

Lehrstuhl für Phytopathologie

Die spektrale Abhängigkeit der Wirkung von UV-induzierten Reaktionen in *Arabidopsis thaliana*

Michael Götz

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

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Wenzel

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Christian Langebartels

2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Gert Forkmann

Die Dissertation wurde am 11. 05. 2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 09. 09. 2004 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG.....	7
1.1 Stratosphärischer Ozonabbau.....	7
1.2 Spektrale Abhängigkeit der Wirkung von UV-Strahlung.....	7
1.2.1 Monochromatische Wirkungsspektroskopie.....	10
1.2.2 Polychromatische Wirkungsspektroskopie.....	10
1.3 Wirkung von UV-Strahlung auf Pflanzen.....	13
1.3.1 Ökologische Auswirkungen.....	13
1.3.2 Biochemische Regulation des Sekundärstoffwechsels.....	16
1.3.2.1 Signalaufnahme: Photorezeptoren.....	16
1.3.2.2 Signaltransduktion.....	18
1.3.2.3 Transkriptionsfaktoren.....	20
1.3.3 UV-Abschirmung durch phenolische Inhaltsstoffe.....	22
1.3.3.1 UV-Abschirmung durch Flavonoide.....	23
1.3.3.2 UV-Abschirmung durch Sinapinsäureester.....	26
1.3.3.3 Anthocyane.....	28
1.3.4 UV-Schäden und deren Reparatur.....	28
1.3.4.1 DNA-Mutationen.....	28
1.3.4.2 DNA-Reparatur.....	28
1.3.5 UV-B-Schädigung des Photosyntheseapparates.....	30
1.4 Themenstellung.....	31
2 MATERIAL UND METHODEN.....	32
2.1 UV-Strahlungssimulation.....	39
2.2 Pflanzenanzucht.....	43
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	44
2.3.1 DNA-Arrays.....	44
2.3.1.1 PCR-Amplifikation der Array-Proben (,Targets').....	44
2.3.1.2 T7-Referenzhybridisierung.....	46
2.3.1.3 cDNA-Hybridisierung.....	47
2.3.2 DNA- und RNA-Techniken.....	49
2.3.2.1 Isolierung genomischer DNA.....	49
2.3.2.2 Aufreinigung von PCR-Produkten.....	49
2.3.2.3 Vektorligation des PCR-Produkts.....	49

2.3.2.4 Transformation rekombinanter Plasmide.....	49
2.3.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	50
2.3.2.6 Gelelektrophorese.....	50
2.3.2.7 Restriktionsverdau (Arber & Leim, 1969)	51
2.3.2.8 Enzymatische DNA-Sequenzierung	51
2.3.2.9 PCR aus genomischer DNA (Mullis & Faloona, 1987)	51
2.3.2.10 Quantitative ‚Real-Time-PCR‘	53
2.4 Biochemische Methoden	58
2.4.1 HPLC phenolischer Inhaltsstoffe	58
2.4.2 HPLC von photosynthetischen Pigmenten	59
2.5 Expressionsdaten – Normalisierung und statistische Aspekte.....	59
2.5.1 Normalisierung	59
2.5.2 Problembehandlung bei fehlenden Messwerten.....	61
2.5.3 Messfehler	63
3 ERGEBNISSE	67
3.1 Hoch PAR / Hoch UV-B (H/H)	69
3.1.1 Schutzpigmente.....	69
3.1.2 Genexpression der Flavonoidbiosynthese.....	71
3.2 Mittel PAR / Hoch UV-B (M/H).....	72
3.2.1 Schutzpigmente.....	72
3.2.2 Genexpression der Flavonoidbiosynthese.....	73
3.3 Niedrig PAR / Hoch UV-B (L/H)	75
3.3.1 Schutzpigmente.....	76
3.3.2 Genexpression der Flavonoidbiosynthese.....	78
3.4 Hoch PAR / Niedrig UV-B (H/L)	79
3.4.1 Schutzpigmente.....	79
3.4.2 Genexpression der Flavonoidbiosynthese.....	81
3.5 Expression der Chalkonsynthese	82
3.6 PAR-Abhängigkeit für die Akkumulation an Quercetinderivaten.....	83
3.7 Wirkungsspektrum für die Akkumulation an Quercetinderivaten	84
3.8 Transkriptomanalyse	89
3.8.1 Statistische Überprüfung UV-B-responsiver Gene	91
3.8.2 Induzierte Gene - Probleme in Folgeanalysen	92

3.8.3 UV-B-responsive Gene	94
3.8.4 ‚Expression-Profiling‘	94
3.8.5 Zelluläre Funktionen der Gene aus ‚Node‘ 78 und 73.....	96
3.8.5.1 Orginaldaten aus ‚Node‘ 78	98
3.8.5.2 Orginaldaten aus ‚Node‘ 73	100
3.8.6 Gengruppe aus ‚Node‘ 107	105
3.8.7 Überprüfung der Array-Ergebnisse mittels RT-PCR	108
3.9 Photosynthetische Pigmente.....	109
4 DISKUSSION	110
4.1 Biologisches Wirkungsspektrum	110
4.2 Entwicklungsspezifität der Pigmentbildung	112
4.3 Interaktion von UV-B-Strahlung und PAR	113
4.4 Akklimatisierung von Pflanzen an Strahlungsbedingungen.....	114
4.5 Gene des Sekundärmetabolismus	115
4.6 Gene des oxidativen Stresses.....	118
4.7 Antioxidative Wirksamkeit von Quercetin	119
4.8 DNA-Reparatur	121
4.9 PAR-Schwellenwert	123
4.10 Ausblick.....	124
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	126
6 LITERATURVERZEICHNIS	128
Anhang A: UV-B-reaktive Gene	143
Anhang B: Photosynthetische Pigmente.....	152
Anhang C: Akkumulation der Quercetinderivate in Abhängigkeit der PAR	153
Anhang D: Akkumulation von Sinapoylglukose in Abhängigkeit der PAR.....	154
DANKSAGUNG.....	155
LEBENS LAUF	157

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung		Abkürzung	
16S r rn	16S ribosomale RNA	OD	optische Dichte
A	Adenosin	p	Wahrscheinlichkeit
ANOVA	Varianzanalyse	PAR	photosynthetisch aktive Strahlung (400-700 nm)
Atgyyyyy	Gencode für <i>Arabidopsis thaliana</i>	PCR	Polymerasekettenreaktion
bp	Basenpaare	PD	generalisiertes Pflanzenwirkungsspektrum nach Caldwell, (1971)
bZIP	.basic leucine zipper'-Protein	PHYA-PHYE	Phytochrom A-E
C	Cytosin	psbA	D1 Komplex Photosystem II
cGMP	zyklisches Guanosin-monophosphat	PSI	Photosystem I
CHI	Chalkonisomerase-Gen	PVP	Polyvinylpyrrolidon
CHS	Chalkonsynthase-Gen	q	Quercetinderivate
COV	Covarianz	R	rotes Licht (660 nm)
cpm	Zerfälle pro Minute	rbcl	Ribulose Bisphosphat Carboxylase
CRY1, CRY2	Cryptochrome 1,2	rER	rauhes Endoplasmatisches Retikulum
C-Terminus	Carboxyl-Ende eines Proteins	Rha	Rhamnose
CytP450	Cytochrome P450 Monooxygenase (Pigment absorbiert bei 450 nm)	RNA	Ribonukleinsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	ROS	reaktive Sauerstoffspezies
DET1	.de-etiolated1'-Gen	rRNA	ribosomale RNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RT	reverse Transkription
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	RT-PCR	Echtzeit-PCR
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	RUBISCO	Ribulose Bisphosphat Carboxylase/Oxygenase
eff.	PCR-Effizienz	SDS	Natriumdodecylsulfat
EST	expremiertes cDNA-Stück	SOD	Superoxiddismutase
F3'H	Flavonoid 3'-Hydroxylase-Gen	SSC	salines Natriumcitrat
FADH ₂	Flavinadenindinukleotid	T	Thymidin
FHT	Flavanon 3-Hydroxylase-Gen	Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
FLS	Flavonolsynthase-Gen	TM	eingetragene Handelsmarke
FR	rotes Licht (730 nm)	Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
G	Guanosin	U	Enzymaktivität
Glc	Glukose	Upm	Umdrehungen pro Minute
GST	GlutathionS-Transferasen	UTR	nicht translaterter Bereich eines Gens
H, M, L	Hoch, Mittel, Niedrig	UV-A	Ultraviolette Strahlung (315-400 nm)
H ₀	Nullhypothese	UV-B	Ultraviolette Strahlung (280-315 nm)
H ₁	Alternativhypothese	UV-B _{BE}	biologisch gewichtete UV-B-Bestrahlungsstärke
H ₂ O _{bide} st.	vollentsalztes Wasser	UV-C	Ultraviolette Strahlung (100-280 nm)
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatografie	UV-Strahlung	Ultraviolette Strahlung
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid	V	Versuch
K13	Sonnensimulator K13	v/v	Volumen je Volumen
LB	Luria-Bertani	VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
LB _i	Leerposition auf dem DNA-Array	w/v	Masse je Volumen
MIPS	Münchener Informationszentrum für Proteinsequenzen	WG	Weißglasfilter
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure	x	x-fach konzentriert
MuLV	Moloney-Murine Leukaemia Virus		
NADPH	Nikotinsäureamid-Adenindinukleotid-Phosphat		

1 Einleitung

1.1 Stratosphärischer Ozonabbau

Anthropogene Aktivitäten, insbesondere der Ausstoß von Fluorchlorkohlenwasserstoffen, haben zu einer lang anhaltenden Ausdünnung der stratosphärischen Ozonschicht geführt, die in besonders drastischen Ausmaßen (Abnahme >50%) häufig mit dem Begriff Ozonloch beschrieben wird. Ursache hierfür sind katalytische Abbauprozesse in der Stratosphäre, die durch die natürliche, photolytische Bildung von Ozon aus molekularem Sauerstoff nicht ausgeglichen werden können (Chapman, 1930; Crutzen, 1970; Molina & Rowland, 1974; Zellner *et al.*, 1999). Der Ozonverlust wird voraussichtlich in der zweiten Hälfte dieses Jahrzehnts ein Maximum erreichen und dann, wenn die internationalen Vereinbarungen des Montrealer Protokolls zur Begrenzung des Ausstoßes von Fluorchlorkohlenwasserstoffen eingehalten werden, in einigen Jahrzehnten durch die natürliche Regeneration der Ozonschicht wieder kompensiert werden. Ein Unsicherheitsfaktor ist jedoch der zunehmende Flugverkehr.

Ozon ist ein effizienter Absorber für kurzwellige UV-B-Strahlung (280-315 nm). Die stratosphärische Ozonschicht stellt daher ein sehr wirksames Schutzschild für solare UV-B-Strahlung dar. Mit der Ausdünnung der Ozonschicht geht somit der Anstieg der bodennahen UV-B-Strahlung einher. Der energetische Anteil dieser Strahlungskomponente an der gesamten terrestrischen Sonneneinstrahlung beträgt nur wenige Promille, aufgrund ihrer hohen Photonenenergie von etwa 4 eV kann sie jedoch Biomoleküle, insbesondere die DNA, irreversibel verändern (Britt, 1996).

1.2 Spektrale Abhängigkeit der Wirkung von UV-Strahlung

Die Wirkung von UV-Strahlung wird, wie erwähnt, von zwei physikalischen Faktoren abhängen:

1. Der Menge von UV-Photonen, die auf den Organismus bzw. ein bestimmtes Organ treffen.

2. Der Energie (E) der einzelnen Photonen. Diese ist mit der Wellenlänge (λ) der UV-Strahlung eindeutig über die Beziehung $E = h c \lambda^{-1}$ definiert (Planck'sches Wirkungsquantum; $h = 6,63 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$ und Lichtgeschwindigkeit $c = 3,0 \cdot 10^8 \text{ m s}^{-1}$).

Die Auftragung der Strahlungsmenge über die Wellenlänge definiert ein Spektrum. In der biologischen Anwendung bezieht man die Photonenmenge auf die Zahl der Photonen, die pro Sekunde auf die Flächeneinheit trifft und dividiert durch die Avogadrokonstante ($L = 6,02 \cdot 10^{23} \text{ Photonen mol}^{-1}$) und erhält den Strahlungsfluss in $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Alternativ wird mit dem Planck'schen Wirkungsquantum die sekundliche Energie pro Flächeneinheit ermittelt und in W m^{-2} angegeben. Typische Spektren der terrestrischen Globalstrahlung bei verschiedenen Sonnenhöhen über dem Horizont zeigt Abbildung 1-1. Charakteristisch für das terrestrische Sonnenspektrum ist der sehr steile Abfall zu kürzeren Wellenlängen bei etwa 300 nm (siehe Abbildung 1-2). Die Ausdünnung der stratosphärischen Ozonschicht bewirkt eine ‚scheinbar‘ geringfügige Verschiebung dieser Kante zu kürzeren Wellenlängen hin.

Ein spezielles Spektrum, das sogenannte Wirkungsspektrum, bezeichnet die biologische Wirkung von Licht oder UV-Strahlung in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Ein Wirkungsspektrum definiert somit eine quantitative Abhängigkeit; z. B. die Anzahl von UV-induzierten Cyclobutanpyrimidin Dimeren (s. u.). Die Bestimmung solcher quantitativen Zusammenhänge ist sehr aufwändig. Meist genügt es, die relative Abhängigkeit zu bestimmen, d. h. die Wirkung bei einer beliebigen Wellenlänge wird auf die Wirkung einer vorgegebenen Wellenlänge normiert (meist 300 nm). Zur Unterscheidung vom Wirkungsspektrum spricht man von der biologischen Wichtungsfunktion (BWF). Auf diese Weise können auch verschiedenartige BWFs miteinander verglichen werden.

In der Natur sind Pflanzen und andere Organismen dem breiten Spektrum der solaren Globalstrahlung ausgesetzt. Bezeichnet man die spektrale Bestrahlungsstärke mit $E_\lambda (\lambda, t)$ und die BWF mit $s(\lambda)$, so ergibt sich der gesamte biologische Effekt (B.E.) als

$$\text{B.E.} = \int s(\lambda) E_\lambda (\lambda, t) d\lambda.$$

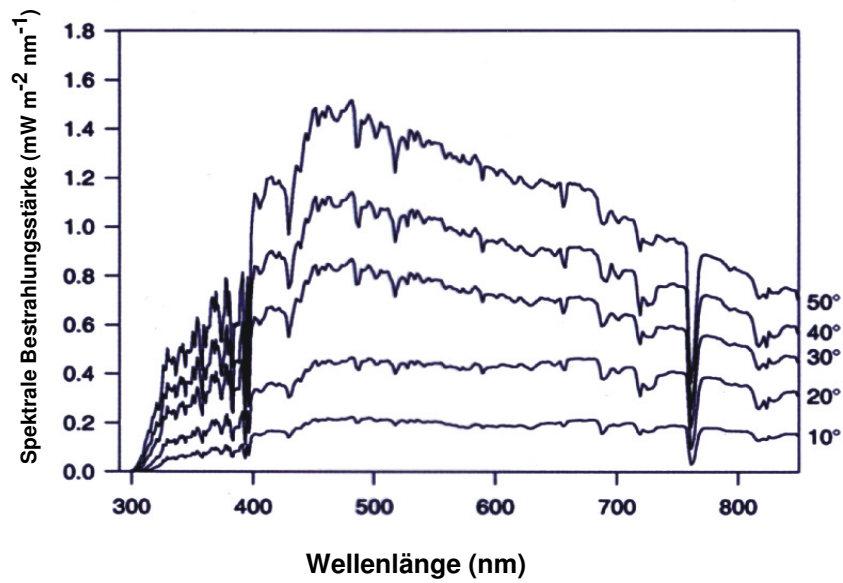


Abbildung 1-1

Typische Spektren der terrestrischen Globalstrahlung bei verschiedenen Sonnenhöhen über dem Horizont (gemessen in Neuherberg am 17.04.1996 (48° 41' N, 11° 41' E; 495 m Höhe über Meeresspiegel)).

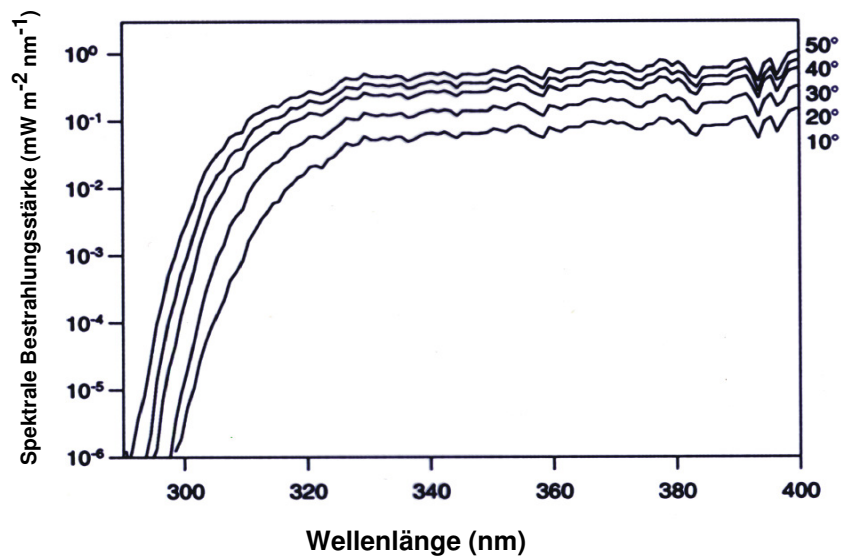


Abbildung 1-2

Logarithmische Auftragung von Abbildung 1-1 im Strahlungsbereich von 300 – 400 nm.

Die Integration erstreckt sich über den Spektralbereich der UV-B- und UV-A-Strahlung (280-400 nm). Maßgebend für die biologische Wirkung ist also der Überlappungsbereich zwischen dem Spektrum der einfallenden Strahlung und dem Wirkungsspektrum bzw. der BWF. Eine kleine Verschiebung der kurzwelligen Kante des Bestrahlungsspektrums kann damit einen überproportionalen Anstieg der biologischen Wirkung zur Folge haben.

Wirkungsspektren und BWFs sind die Voraussetzung für die Bewertung der UV-Wirkung auf Pflanzen, daher gibt es verschiedene Ansätze zur Ermittlung solcher Funktionen (Holmes, 1997).

1.2.1 Monochromatische Wirkungsspektroskopie

Der naheliegendste Ansatz ist die monochromatische Wirkungsspektroskopie. Mit einem sehr schmalen, in der Wellenlänge veränderlichen Spektralband (erzeugt z. B. mit einer starken Lampe mit vorgeschaltetem Monochromator oder mit einem Satz sehr schmalbandiger Interferenzfilter), wird die infrage kommende, möglichst gut quantifizierbare, pflanzliche Reaktion spektral abgetastet. Diese relativ einfache Methode entspricht zwar nicht den natürlichen Gegebenheiten, bei denen stets das gesamte Sonnenspektrum präsent ist, aber sie liefert immerhin ein grobe Vorstellung von der spektralen Empfindlichkeit der biochemischen Reaktion, und es lassen sich unter Umständen sogar bestimmte Strahlungsrezeptoren identifizieren (Briggs & Huala, 1999). Als Beispiel seien hier das Wirkungsspektrum für DNA-Schäden in Luzerne (Quaite *et al.*, 1992) und das Wirkungsspektrum für die stomatale Öffnung bei *Vicia faba* genannt (Eisinger *et al.*, 2000).

1.2.2 Polychromatische Wirkungsspektroskopie

Eine realistischere Bewertung liefert die polychromatische Wirkungsspektroskopie. In einer meist sehr umfangreichen und langwierigen Versuchsreihe wird eine Anzahl möglichst gleichartiger Pflanzen unter verschiedenen sonnenähnlichen Spektren mit zunehmenden UV-Anteilen und Bestrahlungsstärken kultiviert. Die Entwicklung des betrachteten Endpunkts (Akkumulation von Inhaltsstoffen, Wachstumsparameter, Genaktivität etc.) wird quantitativ erfasst. Sind genügend statistisch abgesicherte Daten vorhanden und sind die Bestrahlungsszenarien spektralradiometrisch vermessen,

kann man versuchen, eine biologische Wichtungsfunktion zu finden, welche die gefundenen biologischen Daten modelliert. Mit sukzessiven Approximationen wird die Funktion verfeinert, bis eine optimale Anpassung („Fit“) erreicht ist (Cullen *et al.*, 1992; Rundel, 1983; Steinmüller & Tevini, 1985). Ein alternativer Ansatz ist die differentielle Wirkungsspektroskopie. Hier wird die Differenz der biologischen Wirkungen ermittelt, die unter zwei Spektren mit wenig verschiedener kurzweiliger Absorptionskante registriert wurden (Cooley *et al.*, 2000; Holmes, 1997). In jedem Fall muss zur Berechnung der BWF die Dosisabhängigkeit ermittelt werden, d. h., dass Bestrahlungsexperimente nicht nur mit Spektren verschiedener Absorptionskante, sondern auch mit verschiedenen Bestrahlungsstärken durchgeführt werden müssen. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass die Reziprozität von UV-Effekten auf Pflanzen bisher sehr wenig untersucht ist. Reziprozität bedeutet, dass hohe Bestrahlungsstärke und kurze Einwirkungszeit die gleiche pflanzliche Reaktion hervorrufen wie eine geringe Bestrahlungsstärke, die entsprechend länger einwirkt, solange nur das Produkt aus beiden Größen gleich bleibt. Wegen der zeitlichen Entwicklung von Pflanzen und der Regulation ihrer Schutzpigmente ist eine Reziprozität der Effekte allerdings nur in sehr eingeschränktem Umfang zu erwarten.

Die polychromatische Wirkungsspektroskopie ist also ein aufwendiges Verfahren, und es ist daher kaum verwunderlich, dass bisher nur wenige polychromatische biologische Wichtungsfunktionen bestimmt wurden (Ghetti *et al.*, 1999; Holmes, 1997; Ibdah *et al.*, 2002).

In der Literatur finden sich biologische Wichtungsfunktionen, die formelmäßig festgelegt sind. Die wichtigsten, die auch Eingang in die Praxis gefunden haben, sind:

- Die Erythembewertung, welche die Sonnenbrandaktivität für die menschliche Haut bewertet (McKinley & Diffey, 1987). Sie ist die Grundlage für die Angabe des UV-Index, der über die Medien verbreitet wird, um die Bevölkerung vor starker UV-B-Belastung durch die Sonnenstrahlung zu warnen .

- Das sogenannte generalisierte DNA-Wirkungsspektrum nach Setlow (1974), welches ursprünglich mutagene Effekte der UV-Strahlung bewerten sollte. Es wird häufig zur Abschätzung von UV-Wirkungen auf Mikroorganismen verwendet.

- Das generalisierte Pflanzenaktionsspektrum (Caldwell, 1971). Diese BWF, die unter verschiedenen Acronymen (PD für ‚plant damage‘, PAS300 für ‚plant action spectrum, normalized at 300 nm‘ und UVB_{B.E.} für ‚UV-B biologically effective‘) in der Literatur erscheint, wird bei Untersuchungen pflanzlicher UV-Reaktionen sehr häufig verwendet. Es stellt eine Synthese aus verschiedenen experimentellen Daten dar, die meist auf Untersuchungen mit monochromatischer UV-Strahlung beruhen. Die Summe dieser Daten führte zu einer Formel, die oberhalb $\lambda = 313,3$ nm willkürlich gleich null gesetzt wurde:

$$\lambda < 313,3 \text{ nm} \quad s(\lambda) = 12,03 [1 - (\lambda/313,3)^2] * \exp[-(\lambda-300)/31,08]$$

(Normierung bei 300 nm)

$$\lambda > 313,3 \text{ nm} \quad s(\lambda) = 0$$

Diese Funktion wird in der vorliegenden Arbeit allgemein verwendet, um die jeweiligen UV-B-Bestrahlungsverhältnisse zu charakterisieren.

Allen drei genannten Wichtungsfunktionen ist der generalisierte Aspekt gemeinsam, d. h. zugunsten einer breiten Anwendbarkeit werden die Reaktionen individueller Organismen außer Betracht gelassen. Die beiden letzteren Funktionen zeigen oberhalb von 315 nm, also im UV-A-Bereich, sehr kleine Werte bzw. null. Weiter unten wird gezeigt, dass Wichtungsfunktionen, die mit realistischer polychromatischer, also sonnenähnlicher Strahlung gewonnen wurden, einen flacheren Verlauf zeigen, der sich bis in den UV-A-Bereich erstreckt.

In einer kürzlich erschienenen Revision des generalisierten Pflanzenwirkungsspektrums legen Flint und Caldwell (Flint & Caldwell, 2003) eine Wichtungsfunktion vor, die sich bis in den UV-A-Bereich erstreckt. Da die Wirkung auf die Pflanze aus dem Produkt aus Wirkungsfunktion und spektraler Bestrahlungsstärke bestimmt wird und im Sonnenspektrum die UV-A-Komponente um zwei bis drei Größenordnungen intensiver ist als im UV-B-Bereich, darf auch die UV-A-Komponente für die UV-Wirkung nicht unberücksichtigt bleiben.

1.3 Wirkung von UV-Strahlung auf Pflanzen

1.3.1 Ökologische Auswirkungen

Pflanzen sind von Natur aus der UV-Strahlung ausgesetzt. UV-Strahlung ist aber nicht nur schädlich für die Pflanzen, sondern sie ist für die Entwicklung von Wurzeln, Sprosse und Blüten notwendig. Weiterhin regeln UV-Strahlen die Öffnung der Stomata und den Phototropismus (Eisinger *et al.*, 2000).

Das Risiko negativer Einflüsse von UV-Strahlung auf Pflanzengemeinschaften durch den stratosphärischen Ozonabbau wird in erster Linie von der UV-B-Strahlung zu erwarten sein. Dies begründet sich dadurch, dass die bodennahen UV-A-Komponenten unabhängig vom Absorptionsvermögen des stratosphärischen Ozons die Erdoberfläche erreichen. UV-B-Studien wurden zu einem großen Teil transient an Einzelpflanzen durchgeführt. Welche langfristigen Auswirkungen UV-B-Strahlung auf Pflanzengemeinschaften auslösen kann, ist nach derzeitigem Wissensstand nicht eindeutig beantwortet, da ein großer Teil der UV-B-Studien in Klimakammern oder in Gewächshäusern durchgeführt wurde. Die Simulationszeit war bei sehr vielen Studien kürzer als eine Woche und sie sind demzufolge für eine realistische Einschätzung des langfristigen Risikos erhöhter bodennaher UV-B-Strahlung unzureichend (Caldwell & Flint, 1994). Voraussetzung für eine gesicherte Bewertung des Risikos einer dauerhaft erhöhten UV-B-Belastung wären Risikostudien über einen Zeitraum von mehreren Jahrzehnten. Ökologisch ausgerichtete Untersuchungen über eine länger anhaltende Periode hinweg zeigten bisher, dass die zunehmende UV-B-Bestrahlung einen Einfluss auf die Artenzusammensetzung haben kann (Caldwell & Flint, 1994).

Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass UV-B-Strahlung Auswirkungen auf die Entwicklung und das Wachstum der Pflanze hat (Bornman & Teramura, 1993; Caldwell & Flint, 1993; Jansen, 1998; Jordan, 1996; Tevini, 1993), wobei die Reaktionen zwischen verschiedenen Pflanzenarten sehr unterschiedlich sein können. Einige morphologische Auswirkungen sind bei vielen Pflanzenarten sehr ähnlich, wie z. B. eine verstärkte Kutikula oder eine verkleinerte Blattfläche (Barnes *et al.*, 1987). Große Unterschiede gegenüber UV-B-Strahlung können hingegen zwischen mono- und dikotylen Pflanzenarten festgestellt werden, wobei monokotyle Pflanzen generell resistenter gegenüber UV-B-Schäden sind als dikotyle Arten (Caldwell & Flint, 1994).

Landwirtschaftliche Kulturen können durch zusätzliches UV-B in ihrem Ertrag negativ beeinflusst werden (Fiscus & Booker, 1995). Bestimmte Sorten von Sojapflanzen brachten nach erhöhter UV-B-Bestrahlung im Freiland deutlich niedrigere Erträge. Andere Varietäten von Soja hingegen zeigten sich dadurch in ihrer Ertragskraft unbeeinflusst (Teramura & Murali, 1986).

Indirekte Auswirkungen erhöhter UV-B-Strahlung sind in der Veränderung des Sekundärstoffwechsels zu sehen. Sowohl in Sonnensimulatoren als auch im Freiland konnte gezeigt werden, dass erhöhte UV-B-Strahlung einen Anstieg an Flavonoiden und verwandten Verbindungen auslöst. Die Entwicklung der Stoffe gilt als Schutz gegenüber UV-B-Strahlung, da die Moleküle im UV-Bereich absorbieren. Erhöhter Gehalt an Flavonoiden in der Epidermis, wie in Abbildung 1-3 dargestellt, verleihen der Pflanze einen besseren Schutz gegenüber UV-B-Einwirkung (Caldwell *et al.*, 1983; Tevini *et al.*, 1991). Die UV-B-bedingte Erhöhung von Flavonoiden und anderen Klassen sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe kann indirekte Auswirkungen auf die Anfälligkeit gegenüber Pathogenen und Pflanzenfressern haben (Berenbaum, 1988). In der Vergangenheit konnte in *Citrus jambhiri* gezeigt werden, dass die UV-B-induzierte Erhöhung der Konzentration an Psoralen sekundär die Widerstandsfähigkeit gegenüber Bakterieninfektionen verstärkte (McCloud *et al.*, 1992). Ein weiterer indirekter Einfluss, den UV-B-Strahlung auf die Pflanzen-Pathogen-Interaktion ausüben kann, konnte an der Entwicklungszeit von Insekten festgestellt werden. Ernährten sich Raupen von UV-B-behandelten Pflanzen, so entwickelten sich diese langsamer als Raupen von Pflanzen mit moderater UV-B-Behandlung (McCloud & Berenbaum, 1994). Verantwortlich dafür sind phenolische Inhaltsstoffe, die bei den Raupen die Verdaulichkeit des Pflanzenmaterials herabsetzten und dadurch eine verlangsamte Entwicklung verursachten. Überdies wirken manche phenolische Verbindungen im Insekt hormonell und beeinflussen dadurch die Entwicklungszeit ebenfalls negativ. Neben der insektiziden Wirkung konnte an Zuckerrübe und *Cucumis sativus*, bedingt durch eine UV-B-induzierte Erhöhung phenolischer Verbindungen, die Widerstandskraft gegenüber Pilzen verbessert werden (Orth *et al.*, 1990; Panagopoulos *et al.*, 1992).

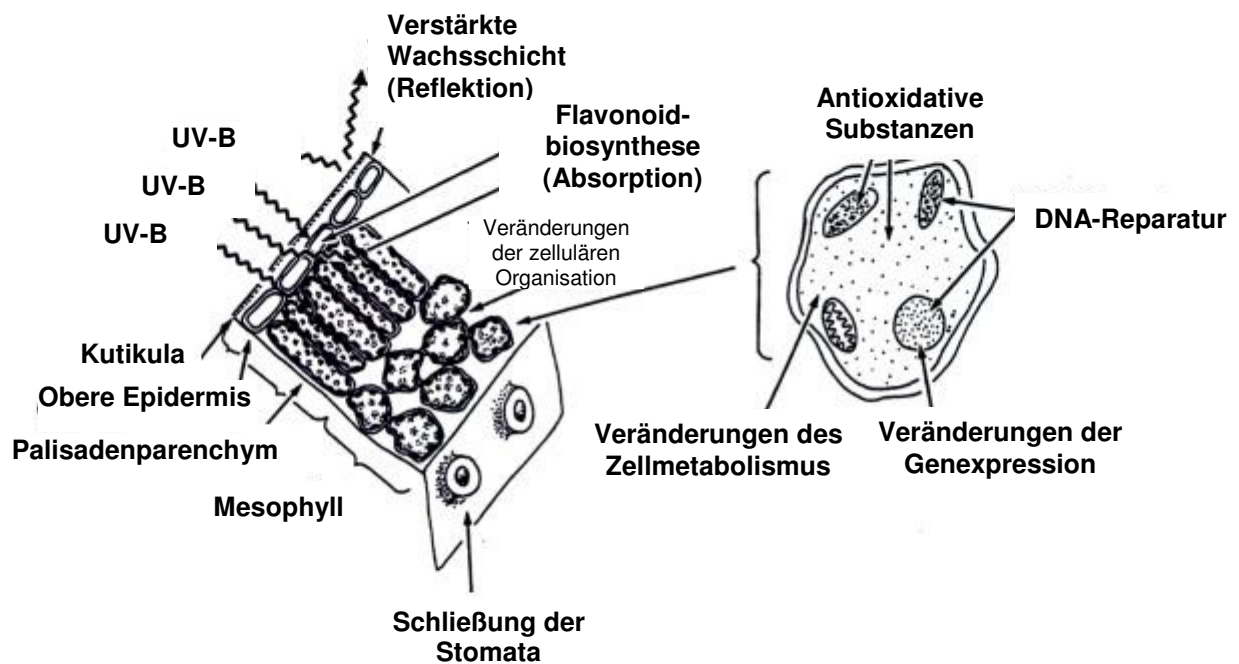


Abbildung 1-3

UV-B-Schädigungen und Schutzmaßnahmen im Blattgewebe (abgeändert nach Jordan, 1996).

Die Abbildung zeigt die physiologischen Veränderungen nach UV-B-Einwirkung innerhalb eines Blattquerschnittes. Die UV-B-Abschirmung durch die Flavonoide findet hauptsächlich in der Epidermis und im Palisadenparenchym statt.

Im Zusammenhang mit einer durch UV-B verursachten Erhöhung des Sekundärmetabolismus innerhalb von Pflanzenpopulationen konnte ferner gezeigt werden, dass eine UV-B-bedingte Konzentrationserhöhung von Verbindungen der Shikimatbiosynthese Auswirkungen auf die Nahrungsmittelqualität hat. Weiterhin können erhöhte Gehalte an Sekundärstoffen die Zersetzung von Pflanzenmaterial verzögern, was dazu führen kann, dass sich die botanische Zusammensetzung in einer Pflanzenpopulation verändert (Caldwell *et al.*, 1989).

Ökologische Folgen erhöhter UV-B-Belastung auf Pflanzengemeinschaften sind also in erster Linie indirekter Natur, obgleich in jüngster Zeit gezeigt werden konnte, dass in *Arabidopsis thaliana* eine direkte Korrelation von UV-B-bedingten Mutationen und UV-B-Dosis besteht (Ries *et al.*, 2000). Überdies konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Mutationsrate der Folgegeneration verstärkt wurde, was bedeuten

könnte, dass dramatische Folgen erhöhter UV-B-Strahlung erst im Laufe der nächsten Generationen auftreten werden.

1.3.2 Biochemische Regulation des Sekundärstoffwechsels

1.3.2.1 Signalaufnahme: Photorezeptoren

Damit Strahlung auf Pflanzen wirken kann, muss zwischen dem Lichtstimulus und den zellulären Regulationssystemen vermittelt werden. Der Lichtreiz muss von der Pflanze empfangen und weitergegeben werden. Die am besten untersuchten Rezeptoren in Pflanzen sind die Phytochrome. Ihnen wird eine Schlüsselfunktion in der Photomorphogenese der Pflanze zugesprochen. Phytochrome kommen in zwei Zustandsformen vor, die sich in ihrem Absorptionsmaxima unterscheiden. Liegt dieses bei 660 nm, spricht man von der inaktiven Form, während die aktive Form ihr Maximum bei 730 nm hat. Die Aktivierung und Inaktivierung dieses Photorezeptors ist dabei reversibel und beide Formen stehen aufgrund ihrer überlappenden Absorptionskurven in einem photodynamischen Gleichgewicht.

Phytochrome sind Chromoproteine, die aus einem Apoprotein und einem kovalent gebundenem, offenkettigem Tetrapyrrolysystem aufgebaut sind. Die Aktivierung des Rezeptors erfolgt durch die chromophore Quantenaufnahme und die dadurch bedingte Verschiebung der negativen Ladungsstruktur des Proteins, welche die Faltung der A-Domäne bewirkt (Westhoff *et al.*, 1996).

Neben dem Absorptionsmaximum im Rotlichtbereich besitzen Phytochrome ein weiteres Maximum im Bereich der UV-A-Strahlung. Komplexe Interaktionen der verschiedenen Phytochrome (PHYA-PHYE) können, zusammen mit den Photorezeptoren der Cryptochrome (CRY1, CRY2), die typischerweise Komponenten der UV-A-Strahlung absorbieren, sich auf der Ebene der Genexpression auswirken (Feinbaum & Ausubel, 1988). Die Transkription der Chalkonsynthese befindet sich in einem komplexen Netzwerk der verschiedenen Lichtrezeptoren (Boccalandro *et al.*, 2001). Phytochrom A und B können die CRY1-vermittelte Signalantwort der Expression der *CHS* verstärken (UV-A-Antwort). Andererseits erfolgt eine Suppression durch PHYB in der UV-B-induzierten Kaskade der *CHS* (Wade *et al.*, 2001). Synergistische Effekte von Cryptochrom- und Phytochromrezeptoren konnten auch an chloroplastidären Transkripten gezeigt werden. UV-A-Strahlung kann als Hauptsignal in *Arabidopsis thaliana* angesehen werden, um die chloroplastidären Gene *psbA*, *rbcL* und *16Srrn*

zu aktivieren. In Mutanten ohne PHYA (*phyA*) war jedoch der Gehalt an diesen UV-A-induzierbaren Transkripten um 60-80% niedriger als im Wildtyp (Chun *et al.*, 2001). Die Cryptochrome besitzen eine andere molekulare Struktur als die Phytochrome (Ahmad & Cashmore, 1996; Ahmad, 1998; Lin *et al.*, 1995; Ninu *et al.*, 1999). Die Struktur konnte durch die Isolierung des HY4-Proteins gezeigt werden. *hy4* ist eine Arabidopsis-Mutante, die keine blaulichtabhängige Inhibierung des Hypokotylwachstums zeigt. Das Protein besitzt im N-Terminus eine Bindestelle für das Chromophor Deazaflavin. C-terminal abwärts weist es eine Bindestelle für das Flavinchromophor FADH₂ auf. Unterbrochen werden beide Proteinbindestellen von einem Sequenzmotiv, das sehr homolog zu dem DNA-Reparaturgen Cyclobutanphotolyase (*CPDII*) ist (Ahmad *et al.*, 1997; Sancar, 1994). Letzteres behebt UV-bedingte Mutationen in der Pflanze. Die auffällige Ähnlichkeit von UV-Reparatur und -Rezeption lässt den Rückschluss zu, dass beide Proteine aus einer gemeinsamen evolutionären Gabelung hervorgegangen sind. Die wichtigsten Funktionen, die von Photorezeptoren in der Pflanze ausgeübt werden können, sind zusammenfassend in Abbildung 1-4 dargestellt.

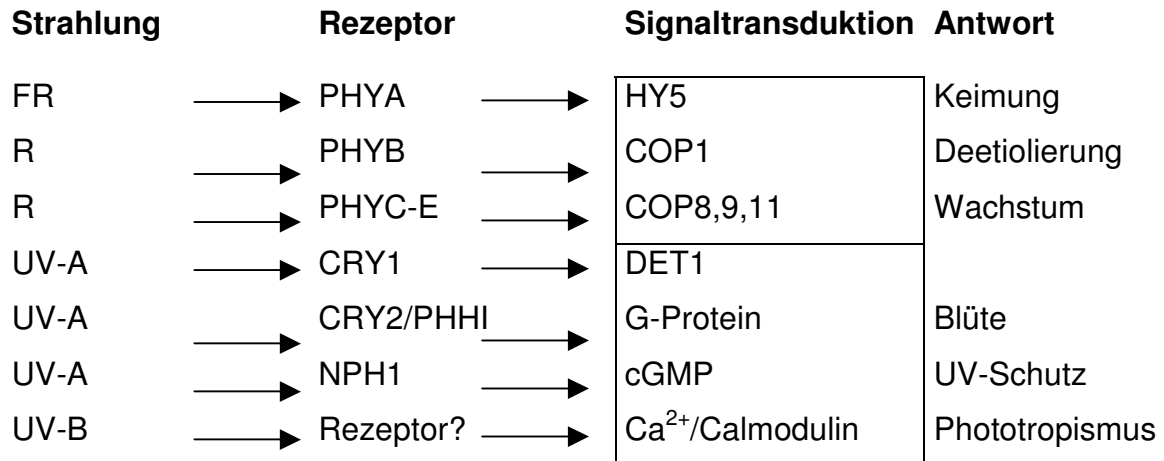


Abbildung 1-4

Strahlungsart, Rezeptor und Signaltransduktion (Batschauer, 1999).

Die Abbildung zeigt vereinfacht die Signalaufnahme unterschiedlicher Strahlung durch bekannte Rezeptoren. Weiterhin sind die bekannten Signaltransduktionsfaktoren aufgelistet, welche die Signalantwort herbeiführen.

In unmittelbarem Zusammenspiel mit den Cryptochromen stehen die COP- Proteine (,constitutive photomorphogenetic'). Diese konnten in dunkel angezogenen Arabidopsis-Mutanten gefunden werden, die trotz fehlender Lichtsignale typische PHYA-

initiierte Reaktionen wie Anthocyanbiosynthese und verkürztes Hypokotyl zeigten. Deshalb können COP-Proteine als negative Lichtregulatoren angesehen werden. COP1 interagiert mit dem C-Terminus von CRY1 und könnte sich nach derzeitigen Modellvorstellungen nach einem UV-A-Impuls von der Rezeptordomäne lösen, was als erster Signaltransduktionsschritt nach der UV-A-Aufnahme verstanden werden könnte und dadurch die CRY1-Antworten initiiert werden (Yang *et al.*, 2001). Ferner konnte gezeigt werden, dass COP1 in direkter Interaktion mit dem positiven Lichtregulator HY5 steht. HY5 bindet als bZIP-Transkriptionsfaktor (vgl. Kapitel Transkriptionsfaktoren) in der Promotorregion der Chalkonsynthese („Box'II: CCACGTGGCC). Das COP1-HY5 Fusionsprotein ist wahrscheinlich bei seiner Aktivierung im Nukleus lokalisiert. Das Lichtsignal führt zur Trennung der Domänen, freies HY5 bindet an den *CHS*-Promotor und aktiviert die Transkription des Gens (Ang *et al.*, 1998).

1.3.2.2 Signaltransduktion

Durch die starke Konservierung von Signaltransduktionsfaktoren der Lichtantwort in niedrigen und höheren Tieren sowie aufgrund der starken Ähnlichkeiten dieser Komponenten in Hefe liegt der Schluss nahe, dass sich lichtabhängige Regelmechanismen innerhalb der Eukaryoten im Laufe der Evolution wenig verändert haben (Emery *et al.*, 2000; Liu, 2001; Stanewsky *et al.*, 1998). Wichtige Signaltransduktionskomponenten, wie heterodimere G-Proteine, Phosphoinositidphosphat, Ca^{2+} /Calmodulin und Proteinkinasen verschiedener Spezifität konnten in den letzten Jahren der Lichtregulation in Pflanzen zugeschrieben werden (Bowler & Chua, 1994; Frohnmeyer *et al.*, 1997; Frohnmeyer *et al.*, 1999).

Als zentraler Regulator hinter PHYA befindet sich das heterodimere G-Protein. Nach diesem verzweigt sich die Signalkette. Ein Ca^{2+} /Calmodulin-abhängiger Weg führt zur Aktivierung des *CAB*-Promotors des Photosystems II. Der zweite Weg (PHYA-abhängig) ist auf zyklisches GMP angewiesen. cGMP ist für die Signalweiterleitung zum *CHS*-Promotor erforderlich. Die Kaskade führt zu einer Erhöhung der Anthocyane und kann als Lichtschutz für die Pflanze angesehen werden. Beide Signalwege sind für die Biogenese der Chloroplasten notwendig, was an dunkel angezogenen *phyA*-Tomaten-Mutanten gezeigt werden konnte, die nach Belichtung keine Chloroplasten bildeten und deutlich an den photosynthetischen Redoxäquivalenten NADP^+ -Ferredoxinoxidoreduktase (FNR) und Cytochrom- b_6/f des Photosystems I reduziert waren. Wurde extern Ca^{2+} /Calmodulin und cGMP injiziert, bildeten die *phyA*-

Mutanten die Chloroplasten vollständig aus (Neuhaus *et al.*, 1993). Neben der PHYA-Antwort ist Ca^{2+} /Calmodulin bei der Regulation der *CHS* nach UV-Bestrahlung involviert. Der für die Induktion der *CHS* notwendige cytosolische ‚Pool‘ an Ca^{2+} -Ionen wird hierbei durch die erhöhte Aktivität von spezifischen Ca^{2+} -ATPasen unterstützt (Long & Jenkins, 1998).

Der UV-B-Strahlung konnte bis heute kein Rezeptor zugeordnet werden. Nach bisherigen experimentellen Erfahrungen wird das UV-B-Signal an der Plasmamembran aufgenommen. Dieses wird, das haben pharmakologische Studien gezeigt, von einem Flavoprotein bewerkstelligt, was eine deutliche Parallele zu der UV-A-vermittelten Signalaufnahme ist. Die Cryptochrome, die im Spektralbereich der UV-A-Strahlung agieren, stellen derartige Flavoproteine dar. Die Ergebnisse zeigen, dass die UV-B-Rezeption durch ein ähnliches Molekül bewirkt wird, welches an der Plasmamembran einen Elektronentransport initiiert (Long & Jenkins, 1998). Die Unterschiede zwischen UV-B- und UV-A-Antwort sind insbesondere in der Regulation der Kalziumhomöostase zu sehen (Long & Jenkins, 1998). Die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der CRY1-abhängigen Induktion der *CHS* sowie der UV-B-Antwort über einen unbekanntem Rezeptor sind in Abbildung 1-5 zusammengefasst.

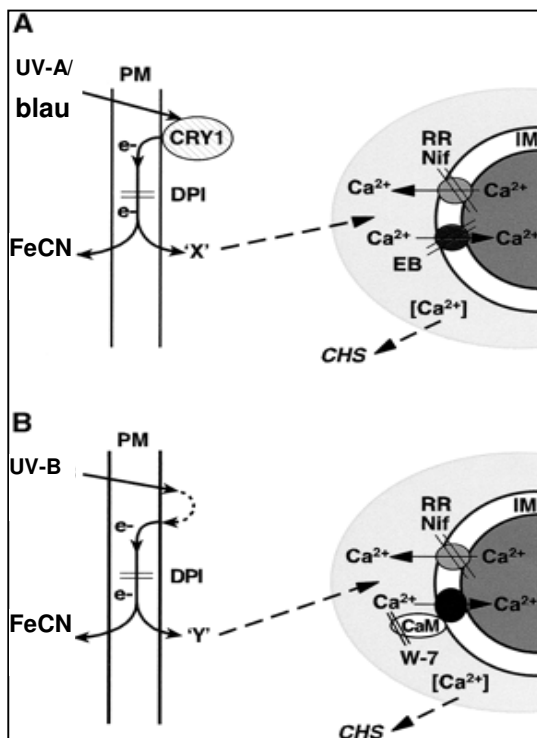


Abbildung 1-5

UV-B-/UV-A-Signaltransduktion der Chalkonsynthese (aus Long & Jenkins, 1998).

Abbildung A: UV-A-Rezeption an der Plasmamembran durch CRY1.

Abbildung B: Signaltransduktions-Kaskade der UV-B-Antwort.

(Abkürzungen: CRY = Cryptochrom; PM = Plasmamembran; IM = Internale Membran (wahrscheinlich Tonoplastenmembran); DPI = Diphenyliodonium; FeCN = Ferricyanid; EB = Erythrosin B; CaM = Calmodulin; W-7 = Antagonist von Calmodulin; RR und Nif = Kalziumkanäle, die sensitiv auf Ruthenium-Rot und Nifdipin reagieren)

UV-B-Strahlung führt in der Pflanze in ähnlicher Weise zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), wie das nach einem Pathogenbefall zu beobachten ist (Surplus *et al.*, 1998). Die UV-B-Induktion der *CHS* wird aber nicht dieser allgemeinen Stressantwort zugeschrieben (Mackerness, 2001). Der oxidative Status der Zelle ist aber trotzdem in der frühen Phase der *CHS*-Aktivierung notwendig, da *PcGST1*, das bei oxidativem Stress aktiviert wird, im frühen Stadium der *CHS*-Induktion coexprimiert vorgefunden wurde (Frohnmeier *et al.*, 1997). Dieser Sachverhalt widerlegt aber nicht die These, dass die Induktion der *CHS* durch einen UV-B-Rezeptor angesteuert wird, da die alleinige Aktivierung über reaktive Sauerstoffspezies nicht in Frage kommt (Mackerness, 2001).

1.3.2.3 Transkriptionsfaktoren

Die molekularen Grundlagen der Lichtregulation des Sekundärmetabolismus durch Transkriptionsfaktoren werden momentan erst ansatzweise verstanden. Als Modellsystem hat sich in der Vergangenheit die Promotorregion der *CHS* in Petersilie herauskristallisiert (Christie & Jenkins, 1996; Feinbaum & Ausubel, 1988; Jenkins *et al.*, 2001; Leyva *et al.*, 1995; Loyall *et al.*, 2000; Oberholzer *et al.*, 2000; Shimizu *et al.*, 1999; Wade *et al.*, 2001). In diesen befinden sich molekulare Lichtschalter. Darunter sind DNA-Sequenzmotive zu verstehen, an denen *cis*-regulatorische Elemente binden.

In Petersilie ist der Promotor in zwei Einheiten eingeteilt. Beide bestehen jeweils aus zwei ‚Boxen‘, die bindetypische Sequenzmotive aufweisen. Wirksam ist vor allem die erste Einheit und zwar dann, wenn die Pflanze mit Licht bestrahlt wird, das sowohl weißes als auch UV enthält.

In Kapitel 1.3.2.2 wurde bereits die molekulare Regulation und das Zusammenspiel von HY5 mit Photorezeptoren erörtert. HY5 ist ein bZIP-Transkriptionsfaktor, der speziell in die zweite ‚Box‘ bindet und dafür das zentrale Motiv ACGT benötigt. Neben der Bindung des bZIP-Proteins ist für die Aktivierung des Gens ein Transkriptionsfaktor der MYB-Familie in der ‚Box‘ notwendig. Solche Elemente können bei verschiedenen Genen in ähnlicher Sequenzfolge in mehrfacher Anzahl hintereinander angeordnet sein und über ihre Häufung die Genaktivität bestimmen (Weisshaar *et al.*, 1991). Offen bleibt allerdings die Frage, ob es eine Vielzahl von *cis*-regulierten Elementen gibt, die sich von Promotor zu Promotor unterscheiden, oder ob die unterschiedlichen Photorezeptoren die gleichen Lichtschalter benutzen. Die Transkrip-

tionsfaktoren der *MYB*-Genfamilie umfassen in *Arabidopsis thaliana*, das ein vergleichsweise kleines Genom besitzt, schätzungsweise über 100 verschiedene Kandidatengene. Die Zuordnung zu dieser Familie erfolgte durch die kennzeichnenden ‚Helix-Turn-Helix‘-Motive der Proteine (R2R3). Neben den Regulationsmöglichkeiten innerhalb des Sekundärmetabolismus (Borevitz *et al.*, 2000; Hemm *et al.*, 2001) steuern die Transkriptionsfaktoren die Genaktivität innerhalb verschiedener Pflanzenorgane, nach Pathogenbefall und den der zirkadianen Rhythmik (Carre & Kim, 2002; Kranz *et al.*, 1998; Yang & Klessig, 1996). Welche Gene und Sequenzmotive von den verschiedenen Mitgliedern tatsächlich reguliert und verwendet werden, ist zum großen Teil unbekannt (Romero *et al.*, 1998).

Mit am besten charakterisiert sind die Transkriptionsfaktoren der Anthocyanbiosynthese in *Zea mays* (Doebley, 1993). Für die Regulation sind die sechs Transkriptionsfaktoren C1, P1, R, B, P und VP1 verantwortlich (Bruce *et al.*, 2000). C1 und P1 sind Vertreter der *MYB*-Familie (Grotewold *et al.*, 2000; Paz-Ares *et al.*, 1987). R und B sind funktionell äquivalente Proteine der Protoonkogene *MYC*. C1 wird für die Anthocyanbiosynthese im Samen benötigt. Der dazu homologe P1-Transkriptionsfaktor erfüllt die gleiche Funktion außerhalb des Samens, so dass beide Regelemente gewebespezifisch transkribiert werden. Die beiden Proteine reichen jedoch nicht aus, um die Anthocyanbiosynthese in Gang zu setzen. Sie benötigt zusätzlich die Translation von R/B. B ist dabei ein singuläres Gen, während die R-Proteine von einer Genfamilie kodiert werden. Im Gegensatz zu den Vertretern der *MYB*-Familie C1 und P1 werden R und B nicht gewebespezifisch exprimiert. Je nach Maisvarietät zeigen sie unterschiedliche zeitliche und räumliche Expressionsmuster, was besonders für die Mitglieder der R-Genfamilie gilt (Westhoff *et al.*, 1996). Die Tatsache, dass sowohl C1 als auch R/B für die Transkription der Strukturgene der Flavonoid- und Anthocyanbiosynthese im Samen benötigt werden, belegen transiente Coexpressionsstudien. Die Promotoren des Typs *BZ1* und *A1* (*BZ1*: UDP-3-OH-Anthocyanidin-Glukosyltransferase; *A1*: Dihydroflavonolreduktase) sind nur dann aktiv, wenn äquivalente Mengen an C1 und R/B vorhanden sind. Diese scheinen hierbei als Homodimere an die Zielsequenz zu binden und wirken synergetisch. Während die Anthocyanbiosynthese diese Transkriptionsfaktoren benötigt, ist in Mais die Synthese von Phlobaphenen unabhängig von diesen regulativen Elementen. Die Flavonoidklasse der Phlobaphene wird im Gegensatz zu den Anthocyanen von dem Transkriptionsfaktor P gesteuert (*MYB*-Vertreter). Dieser aktiviert einen Promotor des Typs *A1*, was

zur Synthese der Phlobaphenvorstufe Flavan 4-ol führt. P alleine kann Promotoren des Typs *A1* ansteuern, nicht aber die *BZ1*-Typen. Durch diese Differenzierung kann die Pflanze Anthocyan- und Phlobaphensynthese getrennt regeln.

Die Anthocyanbiosynthese im Samen steht aber nicht nur unter der Kontrolle der Transkriptionsfaktoren C1 und R/B, sondern wird überdies durch VP1 (*Viviparous 1*) kontrolliert. Dieses Regulativ übt außerdem pleiotrope Eigenschaften aus, weil es zusätzlich die Reifung des Embryos zentral steuert. VP1 ist also ein hierarchisch übergeordneter Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Funktion bei der Fruchtreife einnimmt. Die Flavonoid- und Anthocyanbiosynthese ist demnach im Samen von *Zea mays* in ein übergeordnetes Entwicklungsprogramm eingebunden (Doebley, 1993).

1.3.3 UV-Abschirmung durch phenolische Inhaltsstoffe

Die UV-Abschirmung wird in der Pflanze in erster Linie durch das Absorptionsvermögen phenolischer Inhaltsstoffe bewirkt. Solche Verbindungen sind in der Pflanze in sehr großer Vielfalt vorhanden. Welche Verbindungsklassen im Wesentlichen für die UV-Abschirmung sorgen, ist abhängig von deren Konzentrationen, deren zellulären Lokalisation und ihrem spezifischen UV-Absorptionsvermögen. Vergleichsweise niedrig konzentrierte phenolische Inhaltsstoffe können zwar durch UV-B-Strahlung induziert werden, wie das für Myricetin 3-Galaktosid und für die Chlorogensäure in Birkenblättern gezeigt wurde (Lavola *et al.*, 1997), für das gesamte UV-Abschirmpotential spielte diese Reaktion jedoch nur eine untergeordnete Rolle. Dieses wird in Birke primär durch Quercitrin determiniert, das nach UV-B-Bestrahlung um ein Vielfaches höher konzentriert vorliegt. Die Ergebnisse der Vergangenheit deuten darauf hin, dass die UV-Abschirmung nicht durch eine generelle Erhöhung phenolischer Inhaltsstoffe bewirkt wird, sondern dass die Pflanze zu diesem Zweck ganz bestimmte Moleküle des Sekundärstoffwechsels verwendet.

In *Arabidopsis thaliana* haben sich in der Vergangenheit vor allem durch den Einsatz von Mutanten zwei sekundäre Verbindungsklassen herauskristallisiert, die obenstehende Kriterien eines effektiven Absorbers besonders gut erfüllen, nämlich die Flavonol- und Sinapinsäurederivate. Diese liegen in den Blättern in sehr hohen Konzentrationen vor und absorbieren spezifisch im UV-Bereich (Stephan, 1996; Veit & Pauli, 1999). Weiterhin sind sie größtenteils in der Epidermis lokalisiert und zwar in gelöster Form (W. Heller, unveröffentlicht) und können dadurch das darunter liegende Gewe-

be vor UV-Einwirkung abschirmen. Aus diesem Sachverhalt heraus konzentriert sich die Analytik der Schutzpigmente in Kapitel 3 auf diese beiden Verbindungsklassen. In den nachfolgenden Kapiteln (1.3.3.1 - 1.3.3.2) werden experimentelle Details aus UV-Studien der Vergangenheit vorgestellt, die den Flavonole (Flavonoide) und auch den Estern der Sinapinsäure eine essentielle Funktion bei der UV-Abschirmung zugeschrieben haben.

Die Funktion der Anthocyane zur Abschirmung von Strahlung wird in Kapitel 1.3.3.3 erörtert. Diese sind nah verwandt zu den Flavonolen, und sind in der Pflanze ebenfalls in vergleichsweise hohen Konzentrationen vorhanden.

1.3.3.1 UV-Abschirmung durch Flavonoide

Das Interesse an Flavonoiden lag in der Vergangenheit primär an deren farbgebenden Eigenschaften für die Blüten (Heller & Forkmann, 1988; Meyer *et al.*, 1987). In den 80er Jahren bestand großes Interesse daran, durch gezieltes Einbringen von Genen des Flavonoidstoffwechsels die Farbgebung der Blütenblätter zu manipulieren. Erstmals ist das bei der Petunia-Mutante *RL01* gelungen. Diese Pflanze ist ein Dihydroflavonol-Akkumulator, die keine rotfärbenden Pelargonidine bildet und dadurch farblose Blütenblätter besitzt. Durch Einbringen des *A1*-Gens (Dihydroquercetin 4-reduktase, *DFR*) aus *Zea mays* konnten die Transformanten Pelargonidine herstellen und die Blüten der Pflanzen waren wieder rot (Meyer *et al.*, 1987).

Neben der roten Verfärbung konnte die Gelbfärbung auf die Flavonoide der Blütenblätter zurückgeführt werden. Die Färbung wird chemisch durch die enolische Tautomerform der acetylierten Flavonol 7-O-Glykoside bewirkt. Zudem scheint für die gelbe Farbgebung die cytoplasmatische Lokalisation dieser Strukturen von Bedeutung zu sein (Markham *et al.*, 2001).

Neben den Farbcharakteristiken besitzen die Flavonoide für die Pflanze die essentielle Funktion des UV-Schutzes. Die Moleküle nehmen die Strahlung im Bereich von 270-340 nm auf und geben die Energie größtenteils als Wärme wieder ab (Sheahan & Rehnitz, 1999). Die Flavonoide absorbieren im Spektralbereich der UV-Strahlung und beeinträchtigen damit nicht die photosynthetische Energieumsetzung der Chlorophylle (Lois, 1994; Ryan *et al.*, 2001; Stapleton & Walbot, 1994; Stephan, 1996). Die Biosynthese ist in Abbildung 1-6 dargestellt. Die Enzyme, welche in Kapitel 3 auf der Ebene der Genexpression untersucht werden, sind in *Arabidopsis thaliana* bereits bestens biochemisch charakterisiert. Tabelle 1-1 fasst die verwendeten Se-

quenzen und die entsprechenden Literaturstellen zusammen, in denen die Funktionalität der Gene gezeigt wurde.

Die Flavonoide werden durch UV-B-Strahlung vorwiegend in der oberen Epidermis und im Palisadenparenchym gebildet (Kolb *et al.*, 2001). Für den UV-Schutz sind hauptsächlich glykosidische Flavonole von Bedeutung (Sheahan & Rechnitz, 1999; Veit & Pauli, 1999).

Die Notwendigkeit der Flavonoide als UV-B-Schutz konnte an zahlreichen *tt*-Mutanten (,transparent testa') in *Arabidopsis thaliana* gezeigt werden. Die *tt*-Loci führen bei allen Mutanten wegen fehlender Pigmentierung zu gelblichen Samen (Koorneef, 1990; Koorneef & Stam, 1992). *tt4* kann keine Chalkonsynthase herstellen und *tt5* produziert keine funktionstüchtige Chalkonisomerase. Die Mutanten sind gegenüber UV-B-Strahlung wesentlich empfindlicher als Wildtypen (Li *et al.*, 1993). Neben diesen beiden Mutanten sind in *Arabidopsis thaliana* *tt3*, *tt6*, *tt7*, *tt8* und seit neuestem *tt15* bekannt. *tt3* trägt eine Mutation in der Dihydroflavonolreduktase, *tt6* eine in der Flavanon 3-Hydroxylase und *tt7* ist defizient in der Flavonoid 3'-Hydroxylase (Peer *et al.*, 2001). Die Insertionsmutante *tt8* kann keine Dihydroflavonolreduktase transkribieren. Bei dieser Mutante handelt es sich aber nicht um einen direkten Funktionsverlust des Enzyms, sondern es fehlt dort ein essentieller *MYC*-Transkriptionsfaktor, der die *DFR*-Expression regelt (vgl. Kapitel 1.3.2.3). Bei *tt15* ist die genaue Funktion nicht bekannt. Der Verlust der Pigmentierung könnte hier durch eine gestörte Biosynthese von Tanninen hervorgerufen sein (Focks *et al.*, 1999).

Tabelle 1-1

Enzyme der Flavonoidbiosynthese in *Arabidopsis thaliana*.

Die entsprechenden Gene werden in dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Expression untersucht.

Enzym	Abkürzung	Aminosäuren (AS)	Gen (MIPS-Code)	Funktionelle Charakterisierung
Chalkonsynthase	CHS	395	At5g13930	Feinbaum & Ausubel (1988)
Chalkonisomerase	CHI	246	At3g55120	Shirley <i>et al.</i> (1995)
Flavanon 3-Hydroxylase	FHT	358	At3g51240	Wisman <i>et al.</i> (1998)
Flavonoid 3'-Hydroxylase	F3'H	513	At5g07990	Schoenbohm <i>et al.</i> (2000)
Flavonolsynthase	FLS	336	At5g08640	Wisman <i>et al.</i> (1998)

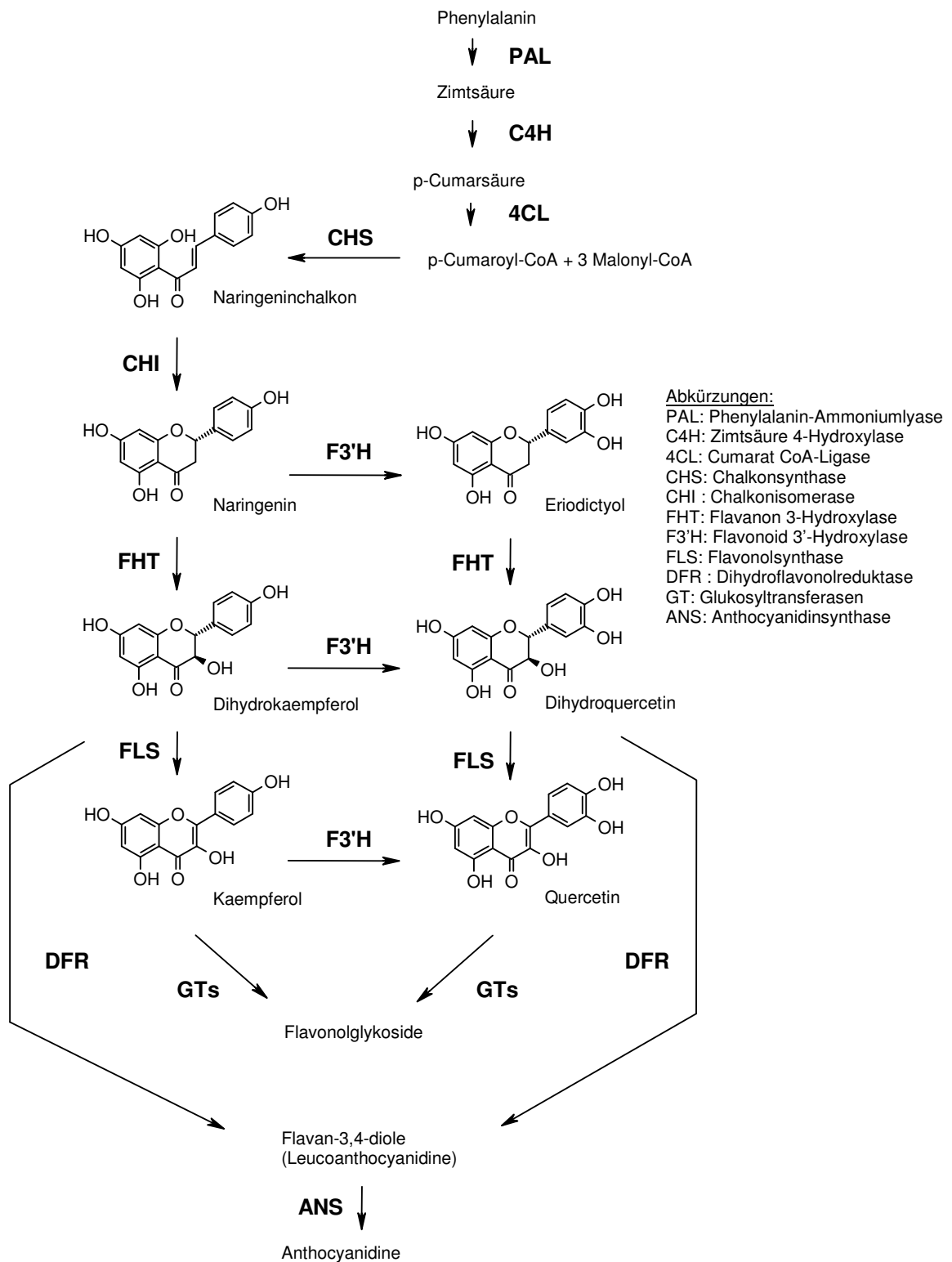


Abbildung 1-6

Biosynthese UV-abschirmender Flavonoide (aus Winkel-Shirley, 2001).

Die Flavonoidbiosynthese beginnt mit der Katalyse von p-Cumaroyl-CoA mit 3 Malonyl-CoA zu Naringeninchalkon. Das Schema führt zu den Flavonolglykosiden, die nach dem momentanen Stand des Wissens als Hauptschutz vor UV-Strahlung angesehen werden (vgl. Veit & Pauli, 1999).

1.3.3.2 UV-Abschirmung durch Sinapinsäureester

Die Sinapinsäureester sind nahe verwandt mit den Flavonoiden. Der gemeinsame Syntheseweg endet bei der p-Cumarsäure. Freie Sinapinsäure kommt in Pflanzen fast nicht vor. Pflanzen setzen diese in Sinapinsäureester um und lagern diese in der Vakuole ab (Lehfeldt *et al.*, 2000; Ruegger *et al.*, 1999). Die Biosynthese der Sinapinsäureester ist in Abbildung 1-7 dargestellt. Sinapinsäure-Glukosyltransferase (SGT) und Sinapoylglukose : L-Malat-Sinapoyltransferase (SMT), welche die speicherfähigen Esterformen bilden, konnten in *A. thaliana* erst vor kurzem gefunden werden (Lehfeldt *et al.*, 2000; Lim *et al.*, 2001). Sinapinsäureester sind, abgesehen innerhalb der Brassicaceen, in Pflanzen nicht sehr weit verbreitet. Sie konnten in jüngster Zeit in *Daucus carota*, *Ananas comosus*, *Capsicum annum* und *Beta vulgaris* gefunden werden (Fernandez De Simon *et al.*, 1992; Halaweish & Dougall, 1990; Winter & Herrmann, 1986).

Die Bedeutung der Hydroxyzimtsäuren als UV-B-Schutz konnte in *A. thaliana* durch einen Gendefekt des Enzyms Ferulasäure 5-Hydroxylase demonstriert werden (*fah1*-Mutante). Pflanzen, welche diese Mutation tragen, können keine schützenden Sinapinsäureester bilden, und zeigen daher die UV-B-induzierbare, rote Chlorophyllfluoreszenz sehr ausgeprägt (Chapple *et al.*, 1992). Welcher Stellenwert den Hydroxyzimtsäuren im Vergleich zu den Flavonoiden für den UV-B-Schutz der Pflanze einzuräumen ist, kann nicht eindeutig beantwortet werden. Es ist jedoch festgestellt worden, dass die Chlorophyllfluoreszenz von *fah1*-Mutanten höher ist als bei *tt4*-Mutanten. Daraus ist rückzuschließen, dass Sinapinsäureester die UV-B-Strahlung stärker abschwächen als die Flavonoide. Dieser Aussage steht allerdings gegenüber, dass die *tt4*-Mutante eine positive Rückkopplung zu den Hydroxyzimtsäuren besitzt (Li *et al.*, 1993). Die niedrigere Chlorophyllfluoreszenz der flavonoiddefizienten Pflanzen dürfte sich demnach durch die erhöhte Absorption der indirekt erhöhten Hydroxyzimtsäuren ergeben. Der Rückschluss, dass Sinapinsäureester den besseren UV-B-Schutz bieten als Flavonoide, ist deswegen fragwürdig (Stephan, 1996). Für die Flavonoide spricht jedoch deren hohe Konzentration in den Blättern, die bei glykosidischen Flavonolen um etwa den Faktor Zehn höher liegen als bei den Sinapinsäureestern, wobei beide chemischen Strukturen etwa die gleiche Absorptionskapazität aufweisen (Stephan, 1996).

Die Wichtigkeit der Flavonoiden als UV-B-Schutz in der Pflanze ergibt sich auch dadurch, dass Quercetin im Zellkern direkt an der DNA entdeckt wurde und infolgedes-

sen UV-B-bedingte Mutationen am Erbgut effektiver abgeschirmt werden können als mit zellsaftgelösten Sinapinsäurederivaten (Ahmed *et al.*, 1994).

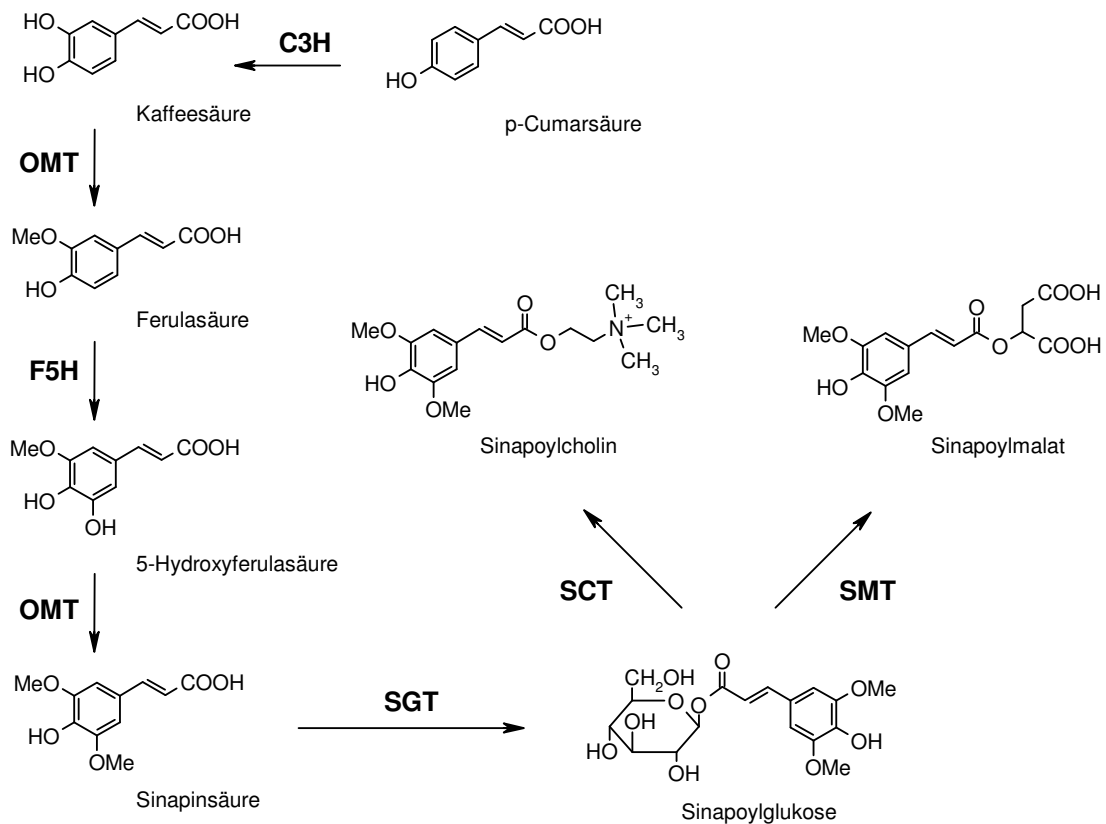


Abbildung 1-7

Biosynthese UV-absorbierender Sinapinsäureester (aus Ruegger *et al.*, 1999).

Das Enzym p-Cumarsäure 3-Hydroxylase (C3H) katalysiert im ersten Schritt der Biosynthese die Kaffeesäure. Durch eine Methylierungsreaktion mit Hilfe einer Methyltransferase (OMT) wird Ferulasäure metabolisiert. Diese wird an C5 hydroxyliert (mit Hilfe von Ferulasäure 5-Hydroxylase; F5H) und nochmals methyliert (OMT), so dass freie Sinapinsäure entsteht. Die beiden Hauptformen sind Sinapoylglukose und Sinapoylmalat. Die katalysierenden Enzyme sind Sinapinsäure-Glukosyltransferase (SGT) und Sinapoylglukose : L-Malat-Sinapoyltransferase (SMT). Sinapoylcholin wird durch das Enzym Sinapoylglukose : Cholin-Sinapoyltransferase synthetisiert (SCT).

1.3.3.3 Anthocyane

Der erste Schritt in der Anthocyanbiosynthese wird durch die Dihydroflavonolreduktase eingeleitet, was zu Leucoanthocyanidinen führt. Diese werden demnach aus den gleichen Substraten gebildet wie die bereits vorgestellten Flavonole (Heller & Forkmann, 1988). Im Gegensatz zu den Flavonolen haben Anthocyane jedoch ihr Absorptionsmaximum im Spektrum des sichtbaren Lichtes (400-700 nm), und sie werden deswegen als Schutz gegenüber erhöhten Intensitäten an PAR diskutiert. Sie können überschüssige photosynthetische Strahlungsenergie absorbieren, welche nicht mehr in chemische Energie eingebunden werden kann und als primäre Folge peroxisomales H_2O_2 oxidative Prozesse in Gang setzen würde (Vandenabeele *et al.*, 2004). Erhöhte Gehalte an Anthocyanen, verursacht durch Hochlichtstress in Kombination mit kühler Temperatur, beeinträchtigen andererseits nicht die photosynthetische Leistungsfähigkeit der Pflanze (Pietrini *et al.*, 2002).

1.3.4 UV-Schäden und deren Reparatur

1.3.4.1 DNA-Mutationen

Die Absorption der DNA von UV-B-Photonen führt *in vivo* hauptsächlich zur Bildung von Cyclobutan-Pyrimidindimeren (CPDs) und zu einem niedrigeren Anteil zu 6-4-Photoprodukten der DNA (Britt, 1996) (Abbildung 1-8). Die mutagene Wirkung der UV-B-Strahlung führt zellulär zu einem gestörten Ablauf der DNA- und RNA-Polymerisation, da die Polymerasen die Modifikationsstrukturen nicht übersetzen können, was zu einer gestörten DNA-Replikation und RNA-Transkription führt (Britt, 1996).

1.3.4.2 DNA-Reparatur

Die Reparatur der DNA-Schäden geschieht hauptsächlich durch die lichtgetriebene Photoreaktivierung der DNA durch die Photolyasen (Britt, 1996). Die Photolyasen setzen die Cyclobutan- und 6-4-Pyrimidine wieder zur nativen, übersetzbaren DNA um (Ahmad *et al.*, 1997; Sakamoto *et al.*, 1998; Waterworth *et al.*, 2002). Die Mutationen des Cyclobutantyps werden spezifisch durch die CPDII-Photolyase und die 6-4-Dimere durch die 6-4-Photolyase rückgängig gemacht (Taylor *et al.*, 1990). CPDII-Photolyasen tragen zwei chromophore Gruppen eines Flavin- und Folsäuretyps, deren Absorptionsmaxima in einem Wellenbereich von 350-450 nm liegen. Die Über-

tragung eines Elektrons im katalytischen Zentrum der CPDII auf die Cyclobutanstruktur führt zur Rückbildung in zwei lesbare Pyrimidine (Jansen, 1998; Sancar, 1994). Die 6-4-Photolyasen sind zu den CPDII-Photolyasen je nach Organismus etwa zu 30% aminosäurehomolog. Die enzymatischen Redoxvorgänge sind bei den 6-4-Photolyasen anderer Natur als die der CPDII-Photolyasen (Nakajima *et al.*, 1997; Weber *et al.*, 2002). Beide Enzyme müssen aber für ihre Reparaturaktivität durch Komponenten der UV-A-Strahlung photoaktiviert werden. In *Arabidopsis thaliana* konnte allerdings beobachtet werden, dass die Pflanze im Dunklen DNA-Reparatur betreibt. Diese Funktion wurde dem *UVH1*-Locus zugeschrieben. Die *uvh1*-Mutante hingegen ist nicht befähigt, diesen Reparaturweg zu bestreiten. Funktionsanalysen zeigten, dass UVH1 eine Untereinheit des Enzymkomplexes des ‚nucleotide excision repair‘-Mechanismus ist. Die Pflanze verfügt demnach über eine zusätzliche, vom Licht unabhängige Reparaturmöglichkeit Dimerenstrukturen benachbarter Pyrimidine zu beseitigen. Dieser dürfte aber im Vergleich zu den Photolyasen eine untergeordnete Rolle spielen (Liu *et al.*, 2000).

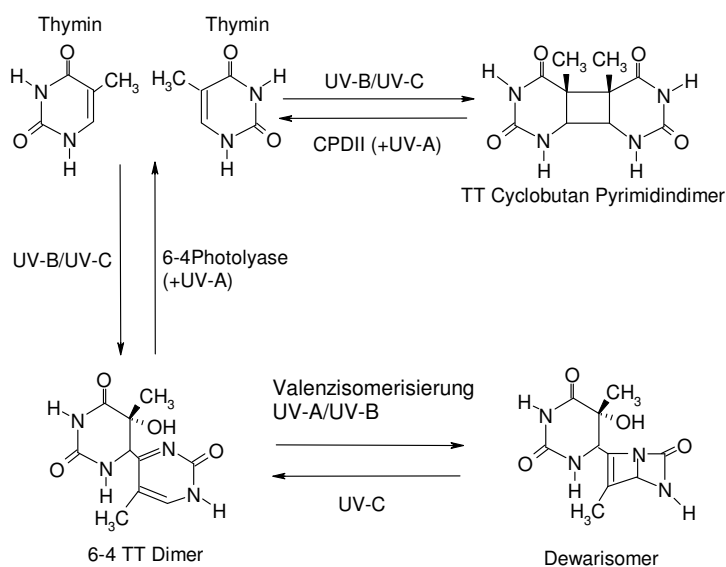


Abbildung 1-8

DNA-Mutationen durch UV-B-Strahlung und deren Reparatur (Jansen, 1998; Taylor *et al.*, 1990).

Die Abbildung zeigt zwei verschiedenen Möglichkeiten der Dimerenbildung durch UV-B-Strahlung (Cyclobutandimer und 6-4 Dimer). Die enzymatische Reparatur der Mutationsprodukte erfolgt *in vivo* durch die Cyclobutan- (CPDII) und der 6-4-Photolyase (Erläuterungen siehe Text).

1.3.5 UV-B-Schädigung des Photosyntheseapparates

Die Photosynthese ist der zentrale Prozess für die Energiegewinnung der Pflanze. Erhöhte UV-B-Strahlung kann die Funktionstüchtigkeit des Photosyntheseapparates negativ beeinflussen, was bei steigender terrestrischer UV-B-Strahlung zur Reduzierung landwirtschaftlicher Erträge führen kann (Fiscus & Booker, 1995). Proteine in der Thylakoidmembran des Photosystems II zeigen sich durch UV-B-Strahlung besonders negativ beeinflussbar (Jordan *et al.*, 1991). Das Photosystem II ist ein hochmolekularer Protein-Pigment-Komplex in der Thylakoidmembran, an dem der Transfer der freigesetzten Elektronen von H₂O entlang eines elektrochemischen Gradienten läuft, um schließlich im PSI NADP⁺ zu reduzieren. UV-B-Strahlung stört diesen Vorgang durch die Degradierung der D1- und D2-Proteine (Jansen *et al.*, 1996). Die Neusynthese („turn over“) der Proteine tritt aber sehr schnell ein, und es wird angenommen, dass die *de novo*-Synthese Teil eines Reparatursystems ist, der für die Aufrechterhaltung der Funktion des PSII notwendig ist (Aro *et al.*, 1993). UV-B-bedingte Repression des D1/D2-Komplexes ist generell begleitet von einer erniedrigten O₂-Freisetzung und einer erhöhten Chlorophyllfluoreszenz. Weiterhin hat UV-Strahlung Einfluss auf die oxidierenden und reduzierenden Prozesse im PS II. Unter diese Kategorie fallen vor allem redoxaktive Tyrosine (Z- und D-Proteine), die UV-B-Chromophore Q_A⁻ und Q_B⁻ und das manganhaltige Reaktionszentrum des wasserspaltenden Komplexes im PSII (Vass *et al.*, 1996).

UV-B-Strahlung führt im PSII zur Erniedrigung der Chlorophylle, Xanthine und der chlorophyllbindenden Proteine. Des Weiteren konnte eine erniedrigte Aktivität der RUBISCO und eine absinkende Konzentration der löslichen Proteine des Calvinzyklus festgestellt werden (Greenberg *et al.*, 1997; Nogues & Baker, 1995; Strid *et al.*, 1994). Die Reduktion wurde jedoch bei diesen Studien mit niedrigen PAR-Werten beobachtet. In ökologisch relevanten Untersuchungen mit hoher PAR reduzierte sich durch zusätzliche UV-B-Bestrahlung zwar die Biomasse, eine Reduktion der Konzentration an Photosyntheseproteinen konnte jedoch nicht gefunden werden (Fiscus & Booker, 1995).

1.4 Themenstellung

UV-Studien an Pflanzen konzentrierten sich in der Vergangenheit in erster Linie auf transiente Effekte mit z.T. unrealistischen Bestrahlungsbedingungen. In diesen Versuchen erfolgte eine starke Induktion der pflanzlichen Reaktion. Sie wurden daher hauptsächlich zur Aufklärung der biochemischen Regulation des Sekundärmetabolismus angewandt (Jenkins *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2000; Mackerness, 2000; Mackerness, 2001). Neben dieser Disziplin gab es eine Reihe an ökologisch relevanten Studien, bei denen der UV-Anteil künstlich modifiziert wurde. Dies geschah entweder durch Filter, die nur einen Teil der UV-B-Strahlung durchließen und somit die UV-B-Belastung reduzierten bzw. durch künstliche Quellen, die eine UV-B-Erhöhung simulierten. In solchen Untersuchungen wurden zwar spektrale Abhängigkeiten der UV-Antwort beschrieben (Cooley *et al.*, 2001; Day *et al.*, 1994; Day *et al.*, 1996; Ghetti *et al.*, 1999; Strid, 1993), umfassende spektrale Experimente an höheren Pflanzen unter Variation des Verhältnisses von UV-B zu PAR fehlten bisher.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, erstmals mit *Arabidopsis thaliana* ökologisch relevante UV-Szenarien mit Hilfe polychromatischer Experimente durchzuführen, um dadurch komplexe Interaktionsmuster von UV-B-, UV-A- und PAR-Bestrahlung sowohl auf Transkript- als auch auf der Metabolitebene des Schutzpigmentstoffwechselweges aufzuzeigen. Darüberhinaus sollte die Genexpression mit Hilfe eines DNA-Arrays unter den verschiedenen Bestrahlungsmodalitäten untersucht werden.

2 Material und Methoden

Geräte

Analysenwaage (+-0,00001 g)	Sartorius AG, Göttingen
Ausschwingzentrifuge Hettich	Hettich, Tuttlingen
Autoklav 5075 EL	Tuttnauer, New York, USA
Dioden-Array-Detektor Modell 168	Beckman Coulter GmbH, Unterschleißheim
Drehofen zur radioaktiven Hybridisierung	Uniequip, Martinsried
Eppendorf Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
FLA-3000	FUJI Photo Film Co., LTD, Japan
Gelelektrophorese-Kammern	PeqLab, Erlangen
Heizblock	Bachofer GmbH, Reutlingen
Hettich Tischzentrifuge EBA12	Hettich, Tuttlingen
HPLC Gold	Beckman Coulter GmbH, Unterschleißheim
Kühlzentrifuge RC58 Plus	Sorvall (Kendro), Stuttgart
Microgrid II	BioRobotics, UK
Mikrodismembrator II	Braun, Melsungen
Mikrotiterplattenzentrifuge 4K15C	Sigma GmbH, Osterode
Radialspektrometer	Bentham, Reading, Berkshire, UK
Sigma 2 K15 Laborzentrifuge	Sigma GmbH, Osterode
Spektrofluorimeter Modell RF530	Shimadzu, Duisburg
Spektrophotometer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Spherisorb ODSII (Typ NC, 4,6 x 250 nm, 5 µm mit Vorsäule)	Bischoff, Leonberg
Szintillationszähler LS1801	Beckman Coulter GmbH, Unterschleißheim
TaqMan ABI 7700 SDS	Perkin Elmer, Langen
Termocycler Express	Hybaid, Heidelberg
Thermocycler MJ PTC 100	MJ Research, Waltham, USA
Thermocycler MJ PTC 200	MJ Research, Waltham, USA
Thermocycler Sprint	Hybaid, Heidelberg
Tragbarer Kontaminationsmonitor LB1210B	Berthold, Bad Wildbad

Univapo 100H	Uniequip, Martinsried
UV Stratalinker®	Stratagene, La Jolla, USA
Waage (+-0,01 g)	Sartorius AG, Göttingen

Chemikalien

β-Mercaptoethanol	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
(NH ₄) ₂ SO ₄	Merck, Darmstadt
5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP)	Boehringer, Mannheim
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D- Galaktopyranosid (X-Gal)	Boehringer, Mannheim
Agarose Ultrapure	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Borsäure	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Bromphenolblau	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
Chloroform/Phenol/Isoamylalkohol pH 5,2 (24:25:1 (v/v))	Invitrogen, Life Technologies, Karlsruhe
Desoxynukleotide (dATP,dTTP,dCTP,dGTP)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Diethylpolycarbonat (DEPC)	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dithiothritol (DTT)	Invitrogen, Life Technologies, Karlsruhe
Dodecylsulfat . Na ⁺ -Salz (SDS)	SERVA, Heidelberg
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatrium · 2H ₂ O	SERVA, Heidelberg
Ficoll, Type 400	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Formaldehyd	Fluka Chemie, Buchs
Formamid	Fluka Chemie, Buchs
Glycerol	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Hexadecyltrimethylammoniumbromide (CTAB)	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim

Isoamylalkohol	Merck DgaA, Darmstadt
Isopropanol (2-Propanol)	Merck, Darmstadt
Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG)	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Lithiumchlorid	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl ₂ · 6H ₂ O	Merck, Darmstadt
MgSO ₄	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	SERVA, Heidelberg
Na ₃ Citrat · 2H ₂ O	United States Biological, USA
Natriumchlorid	Merck , Darmstadt
Oligo-dT	Invitrogen, Life Technologies, Karlsruhe
pAW109 RNA	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Polyvinylpyrrolidon (PVP-360; MW 360.000)	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Polyvinylpyrrolidon K 30	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Randomhexamere	Invitrogen, Life Technologies, Karlsruhe
Rinderserumalbumin,BSA (Fraktion V)	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Salmonsperm-DNA	Boehringer, Mannheim
Spermidine	SERVA, Heidelberg
Sulfosalicylsäure	Merck , Darmstadt
Trichloressigsäure	Merck , Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Triton X-100	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Tween 20	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Xylencyanol	Merck , Darmstadt

Radiochemikalien

α -[³² P]-dATP, Redivue	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
γ -[³³ P]-dATP, Redivue	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
α -[³³ P]-dATP, Redivue	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Molekularbiologische Handelsprodukte

GenomeStar™	Hybaid-AGS, Heidelberg
NucleoSpin®96 Flash	Macherey-Nagel, Düren
Omniscript™ RT Kit	Qiagen, Hilden
pGEM®-T Easy Vector System	Promega GmbH, Mannheim
Qiaprep® Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick™ Gel-Extraction-Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick™ PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Quantitect™ SYBR Green® PCR Kit	Qiagen, Hilden
Strip-EZ™ DNA	Ambion, Austin, UK
Strip-EZ™ RT	Ambion, Austin, UK
ULTRAhyb™	Ambion, Austin, UK

Enzyme und Enzyminhibitoren

DNaseI, RNase free (10 U/μl)	Boehringer, Mannheim
Lysozym (10 U/μl)	Merck, Darmstadt
RNase-Inhibitor RNasin (40 U/μl)	Invitrogen, Life Technologies, Karlsruhe
Superscript II (200 U/μl)	Invitrogen, Life Technologies, Karlsruhe
T4-Polynukleotidkinase (10 U/μl)	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Taq-Polymerase (5 U/μl)	Abigene, Heidelberg

Materialien

3 MM-Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
Hybond-N™+-Nylonmembran (Rolle)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hybond™-N+-Nylonmembran (15 mm x 73 mm)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hybridisierungsröhrchen (50 mm x 150 mm)	ThermoHybaid, Heidelberg

Imaging Plate BAS-IP 2340	FUJI Photo Film Co., LTD, Japan
MicroSpin Columns™ G-25	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
MicroSpin Columns™ S-400	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
MicroWell™ Platten (Polystyrol)	Nunc GmbH &Co KG, Wiesbaden
MultiScreen PCR®	Millipore, Eschborn
Nunclon™ OmniTray	Nunc GmbH &Co KG, Wiesbaden
Optical Wells, Optical Caps	Applied Biosystems, Foster, CA
Parafilm	American National Can, London, UK
PCR-Reaktionsgefäße (8er-Streifen, 96er-Platten)	Biozym, Hess, Oldendorf

Pflanzenanzucht

Tonhaltige Anzuchterde Floraton	Bayerische Gärtnerei-Genossenschaft, BZV Aschheim, München
Anzuchttöpfchen, Teku-Sechsergebinde	Pöppelmann GmbH & Co, Kunststoffwerk-Werkzeugbau, Löhne
Kalksand 0,1 – 0,4 mm	Vertrieb: Sekret Baustoffe, Taufkirchen Hersteller: Dorfner, Hirschau
Kristallquarzsand 0,6 -1,2 mm	Vertrieb: Sekret Baustoffe, Taufkirchen Hersteller: Dorfner, Hirschau

Plasmide

pBluescript	Ampicillinresistenz	Stratagene, LaJolla, USA
pGEM-T Easy	Ampicillinresistenz	Promega GmbH, Mannheim

Lösungen, Puffer und Medien

100x Denhardt-Lösung	2% (w/v) Ficoll (Type 400, Pharmacia) 2% (w/v) Polyvinylpyrrolidon (PVP-360, Sigma) 2% (w/v) BSA (Fraktion V, Sigma) autoklaviert und sterilfiltriert
10x MOPS	0,2 M MOPS 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA auf 1000 ml aufgefüll, pH 7 einstellt, autoklaviert

10x PCR-Puffer	(750 mM Tris/HCl (pH 9,0), 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1% TWEEN-20, 15 mM MgCl ₂)
10xTBE	0,89 M Tris 0,89 M Borsäure 200 mM EDTA
1xTE	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA
20x SSC	3 M NaCl 0,3 M Na ₃ Citrat · 2H ₂ O pH 7,0
DNA-Auftragspuffer 5x	0,1% Bromphenolblau (m/v) 0,1% Xylencyanol (m/v) 25% Saccharose (m/v) 0,25 M EDTA
Formamidgel	1,0% Agarose (w/v) in 60 °C abgekühlte Agarose: 1x MOPS 3% Formaldehyd (v/v) 5 µl/100 ml Gel Ethidiumbromid
Heringssperma-DNA	10 mg/ml autoklaviert
Hybridisierungslösung	5x SSC 5x Denhardt 0,5% SDS 100 µg/ml Heringssperma-DNA (vor jeder Hybridisierung frisch denaturiert hinzugegeben)
LB-Medium	2,5% (w/v) Miller's Luria Broth Base (Sigma) 60 µl 5 M NaOH/100 ml Medium
LB-Platten	1,25% (w/v) Bacto Agar (Difco Laboratories, Detroit, USA) 2,5% (w/v) Miller's Luria Broth Base (Sigma) 60 µl 5 M NaOH/100 ml Medium

RNA-Auftragepuffer 5x	7,5 ml deionisiertes Formamid 1,5 ml 10x MOPS 2,4 ml Formaldehyd 1,0 ml H ₂ O _{bidest.} 1,0 ml Glycerol 0,08 ml 10% Bromphenolblau
RNA-Extraktionspuffer (alle Lösungen in DEPC-H ₂ O _{bidest.} hergestellt)	2% CTAB 2% PVP-360 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) 2,0 M NaCl 0,5 g/l Spermidin (gemischt und autoklaviert) 2% β-Mercaptoethanol (kurz vor der Extraktion begeben)
SOC-Medium	2,0 g Trypton 0,5 g Hefeextrakt 1 ml 1 M NaCl auf 97 ml mit H ₂ O _{bidest.} aufgefüllt autoklaviert und abkühlen lassen: 0,25 ml 2 M Mg ²⁺ -Vorrat* 1 ml 2 M Glukose fertiges Medium mit 0,2 µm Filtereinheit sterilisiert pH Medium: 7,0 *: 2 M Mg ²⁺ -Vorrat: 20,33 g MgCl ₂ · 6H ₂ O; 24,65 g MgSO ₄ · 7H ₂ O; mit autoklaviertem H ₂ O _{bidest.} auf 100 ml aufgefüllt
SSTE-Puffer (alle Lösungen in DEPC-H ₂ O _{bidest.} hergestellt)	1,0 M NaCl 0,5% SDS 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA (pH 8,0)
STE-Puffer	25 mM Tris-HCl pH 8,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA
Tris-HCl/MgCl ₂ -Puffer	40 mM Tris-HCl (pH 7,5) 6 mM MgCl ₂

Analysesoftware und öffentlich zugängliche Datenbanken (vgl. Baxevanis, 2001)

ArrayVision5.1™	Interfocus, Mering
Sequence Detection System	Perkin Elmer, Langen
Vector NTI suite 6.0	InforMax, UK
Arabidopsis Information Resource (TAIR): http://www.arabidopsis.org/home.html	
GeneCluster und TreeView: http://rana.stanford.edu/software	
Haruspex expression database: https://euklid.mpimgolm.mpg.de	
MIPS <i>Arabidopsis thaliana</i> Datenbank: http://mips.gsf.de/proj/thal/	
National Center for Biotechnology Information: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	
TIGR <i>Arabidopsis thaliana</i> Datenbank: http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/	

2.1 UV-Strahlungssimulation

Für die polychromatischen Bestrahlungsexperimente wurde eine Küvette mit fünf verschiedenen WG-Kantenfiltern (WG295, WG305, WG320, WG335 und WG360) der Firma Schott in den Simulator integriert. Die Wärmeabfuhr in der Küvette erfolgte durch ein spezielles Umluftkühlsystem, um in den Bestrahlungsversuchen annähernd eine konstante Temperatur von 25 °C zu erzielen. Die Bodentemperatur wurde fortlaufend mit einer Temperatursonde in 5 cm Bodentiefe kontrolliert. Das Sonnenspektrum wurde durch eine geeignete Kombination an Lampen simuliert (Abbildung 2-1). Der Versuchsaufbau der Bestrahlungsexperimente und die dazugehörigen Spektren sind in Abbildung 2-2 und Abbildung 2-3 dargestellt. Die Qualität der Anpassung der spektralen Bestrahlungsstärke des Simulators an das Sonnenspektrum ist in Abbildung 2-4 dargestellt.

Die spektralen Bestrahlungsstärken des Simulators aus Tabelle 2-1 wurden mit einem Doppelmonochromator-System vor Beginn jedes Experiments gemessen. Die Wellenlängenauflösung und -schritte betragen 1 nm im UV Bereich und 2 nm im sichtbaren Bereich des Spektrums. Die Kalibrierungsdaten zur Bestimmung der

spektralen Empfindlichkeit des Detektors wurde von der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt erhalten. Während der Expositionszeit wurden PAR-, UV-A- und UV-B-Bestrahlungsstärke fortlaufend überwacht (Ibdah *et al.*, 2002).

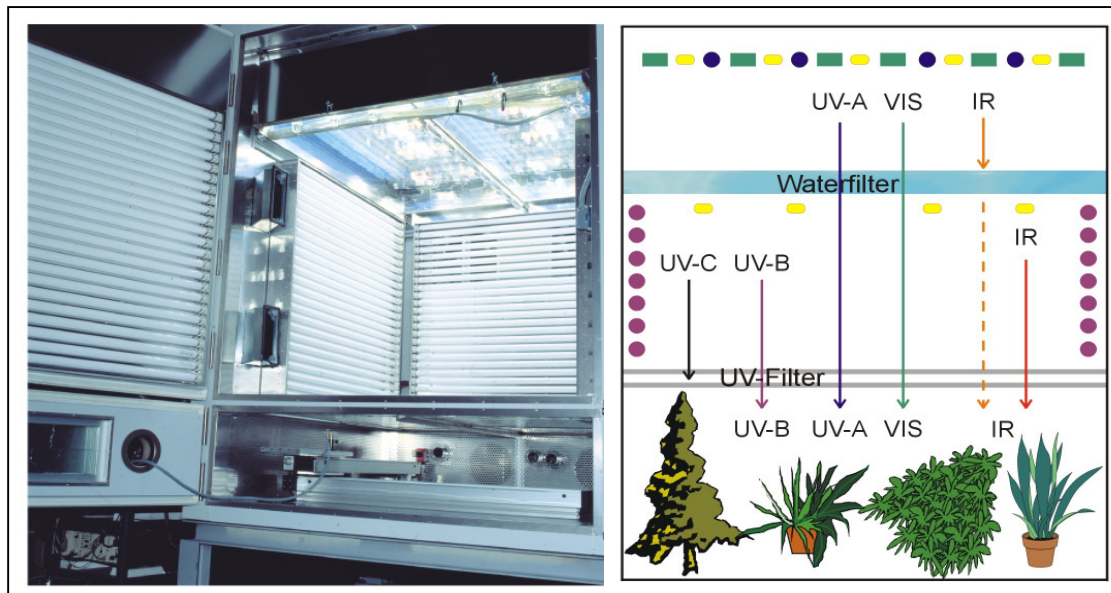


Abbildung 2-1

GSF-Sonnensimulator.

Das linke Photo zeigt den GSF-Sonnensimulator. Rechts ist schematisch dargestellt, mit welchen Lampen- und Strahlungsfilttern dort die einzelnen Spektralanteile des Sonnenspektrums möglichst realistisch nachgestellt wurden.

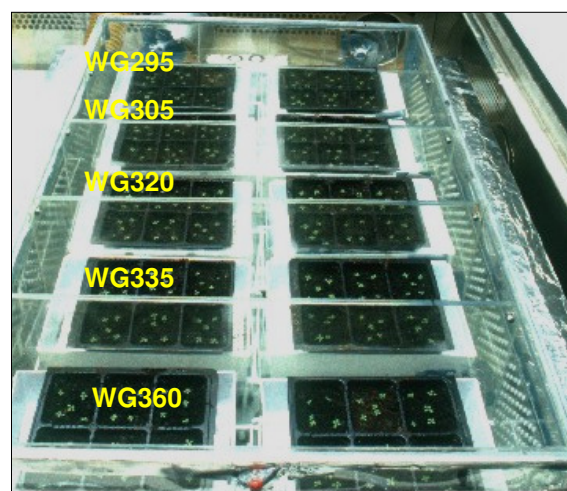


Abbildung 2-2

Polychromatisches Bestrahlungsexperiment mit *Arabidopsis thaliana*.

Zum oberen Schacht der Küvette hin (WG295) ist die Absorptionskante der Filter so gewählt worden, dass zunehmend UV-Strahlung aus dem kurzwelligen Bereich auf die Pflanzen traf. Die Abbildung zeigt Arabidopsis zu Beginn der Bestrahlungsperiode.

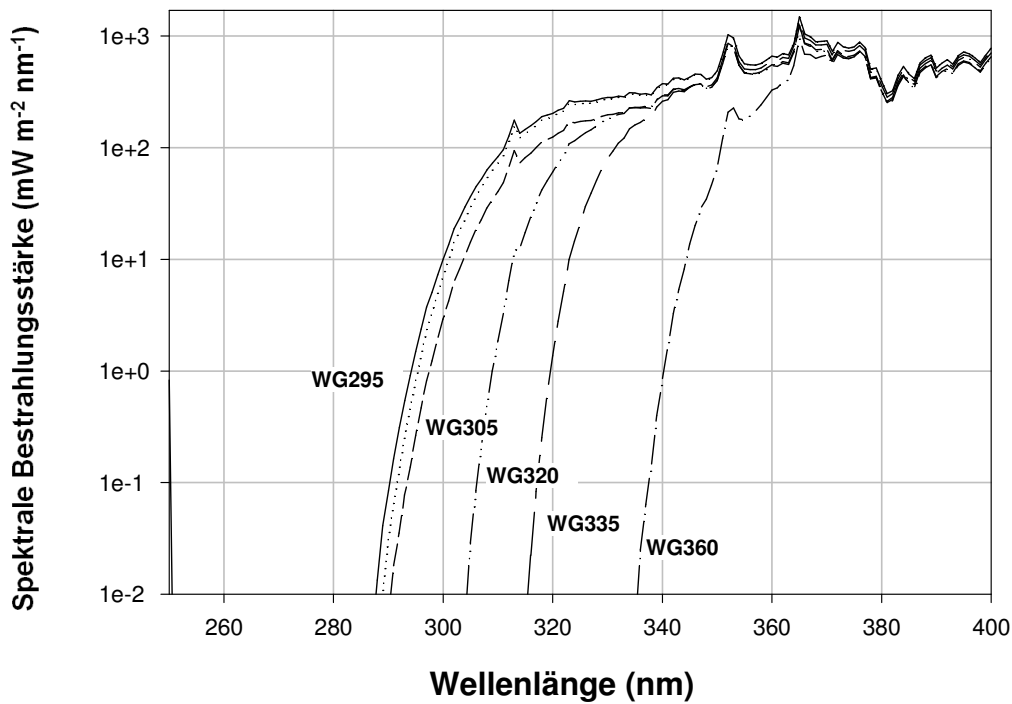


Abbildung 2-3

Bestrahlungsspektren für die polychromatischen Experimente.

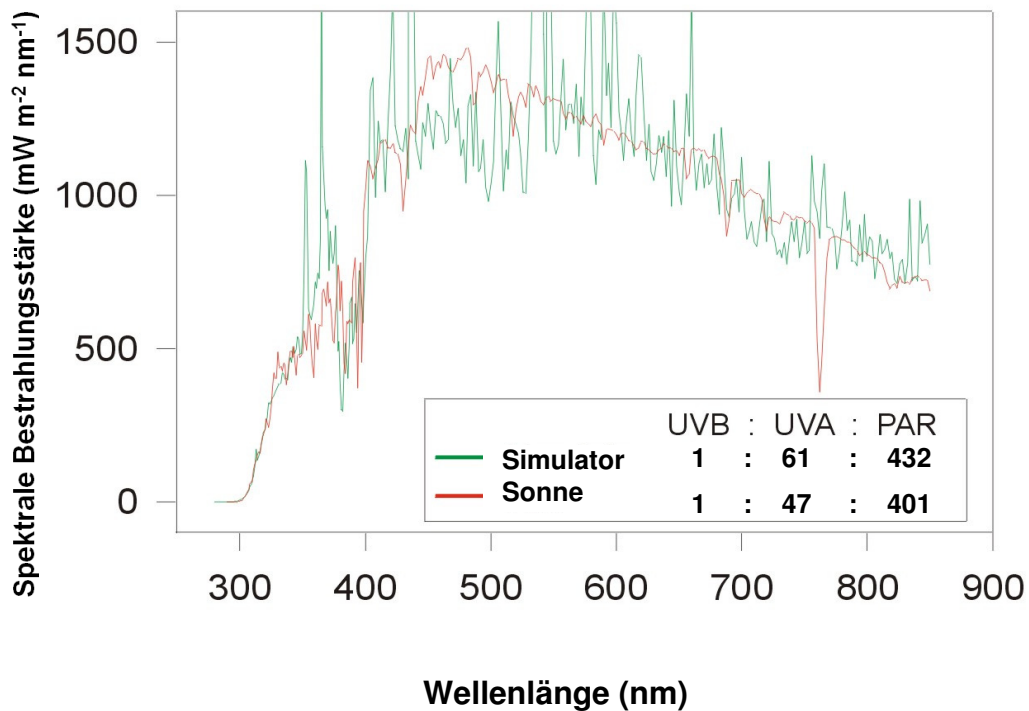


Abbildung 2-4

Vergleich der spektralen Bestrahlungsstärken von Sonne und Simulator.

Die Abbildung zeigt die Anpassung der spektralen Bestrahlungsstärken des Simulators an das Sonnenspektrum (Bereich: 300-900 nm). Die hohen Strahlungsintensitäten des solaren UV-A- und PAR-Spektrums sind nur durch einen hohen technischen Aufwand nachzustellen.

Tabelle 2-1

Polychromatische Bestrahlungsexperimente im Sonnensimulator K13.

Die Bestrahlungsbedingungen wurden vor Beginn jedes Versuches spektroradiometrisch bestimmt und daraus die charakteristischen Größen PPFD (Fluenz der photosynthetisch wirksamen Photonen - E_{PAR}) und UV-B_{BE}-Bestrahlungsstärke (Wichtung des Spektrums mit dem generalisierten Pflanzenwirkungsspektrum nach Caldwell (1971) und Normierung bei 300 nm - E_{PD}) abgeleitet.

Versuch	Szenario – PAR/UV	Filter	E_{PD}	E_{UV-B}	E_{UV-A}	E_{PAR}
			($mW m^{-2}$)	($W m^{-2}$)	($W m^{-2}$)	($\mu mol m^{-2} \cdot s^{-1}$)
V318	H/H	WG295	300	1,1	35	1400
	H/H	WG305	230	0,95	35	1440
	H/H	WG320	2,3	0,055	32	1490
	H/H	WG335	0	0	25	1340
	H/H	WG360	0	0	15	1260
V321	H/H	WG295	210	1	32	1320
	H/H	WG305	180	0,95	32	1350
	H/H	WG320	0	0,058	30	1330
	H/H	WG335	0	0	26	1260
	H/H	WG360	0	0	15	1120
V320	M/H	WG295	150	0,87	24	970
	M/H	WG305	120	0,75	24	990
	M/H	WG320	1	0,042	22	950
	M/H	WG335	0	0	19	920
	M/H	WG360	0	0	11	860
V323	M/H	WG295	200	0,97	24	790
	M/H	WG305	160	0,86	25	810
	M/H	WG320	0	0,058	22	790
	M/H	WG335	0	0	18	840
	M/H	WG360	0	0	11	680
V325	L/H	WG295	170	0,96	15	560
/V327*	L/H	WG305	130	0,83	15	580
	L/H	WG320	1	0,045	12	520
	L/H	WG335	0	0	11	540
	L/H	WG360	0	0	6	490
V322	H/L	WG295	33	0,17	27	1330
	H/L	WG305	26	0,15	24	1360
	H/L	WG320	0	0,011	27	1340
	H/L	WG335	0	0	24	1260
	H/L	WG360	0	0	15	1180
V324	H/L	WG295	17	0,091	19	1260
	H/L	WG305	14	0,085	19	1280
	H/L	WG320	0	0,006	20	1350
	H/L	WG335	0	0	16	1190
	H/L	WG360	0	0	11	1150

* Die Bestrahlungsstärken für die Wiederholungen V325 und V327 w urden nur einmal gemessen.

2.2 Pflanzenanzucht

Die Bestrahlungsversuche mit *Arabidopsis thaliana* wurden mit dem genetischen Hintergrund Columbia (Col 0) durchgeführt. Die Samen wurden von der Firma Lehle Seeds bezogen.

Das gesiebte Bodensubstrat wurde mit 1/16 Volumen Kiessand und dem gleichen Anteil an Quarzsand versetzt und gründlich gemischt. Die Erde wurde 12 h bei 130 °C autoklaviert. Der abgekühlte Boden wurde ca. 1 cm angedrückt und erneut eben mit Substrat gefüllt und dann nochmals verdichtet. Vor Aussaat wurde jedes Töpfchen mit 50 ml destilliertem Wasser angegossen.

Die Aussaat erfolgte mit Hilfe einer abgekühlten, 0,1%igen Agaroselösung, in der die Arabidopsis-Samen homogen verteilt worden sind. Die Samenzahl wurde so abgewogen (50000 Samen \approx 1 g), dass bei 300 μ l Volumen ca. drei Samen abgegeben wurden. Die Aussaatdichte betrug 5 x 300 μ l je Anzuchtöpfchen. Im Anschluss sind die Samen lichtdicht verschlossen worden, um sie für zwei Tage bei 4 °C vernalisieren zu lassen. Unter ambienten Lichtbedingungen (ca. 200 μ mol m⁻² s⁻¹) bei einer Temperatur von 22 °C keimten die Samen vier Tage an. Nachfolgend erfolgte im Sonnensimulator eine sechstägige Akklimatisierungsphase unter Ausschluss der Wellenlängen <400 nm und einem PAR-Hintergrund von ca. 200 μ mol m⁻² s⁻¹. Nach dem fünften Akklimatisierungstag wurde die Dichte auf fünf Pflanzen je Töpfchen reduziert. Ab dem siebten Tag im Sonnensimulator konnten die Pflanzen mit UV behandelt werden (Abbildung 2-2). Der Tag-/Nachtzyklus war auf 14/10 h eingestellt, wobei die tägliche UV-Periode 10 h betrug. Die Pflanzen wuchsen für zwei Wochen unter den definierten Bedingungen aus Tabelle 2-1. Die Ernte begann bei allen Versuchen um 14⁰⁰ Uhr. Es wurde ausschließlich die Blattrosette geerntet, Wurzeln und eventuelle Infloreszenzen sind entfernt worden. Das geerntete Pflanzenmaterial wurde unter flüssigem Stickstoff dismembriert und bei -80 °C aufbewahrt.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 DNA-Arrays

Mit der DNA-Array-Technik kann die Expression von mehreren hundert Genen parallel erfasst werden. Neue, miniaturisierte Techniken erlauben sogar die genomweite Analyse von bis zu 20000 Transkripten. In den letzten Jahren haben sich zahlreiche verschiedene Methoden auf diesem Gebiet entwickelt. Das Prinzip ist aber bei allen Verfahren das gleiche (Eisen & Brown, 1999). Die Gensequenzen werden auf eine Matrix gebracht, die aus Glas oder Nylon besteht. Sie werden mit Hilfe von Robotern an eine definierte Position gebracht. Durch anschließende Hybridisierung von markierten Transkripten von unterschiedlichen Behandlungen können Expressionsunterschiede mit Hilfe von Bildverarbeitungsprogrammen gemessen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bekannte Stressgene aus *Arabidopsis thaliana* ausgewählt. Insgesamt wurde eine Kollektion von 579 Genen zusammengestellt. Diese umfasste Gene aus dem Sekundärmetabolismus, des antioxidativen Stoffwechsels, der Photosynthese, Transportproteine, die Genfamilie der Glutathion S-Transferasen, zellregulatorische Sequenzen. Sequenzen aus Multigenfamilien (z. B. Transportproteine, Glukosyltransferasen, CYT P450 Monooxygenasen, Glutathion S-Transferasen) sind in *Arabidopsis thaliana* z. T. sehr homolog. Würde die kodierende, homologe Region eines Gens auf die Matrix aufgetragen, hätte das zur Folge, dass Hybridisierungssignale zwischen diesen Genen nicht mehr zuzuordnen wären. An Expressionsstudien mit CYT P450 Monooxygenasen ist gezeigt worden, dass zwischen zwei Genen ab einer Homologie von 85% Kreuzhybridisierung stattfindet (Xu *et al.*, 2001). Da die Ähnlichkeit zweier Gene bis 99% betragen kann, wurden Sequenzen aus dem heterologen 3'-UTR-Bereich gewonnen (Abbildung 2-5). Die resultierenden DNA-Fragmente wurden mit einem FASTA Blast gegen das Genom von *Arabidopsis* verglichen, um die Spezifität der Probe zu überprüfen (Baxevanis, 2001; Nielsen & Knudsen, 2002).

2.3.1.1 PCR-Amplifikation der Array-Proben (,Targets')

Die Plasmide der ESTs wurden laut Herstellerangaben mit dem NucleoSpin[®] 96 Flash der Firma Machery-Nagel isoliert. Die gereinigten Plasmide wurden in Mikrotiterplatten überführt und in einer neuen Platte mit H₂O_{bidest.} 1:50 verdünnt. Mit der Ver-

Verdünnungsstufe wurden je EST zwei 100 µl PCRs angesetzt. Als Primer wurden M13forward (5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3') und M13reverse (5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3') verwendet. Eine Reaktion bestand aus 10 µl 10x PCR-Puffer, 2 µl 10 mM dNTPs, 3 µl 10 µM M13forward, 3 µl 10 µM M13reverse, 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl), 3 µl Plasmid-DNA (20-50 ng/µl) und 78,5 µl H₂O_{bide}st. Die Reaktion wurde mit 96er PCR-Platten durchgeführt. Das PCR-Programm begann mit einem Denaturierungsschritt bei 95 °C für 5:30 min. Im Anschluss folgten 40 Zyklen mit 95 °C für 1 min, 52 °C für 45 sec und 72 °C für 2 min. Zum Abschluss des PCR-Programms wurden zusätzlich 72 °C für 7 min eingestellt.

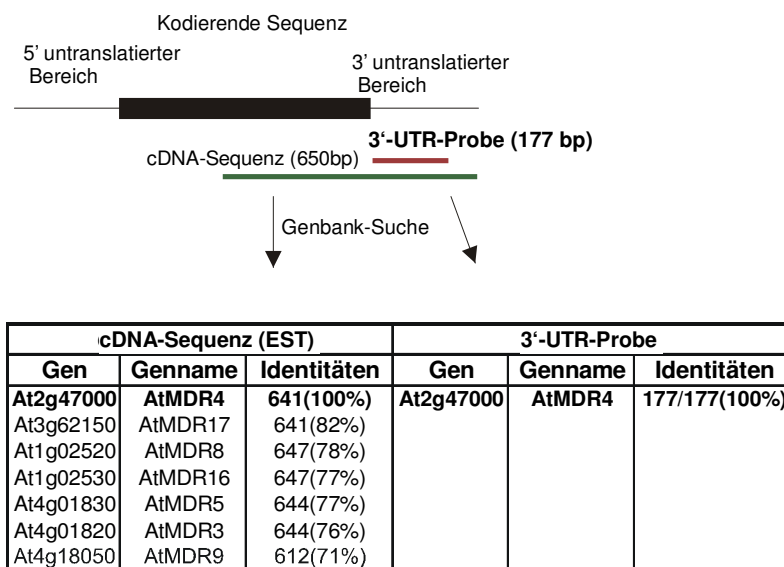


Abbildung 2-5

Erhöhung der Hybridisierungsspezifität durch 3'-UTR-Proben.

Schwarz: Kodierende Sequenz des Gens; rot: Heterologe 3'-UTR-Probe; grün: Sequenzbereich einer analogen cDNA (aus Glombitza, 2002). Die Tabelle zeigt, dass die 3'-UTR-Sequenz von *AtMDR4* keinen homologen DNA-Abschnitt im Genom von Arabidopsis aufweist, während die analoge cDNA starke Homologien zu anderen Genen zeigt und dadurch Kreuzhybridisierung zwischen diesen Genen stattfinden kann.

Die 3'-UTR-Proben wurden zunächst mit den Primern M13forward und M13reverse amplifiziert. Die Produkte wurden nach einer gelelektrophoretischen Kontrolle 1:100 verdünnt. Aus dieser wurden im Anschluss 3 µl (2-5 ng) für eine ‚nested‘-PCR mit 100 µl Reaktionsvolumen eingesetzt. Die PCR konnte mit den Reaktionsbedingungen der ESTs durchgeführt werden. Als Primer wurden T7 (5'-TAA TAC GAC

TCA CTA TAG GG-3') und SP6 (5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG-3') eingesetzt. Die Oligonukleotid-Konzentration betrug 0,3 μM . Die beiden 100 μl Reaktionen wurden im Anschluss laut Herstellerangaben mit Millipore MultiScreen PCR[®] aufgereinigt, in 55 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ aufgenommen und dann in Nunclon[™] OmniTray transferiert. Die Konzentration der gereinigten PCR-Produkte lag in einem Bereich zwischen 200-350 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Ein Aliquot von 2 μl wurde auf einem 1,5%igen Agarosegel kontrolliert.

Mit dem Microgrid II-Roboter wurden die PCR-Produkte auf Membranen übertragen (Hybond[™]-N⁺, 15 mm x 73 mm). Dazu wurde ein Stempel mit 400 μm Nadeldurchmesser verwendet. Dieser ‚spotete‘ je Übertragung ca. 20 nl Flüssigkeit. Jedes PCR-Produkt wurde zehnmal gestempelt, was einer Flüssigkeitsmenge von 200 nl und einer DNA-Menge von 40-70 ng/Spot entsprach. Das ‚Spotting‘-Muster ist in der Abbildung 2-8 zu sehen.

2.3.1.2 T7-Referenzhybridisierung

Die beladenen Membranen wurden durch ‚UV-cross-linking‘ (120 mJ) fixiert. Im Anschluss wurden sie je fünf Minuten in 0,4 M NaOH, 0,5 M Tris/ 1,5 M NaCl (pH 7,5) und 2x SSC gegeben. Fünf Membranen wurden mit 50 ml frisch hergestellter Hybridisierungslösung in eine Schale gegeben. Die Prähybridisierungszeit betrug 4 h. Die Prähybridisierungstemperatur war in einem Wasserbad unter leichtem Schütteln auf 37 °C einzustellen. Das Oligonukleotid (T7: 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') konnte mit einer T4-Polynukleotidkinase (MBI Fermentas) am 5'-Ende radioaktiv markiert werden. Für eine Membran wurde ein Reaktionsansatz mit 0,5 μl Enzym (10 $\text{U}/\mu\text{l}$), 1,25 μl 10 μM T7-Oligonukleotid, 0,625 μl 10x Puffer (‚for forward reaction‘), 1 μl γ -[³³P]-ATP (2500 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ = 40 μCi) und 9,125 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ berechnet. Die Reaktion wurde bei 37 °C für 30 min durchgeführt. Um die radioaktiv markierten Oligonukleotide von nicht gebundenen Isotopen zu trennen, wurde der Reaktionsansatz auf eine MicroSpin[™]Column G-25 gegeben (Amersham). Die Präparation und Zentrifugationszeiten der Säule waren dabei den Herstellerangaben zu entnehmen. Ein Aliquot von 1 μl wurde im Szintillationszähler gemessen. Die Aktivität der Sonde lag in einem Bereich von 250000-300000 $\text{cpm}/\mu\text{l}$. Der Reaktionsansatz wurde in die Schale zu den Membranen pipettiert, um bei 37 °C für 16 h bei leichtem Schütteln zu hybridisieren. Um die nicht gebundenen Oligonukleotide zu entfernen, wurden die Filter nach der Hybridisierung mit folgenden Lösungen gewaschen:

2x SSC; 0,1% SDS kurz geschwenkt und wieder abgekippt

20 min bei Raumtemperatur mit 2x SSC; 0,1% SDS

0,2x SSC; 0,1% SDS kurz inkubiert

20 min bei Raumtemperatur mit 0,2x SSC; 0,1% SDS

20 min bei 37 °C mit 0,2x SSC; 0,1% SDS

Um das Austrocknen der Membranen während der Entwicklungszeit zu vermeiden, wurden sie auf ein mit 2x SSC-Puffer getränktes 3 MM-Papier gelegt und im Anschluss mit einer dünnen Haushaltsfolie luftblasenfrei überzogen. Auf diese wurde ein ‚ImageScreen‘ (Fuji) gelegt und für 15 h in einer Hybridisierungskassette exponiert. Die ‚Image‘-Platten wurden mit dem Scanner Fuji FLA3000 mit einer Auflösung von 50 µm eingelesen. Die gebundenen Sonden wurden bei 68 °C für 30 min von der Membran entfernt. Als Lösung wurde Strip-EZ™ RT-Kit verwendet (siehe Herstellerangaben). Um die vollständige Entfernung der Sonden zu kontrollieren, wurden die Membranen erneut mit einem ‚Image-Screen‘ für 15 h exponiert. Waren die Filter frei von radioaktiven Signalen, konnten sie mit cDNA hybridisiert werden.

2.3.1.3 cDNA-Hybridisierung

Für die Hybridisierung wird die mRNA mittels des viralen Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA übersetzt und dabei radioaktiv markiertes Adenosintriphosphat (α -[³³P]-dATP) eingebaut. Die markierte cDNA wird dann in einer Hybridisierung eingesetzt. Die Markierung der cDNA erfolgte mit untenstehenden Reaktionsansatz, der höhere RNA-Mengen enthielt, als dies vom Hersteller empfohlen wurde (vgl. Handbuch Strip-EZ™ RT, Ambion und Johannes *et al.*, 1999). Die Prähybridisierung der Membranen erfolgte bei 68 °C für 4 h.

11 µl total RNA (10 µg)

2 µl Oligo dT-Primer

13 µl Gesamtvolumen (in DEPC-H₂O_{bidest.})

5 min bei 65 °C, 2-3 min auf Eis .

2 µl 10 x RT-Puffer

2 µl dNTPs

1 µl MuLV-Reverse Transkriptase (200 U/µl)

Zuletzt wurden 4 μl α -[^{33}P]-dATP ($>2500 \mu\text{Ci}/\text{mmol} = 40 \mu\text{Ci}$, Amersham Pharmacia) dazupipettiert. Die cDNA-Synthese fand bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$ für 1 h 30 min im Thermoblock statt. Die cDNA-Probe wurde vor der Säulentrennung mit 1 μl 0,5 M EDTA pH 8,0 und 77 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ auf 100 μl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Säulenzentrifugationsschritte wurden laut Handbuch von MicroSpinTM Columns G-400 (Amersham) durchgeführt. Die Messung eines Aliquots ergab eine Aktivität im Bereich von 250000-350000 cpm/ μl . Die gereinigte Probe wurde bei $100 \text{ }^\circ\text{C}$ für 2 min im Thermoblock denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die cDNA wurde zu den vorhybridisierten Membranen gegeben. Die Hybridisierungszeit betrug ca. 20 h bei $68 \text{ }^\circ\text{C}$. Vor Beginn der Waschschrte wurden die Lösungen in einem Wasserbad auf $68 \text{ }^\circ\text{C}$ vorgewärmt. Das Waschen erfolgte in den Hybridisierungsröhrchen in einem Drehofen mit folgenden Lösungen:

2x SSC; 0,1% SDS kurz vorgespült

30 min mit 2x SSC; 0,1% SDS bei $68 \text{ }^\circ\text{C}$

30 min mit 0,2x SSC; 0,1% SDS bei $68 \text{ }^\circ\text{C}$

Die Membranen wurden, wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben, exponiert und digitalisiert. Das Strippen der cDNA von den Membranen erfolgte gemäß den Beschreibungen von Strip-EZTM RT (Amersham). Zur Überprüfung der vollständigen Entfernung von Signalen wurden die Membranen nochmals exponiert.

2.3.2 DNA- und RNA-Techniken

2.3.2.1 Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA wurde laut Herstellerangaben mit GenomeStar™ der Firma Hybaid extrahiert. Ausgangsmaterial war homogenisiertes, -80 °C gekühltes Pflanzenmaterial. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

2.3.2.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung von PCR-Produkten wurde mit Hilfe des QIAquick™ PCR purification Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Die Reinigung der DNA erfolgt bei diesem System durch die Bindung an das Säulenmaterial unter hohen Salzkonzentrationen und einem pH-Wert <7,5. Die Konzentrationsbestimmung der PCR-Produkte, die mit 30 µl H₂O_{bidest.} eluiert wurden, erfolgte gelelektrophoretisch durch Vergleich mit einem DNA-Längenstandard. Um PCR-Banden aus einem Agarosegel zu reinigen, wurde der QIAquick™ Gel-Extraction-Kit der Firma Quiagen verwendet (siehe Herstellerangaben).

2.3.2.3 Vektorligation des PCR-Produkts

Bei einer Standardligation wurde ein molares Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:1 eingesetzt. Die einzusetzende Menge an PCR-Produkt ließ sich mit $PCR (ng) = \frac{Vektor(ng) * PRC-Produkt (bp)}{Vektor (bp)}$ berechnen. Der Reaktionsansatz wurde laut Herstellerangaben von Promega hergestellt (pGEM®-T Vector System I).

2.3.2.4 Transformation rekombinanter Plasmide

Der rekombinante Vektor wurde gemäß den Herstellerangaben von Promega transformiert (Bakterienstamm JM109). Der Ansatz wurde ohne Antibiotika mit 900 µl SOC-Medium versetzt und für 90 min bei 37 °C und 240 Upm in Schüttelkultur gegeben. Im Anschluss wurden davon 300 µl entnommen und auf eine LB-Platte gleichmäßig ausgestrichen. Diese enthielt für die Insertionskontrolle 50 µg/ml Ampicillin, IPTG (0,5 mM) und X-Gal (32 mg/l). Die Bakterien wuchsen im Brutschrank bei 37 °C für 16 h. Der Transformationserfolg konnte an der Färbung der Kolonien erkannt werden. War das PCR-Produkt stabil in den Vektor eingebaut, blieben die Bakterienkolonien weiß, da die codierende Sequenz des Enzyms β-Galaktosidase durch das eingebrachte DNA-Fragment unterbrochen wurde. Kolonien, die nur Plasmid-DNA

aufgenommen hatten, wuchsen zwar auf Antibiotika, waren aber durch ihre blaue Färbung zu erkennen. Diese resultierte aus der Spaltung des halogenierten Disaccharides X-Gal, was durch ein funktionstüchtiges β -Galaktosidase-Gen bewirkt wird. Weiße Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in 5 ml LB-Medium gegeben. Die Kulturen wuchsen für 16 h im Schüttelinkubator bei 240 Upm und 37 °C. Zusätzlich wurde die Integration des DNA-Fragmentes mit einer PCR getestet. Diese wurde innerhalb der Vektorsequenz mit den Primerpaaren 5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3' (M13forward) und 5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3' (M13reverse) durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 25 μ l, bestehend aus 2,5 μ l 10x PCR-Puffer (15 mM MgCl₂), 0,5 μ l 10 mM dNTPs, 0,75 μ l 10 μ M M13forward, 0,75 μ l 10 μ M M13reverse, 0,5 μ l Taq-Polymerase (AGSGold 5 U/ μ l) und 19 μ l H₂O_{bidest.}. Zum Reaktionsansatz wurde 1 μ l der Bakterienkultur gegeben. Das PCR-Programm begann mit einem Vorabdenaturierungsschritt von 95 °C für 5 min und 30 sec. Im Anschluss folgten 40 Zyklen mit 95 °C für 1min, 52 °C für 45 sec und 72 °C für 2 min. Zum Abschluss der PCR wurden zusätzlich 72 °C für 7 min eingestellt. Ein Aliquot des Reaktionsansatzes wurde zusammen mit einem DNA-Längenstandard, der die entsprechenden DNA-Fragmentgrößen des zu erwartenden PCR-Produkts enthielt, auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Nach einer Auftrennungszeit von 1,5 h konnte die zu erwartende Fragmentlänge überprüft werden.

2.3.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Das notwendige Bakteriensediment wurde aus einem beimpften 5 ml LB-Medium (Ampicillin 50 μ g/ml) gewonnen, das für 16 h bei 240 Upm und 37 °C inkubiert wurde. Davon wurde ein 2 ml Reaktionsgefäß aufgefüllt und bei 14.000 Upm für 15 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen.

Die Isolierung des Plasmids wurde mit Hilfe des QIAprep[®] Miniprep Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Die DNA wurde von der Säule mit 30 μ l H₂O_{bidest.} eluiert. Die DNA-Konzentration im Eluat wurde photometrisch bestimmt.

2.3.2.6 Gelelektrophorese

Die größenabhängige Separation von Makromolekülen durch Gelelektrophorese basiert auf der elektrokinetischen Eigenschaft, dass ein geladener Partikel durch elektrostatische Kräfte in Bewegung gesetzt wird. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Molekular-

gewichte. Zusätzlich hängt das Wanderungsverhalten von der Dichte der Gelmatrix ab, weswegen die Agarosekonzentration an die Fragmentgröße des aufzutrennenden DNA-Fragmentes angepasst wurde und zwischen 1% und 2% (w/v) variierte. Die Agarose wurde in 1x TBE-Puffer aufgekocht. Im Anschluss wurden 5 µl Ethidiumbromid/100 ml Agarose hinzugegeben. Durch leichtes Schwenken des Kolbens wurde das Ethidiumbromid homogen verteilt. Der Farbstoff interkaliert zwischen den gestapelten Basenpaaren der Nukleinsäuren und die Banden konnten durch Anregung mit UV-Licht (320 nm) im Gel sichtbar gemacht werden.

Die Agaroselösung wurde bei der Temperatur von ca. 60 °C in einen mit Kämmen versehenen Gelträger gegossen und man ließ die Agarose bei Raumtemperatur für 45 min aushärten. Die Proben wurden jeweils mit 1/5 Volumen Auftragspuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1x TBE-Puffer. Zur Größenbestimmung der DNA-Banden wurde als Referenz ein DNA-Größenstandard mitgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Feldstärke von 5-10 V/cm.

2.3.2.7 Restriktionsverdau (Arber & Leim, 1969)

Der Restriktionsverdau wurde so angesetzt, dass das Volumen der einzusetzenden Enzymlösung 1/10 des Gesamtvolumens nicht überschritt, um dadurch eine Inhibition durch das im Lagerpuffer der Enzyme befindliche Glycerin zu vermeiden. Pro 1 µg zu spaltender DNA wurden 3 bis 5 U Enzym eingesetzt. Die optimale Temperatur für die Reaktion war den Herstellerangaben zu entnehmen.

2.3.2.8 Enzymatische DNA-Sequenzierung

Die enzymatische DNA-Sequenziermethode beruhte auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977). DNA-Sequenzierungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden an die Firma MWG in Auftrag gegeben.

2.3.2.9 PCR aus genomischer DNA (Mullis & Faloona, 1987)

Genomische Array-Proben wurden mit genspezifischen Primern gewonnen. Das Reaktionsvolumen betrug dazu 50 µl, bestehend aus 5 µl 10x PCR-Puffer (15 mM MgCl₂), 1 µl 10 mM dNTPs, 1,5 µl 10 µM Primer (a), 1,5 µl 10 µM Primer (b), 1 µl Taq-Polymerase (5 U/µl), 5 µl DNA (200 ng/µl) und 35 µl H₂O_{bidest.}. Das PCR-Programm enthielt einen Vorabdenaturierungsschritt von 95 °C für 5 min und 30 sec. Im Anschluss folgten 40 Zyklen mit 95°C für 1min, („Annealing“-Temperatur für Pri-

mer (a) und (b): 52-58 °C) für 45 sec und 72 °C für 2 min. Zum Abschluss des PCR-Programms wurden zusätzlich 72 °C für 7 min programmiert.

Die Größe des PCR-Produkts wurde mittels eines DNA-Standards in einer Agarosegel-Elektrophorese ermittelt. Damit die genomisch gewonnenen DNA-Fragmente in einer gemeinsamen PCR mit den ESTs amplifiziert werden konnten, wurden sie im Anschluss gemäß den Kapiteln 2.2.2.2 - 2.2.2.4 in den Vektor pGEM[®]-T ligiert und in den Bakterienstamm JM109 transformiert.

RNA-Gewinnung für Hybridisierung der DNA-Arrays

Aus 150 mg dismembriertem Pflanzenmaterial wurde gemäß Chang *et al.* (1993) Gesamt-RNA extrahiert. Die Konzentration (ng/μl) wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch bestimmt. Parallel dazu wurde zur Reinheitskontrolle der RNA das Verhältnis 260 nm/280 nm bestimmt, das in einem Bereich von 1,8-2,1 lag. Um die Integrität der Probe zu überprüfen, wurde die RNA auf einem 1,5%igem Agarosegel (in 1x TBE-Puffer) bei 80 V für 1,5 h elektrophoretisch getrennt.

RNA-Gewinnung für quantitative RT-PCRs

Für die RNA zur quantitativen RT-PCR musste das Protokoll von Chang *et al.* (1993) an der Stelle abgeändert werden, an der mit LiCl gefällt wurde, da Li⁺-Kationen die Taq-Polymerase inhibieren. Aus diesem Grund wurde dort mit einem Volumen (750 μl) Isopropanol bei -20 °C für 2 h gefällt. Nach einer Zentrifugation bei 4 °C mit 14000 Upm für 20 min konnte die RNA pelletiert werden. Nach dem Waschschrift in 75%igem Ethanol (v/w) wurde der Überstand abgenommen und die RNA in 750 μl Tris-HCl/MgCl₂-Puffer gelöst. In diesem Puffer wurde kontaminierende DNA durch Zugabe von 20 U DNaseI bei 37 °C für 30 min verdaut. Durch Zugabe eines Volumens Chloroform/Phenol/Isoamylalkohol wurde das Enzym durch zentrifugieren mit 14000 Upm bei 4 °C für 20 min in die Phenolphase gebracht. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Er wurde nochmals mit einem Volumen Isopropanol vermischt, für 2 h bei -20 °C gelagert und im Anschluss mit 14000 Upm bei 4 °C für 20 min gefällt. Der Überstand wurde abgezogen und das Pellet in 75%igem Ethanol (v/w) gewaschen und luftgetrocknet. Das Pellet wurde in 35 μl DEPC-H₂O_{bidest.} aufgenommen und die Konzentration photometrisch auf 300 ng/μl Gesamt-RNA eingestellt.

2.3.2.10 Quantitative ‚Real-Time-PCR‘

Die quantitative RT-PCR basiert auf den Eigenschaften des kinetischen Verlaufs der DNA-Synthese mittels der Taq-Polymerase, der sich in drei Bereiche unterteilen lässt:

1. Exponentielle Phase der Amplifikation
2. Limitierende Phase der Amplifikation
3. Plateauphase der Reaktion

Bei der PCR wird ein definiertes Stück cDNA, das durch zwei Primer begrenzt ist, in immer wieder aufeinander folgenden Reaktionen *in vitro* vermehrt. Durch geeignete Fluoreszenzfarbstoffe kann der Verlauf der Kinetik mit Hilfe eines Detektors aufgezeichnet werden. Nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz kann der Zyklus bestimmt werden, bis zu dem die linearen Bedingungen einer exponentiellen Wachstumskurve gültig sind. Im idealisierten Fall synthetisiert das Enzym in diesem Bereich den cDNA-Strang nach der Formel:

Anzahl der cDNA-Stränge nach n Zyklen = 2^n

Die etablierte RT-PCR bestimmte nicht die Molekülzahl eines Transkripts, sondern es wurde durch einen Abgleich mit einer zellulären, endogenen Kontrolle das Expressionsniveau des Zielgens zu einer UV-B-freien Variante verglichen. Als endogene Kontrolle wurde die ribosomale Untereinheit *18S* gewählt (Goidin *et al.*, 2001).

Von beiden Genen wurde der CT-Wert bestimmt. Dies war die Zykluszahl, bis zu der die linearen Verhältnisse des exponentiellen Wachstums galten. Nur in diesem Bereich war eine zuverlässige, quantitative Aussage möglich (Abbildung 2-6).

In einer externen Reaktion mit definierten cDNA-Verdünnungsreihen wurden von der endogenen Kontrolle und vom Zielgen die PCR-Effizienzen bestimmt. Diese waren in erster Linie von der verwendeten Primerkombination abhängig und schwankten zwischen 1,6 - 2,0. Die Effizienzen wurden bei jeder PCR bestimmt (Abbildung 2-7). Die Berechnung der relativen Veränderung eines Zielgens im Vergleich zur *18S* rRNA erfolgte nach der Formel (Pfaffl, 2001):

$$\text{rel. Expression (Zielgen)} = \frac{\text{Zielgen}_{\text{eff.}} \cdot \left(\text{CT}_{\text{K(Zielgen)}} - \text{CT}_{\text{B(Zielgen)}} \right)}{18\text{s}_{\text{eff.}} \cdot \left(\text{CT}_{\text{K(18S)}} - \text{CT}_{\text{B(18S)}} \right)}$$

K: Kontrolle

B: Behandlung

Für die Parameter CT_{K} (Kontrolle für Zielgen und 18S rRNA) wurde der CT-Mittel von WG295-360 herangezogen.

Die cDNA-Synthese für die anschließende RT-PCR erfolgte leicht abgeändert zu den Herstellerangaben von Omniscript™ RT Kit (Quiagen). Für einen zweifachen Markierungsansatz wurden 10 µl Gesamt-RNA (300 ng/µl) verwendet. Ein Reaktionsansatz bestand demnach aus 4 µl 10x RT-Puffer, 4 µl 5 mM dNTPs, 2 µl 50 µM Randomhexamer, 2 µl Reverse Transkriptase (4 U/µl), 2 µl RNase Out Inhibitor (10 U/µl) und 16 µl DEPC-H₂O_{bidest.}. 10 µl Gesamt-RNA (3 µg) wurden bei 65 °C für 3 min denaturiert. Die Proben wurden danach auf Eis gestellt und mit dem Reaktionsansatz auf 30 µl Volumen aufgefüllt. Für das Anlagern der Hexamere an die RNA inkorporierte die Reaktion für 10 min bei 25 °C. Nach der Anlagerungszeit wurde die Temperatur für 1 h auf 37 °C erhöht. Neben den eigentlichen Proben wurde eine sog. NTC-Probe hergestellt („None Template Control“), die einen RNA-Mix aller Probanden enthielt. Zu dieser (10 µl) wurden, bis auf die Reversen Transkriptase, alle Reaktionskomponenten pipettiert. Die NTC-Probe diente bei allen RT-PCRs als Negativkontrolle zur Überprüfung etwaiger DNA-Verunreinigungen. Zudem konnte mit der Probe festgestellt werden, ob die PCR-Primerpaarungen unspezifische Produkte bildeten. Für die PCR-Reaktion wurde der Quantitect™ SYBR Green® PCR Kit der Firma Quiagen verwendet. Dieses System arbeitet mit einem Farbstoff, der sich in doppelsträngige DNA einlagert. Durch einen Laserstrahl kann die Fluoreszenz dieses Farbstoffs bei 540 nm induziert werden.

Die Primeroptimierung war für jedes Gen in einem Vorlauf am TaqMan durchzuführen. Die PCR wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und es wurde überprüft, ob das Produkt aus einer diskreten Bande bestand. Hierbei war besonders darauf zu achten, ob eine Primerkombination eine sog. Dimerenfluoreszenz hervorrief. Diese entsteht durch das gegenseitige Anlagern beider Primer und führen zu einem Fehlsignal, da auch hier der Inkorporationsfarbstoff eine Fluoreszenz induziert. Die Primer wurden so gewählt, dass das Amplifikat eine Länge von 200-300 bp hatte. Die Anlagerungs-

temperatur war so einzustellen, dass sie zwischen 58 °C und 62 °C lag. Die Primer hatten eine Länge zwischen 19-25 Nukleotiden.

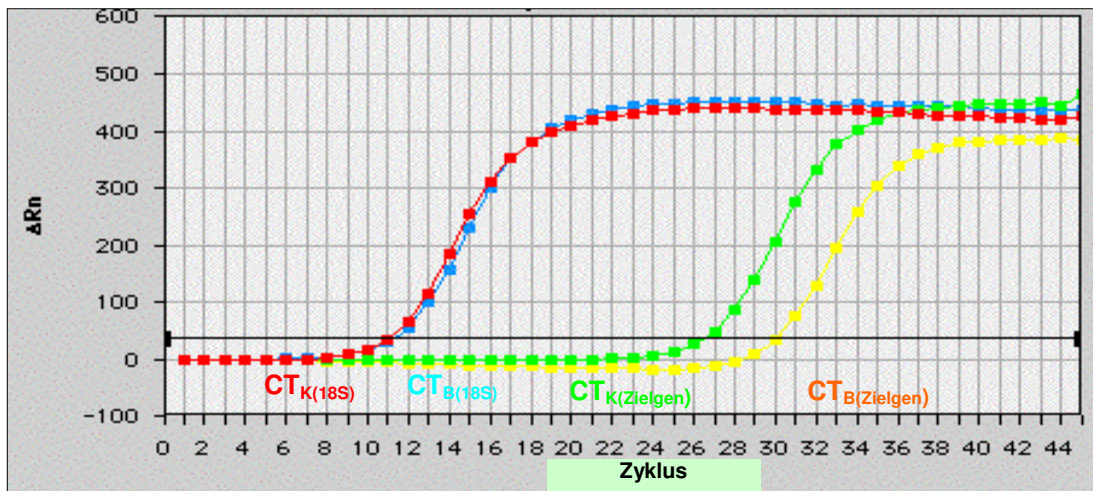


Abbildung 2-6

Relative Expressionsveränderung eines Gens.

In der quantitativen PCR wurde der Zyklus bestimmt, bis zu dem die linearen Bedingungen der exponentiellen Amplifikation ihre Gültigkeit hatten. Durch Abgleich einer zellulären, endogenen Kontrolle erfolgte ein Ausgleich unterschiedlicher Gesamt-RNA-Mengen und verschiedener Effizienzen in der cDNA-Synthese. Sind die endogenen Kontrollen, wie die rote und blaue Kurve in der Abbildung zeigt, in ihrem CT-Wert annähernd gleich, bedeuteten vier Zyklen Unterschied von behandelter und unbehandelter Probe (grüne und gelbe Kurve) eine Erhöhung der Transkription des untersuchten Gens um den Faktor 16 (2^4).

Ein Reaktionsansatz bestand aus 10x Quantitect-Puffer, 0,75 µl 10 µM Primer (a), 0,75 µl 10 µM Primer (b) und H₂O_{bidest.} Das Gesamtvolumen einer Reaktion betrug 25 µl. Das einzusetzende Volumen an cDNA des Zielgens war aus dem Vorlauf zu bestimmen. Es war so zu wählen, dass die CT-Werte in einem Bereich von 20-30 lagen. Für die 18S rRNA wurde 1 µl cDNA in einer Reaktion eingesetzt. Das PCR-Programm am TaqMan begann für 15 min mit einem 95 °C Aktivierungsschritt („Hotstart-Polymerase“). Im Anschluss folgten 45 Zyklen mit 94 °C für 15 sec, 58-62 °C (von der Primerpaarung abhängig) für 30 sec und 72 °C für 30 sec.

Das Maximum an doppelsträngiger DNA ist nach dem Polymerisationsschritt vorhanden. Deshalb wurde die Fluoreszenz nach diesem Schritt gemessen (72 °C).

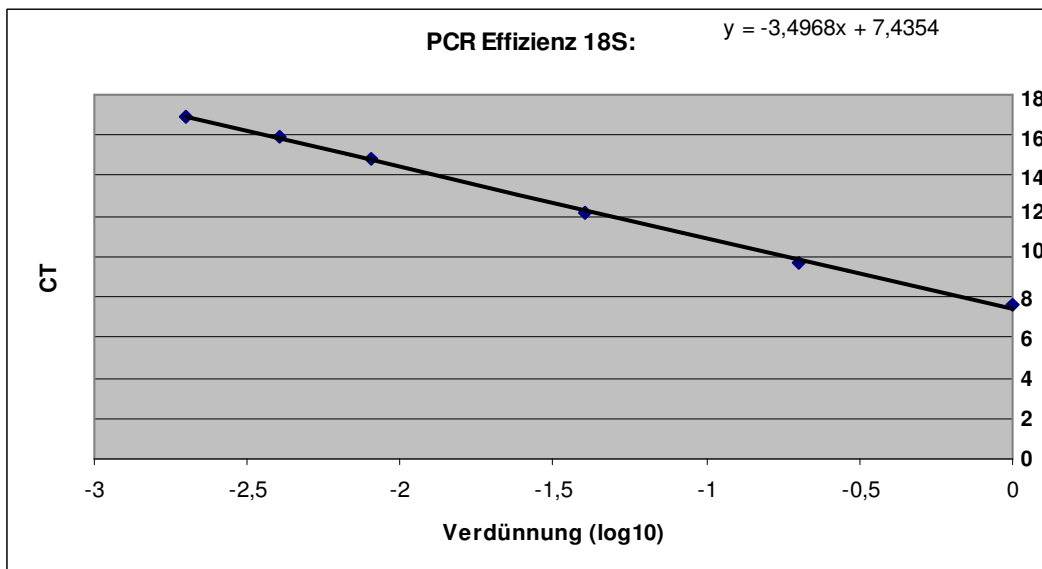
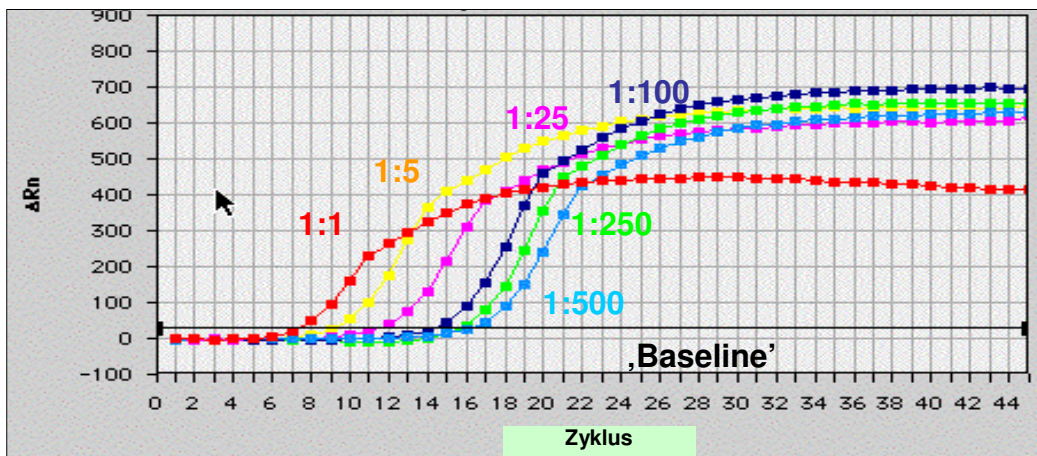


Abbildung 2-7

Ermittlung der exponentiellen Basis einer PCR-Kinetik (Pfaffl, 2001).

Die obere Abbildung zeigt die Kalibrierungskurven der 18S rRNA mit einer cDNA-Verdünnungsreihe von 1:1 bis 1:500. Durch logarithmische Auftragung der cDNA-Verdünnungen gegen die ermittelten CT-Werte lässt sich die Basis der exponentiellen Funktion mit $18S_{\text{eff.}} = 10^{(-1/\text{Steigung})}$ berechnen.

2.3.2.11 Northern Blotting

Gesamt-RNA wurde unter denaturierenden Bedingungen in Formamidgelen elektrophoretisch getrennt. Hierbei sind je Gelspur 20 µg photometrisch vermessene Gesamt-RNA aufgetragen worden. Der RNA-Laufpuffer war dabei 1x konzentriert. Bevor man die Proben auf das Gel auftrug, wurde die RNA für 5 min bei 65 °C hitzedenaturiert und dann auf Eis abgekühlt.

Die Elektrophorese erfolgte in Horizontalgelapparaturen bei 7 V/cm Gelbreite. Als Laufpuffer diente 1x MOPS-Puffer. Die Laufzeit betrug 2 h.

Nach der Elektrophorese wurde die RNA über Nacht auf eine Nylonmembran transferiert (HybondTM-N⁺, Amersham). Dazu musste das Gel auf ein in 20x SSC tauchendes 3 MM-Papier gelegt werden. Der Rand des Gels war mit Parafilm ausgelegt worden. Auf das Gel kamen zwei Schichten 3 MM-Papier. Die Größe der Membran und die des Papiers waren der des Gels exakt anzupassen. Auf das 3 MM-Papier wurden ca. 20 cm zugeschnittenes, saugfähiges Papier gelegt. Auf dieses wurde für ein Gel mit 20 x 20 cm Ausmaß 1 kg Ballast gestellt. Die Transferzeit betrug 20 h. Nach dieser Zeit wurde der vollständige Transfer vom Gel in die Membran unter UV-Licht kontrolliert. Die RNA wurde bei 120 mJ Bestrahlung UV-quervernetzt. Für die Hybridisierung wurde der Puffer ULTRAhybTM verwendet (Ambion). Die Prähybridisierungszeit betrug 1 h. Die Markierung der Sonde ist nach den Herstellerangaben von Ambion durchgeführt worden (Strip-EZTM DNA). Die markierte Sonde konnte von nichteingebauten Nukleotiden laut Herstellerangaben mit MicroSpin ColumnsTM S-400 getrennt werden (Amersham). Die Hybridisierung erfolgte für 16 h bei 42 °C im Hybridisierungsöfen.

Die Membran wurde zuerst mit der Waschlösung 2x SSC; 0,1 % SDS und im Anschluss mit 0,5x SSC; 0,1% SDS bei 42 °C je 15 min gewaschen. Die Lösungen wurden im Wasserbad auf 42 °C vorgewärmt. Die Exposition erfolgte auf einem mit 2x SSC getränktem 3 MM-Papier für 15 h. Bevor die 'Image'-Platte aufgelegt wurde, sind die Membranen mit einer Haushaltsfolie eingewickelt worden. Eingelese wurden die radioaktiven Signale mit dem Scanner FLA3000 (Fuji) mit 50 µm Auflösung. Die Entfernung der hybridisierten cDNA wurde nach den Beschreibungen von Ambion durchgeführt. Die vollständige Entfernung der Sonden konnte durch eine erneute Exposition überprüft werden.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 HPLC phenolischer Inhaltsstoffe

Die HPLC von löslichen Quercetin- und Kaempferolderivaten sowie den Estern der Sinapinsäure erfolgte nach Turunen *et al.* (1999). Die Strukturformeln und Chromatogramme der UV-absorbierenden Metaboliten sind in Abbildung 3-1 dargestellt. Die Molekülstrukturen waren bereits bekannt (Veit & Pauli, 1999).

Das bei -80 °C eingelagerte Pflanzenmaterial wurde im gefrorenen Zustand dismembriert und danach bei 4 °C für 16 h mit Methanol extrahiert. Die anschließende Zentrifugation verlief bei 11000 Upm. Der Überstand wurde bei -80 °C für weitere Analysen aufbewahrt.

Die Metaboliten konnten durch eine HPLC (Gold, Beckman) in einer Spherisorb ODSII Säule (Bischof) getrennt werden. Proben (Methanol-H₂O 75:25 (v/v); Injektionsvolumen 10 µl) wurden von der Säule durch einen Lösungsmittelgradienten eluiert. Dieser bestand aus Lösungsmittel A (980 ml H₂O + 20 ml 5% Ammoniumformiat gelöst in 98%iger Ameisensäure) und Lösungsmittel B (882 ml Methanol + 96 ml H₂O + 20 ml 5% Ammoniumformiat gelöst in 98%iger Ameisensäure).

Der Gradient wurde folgendermaßen ausgeführt: 0-5 min: 0% B; 5-45 min: 0-100% B (linear), 45-48 min: 100% B; 48-50 min: 100-0% B und 50-58 min: 0%B. Die Detektion der Verbindungen fand bei einer Wellenlänge von 280 nm (Beckman Modell 168) und mit einem Spektrofluorimeter (Anregung bei 300 nm, Emission bei 400 nm; Shimadzu Modell RF530) statt. Die folgenden wasserlöslichen Phenole wurde durch Vergleich ihrer Retentionszeit und der UV-Spektren bestimmt:

Sinapoylglukose (23,4 min), Sinapinderivat (unbekannte Struktur) 25,5 min, Quercetin 3(Glc 6''→1'''Glc) 7Rha (26,6 min), Kaempferol 3(Glc 6''→1'''Glc) 7Rha (27,5 min), Sinapoylmalat (27,9 min), Quercetin 3Glc 7Rha (29,5 min), Kaempferol 3Glc 7Rha (31,0 min), Quercetin 3,7Rha₂ (31,3 min), Kaempferol 3,7Rha₂ (33,1 min).

2.4.2 HPLC von photosynthetischen Pigmenten

Die Analysen der photosynthetischen Pigmente erfolgte in Zusammenarbeit mit dem PigmentanalySELabor der Abteilung Experimentelle Umweltsimulation. Die Probenaufbereitung wurde dort gemäß Siefertmann-Harms (1988) durchgeführt.

2.5 Expressionsdaten – Normalisierung und statistische Aspekte

2.5.1 Normalisierung

Die Normalisierung von Arrays ist notwendig um unterschiedliche Hybridisierungen miteinander vergleichen zu können. Sie soll die Signalintensitäten verschiedener cDNA-Synthesen abgleichen. Die bei der Auswertung der Arrays verwendete Methode wurde am MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie etabliert (Colebatch *et al.*, 2002). Hierbei handelt es sich um ein lineares Verfahren. Der Algorithmus unterstellt, dass die Summe aus allen gemessenen ‚Spots‘, unabhängig von der jeweiligen Behandlung, annähernd die gleiche ist. Diese Annahme kann nur gemacht werden, wenn sich eine ausreichende Zahl an Genen auf dem Array befindet. Die Annahme wäre jedoch ungültig, wenn eine selektive Auswahl von z. B. nur 100 Stressgenen stattfände. Würden bei einem solchen Array die meisten Gene auf einen Stressor reagieren, könnte nur wenig Effekte geltend gemacht werden. Der eigene DNA-Array war jedoch mit 579 Genen für dieses Verfahren geeignet. Die Signalintensitäten wurden zunächst auf den Arrays gemessen. Zu diesem Zweck wurde die Software ArrayVision5.1TM verwendet (InterFocus). Die Einstellungen der Software waren so zu wählen, dass nur die Pixelintensitäten gemessen wurden. Zusätzliche Einstellungsmöglichkeiten wie Hintergrundabzug, Normalisierungsverfahren und Referenzgenauswahl waren laut Benutzerhandbuch zu deaktivieren. Die Zuordnung der Punkte war im Programm so einzustellen, dass jeder ‚Spot‘ durch seine Koordinate definiert war (z. B. R1 – C1 : r1 – c1).

Die gemessenen Daten aus der Referenz- und cDNA-Hybridisierung wurden über die Expressionsdatenbank ‚HARUSPEX‘ normalisiert. Die Referenzhybridisierung diente sowohl der qualitativen Überprüfung der PCR-Produkte als auch dem Abgleich verschiedener Signalintensitäten, die durch unterschiedliche DNA-Mengen bedingt waren. Die Normalisierung unterteilte sich in zwei Bereiche:

Interne Normalisierung (Abgleich unterschiedlicher cDNA-Markierungsreaktionen)

Vollständige Normalisierung (Abgleich verschiedener DNA-Mengen eines ‚Spots‘)

Interne Normalisierung

Mit der internen Normalisierung wurde überprüft, ob bei der cDNA-Hybridisierung ein gemessener Punkt S_i mindestens 50% höher lag als der dazugehörige Hintergrundwert (LB_i). War dies nicht der Fall, wurde das Gen als nicht detektiert betrachtet. Ein gemessenes Signal GV_i ließ sich demnach mit

$$GV_i = \begin{cases} S_i - LB_i & \text{wenn } S_i \geq LB_i * 1,5 \text{ war} \\ \text{ansonsten } 0 \text{ und } N_i = (LB_i) / (GV_{MW}) * (-1) & \text{(siehe c)} \end{cases} \quad (a)$$

definieren. LB_i war dabei der jeweilige Hintergrundwert eines ‚Subgrids‘. S_i waren die Rohsignalintensitäten der Gene, die diesem Hintergrundwert zugeordnet wurden (jeweils zwölf Signalwerte von sechs verschiedenen Genen – Abbildung 2-8). GV_{MW} war die durchschnittliche Signalintensität eines detektierten Gens auf dem Array. Diese ließ sich nach

$$GV_{MW} = \frac{1}{GC} * \sum_{i=1}^{GC} GV_i \quad (b)$$

berechnen. GC entsprach der Anzahl an detektierten ‚Spots‘. Ein intern normalisiertes cDNA-Signal N_i erhielt man durch:

$$N_i = GV_i / GV_{MW} \quad (c)$$

$N_i = 1$ bedeutete, dass das gemessene Gen dem Durchschnitt aller Signalintensitäten der detektierten ‚Spots‘ entsprach. Ein nichtgemessenes Gen wurde durch einen intern normalisierten Platzhalter nach Gleichung (a) ersetzt. Um diese Werte noch von detektierten Genen unterscheiden zu können, wurden sie mit (-1) multipliziert. Die negativen Wert wurde schließlich durch $NR_{c,i}$ dividiert (siehe vollständige Normalisierung). Die Platzhalter (-dL) eines nicht gemessenen Gens konnten als Mindest-

wert betrachtet werden, den ein Transkript überschreiten musste, um als detektiert zu gelten.

Vollständige Normalisierung

Der zweite Normalisierungsschritt bezog sich auf die Werte der Referenzhybridisierung. Im ersten Schritt wurden die Daten der internen Normalisierung unterzogen. $NR_{c,i}$ war ein intern normalisierter Wert der Referenzhybridisierung von ‚Spot‘ i des Gens c . Dieser wurde nur berechnet, wenn $SR_i \geq 2 * LBR_i$ galt. War dies nicht der Fall, wurde das Gen in der Expressionsliste mit *<nil>* gekennzeichnet und konnte dadurch für Folgeanalysen ausgeschlossen werden, weil sich zu wenig DNA auf dem ‚Spot‘ befand. Ein vollständig normalisierter Wert $VN_{c,i}$ ließ sich durch $VN_{c,i} = N_{c,i} / NR_{c,i}$ berechnen. $N_{c,i}$ war dabei der intern normalisierte Wert aus der cDNA-Hybridisierung des selben Gens. Die Korrektur der normalisierten cDNA-Werte ($N_{c,i}$) mit Referenzwerten setzte eine lineare Beziehung zwischen DNA-Menge und $NR_{c,i}$ voraus. Dieser Zusammenhang konnte in eigenen Versuchen an acht PCR-Fragmenten mit einer Länge von 260-1000bp Länge gezeigt werden. Die Signalintensität SR_i korrelierte dabei eng mit dem DNA-Gehalt ($R^2=0,91-0,97$).

2.5.2 Problembehandlung bei fehlenden Messwerten

Die experimentelle Schwierigkeit fehlender Messwerte eines Gens innerhalb einer Wiederholungsreihe tritt bei Array-Hybridisierungen immer wieder auf. Es besteht zwar die Möglichkeit diese einfach von der Liste zu entfernen, was aber die auswertbaren Daten deutlich reduzieren würde. Dabei würden auch solche Gene entfernt werden, die in einer Behandlung messbar waren. Um dieser Eventualität Rechnung zu tragen, muss ein Platzhalter eingeführt werden. Hierfür gab es zwei Möglichkeiten:

1. Nichtgemessene Werte werden durch den Mittelwert der gemessenen Gene substituiert
2. Dynamische Platzhalter

1. Messung (Referenzhybridisierung)

2. Messung (cDNA-Probe)

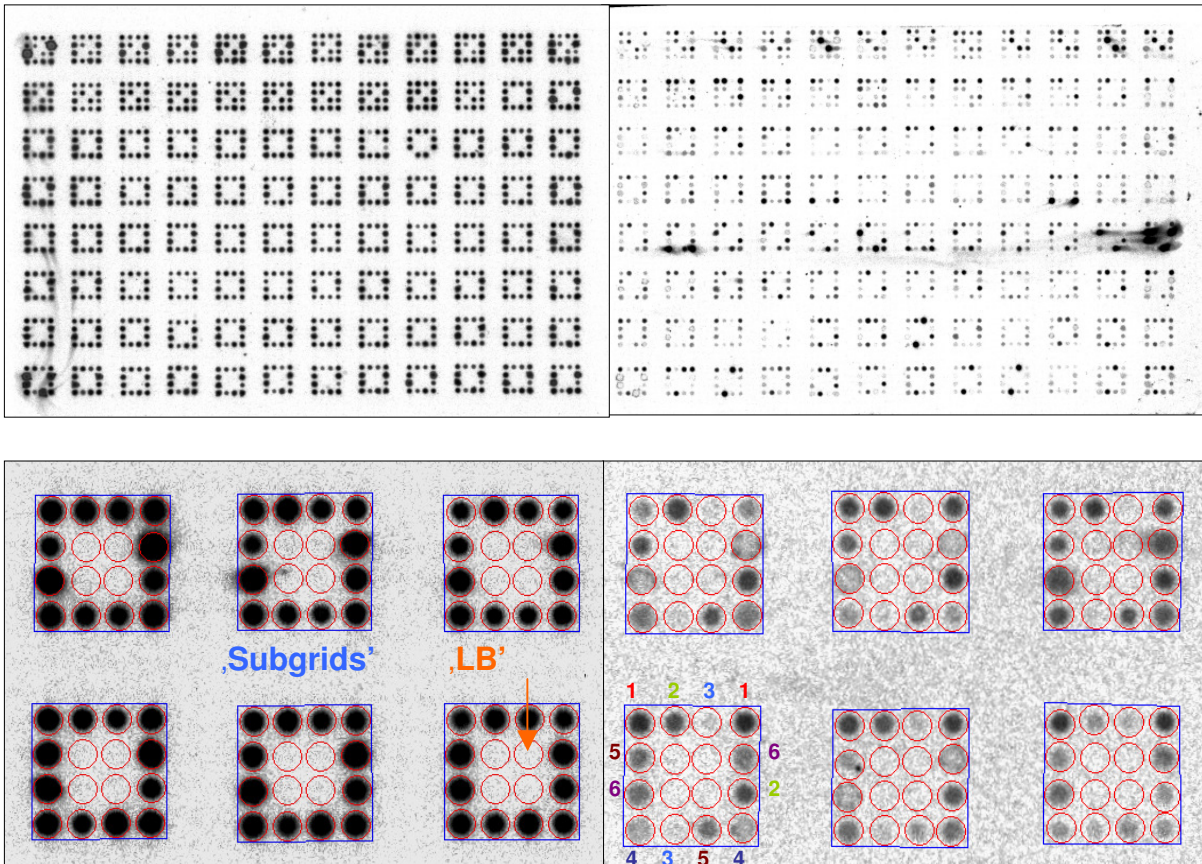


Abbildung 2-8

Normalisierung der DNA-Arrays.

Die ‚gespoteten‘ Membranen wurden zuerst mit einem radioaktiv markiertem Oligonukleotid hybridisiert (1. Quantifizierung). Die Sequenz dieser Sonde hatten alle PCR-Produkte des Arrays gemeinsam. Der Vorgang diente sowohl der Qualitätskontrolle als auch der Normalisierung der cDNA-Expressionswerte (2. Quantifizierung).

Die oberen zwei Abbildungen zeigen die Signale der 579 Gene nach der Referenzhybridisierung (links) und nach einer Hybridisierung mit einer radioaktiven cDNA (rechts).

Die untere Hälfte zeigt einen Ausschnitt nach dem ‚Gridding‘ mit der Image-Software ArrayVision™ 5.1. In jedes ‚Subgrid‘ wurden sechs verschiedene Gene ‚gespotet‘, die jeweils repliziert aufgetragen waren (‚Replica‘). An der Position ‚LB‘ wird für diese sechs DNA-Sequenzen ein Hintergrundwert gemessen. Die Verrechnung der Daten erfolgte über die ‚HARUSPEX‘-Expressionsdatenbank des MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie (siehe Kapitel 2.5.1).

Das bessere Verfahren ist eine Fallentscheidung mithilfe dynamischer Platzhalter. In Kapitel 2.5.1 wurde das Prinzip der Berechnung der Detektionslimits (-dL) abgehandelt. Basierend auf diesen Zahlen und den Messwerten von detektierten Werten in-

nerhalb einer Variante können entsprechende Platzhalter geschaffen werden. Damit ein Gen innerhalb einer Behandlungsvariante dem Substitutionsverfahren unterzogen werden konnte, musste es zunächst über alle Wiederholungen in mindestens 67% der Messungen detektiert worden sein. Fehlende Werte wurden anhand der Standardabweichung ($SA_{\text{detekt.}}$) und des Mittelwertes ($MW_{\text{detekt.}}$) der detektierten Gene angepasst. Für den Wert des Platzhalters wurde der dynamische Hintergrund (dL) herangezogen. Für diese Annäherung wurden drei Fälle unterschieden:

$$1. MW_{\text{detekt.}} + SA_{\text{detekt.}} \geq dL \geq MW_{\text{detekt.}} - SA_{\text{detekt.}}$$
$$\Rightarrow \text{Platzhalter}_1 = (MW_{\text{detekt.}} - (MW_{\text{detekt.}} - SA_{\text{detekt.}}))/2$$

$$2. dL < MW_{\text{detekt.}} - SA_{\text{detekt.}}$$
$$\Rightarrow \text{Platzhalter}_2 = dL/2$$

$$3. dL > MW_{\text{detekt.}} + SA_{\text{detekt.}}$$
$$\Rightarrow \text{Platzhalter}_3 = MW_{\text{detekt.}}$$

Ein aktives Gen einer Behandlungsvariante, das diesem Prozedere unterzogen wurde, besaß nun über alle Wiederholungen Messwerte.

Ein zusätzliches Problem, das sich beim Vergleich des Expressionsmusters eines Gens über mehrere Behandlungen ergab, waren fehlende Messwerte innerhalb eines Versuches. Hatte ein Gen mindestens in einer Behandlungsvariante Messwerte, wurden die fehlenden Werte der anderen Behandlungsvarianten durch deren dL-Werte ersetzt. Die Mehrzahl der dL-Werte lagen alsdann zwischen 0,2-0,05. In diesem Bereich bewegte sich der Analysefehler in einem Bereich zwischen 50–170% (Kapitel 2.5.3). Messreihen eines Gens, die zufällig zustande kommen konnten, waren hier mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht signifikant spektralabhängig.

2.5.3 Messfehler

Die Messung der Genexpression mit Hilfe der DNA-Arrays ist mit einem Messfehler behaftet. Um diesen zu ermitteln, wurde die Fehlerverteilung in Abhängigkeit der Signalstärke ermittelt. Aus diesem Sachverhalt konnte ein Fehlermodell entwickelt werden (Rocke & Durbin, 2001). Dieses enthielt die gesamte Variation, die sich aus

den beiden Teilvariationen zwischen den Arrays und der Variabilität innerhalb einer Behandlungsvariante zusammensetzte. Die Variation zweier Hybridisierungen mit gleicher RNA kann sich aus verschiedenen Fehlerquellen bilden, wie z. B. variierende Hintergrundwerte, Pipettierfehler und unterschiedliche Hybridisierungs- und Expositionszeiten. Die biologische Variabilität hingegen setzt sich in erster Linie aus den Unterschieden zwischen dem Pflanzenmaterial einer Bestrahlungsvariante zusammen. Der durchschnittliche Gesamtfehler konnte in WG295 und WG360 des Versuches V320 ermittelt werden. Dort wurde jeweils an zehn verschiedenen Positionen Proben (je fünf Pflanzen) entnommen und von diesen RNA extrahiert. Mit diesen RNAs wurden zehn verschiedene DNA-Arrays hybridisiert und die Daten normalisiert. Die relativ hohe Anzahl an Wiederholungen bestätigte zusätzlich die Normalverteilungshypothese der Genexpressionsmessungen, was Voraussetzung für die anschließende Varianzanalyse war (Precht & Kraft, 1993). Betrachtete man alle detektierten Gene dieses Versuches, so lag der mittlere Fehler einer Bestrahlungsvariante bei 35%. Ein differenzierteres Bild über die Fehlerverteilung von Genen in Abhängigkeit ihrer Signalstärken ist in Abbildung 2-9 wiedergegeben. Der Gesamtfehler eines Expressionswertes setzt sich demnach aus zwei Komponenten zusammen, die durch das additive Modell beschrieben werden konnten:

$$\text{Var}(\text{VN}_{c,i}) = \text{VN}_{c,i}^2 S_{\eta}^2 + \sigma^2$$

$\text{VN}_{c,i}$ entspricht dem normalisierten Transkriptionswert für den die Varianz bestimmt wurde. Die Komponente σ wurde aus den schwächeren Signalen mit

$$\sigma^2 = (n-m)^{-1} \sum_{i=1}^m s_i^2 (n_i - 1) \quad (n_i: \text{Zahl der Wiederholungen jedes Gens (10)}); \quad n = \sum_{i=1}^m n_i$$

berechnet. M war eine willkürlich festgelegte Zahl an schwach transkribierten Genen und n_i steht für die Anzahl an wiederholten Arrays aus einer UV-Bestrahlungsvariante. Das Intervall m wurde so lange ausgeweitet, bis 95% der schwach exprimierten Gene für die Berechnung von σ herangezogen waren ($[MW - 2\sigma; MW + 2\sigma]$).

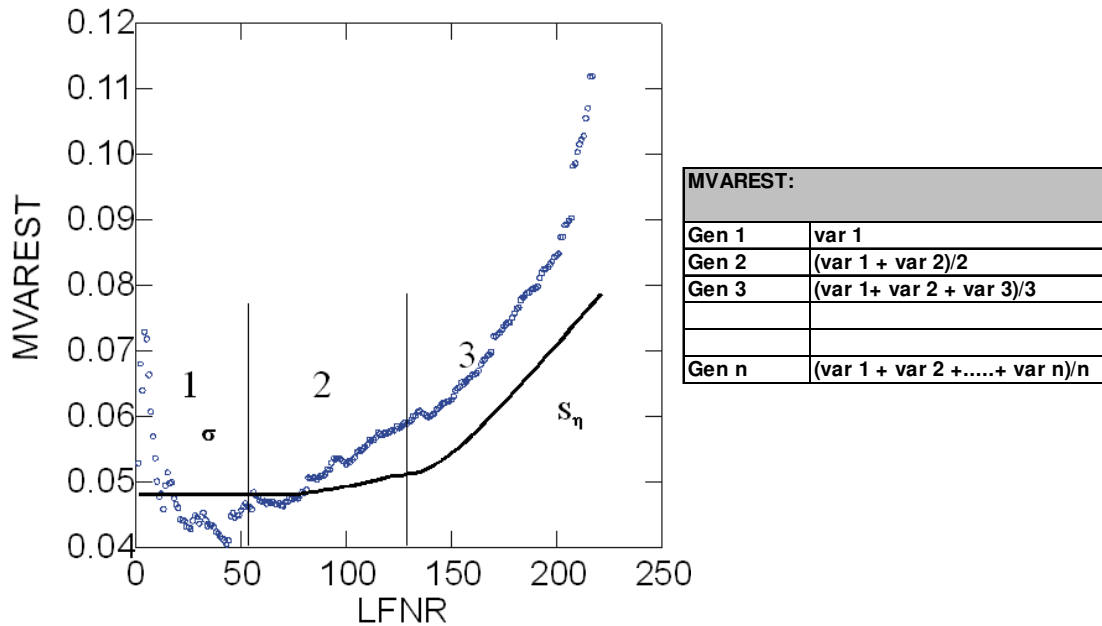


Abbildung 2-9

Überprüfung der Anwendbarkeit eines additiven Fehlermodells.

Die Abbildung zeigt den Fehler aus WG295 von 250 Genen in Abhängigkeit ihrer Signalstärke. Für jedes der zehn hybridisierten Arrays wurde RNA aus unterschiedlichem biologischen Material gewonnen. Die detektierten Gene sind gegen ihre mittlere Varianz aufgetragen (MVAREST, blaue Kurve). Das Fehlermodell setzt eine Einteilung der MVAREST in drei Bereiche voraus (schwarze Kurve).

1. Approximativ konstanter Bereich
2. Substantielle Veränderung der Varianz
3. Lineare Zunahme der Varianz mit Zunahme der Signalstärke

Für die Schätzung des Parameters S_n^2 wurde analog zu der von σ^2 vorgegangen. Die Daten wurden vor der Berechnung logarithmiert. Die Berechnung erfolgte nach

$$S_n^2 = (n-m)^{-1} \sum_{i=1}^m s_i^2 (n_i - 1) \quad (n_i: \text{Zahl der Wiederholungen jedes Gens (10)}; n = \sum_{i=1}^m n_i).$$

Nach dieser Berechnung ergab sich eine Varianz aus den Versuchsschächten WG295 mit $\text{var}_{\text{wg295}}(VN_{c,i}) = VN_{c,i}^2 0,0576 + 0,007156$ und WG360 mit $\text{var}_{\text{wg360}}(VN_{c,i}) = VN_{c,i}^2 0,051 + 0,0169$ für WG360. Die beiden unabhängig voneinander erstellten Modelle zeigten sehr ähnliche kalkulatorische Varianzen, was darauf rückschließen ließ, dass die Variationen innerhalb der Bestrahlungsfelder in einem sehr ähnlichen Bereich lagen. Die errechenbare Standardabweichung in Abhängigkeit des gemessenen Standardfehlers ist in Abbildung 2-10 dargestellt.

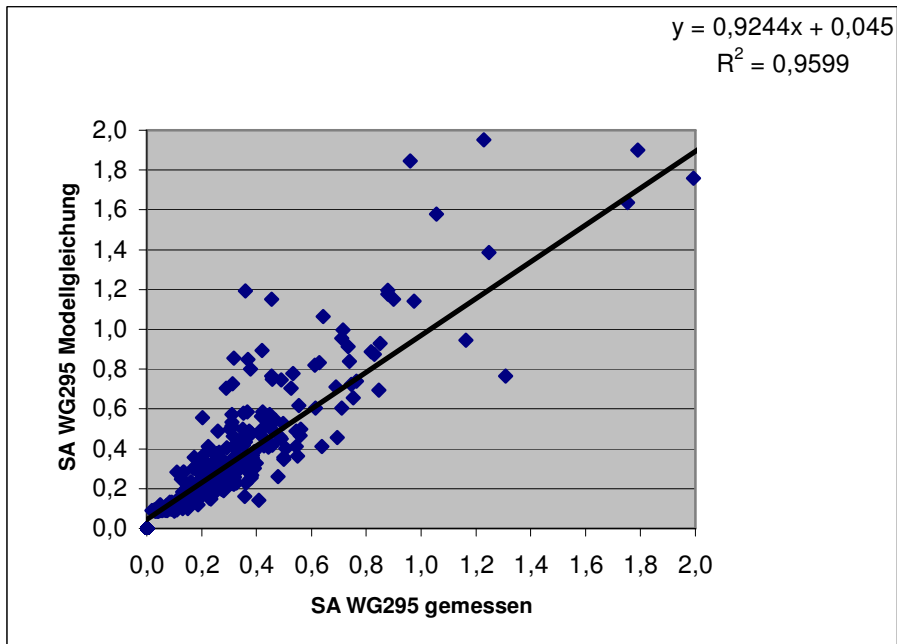


Abbildung 2-10

Gegenüberstellung der Standardfehler aus dem Fehlermodell und der gemessenen Expression.

Die Standardabweichung der Modellgleichung ist in Abhängigkeit der gemessenen Standardabweichung aufgetragen. Die Berechnung wurde mit dem Modell

$$SA_{wg295}(VN_{c,i}) = \sqrt{VN_{c,i}^2 \cdot 0,0576 + 0,007156} \text{ durchgeführt.}$$

3 Ergebnisse

Im Sonnensimulator der GSF wurden vier verschiedene Basis-Strahlungsszenarien realisiert, die durch unterschiedliche Intensitäten im PAR/UV-Bereich charakterisiert waren. Diese Strahlungsszenarien werden im Folgenden mit H/H, M/H, L/H, und H/L bezeichnet. H, M und L stehen für hoch, mittel und niedrig (engl. ‚low‘). Hoch entsprach dabei etwa den Bedingungen, die wir in unserem Klima am Mittag eines mittleren Sonnentags erwarten können, mittel am Vor- oder Nachmittag und niedrig im Schatten. Zusätzlich wurden fünf spektral unterschiedliche UV-Varianten mit einer in den Simulator integrierten Küvette mit einer Abdeckung aus fünf verschiedenen WG-Kantenfiltern der Firma Schott erreicht. Jeder Versuch mit einem bestimmten Strahlungsszenario wurde mit möglichst ähnlichen Parametern wiederholt, so dass insgesamt zweimal 20 Bestrahlungsvarianten ausgewertet werden konnten. Die spektro-radiometrischen Daten und die dazugehörigen Numerierung der Versuche (V318 - V327) sind in Tabelle 2-1 zusammengestellt.

Unter einer spektralen UV-Variante wuchsen ca. 50 Pflanzen, die i. d. R. in drei ‚Pools‘ aufgeteilt wurden. Zur Darstellung der Messwerte der UV-Varianten sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus den Werten der einzelnen ‚Pools‘ berechnet worden.

Analysiert wurden die Derivate von Kaempferol und Quercetin sowie die Ester der Sinapinsäure. Beide Verbindungsklassen sind vergleichsweise hoch konzentriert und vorwiegend in der oberen Epidermis zu finden. Dadurch haben sie eine sehr günstige Lokalisation, um das photosynthetisch aktive Mesophyllgewebe vor UV-B-Einwirkung abzuschirmen. Die analysierten Pigmente sind wasserlöslich und in *Arabidopsis thaliana* existieren keine zellwandgebundenen Fraktionen (W. Heller, unveröffentlicht). Die chemischen Strukturen wurden durch die Kombination von NMR-Spektroskopie (Nukleare Magnetische Resonanz), Massen- und UV-Spektroskopie sowie der chiralen Kapillar-Elektrophorese identifiziert. Die strukturanalytischen Daten der Verbindungen sind detailliert in der Veröffentlichung von Veit & Pauli (1999) zusammengefasst. Die daraus abgeleiteten Strukturformeln sind in Abbildung 3-1 dargestellt.

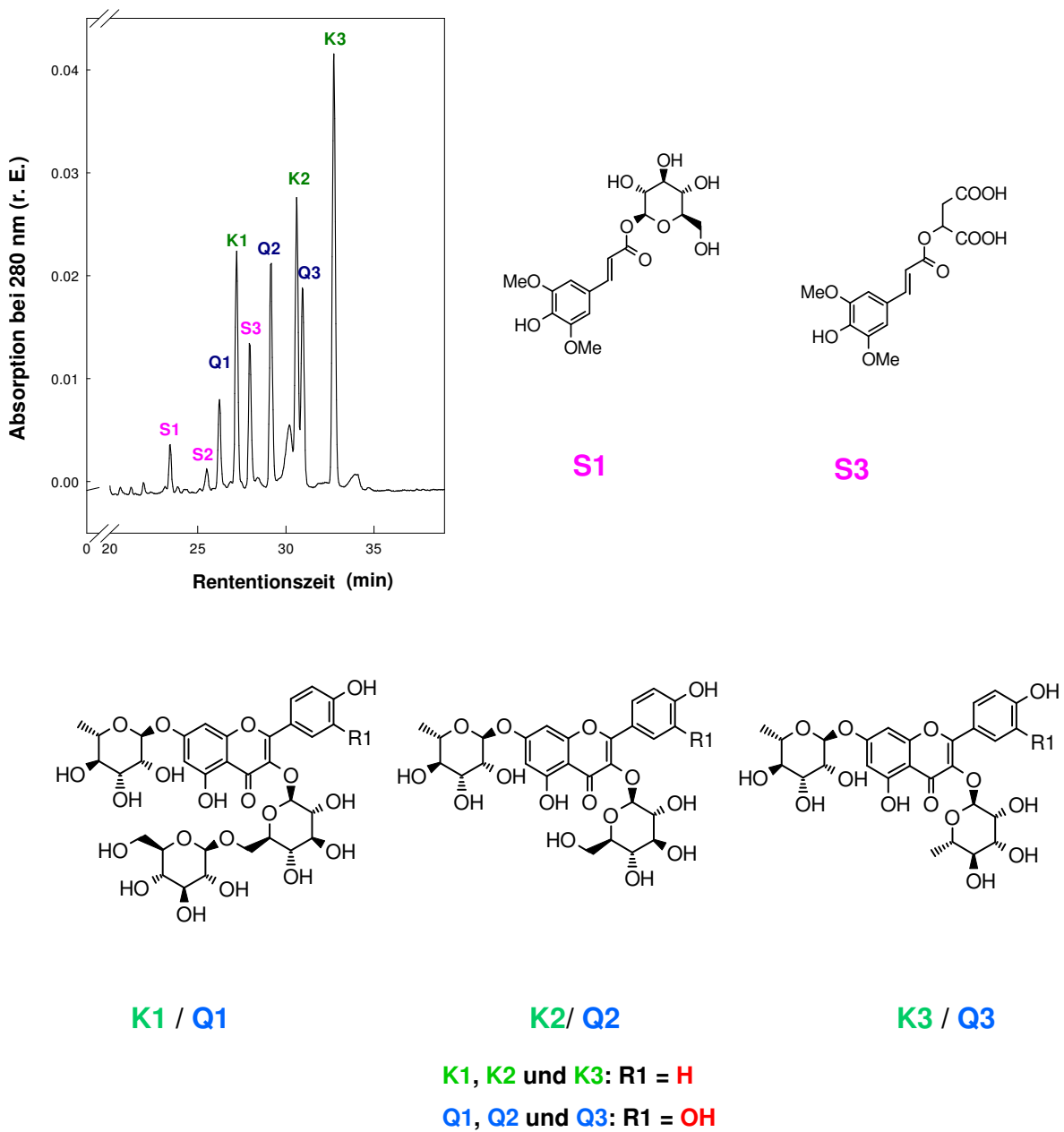


Abbildung 3-1

Chemische Strukturen der analysierten Pigmente.

S1 und S3: Sinapinapoyl-1-O- β -D-Glukosid und 1-O-Sinapoyl-L-Malat. S2 des HPLC-Chromatogramms zeigt eine Sinapinsäureverbindung unbekannter chemischer Struktur an. Die Quercetin- (Q1-Q3) und Kaempferolderivate (K1-K3) unterscheiden sich durch die Hydroxylierung an der 3'-Position (R1). Die glykosidische Konjugation ist bei K1, Q1 und K2, Q2 sowie K3, Q3 jeweils gleich:

K1, Q1: 3-O-[β -D-Glukopyranosyl (6'' \rightarrow 1''') β -D-Glukopyranosid]-7-O- α -L-Rhamnopyranosid

K2, Q2: 3-O- β -D-Glukopyranosid-7-O- α -L-Rhamnopyranosid

K3, Q3: 3-O- α -L-Rhamnopyranosid-7-O- α -L-Rhamnopyranosid

Für eine exakte Quantifizierung wurde das oben abgebildete Chromatogramm mittels der ‚Deconvolution‘-Funktion der HPLC-Software nach einem Standardverfahren getrennt.

3.1 Hoch PAR / Hoch UV-B (H/H)

3.1.1 Schutzpigmente

Flavonolderivate

Die Konzentrationen der Quercetinderivate unterlagen in beiden Versuchen einer deutlichen spektralen Abhängigkeit im UV-Bereich (Abbildung 3-2). In WG295 waren die Quercetinderivate beider Experimente etwa dreimal höher konzentriert als in WG360. Die Konzentrationen an Kaempferolderivaten zeigten nur schwach ausgeprägte spektrale Abhängigkeiten.

Sinapinsäureester

Die Sinapinsäureester unterlagen in ihren Konzentrationen, ähnlich wie bei den Kaempferolderivaten, nur andeutungsweise einer spektralen Abhängigkeit (Abbildung 3-3). Die Statistik der Pigmentanalytik für das Basisszenario H/H ist in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

Tabelle 3-1

Varianzanalyse der Pigmentmessungen in Pflanzen an dem Szenario H/H.

	V318		kritischer F	Signifikanz	V321		kritischer F	Signifikanz
	F	p			F	p		
Kaempferolderivate	5,29	0,048	5,19	*	3,90	0,037	3,48	*
Quercetinderivate	30,52	0,001	5,19	***	5,04	0,017	3,48	*
Sinapoylglukose	10,16	0,013	5,19	*	2,02	0,168	3,48	n.s.
Sinapoylmalat	0,76	0,595	5,19	n.s.	0,29	0,879	3,48	n.s.

H0: Pigmentkonzentration ist nicht spektralabhängig im UV-Bereich

H1: Pigmentkonzentration ist spektralabhängig im UV-Bereich

* signifikant $p < 0,05$

** hoch signifikant $p < 0,01$

*** sehr hoch signifikant $p < 0,001$

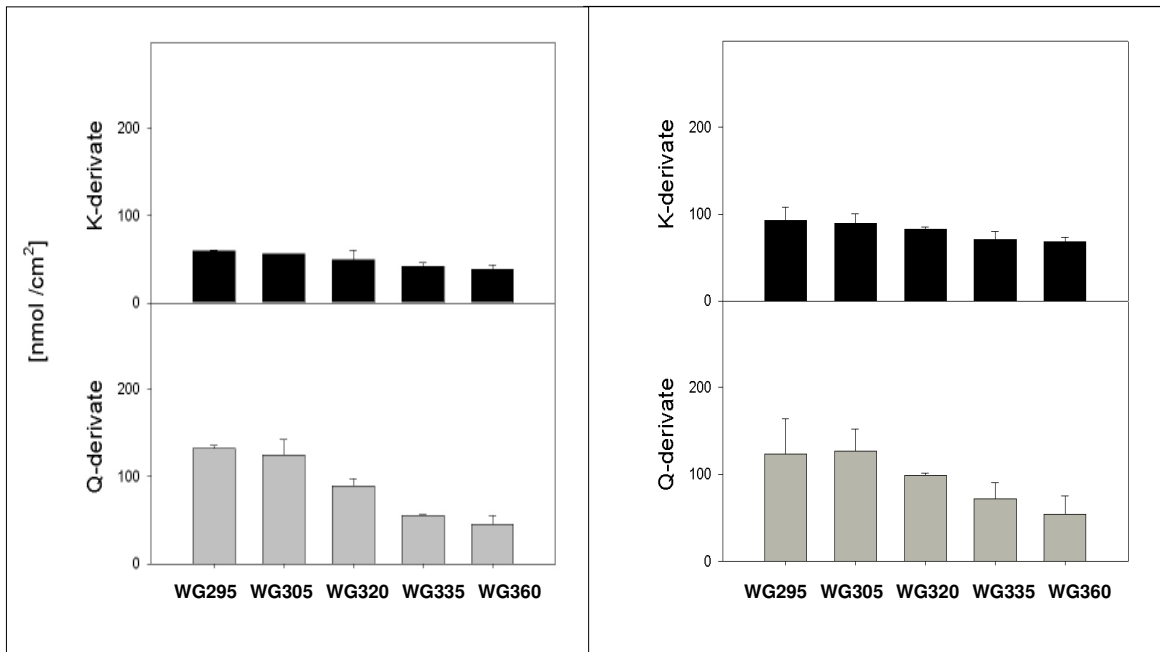


Abbildung 3-2

Spektrale Abhängigkeiten der Gehalte an Quercetin- (Q) und Kaempferolderivaten (K) (H/H).

Links sind die Ergebnisse des Experimentes V318 dargestellt; rechts die des Experimentes V321.

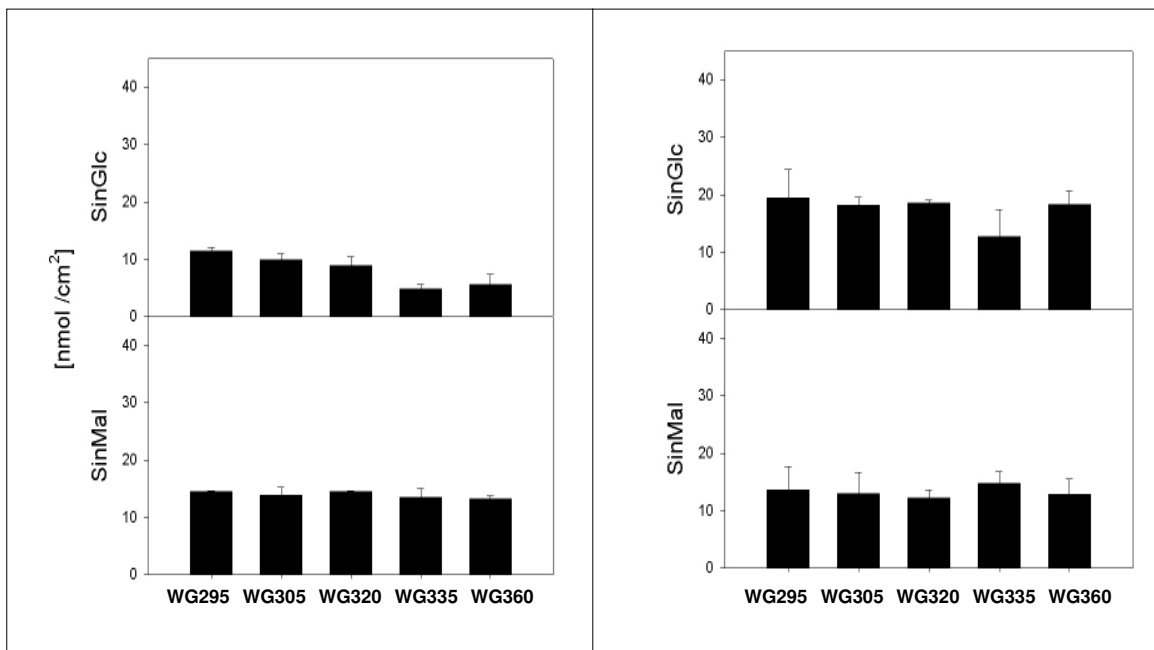


Abbildung 3-3

Spektrale Abhängigkeiten der Konzentrationen an Sinapinsäureestern (SinGlc; SinMal) (H/H).

Das linke Diagramm zeigt die Konzentrationen an Sinapoylglukose und -malat des Versuches V318.

Das rechte Diagramm zeigt die Ergebnisse des Versuches V321.

Mittelwerte und Standardabweichungen der Balken wurden für V318 mit $n = 2$ und für V321 mit $n = 3$ berechnet.

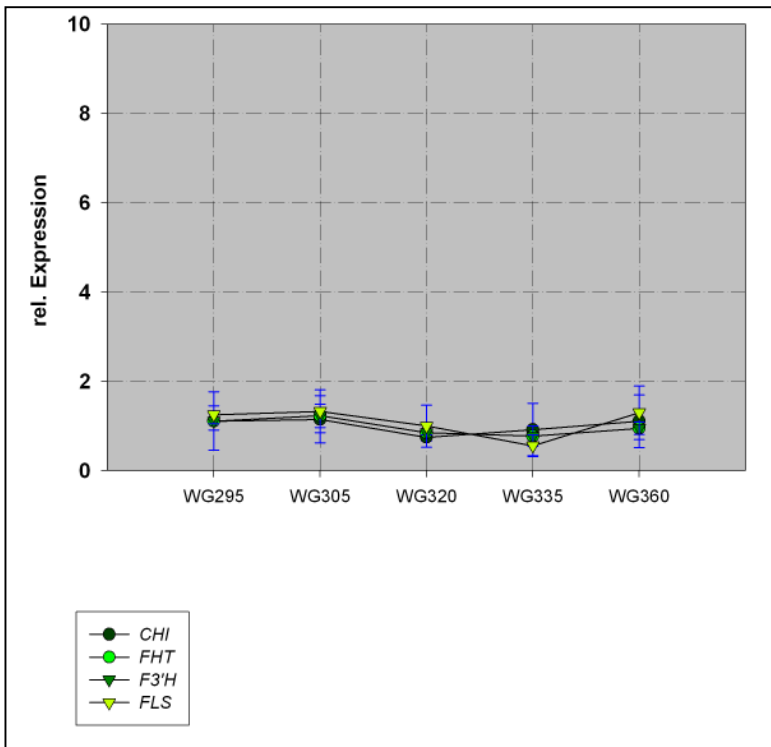


Abbildung 3-4

Spektrale Abhängigkeit der Transkription der Flavonoidbiosynthese-Gene nach 14 d UV-Exposition (H/H).

3.2 Mittel PAR / Hoch UV-B (M/H)

3.2.1 Schutzpigmente

Flavonolderivate

Die Konzentrationen an Quercetinderivaten zeigten im Szenario M/H die deutlichsten Spektralabhängigkeiten (Abbildung 3-6). Den Kaempferolderivaten konnte bei dem Experiment V320 eine leichte, statistisch signifikante spektrale Abhängigkeit zugeschrieben werden, die aber weniger ausgeprägt war als die der Quercetinderivate.

Sinapinsäureester

Die Gehalte an Sinapinsäureestern waren im Szenario M/H nicht spektralabhängig. Vielmehr konnten zwischen den Experimenten V320 und V323 bei den Gehalten an Sinapoylglukose Temperatureffekte festgestellt werden (Abbildung 3-7). Die statistische Zusammenfassung ist in Tabelle 3-4 dargestellt.

3.2.2 Genexpression der Flavonoidbiosynthese

Die Genexpressionsdaten aus Experiment V320 und V323 wurden für das Szenario M/H nicht zusammengeführt, da zwischen den beiden Versuchen große Unterschiede in der Induzierbarkeit der Gene der Flavonoidbiosynthese bestanden. Die Induktionen der Transkripte waren bei Experiment V320 dem Szenario H/H ähnlich, indes- sen zeigte sich das Expressionsprofil des Versuches V323 sehr ähnlich zum Basis- szenario L/H (Abbildung 3-5 und Abbildung 3-8). Aufgrund der niedrigen Anzahl an Messwerten wurde auf eine statistische Analyse der einzelnen Versuche verzichtet.

Tabelle 3-4

Varianzanalyse der Pigmentmessungen in Pflanzen an dem Szenario M/H.

	V320		kritischer F	Signifikanz
	F	p		
<i>Kaempferol</i> derivate	11,20	0,000	2,58	***
<i>Quercetin</i> derivate	23,96	0,000	2,58	***
<i>Sinapoylglukose</i>	9,83	0,000	2,58	***
<i>Sinapoylmalat</i>	5,94	0,001	2,58	***

	V323		kritischer F	Signifikanz
	F	p		
	7,89	0,004	3,48	**
	7,27	0,005	3,48	**
	1,65	0,237	3,48	n.s.
	10,48	0,001	3,48	**

H0: Pigmentkonzentration ist nicht spektralabhängig im UV-Bereich
H1: Pigmentkonzentration ist spektralabhängig im UV-Bereich

* signifikant $p < 0,05$
** hoch signifikant $p < 0,01$
*** sehr hoch signifikant $p < 0,001$

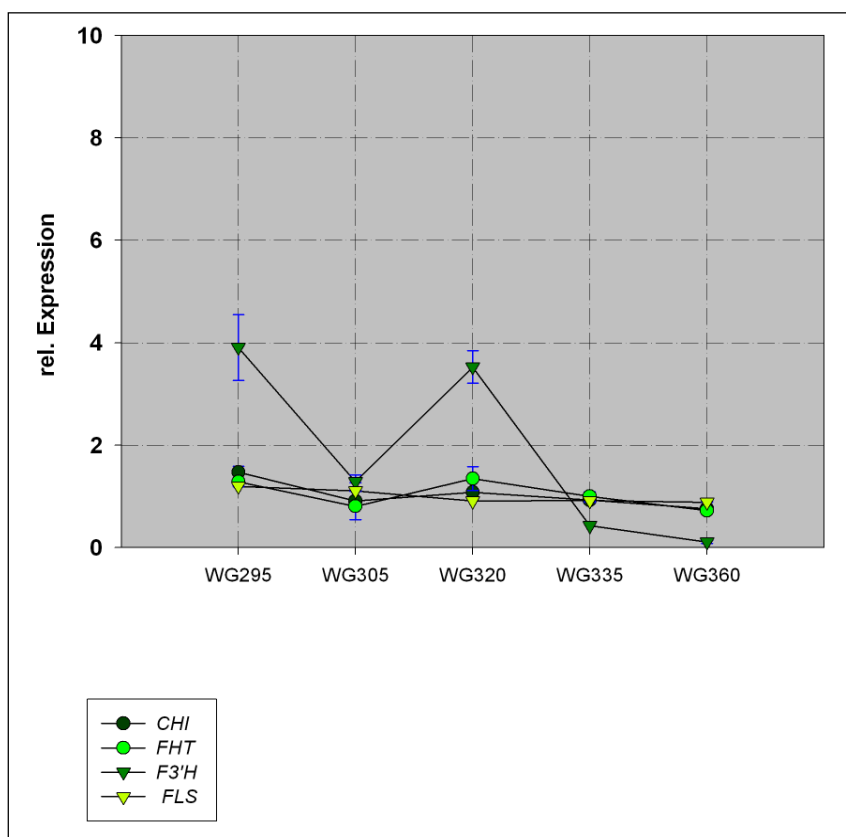


Abbildung 3-5

Spektrale Abhängigkeit der Transkription der Flavonoidbiosynthese-Gene nach 14 d UV-Exposition (V320).

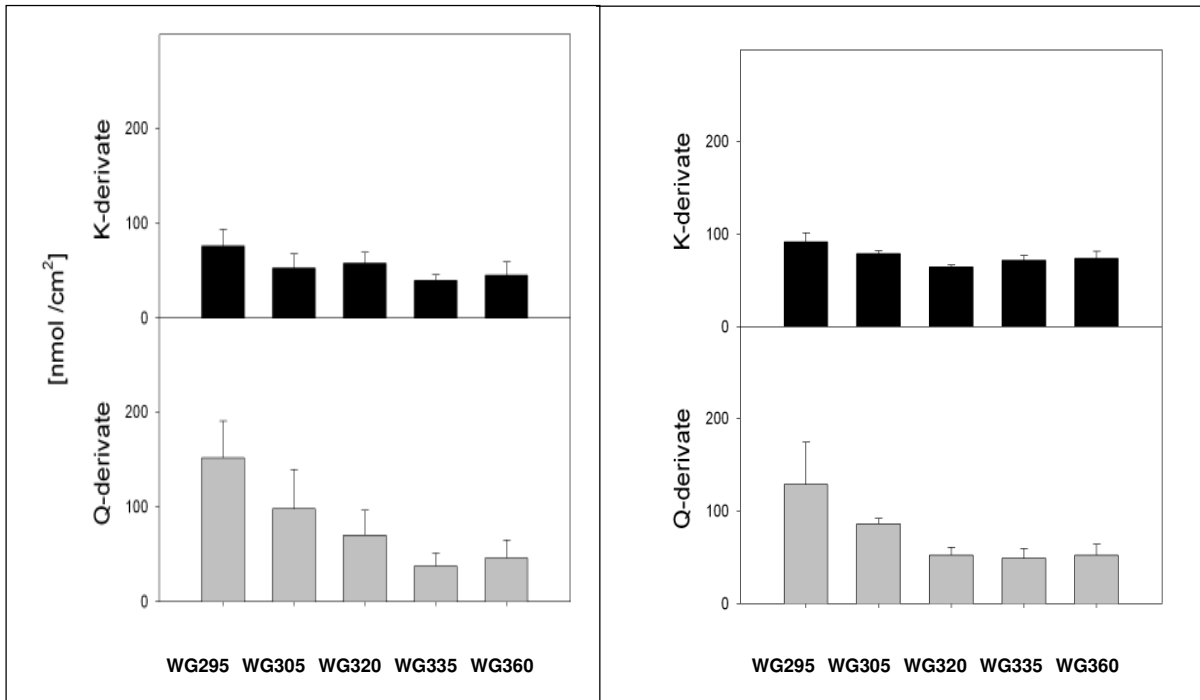


Abbildung 3-6

Spektrale Abhängigkeiten der Gehalte an Quercetin- (Q) und Kaempferolderivaten (K) (M/H).

Links sind die Ergebnisse des Experimentes V320 dargestellt; rechts die des Experimentes V323.

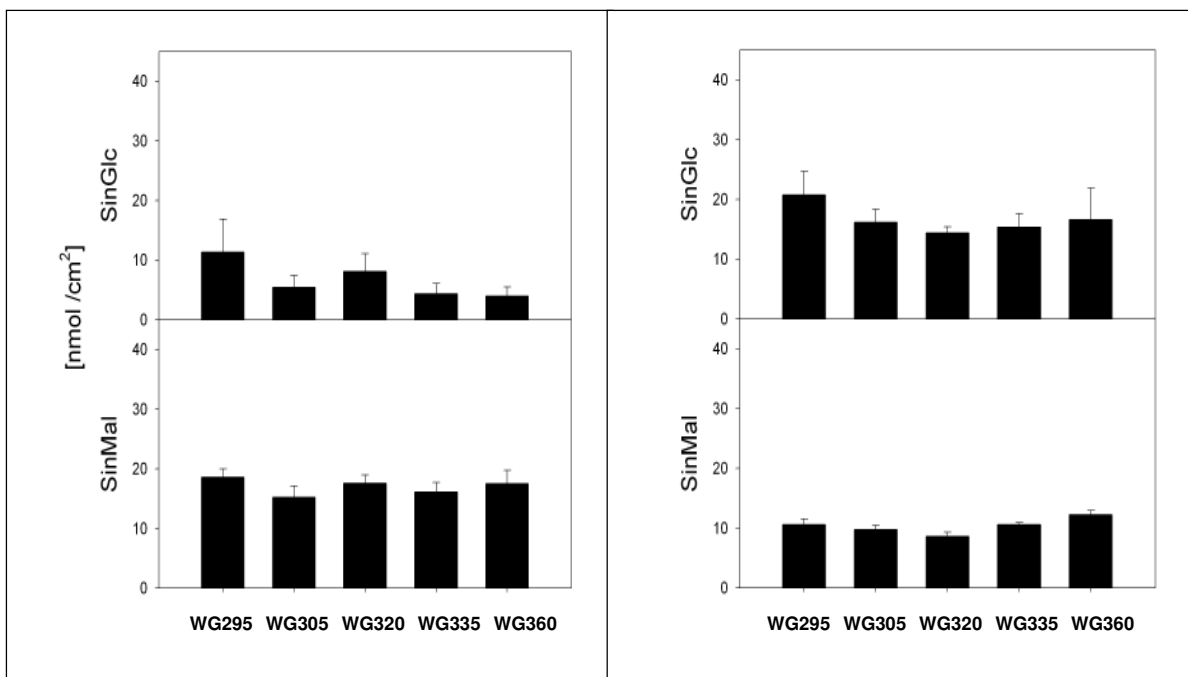


Abbildung 3-7

Spektrale Abhängigkeiten der Konzentrationen an Sinapinsäureestern (SinGlc; SinMal) (M/H).

Das linke Diagramm zeigt die Konzentrationen an Sinapoylglukose und -malat des Versuches V320.

Das rechte Diagramm zeigt die Ergebnisse des Versuches V323.

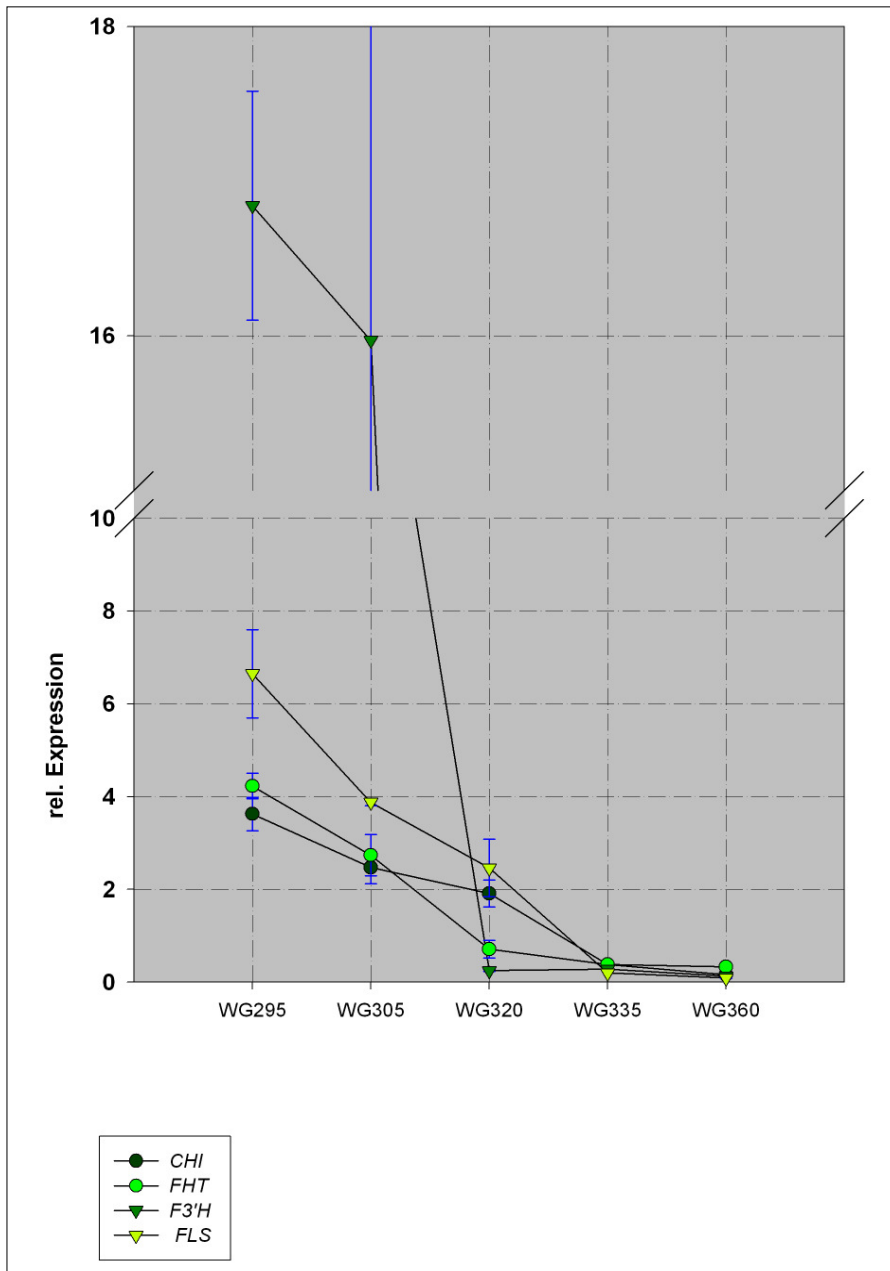


Abbildung 3-8

Spektrale Abhängigkeit der Transkription der Flavonoidbiosynthese-Gene nach 14 d UV-Exposition (V323).

3.3 Niedrig PAR / Hoch UV-B (L/H)

Die biologisch effektive Strahlung war in diesem Experiment mit 180 mW m^{-2} in WG295 annähernd identisch zu Szenario H/H. Jedoch war der PAR-Hintergrund mit $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ deutlich niedriger als in Szenario H/H ($1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). In der Na-

tur können vergleichbare Bestrahlungsmodalitäten an beschatteten Plätzen und an wolkigen Tagen gemessen werden.

3.3.1 Schutzpigmente

Flavonolderivate

Während die Gehalte an Quercetinderivaten in dem Basisszenario L/H eine signifikante spektrale Abhängigkeit aufwiesen, war dies nicht bei Kaempferolderivaten zu beobachten (Abbildung 3-9). Die Konzentrationen an Quercetinderivaten waren jedoch im Vergleich zu den Varianten H/H und M/H auf einem niedrigerem Niveau.

Sinapinsäureester

Die Akkumulation der Sinapinsäureester zeigten sich in diesem Versuch nicht UV-spektralabhängig. Dies galt sowohl für die Sinapoylglukose als auch für Sinapoylmalat (Abbildung 3-10). Die Varianzanalyse der phenolischen Pigmente von L/H ist in Tabelle 3-5 einzusehen.

Tabelle 3-5

Varianzanalyse der Pigmentmessungen in Pflanzen an dem Szenario L/H.

	V325		kritischer F	Signifikanz		V327		kritischer F	Signifikanz
	F	p				F	p		
<i>Kaempferoderivate</i>	2,05	0,157	3,36	n.s.	3,70	0,038	3,36	*	
<i>Quercetinderivate</i>	7,65	0,003	3,36	**	7,84	0,003	3,36	**	
<i>Sinapoylglukose</i>	1,91	0,178	3,36	n.s.	0,45	0,773	3,36	n.s.	
<i>Sinapoylmalat</i>	0,56	0,695	3,36	n.s.	1,45	0,282	3,36	n.s.	

H0: Pigmentkonzentration ist nicht spektralabhängig im UV-Bereich

H1: Pigmentkonzentration ist spektralabhängig im UV-Bereich

* *signifikant p<0,05*

** *hoch signifikant p<0,01*

*** *sehr hoch signifikant p<0,001*

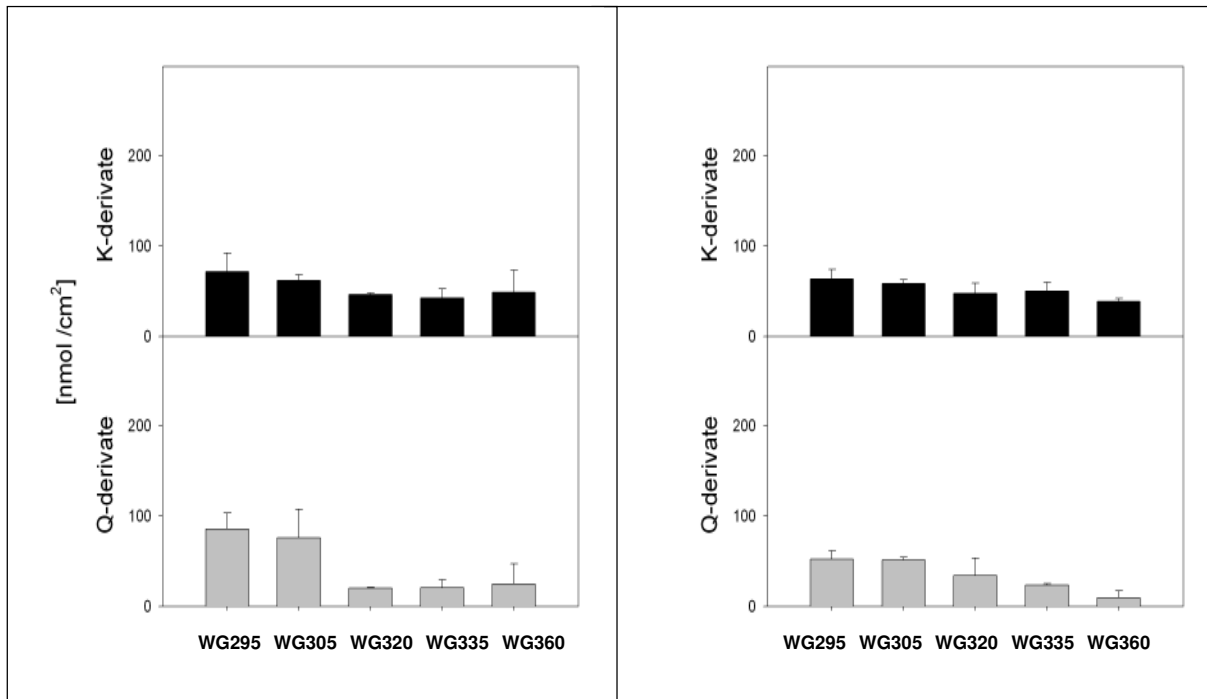


Abbildung 3-9

Spektrale Abhängigkeiten der Gehalte an Quercetin- (Q) und Kaempferolderivaten (K) (L/H).

Links sind die Ergebnisse des Experimentes V325 dargestellt; rechts die des Experimentes V327.

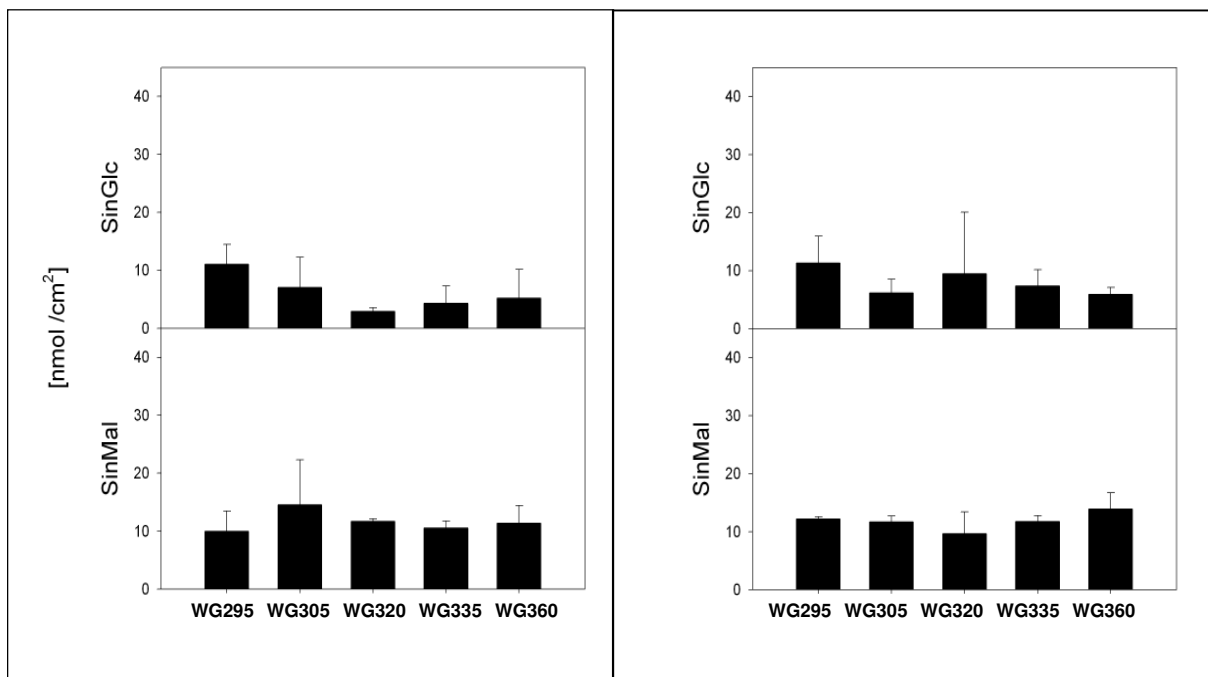


Abbildung 3-10

Spektrale Abhängigkeiten der Konzentrationen an Sinapinsäureestern (SinGlc; SinMal) (L/H).

Das linke Diagramm zeigt die Konzentrationen an Sinapoylglukose und -malat des Versuches V325.

Das rechte Diagramm zeigt die Ergebnisse des Versuches V327.

Mittelwerte und Standardabweichungen der Balken wurden für V325 mit $n = 3$ und für V327 mit $n = 3$ berechnet.

3.3.2 Genexpression der Flavonoidbiosynthese

Die Transkripte der Flavonoidbiosynthese waren bei diesem Versuch durch UV-B-Strahlung signifikant induziert. Die Induktionsfaktoren der Gene und die Ergebnisse der dazugehörigen ANOVA sind in Tabelle 3-6 dargestellt. Die Daten sind in Abbildung 3-11 zusammengestellt.

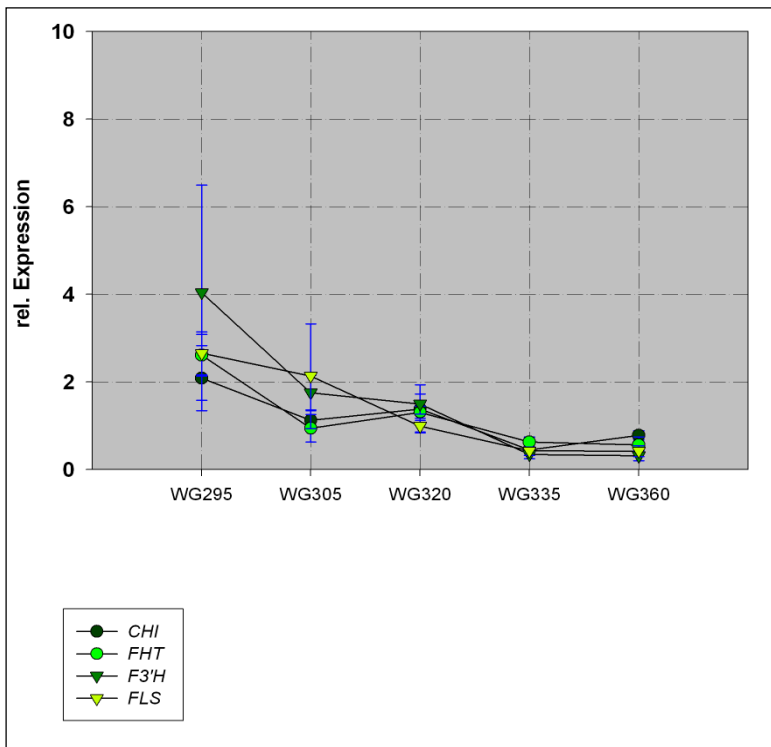


Abbildung 3-11

Spektrale Abhängigkeit der Transkription der Flavonoidbiosynthese-Gene nach 14 d UV-Exposition (L/H).

Tabelle 3-6

Statistische Auswertung der RT-PCR-Analysen des Basisszenarios L/H.

	L/H		kritischer F	Signifikanz	Induktion (+UV-B+UV-A / ohne UV-B)
	F	p			
<i>Chalkonisomerase (n=2x2)</i>	8,47	0,001	3,06	***	1,84
<i>Flavanon 3-Hydroxylase (n=2x2)</i>	35,92	0,000	3,06	***	2,14
<i>Flavonoid 3'-Hydroxylase (n=2x3)</i>	11,03	0,000	2,76	***	4,04
<i>Flavonolsynthase (n=2x2)</i>	10,76	0,000	3,11	***	3,92

H0: Genexpression ist nicht spektralabhängig im UV-Bereich

H1: Genexpression ist spektralabhängig im UV-Bereich

* signifikant $p < 0,05$

** hoch signifikant $p < 0,01$

*** sehr hoch signifikant $p < 0,001$

3.4 Hoch PAR / Niedrig UV-B (H/L)

In WG295 waren in H/L 25 mWm⁻² UV-B_{BE} appliziert worden (siehe Kapitel 2.1). Der PAR-Hintergrund war mit ca. 1300 µmol m⁻² s⁻¹ PAR vergleichbar mit dem H/H-Szenario.

3.4.1 Schutzpigmente

Flavonolderivate

Im Gegensatz zu den bisher vorgestellten Ergebnissen waren im Szenario H/L die Gehalte an Quercetinderivaten nicht spektralabhängig im UV-Spektrum. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-12 dargestellt.

Sinapinsäureester

Die Sinapinsäureester waren bei diesem Szenario nicht spektralabhängig (Abbildung 3-13). Die statistische Auswertung der Pigmentanalyse des Basisszenarios H/L ist in der Tabelle 3-7 zusammengefasst.

Tabelle 3-7

Varianzanalyse der Pigmentmessungen in Pflanzen an dem Szenario H/L.

	V322		n=3		kritischer F	Signifikanz
	F	p				
<i>Kaempfer</i> derivate	1,76	0,213			3,48	n.s.
<i>Quercet</i> inderivate	1,22	0,364			3,48	n.s.
<i>Sinapoyl</i> glukose	0,17	0,949			3,48	n.s.
<i>Sinapoyl</i> malat	1,42	0,295			3,48	n.s.

	V324		n=3		kritischer F	Signifikanz
	F	p				
	0,42	0,788			3,48	n.s.
	0,31	0,867			3,48	n.s.
	2,03	0,166			3,48	n.s.
	4,63	0,023			3,48	*

H0: Pigmentkonzentration ist nicht spektralabhängig im UV-Bereich

H1: Pigmentkonzentration ist spektralabhängig im UV-Bereich

* signifikant p<0,05

** hoch signifikant p<0,01

*** sehr hoch signifikant p<0,001

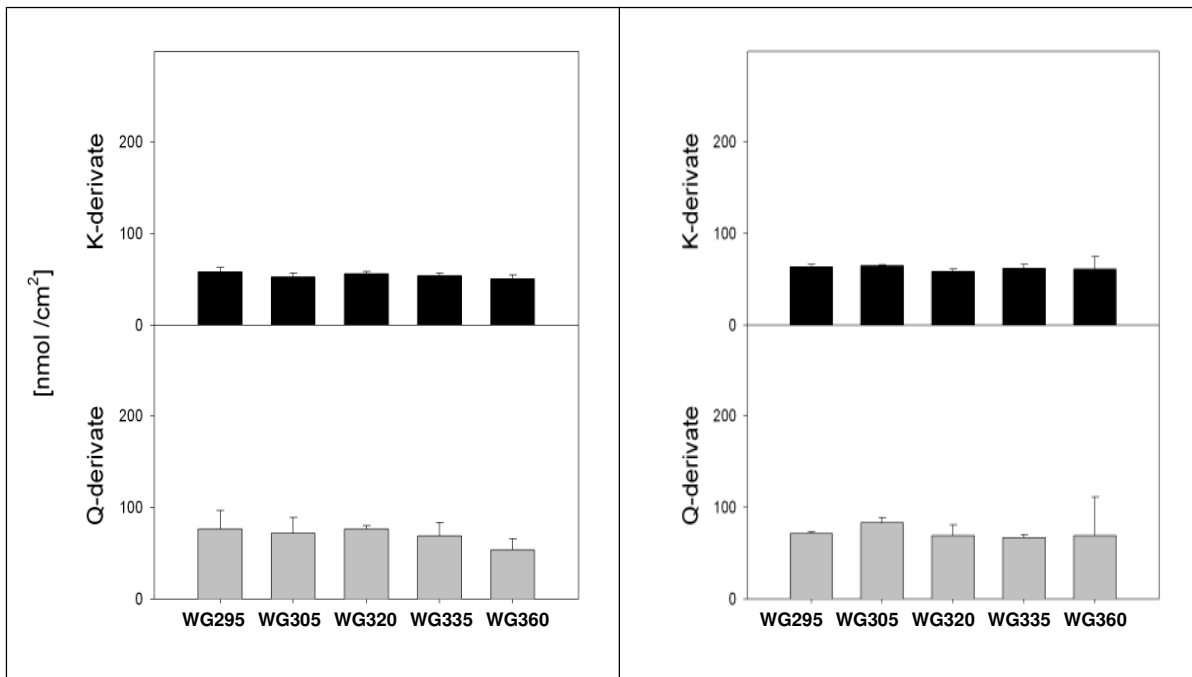


Abbildung 3-12

Spektrale Abhängigkeiten der Gehalte an Quercetin- (Q) und Kaempferolderivaten (K) (H/L).

Links sind die Ergebnisse des Experimentes V322 dargestellt; rechts die des Experimentes V324.

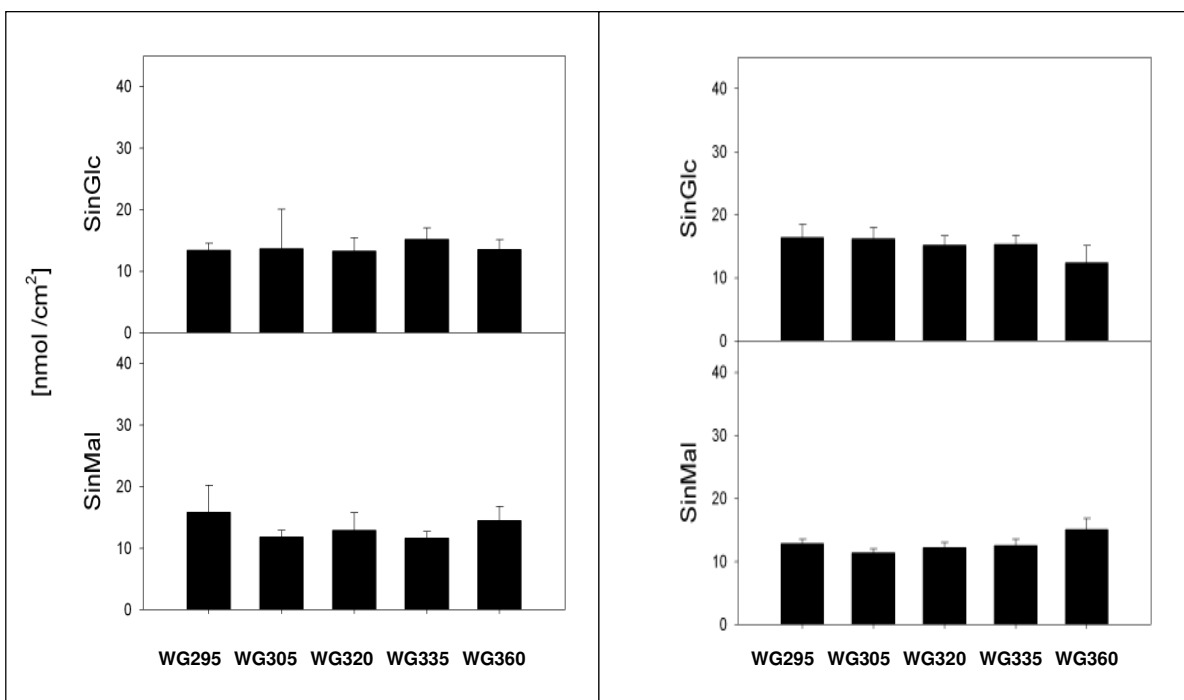


Abbildung 3-13

Spektrale Abhängigkeiten der Konzentrationen an Sinapinsäureestern (SinGlc; SinMal) (H/L).

Das linke Diagramm zeigt die Konzentrationen an Sinapoylglukose und -malat des Versuches V322.

Das rechte Diagramm zeigt die Ergebnisse des Versuches V324.

Mittelwerte und Standardabweichungen der Balken wurden für V322 mit $n = 3$ und für V324 mit $n = 3$ berechnet.

3.4.2 Genexpression der Flavonoidbiosynthese

Im Gegensatz zu den Metaboliten zeigten die Gene der Flavonoid-Biosynthese bei H/L eine ausgeprägte Reaktion auf UV-B-Strahlung (Abbildung 3-14). Die Auswertung der Ergebnisse ist in Tabelle 3-8 zusammengefasst.

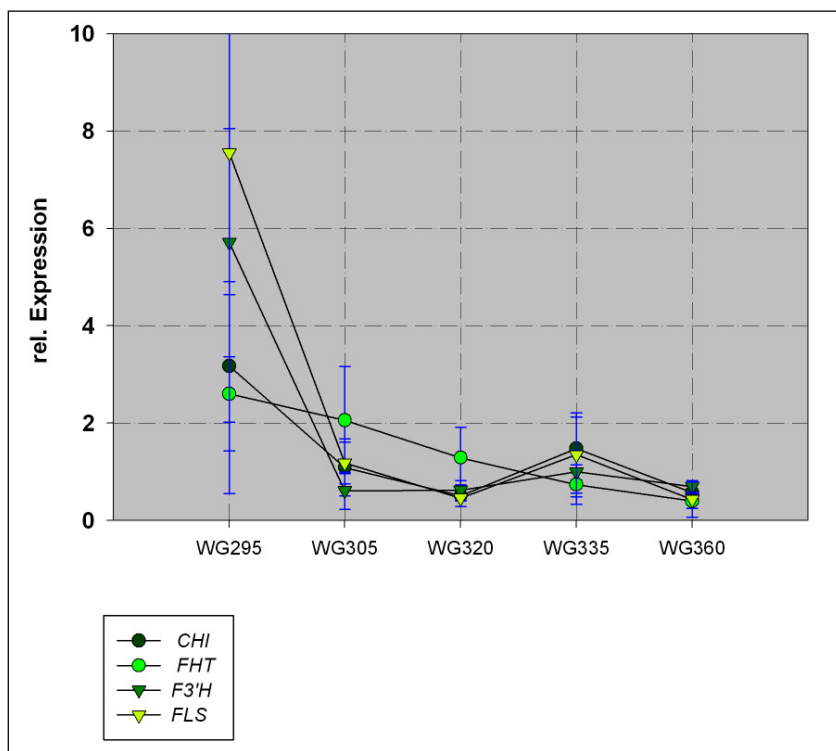


Abbildung 3-14

Spektrale Abhängigkeit der Transkription der Flavonoidbiosynthese-Gene nach 14 d UV-Exposition (H/L).

Tabelle 3-8

Statistische Auswertung der RT-PCR-Analysen des Basisszenarios H/L.

	H/L		kritischer F	Signifikanz	Induktion (+UV-B+UV-A / ohne UV-B)
	F	p			
Chalkonisomerase (n=2x2)	6,10	0,004	3,06	**	2,49
Flavanon 3-Hydroxylase (n=2x2)	2,79	0,065	3,06	n.s.	2,88
Flavonoid 3'-Hydroxylase (n=2x3)	25,46	0,000	2,76	***	4,10
Flavonolsynthase (n=2x2)	5,77	0,005	3,06	**	5,85

H0: Genexpression ist nicht spektralabhängig im UV-Bereich

H1: Genexpression ist spektralabhängig im UV-Bereich

* signifikant p<0,05

** hoch signifikant p<0,01

*** sehr hoch signifikant p<0,001

3.5 Expression der Chalkonsynthase

Die *CHS* ist im Vergleich zu den Flavonoidbiosynthese-Genen der RT-PCR-Messungen in der Pflanze stärker exprimiert. Deshalb konnten die mRNAs der Chalkonsynthase mittels Northern-Blotting untersucht werden. Die Transkripte der Chalkonsynthase zeigten sich in den Experimenten in ihrer UV-B-Induzierbarkeit deutlich von der PAR abhängig. Die Tendenzen der UV-B-Induzierbarkeit der *CHS* waren sehr ähnlich zu den Ergebnissen von *CHI*, *FHT*, *F3'H* und *FLS*. Als Sonde wurde ein EST verwendet (Abbildung 3-15). Auf eine Zusammenführung der beiden Experimente des Szenarios M/H wurde analog zu den RT-PCR-Ergebnissen verzichtet (V320 und V323).

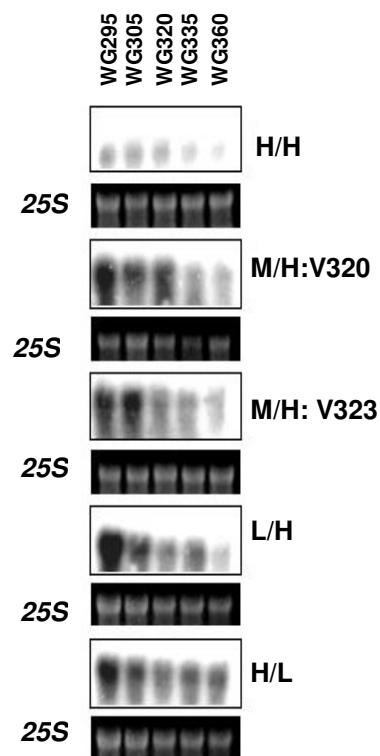


Abbildung 3-15

Spektrale Abhängigkeit der Transkription der Chalkonsynthase nach 14 d UV-Exposition .

Die Abbildung zeigt die Expression der Chalkonsynthase (*At5g13930*). Für den Northern Blott wurden 20 µg Gesamt-RNA auf jede Spur aufgetragen. Um eine gleichmäßige Beladung der Membran sicherzustellen, ist die 25S rRNA in einem mit Ethidiumbromid versetzten Agarosegel fotografiert worden.

3.6 PAR-Abhängigkeit für die Akkumulation an Quercetinderivaten

Neben der statistischen Absicherung der spektralen Abhängigkeit der Wirkung von UV-Strahlung auf die Akkumulation von Quercetinderivaten musste zusätzlich geprüft werden, ob die Konzentrationen der Quercetinderivate einem Einfluss der PAR-Bestrahlungsstärke unterlagen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die spektralen Ergebnisse von H/H gegen die des L/H-Szenarios durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse auf eine etwaige Beeinflussung durch diesen Strahlungsbereich getestet. Damit die Hauptwirkung der Faktoren UV-Strahlung und PAR auf die Akkumulation an Quercetinderivaten geprüft werden konnte, musste eine eventuelle Wechselwirkung zwischen beiden Strahlungskomponenten statistisch ausgeschlossen werden, da es sonst keinen Sinn hätte, die Hauptwirkung von PAR und UV-Strahlung zu testen (Precht & Kraft, 1993). In Tabelle 3-9 sind die statistischen Kenngrößen dieses Tests zusammengestellt. Dort ist ersichtlich, dass die UV-spektrale Wirkung auf einem sehr hohem Signifikanzniveau von PAR abhängig war ($p < 0,001$).

Tabelle 3-9

Statistische Überprüfung der PAR-Abhängigkeit der Synthese der Quercetinderivate.

Variation	Quadratsummen (SS)	Freiheitsgrade (df)	Mittlere Quadratsumme (MS)
PAR Stufen L und H	31072,89074	1	31072,89
UV-Stufen WG295-360	36162,38943	4	9040,60
Wechselwirkung	1737,035051	4	434,26
Fehler	15509,19157	40	387,73
Gesamt	84481,50679	49	

Variation	Prüfgröße (F)	P-Wert	Signifikanz
PAR Stufen L und H	80,14	0,000	***
UV-Stufen WG295-360	23,32	0,000	***
Wechselwirkung	1,12	0,361	n.s.

* signifikant $p < 0,05$

** hoch signifikant $p < 0,01$

*** sehr hoch signifikant $p < 0,001$

3.7 Wirkungsspektrum für die Akkumulation an Quercetinderivaten

Das Ziel der polychromatischen Versuche war es, aus den erhobenen Daten für UV-B-Schutzmoleküle Wirkungsspektren zu erstellen, um damit das Risiko erhöhter UV-B-Strahlung sowie die Strahlungsbeeinflussung des Schutzpotentials dieser Moleküle funktionell zu bewerten. Ein Wirkungsspektrum kann hierbei allgemein als Strahlungsdosimetrie angesehen werden, bei der das Ausmaß der Antwort dadurch getestet wird, dass die Flussraten an Photonen bekannter Wellenlängen variiert werden. Die biochemische Antwort resultiert hierbei aus den Komponenten UV-Spektral($s(\lambda)$), UV-Dosisabhängigkeit ($W(H_{BA})$) und dem Synthesebeitrag der Energiemenge an Photonen des sichtbaren Spektralbereiches q_{PAR} (Holmes, 1997).

Die Ergebnisse der Schirmpigmentanalysen der vier Basisszenarien zeigten, dass unter den verschiedenen Behandlungsbedingungen die Konzentrationen an Kaempferol- und Sinapinsäurederivaten nur geringe Unterschiede aufwiesen, die außerdem nicht statistisch signifikant waren. Hingegen konnten für die Konzentrationen an Quercetinderivaten klare Abhängigkeiten beobachtet werden, die sich wie folgt zusammenfassen lassen (vgl. Anhang C und D):

- a. Zunahme des Gehalts mit zunehmender PAR-Bestrahlungsstärke. Die Abweichung von Variante WG295 M/H können auf die relativ große statistische Streuung dieser Werte zurückgeführt werden.
- b. Zunahme des Gehalts mit zunehmendem Anteil der kurzwelligen UV-Komponenten. Die Gehalte unter der Filtervariante WG295 (hoher UV-B-Anteil) waren mindestens um den Faktor Drei höher als diejenigen unter WG360 (ohne UV-B).
- c. In einem Zusatzexperiment mit der PAR-Variante H und Schott-Filtern WG335 und 360 sowie GG400 und 420 wurde gezeigt, dass die UV-A-Komponenten zwischen 360 und 400 nm keinen Einfluss auf den Gehalt an Inhaltsstoffen haben und demnach nur noch der PAR-Anteil von Bedeutung ist. Dies wird auch durch die geringen Unterschiede zwischen den Werten der Filtervarianten WG335 und WG360 deutlich (Abbildung 3-16).

Die Gehalte an Sinapoylglukose zeigten tendenziell einen ähnlichen Verlauf als die der Quercetinderivate. Ähnlich den Kaempferol-Daten waren die Fehlerbalken für eine Modellierung der Strahlungsabhängigkeit zu groß. Des weiteren zeigten Sinapoylmalat und ein drittes Sinapinsäurederivat keine erkennbare UV-Abhängigkeit.

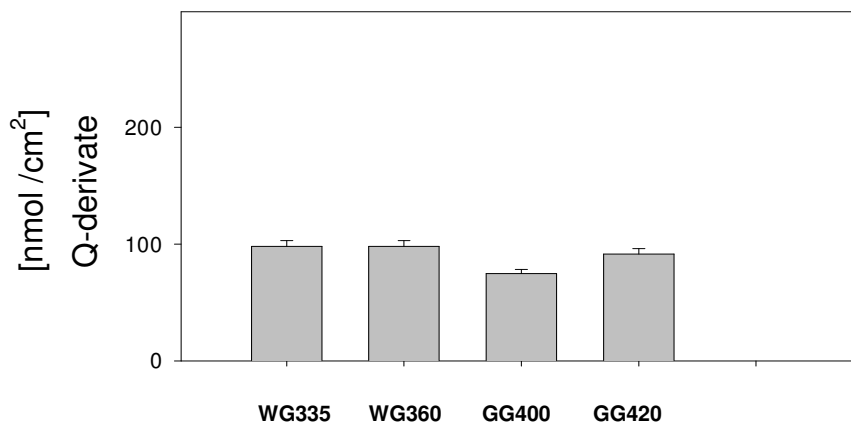


Abbildung 3-16

Akkumulation der Quercetinderivate mit abnehmenden UV-Anteilen (PAR 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Mit GG420 ist die UV-Strahlung vollständig ausgeschlossen worden. Unter GG400, WG360 und WG335 wurden abnehmend kürzerwelligere UV-A-Komponenten appliziert (5% Analysefehler in der HPLC).

Mit den Quercetinderivatkonzentrationen wird im Folgenden die spektrale Abhängigkeit der Produktbildung mathematisch beschrieben und eine geeignete biologische Wichtungsfunktion abgeleitet (BWF). Dazu wurde von der Gesamtkonzentration q_{total} der durch PAR-Strahlung bedingte Gehalt q_{PAR} abgezogen. Zur Parametrisierung von q_{PAR} wurden mit den Quercetingehalten unter den Filtervarianten WG360 eine linearen Regressionsanalyse durchgeführt. Das Zusatzexperiment hatte gezeigt, dass unter Ausschluss von UV-B-Strahlung nur noch die PAR-Komponente zur Bildung der Produkte beiträgt. Die Regressionsanalyse der Daten liefert eine lineare Abhängigkeit nach folgender Gleichung

$$q_{\text{PAR}} = 0.045 \frac{\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2}}{\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}} \cdot E_{\text{PAR}}$$

mit einem Korrelationskoeffizienten $r = 0,85$. Für die Analyse der UV-Abhängigkeit wurden ausschließlich die zusätzlich durch UV-Strahlung induzierten Anteile der

Quercetingehalte $q_{UV} = q_{total} - q_{PAR}$ berücksichtigt. Die reduzierten Quercetin-konzentrationen wurden für jede PAR/UV-Filter-Kombination einzeln bestimmt, wobei negative Werte gleich null gesetzt wurden. Diese reduzierten Daten bildeten die Grundlage für die Berechnung der BWF $s(\lambda)$ für die UV-abhängige Bildung von Quercetinderivaten in den Blattrosetten bei Dauerexposition. Allerdings ist zum Verständnis der BWF zusätzlich die Kenntnis der Dosisfunktion $W(H_{BA})$ erforderlich. Diese beschreibt die UV-induzierten Quercetingehalte als Funktion der mit der BWF gewichteten Bestrahlung. H_{BA} ist die über den UV-Bereich und über die Zeit (z. B. einen Tag) integrierte Strahlungsdosis. Hier fließt die Annahme ein, dass alle UV-Quanten unabhängig von ihrer Wellenlänge den gleichen biochemischen Prozess auslösen, allerdings mit wellenlängenabhängiger Effizienz. Da die Zahl der unabhängigen Behandlungsvarianten bei einer höheren Pflanze auf Grund des großen experimentellen Aufwands sehr beschränkt bleibt (in dieser Arbeit waren es 20 Varianten), wurde die Modellierung mit möglichst einfachen Funktionen in folgenden Schritten versucht:

a) Die spektrale Abhängigkeit wurde als Exponentialfunktion angesetzt (siehe Ibdah *et al.*, 2002)

b)

$$s(\lambda) = \exp[-k \cdot (\lambda - \lambda_0)]$$

wobei $\lambda_0 = 300$ nm die allgemein verwendete Normierungswellenlänge ist. Die logarithmische Steigung k war dabei der ‚Fit‘-Parameter.

c) Die Bestrahlung H_{BA} wird damit

$$\begin{aligned} H_{BA} &= \int dt \cdot d\lambda \cdot s(\lambda) \cdot E_{\lambda}(\lambda, t) \\ &= \int d\lambda \cdot s(\lambda) \cdot H_{\lambda}(\lambda) \end{aligned}$$

wobei $E_{\lambda}(\lambda, t)$ und $H_{\lambda}(\lambda, t)$ die spektrale Bestrahlungsstärke, bzw. Bestrahlung der jeweiligen Versuchsvariante darstellen.

d) Die Dosisfunktion $W(H_{BA})$ setzt die biologisch wirksame UV-Dosis mit den gemessenen und reduzierten Quercetingehalten q_{UV} in Beziehung. Wenn ein line-

arer Zusammenhang mit der Proportionalitätskonstanten w angenommen wird, so ist

e)

$$q_{UV} = W(H_{BA}) = w \cdot H_{BA}.$$

Die Proportionalitätskonstante w ist dabei der zweite ‚Fit‘-Parameter. Die Modellierung lief auf die Schätzung der logarithmischen Steigung k der BWF und des Dosisfaktors w hinaus, wobei der Bereich dieser Parameter aus Plausibilitätsgründen eingeschränkt werden konnte.

$$k \in [1\mu\text{m}^{-1}, 500\mu\text{m}^{-1}] \quad \text{und}$$

$$w \in [0.01 \frac{\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2}}{43.2\text{J} \cdot \text{m}^{-2}}, 1000 \frac{\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2}}{43.2\text{J} \cdot \text{m}^{-2}}].$$

Die numerische Analyse basierte auf einem Zufallssampling mit 10^6 Parametersätzen und einer anschließenden Optimierung der Parameter mit dem SOLVER Makro von MS Excel. Diese Analyse lieferte schließlich:

$$k = 78\mu\text{m}^{-1} \quad \text{und}$$

$$w = 49 \frac{\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2}}{43.2\text{J} \cdot \text{m}^{-2}} = 1.13 \frac{\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2}}{\text{J} \cdot \text{m}^{-2}}.$$

Abbildung 3-17 zeigt sowohl die reduzierten gemessenen UV-Induktionen der Quercetingehalte q_{UV} mit den zugehörigen Messunsicherheiten als Balken als auch die mit den obigen Parametern modellierten Werte als Punkte aufgetragen. In Anbetracht der einfachen Annahmen und der geringen Zahl unabhängiger Versuchsvarianten ist die Übereinstimmung sehr zufriedenstellend. Die größten Abweichungen ergeben sich bei Szenarien mit der Filtervariante WG295, doch liegen sie immer noch innerhalb der experimentellen Unsicherheit.

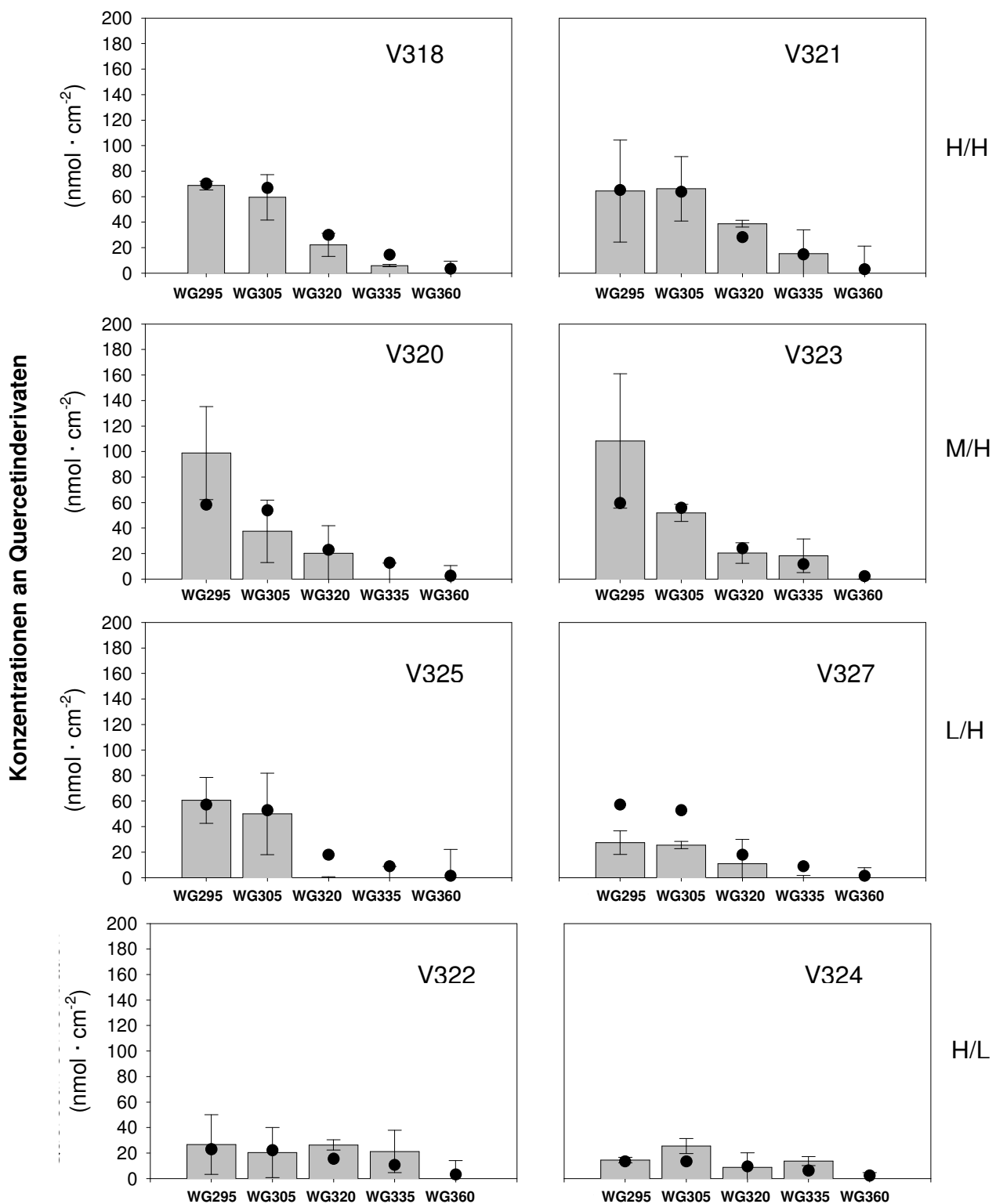


Abbildung 3-17

UV-Dosis-Wirkungsbeziehung bestimmt an Hand der Gehalte an Quercetinderivaten.

Die grauen Balken zeigen die PAR-korrigierten Messwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen. Die schwarzen Punkte entsprechen den kalkulatorischen Werten der Dosisfunktion ($q_{\text{netto}} = W(H_{\text{BA}})$).

3.8 Transkriptomanalyse

Die Transkriptomanalyse wurde mit einem DNA-Array aus 579 ausgewählten Stressgenen durchgeführt. Die Auswahl von heterologen Sequenzmotiven sowie deren Präparation zur DNA-Array-Probe ist in Kapitel 2.3.1 erläutert. Die zahlenmäßige Verteilung der unterschiedlichen Stoffwechselwege des DNA-Arrays ist in Tabelle 3-10 wiedergegeben. In dieser Tabelle werden Gene des Sekundärmetabolismus in drei Gruppen eingeteilt. Die Gruppen Glukosyltransferasen und CYT P450 Monooxygenasen sind von der AG Molekulare Ökologie (PD Dr. Anton Schäffner) aus dem heterologen 3'-UTR-Bereich des Gens hergestellt worden. Diese hochspezifischen Array-Proben wurden basierend auf Sequenzhomologien und funktioneller Motive regeneriert. Die meisten Gene sind jedoch noch nicht biochemisch charakterisiert (Ausnahme: Zimtsäure 4-Hydroxylase). Die dritte Gruppe enthält hauptsächlich ESTs mit größtenteils bekannter Funktion. Diese Gengruppe ist detailliert in Tabelle 3-11 zusammengestellt.

Die Normalisierung und Datenverarbeitung der Expressionswerte erfolgte laut Kapitel 2.5. Die Induktionsfaktoren beider Experimente eines Szenarios wurden in Analogie zu den Ergebnissen der RT-PCRs aus den Kapiteln 3.1 - 3.4 zusammengeführt. Von den ursprünglichen 579 Sequenzen konnten über alle Simulationsexperimente hinweg noch 401 Gene als gemeinsam detektiert geltend gemacht werden. Für jedes Strahlungsszenario wurden insgesamt 30 Arrays hybridisiert. Das Pflanzenmaterial wurde zu diesem Zweck aus drei unterschiedlichen Positionen eines Schachtes beerntet (3 ‚Pools‘ x 5 Schächte x 2 Experimente = 30 Arrays). Mit den normalisierten Werten wurden Induktionsfaktoren gebildet. Als Kontrolleexpressionswert diente der Median der normalisierten Werte aus Schacht WG320.

Tabelle 3-10

Metabolische Kategorien des DNA-Arrays.

Kategorie	Anzahl Array-Proben
Sekundärstoffwechsel:	
Mitglieder der Glukosyltransferasen (AG PD Dr. Schöffner)	126
ESTs und genomisch regenerierte Proben mit größtenteils bekannter Funktion (Dr. Ernst)	23
Cytochrom P450 Monooxygenasen (AG PD Dr. Schöffner)	66
Zelluläre Transportproteine	108
Oxidativer Streß	31
Glutathion-S-Transferasen	54
Glutathion Peroxidasen	11
Glutathion Reduktasen	3
Primärstoffwechsel	14
Wundantwort	33
Ethylenstoffwechsel	15
Photosynthese	23
Zellulärer Signalstoffwechsel	54
DNA-Reparatur	4
Proteinmodifikation	1
Unbekannte Proteine (bzw. Hg/Ozon induzierbar)	10
Jasmonsäurebiosynthese	3
Summe:	579

Tabelle 3-11

Array-Proben des Sekundärstoffwechsels mit größtenteils bekannter Funktion.

Gen	MIPS-Code	Herkunft (ABRC: Arabidopsis Biological Resource Center)
Chorismatmutase	At1g69370	ABRC
Anthranilatsynthase Komponente I-1, Vorläufer	At5g05730	ABRC
Anthranilatsynthase, β -Kette	At5g57890	ABRC
Phenylalanin-Ammoniumlyase (PAL)	At3g53260	aus genomischer DNA (BIOP)
Phenylalanin-Ammoniumlyase (PAL3)	At5g04230	aus genomischer DNA (BIOP)
Phenylalanin-Ammoniumlyase (PAL1)	At2g37040	aus genomischer DNA (BIOP)
4-Cumarat CoA-Ligase (4CL)	At1g51680	ABRC
Cinnamylalkohol-Dehydrogenase (CAD1)	At4g39330	ABRC
Cinnamylalkohol-Dehydrogenase (ELI3-1)	At4g37980	ABRC
Chalkonsynthase (CHS)	At5g13930	ABRC
Chalkonisomerase (CHI)	At3g55120	ABRC
Flavanon 3-Hydroxylase (FHT)	At3g51240	ABRC
Vermutliche Flavanon 3-Hydroxylase	At4g10490	aus genomischer DNA (BIOP)
Flavonolsynthase (FLS)	At5g08640	ABRC
Vermutliche NADPH-Oxidoreduktase (IFR)	At1g75280	ABRC
S-Adenosyl L-Methionin: Trans-Caffeoyl CoA 3-O-Methyltransferase (CCOAMT)	At1g67980	ABRC
O-Methyltransferase (Kaffesäuremethyltransferase; OMT)	At5g54160	ABRC
Ferulasäure 5-Hydroxylase (F5H)	At4g36220	aus genomischer DNA (BIOP)
Indol-3-acetat β -glukosyltransferase (SGT)	AT3g21560	Prof. Strack, Halle
Indol-3-acetat β -glukosyltransferase (SGT)	At4g15480	Prof. Strack, Halle
Indol-3-acetat β -glukosyltransferase (SGT)	At4g15490	Prof. Strack, Halle
Indol-3-acetat β -glukosyltransferase (SGT)	At4g15500	Prof. Strack, Halle
Sinapoylglukose-Malatttransferase (SMT)	At2g22990	aus genomischer DNA (BIOP)

Die hohe Anzahl an Messwerten war für eine statistische Absicherung der Daten nötig, weil UV-Langzeitbestrahlungen erheblich niedrigere UV-B-Induktionen hervorrufen, als transiente Expositionen. Bei einer ‚chronischen‘ UV-B-Behandlung nähert sich der mRNA-Gehalt auf ein physiologisch relevantes Niveau, hingegen ist bei Kurzzeitexperimenten nach wenigen Stunden UV-B-Applikation (oft bei relativ niedrigen UV-Bestrahlungsstärken) bei vielen UV-responsiven Genen ein Maximum an mRNA transkribiert. Dieses hohe Niveau wird jedoch nicht dauerhaft synthetisiert, sondern es fällt rasch wieder ab (Schoenbohm *et al.*, 2000).

3.8.1 Statistische Überprüfung UV-B-responsiver Gene

Die statistische Überprüfung der Induktionsfaktoren wurde durch eine einfaktorielle Varianzanalyse bewerkstelligt. Der Test sollte zeigen, ob zwischen den verschiedenen Spektralkomponenten (WG295-360) der UV-Strahlung signifikante Unterschiede bestanden. Die Vorgehensweise für die Berechnung der p-Werte für die detektierten Gene erfolgte nach Precht & Kraft (1993). Die deutlichsten UV-B-Wirkungen waren offensichtlich in der Simulation L/H vorhanden. Dieses Szenario diente deswegen zur Hauptselektion interessanter Gene. Als Kenngrößen in der so erstellten Liste waren für jedes Gen drei Parameter angegeben. Zuerst ist der Median der sechs Induktionsfaktoren aus WG295 berechnet worden. Neben dem ist zusätzlich der Median_{WG295+WG305} aufgelistet. Das dritte Kriterium stellt der Median_{WG320-360} dar (siehe Anhang A).

Im ersten Schritt der Genselektion wurde die Primärliste aus 227 Genen erstellt, die aus Sequenzen bestand, die sich auf einem signifikanten Niveau UV-spektral abhängig erwiesen ($p < 0,05$). Die hohe Anzahl an signifikant reagierenden Genen konnte auf eine generell geringe Variation innerhalb der Messwiederholungen zurückgeführt werden. Im zweiten Selektionsschritt wurde nach Genen in der Primärliste gesucht, die eine deutliche Hoch- oder Abregulation im Spektralbereich von UV aufwiesen. Zur Bewertung der Spektralabhängigkeit der Genexpression wurde die prozentuale UV-B-Erhöhung bzw. -Erniedrigung mit $\text{Median}_{\text{WG295+WG305}} / \text{Median}_{\text{WG320-360}} \cdot 100 - 100$ für jedes Gen berechnet. Alle Transkripte, die nicht mindestens eine 30%ige UV-B-Erhöhung oder -Erniedrigung erfuhren, wurden von der Liste entfernt. Von den 227 Genen der Primärliste entstand so eine Liste von 149 Genen. Im letzten Schritt wurde mit dieser Liste nach detektierten Genen in H/H, M/H und H/L gesucht und es

blieben 112 Gene übrig, die in allen Simulationen letztendlich den Detektionskriterien entsprachen (vgl. Kapitel 2.4). Von diesen 112 Sequenzen waren im Szenario L/H 104 UV-B-erhöht und acht Klone durch UV-B-Strahlung erniedrigt transkribiert.

3.8.2 Induzierte Gene - Probleme in Folgeanalysen

In zahlreichen Expressionsstudien aus der Literatur beziehen sich die Ergebnisse auf die Mittelwerte von Array-Wiederholungen (z. B. ‚Scatter Plots‘). Die Varianz der einzelnen Gene blieb jedoch unberücksichtigt, bzw. sie wurde zwar angegeben, die statistische Signifikanz wurde jedoch nicht geprüft. Diese Datenpräsentation ist nur vertretbar, wenn sich im Experiment ausgeprägte Induktionen zeigen. Ergebnisse von schwach induzierbaren Genen, vor allem bei niedrigen Signalstärken (vgl. Kapitel 2.5.3), sind ohne Statistik sehr fragwürdig und in Verifikationsexperimenten zum großen Teil nicht zu bestätigen. Wenn die Induktionsfaktoren nicht auf Signifikanz geprüft werden, kann es in einer anschließenden Clusteranalyse zur Zusammenführung von Messwerten kommen, die nur zufällig zu einer Gruppe interessanter Gene gerechnet wurden, was demzufolge zu einer falschen biologischen Interpretation führen würde.

Die Messung der spektralen Abhängigkeit von Expressionsmustern mit dem DNA-Array ist exemplarisch in Abbildung 3-18 dargestellt. Die dazugehörige Grafik ist in Abbildung 3-19 zu sehen. Bei der DNA-Sequenz handelt es sich um ein Transkript aus der Familie der Glukosyltransferasen.

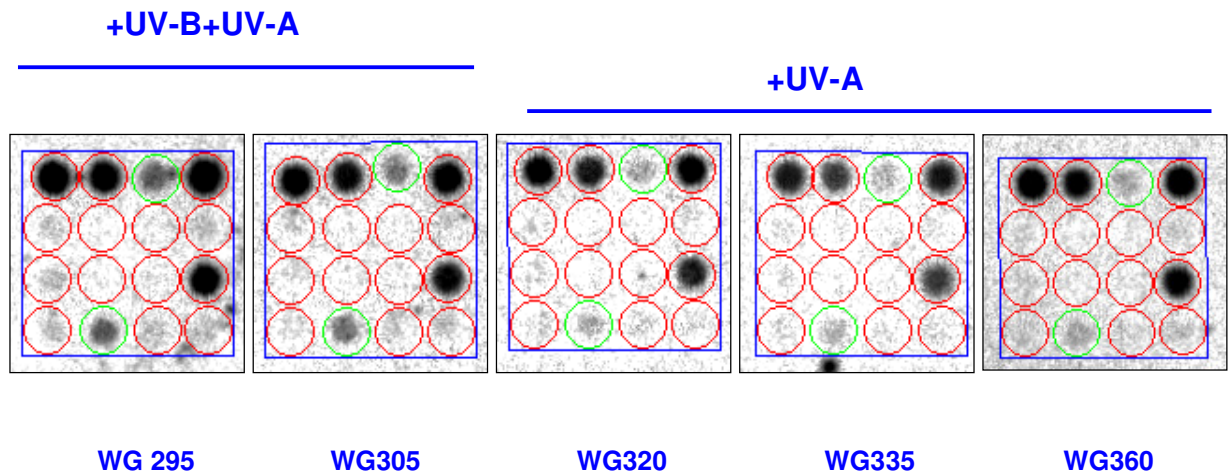


Abbildung 3-18

„Differential Displaying“ mit Hilfe des DNA-Arrays.

Die Abbildung zeigt exemplarisch eine radioaktive Hybridisierungsserie des Szenarios L/H. Die grün eingekreisten ‚Spots‘ sind die Hybridisierungssignale der 3'-UTR-Probe At2g23210. Die rot eingekreisten Transkripte waren nicht durch UV-B-Strahlung induziert.

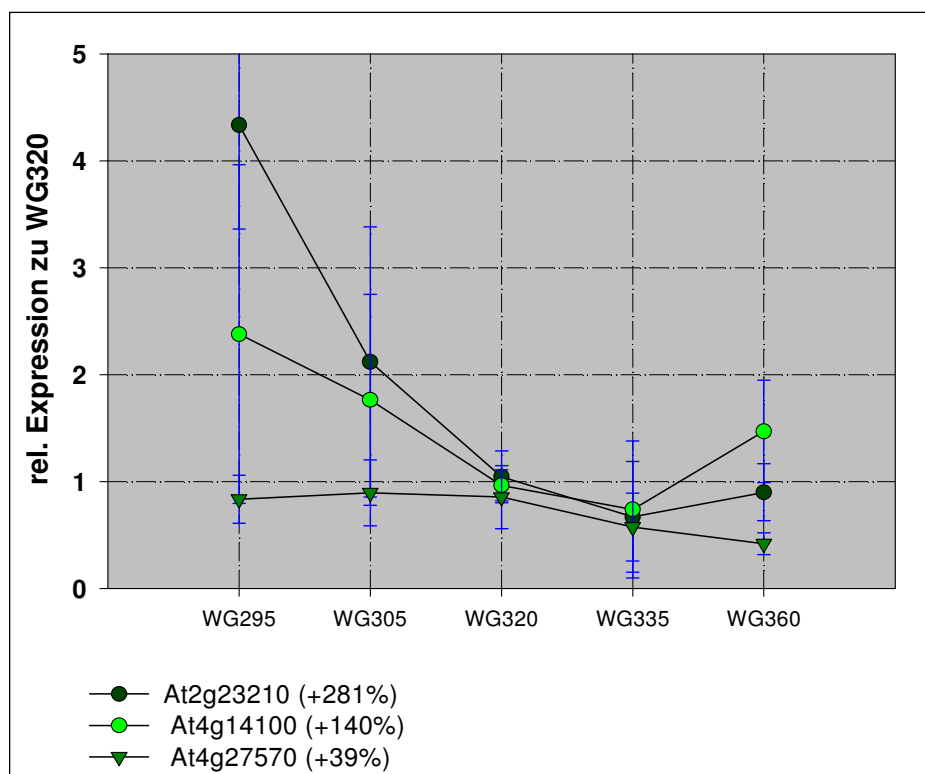


Abbildung 3-19

Unterschiedlich ausgeprägte spektrale Abhängigkeiten (+39% - +281%).

Die drei dargestellten Gene entsprachen den Auswahlkriterien von UV-B-responsiven Genen.

3.8.3 UV-B-responsive Gene

Die Kategorisierung der Transkripte, die auf UV-B-Strahlung reagierten, ergab, dass sich die 112 regulierten Gene in folgende Stoffwechselwege unterteilen ließen (vollständige Liste siehe Anhang A):

UV-B-hochregulierte Gene:

Cytochrom P450 Monooxygenasen (15)
Zelluläre Transportproteine (29)
Glukosyltransferasen (14)
Oxidativer Stress (16)
Photosynthese (4)
Ethylenstoffwechsel (4)
Primärstoffwechsel (7)
Sekundärstoffwechsel (5)
DNA-Reparatur (2)
Pathogenabwehr und Zellregulation (8)

UV-B-abregulierte Gene:

Photosynthese (1)
GSTs (5)
Glukosyltransferase (1)
Zellregulation (1)

3.8.4 ‚Expression-Profiling‘

Die Clusteranalyse als Hilfsmittel zur Sondierung von Genexpressionsdaten wurde erstmals mit *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt (Eisen *et al.*, 1998).

Die eigenen Daten („master tabels“), bestehend aus 401 Zeilen („genes“) und 30 Spalten („Arrays“), mussten zunächst einer Transformation unterzogen werden. Im ersten Schritt wurden die Werte dazu zur Basis zwei logarithmiert. Die Basis zwei ist deshalb gewählt worden, um bei der Ähnlichkeitsberechnung einer doppelten Induk-

tion die gleiche Gewichtung einzuräumen wie einer 0,5fachen Reprimierung. Im nächsten Schritt erfolgte eine Normierung und eine Standardisierung. Sie fand in der Art statt, dass von jedem Expressionswert der logarithmierten Matrix der Zeilen- und Spaltenmittelwert abgezogen wurden und schließlich der Gesamtmittelwert addiert wurde. Die Matrix enthielt nun Werte, deren Zeilen- und Spaltenmittelwerte jeweils 0 betragen. Die Normierung hatte zum einen den Zweck, dass die Expressionen der Gene auf ihren jeweiligen Mittelwert kalibriert wurden, wodurch Tendenzen auf unterschiedlicher Induktionshöhe egalisiert waren. Die zusätzliche Normierung über die Spalten („Arrays“) unterlag zum anderen dem Gedanken, dass mögliche Unterschiede zwischen den Arrays abzugleichen seien. Darunter versteht man systematisch bedingte Fehler, die bei der Benutzung unterschiedlicher Kontrollen denkbar sind oder auch noch zu einem gewissen Maße aus unterschiedlichen Markierungseffizienzen der cDNA-Synthese herrühren konnten. Im letzten Transformationsschritt für die eigentliche Clusteranalyse wurde die normalisierte Matrix auf $s = 1$ für die Zeilen und Spalten standardisiert (Landgrebe *et al.*, 2002).

Die Transformation wurde mit allen ‚master tables‘ der Strahlungsexperimente durchgeführt. Die Daten wurden dann auf die 112 Gene aus Kapitel 3.8.1 reduziert und die Werte auf +UV-B und -UV-B medianisiert. Diese Zahlen entsprachen prinzipiell den Kenngrößen $\text{Median}_{\text{WG295+WG305}}$ und $\text{Median}_{\text{WG320-360}}$ aus Anhang A. Die Ähnlichkeit von Genen wurde in der Clusteranalyse über den Pearsonschen Korrelationskoeffizienten bewertet:

$$r = \frac{\text{COV}(X,Y)}{S_X S_Y} = \frac{1/N \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{S_X S_Y}$$

Dieser lag im Bereich $[-1;1]$ und beschreibt die Ähnlichkeit im Expressionsverhalten zweier Gene ($r = 1$: identisch; $r = 0$: unabhängig voneinander; $r = -1$: gegenläufig). Nach der Berechnung der Ähnlichkeiten aller möglichen Paarungen begann das eigentliche ‚Clustering‘, für das ein hierarchisches System gewählt wurde, welches mit den beiden ähnlichsten Genen startete und für dieses Paar einen Knoten zuwies („NODE“ 1). Gleichzeitig wurde diesem Paar ein neues Expressionsprofil zugeordnet, das sich aus dem Mittelwert der beiden Elemente ergab („average linkage“). Die Ähnlichkeitsmatrix wurde mit diesem Wert aktualisiert. Der Prozess wurde $n-1$ mal wiederholt, bis schließlich ein Element blieb, in dem alle Gene miteinander verbunden

waren (Eisen *et al.*, 1998). Die Clusteranalyse sollte dazu dienen, die Gene zu gruppieren, um biologisch interessante Forschungsbereiche zu finden. Die Expressionsprofile dieser Gene konnten im Anschluss aus den Originaldaten näher in Betracht genommen werden. Die Abbildung 3-20 zeigt die Ergebnisse aus der Clusteranalyse. ‚Node‘ 78 (19 Gene) und ‚Node‘ 73 (9 Gene) enthalten Gene, die ausschließlich im Szenario L/H signifikant durch UV-B-Strahlung zu induzieren waren. Die Trennung der Gene in zwei Gruppen beruht auf den deutlicheren UV-B-Effekt in ‚Node‘ 78. In den Varianten H/H und H/L waren diese Transkripte durch UV-B-Strahlung in ihrer Expression unbeeinflusst. Die Originaldaten der Genexpression der beiden Gruppen sind in Abbildung 3-21 und Abbildung 3-22 dargestellt.

3.8.5 Zelluläre Funktionen der Gene aus ‚Node‘ 78 und 73

Die metabolischen Aufgaben der gruppierten Gene ließen sich allgemein der zellulären Detoxifikation zuschreiben. Sie konnten hierbei in sechs Gruppen eingeteilt werden:

- A. ROS-Detoxifikation (5)
- B. CYP450 Monooxygenasen (6)
- C. Glukosyltransferasen (5)
- D. Zelluläre Transportproteine (5)
- E. Glyoxalasen (2)
- F. Andere (5)

A. ROS-Detoxifikation

UV-B-Strahlung kann oxidative Vorgänge in Gang setzen (Mackerness *et al.*, 1999; Surplus *et al.*, 1998). Primär entsteht nach UV-B-Einwirkung durch gestörte Redoxvorgänge an der Thylakoidmembran ein Superoxidradikal ($O_2^{\cdot-}$). Dieses kann spontan zerfallen oder enzymatisch durch die Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff umgesetzt werden (in den Chloroplasten: FeSOD). Für die Entgiftung von H_2O_2 sind zelluläre Redoxsysteme mit Glutathion notwendig (Jung *et al.*, 2002). Auffällig war, dass ROS-detoxifizierende Gene ausschließlich in L/H aktiv waren, während in den anderen Szenarien dies nicht der Fall war.

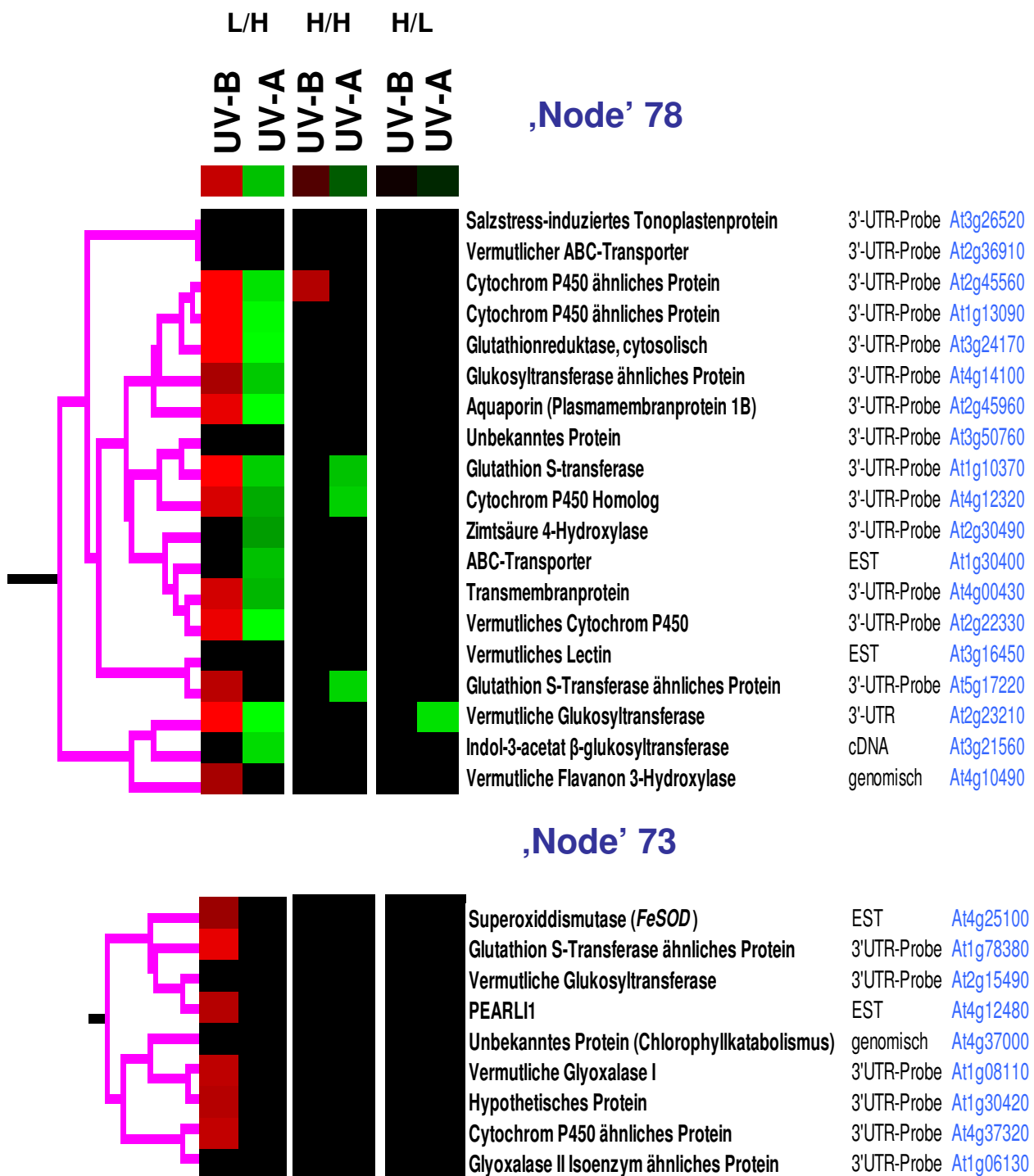
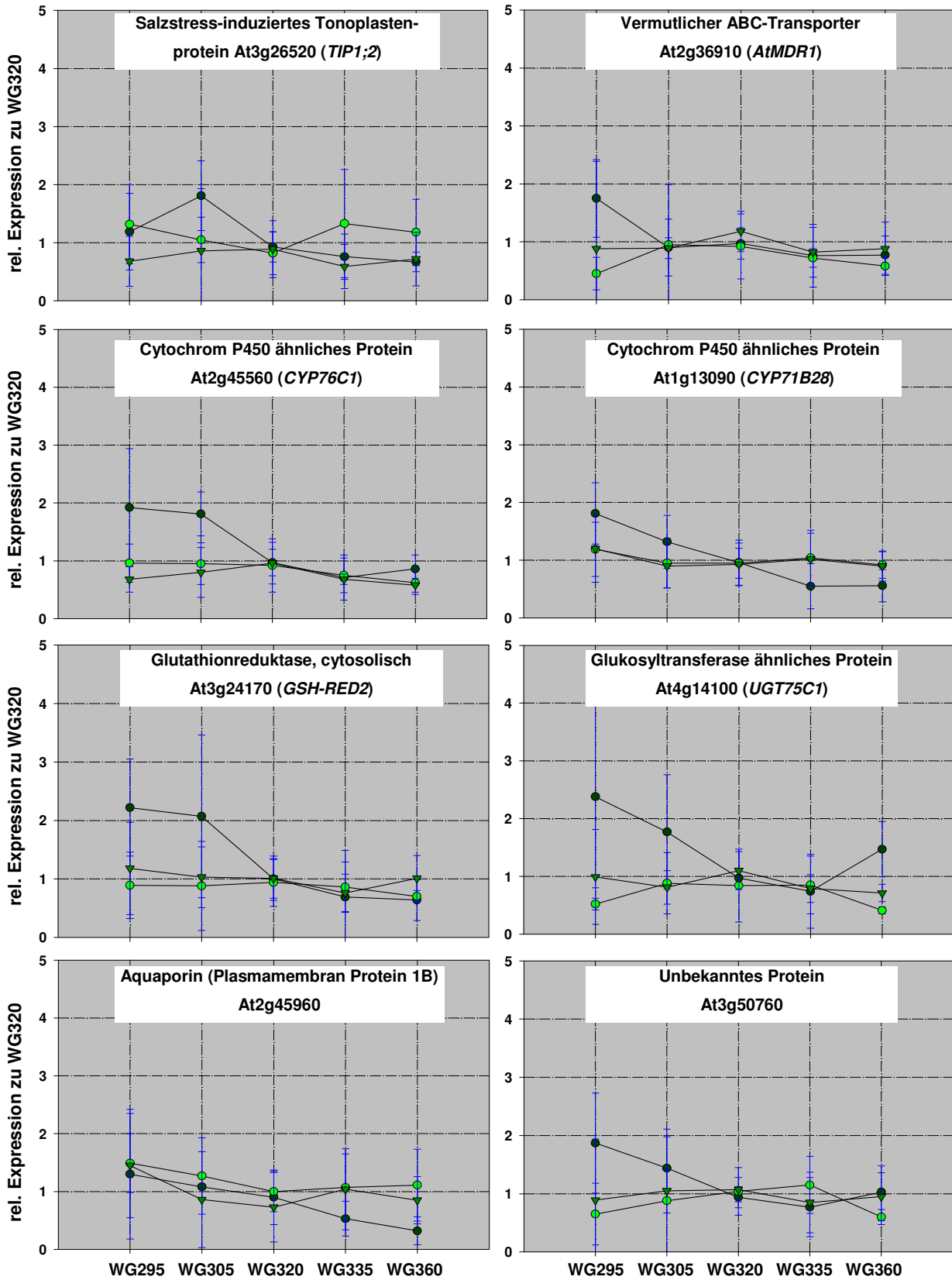


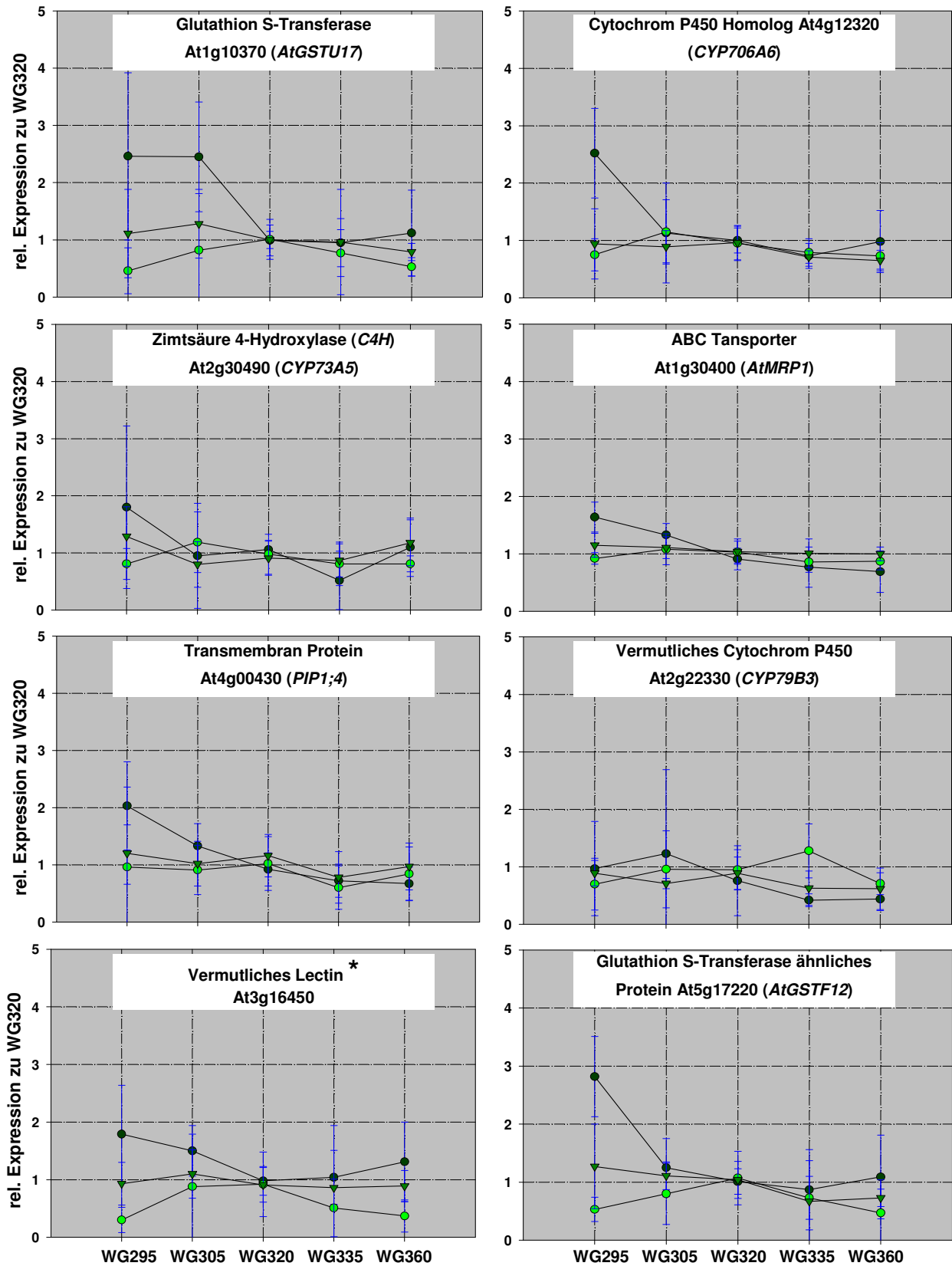
Abbildung 3-20

Clusteranalyse der Genexpressionswerte der Szenarien L/H, H/H und H/L.

Die Abbildung zeigt ,Node' 78 und ,Node' 73. Die Rotintensität visualisiert das Ausmaß der Induktion durch UV-B-Strahlung. Die grüne Farbe zeigt an, dass die Gene in ihrer Expression reprimiert sind (im Vergleich zur Kontrolle aus WG320). Für die möglichen Funktionen der Transkripte siehe Text.

3.8.5.1 Originaldaten aus ‚Node‘ 78





*: Bezeichnung aus MIPS-Datenbank, Proteinvergleich ergab jedoch 61% Homologie zu einem Myrosinase bindenden Protein

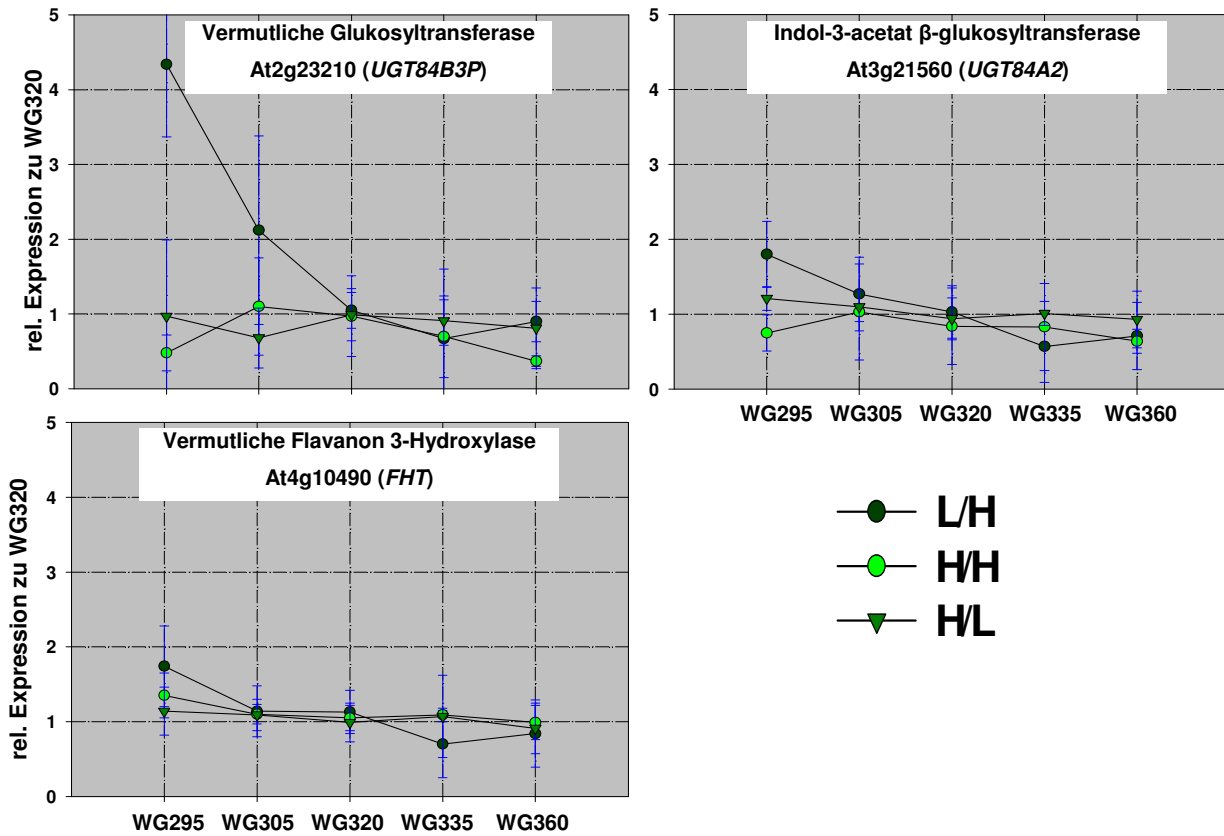
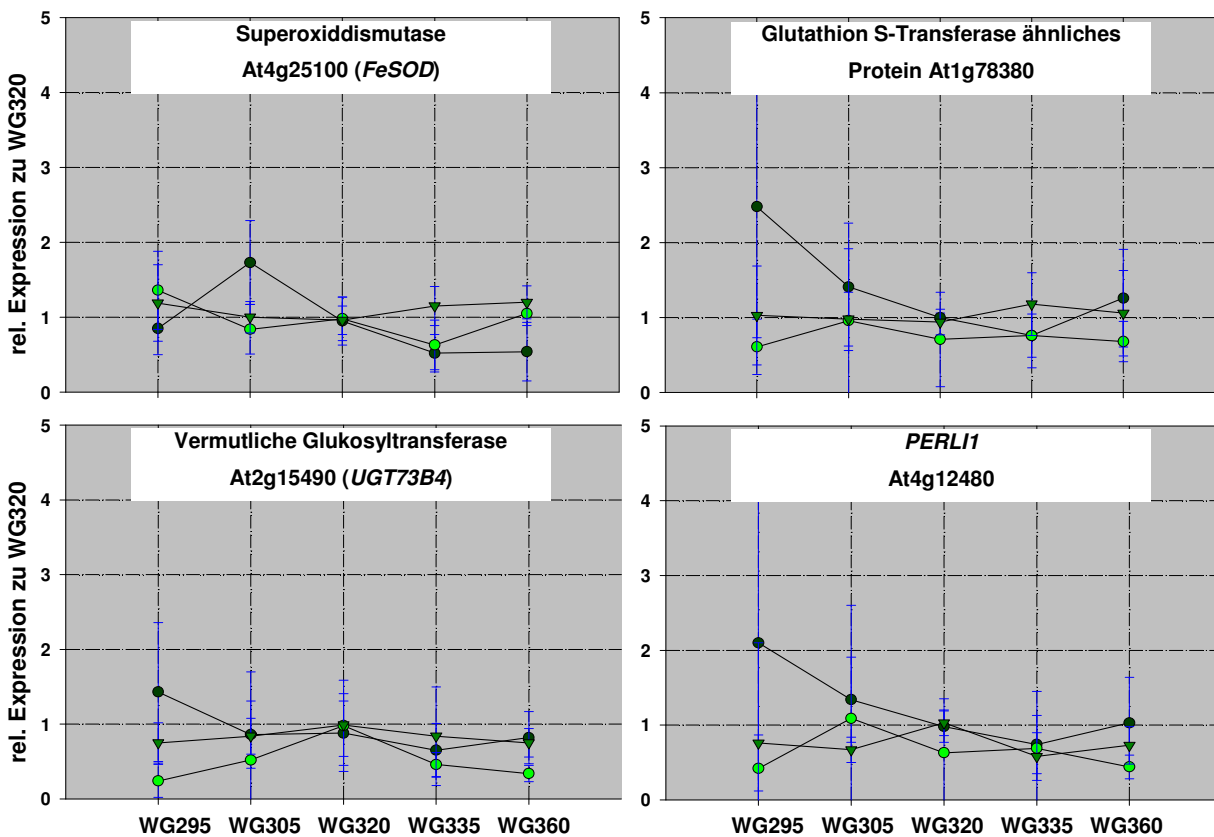


Abbildung 3-21

Originaldaten aus ‚Node‘ 78.

3.8.5.2 Originaldaten aus ‚Node‘ 73



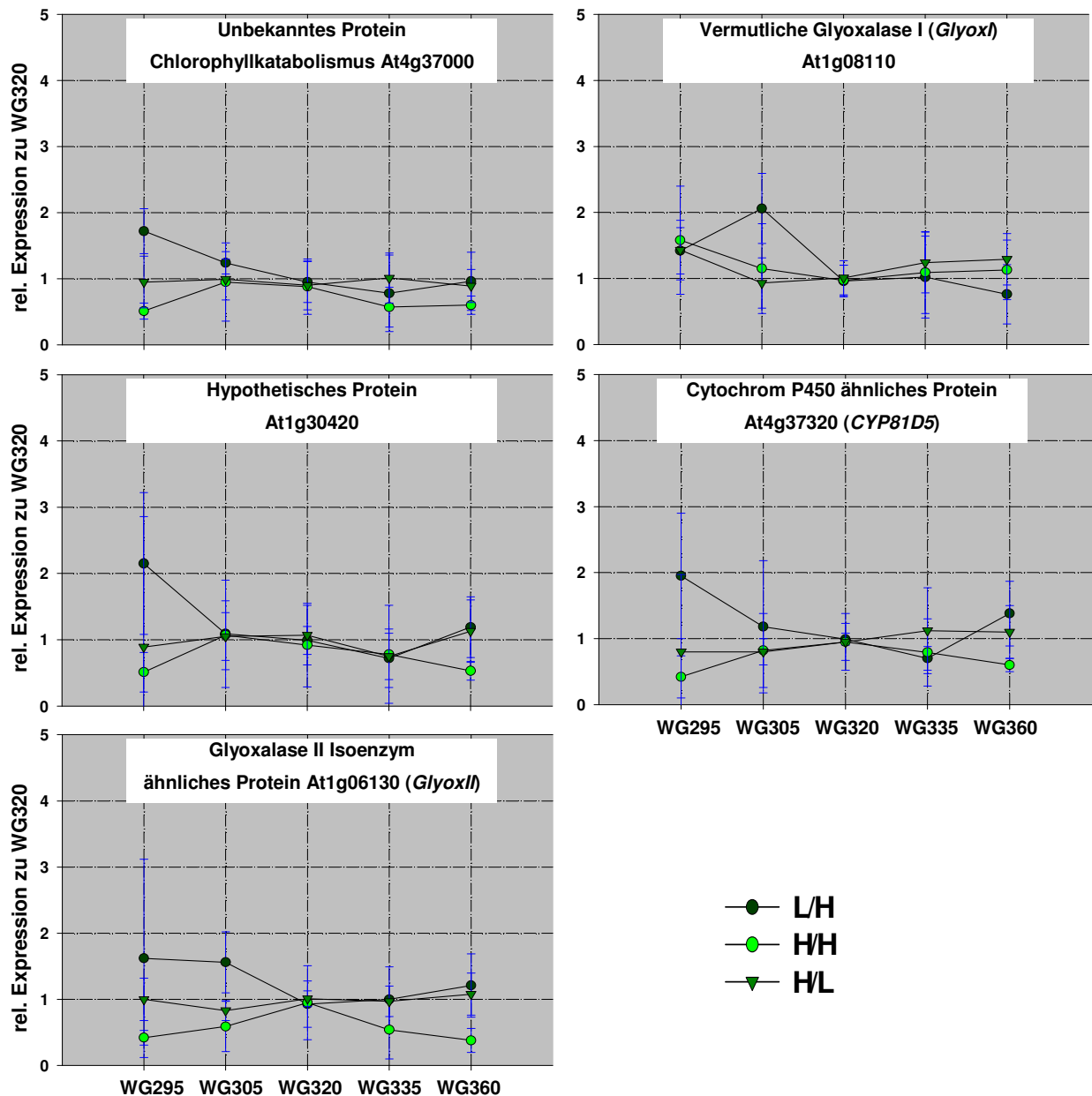


Abbildung 3-22

Originaldaten aus ‚Node‘ 73.

Die chloroplastidäre *FeSOD* (At4g25100), *AtGSTU19* und die Glutathionreduktase (*GSH-RED2*, At3g24170) waren ausschließlich in Szenario L/H aktiv. Das erstgenannte entsorgt Superoxid zu Wasserstoffperoxid (Van Camp *et al.*, 1990). H_2O_2 könnte durch *AtGSTU19* (At1g78380) zu H_2O peroxidiert werden (Bartling *et al.*, 1993; Cheng *et al.*, 1996; Kampranis *et al.*, 2000). *GSH-RED2* würde für diese Reaktion das reduzierte Glutathion zur Verfügung stellen ($G-S-S-G \rightarrow 2GSH$). Das Protein ist zu einer cytosolischen Glutathionreduktase aus *Brassica campestris* zu 92% sequenzhomolog und die Transkripte können durch Ozon oder Paraquat

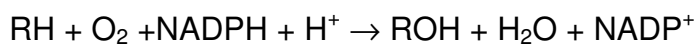
induziert werden. Die Aktivierung durch Paraquat, welches den Elektronenfluss an der Außenseite der Thylakoidmembran unterbricht, spricht desgleichen für die Hypothese, dass Superoxid durch UV-B-Strahlung hauptsächlich am Chloroplasten gebildet wird (Lee *et al.*, 1998).

AtGSTU19 besitzt möglicherweise zwar eine Peroxidaseaktivität, es wird aber als Glutathion S-Transferasen (GST) gewertet. GSTs zeigen sich aber auch besonders bei oxidativem Stress aktiv (Cheng *et al.*, 1996).

Des Weiteren waren die GSTs *AtGSTU17* und *AtGSTF12* in ‚Node‘ 78, gruppiert worden, welche auf ein sekundäres Substrat Glutathion kovalent übertragen können. Durch diesen Reaktionsmechanismus besitzt die Pflanze ein System, mit dem sie zelltoxische Verbindungen in der Vakuole entsorgen kann (Alfenito *et al.*, 1998; Tommasini *et al.*, 1993).

B. CYTP450 Monooxygenasen

Die gruppierten CYTP450 Monooxygenasen waren keine Vertreter der mitochondrialen Atmungskette, sondern sie können an sekundären Verbindungen einen bestimmten Reaktionstyp ausführen. Allgemein übertragen sie molekularen Sauerstoff unter Abspaltung eines Wassermoleküls nach folgender Reaktionsgleichung:



Eine bekannte Monooxygenase zeigte sich als *CYP73A5* (Zimtsäure 4-Hydroxylase), das Zimtsäure zu 4-Hydroxymimtsäure umsetzt (Mizutani *et al.*, 1997). Eine sehr enge Verwandtschaft zu diesem Protein hatte *CYP706A6*, was eine 3',5'-Hydroxylase darstellen könnte (De Vetten *et al.*, 1999; Heller & Forkmann, 1988). Die Hydroxylierungsreaktion dieses Gens und die RT-PCR-Überprüfung sind in Abbildung 3-23 dargestellt. Das Protein könnte Dihydromyricetin herstellen. Als Substrat von *CYP706A6* kommen Dihydrokaempferol und Dihydroquercetin in Frage (De Vetten *et al.*, 1999).

CYP71B28, *CYP76C1*, *CYP79B3* und *CYP81D5* waren zwar durch ihr hydrophobes Segment, mit dem Monooxygenasen typischerweise am rER anhaften, als Monooxygenasen eingeteilt (Kahn & Durst, 2000), über eine metabolische Funktion als solche kann momentan jedoch noch keine klare Aussage getroffen werden.

In *Arabidopsis* sind derzeit nahezu 300 verschiedene Monooxygenasen in 45 Unterfamilien eingeteilt. Sie setzen ein breites Spektrum an natürlichen Substraten um (Williams *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2001). CYP450 Monooxygenasen sind auch bei der Pathogenabwehr aktiv (Whitebread & Schuler, 2000).

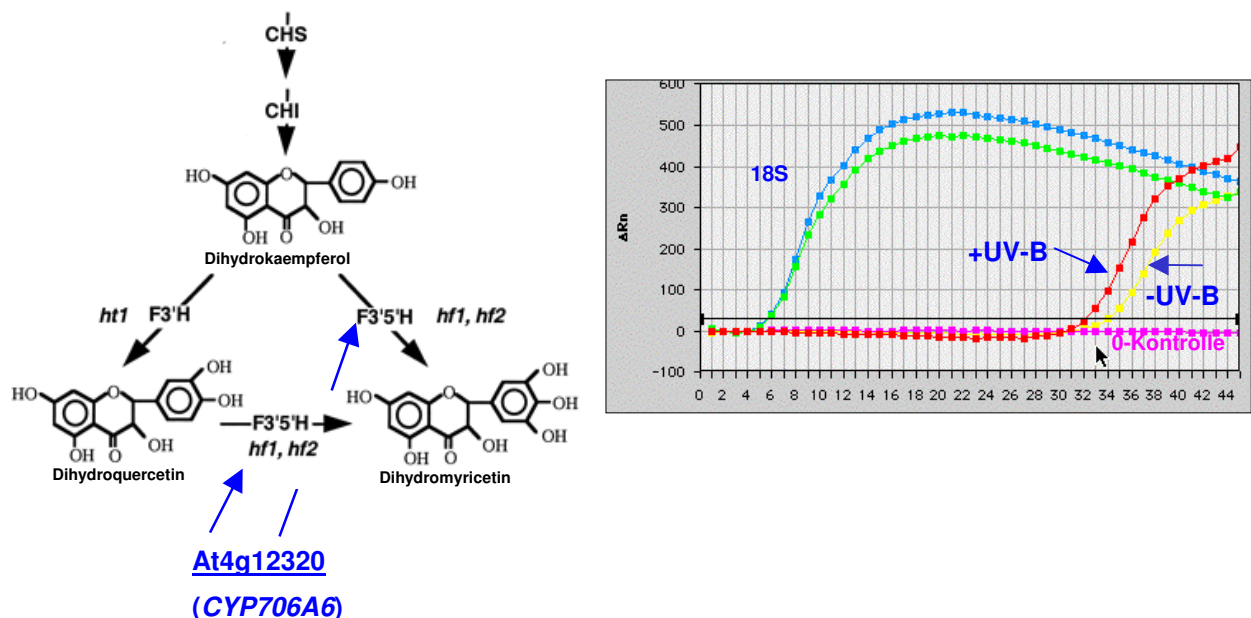


Abbildung 3-23

Überprüfung der Induktion von *CYP706A6* mittels RT-PCR (Szenario L/H).

Die Abbildung zeigt die mögliche Funktion von *CYP706A6* innerhalb der Flavonoidbiosynthese. Die rechte Abbildung zeigt die Verifizierung der DNA-Array-Ergebnisse mittels quantitativer RT-PCR.

C. Glukosyltransferasen

Die Glukosyltransferase *UGT84B3P* (At2g23210) zeigte eine ausgeprägte Spektralabhängigkeit. Die Sequenz besitzt 51% Proteinhomologie zu einer bekannten Limonoidglukosyltransferase aus *Citrus unshiu* (Kita *et al.*, 2000). *UGT84A2* ist nahe verwandt zu diesem Protein, besitzt aber eine Substratspezifität zu Sinapinsäure (Lim *et al.*, 2001). Des Weiteren zeigte *UGT75C1* eine sehr deutliche spektrale Abhängigkeit. Die abgeleitete Aminosäuresequenz war 64% homolog zu einer Anthocyanidin 3-O-Glukosyltransferase. *UGT73B4* besitzt ebenfalls starke Ähnlichkeit zu *UGT75C1*, ein Gen, das durch oxidativem Stress und Salicylsäure induziert wird (Horvath & Chuna, 1996; Picton *et al.*, 1993; Sullivan *et al.*, 2001; Surplus *et al.*, 1998).

Die Oxidation von sekundären Verbindungen durch CYTP450 Monooxygenasen zieht in vielen Fällen eine Glukosyltransferasen-Reaktion nach sich. Die Pflanze kann mit dieser Reaktionsabfolge z. B. Xenobiotika entsorgen (Kreuz & Martinoia, 1999). Glukosyltransferasen verbessern die Wasserlöslichkeit von Verbindungen. Die Glykoside haben einen besseren Zugang zu Tonoplastentransportsystemen und können in der Vakuole über längere Zeit gespeichert werden (Lim *et al.*, 2001; Mock & Strack, 1993).

D. Zelluläre Transportproteine

Für den aktiven Transport in die Vakuole mittels ATP wurden die ABC-Transporter *MDR1* (Subklasse MDR: ‚multidrug resistance proteins‘) (Dudler & Hertig, 1992) und *MRP1* (Subklasse MRP: ‚multidrug resistance-associated proteins‘) gemeinsam in ‚Node‘ 73 gruppiert. Beides sind Vollängentransporter mit unterschiedlicher Domänenreihenfolge. Die MRP-Mitglieder verfügen über die Reihenfolge ABC-ABC-TM-TM (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001), während die MDR-Vertreter die vertauschte Reihenfolge TM-ABC-TM-ABC aufweisen (Tusnady *et al.*, 1997). MRP transportieren glykosidische Flavonoide (z. B. Luteolin 7-O-Diglukuronid) in die Vakuole, während die MDR-Mitglieder für Translokation von degradierten Phospholipiden diskutiert werden (Klein *et al.*, 2000; Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001; Sidler *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1996).

Neben den ABC-Transportern konnten die Transkripte der Membrankanäleproteine At3g26520 (*TIP1;2*), At2g45960 (*PIP1;2*) und At4g00430 (*PIP1;4*) im ‚Node‘ 78 gruppiert werden. Die Gene gehören zu der MIP-Genfamilie (‚membrane intrinsic proteins‘). Sie befördern kleine, polare Verbindungen über Biomembranen (Wasser, Glycerol) und nehmen dadurch eine aktive Rolle bei der Regulation des osmotischen Druckes und der Kompartimentierung von Abbauprodukten der Biomembranen ein (Johanson *et al.*, 2001; Kinoshita *et al.*, 1994; Weig *et al.*, 1997).

E. Glyoxalasen

Die Glyoxalase I (At1g08110) und II (At1g06139) waren beide in ‚Node‘ 73 eingegliedert. Glyoxalasen sind während oxidativer Vorgängen verstärkt aktiv (Skipsey *et al.*, 2000). Die Aufgabe der Enzyme dieser Gene besteht in der Entsorgung des zelltoxischen Stoffwechselnebenproduktes Methylglyoxal, welches beim Abbau von Threonin oder aus Triosephosphaten der Glykolyse gebildet werden kann (Karlson *et*

al., 1994). Im ersten Schritt wird Methylglyoxal nichtenzymatisch zu Hemithioacetal umgesetzt. Die Glyoxalase I isomerisiert dieses Produkt zu S-D-Lactoglutathion, welches durch Glyoxalase II in der Umwandlung zu D-Milchsäure unschädlich gemacht wird. Es ist zwar gezeigt worden, dass Methylglyoxal durch kovalente Bindungen mit der DNA oder durch unspezifische Reaktionen mit Arginin- und Lysinresten als Zellgift stark wirksam ist, warum es jedoch zu einer Überbelastung dieses Effektors kommt, ist weitgehend unbekannt (Hou *et al.*, 1995; Westwood & Thornalley, 1995).

F. Andere

At3g16450 war das einzige Gen in dieser Kategorie, dem eine physiologische Aufgabe bei der Pathogenabwehr zugeschrieben werden könnte (Eckardt, 2001). Das Protein besitzt 61% Homologie zu dem Transkriptionsfaktor *MPB1.2*, der die Myrosinaseaktivität in Arabidopsis (Glukosinolathydrolyse) reguliert (Capella *et al.*, 2001). Die Hydrolyse von Glukosinolaten führt zu Isothiocyanat- oder Nitrilverbindungen, die vor Herbivoren schützen können (Eckardt, 2001).

Hingegen zeigten die Gene At4g10490, At4g12480, At1g30420 und At4g3700 kaum Verwandtschaften zu bekannten Funktionen. Nichtsdestoweniger hatte At4g3700 47% Homologie zu einem Gen des Chlorophyllkatabolismus (Hörtensteiner *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 1998; Tommasini *et al.*, 1998; Wüthrich *et al.*, 2000).

3.8.6 Gengruppe aus ‚Node‘ 107

Kurzweilige UV-B-Strahlung ist biologisch besonders wirksam, weshalb die Mehrzahl der gruppierten Stressgene erhöht transkribiert wurde. Trotzdem legte ‚Node‘ 107 acht unterdrückte Gene zusammen (Abbildung 3-24). Hauptsächlich befanden sich in dieser Gruppe nah verwandte GST-Gene. Die beiden ESTs der Sequenz At1g02930 konnte wegen möglicher Kreuzhybridisierung nicht ausgewertet werden (93% Homologie zu At1g02920). In Abbildung 3-25 sind die Originaldaten der Gene dargestellt. Die Ergebnisse der ANOVA sind in Tabelle 3-12 zusammengestellt.

In der Tendenz war die UV-B-Unterdrückung im Basisszenario L/H am deutlichsten, während sie sich in H/H weniger ausgeprägt darstellte. Die Glutathion S-Transferase *AtGSTF2* war in allen drei Szenarien signifikant durch UV-B reprimiert. Das Protein von *AtGSTF2* konnte subzellulär sowohl in der Plasmamembran als auch an den Mikrosomen lokalisiert werden (Zettl *et al.*, 1994). Die Expression des Gens steigt mit zunehmender Vegetationsdauer und erlangt in den Blättern von blühenden Pflanzen ein Maximum (Zhou & Goldsbrough, 1993). Eine vergleichbare Abregulation von *AtGSTF2* konnte jüngst durch eine blühverzögernde Wirkung einer Bromoxynil-Applikation gezeigt werden (Glombitza *et al.*, 2004). Indessen hatten andere Stressoren, wie Methyljasmonsäure, Ethylen, die Infektion *Pseudomonas syringe* und Sulfonylharnstoffe eine deutliche Induktion dieses Gens bewirkt (Glombitza *et al.*, 2004). Wegen der sehr starken Homologie zu *AtGSTF2* könnten *AtGSTF3* und *AtGSTF7* eine ähnliche Funktion ausführen.

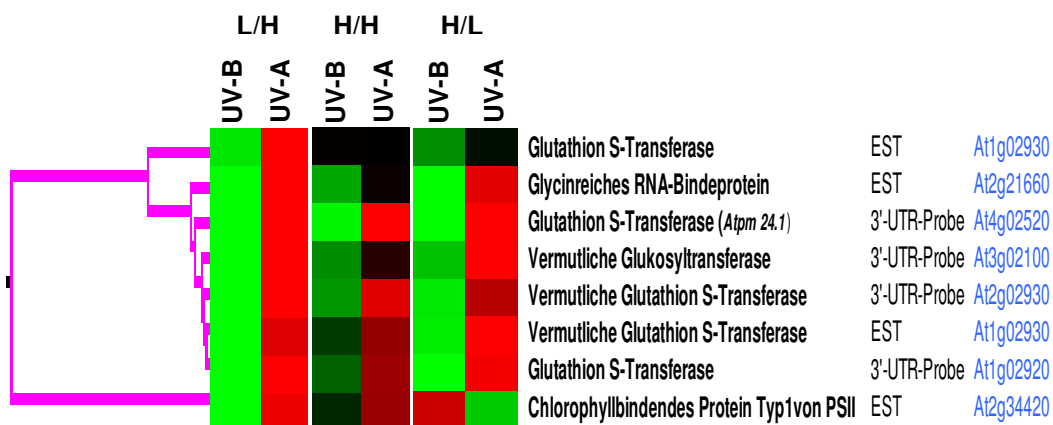


Abbildung 3-24

Clusteranalyse der Genexpressionswerte der Szenarien L/H, H/H und H/L.

Die Abbildung zeigt ‚Node‘ 107. Die Grünintensität visualisiert das Ausmaß der Reprimierung durch UV-B-Strahlung. Die rote Farbe zeigt an, dass die Gene in ihrer Expression induziert sind (im Vergleich zur Kontrolle aus WG320). Für die möglichen Funktionen der Transkripte siehe Text.

Neben den Vertretern der Glutathion S-Transferasen war die Glukosyltransferase *At3g02100* (*UGT83A1*) und das glycinreiche RNA-Bindeprotein (*At2g21660*) durch UV-B-Strahlung abreguliert. Die Transkripte dieser RNA-bindenden Proteine konnten in der Vergangenheit in *Sinapsis alba* als zirkadian reguliert beschrieben werden (Heintzen *et al.*, 1994). Bei *UGT83A1* stellt sich die Funktionszuordnung schwierig dar. In *Phaseolus vulgaris* existiert ein schwaches Homolog von 43% (auf Proteinebene), das der Pathogenabwehr zugeordnet wurde (Tang *et al.*, 2002).

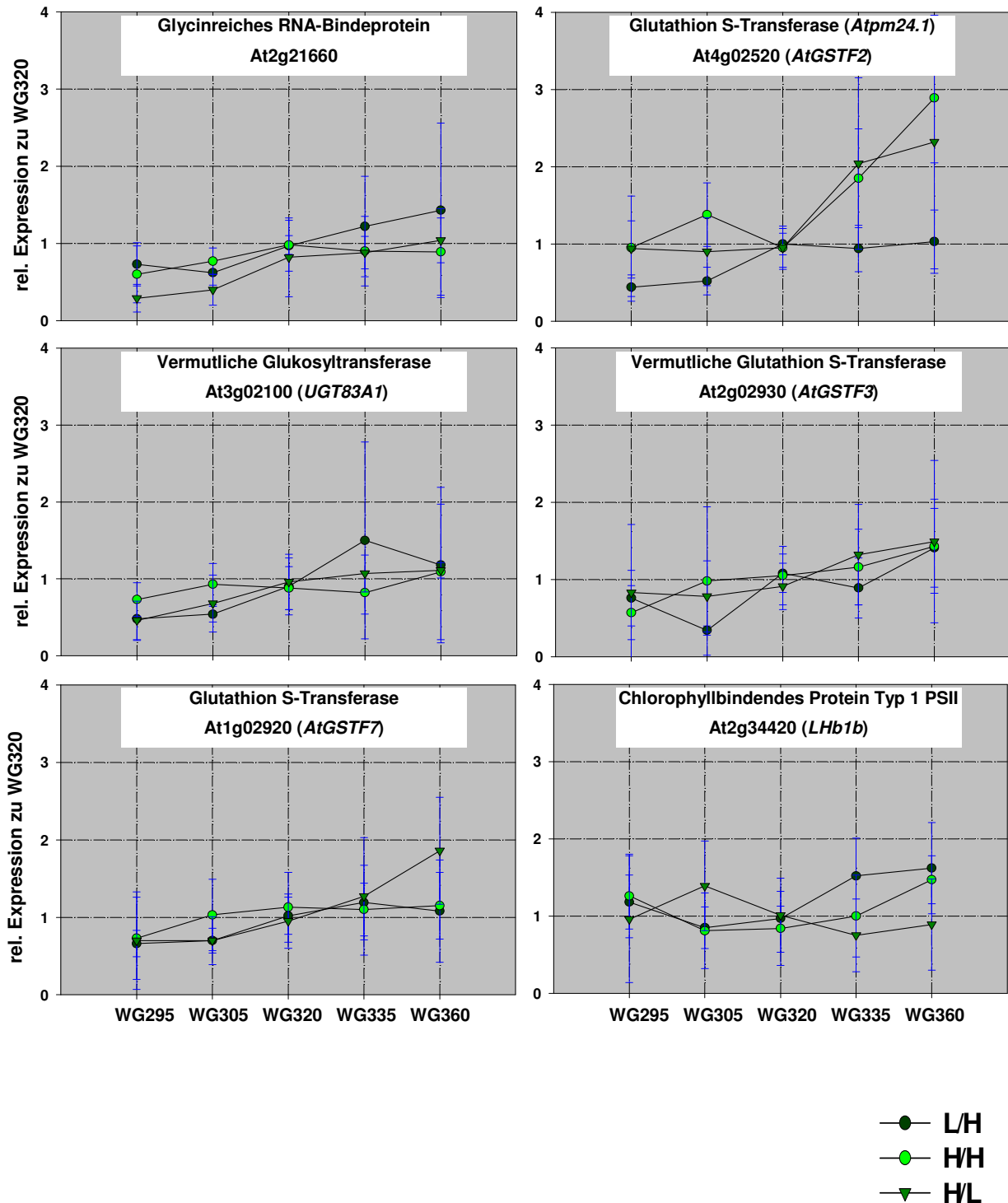


Abbildung 3-25

Originaldaten von ‚Node‘ 107.

Schließlich waren die Transkripte des chlorophyllbindenden Proteins *Lhb1B* (At2g34420) durch UV-B unterdrückt (McGrath *et al.*, 1992), was eine bekannte, typische UV-B-Reaktion ist, die z. B. in *Pisum sativum* gezeigt wurde (Jordan *et al.*, 1991). *Lhb1B* zeigte jedoch keine signifikante Reaktion auf UV-B-Strahlung in den Szenarien H/H und H/L.

Tabelle 3-12

Statistische Auswertung von ‚Node‘ 107.

Das Ausmaß der Reprimierung durch UV-B-Strahlung wird durch rote Pfeile angezeigt (signifikant bei $p < 0,05$). Schwarze Pfeile deuten eine UV-B-Unterdrückung an, die nicht signifikant war.

Gen	L/H UV-B+UV-A (Median _{WG295+WG305})	H/H UV-B+UV-A (Median _{WG295+WG305})	H/L UV-B+UV-A (Median _{WG295+WG305})
Glycinreiches RNA-Bindeprotein	0,65, **, ↓	0,72, n.s., ↓	0,32, ***, ↓↓
Glutathion S-Transferase	0,46, ***, ↓↓	1,17, ***, (UV-A↑)	0,94, **, ↓
Vermutliche Glukosyltransferase	0,54, *, ↓↓	0,79, n.s., ↓	0,59, ***, ↓↓
Vermutliche Glutathion S-Transferase	0,53, ***, ↓↓	0,66, n.s., ↓	0,81, n.s., ↓
Glutathione S-Transferase	0,69, **, ↓	0,94, n.s., ↓	0,70, *, ↓
Chlorophyllbindendes Protein Typ 1 PSII	0,93, ***, ↓	0,97, n.s., ↓	1,24, n.s.

↓ : >0,6 - 1

↓↓ : >= 0,4 - 0,6

↓↓↓ : <0,4

H0: Genexpression ist nicht spektralabhängig im UV-Bereich

H1: Genexpression ist spektralabhängig im UV-Bereich

* signifikant $p < 0,05$

** hoch signifikant $p < 0,01$

*** sehr hoch signifikant $p < 0,001$

3.8.7 Überprüfung der Array-Ergebnisse mittels RT-PCR

Die Überprüfung der Resultate von *AtGSTF2* wurde mit RT-PCR durchgeführt. Die Tendenzen aus den DNA-Array-Ergebnissen konnten dadurch bestätigt werden (siehe Abbildung 3-26 und Tabelle 3-13).

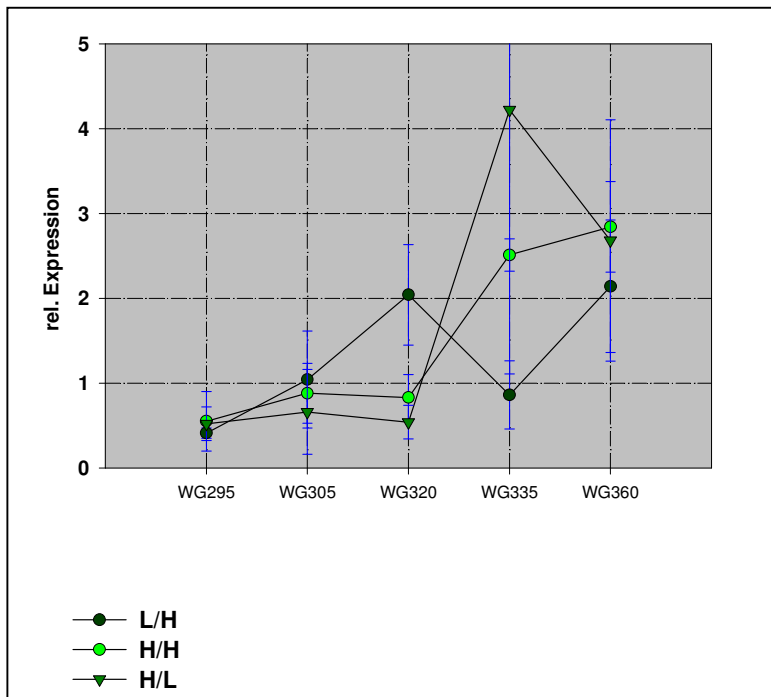


Abbildung 3-26

RT-PCR-Ergebnisse der Transkription von *AtGSTF2* (At4g02520).

Tabelle 3-13

Statistische Zusammenfassung der quantitativen RT-PCR von *AtGSTF2* (At4g02520).

	<i>AtGSTF2</i>		kritischer F	Signifikanz	Induktion (+UV-B+UV-A / ohne UV-B)
	F	p			
L/H	7,86	0,00	3,11	**	0,35
H/H	35,40	0,00	3,06	***	0,35
H/L	4,62	0,01	3,06	*	0,24

H0: Genexpression nicht spektralabhängig im UV-Bereich

H1: Genexpression spektralabhängig im UV-Bereich

* signifikant $p < 0,05$

** hoch signifikant $p < 0,01$

*** sehr hoch signifikant $p < 0,001$

3.9 Photosynthetische Pigmente

Die Pigmentanalytik ist momentan noch nicht für alle Bestrahlungsvarianten durchgeführt worden. Die vorläufigen Ergebnisse sind deswegen in Anhang B abgebildet.

Untersucht wurden die Pigmente des Photosystems II der Versuche V318 und V320. Bei der Gegenüberstellung der Versuche ergaben sich erniedrigte Konzentrationen an Chlorophyllen und Xanthophyllen in V318 aufgrund der $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ höheren PAR-Bestrahlungssärke dieses Versuches. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass in V318 eine Reduktion der Pigmentkonzentrationen im Strahlungsbereich der UV-B-Strahlung stattfand, die bei V320 nicht zu beobachten war. Neben diesen Unterschieden konnte in beiden Bestrahlungsversuchen kein α -Carotin und kein Zeaxanthin gemessen werden.

4 Diskussion

4.1 Biologisches Wirkungsspektrum

Abbildung 4-1 zeigt in logarithmischer Darstellung den Verlauf des Wirkungsspektrums aus Kapitel 3.7 im Vergleich zu einigen weiteren experimentellen und pflanzlich orientierten Spektren aus der Literatur (Ghetti *et al.*, 1999; Ibdah *et al.*, 2002) sowie das generalisierte Pflanzenwirkungsspektrum nach Caldwell (1971). Das letztere stellt eine Synthese aus verschiedenen experimentellen Daten dar, die meist auf monochromatischer UV-Strahlung beruhten. Die Summe dieser Daten führte zu einer Formel, die zudem oberhalb 313 nm willkürlich gleich null gesetzt wurde. Die anderen Wirkungsfunktionen, die mit realistischer polychromatischer, also sonnenähnlicher Strahlung gewonnen wurden, wie auch in der vorliegenden Arbeit, zeigen einen flacheren Verlauf, unabhängig vom betrachteten Endpunkt (Ghetti *et al.* (1999): Photoinhibition; Ibdah *et al.* (2002): Mesembryanthinbildung; Quate *et al.*, (1992): DNA-Schädigung; vorliegende Arbeit: Akkumulation an Quercetinderivaten). Der Unterschied in den Steigungen dieser Wirkungsfunktionen dürfte wegen der experimentellen Unsicherheiten nicht signifikant sein. Unter diesem Gesichtspunkt ist die Ähnlichkeit der Verläufe bemerkenswert. Sie deutet möglicherweise darauf hin, dass viele UV-induzierten Prozesse in der Pflanze auf einen gemeinsames Primärsignal zurückzuführen sind. Einen Hinweis darauf haben frühere Experimente mit transgener Arabidopsis ergeben, bei denen das Auftreten von Pyrimidindimeren im Genom von Pflanzen zu einer Reorganisation und Destabilisierung des Genoms der Pflanze führte (Ries *et al.*, 2000). Alle polychromatischen Wirkungsfunktionen weisen eine signifikante Komponente im UV-A-Bereich auf (315-400 nm). Die Empfindlichkeit ist hier jedoch wesentlich geringer als unterhalb von 315 nm. Da die Wirkung auf die Pflanze jedoch aus dem Produkt aus Wirkungsfunktion und spektraler Bestrahlungsstärke bestimmt wird und im Sonnenspektrum die UV-A-Komponente um zwei bis drei Größenordnungen intensiver ist als im UV-B-Bereich, darf die UV-A-Komponente für die UV-Wirkung auf Pflanzen nicht unberücksichtigt bleiben.

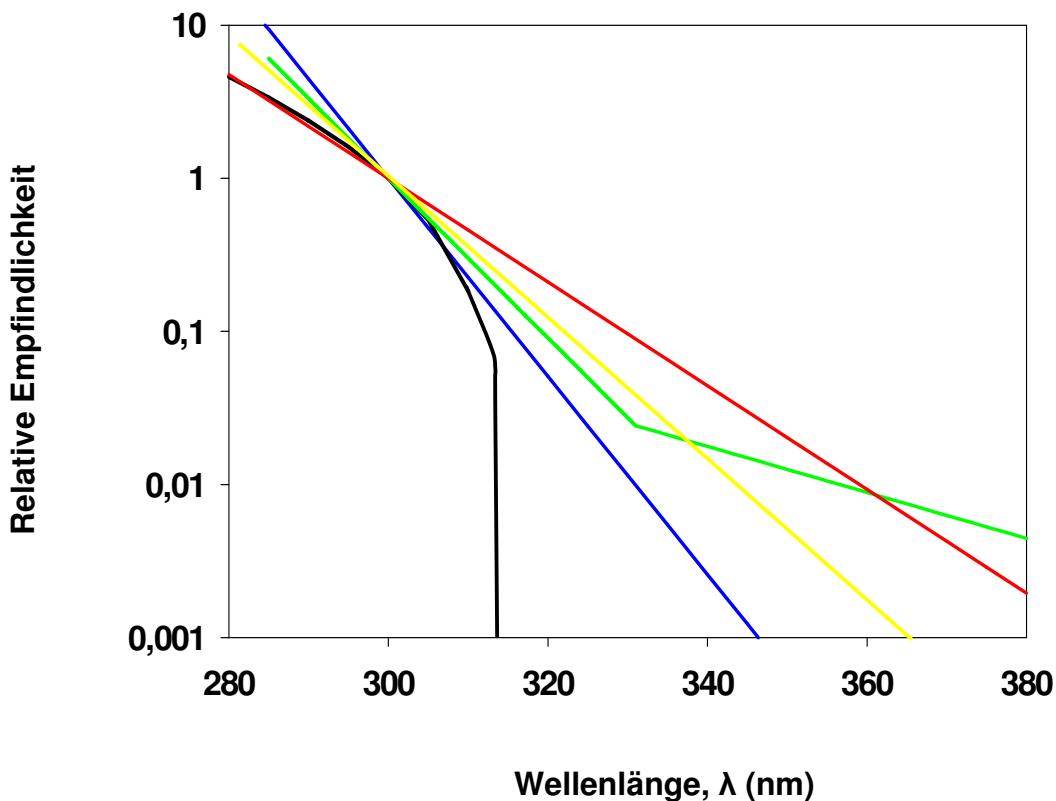


Abbildung 4-1

Vergleich verschiedener Wirkungsspektren (normiert bei 300 nm).

Rote Linie: Akkumulation der Quercetinderivate (eigene Daten); blaue Linie: Mesembryanthinbildung (Ibdah *et al.*, 2002); grüne Linie: Photoinhibition in *Dunaliella salina* (Ghetti *et al.*, 1999); gelbe Linie: DNA-Schädigung (Quaite *et al.*, 1992); schwarze Linie: Allgemeines Pflanzenwirkungsspektrum nach Caldwell (1971).

Die Gehalte an Esterverbindungen der Sinapinsäure und die der Kaempferolderivate zeigten keine signifikanten Spektralabhängigkeiten im UV-Bereich, so dass von diesen Verbindungen keine Wirkungsspektren abgeleitet werden konnten. Das ist eine neue Erkenntnis, die im Gegensatz zu Ergebnissen aus transienten UV-B-Expositionsexperimenten steht, in denen argumentiert wird, dass den Estern der Sinapinsäure eine wichtigere Funktion im UV-B-Schutz zukommt als den Flavonoiden (Stephan, 1996). In der *fah1*-Mutante kann im Vergleich zu der *tt5*-Mutante eine erhöhte Peroxidation der Lipidfraktion nach 72 h UV-B-Einwirkung beobachtet werden (Landry *et al.*, 1995). In den eigenen Experimenten hingegen waren Gene von Proteinen des oxidativen Stresses nur dann durch UV-B induziert, wenn bei hoher UV-B-Intensität die Konzentrationen an Quercetinderivaten niedrig waren (Szenario L/H). Die Sinapinsäureester und die Kaempferolderivate dienen demnach als konstitutiver

Strahlungsschutz, der sich nicht UV-spektralabhängig zeigte. Vielmehr sind Sinapinsäurederivate zu Beginn der Bestrahlungsperiode im Jugendstadium dominant, wobei diese Funktion im späteren Verlauf der Entwicklung und Akklimatisierung verloren geht (Burchard *et al.*, 2000). Die erhobenen HPLC-Profile zeigten, dass den Quercetinderivaten eine besondere Rolle im Schutz der Pflanze gegenüber UV-B-Strahlung einzuräumen ist.

Für diese besondere Funktion der Quercetinderivate spricht, dass sie unter ambienten UV-B-Bedingungen kaum synthetisiert werden. Unter solchen Lichtbedingungen sind Kaempferolderivate dominant und zwar in vergleichbaren Konzentrationen als mit zusätzlichem UV-B (Veit & Pauli, 1999). Das Enzym F3'H spielt also eine kritische Rolle bei der UV-Abschirmung. Das haben Versuche mit *tt7*-Mutanten bestätigt. Die Blockade des Enzyms führt zwar im Vergleich zum Wildtyp unter UV-B-Belastung zu erhöhten Konzentrationen an Kaempferolderivaten, trotzdem sind *tt7*-Mutanten weniger vor UV-B-Strahlung abgeschirmt als Wildtypen. Demzufolge sind Kaempferolderivate weniger effektiv in der UV-B-Abschirmung als Quercetinderivate (Ryan *et al.*, 2001). Quercetinderivate sind in *Arabidopsis* nicht an die Zellwand gebunden, so dass nur die analysierten, wasserlöslichen Verbindungen für eine epidermale UV-Absorption sorgen können (W. Heller, unveröffentlicht).

Weiterhin bleibt zu diskutieren, ob andere Verbindungsklassen des Sekundärstoffwechsels an der UV-B-Abschirmung teilhaben, notwendige Experimente mit z. B. catechin- oder anthocyan-defizienten Mutanten liegen derzeit nicht vor. Catechine werden zwar in *Arabidopsis* synthetisiert, die Konzentrationen sind aber wesentlich niedriger als die der Flavonole (W. Heller, unveröffentlicht). Sie kommen deswegen für eine essentielle Funktion in der UV-Abschirmung kaum in Frage. Die mögliche Bedeutung der Anthocyane im Zusammenhang mit der Abschirmung vor Strahlung wurde bereits in Kapitel 1.3.3.3 geschildert.

4.2 Entwicklungsspezifität der Pigmentbildung

Die Pigmentbildung innerhalb verschiedener Blattetagen stellt sich nach länger anhaltender UV-B-Einwirkung unterschiedlich stark ausgeprägt dar. Das erste Laubblattpaar zeigt z. B. nach UV-B-Bestrahlung in zehn Tage alten *Arabidopsis* eine sehr ausgeprägte Konzentrationserhöhung an Flavonoiden, die nach 28 Tage in dieser Etage nicht mehr existiert. Die UV-B-bedingte Erhöhung an Flavonoiden findet zu

diesem Zeitpunkt vor allem in der vierten Blatttage statt (Lois, 1994). Das jüngste Blatt scheint demnach dasjenige zu sein, das die ausgeprägteste Reaktion auf UV-B-Einwirkung zeigt (Lois, 1994). Eigene Quercetinderivat-Analysen aus unterschiedlichen Blattregionen liefern gute Hinweise dafür, dass die Verbindungen ebenfalls in den jüngeren Blättern der oberen Blatttagen höher konzentriert vorliegen als in den älteren Blättern. Das Wirkungsspektrum aus Abbildung 4-1 resultiert somit aus dem Mittelwert der Akkumulation an Quercetinderivaten verschiedener Blatttagen.

4.3 Interaktion von UV-B-Strahlung und PAR

Die Abhängigkeit des Grundschutzes vor UV-B-Strahlung von PAR ist grundsätzlich seit längerem bekannt (Caldwell & Flint, 1994; Mirecki & Teramura, 1984). Die neuen Versuche unterscheiden sich jedoch von vielen Studien der Vergangenheit, die sich mit dem Einfluss des sichtbaren Strahlungsbereiches auf die UV-B-Schädigung durch verschiedene PAR-Stufen und anschließender UV-B-Exposition beschäftigten. In den eigenen Experimenten hingegen gingen die Spektralkomponenten des sichtbaren und des UV-Bereiches immer parallel einher. Die PAR-Abstufung wurde darüber hinaus in vielen Studien unrealistisch gewählt. So konnte z. B. gezeigt werden, dass bei einer PAR von $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ im Vergleich zu einer niedrigeren mit $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR die UV-B-Absorptionskapazität in der Pflanze signifikant erhöht vorlag (Berkelaar *et al.*, 1996). In Versuchen mit realistischeren Freilandwerten konnte diese Beobachtung ebenfalls gemacht werden, was in Bohnen bei einer biologisch effektiven Tagesdosis von $6,2 \text{ kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (UV-B_{BE}) in Kombination mit drei verschiedenen PAR-Hintergründen ($700, 500, 230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) gezeigt wurde (Cen & Bornman, 1990). Die PAR-Abhängigkeit der UV-B-Reaktion konnte überdies bei einer Freilandsimulation in *Glycine max* festgestellt werden, in der die UV-B-Antwort bei $1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR schwächer ausgeprägt war als bei niedrigem PAR-Hintergrund (Mirecki & Teramura, 1984). Gestützt durch diese Ergebnisse kann angenommen werden, dass die PAR-Abhängigkeit der UV-B-Antwort relativ unabhängig von dem Niveau der PAR-Stufen stattfinden könnte. Ob höhere Bestrahlungsstärken als $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ die Akkumulation an Quercetinderivaten weiter ansteigen lassen, ist nicht zu erwarten, da in einem Experiment mit $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR kein zusätzlicher Anstieg festzustellen war. Bestrahlungsstärken von $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ können in der Natur nur an extrem sonnigen Tagen gemessen werden. Dauerhaf-

te Expositionen unter diesen Bedingungen führen demnach zu einem Stresszustand, den die Pflanze nicht mehr durch eine Erhöhung des Grundschutzes ausgleichen kann.

4.4 Akklimatisierung von Pflanzen an Strahlungsbedingungen

Der Begriff Akklimatisierung beschreibt einen Reaktionszustand der Pflanze, der nach länger anhaltender Bestrahlungsdauer weniger aktiv ist als zu Beginn der Exposition. Während der Akklimatisierungsphase an erhöhte Strahlungsbedingungen ereignen sich im Organismus ausgeprägte biochemische Reaktionen. Die starke Antwort zu Beginn setzt oft schon nach wenigen Stunden Bestrahlung ein. In welchem Ausmaß diese Akklimatisierungsreaktionen stattfinden, ist in erster Linie von den Vorkultivierungs- und den physikalischen Bestrahlungsstärken abhängig. In Cyanobakterien sind die Anpassungsreaktionen an Hochlichtbedingungen sehr ausgeprägt, wobei bereits nach 15 min Bestrahlung eine Vielzahl an Transkripten der Photosynthese induziert wird (Hihara *et al.*, 2001).

Der Begriff Hochlicht unterliegt dabei in der Literatur keinen definierten Strahlungsintensitäten, so dass in den eigenen Versuchen bei einer PAR von $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ von Niedriglicht gesprochen wird, während andere dieses Niveau bereits als Hochlicht festlegen (Bailey *et al.*, 2001).

Die Pflanze zeigt nach einer UV-B-Exposition schon nach einem Tag eine gesteigerte Aktivität an antioxidativ wirksamen Genen. Bei gleichbleibender UV-B-Bestrahlung über mehrere Tage geht diese Aktivitätserhöhung verloren (Jansen, 1998). Auf welchen molekularen Grundlagen diese Beobachtungen beruhen, ist weitgehend unbekannt. Das Ausbleiben der UV-B-Reaktion nach mehreren Tagen Bestrahlung kann physiologisch bedeuten, dass die Pflanze eine gewisse Zeit benötigt, um Absorptionmoleküle für den Strahlungsschutz zu bilden. In *Spirodela oligorrhiza* dauert die Synthese der Schutzpigmente etwa zwei Tage. Die deutlichen Reaktionen von Genen des antioxidativen Stoffwechsels am ersten Tag sind somit nur Ursache mangelnder Schutzmöglichkeiten, die im Laufe der Zeit durch die Akkumulation von phenolischen Inhaltsstoffen abgeschwächt werden (Jansen *et al.*, 1996).

Die zirkadiane Rhythmik der Pflanze unterliegt ebenfalls einer Art Akklimatisierung. Nahezu alle mRNA-Spezies des Phenylpropanoidstoffwechsels zeigen eine zirkadianen Tagesrhythmik, dessen Amplitude am zweiten Tag abnimmt (Harmer *et al.*, 2000).

Ob dieser Rhythmus nach mehreren Tagen weiter abnimmt, ist nicht bekannt. Es deutet sich aber an, dass der zirkadianen Regulation einer Akklimatisierung unterliegt, deren Ausmaß überdies von PAR abhängig sein könnte. Es ist vorstellbar, dass die Akklimatisierung der zellulären Rhythmik ebenfalls mit der Zeitverzögerung der Absorptionsausstattung der Pflanze in Zusammenhang steht.

Insgesamt wurde in den Simulationsexperimenten eine Strahlungsperiode von 14 Tagen UV-B eingehalten. Die in Kapitel 3 dargestellten Ergebnisse können als Integral der Bestrahlungszeit angesehen werden. Für die zeitliche Entwicklung von Schutzmolekülen ist zu vermuten, dass bei der H/H-Variante im früheren Stadium der Bestrahlung durch die begleitende hohe Bestrahlungsstärke an PAR sich für die Pflanze eine strahlungsadequate Konzentration an Quercetinderivaten einstellt, die sich wahrscheinlich im späteren Verlauf der Vegetationsperiode wenig verändert. Die Schwierigkeit des Verständnisses der Dynamik der Akkumulation von Quercetinderivaten liegt darin, dass nach dem momentanen Wissensstand nichts über den Katabolismus bekannt ist. Aufgrund eigener Messungen ist anzunehmen, dass diese Moleküle, zumindest während des vegetativen Wachstums der Pflanze, wenig Abbau erfahren. Vergleicht man die Mittelwerte der beiden Hoch-UV-B-Varianten mit niedrigem und hohem PAR-Hintergrund, so könnte das Ergebnis derart interpretiert werden, dass im früheren Stadium der Bestrahlungsperiode die Endkonzentrationen der Quercetinderivate geregelt werden. Im Szenario H/H fällt dieses Signal entsprechend höher aus als bei der Variante L/H. Um die Frage des zeitlichen Moments der Einstellung des notwendigen Gehaltes an Quercetinderivaten experimentell zu belegen, wären kinetisch ausgerichtete Versuche beider PAR-Hintergründe notwendig. Festzuhalten bleibt weiterhin, dass 25 mW UV-B_{BE} (H/L) mit einem vergleichbaren PAR-Hintergrund als bei H/H nicht ausreichen, um die UV-B-Erhöhung der Konzentration an Quercetinderivaten über die Wachstumsperiode herbeizuführen.

4.5 Gene des Sekundärmetabolismus

Unter den in Kapitel 3.8.3 vorgestellten UV-B-responsiven Genen waren fünf Gene aus dem Sekundärmetabolismus der Tabelle 3-11 enthalten (siehe Anhang A; Sekundärstoffwechsel). Die übrigen 18 Gene dieser Tabelle entsprachen nicht den Auswahlkriterien UV-B-responsiver Gene aus Kapitel 3.8.1. Dies sollte aber nicht zu

der generellen Aussage führen, dass sie keine Reaktion auf UV-B zeigten, vielmehr können sie wegen schwacher Signale nicht mit der Array-Technik detektiert werden. Das große Problem der DNA-Array-Technik ist die relativ niedrige Sensitivität im Vergleich zur RT-PCR. Trotzdem sind im Anhang A unter der Kategorie Sekundärstoffwechsel zwei bekannte Gene der Flavonoidbiosynthese enthalten, die signifikante PAR-Effekte zeigten, nämlich die Chalkonsynthase (*CHS*) und die Chalkonisomerase (*CHI*). Die Expression der Gene wurden mit Hilfe von Northern Blotting bzw. RT-PCR verifiziert. Weiterhin wurden die Gene für die bekannten Enzyme FHT, F3'H und FLS mit RT-PCR untersucht, so dass für die Flavonoidbiosynthese ein vollständiges Expressionsmuster vorliegt. Ein Beispiel für ein aufgetretenes Problem bei den Array-Messungen sei anhand der Flavonolsynthase kurz dargestellt. Das Gen ist auf dem DNA-Array in der Koordinate E12 zu finden (siehe Abbildung 2-8; Position 2). In der Nachbarschaft befinden sich zwei auffällig stark exprimierte Gene, die den Hintergrundwert ‚LB‘ dramatisch anheben. Das Gen hat zwar ein Signal, liefert aber durch den hohen Hintergrund einen kleinen normalisierten Wert, der entsprechend hoch mit einem Fehler behaftet ist.

Die Genexpression der Flavonoidbiosynthese zeigte sich bei H/H nicht mehr UV-spektralabhängig. Dieses Verhalten der Genaktivität widersprach prinzipiell den Modellvorstellungen der Wirkungsspektroskopie, die an der Pflanze bei höherer Bestrahlungsenergie einen größeren biochemischen Effekt unterstellt, als das bei niedrigeren Energiestufen der Fall sein müsste. Die untersuchten Gene waren jedoch bei L/H und auch bei H/L induziert. Vergleicht man die Ergebnisse mit den Metabolitdaten, so ergeben sich daraus zwei Fragen:

1. Wieso sind die Gene bei dem Szenario H/H nicht mehr aktiv?
2. Wieso sind die Gene bei H/L aktiv?

Auf den ersten Blick würde man vermuten, dass diese Ergebnisse, betrachtet man zunächst nur die Transkription der *F3'H*, das genaue Gegenteil des Metabolitenbildes widerspiegeln, in dem sich die Quercetinderivate fast gegenläufig darstellen. Die physiologischen Vorgänge in der Pflanze präsentierten sich nach der Bestrahlungsperiode wesentlich komplexer, als man das auf den ersten Blick annehmen konnte. Um sich das Verhalten der Gene mit dem Verlauf der Schutzmoleküle zu er-

klären, müssen die Aspekte der Akklimatisierung und die sich daraus ableitende UV-B-Absorptionskapazität betrachtet werden.

Der PAR-abhängige Aufbau an Schutzmolekülen vollzieht sich wahrscheinlich in den ersten Tagen der Strahlungsexposition. Bei der Endpunktbestimmung liegt in der oberen Epidermis eine physiologisch relevante Konzentration an Quercetinderivaten vor, die das darunter liegende Mesophyllgewebe vor UV-B-Transmission schützt. Die epidermale Anreicherung hätte eine Gewebespezifität der Genexpression zur Folge, die sich innerhalb des Blattquerschnittes differentiell zeigen müsste, da in der Epidermis weniger UV-B-Strahlung zellulär aktiv wäre, während die biochemische Hauptreaktion in den pigmentarmen Mesophyllzellen stattfinden müsste. Diese Differenzierung konnte bereits für die *CHS* in *Pisum sativum* gezeigt werden. Zum einem wurde in dieser Studie gezeigt, dass die *CHS* nach 9 h UV-B-Exposition in den Mesophyllzellen stärker exprimiert war, als in der darüberliegenden Epidermis. Zum anderen führte eine Akklimatisierung der Pflanzen zu einer Abschwächung der gewebespezifischen Unterschiede (Kalbin *et al.*, 2001). Die Bestrahlungszeit von 14 Tagen führt zu einer vollkommen akklimatisierten Pflanze, die sich über die Zeit einen physiologisch notwendigen Strahlungsschutz angeeignet hat. Liegt im Szenario H/H die Konzentration an Schutzmolekülen entsprechend hoch in der Epidermis vor, führt das schließlich dazu, dass in diesem Gewebe keine UV-B-Antwort von Genen der Flavonoidbiosynthese stattfindet. Weiterhin würde dabei epidermal nahezu die gesamte UV-B-Strahlung absorbiert werden, was eine verminderte Reaktion im Mesophyllgewebe zur Folge hätte und sich letztendlich das gesamte Expressionsbild der Blattrosette UV-B-unbeeinflusst darstellt. Tatsächlich konnte an epidermalen Transmissionsstudien gezeigt werden, dass UV-Pigmente der Epidermis mehr als 90% der einfallenden UV-B-Strahlung absorbieren können (DeLucia *et al.*, 1992).

Die Reaktionen der Gene der Flavonoidbiosynthese auf UV-B-Strahlung können demnach indirekte Effekte sein, die je nach Ausstattung an Schutzmolekülen hauptsächlich die mRNAs der Mesophyllzellen betreffen. In dieser Blattschicht sind die Konzentrationen an Flavanoiden sehr gering, trotzdem ist eine vergleichsweise starke Expression metabolisierender Gene zu beobachten, was ebenfalls darauf hindeutet, dass dort die Pigmentgehalte nicht mit dem Genexpressionsmuster korrelieren (Kalbin *et al.*, 2001). Die Aktivierung eines Gens führt demnach nicht zwingend zur Erhöhung der entsprechenden Metabolitkonzentration.

Die Ergebnisse des H/L-Szenarios können ebenfalls mit der epidermalen Transmission erklärt werden. Lagen dort relativ niedrige Konzentrationen an Derivaten von Quercetin vor, reichte nach 14 d Bestrahlung eine relativ niedrige Intensität an UV-B-Strahlung aus, um subzelluläre Reaktionen der Gene der Flavonoidbiosynthese auszulösen, ohne sich jedoch auf der Ebene der Metaboliten fortzusetzen. Für ein detaillierteres Bild der Akkumulation an Quercetinderivaten müssten die Biosynthese-Proteine unter den verschiedenen Bestrahlungsregimen hinsichtlich Translationsrate und Enzymaktivität näher charakterisiert werden. Das Modell für den zeitlichen Verlauf der UV-B-abhängigen Synthese der Quercetinderivate mit verschiedenen PAR-Bestrahlungsstärken sowie die dafür notwendige Genaktivität der Flavonoid 3'-Hydroxylase sind in Abbildung 4-2 dargestellt.

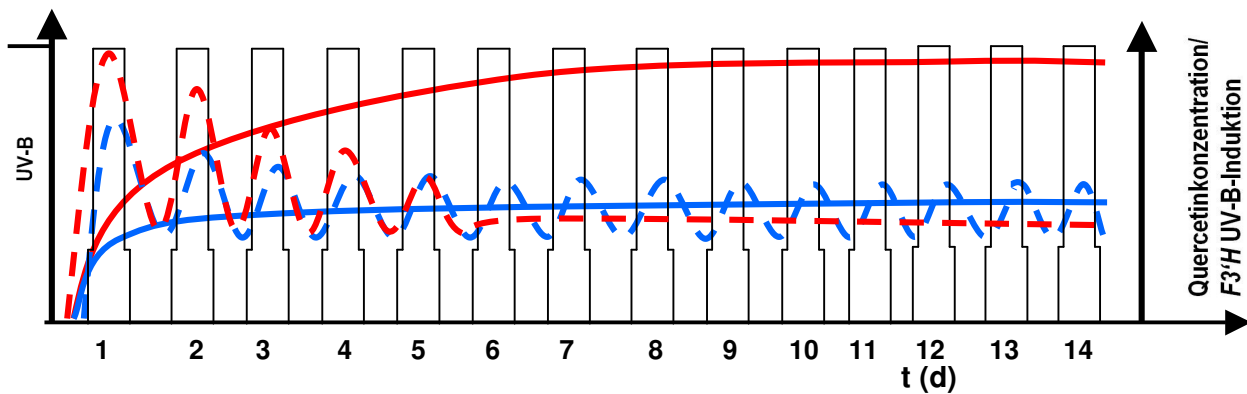


Abbildung 4-2

Postulierter Verlauf der Akkumulation an Quercetinderivaten und der Genaktivität der *F3'H*.

Die durchgezogenen Linien stellen die tägliche Akkumulation der Quercetinderivate dar. Die gestrichelten Linien entsprechen der Genaktivität der *F3'H*. Rote Linien sind dem Szenario H/H zugeordnet, während die blauen Linien das Szenario L/H andeuten.

4.6 Gene des oxidativen Stresses

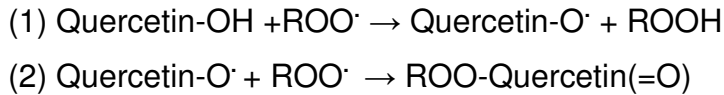
Die deutlich ausgeprägten UV-B-Induktionen von 28 Genen des zellulären Detoxifikationssystems in der Simulation L/H lassen rückschließen, dass die Aktivierung dieser Gene ebenfalls in Zusammenhang mit der verminderten epidermalen Abschirmung steht. Die Akkumulation der Quercetinderivate war im Szenario L/H schwächer ausgeprägt als in H/H, was die Transmission von UV-B erhöhen könnte und wahrscheinlich im Mesophyllgewebe die Induktion dieser Gene bewirkt. Die Pflanze befindet sich hier in einem Zustand, in dem sie auf die Anwesenheit des Entsorgungs-

systems zelltoxischer Produkte angewiesen ist, während bei der Strahlungsvariante mit höherem PAR-Hintergrund diese Gene nicht mehr benötigt werden. Zu Beginn der Bestrahlungsperiode von H/H könnte die Pflanze verstärkt Quercetin zur Radikalentorgung produzieren, um reaktive Sauerstoffspezies zu detoxifizieren, die wegen des begleitenden Hochlichts entstehen müssten. Das biochemische Signal für die Pflanze mehr Quercetinderivate, wie die rote Kurve in Abbildung 4-2 zeigt, zu bilden, fällt also zu einem früheren Zeitpunkt der Bestrahlungsdauer. Durch diesen Regelmechanismus könnte sich eine strahlungsadequate Konzentration aufbauen, die durch ein Verstärkungssignal der Phytochromrezeptoren geregelt sein könnte (Boccalandro *et al.*, 2001). Wenn hohe UV-B-Strahlung mit niedrigem PAR-Anteil kombiniert wird, ist zu Vegetationsende ein mangelnder Grundschutz vorhanden, der die Aktivierung des zellulären Detoxifikationssystems verursacht (vgl. Kapitel 3.8.4; ‚Node’78 und ‚Node’ 73).

4.7 Antioxidative Wirksamkeit von Quercetin

Die reduzierende Eigenschaft einer phenolischen Verbindung als Elektronen- oder Wasserstoffdonator macht eine biologische Funktion als Reduktionssmittel zur Entsorgung von zellulären Radikalen naheliegend (Rice-Evans *et al.*, 1997). Phenole bieten zudem ideale chemische Struktur, um freie, zelluläre Radikale abzufangen. Einige Phenole besitzen *in vitro* ein höheres antioxidatives Potential als Vitamin C oder Vitamin E (Rice-Evans *et al.*, 1996). Dies konnte in der Vergangenheit für die Entsorgung von Hydroxylradikalen ($\cdot\text{OH}$), Azidradikalen ($\text{N}_3\cdot$), Superoxidanionen ($\text{O}_2\cdot^-$) und Lipidperoxidradikalen ($\text{LOO}\cdot$) exemplarisch gezeigt werden. Überdies bekommt die eisenchelatierende Eigenschaft vieler phenolischer Moleküle insofern eine präventive Funktion, als sie die Metallkatalyse von Hydroxylradikalen (Haber-Weiss-Reaktion) unterbinden, die ihrerseits als Initialradikale für die Peroxidation von ungesättigten Fettsäuren diskutiert werden, da weder das Superoxidanion noch das Produkt der Dismutation, H_2O_2 , eine ausreichende Reaktivität haben, um die Peroxidation ungesättigter Fettsäuren einzuleiten, d. h. sie sind nicht in der Lage, Wasserstoffatome von ungesättigten Fettsäuren zu abstrahieren (Hock & Elstner, 1995; Hudson & Lewis, 1983). Quercetin kann *in vivo* durch die Inhibierung der eisenabhängigen Hydroxylradikalproduktion für einen ausreichenden Schutz der Biomembranen gegenüber Peroxidationsprozessen sorgen. Neben dieser präventiven Funktion kann

Quercetin zelltoxische Peroxylradikale abbauen, die z. B. bei der Peroxidation durch ein Hydroxylradikal der Linolensäure entstehen. Die chemische Reaktion dürfte nach folgender Reaktionsgleichung ablaufen (Erben-Russ *et al.*, 1987):



Die erste Reaktion hat dabei eine Umsatzrate von ca. $10^7 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Die zweite Reaktion kann demgegenüber eine Rate von über $10^8 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ erreichen (Erben-Russ *et al.*, 1987). Das Quercetin-O \cdot -Radikal wird dabei generell als Aroxylradikal bezeichnet. Die nötigen Strukturen für die Radikalentsorgung können am Flavonolgerüst an der Position 4' und 4 durch mesomere Intermediate entstehen (Bors *et al.*, 1990; Erben-Russ *et al.*, 1987). Flavonoide bieten ein hohes antioxidatives Potential, wenn sie folgende chemische Strukturen aufweisen (Rice-Evans *et al.*, 1997):

- 3',4' dihydroxylierter B-Ring (z. B. Catechin, Luteolin und Quercetin)
- 5,7 dihydroxylierter A-Ring (z. B. Kaempferol, Apigenin und Quercetin)
- 2,3-Doppelbindung in Kombination sowohl mit der 4-Keto- als auch der 3-Hydroxygruppe am C-Ring. Damit diese Struktur vom Radikalpartner Elektronen delokalisieren kann, ist parallel der 3',4' o-Dihydroxystruktur am B-Ring erforderlich (z. B. Luteolin oder Quercetin).

Quercetin verfügt demnach über alle drei notwendigen chemischen Strukturelemente, um Radikale zu detoxifizieren. Kaempferol hingegen besitzt keinen o-dihydroxylierten B-Ring, was dessen Möglichkeiten als Antioxidans stark eingrenzt. Glykosidische Analoga von Quercetin sind jedoch weniger antioxidativ wirksam (Rice-Evans *et al.*, 1997). Dieser Sachverhalt lässt rückschließen, dass Quercetin *in vivo* die antioxidative Funktion im Cytoplasma wahrnimmt, während den Quercetinderivaten bei der Entsorgung von Radikalen eine untergeordnete Funktion zukommt. Die in der HPLC erfassten Quercetinderivate müssen demzufolge so interpretiert werden, dass die Vorstufen-Aglykone die antioxidative Funktion am rER ausüben, bevor sie glykosidisch gebunden werden. Quercetinderivate nehmen aber dennoch die essentielle Funktion der UV-Abschirmung wahr (Rice-Evans *et al.*, 1997).

Die subzelluläre Metabolisierung am rER findet wahrscheinlich in einem Multienzymkomplex statt, in dem die Enzyme CHS und CHI mit eingebunden sind. Die F3'H übernimmt in diesem Komplex eine Ankerfunktion für CHS und CHI. Dieser Sachverhalt konnte in der Elongationszone von Arabidopsis-Wurzeln festgestellt werden. Hier werden bei der *tt7*-Mutante die Proteine von CHS und CHI deutlich weniger akkumuliert als im Wildtyp, was mit der Konzentration der Flavonoid-Endprodukte einhergeht. Der F3'H könnte somit neben der Bildung der antioxidativen Quercetinstruktur eine wichtige Funktion in der zellulären Verankerung weiterer Flavonoid-Proteinen zu einem Multienzymkomplex am rER zukommen, der die notwendige räumliche Nähe der beteiligten Proteine für die störungsfreie Synthese der Flavonoide sicherstellt (Saslowsky & Winkel-Shirley, 2001; Winkel-Shirley & Burbulis, 1999).

4.8 DNA-Reparatur

Das Expressionsprofil einer vermutlichen *CPDII* unter den Bestrahlungsszenarien in Abbildung 4-3 zeigt, dass die DNA-Reparatur nur in L/H aktiv war. Photolyasen sind wichtige Markergene für UV-B-Reparatur. Bildet die Pflanze wenig Schirmpigmente aus, führt dies zu einer Schädigung der DNA durch Cyclobutanstrukturen und damit zur Aktivierung der dafür notwendigen Reparaturgene (vgl. Abbildung 1-7). Es ist gezeigt worden, dass nach transienter UV-B-Bestrahlung höhere PAR-Werte die CPD-Bildung und dadurch auch DNA-Strangbruchprozesse im Genom verstärken (Ries *et al.*, 2000). Die eigenen Resultate zeigen jedoch, dass ein vermutliches Photolyase-Gen unter Langzeiteinfluss von UV-B-Strahlung bei hohen PAR-Werten (Szenario H/H) nicht mehr durch UV-B induziert war. Ist die Pflanze aufgrund niedrigerer PAR-Hintergründe nicht in der Lage, einen Grundschutz aufzubauen, sind am Ende der Bestrahlungsperiode DNA-Reparaturgene aktiv. In Mais wurde gezeigt, dass die Gehalte an phenolischen Verbindungen für das Ausmaß an DNA-Schädigung verantwortlich sind (Stapleton & Walbot, 1994). Die epidermale Abschirmung durch phenolische Verbindungen wurde in der Vergangenheit mehrmals gezeigt (Bieza & Lois, 2001; Rao & Ormrod, 1995; Stapleton & Walbot, 1994). Der eigene Befund, dass bei akklimatisierten Pflanzen nicht generell phenolische Verbindungen einen epidermalen UV-Schutz herbeiführen, sondern dass dafür die Quercetinverbindungen verantwortlich sein müssten, ist eine neue Erkenntnis.

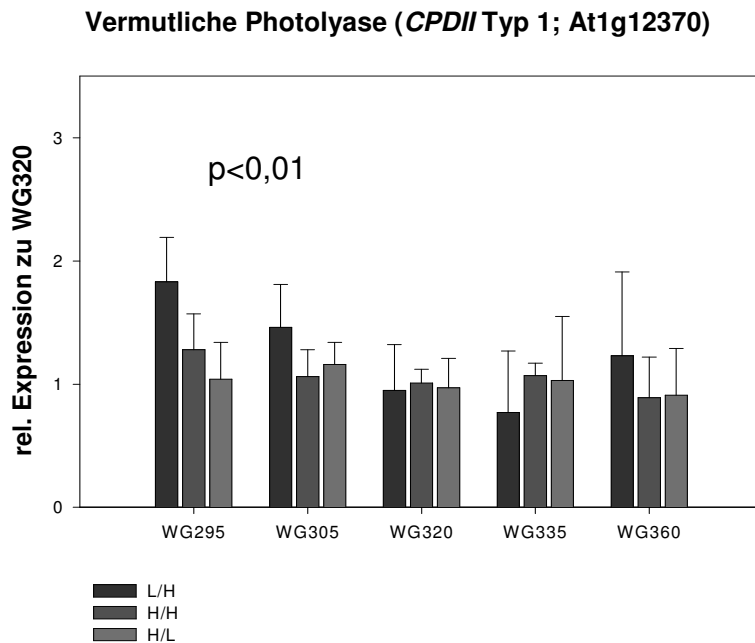


Abbildung 4-3

Expression einer vermutlichen Photolyase.

Die Abbildung zeigt das UV-B-Induktionsvermögen eines vermutlichen Photoreparaturgens (*CPDII*). Das Gen war durch UV-B-Strahlung nur im Szenario L/H signifikant induziert (in Relation zur Expression von WG320).

In zahlreichen Studien wird vermutet, dass die DNA in der Pflanze durch ihr Absorptionsmaximum im UV-B-Bereich als Photorezeptor wirken könnte (Beggs & Wellmann, 1994; Ibdah *et al.*, 2002). Weiterhin kann die DNA-Reparatur durch die Photolyasen als Initialsignal für biochemische Reaktionen angesehen werden, da die UV-Anregung der Pterin- und Flavinchromophore einen primären Elektronenfluss auslösen können und dadurch ROS entstehen (Jenkins *et al.*, 2001). Die Coexpression der *CPDII* und der Gene der Flavonoidbiosynthese im Szenario L/H spricht einerseits für die Theorie des primären Signals durch die Photolyasen, andererseits zeigt die *CPDII* keine Reaktion auf UV-B-Strahlung im Szenario H/L, während die Gene Flavonoidbiosynthese eine deutliche Reaktion in diesem Bestrahlungsversuch zeigten. Vielmehr ist die Aktivität der *CPDII*, wenn auch weniger stark ausgeprägt, etwa mit den Genen aus ‚Node‘ 78 und 73 vergleichbar. Die Coexpression zu Genen, die durch oxidativen Streß aktiviert werden, lässt die Photolyase als ROS-Quelle neben dem Photosystem näher ins Blickfeld rücken. Dass die Genaktivierung der Flavonoidbiosynthese nicht durch ROS bedingt ist, wurde bereits in Arabidopsis an der

Transkription der *CHS* belegt (Mackerness, 2001). Die Aktivierung weiterer Flavonoidbiosynthese-Gene in H/L, deutet an, dass die Expression der Gene der Flavonoidbiosynthese durch Transkriptionsfaktoren übergeordnet reguliert wird (Bruce *et al.*, 2000; Hemm *et al.*, 2001). Die Aktivierung der Gene der Flavonoidbiosynthese könnte auf einen spezifischen UV-B-Rezeptor zurückgeführt werden. Die Photolyase ist jedoch wegen der fehlenden Coexpression zu den Flavonoidbiosynthese-Genen als Rezeptor fragwürdig.

4.9 PAR-Schwellenwert

In Kapitel 3.2.2 sind die Unterschiede der Expression der Gene der Flavonoidbiosynthese unter den beiden Bestrahlungsversuchen des Szenarios M/H dargestellt. Beide Experimente waren jeweils mit hoher UV-B-Bestrahlung und 1000 (V320) bzw. 700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (V323) PAR-Hintergrund durchgeführt worden. Die Expressionsdaten der Versuche wurden nicht zusammengeführt, da die Induktionen sehr unterschiedlich waren. Die Konzentrationen an Quercetinderivaten waren in V323 niedriger als in V320. Die niedrigere Konzentration in V323 legt die Vermutung nahe, dass ein Schwellenwert von mindestens 700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ über die Vegetationsperiode notwendig ist, um die Pflanze bei hoher UV-B-Bestrahlung ausreichend mit Quercetinderivaten auszurüsten. Ferner kann festgestellt werden, dass das Expressionsverhalten der Flavonoidbiosynthese-Gene in V323 dem des Szenarios L/H ähnelt, während das bei V320 dem des Szenario H/H näher steht. Die unterschiedliche UV-B-Induktion der vermutlichen Photolyase *CPDII* bei V320 und V323 in Abbildung 4-4 deutet einen vermuteten Grenzwert an PAR an. Die Geninduktionen fallen in V323 nicht in der Deutlichkeit des Szenarios L/H aus, was in den vergleichsweise höheren Konzentrationen an Quercetinderivaten seine Ursache haben könnte. In Versuch V323 war der Gehalt an Sinapoylglukose relativ hoch. Obwohl den Sinapinsäureestern für den UV-B-Schutz keine bedeutende Rolle zugeschrieben wurde, könnten die Moleküle in V323 zusätzlich UV-B-Strahlung filtern, und dadurch wären die Gene des oxidativen Stresses weniger aktiv als in Szenario L/H. Wurden die Versuche V320 und V323 des Szenarios M/H in die Clusteranalyse mit einbezogen, so war die Tendenz der Geninduktion in V323 jedoch dem Szenario L/H ähnlich, während das Expressionsmuster aus Experiment V320 dem Szenario H/H entsprach.

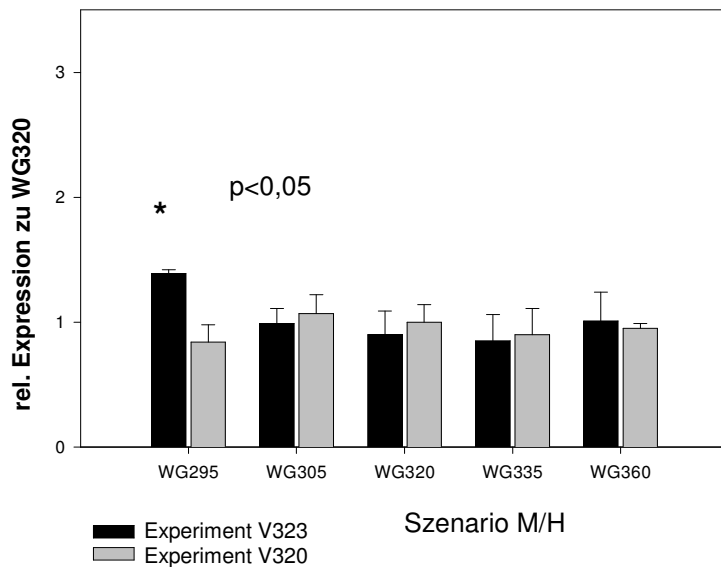


Abbildung 4-4

Genexpression der *CPDII* (V320: PAR 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; V323: PAR 700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Die Abbildung zeigt die UV-B-Reaktion einer vermutlichen *CPDII*-Photolyase in den Experimenten V320 und V323 (M/H). Die Photolyase war nur bei V323 durch UV-B-Strahlung signifikant induziert (in Relation zur Expression von WG320).

4.10 Ausblick

Um die kausale Rolle der Quercetinderivate im Zusammenhang mit der UV-B-Abschirmung weiter verfolgen zu können, wären Versuche mit Mutanten notwendig, welche nicht in der Lage sind, diese Metaboliten herzustellen. Zu diesem Zweck würde sich die *tt7*-Mutante anbieten. Der Verlust der Substrataffinität in der F3'H ist durch eine C zu T EMS-Mutation an Triplet 113 verursacht (Wildtyp: (T)AA \rightarrow Glutamin (Q)) (Koorneef, 1990; Schoenbohm *et al.*, 2000). Die Mutante trägt aber den genetischen Hintergrund des Ökotyps Landsberg *erecta* und Ergebnisse könnten daher nicht mit den bisherigen verglichen werden. Sinnvoller wäre der Ansatz eines transgenen Wildtyps Columbia, bei der das Enzym durch ein Antisense-Konstrukt nicht mehr translatiert wird. Mit den transgenen Arabidopsis hätte man im Szenario H/H die Möglichkeit, die Funktion der Quercetinderivate im Zusammenhang mit der UV-B-Abschirmung zu überprüfen.

Des weiteren könnte die Regulation der Gehalte an Quercetinderivaten in der früheren Phase der Bestrahlungsperiode Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. In

erster Line ist in diesem Zusammenhang an Experimente mit Mutanten der Phytochromrezeptoren zu denken, um damit zu Beginn der Strahlungsperiode den Einfluss der Rezeptoren auf die Anreicherung an Quercetinderivaten einschätzen zu können. Es ist gezeigt, dass die UV-B-Induktion der Anthocyanbiosynthese in der *phyAphyB*-Mutante weniger ausgeprägt sind als im Wildtyp (Ahmad & Cashmore, 1997). Solche Experimente versprechen ein genaueres Bild vom Zusammenspiel verschiedener Strahlungsarten bei der Einstellung der notwendigen Konzentration an Quercetinderivaten zum Schutz vor UV-B-Strahlung.

5 Zusammenfassung

In der Vergangenheit wurden zahlreiche Studien zur Auswirkung von UV-B-Strahlung auf Pflanzen angefertigt. Die meisten Ergebnisse beruhten jedoch hauptsächlich auf transienten Reaktionen. Damit das Risiko erhöhter bodennaher UV-Strahlung aber realistisch eingeschätzt werden kann, fehlten bisher Wirkungsspektren von Schutzmolekülen unter Langzeiteinfluss von UV-Strahlung. In dieser Arbeit wurden in den Sonnensimulatoren der GSF Versuche unter ökologisch relevanten Bestrahlungsszenarien mit der genetischen Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* unternommen, die an UV-B-Werten angepasst waren, wie sie durch eine weitere Abnahme der Ozonschicht in Zukunft zu erwarten sind. Die Langzeitversuche sind polychromatisch mit fünf fein abgestuften UV-Filtern realisiert worden (WG295, WG305, WG320, WG335, WG360). Neben der Spektral- und Dosisvariation im UV-Bereich ist zusätzlich die Energiemenge an Photonen der photosynthetisch aktiven Strahlung (PAR) verändert gewesen. Daraus ergaben sich die Simulationen H/H, M/H, L/H und H/L (PAR/UV-B; H, M und L stehen für hoch, mittel und engl. ‚low‘).

Die HPLC-Analysen der Schirmpigmente der Blattrosetten zeigten, dass die Konzentrationen der Quercetinderivate unter den oben stehenden Simulationen die deutlichsten UV-Spektralabhängigkeiten zeigten, die überdies von der Strahlungsenergie der PAR abhängig waren. Im Szenario H/H mit $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR war dabei die spektrale Abhängigkeit im UV-Bereich auf einem höheren Niveau als bei vergleichbarer UV-B-Intensität und $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR-Hintergrund (L/H). Weiterhin konnte die UV-B-bedingte Konzentrationserhöhung an Quercetinderivaten nicht bei 25 mW UV-B_{BE} herbeigeführt werden (H/L). Es konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation an Quercetinderivaten in einer annähernd linearen Beziehung zur Bestrahlungsstärke der PAR stand. Der PAR-Beitrag wurde dabei unabhängig von der UV-Strahlung ausgelöst. Mit Hilfe der UV-Nettoakkumulations-Werte, die um den Synthesebeitrag der PAR korrigiert waren, konnte die spektrale Abhängigkeit im UV-Bereich bestimmt werden, die in guter Annäherung einem exponentiellen Wirkungsspektrum entsprach. Dieses war Basis einer UV-Dosisfunktion, mit der die Konzentrationen an Quercetinderivaten in Abhängigkeit von der UV-Dosis und den UV-Spektralanteilen modelliert werden konnten.

Im Gegensatz zu den Quercetinderivaten zeigten die Gehalte der Kaempferol- und Sinapinsäurederivate keine signifikanten Spektralabhängigkeiten. Sie müssen dem-

zufolge als konstitutiver Strahlungsschutz angesehen werden, der ferner nicht durch PAR beeinflusst war. Die Experimente deckten auf, dass *Arabidopsis* zum UV-B-Schutz bevorzugt Quercetinverbindungen produziert. Eine mögliche Erklärung ist, dass Quercetin neben seiner Absorptionseigenschaft ein ausgesprochen hohes antioxidatives Potential besitzt.

Die Induktionen der Gene des Biosyntheseweges der Flavonoide waren in der Simulation H/H nicht mehr UV-spektralabhängig. Sie hatten jedoch eine deutliche Reaktion auf UV-B-Strahlung in den Szenarien L/H und H/L. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass am Ende der Periode des vegetativen Wachstums in erster Linie das UV-Abschirmvermögen ausschlaggebend für die zelluläre Aktivierung von Transkripten der Flavonoidbiosynthese war. Die Pflanzen waren bei hohen Konzentrationen an Quercetinderivaten aufgrund der epidermalen Absorptionseigenschaften der Moleküle nicht mehr auf die Aktivität metabolisierender Gene angewiesen, so dass nur mit relativ unrealistischen Bestrahlungsbedingungen die Gene der Flavonoidbiosynthese hohe Aktivität zeigten, um damit den fehlenden Grundschutz zu ergänzen.

Expressionsstudien mit 579 ausgewählten Stressgenen konnten zeigen, dass 28 Gene ausschließlich in der Simulation L/H durch UV-B zu induzieren waren („Node“ 73 und 78 der Clusteranalyse). Die Funktionszuordnung der Gene machte deutlich, dass sie zum großen Teil für Enzyme kodieren, die in der Vergangenheit mit einem oxidativen Stress in der Pflanze in Zusammenhang gebracht worden sind. Die Resultate zeigten, dass sich die Pflanzen bei starker UV-B-Intensität und begleitenden niedrigen PAR-Bestrahlungsstärken nur ungenügend abschirmen konnten, was im Mesophyllgewebe die typischen oxidativen Stressreaktionen initiierte.

Da im Freiland aber hohe UV-B-Werte fast immer mit hoher PAR auftreten, weisen die Ergebnisse darauf hin, dass *Arabidopsis thaliana* vor allem durch die Akkumulation von Quercetinderivaten ein großes Potential besitzt, solare UV-B-Strahlung abzuschirmen.

6 Literaturverzeichnis

- Ahmad, M. & Cashmore, A. R. (1997). The blue light receptor cryptochrome 1 shows functional dependence on phytochrome A or phytochrome B in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **11**, 421-427.
- Ahmad, M. & Cashmore, A. R. (1996). Seeing blue: the discovery of cryptochrome. *Plant Mol Biol*, **30**, 851-861.
- Ahmad, M., Jarillo, J. A., Klimczak, L. J., Landry, L. G., Peng, T., Last, R. L. & Cashmore, A. R. (1997). An enzyme similar to animal type II photolyases mediates photoreactivation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **9**, 199-207.
- Ahmad, M., Jarillo, J.A., Smirnova, O. and Cashmore, A.R. (1998). Cryptochrome blue-light photoreceptors of *Arabidopsis* implicated in phototropism. *Nature*, **392**, 720-723.
- Ahmed, M. S., Ramesh, V., Nagaraja, V., Parish, J. H. & Hadi, S. M. (1994). Mode of binding of quercetin to DNA. *Mutagen*, **9**, 193-197.
- Alfenito, M. R., Souer, E., Goodman, C. D., Buell, R., Mol, J., Koes, R. & Walbot, V. (1998). Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases. *Plant Cell*, **10**, 1135-1150.
- Ang, L.-H., Chattopadhyay, S., Wei, N., Oyama, T., Okada, K., Batschauer, A. & Deng, X.-W. (1998). Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of *Arabidopsis* development. *Mol Cell*, **1**, 213-222.
- Arber, W. & Leim, S. (1969). DNA-modification and restriction. *Ann Rev Biochem*, **38**, 467-500.
- Aro, E.-M., Virgin, I. & Andersson, B. (1993). Photoinhibition of photosystem II: inactivation, protein damage and turnover. *Biochim Biophys Acta*, **1143**, 113-134.
- Bailey, S., Walters, R. G., Jansson, S. & Horton, P. (2001). Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the existence of separate low light and high light responses. *Planta*, **213**, 794-801.
- Baldrige, G. D., O'Neill, N. R. & Samac, D. A. (1998). Alfalfa (*Medicago sativa* L.) resistance to the root-lesion nematode, *Pratylenchus penetrans*: defense-response gene mRNA and isoflavonoid phytoalexin levels in roots. *Plant Mol Biol*, **38**, 999-1010.
- Balzi, D. & Goffeau, A. (1994). Genetics and biochemistry of yeast multidrug resistance. *Biochim Biophys Acta*, **1187**, 152-162.
- Barnes, P. W., Flint, S. D. & Caldwell, M. M. (1987). Photosynthesis damage and protective pigments in plants from a latitudinal arctic/alpine gradient exposed to supplemental UV-B radiation in the field. *Arctic Alpine Res*, **19**, 21-27.
- Bartling, D., Radzio, R., Steiner, U. & Weiler, E. W. (1993). A glutathione S-transferase with glutathione-peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem*, **216**, 579-586.
- Batschauer, A. (1999). Light perception in higher plants. *Cell Mol Life Sci*, **55**, 153-166.
- Baxevanis, A. D. (2001). The molecular biology database collection: an updated compilation of biological database resources. *Nucl Acid Res*, **29**, 1-10.
- Beggs, C. J. & Wellmann, E. (1994). Photocontrol of flavonoid biosynthesis. In *Photomorphogenesis in plants*, eds. R. E. Kendrick & G. H. M. Kronenberg, Kluwer Academic Press. Dordrecht, pp. 733-751.

- Berenbaum, M. (1988). Effects of electromagnetic radiation on insect-plant interactions. In *Plant stress-insect interactions*, ed. E. A. Heinrichs, John Wiley & Sons. New York, pp. 167-185.
- Berkelaar, E. J., Ormrod, D. P. & Hale, B. A. (1996). The influence of photosynthetically active radiation on the effects of ultraviolet-B radiation on *Arabidopsis thaliana*. *Photochem Photobiol*, **64**, 110-116.
- Bieza, K. & Lois, R. (2001). An *Arabidopsis* mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. *Plant Physiol*, **126**, 1105-1115.
- Boccalandro, H., Mazza, C. A., Mazella, M. A., Casal, J. J. & Ballare, C. L. (2001). Ultraviolet B radiation enhances a phytochrome-B-mediated photomorphogenic response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **126**, 780-788.
- Borevitz, J. O., Xia, Y., Blount, J., Dixon, R. A. & Lamb, C. (2000). Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell*, **12**, 2383-2393.
- Bornman, J. F. & Teramura, A. H. (1993). Effects of UV-B radiation on terrestrial vegetation. In *Environmental UV Photobiology*, eds. A. R. Young, L. O. Björn, J. Moan & W. Nultsch, Plenum. London, pp. 427-472.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C. & Saran, M. (1990). Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Meth Enzymol*, **186**, 343-355.
- Bowler, C. & Chua, N.-H. (1994). Emerging themes of plant signal transduction. *Plant Cell*, **6**, 1529-1541.
- Briggs, W. R. & Huala, E. (1999). Blue-light photoreceptors in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 33-62.
- Britt, A. B. (1996). DNA damage and repair in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **47**, 75-100.
- Bruce, W., Folkerts, O., Garnaat, C., Crasta, O., Roth, B. & Bowen, B. (2000). Expression profiling of the maize flavonoid pathway genes controlled by estradiol-inducible transcription factors CRC and P. *Plant Cell*, **12**, 65-79.
- Burchard, P., Bilger, W. & Weissenböck, G. (2000). Contribution of hydroxycinnamates and flavonoids to epidermal shielding of UV-A and UV-B radiation in developing rye primary leaves as assessed by ultraviolet-induced chlorophyll fluorescence measurements. *Plant Cell Environ*, **23**, 1373-1380.
- Caldwell, M. M. (1971). Solar ultraviolet radiation and the growth and development of higher plants. In *Photophysiology*, ed. A. C. Giese, Vol. 6. New York, pp. 133-177.
- Caldwell, M. M. & Flint, S. D. (1993). Implications of increased solar UV-B for terrestrial vegetation. In *The role of the stratosphere in global change*, Springer-Verlag. Heidelberg, pp. 495-516.
- Caldwell, M. M. & Flint, S. D. (1994). Stratospheric ozone reduction, solar UV-B radiation and terrestrial ecosystems. *Climatic Change*, **28**, 375-394.
- Caldwell, M. M., Robberecht, R. & Flint, S. D. (1983). Internal filters: prospects for UV-acclimation in higher plants. *Physiol Plant*, **58**, 445-450.
- Caldwell, M. M., Teramura, A. H. & Tevini, M. (1989). The changing solar ultraviolet climate and the ecological consequences for higher plants. *Trends Ecol Evol*, **4**, 363-367.
- Capella, A. N., Menossi, M., Arruda, P. & Benedetti, C. E. (2001). COI1 affects myrosinase activity and controls the expression of two flower-specific myrosinase-binding protein homologues in *Arabidopsis*. *Planta*, **213**, 691-699.

- Carre, I. A. & Kim, J. Y. (2002). MYB transcription factors in the Arabidopsis circadian clock. *J Exp Bot*, **53**, 1551-1557.
- Cen, Y.-P. & Bornman, J. F. (1990). The response of bean plants to UV-B radiation under different irradiances of background visible light. *J Exp Bot*, **41**, 1489-1495.
- Century, K. S., Shapiro, A. D., Repetti, P. P., Dahlbeck, D., Holub, E. & Staskawicz, B. J. (1997). NDR1, a pathogen-induced component required for Arabidopsis disease resistance. *Science*, **278**, 1963-1965.
- Chang, S., Puryear, J. & Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Reprtr*, **11**, 113-116.
- Chapman, S. (1930). A theory of upper atmospheric ozone. *Mem Roy Met Soc*, **3**, 103-125.
- Chapple, C. S., Vogt, T., Ellis, B. E. & Somerville, C. R. (1992). An Arabidopsis mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. *Plant Cell*, **4**, 1413-1424.
- Cheng, W., Chao, G. & Singh, K. B. (1996). The promoter of a H₂O₂-inducible, Arabidopsis glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP1-binding sites. *Plant J*, **10**, 955-966.
- Christie, J. M. & Jenkins, G. I. (1996). Distinct UV-B and UV-A/blue light signal transduction pathways induce chalcone synthase gene expression in Arabidopsis cells. *Plant Cell*, **8**, 1555-1567.
- Chun, L., Kawakami, A. & Christopher, D. A. (2001). Phytochrome A mediates blue light and UV-A-dependent chloroplast gene transcription in green leaves. *Plant Physiol*, **125**, 1957-1966.
- Colebatch, G., Kloska, S., Trevaskis, B., Freund, S., Altmann, T. & Udvardi, M. K. (2002). Novel aspects of symbiotic nitrogen fixation uncovered by transcript profiling with cDNA arrays. *Mol Plant-Microbe Interact*, **15**, 411-420.
- Cooley, N. M., Higgins, J. T., Holmes, M. G. & Attridge, T. H. (2001). Ecotypic differences in response of *Arabidopsis thaliana* L. to elevated polychromatic UV-A and UV-B+A radiation in the natural environment: a positive correlation between UV-B+A inhibition and growth rate. *Photochem Photobiol*, **60**, 143-150.
- Cooley, N. M., Truscott, H. M. F., Holmes, M. G. & Attridge, T. H. (2000). Outdoor ultraviolet polychromatic action spectra for growth response of *Bellis perennis* and *Cynosurus cristatus*. *Photochem Photobiol*, **59**, 64-71.
- Coupe, S. A., Taylor, J. E., Isaac, P. G. & Roberts, J. A. (1993). Identification and characterization of a proline-rich mRNA that accumulates during pod development in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Mol Biol*, **23**, 1223-1232.
- Crutzen, P. J. (1970). The influence of nitrogen oxides on the atmospheric ozone content. *Quart J R Met Soc*, **96**, 320-325.
- Cullen, J. C., Neale, P. J. & Lesser, P. (1992). Biological weighting function for the inhibition of phytoplankton photosynthesis by ultraviolet radiation. *Science*, **258**, 646-650.
- Day, T. A., Howells, B. W. & Rice, W. J. (1994). Ultraviolet absorption and epidermal-transmittance spectra in foliage. *Physiol Plant*, **92**, 207-218.
- Day, T. A., Howells, B. W. & Ruhland, C. T. (1996). Changes in growth and pigment concentration with leaf age pea under modulate UV-B radiation field treatments. *Plant Cell Environ*, **19**, 101-108.
- De Vetten, N., Ter Horst, J., Van Schaik, H.-P., De Boer, A., Mol, J. & Koes, R. (1999). A cytochrome b5 is required for full activity of flavonoid 3',5'-hydroxylase, a cytochrome P450 involved in the formation of blue flower colors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 778-783.

- DeLucia, E. H., Day, T. A. & Vogelmann, T. C. (1992). Ultraviolet-B and visible light penetration into needles of two species of subalpine conifers during foliar development. *Plant Cell Environ*, **15**, 921-929.
- Doebley, J. (1993). Genetics, development and plant evolution. *Curr Opin Genet Dev*, **3**, 865-872.
- Dudler, R. & Hertig, C. (1992). Structure of an mdr-like gene from *Arabidopsis thaliana*: evolutionary implications. *J Biol Chem*, **267**, 5882-5888.
- Eckardt, N. A. (2001). Some like it with nitriles: a nitrile-specifying protein linked to herbivore feeding behavior in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **13**, 2565-2568.
- Eisen, M. B. & Brown, P. O. (1999). DNA arrays for analysis of gene expression. *Meth Enzymol*, **303**, 179-204.
- 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*, **25**, 14863-14868.
- Eisinger, W., Swartz, T. E., Bogomolni, R. A. & Taiz, L. (2000). The ultraviolet action spectrum for stomatal opening in broad bean. *Plant Physiol*, **122**, 99-105.
- Emery, P., Stanewsky, R., Helfrich-Förster, C., Emery-Le, M., Hall, J. C. & Rosbash, M. (2000). *Drosophila* CRY is a deep brain circadian photoreceptor. *Neuron*, **26**, 493-504.
- Erben-Russ, M., Bors, W. & Saran, M. (1987). Reactions of linoleic acid peroxy radicals with phenolic antioxidants: a pulse radiolysis study. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, **52**, 393-412.
- Feinbaum, R. L. & Ausubel, F. M. (1988). Transcriptional regulation of the *Arabidopsis thaliana* chalcone synthase gene. *Mol Cell Biol*, **8**, 1985-1992.
- Fernandez De Simon, B., Perez-Illarbe, J., Hernandez, T., Gomez-Coroves, C. & Estrella, I. (1992). Importance of phenolic compounds for the characterization of fruit juices. *J Agric Food Chem*, **40**, 1531-1540.
- Fiscus, E. L. & Booker, F. L. (1995). Is increased UV-B a threat to crop photosynthesis and productivity? *Photosynth Res*, **43**, 81-92.
- Flint, S. D. & Caldwell, M. M. (2003). Field testing of UV biological weighting functions for higher plants. *Physiol Plantarum*, **117**, 145-153.
- Focks, N., Sagasser, M., Weisshaar, B. & Benning, C. (1999). Characterization of tt15, a novel transparent testa mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta*, **208**, 352-357.
- Frohnemeyer, H., Bowler, C. & Schäfer, E. (1997). Evidence for some signal transduction elements involved in UV-light-dependent responses in parsley protoplasts. *J Exp Bot*, **48**, 739-750.
- Frohnemeyer, H., Loyall, L., Blatt, M. R. & Grabov, A. (1999). Millisecond UV-B irradiation evokes prolonged elevation of cytosolic-free Ca²⁺ and stimulates gene expression in transgenic parsley cell cultures. *Plant J*, **20**, 109-117.
- Fujiyama, K., Takemura, H., Shinmyo, A., Okada, H. & Takano, M. (1990). Genomic DNA structure of two horseradish-peroxidase encoding genes. *Gene*, **89**, 163-169.
- Gachotte, D. & Benveniste, P. (1996). Cloning of a glutathione peroxidase homolog in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, **110**, 713.
- Ghetti, F., Herrmann, H., Häder, D.-P. & Seidlitz, H. K. (1999). Spectral dependence of the inhibition of photosynthesis under simulated global radiation in the unicellular green alga *Dunaliella salina*. *J Photochem Photobiol*, **48**, 166-173.

- Glombitza, S. (2002). Expressionsprofile von ABC-Transportern in *Arabidopsis thaliana*: Reaktionen auf Xenobiotika im Kontext mit anderen Genfamilien der Entgiftung. *Dissertation LMU München*.
- Glombitza, S., Dubuis, P.-H., Thulke, O., Welzl, G., Bover, L., Götz, M., Affenzeller, M., Geist, B., Hehn, A., Asnaghi, C., Ernst, D., Seidlitz, H. K., Martinoia, E., Werck-Reichhart, D., Mauch, F. & Schäffner, A. R. (2004). Crosstalk and differential response to abiotic and biotic stressors reflected at the transcriptional level of effector genes from secondary metabolism. *Plant Mol Biol* **54**, 817-835.
- Goidin, D., Mamessier, A., Staquet, M.-J., Schmitt, D. & Berthier-Vergnes, O. (2001). Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and β -actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Anal Biochem*, **295**, 17-21.
- Greenberg, B. M., Wilson, M. J., Hung, X.-D., Duxburg, L. L. & Gensemer, R. (1997). The effects of ultraviolet-B radiation on higher plants. In *Plants for Environmental Studies*, eds. W. Wang, J. Gorsuch & J. S. Hughes, CRC Press. New York, pp. 1-35.
- Grotewold, E., Sainz, M. B., Tagliani, L., Hernandez, J. M., Bowen, B. & Chandler, V. L. (2000). Identification of the residues in the Myb domain of maize C1 that specify the interaction with the bHLH cofactor R. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 13579-13584.
- Halaweish, F. T. & Dougall, D. (1990). Sinapoyl glucose synthesis by extracts of wild carrot cultures. *Plant Sci*, **71**, 179-184.
- Harmer, S. L., Hogenesch, J. B., Straume, M., Chang, H.-S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J. A. & Kay, S. A. (2000). Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock. *Science*, **290**, 2110-2113.
- Harper, J. F., Surowy, T. K. & Sussmann, M. R. (1989). Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the plasma membrane proton pump (H^+ -ATPase) of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**, 1234-1238.
- Heintzen, C., Melzer, S., Fischer, R., Kappeler, S., Apel, K. & Staiger, D. (1994). A light- and temperature-entrained circadian clock controls expression of transcripts encoding nuclear proteins with homology to RNA-binding proteins in meristematic tissue. *Plant J*, **5**, 799-813.
- Heller, W. & Forkmann, G. (1988). Biosynthesis of flavonoids. In *The Flavonoids: Advances in research since 1986*, ed. J. B. Harborne, Vol. 11, Capman and Hall Ltd. London, pp. 499-535.
- Hemm, M. R., Herrmann, K. M. & Chapple, C. (2001). AtMYB4: a transcription factor general in the battle against UV. *Trends Plant Sci*, **6**, 135-136.
- Henze, K., Schnarrenberger, C., Kellermann, J. & Martin, W. (1994). Chloroplast and cytosolic triosephosphate isomerases from spinach: purification, microsequencing and cDNA cloning of the chloroplast enzyme. *Plant Mol Biol*, **26**, 1961-1973.
- Hihara, Y., Kamei, A., Kanehisa, M., Kaplan, A. & Ikeuchi, M. (2001). DNA microarray analysis of cyanobacterial gene expression during acclimation to high light. *Plant Cell*, **13**, 793-806.
- Hillebrand, H., Bartling, D. & Weiler, E. W. (1998). Structural analysis of the nit2/nit1/nit3 gene cluster encoding nitrilases, enzymes catalyzing the terminal activation step in indole-acetic acid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, **36**, 89-99.
- Hock, B. & Elstner, E. F. (1995). *Schadwirkungen auf Pflanzen*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- Holmes, M. G. (1997). Action spectra for UV-B effects on plants: monochromatic and polychromatic approaches for analysing plant responses. In *Plants and UV-B: responses to environmental change*, ed. P. J. Lumsden, Cambridge University Press. Cambridge, pp. 31-52.

- Hörtensteiner, S., Chinner, J., Matile, P., Thomas, H. & Donnison, I. S. (2000). Chlorophyll breakdown in *Chlorella protothecoides*: characterization of degreening and cloning of degreening-related genes. *Plant Mol Biol*, **42**, 429-450.
- Horvath, D. M. & Chuna, N. H. (1996). Identification of an immediate-early salicylic acid-inducible tobacco gene and characterization of induction by other compounds. *Plant Mol Biol*, **31**, 1061-1072.
- Hou, S. M., Nori, P., Fang, J. L. & Vaca, C. E. (1995). Methylglyoxal induces hprt mutation and DNA adducts in human T-lymphocytes in vitro. *Environ Mol Mutagen*, **26**, 286-291.
- Hudson, B. J. F. & Lewis, L. I. (1983). Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils. Structural criteria for activity. *Food Chem*, **10**, 47-55.
- Ibdah, M., Krins, A., Seidlitz, H. K., Heller, W., Strack, D. & Vogt, T. (2002). Spectral dependence of flavonol and betacyanin accumulation in *Mysembryanthemum crystallinum* under enhanced ultraviolet radiation. *Plant Cell Environ*, **25**, 1145-1154.
- Jansen, M. A. K., Babu, T. S., Heller, D., Mattoo, A. K. & Edelman, M. (1996). Ultraviolet-B effects on *Spirodela oligorrhiza*: induction of different protection mechanisms. *Plant Sci*, **106**, 217-223.
- Jansen, M. A. K., Gaba, V., Greenberg, B. M., Mattoo, A. K. & Edelman, M. (1996). Low threshold levels of ultraviolet-B in a background of photosynthetically active radiation trigger rapid degradation of the D2 protein of photosystem-II. *Plant J*, **9**, 693-699.
- Jansen, M. A. K., Gaba, V. and Greenberg, B.M. (1998). Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends Plant Sci*, **3**, 131-135.
- Jenkins, G. I., Long, J. C., Wade, H. K., Shenton, M. R. & Bibikova, T. N. (2001). UV and blue light signalling: pathways regulating chalcone synthase gene expression in Arabidopsis. *New Phytol*, **151**, 121-131.
- Jespersen, H. M., Kjaersgard, I. V., Ostergaard, L. & Welinder, K. G. (1997). From sequence analysis of three novel ascorbate peroxidases from *Arabidopsis thaliana* to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase. *Biochem J*, **326**, 305-310.
- Jin, H., Cominelli, P. B., 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 J*, **19**, 6150-6161.
- Johannes, G., Carter, M. S., M B, Brown, P. O., & Sarnow, P. (1999). Identification of eukaryotic mRNAs that are translated at reduced cap binding complex eIF4F concentrations using a cDNA microarray. *Proc Natl Acad Sci USA*, **23**, 13118-13123.
- Johanson, U., Karlsson, M., Johansson, I., Gustavsson, S., Sjövall, S., Frayse, L., Weig, A. & Kjellbom, P. (2001). The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in Arabidopsis provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiol*, **126**, 1358-1369.
- Jordan, B. R. (1996). The effects of ultraviolet-B radiation on plants: a molecular perspective. *Adv Bot Res*, **22**, 98-162.
- Jordan, B. R., Chow, W. S., Strid, A. & Anderson, J. M. (1991). Reduction in cab and psb A RNA transcripts in response to supplementary ultraviolet-B radiation. *FEBS Lett*, **284**, 5-8.
- Jung, B. G., Lee, K. O., Lee, S. S., Chi, Y. H., Jang, H. H., Kang, S. S., Lee, K., Lim, D., Yoon, S. C., Yun, D. J., Inoue, Y., Cho, M. J. & Lee, S. Y. (2002). A Chinese cabbage cDNA with high sequence identity to phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases encodes a novel isoform of thioredoxin-dependent peroxidase. *J Biol Chem*, **15**, 12572-12578.
- Kahn, R. & Durst, F. (2000). Function and evolution of plant cytochrome P450. *Recent Adv Phytochem*, **34**, 151-189.

- Kalbin, G., Hidema, J., Brosche, M., Kumagai, T., Bornman, J. F. & Strid, A. (2001). UV-B-induced DNA damage and expression of defence genes under UV-B stress: tissue-specific molecular marker analysis in leaves. *Plant Cell Environ*, **24**, 983-990.
- Kampranis, S. C., Damianova, R., Atallah, M., Toby, G., Kondi, G., Tsihchlis, P. N. & Makris, A. M. (2000). A novel plant glutathione S-transferase/peroxidase suppresses Bax lethality in yeast. *J Biol Chem*, **275**, 29207-29216.
- Karlson, P., Doenecke, D. & Koolman, J. (1994). *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Kinoshita, T., Hara-Nishimura, I., Siraishi, H., Okada, K., Shimura, Y. & Nishimura, M. (1994). Nucleotide sequence of a transmembrane protein (TMP-C) cDNA in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, **105**, 1441-1442.
- Kita, M., Hirata, Y., Moriguchi, T., Endo-Inagaki, T., Matsumoto, R., Hasegawa, S., Suhayda, C. G. & Omura, M. (2000). Molecular cloning and characterization of a novel gene encoding limonoid UDP-glucosyltransferase in Citrus. *FEBS Lett*, **469**, 173-178.
- Klein, M., Martinoia, E., Hoffmann-Thoma, G. & Weissenböck, G. (2000). A membrane-potential dependent ABC-like transporter mediates the vacuolar uptake of rye flavone glucuronides: regulation of glucuronide uptake by glutathione and its conjugates. *Plant J*, **21**, 289-304.
- Kochhar, A., Khurana, J. P. & Tyagi, A. K. (1996). Nucleotide sequence of the psbP gene encoding precursor of 23-kDa polypeptide of oxygen-evolving complex in *Arabidopsis thaliana* and its expression in the wild-type and a constitutively photomorphogenic mutant. *DNA Res*, **31**, 277-285.
- Kolb, C. A., Käser, M. A., Kopecky, J., Zotz, G., Riederer, M. & Pfündel, E. E. (2001). Effects of natural intensities of visible and ultraviolet radiation on epidermal ultraviolet screening and photosynthesis in grape leaves. *Plant Physiol*, **127**, 863-875.
- Koorneef, M. (1990). Mutation affecting the testa colour in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Inf Serv*, **27**, 1-4.
- Koorneef, M. & Stam, P. (1992). Genetic analysis. In *Methods in Arabidopsis Research*, eds. C. Koncz, N.-H. Chua & J. Schell, World Scientific, Singapore, pp. 83-99.
- Kranz, H. D., Denekamp, M., Greco, R., Jin, H., Leyva, A., Meissner, R. C., Petroni, K., Urzainqui, A., Bevan, M., Martin, C., Smeekens, S., Tonelli, C., Paz-Ares, J. & Weisshaar, B. (1998). Towards functional characterisation of the member of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **16**, 263-276.
- Kreuz, K. & Martinoia, E. (1999). Herbicide metabolism in plants: integrated pathways of detoxification. In *The proceedings of the 9th international congress on pesticide chemistry: the food-environment challenge*, eds. G. T. Brooks & T. R. Roberts, The Royal Society of Chemistry, London, pp. 279-287.
- Kuittinen, H. & Aguade, M. (2000). Nucleotide variation at the chalcone isomerase locus in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, **155**, 863-872.
- Landgrebe, J., Wurst, W. & Welzl, G. (2002). Permutation-validated principal components analysis of microarray data. *Gen Biol*, **3**, 0019.1-0019.11.
- Landry, L. G., Chapple, C. C. S. & Last, R. L. (1995). *Arabidopsis* mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiol*, **109**, 1159-1166.
- Lavola, A., Julkunen-Tiitto, R., Aphalo, P., De La Rosa, T. & Lehto, T. (1997). The effect of u.v.-B radiation on u.v.-absorbing secondary metabolites in birch seedlings grown under simulated forest soil conditions. *New Phytol*, **137**, 617.

- Lee, H., Jo, J. & Son, D. (1998). Molecular cloning and characterization of the gene encoding glutathione reductase in *Brassica campestris*. *Biochim Biophys Acta*, **1395**, 309-314.
- Lehfeldt, C., Shirley, A. M., Meyer, K., Ruegger, M. O., Cusumano, J. C., Viitanen, P. V., Strack, D. & Chapple, C. (2000). Cloning of the SNG1 gene of *Arabidopsis* reveals a role for a serine carboxypeptidase-like protein as an acyltransferase in secondary metabolism. *Plant Cell*, **12**, 1295-1306.
- Leyva, A., Jarillo, J. A., Salinas, J. & Martinez-Zapater, J. M. (1995). Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. *Plant Physiol*, **108**, 39-46.
- Li, J., Ou-Lee, T.-M., Raba, R., Amundson, R. & Last, R. L. (1993). *Arabidopsis* flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell*, **5**, 171-179.
- Liang, X., Oono, Y., Shen, N. F., Kohler, C., Li, K., Scolnik, P. A. & Theologis, A. (1995). Characterization of two members (ACS1 and ACS3) of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, **167**, 17-24.
- Liang, X., Shen, N. F. & Theologis, A. (1996). Li⁺-regulated 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **10**, 1027.
- Lim, E.-K., Li, Y., Parr, A., Jackson, R., Ashford, D. A. & Bowles, D. J. (2001). Identification of glucosyltransferase genes involved in sinapate metabolism and lignin synthesis in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, **274**, 4344-4399.
- Lin, C., Ahmad, M., Gordon, D. & Cashmore, A. R. (1995). Expression of an *Arabidopsis* cryptochrome gene in transgenic tobacco results in hypersensitivity to blue, UV-A, and green light. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 8423-8427.
- Liu, Z., Hall, J. D. and Mount, D. W. (2001). *Arabidopsis* UVH3 gene is homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD2 and human XPG DNA repair genes. *Plant J*, **26**, 329-338.
- Liu, Z., Hossain, G. S., Islas-Osuna, M. A., Mitchell, D. L. & Mount, D. W. (2000). Repair of UV damage in plants by nucleotide excision repair: *Arabidopsis* UVH1 DNA repair gene is a homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Rad 1. *Plant J*, **21**, 519-528.
- Loebler, M. (1996). An *Arabidopsis* cDNA (Accession No. U37697) homologous to glutathione reductase (PGR96-053). *Plant Physiol*, **111**, 1353.
- Lois, R. (1994). Accumulation of UV-absorbing flavonoids induced by UV-B radiation in *Arabidopsis thaliana* L. *Planta*, **194**, 498-503.
- Long, J. C. & Jenkins, G. I. (1998). Involvement of plasma membrane redox activity and calcium homeostasis in the UV-B and UV-A/blue light induction of gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **10**, 2977-2086.
- Loyall, L., Uchida, K., Braun, S., Furuya, M. & Frohnmeyer, H. (2000). Glutathione and a UV light-induced glutathione S-transferase are involved in signalling to chalcone synthase in cell cultures. *Plant Cell*, **12**, 1939-1950.
- Lu, Y.-P., Li, Z.-S., Drozdowicz, Y. M., Hörtensteiner, S., Martinoia, E. & Rea, P. A. (1998). AtMRP2, an *Arabidopsis* ATP-binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugate and chlorophyll catabolites: functional comparisons with AtMRP1. *Plant Cell*, **10**, 267-282.
- Mackerness, S. A.-H. (2000). Plant response to ultraviolet-B (UV-B: 280-320 nm) stress: what are the key regulators. *J Plant Growth Reg*, **32**, 27-39.
- Mackerness, S. A.-H., John, C.F., Jordan, B. and Thomas, B. (2001). Early signaling components in ultraviolet-B response: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. *FEBS Lett*, **489**, 237-242.

- Mackerness, S. A.-H., Surplus, S. L., Blake, P., John, C. F., Buchanan-Wollaston, V., Jordan, B. R. & Thomas, B. (1999). Ultraviolet-B-induced stress and changes in gene expression in *Arabidopsis thaliana*: role of signalling pathways controlled by jasmonic acid, ethylene and reactive oxygen species. *Plant Cell Environ*, **22**, 1413-1423.
- Markham, K. R., Gould, K. S. & Ryan, K. G. (2001). Cytoplasmic accumulation of flavonoids in flower petals and its relevance to yellow flower colouration. *Phytochemistry*, **58**, 403-413.
- McCloud, E. S. & Berenbaum, M. (1994). Stratospheric ozone depletion and plant-insect interactions: effects of UVB radiation on foliage quality of *Citrus jambhiri* for *Trichoplusia ni*. *J Chem Ecol*, **20**, 525-539.
- McCloud, E. S., Berenbaum, M. R. & Tuveson, R. W. (1992). Furanocoumarin content and phototoxicity of rough lemon (*Citrus jambhiri*) foliage exposed to enhanced ultraviolet-B (UVB) irradiation. *J Chem Ecol*, **18**, 1125-1137.
- McGrath, J. M., Terzaghi, W. B., Sridhar, P., Cashmore, A. R. & Pichersky, E. (1992). Sequence of the fourth and fifth Photosystem II type I chlorophyll a/b-binding protein genes of *Arabidopsis thaliana* and evidence for the presence of a full complement of the extended CAB gene family. *Plant Mol Biol*, **19**, 725-733.
- McKinley, A. F. & Diffey, B. J. (1987). A reference action spectrum for ultraviolet induced erythema in human skin. In *Human exposure to ultraviolet radiation: risks and regulations*, eds. W. F. Paschier & B. F. M. Bosnjakovic, Elsevier, Amsterdam, pp. 83-86.
- Meyer, P., Heidmann, I., Forkmann, G. & Saedler, H. (1987). A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. *Nature*, **330**, 677-678.
- Mirecki, R. M. & Teramura, A. H. (1984). Effects of ultraviolet-B on soybean: the dependence of plant sensitivity on the photosynthetic photon flux density during and after leaf expansion. *Plant Physiol*, **74**, 475-480.
- Mizutani, M., Ohta, D. & Sato, R. (1997). Isolation of a cDNA and a genomic clone encoding cinnamate 4-hydroxylase from *Arabidopsis* and its expression manner in planta. *Plant Physiol*, **113**, 755-763.
- Mock, H.-P. & Strack, D. (1993). Energetics of uridine 5'-diphosphoglucose-hydroxy-cinnamic acid acyl-glucotransferase reaction. *Phytochemistry*, **32**, 575-579.
- Molina, M. J. & Rowland, F. S. (1974). Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: chlorine atom catalysed destruction of ozone. *Nature*, **249**, 810.
- Muller, M., Meijer, C., Zaman, G. J. R., Borst, P., Scheper, R. J., Mulder, N. H., De Vries, E. G. E. & Jansen, P. L. M. (1994). Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 13033-13037.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chain reaction. *Meth Enzymol*, **155**, 335-350.
- Nakajima, S., Sugiyama, M., Iwai, S., Hitomi, K., Otsoshi, E., Kim, S.-T., Jiang, C.-Z., Todo, T., Britt, A. B. & Yamamoto, K. (1997). Cloning and characterization of a gene (UVR3) required for photorepair of 6-4 photoproducts in *Arabidopsis thaliana*. *Nucl Acid Res*, **26**, 638-644.
- Neuhaus, G., Bowler, C., Kern, R. & Chua, N.-H. (1993). Calcium/calmodulin-dependent and -independent phytochrome signal transduction pathways. *Cell*, **73**, 937-952.
- Nielsen, H. B. & Knudsen, S. (2002). Avoiding cross hybridization by choosing nonredundant targets on cDNA arrays. *Bioinf Appl Note*, **18**, 321-322.
- Ninu, L., Ahmad, M., Miarelli, C., Cashmore, A. R. & Giuliano, G. (1999). Cryptochrome 1 controls tomato development in response to blue light. *Plant J*, **18**, 551-556.

- Nogues, S. & Baker, N. R. (1995). Evaluation of the role of damage to photosystem II in the inhibition of CO₂ assimilation in pea leaves on exposure to UV-B radiation. *Plant Cell Environ*, **18**, 781-787.
- Oberholzer, V., Durbin, M. L. & Clegg, M. T. (2000). Comparative genomics of chalcone synthase and Myb genes in the grass family. *Genes Genet Syst*, **75**, 2000.
- O'Grady, K., Goekjian, V. H., Naim, C. J., Nagao, R. T. & Key, J. L. (2001). The transcript abundance of GmGT-2, a new member of the GT-2 family of transcription factors from soybean, is down-regulated by light in a phytochrome-dependent manner. *Plant Mol Biol*, **47**, 367-378.
- Orth, A. B., Teramura, A. H. & Sisler, H. D. (1990). Effects of ultraviolet-B radiation on fungal disease development in *Cucumis sativus*. *Amer J Bot*, **77**, 1188-1192.
- Paiva, N. L., Sun, Y., Dixon, R. A., VanEtten, H. D. & Hrazdina, G. (1994). Molecular cloning of isoflavone reductase from pea (*Pisum sativum* L.): evidence for a 3R-Isoflavone intermediate in (+)-piscatin biosynthesis. *Arch Biochem Biophys*, **312**, 501-510.
- Panagopoulos, I., Bornman, J. F. & Björn, L. O. (1992). Response of sugar beet plants to ultraviolet-B (280-320 nm) radiation and Cercospora leaf spot disease. *Plant Physiol*, **84**, 140-145.
- Paz-Ares, J., Ghosal, D., Wienand, U., Peterson, P. A. & Saedler, H. (1987). The regulatory c1 locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *EMBO J*, **6**, 3553-3558.
- Peer, W. A., Brown, D. E., Tague, B. W., Muday, G. K., Taiz, L. & Murphy, A. S. (2001). Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of Arabidopsis. *Plant Physiol*, **126**, 536-548.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucl Acid Res*, **29**, 1-6.
- Picton, S., Gray, J., Barton, S., AbuBakar, U., Lowe, A. & Grierson, D. (1993). cDNA cloning and characterisation of novel ripening-related mRNAs with altered patterns of accumulation in the ripening inhibitor (rin) tomato ripening mutant. *Plant Mol Biol*, **23**, 193-207.
- Pietrini, F., Iannelli, M. A. & Massacci, A. (2002). Anthocyanin accumulation in the illuminated surface of maize leaves enhances protection from photo-inhibitory risks at low temperature, without further limitation to photosynthesis. *Plant Cell Environ*, **25**, 1251-1259.
- Precht, M. & Kraft, R. (1993). *Biostatistik 2*. Oldenbourg Verlag GmbH, München.
- Quaite, F. E., Sutherland, B. M. & Sutherland, J. C. (1992). Action spectrum for DNA damage in alfalfa lowers predicted impacted of ozone depletion. *Nature*, **358**, 576-578.
- Rao, M. V. & Ormrod, D. P. (1995). Impact of UVB and O₃ on the oxygen free radical scavenging system in *Arabidopsis thaliana* genotypes differing in flavonoid biosynthesis. *Phytochem Photobiol*, **62**, 719-726.
- Reinemer, P., Prade, L., Hof, P., Neufeind, T., Huber, R., Zettl, R., Palme, K., Schell, J., Koelln, I., Bartunik, H. D. & Bieseler, B. (1996). Three-dimensional structure of glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana* at 2.2 Å resolution: structural glutathione S-transferases and a novel active site architecture. *J Mol Biol*, **255**, 289-309.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci*, **2**, 152-159.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med*, **20**, 933-956.

- Ries, G., Buchholz, G., Frohnmeyer, H. & Hohn, B. (2000). UV-damage-mediated induction of homologous recombination in *Arabidopsis* is dependent on photosynthetically active radiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 13425-13429.
- 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**, 98-101.
- Rocke, D. M. & Durbin, B. (2001). A model for measurement error for gene expression arrays. *J Comp Biol*, **8**, 557-569.
- Romero, I., Fuertes, A., Benito, M. J., Malpica, J. M., Leyva, A. & Paz-Ares, J. (1998). More than 80 R2R3-MYB regulatory genes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **14**, 273-284.
- Ruegger, M., Meyer, K., Cusumano, J. C. & Chapple, C. (1999). Regulation of ferulate-5-hydroxylase expression in *Arabidopsis* in the context of sinapate ester biosynthesis. *Plant Physiol*, **119**, 101-110.
- Rundel, R. D. (1983). Promotional effects of ultraviolet radiation on human basal and squamous cell carcinoma. *Photochem Photobiol*, **38**, 569-575.
- Ryan, K. G., Swinny, E. E., Winefield, C. & Markham, K. R. (2001). Flavonoids and UV photoprotection in *Arabidopsis* mutants. *Z Naturforsch*, **56c**, 745-754.
- Sakamoto, A., Tanaka, A., Watanabe, H. & Tano, S. (1998). Molecular cloning of *Arabidopsis* photolyase gene (PHR1) and characterization of its promoter region. *J Sequen Mapp*, **9**, 335-340.
- Sancar, A. (1994). Structure and function of DNA photolyase. *Biochem J*, **33**, 2-9.
- Sanchez-Fernandez, R., Davies, T. G. E., Coleman, J. O. D. & Rea, P. A. (2001). The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily a complete inventory. *J Biol Chem*, **276**, 30231-30244.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **74**, 5463.
- Saslowsky, D. & Winkel-Shirley, B. (2001). Localization of flavonoid enzymes in *Arabidopsis* roots. *Plant J*, **27**, 37-48.
- Schoenbohm, C., Martens, S., Eder, C., Forkmann, G. & Weisshaar, B. (2000). Identification of the *Arabidopsis thaliana* flavonoid 3'-hydroxylase gene and functional expression of the encoded P450 enzyme. *Biol Chem*, **381**, 749-753.
- Setlow, R. B. (1974). The wavelength in sunlight effective in producing skin cancer: a theoretical analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **71**, 3363-3366.
- Sheahan, J. J. & Rechnitz, G. A. (1999). Differential visualization of transparent testa mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Anal Chem*, **65**, 961-963.
- Shimizu, T., Akada, S., Senda, M., Ishikawa, R., Harada, T., Niizeki, M. & Dube, S. K. (1999). Enhanced expression and differential inducibility of soybean chalcone synthase genes by supplemental UV-B in dark-grown seedlings. *Plant Mol Biol*, **39**, 785-795.
- Shirley, B. W., Kubasek, W. L., Storz, G., Bruggemann, E., Koorneef, M., Ausubel, F. M. & Goodman, H. M. (1995). Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis. *Plant J*, **8**, 659-671.
- Sidler, M., Hassa, P., Hasan, S., Ringli, C. & Dudler, R. (1998). Involvement of an ABC transporter in a developmental pathway regulating hypocotyl cell elongation in the light. *Plant Cell*, **10**, 1623-1636.
- Siefermann-Harms, D. (1988). One-step separation of carotene and xanthophyll isomers, chlorophylls and pheophytins. *J Chromatogr*, **448**, 411-416.

- Skipsey, M., Andrews, C. J., Townson, J. K., Jepson, I. & Edwards, R. (2000). Cloning and characterization of glyoxalase I from soybean. *Arch Biochem Biophys*, **374**, 261-268.
- Smart, C. C. & Flemings, A. J. (1996). Hormonal and environmental regulation of a plant PDR5-like ABC-transporter. *J Biol Chem*, **271**, 19351-19357.
- Stanewsky, R., Kaneko, M., Emery, P., Beretta, B., Wager-Smith, K., Kay, S. A., Rosbash, M. & Hall, J. C. (1998). The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in drosophila. *Cell*, **95**, 681-692.
- Stapleton, A. E. & Walbot, V. (1994). Flavonoids can protect maize DNA from the induction of ultraviolet radiation damage. *Plant Physiol*, **105**, 881-889.
- Steinmüller, D. & Tevini, M. (1985). Action of ultraviolet radiation (UV-B) upon cuticular waxes in some crop plants. *Planta*, **164**, 557-564.
- Stephan, J. J. (1996). Sinapate esters provide greater UV-B attenuation than flavonoids in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Am J Bot*, **83**, 679-686.
- Strid, A. (1993). Alteration in expression of defence genes in *Pisum sativum* after exposure to supplementary ultraviolet-B radiation. *Plant Cell Physiol*, **34**, 949-953.
- Strid, A., Chow, W. S. & Anderson, J. M. (1994). UV-B damage and protection at the molecular level in plants. *Photosynth Res*, **39**, 475-489.
- Sullivan, T. A., Jakobek, J. L. & Lindgren, P. B. (2001). Cloning and characterization of a bean UDP-glucosyltransferase cDNA expressed during plant-bacterial interactions. *Mol Plant-Microbe Interact*, **14**, 90-92.
- Sun, Z., Gantt, E. & Cunningham, F. X. J. (1996). Cloning and functional analysis of a beta-carotene hydroxylase of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, **271**, 24349-24352.
- Surplus, S. L., Jordan, B. R., Murphy, A. M., Carr, J. P., Thomas, B. & Mackerness, S. 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**, 685-694.
- Takahashi, S., Nakajima, N., Saji, H. & Kondo, N. (2002). Diurnal change of cucumber CPD photolyase gene (CsPHR) expression and its physiological role in growth under UV-B irradiation. *Plant Cell Physiol*, **43**, 342-349.
- Tang, L., Lin, W., Wu, X., Liang, Y. & Chen, F. (2002). Effects of enhanced ultraviolet-B radiation on growth development and yield formation in rice (*Oryza sativa* L.). *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*, **13**, 1278-1282.
- Taylor, J.-S., Lu, H.-F. & Kotyk, J. J. (1990). Quantitative conversion of the (6-4) photoproduct of TpdC to its dewar valence isomer upon exposure to simulated sunlight. *Photochem Photobiol*, **51**, 161-167.
- Teramura, A. H. & Murali, N. S. (1986). Intraspecific differences in growth and yield of soybean exposed to ultraviolet-B radiation under greenhouse and field conditions. *Environ Exp Bot*, **26**, 89-95.
- Tevini, M. (1993). Effects of enhanced UV-B radiation on terrestrial plants. In *UV-B radiation and ozone depletion: effects on humans, animal and plant, microorganisms and materials*, ed. M. Tevini, CRC Press. Boca Raton: Lewis Publisher, USA, pp. 125-153.
- Tevini, M., Braun, J. & Fieser, G. (1991). The protective function of the epidermal layer of rye seedlings against ultraviolet-B radiation. *Photochem Photobiol*, **53**, 329-333.

- Tommasini, R., Evers, R., Vogt, E., Mornet, C., Zaman, G. H., Schinkel, A. H., Borst, P. & Martinoia, E. (1996). The human multidrug resistance-associated protein functionally complements the yeast cadmium factor 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 6743-6748.
- Tommasini, R., Martinoia, E., Grill, E., Dietz, K.-J. & Amrhein, N. (1993). Transport of oxidized glutathione into barley vacuoles: Evidence for the involvement of the glutathione-S-conjugate ATPase. *Z Naturforsch*, **48c**, 867-871.
- Tommasini, R., Vogt, E., Fromenteau, M., Hörtensteiner, S., Matile, P., Amrhein, N. & Martinoia, E. (1998). An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. *Plant J*, **13**, 773-780.
- Turunen, M., Heller, W., Stich, S., Sandermann, H., Sutinen, M.-L. & Norokorpi, Y. (1999). The effects of UV exclusion on the soluble phenolics of young scots pine seedlings in the subarctic. *Environ Pollut*, **106**, 219-228.
- Tusnady, G. E., Bakos, E., Varadi, A. & Sarkadi, B. (1997). Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. *FEBS Lett*, **402**, 1-3.
- Utsugi, S., Sakamoto, W., Murata, M. & Motoyoshi, F. (1998). *Arabidopsis thaliana* vegetative storage protein (VSP) genes: gene organization and tissue-specific expression. *Plant Mol Biol*, **38**, 565-576.
- Van Camp, W., Bowler, C., Villarroel, R., Tsang, E. W., Van Montagu, M. & Inze, D. (1990). Characterization of iron superoxide dismutase cDNA's from plants obtained by genetic complementation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**, 9903-9307.
- Vandenabeele, S., Vanderauwera, S., Vuylsteke, M., Rombauts, S., Langebartels, C., Seidlitz, H. K., Zabeau, M., Montagu, M. V., Inze, D. & Van Breusegem, F. (2004). Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **39**, 45-58.
- Vass, I., Sass, L., Spetea, C., Bakou, A., Ghanotakis, D. F. & Petrouleas, V. (1996). UV-B induced inhibition of photosystem II electron transport by EPR and chlorophyll fluorescence. Impairment of donor- and acceptor-side components. *Biochem J*, **35**, 8964-8973.
- Veit, M. & Pauli, G. F. (1999). Major flavonoids from *Arabidopsis thaliana* leaves. *J Nat Prod*, **62**, 1301-1303.
- Vogel, J. P., Woeste, K. E., Theologis, A. & Kieber, J. J. (1998). Recessive and dominant mutations in the ethylene biosynthetic gene ACS5 of *Arabidopsis* confer cytokinin insensitivity and ethylene overproduction, respectively. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 4766-4771.
- Wade, H. K., Bibikova, T. N., Valentine, W. J. & Jenkins, G. I. (2001). Interaction within a network of phytochrome, cryptochrome and UV-B phototransduction pathways regulate chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis* tissue. *Plant J*, **25**, 675-685.
- Wang, W., Takezawa, G. & Pooviah, B. W. (1996). A potato cDNA encodes a homologue of mammalian multidrug resistance P-glycoprotein. *Plant Mol Biol*, **31**, 683-687.
- Waterworth, W. M., Jiang, Q., West, C. E., Nikaido, M. & Bray, C. M. (2002). Characterization of *Arabidopsis* photolyase enzymes and analysis of their role in protection from ultraviolet radiation. *J Exp Bot*, **53**, 1005-1015.
- Weber, S., Kay, C. W. M., Mögling, H., Möbius, K., Hitomi, K. & Todo, T. (2002). Photoactivation of the flavin cofactor in *Xenopus laevis* (6-4) photolyase: observation of a transient tyrosyl radical by time-resolved electron paramagnetic resonance. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 1319-1322.
- Weig, A., Deswarte, C. & Chrispeels, M. J. (1997). The major intrinsic protein family of *Arabidopsis* has 23 members that form three distinct groups with functional aquaporins in each group. *Plant Physiol*, **114**, 1347-1357.

- Weisshaar, B., Armstrong, G. A., Block, A., Da Costa e Silva, O. & Hohlbrock, K. (1991). Light inducible and constitutively expressed DNA-binding proteins recognizing a plant promoter element with functional relevance in light responsiveness. *EMBO J*, **10**, 1777-1786.
- Westhoff, P., Jeske, H., Jürgens, G., Kloppstech, K. & Link, G. (1996). *Molekulare Entwicklungsbiologie. Vom Gen zur Pflanze*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Westwood, M. E. & Thornalley, P. J. (1995). Molecular characteristics of methylglyoxal-modified bovine and human serum albumins. Comparison with glucose-derived advanced glycation end-product-modified serum albumins. *J Protein Chem*, **14**, 359-372.
- Whitebread, J. M. & Schuler, M. A. (2000). Molecular characterization of CYP73A9 and CYP82A1 P450 genes involved in plant defense in pea. *Plant Physiol*, **124**, 47-58.
- Williams, P. A., Cosme, J., Sridhar, V., Johnsen, E. & McRee, D. E. (2000). Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase; structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Mol Cell*, **5**, 121-131.
- Williams, P. A., Frank, M. R., Galbraith, D., Feyereisen, R. & Feldmann, K. A. (1998). Systematic reverse genetics of transfer-DNA-tagged lines of Arabidopsis. Isolation of mutations in cytochrome P450 gene superfamily. *Plant Physiol*, **118**, 743-750.
- Winkel-Shirley, B. (2001). Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol*, **126**, 485-493.
- Winkel-Shirley, B. & Burbulis, I. E. (1999). Interaction among enzymes of the Arabidopsis flavonoid biosynthetic pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 12929-12934.
- Winter, K. & Herrmann, K. (1986). Esters and glucosides of hydroxycinnamic acids in vegetables. *J Agric Food Chem*, **34**, 616-620.
- Wisman, E., Hartmann, U., Sagasser, M., Baumann, E., Palme, K., Hahlbrock, K., Saedler, H. & Weisshaar, B. (1998). Knock-out mutants from an En-1 mutagenized *Arabidopsis thaliana* population generate phenylpropanoid biosynthesis phenotypes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 12432-12437.
- Wüthrich, K. L., Bovet, L., Hunziker, P. E., Donnison, I. S. & Hörtensteiner, S. (2000). Molecular cloning, functional expression and characterisation of RCC reductase involved in chlorophyll catabolism. *Plant J*, **21**, 189-198.
- Xu, W., Bak, S., Decker, A., Paquette, S. M., Feyereisen, R. & Galbraith, D. W. (2001). Microarray-based analysis of gene expression in very large gene families: the cytochrome P450 gene superfamily of *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, **272**, 61-74.
- Yamasaki, H., Fujii, N. & Takahashi, H. (2000). The ethylene-regulated expression of CS-ETR2 and CS-ERS genes in cucumber plants and their possible involvement with sex expression in flowers. *Plant Cell Physiol*, **41**, 608-616.
- Yamazaki, M., Gong, Z., Fokuchi-Mizutani, M., Fukui, Y., Tanaka, Y., Kusumi, T. & Saito, K. (1999). Molecular cloning and biochemical characterization of a novel anthocyanin 5-O-glucosyltransferase by mRNA differential display for plant forms regarding anthocyanin. *J Biol Chem*, **274**, 7405-7411.
- Yang, H.-Q., Tang, R.-H. & Cashmore, A. R. (2001). The signalling mechanism of Arabidopsis CRY1 involves direct interaction with COP1. *Plant Cell*, **13**, 2573-2587.
- Yang, Y. & Klessig, D. F. (1996). Isolation and characterization of a tobacco mosaic virus-inducible myb oncogene homolog from tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 14972-14977.
- Zellner, R., Peter, T., Dämmer, K. & Quintern, L. (ed.) (1999). *10 Jahre Deutsche Ozonforschung 1989-1999*. Verlag für Marketing und Kommunikation, Worms.

- Zettl, R., Schell, J. & Palme, K. (1994). Photoaffinity labeling of *Arabidopsis thaliana* plasma membrane vesicles by 5-azido-[7-³H]indole-3-acetic acid: identification of a glutathione S-transferase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 689-693.
- Zhou, J. & Goldsbrough, P. B. (1993). An *Arabidopsis* gene with homology to glutathione S-transferases is regulated by ethylene. *Plant Mol Biol*, **22**, 517-523.
- Zhou, N., Tootle, T. L. & Glazebrook, J. (1999). *Arabidopsis* PAD3, a gene required for camamloxin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Cell*, **11**, 2419-2428.

Anhang A: UV-B-reaktive Gene

UV-B-hochregulierte Gene:

1. Monooxygenasen:

ANOVA	Induktion (Median _{WG295})	Induktion mitUV-B+UV-A (Median _{WG295+WG305})	Induktion ohneUV-B+UV-A (Median _{WG320-360})	Funktion	Proben-Typ	Genbanknummer	UV-B- Erhöhung/ -Erniedrigung (%)	Abkürzung
0,0001	1,8	1,5	0,6	<i>Cytochrome P450 monooxygenase like protein</i>	3'-UTR-Probe	At1g13090	141	<i>CYP71B28</i>
0,0002	1,9	1,9	0,8	<i>Cytochrome P450 like protein</i>	3'-UTR-Probe	At2g45560	141	<i>CYP76C1</i>
0,0001	2,5	1,9	0,9	<i>Cytochrome P450 homolog</i>	3'-UTR-Probe	At4g12320	116	<i>CYP706A6</i>
0,0000	1,7	1,5	0,7	<i>Obtusifoliol 14-alpha demethylase like protein</i>	3'-UTR-Probe	At1g11680	115	<i>CYP-51A2-sterolDM</i>
0,0364	1,0	1,1	0,5	<i>Putative cytochrome P450</i>	3'-UTR-Probe	At2g22330	114	<i>CYP79B3</i>
0,0037	1,1	1,0	0,5	<i>Putative cytochrome P450</i>	3'-UTR-Probe	At3g26830	93	<i>CYP71B15</i>
0,0147	1,9	1,8	1,0	<i>Cytochrome P450-like protein</i>	3'-UTR-Probe	At4g37320	82	<i>CYP81D5</i>
0,0121	2,0	1,7	1,0	<i>Cytochrome P450 - like protein</i>	3'-UTR-Probe	At4g37370	68	<i>CYP81D8</i>
0,0358	1,8	1,6	1,0	<i>Cinnamate-4-hydroxylase</i>	3'-UTR-Probe	At2g30490	61	<i>CYP73A5-C4H</i>
0,0066	1,0	1,0	0,6	<i>Putative protein</i>	3'-UTR-Probe	At1g78490	55	<i>CYP708A3</i>
0,0384	1,8	1,8	1,2	<i>Cytochrome P450, putative</i>	3'-UTR-Probe	At3g20080	50	<i>CYP705A15</i>
0,0372	1,6	1,3	0,9	<i>Cytochrome P450-like protein</i>	3'-UTR-Probe	At4g37310	41	<i>CYP81H1</i>
0,0265	1,8	1,5	1,1	<i>Cytochrome P450</i>	3'-UTR-Probe	At5g57220	36	<i>CYP81F2</i>
0,0310	2,0	1,5	1,1	<i>Cytochrome P450</i>	3'-UTR-Probe	At5g06900	31	<i>CYP93D1</i>
0,0160	2,1	1,4	1,0	<i>Cytochrome P450 monooxygenase -like protein</i>	3'-UTR-Probe	At4g37400	31	<i>CYP81F3</i>

Referenzen:At2g30490 (*CYP73A5*) (Mizutani *et al.*, 1997)At3g26830 (*CYP71B15*) (Zhou *et al.*, 1999)At4g12320 (*CYP706A6*) (De Vetten *et al.*, 1999)

2. Zelluläre Transportproteine:

a: ABC-Transporter

ANOVA	Induktion (Median _{WG295})	Induktion mitUV-B+UV-A (Median _{WG295+WG305})	Induktion ohneUV-B+UV-A (Median _{WG320-360})	Funktion	Proben-Typ	Genbanknummer	UV-B- Erhöhung/ Erniedrigung (%)	Abkürzung
0,0006	1,7	1,4	0,6	<i>MRP-like ABC transporter</i>	EST	At2g34660	113	<i>AtMRP2</i>
0,0146	2,2	1,7	1,0	<i>Hypothetical protein</i>	3'-UTR-Probe	At1g30420	76	<i>AtMRP12</i>
0,0000	1,6	1,4	0,8	<i>AtMRP1</i>	EST	At1g30400	75	<i>AtMRP1</i>
0,0019	1,3	1,3	0,8	<i>Putative ABC transporter</i>	EST	AT4g04770	68	<i>AtNAP1</i>
0,0143	1,7	1,4	0,8	<i>Putative ABC transporter</i>	3'-UTR-Probe	At2g36910	64	<i>AtMDR1</i>
0,0046	2,6	1,8	1,1	<i>ABC transporter - like protein</i>	3'-UTR-Probe	At3g53480	64	<i>AtPDR9</i>
0,0030	1,3	1,3	0,8	<i>ABC transporter homolog PnATH - like</i>	EST	AT5g60790	53	<i>AtGCN1</i>
0,0120	1,6	1,3	0,9	<i>P-glycoprotein, putative</i>	EST	AT3g28860	53	<i>AtMDR11</i>
0,0057	1,5	1,5	1,0	<i>ABC transporter protein, putative</i>	3'-UTR-Probe	At1g64550	53	<i>AtGCN3</i>
0,0005	1,5	1,2	0,8	<i>ABC transport protein - like</i>	EST	AT5g61730	52	<i>AtATH11</i>
0,0018	2,4	1,4	0,9	<i>ABC transporter homolog PnATH - like</i>	EST	AT5g60790	51	<i>AtGCN1</i>
0,0021	1,1	1,2	0,8	<i>Putative protein</i>	EST	AT4g25450	51	<i>AtNAP8</i>
0,0018	1,2	1,1	0,8	<i>ABC transporter homolog PnATH - like</i>	EST	AT5g60790	46	<i>AtGCN1</i>
0,0387	1,3	1,3	0,9	<i>P-glycoprotein, 5' partial</i>	EST	At3g28344	45	<i>AtMD13</i>
0,0041	1,5	1,1	0,8	<i>ATP-dependent transmembrane transporter, putative</i>	EST	At1g51500	45	<i>AtWBC12</i>
0,0081	1,2	1,1	0,8	<i>Putative ABC transporter</i>	EST	At2g26910	40	<i>AtPDR4</i>

gelbe Hinterlegung: *AtGCN1* war auf drei unterschiedlichen Positionen auf dem DNA-Array vorhanden.

Referenzen:

Zellulärer Transport von Glutathion-Konjugaten und Flavonoiden:

At1g30420 (*AtMRP1*), At1g30420 (*AtMRP12*) und At34660 (*AtMRP2*) (Klein *et al.*, 2000; Muller *et al.*, 1994; Tommasini *et al.*, 1996; Tommasini *et al.*, 1993; Tommasini *et al.*, 1998)

Zelluläre Translokation von Phospholipiden:

At2g36910 (*AtMDR1*), At3g28860 (*AtMDR11*) und At3g28344 (*AtMDR13*) (Dudler & Hertig, 1992; Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001; Sidler *et al.*, 1998)

Xenobiotika-Entgiftung:

At2g26910 (*AtPDR4*) und At3g53480 (*AtPDR9*) (Balzi & Goffeau, 1994; Smart & Flemings, 1996)

Phylogenetische Einordnung der UV-B-reaktiven ABC-Transporter:



Phylogenetische Einordnung UV-B-reaktiver ABC-Transporter (gelb eingekreist). Abbildung enthält nur Sequenzen mit transmembraner Domäne. Die UV-B-responsiven Transportproteine *AtGCN1*, *AtGCN3*, *AtNAP1* und *AtNAP8* besitzen aber keine solche Domäne und sind deshalb nicht im Stammbaum enthalten (Glombitza, 2002; Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001).

2. Zelluläre Transportproteine:

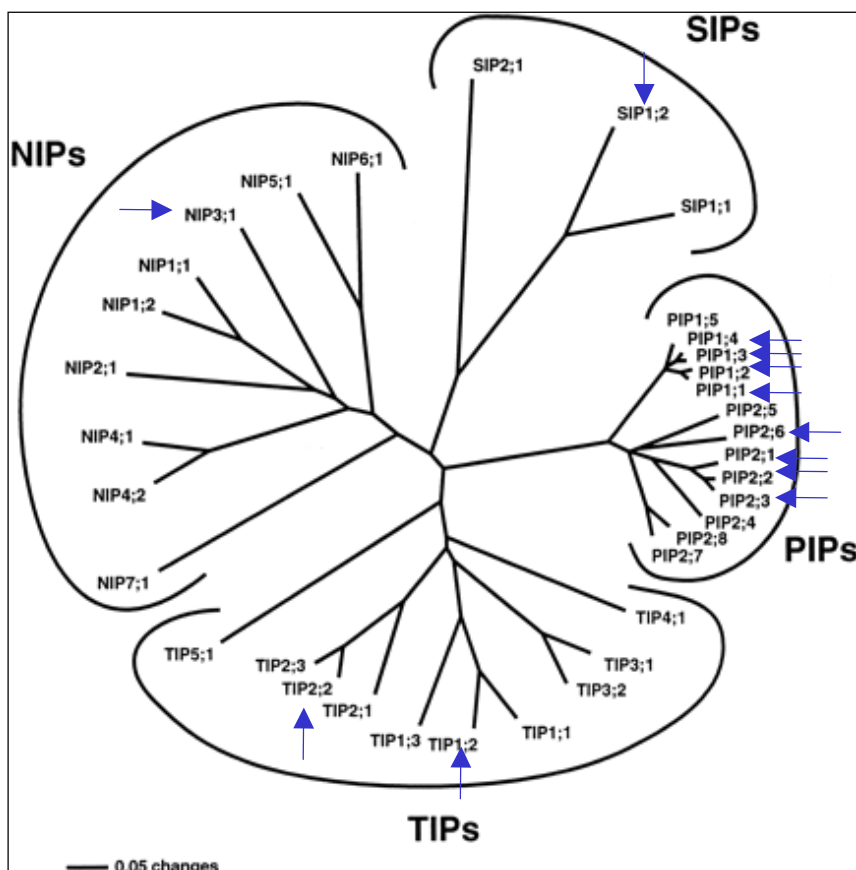
b: Membrankanäleproteine

ANOVA	Induktion (Median _{WG295})	Induktion mit UV-B+UV-A (Median _{WG295+WG305})	Induktion ohne UV-B+UV-A (Median _{WG320-360})	Funktion	Proben-Typ	Genbanknummer	UV-B- Erhöhung/- Erniedrigung (%)	Nomenklatur (Johanson <i>et al.</i> , 2001)
0,0000	2,0	1,8	0,8	Transmembrane protein Salt-stress induced tonoplast intrinsic protein	3'-UTR	At4g00430	144	<i>PIP1;4</i>
0,0065	1,2	1,6	0,8	Aquaporin (plasma membrane intrinsic protein 1B)	3'-UTR	At3g26520	105	<i>TIP1;2</i>
0,0133	1,3	1,1	0,6	Aquaporin (plasma membrane intrinsic protein 2C)	3'-UTR	At2g45960	95	<i>PIP1;2</i>
0,0157	2,0	2,0	1,1	Plasma membrane intrinsic protein 2a	3'-UTR	At2g37180	87	<i>PIP2;3</i>
0,0394	1,5	1,4	0,8	Unknown protein	3'-UTR	At3g53420	66	<i>PIP2;1</i>
0,0268	2,2	1,8	1,1	Aquaporin (plasma membrane intrinsic protein 2B)	3'-UTR	At5g18290	65	<i>SIP1;2</i>
0,0285	2,1	1,8	1,1	Hypothetical protein	3'-UTR	At2g37170	60	<i>PIP2;2</i>
0,0053	2,4	1,6	1,0	Plasma membrane intrinsic protein 1a	3'-UTR	At1g31880	56	<i>NIP3;1</i>
0,0003	1,0	1,0	0,7	Putative aquaporin (water channel protein)	3'-UTR	At3g61430	48	<i>PIP1;1</i>
0,0291	0,9	1,2	0,8	Membrane channel like protein	3'-UTR	At2g39010	44	<i>PIP2;6</i>
0,0091	1,3	1,1	0,7	Putative delta tonoplast integral protein	3'-UTR	At4g17340	44	<i>TIP2;2</i>
0,0137	1,8	1,5	1,1	Putative protein	3'-UTR	At1g52180	43	Pseudogen!
0,0139	1,8	1,6	1,1		3'-UTR	At1g01620	42	<i>PIP1;3</i>

Referenzen:

At4g00430 (*PIP1;4*) (Kinoshita *et al.*, 1994)

Stammbaum-Einordnung UV-B-reaktiver Kanalproteine (Johanson *et al.*, 2001).



3. Glukosyltransferasen:

ANOVA	Induktion (Median _{WG295})	Induktion mitUV-B+UV-A (Median _{WG295+WG305})	Induktion ohneUV-B+UV-A (Median _{WG320-360})	Funktion	Proben-Typ	Genbanknummer	UV-B- Erhöhung/- Erniedrigung (%)	Abkürzung
0,0000	4,3	3,2	0,8	Putative glucosyltransferase	3'-UTR	At2g23210	281	UGT84B3P
0,0025	2,1	1,9	0,7	Glucuronosyl transferase-like protein	3'-UTR	At5g05870	150	UGT76C1
0,0052	2,4	2,3	1,0	Glucosyltransferase like protein	3'-UTR	At4g14100	138	UGT75C1
0,0342	1,5	1,7	0,9	UDP-glucose:sterol glucosyltransferase	3'-UTR	At3g07020	84	UGT80A2
0,0001	2,1	1,7	0,9	Glucuronosyl transferase-like protein	3'-UTR	At5g05880	83	UGT76C4
0,0203	2,0	1,6	0,9	Putative glucosyltransferase	3'-UTR	At2g23250	77	UGT84B2
0,0266	2,2	1,6	0,9	Glucosyltransferase -like protein	3'-UTR	At5g14860	75	UGT90A4
0,0215	1,9	1,6	0,9	Putative protein	3'-UTR	At3g50760	73	UGT: Nicht sicher
0,0184	1,4	1,3	0,7	Putative glucosyltransferase	3'-UTR	At2g15490	70	UGT73B4
0,0034	1,3	1,2	0,8	Glucuronosyl transferase - like protein	3'-UTR	At3g55710	59	UGT76F1
0,0003	1,8	1,4	0,9	Putative glucosyl transferase	3'-UTR	At2g36750	59	UGT73C1
0,0129	1,5	1,4	0,9	Putative glucosyltransferase	3'-UTR	At2g31790	57	UGT74C1
0,0068	1,2	1,3	0,8	Flavonol 3-O- glucosyltransferase-like	3'-UTR	At5g54060	53	UGT79B1
0,0035	0,8	0,8	0,6	UDP rhamnose- anthocyanidin-3- glucoside rhamnosyltransferase - like protein	3'-UTR	At4g27570	39	UGT79B3

Referenzen:

At2g23210 (*UGT84B3P*) (Kita *et al.*, 2000)

At4g14100 (*UGT75C1*) (Yamazaki *et al.*, 1999)

At5g05870 (*UGT76C1*) (Picton *et al.*, 1993)

4. Antioxidatives System:

ANOVA	Induktion (Median _{WG295})	Induktion mitUV-B+UV-A (Median _{WG295+WG305})	Induktion ohneUV-B+UV-A (Median _{WG320-360})	Funktion	Proben-Typ	Genbanknummer	UV-B- Erhöhung/ Erniedrigung (%)	Abkürzung
0,0007	2,2	2,1	0,8	<i>Glutathione reductase, cytosolic</i>	3'-UTR	At3g24170	155	<i>GSH-RED2</i>
0,0018	2,5	2,5	1,1	<i>Glutathione S-transferase</i>	3'-UTR	At1g10370	129	<i>AtGSTU17</i>
0,0000	2,8	2,1	0,9	<i>Glutathione S-transferase-like protein</i>	3'-UTR	At5g17220	127	<i>AtGSTF12</i>
0,0001	1,1	1,5	0,6	<i>Putative copper/zinc superoxide dismutase</i>	EST	At2g28190	127	<i>Cu/Zn-SOD</i>
0,0021	0,8	1,2	0,6	<i>Superoxide dismutase</i>	EST	At4g25100	94	<i>Fe-SOD</i>
0,0020	1,4	1,4	0,8	<i>Putative glutathione peroxidase</i>	3'-UTR	At2g25080	82	<i>GSH-POX3</i>
0,0085	2,5	1,8	1,0	<i>Glutathione S-transferase like protein</i>	3'-UTR	At1g78380	76	<i>AtGSTU19</i>
0,0075	2,2	1,8	1,1	<i>Glutathione S-transferase</i>	3'-UTR	At3g03190	66	<i>AtGSTF11</i>
0,0422	1,1	1,3	0,8	<i>Glutathione transferase AtGST 10</i>	3'-UTR	At5g41210	65	<i>AtGSTT1</i>
0,0019	1,4	1,3	0,8	<i>Superoxidase dismutase</i>	EST	At1g08830	57	<i>Cu/Zn-SOD</i>
0,0219	1,9	1,5	1,0	<i>Glutathione transferase-like</i>	3'-UTR	At5g41220	51	<i>AtGSTT3</i>
0,0014	1,1	1,1	0,8	<i>Putative glutathione peroxidase</i>	EST	At2g25080	40	<i>GSH-POX3</i>
0,0091	1,3	0,9	0,6	<i>Unknown protein</i>	3'-UTR	At1g78370	40	<i>AtGSTU20</i>
0,0415	1,4	1,3	1,0	<i>Atpm24.1 utilizes cumene hydroperoxide and trans-stilbene oxide as substrate, MedLine ID 8290582</i>	EST(cross hybridization!!)	At4g02520	35	
0,0001	1,2	1,1	0,8	<i>Thylakoid-bound ascorbate peroxidase</i>	EST	At1g77490	31	<i>APOX</i>
0,0011	1,4	1,2	0,9	<i>Peroxidase like protein</i>	EST	At2g38380	31	<i>POX</i>

Rote Hinterlegung: At2g25080 war sowohl als EST als auch als 3'-UTR auf dem DNA-Array.

Referenzen:

At3g24170 (*GSH-RED2*) (Lee *et al.*, 1998; Loebler, 1996)

At2g25080 (*GSH-POX3*) (Gachotte & Benveniste, 1996; Jung *et al.*, 2002)

At1g77490 (*APOX*) (Jespersen *et al.*, 1997)

At2g38380 (*POX*) (Fujiyama *et al.*, 1990)

5. Photosynthese:

ANOVA	Induktion (Median _{WG295})	Induktion mitUV-B+UV-A (Median _{WG295+WG305})	Induktion ohneUV-B+UV-A (Median _{WG320-360})	Funktion	Proben-Typ	Genbanknummer	UV-B- Erhöhung/ Erniedrigung (%)
0,0034	1,7	1,4	0,9	<i>Unknown protein (chlorophyll catabolism)</i>	genomisch	At4g37000	50
0,0006	0,9	1,0	0,7	<i>23 kDa polypeptide of oxygen-evolving complex</i>	EST	At1g06680	47
0,0398	1,5	1,5	1,1	<i>Beta-carotene hydroxylase</i>	genomisch	At5g52570	43
0,0391	1,1	1,1	0,8	<i>Putative triosephosphate isomerase</i>	EST	At2g21170	33

Referenzen:

At1g06680 (Kochhar *et al.*, 1996)

At4g37000 (Wüthrich *et al.*, 2000)

At5g52570 (Sun *et al.*, 1996)

At2g21170 (Henze *et al.*, 1994)

6. Ethylenstoffwechsel:

Induktion (Median _{WG295})	Induktion mitUV-B+UV-A (Median _{WG295-WG305})	Induktion ohneUV-B+UV-A (Median _{WG320-360})	Proben Abkürzung	Funktion	Proben-Typ	UV-B- Erhöhung/ Erniedrigung (%)
2,8	1,9	1,2	ACS-5	<i>1-Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (ACS5)</i>	genomisch	64
2,0	1,6	1,1	ACS-2	<i>1-Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (ACC2)</i>	genomisch	53
1,4	1,3	0,9	ERS2	<i>Putative ethylene receptor ERS2</i>	EST	49
1,6	1,5	1,1	ACS-1	<i>1-Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase-like protein</i>	genomisch	41

Referenzen:

At3g61510 (*ACS1*) (Liang *et al.*, 1995)

At1g01480 (*ACS2*) (Liang *et al.*, 1996; Yamasaki *et al.*, 2000)

At5g65800 (*ACS5*) (Vogel *et al.*, 1998)

7. Primärstoffwechsel:

ANOVA	Induktion (Median _{WG295})	Induktion mitUV-B+UV-A (Median _{WG295-WG305})	Induktion ohneUV-B+UV-A (Median _{WG320-360})	Funktion	Proben-Typ	Genbanknummer	UV-B- Erhöhung/ Erniedrigung (%)
0,0017	1,4	1,6	0,9	<i>Glyoxalase I, putative</i>	3'-UTR	At1g08110	74
0,0368	1,6	1,5	0,9	<i>Glyoxalase II</i>	3'-UTR	At1g53580	66
0,0009	1,5	1,5	0,9	<i>Unknown protein (similar to chloroplast omega-6 fatty acid desaturase (fad6))</i>	EST	At3g12120	66
0,0455	1,6	1,6	1,0	<i>Glyoxalase II isozyme like protein</i>	3'-UTR	At1g06130	56
0,0043	1,7	1,5	0,9	<i>Succinate dehydrogenase iron-protein subunit, putative</i>	EST	At3g27380	69
0,0295	1,7	1,5	1,0	<i>H⁺-transporting ATPase type 2, plasma membrane</i>	EST	At4g30190	44
0,0079	1,3	1,0	0,8	<i>H⁺-transporting ATP synthase beta chain (mitochondrial) - like protein</i>	EST	At5g08670	35

Referenzen:

Glyoxalasen: At1g08110, At1g53580 und At1g06130 (Hou *et al.*, 1995; Skipsey *et al.*, 2000; Westwood & Thornalley, 1995)

At4g30190 (Harper *et al.*, 1989)

8. Sekundärstoffwechsel:

ANOVA	Induktion (Median _{WG295})	Induktion mit UV-B+UV-A (Median _{WG295+WG305})	Induktion ohne UV-B+UV-A (Median _{WG320-360})	Funktion	Proben-Typ	Genbanknummer	UV-B- Erhöhung/ Erniedrigung (%)
0,0030	1,8	1,5	0,7	<i>Indole-3-acetate beta-glucosyltransferase</i>	cDNA	AT3g21560	110
0,0007	2,2	1,4	0,8	<i>Chalcone synthase</i>	EST	At5g13930	66
0,0136	1,7	1,3	0,8	<i>Putative flavanone 3-beta-hydroxylase</i>	genomisch	At4g10490	54
0,0004	1,6	1,4	1,0	<i>Putative NADPH oxidoreductase</i>	EST	At1g75280	48
0,0284	1,4	1,3	1,0	<i>Chalcone isomerase</i>	EST	At3g55120	32

Referenzen:

At3g21560 (*UGT84A2*) (Lim *et al.*, 2001)

At5g13930 (*CHS*) (Feinbaum & Ausubel, 1988)

At1g75280 (*IFR*) (Baldrige *et al.*, 1998; Paiva *et al.*, 1994)

At3g55120 (*CHI*) (Kuittinen & Aguade, 2000)

9. DNA-Reparatur:

ANOVA	Induktion (Median _{WG295})	Induktion mit UV-B+UV-A (Median _{WG295+WG305})	Induktion ohne UV-B+UV-A (Median _{WG320-360})	Funktion	Proben-Typ	Genbanknummer	UV-B- Erhöhung/ Erniedrigung (%)
0,0251	1,7	1,6	0,9	<i>6-4 photolyase (UVR3)</i>	genomisch	At3g15620	75
0,0103	1,8	1,7	1,0	<i>Putative type II CPD photolyase</i>	genomisch	At1g12370	67

Referenzen:

At3g15620 (*UVR3*) (Nakajima *et al.*, 1997)

At1g12370 (*CPDII*) (Takahashi *et al.*, 2002)

10. Pathogenabwehr und Zellregulation:

ANOVA	Induktion (Median _{WG295})	Induktion mit UV-B+UV-A (Median _{WG295+WG305})	Induktion ohne UV-B+UV-A (Median _{WG320-360})	Funktion	Proben-Typ	Genbanknummer	UV-B- Erhöhung/ Erniedrigung (%)
0,0207	2,1	1,9	0,9	<i>PEARL1 1</i>	EST	At4g12480	111
0,0345	2,2	1,9	1,1	<i>Predicted GPI-anchored protein</i>	EST	At1g08500	85
0,0023	1,8	1,6	0,9	<i>Nitrilase 3</i>	EST	At3g44320	65
0,0004	1,3	1,4	0,87	<i>Non-race specific disease resistance protein (NDR1)</i>	EST	At3g20600	56
0,0062	1,0	1,0	0,7	<i>Unknown protein</i>	EST	At1g76890	50
0,0240	1,8	1,7	1,1	<i>Putative lectin</i>	EST	At3g16450	47
0,0065	1,2	1,2	0,9	<i>Vegetative storage protein Vsp1</i>	EST	At5g24780	38
0,0141	1,6	1,3	1,0	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kD 8</i>	EST	AT5g41700	31

Referenzen:

At5g24780 (VSP) (Utsugi *et al.*, 1998)

At3g20600 (*NDR1*) (Century *et al.*, 1997)

At3g16450 (Capella *et al.*, 2001; Eckardt, 2001), At1g76890 (*GmGt-2*) (O'Grady *et al.*, 2001)

At3g44320 (*NIT3*) (Hillebrand *et al.*, 1998), At4g12480 (*PEARL1*) (Coupe *et al.*, 1993)

UV-B-abregulierte Gene:

ANOVA	Induktion (Median _{WG295})	Induktion mitUV-B+UV-A (Median _{WG295+WG305})	Induktion ohneUV-B+UV-A (Median _{WG320-360})	Funktion	Proben-Typ	Genbanknummer	UV-B- Erhöhung/- Erniedrigung (%)
0,0004	0,4	0,5	1,0	<i>Atpm24.1 glutathione S transferase</i>	3'-UTR	At4g02520	-55
0,0006	0,8	0,5	1,1	<i>Putative glutathione S-transferase</i>	3'-UTR	At2g02930	-53
0,0317	0,5	0,5	1,1	<i>Putative UDP-glucosyl transferase</i>	3'-UTR	At3g02100	-53
0,0121	0,7	0,6	1,2	<i>Glycine-rich RNA binding protein</i>	EST	At2g21660	-47
0,0100	0,8	0,7	1,1	<i>Glutathione S-transferase</i>	EST	At1g02930	-40
0,0071	0,7	0,7	1,1	<i>Glutathione S-transferase</i>	3'-UTR	At1g02920	-39
0,0011	0,7	0,6	1,0	<i>Glutathione S-transferase</i>	EST	At1g02930	-34
0,0007	1,2	0,9	1,4	<i>Photosystem II type I chlorophyll a/b binding protein</i>	EST	At2g34420	-33

gelbe Hinterlegung: At1g02930 war zweimal auf dem DNA-Array lokalisiert. Zudem zeigt es eine sehr hohe Sequenzhomologie zu At02920 .

Referenzen:

At4g02520 (*AtGSTF2*) (Glombitza *et al.*, 2004; Reinemer *et al.*, 1996; Zettl *et al.*, 1994; Zhou & Goldsbrough, 1993)

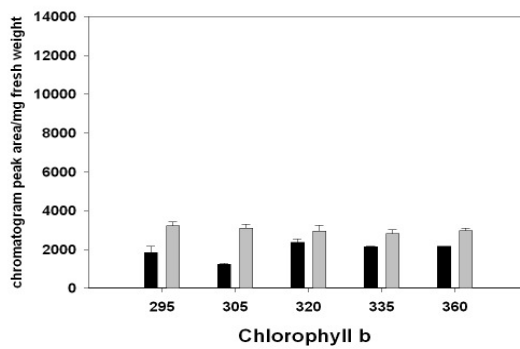
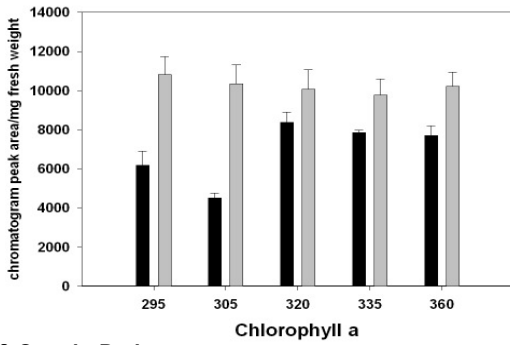
At2g21660 (Heintzen *et al.*, 1994)

At3g02100 (*UGT83A1*) (Tang *et al.*, 2002)

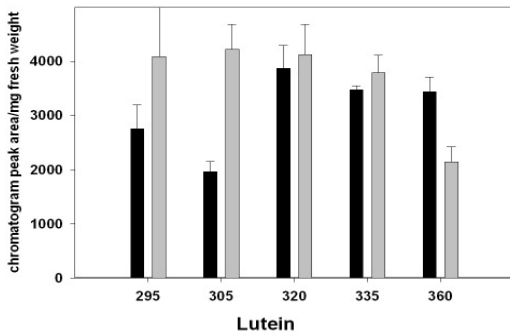
At2g34420 (*Lhb1B*) (McGrath *et al.*, 1992)

Anhang B: Photosynthetische Pigmente

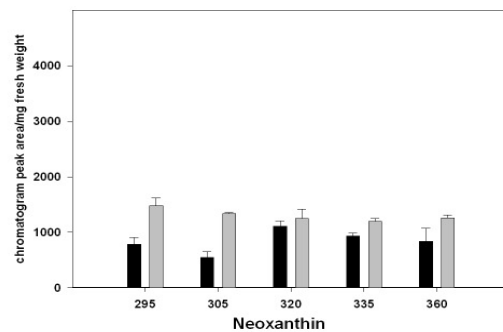
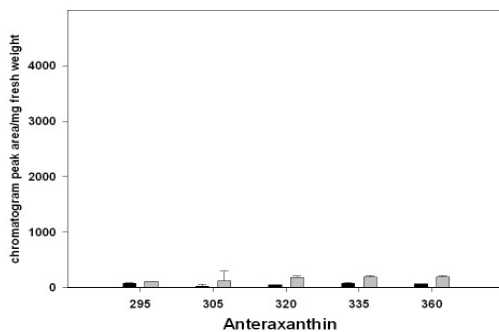
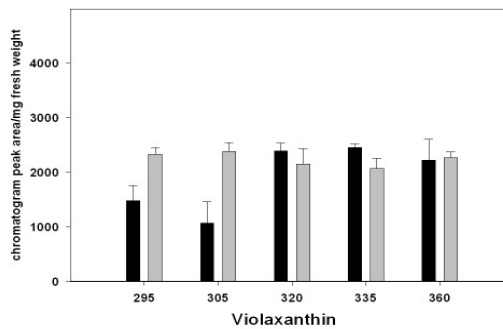
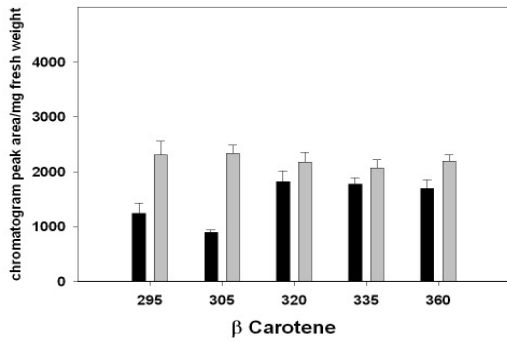
Chlorophyll a/b:



β -Carotin-Derivat:



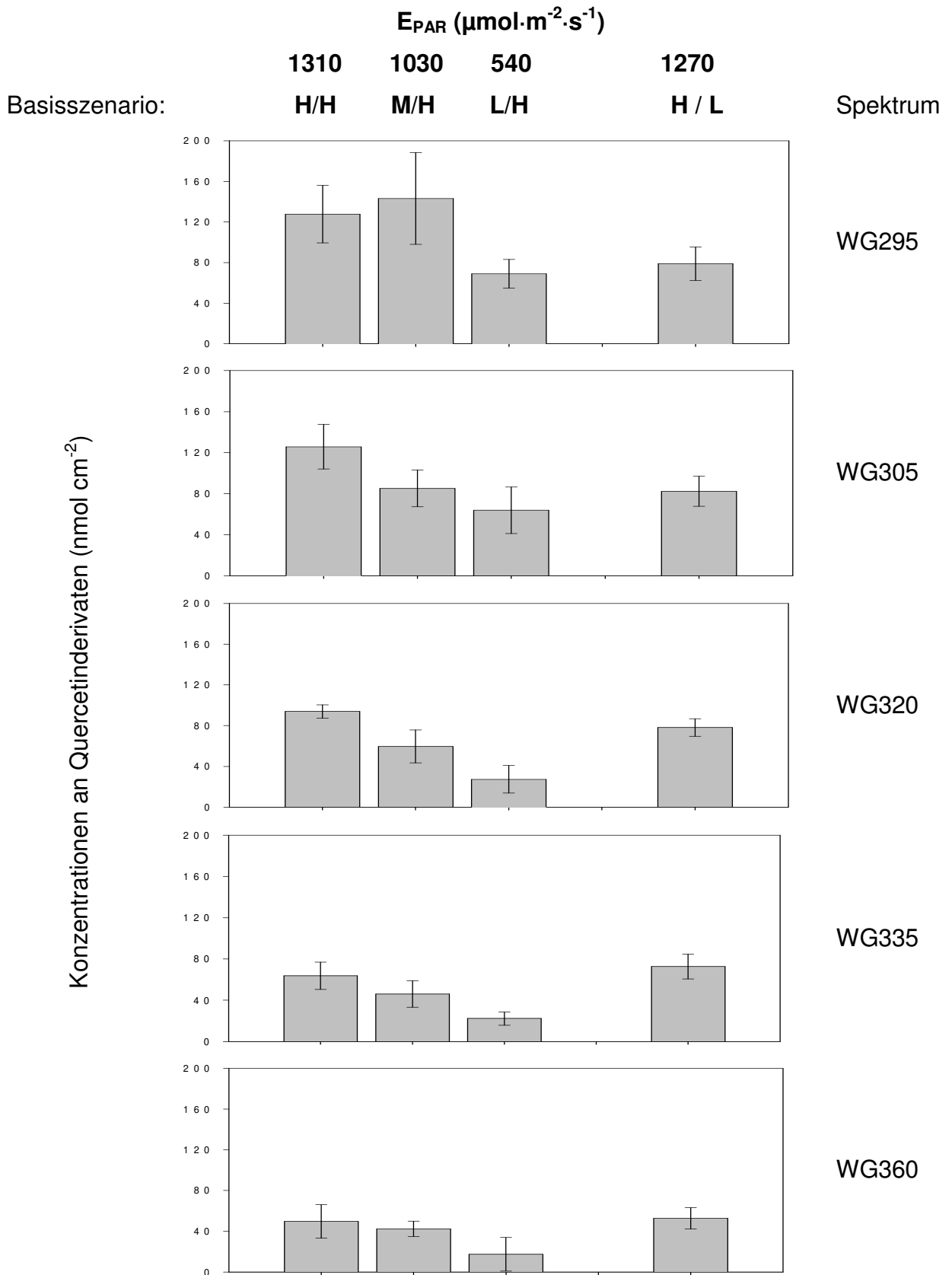
α -Carotin-Derivate:



UV-spektrale Abhängigkeit der Konzentrationen der Pigmente des Photosystems II.

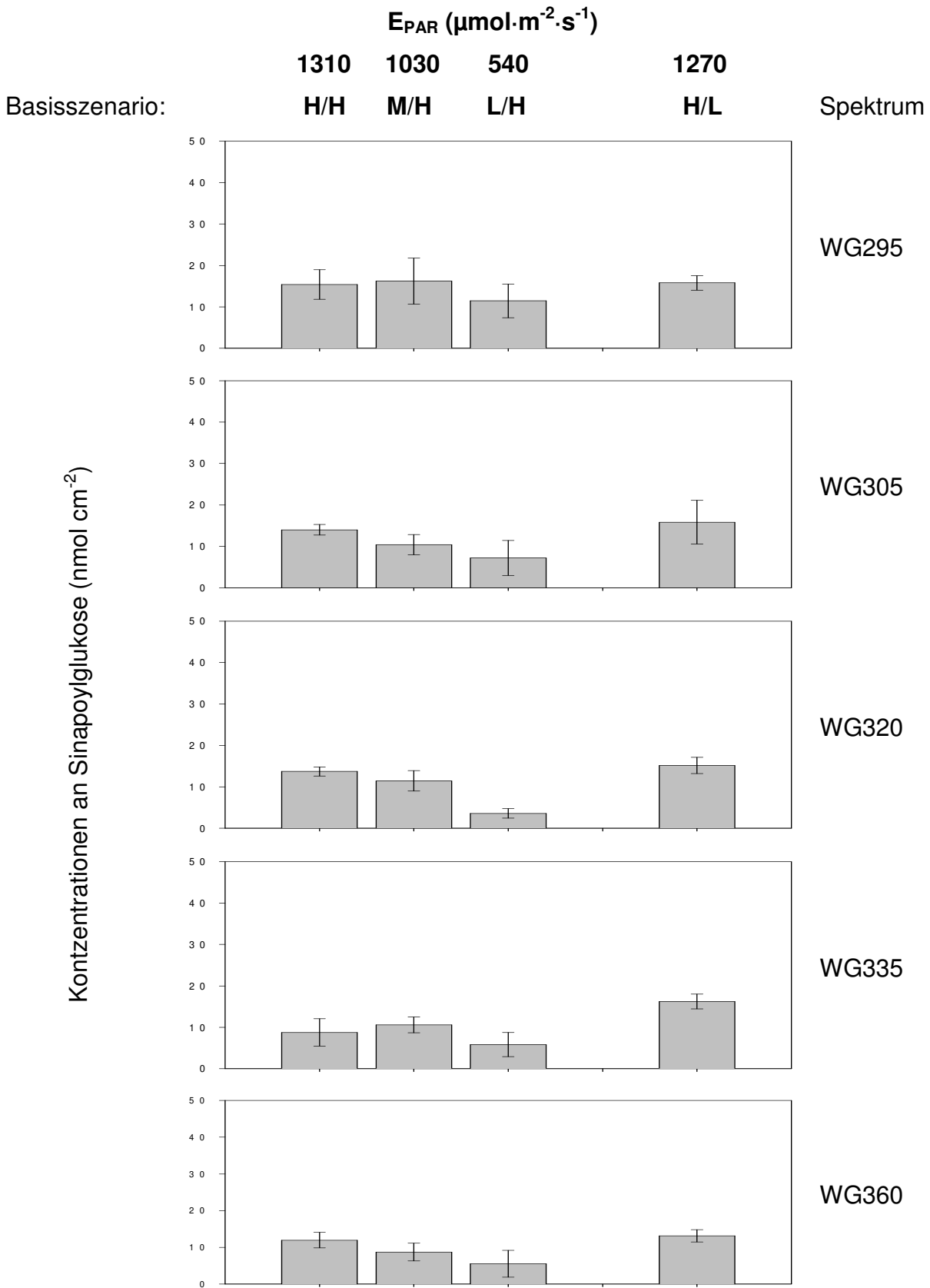
Die grauen Balken entsprechen den Messwerten des Versuches V320 (PAR: 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), schwarze Balken repräsentieren die des Versuches V318 (PAR: 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Die HPLC-Analytik wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung Experimentelle Umweltsimulation durchgeführt.

Anhang C: Akkumulation der Quercetinderivate in Abhängigkeit der PAR



Die Balken entsprechen den Gesamt-Mittelwerten der Konzentrationen an Quercetinderivaten beider Experimente eines Basisszenarios mit den dazugehörigen Standardabweichungen ($n = 2 \times 3$).

Anhang D: Akkumulation von Sinapoylglukose in Abhängigkeit der PAR



Die Balken entsprechen den Gesamt-Mittelwerten der Konzentrationen an Sinapoylglukose beider Experimente eines Basisszenarios mit den dazugehörigen Standardabweichungen ($n = 2 \times 3$).

Danksagung

Folgenden Personen danke ich herzlich für die Unterstützung bei meiner Dissertation:

Herrn PD Dr. Christian Langebartels für die Überlassung dieses interessanten Themas und für die kritische Überprüfung der Manuskripte.

Herrn Prof. Dr. Gert Forkmann für die bereitwillige Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Wenzel für seine Bereitschaft die Prüfungskommission zu leiten.

Herrn Prof. Dr. Heinrich Sandermann für die hervorragende interdisziplinäre Integration am Institut für Biochemische Pflanzenpahtologie.

Herrn Dr. habil. Dieter Ernst für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe Molekulare Phytodiagnostik und für die Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Werner Heller für seine ständige Diskussionsbereitschaft und für seine fundierte fachliche Betreuung hinsichtlich sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe.

Herrn Dr. Harald Seidlitz und seinen Mitarbeitern der Abteilung Experimentelle Umweltsimulation für die Planung und die Durchführung der Bestrahlungsversuche.

Herrn PD Dr. Anton Schöffner für die Bereitstellung der spezifischen 3'-UTR-Proben.

Herrn Dr. Andreas Krins für die spektralanalytischen Modellierungen.

Herrn Dr. Gerhard Welzl vom Institut für Biomathematik und Biometrie für die Beratung bei statistischen Problemen.

Frau Susanne Stich für die zuverlässige Durchführung der HPLC-Analytik.

Dem Bayerischen Staatsministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst, das im Rahmen des Bayerischen Forschungsverbundes „Erhöhte UV-Strahlung in Bayern – Folgen und Maßnahmen (BayForUV)“ die Dissertation finanziert hat.

Allen Postdocs, Doktoranden und technischen Assistenten des Instituts für Biochemische Pflanzenpathologie für das konstruktive Arbeitsumfeld.

Meinen Eltern, Bekannten und Freunden. Besonderer Dank gilt meiner Freundin Janine Appelfelder und meinem langjährigen Freund Dr. phil. Werner Simon (Split).

Lebenslauf

Geboren:

2.7.1971 in Neumarkt i.d. Opf. als Sohn der Eltern Richard und Hilde Götz (geb. Reiff)

Grund- und Hauptschule:

1977-1983 Grund- und Hauptschule Holnstein

Realschule:

1983-1987 Knabenrealschule Neumarkt i. d. Opf.: *Mittlere Reife*

Berufsschule:

1987-1990 Berufsschule Neumarkt: *Landwirtschaftsgehilfe*

Landwirtschaftsschule:

1990-1992 Landwirtschaftsschule Neumarkt i. d. Opf.: *Staatlich Geprüfter Landwirt*

Hochschulreife:

1992-1993 Fachoberschule Triesdorf: *Fachhochschulreife*

1993-1994 Vordiplom an der FH Triesdorf: *Hochschulreife*

Studium:

1994-2000 Studium der Agrarwissenschaften an der Technische Universität München mit den Schwerpunkten Genetik und Phytopathologie

1999-2000 Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung (AG Molekulare Marker) bei Prof. Wenzel: Entwicklung molekularer Marker zur Unterscheidung des α - und β -mitochondrialen Genomes sowie des cytoplasmatisch männlich sterilen γ -Chondriomtyps (*Solanum* spp.):

Dipl.-Ing. (Univ.)

Promotion:

2000-2004 Institut für Biochemische Pflanzenpathologie (GSF München/Neuherberg) bei PD Dr. Langebartels: Die spektrale Abhängigkeit der Wirkung von UV-induzierten Reaktionen in *Arabidopsis thaliana*:

Dr. rer. nat.