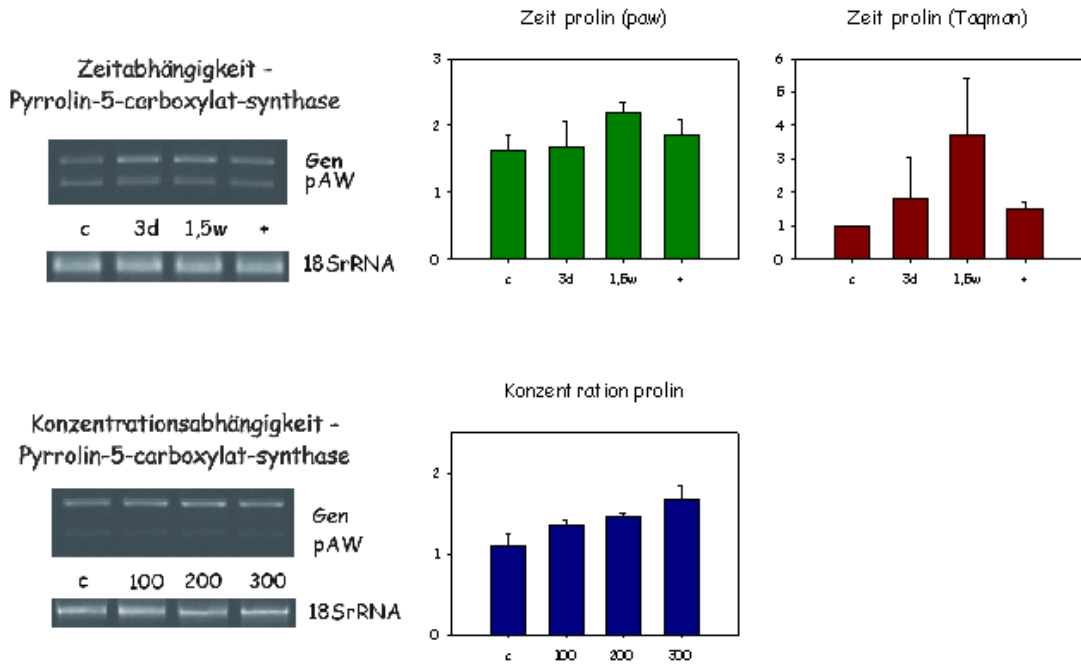
<b>Zeitabhängigkeit</b>		<b>Konzentrationsabhängigkeit</b>	
C	= 0 $\mu$ M <sup>133</sup> Cs (Kontrolle)	C	= 0 $\mu$ M <sup>133</sup> Cs (Kontrolle)
3d	= 150 $\mu$ M, für 3 Tage	100	= 100 $\mu$ M, für 4 Wochen
1,5w	= 150 $\mu$ M, für 1,5 Wochen	200	= 200 $\mu$ M, für 4 Wochen
+	= 150 $\mu$ M, für 4 Wochen	300	= 300 $\mu$ M, für 4 Wochen

Die Untersuchungen der Zeitabhängigkeit wurden mehrmals wiederholt, bei nur schwach induzierten/reprimierten Genen bis zu fünfmal. Die Konzentrationsexperimente konnten aufgrund der sehr geringen RNA-Ausbeuten (vor allem der 300 $\mu$ M-Cäsium Experimente) für jedes Gen nur einmal ausgeführt werden; dementsprechend sind die Ergebnisse nur als Tendenz ohne statistischen Wert und nur als Ergänzung zu den anderen Versuchen zu verstehen.

### 1. Metabolismus

Die **S-Adenosyl-L-Homocysteinase** katalysiert die reversible Dehydratation von S-Adenosine-L-Homocystein zu Adenosin und Homocystein. Homocystein ist ein Bestandteil des Aminosäure-Metabolismus und kann als Vorstufe für Methionin und Cystein dienen.

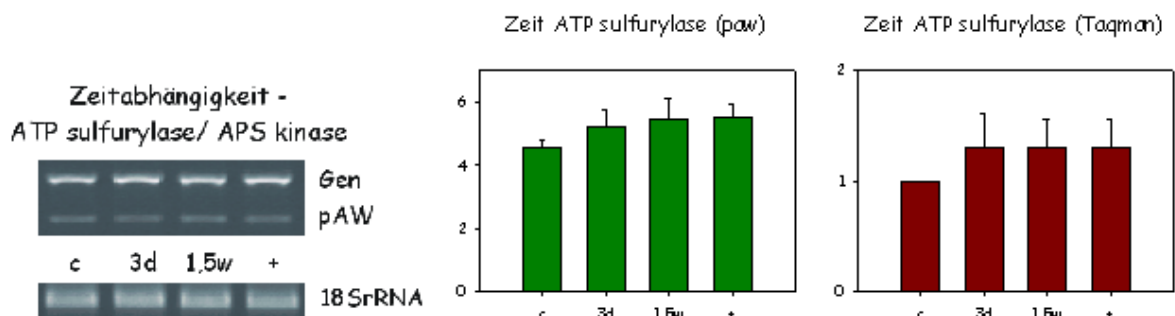
Ebenso sind die Enzyme **Anthranilat-Synthase** (Tryptophan), **Acetylserin-Thiolyase** (Cystein) und  **$\Delta$ -1-Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthase** (Prolin, Abbildung 3-12) an der Synthese von Aminosäuren beteiligt. Sie alle haben auch Einfluss auf den Kohlenstoff-, Stickstoff- und Schwefelhaushalt der Zelle.



**Abbildung 3-12 Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman):  $\Delta$ -1-Pyrrolin-5-carboxylat-Synthase (At3g55610)**

C = 0 $\mu$ M  $^{133}$ Cs (Kontrolle); 3d = 150 $\mu$ M, für 3 Tage; 1,5w = 150 $\mu$ M, für 1,5 Wochen; + = 150 $\mu$ M, für 4 Wochen; 100 = 100 $\mu$ M, für 4 Wochen; 200 = 200 $\mu$ M, für 4 Wochen; 300 = 300 $\mu$ M, für 4 Wochen

Die **ATP-Sulfurylase** (Abbildung 3-13) ist mit **Adenosyl-phosphosulfat (APS)-Kinase** zu einer bifunktionalen Polypeptidkette assoziiert. Zusammen sind sie an der Schwefelassimilation beteiligt, indem sie die Synthese von ATP und anorganischem Schwefel zu APS katalysieren. Das Sulfation wird in einer Zweischnittreaktion in die reduzierte Form gebracht. Der reduzierte Schwefel erscheint letztlich als SH-Gruppe im Cystein (assimilatorische Sulfatreduktion).



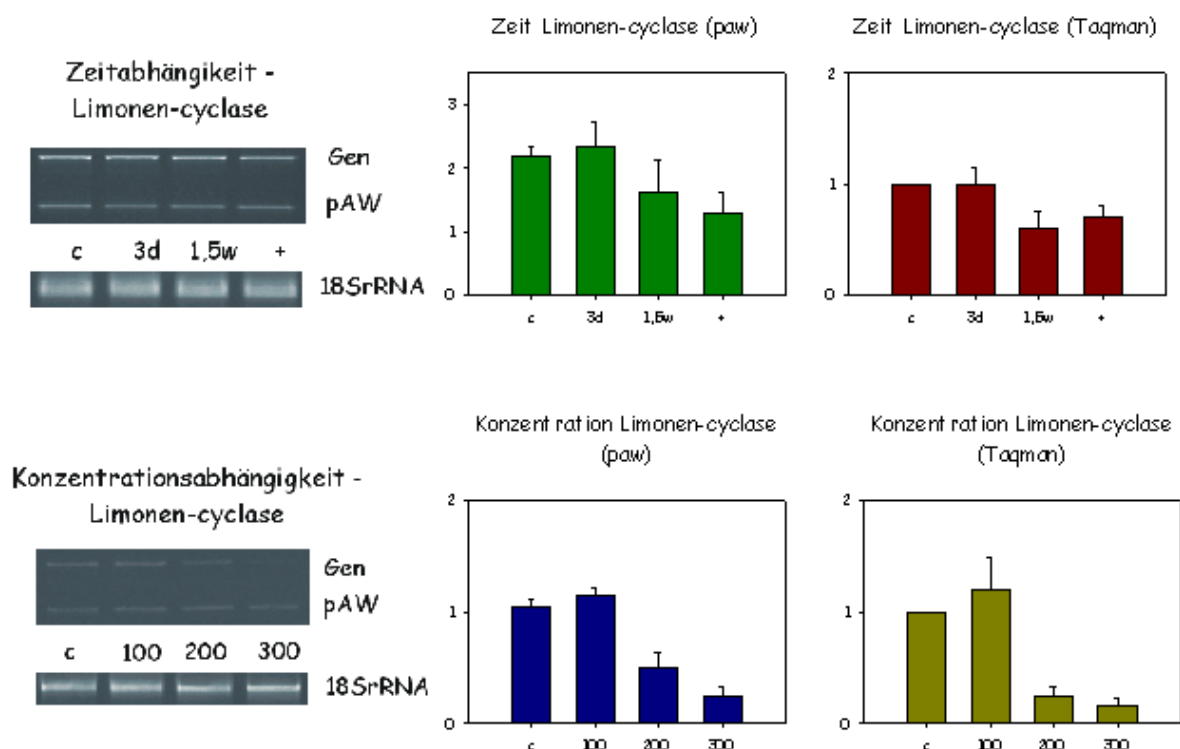
**Abbildung 3-13 Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw): ATP Sulfurylase/APS Kinase (At3g22890)**

C = 0 $\mu$ M  $^{133}$ Cs (Kontrolle); 3d = 150 $\mu$ M, für 3 Tage; 1,5w = 150 $\mu$ M, für 1,5 Wochen; + = 150 $\mu$ M, für 4 Wochen; 100 = 100 $\mu$ M, für 4 Wochen; 200 = 200 $\mu$ M, für 4 Wochen; 300 = 300 $\mu$ M, für 4 Wochen

Die Reduktion des Tropinon ist eine Schlüsselstelle des Tropinon-Alkaloid-Metabolismus. Die **Tropinon-Reduktase** ist in Eukaryonten – neben der Synthese von sekundären Pflanzenstoffen – auch am Aromaten-Katabolismus beteiligt, und auf diese Weise ebenfalls mit Aminosäure-Stoffwechsel verbunden. Die tatsächliche Funktion des gefundenen Gens ist aber noch nicht eindeutig geklärt. Die **Carboxylesterase** und **Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH)** sind Enzyme des Lipid- bzw. des Glucose-Metabolismus. Die GAPDH oxidiert Glycerinaldehydphosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat, welches im nächsten Schritt der Glycolyse durch Abspalten einer Phosphat-Gruppe zu 3-Phosphoglycerat umgebaut wird.

Die Expression der übrigen Gene dieser Gruppe wurde unter Cäsium-Stress reprimiert. **Betaglucosidasen** spalten glycosidische Bindungen hydrolytisch und sind Teil der Glycosid-Biosynthese und des Kohlenwasserstoff-Metabolismus.

Sowohl die **Limonen-Cyclase** als auch die **Cycloartenol-Synthase** sind Teile der Terpen-Biosynthese: Die enzymatische Reaktion der Limonen-Cyclase ist die Zyklisierung von Geranylpyrophosphat zu (-)-Limonen, die Cycloartenol-Synthase katalysiert die Umwandlung von Squalenepoxid zu Cycloartenol (Steroid-Biosynthese).



**Abbildung 3- 14** Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): Limonen-Cyclase (At3g25830)

C = 0µM <sup>133</sup>Cs (Kontrolle); 3d = 150µM, für 3 Tage; 1,5w = 150µM, für 1,5 Wochen; + = 150µM, für 4 Wochen; 100 = 100µM, für 4 Wochen; 200 = 200µM, für 4 Wochen; 300 = 300µM, für 4 Wochen

Die **Glutamin-abhängige Asparagin-Synthase** katalysiert die Übertragung der Ammoniumgruppe von Glutamin auf Aspartat unter der Bildung von Asparagin. Es handelt sich hierbei um Aminosäuren, die alle aus Zwischenprodukten des Zitronensäure-Zyklus stammen. Sie stehen somit im direkten Zusammenhang mit der **Isocitrat-Dehydrogenase**, welches Isocitrat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat decarboxyliert.

## 2. Energie

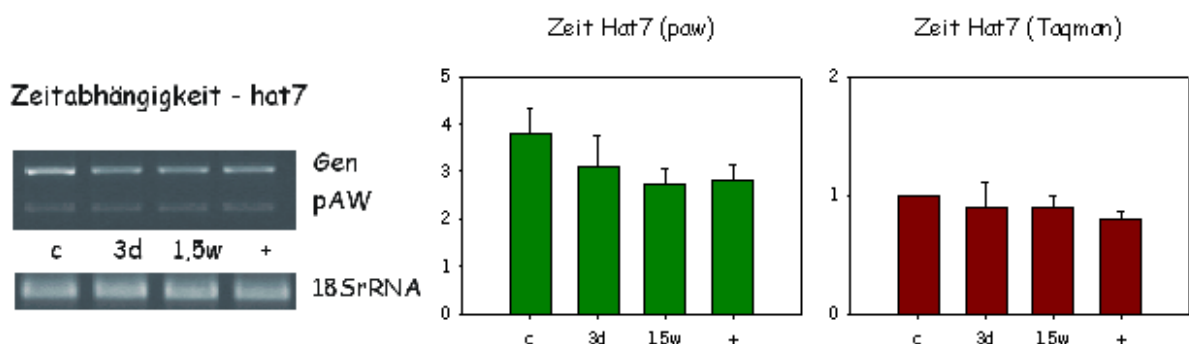
Die Transkription der Gene des **Cytochrom c** und der  **$\beta$ -Kette der mitochondrialen ATP-Synthase** wird durch Cäsium induziert. Cytochrom c hat ein breit gefächertes Funktionsspektrum und ist an einer Vielzahl unterschiedlicher Redox-Reaktionen beteiligt (u.a. in der Atmungskette). Elektronen-carrier-Proteine besitzt eine Hämgruppe, die über ein oder mehrere Sulfhydryl-Gruppen von Cystein-Resten an das Protein gebunden wird.

Die ATP-Synthase ist Teil der mitochondrialen Atmungskette und katalysiert die Bildung von ATP durch Abbau des Protonengradienten.

## 3. Zellwachstum, Zellteilung und Entwicklung der Pflanze

Das einzige Gen aus dieser Gruppe, dass induziert wurde, kodiert für ein **Calcium-abhängiges Membranprotein (Annexin)**, eine Familie von Phospholipid-bindenden Proteinen (Barton, 1991). Ihre Rolle in der Zelle ist noch nicht eindeutig geklärt, es beeinflusst u.a. die Fusion von Membranen, die Exocytose oder sekretorische Vorgänge; auch wird ihre Beteiligung am Aufbau von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase diskutiert.

Reprimiert wurde mit dem Gen für **Actin2** eine Hauptkomponente des Cytoskeletts. In Pflanzen besitzt Actin zahlreiche Funktionen wie cytoplasmatische Bewegungen, Determination der Zellform, Wachstum der Wurzelspitze oder Beteiligung an der Zellwandbildung..



**Abbildung 3- 15** Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw): putatives HAT7 (At3g01220)

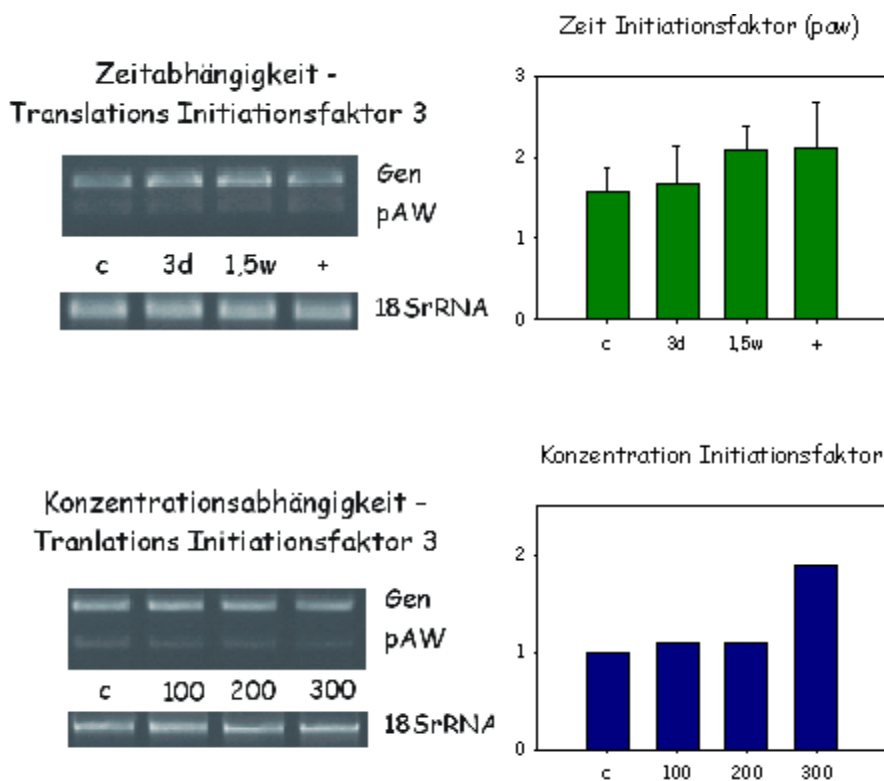
C = 0 $\mu$ M  $^{133}\text{Cs}$  (Kontrolle); 3d = 150 $\mu$ M, für 3 Tage; 1,5w = 150 $\mu$ M, für 1,5 Wochen; + = 150 $\mu$ M, für 4 Wochen; 100 = 100 $\mu$ M, für 4 Wochen; 200 = 200 $\mu$ M, für 4 Wochen; 300 = 300 $\mu$ M, für 4 Wochen

Das **Homeobox-Leucin-Zipper Protein Hat7** (Abbildung 3-15) ist ein Transkriptionsfaktor und leitet daher zur nächsten Gruppe über

Proteine, die Homeobox-Domänen besitzen, spielen meist eine wichtige Rolle bei Entwicklungsvorgängen (sie wurden zum ersten Mal in *Drosophila* Homeo- und Segmentations-Proteinen identifiziert). Die DNA-Erkennung und -Bindung erfolgt über eine „helix-turn-helix“-Motiv (Scott, 1998).

#### 4. Kontrolle der Transkription und Translation

Die **Initiationsfaktoren** spielen eine Rolle bei Initiation der Translation; IF3 (Abbildung 3-16) ist dabei an der mRNA-Bindung beteiligt und verlässt die ribosomale Untereinheit nach Bindung der mRNA und des fMet-tRNA. **Elongationsfaktoren** gehören zu einer Proteinfamilie, die während der Protein-Biosynthese die GTP-abhängige Bindung der Aminoacyl-tRNA an die Ribosomen begünstigen und die Translokation der entstehenden Polypeptidkette katalysieren.

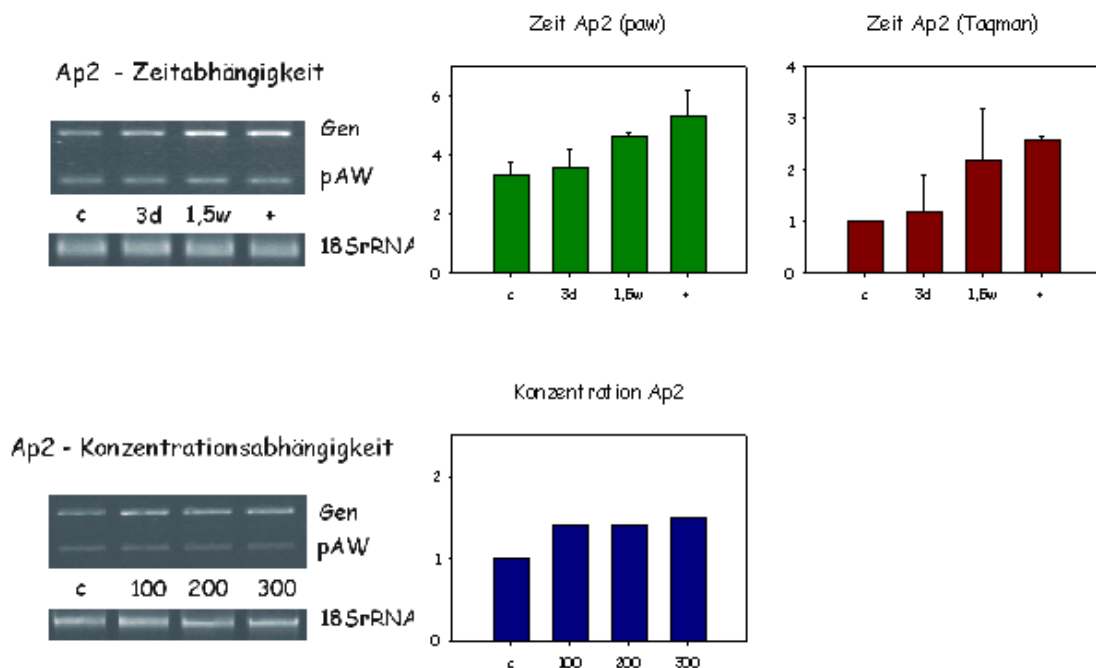


**Abbildung 3- 16 Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw):** Eukaryotischer Translations Initiationsfaktor 3 subunit 8 (At3g56150)

C = 0µM <sup>133</sup>Cs (Kontrolle); 3d = 150µM, für 3 Tage; 1,5w = 150µM, für 1,5 Wochen; + = 150µM, für 4 Wochen; 100 = 100µM, für 4 Wochen; 200 = 200µM, für 4 Wochen; 300 = 300µM, für 4 Wochen



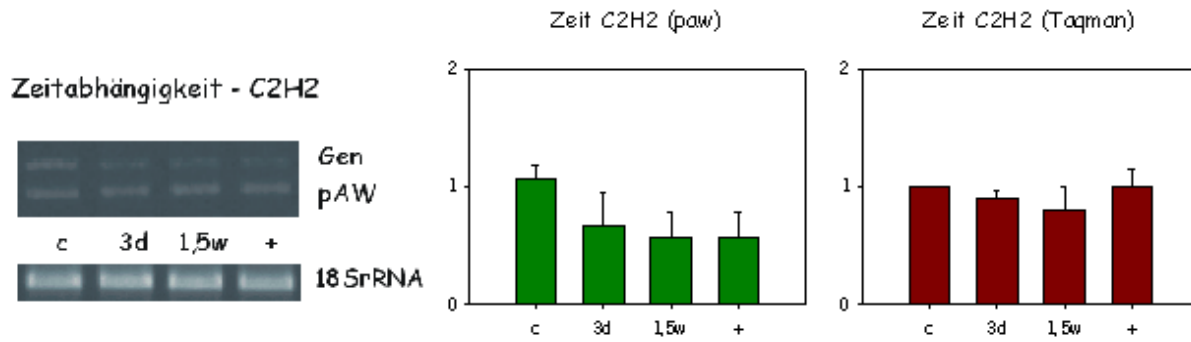
Zu den Transkriptionsfaktoren, die durch Cäsium-Stress auf Transkriptebene induziert wurden, zählt ein **putativer AP2-Domäne Transkriptionsfaktor** (Abbildung 3-17). Die AP2-Domäne bindet an einer GCCNNNGGC Consensus-Sequenz innerhalb des Promotors und stimuliert auf diese Weise die Transkription. AP2-TF sind häufig an Abwehr- und Entwicklungsprozessen der Pflanzen beteiligt, wie zum Beispiel bei der Samenkeimung, der Förderung der Blütenbildung und Fruchtreife, der Alterung von Blättern, aber auch bei der Inhibition des Längenwachstums von Stengel und Wurzel (Liu *et al.*, 1998). Motive für die mRNA-Erkennung der **polyA-bindenden Proteine** kommen in einer Vielzahl von Proteinen vor, die Splicing oder Translationsprozesse regulieren (Bandziulis, 1989; Birney, 1993).



**Abbildung 3-17** Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): putativer AP2 Domäne Transkriptionsfaktor (At1g72360)

C = 0µM <sup>133</sup>Cs (Kontrolle); 3d = 150µM, für 3 Tage; 1,5w = 150µM, für 1,5 Wochen; + = 150µM, für 4 Wochen; 100 = 100µM, für 4 Wochen; 200 = 200µM, für 4 Wochen; 300 = 300µM, für 4 Wochen

Reprimiert wurden Gene, die für ein **putatives ribosomales Protein L19**, einen **c2h2-Typ Protein** (Abbildung 3-18) und ein **putatives Homeobox-leucine-Zipper (HAT) Protein** kodieren. Während L19 am Aufbau der Ribosomen beteiligt ist, steuern die c2h2-Typ Zink-finger Proteine und hat7-TF als DNA-bindende Proteine die Transkription zahlreicher Gene innerhalb der Zelle.

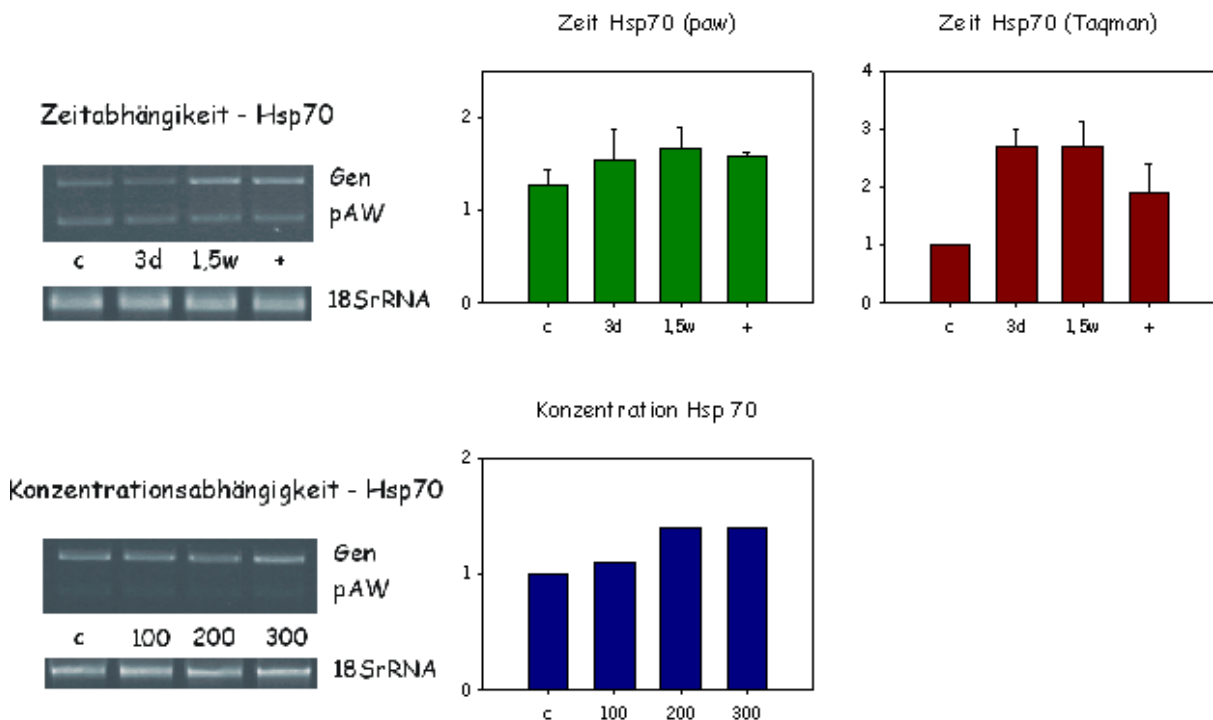


**Abbildung 3- 18 Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw): c2h2-Typ Zink-Finger Domäne Transkriptionsfaktor (At1g72050)**

C = 0 $\mu$ M <sup>133</sup>Cs (Kontrolle); 3d = 150 $\mu$ M, für 3 Tage; 1,5w = 150 $\mu$ M, für 1,5 Wochen; + = 150 $\mu$ M, für 4 Wochen; 100 = 100 $\mu$ M, für 4 Wochen; 200 = 200 $\mu$ M, für 4 Wochen; 300 = 300 $\mu$ M, für 4 Wochen

## 5. Proteinsynthese, Proteinfaltung und Modifikation

Zwei verschiedene Proteine aus der Familie der **Hsp70 Chaperone** (Abbildung 3-19) konnten als cäsiuminduziert identifiziert werden.



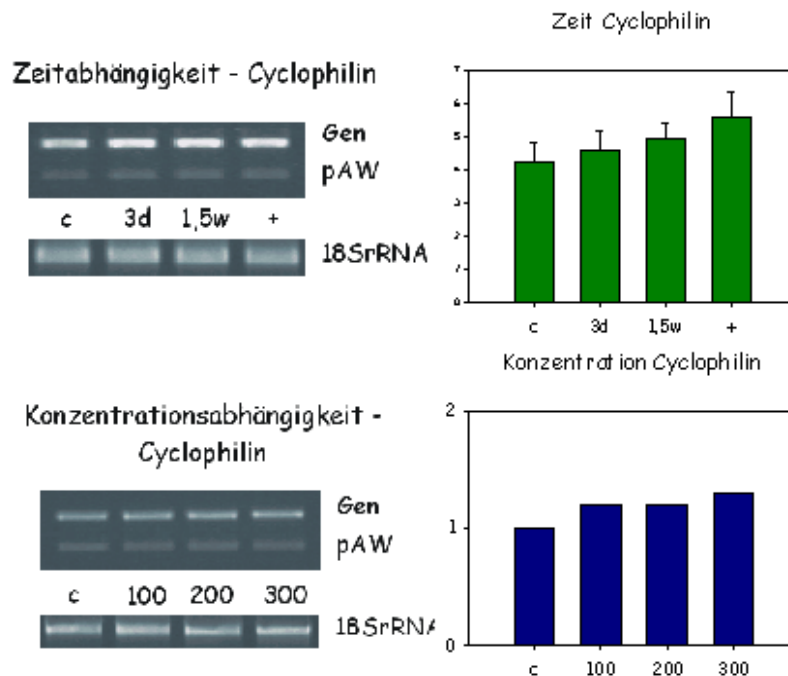
**Abbildung 3- 19 Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): Chaperon hsc70.1 (At5g02500)**

C = 0 $\mu$ M <sup>133</sup>Cs (Kontrolle); 3d = 150 $\mu$ M, für 3 Tage; 1,5w = 150 $\mu$ M, für 1,5 Wochen; + = 150 $\mu$ M, für 4 Wochen; 100 = 100 $\mu$ M, für 4 Wochen; 200 = 200 $\mu$ M, für 4 Wochen; 300 = 300 $\mu$ M, für 4 Wochen

Einige dieser so genannten Heat-shock-proteine werden nur unter Stress induziert, während andere konstitutiv in der Zelle auch unter Normalbedingungen exprimiert werden (Lin *et al.*, 2001). Unter Verwendung von ATP assistieren diese 70kDa großen Proteine zahlreichen Polypeptiden bei der Faltung in ihre native Form.

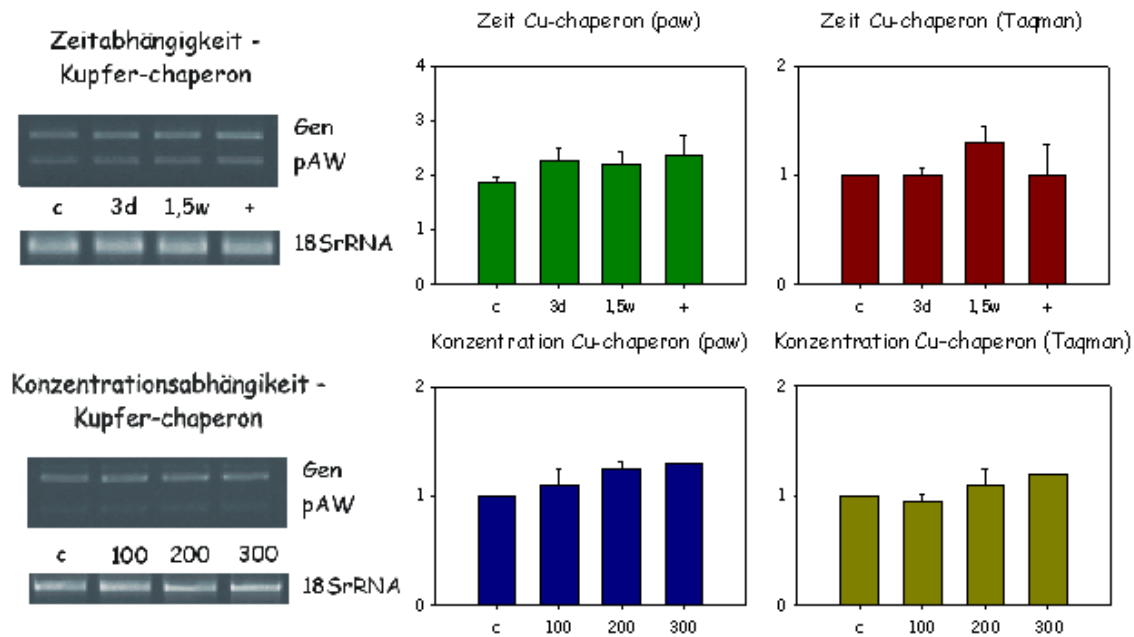
**DNAJ-like Proteine** interagieren bei diesem Prozess mit den hsp70-System und spielen wahrscheinlich eine Vermittlerrolle.

Weitere Proteine, die bei der Proteinfaltung und -aktivierung eine Rolle spielen, konnten mit einem **putativen Kupfer-Chaperone** der **Superoxid-Dismutase** (Abbildung 3-21) und dem **Cyclophilin** (Abbildung 3-20) nachgewiesen werden (Torres *et al.*, 2001; Matouschek *et al.*, 1995).



**Abbildung 3- 20** Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw): Peptidylprolyl Isomerase – Cyclophilin (At4g34870)

C = 0µM <sup>133</sup>Cs (Kontrolle); 3d = 150µM, für 3 Tage; 1,5w = 150µM, für 1,5 Wochen; + = 150µM, für 4 Wochen; 100 = 100µM, für 4 Wochen; 200 = 200µM, für 4 Wochen; 300 = 300µM, für 4 Wochen



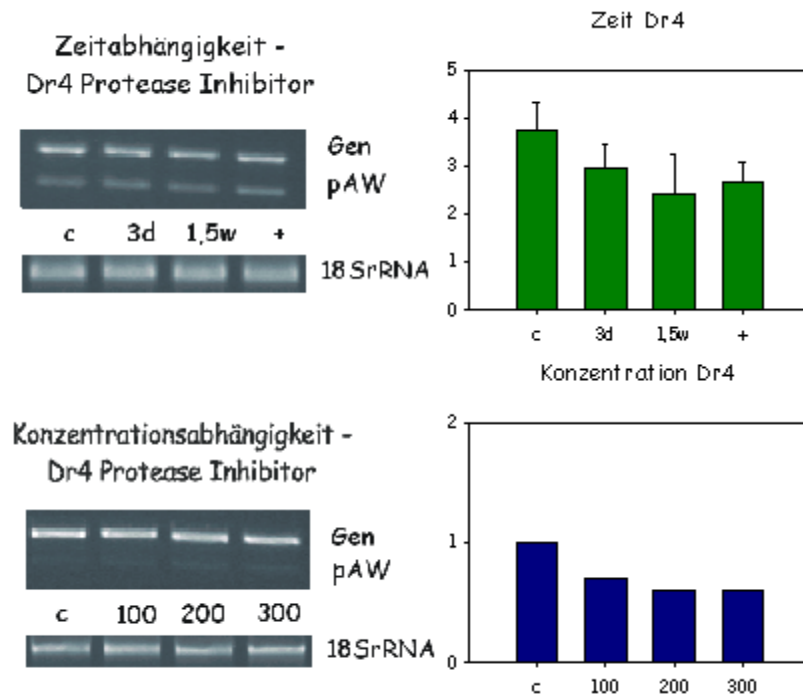
**Abbildung 3-21** Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): putativer Kupfer-Chaperon der SOD (At1g12520)

C = 0µM <sup>133</sup>Cs (Kontrolle); 3d = 150µM, für 3 Tage; 1,5w = 150µM, für 1,5 Wochen; + = 150µM, für 4 Wochen; 100 = 100µM, für 4 Wochen; 200 = 200µM, für 4 Wochen; 300 = 300µM, für 4 Wochen

Die **Leucyl-Aminopeptidase** ist eine Exopeptidase, die bei der Prozessierung und dem Umsatz von intrazellulären Proteinen mitwirkt; sie spaltet vom N-terminalen Ende der Polypeptidkette bevorzugt Leucin-Reste ab, besitzt aber auch Affinität zu anderen Aminosäuren.

Die **UDP-N-Acetylglucosamine-dolichyl-phosphat N-Acetylglucosamin-Phosphotransferase** modifiziert Proteine durch Übertragung von Glycosylgruppen. Auch hier ist die genaue Funktion im zellulären Metabolismus noch ungeklärt.

Geringere Genaktivität wurde bei zwei Protease-Inhibitoren nachgewiesen, dem **Dr4 putativen Protease-Inhibitor** (Abbildung 3-22) und dem **putativen Trypsin-Inhibitor**. Inhibitoren greifen meist exogene Proteasen an und können somit spezifisch gegen die proteolytischen Enzyme von Schadinsekten oder Viren wirken. Sie spielen aber auch eine Rolle beim Metabolismus von zelleigenen Proteinen durch Regulation der Aktivität der endogenen Proteasen (Lakowski and Kato, 1980).



**Abbildung 3-22 Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw):** Dr4 putativer Protease Inhibitor (At1g73330)

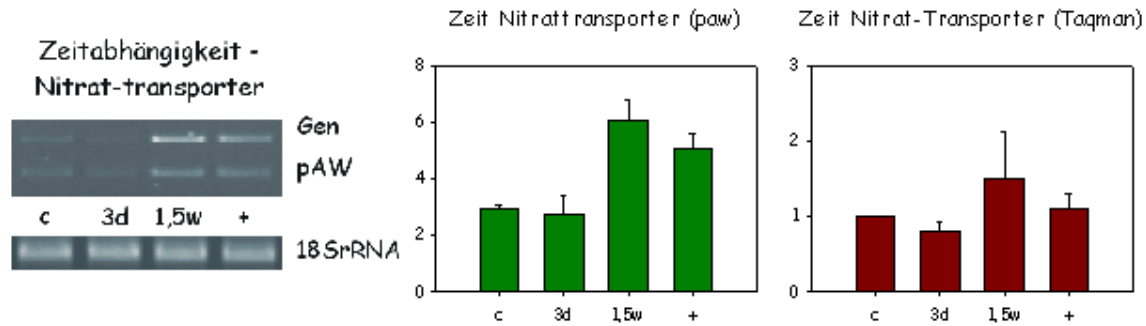
C = 0 $\mu$ M  $^{133}$ Cs (Kontrolle); 3d = 150 $\mu$ M, für 3 Tage; 1,5w = 150 $\mu$ M, für 1,5 Wochen; + = 150 $\mu$ M, für 4 Wochen; 100 = 100 $\mu$ M, für 4 Wochen; 200 = 200 $\mu$ M, für 4 Wochen; 300 = 300 $\mu$ M, für 4 Wochen

## 6. Transport und Homöostase

In Verbindung zur vorherigen Gruppe steht der „**vacuolar-sorting<sup>o</sup> Rezeptor (VSR)-Homolog**“. Er enthält eine Protease-Domäne und besitzt daher wahrscheinlich auch proteolytische Aktivität. VSR ist bei Sortierung und Translokation von Proteinen beteiligt (Paris *et al.*, 1997).

Die **H<sup>+</sup>-ATPase Typ 2** ist eine Protonenpumpe und eines der Hauptenzyme in der Plasmamembran. Sie transportiert unter ATP-Hydrolyse Protonen aus der Zelle und baut dadurch einen elektrochemischen Gradienten über die Membran aus. Dieser kann genutzt werden, um andere Ionen oder Metabolite (Aminosäuren, Zucker, Hormone etc.) in die Zelle aufzunehmen oder aus der Zelle (z.B. Beladung des Phloems) zu transportieren.

Gekoppelt ist der Abbau des Protonen-Gradienten z.B. auch an die Nitrat-Aufnahme über den **high-affinity Nitrat-Transporter NRT2** (Abbildung 3-23), einem Schlüsselschritt in der Kontrolle des Nitrat-Gehaltes in der Zelle (Okamoto *et al.*, 2003). Nitrat beeinflusst unter anderem als Signalmolekül die Wurzelmorphogenese und das Größenverhältnis von Wurzel zu Spross. Nitrat ist direkt oder indirekt am Stickstoff-, Schwefel- und Kohlenstoffhaushalt der Pflanze beteiligt und essentiell für die Aminosäure- und Nucleotid-Synthese.

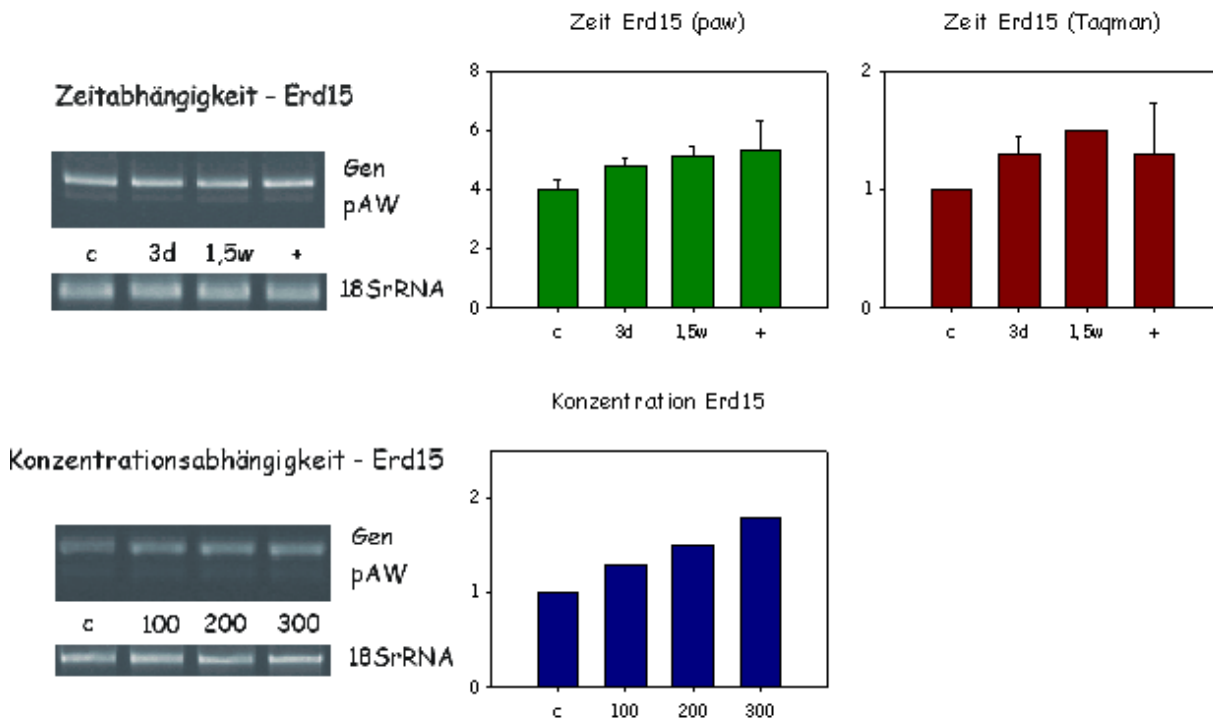


**Abbildung 3-23** Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw): high affinity Nitrat-Transporter (At1g08090)

C = 0µM <sup>133</sup>Cs (Kontrolle); 3d = 150µM, für 3 Tage; 1,5w = 150µM, für 1,5 Wochen; + = 150µM, für 4 Wochen; 100 = 100µM, für 4 Wochen; 200 = 200µM, für 4 Wochen; 300 = 300µM, für 4 Wochen

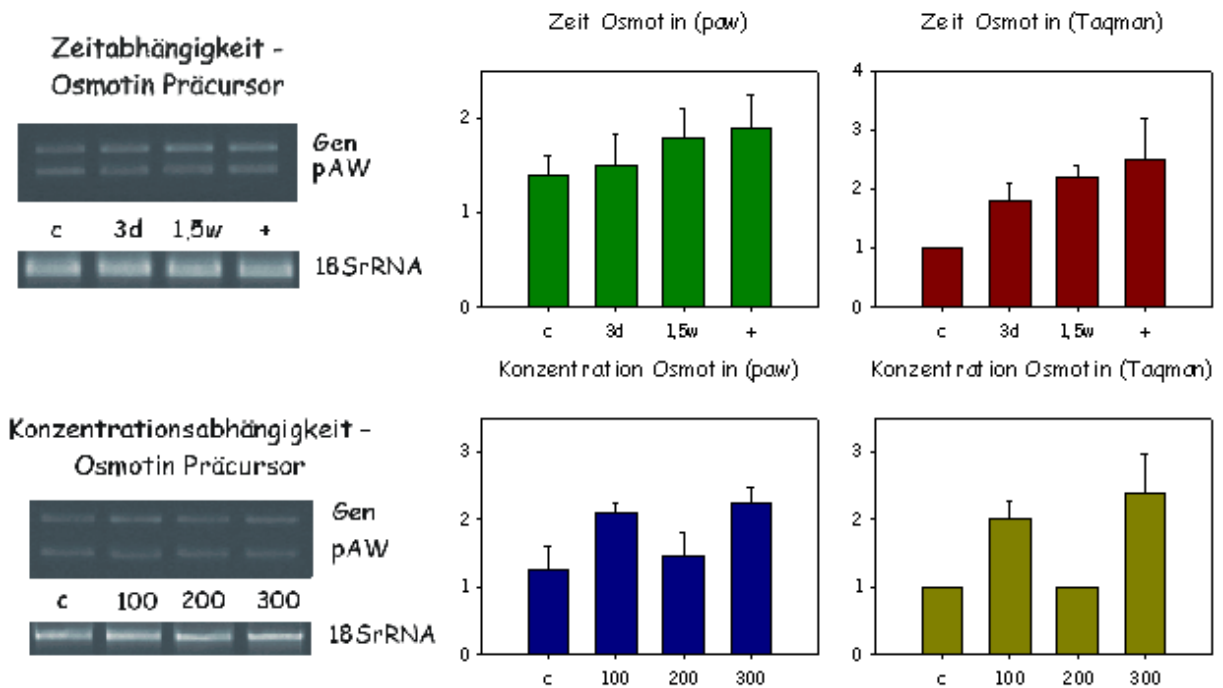
Das Gen für eine **putative Carnitin/Acylcarnitin-Translocase** wurde ebenfalls durch Cäsium-Stress induziert. Es handelt sich hierbei vorraussichtlich um ein Carrier-Protein für den Energietransfer an der inneren Mitochondrienmembran.

Die Proteine **Dehydration-induziertes Protein ERD15** (Abbildung 3-24) und **Osmotin Präcursor** (Abbildung 3-25) werden bei der Antwort der Pflanze auf osmotischen Stress gebildet (Kiyosue *et al.*, 1994; Capelli *et al.*, 1997).



**Abbildung 3-24** Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): Dehydratation-induziertes Protein (Erd15) (At2g41430)

C = 0µM <sup>133</sup>Cs (Kontrolle); 3d = 150µM, für 3 Tage; 1,5w = 150µM, für 1,5 Wochen; + = 150µM, für 4 Wochen; 100 = 100µM, für 4 Wochen; 200 = 200µM, für 4 Wochen; 300 = 300µM, für 4 Wochen



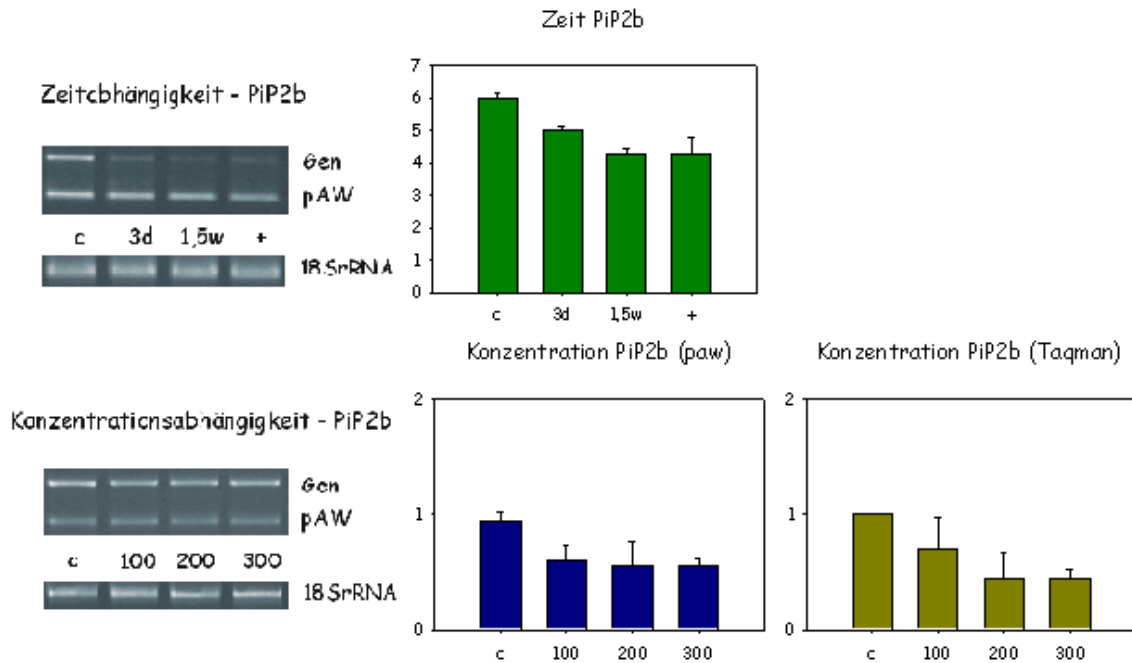
**Abbildung 3- 25** Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): Osmotin Präcursor (at4g11650)

C = 0 $\mu$ M <sup>133</sup>Cs (Kontrolle); 3d = 150 $\mu$ M, für 3 Tage; 1,5w = 150 $\mu$ M, für 1,5 Wochen; + = 150 $\mu$ M, für 4 Wochen; 100 = 100 $\mu$ M, für 4 Wochen; 200 = 200 $\mu$ M, für 4 Wochen; 300 = 300 $\mu$ M, für 4 Wochen

Die genaue Funktion von ERD15 ist noch nicht geklärt, es tritt unter anderem als Schutzprotein bei Austrocknungsprozessen während der Samenreifung auf. Auch wenn die Osmotine bei Untersuchungen zum Salzstress entdeckt wurden, gehören sie zu den so genannten Pathogenesis-related (PR)-Proteinen und besitzen antimykotische Wirkung. Es sind somit keine spezifischen Stressproteine, sondern verknüpfen aufgrund ihrer Funktion osmotischen Stress mit Abwehrreaktionen auf Pathogenbefall.

Prolin (vgl.  $\Delta$ -1-Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthase, 1. Metabolismus) wird ebenfalls bei osmotischem Stress akkumuliert und ist zusammen mit Zucker-Verbindungen die wichtigste osmotisch aktive Substanz in der Zelle (Yoshida *et al.*, 1997).

Zu den reprimierten Genen innerhalb dieser Gruppe zählten Gene, die für die **Aquaporine PIP1b**, **PIP2b** (Abbildung 3-26) und **TIP** kodierte. Es handelt sich hierbei um wasserselektive Kanäle über der Plasmamembran oder den Tonoplasten, die dem beschleunigten bidirektionalen H<sub>2</sub>O-Transfer gemäß dem osmotischen Gefälle dienen (Baiges *et al.*, 2002).



**Abbildung 3-26** Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): Aquaporin – Plasma intrinsic Protein PiP2b (At2g37170)

C = 0 µM <sup>133</sup>Cs (Kontrolle); 3d = 150 µM, für 3 Tage; 1,5w = 150 µM, für 1,5 Wochen; + = 150 µM, für 4 Wochen; 100 = 100 µM, für 4 Wochen; 200 = 200 µM, für 4 Wochen; 300 = 300 µM, für 4 Wochen

Ebenfalls eine verminderte Transkriptionsrate konnte für das Gen des **Kalium-Transporter HAK5** ermittelt werden; dieses Ergebnis konnte nicht eindeutig mittels RT-PCR bestätigt werden (Abbildung 3-48). Unter ATP-Spaltung wird bei diesem Aufnahmesystem das Kation mit hoher Affinität in die Zelle transportiert. Durch aktiven Transport kann das Kalium auch entgegen eines Ionen- oder Ladungs-Gradienten aufgenommen werden (Rubio *et al.*, 2000).

## 7. Zelluläre Kommunikation und Signaltransduktion

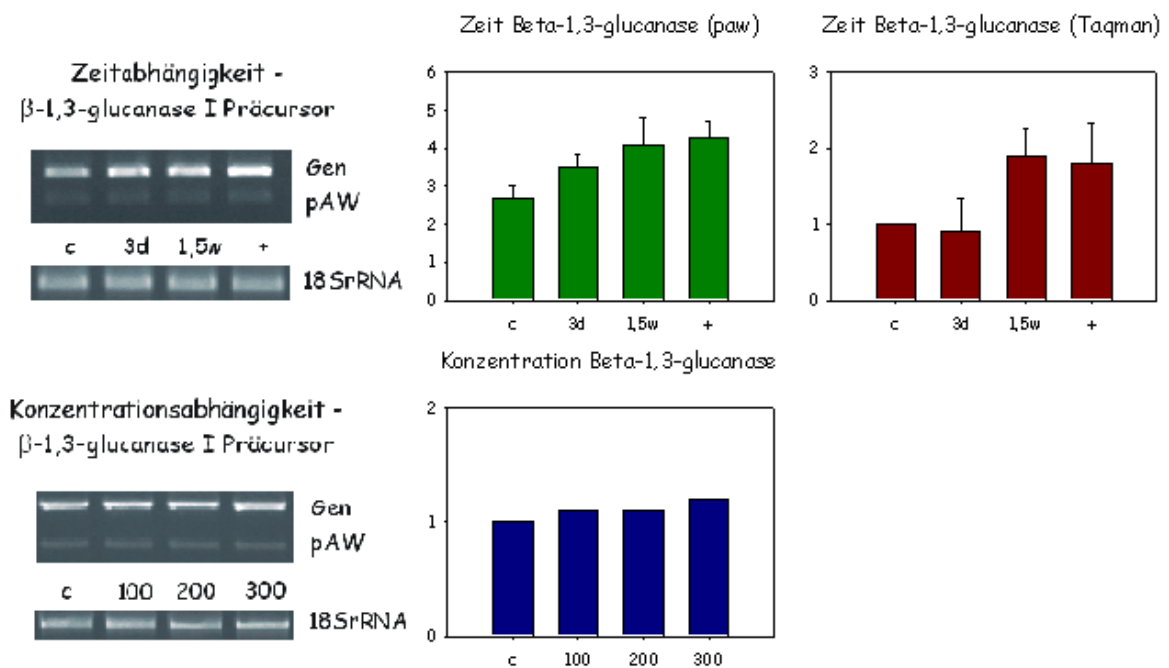
Nur zwei Proteine, eine **Serin-Threonin-Kinase** und ein **putatives Calcium-bindendes Protein**, konnten dieser Gruppe zugeordnet werden. Beide korrespondierenden Gene wurden bei Anwesenheit von Cäsium-133 im Substrat verstärkt transkribiert. Eine eindeutige Funktion konnte nicht ermittelt werden: Proteinkinasen aktivieren oder inaktivieren durch Phosphorylierungs-Kaskaden eine Vielzahl von Proteinen und besitzen dabei Signalverstärker-Funktion. Die meisten Ca<sup>2+</sup>-bindenden Proteine, wie z.B. Calmodulin, haben Signalfunktion. Sie vollziehen durch die Bindung von Calcium an eine EF-Hand-Struktur eine Änderung in ihrer Konformation. Eine zweite Klasse ist an der Homöostase und dem Transport von Ca<sup>2+</sup>-Ionen in der Zelle beteiligt. Sowohl eine Proteinekinase als auch ein calcium-bindendes Protein sind unter anderem an der SOS-Kaskade beteiligt (Halfter *et al.*, 2000)



## 8. Zellabwehr, Stressantwort und Detoxifikation

Diese Gruppe umfasst die meisten differentiell exprimierten Gene, die aufgrund der SSH-Banken gefunden wurden; alle sind nach Cäsium-Applikation verstärkt transkribiert worden.

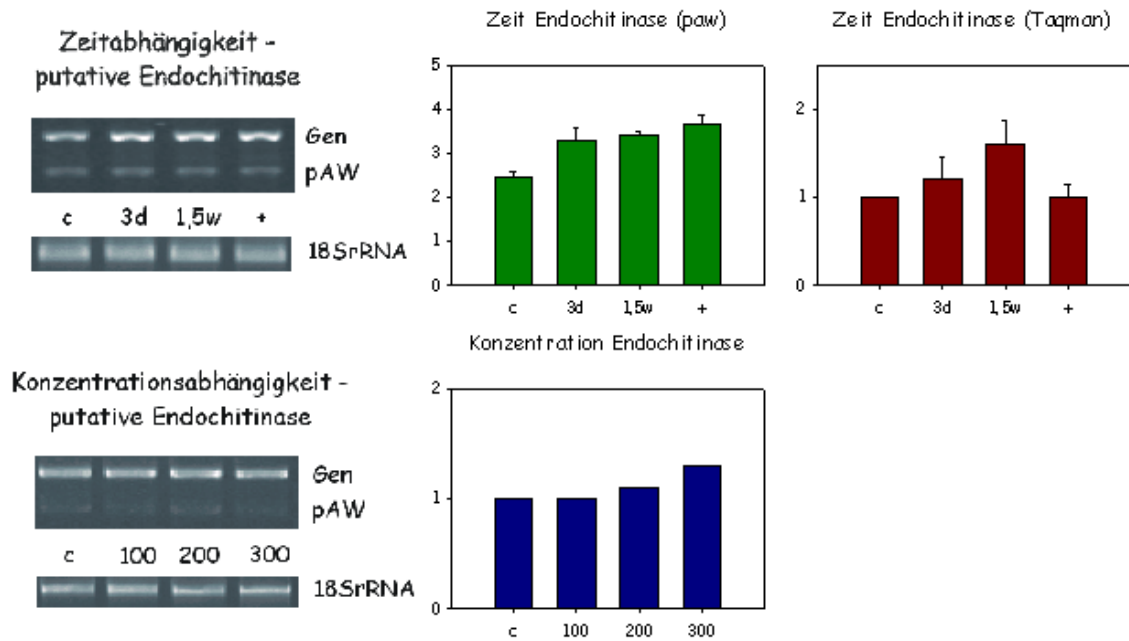
Das Gen des  **$\beta$ -1,3-Glucanase I Präcursor** (Abbildung 3-27) wird bei einer Vielzahl von biotischen und abiotischen Stressoren, z.B. bei Verwundung, aktiviert (Simmons, 1994). Es handelt sich um den Vorläufer einer Glycosyl-Hydrolase, welche die O-glycosidische Bindung zwischen Kohlen-Wasserstoffen spaltet.



**Abbildung 3-27** Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman):  $\beta$ -1,3-Glucanase I Präcursor (At4g16260)

C =  $0\mu\text{M}$   $^{133}\text{Cs}$  (Kontrolle); 3d =  $150\mu\text{M}$ , für 3 Tage; 1,5w =  $150\mu\text{M}$ , für 1,5 Wochen; + =  $150\mu\text{M}$ , für 4 Wochen; 100 =  $100\mu\text{M}$ , für 4 Wochen; 200 =  $200\mu\text{M}$ , für 4 Wochen; 300 =  $300\mu\text{M}$ , für 4 Wochen

Die  $\beta$ -1,3-Glucanase zählt zu der Gruppe der so genannten Pathogenesis-related (PR)- Proteine. PR-Proteine sind als Polypeptide definiert, die nach Pathogen-Befall oder verwandtem Stress synthetisiert werden, in der ungestressten Pflanze jedoch nicht oder nur in geringen Mengen vorliegen (Grimmig *et al.*, 2003). Sie alle besitzen direkte Wirkung gegen Befall von Schädlingen, indem sie die Zellwand der Eindringlinge schädigen oder zerstören. Weitere Proteine, die in diese Gruppe fallen, sind das **PR1-Protein** und die **putative Endochitinase** (Abbildung 3-28).

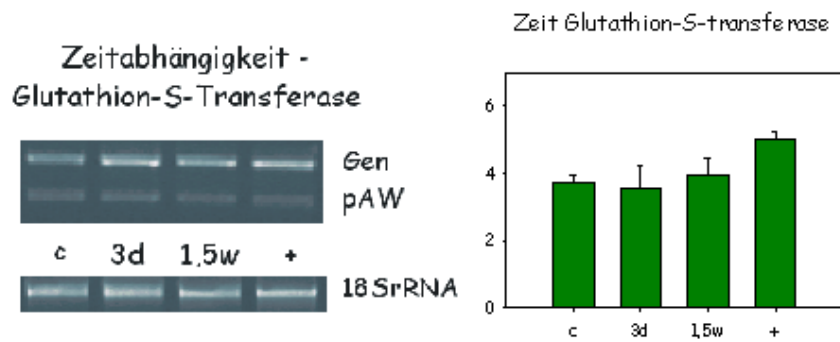


**Abbildung 3-28** Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): putative Endochitinase (At2g43570)

C = 0 $\mu$ M  $^{133}$ Cs (Kontrolle); 3d = 150 $\mu$ M, für 3 Tage; 1,5w = 150 $\mu$ M, für 1,5 Wochen; + = 150 $\mu$ M, für 4 Wochen; 100 = 100 $\mu$ M, für 4 Wochen; 200 = 200 $\mu$ M, für 4 Wochen; 300 = 300 $\mu$ M, für 4 Wochen

Die Strukturproteine verhindern das Eindringen von Pathogenen, indem sie die eigene Zellwand verstärken. Zu ihnen zählen die **Extensine**, hydroxyprolin-reiche Glycoproteine, die in der extrazellulären Matrix von Pflanzen auftreten (Yoshida *et al.*, 2001). Sie spielen außerdem eine Rolle bei dem Aufbau der Zellwand, der Zellstreckung, und sie erhöhen die Zugfestigkeit von Zellen. Eine ähnliche Funktion wird den **Glycin-** und **Prolin-reichen Proteinen** zugesprochen; ihre Aufgabe ist aber noch nicht geklärt. **Pectinesterasen** hydrolysieren Pectin zu Pectat und sind ebenfalls Bestandteil des Zellwand-Metabolismus von Pflanzen.

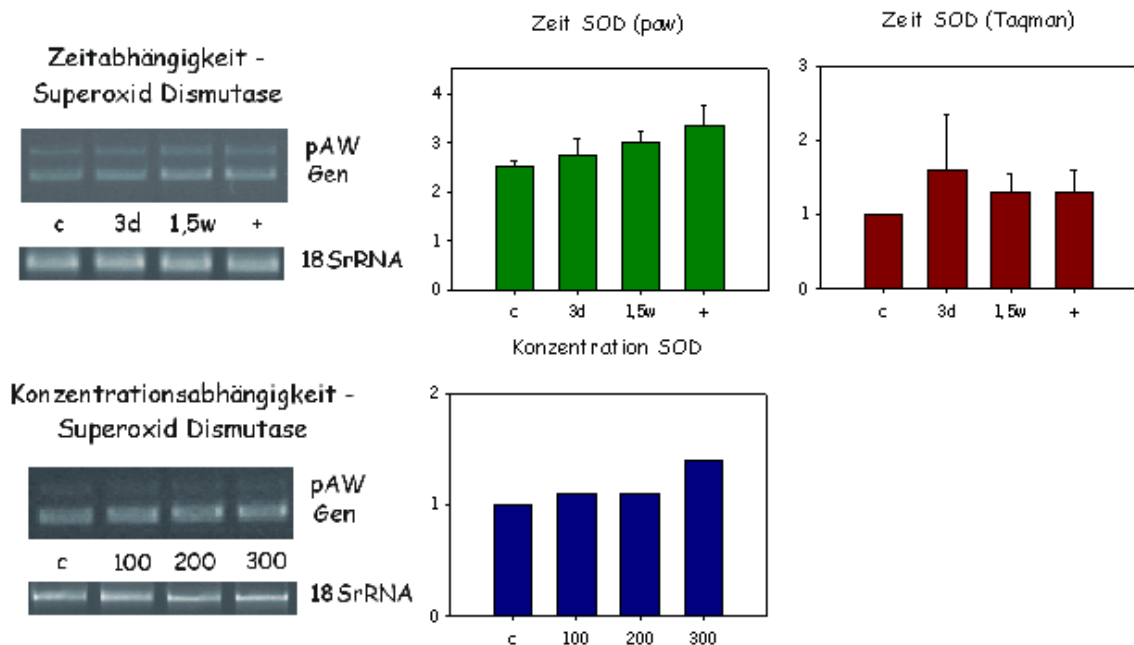
Weiter wurden verschiedene Isoenzyme der **Glutathion-S-Transferase (GST)** gefunden (Abbildung 3-29). Sie nehmen an der Detoxifikation teil, indem sie die Konjugation von reaktiven elektrophilen Molekülen mit Glutathion katalysieren (Eaton and Bammer, 1999). Die reagierenden Gruppen des Glutathion sind Sulfhydryl-Gruppen von Cysteinen, welche in der oxidierten Form als Cystin vorliegen. Dieses Redoxsystem ist ein zentraler Bestandteil des Schutzes der Zelle (vor allem der nucleophilen Zentren von Proteinen und Nucleinsäuren) vor reaktiven Sauerstoff und freien Radikalen. Neben dem antioxidativen Abwehrmechanismus wirken die Glutathion-S-Transferasen aber auch als Entgiftungsenzyme für organische Schadstoffen durch Bildung von schwefelsubstituierten Glutathion-Derivate. Auch beeinflussen die GSTs u.a. die Strukturbildung und Biosynthese von Proteinen und sind an Entwicklungs- und Alterungsprozessen beteiligt. Sie werden daher auch in Folge zahlreicher Stressoren, wie bei Ozon, Pathogene oder anderen oxidativ wirkenden Schadstoffen, verstärkt synthetisiert (McGonigle *et al.*, 2000).



**Abbildung 3-29** Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw: Glutathion-S-Transferase (At1g02920))

C = 0µM <sup>133</sup>Cs (Kontrolle); 3d = 150µM, für 3 Tage; 1,5w = 150µM, für 1,5 Wochen; + = 150µM, für 4 Wochen; 100 = 100µM, für 4 Wochen; 200 = 200µM, für 4 Wochen; 300 = 300µM, für 4 Wochen

Drei evolutionär unabhängig voneinander entstandene Superoxid-Dismutase-Familien sind bekannt, eine davon ist die **Kupfer/Zink-bindenden Superoxid-Dismutase (SOD)** (Abbildung 3-30). Es sind Metalloproteine, die Zellen und Gewebe vor Schäden durch reaktiven Sauerstoff und freie Radikale schützen: SODs katalysieren die Umwandlung von Superoxid in molekularen Sauerstoff und Wasserstoff-Peroxid (Kliebenstein *et al.*, 1998; Alscher *et al.*, 2002).



**Abbildung 3-30** Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): Superoxid Dismutase (AtAt1g08830)

C = 0µM <sup>133</sup>Cs (Kontrolle); 3d = 150µM, für 3 Tage; 1,5w = 150µM, für 1,5 Wochen; + = 150µM, für 4 Wochen; 100 = 100µM, für 4 Wochen; 200 = 200µM, für 4 Wochen; 300 = 300µM, für 4 Wochen

Sauerstoff-Radikale sind Nebenprodukte des oxidativen Stoffwechsels (Respiration, Oxidative Phosphorylierung, Photosynthese etc.), sie entstehen aber auch durch Umweltgifte (Schwermetalle,

Strahlung) oder werden aktiv in der Zelle gebildet zur Pathogenese oder bei Alterungsprozessen. Reaktiver Sauerstoff und freie Radikale können Nucleinsäuren und Proteine, aber auch die mehrfach ungesättigten Fettsäuren, z.B. der Phospholipide von Zellmembranen, angreifen.

Ebenfalls antioxidative Wirkung besitzen die **Peroxidasen**. Sie nutzen Wasserstoff-Peroxid als Elektronenakzeptor zur Katalyse einer Vielzahl von oxidativen Reaktionen, wobei Wasser entsteht und das Eisen der Hämgruppe des Enzyms in seinen oxidierten Zustand übergeht.

**Cytochrom P450 Monooxygenasen** schließlich sind zwar in Pflanzen bisher relativ wenig untersucht worden, sie sind aber an zahlreichen Elektronentransfer-Ketten des Primär- und Sekundärstoffwechsels beteiligt und katalysieren induzierbare Abwehrreaktionen u.a. im Stoffwechsel von Umweltchemikalien oder bei der Synthese von antimikrobiellen Phytoalexinen (Zhou *et al.*, 1999; Akashi *et al.*, 1999).

## 9. Unbekannte und hypothetische Proteine

In der letzten Gruppe sind diejenigen Proteine zusammengefasst, die bisher noch nicht eindeutig definiert und klassifiziert werden konnten. Falls möglich wird in der folgenden Aufzählung auf bekannte Motive oder Domänen innerhalb der Sequenz hingewiesen.

### *Induzierte Gene:*

Feebly-protein (At3g01420) – Häm peroxidase Motiv  
phi1-like Protein (At5g64260) – Konservierte Region Phosphat-induzierter Proteine  
putatives Protein (At1g54320) – LEM3 Familie/ CDC50 Familie (Transmembranproteine)  
putatives Protein (At5g27710) – Arginase-Familie Signaturen  
unknown Protein (At1g03220)  
unknown Protein (At1g10140)  
unknown Protein (At1g26250) – extensin-like Region  
unknown Protein (At2g05260) – ATP/GTP-bindendes Motiv, Lipase-BLOCK  
unknown Protein (At3g13460) – YT521-B-like Familie (alternatives splicen)  
unknown Protein (At5g41520) – Plectin/S10 domain (RNA-Bindung)  
unknown protein (At5g45350)

### *Reprimierte Gene:*

unknown Protein (At3g15450) – GATase Domäne (Asparagin-Biosynthese)

#### **3.4.2 Induktion/Repression durch ionisierende Strahlung (Cs-134)**

Analog zu den vorangegangenen Versuchen mit Cäsium-133 wurden auch hier drei verschiedene subtraktive cDNA-Banken erstellt. Zwei SSHs wurden aus je fünf unabhängigen Arabidopsis-Anzuchten hergestellt, eine dritte subtraktive cDNA-Bank wurde aus den vereinigten mRNA-Pools der beiden anderen gebildet. Die cDNA-Synthese wurde unabhängig voneinander durchgeführt. Ein Teil der Pflanzen wurde mit Cäsium-134 (Aktivität 30Bq/cm<sup>3</sup>) behandelt, die Kontrolle wurde auf identischem Medium ohne Cäsium-Zugabe angezogen.

Mögliche tageszeitliche Schwankungen im Expressionsmuster der Gene wurden vermindert, indem die Versuchs- und Kontroll-Pflanzen gleichzeitig geerntet wurden. Die unabhängigen Kultivate wurden vereinigt und die RNA aus den Wurzeln isoliert. Anschließend wurde die SSH (vgl. Kapitel 2.12) durchgeführt, wobei die Kontrolle und die behandelten Pflanzen wechselweise als Driver oder Tester eingesetzt wurden. Aus den Array-Hybridisierungen und der anschließenden Sequenzierung ergaben sich 46 verschiedene, differentiell exprimierte Gene. Einige dieser Gene wurden durch semiquantitative PCR und der RT-PCR überprüft (Abbildung 3-31; rot unterlegt).

In der folgenden Abbildung sind alle aus den Radiocäsium-Experimenten identifizierten Gene aufgeführt:

sshradio (30Bq/cm<sup>3</sup>)

induziert	reprimiert
3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (At1g76490)	putative protein (At5g15120)
60S ribosomal protein L37A like (At3g60245)	putative oligouridylate binding protein (At3g14100)
60S ribosomal protein L38-like protein (At3g59540)	glutamate dehydrogenase GDH2 (At5g07440)
alpha-ketoacid-dehydrogenase E1 alpha subunit (At1g21400)	xylose isomerase (At5g57655)
bax-inhibitor-1 like (At5g47120)	unknown protein (At5g58375)
catalase 3; unknown (At1g20620)	
cell cycle control crn-like protein (At5g41770)	
DNA excision repair protein (At5g21900)	
extensin-like protein (At5g46890)	
low temp. and salt response protein (At4g30650)	
mitosis-specific cyclin 1b (At5g06150)	
phi1-like protein (At5g64260) - phosphate-induced protein 1 conserved region	
profilin 2 (At4g29350)	
putative actin depolymeration factor (At4g00680)	
putative aminoacid transporter protein (At4g38250)	
putative auxin-regulated protein (At2g33830)	
putative glycin-rich protein (At2g05510)	
putative major latex protein (At4g23670)	
putative protein (At1g50300) - RNA recognition motif	
putative protein (At1g65980) - AhpC/TSA family	
putative protein (At3g48530) - CBS domain	
putative ubiquinol-cytochrome c reductase (At3g10860)	
putative ubiquitin conjugated enzym E2 (At2g33770)	
ribosomal protein GL41-like (At3g56020)	
similar to O-succinylhomoserine sulfhydrylase (At1g64660)	
stress inducible kin2/kin1 protein (At5g15970/60)	
thioredoxin (At5g42980)	
tubulin alpha-5 chain (At5g19780)	
unknown protein (At1g19015)	
unknown protein (At1g19530)	
unknown protein (At1g54410) - dehydrin domain	
unknown protein (At1g76200)	
unknown protein (At2g23090)	
unknown protein (At2g26280) - mismatch repair Smr domain	
unknown protein (At3g15580) - Microtubule associated protein domain	
unknown protein (At3g53990) - universal stress protein signature	
unknown protein (At4g14010)	
unknown protein (At4g22310)	
unknown protein (At5g02810) - transcriptional regulatory protein domain	
unknown protein (At5g48180) - kelch motif	
unknown protein (At5g66052)	

**Abbildung 3- 31** Alphabetische Liste differentiell exprimierter Gene nach Radiocäsium-Behandlung (rot markierte Klone wurden durch RT-PCR verifiziert)

Die cDNA für die Verifikation wurde aus – von den SSH-Experimenten – unabhängig gewachsenen Pflanzen gewonnen. Dabei wurden eine dosisabhängige Kinetik der Genexpression und soweit möglich Synergieeffekte von Cäsium-Stress und ionisierender Strahlung untersucht (auf diese vergleichenden Versuche wird im Kapitel 3.4.5 näher eingegangen):

<b>Radiocäsium-Kinetik</b>	
C	= 0Bq/cm <sup>3</sup> <sup>134</sup> Cs (Kontrolle)
R1	= 10Bq/cm <sup>3</sup>
R2	= 20Bq/cm <sup>3</sup>
R3	= 60Bq/cm <sup>3</sup>
R2+	= 20Bq/cm <sup>3</sup> <sup>134</sup> Cs + 100µM <sup>133</sup> Cs

## 1. Metabolismus

Die **Hydroxymethylglutaryl-CoenzymA-Reductase** (HMG-CoA-Reductase) katalysiert die NADP-abhängige Synthese von Mevalonat, einem wichtigen Vorläufer zahlreicher Isopren-Verbindungen (z.B. in der Sterol-Biosynthese) der Pflanzen.

Die **O-Succinylhomoserin-Sulphydrylase** ist zwar in Pflanzen noch nicht näher beschrieben worden, aller Wahrscheinlichkeit nach spielt sie jedoch eine Rolle im Metabolismus von Cystein, Homocystein und Methionin.

Auch die **alpha-Ketosäure-Dehydrogenase**, ein Multienzym-Komplex aus drei katalytischen Komponenten, ist Teil des Aminosäure-Stoffwechsels. Dieser katalysiert die oxidative Decarboxylierung von alpha-Ketosäuren (v.a. Aminosäuren mit verzweigten Resten wie Leucin, Isoleucin und Valin) unter Bildung von Acyl-CoA.

Durch Radiocäsium wurden zwei Gene reprimiert, die für eine **Glutamat-Dehydrogenase** bzw. **Xylose-Isomerase** kodierten. Bei der Glutamat-Dehydrogenase handelt sich um ein Enzym, welches reversibel die NADPH/H<sup>+</sup>-abhängige Aminierung von alpha-Ketoglutarat zu Glutamat katalysiert. Sie ist ein wichtiger Bestandteil des Stickstoff-Haushaltes der Pflanze und ein Schlüsselenzym für die Synthese der Aminosäuren der Glutamat-Familie.

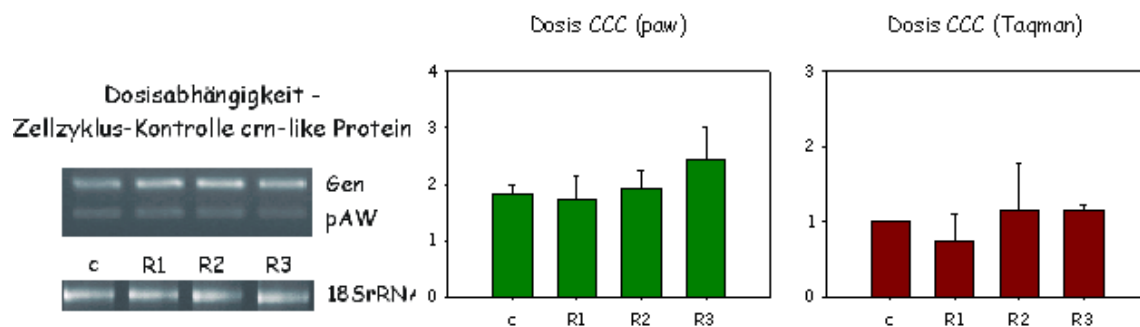
Die Xylose-Isomerase ist ein Teil des Kohlenhydrat-Stoffwechsels. Sie unterstützt die gegenseitige Umwandlung von D-Xylose in D-Xylulose; auch die Isomerisierung von D-Ribose in D-Ribulose und D-Glucose in D-Fructose werden von dem Enzym katalysiert.

## 2. Energie

Das **putative Ubiquinol-Cytochrom C Reductase-komplex ubiquinone-bindende Protein (QP-C)** ist eine Komponente des Ubiquinol-Cytochrom c-Reduktase-Komplexes, einem Teil der mitochondrialen Atmungskette.

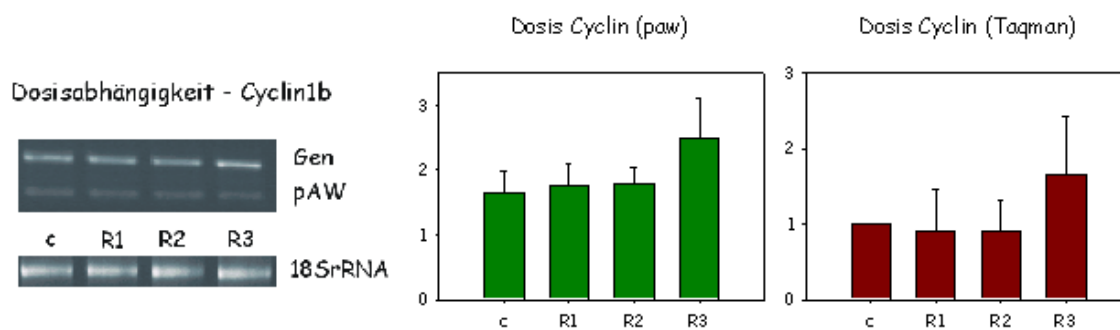
### 3. Zellwachstum, Zellteilung und Entwicklung der Pflanze

Ein Gen für ein **Zellzyklus-kontrollierendes (crn-like) Protein** (Abbildung 3-32) wird durch Radio-<sup>134</sup>Cäsium genauso induziert wie das Gen für das **Mitose-spezifische CyclinB1** (Abbildung 3-33). Die Funktion crn-like Proteine ist in *Arabidopsis* noch nicht bekannt; in anderen Eukaryonten sind diese Proteine an der Regulation der Mitose und an der RNA-Prozessierung beteiligt (Preker and Keller, 1998).



**Abbildung 3- 32** Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): Zellzyklus-Kontrolle crn-like Protein (At5g41770)

C = 0Bq/cm<sup>3</sup> <sup>134</sup>Cs (Kontrolle); R1 = 10Bq/cm<sup>3</sup>; R2 = 20Bq/cm<sup>3</sup>; R3 = 60Bq/cm<sup>3</sup>



**Abbildung 3- 33** Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): Mitose-spezifisches CyclinB1 (At5g09150)

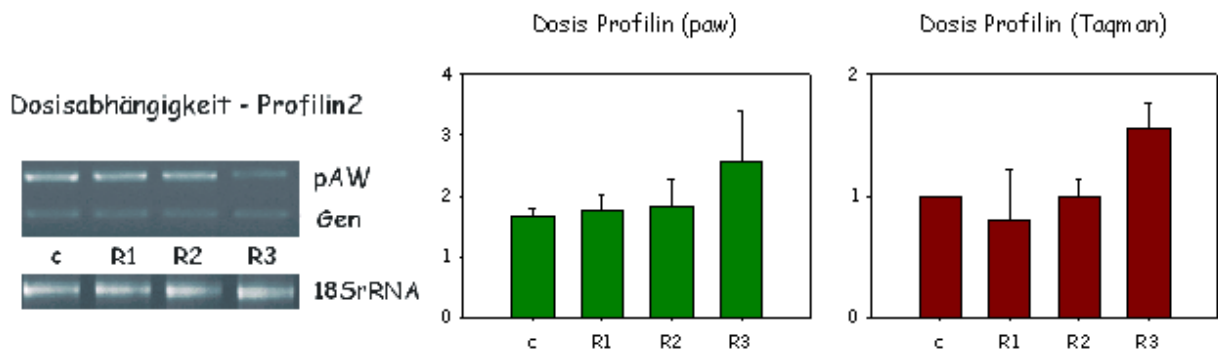
C = 0Bq/cm<sup>3</sup> <sup>134</sup>Cs (Kontrolle); R1 = 10Bq/cm<sup>3</sup>; R2 = 20Bq/cm<sup>3</sup>; R3 = 60Bq/cm<sup>3</sup>

Cycline sind zusammen mit Cyclin-abhängigen Proteinkinasen essentiell für den Ablauf des Zellteilungszyklus (Weingartner *et al.*, 2003). Nur nach Inaktivierung durch Ubiquitin-vermittelter Degradation (Ubiquitin/Proteasom-System) kann die Zelle die Mitose abschließen und in die G1-Phase eintreten; nach Beginn der G2-phase werden die Cycline erneut gebildet.

**Profiline** (Abbildung 3-34) sind im Cytoplasma und Zellkern lokalisiert und dienen in der Zelle als regulatorische Proteine der Aktinmodulation (Christensen *et al.*, 1996). Sie binden an das monomere G-Actin und verhindern dadurch die Polymerisation zum Actinfilament (F-actin). Profilin steht damit



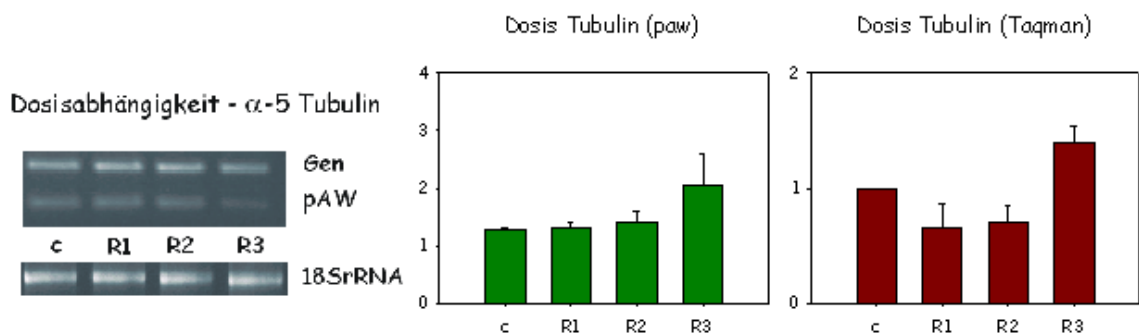
in Zusammenhang mit dem **putativen Actin-depolymerisierenden Faktor**, der ebenfalls die Actin-zusammenlagerung hemmt (Galkin *et al.*, 2001). Es ist auch bekannt, dass zelluläre Stressbelastungen wie Hitzeschock oder andere Stimuli eine Überexpression dieser Gene bewirken können (Morellie, 1998).



**Abbildung 3-34** Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): Profilin 2 (At4g29350)

C = 0Bq/cm<sup>3</sup> <sup>134</sup>Cs (Kontrolle); R1 = 10Bq/cm<sup>3</sup>; R2 = 20Bq/cm<sup>3</sup>; R3 = 60Bq/cm<sup>3</sup>

Das Gen für  $\alpha$ -5 **Tubulin** (Abbildung 3-35) wurde ebenfalls bei Anwesenheit des radioaktiven Cäsiums-134 verstärkt transkribiert. Während Actin vor allem für die Strukturbildung und Bewegungen (Cytoplasmaströmungen) innerhalb der pflanzlichen Zelle wichtig ist, sind die Microtubuli zusammen mit tubulin-assoziierten Proteinen an der strukturellen Stabilisierung, an der intrazellulären Translokation von Cytoplasma-Bestandteile und an der Zellteilung beteiligt.



**Abbildung 3-35** Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): Tubulin alpha-5 Untereinheit (At5g19780)

C = 0Bq/cm<sup>3</sup> <sup>134</sup>Cs (Kontrolle); R1 = 10Bq/cm<sup>3</sup>; R2 = 20Bq/cm<sup>3</sup>; R3 = 60Bq/cm<sup>3</sup>

#### 4. Kontrolle der Transkription und Translation

Es konnten drei ribosomale Proteine identifiziert werden: **L37-like, L38-like Proteine** und **GL41-like Protein** – Bestandteile der Ribosomen-Biogenese und damit der Protein-Synthese. Die zugehörigen Gene werden durch Radiocäsium induziert.

Reprimiert wurde hingegen ein Gen für ein **putatives Oligouridylat-bindendes Protein**, Mitglied einer Gruppe von nicht näher klassifizierten RNA-bindende Proteinen. In Eukaryonten werden sie in Zusammenhang mit der Regulation der Translation und dem alternativen Splicen gebracht.

#### 5. Proteinsynthese, Proteinfaltung und Modifikation

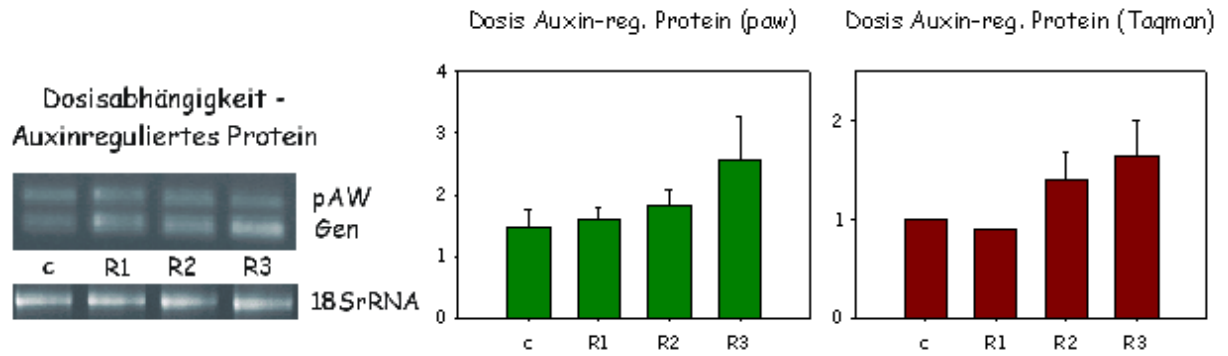
**Ubiquitin-konjugierende Enzyme** katalysieren die kovalente Bindung von Ubiquitin an den Cystein- oder Lysin-Rest eines Zielproteins; die so markierten Proteine werden durch das Ubiquitin/Proteasom-System erkannt und anschließend abgebaut. Die Funktionen sind vielfältig und reichen vom Abbau fehlerhafter Proteine bis zur Kontrolle von Stoffwechselwegen oder der Regulation des Zellzyklus (vgl. oben **Cyclin**). Das Ubiquitin-System besitzt wohl außerdem eine zentrale Bedeutung bei der Reparatur von DNA-Schäden, indem es beteiligte Enzyme modifiziert (Ubiquitinierung) und dadurch ihre Aktivität beeinflusst (Pickart, 2002).

#### 6. Transport und Homöostase

Auch hier konnte nur ein induziertes Gen identifiziert werden, welches für ein **putatives Aminosäure-Transporter Protein** kodiert. Es handelt sich hierbei um integrale Membranproteine mit bis zu 12 Transmembran-Domänen, die für den Transport von Aminosäuren in die Zelle verantwortlich sind.

#### 7. Zelluläre Kommunikation und Signaltransduktion

Proteine, die in Zusammenhang mit zellulärer Kommunikation und Signaltransduktion stehen, konnten mit dem **bax-inhibitor-1 like Protein** und einem **putativen Auxin-regulierten Protein** (Abbildung 3-36) identifiziert werden.



**Abbildung 3-36** Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): putatives Auxin-reguliertes Protein (At2g33830)

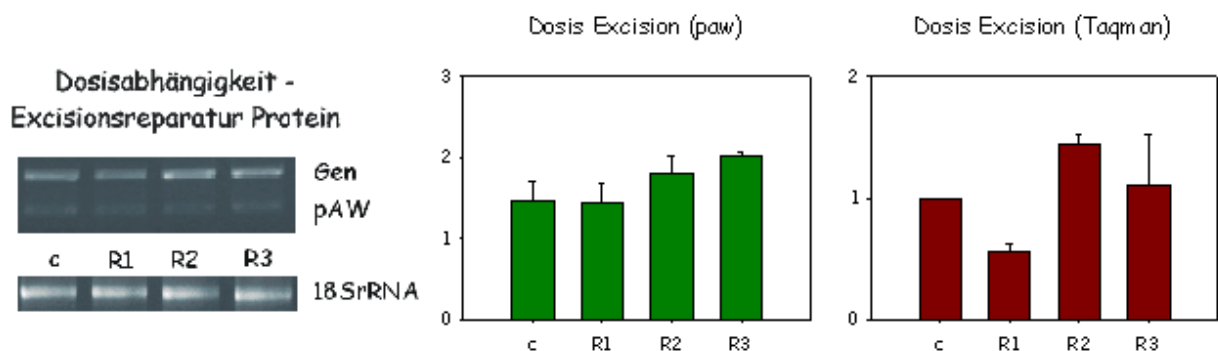
C = 0Bq/cm<sup>3</sup> <sup>134</sup>Cs (Kontrolle); R1 = 10Bq/cm<sup>3</sup>; R2 = 20Bq/cm<sup>3</sup>; R3 = 60Bq/cm<sup>3</sup>

Die Funktion in Pflanzen ist bei beiden noch ungeklärt. Während das erste bei Eukaryonten in den programmierten Zelltod durch Suppression des Bax-Apoptosis-Regulator eingreift (Xhu and Reed, 1998), besitzt das zweite wohl Protein-Kinase Aktivität.

## 8. Zellabwehr, Stressantwort und Detoxifikation

Analog zu den Cäsium-Experimenten sind auch nach Radiocäsium-Applikation ausschließlich induzierte Gene dieser Gruppe zuzuordnen.

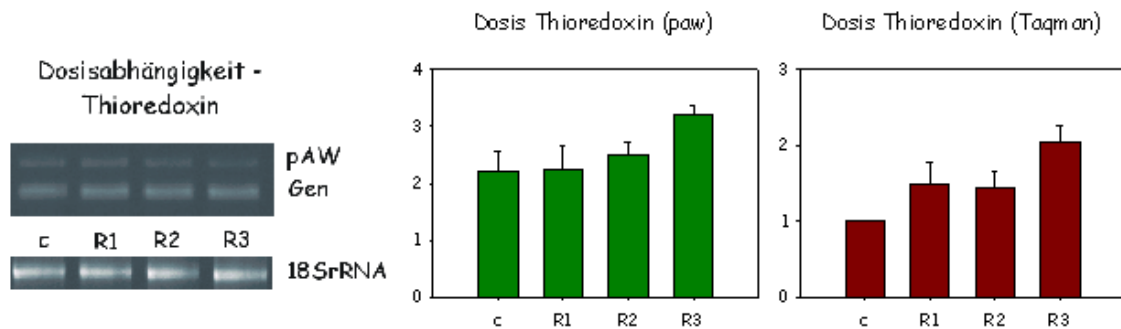
An der Beseitigung von Schäden des Erbgutes (z.B. Einzelstrangbrüchen) ist das **DNA-Excisions-Reparatur Protein** (Abbildung 3-37) beteiligt. Der Mechanismus beruht darauf, dass der beschädigte DNA-Abschnitt erkannt, ausgeschnitten und ersetzt wird.



**Abbildung 3-37** Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): DNA-Excisions-Reparatur Protein (At5g46890)

C = 0Bq/cm<sup>3</sup> <sup>134</sup>Cs (Kontrolle); R1 = 10Bq/cm<sup>3</sup>; R2 = 20Bq/cm<sup>3</sup>; R3 = 60Bq/cm<sup>3</sup>

**Thioredoxin** (Abbildung 3-38) ist eines der wichtigsten Regulationsmoleküle für Redoxvorgänge, da es mit einer breiten Masse an Proteinen interagieren kann (Holmgren, 1985).



**Abbildung 3-38** Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw) und quantitativer RT-PCR (Taqman): Thioredoxin (At5g42980)

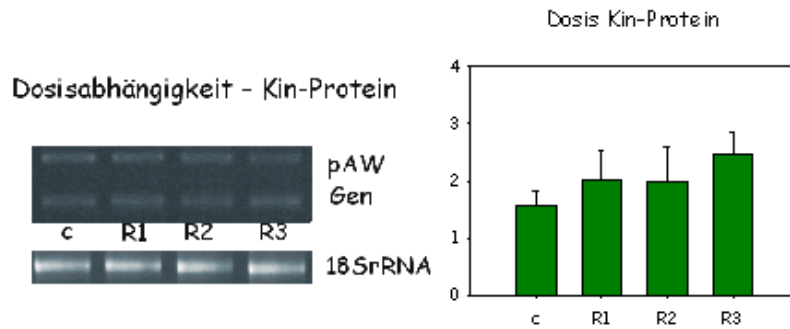
C = 0Bq/cm<sup>3</sup> <sup>134</sup>Cs (Kontrolle); R1 = 10Bq/cm<sup>3</sup>; R2 = 20Bq/cm<sup>3</sup>; R3 = 60Bq/cm<sup>3</sup>

Der Mechanismus basiert auf einer reversiblen Oxidation der Schwefel-Gruppen zweier Cystein-Reste zu einem Disulfid. Unter anderem besitzt das Thioredoxin-System in Chloroplasten eine Schlüsselstellung bei der Regulation der Lichtreaktion und des Calvin-Zyklus. Es ist an der Bildung der Desoxyribonucleotide beteiligt und reduziert verschiedene Inhibitoren von Enzymen, die an der Mobilisierung von Kohlenstoff mitwirken, wie z.B. den  $\alpha$ -Amylase-Inhibitor oder Trypsin-Inhibitor. Zudem hat es großen Anteil an der Aufrechterhaltung der Redox-Homöostase und schützt die Zelle vor oxidativem Stress.

In diesem Zusammenhang ist auch die **Katalase** zu nennen: Sie katalysiert die Umwandlung von Wasserstoff-Peroxid zu Wasser und molekularem Sauerstoff und bewahrt so die Zellen vor den toxischen Effekten des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Zellwand-verstärkende Eigenschaften besitzen die **Extensin-like Proteine** und wohl auch die **Glycinreichen Proteine**, die auch schon bei Behandlung mit Cäsium-133 verstärkt gebildet wurden.

Das so genannte **putative major-latex Protein** spielt eine Rolle bei der Stress-Antwort und der Zellabwehr. Eine genaue Klassifizierung ist noch nicht möglich. Gleiches gilt auch für das durch Kälte- und Salz-Stress induzierte (**low temperature and salt response**) **Protein-Homolog** und das **kin**-Protein (Abbildung 3-39) (Gong *et al.*, 2001; Xiong *et al.*, 2002).



**Abbildung 3- 39 Verifikation der SSH-Gene mit semiquantitativer PCR (paw):** Stress-induziertes kin1/kin2- Protein (At5g15970/60)

C = 0Bq/cm<sup>3</sup> <sup>134</sup>Cs (Kontrolle); R1 = 10Bq/cm<sup>3</sup>; R2 = 20Bq/cm<sup>3</sup>; R3 = 60Bq/cm<sup>3</sup>

## 9. Unbekannte und hypothetische Proteine

### *Induzierte Gene:*

phi1-like Protein (At5g64260) – Konservierte Region Phosphat-induzierter Proteine

putatives Protein (At1g50300) – RNA-erkennendes Motiv

putatives Protein (At1g65980) – AhpC/TSA-Familie (Peroxid-Reductasen)

putatives Protein (At3g48530) – CBS-Domäne

unknown Protein (At1g19015)

unknown Protein (At1g19530)

unknown Protein (At1g54410) – Dehydrin-Domäne

unknown Protein (At1g76200)

unknown Protein (At2g23090)

unknown Protein (At2g26280) – Mismatch Reparatur Smr Domäne

unknown Protein (At3g15580) – Microtubuli-assoziierte Protein-Domäne

unknown Protein (At3g53990) – universal stress Protein Signatur

unknown Protein (At4g14010)

unknown Protein (At4g22310)

unknown Protein (At5g02810) – Transkription-regulierende Protein-Domäne

unknown Protein (At5g48180) – Kelch-Motiv (Cytoskelett; Actin-bindend)

unknown Protein (At5g66052)

### *Reprimierte Gene:*

putatives Protein (At5g15120)

unknown Protein (At5g58375)

### 3.4.3 SSH-Vergleich von Wildtyp und *csi52*-Transportermutante

Um das Genexpressionsmuster von *Arabidopsis thaliana* Col-0 WT und der *csi52*-Mutante unter Cäsium-133-Stress (150µM) analysieren zu können, wurde eine weitere SSH-Bank erstellt. Der Ablauf ist analog zu den vorherigen Experimenten. Es wurden erneut Pflanzen in fünf unabhängigen Kulturen auf Flüssigmedium angezogen, die Wurzeln geerntet und vor der RNA-Isolierung vereinigt. Im Gegensatz zu den vorherigen Experimenten konnte nur eine sehr geringe Anzahl unterschiedlicher Gene identifiziert werden.

Die wenigen gefundenen Gene sind auch schon bei den anderen subtraktiven cDNA-Banken aufgetreten. Aus diesem Grund wird auf eine Erläuterung der Funktion der zugehörigen Proteine nicht näher eingegangen. Eine vergleichende Untersuchung durch RT-PCR wurde nur für verschiedene Kalium-Transporter durchgeführt (siehe Kapitel 3.4.6).

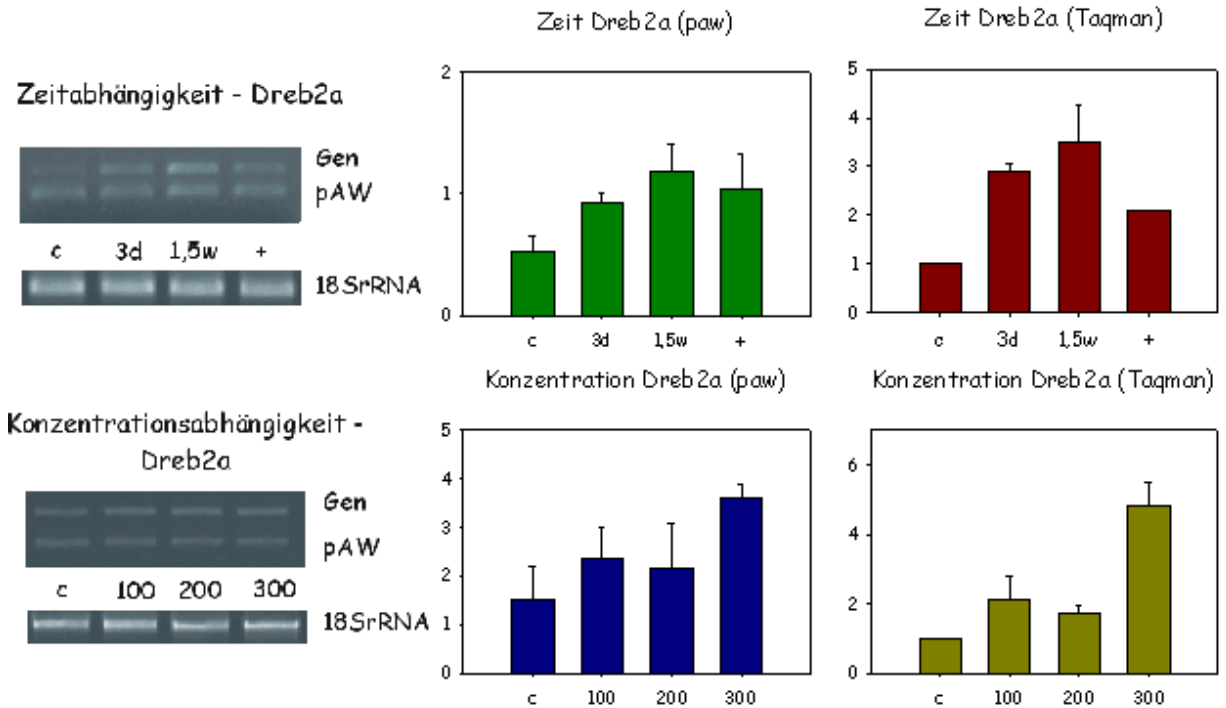
#### Vergleich WT und *csi52*-Mutante

<b>csi induziert</b>	<b>WT induziert</b>
feebly-like protein (At3g01420)	putative protein (At5g32420)
hypothetical protein (At1g26250) - extensin-like domain	
pathogenesis-related protein 1 precursor (At4g33720)	
putative extensin (At2g43150)	
putative protein (At5g15120)	
translation elongation factor eEF-1 alpha (At5g60390)	
unknown protein (At3g15450) - GA Tase domain (asparagine synthase)	

### 3.4.4 Ergänzende Analyse ausgewählter Gene mittels RT-PCR

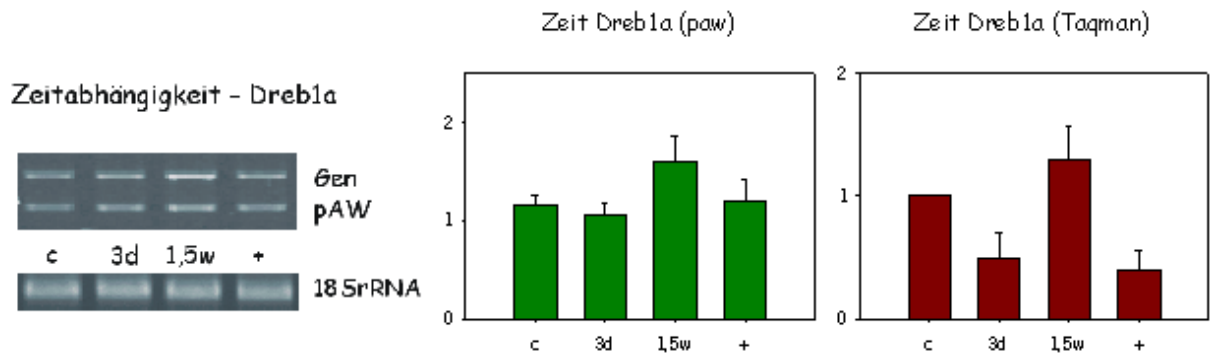
Um das Bild, das durch die Ergebnisse der SSHs entstanden ist, weiter zu präzisieren, wurden ein paar zusätzliche Primerpaare für bisher noch nicht identifizierte Gene synthetisiert.

**Dreb1a** (At4g25481) und **Dreb2a** (At5g05410) sind Transkriptionsfaktoren (Liu *et al.*, 1998). Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Antwort auf Trocken-, Salz- und Kältestress, da sie eine Vielzahl von Genen (wie z.B. *kin1*) induzieren, die in Zusammenhang mit erhöhter Stresstoleranz der Pflanze stehen.



**Abbildung 3- 40 RT-PCR Transkriptionsfaktor Dreb2a (At5g054190)**

C = 0 $\mu$ M <sup>133</sup>Cs (Kontrolle); 3d = 150 $\mu$ M, für 3 Tage; 1,5w = 150 $\mu$ M, für 1,5 Wochen; + = 150 $\mu$ M, für 4 Wochen; 100 = 100 $\mu$ M, für 4 Wochen; 200 = 200 $\mu$ M, für 4 Wochen; 300 = 300 $\mu$ M, für 4 Wochen

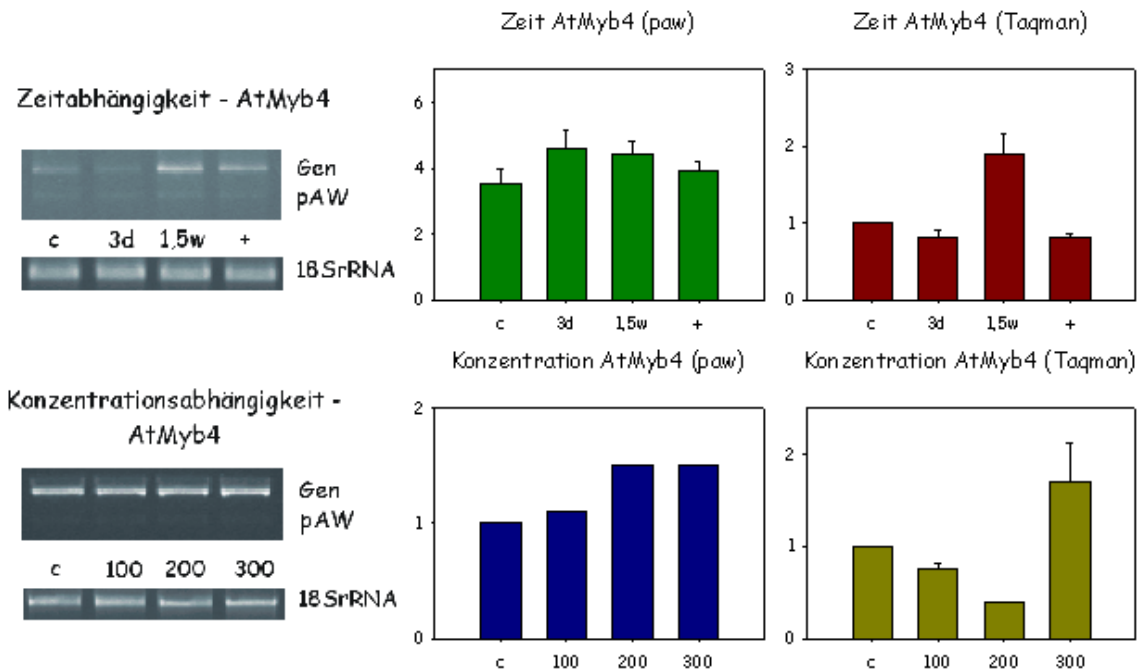


**Abbildung 3- 41 RT-PCR Transkriptionsfaktor Dreb1a (At4g25481)**

C = 0 $\mu$ M <sup>133</sup>Cs (Kontrolle); 3d = 150 $\mu$ M, für 3 Tage; 1,5w = 150 $\mu$ M, für 1,5 Wochen; + = 150 $\mu$ M, für 4 Wochen; 100 = 100 $\mu$ M, für 4 Wochen; 200 = 200 $\mu$ M, für 4 Wochen; 300 = 300 $\mu$ M, für 4 Wochen

Während das Gen für Dreb1a nur eine äußerst schwache Induktion - und auch nur nach 1,5 Wochen - zeigte, wurde das Gen des Dreb2a von Beginn an deutlich stärker transkribiert; die Induktion nahm mit steigender Cäsium-Konzentration im Medium zu.

**AtMyb4** (Abbildung 3-41) ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor, der die Synthese von Flavanoiden, Stilben und Cinnapinsäuren in der Zelle reprimiert (Jin *et al.*, 2000). Unter anderem konnte bereits der Einfluss dieses TF auf die Cumaryl-CoA-Ligase und die Cinnamt-4-Hydroxylase nachgewiesen werden.



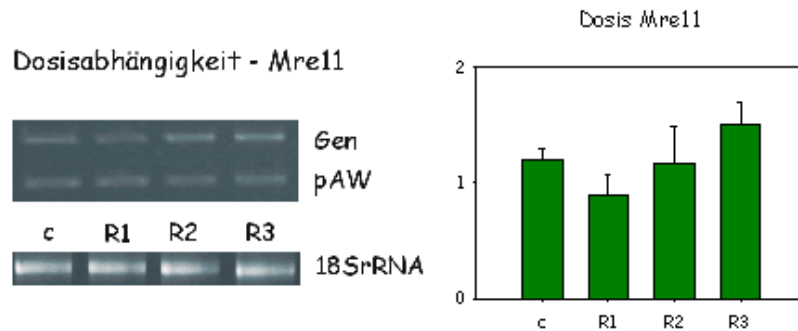
**Abbildung 3- 42 RT-PCR Transkriptionsfaktor AtMyb4 (At5g26660)**

C = 0 $\mu$ M <sup>133</sup>Cs (Kontrolle); 3d = 150 $\mu$ M, für 3 Tage; 1,5w = 150 $\mu$ M, für 1,5 Wochen; + = 150 $\mu$ M, für 4 Wochen; 100 = 100 $\mu$ M, für 4 Wochen; 200 = 200 $\mu$ M, für 4 Wochen; 300 = 300 $\mu$ M, für 4 Wochen

Auch dieser Transkriptionsfaktor zeigte eine deutliche Geninduktion (Abbildung 3-42); zudem zeigte sich eine Abhängigkeit zu steigenden Cäsium-133 Konzentrationen. Die Werte zwischen der semi-quantitativen PCR und der RT-PCR sind dabei jedoch nicht eindeutig.

In den Radiocäsiumexperimenten wurde noch ein weiteres Reparaturenzym Enzym untersucht. **Mre11** (Abbildung 3-43) ist zusammen mit Rad50 Teil eines Rekombinations-Systems in der Zelle und hat insbesondere bei der Erkennung und Reparatur von Strahlenschäden eine zentraler Bedeutung (Gherbi *et al.*, 2001).





**Abbildung 3- 43 RT-PCR DNA-Reparatur und Meiose Protein Mre11 (At5g54260)**

C = 0Bq/cm<sup>3</sup> <sup>134</sup>Cs (Kontrolle); R1 = 10Bq/cm<sup>3</sup>; R2 = 20Bq/cm<sup>3</sup>; R3 = 60Bq/cm<sup>3</sup>

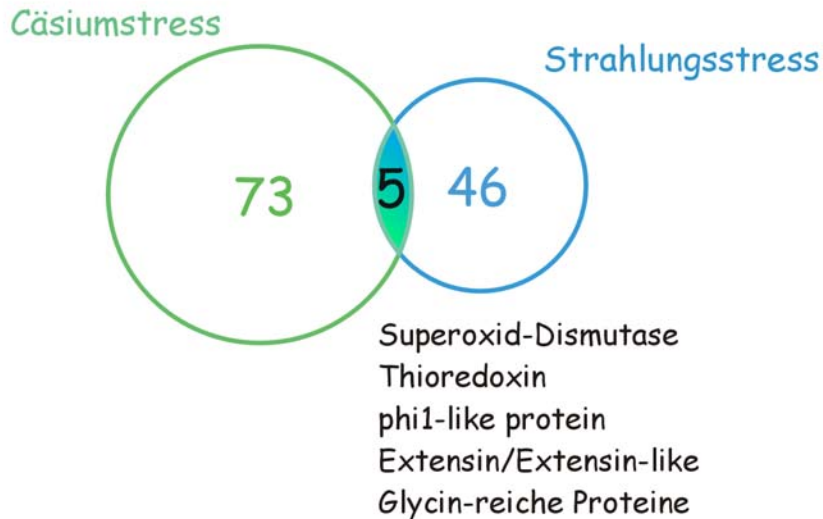
Ähnlich wie das Protein der Excisions-Reparatur (Abb. 3-37) wird das Gen der Mre11 wohl erst bei Aktivitäten über 20Bq/cm<sup>3</sup> induziert. Aufgrund der geringen RNA-Ausbeuten konnte hier keine ergänzenden Taqman-Daten evaluiert werden.

Noch weitere Gene, wie Extensin, sos2, sos3 oder rad50, wurden untersucht. Die Experimente konnten aber nicht weiter berücksichtigt werden, da keine funktionierenden Primer synthetisiert werden konnten, oder die PCR keine signifikanten Ergebnisse ergab.

### 3.4.5 Vergleich von Cäsium-133 und Radiocäsium-Experimenten

Anhand einiger ausgewählter Gene wurde versucht, die Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede der Reaktion der Pflanze auf Cäsium-133 Stress und nach Applikation von Radiocäsium vergleichend darzustellen. Wegen der Schwierigkeiten bei der Durchführung der Radioexperimente (v.a bei der Pflanzenanzucht) konnte jedoch kein umfassendes Bild erstellt werden.

Bereits anhand der subtraktiven cDNA-Banken konnte man feststellen, dass Unterschiede im Expressionmuster der Pflanze aufgrund der verschiedenen Stressoren vorherrschten. Um dies weiter zu untermauern, wurden die Membranen der Radiocäsium-SSH mit den Produkten der Cäsium-SSH hybridisiert und umgekehrt. Nur wenige Gene konnten eindeutig als gemeinsam induziert bzw. reprimiert identifiziert werden:

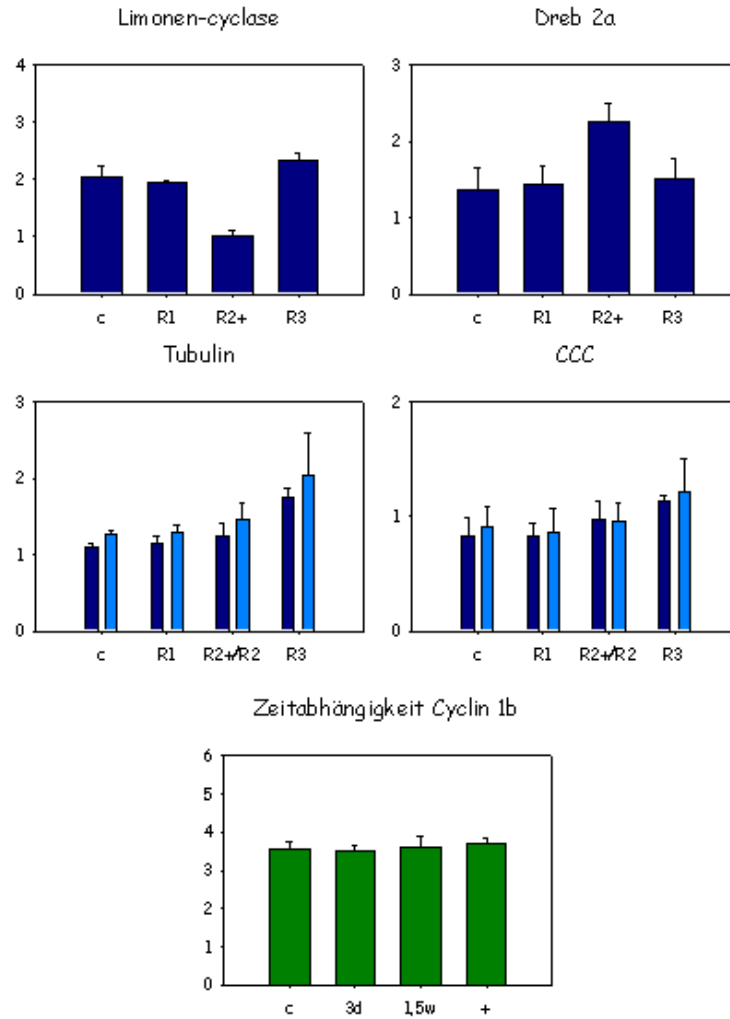


**Abbildung 3- 44 VENN-Diagramm: Vergleich der Stressoren Cäsium-133 und Radiocäsium (Cs-134)**

Dieses Bild wurde mit semiquantitativer PCR und durch quantitative RT-PCR soweit als möglich überprüft. Wie bereits in Kapitel 3.4.2 erwähnt, wurden – neben den reinen Radiocäsium-Versuchen – auch Pflanzen auf einem Medium angezogen, welches Cäsium-134 und Cäsium-133 enthielt. Die daraus erhaltene RNA diente als Ausgangsprodukt für die vergleichende RT-PCR.

<b>Vergleich Cs-133 und Cs-134</b>	
C	= 0Bq/cm <sup>3</sup> <sup>134</sup> Cs (Kontrolle)
R2	= 20Bq/cm <sup>3</sup>
R2+	= 20Bq/cm <sup>3</sup> <sup>134</sup> Cs + 100µM <sup>133</sup> Cs
+	= 150µM <sup>133</sup> Cs

Beispiele für Gen-Transkripte, die ausschließlich entweder durch Cäsium-133 oder Radiocäsium signifikant beeinflusst wurden, sind in Abbildung 3-45 dargestellt.



**Abbildung 3- 45 Beispiele einiger Gene, die entweder durch Cäsium-133 oder durch Radiocäsium induziert bzw. repimiert werden** (oben: keine Dosisabhängigkeit von Limonen-Cyclase und Dreb2a; mitte: R2/R2+-Vergleich von Tubulin und crn-like Protein (ccc); unten: keine Zeitabhängigkeit von CyclinB1)

C =  $0\mu\text{M } ^{133}\text{Cs}$  und  $0\text{Bq/cm}^3 \text{ } ^{134}\text{Cs}$  (Kontrolle); 3d =  $150\mu\text{M}$ , für 3 Tage; 1,5w =  $150\mu\text{M}$ , für 1,5 Wochen; + =  $150\mu\text{M}$ , für 4 Wochen; R1 =  $10\text{Bq/cm}^3$ ; R2 =  $20\text{Bq/cm}^3$ ; R3 =  $60\text{Bq/cm}^3$  R2+ =  $20\text{Bq/cm}^3 \text{ } ^{134}\text{Cs}$  +  $100\mu\text{M } ^{133}\text{Cs}$

Die Gene der Limonen-Cyclase und des Dreb2a-Transkriptionsfaktor wurden nur durch Cäsium-Stress an- bzw. abgeschaltet, eine Veränderung durch radioaktive Strahlung konnte ausgeschlossen werden. Umgekehrt zeigten sich in den Versuchen mit den Genen CyclinB1, Tubulin etc. (Abbildung 3-45 mitte und unten) keine signifikante Expressionsänderung nach Cäsium-133-Stress.

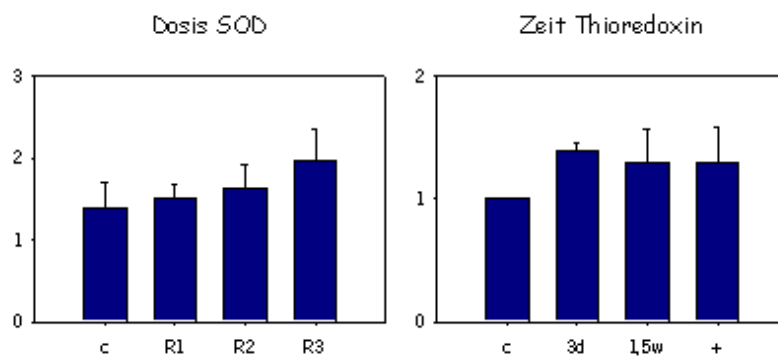
Eine Induktion dieser Gene nach Radiocäsium-Behandlung wurde sowohl durch die subtraktiven cDNA-Banken als auch durch RT-PCR nachgewiesen.

Demgegenüber standen Gentranskripte, die durch beide Stressoren gleichermaßen induziert wurden. Da einige Gene (phil-like Protein, Extensin/Extensin-like und Glycin-reiche Proteine) unabhängig

voneinander auch schon in den SSH-Banken gefunden werden konnten, wurden die weiteren Experimente auf die Superoxid-Dismutase und das Thioredoxin beschränkt.

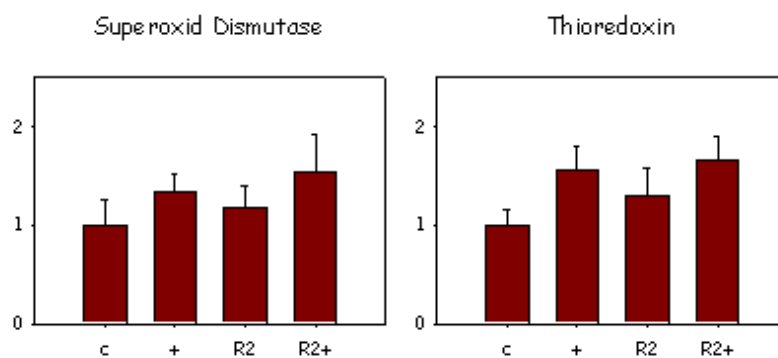
Die Induktion der SOD durch Cäsium-133 wurde bereits aufgrund der SSH deutlich (vgl. Kapitel 3.4.1). Es konnte gezeigt werden, dass nach Behandlung mit ionisierender Strahlen das Gen verstärkt exprimiert wurde. Analoges gilt für das Gen des Thioredoxins. Abbildung 3-46 (rechts) zeigt die veränderte Expressionsrate des Genes nach Cäsium-133 Applikation.

Zudem wurde das Transkript bei gleichzeitiger Behandlung der Pflanzen mit beiden Stressoren durch synergistische Effekte verstärkt transkribiert (Abbildung 3-47).



**Abbildung 3- 46 Dosisabhängige Genexpression der Superoxid Dismutase und Zeitabhängige Genexpression des Thioredoxin**

C = 0 $\mu$ M  $^{133}$ Cs und 0Bq/cm $^3$   $^{134}$ Cs (Kontrolle); 3d = 150 $\mu$ M, für 3 Tage; 1,5w = 150 $\mu$ M, für 1,5 Wochen; + = 150 $\mu$ M, für 4 Wochen; R1 = 10Bq/cm $^3$ ; R2 = 20Bq/cm $^3$ ; R3 = 60Bq/cm $^3$



**Abbildung 3- 47 Synergistische Effekte von Cäsium-133 und ionisierender Strahlung (R2+)**

C = 0 $\mu$ M  $^{133}$ Cs und 0Bq/cm $^3$   $^{134}$ Cs (Kontrolle); R2 = 20Bq/cm $^3$ ; R3 = 60Bq/cm $^3$  R2+ = 20Bq/cm $^3$   $^{134}$ Cs + 100 $\mu$ M  $^{133}$ Cs

Um Cäsium-133 und Radiocäsium-Stress vergleichend darstellen zu können, sind die Ergebnisse der verschiedenen subtraktiven cDNA-Banken und RT-PCRs im Anschluss nochmals tabellarisch gegenübergestellt (Doppelnennungen sind durch nicht eindeutige Zuordnung möglich, siehe z.B.  $\Delta$ -1-Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthase):

Genfunktion	Cäsium induziert (reprimiert)	Radiocäsium induziert (reprimiert)
1. Metabolismus	9 (5)	3 (2)
2. Energie	2	1
3. Zellwachstum, Zellteilung und Entwicklung	1 (2)	7
4. Kontrolle der Transkription und Translation	7 (2)	3 (1)
5. Proteinsynthese, Proteinfaltung und Modifikation	6 (2)	1
6. Transport und Homöostase	11 (4)	1
7. Zelluläre Kommunikation und Signaltransduktion	2	2
8. Zellabwehr, Stressantwort und Detoxifikation	16	10
9. Unbekannte und hypothetische Proteine	11 (1)	17 (2)

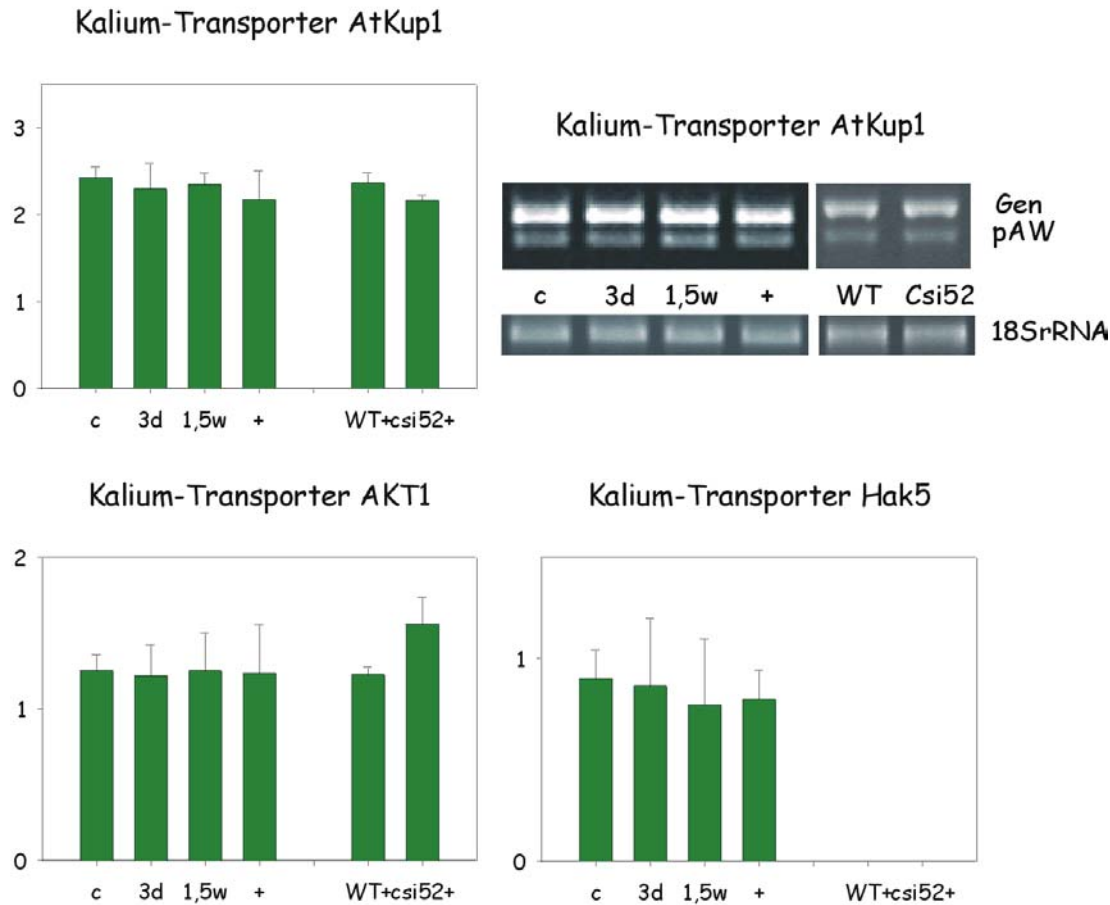
### 3.4.6 Transkriptionsverhalten verschiedener Kalium-Aufnahmesysteme

Ein spezielles Augenmerk wurde auf die Kalium-Aufnahme gelegt. Für 20 verschiedene Transporter und Kanäle wurden Primer synthetisiert und in Vorversuchen getestet. Folgende wurden ausgewählt und vor allem mit Hilfe der semiquantitativen PCR näher untersucht:

- CaM-regulierter Kaliumkanal ACBK1 (At1g01340)
- outward rectifying Kalium-Kanal KCO (At5g55630)
- Kalium-Kanal ATKC (At4g32650)
- putativer Kalium-Kanal,  $\beta$ -Untereinheit (At1g04690)
- Kalium-Transporter HAK5 (At4g13429) ← **aus SSH**
- Kalium-Transporter AtKup1 (At2g30070)
- Kalium-Transporter AKT1 (At2g26650)

Die unterschiedlichen Kalium-Aufnahmewege sind größtenteils auch für die Aufnahme des Cäsiums in die Pflanze verantwortlich (White and Broadley, 2000). Daher ist es notwendig, das Transkripti-

onsverhalten verschiedener Transporter und Kanäle zu untersuchen. Hier war vor allem der Vergleich des Wildtypes mit der *csi52*-Mutante von Interesse, da die Transportermutante im Vergleich zum Wildtyp eine höhere Cäsium-Resistenz aufweist (Sheahan *et al.*, 1993).



**Abbildung 3- 48 Geninduktion verschiedener Kalium-Transporter nach Behandlung mit Cäsium-133, Vergleich von Wildtyp und Cäsium-toleranter *csi52*- Mutante**

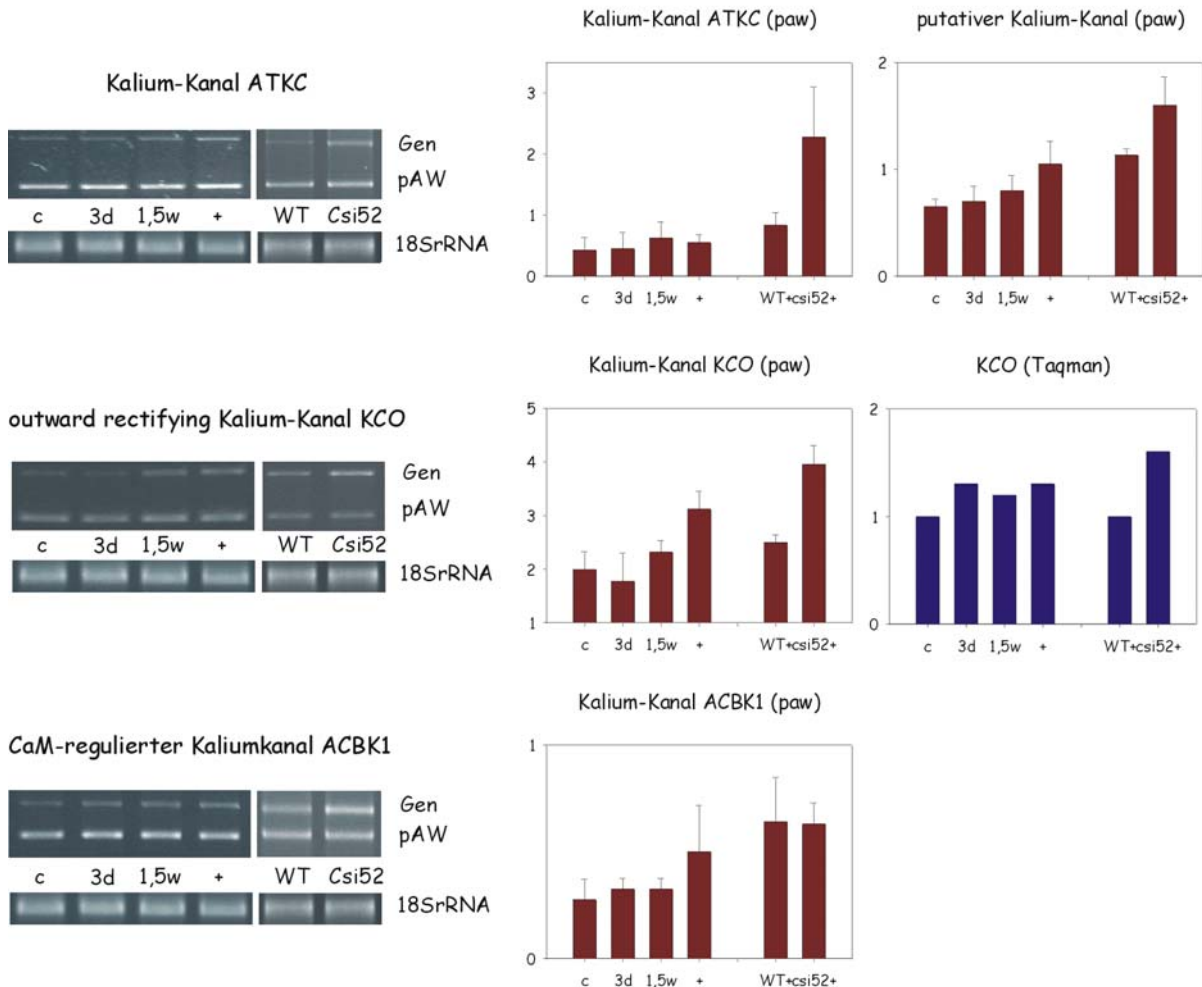
C = 0µM <sup>133</sup>Cs (Kontrolle); 3d = 150µM, für 3 Tage; 1,5w = 150µM, für 1,5 Wochen; + = 150µM, für 4 Wochen

Ein Vergleich verschiedener Transporter zeigte, dass sich das Transkriptionsverhalten nach Behandlung mit Cäsium-133 kaum veränderte; es ist auch keine Unterscheidung im Expressionsmuster zwischen Wildtyp und Transportermutante möglich.

Hak5 konnte bereits in einer subtraktiven cDNA-Bank als Cäsium-reprimiert identifiziert werden. Dieses Ergebnis konnte durch die semiquantitativen PCR nicht bestätigt werden, wobei erwähnt werden muss, dass die Primer für den Hak5 dem Anschein nach nicht optimal funktionierten und zahlreiche Versuche notwendig waren, um zumindest zwei Wiederholungen zu bekommen, in denen bei allen Ansätzen (c, 3d, 1.5w, +) auswertbare Banden enthalten waren.

Im Gegensatz zu den Transportern zeigten die ausgewählten Kanäle zwar eine leichte Induktion nach Cäsium-133 Zugabe, jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant und konnten auch nicht durch

quantitative RT-PCR bestätigt werden. Einzige Ausnahme war der outward-rectifying Kanal KCO. Signifikant hingegen waren die Differenzen im Transkriptionsverhalten zwischen Wildtyp und *csi52*-Mutante.

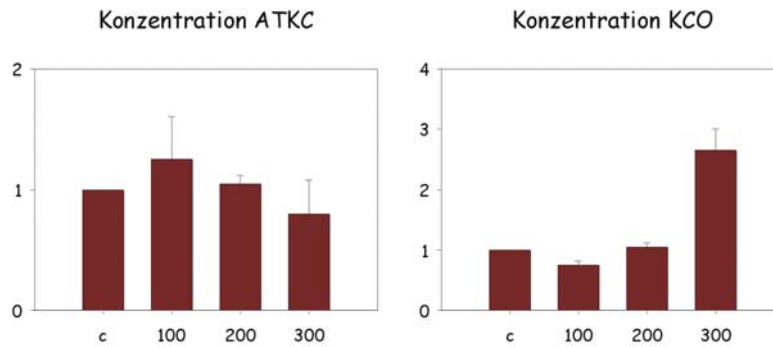


**Abbildung 3- 49 Zeitabhängige Geninduktion verschiedener Kalium-Kanäle nach Behandlung mit Cäsium-133, Vergleich von Wildtyp und Cäsium-toleranter *csi52*- Mutante**

C = 0 $\mu$ M <sup>133</sup>Cs (Kontrolle); 3d = 150 $\mu$ M, für 3 Tage; 1,5w = 150 $\mu$ M, für 1,5 Wochen; + = 150 $\mu$ M, für 4 Wochen;

Vor allem die Kanäle ATKC und KCO zeigten eine deutliche Induktion bei *csi52*. Der putative Kalium-Kanal war ebenfalls in der Mutante verstärkt transkribiert, wenn auch auf niedrigerem Niveau. Im Transkriptionsmuster des CaM-regulierten Kanals ACBK1 konnte kein Anstieg der Genprodukte festgestellt werden; ebenso bei einem Vergleich zwischen WT und *csi52*. Die Ergebnisse der Taqman-PCR (Zeit- und Konzentrationsverlauf) wurden nicht berücksichtigt, da die Regressionsgerade der Verdünnungsreihe nicht eindeutig ermittelt werden konnte und sich z.T. Werte für die PCR-Effizienz von über 2,5 ergaben (regulär zwischen 1,6 und 2,0, vgl. Kapitel 2.10.3).

Für die Kanäle ATKC und KCO wurden zusätzlich mit Hilfe der quantitativen RT-PCR ein konzentrationsabhängiger Transkriptionsverlauf ermittelt. Während die Expression von ATKC nach anfänglicher Induktion leicht zurückging, nahm die Genaktivität des outward-rectifying Kanals KCO bei einer Konzentration von 300 $\mu$ M Cäsium-133 deutlich zu.



**Abbildung 3- 50 Konzentrationsabhängige Geninduktion zweier Kalium-Kanäle in Arabidopsis-Wildtyp**

C = 0 $\mu$ M  $^{133}$ Cs (Kontrolle); 100 = 100 $\mu$ M, für 4 Wochen; 200 = 200 $\mu$ M, für 4 Wochen; 300 = 300 $\mu$ M, für 4 Wochen

### 3.5 Ergebnisse der In-situ PCR

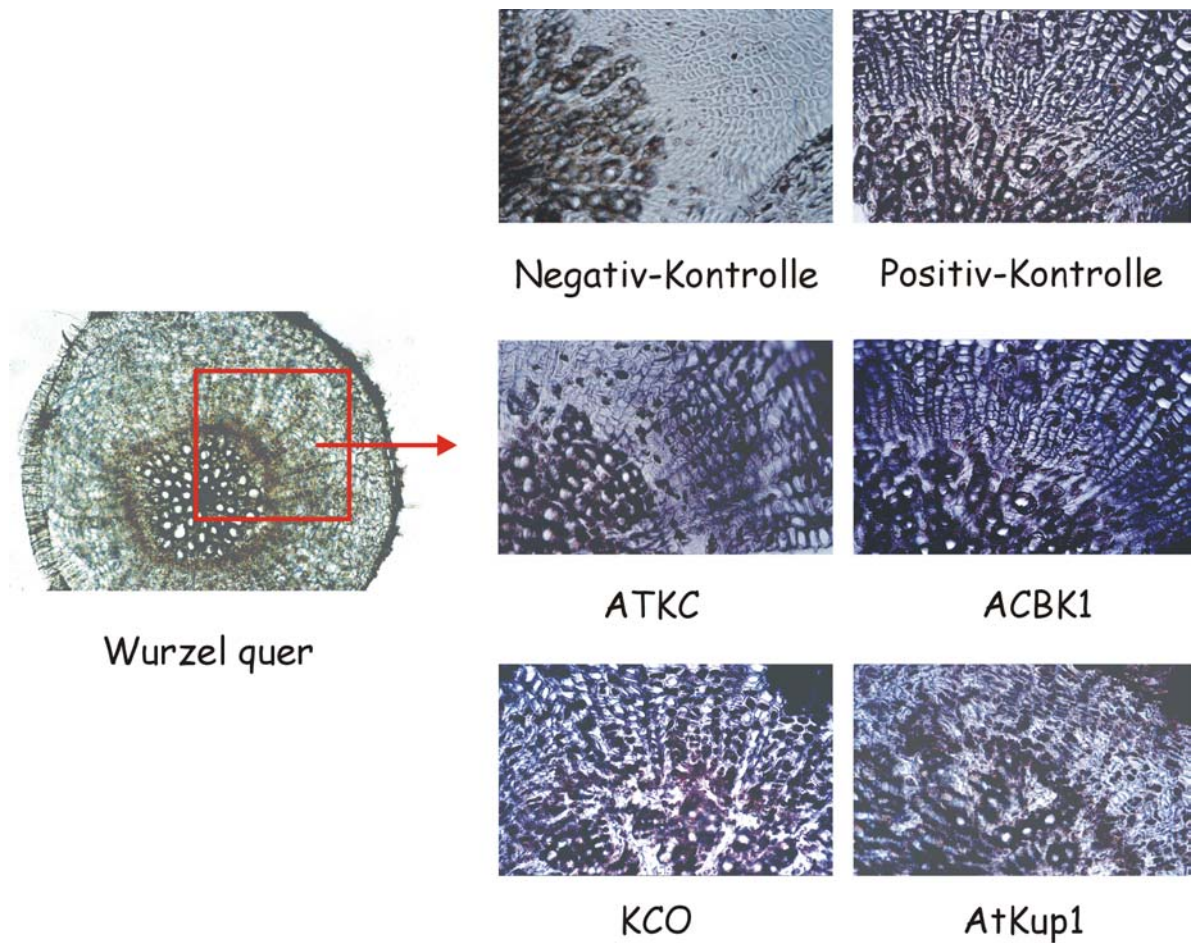
Mit Hilfe der In-situ PCR sollte versucht werden, die Transkription der Kalium-Kanäle ATKC, ACBK1 und KCO sowie die des Kalium-Transporter AtKup1 innerhalb eines Wurzelquerschnittes zu lokalisieren. Der 30 $\mu$ m dicke Querschnitt wurde mit Hilfe eines Vibratoms hergestellt; die Wurzel wurde  $\geq 0,5$ cm unterhalb des Wurzel-Stengelübergangs geschnitten.

Parallel zu den untersuchten Genen wurde die PCR-Reaktion einer Negativ-Kontrolle (keine cDNA-Synthese, DIG-PCR mit ATKC Primern) und einer Positiv-Kontrolle mit 18S-rRNA spezifischen Primern durchgeführt. Der Ablauf der In-situ PCR ist in Kapitel 2.10.4 ausführlich beschrieben. Durch die DIG Markierung war es möglich, mit Hilfe von Antikörpern die spezifischen Genfragmente der Kanäle und Transporter innerhalb der Gewebeschnitte anzufärben, d.h. jede Zelle, die das entsprechende Gen transkribiert, zeigt nach einer Inkubationszeit eine charakteristische Blaufärbung (Abbildung 3-51).

In der Negativ-Kontrolle hatte keine cDNA-Synthese stattgefunden. Damit kam nur Kern-DNA als Matrize für die PCR in Frage, und es war zu erwarten, dass die Verfärbung nur sehr schwach ausgeprägt sein sollte. So konnte auch bis auf ein paar dunkel-gefärbte Zellkerne keine Veränderung in der Negativ-Kontrolle unter dem Mikroskop festgestellt werden. Da im Gegensatz dazu die ribosomalen Gene in jeder lebenden Zelle abgelesen werden und diese normalerweise auch in sehr hoher Kopienzahl im Zellkern vorhanden sind, sollte die Positiv-Kontrolle unter dem Mikroskop eine deutliche



Blaufärbung aufweisen. Mit Hilfe der Positiv-Kontrolle konnte auch die Funktionalität der Methode nachgewiesen werden.



**Abbildung 3- 51** Wurzelquerschnitt; In-situ PCR der Kontrollen und der verschiedenen Kalium-Kanäle (ATKC, ACBK1, KCO) und -Transporter (AtKup1)

Wie in der Abbildung 3-51 zu erkennen ist, waren auch die übrigen Wurzelquerschnitte durch die DIG-PCR stark blau gefärbt. Dies legte nahe, dass auch die Gene für die hier untersuchten Kanäle und Transporter in allen Parenchymzellen exprimiert werden. Eine Unterscheidung des Transkriptionsmusters zwischen den Geweben und gar einzelnen Zellen der Rhizodermis, des Cortex und der Stele war aufgrund der geringen Auflösung dieser Methode nicht möglich.

### 3.6 RNAi und Überexpression verschiedener Kalium-Kanäle in *Arabidopsis thaliana*

Ausgehend von den Ergebnissen der vorangegangenen Experimente – einerseits eine möglicherweise unterschiedlich starke Genexpression einiger Kalium-Kanäle der *csi52*-Mutante unter erhöhten Cä-

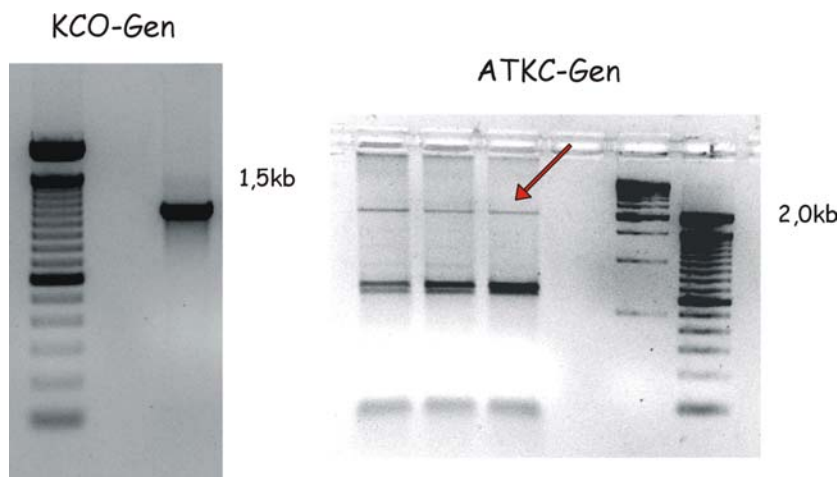
### 3. Ergebnisse

sium-Bedingungen (Kapitel 3.4.6), andererseits eine möglicherweise verringerte Cäsium-Aufnahme der *csi52*-Pflanze im Vergleich zum Wildtyp – sollte durch gezieltes Ausschalten oder Aktivieren dieser Aufnahmesysteme überprüft werden, ob so die Aufnahme von Cäsium aus der Umgebung in die Pflanze beeinflusst werden kann.

Dazu wurden für die Kanäle ATKC und KCO Konstrukte gebildet, um das jeweilige Gen in der Pflanze überexprimieren zu können. Für das post-transkriptionale Ausschalten der Kalium-Kanäle ACBK1 und KCO wurden 300-600 Basenpaar große Genfragmente in den Vektor pJawohl17 ligiert und ebenfalls in Agrobakterien eingeschleust. Mit Hilfe dieser Transformanden konnten dann *Arabidopsis thaliana* Col-0 Wildtyp Pflanzen infiziert werden, wobei das gewünschte Gen zusammen mit Promotor und Selektionsmarker in das Pflanzengenom integriert wurde (vgl. Kapitel 2.14).

ATKC	(At4g32650)	inward rectifying K <sup>+</sup> -Kanal	Überexpression
ACBK1	(At1g01340)	CaM-regulierter Kanal	RNAi
KCO	(At5g55630)	outward rectifying K <sup>+</sup> -Kanal	Überexpression, RNAi

Um gewährleisten zu können, dass alle Gene in korrekter Weise in die Pflanzen eingebracht worden waren, mussten die verschiedenen Zwischenschritte (siehe Kapitel 2.14.1) kontrolliert werden.



**Abbildung 3- 52 AttB-Volllänge-PCR der Gene KCO und ATKC (roter Pfeil)**

Zuerst wurde eine attB-PCR für die verschiedenen Volllänge-Gene bzw. Genfragmente durchgeführt. Bevor sie mittels BP-Klonierung in den Entry-Vektor ligiert werden konnten, wurde die Länge der PCR-Produkte elektrophoretisch überprüft. Die Volllänge-PCR der ATKC bzw. KCO sollten Banden von ca. 2000bp und 1200bp ergeben (Abbildung 3-52). Die Genfragmente von ACBK1 (350bp) und KCO (ca. 600bp) sind nicht dargestellt.

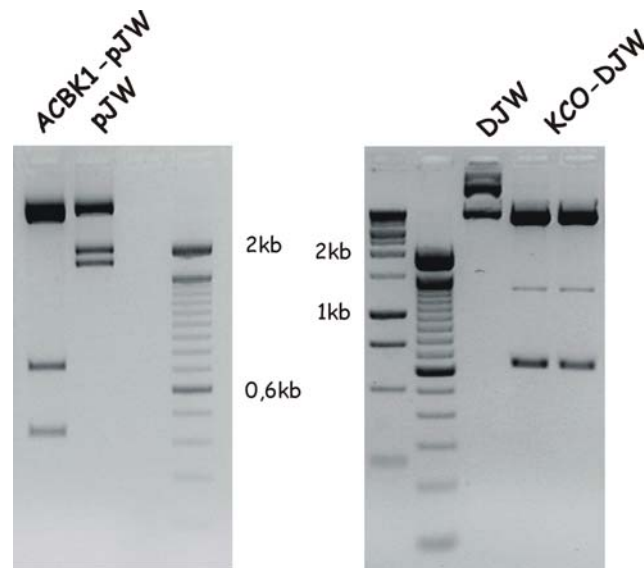
### 3. Ergebnisse

Die korrekten Banden wurden danach aus dem Gel ausgeschnitten, in den Donor-Vektor durch Rekombination ligiert und in *E. coli* transformiert. Um die Richtigkeit und Vollständigkeit des Inserts zu testen, wurde aus positiven Klonen die Plasmide gereinigt, sequenziert und durch alignen mit den bekannten Gensequenzen verglichen. Als Beispiel ist in Abbildung 3-53 ein Ausschnitt aus dem Alignment des ACBK1-Fragmentes aufgeführt (die weiteren Sequenzen sind im Anhang dargestellt).

	451				500
ACBK1	GTGGTTGCTT	TGGCGATTGA	TCCATTGTTT	TTCTACATTC	CCATTGTGCGA
P3_Entry-Klon	.....	.....	.....	.....	.....
	501				550
ACBK1	TAGCGCAAGG	CACTGTCTTA	CTTTGGACTC	AAAGTTGGAG	ATAGCTGCGA
P3_Entry-Klon	.....	.....	.....	.....	.....
	551				600
ACBK1	GTTTGCTTCG	TACGCTCATC	GATGCCTTTT	ACATTATTCA	CATTGTGTTT
P3_Entry-Klon	.....	.....	.CAGGCGGCC	GCACTAGTGA	TTTTGTGTT.
	601				650
ACBK1	CAGTTCAGGA	CAGCTTACAT	CGCTCCTTCT	TCGCGGGTTT	TTGGAAGAGG
P3_Entry-Klon	CAGTTC.GGA	CAGCTTACAT	CGCTCCTTCT	TCGCGGGTTT	TTGGAAGAGG
	651				700
ACBK1	TGAACTGGTA	GATGATGCTA	AGGCAATAGC	CTTAAAGTAT	CTCTCTTCTT
P3_Entry-Klon	TGAACTGGTA	GATGATGCTA	AGGCGATAGC	CTTAAAGTAT	CTCTCTTCTT
	701				750
ACBK1	ACTTCATCAT	TGATCTACTC	TCTATCCTTC	CTCTCCCACA	GATAGTAGTT
P3_Entry-Klon	ACTTCATCAT	TGATCTACTC	TCTATCCTTC	CTCTCCCACA	GATAGTAGTT
	751				800
ACBK1	TTAGCCGTTA	TTCCAAGCGT	CAACCAGCCA	GTCTCTTTGC	TAACAAAAGA
P3_Entry-Klon	TTAGCCGTTA	TTCCAAGCGT	CAACCAGCCA	GTCTCTTTGC	TAACAAAAGA
	801				850
ACBK1	TTACCTTAAA	TTTCCATAA	TTGCTCAATA	TGTTCCCTCGG	ATTCTCCGTA
P3_Entry-Klon	CTACCTTAAA	TTTCCATAA	TTGCTCAATA	TGTTCCCTCGG	ATTCTCCGTA
	851				900
ACBK1	TGTATCCGCT	TTACACTGAA	GTGACAAGAA	CATCTGGCAT	TGTTACTGAA
P3_Entry-Klon	TGTATCCGCT	TTACACTGAA	GTGACAAGAA	CATCTGGCAT	TGTTACTGAA
	901				950
ACBK1	ACAGCATGGG	CTGGAGCTGC	TTGGAACCTC	TCTCTCTATA	TGTTAGCCAG
P3_Entry-Klon	ACAGCAATCC	CG.....	.....	.....	.....
	951				1000
ACBK1	TCATGTGTTT	GGAGCTTTAT	GGTACTTAAT	CTCAGTAGAA	CGAGAAGACA
P3_Entry-Klon	.....	.....	.....	.....	.....
	1001				
ACBK1	GATGCTGGCA				
P3_Entry-Klon	.....				

**Abbildung 3- 53 Ausschnitt aus dem Sequenzvergleich des Entry-Klones und dem Gen des ACBK1 Kalium-kanal**

Nachdem auf diese Weise alle Gene überprüft wurden, konnten die Inserts aus dem Entry-Klon mittels LR-Klonierung in den jeweiligen Vektor (Überexpression: pDJW17, RNAi: pJW17) überführt werden. Auch danach wurde der korrekte Einbau durch Restriktionsverdau oder PCR mit gen- und vektorspezifischen Primern kontrolliert.



**Abbildung 3- 54 Überprüfung des korrekten Einbaus der Inserts für die Gene für die Kalium-Kanäle durch Restriktionsverdau:** Beispiel ACBK1 und KCO in den Vektoren pJawohl17 (pJW) und pDJW17 (DJW); links: Verdau mit XhoI, HindIII und SpeI; rechts: Verdau mit XhoI und HindIII

Zuletzt wurden die Plasmide mit Hilfe der Elektroporation in *Agrobacterium tumefaciens* eingeschleust und die Pflanzen infiziert (siehe Kapitel 2.14.2). Eine Überprüfung der Agrobakterium-vermittelten Pflanzen-Transformation und die Analyse der Cäsium-Aufnahme konnte im Rahmen der Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

### **4. Diskussion**

Die Auswirkungen von Cäsium auf Zellen und Gewebe sind seit langem Gegenstand der Forschung. Von besonderem Interesse ist dabei die selektive Aufnahme der verschiedenen Alkalimetalle und die Wirkung der ionisierenden Strahlen der beiden wichtigsten radioaktiven Isotope, Cäsium-134 und Cäsium-137. Durch Nuclearwaffen-Tests und Störfällen in Kernkraftwerken wie in Tschernobyl 1986 wurden diese Radioisotope inzwischen über den gesamten Planeten verteilt und belasten je nach Region in unterschiedlichem Maße die Umwelt.

Entscheidend für ihr Verhalten in ökologischen Systemen sind die Verfügbarkeit und der Transport in die Pflanzen. Bei der Aufnahme spielt vor allem die chemische Verwandtschaft zu Kalium, dem quantitativ wichtigsten Kation in Organismen, eine herausragende Rolle. Sie erfolgt primär über die unterschiedlichen Kalium-Transporter und -Kanäle einer Zelle, was bereits durch zahlreichen Patch-Clamp-Versuchen an einzelnen Zellen und bei Mutanten bzw. Simulationsberechnungen ermittelt wurde (White and Broadley, 2000).

Wie wirkt sich aber nun das Cäsium auf den Stoffwechsel aus und inwieweit ist es der Pflanze möglich, die schädigende Wirkung, die das Cäsium auf den Stoffwechsel ausübt, zu tolerieren und entstandene Schäden zu reparieren? Kann die Pflanze eventuell Strategien entwickeln, den Stressor weitgehend zu vermeiden? Ziel der Arbeit war es, diesen Fragen nachzugehen und zu neuen Erkenntnissen über die Auswirkungen von Cäsium-Stress und Cäsium-Aufnahme in *Arabidopsis thaliana* zu gelangen. Die Ergebnisse könnten letztendlich als Grundlage dienen, genetisch veränderte Nutzpflanzen zu erzeugen, die eine erhöhte Toleranz gegenüber Cäsium (z.B. durch verminderte Aufnahmefähigkeit) besitzen, um so möglicherweise in hochkontaminierten Gegenden die Belastung von Mensch und Tier zu reduzieren.

Zu Beginn wurden mit Hilfe der Subtraktiven-Suppressions-Hybridisierung (SSH) und Makroarrays das Genexpressionsmuster behandelte Pflanze mit Kontroll-Pflanzen verglichen. Bei der SSH handelt es sich um ein sehr effizientes und sensitives Verfahren, differentiell exprimierte Gene aufzufinden. Zusammen mit der Array-Technologie ist ein sehr hoher Durchsatz bei hoher Reproduzierbarkeit für die Analyse der subtraktiven cDNA-Bank gewährleistet.

Um auf diese Weise gefundene Gene ergänzend überprüfen zu können, wurde aus SSH-unabhängigen *Arabidopsis*-Anzuchten die Wurzel-RNA isoliert und durch semiquantitative und quantitative RT-PCR die Induktion bzw. Repression ausgewählter Gene analysiert. Eine ursprünglich geplante Verifikation in größerem Umfang durch Northern-Blots scheiterte, da dieses Verfahren wohl nicht sensitiv genug war, um nicht-subtrahierte cDNA-Pools miteinander zu vergleichen. Ausschließlich auf PCR basierende Methoden schienen geeignet, um die z.T. nur äußerst geringen Unterschiede auf Transkriptionsebene untersuchen zu können.

Die Konzentrationen und Aktivitäten an Cäsium und Radiocäsium wurden bewusst im Bereich des maximalen natürlichen Vorkommens gehalten, auch wenn die Stressantworten dadurch weit schwächer ausfielen als bei Kurzzeit-Untersuchungen mit sehr hohen Dosen und Konzentrationen. Durch Vorversuche zeigte sich, dass bei nahe letalen Konzentrationen ( $700\mu\text{M Cs}^+$  bei  $2\text{mM K}^+$ ) keine interpretierbaren Ergebnisse über die Auswirkungen der Stressoren auf den Stoffwechsel mehr zustande kamen, da sich der Metabolismus wahrscheinlich bereits in einem chaotischen Zustand befand, wobei nahezu alle gefundenen Gene stark reprimiert waren (darunter auch typische Stressindikatoren wie  $\beta$ -1,3-glucanasen, Extensine oder GST). Es wurde daher als sinnvoller erachtet, die Analysen bei physiologischen Cäsium-Konzentrationen und bei natürlich vorkommenden Aktivitäten zu betreiben, auch wenn damit die Verifikation der gefundenen Gene unter nicht-subtraktiven Bedingungen erschwert wurde.

Aus diesem Grund mussten mehrere Wiederholungen der RT-PCR Verifikationsexperimente durchgeführt werden, um die geringen Unterschiede auf Transkriptionsebene – zum Teil wurden nur 1,3 bis  $>2$ -fache Induktionen/Repressionen ermittelt – zwischen behandelter Pflanze und Kontrollpflanze statistisch untermauern zu können. So konnte festgestellt werden, dass sich nicht-signifikant verändernde Gentranskripte, wie z.B. die des CyclinB1-Genes nach Cäsium-133-Applikation oder des Gens der Limonen-Cyclase nach Radiocäsium-Behandlung, im Mittel nur um maximal den Faktor 1,1 von dem Kontrollwert abwichen. Dies führte dazu, dass in der Regel bereits relative Induktionen von 1,3 und größer als signifikante Unterscheidung zwischen Kontrolle und behandelter Pflanze eingestuft werden konnten. Die Signifikanz wurde durch die Einfaktorielle Varianzanalyse ( $P < 0,05$ ) bzw. durch Ablehnung der Nullhypothese beim Zweistichproben t-Test einzelner Werte mit gleicher Varianz beim Signifikanzniveau  $\alpha$  ermittelt.

Ein Teil der identifizierten Gene aus dem Vergleich der verschiedenen subtraktiven-cDNA-Banken wurde so überprüft und bis auf wenige Ausnahmen eindeutig bestätigt. Durchgehend war erkennbar, dass bei den Cäsium-133-Versuche die Signifikanzwerte der Taqman-PCR im Vergleich zur semi-quantitativen PCR in der Regel deutlich höher lagen, was auf die wesentlich geringere Varianz der Ergebnisse zurückzuführen war. (Ursache dafür – neben der höheren Sensitivität der Methode – ist wohl, dass hier die cDNA aus nur einem einzigen RNA-Pool stammte, während für die semiquantitative PCR die RNA aus zwei voneinander unabhängigen Anzuchten verwendet wurde.) Bei dem Gen des Osmotin-Präcursors konnte nur bei der quantitativen RT-PCR eine signifikant erhöhte Induktion festgestellt werden.

Abweichend von diesem Trend verhielten sich lediglich die Gene für die beiden Transkriptionsfaktoren *hat7* und *c2h2*, die aufgrund der quantitativen RT-PCR als nicht signifikant eingestuft werden mussten. Bei den Radiocäsium-Werten waren die Unterschiede der Gene für CyclinB1 und *crn*-like Protein aufgrund der unerklärlich hohen Varianzen nicht signifikant. Die einzelnen Werte sind im Anhang (Kapitel 1.7) aufgelistet.

Um die Richtigkeit der PCR-Produkte gewährleisten zu können, wurden einige ausgewählt, kloniert und sequenziert (identifiziert wurden vor allem solche, deren Primersequenz nicht eindeutig einem Gen innerhalb der Gengruppe, wie z.B. bei Dreb-Transkriptionsfaktoren, Kalium-Transportern oder Glutathion-S-Transferasen, zuzuordnen sind).

Bei den Untersuchungen zum Cäsium-Stress und den Auswirkung der ionisierenden Strahlung stellte sich heraus, dass von der Pflanze einigen toxischen Eigenschaften des (Radio)Cäsiums scheinbar gezielt entgegengewirkt wurde. Zudem konnten einige frühere Beobachtungen bestätigt werden (vgl. Einleitung). Bei Ghosh *et al.* (1993) wurde zum Beispiel eine erhöhte Aktivität der Enzyme Katalase und Peroxidase beschrieben, was sich auch im Rahmen der Arbeit auf Transkriptionsebene zeigte. Andere Stoffwechseländerungen wiederum waren unspezifisch. Zu diesen zählen vor allem Gene der allgemeinen Stressabwehr, welche bei zahlreichen biotischen und abiotischen Stressfaktoren auftreten. Inwieweit es sich jedoch bei der Stressantwort auf das Cäsium und Radiocäsium tatsächlich um gezielte Reaktionen der Pflanze handelt, darüber kann nur spekuliert werden. Wie bei den meisten Stressoren ist es sehr schwierig, zwischen spezifischer und unspezifischer Stressantwort zu unterscheiden, da diese nicht unabhängig voneinander auftreten und meist ineinander übergehen.

In den folgenden Absätzen werden die verschiedenen Ergebnisse der Genexpressionsversuche in einen Kontext gebracht. Es wird auf Zusammenhänge im Stoffwechsel und Gemeinsamkeiten der im Rahmen der Arbeit gefundene Gene eingegangen. Wenn möglich wird ein Vergleich mit bereits bekannten Wirkungen von Cäsium und ionisierender Strahlung in Zellen und Organismen gezogen.

### **Wirkung auf das Redoxpotential der Zelle**

Wie in Kapitel 1.1 der Einleitung erwähnt, ist Cäsium äußerst reaktionsfreudig, da das äußerste Elektron des Alkalimetalls nur sehr schwach an das Atom gebunden ist. Cäsium ist eines der stärksten bekannten Reduktionsmittel, wobei es besonders mit Wasser, Sauerstoff und Schwefel unter Bildung von z.B. Cäsiumhydroxyd, Peroxide und Hyperoxide wechselwirkt. Es reagiert ebenfalls mit CO-, OH- und SH-Gruppen der Makromoleküle und geht starke ionische Bindungen mit negativ geladenen Gruppen ein, wobei es effektiv andere einwertige Kationen verdrängt. Als Reduktionsmittel spaltet es Disulfidbrücken und stört das pH-Milieu der Zelle aufgrund seiner basischen Eigenschaften.

Aus dem Vergleich der subtraktiven cDNA-Banken wurde deutlich, dass einige Enzyme, die direkt oder indirekt mit dem Schwefelhaushalt in Verbindung stehen durch das Cäsium aktiviert wurden: Anfangen von der Schwefelassimilation durch die ATP-Sulfurylase über verschiedene Enzyme des Stoffwechsels schwefelhaltiger Aminosäuren bis hin zu Enzymen, die für ihre katalytische Arbeit Cystein oder andere Schwefelverbindungen essentiell benötigen. Zu letzteren sind z.B. die Glutathion-

S-Transferasen, Thioredoxin oder Cytochrome zu zählen. Es wurde bereits festgestellt, dass Cäsium die Stabilität von SH-Gruppen verändern kann (Sgarrella *et al.*, 1983). Dies würde durch eine verstärkte Synthese von schwefelhaltigen Verbindungen als Fängersubstanzen gemindert werden. Außerdem könnten durch verschiedene schwefelhaltige Moleküle der Cäsium-bedingten Verschiebung des Redoxpotentials in der Zelle entgegengewirkt werden. Eine Verbindung zwischen oxidativem Stress und gesteigerter Aktivität der ATP-Sulfurylase wurde von Lappartient und Touraine (1997) gezeigt.

In diesem Zusammenhang stehen auch Gene, die für die Enzyme SOD oder Peroxidasen kodieren. Diese Proteine sind vor allem an der Detoxifikation von reaktiven Sauerstoffspezies ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ) beteiligt. Ursprung hierfür ist vermutlich die oben erwähnte hohe Reaktivität von Cäsium mit Sauerstoff und Wasser und die damit verbundene Produktion von Peroxiden und anderen reaktiven Spezies.

Durch Bindung des Alkalimetalls an Membranen oder Proteine könnten auch die oxidative Phosphorylierung oder die Photosynthese durch Cäsium beeinflusst werden. Dadurch würde es zu einer unvollkommenen Reduktion des Sauerstoffs kommen, wobei toxische Sauerstoffverbindungen entstehen, die verstoffwechselt werden müssten. Störungen dieser Art wurden bereits infolge erhöhter Cäsium-Konzentrationen beobachtet (Ghosh *et al.*, 1993). Auf die erhöhte Enzymaktivität von Peroxidasen und Katalasen nach Cäsium-Applikation wurde bereits hingewiesen.

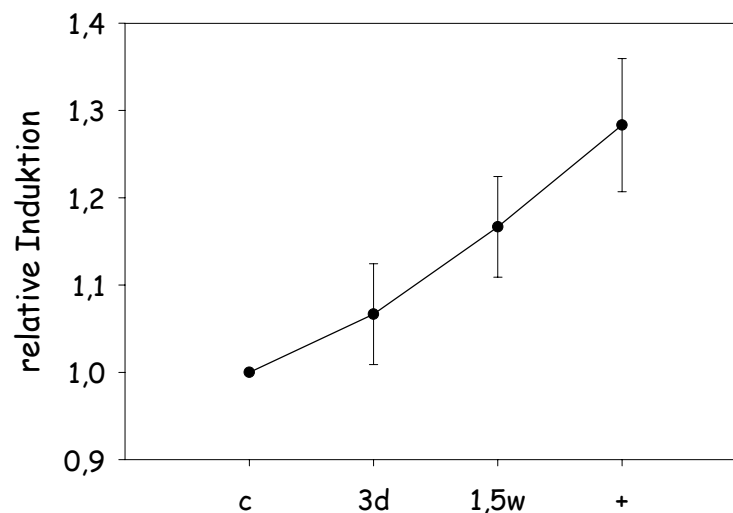
Insgesamt lässt sich also eine Verschiebung des Gleichgewichtes von reduktiven und oxidativen Prozessen durch das Cäsium erkennen, dem die Pflanze auf Transkriptionsebene entgegenwirkt. Man kann demzufolge auch von einem Cäsium-bedingten oxidativen Stress sprechen.

Ein weiterer Anhaltspunkt dafür konnte anhand des Phänotypes der Arabidopsis-Pflanzen (Kapitel 3.1) gezeigt werden. Die Blätter wiesen ab Konzentrationen von  $500\mu\text{M}$  Cäsium und höher deutliche nekrotische Veränderungen auf. Ob diese Nekrosen tatsächlich durch reaktive Sauerstoffspezies hervorgerufen werden, müsste jedoch noch gezeigt werden.

Es soll nochmals erwähnt werden, dass es sich hierbei stets um indirekte Ergebnisse auf Transkriptionsebene handelt. Zur Überprüfung könnten u.a. Messungen der Konzentration an Sauerstoffspezies in der Zelle durchgeführt werden. Da außerdem – wie in der Einleitung erwähnt – bei einer Vielzahl von biotischen und abiotischen Stresssituationen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet werden (Allen, 1995; Dat *et al.*, 2000, Surplus *et al.*, 1998), sind direkte Zusammenhänge von Cäsiumstress und der Bildung von ROS nur schwer nachweisbar. Auch ob es sich dabei um Beiprodukte des Stress-Metabolismus handelt oder es zu einer aktiven Erzeugung als „second messenger“ Signalmoleküle kommt – wie es bei Ozonstress bereits aufgezeigt wurde (Langebartels *et al.*, 2002) – konnte ebenfalls im Rahmen der Arbeit nicht geklärt werden. Zumindest bei den eingesetzten Cäsium-Mengen scheint Letzteres jedoch eher unwahrscheinlich. Zur Klärung müssten noch weitere Enzyme (z.B. NADPH-Oxidasen) in die Untersuchungen miteinbezogen werden.



Alle Gene – soweit zeit- und konzentrationsabhängige Untersuchungen durchgeführt wurden – zeigten einen ähnlichen Transkriptionsverlauf: Im Laufe der Zeit werden sie zunehmend exprimiert, was vermutlich auf die stetige Anreicherung des Cäsiums in *Arabidopsis* zurückzuführen ist. Thioredoxin weicht insofern leicht davon ab, da hier bereits nach drei Tagen eine maximale Induktion erreicht wurde.



**Abbildung 4- 1** Durchschnittliche relative Induktionswerte der ATP-Sufurylase, Glutathion-S-Transferase und der Superoxid-Dismutase

Zumindest die Expression von SOD scheint auch durch steigende Cäsium-Konzentrationen im Medium weiter erhöht zu werden (Abbildung 3-30). Auch dies spricht für einen direkten Zusammenhang zwischen der Cäsium-Konzentration und der Expression von Genen des oxidativen Stresses.

Bei den Versuchen mit Radiocäsium wurde wesentlich weniger Cäsium (Faktor  $10^{-6}$ ) eingesetzt, da hierbei vor allem die Auswirkungen der ionisierenden Strahlung betrachtet werden sollten. Ein Vergleich der SSH-Banken zeigte, dass eine Transkription von Genen des Schwefelhaushaltes nur schwach ausgeprägt war. Lediglich ein Gen mit Ähnlichkeit zu einer O-Succinylhomoserin-Sulfhydrylase wurde in diesem Zusammenhang gefunden, wobei die Funktion des Enzyms in Pflanzen noch nicht geklärt ist. Thioredoxin, SOD und Katalasen wurden ebenfalls durch Cäsium-134 induziert, so dass auch hier Hinweise auf eine Verknüpfung von ionisierender Strahlung und oxidativem Stress gegeben waren. Dafür spricht unter anderem auch, dass bei früheren Versuchen kleine heatshock Proteine entdeckt werden konnten, die sowohl bei oxidativem Stress als auch durch Gammastrahlen induziert wurden (Banzet *et al.*, 1998).

Es stellt sich die Frage, ob sich bei beiden Stressoren die Veränderung der Genexpression ausschließlich auf die reduzierende Wirkung des Cäsiums zurückführen lässt. Aufgrund der äußerst geringen

Konzentrationen an Radiocäsium liegt es nahe, der radikalisierenden Wirkung der radioaktiven Strahlung einen nicht unerheblichen Anteil an der Bildung von oxidativen Sauerstoffspezies einzuräumen. Wie in der Einleitung beschrieben, wirken sich die ionisierenden Strahlen – abhängig von Intensität und Dichte des Absorbers – mehr oder weniger stark auf das Wasser aus, was wiederum zu Radikalen und Superoxiden führen kann (Sauerstoffeffekt; vgl. Kapitel 1.4.2). Dies könnte ebenfalls die erhöht Genexpression der SOD, des Thioredoxins und der Katalasen erklären.

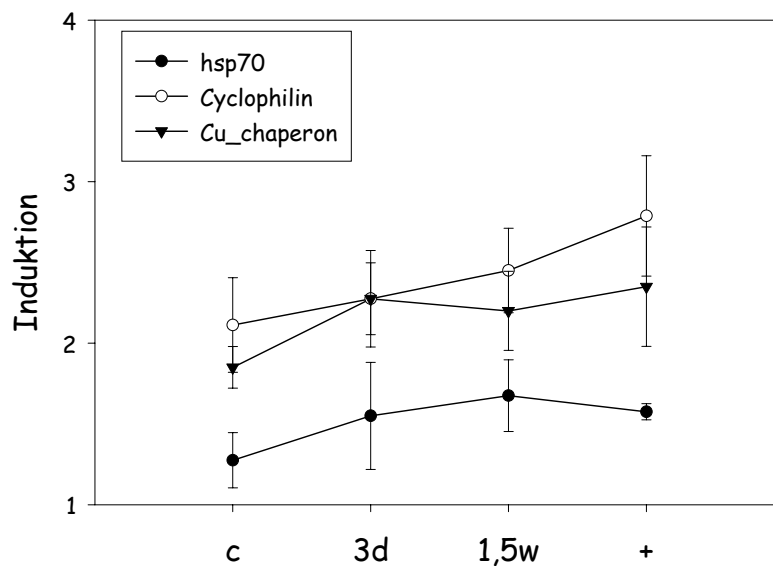
Auch die Beobachtung der synergistischer Effekte der beiden Stressoren auf die Expression des SOD-Genes (Abbildung 3-47) lässt eine ergänzende Wirkungsweise auf die Verschiebung des Redoxpotentials der Zelle vermuten. Die reaktiven Sauerstoffspezies entstehen zwar vermutlich auf unterschiedliche Art und Weise, jedoch das Ergebnis – oxidativer Stress – scheint identisch zu sein.

### **Cäsium und Makromoleküle**

Kalium hat auch einen wichtigen Einfluss auf die Stabilität und die Funktionalität zahlreicher Makromoleküle. Durch die stark reduzierende Wirkung des Cäsiums kann es zur Destabilisierung der Proteine kommen, indem z.B. Disulfidbrücken gespalten werden. Auch die Wirkung auf OH- und CO-Gruppen bzw. die ionische Wechselwirkung mit negativ geladenen Verbindungen (z.B. COO<sup>-</sup>-Gruppen) wurde bereits erwähnt, was ebenfalls zu einer Veränderung der Struktur der nativen Proteine führen und so deren Funktion stören kann. Aber auch Bildung von Cäsium-Nucleinsäure-Komplexen und Chromosomenabberationen oder die Bindung des Alkalimetalles an die Zellwand von Bakterien und Zellmembranen wurden bereits beobachtet (Ghosh *et al.*, 1993). Neben diesen direkten toxischen Effekten des Cäsiums könnten auch sekundär gebildete reaktive Sauerstoffspezies die Makromoleküle und Zellstrukturen schädigen.

In diesem Zusammenhang war es gelungen, einige Chaperone zu identifizieren, die als unmittelbare Folge auf die oben genannten Beeinträchtigungen verstärkt synthetisiert worden sein könnten. Weiter wurde auch die Synthese einer Leucyl-Aminopeptidase und die Repression verschiedener Protease-Inhibitoren beobachtet. Letztere dienen allerdings vor allem der Verteidigung gegenüber exogenen Proteasen bei der Pathogen-Abwehr; sie erfüllen aber auch endogenen Aufgaben.

Dennoch waren deutliche Anzeichen dafür gegeben, dass die Pflanzen bei Cäsiumstress wohl zunehmend auf fehlgefaltete oder funktionsunfähige Proteine reagieren mussten.



**Abbildung 4-2 Vergleich der Transkriptionsänderung einiger Gene des Protein-Metabolismus**  
Rückschlüsse auf die absolute Transkriptionsrate der einzelnen Gene dürfen nicht geschlossen werden, da zur Optimierung der semiquantitativen PCR unterschiedliche Konzentrationen an paw-Standard eingesetzt wurden

Auch durch ionisierende Strahlen könnte der Katabolismus der Proteine – Identifizierung eines Ubiquitin-konjugierenden Enzyms – beeinflusst werden; eine zusätzliche Stabilisierung der Proteine durch Chaperone konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Ubiquitin-konjugierende Proteine sind an zahlreichen anderen Reaktionen in der Zelle beteiligt, unter anderem wohl auch als regulatorische Elemente der post-replikativen DNA-Reparatur und der Apoptose (Ulrich and Jentsch, 2000; Hauser et al., 1998). Ein Zusammenhang zwischen Proteinabbau und einer Strahlung von  $30\text{Bq/cm}^3$  scheint daher eher unwahrscheinlich. Die direkten Auswirkungen auf die Proteinstruktur sind durch Gammastrahlen normalerweise auch nur relativ gering. Das Fehlen von Radiocäsium-induzierten Chaperonen spricht ebenfalls dafür, dass Destabilisierung und Fehlfaltungen von Proteinen infolge der Radiocäsium-Behandlung nicht oder nur sehr schwach auftraten.

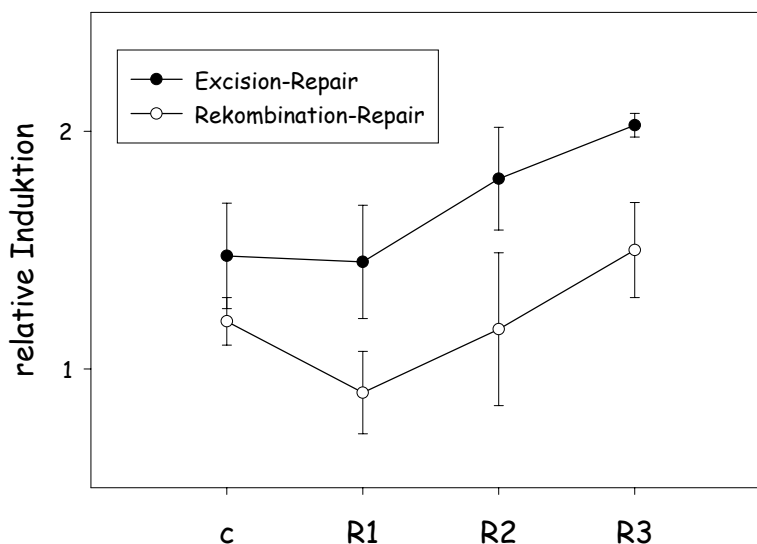
Dass umgekehrt Nucleinsäuren wesentlich strahlensensitiver reagieren als andere Makromoleküle, wird im Folgenden deutlich. Ein Anzeichen auf eine unterschiedliche Wirkung zwischen Cäsium-Stress und Strahlungsstress auf Proteine und Nucleinsäuren wurde beim Vergleich der Expression von Genen sichtbar, die an der Zellabwehr und Detoxifikation beteiligt sind. Wie oben beschrieben, wurden zwar einige Gene genauso oder zumindest ähnlich durch beide Stressoren angeschaltet (zu Thio-redoxin, SOD, Extensin/extensin-like Proteine, Katalase/Peroxidase).

Im Gegensatz dazu wurden durch ionisierende Strahlen mit Aktivitäten von über  $20\text{Bq/cm}^3$  zusätzlich auch DNA-Reparatursysteme aktiviert, die durch Cäsium-133 (zumindest bei den hier verwendeten Konzentrationen) nicht induziert wurden.

Das Excisions-Reparatur Protein konnte dabei sowohl durch eine subtraktive cDNA-Bank gefunden, also auch durch RT-PCR bestätigt werden.

Mre11 – Bestandteil eines DNA-Rekombinations-Komplexes – wurde hingegen nachträglich mittels semiquantitativer PCR untersucht. Eine hoch signifikante Veränderung der Transkription konnte vor allem bei  $60\text{Bq/cm}^3$  (R3) gezeigt werden, was im Einklang damit steht, dass es mit Hilfe der subtraktive cDNA-Banken ( $30\text{Bq/cm}^3$ ) nicht gefunden werden konnte.

Bei beiden Genen – Mre11 und Excisions-Reparatur – war zudem ein ähnliches Expressionsverhalten in Abhängigkeit zur Aktivität zu beobachten, wobei die Mre11-Induktion zu höheren Aktivitäten hin verschoben schien (Abbildung 4-3).



**Abbildung 4-3 Vergleich des zeitlichen Verlaufs der relativen Induktionen der Gene für ein Excisions-Reparatur Protein und des Mre11Protein (Teil der Rekombinations-Reparatur)** Rückschlüsse auf die absolute Transkriptionsrate der einzelnen Gene dürfen nicht geschlossen werden, da zur Optimierung der semiquantitativen PCR unterschiedliche Konzentrationen an paw-Standard eingesetzt wurden

Beide Genprodukte dienen dazu, die häufigsten Schäden durch ionisierende Strahlen an der DNA zu korrigieren. Wie in Kapitel 1.4.2 beschrieben, treten hierbei besonders Einzel- und Doppelstrangbrüche auf, die hauptsächlich durch diese Systeme repariert werden. Doppelstrangbrüche sind dabei seltener und treten erst bei höheren Aktivitäten auf. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die anfängliche Repression des Mre11 Genes und Verschiebung zu höheren Aktivitäten sein.

Beim Menschen, aber auch in *Saccharomyces*, spielt Mre11 zudem bei der Kontrolle des Zellzyklus und der Anpassung an den G2/M-Block eine Rolle; die genaue Funktion ist jedoch noch unklar (Lee, 1998).

Zusammenfassend lässt sich auch auf Transkriptionsebene festhalten: Nucleinsäuren gelten als relativ strahlensensitiv, Proteine hingegen eher als resistent. Anhand der durchgeführten Experimente wirkten hohe Cäsium-Konzentrationen besonders auf Stabilität und Struktur von Proteinen, die ionisierende Strahlung hingegen eher auf die Nucleinsäuren.

Mögliche Auswirkungen auf Membranen konnten anhand des Transkriptionsmusters nicht festgestellt werden. Zwar zeigt sich eine verstärkte Synthese von zellwandspezifischen Proteinen, wie prolin-, glycinreichen Proteinen und Extensinen. Diese treten jedoch auch im Zusammenhang mit zahlreichen anderen biotischen und abiotischen Stressfaktoren auf; unter anderem konnte eine verstärkte Synthese bei Salzstress und Pathogenbefall nachgewiesen werden.

#### **Osmoregulation und Salzstress**

Kalium ist in biologischen Systemen das quantitativ wichtigste Kation und besitzt eine zentrale Funktion bei der Regulation des osmotischen Gleichgewichtes und des pH-Haushaltes in der Zelle. Es würde demnach nahe liegen, dass erhöhte Cäsium-Konzentrationen in der Umgebung auch zu Störungen des osmotischen Potentials der Zelle führen könnten. Unter anderem wurde bereits an den Erythrocyten des Frosches eine Störung des Wasserhaushaltes durch hohe Cäsiumkonzentrationen aufgezeigt (Ermakova, 1970).

Bei Pflanzen äußert sich Wasserstress primär anhand eines reduzierten Turgordruckes. Ein Vergleich der Kontrollpflanze und der Pflanze, die auf  $\geq 500\mu\text{M}$  cäsiumhaltigem Medium angezogen wurde (Kapitel 3.1), gab dabei einen ersten Hinweis. Es traten deutliche Welkeerscheinungen an den Blättern auf, aber auch das Wachstum von Blättern und vor allem der Wurzeln wurde bei höheren Konzentrationen zunehmend beeinträchtigt.

Auch hier zeigte sich ein deutlicher Unterschied im Antwortverhalten von *Arabidopsis* zwischen der Wirkung des Cäsiums nach Applikation größerer Mengen und der Behandlung mit geringen Konzentrationen an Radiocäsium als Strahlungsquelle.

Während durch Cäsium zahlreiche Enzyme hochreguliert werden, die direkt oder indirekt auf die Osmoregulation einwirken, konnten bei Radiocäsium-Applikation keinerlei Hinweise auf osmotischen Stress gefunden werden.

Dies lässt sich unter anderem anhand des Aminosäurestoffwechsels erläutern. Auf die durch Cäsium hervorgerufene Verlagerung zur Synthese von schwefelhaltigen Aminosäuren wurde bereits hinge-

wiesen (siehe S.127). Daneben scheint auch eine verstärkte Bildung des osmotisch-aktiven Prolins stattzufinden, was sich in der erhöhten Transkription des Genes der  $\Delta$ -1-Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthase äußerte. Es ist zwar nicht auszuschließen, dass dies mit der verstärkten Bildung von prolinreichen Zellwandproteinen zu erklären ist; eine Verbindung von Salzstress (vor allem an NaCl untersucht) und der gesteigerten Synthese von Prolin als Osmotikum gilt aber als gesichert (Yoshida *et al.*, 1997). Seine Schutzwirkung besteht in einer Vergrößerung des osmotischen Potentials der Zelle und in der Konkurrenz um die geladenen Gruppen von Membranen und Proteinen mit anderen gelösten Stoffen, vor allem Ionen. Durch die hohe Löslichkeit des Prolins können Proteine so vor Aussalzung geschützt werden. Die Kontrolle der  $\Delta$ -1-Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthase, dem Schlüsselenzym der Prolinsynthese, erfolgt dabei auch durch die Wasser- und Stickstoffverfügbarkeit (Kavi Kishor, 1995). Als ein mögliches Anzeichen für einen erhöhten Stickstoffbedarf der Zelle durch Stimulation der Aminosäuresynthese konnte die Induktion eines Nitrat-Transporters verstanden werden. Nitrat hat in der Zelle jedoch auch noch zahlreiche Funktionen; es ist z.B. indirekt wiederum bei der Kontrolle des Schwefelhaushaltes oder auch als Signalmolekül von Bedeutung.

Eine weitere Aminosäure, die über das Glutamin mit der Glutamat-Familie in Verbindung steht, das Asparagin, wird analog dazu durch Cäsium transkriptional gehemmt, was die Verschiebung zu einer verstärkten Prolin-Synthese aus Glutamat indirekt stützen könnte.

Bei den Radiocäsium-Experimente wurden ausschließlich zwei Enzyme des Aminosäure-Metabolismus identifiziert; beide sind am Abbau von Glutamat und den damit abgeleiteten Aminosäuren beteiligt.

Das Prinzip des Cäsium-bedingten osmotischen Stresses wurde aber auch durch andere Gene untermauert, unter anderem durch die Induktion des Transkriptionsfaktor Dreb2a (Liu *et al.*, 1998). Dieser bindet an so genannte DRE-Elemente von Promotoren und aktiviert so die Transkription der zugehörigen Proteine. Seine konstitutive Überexpression verleiht Stoffwechselprozessen durch Akkumulation bestimmter Genprodukte mehr Stabilität – und dadurch eine erhöhte Toleranz gegen Trocken-, Salz- oder Kältestress.

Dem DRE-System werden die Abscisinsäure (ABA)-abhängigen Gene gegenübergestellt (Bray, 1997), die ebenfalls durch Salz- und Trockenstress aktiviert werden. Eine erhöhte Produktion der ABA in Abhängigkeit zur Cäsium-Konzentration konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht direkt ermittelt werden. Über Signaltransduktionskaskaden ist nur sehr wenig bekannt; hierbei konnten nur einige wenige, noch unbestimmte Enzyme der zellulären Kommunikation und Transduktion identifiziert werden.

Zu den funktionalen Proteinen, die durch ABA oder DRE-Elemente gesteuert werden, zählen unter anderem einige Enzyme, die an der Biosynthese von osmotisch aktiven Substanzen (Kohlenhydrate, Aminosäuren) beteiligt sind, aber auch Proteasen, detoxifizierende Enzyme (SOD, Peroxidasen, Glu-

tation-S-Transferasen) und viele mehr. Auf die mögliche Akkumulation von Prolin und dessen Schutzfunktion bei Salzstress und osmotischen Stress wurde bereits eingegangen (vgl. S.129).

Das Dehydrin ERD15, ein Mitglied der LEA-Familie, ist ebenso in diese Reihe zu stellen. Es handelt sich um nicht enzymatisch-aktive Polypeptide, die jedoch eine hohe Effizienz beim Schutz von Proteinen und Membranen besitzen (Close, 1997). Sie wurden nach Wassermangel und Salzstress identifiziert und treten verstärkt als Schutzproteine bei der Austrocknung von Embryonen während der Samenreifung auf.

Die genaue Aufgabe des Osmotins ist nicht geklärt. Es besitzt wohl Abwehrfunktion bei Pathogenbefall und wird daher zu den PR-Proteinen gerechnet. Unter anderem über ABA induziert, wurde aber auch eine erhöhte Konzentration an Osmotin in der Zelle nach Salzbelastungen oder Trockenstress gefunden. Wie bei vielen anderen bereits aufgeführten Proteinen ist auch hier eine eindeutige Funktionsbestimmung nicht möglich, da es sich um unspezifische Stressantworten auf mehrere Stressoren handelt. Die Osmotine unterliegen zudem einer posttranskriptionalen Kontrolle (La Rosa *et al.*, 1992). Die Bildung des Proteins ist von der Expression des Genes zu unterscheiden, was eine Diskussion über die Auswirkungen der Cäsium-bedingten Induktion des Osmotin Präcursor-Genes weiter erschwert.

Aquaporine sind membrandurchspannende Wasserkanäle, die an der Plasmamembran (PIP) oder dem Tonoplasten (TIP) lokalisiert sein können. Im Unterschied zur Diffusion des Wassers durch die Lipidschicht ist der Transport über die Aquaporine durch eine hohe Wasserleitfähigkeit gekennzeichnet. Sie dienen dazu, osmotische Unterschiede zwischen Symplast und Apoplast schnell auszugleichen. Unter Stressbedingungen muss die Wasserpermeabilität dem veränderten osmotischen Gradienten über der Plasmamembran angepasst werden.

In der Regel nimmt bei Salzstress – und den damit verbundenen Veränderungen des Wasserpotentials – auch die Expressionsrate der Aquaporine ab, um einen kurzfristigen Wasserverlust durch Ausstrom in das extrazelluläre Medium zu minimieren. Dieses Phänomen ist jedoch nicht einheitlich und variiert zwischen verschiedenen Pflanzenarten und Stressbedingungen (Yamada, 1997; Aharon, 2003). Generell wird aber von einer Koregulation zwischen Nährstoffaufnahme und Wasserpermeabilität ausgegangen (Hasegawa *et al.*, 2000). Es stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob eine verminderte Transkription von Aquaporin-kodierenden Genen dann nicht ebenso als Folge einer verringerten Kalium-Aufnahme in die Wurzel gedeutet werden kann: Koregulation von Kaliumverfügbarkeit/Nährstoffaufnahme und Wassertransport. Dies würde des Weiteren auch die Verminderung des Wachstums und die Welkeerscheinungen der Blätter bei hohen Cäsium-Konzentrationen erklären.

Im Unterschied zu einigen bisher durchgeführten NaCl-Untersuchungen (Kawasaki *et al.*, 2001), erreichte unter Langzeit-Cäsiumstress die Expressionsrate – zumindest bei Aquaporin PIP2b – auch nach mehreren Wochen nicht das Niveau der Kontrollpflanzen. Dies lässt vermuten, dass CsCl zwar dieselben Symptome wie NaCl hervorruft, jedoch eine Stressvermeidung nicht auf gleiche Art und

Weise – z.B. über Aktivierung von speziellen Natrium-Transportern und Kompartimentierung der Ionen – von der Pflanze erreicht werden kann. Vielmehr kam es anscheinend zu einer ständigen Verschärfung des Stresses im Laufe der Zeit durch Akkumulation des Cäsiums (vgl. auch die konstant steigende Transkriptionsrate von SOD, GST etc.)

Dafür würde auch die Entdeckung von Nagata (1988) sprechen, dass salztolerante Bakterien durch Cäsium im Wachstum gehemmt werden, nicht aber durch Natrium oder andere Alkalimetalle.

Deutlich wurde zudem, dass Cäsium wesentlich stärker als NaCl auf die Pflanze wirkte. Während die Pflanzen bei einer Cäsium-Konzentration von 1mM (25% MS-Medium) nicht mehr lebensfähig waren, sind bei Salzstressuntersuchungen Konzentrationen von 100-200mM an NaCl durchaus üblich.

In den Radiocäsium-Experimenten konnte keine Änderung der Transkriptionsrate des PIP2b oder anderer Aquaporine festgestellt werden.

Die Auswirkungen der Geninduktion einer Protonen-Pumpe der Plasmamembran sind schwer zu interpretieren, da der Einfluss auf zelluläre Vorgänge sehr weit gefächert sein kann. Unter anderem sind sie an dem Transport von Ionen, Aminosäuren und Zuckern (Osmolyte) in die Zelle, aber auch an der Einstellung des pH-Wertes beteiligt. Eine Akkumulation von H<sup>+</sup>-ATPasen an Tonoplast und Plasmamembran konnte bereits direkt mit NaCl-Applikation in Verbindung gebracht werden (Binzel, 1995).

Auch die Regulation der Ionenhomöostase durch Ca<sup>2+</sup>-Ionen bei Salzbelastung bzw. eine Verbindung zwischen osmotischer Adaptation der Pflanze und erhöhtem cytosolischem Ca<sup>2+</sup>-Spiegel wird diskutiert (Knight *et al.*, 1997). In diesem Zusammenhang wurden durch Cäsium z.B. ein Gen des Annexin, ein Calcium-abhängiges Membranprotein, und ein putatives Ca<sup>2+</sup>-bindendes Protein nach Cäsium-Behandlung in der Zelle induziert. Deren Funktionen sind jedoch nicht näher bekannt, sie könnten aber durchaus Signalfunktion bei der Stressantwort besitzen. Es wäre interessant, sich Calcium-Kanäle und das Verhalten ihrer Expression bzw. den SOS-Signaltransduktionsweg in *Arabidopsis* nach einer Cäsium-Behandlung näher anzusehen.

Da das Cäsium stärker als andere Alkalimetalle ein unmittelbarer Konkurrent des Kaliums in der Zelle ist, liegt es nahe, den Cäsium-Stress als Kaliummangel-Syndrom zu sehen. Auch die Tatsache, dass die interne Kalium-Konzentration mit dem Cäsium abnimmt und durch erhöhte Kalium-Konzentrationen im Medium die Cäsium-Toleranz der Pflanze steigt, spricht für diese Interpretation. Wie sich an der Stressantwort von *Arabidopsis thaliana* gezeigt hat, waren daneben aber auch die direkten Schädwirkungen des Cäsiums von Bedeutung.

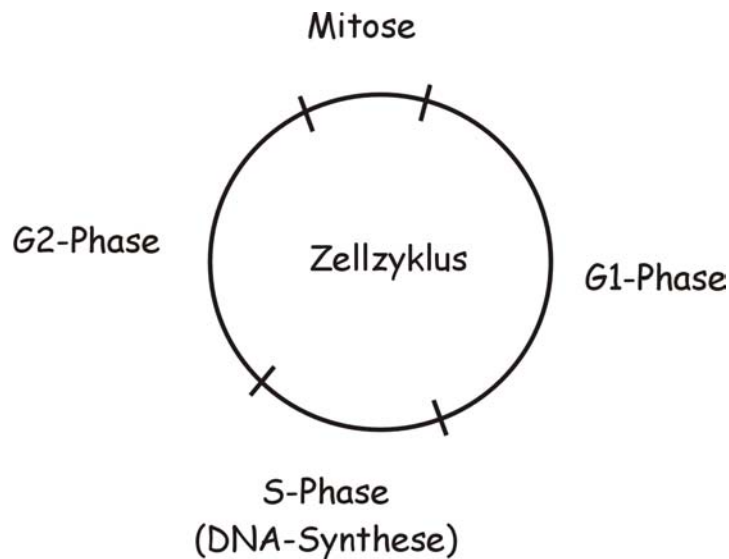


### Auswirkungen auf den Zellzyklus und das Cytoskelett

In diese Gruppe fallen ausschließlich Gene, die durch ionisierende Strahlung beeinflusst wurden. Es handelt sich um Enzyme oder Strukturproteine, die direkt oder indirekt an dem Zellzyklus beteiligt sind.

Bereits in der Einleitung wurde die Verbindung von ionisierender Strahlung und dem Zellzyklus angesprochen. Während die Funktion des Zellzyklus-kontrollierenden *crn*-like Proteins in Pflanzen noch nicht näher bestimmt werden konnte, ist das CyclinB1 zusammen mit den cyclin-abhängigen Proteinkinasen essentiell für den Ablauf der Zellteilung. Erst in Verbindung mit Ubiquitin-vermitteltem Abbau tritt die Zelle in die G1-Phase des Zellzyklus ein. Die G1-Phase ist dabei die Zeit, in der die Zelle wächst und ihre Stoffwechselprozesse ablaufen; die G2-Phase dient der Vorbereitung auf die Mitose (Abbildung 4-4).

Eine eindeutige Aussage, ob eine Verzögerung oder eine Beschleunigung des Zellteilungszyklus aufgrund schwach-radioaktiver Strahlung stattfand, kann auch anhand dieser Ergebnisse nicht gemacht werden. Es ist zwar beobachtet worden, dass geringe Strahlendosen positive Effekte auf Organismen haben können (Hormesis-Effekt), diese Thesen sind aber nach wie vor umstritten (Sagan, L; Wolff, S., 1995).



**Abbildung 4-4** Schematische Darstellung des Zellzyklus

Erwiesen ist hingegen, dass nach Röntgen- oder Gammabestrahlung aufgrund von Reparaturprozessen die G2-Phase bei teilungsfähigen Zellen verlängert wurde (Evans, L. and Van't Hof, J., 1975). Erst vor kurzem ist es gelungen, in *Arabidopsis thaliana* ein strahlungsinduziertes Gen zu entdecken, dessen Produkt AtGR1 den Ablauf der G2/M-Phase verzögerte (Deveaux, in press).

Ob das CyclinB in Eukaryonten auch an der Kontrolle des Übergangs der G2-Phase in die Mitose beteiligt ist, ist noch nicht bekannt. Sicher ist jedoch, dass durch CyclinB-Akkumulation die Zellen in einem G2/M-Block arretiert werden und die Mitose nicht abschließen können.

Dies lässt vermuten, dass eine verstärkte Synthese nach Radiocäsium-Behandlung in Zusammenhang mit einer Verzögerung der Zellteilung steht, um dadurch der Zelle mehr Zeit für die Reparatur von DNA-Schäden zu geben. Dies würde auch durch die Induktion der Gene für Mre11 und des Excisions-Reparatur Proteins unterstützt werden.

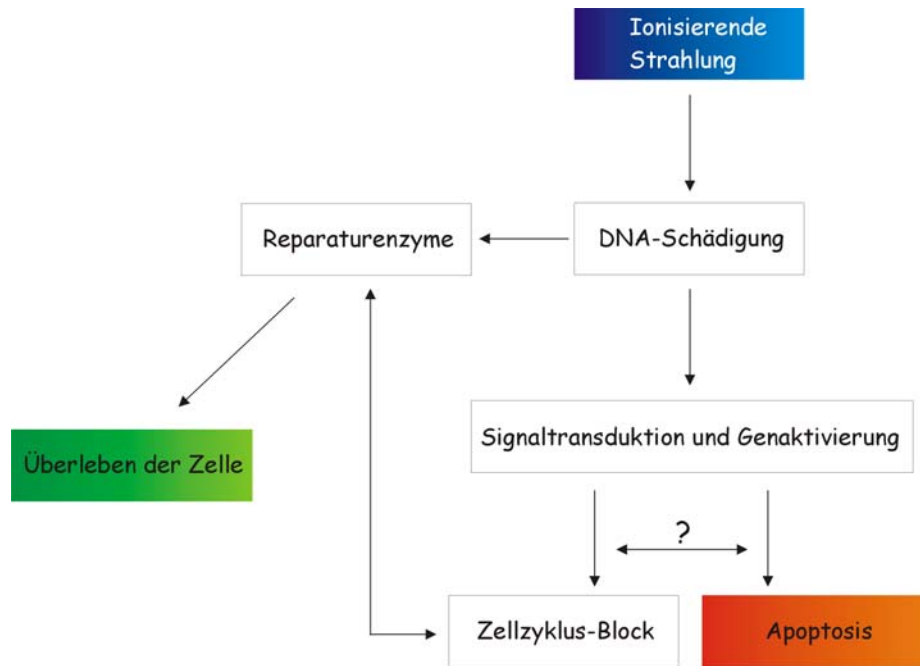
Die bisherigen Forschungsergebnisse dazu sind schwer zu deuten und zum Teil widersprüchlich. So wurde bei DNA-Schädigung zwar eine Akkumulation des CyclinB1-Proteins nachgewiesen, nicht aber eine Erhöhung des Proteinkinase-Levels. Im Gegensatz dazu war aber bei einer Bestrahlung mit hohen Dosen der Transkript-Level des CyclinB1 reduziert (Thomas *et al.*, 1998).

Bei der Kontrolle des Ablaufs der Zellteilung spielen eine Vielzahl zusätzlicher Mechanismen eine Rolle. So ist eine Voraussetzung für den Eintritt der Zelle in die Mitose die Aktivierung des Cyclin/Proteinkinase-Komplexes durch Dephosphorylierung (Strausfeld *et al.*, 1991). In zahlreichen Veröffentlichungen wird zudem dem p53-Protein eine Schlüsselrolle bei der Blockierung der Mitose aufgrund von DNA-Schäden und der Kontrolle der Apoptose eingeräumt (Matsamura and Ananthaswamy, 2002). Wie alle Regulatoren bei dem Ablauf des Zellzyklus zusammenspielen, ist noch nicht gänzlich geklärt (vor allem bei eintretenden Störungen z.B. durch Schäden an der DNA oder des Spindelapparates).

Eine Steigerung der Apoptose durch ionisierende Strahlen konnte nicht nachgewiesen werden. Im Gegenteil, es liegen eher Hinweise dafür vor, dass ein bax-Inhibitor-1 ähnliches Protein induziert wurde (Xhu and Reed, 1998). Dass Bax und andere p53-abhängigen Gene eine wichtige Rolle bei Kontrolle des programmierten Zelltodes haben, ist mehrfach beschrieben worden (Mullauer *et al.*, 2003). Ebenso wurde gezeigt, dass niedrige Dosen ionisierender Strahlung bei Mäusen eine radioadaptive Suppression der Akkumulation von p53 und Bax bewirken können (Wang and Onishi, 1997; Yonezawa, 1990).

So spricht einiges dafür, dass bei geringen Strahlendosen die Apoptose unter Bevorzugung von Reparaturmechanismen durch transkriptionale (p53/Bax-Suppression) oder posttranslationale (bax-Inhibitor1-Induktion) Regulation gehemmt sein könnte (Abbildung 4-5).

Um gesicherte Aussagen über die Vernetzungen von Zellzyklus-Kontrolle und Apoptosis im Zusammenhang mit schwacher Gammastrahlung bei *Arabidopsis thaliana* machen zu können, müssten jedoch noch weitere Untersuchungen, v.a. des Transkriptionsverhalten von p53-homologer Proteine, durchgeführt werden.



**Abbildung 4- 5 Vorgänge in einer Säugerzelle nach Strahlenwirkung**

Auch Gene, die für eine Tubulin-Untereinheit kodieren, und andere Proteine, die auf die Actinmodulation einwirken, werden durch Radiocäsium stimuliert. Ob diese mit der Zellteilung in Verbindung stehen, ist unklar, da ihre Funktionen in der Zelle sehr breit gestreut sind. Actine sind vor allem an Bewegungen (Cytoplasmaströmungen) innerhalb der pflanzlichen Zelle beteiligt, die Microtubuli zusammen mit tubulin-assoziierten Proteinen eher an der strukturellen Stabilisierung und an der Zellteilung (CyclinB1 ist ebenfalls Tubulin-gebunden; Jackman *et al.*, 1995).

Unter verschiedenartigen Stressbedingungen kann die Aktin-Polymerisation gehemmt sein (Morelli, 1998; Gulick and Dvorak, 1992). Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit durch die Entdeckung der Induktion von Profilin und eines putativen Actin-depolymerisierenden Faktors durch Radiocäsium ebenfalls festgestellt werden. Es scheint deutlich zu werden, dass durch den Stressor eine verstärkte Reorganisation des Cytoskelettes stattfindet, ohne dass die Bedeutung und mögliche Folgen für die Zelle geklärt werden konnten.

Ein einziges Gen wurde durch Cäsium-133 beeinflusst; es kodiert für Actin2 und wird nach Ergebnissen der SSH durch erhöhte Cäsium-Konzentrationen reprimiert. Ob dies ähnlich wie bei Radiocäsium in Zusammenhang mit einer Reorganisation des Cytoskelettes steht, sollte durch weitere Versuche überprüft werden. Es ist nicht auszuschließen, dass damit die beobachtete Verringerung des Wurzelwachstums oder eine verminderte cytoplasmatische Beweglichkeit verknüpft sein könnte.

### Weitere Ergebnisse

Auf die zahlreichen anderen Gene, die mit Hilfe der subtraktiven Banken gefunden werden konnten, soll hier nicht im Einzelnen eingegangen werden, da ihre Funktionen nicht bekannt sind oder keine direkte Verbindung zu den beiden Stressoren erkennbar war. Es handelt sich um unspezifische Stressantworten der Zelle, die durch biotischen Stress und durch zahlreiche abiotische Stressfaktoren ebenso ausgelöst werden. Aber auch Gene aus der Gruppe der zellulären Kommunikation und Signaltransduktion bzw. der Gruppe der unbekannt Proteine sind darunter.

Auf die verstärkte Synthese von Zellwandproteinen, wie prolin-, glycinreiche Proteine und Extensine, wurde bereits hingewiesen. Andere Proteine wie Chitinasen,  $\beta$ -1,3-glucanase Präcursor oder PR-Proteine verdeutlichen ebenfalls die Quervernetzung der Stressoren Cäsium und Radiocäsium mit anderen Stressfaktoren.

Über die verschiedenen Transkriptionsfaktoren und regulatorischen Proteine lässt sich nichts Genaues aussagen. Es verwundert jedoch nicht, dass unter anderem putative Elemente des Entwicklungszyklus der Pflanze, wie z.B. RNA-bindende Proteine, Ap2-Domäne-TF oder hat7-TF, durch Cäsium beeinflusst wurden. Das Entwicklungsprogramm von Pflanzen ist in der Regel sehr variabel angelegt, wodurch entsprechend häufig regulatorische Proteine der Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse an der Biosynthese von Schutzproteinen des Stoffwechsels vor Stressoren beteiligt sind. Wie bereits angedeutet, ist zum Beispiel bei der Samenreife die zeitweise Austrocknung des Organismus ein natürliches Phänomen.

In Bezug auf den Sekundärmetabolismus ist noch kein umfassendes Bild erkennbar. Es deutete sich aber an, dass die Bildung von Sekundärmetaboliten bei Cäsium-Behandlung heruntergefahren wurde. So waren zwei Gene der Terpen-Biosynthese (Limonen-Cyclase, Cycloartenol-Synthase) eindeutig reprimiert. Die Steuerung der Synthese von Flavanoiden, Stilbenen und Cinnapinsäuren wird negativ über den AtMyb4 Transkriptionsfaktor gesteuert. Die Transkriptionsrate dieses TF wurde nicht über die SSH-Experimente gefunden, sondern unabhängig davon untersucht. Auch wenn die Unterschiede in der Transkription signifikant waren, konnte kein eindeutiges Ergebnis ermittelt werden, da die Versuche zwischen semiquantitativer PCR und quantitativer RT-PCR voneinander abwichen: Während die paw-PCR eine zeit- und konzentrationsabhängige Induktion zeigte, waren die Resultate der Taqman-PCR uneinheitlich (Abbildung 3-42). Es konnte nur bei Cäsiumkonzentrationen von 300 $\mu$ M in beiden Versuchsansätzen gleichermaßen eine Induktion nachgewiesen werden. Dies würde zu einer Repression der oben aufgeführten Stoffwechselwege führen. Hier müssten jedoch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um gesicherte Resultate zu erreichen.

Bei ionisierender Strahlung konnten keine Enzyme identifiziert werden, die am Sekundärmetabolismus beteiligt sind. Die Transkriptionsrate der Limonen-Cyclase jedenfalls war in den Radiocäsium-Experimenten nicht signifikant verändert (Abbildung 3-45).

Der Energiehaushalt und die Translation wurden ebenfalls durch Cäsium und Radiocäsium beeinflusst. Was einzelne ribosomale Proteine und deren Einfluss auf die Translation betrifft, ist erst wenig bekannt; auf die Folgen für den Organismus konnten daher keine Rückschlüsse gezogen werden.

Ebenfalls nicht zu klären war, ob die verstärkte Transkription eines Schlüsselenzyms der Glycolyse, der GAPDH, auf einen gesteigerten Energie-Bedarf der Zelle oder auf die verstärkte Bereitstellung von Aminosäuren zurückzuführen ist, die sich aus Zwischenprodukten dieses Stoffwechselweges ableiten. Ein Anzeichen für den gesteigerten Energie-Bedarf wäre, dass auch Enzyme der Atmungskette durch Cäsium- und Radiocäsium-Stress überexprimiert wurden. Für die Bereitstellung von Stoffwechselzwischenprodukten spräche die verstärkte Transkription der Anthranilat-Synthase (Tryptophan aus Phosphoenolpyruvat) oder der Acetylserin-Thiolyase (Cystein aus 3-Phosphoglycerat). Inwieweit die Repression eines Isocitrat-Dehydrogenase (IDH)-ähnlichen Genes in diesem Zusammenhang steht, darüber kann nur spekuliert werden; denn es war zum Beispiel nicht nachvollziehbar, ob es sich hierbei um eine cytoplasmatische oder mitochondriale IDH handelt und welche Rolle die verschiedenen Isoenzyme bei der Bereitstellung von Stoffwechselzwischenprodukten bzw. der Energiegewinnung spielen.

Trotz einiger Gemeinsamkeiten in der Stressreaktion von *Arabidopsis thaliana* auf Cäsium- bzw. Radiocäsium-Behandlung überwogen auf Transkriptionsebene jedoch die Unterschiede. Hauptgründe hierfür lagen in den Auswirkungen der ionisierenden Strahlung und in den bereits erwähnten deutlich unterschiedlichen Konzentrationen an eingesetztem Cäsium (Faktor  $10^{-6}$ ). Die Ergebnisse der Experimente sollen nochmals zusammenfassend anhand einer Graphik (Abbildung 4-6) gegenübergestellt werden:

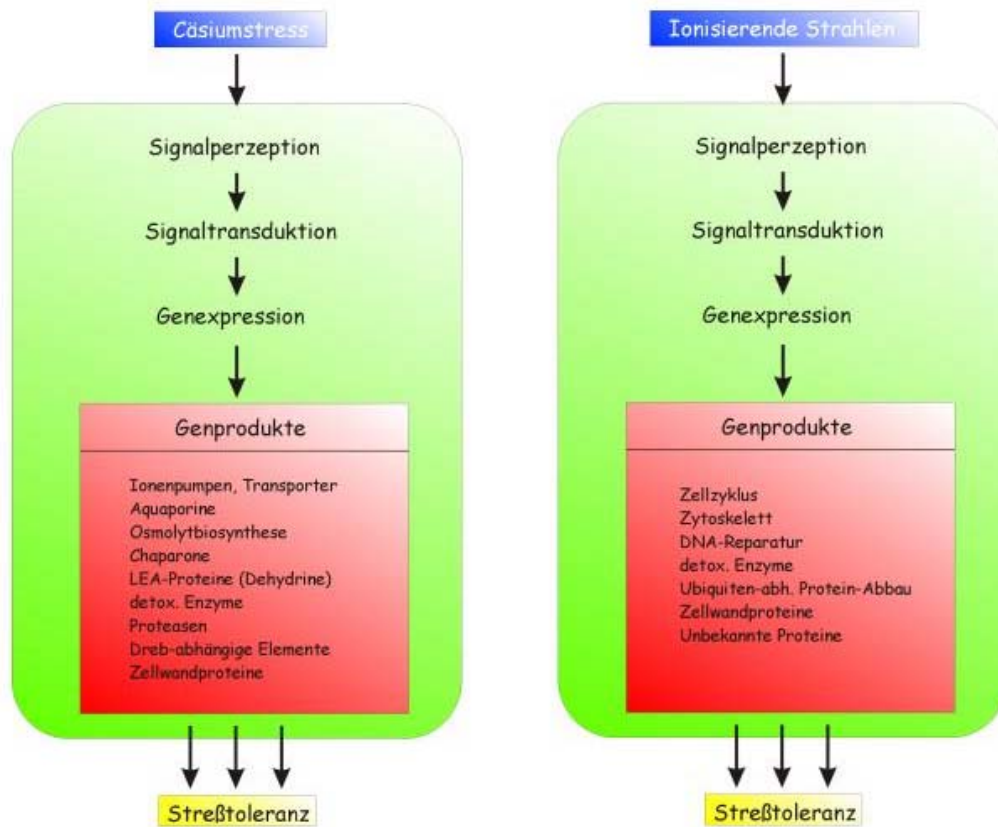


Abbildung 4-6 Vergleich Cäsium und ionisierende Strahlung

Es ließ sich zeigen, dass Cäsium-Stress zahlreiche Symptome des Salz- und Trocken-Stresses aufwies. Die Synthese von Osmolyten als Schutzproteine und zur Anpassung des osmotischen Potentials bzw. die Reaktionen zur Wiederherstellung der Ionenhomöostase stehen in diesem Zusammenhang. Für weitere Faktoren, wie die Rolle des Abscisinsäure (ABA)-Spiegels – ebenfalls ein wichtiges Signal bei Salzstress – lagen indirekte Anhaltspunkte vor, da einige der gefundenen Moleküle wohl ABA-abhängig kontrolliert werden. Dem war der Dreb-abhängige (bzw. ABA-unabhängige)-Weg und die Induktion der Dreb-Transkriptionsfaktoren gegenüberzustellen. Auf die Ionenhomöostase und die Adaptation des Kalium-Haushaltes werden im Folgenden noch näher eingegangen.

Wie bei einer Salzbelastung durch NaCl, waren auch bei Cäsium-Behandlung typische phänotypische Schadbilder an der Pflanze zu erkennen. Das reduzierte Wachstum von Wurzeln und Blätter aufgrund verminderten Zellstreckungswachstums oder die nekrotischen Veränderungen und Welkeerscheinungen an den Blättern sind hierbei zu nennen.

Auf der anderen Seite standen die Effekte der ionisierenden Strahlung, die sich vor allem an der Entgiftung von Radikalen und der Reparatur von Schäden an Nucleinsäuren widerspiegeln, jedoch keine

Symptome von osmotischem Stress oder Proteinschädigung zeigten. Außerdem wurden wohl direkt Zellteilung und Zellzyklus durch die radioaktive Strahlung beeinflusst.

Gemeinsamkeiten in der Stressantwort von ionisierender Strahlung und erhöhten Cäsium-133 Konzentrationen konnten lediglich im Hinblick auf die Zellwandprotein-Synthese und anhand einiger antioxidativer Enzyme gefunden werden. In der Störung des Redoxgleichgewichtes zeigte sich auch die Verknüpfung von Cäsium-133 und Radiocäsium mit einer Vielzahl von anderen Stressoren, wie Pathogenbefall, Kältestress, Schwermetallbelastung, Ozon-Exposition oder UV-B-Strahlung, die ebenfalls oxidativen Stress auslösen (Wojitaszek, 1997; Allen, 1995; Dat et al., 2000; Surplus et al., 1998).

Bei gleichzeitiger Behandlung mit beiden Stressfaktoren ( $150\mu\text{M}$  Cäsium-133,  $20\text{Bq/cm}^3$  Cäsium-134) wurden alle untersuchten Gene analog der Reaktion auf einen einzelnen Stressor transkribiert. Schwache synergistische Effekte traten nur bei den Genen des oxidativen Stresses auf; die Zellwandproteine konnten nicht durch RT-PCR analysiert werden.

#### **Kalium-Aufnahmesysteme**

Von besonderem Interesse im Zusammenhang mit Cäsiumstress ist eine Analyse der Kalium-Aufnahmesysteme. Um der Frage nachzugehen, ob das Aufnahmeverhalten von Cäsium in die Pflanze durch eine veränderte Transkription einiger dieser Systeme beeinflusst wird, wurden verschiedene Transport-Mutanten miteinander verglichen.

Hauptziel der Pflanze bei zunehmender Belastung durch Cäsium ist es, die Ionenhomöostase und das Membranpotential der Zellen wiederherzustellen. Dieses Ungleichgewicht könnte zum einen durch Transport des Cäsiums in die Vacuole oder in den Apoplasten umgangen werden. Gleichzeitig werden Kalium und andere osmotische aktive Substanzen in die Zelle transportiert oder neu synthetisiert. Besondere Bedeutung hat dabei der Kaliumhaushalt, weswegen die Pflanzen auch über eine Vielzahl unterschiedlicher Kalium-Transportsysteme verfügen, welche sich nach Energieabhängigkeit, Affinität und Selektivität voneinander unterscheiden (vgl. Einleitung).

Als Anpassung an den gut untersuchten NaCl-Stress (Hasegawa *et al.*, 2000) wird der Transport des Natriums in die Vacuole durch energieabhängige Transporter gefördert, was zu einem erhöhten ATP-Verbrauch in der Zelle führt. Weitere Möglichkeiten sind der Transport des Kations zurück in den Apoplasten oder in das Xylem (und damit in den Stängel und die Blätter).

Im Gegensatz dazu besitzt die Pflanze für Cäsium keine oder nur wenige Möglichkeiten, die schädigenden Ionen durch spezielle Abgabesysteme gezielt aus der Zelle herauszuschleusen. Es stehen keine

eigenen Transporter wie bei Natrium zur Verfügung, sondern nur indirekte Wege, über die Transportsysteme des Kaliums. Ein Ionenausgleich ist daher sehr viel schwieriger als bei NaCl-Stress herstellbar und vermutlich nur auf Kosten des Kaliumgehaltes zu erreichen (Abbildung 3-4). Die Pflanze könnte den Cäsium-Einstrom in die Wurzel nur durch verstärkte Expression sehr selektiver Kanäle oder durch Modifikation der Aufnahmesysteme vermindern.

Die Ergebnisse der Expressionsanalysen einiger ausgewählter Kalium-Transporter und -Kanäle im Wildtyp zeigten, dass nur ein Kanal nach Cäsium-Applikation signifikant erhöht transkribiert wurde. Es handelt es sich hierbei um den outward-rectifying Kanal KCO, der vor allem für einen Heraustransport des Kaliums aus der Zelle verantwortlich ist; je nach Gradientenverteilung kann er aber auch als Aufnahmesystem fungieren. Durch In-situ PCR wurde festgestellt, dass der Kanal – analog zu allen anderen im Rahmen der Arbeit untersuchten Kanälen und Transportern – gleichmäßig über den gesamten Wurzelquerschnitt exprimiert wird. Ob KCO eher am Tonoplasten bzw. an der Plasmamembran lokalisiert oder im Bereich des Xylems konzentriert ist, konnte aufgrund der geringen Auflösung dieser Methode nicht nachgewiesen werden.

Auch ein Vergleich einiger bekannter Arabidopsis-Mutanten brachte keinen Aufschluss. Weder die Überexpression eines KAT-Transporters noch die Repression eines SKOR-Kanals hatten Auswirkungen auf die Cäsium-Konzentration in den Blättern. Eine Mutante, bei der der AKT1 Kanal ausgeschaltet war, zeigte eine erhöhte Sensitivität gegenüber Cäsium. Bei einer externen Konzentration von 250µM waren die Keimlinge nicht mehr lebensfähig. Unterhalb davon war das Cäsium-Aufnahmeverhalten von akt1 und Wildtyp jedoch gleich.

Einziges Anzeichen eines veränderten  $K^+/Cs^+$ -Verhältnisses lieferte die csi52-Mutante. Wie in Abbildung 3-5 dargestellt, ist die Cäsiumkonzentration in der Mutante leicht verringert. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass diese Mutante wesentlich resistenter als der Wildtyp gegenüber Cäsium ist (Sheahan *et al.*, 1993); die Ursachen hierfür sind jedoch unklar. Möglicherweise ist diese Toleranz auf eine verminderte Cäsium-Aufnahme zurückzuführen.

Mit Hilfe von Patch-Clamp-Untersuchungen wurde von Maathuis und Sanders (1996) gezeigt, dass sowohl die „High-Affinity“- als auch die „Low-Affinity“-Kaliumaufnahme bei csi52 reduziert waren. Dies war – so wurde angenommen – wohl eher auf eine geringere Aktivität der Kanäle aufgrund von Modifikationen im Öffnungsmechanismus oder eine veränderte Spannungsabhängigkeit zurückzuführen, als in einer Reduktion des Expressionslevels. Auf die hemmende Wirkung des Cäsiums auf Kalium-Kanäle soll hier nochmals hingewiesen werden (vgl. Kapitel 1.2).

Ein Vergleich des Transkriptionsmusters von Wildtyp und csi52-Mutante zeigte, dass die untersuchten Transporter und der spannungsunabhängige Kanal ACBK1 unter Stressbedingungen in beiden



Pflanzen gleich stark exprimiert wurden. Auf der anderen Seite war aber die Transkription einiger spannungsabhängiger Kanäle in der Mutante erheblich gesteigert.

Durch Modellierung des Cäsium-Einstromes in die Wurzel-Zelle wurde von White und Broadley, (2000) gefordert, dass ein Großteil des Cäsiums unter natürlichen Bedingungen über die spannungsunabhängigen Kanäle und die Transporter aufgenommen wird. Falls letztere nur in geringer Anzahl in Wurzelzellen auftreten (Maathuis and Sanders, 1994), würde die Hauptlast den spannungsunabhängigen Kanälen zufallen. Die spannungsabhängigen Kanäle tragen mit 8-14% nur einen relativ geringen Beitrag dazu bei. AKT1 ist dabei der wichtigste Kaliumkanal, was auch für die hohe Sensitivität der akt1-Knockout-Mutante gegenüber Cäsium sprechen würde.

Es stellte sich nun die Frage, ob dies auch Rückschlüsse auf die Beobachtungen bei *csi52* – gesteigerte Transkriptionsrate einiger Kanäle, bei gleichzeitiger leichter Reduktion der intrazellulären Cäsium-Konzentration – zuließe. Durch eine Überexpression einiger spannungsabhängiger Kanäle würde vermutlich die Dichte dieser Kanäle in der Zellmembran gesteigert werden und gleichzeitig würden die spannungsunabhängigen Kanäle – welche nur eine sehr geringe Selektivität besitzen – an Bedeutung verlieren. Die Ionen-Aufnahme wäre dadurch zugunsten des Kaliums verschoben: verringerte Aufnahme des Cäsiums durch den höheren Anteil an selektiven Aufnahmesystemen. Eine erhöhte Kalium-Konzentration in *csi52*-Blättern im Vergleich zum Wildtyp konnte in diesem Zusammenhang jedoch nicht festgestellt werden.

Umgekehrt fand parallel dazu keine Abnahme der Transkription des spannungsunabhängigen Kanals in der Mutante statt. Man musste daher annehmen, dass diese nach wie vor in gleicher Anzahl in der Zellmembran vorhanden waren, weswegen die Cäsium-Konzentration in den Wurzeln auch nur wenig zurückgehen sollte.

Es handelt sich hierbei nur um theoretische Überlegungen, und es noch nicht geklärt, ob z.B. ein erhöhter Expressionslevel auch unmittelbar eine erhöhte Proteinkonzentration zur Folge hat. Auch konnte im Rahmen der Arbeit nur ein Teil aller bekannten Kalium-Transporter und -Kanäle untersucht werden und weiterhin ist nicht auszuschließen, dass modifikatorische Veränderungen eines oder mehrerer Kanäle eine erhöhte Selektivität und damit eine größere Resistenz der Pflanze gegenüber Cäsium zur Folge haben.

Zum besseren Verständnis der Aufnahme und zur Überprüfung der Überlegungen sollte die Auswirkungen der Geninduktion der verschiedenen Aufnahmesysteme auf die interne Cäsium-Konzentration untersucht werden. In ersten Versuchen wurden im Rahmen der Arbeit bereits Mutanten zu synthetisiert, die Gene für die Kanäle ATKC und KCO überexprimierten. Mit Hilfe der RNA-Interferenz-Methode sollte das Gen eines CaM-regulierten Kanals ACBK1 ausgeschaltet werden (vgl. Kapitel

3.6); die post-transkriptionale Repression des KCO-Kanals schlug fehl, da von den entsprechend behandelten Pflanzen keine Samen geerntet werden konnten.

Auch die anderen synthetisierten Mutanten konnten nicht mehr analysiert werden. Die Pflanzen starben aufgrund von Kontaminationen ab bzw. einige positive Keimlinge wuchsen nach Umsetzen auf Erde nicht an. Ein Wiederholungsversuch war zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen.

Dennoch: es konnte anhand der *csi52*-Mutante zum erstenmal gezeigt werden, dass möglicherweise ein direkter Zusammenhang zwischen Cäsium-Toleranz, verringerter Cäsium-Aufnahme und einer veränderten Transkriptionsrate bestimmter Kalium-Kanäle bestehen könnte. Dieser Erkenntnis sollte dringend in weiterführenden Projekten nachgegangen werden; mit der Synthese der Transformanden ist die Grundlage für zukünftige Studien bereits gelegt worden.

**5. Literaturverzeichnis**

- Absalom, J. P., Young, S. D., Crout, N. M. J., Nisbet, A. F., Woodman, R. F. M., Smolders, E. & Gillett, A. G. (1999). Predicting Soil to Plant Transfer of Radiocesium Using Soil Characteristics. *Environ. Sci. Technol.*, **33**(8), 1218-1223.
- Aharon, R., Shahak, Y., Wininger, S., Bendov, R., Kapulnik, Y. & Galili, G. (2003). Overexpression of a Plasma Membrane Aquaporin in Transgenic Tobacco Improves Plant Vigor under Favorable Growth Conditions but Not under Drought or Salt Stress. *The Plant Cell*, **15**, 439-447.
- Aharoni, C., Pasricha, N. S. & Sparks, D. L. (1992). Adsorption and Desorption Kinetics of Cesium in an Organic Matter-Rich Soil Saturated with Different Cations. *Soil Science*, **156**(4), 233-239.
- Akashi, T., Aoki, T. & Ayabe, S. (1999). Cloning and functional expression of a cytochrome P450 cDNA encoding 2-hydroxyisoflavanone synthase involved in biosynthesis of the isoflavonoid skeleton in licorice. *Plant Physiol.*, **121**(3), 821-828.
- Alberts, B. Bray, D., Lewis, J., Raft, M., Roberts, K. & Watson, J.D. (1995). *Molekularbiologie der Zelle*. VCH, Weinheim.
- Albinsky, D., Masson, J. E., Bogucki, A., Afsar, K., WVass, I., Nagy, F. & Paszkowski, J. (1999). Plant response to genotoxic stress are linked to an ABA/salinity signaling pathway. *The Plant Journal*, **17**(1), 73-82.
- Allen, R.D. (1995). Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol.*, **107**, 1049-1054.
- Alonso, J. M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S. & Ecker, J. R. (1999). EIN2, a Bifunctional Transducer of Ethylene and Stress Response in *Arabidopsis*. *Science*, **284**, 2148-2152.
- Alscher, R.G., Erturk, N. & Heath, L.S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.*, **53**(372), 1331-1341.
- Alvarez, M. E., Pennell, R. I., Meijer, P.-J., Ishikawa, A., Dixon, R. A. & Lamb, C. (1998). Reactive Oxygen Intermediates Mediate a Systematic Signal Network in the Establishment of Plant Immunity. *Cell*, **92**, 773-784.
- Anderson, J. A., Huprkar, S. S., Kochian, L. V., Lucas, W. J. & Gaber, R. F. (1992). Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3736-3740.
- Arpin, M., Reboud, A. M. & Reboud, J. P. Conformational changes of large ribosomal subunits of rat liver, induced by some monovalent cations. *Acta Biochim. Biophys.*, **277**, 134-139.
- Avery, S. V., Codd, G. A. & Gadd, G. M. (1995). Characterisation of caesium transport in the microalga *Chlorella salina*. *Biochemical Society. Transactions*, **23**(3), 468S.
- Baiges, I., Schäffner, A.R., Affenzeller M.J. & Mas, A. (2002). Plant aquaporins. *Physiol Plant.*, **115**(2), 175-182.
- Bakunov, N. A. (1989). Accumulation of <sup>137</sup>Cs in Plants and Characteristics of its Behavior in Soils. *Soviet soil science*, **21**(6), 71-78.
- Bandziulis, R. J., Swanson, M. S. & Dreyfuss, G. (1989). RNA-binding proteins as developmental regulators. *Genes Dev.*, **3**(4), 431-437.
- Banzet, N., Richaud, C., Deveaux, Y., Kazmaier, M., Gagnon, J. & Triantaphylides, C. (1998). Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cells. *The Plant Journal*, **13**(4), 519-527.
- Barton, G. J., Newman, R. H., Freemont, P. S. & Crumpton, M. J. (1991). Amino acid sequence analysis of the annexin super-gene family of proteins. *Eur. J. Biochem*, **198**(3), 749-760.
- Bassatt Jr., D. E., Eisen, M. B. & Boguski, M. S. (1999). Gene expression informatics - it's all in your mine. *Nature genetics*, **21**(1), 51-55.
- Beck, E. & Lüttge, U. (1990). Stress bei Pflanzen. *Biologie in unserer Zeit*, **20**, 237-244.
- Becker, D., Dreyer, I., Hoth, S., Reid, J. D., Busch, H., Lehnen, M., Palme, K. & Hedrich, R. (1996). Changes in voltage activation, Cs<sup>+</sup> sensitivity, and ion permeability in H5 mutants of the plant K<sup>+</sup> channel *KAT1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 8123-8128.
- Beckhelling, C., Chang, P., Chevalier, S., Ford, C. & Houliston, E. (2003). Pre-M Phase-promoting Factor Associates with Annulate Lamellae in *Xenopus* Oocytes and Egg Extracts. *Mol Biol Cell*, **14**(3), 1125-1137.
- Belli, M., Sansone, U., Ardiani, R., Feoli, E., Scimone, M., Menegon, S. & Parente, G. (1995). The Effect of Fertilizer Applications on <sup>137</sup>Cs Uptake by Different Plant Species and Vegetation Types. *J. Environ.*

- Radioactivity*, **27**, 75-89.
- Benfey, P. N., Linstead, P. J., Roberts, K., Schiefelbein, J. W., Hauser, M.-T. & Aeschbacher, R. A. (1993). Root development in Arabidopsis: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development*, **119**, 57-70.
- Berna, A. & Bernier, F. (1999). Regulation by biotic and abiotic stress of a wheat germin gene encoding oxalate oxidase, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing enzyme. *Plant Molecular Biology*, **39**, 539-549.
- Bertl, A., Anderson, J. A., Slayman, C. L. & Gaber, R. F. (1995). Use of *Saccharomyces cerevisiae* for patch-clamp analysis of heterologous membrane proteins: Characterization of *Kat1*, an inward-rectifying K<sup>+</sup> channel from *Arabidopsis thaliana*, and comparison with endogenous yeast channels and carriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2701-2705.
- Bilo, M., Steffens, W., Führ, F. & Pfeffer, K.-H. (1993). Uptake of <sup>134/137</sup>Cs in Soil by Cereals as a Function of Several Soil Parameters of Three Soil Types in Upper Swabia and North Rhine-Westphalia (FRG). *J. Environ. Radioactivity*, **19**, 25-39.
- Binzel, M. L. (1995). NaCl-induced accumulation of tonoplast and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in tomato. *Physiol. Plant.*, **94**, 722-728.
- Birney, E., Kumar, S. & Krainer, A. R. (1993). Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic Acids Research*, **21**(25), 5803-5816.
- Blatt, M. R. & Slayman, C. L. (1987). Role of "active" potassium transport in the regulation of cytoplasmic pH by nonanimal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 2737-2741.
- Blumwald, E., Aharon, G. S. & Apse, M. P. (2000). Sodium transport in plant cell. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1465**, 140-151.
- Bohnert, H. J., Nelson, D. E. & Jensen, R. G. (1995). Adaptations to Environmental Stresses. *The Plant Cell*, **7**, 1099-1111.
- Borretzen, P., Jolle, T. and Strand, P., eds. (2002). Proceedings from the International Conference on Radioactivity in the Environment, Monaco.
- Bossemeyer, D., Schlösser, A. & Bakker, E. P. (1989). Specific Cesium Transport via the *Escherichia coli* Kup (TrkD) K<sup>+</sup> Uptake System. *Journal of Bacteriology*, **171**(4), 2219-2221.
- Bowtell, D. (1999). Options available - from start to finish - for obtaining expression data by microarray. *Nature genetics*, **21**(1), 25-32.
- Bray, E. A. (1997). Plant response to water deficit. *Trends in Plant Science*, **2**, 48-54.
- Britt, A. B. (1996). DNA Damage and Repair in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **47**, 75-100.
- Broadley, M. R., Escobar-Gutiérrez, A. J., Bowen, H. C., Willey, N. J. & White, P. J. (2001). Influx and accumulation of Cs<sup>+</sup> by *akt1* mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. lacking a dominant K<sup>+</sup> transport system. *Journal of Experimental Botany*, **52**(357), 839-844.
- Broadley, M. R. & Willey, N. J. (1997). Differences in Root Uptake of Radiocaesium by 30 Plant Taxa. *Environmental Pollution*, **97**(1-2), 11-15.
- Brown, P. O. & Botstein, D. (1999). Exploring the new world of genome with DNA microarrays. *Nature genetics*, **21**(1), 33-37.
- Buchanan-Wollaston, V. (1994). Isolation of cDNA Clones of Genes That Are Expressed during Leaf Senescence in *Brassica napus*. *Plant Physiol.*, **105**, 839-846.
- Bunzl, K., Albers, B. P., Shimmack, W., Rissanen, K., Suomela, M., Puhakainen, M., Rahola, T. & Steinnes, E. (1999). Soil to plant uptake of fallout <sup>137</sup>Cs by plants from boreal areas polluted by industrial emissions from smelters. *The Science of the Total Environment*, **234**, 213-221.
- Buschmann, P. H., Vaidyanathan, R., Gassmann, W. & Schroeder, J. I. (2000). Enhancement of Na<sup>+</sup> Uptake Currents, Time-Dependent Inward-Rectifying K<sup>+</sup> Channel Currents, and K<sup>+</sup> Channel Transcript by K<sup>+</sup> Starvation in Wheat Root Cells. *Plant Physiol.*, **122**, 1387-1398.
- Buysse, J., Van den Brande, K. & Merckx, R. (1996). Genotypic differences in the uptake and distribution of radiocaesium in plants. *Plant and Soil*, **178**, 265-271.
- Capelli, N., Diogon, T., Greppin, H. & Simon, P. (1997). Isolation and characterization of a cDNA clone encoding an osmotin-like protein from *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, **191**(1), 51-56.
- Carninci, P. & Hayashizaki, Y. (1999). High-Efficiency Full-Length cDNA Cloning. *Methods in Enzymology*, **303**, 19-44.
- Chen, H. M., Zheng, C. R., Tu, C. & Shen, Z. G. (2000). Chemical methods and phytoremediation of soil contaminated with heavy metals. *Chemosphere*, **41**, 229-234.
- Chen, J. J. W., Wu, R., Yang, P.-C., Huang, J.-Y., Sher, Y.-P., Han, M.-H., Kao, W.-C., Lee, P.-J., Chiu, T. F., Chang, F., Chu, Y.-W., Wu, C.-W. & Peck, K. (1998). Profiling Expression Patterns and Isolating Differentially Expressed Genes by cDNA Microarray System with Colorimetry Detection. *Genomics*, **51**, 313-324.
- Cheung, V. G., Morley, M., Aguilar, F., Massimi, A., Kucherlapati, R. & Childs, G. (1999). Making and reading

- microarrays. *Nature genetics*, **21**(1), 15-19.
- Cho, R. J., Fromont-Racine, M., Wodicka, L., Feierbach, B., Stearns, T., Legrain, P., Lockhart, D. J. & Davis, R. W. (1998). Parallel analysis of genetic selections using whole genome oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 3752- 3757.
- Christensen, H. E., Ramachandran, S., Tan, C. T., Surana, U., Dong, C. H. & Chua, N. H. (1996). Arabidopsis profilins are functionally similar to yeast profilins: identification of a vascular bundle-specific profilin and a pollen-specific profilin. *The Plant Journal*, **10**, 269-279.
- Clark, M. D., Panopoulou, G. D., Cahill, D. J., Büssov, K. & Lehrach, H. (1999). Construction and Analysis of arrayed cDNA Libraries. *Methods in Enzymology*, **303**, 205-293.
- Clemens, S., Antosiewicz, D. M., Ward, J. M., Schachtman, D. P. & Schroeder, J. I. (1998). The plant cDNA *LCT1* mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 12043-12048.
- Clint, G. & Dighton, J. (1992). Uptake and accumulation of radiocaesium by mycorrhizal and non-mycorrhizal heather plant. *New Phytologist*, **121**, 555-561.
- Close, T. J. (1997). Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiologia Plantarum*, **100**, 291-296.
- Clough, S. J. & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **16**(6), 735-743.
- Cobbett, C. S. (2000). Phytochelatins and Their Roles in Heavy Metal Detoxification. *Plant Physiol.*, **123**, 825-832.
- Cohen, C. K., Fox, T. C., Garvin, D. F. & Kochian, L. V. (1998). The Role of Iron-Deficiency Stress Responses in Stimulating Heavy-Metal Transport in Plants. *Plant Physiol.*, **116**, 1063-1072.
- Collander, R. (1941). Selective absorption of cations by higher plants. *Plant Physiol.*, **16**, 691-720.
- Conklin, P. L., Williams, E. H. & Last, R. L. (1996). Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 9970-9974.
- Cosgrove, D. J. (1997). Relaxation in a High-Stress Environment: The Molecular Bases of Extensible Cell Walls and Cell Enlargement. *The Plant Cell*, **9**, 1031-1041.
- Coughtrey, P. J., Kirton, J. A. & Mitchell, N. G. (1989). Transfer of Radioactive Caesium from Soil to Vegetation and Comparison with Potassium in Upland Grassland. *Environmental Pollution*, **62**, 281-315.
- Dat, J., Vandenabeele, E., Vranová, E., van Montagu, M., Inzé, D. & van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress response. *Cell. Mol. Life Science*, **57**, 779-795.
- Desprez, T., Amselem, J., Caboche, M. & Höfte, H. (1998). Differential gene expression in *Arabidopsis* monitored using cDNA arrays. *The Plant Journal*, **14**(5), 643-652.
- Deveaux, Y., Alonso, B., Pierrugues, O., Godon, C. & Kazmaier, M. (in press). Molecular cloning and developmental expression of AtGR1, a new growth-related *Arabidopsis* gene strongly induced by Ionizing radiation. *Radiation Research*.
- Diatchenko, L., Lukyanov, S., Lau, Y.-F. C. and Siebert, P.D. (1999). Suppression Subtractive Hybridization: A Versatile Method for Identifying Differentially Expressed Genes. *Methods in Enzymology*, **303**, 349-380.
- Diatchenko, L., Lau, Y.-F. C., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D. & Siebert, P. (1996). Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6025-6030.
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K. & Scheres, B. (1993). Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development*, **119**, 71-84.
- Drmanac, R. & Drmanac, S. (1999). cDNA Screening by Array Hybridization. *Methods in Enzymology*, **303**, 159-178.
- Duggan, D. J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P. & Trent, J. M. (1999). Expression profiling using cDNA microarrays. *Nature genetics*, **21**(1), 10-14.
- Eaton, D. L. & Bammler, T. K. (1999). Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol. Sci.*, **49**(2), 156-164.
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J. & Guerinot, M. L. (1996). A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 5624-5628.
- Eisen, M. B. & Brown, P. O. (1999). DNA Array for Analysis of Gene Expression. *Methods in Enzymology*, **303**, 179-205.
- Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O. & Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**(25), 14863-14868.
- Engels, C. & Marschner, H. (1991). Root to shoot translocation of macronutrients in relation to shoot demand in maize (*Zea mays* L.) grown at different root zone temperatures. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenk.*, **155**, 121-

128.

- Entry, J. A., Vance, N. C., Hamilton, M. A., Zabowski, D., Watrud, L. S. & Adriano, D. C. (1996). Phytoremediation of Soil Contaminated with Low Concentrations of Radionuclides. *Water, Air, and Soil Pollution*, **88**, 167-176.
- Epstein, E. (1994). The anomaly of silicon in plant biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 11-17.
- Epstein, E., Rains, D. W. & Elzam, O. E. (1963). Resolution of Dual Mechanism of Potassium Absorption by Barely Roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **49**, 684-692.
- Ermakova, M. V. (1970). Seasonal effect of some trace elements on osmotic fragility of erythrocytes in the frog *Rana temporaria*. *Zn. Evol. Bio. Khim. Fizol.*, **6**, 623-626.
- Ertel, J. & Ziegler, H. (1991). Cs-134/137 contamination and root uptake of different forest trees before and after the Chernobyl accident. *Radiat. Environ. Biophys.*, **30**, 147-157.
- Evans, L. S. & Van 't Hof, J. (1975). Dose Rate, Mitotic Cycle Duration, and Sensitivity of Cell Transitions from G1/S and G2/M to Protracted Gamma Radiation in Root Meristem. *Radiation Research*, **64**, 331-343.
- Fairbairn, D. J., Liu, W., Schachtman, D. P., Gomez-Gallego, S., Day, S. R. & Teasdale, R. D. (2000). Characterisation of two distinct HKT1-like potassium transporters from *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Molecular Biology*, **43**(4), 515-525.
- Ferguson, J. A., Boles, T. C., Adams, C. P. & Walt, D. R. (1996). A fiber-optic DNA biosensor microarray for the analysis of gene expression. *Nature biotechnology*, **14**, 1681-1684.
- Fesenko, S. V. & Lissiansky, K. B. (1997). A comparative analysis of the restoration strategies in agriculture after radiation accidents. *Radiation Protection Dosimetry*, **73**, 147-150.
- Fodor, S. P. A., Rava, R. P., Huang, X. C., Pease, A. C., Holmes, C. P. & Adams, C. L. (1993). Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature*, **364**, 555-556.
- Fotin, A. V., Drobyshev, A. L., Proudnikov, D. Y., Perov, A. N. & Mirzabekov, A. D. (1998). Parallel thermodynamic analysis of duplexes on oligodeoxyribonucleotide microchips. *Nucleic Acids Research*, **26**, 1515-1521.
- Fox, T. C. & Guerinot, M. L. (1998). Molecular Biology of Cation Transport in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **49**, 669-696.
- Fu, H.-H. & Luan, S. (1998). *AtKUP1*: A Dual-Affinity K<sup>+</sup> Transporter from *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **10**, 63-73.
- Galkin, V.E., Orlova, A., Lukoyanova, N., Wriggers, W. & Egelman, E.H. (2001). Actin Depolymerizing Factor Stabilizes an Existing State of F-Actin and Can Change the Tilt of F-Actin Subunits. *J. Cell Biol.*, **153**(1), 75-86.
- Gassman, W. & Schroeder, J. I. (1994). Inward-Rectifying K<sup>+</sup> Channels in Root Hairs of Wheat. *Plant Physiol.*, **105**, 1399-1408.
- Gassman, W., Ward, J. M. & Schroeder, J. I. (1993). Physiological Roles of Inward-Rectifying K<sup>+</sup> Channels. *The Plant Cell*, **5**, 1491-1493.
- Gassmann, W., Rubio, F. & Schroeder, J. I. (1996). Alkali cation selectivity of the wheat root high-affinity potassium transporter HKT1. *The Plant Journal*, **10**(5), 869-882.
- Gaymard, F., Pilot, G., Lacombe, B., Bouchez, D., Bruneau, D., Boucherez, J., Michaux-Ferrière, N., Thibaud, J.-B. & Sentenac, H. (1998). Identification and Disruption of a Plant Shaker-like Outward Channel Involved in K<sup>+</sup> Release into Xylem Sap. *Cell*, **94**, 647-655.
- Gebhardt, H. & Rosemann, V. (1984). Cesium- und Strontiumaustauscheigenschaften von Marschböden. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenk.*, **147**, 592-603.
- Gherbi, H., Eugenia Gallego, M., Jalut, N., Lucht, J. M., Hohn, H. & White, C. I. (2001). Homologous recombination *in planta* is stimulated in the absence of Rad50. *EMBO Reports*, **2**(4), 287-291.
- Ghosh, A., Sharma, A. & Talukder, G. (1993). Effects of Cesium on Cellular Systems. *Biological Trace Element Research*, **38**, 165-203.
- Gibeaut, D. M., Hulett, J., Cramer, G. R. & Seemann, J. R. (1997). Maximal Biomass of *Arabidopsis thaliana* Using a Simple, Low-Maintenance Hydroponic Method and Favorable Environmental Conditions. *Plant Physiol.*, **115**, 317-319.
- Gicher, T., Badayev, S. A., Demchenko, S. I., Relichová, J., Sandhu, S. S., Usmanov, P. D., Usmanov, O. & Velemínský, J. (1994). *Arabidopsis* assay of mutagenicity. *Mutation Research*, **310**, 249-256.
- Ginzberg, I., Stein, H., Kapulnik, Y., Szabados, L., Strizhov, N., Schell, J., Koncz, C. & Zilberstein, A. (1998). Isolation and characterization of two different cDNAs of Delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthase in alfalfa, transcriptionally induced upon salt stress. *Plant Molecular Biology*, **38**(5), 755-764.
- Gong, Z., Koiwa, H., Cushman, M.A., Ray, A., Bufford, D., Kore-eda S., Matsumoto, T.K., Zhu, J., Cushman, J.C., Bressan, R.A. & Hasegawa, P.M. (2001). Genes that are uniquely stress regulated in salt overly sensitive (sos) mutants. *Plant Physiol.*, **126**(1), 363-375.
- Grill, E., Winnacker, E.-L. & Zenk, M. H. (1987). Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 439-443.

- Grimmig, B., Gonzalez-Perez, M.N., Leubner-Metzger, G., Vogeli-Lange, R., Meins, F., Hain, R., Penuelas, J., Heidenreich, B., Langebartels, C., Ernst, D. & Sandermann, H. (2003). Ozone-induced gene expression occurs via ethylene-dependent and -independent signalling. *Plant Mol Biol.*, **51**(4), 599-607.
- Guerinot, M. L. (2000). The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1465**, 190-198.
- Guivarch, A., Hinsinger, P. & Staunton, S. (1999). Root uptake and distribution of radiocaesium from contaminated soils and the enhancement of Cs adsorption in the rhizosphere. *Plant and Soil*, **211**, 131-138.
- Gulick, P. J. & Dvorak, J. (1992). Coordinate gene response to salt stress in *Lophopyrum elongatum*. *Plant Physiol.*, **100**, 1384-1388.
- Gurskaya, N. G., Diatchenko, L., Chenichik, A., Siebert, P. D., Khaspekov, G. L., Lukyanov, K. A., Vagner, L. L., Ermolaeva, O. D., Lukyanov, S. A. & Sverdlov, E. D. (1996). Equalizing cDNA Subtraction Based on Selective Suppression of Polymerase Chain Reaction: Cloning of Jurkat Cell Transcripts Induced by Phytohemagglutinin and Phorbol 12-Myristate 13-Acetate. *Analytical Biochemistry*, **240**, 90-97.
- Hacia, J. G. (1999). Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *Nature genetics*, **21**(1), 42-47.
- Halfter, U., Ishitani, M. & Zhu, J.-K. (2000). The *Arabidopsis* *SOS2* protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein *SOS3*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**(7), 3735-3740.
- Hanahan, D. (1985). *Techniques for transformation of E. coli*. IRL-Press, Oxford, Washington D.C.
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J.-K. & Bohnert, H. J. (2000). Plant Cellular and Molecular Responses to High Salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **51**, 463-499.
- Hauser, H. P., Bardroff, M., Pyrowolakis, G. & Jentsch, S. (1998). A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors. *J Cell Biol*, **141**(6), 1415-1422.
- Hedrich, R., Bregante, M., Dreyer, I. & Gambale, F. (1995). The voltage-dependent potassium-uptake channel of corn coleoptiles has permeation properties different from other K<sup>+</sup> channels. *Planta*, **197**, 193-199.
- Hedrich, R. & Schroeder, J. I. (1989). The Physiology of Ion Channels and Electrogenic Pumps in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **40**, 539-569.
- Hefner, E., Preuss, S. B. & Britt, A. B. (2003). *Arabidopsis* mutants sensitive to gamma radiation include the homologue of the human repair gene *ERCC1*. *Journal of Experimental Botany*, **54**(383), 669-680.
- Heidenreich, B., Seidlitz, H., Ernst, D. & Sandermann, H. (1999). Mercuric-Ion-Induced Gene Expression in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Phytoremediation*, **1**(2), 153-167.
- Hirono, Y., Smith, H. H., Lyman, J. T., Thompson, K. H. & Baum, J. W. (1970). Relative Biological Effectiveness of Heavy Ions in Producing Mutations, Tumors, and Growth Inhibition in the Crucifer Plant, *Arabidopsis*. *Radiation Research*, **44**, 204-223.
- Hirsch, R. E., Lewis, B. D., Spalding, E. P. & Sussman, M. R. (1998). A Role for the AKT1 Potassium Channel in Plant Nutrition. *Science*, **280**, 918-921.
- Hock, B. & Elstner, E. F. H. (1995). *Schadwirkungen auf Pflanzen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Holmgren, A. (1985). Thioredoxin. *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 237-271.
- Hoppe, W., Lohmann, W., Markl, H. & Ziegler, H. H. (1982). *Biophysik*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Howitt, S. M. & Udvardi, M. K. (2000). Structure, function and regulation of ammonium transports in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1465**, 152-170.
- Ichida, A. M., Pei, Z.-M., Baizabal-Aguirre, V., Turner, K. J. & Schroeder, J. I. (1997). Expression of Cs<sup>+</sup>-Resistant Guard Cell K<sup>+</sup> Channel Confers Cs<sup>+</sup>-Resistant, Light-Induced Stomatal Opening in Transgenic *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **9**, 1843-1857.
- Ishitani, M., Liming, X., Stevenson, B. & Zhu, J.-K. (1997). Genetic Analysis of Osmotic and Cold Stress Signal Transduction in *Arabidopsis*: Interactions and Convergences of Abscisic Acid-Dependent and Abscisic Acid-Independent Pathways. *The Plant Cell*, **9**, 1935-1949.
- Jackman, M., Firth, M. & Pines, J. (1995). Human cyclins B1 and B2 are localized to strikingly different structures: B1 to microtubules, B2 primarily to the Golgi apparatus. *EMBO Journal*, **14**, 1646-1654.
- Jackson, D., Coughtrey, P. J. & Crabtree, D. F. (1987). Predicted Concentrations of <sup>137</sup>Cs, <sup>131</sup>I, <sup>129</sup>I, <sup>241</sup>Pu and <sup>241</sup>Am in Various Foodstuff Following Deposition to Ground. *J. Environ. Radioactivity*, **5**, 143-158.
- Jin, H. L., Cominelli, E., Bailey, P., Parr, A., Mehrtens, F., Jones, J., Tonelli, C., Weisshaar, B. & Martin, C. (2000). Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*. *EMBO Reports*, **19**(22), 6150-6161.
- Johannes, G., Carter, M. S., Eisen, M. B., Brown, P. O. & Sarnow, P. (1999). Identification of eucaryotic mRNAs that are translated at reduced cap binding complex eIF4F concentrations using a cDNA microarray. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**(23), 13118-13123.
- Johansen, L. K. & Carrington, J. C. (2001). Silencing on the Spot. Induction and Suppression of RNA Silencing in the Agrobacterium-Mediated Transient Expression System. *Plant Physiol.*, **126**, 930-938.

- Johansson, I., Larsson, C., Ek, B. & Kjellbom, P. (1996). The major integral proteins of spinach leaf plasma membranes are putative aquaporins and are phosphorylated in response to  $\text{Ca}^{2+}$  and apoplastic water potential. *Plant Cell*, **8**, 1181-1191.
- Karimi, M., Inzé, D. & Depicker, A. (2002). GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, **7**(5), 193-195.
- Kavi Kishor, P. B., Hong, Z., Miao, G.-H., Hu, C.-A. & Verma, D. P. S. (1995). Overexpression of  $\Delta$ -1-Pyrroline-5-carboxylat-synthase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.*, **108**, 1387-1394.
- Kawasaki, S., Borchert, C., Deyholos, M., Wang, H., Brazille, S., Kawai, K., Galbraith, D. & Bohnert, H. J. (2001). Gene Expression Profiles during the Initial Phase of Salt Stress in Rice. *Plant Cell*, **13**, 889-906.
- Ketchum, K. A., Joiner, W. J., Sellers, A. J., Kaczmarek, L. K. & Goldstein, S. A. N. (1995). A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature*, **376**, 690-695.
- Kim, E. J., Kwak, J. M., Uozumi, N. & Schroeder, J. I. (1998). *AtKUPI*: An *Arabidopsis* Gene Encoding High-Affinity Potassium Transport Activity. *The Plant Cell*, **10**, 51-62.
- Kim, S., Zeller, K., Dang, C. V., Sandgren, E. P. & Lee, L. A. (2001). A Strategy to Identify Differentially Expressed Genes Using Representational Difference Analysis and cDNA Arrays. *Analytical Biochemistry*, **288**, 141-148.
- Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. (1994). ERD15, a cDNA for a dehydration-induced gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, **106**(4), 1707.
- Kliebenstein, D.J., Monde, R.A. & Last, R.L. (1998). Superoxide dismutase in Arabidopsis: An eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiol.*, **118**, 637-650.
- Klinedinst, S., Pascuzzi, P., Redmann, J., Desai, M. & Arias, J. (2000). A xenobiotic-stress-activated transcription factor and its cognate target genes are preferentially expressed in root tip meristems. *Plant Molecular Biology*, **42**, 679-688.
- Knoester, M., van Loon, L. C., van den Heuvel, J., Hennig, J., Bol, J. F. & Linthorst, H. J. M. (1998). Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 1933-1937.
- Ko, C. H. & Gaber, R. F. (1991). *TRK1* and *TRK2* Encode Structurally Related  $\text{K}^+$  Transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, **11**(8), 4266-4273.
- Kochian, L. V., Garvin, D.F., Shaff, J.E., Chilcott, T.C. and Lucas, W.J. (1993). Towards an understanding of the molecular basis of plants  $\text{K}^+$  transport: Characterization of cloned  $\text{K}^+$  transport cDNAs. *Plant and Soil*, **155/156**, 115-118.
- Kochian, L. V., Shaff, J. E. & Lucas, W. J. (1989). High Affinity  $\text{K}^+$  Uptake in Maize Roots. *Plant Physiol.*, **91**, 1202-1211.
- Koornneef, M., Dellaert, L. W. M. & van der Veen, J. H. (1982). EMS- and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Mutation Research*, **93**, 109-123.
- Kooter, J. M., Matzke, M. A. & Meyer, P. (1999). Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *Trends in Plant Science*, **4**, 340-347.
- Korshunova, Y. O., Eide, D., Clark, G., Guerinot, M. L. & Pakrasi, H. B. (1999). The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Molecular Biology*, **40**, 37-44.
- Kovalchuk, I., Kovalchuk, O., Arkhipov, A. & Hohn, B. (1998). Transgenic plants are sensitive bioindicators of nuclear pollution caused by the Chernobyl accident. *Nature biotechnology*, **16**, 1054-1059.
- Kuzin, A. M. (1986). Stimulation of plant growth by exposure to low level gamma-radiation and magnetic field, and their possible mechanism of action. *Environ. Exp. Bot.*, **26**(2), 163-167.
- Langebartels, C., Wohlgemuth, H., Kschieschan, S., Grün, S. & Sandermann, H. (2002). Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiol. Biochem.* **40**, 567-575.
- Lappartient, A.G. & Touraine, B. (1997). Glutathione-Mediated Regulation of ATP Sulfurylase Activity,  $\text{SO}_4^{2-}$  Uptake, and Oxidative Stress Response in Intact Canola Roots. *Plant Physiol.*, **114**(1), 177-183.
- La Rosa, P. C., Nelson, D. E., Singh, N. K., Hasegawa, P. M. & Bressan, R. A. (1992). Osmotin gene expression is posttranscriptionally regulated. *Plant Physiol.*, **100**, 409-415.
- Larcher, W. (1987). Stress bei Pflanzen. *Naturwissenschaften*, **74**, 861-863.
- Larsen, P. B., Degenhardt, J., Tai, C.-Y., Stenzler, L. M., Howell, S. H. & Kochian, L. V. (1998). Aluminum-Resistant *Arabidopsis* Mutants That Exhibit Altered Patterns of Aluminium Accumulation and Organic Acid Release from Roots. *Plant Physiol.*, **117**, 9-18.
- Lasat, M. M., Fuhrmann, M., Ebbs, S.D., Cornish, J.E. and Kochian, L.V. (1998). Phytoremediation of a Radiocesium-Contaminated Soil: Evaluation of Cesium-137 Bioaccumulation in the Shoots of Three Plant Species. *J. Environ. Qual.*, **27**, 165-169.



- Lasat, M. M., Norvell, W. A. & Kochian, L. V. (1997). Potential for Phytoextraction of Cs-137 from a Contaminated Soil. *Plant and Soil*, **195**(1), 99-106.
- Laskowski, M. & Kato, I. (1980). Protein inhibitors of proteinases. *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 593-626.
- Lee, S. E., Moore, J. K., Holmes, A., Umez, K., Kolodner, R. D. & Haber, J. E. (1998). *Saccharomyces* Ku70, Mre11/Rad50, and RPA Proteins Regulate Adaptation to G2/M Arrest after DNA Damage. *Cell*, **94**, 399-409.
- Leng, Q., Mercier, R. W., Yao, W. & Berkowitz, G. A. (1999). Cloning and First Functional Characterization of a Plant Cyclic Nucleotide-Gated Cation Channel. *Plant Physiol.*, **121**, 753-761.
- Liang, P. & Pardee, A. B. (1992). Differential Display of Eucariotic Messenger RNA by Means of the Polymerase Chain Reaction. *Science*, **257**, 967-971.
- Lichtenthaler, H. K. (1988). *In vivo* chlorophyll fluorescence as a tool for stress detection in plants. In *Application of Chlorophyll Fluorescence*, ed. Dordrecht, Kluwer academic Publishers, pp. 129-142.
- Likhtarev, I. A., Kovgan, L. N., Vavilov, S. E., Perevoznikov, O. N., Litvinets, L. N., Anspaugh, L. R., Jacob, P. & Pröhl, G. (2000). Internal Exposure from the Ingestion of Foods Contaminated by <sup>137</sup>Cs after the Chernobyl Accident. *Health Physics*, **79**(4), 341-357.
- Lin, B. L., Wang, J. S., Liu, H. C., Chen, R. W., Meyer, Y., Barakat, A. & Delseny, M. (2001). Genomic analysis of the Hsp70 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress Chaperones*, **6**(3), 201-208.
- Lipshutz, R. J., Fodor, S., Gingeras, T. R. & Lockhart, D. (1999). High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nature genetics*, **21**(1), 20-24.
- Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, C.-S. & Zhu, J.-K. (2000). The *Arabidopsis thaliana* *SOS2* gene encodes for a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**(7), 3730-3734.
- Liu, J. & Zhu, J.-K. (1998). A Calcium Sensor Homolog Required for Plant Salt Tolerance. *Science*, **280**, 1943-1945.
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. (1998). Two Transcription Factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA Binding Domain Separate Two Cellular Signal Transduction Pathways in Drought- and Low-Temperature-Responsive Gene Expression, Respectively, in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **10**, 1391-1406.
- Lockhart, D. L., Dong, H., Byrne, M. C., Follettie, M. T., Gallo, M. V., Chee, M. S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H. & Brown, E. L. (1996). Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature biotechnology*, **14**, 1675-1680.
- Luckey, T. D. (1982). Physiological Benefits from Low Levels of Ionizing Radiation. *Health Physics*, **43**(6), 771-789.
- Maathuis, F. J. M., Verlin, D., Smith, A., Sanders, D., Fernández, J.A. and Walker, N.A. (1996). The Physiological Relevance of Na<sup>+</sup>-Coupled K<sup>+</sup>-Transport. *Plant Physiol.*, **112**, 1609-1616.
- Maathuis, F. J. M. & Sander, D. (1997). Regulation of K<sup>+</sup> absorption in plant root cells by external K<sup>+</sup>: interplay of different plasma membrane K<sup>+</sup> transporters. *Journal of Experimental Botany*, **48**, 451-458.
- Maathuis, F. J. M. & Sanders, D. (1994). Mechanism of high-affinity potassium uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 9272-9276.
- Maathuis, F. J. M. & Sanders, D. (1996). Characterization of *csi52*, a Cs<sup>+</sup> resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* altered in K<sup>+</sup> transport. *The Plant Journal*, **10**(4), 579-589.
- Maathuis, F. J. M. a. S., D. (1995). Contrasting roles in ion transport of two K<sup>+</sup>-channel types in root cells of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **197**, 456-464.
- Mahadeva, H., Starkey, M. P., Sheikh, F. N., Mundy, C. R. & Samani, N. J. (1998). A Simple and Efficient Method for the Isolation of Differentially Expressed Genes. *J. Mol. Biol*, **284**, 1391-1398.
- Mamikhin, S. V., Tokhomirov, F. A. & Shcheglov, A. I. (1997). Dynamics of <sup>137</sup>Cs in the forests of the 30-km zone around the Chernobyl nuclear power plant. *The Science of the Total Environment*, **193**, 169-177.
- Martin, K. J. & Pardee, A. B. (1999). Principles of Differential Display. *Methods in Enzymology*, **303**, 234-258.
- Matouschek, A., Rospert, S., Schmid, K., Glick, B. S. & Schatz, G. (1995). Cyclophilin catalyzes protein folding in yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **92**, 6319-6323.
- Matsumura, Y. & Ananthaswamy, H. N. (2/12/2002). Short-term and long-term cellular and molecular events following UV irradiation of skin: implications for molecular medicine. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 1-22.
- Mayer, U., Torres Ruiz, R. A., Berleth, T., Miséra, S. & Jürgens, G. (1991). Mutations affecting body organization in the *Arabidopsis* embryo. *Nature*, **353**, 402-407.
- McGonigle, B., Keeler, S.J., Lau, S.-M.C., Koeppel, M.K. & O'Keefe, D.P. (2000). A Genomics Approach to the Comprehensive Analysis of the Glutathione S-Transferase Gene Family in Soybean and Maize. *Plant Physiol.*, **124**, 1105-1120.
- Midgley, C. A., Owens, B., Briscoe, C. V., Thomas, D. B., Lane, D. P. & Hall, P. A. (1995). Coupling between gamma irradiation, p53 induction and the apoptotic response depends upon cell type in vivo. *Journal of Cell Science*, **108**, 1843-1848.

- Morellie, J. K. (1998). Actin depolymerization affects stress-induced translational activity of potato tuber tissue. *Plant Physiol.*, **116**(4), 1227-1237.
- Mourashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, **15**, 493-497.
- Mullauer, L., Gruber, P., Sebingner, D., Buch, J., Wohlfart, S. & Chott, A. (2001). Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutat. Res.*, **488**(3), 211-231.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, **155**, 335-350.
- Munns, R. (1993). Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant, Cell and Environment*, **16**, 15-24.
- Nagata, S. (1988). Influence of salts and pH on the growth as well as NADH oxidase of the halotolerant bacterium A505. *Arch. Microbiol.*, **150**, 302-308.
- Nakamura, R. K., McKendree, W. L., Hirsch, R. E., Sedbrook, J. C., Gaber, R. F. & Sussman, M. R. (1995). Expression of an Arabidopsis Potassium Channel Gene in Guard Cells. *Plant Physiol.*, **109**, 371-374.
- Newman, I. A., Kochian, L. V., Grusak, M. A. & Lucas, W. J. (1987). Fluxes of H<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> in Corn Roots. *Plant Physiol.*, **84**, 1177-1184.
- Nisbet, A. F. & R.F.M., W. (2000). Soil-to-Plant Transfer Factors for Radiocesium and Radiostrontium in Agricultural Systems. *Health Physics*, **78**(3), 279-288.
- Niu, X. M., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M. & Pardo, J. M. (1995). Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol.*, **109**(3), 735-742.
- Okamoto, M., Vidmar, J.J. & Glass, A.D. (2003). Regulation of NRT1 and NRT2 Gene Families of Arabidopsis thaliana: Responses to Nitrate Provision. *Plant Cell Physiol.*, **44**(3), 304-317.
- Olsen, R. A. (1994). The Transfer of Radiocaesium from Soil to Plant and Fungi in Seminatural Ecosystems. *Studies in Environmental Science*, **62**, 265-286.
- Omay, H. S. & Schwarz, W. (1992). Voltage-dependent stimulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pump current by external cations: selectivity of different K<sup>+</sup> congeners. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1104**, 167-173.
- Palayoor, S. T., Macklis, R. M., Bump, E. A. & Coleman, C. N. (1995). Modulation of Radiation-Induced Apoptosis and G2/M-Block in Murine T-Lymphoma Cells. *rrsOnline*, **141**(3), 235-243.
- Paris, N., Rogers, S. W., Jiang, L., Kirsch, T., Beevers, L., Phillips, T. E. & Rogers, J. C. (1997). Molecular Cloning and Further Characterization of a Probable Plant Vacuolar Sorting Receptor. *Plant Physiol.*, **115**(1), 29-39.
- Perkins, J. & Gadd, G. M. (1993). Caesium toxicity, accumulation and intracellular localization in yeast. *Mycological Research*, **97**(6), 717-724.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, **29**(9), 1-6.
- Pickart, C. M. (2002). DNA repair: Right on target with ubiquitin. *Nature*, **419**, 120-121.
- Pinksey, C., Bose, R., Taylor, J. R., McKee, J. S. C., Lapointe, C. & Birchall, J. (1981). Cesium in Mammals: Acute Toxicity, Organ Changes and Tissue Accumulation. *Journal of environmental science and health*, **A16**(5), 549-567.
- Precht, M. & Kraft, R. (1993). *Biostatistik 2*. R. Oldenbourg Verlag GmbH, München.
- Preker, P. J. & Keller, W. (1998). The HAT helix, a repetitive motif implicated in RNA processing. *Trends Biochem. Sci.*, **23**(1), 15-16.
- Quintero, F. J. & Blatt, M. R. (1997). A new family of K<sup>+</sup> transporters from *Arabidopsis* that are conserved across phyla. *FEBS Letters*, **415**, 206-211.
- Rassow, J., Mohrs, K., Koidl, S., Barthelmess, I. B., Pfanner, N. & Tropschug, M. (1995). Cyclophilin 20 Is Involved in Mitochondrial Protein Folding in Cooperation with Molecular Chaperones Hsp70 and Hsp60. *Molecular Cellular Biology*, **15**(5), 2654-2662.
- Rausser, W. E. (1995). Phytochelatins and related peptides: structure, biosynthesis, and functions. *Plant Physiol.*, **109**, 1141-1149.
- Reymond, P., Weber, H., Damond, M. & Farmer, E. (2000). Differential Gene Expression in Response to Mechanical Wounding and Insect Feeding in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **12**, 707-720.
- Richards, K. D., Schott, E. J., Shamara, Y. K., Davis, K. R. & Gardner, R. C. (1998). Aluminum Induces Oxidative Stress Genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, **116**, 409-418.
- Ries, G., Heller, W., Puchta, H., Sandermann, H., Seidlitz, H.K. & Hohn, B. (2000). Elevated UV-B radiation reduces genome stability in plants. *Nature* **406**(6791), 98-101.
- Roca, M. C. & Vallejo, V. R. (1995). Effect of Soil Potassium and Calcium on Caesium and Strontium Uptake by Plant Roots. *J. Environ. Radioactivity*, **28**(2), 141-159.
- Rocke, D. M. & Durbin, B. (2001). A Model for Measurement Error for Gene Expression Arrays. *Journal of Computational Biology*, **8**(6), 557-569.
- Rodecap, K. D., Tingey, D. T. & Lee, E. H. (1994). Iron Nutrition Influence on Cadmium Accumulation by

- Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *J. Environ. Qual.*, **23**, 239-246.
- Rogers, S. O. & Bendich, A. J. (1985). Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology*, **5**, 69-76.
- Ruan, Y., Gilmore, J. & Conner, T. (1998). Towards *Arabidopsis* genome analysis: monitoring expression profiles of 1400 genes using cDNA microarrays. *The Plant Journal*, **15**(6), 821-833.
- Rubio, F., Santa-Maria, G. E. & Rodríguez-Navarro, A. (2000). Cloning of *Arabidopsis* and barley cDNAs encoding *HAK* potassium transporter in root and shoot cells. *Physiologia Plantarum*, **109**, 34-43.
- Rugh, C. L., Wilde, H. D., Stack, N. M., Thompson, D. M., Summers, A. O. & Meagher, R. B. (1996). Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a modified bacterial *merA* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 3182-3187.
- Russell, M. & Nurse, P. (1986). *cdc25<sup>+</sup>* functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell*, **45**, 145-153.
- Ryu, S.B., Costa, A., Xin, Z. & Li, P.H. (1995). Induction of cold hardiness by salt stress involves synthesis of cold- and abscisic acid- responsive proteins in Potato (*Solanum commersonii* Dun.). *Plant Cell Physiol.* **36**, 1245-1251.
- Sacchi, G. A., Espen, L., Nocito, F. & Cocucci, M. (1997). Cs<sup>+</sup> Uptake in Supapical Maize Root Segments: Mechanism and Effects on H<sup>+</sup> Release, Transmembrane Electric Potential and Cell pH. *Plant Cell Physiol.*, **38**(3), 282-289.
- Sagan, L. A. (1989). On Radiation, Paradigms, and Hormesis. *Science*, **245**, 574.
- Saiki, R., Short, S., Faloon, F. A., Mullis, K. B., Horn, G., Erlich, H. & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1352.
- Sakakibara, H., Taniguchi, M. & Sugiyama, T. (2000). His-Asp phosphorelay signaling: a communication avenue between plants and their environment. *Plant Molecular Biology*, **42**, 273-278.
- Salt, D. E., Smith, R. D. & Raskin, I. (1998). Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **49**, 643-668.
- Sambrook, J. & Russel, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manuel*. 3 ed, Cold Spring Harbor Laboratory press. Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchez, A. L., Wright, S. M., Smolders, E., Naylor, C., Stevens, P. A., Kennedy, V. H., Dodd, B. A., Singleton, D. L. & Barnett, C. L. (1999). High Plant Uptake of Radiocesium from Organic Soils Due to Cs Mobility and Low Soil K Content. *Environ. Sci. Technol.*, **33**(16), 2752-2757.
- Sandermann, H. (2000). Active Oxygen Species as Mediators of Plant Immunity: Three Case Studies. *Biol. Chem.*, **381**, 649-653.
- Santa-Maria, G. E., Rubio, F., Dubcovsky, J. & Rodríguez-Navarro, A. R. (1997). The *HAK1* Gene of Barley is a Member of a Large Gene Family and Encodes a High-Affinity Potassium Transporter. *The Plant Cell*, **9**, 2281-2289.
- Sävenstrand, H., Brosché, M., Ängelsten, M. & Strid, A. (2000). Molecular marker for ozone stress isolated by suppression subtractive hybridization: specificity of gene expression and identification of a novel stress-regulated gene. *Plant, Cell and Environment*, **23**, 689-700.
- Schachtman, D. P. (2000). Molecular insights into the structure and function of plant K<sup>+</sup> transport mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1465**, 127-139.
- Schachtman, D. P. & Schroeder, J. I. (1994). Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature*, **370**, 655-658.
- Schachtman, D. P., Schroeder, J. I., Lucas, W. J., Anderson, J. A. & Gaber, R. F. (1992). Expression of an Inward-Rectifying Potassium Channel by the *Arabidopsis KAT1* cDNA. *Science*, **258**, 1654-1658.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. & Brown, P. O. (1995). Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. *Science*, **270**, 467-470.
- Schenk, P. M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J. P., Richmond, T., Somerville, S. C. & Manners, J. M. (2000). Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**(21), 11655-11660.
- Scheres, B., Di Laurenzio, L., Willemsen, V., Hauser, M.-T., Janmaat, K., Weisbeek, P. & Benfey, P. N. (1995). Mutations affecting the radial organisation of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development*, **121**, 53-62.
- Schimmack, W. & Bunzl, K. (1996). Mobility of Chernobyl-derived Radiocesium in the Soil. In *Ten Years Terrestrial Radioecological Research Following the Chernobyl Accident*, ed. A. S. S. Soc., Proc. Internat. Symposium on Radioecology. Wien, pp. 11-16.
- Schraudner, M., Moeder, W., Wiese, C., van Camp, W., Inzé, D., Langebartels, C. & Sandermann, H. (1998). Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco Bel W3. *The Plant Journal*, **16**(2), 235-245.
- Schroeder, J. I. & Fang, H. H. (1991). Inward-rectifying K<sup>+</sup> channels in guard cells provide a mechanism for

- low-affinity  $K^+$  uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 11583-11587.
- Schulze, E.-D., Beck, E. & Müller-Hohenstein, K. (2002). *Pflanzenökologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Schulze-Lefert, P. & Vogel, J. (2000). Closing the rank to attack by powdery mildew. *Trends in Plant Science*, **5**(8), 343-348.
- Scott, M. P., Tamkun, J. W. & Hartzell, G. W. (1998). The structure and function of the homeodomain. *Biochimica et Biophysica Acta*, **989**(1), 25-48.
- Selye, H. (1936). A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature*, **138**, 32-34.
- Sentenac, H., Bonneaud, N., Minet, M., Lacroute, F., Salmon, J.-M., Gaymard, F. & Grignon, C. (1992). Cloning and Expression in Yeast of a Plant Potassium Ion Transport system. *Science*, **256**, 663-665.
- Sgarrella, F., Mura, V., Catalani, R., Pitli, A. & Ipata, P. L. (1983). Preliminary characterization of adenosine deaminase from *Bacillus cereus*. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, **58**, 1145-1151.
- Shaw, G. (1993). Blockade by fertilisers of caesium and strontium uptake into crops: effects on the root uptake process. *The Science of the Total Environment*, **137**, 119-133.
- Shaw, G. & Bell, J. N. (1991). Competitive Effects of Potassium and Ammonium on Caesium Uptake Kinetics in Wheat. *J. Environ. Radioactivity*, **13**, 283-296.
- Shaw, G., Hewamanna, R., Lillywithe, J. & Bell, J. N. (1992). Radiocaesium Uptake and Translocation in Wheat with Reference to the Transfer Factor Concept and Ion Competition Effects. *J. Environ. Radioactivity*, **16**, 167-180.
- Shaw-Smith, C. J., Coffey, A. J., Huckle, E., Durham, J., Campbell, E. A., Freeman, T. C., Walters, J. R. F. & Bentley, D. R. (2000). Improved Method for Detecting Differentially Expressed Genes Using cDNA Indexing. *BioTechniques*, **28**, 958-964.
- Sheahan, J. J., Ribeiro-Neto, L. & Sussman, M. R. (1993). Cesium-insensitiv mutants of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **3**(5), 647-656.
- Siebert, P. D., Chenchik, A., Kellogg, D. E., Lukyanov, K. A. & Lukyanov, S. A. (1995). An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Research*, **23**, 1087-1088.
- Simmons, C.R. (1994). The physiology and molecular biology of plant 1,3-beta-D-glucanases and 1,3;1,4-beta-D-glucanases. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **13**, 325-387.
- Smolders, E., Sweek, L., Merckx, R. and Cremers, A. (1997). Cationic Interactions in Radiocaesium Uptake from Solution by Spinach. *J. Environ. Radioactivity*, **34**(2), 161-170.
- Smolders, E., Kiebooms, L., Buysse, J. & Merckx, R. (1996).  $^{137}\text{Cs}$  Uptake in spring wheat (*Triticum aestivum* L. cv Tonic) at varying K supply. *Plant and Soil*, **181**, 205-209.
- Smolders, E. & Shaw, G. (1995). Changes in radiocaesium uptake and distribution in wheat during plant development: a solution culture study. *Plant and Soil*, **176**, 1-6.
- Southern, E., Mir, K. & Shepchinov, M. (1999). Molecular interactions on microarrays. *Nature genetics*, **21**(1), 5-9.
- Strausfeld, U., Labbe, J. C., Fesquet, D., Cavadore, J. C., Picard, A., Sadhu, K., Russell, P. & Doree, M. (1991). Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein. *Nature*, **351**(6323), 242-245.
- Surplus, S.L., Jordan, B.R., Murphy, A.M., Carr, J.P., Thomas, B. & Mackerness, A.-H. (1998). Ultraviolet-B-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: role of salicylic acid and reactive oxygen species in the regulation of transcripts encoding photosynthetic and acidic pathogenesis-related proteins. *Plant Cell Environ.*, **21**(7), 685-694.
- Svadlenková, M., Konečný, J. & Smutný, V. (1996). Model Calculation of Radiocaesium Transfer into Food Products in Semi-Natural Forest Ecosystems in the Czech Republic after a Nuclear Reactor Accident and an Estimate of the Population Dose Burden. *Environmental Pollution*, **92**(2), 173-184.
- Szerbin, P., Koblinger-Bokori, E., Koblinger, L., Végvári, I. & Ugron, Á. (1999). Caesium-137 migration in Hingarion soils. *The Science of the Total Environment*, **227**, 215-227.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (1991). *Plant Physiology*. The Benjamin/Cummings Pub. Company, Redwood City.
- Tegen, I. & Dörr, H. (1996). Mobilization of Cesium in Organic Rich Soils: Correlation with Production of Dissolved Organic Carbon. *Water, Air, and Soil Pollution*, **88**, 133-144.
- Thomas, H. C., Lamé, M. W., Morin, D., Wilson, D. W. & Segall, H. J. (1998). Prolonged cell-cycle arrest associated with altered cdc2 kinase in monocrotaline pyrrole-treated pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **19**, 129-142.
- Thompson, C. M., Markesbery, W. R., Ehmann, W. O., Mao, Y. X. & Vance, D. E. (1988). Regional brain trace-element studies in Alzheimer's disease. *Neurotoxicology*, **9**, 1-8.
- Torres, A.S., Petri, V., Rae, T.D. & O'Halloran, T.V. (2001). Copper stabilizes a heterodimer of the yCCS metallochaperone and its target superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, **276**(42), 38410-38416.
- Tsukada, H. & Nakamura, Y. (1999). Transfer of  $^{137}\text{Cs}$  and stable Cs from soil to potato in agricultural fields. *The Science of the Total Environment*, **228**, 111-120.

- Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E. & Ryals, J. (1992). Acquired Resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **4**, 645-656.
- Ulrich, H. D. & Jentsch, S. (2000). Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair. *EMBO Journal*, **19**(13), 3388-3397.
- Uozumi, N., Gassmann, W., Cao, Y. & Schroeder, J. I. (1995). Identification of Strong Modifications in Cation Selectivity in *Arabidopsis* Inward Rectifying Potassium Channel by Mutant Selection in Yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**(41), 24276-24281.
- Valcke, E. & Cremers, A. (1994). Sorption-desorption dynamics of radiocaesium in organic matter soils. *Sci. Total Environ.*, **157**, 275-283.
- van Assche, F. & Clijsters, H. (1990). Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell and Environment*, **13**, 195-206.
- van Camp, W., Willekens, H., Bowler, C., van Montagu, Inze, M.D., Reupold-Popp, P., Sandermann, H. & Langebartels, C. (1994). Elevated levels of superoxide dismutase protect transgenic plants against ozone damage. *Biotechnology* **12**, 165-168.
- 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. (2000). The application of DNA microarrays in gene expression analysis. *Journal of Biotechnology*, **78**(3), 271-280.
- Vanacker, H., Carver, T. L. W. & Foyer, C. H. (2000). Early H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Accumulation in Mesophyll Cells Leads to Induction of Glutathione during the Hyper-Sensitive Response in the Barley-Powdery Mildew Interaction. *Plant Physiol.*, **123**, 1289-1300.
- Veresoglou, D. S., Tsialtas, J. T., Barbayiannis, N. & Zalidis, G. C. (1995). Caesium and strontium uptake by two pasture plant species grown in organic and inorganic soils. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **56**, 37-42.
- Voet, D. & Voet, J.G. (1990). *Biochemie*. VCH, Weinheim.
- von Stein, O. D., Thies, W.-G. & Hofmann, M. (1997). A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. *Nucleic Acids Research*, **25**(13), 2598-2602.
- Walker, N. A., Sanders, D. & Maathuis, F. J. M. (1996). High-Affinity Potassium Uptake in Plants. *Science*, **273**, 977-978.
- Wallace, A., Romney, E. M. & Wood, R. A. (1982). The Role of Stable Cesium on Plant Uptake of Cesium-137. *Soil Science*, **134**(1), 71-75.
- Wan, J. S., Sharp, S. J., Poirer, G. M.-C., Wagaman, P. C., Chambers, J., Pyati, J., Hom, Y.-L., Galindo, J. E., Huvar, A., Peterson, P. A., Jackson, M. R. & Erlander, M. G. (1996). Cloning differentially expressed mRNAs. *Nature biotechnology*, **14**, 1685-1691.
- Wang, T.-B., Gassmann, W., Rubio, F., Schroeder, J. I. & Glass, A. D. M. (1998). Rapid Up-Regulation of *HKT1*, a High-Affinity Potassium Transporter Gene, in Roots of Barley and Wheat following Withdrawal of Potassium. *Plant Physiol.*, **118**, 651-659.
- Wang, X. & Ohnishi, T. (1997). p53-dependent signal transduction induced by stress., **38**, 179-194.
- Waterhouse, P. M., Wang, M.-B. & T., L. (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature*, **411**, 834-842.
- Weingartner, M., Pelayo, H. R., Binarova, P., Zwerger, K., Melikant, B., de la Torre, C., Heberle-Bors, E. & Bogre, L. (2003). A plant cyclin B2 is degraded early in mitosis and its ectopic expression shortens G2-phase and alleviates the DNA-damage checkpoint. *Cell Sci.*, **116**, 487-498.
- Weseley, S. V., Helliwell, C. A., Smith, N. A., Wang, M., Rouse, D. T., Liu, Q., Gooding, P. S., Singh, S. P., Abbot, D., Stoutjesdijk, P. A., Robinson, S. P., Gleave, A. P., Green, A. G. & Waterhouse, P. M. (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal*, **27**(6), 581-590.
- Whicker, F. W., Shaw, G., Voigt, G. & Holm, E. (1999). Radioactive contamination: state of the science and its application to predictive models. *Environmental Pollution*, **100**, 133-149.
- White, P. J. (1997). Cation channels in the plasma membrane of rye roots. *Journal of Experimental Botany*, **48**, 499-514.
- White, P. J. (2000). Calcium channels in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1465**, 171-189.
- White, P. J. & Broadley, M. R. (2000). Mechanisms of caesium uptake by plants. *New Phytologist*, **147**, 241-256.
- Williams, L. E., Pittman, J. K. & Hall, J. L. (2000). Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1465**, 104-126.
- Witherspoon, J. P. & Brown, G. N. (1965). Translocation of Cesium-137 from parent trees to seedlings of *Liriodendron tulipifera*. *Bot. Gaz.*, **126**, 181-185.
- Wojtaszek, P. (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. Journal*, **322**, 681-692.
- Wolff, S. (1989). Are Radiation-Induced Effects Hormetic? *Science*, **245**, 575.

- Wu, S.-J., Ding, L. & Zhu, J.-K. (1996). *SOS1*, a Genetic Locus Essential for Salt Tolerance and Potassium Acquisition. *The Plant Cell*, **8**, 617-627.
- Xiang, C. & Oliver, D. J. (1998). Glutathione Metabolic Genes Coordinately Respond to Heavy Metals and Jasmonic Acid in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **10**, 1539-1550.
- Xiong, L., Lee, H., Ishitani, M. & Zhu, J.K. (2002). Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the LOS6/ABA1 locus in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.*, **277**(10), 8588-8596.
- Xu, Q. & Reed, J. C. (1998). Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol. Cell.*, **1**(3), 337-346.
- Yamada, S., Katsuhara, M., Kelly, W. B., Michalowski, C. B. & Bohnert, H. J. (1995). A family of transcripts encoding water channel proteins: tissue-specific expression in the common ice plant. *The Plant Cell*, **7**, 1129-1142.
- Yamada, S., Komori, T., Myers, P. N., Kuwata, S., Kubo, T. & Imaseki, S. (1997). Expression of plasma membrane water channel genes under water stress in *Nicotiana excelsior*. *Plant Cell Physiol.*, **38**, 1226-1231.
- Yang, Y., Kwon, H.-B., Peng, H.-P. & Shih, M.-C. (1993). Stress Response and Metabolic Regulation of Glycerinaldehyd-3-phosphate Dehydrogenase Genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **101**, 209-216.
- Yeo, A. (1998). Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *Journal of Experimental Botany*, **49**(323), 915-929.
- Yonezawa, M., Takeda, A. & Misonoh, J. (1990). Acquired radio-resistance after low dose X- irradiation in mice. *J. Radiation Res.*, **31**, 256-262.
- Yoshiba, Y., Kiyosue, T., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. (1997). Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant Cell Physiol.*, **38**, 1095-1102.
- Yoshiba, Y., Aoki, C., Iuchi, S., Nanjo, T., Seki, M., Sekiguchi, F., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. (2001). Characterization of four extensin genes in *Arabidopsis thaliana* by differential gene expression under stress and non-stress conditions. *DNA Res.*, **8**(3), 115-122.
- Young, G. P., Ross, D. T., Kuang, W. W., Brown, P. O. & Weigel, R. J. (1999). Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucleic Acids Research*, **27**(6), 1517-1523.
- Zaka, R., Vandecasteele, C. M. & Misset, M. T. (2002). Effects of low chronic doses of ionizing radiation on antioxidant enzymes and G<sub>6</sub>PDH activities in *Stipa capillata* (Poaceae). *Journal of Experimental Botany*, **53**, 1979-1987.
- Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. & Bartel, D. P. (2000). RNAi: Double-Stranded RNA Directs the ATP-Dependent Cleavage of mRNA at 21 to 23 Nucleotide Intervals. *Cell*, **101**, 25-33.
- Zhang, K., Smouse, D. & Perrimon, N. (1991). The crooked neck gene of *Drosophila* contains a motif found in a family of yeast cell cycle genes. *Genes Dev.*, **5**(6), 1080-1091.
- Zhou, J. & Goldsbrough, P. B. (1995). Structure, organization and expression of the metallothionein gene family in *Arabidopsis*. *Mol. Gen. Genet.*, **248**, 318-328.
- Zhu, J., Gong, Z., Zhang, C., Song, C.-P., Damsz, B., Inan, G., Koiwa, H., Zhu, J.-K., Hasegawa, P. M. & Bressan, R. A. (2002). OSM1/SYP61: A Syntaxin Protein in *Arabidopsis* Controls Abscisic Acid-Mediated and Non-Abscisic Acid-Mediated Responses to Abiotic Stress. *The Plant Cell*, **14**, 3009-2028.
- Zhu, J.-K., Liu, J. & L., X. (1998). Genetic Analysis of Salt Tolerance in *Arabidopsis*: Evidence for a Critical Role of Potassium Nutrition. *The Plant Cell*, **10**, 1181-1191.
- Zhou, N., Tootle, T.L. & Glazebrook, J. (1999). *Arabidopsis* PAD3, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Cell*, **11**(12), 2419-2428.
- Zhu, X.-D., Küster, B., Mann, M., Petrini, J. H. J. & de Lange, T. (2000). Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *nature genetics*, **25**(3), 347-352.
- Zhu, Y.-G., Shaw, G., Nisbet, A.F. and Wilkins, B.T. (2000). Effect of potassium starvation on the uptake of radiocaesium by spring wheat (*Triticum aestivum* cv. Tonic). *Plant and Soil*, **220**, 27-34.
- Zhu, Y. G. & Shaw, G. (2000). Soil contamination with radionuclides and potential remediation. *Chemosphere*, **41**, 121-128.
- Zhu, Y.-G., Shaw, G., Nisbet, A. F. & Wilkins, B. T. (1999). Effects of External Potassium Supply on Compartmentation and Flux Characteristics of Radiocaesium in Intact Spring Wheat Roots. *Annals of Botany*, **84**, 639-644.
- Zhu, Y.-G. & Smolders, E. (2000). Plant uptake of radiocaesium: a review of mechanisms, regulation and application. *Journal of Experimental Botany*, **51**(351), 1635-1645.
- Zinser, C., Jungblut, T., Heller, W., Seidlitz, H. K., Schnitzler, J.-P., Ernst, D. & Sandermann, H. (2000). The effect of ozone in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) gene expression, biochemical changes and interactions with UV-B radiation. *Plant, Cell and Environment*, **23**, 975-982.

## 6. Anhang

### I) Primer und Klone der SSH-Experimente

#### I.1. PCR Primer:

ACBK1 forw., ATGGGGATTCAAGAAGCC	ACBK1 rev., TCACTTCAGTGTAAGCGG
AKT1 forw., CCTTTCGAGTTTGGGTTC	AKT1 rev., CTTTGTGTTTACAGGATGC
AP2 forw., TGCGAGATCATCTGGAAAG	AP2 rev., TTCTTATTCGCATCGCCC
ATKC forw., GTTGCCGTTGTTGTTGAG	ATKC rev., AAAGAGTTCGGCTACACGAC
AtKup1 forw., GACTTTGTCTTGTGCCAATG	AtKup1 rev., TCGCCACCAAGATGATAC
AtMyb4 forw., GACCAATCCAAGAATCATCAGC	AtMyb4 rev., GCTTCGAAAGCCCAAAGAG
ATPsulf. forw., CCATCATGCTTCTCGTTATG	ATPsulf. rev., GTTCTTCTTTGGGATGCTTG
auxinreg forw., GGACCTAAACCGGAGCATG	auxinreg. rev., TGGGTGAGAAGGCTTGTCG
betaglucan forw., TCAATCAGACACAATCGCTC	betaglucan rev., TCACGTGGATTGTCAACG
c2h2 forw., GTATTGCGGAATCAGCAGATC	c2h2 rev., TGCCTACCAACATTTCCCTG
ccc anti, ATGGCATCCTCAATCCCTTC	ccc sense, GATTTTTGAACGGTGGATGG
Cuchaperon forw., CCAACCCCAAATCTCAATC	Cuchaperon rev., AACCGGTAAAGTTGGCTTC
cyclin forw., AGGTTCCAGCTCTTGGTCC	cyclin rev., CAATGATGTTGACGGTGAGG
cyclophil forw., GCTTTTCGCTGATACAACC	cyclophil rev., GTGATGGTAACGACTTTGG
DM151, GTCTCTGAATCAGAAATCCTTCTATC	DM152, CATGTCAAATTTCACTGCTTCATCC
Dr4 forw., GCTCGTCCTGACAACCATG	Dr4 rev., CGTTCATGCACGTAGTAGTCG
drebl1a forw., TTTCTGAAATGTTTGGCTCC	drebl1a rev., CGCATCACACATCTCATCC
drebl2a sense, AGGAAAGTACCTGCGAAAGG	drebl2a anti, TCTCTTCATCTCTTCCGCAC
Endochit forw., ACAAAATGACCGATTTGCC	Endochit rev., CTCTGGTTTTCTCTGTGTGCG
ERD15 forw., TATTCGGCAGCTGTACG	ERD15 rev., ACAATCGATCTCGGGCTC
Excision forw., GCACTTTTCATGGCGACG	Excision rev., AGCGCAAATCTCACTCGG
extensin forw., CCGCAAATTACTTCTACTC	extensin rev., TATTCGTAGTGCTTCTTGGG
GST forw., ACATCTTCTTCGTCAGCCG	GST rev., CCACCACCGTTGAGATTC
HAK5 forw., GGGACTAATTCCAAACCAAG	HAK5 rev., TCAGCAAACATTGCCTCC
hat7 forw., CTATCAGACGATGGGGCAC	hat7 rev., CCATGCCCAGTAACCAGC
hsp70 forw., GTTTTCGACGCTAAGAGGTTG	hsp70 rev., CAGTTGCCTTCACCTCAAAG
KCO forw., TCCTCGTGGTGATTGTATG	KCO rev., AATGTTGTAACCGTGGAGC
kin1/2 forw., AAGAATGCCTTCCAAGCC	kin1/2 rev., TGTTACAGCCGGTCTTG
K-kanal forw., CAGCTCGATGTGAAAGAAG	K-kanal rev., ATGCAAATCGGCTGTCTG
limcycl forw., TCCTCACCGTTTCGTATG	limcycl rev., TGGTACGGCATTCTAAGG
M13 forw., GTAAAACGACGGCCAGT	M13 rev., GGAAACAGCTATGACCATG
Mre11 forw., TTCCACATCACACAACCAG	Mre11 rev., TTCAGTTCTTCTGGACGAAG
Nitrattp forw., TTCAAGCTCTTCTCCTTCG	Nitrattp rev., GCAGCGCCTAATGATTTCC
osmotin forw., TCATCTCCACCGCAACAG	osmotin rev., CACGTTTGGACATTGTCCG
PIP2b forw., GGTCTTTATACAGAGCCGTC	PIP2b rev., AAACCCAATCGGAAGTGG

## 6. Anhang

profilin forw., CTCATGTGCGAGGTCGAAG  
 prolins forw., AACTTGATGGGAAGGCTTG  
 SOD forw., ATCTTTTTACCCAGGAAGG  
 thioredox forw., GGAGAAGTGATTGCTTGCC  
 tif-factor forw., ATCAATGATTGGGTCAGCC  
 tubulin forw., GATGGTGCCATCAACGTG

profilin rev., AAGGAATAGCCCGGTTGG  
 prolins rev., CCCCTCGTCTAATTTGG  
 SOD rev., AAGGTGGCAGTTCCATCATC  
 thioredox rev., AGGCATTGCCTCAACTTTG  
 tif-factor rev., TTGCTCAGCATCTTCTCCC  
 tubulin rev., CACCTCTGCAACTGCTGTG

### I.2. Cäsium-SSH:

ssh "Cäsium-133" (0,7 mM Kalium, 100µM Cäsium)	
induziert	reprimiert
A.t. vacuolar sorting receptor homolog (At2g14720)	actin2 (At3g18780)
adenosylhomocysteinase (At4g13940)	aquaporin (plasma membrane intrinsic protein PIP 2b (At2g37170)
anthranilate synthase component I-1 precursor (At5g05730)	aquaporin (plasma membrane intrinsic protein PIP1b (At2g45960)
ATP sulfurylase precursor (At5g43780 )	betaglucosidase (At1g66270)
ATP sulfurylase/APS kinase (AT3g22890)	cycloartenol synthase (At5g42600 )
beta 1,3-glucanase I precursor (At4g16260)	Dr4 putative protease inhibitor (At1g73330)
Ca <sup>2+</sup> -dependent membrane-binding protein - annexin (At1g35720)	glutamin-dependent asparagin synthetase (At3g47340)
cytochrome c (At1g22840)	Kalium transporter HAK5 (At4g13420 )
cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase (At4g14880)	known protein - C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> -type zinc finger domain (At1g72050)
dehydration-induced protein (ERD15) (At2g41430)	limonene cyclase-like (At3g25830)
delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (At3g55610)	NADP-specific isocitrate DH (At1g65930 )
DNAJ-like protein (At4g36040)	putative homeobox-leucine zipper protein, HAT7 (At3g01220)
dnaK-type molecular chaperone hsc70.1 (At5g02500)	putative ribosomal protein L19 (At4g02230 )
EF1 alpha A1 elongation factor (At5g60390)	putative trypsin inhibitor (At1g73260)
extensin3 (At1g213130)	salt-stress induced tonoplast intrinsic protein (At3g26520)
feebly-protein (At3g01420) - haem peroxidase motif	unknown protein (At3g15450) - GATase domain (asparagin synthase)
glutathion-S-transferase (At1g02920)	
glutathion-S-transferase (At3g03190)	
glutathion-S-transferase (At4g02520)	
H <sup>+</sup> -transporting ATP synthase beta-chain (mitochondrial) (At5g08680)	
H <sup>+</sup> -transporting ATPase type2 (plasma membrane)	



(At4g30190)	
high affinity nitrate transporter (At1g08090)	
leucine aminopeptidase (At2g24200)	
luminal binding protein/dnaK-type chaperone hsc70 (At5g28540)	
osmotin precursor (At4g11650)	
pathogenesis related protein 1 (At4g33720)	
pectinesterase-like protein (At3g29090)	
peptidylprolyl isomerase (cyclophilin) (At4g34870)	
peroxidase (At2g38390)	
peroxidase prxr1 (At4g21960)	
phi1-like protein (At5g64260) - phosphate-induced protein 1 conserved region	
predicted prolin-rich protein (At4g28300)	
probable eucaryotic translation initiations factor 3 subunit 8 (At3g56150)	
proteinkinase-like/serin-threonin kinase (At5g03320)	
putative AP2 domain transcription factor (At1g72360)	
putative calcium binding protein (At3g47480)	
putative carboxylesterase (At1g68620)	
putative carnitine/acylcarnitine translocase (At1g79900)	
putative copper chaperone (At1g12520)	
putative copper/zinc superoxide dismutase (At2g28190)	
putative cytochrome P450 monooxygenase (At2g24180)	
putative endochitinase (At2g43570 )	
putative glyceraldehydphosphat DH (At1g13440)	
putative glycin-rich protein (At2g05440)	
putative polyA-binding protein (At1g49760)	
putative protein (At1g54320) - LEM3 family / CDC50 family	
putative protein (At5g27710) - arginase family signature	
putative tropinone reductase (At2g29350 )	
superoxide dismutase - copper/zinc signatures (At1g08830)	
UDP-GlcNAc: dolichol phosphate N-acetylglucosamine 1-phosphate transferase (At2g41490)	
unknown protein (At1g03220)	
unknown protein (At1g10140)	
unknown protein (At1g26250) - extensin-like region	
unknown protein (At2g05260) - lipase block	

unknown protein (At3g13460) - YT521-B-like family (alternative splicing)	
unknown protein (At5g41520) - Plectin/S10 domain (RNA binding)	
unknown protein (At5g45350)	

### I.3. Radiocäsium-SSH:

sshradio (30Bq/cm3)	
induziert	reprimiert
3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (At1g76490)	putative protein (At5g15120)
60S ribosomal protein L37A like (At3g60245)	putative oligouridylate binding protein (At3g14100)
60S ribosomal protein L38-like protein (At3g59540)	glutamate dehydrogenase GDH2 (At5g07440)
alpha-ketoacid-dehydrogenase E1 alpha subunit (At1g21400)	xylose isomerase (At5g57655)
bax-inhibitor-1 like (At5g47120)	unknown protein (At5g58375)
catalase 3; unknown (At1g20620)	
cell cycle control crn-like protein (At5g41770)	
DNA excision repair protein (At5g21900)	
extensin-like protein (At5g46890)	
low temp. and salt response protein (At4g30650)	
mitosis-specific cyclin 1b (At5g06150)	
phi1-like protein (At5g64260) - phosphate-induced protein 1 conserved region	
profilin 2 (At4g29350)	
putative actin depolymeration factor (At4g00680)	
putative aminoacid transporter protein (At4g38250)	
putative auxin-regulated protein (At2g33830)	
putative glycin-rich protein (At2g05510)	
putative major latex protein (At4g23670)	
putative protein (At1g50300) - RNA recognition motif	
putative protein (At1g65980) - AhpC/TSA family	
putative protein (At3g48530) - CBS domain	
putative ubiquinol-cytochrome c reductase (At3g10860)	
putative ubiquitin conjugated enzym E2 (At2g33770)	
ribosomal protein GL41-like (At3g56020)	
similar to O-succinylhomoserine sulfhydrylase (At1g64660)	
stress inducible kin2/kin1 protein (At5g15970/60)	

thioredoxin (At5g42980)	
tubulin alpha-5 chain (At5g19780)	
unknown protein (At1g19015)	
unknown protein (At1g19530)	
unknown protein (At1g54410) - dehydrin domain	
unknown protein (At1g76200)	
unknown protein (At2g23090)	
unknown protein (At2g26280) - mismatch repair Smr domain	
unknown protein (At3g15580) - Microtubule associated protein domain	
unknown protein (At3g53990) - universal stress protein signature	
unknown protein (At4g14010)	
unknown protein (At4g22310)	
unknown protein (At5g02810) - transcriptional regulatory protein domain	
unknown protein (At5g48180) - kelch motif	
unknown protein (At5g66052)	

## II) Primer und Sequenz-Vergleich der RNAi/Überexpressionsexperimente

### II.1. Primer für RNAi/Überexpression:

attB1\_PU3, GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTGTGTTTCAGTTCGGACAGC  
 attB2\_PU3, GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCTGTTTCAGTAACAATGCC  
 attb1\_P1, GGGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGTCTACGACGACTACTGAGGCC  
 attb2\_P, GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTAGAAAATATATAAATGATCG  
 attB1\_P4, GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTGCGAGTGATGCAGCTCG  
 attB2\_P4, GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACCTTTGAATCTGAGACCTGG  
 attb1P4\_RNAi, GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCCTCGTGGTGATTTGTATG  
 attb2P4\_RNAi, GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAATGTTGTAACCGTGGAGC

#### *pJawohl/PDJW Vektor-Primer:*

pJW Intron, GGCTTACGTTAGCAGAGGAGG  
 pJW rev., AGAGACTGGTGATTTTTGCGG  
 pJW forw., CTCGAGAAAGAGGATCCACC  
 pJWIntron2, CCTCCTCTGCTAACGTAAGCC

### II.2. Sequenzvergleiche der pEntry-Inserts:

## 6. Anhang

### ATKC-Vergleich:

	1				50
ATKC_voll	.....	.....	.....	.....	.....
ATKC_entry_forw	TCGGGCCCCA	AATAATGATT	TTATTTTGAC	TGATAGTGAC	CTGTTCGTTG
ATKC_entry_rev	.....	.....	.....	.....	.....
	51				100
ATKC_voll	.....	.....	.....	.....	.....
ATKC_entry_forw	CAACAAATTG	ATGAGCAATG	CTTTTTTATA	ATGCCAACTT	TGTACAAAAA
ATKC_entry_rev	.....	.....	.....	.....	.....
	101				150
ATKC_voll	...CCACCAT	GTCTACGACG	ACTACTGAGG	CGAGATCACC	GTTGCCGTTG
ATKC_entry_forw	AGCAGGCTAT	GTCTACGACG	ACTACTGAGG	CGAGATCACC	GTTGCCGTTG
ATKC_entry_rev	.....	.....	.....	.....	.....
	151				200
ATKC_voll	TTGTTGAGAA	GAGGAAGGTC	TTCGACGGCG	TTATCGGCGT	CGACGGCGGA
ATKC_entry_forw	TTGTTGAGAA	GAGGAAGGTC	TTCGACGGCG	TTATCGGCGT	CGACGGCGGA
ATKC_entry_rev	.....	.....	.....	.....	.....
	201				250
ATKC_voll	AGCAAGATCG	CCGTTATCGA	TACTGCAGTT	CAGAAGAAGA	TCGAGCAAAG
ATKC_entry_forw	AGCAAGATCG	CCGTTATCGA	TACTGCAGTT	CAGAAGAAGA	TCGAGCAAAG
ATKC_entry_rev	.....	.....	.....	.....	.....
	251				300
ATKC_voll	ATGTGAGGAA	CATAACGTCA	GTTTCGAGCA	GTCTCTTGCC	TGCTTTTGGG
ATKC_entry_forw	ATGTGAGGAA	CATAACGTCA	GTTTCGAGCA	GTCTCTTGCC	TGCTTTTGGG
ATKC_entry_rev	.....	.....	.....	.....	.....
	301				350
ATKC_voll	ACTTTCATCG	AAGATGATAA	TCCTTCTTCC	AAACCTTTCA	TCGTTCCTCA
ATKC_entry_forw	ACTTTCATCG	AAGATGATAA	TCCTTCTTCC	AAACCTTTCA	TCGTTCCTCA
ATKC_entry_rev	.....	.....	.....	.....	.....
	351				400
ATKC_voll	CTTTGATCGT	CGTTACAGGT	TGTGGGAATT	GTTTTTGGTG	ATATTGGTTG
ATKC_entry_forw	CTTTGATCGT	CGTTACAGGT	TGTGGGAATT	GTTTTTGGTG	ATATTGGTTG
ATKC_entry_rev	.....	.....	.....	.....	.....
	401				450
ATKC_voll	GGTATTCGGC	GTGGGCATCT	TTGTTTCGAGT	TGGCTTTCGA	GAAAGCTGCC
ATKC_entry_forw	GGTATTCGGC	GTGG.CATCT	TTGTTTCGAGT	TGGCTTTCGA	GAAAGCTGCC
ATKC_entry_rev	.....	.....	.....	.....	.....
	451				500
ATKC_voll	GAAGGAGCGT	TATTGACCAT	TGATCTCGTC	GTTGACTTCT	TCTTCGCCGT
ATKC_entry_forw	GAAGGAGCGT	TATTGACCAT	TGATCTCGTC	GTTGACTTCT	TCTTCGCCGT
ATKC_entry_rev	.....	.....	.....	.....	.....
	501				550
ATKC_voll	TGATATCATC	CTCACCTTTT	TTGTTTCCTA	CTTGATAAAT	ACTACTTACC
ATKC_entry_forw	TGATATCATC	CTCACCTTTT	TTGTTTCCTA	CTTGATAAAT	ACTACTTACC
ATKC_entry_rev	.....	.....	.....	.....	.....
	551				600
ATKC_voll	TCAATGTCAC	CGACCACAAG	CTCATCGCCA	AACGGTACTT	GAAGAGCGTG
ATKC_entry_forw	TCAATGTCAC	CGACCACAAG	CTCATCGCCA	AACGGTACTT	GAAGAGCGTG
ATKC_entry_rev	.....	.....	.....	.....	.....
	601				650
ATKC_voll	GCTTTTGTGA	TGGACGTAGC	ATCAACGTTA	CCCATTCAAT	TCATTTATAA
ATKC_entry_forw	GCTTTTGTGA	TGGACGTAGC	ATCAACGTTA	CCCATTCAAT	TCATTTATAA
ATKC_entry_rev	.....	.....	.....	.....	.....
	651				700
ATKC_voll	AACTATTACC	GGAGATGTCG	GACGAGGCCA	AGCTTTCGGC	TTCCTTAATT
ATKC_entry_forw	AACTATTACC	GGAGATGTCG	GACGAGGCCA	AGCTTTCGGC	TTCCTTAATT
ATKC_entry_rev	.....	.....	.....	.....	.....
	701				750
ATKC_voll	TACTCCGCCT	CTGGCGTCTC	CGTCGTGTAG	CCGAACTCTT	TAAAAGACTA
ATKC_entry_forw	TACTCCGCCT	CTGGCGTCTC	CGTCGTGTAG	CCGAACTCTT	TAAAAGACTA

## 6. Anhang

---

```

ATKC_entry_rev .....
751 800
    ATKC_voll GAGAAAGACG CACATTTCAA CTATTTTCGTG ATCCGAGTCA TCAAACCTTCT
ATKC_entry_forw GAGAAAGACG CACATTTCAA CTATTTTCGTG ATCCGAGTCA TCAAACCTTCT
    ATKC_entry_rev .....

801 850
    ATKC_voll ATGTGTAACG ATATTTTGGG TACATTTGGC GGGTTGCATT TTATACTGGA
ATKC_entry_forw ATGTGTAACG ATATTTTGGG TACATTTGGC GGGTTGCATT TTATACTGGA
    ATKC_entry_rev .....

851 900
    ATKC_voll TAGCCTACCA TTATCCAAGG CCTACGGATA CATGGATAGG ATCGCAAGTT
ATKC_entry_forw TAGCCTACCA TTATCCAAGG CCTACGGATA CATGGATAGG ATCGC.....
    ATKC_entry_rev .....

901 950
    ATKC_voll GAGGATTTTA AGGAAAGAAG TGTATGGTTA GGGTACACTT ACTCAATGTA
ATKC_entry_forw .....
    ATKC_entry_rev .....

951 1000
    ATKC_voll CTGGTCCATT GTCACACTCA CTACCGTGGG TTACGGTGAT TTGCATGCAG
ATKC_entry_forw .....
    ATKC_entry_rev .....

1001 1050
    ATKC_voll TTAATAGCCG TGAGAAGACA TTCAACATGT TCTACATGCT TTCAACATT
ATKC_entry_forw .....
    ATKC_entry_rev .....

1051 1100
    ATKC_voll GGCCTCACTT CTTATATCAT CGGTATCATG ACCAATCTAG TTGTCCATGG
ATKC_entry_forw .....
    ATKC_entry_rev .....

1101 1150
    ATKC_voll CGCTCTTCGT ACATTCGCCA TGAGGAGTGC GATCAATGAT ATATTGCGAT
ATKC_entry_forw .....
    ATKC_entry_rev .....

1151 1200
    ATKC_voll ACACAAGCAA GAACAGGTTA CCGGATACAA TGAGGGAACA GATGCTTGCA
ATKC_entry_forw .....
    ATKC_entry_rev .....

1201 1250
    ATKC_voll CATATGCAGC TCAAGTTCAA GACCGCGGAG TTAAGGCAAG AAGAGGTTCT
ATKC_entry_forw .....
    ATKC_entry_rev .....

1251 1300
    ATKC_voll TCAAGACTTA CCTAAGGCCA TAAGATCAAG CATTAACCAA CATCTATTCC
ATKC_entry_forw .....
    ATKC_entry_rev .....

1301 1350
    ATKC_voll GCTCCATCAT CGAAGAAGCT TATCTTTTTA AAGGATTCCC CGAAGGCCTC
ATKC_entry_forw .....
    ATKC_entry_rev .....

1351 1400
    ATKC_voll CTCGTCCAGC TGGTTTCGCA AATACAAGCA GAATATTTTC CGCCGAAAAT
ATKC_entry_forw .....
    ATKC_entry_rev .....

1401 1450
    ATKC_voll GGAGATAATC TTGCAGAATG AGATTCCAAC GGATTTCTAC GTAATTGTAT
ATKC_entry_forw .....
    ATKC_entry_rev .....

1451 1500

```

## 6. Anhang

ATKC_voll	CTGGAGGAGT	GGATATAAAT	GCTTCCAAGG	GTGTGAGTGA	ACAGGTATTA
ATKC_entry_forw	.....	.....	.....	.....	.....
ATKC_entry_rev	.....	.....	.....	.....	.....
	1501				1550
ATKC_voll	GCGAAGTTAG	GTCCCGGAAG	TATGGCAGGA	GAGATAGGAG	TAGTGTTCAA
ATKC_entry_forw	.....	.....	.....	.....	.....
ATKC_entry_rev	.....	.....	.....	.....	.....
	1551				1600
ATKC_voll	CATTCTCAG	CCTTTCACAG	TGAGGACACG	TCGACTTTCA	CAAGTTATCA
ATKC_entry_forw	.....	.....	.....	.....	.....
ATKC_entry_rev	.....	.....	.....	.....	.....
	1601				1650
ATKC_voll	GAATTGGTCA	TCATAAGTTC	AAAGAAATGG	TGCAGTCTGA	TAATGACGTC
ATKC_entry_forw	.....	.....	.....	.....	.....
ATKC_entry_rev	.....	.....	.....	TGCAGTCTGA	TAATGACGTC
	1651				1700
ATKC_voll	GACGCCAAAA	TGATCATTGC	CAATTTTCATG	ACATATCTTA	AGGGATTGAA
ATKC_entry_forw	.....	.....	.....	.....	.....
ATKC_entry_rev	GACGCCAAAA	TGATCATTGC	CAATTTTCATG	ACATATCTTA	AGGGATTGAA
	1701				1750
ATKC_voll	TGATGAGTTA	AAAAAAGAAA	TTCCTTTTCT	TAGAGATTTA	TTAGATGACG
ATKC_entry_forw	.....	.....	.....	.....	.....
ATKC_entry_rev	TGATGAGTTA	AAAAAAGAAA	TTCCTTTTCT	TAGAGATTTA	TTAGATGACG
	1751				1800
ATKC_voll	CAGATGCTCA	GGTTCAGGAA	ACAGTTCAGT	CAGAGGAAAC	ACCACAAAGT
ATKC_entry_forw	.....	.....	.....	.....	.....
ATKC_entry_rev	CAGATGCTCA	GGTTCAGGAA	ACAGTTCAGT	CAGAGGAAAC	ACCACAAAGT
	1801				1850
ATKC_voll	AACGATGAGG	AAATAGTTAC	GGTCTCAAGA	CATGAAAATG	GACAGATAGA
ATKC_entry_forw	.....	.....	.....	.....	.....
ATKC_entry_rev	AACGATGAGG	AAATAGTTAC	GGTCTCAAGA	CATGAAAATG	GACAGATAGA
	1851				1900
ATKC_voll	AGAGAGAAGA	AGAGAGGGAG	TTCCAAAAAG	AGTGATAAAT	CATGGACAAG
ATKC_entry_forw	.....	.....	.....	.....	.....
ATKC_entry_rev	AGAGAGAAGA	AGAGAGGGAG	TTCCAAAAAG	AGTGATAAAT	CATGGACAAG
	1901				1950
ATKC_voll	CTCCTCCTAA	TCAAGATAAC	AAAAACAATG	GTGATTCCAA	CGGTAGGCTT
ATKC_entry_forw	.....	.....	.....	.....	.....
ATKC_entry_rev	CTCCTCCTAA	TCAAGATAAC	AAAAACAATG	GTGATTCCAA	CGGTAGACTT
	1951				2000
ATKC_voll	ATCATTTTAC	CTGACTCTAT	CCAACCTCTA	TTCGACTTAG	CTGAGAAGAA
ATKC_entry_forw	.....	.....	.....	.....	.....
ATKC_entry_rev	ATCATTTTAC	CTGACTCTAT	CCAACCTCTA	TTCGACTTAG	CTGAGAAGAA
	2001				2050
ATKC_voll	GTTGGGGAAA	CGAGGAAGCA	CGATTGCAAT	GGCAGATGGT	GCACATGTTG
ATKC_entry_forw	.....	.....	.....	.....	.....
ATKC_entry_rev	GTTGGGGAAA	CGAGGTAGCA	CGATTGCAAT	GGCAGATGGT	GCACATGTTG
	2051				2100
ATKC_voll	AACAAATTGA	TGCTCTTCGA	GAAAACGATC	ATTTATATAT	TTTCTAA...
ATKC_entry_forw	.....	.....	.....	.....	.....
ATKC_entry_rev	AACAAATTGA	TGCTCTTCGA	GAAAACGATC	ATTTATATAT	TTTCTAAACC

### KCO-Vergleich:

	1				50
KCOvoll_Entry	.....	ATGCAGCTCG	TACGCCATTG	TTACCCACTG	AGAAGATAGA
KCO	.....	ATGTCGAGTG	ATGCAGCTCG	TACGCCATTG	TTACCCACTG
KCO-RNAi_Entry	.....	.....	.....	.....	.....

## 6. Anhang

	51				100
KCOvoll_Entry	TACCATGGCT	CAAGATTTCA	ACCTGAACTC	AAGAACTTCT	TCTTCAAGAG
KCO	TACCATGGCT	CAAGATTTCA	ACCTGAACTC	AAGAACTTCT	TCTTCAAGAA
KCO-RNAi_Entry	.....	.....	.....	.....	.....
	101				150
KCOvoll_Entry	AACGAAGATT	GCGTCGCTCT	AGAAGTGCTC	CTCGTGGTGA	TTGTATGTAC
KCO	AACGAAGATT	GCGTCGCTCT	AGAAGTGCTC	CTCGTGGTGA	TTGTATGTAC
KCO-RNAi_Entry	.....	.....	.....	.....	.....
	151				200
KCOvoll_Entry	AATGATGATG	TCAAAAATCGA	CGAACCACCT	CCTCATCCGA	GTAAAAATCCC
KCO	AATGATGATG	TCAAAAATCGA	CGAACCACCT	CCTCATCCGA	GTAAAAATCCC
KCO-RNAi_Entry	.....	.....	.....	.....	.....
	201				250
KCOvoll_Entry	AATGTTTCAGT	GATCTAAACC	CGAATCTCAG	GCGAGTGATC	ATGTTCTTGG
KCO	AATGTTTCAGT	GATCTAAACC	CGAATCTCAG	GCGAGTGATC	ATGTTCTTGG
KCO-RNAi_Entry	.....	.....	.....	..GAGTGATC	ATGTTCTTGG
	251				300
KCOvoll_Entry	CTTTATATCT	TACCATTGGT	ACGCTCTGTT	TCTACCTCGT	GAGAGACCAG
KCO	CTTTATATCT	TACCATTGGT	ACTCTCTGTT	TCTACCTCGT	GAGAGACCAG
KCO-RNAi_Entry	CTTTATATCT	TACCATTGGT	ACGCTCTGTT	TCTACCTCGT	GAGAGACCAG
	301				350
KCOvoll_Entry	ATCTCCGGTC	ATAAAAACCAG	TGGTGTGGTA	GATGCTCTCT	ATTTCTGTAT
KCO	ATCTCCGGTC	ATAAAAACCAG	TGGTGTGGTA	GATGCTCTCT	ATTTCTGTAT
KCO-RNAi_Entry	ATCTCCGGTC	ATAAAAACCAG	TGGTGTGGTA	GATGCTCTCT	ATTTCTGTAT
	351				400
KCOvoll_Entry	AGTAACGATG	ACAACCTGTTG	GATACGGTGA	CCTTGTCCT	AATAGT.CCG
KCO	AGTAACGATG	ACAACCTGTTG	GATACGGTGA	CCTTGTCCT	AATAGTTCCG
KCO-RNAi_Entry	AGTAACGATG	ACAACCTGTTG	GATACGGTGA	CCTTGTCCT	AATAGTTCCG
	401				450
KCOvoll_Entry	CCTCAAGGCT	ACTTGCTTGT	GCCTTCGTCT	TCTCGGGAAT	GGTCCTCGTT
KCO	CCTCAAGGCT	ACTTGCTTGT	GCCTTCGTCT	TCTCGGGAAT	GGTCCTCGTT
KCO-RNAi_Entry	CCTCAAGGCT	ACTTGCTTGT	GCCTTCGTCT	TCTCGGGAAT	GGTCCTCGTT
	451				500
KCOvoll_Entry	GGTCACCTCT	TAAGTCGAGC	GGCGGATTAT	CTAGTGGAGA	AACAAGAGGC
KCO	GGTCACCTCT	TAAGTCGAGC	GGCGGATTAT	CTAGTGGAGA	AACAAGAGGC
KCO-RNAi_Entry	GGTCACCTCT	TAAGTCGAGC	GGCGGATTAT	CTAGTGGAGA	AACAAGAGGC
	501				550
KCOvoll_Entry	TTTGCTCGTT	AGGGCTTTCC	ATTTGCGTCA	AAGCTTTGGT	CCAACAGACA
KCO	TTTGCTCGTT	AGGGCTTTCC	ATTTGCGTCA	AAGCTTTGGT	CCAACAGACA
KCO-RNAi_Entry	TTTGCTCGTT	AGGGCTTTCC	ATTTGCGTCA	AAGCTTTGGT	CCAACAGACA
	551				600
KCOvoll_Entry	TTTCTCAAGG	AGTTGCATAC	TAACAAGTTG	AGATACAAAT	GCTATGCTAC
KCO	TT.CTCAAGG	AGTTGCATAC	TAACAAGTTG	AGATACAAAT	GCTATGCTAC
KCO-RNAi_Entry	TT.CTCAAGG	AGTTGCATAC	TAACAAGTTG	AGATACAAAT	GCTATGCTAC
	601				650
KCOvoll_Entry	ATGCCTTGTC	CTGGTAGTCC	TCTTCATTGT	TGGCACGATT	TTCCCTGTAA
KCO	ATGCCTTGTC	CTGGTAGTCC	TCTTCATTGT	TGGCACGATT	TTCCCTGTAA
KCO-RNAi_Entry	ATGCCTTGTC	CTGGTAGTCC	TCTTCATTGT	TGGCACGATT	TTCCCTGTAA
	651				700
KCOvoll_Entry	TGGTTGAGAA	AATGCCGGTT	ATCTCAGCTT	TCTACTGCGT	CTGCTCCACG
KCO	TGGTTGAGAA	AATGCCGGTT	ATCTCAGCTT	TCTACTGCGT	CTGCTCCACG
KCO-RNAi_Entry	TGGTTGAGAA	AATGCCGGTT	ATCTCAGCTT	TCTACTGCGT	CTGCTCCACG
	701				750
KCOvoll_Entry	GTTACAACAT	TGGGTTATGG	AGATAAGAGC	TTTAACTCGG	AAGCCGGACG
KCO	GTTACAACAT	TGGGTTATGG	AGATAAGAGT	TTTAACTCGG	AAGCCGGACG
KCO-RNAi_Entry	GTTACNACAT	T.....	.....	.....	.....
	751				800
KCOvoll_Entry	CCTTTTTGCT	GTGTTTTGGA	TCTTGACGAG	CAGCATATGT	TTGGCTCAGT
KCO	CCTTTTTGCT	GTGTTTTGGA	TCTTGACGAG	CAGCATATGT	TTGGCTCAGT
KCO-RNAi_Entry	.....	.....	.....	.....	.....

## 6. Anhang

	801				850
KCOvoll_Entry	TTTTCCTTTA	TGTAGCTGAG	CTAAATACAG	AAAACAAACA	GAGGGCGTTG
KCO	TTTTCCCTCTA	TGTAGCTGAG	CTAAATACAG	AAAACAAACA	GAGGGCGTTG
KCO-RNAi_Entry	.....	.....	.....	.....	.....
	851				900
KCOvoll_Entry	GTGAAATGGG	TTTTAACGCG	AAGAATCACA	AACAATGATC	TCGAAGCAGC
KCO	GTGAAATGGG	TTTTAACGCG	AAGAATCACA	AACAATGATC	TCGAAGCAGC
KCO-RNAi_Entry	.....	.....	.....	.....	.....
	901				950
KCOvoll_Entry	TGATCTCGAT	GAAGATGGAG	TTGTTGGAGC	TGCAGAGTTT	ATTGTGTATA
KCO	TGATCTCGAT	GAAGATGGAG	TTGTTGGAGC	TGCAGAGTTT	ATTGTGTATA
KCO-RNAi_Entry	.....	.....	.....	.....	.....
	951				1000
KCOvoll_Entry	AACTGAAAGA	AATGGGTAAG	ATTGATGAGA	AAGATATTTT	TGGGATAATG
KCO	AACTGAAAGA	AATGGGTAAG	ATTGATGAGA	AAGATATTTT	TGGGATAATG
KCO-RNAi_Entry	.....	.....	.....	.....	.....
	1001				1050
KCOvoll_Entry	GATGAGTTCG	AGCAACTTGA	TTACGATGAA	TCAGGAACTC	TCACGACTTC
KCO	GATGAGTTCG	AGCAACTTGA	TTACGATGAA	TCAGGAACTC	TCACGACTTC
KCO-RNAi_Entry	.....	.....	.....	.....	.....
	1051				1100
KCOvoll_Entry	TGACATCGTT	TTAGCTCAGA	CCAGGTCTCA	GATTCAAAGG	TAAGACCCAG
KCO	TGACATCGTT	TTAGCTCAGA	CCAGGTCTCA	GATTCAAAGG	TA.....
KCO-RNAi_Entry	.....	.....	.....	.....	.....

### ACBK1-Vergleich:

	451				500
ACBK1	GTGGTTGCTT	TGGCGATTGA	TCCATTGTTT	TTCTACATTC	CCATTGTGCGA
P3_Entry-Klon	.....	.....	.....	.....	.....
	501				550
ACBK1	TAGCGCAAGG	CACTGTCTTA	CTTTGGACTC	AAAGTTGGAG	ATAGCTGCGA
P3_Entry-Klon	.....	.....	.....	.....	.....
	551				600
ACBK1	GTTTGCTTCG	TACGCTCATC	GATGCCTTTT	ACATTATTCA	CATTGTGTTT
P3_Entry-Klon	.....	.....	.CAGGCGGCC	GCACTAGTGA	TTTTGTGTT.
	601				650
ACBK1	CAGTTCAGGA	CAGCTTACAT	CGCTCCTTCT	TCGCGGGTTT	TTGGAAGAGG
P3_Entry-Klon	CAGTTC.GGA	CAGCTTACAT	CGCTCCTTCT	TCGCGGGTTT	TTGGAAGAGG
	651				700
ACBK1	TGAAGTGGTA	GATGATGCTA	AGGCAATAGC	CTTAAAGTAT	CTCTCTTCTT
P3_Entry-Klon	TGAAGTGGTA	GATGATGCTA	AGGCGATAGC	CTTAAAGTAT	CTCTCTTCTT
	701				750
ACBK1	ACTTCATCAT	TGATCTACTC	TCTATCCTTC	CTCTCCCACA	GATAGTAGTT
P3_Entry-Klon	ACTTCATCAT	TGATCTACTC	TCTATCCTTC	CTCTCCCACA	GATAGTAGTT
	751				800
ACBK1	TTAGCCGTTA	TTCCAAGCGT	CAACCAGCCA	GTCTCTTTGC	TAACAAAAGA
P3_Entry-Klon	TTAGCCGTTA	TTCCAAGCGT	CAACCAGCCA	GTCTCTTTGC	TAACAAAAGA
	801				850
ACBK1	TTACCTTAAA	TTTTCCATAA	TTGCTCAATA	TGTTCCCTCGG	ATTCTCCGTA
P3_Entry-Klon	CTACCTTAAA	TTTTCCATAA	TTGCTCAATA	TGTTCCCTCGG	ATTCTCCGTA
	851				900
ACBK1	TGTATCCGCT	TTACTACTGAA	GTGACAAGAA	CATCTGGCAT	TGTTACTGAA
P3_Entry-Klon	TGTATCCGCT	TTACTACTGAA	GTGACAAGAA	CATCTGGCAT	TGTTACTGAA
	901				950



ACBK1 ACAGCATGGG CTGGAGCTGC TTGGAACCTC TCTCTCTATA TGTTAGCCAG  
P3\_Entry-Klon ACAGCAATCC CG.....

### III) Ergebnisse der semiquantitativen und quantitativen RT-PCR

#### III.1. Paw-PCR (Zeit):

[Einfaktorielle Varianzanalyse bzw. t-Test: n.s. keine Signifikanz, \* signifikant, \*\* hoch signifikant, \*\*\* sehr hoch signifikant]

Gen		1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch	Mittelwert	Stand.abweichung	rel. Induktion
beta13glc. **	c	2,4	2,8	2,4	3,1	2,675	0,340342964	1
	3d	3,3	4	3,2	3,5	3,5	0,355902608	1,3
	1,5w	3,3	4,8	4,6	3,6	4,075	0,736545993	1,5
	(+)	4,2	4,8	4,4	3,8	4,3	0,4163332	1,6
limocyclase **	c	2,4	2,2	2	2,1	2,175	0,170782513	1
	3d	2,6	1,8	2,6	2,4	2,35	0,37859389	1,1
	1,5w	1,8	0,9	1,7	2,1	1,625	0,512347538	0,75
	(+)	1,6	1,2	0,9	1,5	1,3	0,316227766	0,6
cyclophilin *	c	3,9	4,5	3,6	4,9	4,225	0,585234996	1
	3d	4	4,4	4,4	5,4	4,55	0,597215762	1,1
	1,5w	4,5	5,3	4,4	5,4	4,9	0,522812905	1,2
	(+)	4,5	6,2	5,7	5,9	5,575	0,745542308	1,3
AP2 **	c	3	3,3	3,8		3,3666666	0,404145188	1
	3d	4,2	3	3,6		3,6	0,6	1,1
	1,5w	4,7	4,5	4,7		4,6333333	0,115470054	1,4
	(+)	4,7	6,3	5		5,3333333	0,850490055	1,6
pip2b **	c	5,5	5,8	6,6		5,9666666	0,212132034	1
	3d	5	5,2	4,8		5	0,141421356	0,8
	1,5w	4,8	4,6	3,5		4,3	0,141421356	0,7
	(+)	4	4,7	4,2		4,3	0,494974747	0,7
endochitin ***	c	2,4	2,4	2,6		2,4666666	0,115470054	1
	3d	3,4	3	3,5		3,3	0,264575131	1,3
	1,5w	3,4	3,3	3,5		3,4	0,1	1,4
	(+)	3,9	3,6	3,5		3,6666666	0,2081666	1,5
sod *	c	2,3	2,6	2,6	2,5	2,5	0,141421356	1
	3d	2,4	3,2	2,8	2,5	2,725	0,359397644	1,1
	1,5w	2,7	3	3	3,3	3	0,244948974	1,2
	(+)	2,9	3,6	3,1	3,8	3,35	0,42031734	1,4
hsp70 * t-Test (c/1,5w)	c	1,3	1,2	1,1	1,5	1,275	0,170782513	1
	3d	1,2	1,5	1,5	2	1,55	0,331662479	1,2
	1,5w	1,5	1,6	1,6	2	1,675	0,221735578	1,3
	(+)	1,6	1,5	1,6	1,6	1,575	0,05	1,2
cuchap	c	1,8	1,7	1,7	2,2	1,82	0,216794834	1

## 6. Anhang

* t-Test (c/1,5w)	3d	2,2	2,4	1,8	2	1,98	0,349284984	1,1
	1,5w	2	2	2,3	2,5	2,16	0,230217289	1,2
	(+)	2,1	2	2,5	2,1	2,08	0,286356421	1,1
atpsulf	c	4,3	4,6	4,8		4,5666666	0,251661148	1
* t-Test (c/+)	3d	4,6	5,6	5,4		5,2	0,529150262	1,1
	1,5w	4,7	5,8	5,9		5,4666666	0,665832812	1,2
	(+)	5,1	5,6	5,9		5,5333333	0,404145188	1,2
nitratrnsp	c	3	3	2,8		2,9333333	0,115470054	1
***	3d	3,2	3	2		2,7333333	0,642910051	0,9
	1,5w	5,3	6	6,8		6,0333333	0,75055535	2,1
	(+)	4,6	5	5,6		5,0666666	0,503322296	1,8
myb4	c	3,8	3,5	3,9	3	3,55	0,404145188	1
*	3d	4,6	4,2	4,1	5,4	4,575	0,590903263	1,3
	1,5w	4,3	3,9	4,7	4,8	4,425	0,411298756	1,2
	(+)	3,9	3,6	4	4,2	3,925	0,25	1,1
c2h2	c	1,2	1	1		1,0666666	0,115470054	1
* t-Test (C/1,5w)	3d	1	0,5	0,5		0,6666666	0,288675135	0,6
	1,5w	0,8	0,5	0,4		0,5666666	0,2081666	0,5
	(+)	0,8	0,5	0,4		0,5666666	0,2081666	0,5
drebl1a	c	1,2	1,2	1,2	1	1,15	0,1	1
**	3d	1,1	1,2	0,9	1	1,05	0,129099445	1,1
	1,5w	1,5	1,7	1,3	1,9	1,6	0,25819889	1,4
	(+)	1,2	1,3	0,9	1,4	1,2	0,21602469	1,1
drebl2a	c	0,61	0,58	0,36		0,5166666	0,136503968	1
*	3d	0,92	1	0,84		0,92	0,08	1,8
	1,5w	1	1,1	1,44		1,18	0,230651252	2,3
	(+)	1,1	1,3	0,72		1,04	0,294618397	2
dr4	c	3,5	3,3	4,4		3,7333333	0,585946528	1
*t-Test (c/+)	3d	2,9	2,5	3,5		2,9666666	0,503322296	0,8
	1,5w	3,1	2,7	1,5		2,4333333	0,8326664	0,6
	(+)	2,8	2,2	3		2,6666666	0,4163332	0,7
erd15	c	4,4	4,1	3,9	3,6	4	0,336650165	1
*	3d	4,5	4,9	5,1	4,6	4,775	0,275378527	1,2
	1,5w	4,8	5,5	5,1		5,1333333	0,351188458	1,3
	(+)	4,6	6,6	5,6	4,6	5,35	0,957427108	1,4
GST	c	3,8	3,9	3,4		3,7	0,264575131	1
*	3d	3,2	4,3	3,2		3,5666666	0,635085296	1
	1,5w	3,4	4,2	4,3		3,9666666	0,493288286	1,1
	(+)	5,3	4,9	4,9		5,0333333	0,230940108	1,4
hat7	c	4,2	4	3,2		3,8	0,529150262	1
*t-Test (c/+)	3d	3	2,5	3,8		3,1	0,655743852	0,8
	1,5w	3	2,4	2,8		2,7333333	0,305505046	0,7
	(+)	3	3	2,4		2,8	0,346410162	0,7
prolinsynth	c	1,4	1,9	1,5	1,7	1,625	0,221735578	1
*	3d	1,8	1,6	1,2	2,1	1,675	0,377491722	1
	1,5w	2,3	2,3	2,2	2	2,2	0,141421356	1,4
	(+)	1,6	2	2,1	1,7	1,85	0,238047614	1,1

osmotin	c	1,2	1,5	1,6		1,4	0,2081666	1
n.s./taq***	3d	1,3	1,4	1,9		1,5	0,321455025	1,1
	1,5w	1,5	2,1	1,9		1,8	0,305505046	1,3
	(+)	1,5	2,1	2,1		1,9	0,346410162	1,4
translation_if	c	1,7	1,6	1,7	1,1	1,58	0,277488739	1
*t-Test	3d	1,6	1,6	2	1	1,68	0,460434577	1,1
(c/1,5w)								
	1,5w	2	1,9	1,9	2,6	2,08	0,294957624	1,3
	(+)	2	1,7	1,9	3,1	2,1	0,570087713	1,3
cyclin	c	3,7	3,4			3,55	0,212132034	1
(STND)	3d	3,6	3,4			3,5	0,141421356	1
	1,5w	3,4	3,8			3,6	0,282842712	1
	(+)	3,6	3,8			3,7	0,141421356	1

### III.2. Paw-PCR (Radio):

Gen		1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch	5. Versuch	Mittelwert	Stand.abweichung
excision **	C	1,7	1,4	1,6	1,2		1,475	0,221735578
	R1	1,8	1,3	1,4	1,3		1,45	0,238047614
	R2	2,1	1,7	1,8	1,6		1,8	0,21602469
	R3	2	2,1	2	2		2,025	0,05
profilin t-Test (C/R3)	C	0,3	0,4	0,3	0,4		0,35	0,05773503
	R1							
		0,3	0,4	0,3	0,5		0,375	0,09574271
	R2	0,3	0,5	0,3	0,4		0,375	0,09574271
	R3	0,4	0,76	0,4	0,6		0,54	0,17435596
cyclin *	C	1,6	1,8	1,2	1,5	2,1	1,64	0,336154726
	R1	1,7	1,8	1,5	1,5	2,3	1,76	0,328633535
	R2	1,5	1,8	1,7	1,7	2,2	1,78	0,258843582
	R3	2,5	2	2,7	1,9	3,4	2,5	0,604152299
tubulin *	C	1,2	1,3	1,3			1,266666667	0,057735027
	R1	1,4	1,2	1,3			1,3	0,1
	R2	1,4	1,2	1,6			1,4	0,2
	R3	1,4	2,2	2,5			2,033333333	0,56862407
auxinreg. *	C	1,3	1,3	1,8			1,466666667	0,288675135
	R1	1,4	1,8	1,6			1,6	0,2
	R2	1,6	1,8	2,1			1,833333333	0,251661148
	R3	1,9	3,3	2,5			2,566666667	0,702376917
thioredoxin **	C	2,7	2,1	2,2	1,8		2,2	0,374165739
	R1	2,8	2,1	2,3	1,8		2,25	0,42031734
	R2	2,7	2,7	2,3	2,3		2,5	0,230940108
	R3	3,2	3	3,2	3,4		3,2	0,163299316
kin2 t-Test	C	1,6	1,2	1,7	1,8		1,575	0,262995564
	R1	2,6	1,4	2,1	2		2,025	0,49244289

6. Anhang

(C/R3)	R2	2,8	1,3	1,9	1,9		1,975	0,618465844
	R3	1,9	2,6	2,7	2,7		2,475	0,386221008
ccc t-Test (c/R3)	C	2	1,6	1,9	1,8		1,825	0,170782513
	R1	2,3	1,6	1,3	1,7		1,725	0,419324854
	R2	2,4	1,8	1,7	1,8		1,925	0,320156212
	R3	3,2	1,8	2,5	2,2		2,425	0,590903263
SOD *	C	1,2	1,7	1,7	1	1,3	1,38	0,31144823
	R1	1,3	1,7	1,6	1,5	1,5	1,52	0,14832397
	R2	1,3	1,6	1,7	2,1	1,4	1,62	0,31144823
	R3	1,7	2,6	2	1,8	1,8	1,98	0,363318042
Mre11 *	C	1,1	1,3	1,4			1,266666667	0,152752523
	R1	1	1	0,8			0,933333333	0,115470054
	R2	1,3	0,8	1,7			1,266666667	0,450924975
	R3	1,7	1,5	1,6			1,6	0,1
aux. *	C	1,3	0,9	0,7			0,966666667	0,305505046
	R1	1,3	0,9	0,8			1	0,264575131
	R2+	1,3	1,6	1,6			1,5	0,173205081
	R3	1,5	1,8	1,9			1,733333333	0,2081666
cyclin *	C	1,4	1,7	1,2			1,433333333	0,251661148
	R1	1,5	1,6	1,1			1,4	0,264575131
	R2+	1,7	1,6	1,8			1,7	0,1
	R3	2,3	1,9	1,9			2,033333333	0,230940108
tubulin *t-Test (c/R3)	C	0,5	0,6	0,6	0,5		0,55	0,057735027
	R1	0,7	0,5	0,6	0,5		0,575	0,095742711
	R2+	0,4	0,8	0,6	0,7		0,625	0,170782513
	R3	0,7	0,7	0,9	0,6		0,725	0,125830574
ccc *	C	1	0,7	0,8			0,833333333	0,152752523
	R1	0,7	0,9	0,9			0,833333333	0,115470054
	R2+	1,1	0,9	1,2			1,066666667	0,152752523
	R3	1,2	1,1	1,1			1,133333333	0,057735027
dreb2a **	C	1,7	1,2	1,2			1,366666667	0,288675135
	R1	1,7	1,2	1,4			1,433333333	0,251661148
	R2+	2	2,4	2,4			2,266666667	0,230940108
	R3	1,7	1,2	1,6			1,5	0,264575131
SOD *t-Test (c/R2+)	C	1	1	0,6			0,866666667	0,230940108
	R1	1,1	1	0,6			0,9	0,264575131
	R2+	1,1	1,5	1,3			1,3	0,2
	R3	1,3	1,2	0,9			1,133333333	0,2081666
limonen ***	C	2,1	1,8	2,2			2,033333333	0,2081666
	R1	1,9	1,9	2			1,933333333	0,057735027
	R2+	0,9	1,1	1			1	0,1
	R3	2,2	2,4	2,4			2,333333333	0,115470054
thioredoxin **	C	1,4	1,7	1,6			1,566666667	0,152752523
	R1	1,5	1,6	1,6			1,566666667	0,057735027
	R2+	2	2,5	2,3			2,266666667	0,251661148
	R3	1,7	1,9	2,2			1,933333333	0,251661148

**III.3. RT-PCR (Konzentration):**

Gen		paw- Versuch	
prolinsynth.	c		5,1
	100	1,4	5,8
	200	1,5	6,2
	300		6,6
osmotin	c	1	0,8
	100	2,2	
	200	1,2	0,9
	300	2,4	1,1
Cuchap	c	1	3,5
	100		4,3
	200	1,2	
	300	1,3	4,8
ATKC	c	1	
	100	1,3	
	200	1	
	300	0,8	
ACBK1	c	1	
	100	1,2	
	200	1,7	
	300	4,1	
KCO	c	1	1,3
	100	0,8	1,4
	200	1,1	1,6
	300	2,1	1,9
Myb4	c	1	
	100	1,1	
	200	1,5	
	300	1,5	
PIP2b	c	1	3,4
	100	0,5	
	200	0,4	2,8
	300	0,5	2,4
hsp70	c		3
	100		3,4
	200		4,3
	300		4,1
dr4	c		1
	100		0,7
	200		0,6
	300		0,6
dreb2a	c	1	2,6
	100	1,9	1,8
	200		1,6
	300	3,8	1,6

erd15	c		1,7
	100		2,2
	200		2,5
	300		3,1
cyclophilin	c		3,2
	100		3,8
	200		3,7
	300		4,1
limonencyclase	c	1	1,7
	100	1,2	1,5
	200	0,4	0,9
	300	0,2	0,4
AP2	c		
	100		2,3
	200		2,3
	300		2,4
chitinase			
	100		1,8
	200		1,9
	300		2,4
SOD	c		2,3
	100		2,6
	200		2,6
	300		3,2
beta-1,3 glc.	c		2,1
			2,4
			2,3
	300		2,5
TIF	c		2,2
	100		2,6
	200		2,5
			3,1

#### III.4. RT-PCR (Kalium-Aufnahmesysteme):

	c	3d	1,5w	+	ATKC	WT+	csi52+
ATKC Kanal	0,4	0,5	0,5	0,6	ATKC Kanal	0,6	2,6
n.s.	0,2	0,2	0,4	0,5	**	0,9	3
	0,4	0,3	0,6	0,4		1	3
	0,7	0,8	1	0,7		0,9	1,4
<b>Mittelwert</b>	0,425	0,45	0,625	0,55		0,85	2,5
<b>Stabw</b>	0,206155	0,264575	0,262995	0,129099		0,173205	0,757187
ACBK1	0,2	0,3	0,3	0,4	ACBK1	0,5	0,5
CaM-Kanal	0,2	0,3	0,3	0,5	CaM-Kanal	0,5	0,6
n.s.	0,4	0,3	0,4	0,8	n.s.	0,6	0,7

6. Anhang

	0,3	0,4	0,3	0,3		1	0,6
<b>Mittelwert</b>	0,275	0,325	0,325	0,5		0,65	0,6
<b>Stabw</b>	0,095742	0,05	0,05	0,216024		0,238047	0,081649
KCO	1,66	1,66	2,5	3,33	KCO	2,6	4,2
Out-Kanal	2,2	2,1	2,4	3	Out-Kanal	2,4	3,7
***	1,6	2,4	2,2	2,8	*		
	2,3	1	2	3,6			
	2,2	1,7	2,5	2,9			
<b>Mittelwert</b>	1,992	1,772	2,32	3,126		2,5	3,95
<b>Stabw</b>	0,333646	0,528128	0,216794	0,331481		0,141421	0,353553
putativer Kalium-Kanal (At1g04690)	0,7	0,6	0,9	1,2	putativer Kalium-Kanal (At1g04690)	1,2	1,8
n.s.	0,6	0,8	0,7	0,9	*	1,1	1,3
<b>Mittelwert</b>	0,65	0,7	0,8	1,05		1,133333	1,6
<b>Stabw</b>	0,070710	0,141421	0,141421	0,212132		0,057735	0,264575
AtKup1 Transporter	2,4	2,7	2,4	2,2	AtKup1 Transporter	2,3	2,2
n.s.	2,6	2,2	2,5	2,6	n.s.	2,5	2,1
	2,4	2,3	2,2	2,1		2,3	2,2
	2,3	2	2,3	1,8			
<b>Mittelwert</b>	2,425	2,3	2,35	2,175		2,366666	2,166666
<b>Stabw</b>	0,125830	0,294392	0,129099	0,330403		0,115470	0,057735
Akt1 Kanal	1,1	1	1	1	Akt1 Kanal	1,3	1,7
n.s.	1,3	1,2	1,2	1,2	**	1,2	1,5
	1,2	1,1	1,2	1			1,8
	1,2	1,2	1	1			
<b>Mittelwert</b>	1,2	1,125	1,1	1,05		1,233333	1,666666
<b>Stabw</b>	0,081649	0,095742	0,115470	0,1		0,057735	0,152752
HAK5 Transporter	0,8	0,63	0,54	0,7			
n.s.	1	1,1	1	0,9			
<b>Mittelwert</b>	0,9	0,865	0,77	0,8			
<b>Stabw</b>	0,141421	0,332340	0,325269	0,141421			

## III.5. Taqman RT-PCR (Cäsium-133):

Gen (Steigung der Regressionsgerade)		1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch	Mittelwert	Stand.abweichung
ATKC** 1,9	c	1,0	1,0	1,0		1,0	0
	3d	1,4	1,3	1,5		1,4	0,1
	1,5w	1,1	1,2	0,9		1,1	0,152752523
	(+)	1,7	1,4	1,0		1,4	0,351188458
ATKC 1,9	WT	1,0	1,0			1,0	0
	csi	1,4	1,2			1,3	0,141421356
ACBK1** 2,5	c	1,0	1,0			1,0	0
	3d	1,2	1,4			1,3	0,141421356
	1,5w	0,9	1,0			1,0	0,070710678
	(+)	1,3	1,3			1,3	0
ACBK1 2,5	WT	1,0	1,0			1,0	0
	csi	0,6	0,4			0,5	0,141421356
KCO** 1,8	c	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0
	3d	1,2	1,4	1,3	1,3	1,3	0,081649658
	1,5w	1,1	1,3	1,4	1,4	1,3	0,141421356
	(+)	1,3	1,3	1,4	1,0	1,3	0,173205081
KCO 2,2	WT	1,0	1,0			1,0	0
	csi	1,9	1,2			1,6	0,494974747
SOD**t-Test(C/+) 1,70	c	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0
	3d	1,3	1,2	1,1	2,7	1,6	0,754431353
	1,5w	1,1	1,1	1,6	1,4	1,3	0,244948974
	(+)	1,6	1,5	1,0	1,1	1,3	0,294392029
prolin** 1,9	c	1,0	1,0			1,0	0
	3d	0,9	2,7			1,8	1,272792206
	1,5w	2,5	4,9			3,7	1,697056275
	(+)	1,3	1,6			1,5	0,212132034
hsp70*** 1,6	c	1,0	1,0			1,0	0
	3d	2,5	2,9			2,7	0,282842712
	1,5w	2,4	3,0			2,7	0,424264069
	(+)	2,2	1,5			1,9	0,494974747
erd15* 1,9	c	1,0	1,0			1,0	0
	3d	1,2	1,4			1,3	0,141421356
	1,5w	1,5	1,5			1,5	0
	(+)	1,6	1,0			1,3	0,424264069
hat7 n.s. 1,7	c	1,0	1,0	1,0		1,0	0
	3d	1,0	1,1	0,7		0,9	0,2081666
	1,5w	0,9	0,8	1,0		0,9	0,1
	(+)	0,8	0,8	0,9		0,8	0,057735027
dreb1a 2,0	c	1,0				1,0	0
	3d	0,5				0,5	0,2081666
	1,5w	1,3				1,3	0,264575131



6. Anhang

	(+)	0,4			0,4	0,152752523
dreb2a***	c	1,0	1,0		1,0	0
1,7	3d	3,0	2,8		2,9	0,141421356
	1,5w	2,9	4,0		3,5	0,777817459
	(+)	2,1	2,1		2,1	0
ATPsulf.*	c	1,0	1,0	1,0	1,0	0
1,9	3d	1,0	1,6	1,4	1,3	0,305505046
	1,5w	1,6	1,3	1,1	1,3	0,251661148
	(+)	1,6	1,1	1,3	1,3	0,251661148
Myb4***	c	1,0	1,0	1,0	1,0	0
1,80	3d	0,9	0,7	0,9	0,8	0,115470054
	1,5w	1,8	2,2	1,7	1,9	0,264575131
	(+)	0,8	0,7	0,8	0,8	0,057735027
limonen cyc.**	c	1,0	1,0	1,0	1,0	0
2,1	3d	1,1	0,8	1,0	1,0	0,152752523
	1,5w	0,4	0,6	0,7	0,6	0,152752523
	(+)	0,7	0,8	0,6	0,7	0,1
AP2**	c	1,0	1,0		1,0	0
2,0	3d	0,7	1,7		1,2	0,707106781
	1,5w	1,5	2,9		2,2	0,989949494
	(+)	2,6	2,5		2,6	0,070710678
beta1,3glc.**	c	1,0	1,0	1,0	1,0	0
1,9	3d	0,5	1,4	0,9	0,9	0,450924975
	1,5w	2,2	1,9	1,5	1,9	0,351188458
	(+)	2,2	1,2	2,0	1,8	0,529150262
c2h2 n.s.	c	1,0	1,0	1,0	1,0	0
1,8	3d	0,8	0,9	0,9	0,9	0,057735027
	1,5w	0,8	1,0	0,6	0,8	0,2
	(+)	1,0	0,9	1,2	1,0	0,152752523
Nitrattransp.*	c	1,0	1,0		1,0	0,0
1,8	3d	0,7	0,9		0,8	0,1
	1,5w	2,2	1,3		1,8	0,6
	(+)	1,1	1,3		1,2	0,1
osmotin***	c	1,0	1,0		1,0	0
1,8	3d	1,6	2,0		1,8	0,282842712
	1,5w	2,0	2,3		2,2	0,212132034
	(+)	3,0	2,0		2,5	0,707106781
thioredox.*	c	1,0	1,0	1,0	1,0	0
1,8	3d	1,4	1,3	1,4	1,4	0,057735027
	1,5w	1,5	1,4	1,0	1,3	0,264575131
	(+)	1,5	1,0	1,5	1,3	0,288675135
E.chitinase**	c	1,0	1,0	1,0	1,0	0
1,9	3d	0,9	1,4	1,2	1,2	0,251661148
	1,5w	1,7	1,8	1,3	1,6	0,264575131
	(+)	1,0	0,9	1,2	1,0	0,152752523
Cuchap**t-Test (C/1,5w)	c	1,0	1,0		1,0	0
1,70	3d	1,0	0,9		1,0	0,070710678
	1,5w	1,2	1,4		1,3	0,141421356

	(+)	0,8	1,2	1,0	0,282842712
cyclin	c	1,0	1,0	1,0	0
1,6	3d	1,0	0,9	1,0	0,070710678
	1,5w	0,9	0,8	0,9	0,070710678
	(+)	1,1	1,1	1,1	0

### III.6. Taqman-PCR (Radio):

Gen (Steigung der Regressionsgeraden)		1. Versuch	2. Versuch	Mittelwert	Stand.abweichung
excision** 1,90	C	1	1	1	0
	R1	0,6	0,5	0,55	0,070710678
	R2	1,4	1,5	1,45	0,070710678
	R3	0,8	1,4	1,1	0,424264069
profilin* 1,60	C	1	1	1	0
	R1	1,1	0,5	0,8	0,424264069
	R2	1,1	0,9	1	0,141421356
	R3	1,7	1,4	1,55	0,212132034
cyclin n.s. 1,70	C	1	1	1	0
	R1	1,3	0,5	0,9	0,565685425
	R2	1,2	0,6	0,9	0,424264069
	R3	2,2	1,1	1,65	0,777817459
ccc n.s. 1,80	C	1	1	1	0
	R1	1	0,5	0,75	0,353553391
	R2	1,6	0,7	1,15	0,636396103
	R3	1,2	1,1	1,15	0,070710678
tubulin** 1,60	C	1	1	1	0
	R1	0,8	0,5	0,65	0,212132034
	R2	0,8	0,6	0,7	0,141421356
	R3	1,3	1,5	1,4	0,141421356
auxinreg.** 1,80	C	1	1	1	0
	R1	0,9	0,9	0,9	0
	R2	1,6	1,2	1,4	0,282842712
	R3	1,4	1,9	1,65	0,353553391
thioired.*** 1,80	C	1	1	1	0
	R1	1,7	1,3	1,5	0,282842712
	R2	1,6	1,3	1,45	0,212132034
	R3	1,9	2,2	2,05	0,212132034

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. H. Paretzke und Herrn Prof. Dr. H. Sandermann danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und das Interesse an meiner Arbeit.

Bei Herrn PD Dr. D. Ernst und Frau PD Dr. G Voigt bedanke ich mich für die Betreuung meiner Arbeit, die unter ihrer Anleitung am Institut für Biochemische Pflanzenpathologie und dem Institut für Strahlenschutz des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit entstand.

Unter der restlichen Führungsmannschaft gilt mein besonderer Dank Herrn PD Dr. J. Durner für die Übernahme des Zweitgutachtens. Herrn Prof. Dr. E. Grill und Prof. Dr. W. Höll danke ich herzlich für die Vertretung meiner Dissertation an der Technischen Universität München.

Ein großes Dankeschön geht an alle direkten und indirekten Kollegen, Musen und Freunde etc., die mich während der Arbeit unterstützt haben. Besonders möchte ich in dem Zusammenhang Li Weibo, Valery Taranenko, Valerie Albrecht, Alex Ihring, Heike Wohlgemuth, Cecilia Diara, Mercedes Montero und Andrea Valota nennen...und mich gleichzeitig bei allen entschuldigen, die ich in der Aufzählung nicht erwähnt habe.

Speziell den molekularbiologischen Arbeitern möchte ich noch danken, wobei hier Evi Kiefer, Michael Götz und Matthias Affenzeller meine wichtigsten Begleiter waren.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern, meinem Bruder Oliver – inklusive Steffi selbstverständlich – und bei Chiara recht herzlich bedanken, die mich während meiner Zeit in München stets unterstützten und immer für gsf-ferne Gespräche da waren.

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Tobias Michael Sahr  
Geboren am 24. April 1973 in Regensburg

### **Schulbildung**

1979 - 1983	Grundschule Regensburg
1983 - 1992	Albertus-Magnus-Gymnasium Regensburg (humanistischer Zweig) Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### **Studium**

11/1992 - 03/1998	Studium der Biologie an der Universität Regensburg
04/1995	Diplom-Vorprüfung
03/1998	Diplomprüfung Diplomarbeit am Botanischen Institut der Universität Regensburg; Thema: Zur Systematik und Phylogenie der Gattung <i>Sepedonium</i>

### **Wissenschaftliche Tätigkeit**

04/1998 - 01/1999	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Regensburg
02/1999 - 01/2000	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Ludwig- Maximilian-Universität in München und am Leibnitz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle a.d. Saale

### **Promotion**

07/2000 - 08/2003	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biochemische Pflanzenpathologie und am Institut für Strahlenschutz der GSF, Neuherberg: „Untersuchungen zur Transkriptionsänderung in <i>Arabidopsis thaliana</i> nach Cäsium- und Radiocäsium-Applikation“
-------------------	---

### **Veröffentlichungen**

- Sahr, T., Ammer, H., Besl, H. and Fischer, M., 1999. Infrageneric classification of the boleticolous genus *Sepedonium*: species determination and phylogenetic relationship. *Mycologia* 91 (6): 935-943.
- Sahr, T., Voigt, G., Ernst, D., Paretzke, H., Sandermann, H., 2002. Caesium induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*. In: Proceedings from the International Conference on Radioactivity in the Environment (Borretzen, P., Jolle, T. and Strand, P., eds.), pp. 133-136.