

GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit

# Regulation des Shikimatstoffwechsels der europäischen Buche (*Fagus sylvatica* L.) unter dem Einfluß von Ozon

Gunter Andreas Betz

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. R. Matyssek  
Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. Chr. Langebartels  
2. Univ.-Prof. Dr. G. Wenzel

Die Dissertation wurde am 29.12.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 30.03.2006 angenommen.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Arbeiten innerhalb des Sonderforschungsbereichs 607 . . . . .	1
1.2	Die Europäische Buche ( <i>Fagus sylvatica</i> L.) . . . . .	1
1.2.1	Verbreitung der europäischen Buche . . . . .	1
1.2.2	Gesundheitlicher Zustand der Buche in Deutschland . . . . .	2
1.2.3	Molekularbiologische Untersuchung der Buche . . . . .	4
1.3	Der Luftschadstoff Ozon und seine Wirkung auf Pflanzen . . . . .	5
1.3.1	Vorkommen, Entstehung und Umsetzung von Ozon . . . . .	5
1.3.2	Ozon als Schadstoff für Pflanzen . . . . .	6
1.3.3	Grenzwertkonzepte der Ozonexposition . . . . .	7
1.4	Der Shikimatstoffwechsel . . . . .	9
1.4.1	Allgemeine Bedeutung des Shikimatstoffwechsels . . . . .	9
1.4.2	Enzymatische Reaktionen des Shikimatstoffwechsels . . . . .	10
1.4.3	Subzelluläre Lokalisation des Shikimatstoffwechsels . . . . .	19
1.5	Die Biosynthese von Ethylen . . . . .	20
1.6	Themenstellung . . . . .	21
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>22</b>
2.1	Material . . . . .	22
2.2	Pflanzenkultur und Ernte von Blattproben . . . . .	27
2.2.1	Pflanzung und Überwinterung . . . . .	27
2.2.2	Technische Ausstattung im Gewächshaus . . . . .	28
2.2.3	Klimabedingungen im Gewächshaus . . . . .	28
2.2.4	Bewässerung und Düngung . . . . .	28
2.2.5	Schädlings- und Unkrautbekämpfung . . . . .	28
2.2.6	Ernte und Lagerung der Blattproben . . . . .	29
2.3	Bonitur der Versuchspflanzen . . . . .	29
2.3.1	Knospenaustrieb . . . . .	29
2.3.2	Ozonsymptome . . . . .	29
2.4	Ozon-Expositionsversuche . . . . .	31
2.4.1	Versuch A: Erstellung ozonregulierter cDNA-Banken . . . . .	31
2.4.2	Versuch B: Expressionsanalyse von Genen des Shikimatstoffwechsels unter dem Einfluß von Ozon . . . . .	31
2.4.3	Versuch C: Quantifizierung von Transkripten und Enzymen des Shikimatstoffwechsels unter biotischem und abiotischem Streß . . . . .	31
2.4.4	Versuch D: Expressionsanalyse von Genen des Shikimatstoffwechsels an ausgewachsenen Buchen unter dem Einfluß von Ozon im Freiland . . . . .	32
2.5	Allgemeine molekularbiologische Methoden . . . . .	34

2.6	Genexpressionsanalyse mit quantitativer Realtime-PCR . . . . .	37
2.7	Erstellung ozonregulierter subtraktiver cDNA-Banken . . . . .	38
2.7.1	Subtraktive Hybridisierung und Suppressions-PCR . . . . .	38
2.7.2	Erstellung der subtraktiven cDNA-Banken SSH1 und SSH2 . . . . .	38
2.7.3	Sequenzierung und Klassifikation der cDNA-Klone . . . . .	40
2.8	DNA-Chip Analysen . . . . .	40
2.8.1	Herstellung der DNA-Chips . . . . .	41
2.8.2	Hybridisierung der DNA-Chips mit cDNA . . . . .	42
2.9	Klonierungen mit degenerierten Primerpaaren . . . . .	44
2.10	RACE-Methoden . . . . .	45
2.11	Allgemeine Methoden der Proteinbiochemie . . . . .	48
2.11.1	Isolierung löslicher Proteine aus Buchenblättern . . . . .	48
2.11.2	Protein-Quantifizierung mittels Bradford-Reagenz . . . . .	48
2.11.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .	48
2.11.4	Färben und Auswertung von SDS-Polyacrylamid-Gelen . . . . .	48
2.12	Nachweis von Enzymen des Shikimatstoffwechsels . . . . .	49
2.12.1	Herstellung der Expressionskonstrukte . . . . .	49
2.12.2	Heterologe Proteinexpression . . . . .	50
2.12.3	Herstellung monoklonaler Antikörper . . . . .	51
2.12.4	Validierung der monoklonalen Antikörper . . . . .	51
2.12.5	Westernblot-Methode . . . . .	52
2.13	Infektion von Buchen mit <i>Apiognomonina errabunda</i> . . . . .	53
2.14	Analyse von Sekundärmetaboliten und Signalstoffen . . . . .	53
2.14.1	Ethylen . . . . .	53
2.14.2	Freie und konjugierte 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure . . . . .	54
2.14.3	Salicylsäure und Gentisinsäure . . . . .	55
2.14.4	Lösliche und zellwandgebundene phenolische Inhaltsstoffe . . . . .	56
2.14.5	Analyse von Lignin . . . . .	58
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> . . . . .	<b>59</b>
3.1	Ozonexpositionsversuche . . . . .	59
3.2	Entwicklung von Blattläsionen . . . . .	62
3.2.1	Ozonbedingte Blattläsionen . . . . .	62
3.2.2	Ausbildung von Blattläsionen nach Infektion mit <i>Apiognomonina errabunda</i> . . . . .	68
3.3	Klonierung von Gensequenzen aus <i>Fagus sylvatica</i> . . . . .	69
3.3.1	Erstellung ozoninduzierter subtraktiver cDNA-Banken . . . . .	69
3.3.2	Klonierung von cDNA-Sequenzen putativer Gene des Shikimatstoffwechsels mit degenerierten Primern . . . . .	73
3.3.3	Anwendung von RACE-Methoden zur Klonierung der vollständigen kodierenden Sequenz einzelner Isoenzyme aus dem Shikimatstoffwechsel der Buche . . . . .	79
3.4	Analyse der ozoninduzierten Genexpression mittels DNA-Chips . . . . .	82

3.4.1	Anfertigung der DNA-Chips . . . . .	82
3.4.2	Untersuchung der cDNA-Banken SSH1 und SSH2 nach ozonregulierten cDNA-Klonen . . . . .	82
3.4.3	Analyse der Genexpression einzelner SSH-Klone mittels quantitativer Realtime-PCR . . . . .	85
3.5	Regulation von Genen des Shikimatstoffwechsels . . . . .	87
3.5.1	Differenzierung der DAHPS-Isoformen aus der europäischen Buche mittels quantitativer Realtime-PCR . . . . .	87
3.5.2	Versuch A: Erstellung ozonregulierter cDNA-Banken . . . . .	89
3.5.3	Versuch B: Expressionsanalyse von Genen des Shikimatstoffwechsels unter dem Einfluß von Ozon . . . . .	90
3.5.4	Versuch C: Quantifizierung von Transkripten und Enzymen des Shikimatstoffwechsels unter biotischem und abiotischem Streß . . . . .	94
3.5.5	Versuch D: Expressionsanalyse von Genen des Shikimatstoffwechsels an ausgewachsenen Buchen unter dem Einfluß von Ozon im Freiland . . . . .	104
3.6	Regulation von Genen der Ethylenbiosynthese . . . . .	106
3.6.1	Differenzierung der Isoformen von ACC Synthase und ACC Oxidase aus der europäischen Buche . . . . .	106
3.6.2	Versuch B . . . . .	108
3.6.3	Versuch C . . . . .	109
3.7	Regulation von Signalstoffen und Sekundärmetaboliten . . . . .	113
3.7.1	Ethylen . . . . .	113
3.7.2	1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure . . . . .	114
3.7.3	Salicylsäure und Gentisinsäure . . . . .	116
3.7.4	Phenolische Inhaltsstoffe . . . . .	119
3.7.5	Lignin . . . . .	129
3.8	Akkumulation putativer Shikimatstoffwechsel-Enzyme . . . . .	130
3.8.1	Herstellung der Expressionskonstrukte . . . . .	130
3.8.2	Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i> . . . . .	130
3.8.3	Aufreinigung der GST-Fusionsproteine zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen DAHPS3 und DHQD/SD . . . . .	132
3.8.4	Validierung der monoklonalen Antikörper gegen DAHPS3 und DHQD/SD . . . . .	133
3.8.5	Westernblot-Analyse der Akkumulation von DAHPS3 und DHQD/SD im Verlauf der Ozonexposition von Versuch C . . . . .	134
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> . . . . .	<b>140</b>
4.1	Umsteuerung zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel . . . . .	140
4.2	Ozonexpositionsversuche . . . . .	141
4.2.1	Einflußfaktoren der Wirkung von Ozon auf Bäume . . . . .	141
4.2.2	Interaktion zwischen Ozon und biotischen Stressoren . . . . .	145

---

4.3	Ozoninduzierte Gene aus den cDNA-Banken SSH1 und SSH2 . . . . .	146
4.4	Regulation des Shikimatstoffwechsels . . . . .	153
4.4.1	3-Deoxy- <i>D-arabino</i> -Heptulose 7-Phosphat Synthase . . . . .	154
4.4.2	3-Dehydroquinate Synthase . . . . .	159
4.4.3	3-Dehydroquinate Dehydratase / Shikimat Dehydrogenase . . . . .	161
4.4.4	Shikimat Kinase . . . . .	164
4.4.5	5-Enolpyruvylshikimat 3-Phosphat Synthase . . . . .	166
4.4.6	Chorismat Synthase . . . . .	169
4.4.7	Chorismat Mutase . . . . .	170
4.5	Regulation der Ethylenbiosynthese . . . . .	172
4.6	Signalstoffe und Sekundärmetabolite . . . . .	174
4.6.1	Salicylsäure . . . . .	174
4.6.2	Gentisinsäure . . . . .	175
4.6.3	Phenolische Inhaltsstoffe . . . . .	175
4.6.4	Lignin . . . . .	178
4.7	Zusammenfassung der Arbeit . . . . .	181
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>183</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>202</b>
6.1	Abkürzungsverzeichnis . . . . .	202
6.2	Nukleotid- und Aminosäure-Sequenzen . . . . .	203
6.3	Informationen zur Klonierung von cDNA-Sequenzen aus der Buche . . . . .	213
6.4	Daten der Genexpressionsanalyse . . . . .	220
6.5	Analyse von Signalstoffen und Sekundärmetaboliten . . . . .	225
6.6	Bonitur der ozonbedingten Blattläsionen . . . . .	231

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Versuchsstandort 'Kranzberger Forst' . . . . .	2
1.2	Entwicklung der Kronenverlichtung bei der Buche in Deutschland . . . . .	3
1.3	Reaktionen des Shikimatstoffwechsels . . . . .	11
1.4	Reaktion der 3-Deoxy- <i>D</i> -arabino-Heptulose-7-Phosphat Synthase . . . . .	12
1.5	Reaktion der 3-Dehydroquinate Synthase . . . . .	14
1.6	Reaktion der 3-Dehydroquinate Dehydratase / Shikimate Dehydrogenase . . . . .	15
1.7	Reaktion der Shikimate Kinase . . . . .	16
1.8	Reaktion der 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphat Synthase . . . . .	16
1.9	Reaktion der Chorismate Synthase . . . . .	17
1.10	Enzymatische Umsetzungen von Chorismat . . . . .	18
2.1	DNA- und Protein-Standards . . . . .	26
2.2	Skala zur optischen Bonitur ozonbedingter Blattsymptome . . . . .	30
2.3	Behandlungsvarianten in Versuch C . . . . .	33
2.4	Ablauf bei der Erstellung einer subtraktiven cDNA-Bank . . . . .	39
2.5	Anordnung der cDNA-Klone auf den DNA-Chips . . . . .	42
2.6	Ablauf der RLM-RACE . . . . .	47
2.7	Herstellung von Expressionsklonen mit dem Gateway <sup>TM</sup> -System . . . . .	49
2.8	Schema der Thioacidolyse von Lignin . . . . .	58
3.1	Zeitliche Übersicht der Ozonexpositionsversuche und molekularbiologischen Untersuchungen . . . . .	59
3.2	Blick in die Kontrollkabine und die Ozonexpositionskabine des Versuchsgewächshauses der GSF . . . . .	60
3.3	Symptomausprägung an einer dreijährigen Buche nach 30-tägiger Ozonbehandlung (Versuch A) und Kontrollpflanze ohne Symptome . . . . .	63
3.4	Entwicklung von Blattläsionen im Verlauf von Versuch B . . . . .	64
3.5	Anteil der Blätter mit ozonbedingten Läsionen in Versuch B . . . . .	65
3.6	Entwicklung von Läsionen an einem ozonexponierten Buchenblatt im Verlauf von Versuch C . . . . .	66
3.7	Anteil der Blätter mit ozonbedingten Läsionen in Versuch C . . . . .	67
3.8	Typische Schädigung eines Buchenblattes durch den Erreger der Buchenblattbräune ( <i>Apiognomonia errabunda</i> ) . . . . .	68
3.9	Erstellung der subtraktiven cDNA-Bank SSH1 . . . . .	70
3.10	Funktionelle Zuordnung der nicht redundanten cDNA-Klone aus den subtraktiven cDNA-Banken SSH1 und SSH2 (Versuch A) . . . . .	72
3.11	Gradienten-PCR mit degenerierten Primern . . . . .	74
3.12	Alignment von drei putativen DAHPS-Fragmenten aus <i>Fagus sylvatica</i> mit drei DAHPS-Sequenzen aus <i>Arabidopsis thaliana</i> . . . . .	77

3.13 RACE-PCR Reaktionen zur Klonierung von 5'-Enden mutmaßlicher Gene des Shikimatstoffwechsels aus der europäischen Buche . . . . .	80
3.14 Ausschnitt eines Fluoreszenz-markierten DNA-Chips bei der Analyse ozonregulierter Gene . . . . .	83
3.15 Analyse der ozonbedingten Genexpression von <i>Fs-COMT</i> und <i>Fs-POX</i> (Versuch C) . . . . .	86
3.16 Überprüfung der qRT-PCR Primer für die Genexpressionsanalyse der drei putativen <i>Fs-DAHPS</i> -Isoformen auf Spezifität . . . . .	88
3.17 Position der zur Expressionsanalyse der drei putativen <i>Fs-DAHPS</i> -Isoformen aus der europäischen Buche verwendeten quantitativen Realtime-PCR-Primer . . . . .	89
3.18 Analyse der ozonbedingten Genexpression putativer Gene des Shikimatstoffwechsels in Versuch A . . . . .	90
3.19 Analyse der ozonbedingten Expression der Gene <i>Fs-DAHPS3</i> , <i>Fs-DHQS</i> und <i>Fs-DHQS/SD</i> (Versuch B) . . . . .	91
3.20 Analyse der ozonbedingten Expression der Gene <i>Fs-SK</i> , <i>Fs-EPSPS</i> , <i>Fs-CS</i> und <i>Fs-CM</i> (Versuch B) . . . . .	92
3.21 Analyse der ozonbedingten Expression der Gene <i>Fs-rbcS</i> und <i>Fs-PR1</i> (Versuch B) . . . . .	93
3.22 Analyse der ozonbedingten Expression von drei putativen 3-Deoxy-D-arabino-Heptulosonat 7-Phosphat Synthase Isoformen (Versuch C) . . . . .	96
3.23 Analyse der ozonbedingten Expression der Gene <i>Fs-DHQS</i> , <i>Fs-DHQS/SD</i> und <i>Fs-SK</i> (Versuch C) . . . . .	98
3.24 Analyse der ozonbedingten Expression der Gene <i>Fs-EPSPS</i> , <i>Fs-CS</i> und <i>Fs-CM</i> (Versuch C) . . . . .	100
3.25 Analyse der ozonbedingten Expression der Gene <i>Fs-PR1</i> und <i>Fs-rbcL</i> (Versuch C) . . . . .	101
3.26 Expressionsniveau aller untersuchten putativen Gene des Shikimatstoffwechsels aus der europäischen Buche (Versuch C) . . . . .	103
3.27 Analyse der ozonbedingten Expression der putativen Gene des Shikimatstoffwechsels bei adulten Buchen unter doppelt ambientem Ozonregime (Versuch D) . . . . .	105
3.28 Position der qRT-PCR-Primer im homologen 3'-cDNA Bereich von <i>Fs-ACO1</i> und <i>Fs-ACO2</i> zur Unterscheidung der beiden putativen ACC Oxidase Isoformen . . . . .	107
3.29 Analyse der ozonbedingten Expression der Gene <i>Fs-ACS2</i> , <i>Fs-ACO1</i> und <i>Fs-rbcS</i> (Versuch B) . . . . .	108
3.30 Analyse der ozonbedingten Expression der Gene <i>Fs-ACS1</i> und <i>Fs-ACS2</i> (Versuch C) . . . . .	110
3.31 Analyse der ozonbedingten Expression der Gene <i>Fs-ACO1</i> und <i>Fs-ACO2</i> (Versuch C) . . . . .	112
3.32 Zeitkinetik der ozoninduzierten Ethylenemission von drei vierjährigen Jungbuchen in Ozonexpositionsversuch C . . . . .	115



3.33	Boxplot-Darstellung der mittleren Ethylenemission von je 3 ozonbehandelten Bäumen der Versuchsvarianten a, c, d und e im Rahmen des Ozonexpositionsversuchs C . . . . .	116
3.34	Ozonbedingte Regulation der freien und konjugierten 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure in vierjährigen Buchen (Versuch C) . . . . .	117
3.35	Zeitlicher Verlauf der freien und konjugierten Salicylsäure in vierjährigen Buchen unter dem Einfluß von Ozon (Versuch C) . . . . .	118
3.36	Zeitlicher Verlauf der konjugierten Gentisinsäure in vierjährigen Buchen (Versuch C) . . . . .	119
3.37	Chromatogramm und Einzelpeak-Absorptions-Spektren der HPLC-Analyse löslicher phenolischer Inhaltsstoffe (Versuch C) . . . . .	121
3.38	Lösliche phenolische Inhaltsstoffe: Teil 1 (Versuch C) . . . . .	123
3.39	Lösliche phenolische Inhaltsstoffe: Teil 2 (Versuch C) . . . . .	124
3.40	Chromatogramm und Einzelpeak-Absorptions-Spektren der HPLC-Analyse zellwandgebundener phenolischer Inhaltsstoffe (Versuch C) .	126
3.41	Zellwandgebundene phenolische Inhaltsstoffe (Versuch C) . . . . .	128
3.42	Prozentuale Zusammensetzung der Monomere H, G und S bei der Lignin-Thioacidolyse von unterschiedlich stark ozongeschädigten Buchenblättern (Versuch B) . . . . .	129
3.43	Heterologe Expression der Fusionsproteine GST-DHQD/SD und GST-Fs-DAHPS3 . . . . .	131
3.44	Aufreinigung der Fusionsproteine GST-DAHPS3 und GST-DHQD/SD aus dem bakteriellen Rohextrakt mittels GSH-Affinitätschromatographie	133
3.45	Differentielle Akkumulation des putativen Enzyms DAHPS3 unter dem Einfluß von Ozon in Versuch C . . . . .	135
3.46	Zeitkinetik der Akkumulation des putativen Enzyms DAHPS3 im Verlauf der Ozonexposition von Versuch C mittels Westernblot . . . . .	136
3.47	Differentielle Akkumulation des putativen Enzyms DHQD/SD unter dem Einfluß von Ozon in Versuch C . . . . .	137
3.48	Zeitkinetik der Akkumulation des putativen Enzyms DHQD/SD im Verlauf der Ozonexposition von Versuch C mittels Westernblot . . . . .	139
4.1	Umsteuerung zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel unter dem Einfluß von Ozon . . . . .	140
4.2	Alignment der von <i>Fs-DHQD/SD</i> abgeleiteten N-terminalen Proteinsequenz mit dazu homologen Sequenzen aus weiteren höheren Pflanzen	163
4.3	Ausschnitt des Phenylpropanstoffwechsels höherer Pflanzen . . . . .	177

# Tabellenverzeichnis

2.1	Molekularbiologische Reagenzien . . . . .	22
2.2	Puffer, Lösungen und Medien . . . . .	23
2.3	Plasmide zur Klonierung von PCR-Produkten und Erstellung von Ex- pressionsvektoren . . . . .	27
2.4	Bonitur der Ozonsymptome an Buchenblättern . . . . .	30
2.5	Varianten des Ozonexpositionsversuchs C . . . . .	32
2.6	Klonierungen mit degenerierten Primern . . . . .	45
3.1	Mit degenerierten Primern klonierte cDNA-Fragmente aus der euro- päischen Buche . . . . .	75
3.2	Klassifizierung der putativen <i>DAHPS</i> -Isoformen aus <i>Fagus sylvatica</i> anhand publizierter <i>DAHPS</i> -Isoformen aus <i>Arabidopsis thaliana</i> . . .	78
3.3	Homologievergleich der kodierenden Sequenz putativer Gene des Shi- kimatstoffwechsels aus der Buche mit öffentlichen Datenbanken . . .	81
3.4	Analyse der ozonbedingten Genexpression von Klonen der subtrakti- ven cDNA-Banken SSH1 und SSH2 mittels DNA-Chips (Versuch A) .	84
3.5	Primerkombinationen zum Nachweis der Selektivität der qRT-PCR Primer für die drei putativen <i>DAHPS</i> Isoformen aus der Buche . . . .	88
3.6	Genexpression von <i>Fs-PRI</i> und <i>Fs-rbcL</i> in den Varianten a, b, c, d, e und f des Ozonexpositionsversuchs C relativ zur unbehandelten Kon- trollvariante k 62 Tage nach Versuchsbeginn . . . . .	95
3.7	Analyse der Genexpressionsverläufe aller untersuchten putativen Gene des Shikimatstoffwechsels mit einem gemischten statistischen Modell	104
4.1	Zusammenstellung der funktionellen Zuordnung stark ozoninduzier- ter und -reprimierter Klone aus den subtraktiven cDNA-Banken SSH1 und SSH2 . . . . .	150
4.2	Paarweise Identität bzw. Homologie zwischen der kodierenden Se- quenz von <i>Fs-DAHPS3</i> und dazu homologen cDNA-Sequenzen . . .	156
4.3	Paarweise Identität bzw. Homologie zwischen der kodierenden Se- quenz von <i>Fs-DHQS</i> und dazu homologen cDNA-Sequenzen . . . . .	160
4.4	Paarweise Identität bzw. Homologie zwischen der kodierenden Se- quenz von <i>Fs-DHQD/SD</i> und dazu homologen cDNA-Sequenzen . .	162
4.5	Paarweise Identität bzw. Homologie zwischen der kodierenden Se- quenz von <i>Fs-SK</i> und dazu homologen cDNA-Sequenzen . . . . .	165
4.6	Paarweise Identität bzw. Homologie zwischen der kodierenden Se- quenz von <i>Fs-EPSPS</i> und dazu homologen cDNA-Sequenzen . . . . .	167
4.7	Paarweise Identität bzw. Homologie zwischen der kodierenden Se- quenz von <i>Fs-CS</i> und dazu homologen cDNA-Sequenzen . . . . .	169

4.8	Paarweise Identität bzw. Homologie zwischen der kodierenden Sequenz von <i>Fs-CM</i> und dazu homologen cDNA-Sequenzen . . . . .	171
6.3	cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz von <i>Fs-DAHPS1</i> . . . . .	206
6.4	cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz von <i>Fs-DAHPS2</i> . . . . .	206
6.5	cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz von <i>Fs-DAHPS3</i> . . . . .	207
6.6	cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz von <i>Fs-DHQS</i> . . . . .	208
6.7	cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz von <i>Fs-DHQD/SD</i> . . . . .	209
6.8	cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz von <i>Fs-SK</i> . . . . .	210
6.9	cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz von <i>Fs-EPSPS</i> . . . . .	211
6.10	cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz von <i>Fs-CS</i> . . . . .	212
6.11	cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz von <i>Fs-CM</i> . . . . .	213
6.12	Liste der nicht redundanten Klone aus den subtraktiven cDNA-Banken SSH1 und SSH2 mit funktioneller Zuordnung . . . . .	214
6.13	Primer für die quantitative Realtime-PCR . . . . .	220
6.14	Daten der relativen Genexpression in Versuch A . . . . .	220
6.15	Daten der relativen Genexpression in Versuch B . . . . .	221
6.16	Daten der relativen Genexpression in Versuch C - Teil 1 . . . . .	222
6.17	Daten der relativen Genexpression in Versuch C - Teil 2 . . . . .	223
6.18	Genexpression des Referenzgens <i>Fs-26SrRNA</i> in Versuch C . . . . .	224
6.19	Daten der relativen Genexpression in Versuch D . . . . .	224
6.20	Gehalte an 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure in Versuch C . . . . .	225
6.21	Emission von Ethylen unter dem Einfluß von Ozon in Versuch C . . . . .	226
6.22	Gehalte an Salicylsäure und Gentsinsäure unter dem Einfluß von Ozon in Versuch C . . . . .	226
6.23	Gehalte an löslichen phenolischen Inhaltsstoffen unter dem Einfluß von Ozon in Versuch C . . . . .	227
6.24	Gehalte an löslichen phenolischen Inhaltsstoffen unter dem Einfluß von Ozon in Versuch C . . . . .	228
6.25	Gehalte an zellwandgebundenen phenolischen Inhaltsstoffen unter dem Einfluß von Ozon in Versuch C . . . . .	229
6.26	Ligningehalte nach Klason in Versuch B . . . . .	230
6.27	Lignin-Monomer-Anteile pro Gramm Frischgewicht in Versuch B . . . . .	230
6.28	Lignin-Monomer-Anteile pro Gramm Klason-Lignin in Versuch B . . . . .	231
6.29	Ozonabhängige Blattläsionen in Versuch B . . . . .	231
6.30	Ozonabhängige Blattläsionen in Versuch C . . . . .	232



# 1. Einleitung

## 1.1 Arbeiten innerhalb des Sonderforschungsbereichs 607

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 607 ('Wachstum und Parasitenabwehr') durchgeführt, welcher sich mit der grundsätzlichen Fragestellung beschäftigt, inwieweit das Wachstum von Pflanzen durch Konkurrenzsituationen und Abwehrreaktion gegenüber biotischen und abiotischen Schadeinflüssen beeinträchtigt wird. Als zentrale Hypothese des SFB 607 wurde hierbei postuliert, daß es unter dem Einfluß von Streßsituationen zu einer Einschränkung des pflanzlichen Wachstums und des Konkurrenzverhaltens kommt. In verschiedenen SFB-Teilprojekten wurden einzelne Aspekte dieser Fragestellung an forst- und landwirtschaftlichen Nutzpflanzen durch biochemisch/molekulare und ökophysiologische Methoden analysiert und sowohl an einzelnen Individuen als auch zum Teil auf Bestandebene quantifiziert.

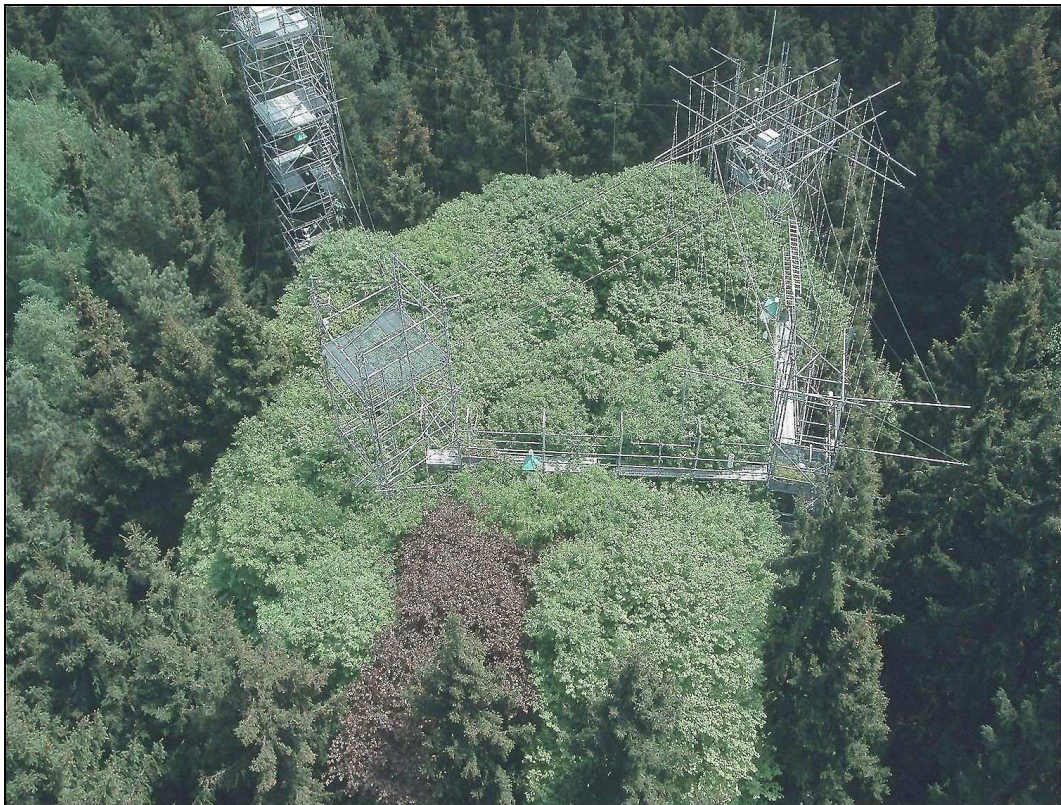
Eine Schlüsselrolle nimmt in diesem Zusammenhang die Regulation der Ressourcenallokation zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel ein, da eine bedarfsgerechte Optimierung dieser Regulation unter den gegebenen Umweltbedingungen zu einem Höchstmaß an pflanzlicher 'Fitneß' führt. Durch die Analyse des Shikimatwegs, der in höheren Pflanzen an der Schnittstelle zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel steht, und weiterer Signalmoleküle und Sekundärmetabolite wie Ethylen, Salicylsäure und Lignin sollte diese Hypothese in der vorliegenden Arbeit am Beispiel der Buche mit molekularbiologischen und biochemischen Methoden untersucht werden.

Als Elicitor pflanzlicher Streßreaktionen [276] wurde in vielen Teilprojekten des SFB 607 das Schadgas Ozon sowohl in Expositions-kammern als auch im Freiland verwendet. Die Ozonapplikation adulter Bäume im Freiland erfolgte am Versuchsstandort 'Kranzberger Forst' (Abb. 1.1, S. 2) mittels einer eigens hierfür entwickelten 'Free-Air' Ozon-Begasungsanlage [227, 331], wobei ein Teil der Versuchsbäume im gesamten Kronenbereich einem doppelt ambienten Ozonregime ausgesetzt wurden. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl 3- und 4-jährige Buchenjungepflanzen in Expositions-kabinen als auch ausgewachsene Buchen im 'Kranzberger Forst' mit Ozon behandelt. Neben der Applikation dieses abiotischen Stressors sollte an 4-jährigen Buchen zudem der Einfluß einer Infektion mit dem Erreger der Buchenblattbräune *Apiognomonium errabunda* untersucht werden.

## 1.2 Die Europäische Buche (*Fagus sylvatica* L.)

### 1.2.1 Verbreitung der europäischen Buche

Die europäische Buche (*Fagus sylvatica* L.) wird auch als Rotbuche bezeichnet und gehört zur Familie der *Fagaceae*. Sie kann bis zu 250 Jahre alt werden und erreicht



**Abbildung 1.1:** Versuchsstandort 'Kranzberger Forst'. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Angela Nunn zur Verfügung gestellt.

dabei eine Höhe von über 30 m [30]. Da sie in Mitteleuropa durch Klima und Boden gegenüber anderen Bäumen begünstigt wird, bestünden ohne den Eingriff des Menschen die meisten Wälder aus dieser Baumart [64, 158]. Tatsächlich nimmt die Buche in Deutschland etwa 15% der Waldfläche ein und ist damit hierzulande die am weitesten verbreitete Laubbaumart. Nur die Nadelbäume Fichte und Kiefer sind mit 28% und 23% Flächenanteil in Deutschland häufiger [321].

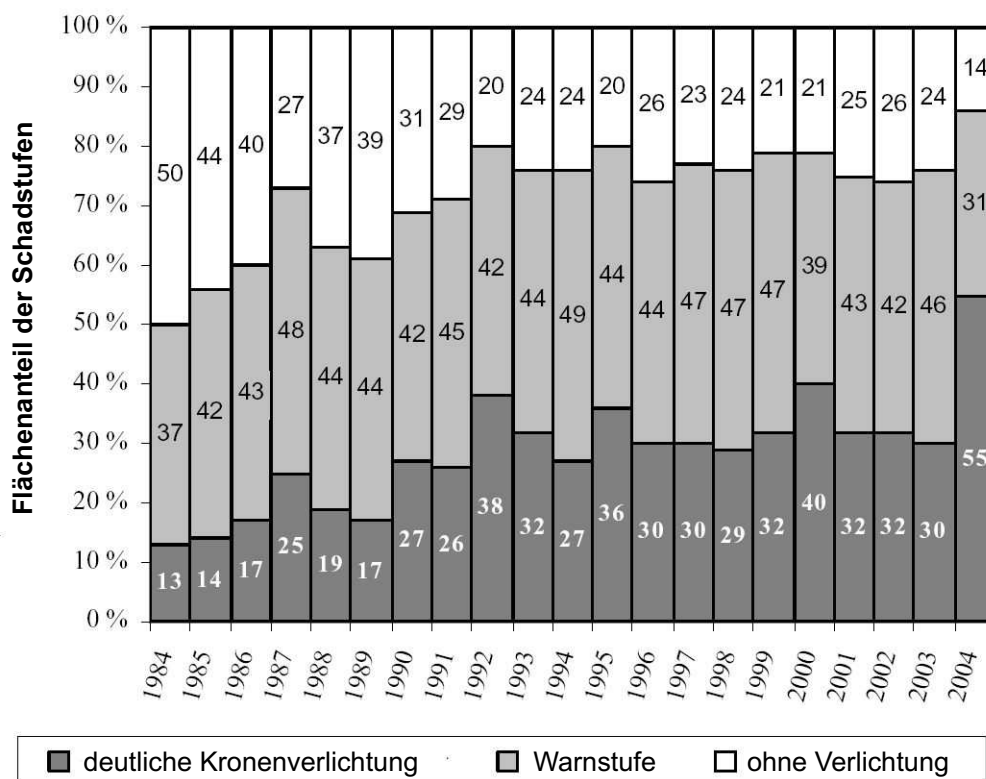
Neben *Fagus sylvatica* sind in Europa aus der Gattung *Fagus* gelegentlich auch die Arten *F. crenata*, *F. engleriana*, *F. grandifolia*, *F. lucida* und *F. orientalis* anzutreffen, haben allerdings forstwirtschaftlich keine Bedeutung.

### 1.2.2 Gesundheitlicher Zustand der Buche in Deutschland

In Europa erfolgt die Beurteilung der Vitalität von Forstbäumen anhand von Parametern wie Kronentransparenz und -verfärbung, welche allerdings laut Innes [132] nur geringe Aussagekraft über den tatsächlichen Gesundheitsstatus der Bäume haben. Bei der Bonitur der Schäden werden im jährlichen Waldzustandsbericht des Bundesministeriums für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft [321] 4 Schadstufen

unterschieden. Der Anteil von Waldbäumen mit deutlicher Kronenverlichtung (Schadstufen 2-4) erreichte im Jahr 2004 mit 31% den höchsten Wert seit Beginn der Aufzeichnungen 1984. Bei der Buche wurde sogar ein Anstieg um 25% auf insgesamt 55% verzeichnet.

Wie in Abbildung 1.2 dargestellt, war im Lauf der letzten 20 Jahre in den deutschen Wäldern eine beständige Zunahme der Kronenverlichtung bei Buchen zu verzeichnen. Im Jahre 1984 wurde noch bei der Hälfte der bonitierten Bäume kein Schaden der Krone festgestellt und nur 13% wiesen eine deutliche Verlichtung auf. Zwanzig Jahre später haben sich diese Befunde in etwa umgedreht, so daß heute nur noch 14% der Buchen nicht, 55% dagegen deutlich verlichtet sind.



**Abbildung 1.2:** Entwicklung der Kronenverlichtung bei der Buche in Deutschland im Verlauf der Jahre 1984 bis 2004. Die Graphik ist dem Waldzustandsbericht 2004 des Bundesministeriums für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft entnommen [321].

Der sprunghafte Anstieg geschädigter Bäume im Jahr 2004 ist vermutlich vor allem auf den Wassermangel und die hohen Ozonbelastungen im trockenen Sommer 2003 zurückzuführen [321]. Außerdem war das Jahr 2004 vielerorts für die Buche ein Mastjahr mit starker Fruktifikation, die erfahrungsgemäß mit einer Zunahme der Kronenverlichtung einhergeht, und es kam zu außergewöhnlich starkem Befall durch die Buchenblatt-Baumlaus (*Phyllaphis fagi*) und durch andere Schädlinge [321]. Nicht

auszuschließen ist auch der negative Einfluß von Infektionen mit bodenbürtigen Pilzen wie *Phytophthora spec.* oder *Pythium spec.* [137, 138, 221].

Obwohl es mittlerweile stiller um die Waldschadensforschung geworden ist, zeugt der historische Negativrekord stark geschädigter Bäume davon, daß Untersuchungen über den Einfluß sich wandelnder Umweltbedingungen auf die Gesundheit unserer Wälder mehr denn je dringend erforderlich sind. Zierl [351] konnte zeigen, daß unter bestimmten Umständen eine positive Korrelation zwischen dem Auftreten von Kronenverlichtung und höheren Ozonwerten bestehen kann. Dennoch ist dieses Merkmal vermutlich multifaktoriell bedingt und es bleibt zudem fraglich, welche Bedeutung die Kronenverlichtung tatsächlich für die Vitalität eines Baumes oder eines forstlichen Ökosystems hat [39, 55].

### 1.2.3 Molekularbiologische Untersuchung der Buche

Um über die Bonitur physiologischer Merkmale wie das der Kronenverlichtung hinaus differenzierte Einblicke in den Gesundheitszustand der Buchen zu erhalten, bietet sich die Suche nach streßspezifischen molekularen Markern mit Methoden der Genexpressionsanalyse an. Langfristiges Ziel könnte hierbei, gegebenenfalls bereits vor dem Auftreten makroskopischer Läsionen, die reproduzierbare Analyse streßinduzierter Gene und eine qualitative Aussage über die Art der vorliegenden Streßsituation sein.

Neben der Tatsache, daß physiologisch vergleichbare Experimente bei Forstbäumen wie der Buche nur in einem weitgesteckten zeitlichen Rahmen möglich sind, da diese einem jahreszeitlichen Rhythmus unterliegen, treten bei der Genexpressionsanalyse von Bäumen drei wesentliche Probleme auf.

- Zum einen sind von vielen Spezies, darunter auch Buche, bis heute nur sehr wenige Gen-Sequenzen bekannt. So waren zu Beginn dieser Arbeit nur 48, zum Teil redundante DNA-Sequenzen der europäischen Buche in öffentlichen Datenbanken verfügbar, bei denen es sich vor allem um verschiedene Kinasen, Phosphatasen und einige Gene aus dem Bereich der Signalweiterleitung handelte. Eine Ausnahme von dieser Regel stellt die Pappelart *Populus trichocarpa* dar, deren Genom erst im vergangenen Jahr vollständig sequenziert wurde und derzeit von dem internationalen Pappel-Genom-Konsortium ausgewertet wird [33, 339].
- Der hohe Gehalte an phenolischen Inhaltsstoffen und Polysacchariden erschwert bei vielen Baumarten die Isolation von RNA und DNA, so daß die Verwendung speziell an Bäume adaptierter Protokolle nötig ist [121, 148, 186], um qualitativ hochwertiges Ausgangsmaterial für Genexpressionsanalysen gewinnen zu können.
- Die dritte und vielleicht wichtigste Einschränkung ist die hohe genetische Variabilität zwischen und innerhalb von Populationen [160, 271, 326]. Für die europäische Buche existieren, im Gegensatz zur Pappel, keine genetisch definier-



ten Klone und wegen der langen Generationsdauer wurden bislang keine Züchtungsprogramme für diese Art durchgeführt [278]. Die ersten Untersuchungen zur genetischen Variation der europäischen Buche basierten vor allem auf Isoenzymanalysen [271]. Mittlerweile werden aber auch schon verschiedene genetische Marker wie RAPDs, AFLPs, Mikrosatelliten verwendet und durch QTL-Analyse in Beziehung zu wichtigen morphologischen Merkmalen der Buche gestellt [278].

Im Gegensatz zu Pappel und Pinie, für die bereits erste Microarray-gestützte Analysen zur Untersuchung der Holzbildung durchgeführt wurden [125, 333], erfolgten für die Buche bislang nur sehr wenige Genexpressionsanalysen zu entwicklungsphysiologischen Prozessen [38, 91, 222]. Die Auswirkungen von biotischem oder abiotischem Streß auf die Buche wurden zwar in vielen Untersuchungen auf physiologischer Ebene genau beschrieben. Hinsichtlich der zugrundeliegenden Genexpressionsregulation unter diesen Bedingungen ist allerdings bisher nur sehr wenig bekannt [82]. Trotz der bestehenden Probleme hat die genetische Forschung an Waldbäumen in den letzten Jahren deutlich zugenommen [304] und wird, wegen des großen Einflusses der Wälder für das lokale und globale Klima, wohl auch in Zukunft an Bedeutung gewinnen.

## **1.3 Der Luftschadstoff Ozon und seine Wirkung auf Pflanzen**

Mit der Zunahme anthropogener Emissionen ging über die letzten 100 Jahre nicht nur in städtischen Gebieten sondern auch im ländlichen Umfeld von Ballungszentren etwa eine Verdopplung der troposphärischen Ozonkonzentration einher [128, 303, 322]. Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten dieses Luftschadstoffs und Schadsymptomen an Pflanzen wurde bereits vor etwa 50 Jahren hergestellt [103, 104, 113] und ist seitdem Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (u.a. [171, 172, 272, 273, 297, 309]). In diesem Zusammenhang wurden in den 80er Jahren des vergangenen Jahrhunderts europäische und amerikanische Projekte ins Leben gerufen, um ozonbedingte Ernteverluste, die für manche Feldfrüchte in Europa bis zu 27% betragen [220], besser abschätzen und eventuell durch gezielte Maßnahmen reduzieren zu können [79, 112].

In Europa und Nordamerika gerieten diesbezüglich in den letzten 20 Jahren auch Waldbäume in den Mittelpunkt des Interesses [275], nicht zuletzt, da Ozon als mögliche Ursache für das beobachtete Phänomen des 'Waldsterbens' in Betracht gezogen wurde [76, 81].

### **1.3.1 Vorkommen, Entstehung und Umsetzung von Ozon**

Die Ozonkonzentration in erdnahen Schichten der Troposphäre über Europa und Amerika resultiert aus der photochemischen Neubildung in der Troposphäre und dem Eintrag aus der Ozonschicht in der Stratosphäre [212]. In der nördlichen Hemisphäre sind

vor allem während des Sommers über den Kontinenten von Amerika und Europa gegenüber der Südhalbkugel erhöhte Ozonwerte zu beobachten [181, 235]. Ursache dafür sind einerseits höhere anthropogene Emissionen, welche die Bildung von Ozon begünstigen [328], und andererseits ein physikalisch bedingter stärkerer Zufluß aus der Stratosphäre [175, 234].

Bei der Neubildung von Ozon ( $O_3$ ) reagiert molekularer Sauerstoff ( $O_2$ ) in einer reversiblen Reaktion mit photolytisch gespaltenem  $NO_2$  zu  $O_3$  und  $NO$ . Durch weitere Umsetzung von Ozon können in Kettenreaktionen Hydroxy-Radikale ( $\dot{H}O$ ) und Peroxi-Radikale ( $\dot{R}O_2$ ) entstehen, die durch Reaktion mit  $NO$  unter Bildung von  $NO_2$  zur weiteren Akkumulation von  $O_3$  beitragen können. Die Ozonkonzentration wird durch die verfügbare Menge an  $NO_2$ , die Rückreaktion von  $O_3$  und  $NO$  zu  $O_2$  und  $NO_2$ , den Ozonabbau am Boden und der Vegetation sowie die Verbindung von Ozon mit flüchtigen organischen Substanzen begrenzt [242, 303].

In der wissenschaftlichen Literatur wird die Ozonkonzentration in den von Luftdruck und Temperatur unabhängigen Größen  $nl/l$  und  $\mu/l$  oder den äquivalenten Größen  $ppb$  und  $ppm$  ('parts per billion bzw. million') angegeben. Die Tagesmittelwerte über Nordamerika und Europa liegen bei etwa 20-60  $nl/l$ , wobei auch Spitzenwerte von bis zu 250  $nl/l$  erreicht werden [303]. Während 1990 weltweit bereits 24% der Wälder Ozonkonzentrationen von über 60  $nl/l$  ausgesetzt waren, sollen es nach einem Modell von Fowler bis 2100 bereits 50% sein [75]. Trotz der Abnahme von Ozon-Spitzenkonzentrationen im letzten Jahrzehnt, die vermutlich auf den Rückgang bei der Freisetzung von Ozon-Vorläufersubstanzen zurückzuführen ist, kam es im Jahresmittel zu einer stetigen Zunahme der Ozonkonzentrationen [4].

### 1.3.2 Ozon als Schadstoff für Pflanzen

Die Kutikula ist für das starke Oxidationsmittel Ozon nahezu undurchlässig, weshalb die Aufnahme in die Pflanze fast ausschließlich durch die Stomata erfolgt [146]. Sofort nach dem Eindringen in die Pflanze reagiert der Großteil des Ozons mit Zellwand und Plasmamembran der Mesophyllzellen [163]. In Verbindung mit Wasser führt Ozon zur Bildung von Superoxid-Anion-Radikalen ( $\dot{O}_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Hydroxy-Radikalen ( $\dot{O}H$ ), die zur Gruppe der reaktiven Sauerstoffspezies zählen [111]. Wenn diese sehr reaktionsfreudigen Moleküle nicht durch die antioxidativen Schutzsysteme der Pflanze wie Ascorbat, Glutathion, alpha-Tocopherol, Polyamin-konjugate, Polyphenole und Entgiftungsenzyme wie die Superoxid-Dismutasen und Peroxidasen unschädlich gemacht werden können, kommt es zur Oxidation und damit zur Zerstörung wichtiger Zellbestandteile und Membranen [111, 170, 225].

Ebenso wie Elicitorbehandlung kann auch Ozon bei Pflanzen Reaktionen hervorrufen, die mit dem Schadbild der 'Hypersensitiven Reaktion' bei Pathogenbefall vergleichbar sind [141]. So kommt es in beiden Fällen zur Stimulation von Signalmolekülen, Zellwandsynthese, Phytoalexinen, PR-Proteinen und zur Aktivierung von antioxidativen Systemen. Wegen dieser Parallelen wird Ozon auch als abiotischer Elicitor bezeichnet [276]. Bei der Exposition mit Ozon kann zwischen chronischer Belastung

mit relativ geringen Ozonkonzentrationen über einen längeren Zeitraum und akuter, meist kurzfristiger Belastung, mit hohen Ozonkonzentrationen unterschieden werden. Bei vielen Pflanzenarten führt akute Ozonbelastung zur Bildung typischer punktförmiger Läsionen, während es durch chronische Ozonbelastung eher zu einer seneszenzähnlichen Symptomatik kommt [246, 287].

Wie für viele andere Baumarten konnte auch für die Buche gezeigt werden, daß unter erhöhten Ozonkonzentrationen bereits während der Vegetationsperiode Wachstumsreduktion und Biomasseverlust auftreten können [244, 256, 334]. Durch chronische Ozonbelastung kann es außerdem, unter anderem bedingt durch eine reduzierte Photosyntheserate [40, 179], zu verfrühtem Blattfall und dem vorzeitigen Eintritt der Seneszenz kommen [199]. In der Birke wurde ein Einfluß von Ozon auf die Blattdifferenzierung nachgewiesen [101]. Gemäß Bortier et al. [24] sind langsam wachsende Bäume wie die Buche weniger anfällig gegenüber Ozonschäden als schnellwüchsige Gehölze wie z.B. die Pappel *Populus nigra*. Die tatsächliche Ausbildung von Ozonsymptomen ist allerdings, abgesehen von der wirksamen Ozondosis und der betrachteten Spezies, wohl auch stark von den herrschenden Klimabedingungen und von der Streßtoleranz der individuellen Einzelpflanze abhängig [100, 168, 351].

Durch mikroskopische Untersuchungen konnte die ozonbedingte Veränderung von Zellwänden, Ablagerungen von kondensierten phenolischen Substanzen in den Vakuolen und die Akkumulation von  $H_2O_2$  an Plasmamembran und Zellwand nachgewiesen werden [102, 248]. Das Auftreten von Ethylenemissionen unter dem Einfluß von Ozon wurde bei verschiedenen Bäumen nachgewiesen und in Verbindung mit der Regulation des Zelltods gesetzt [297, 318, 319]. Durch Ozon waren darüber hinaus sekundäre Inhaltsstoffe wie Jasmonsäure, verschiedene Polyamine, Polyphenole sowie Flavonoide induzierbar [56, 155, 168, 285, 297].

In Zusammenhang mit dem ozonbedingten Rückgang der Photosynthese wurde bei vielen Baumarten sowohl eine Abnahme der Quantität als auch der Aktivität des Enzyms Ribulose-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (RUBISCO) verzeichnet [54]. Bei der Birke wurde durch Ozon die Aktivität der Enzyme Superoxid Dismutase, Peroxidase und Glutathion Reduktase gesteigert und die Transkription der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) induziert [312]. Neben dem Enzym PAL waren in der Kiefer auch PR-Proteine [143], Zimtalkohol-Dehydrogenase (CAD) [82, 83], Chalkon Synthase und Stilben Synthase [266] durch Ozon induzierbar. Aus dem Shikimatstoffwechsel wurde bislang nur für das Enzym Shikimat Dehydrogenase aus der Fichte eine ozonbedingt erhöhte Aktivität nachgewiesen [185]. Es ist möglich, daß diese Aktivitätszunahme mit einem stärkeren Stoffumsatz im Shikimatstoffwechsel zur Bereitstellung von Vorläufersubstanzen für die Synthese von Sekundärmetaboliten im Phenylpropan-Stoffwechsel zusammenhängt [54].

### 1.3.3 Grenzwertkonzepte der Ozonexposition

Im Laufe der letzten 20 Jahre wurden zahlreiche Expositions-Indizes vorgeschlagen, um eine für Pflanzen 'biologisch relevante' Ozondosis zu bestimmen [80, 98, 159,

174, 193]. Die zunächst entwickelten Modelle verwendeten dabei ab einem bestimmten Schwellenwert die aufsummierten Stunden-Mittelwerte der Ozonkonzentration im betrachteten Zeitraum (z.B. SUM06). Als beobachtet wurde, daß höhere Ozonkonzentrationen einen überproportional großen schädigenden Einfluß auf Pflanzen haben [80, 196, 214], wurden Ozonindizes eingeführt, die nur den Anteil der Stunden-Mittelwerte der Ozonkonzentration berücksichtigten, der oberhalb einer definierten Schwelle von z.B. 20, 40 oder 60 nl/l Ozon lag (AOT20, AOT40, AOT60). In Europa wird derzeit der AOT40-Index ('accumulated exposure over a threshold of 40 nl/l') verwendet [80], um kritische Ozon-Niveaus für Feldfrüchte und Waldbäume zu definieren. Fuhrer et al. [80] schlugen aufgrund von Daten aus Klimakammerexperimenten für Waldbäume einen AOT40-Grenzwert von  $10 \mu\text{l/l} \cdot \text{h}$  vor, bei dem ein Verlust von etwa 10% der Biomasse zu erwarten wäre. Zur Berechnung dieses Wertes sollten diejenigen Stundenmittelwerte oberhalb des Schwellenwertes von 40 nl/l Ozon erfaßt werden, die bei Tageslicht (Globalstrahlung  $> 50 \text{ W/m}^2$ ) und innerhalb der Vegetationsperiode von April bis September auftraten.

Die Vergleichbarkeit von Beobachtungen aus Freilandversuchen wird vor allem durch unterschiedliche Witterungsbedingungen, aber auch durch andere nicht zu beeinflussende biotische und abiotische Störgrößen erschwert. So kann zum Beispiel die Veränderung der Luft- und Bodenfeuchtigkeit einen starken Einfluß auf die Öffnung der Stomata und damit auf die Aufnahme von Ozon in die Pflanze haben [66].

Daher versuchen neueste Modelle zur Risikoanalyse von Ozon durch die Ermittlung des stomatären Fluxes unter Einbeziehung verschiedener Klimaparameter nur den physiologisch und ökologisch relevanten Anteil dieses Schadgases zu ermitteln, der tatsächlich in den Interzellularraum der Pflanzen eindringt [88, 98, 193]. Die Ermittlung der kumulativen Ozonaufnahme (CU) in die Blätter wird maßgeblich durch die Öffnung der Stomata beeinflusst und hängt damit nicht nur von verschiedenen Klimaparametern wie Einstrahlung und Luftfeuchtigkeit sondern auch von Faktoren wie dem Alter und der Position des untersuchten Blattes in der Baumkrone ab. Im Gegensatz zu dem Expositionsindex AOT40 wird die CU auch während der Nachtstunden ermittelt und es werden auch externe Ozonkonzentrationen von weniger als 40 nl/l berücksichtigt. Matyssek et al. [193] streben langfristig die Ablösung von Expositionsindizes wie AOT40 an und schlagen vor, den stomatären  $\text{O}_3$ -Flux auf das antioxidative Potential der untersuchten Bäume zu beziehen, um ökologisch sinnvolle Standards zu deren Schutz vor Luftverschmutzung durch Ozon definieren zu können. Bei Freilanduntersuchungen konnte mit einem solchen Ansatz bereits eine gute Korrelation zwischen Blattschäden und Ozonaufnahme hergestellt werden [193].

## 1.4 Der Shikimatstoffwechsel

Der Shikimatstoffwechsel umfaßt die Abfolge von sieben enzymatischen Reaktionen, in deren Verlauf die Substrate 4-Erythrose-4-Phosphat und Phosphoenol-Pyruvat über die Zwischenstufe Shikimat zu dem Produkt Chorismat umgewandelt werden. Der Name begründet sich darin, daß Shikimat als erste Substanz aus diesem Stoffwechselweg isoliert wurde [14, 69]. Bezugnehmend auf das Produkt Chorismat findet aber auch der Name 'Prä-Chorismatweg' Verwendung.

### 1.4.1 Allgemeine Bedeutung des Shikimatstoffwechsels

Die wesentliche Bedeutung des Shikimatstoffwechsels liegt darin, daß nahezu alle in der Natur vorkommenden aromatischen Verbindungen aus diesem hervorgehen. Dazu zählen neben den drei proteinogenen aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin, L-Tryptophan und L-Tyrosin zahlreiche Gruppen pflanzlicher sekundärer Inhaltstoffe wie Acetophenone, Benzophenone, Hydroxycimtsäuren, Phenylpropanoide, Coumarine, Stilbene, Flavonoide, Alkaloide, Phytoalexine, Tannine und Struktur-Polymere wie Suberin und Lignin [105, 106, 151, 237, 329]. Der Shikimatweg kommt ausschließlich in Pflanzen, Pilzen und Mikroorganismen vor [14], was ihn zu einem interessanten Ziel bei der Suche nach Herbiziden und Antibiotika macht [41, 124]. Während der Shikimatstoffwechsel in Bakterien vor allem die Vorstufe für die Synthese aromatischer Aminosäuren zur Proteinbiosynthese bereitstellt [329], verwenden Pflanzen einen Großteil des im Shikimatstoffwechsel umgesetzten Kohlenstoffs, unter Normalbedingungen sind das etwa 20% des fixierten Kohlenstoffs [109], zur Synthese von aromatischen Sekundärmetaboliten, die sich entweder aus den aromatischen Aminosäuren oder Intermediaten des Shikimatstoffwechsels ableiten [14, 124].

Diese Substanzen übernehmen im pflanzlichen Stoffwechsel verschiedenste Aufgaben wie den Schutz vor UV-Strahlung [123, 329], Modifikation der Pollenfertilität, Signalstoff-Funktion bei der Interaktion von Pflanze und Mikroben [329], Wirkung als Pflanzenhormon [206] und enzymatische Kofaktoren [14], Schutz gegen Herbivoren [53], Membranaufbau, Elektronentransport [78] und können auch als Phytoalexine wirken [52, 60]. Für lokale und systemische Abwehrreaktionen ist Salicylsäure, deren Bildung über die Isochorismat-Synthase aus Produkten des Shikimatstoffwechsels erfolgt, von entscheidender Bedeutung [336]. Neben der Salicylsäure sind vermutlich weitere Metabolite des Shikimatstoffwechsels an der Regulation des programmierten Zelltods beteiligt [31]. Aus dem Shikimatstoffwechsel abgeleitete Strukturpolymere wie Lignin haben ebenfalls eine wichtige Funktion durch die Gewährleistung mechanischer Stabilität [332]. Bei verholzenden Pflanzen kann dabei bis zu einem Drittel des durch die Photosynthese fixierten Kohlenstoffs über den Shikimatstoffwechsel in die Produktion von Lignin fließen [127]. Für den Menschen und Tiere ist der Verzehr einiger Substanzen, die sich aus dem Shikimatstoffwechsel ableiten (aromatische Aminosäuren, Vitamine E und K), essentiell.

Die Regulation des Shikimatstoffwechsels bedingt durch die Bereitstellung wich-

tiger Vorläufersubstanzen die Synthese eines breiten Spektrums pflanzlicher Sekundärmetabolite und steht daher in dieser Arbeit im Mittelpunkt der Untersuchungen zur streßinduzierten Genexpression in der europäischen Buche.

### 1.4.2 Enzymatische Reaktionen des Shikimatstoffwechsels

Die einzelnen Reaktionen und Intermediate des Shikimatstoffwechsels höherer Pflanzen gleichen, trotz teils großer Unterschiede in der Primärstruktur der beteiligten Enzyme [124], vollständig dem Shikimatstoffwechsel der Mikroorganismen. Während allerdings in Bakterien normalerweise jeder der sieben Reaktionsschritte von einem eigenständigen Protein katalysiert werden, gibt es in Pflanzen ein bifunktionelles Enzym (3-Dehydroquinat Dehydratase / Shikimat Dehydrogenase), das die Reaktionsschritte 3 und 4 realisiert. In einigen Pilzen (*Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*), Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*) und *Euglena gracilis* sind sogar 5 enzymatische Reaktionen (Schritt 2 bis 6) in einem pentafunktionellen Polypeptid, dem sogenannten 'Arom-Komplex' zusammengefaßt. Ebenso wie in Bakterien existieren auch in Pflanzen von vielen Enzymen des Shikimatstoffwechsels mehrere Isoformen. Abbildung 1.3, S. 11 zeigt die Reaktionsschritte des Shikimatstoffwechsels im Überblick.

Bei der Regulation des Shikimatstoffwechsels gibt es, trotz geringer Unterschiede in der Primärstruktur der Enzyme und gleicher Intermediate, große Unterschiede zwischen Pflanzen, Pilzen und Mikroorganismen [283]. Die bakteriellen Isoenzyme der DAHPS aus *E. coli* unterliegen zum Beispiel einer strengen Kontrolle durch 'feedback'-Regulation [232] während Promotorstrukturen von *DAHPS* und *CS* in Hefe darauf hindeuten, daß diese Gene hier unter dem Einfluß des allgemeinen Transkriptionsaktivators GCN4 stehen, der unspezifisch die Synthese der Aminosäuren reguliert [123]. Die komplexe Regulation des Shikimatstoffwechsels in Pflanzen beinhaltet organ- und gewebespezifische Unterschiede in der Aktivität der beteiligten Enzyme sowie Regulationsmuster, die Abhängigkeiten vom Entwicklungsstadium und Umweltreizen wie Nährstoffmangel [315], Licht [119], Elicitoren [95, 119, 145, 194], Verwundung [59, 211] und Pathogenbefall zeigen [145].

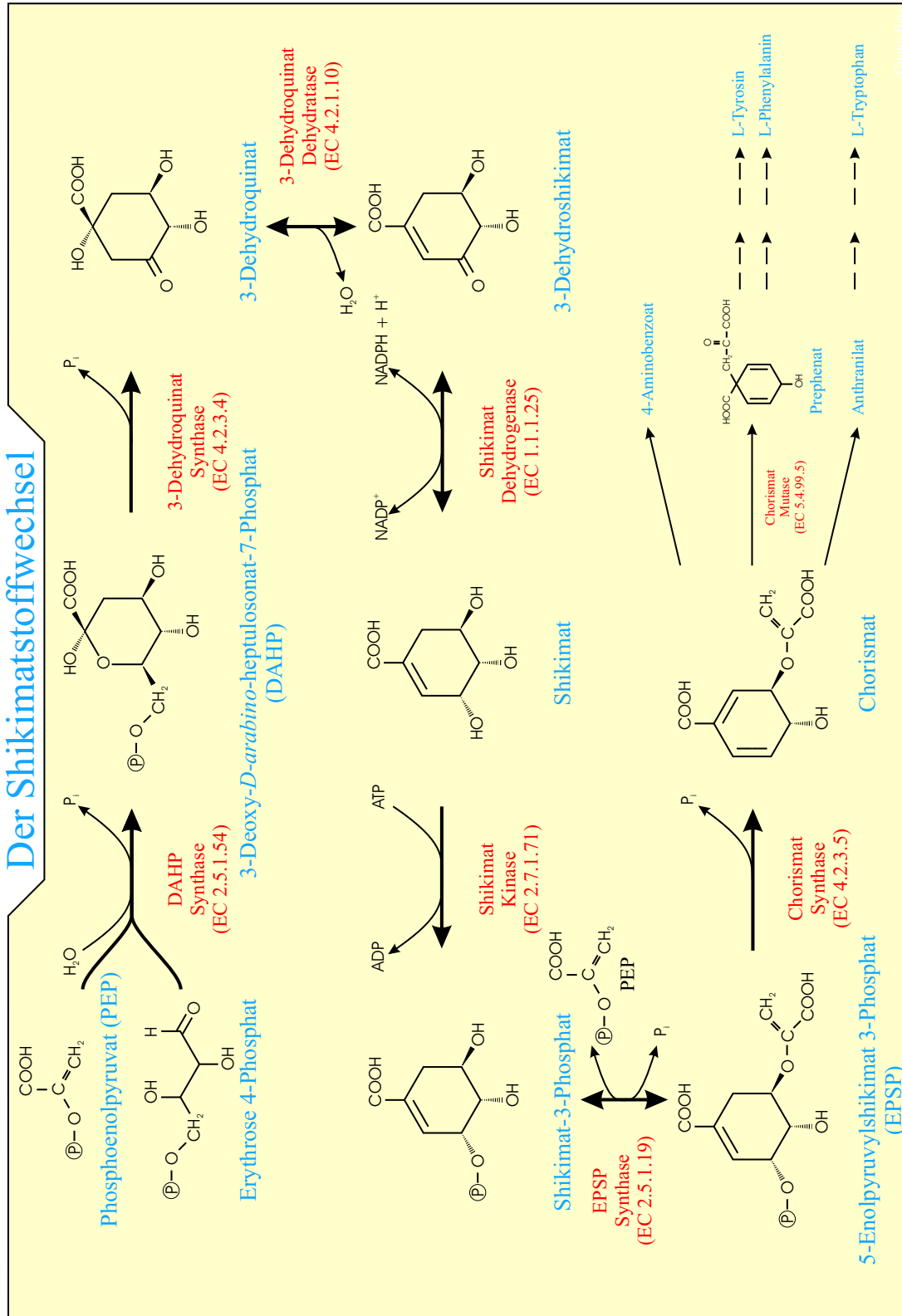
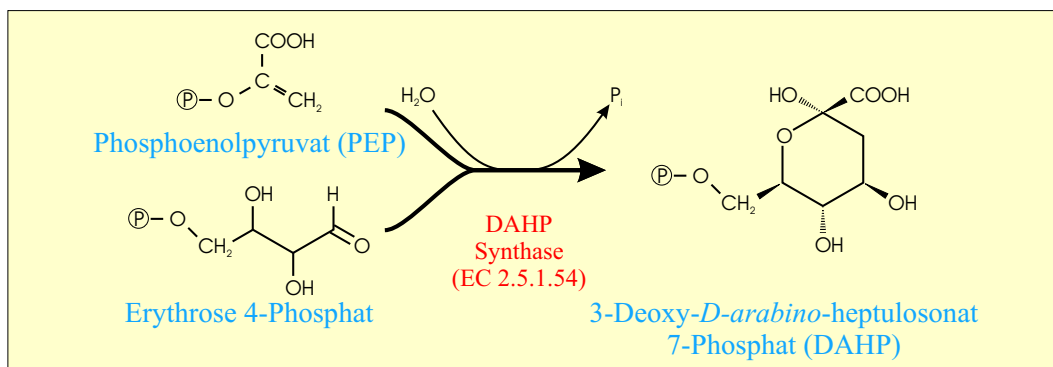


Abbildung 1.3: Reaktionen des Shikimatstoffwechsels.

### 3-Deoxy-*D*-arabino-Heptulose-7-Phosphat Synthase

Durch das erste Enzym des Shikimatstoffwechsels, die 3-Deoxy-*D*-arabino-Heptulose-7-Phosphat Synthase (DAHPS, EC 2.5.1.54), wird die irreversible Kondensation der phosphorylierten aliphatischen Kohlenwasserstoffe Erythrose-4-Phosphat (E4P) und Phosphoenolpyruvat (PEP), Metabolite des Pentosephosphatwegs und der Glycolyse, zu dem heterozyklischen Molekül 3-deoxy-*D*-arabino-heptulose-7-Phosphat (DAHP) unter Abspaltung von anorganischem Phosphat katalysiert (Abb. 1.4).



**Abbildung 1.4:** Reaktion der 3-Deoxy-*D*-arabino-Heptulose-7-Phosphat Synthase.

In *E. coli* existieren 3 Isoformen dieses Enzyms, die dem sogenannten Typ AroAI angehören und einer Regulation durch 'feedback'-Hemmung durch die drei aromatischen Aminosäuren unterliegen. In Bakterien ist diese 'feedback'-Hemmung der DAHPS-Isoenzyme gegenüber einer ebenfalls vorhandenen Regulationsmöglichkeit durch transkriptionelle Repression der hauptsächliche Regelmechanismus des Kohlenwasserstoffverbrauchs im Shikimatstoffwechsel [232]. Zusätzlich zu Isoenzymen des Typs AroAI gibt es in vielen Bakterien auch DAHPS-Isoenzyme des Typs AroAII. Es wird vermutet, daß chloroplastidäre pflanzliche DAHPS-Isoenzyme, die ebenfalls diesem Typ angehören, durch endosymbiontische gramnegative Bakterien in Pflanzen eingeführt wurden [96].

DAHPS Synthasen aus Pflanzen sind Homodimere, die im Gegensatz zu den DAHP Synthasen von *E. coli*, zu denen sie nur bis zu 20% Homologie aufweisen [124], keiner 'feedback'-Hemmung durch aromatische Aminosäuren unterliegen, sondern sogar hysteretisch durch Tyrosin und Tryptophan aktiviert werden können [251, 305]. Eine Hemmung der DAHPS durch Arogenat, einer gemeinsamen Vorstufe von Phenylalanin und Tyrosin, ist zwar möglich, aber diese Substanz akkumuliert nicht in höheren Pflanzen und kommt daher kaum als Regulator der DAHPS-Aktivität in Betracht [136]. Anhand einer DAHPS von *Arabidopsis thaliana* wurde gezeigt, daß dieses Enzym wahrscheinlich der Ferredoxin/Thioredoxin Redoxkontrolle im Chloroplasten unterliegt [67].



Neben der Tatsache, daß Pflanzen über keine Regulationsmechanismen durch 'feedback'-Hemmung verfügen, sprechen zwei experimentelle Beobachtungen für eine transkriptionelle Regulation der DAHPS in Pflanzen. Zum einen konnte durch die Transkriptions- und Translationshemmstoffe Actinomycin D und Cycloheximidin eine zuvor induzierte Aktivitätssteigerung der DAHPS unterdrückt werden [194]. Andererseits wurde die DAHPS aus Kartoffel zwar in vivo, nicht aber in vitro, durch eine sublethale Dosis von Glyphosat, einem starken Hemmstoff der EPSPS, aktiviert [252]. Das läßt vermuten, daß ein noch unbekanntes Signal, ausgelöst durch den Mangel an Produkten des Shikimatstoffwechsels, verantwortlich für die erhöhte Aktivität der DAHPS war [124]. Zudem wurde bereits in mehreren Fällen beobachtet, daß die Aktivitätssteigerung der DAHPS durch eine erhöhte Proteinsyntheserate hervorgerufen und die Modulation der Aktivität durch differentielle Isoenzym-Expression erreicht wurde [94, 95, 119, 145].

In vielen Pflanzen wurden zwei Gruppen von DAHPS-Isoenzymen gefunden, die aufgrund ihrer Aktivierbarkeit durch zweiwertige Metall-Kationen unterschieden wurden (DAHPS-Mn<sup>2+</sup>, DAHPS-Co<sup>2+</sup>) [122, 123], wobei die Sequenzen der Isoenzyme innerhalb einer Gruppen interspezifisch mehr Homologie aufweisen als die Vertreter beider Gruppen innerhalb einer Spezies [92, 145]. Während DAHPS-Mn<sup>2+</sup> zur Aktivierung Mn<sup>2+</sup> benötigt, wird DAHPS-Co<sup>2+</sup> durch Co<sup>2+</sup> und in geringerem Umfang auch durch Mg<sup>2+</sup> und Mn<sup>2+</sup> aktiviert [283].

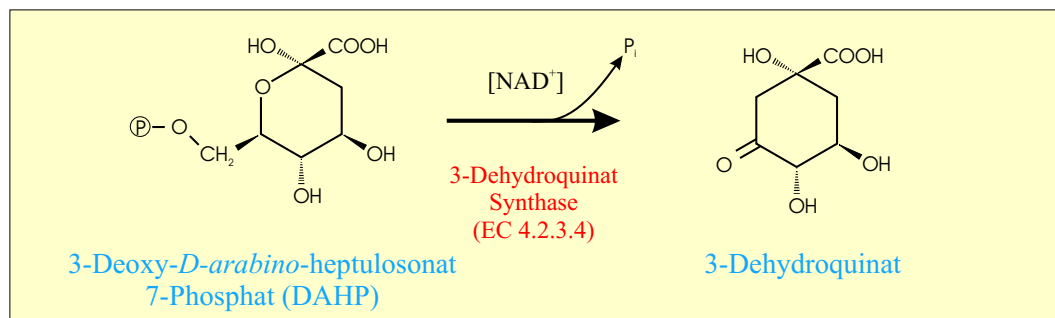
DAHPS-Mn<sup>2+</sup> Isoenzyme besitzen ein N-terminales chloroplastidäres Transitpeptid (cTP), das den Transport der im Cytosol hergestellten Proteine in den Chloroplasten ermöglicht. Bei cDNAs der DAHPS-Co<sup>2+</sup> fehlt dieser etwa 20 Aminosäuren lange Bereich [122]. Eine DAHPS-Co<sup>2+</sup> Isoform wurde durch diskontinuierliche Saccharose-Gradienten-Zentrifugation im Cytosol nachgewiesen [84], war aber sehr unspezifisch für das Substrat E4P und bevorzugte statt dessen Glycolaldehyd, weshalb es sich bei der verzeichneten DAHPS-Aktivität eventuell nur um eine Nebenreaktion dieses cytosolischen Enzyms handeln könnte [57, 124].

Große Unterschiede zwischen den beiden Varianten der DAHPS zeigen sich auch in der Regulation gegenüber Umwelteinflüssen wie Licht, Pathogenbefall, Verwundung, bei der Reaktion auf pilzliche Elicitoren und abhängig vom beobachteten Organ bzw. Gewebe sowie vom Entwicklungsstadium der Pflanze. In mehreren Arbeiten wurde festgestellt, daß die DAHPS-Mn<sup>2+</sup> im Gegensatz zur DAHPS-Co<sup>2+</sup> durch Licht, Elicitoren, Pathogenbefall und Verwundung induzierbar ist [145, 194, 195, 211, 283].

### 3-Dehydroquinat Synthase

Die 3-Dehydroquinat Synthase (DHQS, EC 4.2.3.4) ist ein Metalloenzym, das DAHP durch Alkohol-Oxidation,  $\beta$ -Elimination von anorganischem Phosphat, Carbonyl-Reduktion, Ringöffnung und intramolekulare Aldol-Kondensation in 3-Dehydroquinat (DHQ) umwandelt [14, 32], wobei wohl nur die Oxidation und Reduktion durch das Enzym realisiert werden, während die übrigen Reaktionen spontan ablaufen [10, 204, 205, 335] (Abb. 1.5). Für die insgesamt redoxneutrale Reaktion werden nur

katalytische Mengen an  $\text{NAD}^+$  als Kofaktor benötigt [14].



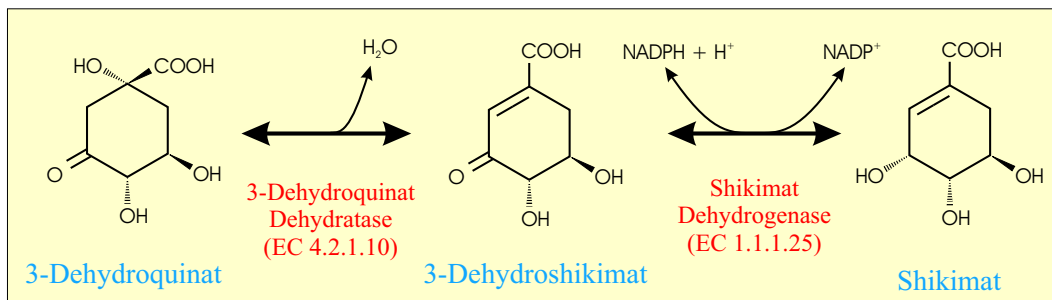
**Abbildung 1.5:** Reaktion der 3-Dehydroquinate Synthase.

Das monomere Enzym DHQS aus der Tomate weist mit 52% Identität eine deutlich höhere Ähnlichkeit zu dem entsprechenden Enzym aus *E. coli* auf als das für die DAHPS der Fall ist (20% Identität) [124]. Während das Vorhandensein einer cTP bei einer in Tomate untersuchten DHQS auf die chloroplastidäre Lokalisation dieses Enzyms hinwies, wurde bisher noch keine entsprechende cytosolische Isoform beschrieben. Wie bereits bei einer DAHPS-Isoform beobachtet, war auch die Transkription der DHQS aus Tomate durch Elicitor-Behandlung induzierbar und wies organspezifische Expressionsmuster auf [18]. Der EPSPS-Hemmstoff Glyphosat hatte keinen Einfluß auf die Aktivität der DHQS in Zellkulturen von Kartoffel [252].

### 3-Dehydroquinate Dehydratase / Shikimat Dehydrogenase

Schritt 3 und 4 des Shikimatstoffwechsels werden in höheren Pflanzen von einem bifunktionellen Enzym [157, 254], der 3-Dehydroquinate Dehydratase / Shikimat Dehydrogenase (DHQD/SD, EC 4.2.1.10 / EC 1.1.1.25) katalysiert (Abb. 1.6, S. 15) Durch *cis*-Elimination von Wasser wird die erste Doppelbindung in den Ring eingeführt, was zur Bildung von 3-Dehydro-Shikimat (DHS) führt, welches dann durch die SD-Aktivität zu Shikimat reduziert wird. Der Verlust des Zwischenproduktes DHS durch Umwandlung in Protocatechusäure wird hierbei dadurch gering gehalten, daß die SD-Reaktion etwa 9 mal so schnell abläuft wie die DHQD-Reaktion und das Intermediat DHS somit schnell in Richtung Shikimat-Synthese abfließen kann [123].

Untersuchungen an Erbse zeigten, daß es sich bei der bifunktionellen DHQD/SD um ein Monomer handelt. Bei dieser Pflanze wurden zwei chloroplastidäre und ein cytosolisches Isoenzym gefunden [210]. Das Vorkommen von SD-Isoenzymen ist in mehreren Pflanzenspezies beschrieben [210, 330] und wird schon seit längerer Zeit bei Isoenzymanalysen in der Pflanzenzüchtung zur Unterscheidung von Sorten genutzt [308]. Bei Untersuchungen der Lokalisation einer aus *Nicotiana sylvestris* isolierten cDNA-Sequenz von *DHQD/SD* wurde eine untypische putative cTP Sequenz



**Abbildung 1.6:** Reaktion des bifunktionellen Enzyms 3-Dehydroquinate Dehydratase / Shikimate Dehydrogenase.

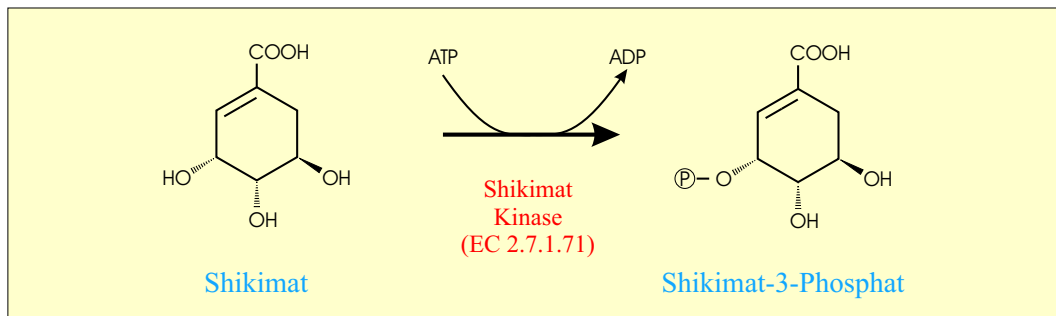
mit zahlreichen hydroxylierten Aminosäuren und insgesamt negativer Ladung gefunden [20].

Neben der in Pflanzen vorkommenden DHQD vom TypI gibt es in manchen Bakterien und Pilzen auch eine DHQD vom TypII, die statt einer *cis*- eine *trans*-Elimination von Wasser katalysiert [124, 296]. Da zwischen diesen Typen keine Sequenzhomologien zu finden sind, scheinen sich beide Enzyme durch konvergente Evolution entwickelt zu haben [149].

Auch die Aktivität der SD wird in Pflanzen gewebespezifisch und abhängig vom Entwicklungsstadium reguliert [19, 70]. In Süßkartoffeln und Paprika erhöhte sich nach Verwundung die Aktivität der SD [124, 201]. Paprikapflanzen reagierten auf erhöhte Konzentrationen von Kupfer im Nährmedium mit einer Aktivitätssteigerung der SD im Hypokotyl, die von einer Anreicherung an löslichen Phenolen und Lignin begleitet war, und einer Verminderung der SD-Aktivität in den Wurzeln [51]. Eine positive Korrelation zwischen Lignin-Anreicherung und erhöhter SD-Aktivität war zuvor bereits nach Verwundung von Paprika-Pflanzen beobachtet worden [50]. Die Shikimate Dehydrogenase ist das einzige Enzym des Shikimatestoffwechsels, das bisher bezüglich seiner Reaktion auf das Schadgas Ozon untersucht wurde. Dabei wurde eine ozonbedingt erhöhte Aktivität dieses Enzyms festgestellt [185].

### Shikimate Kinase

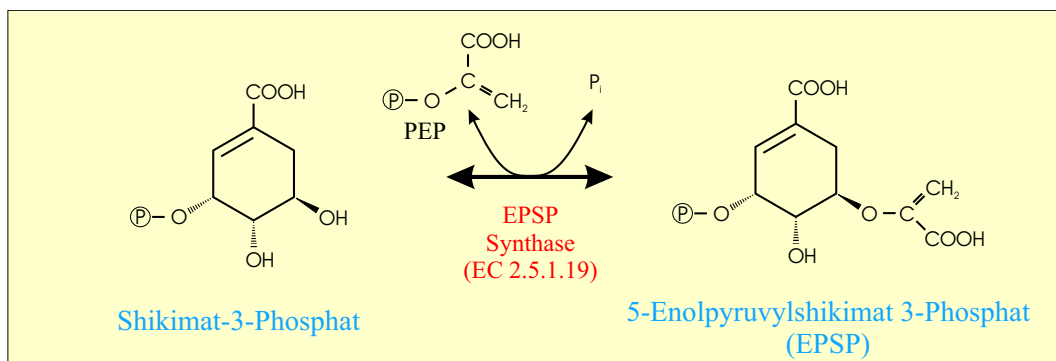
Wie in Abbildung 1.7, S. 16 dargestellt phosphoryliert die Shikimate Kinase (SK) (EC 2.7.1.71) unter Verbrauch von ATP Shikimate zu Shikimate-3-Phosphat, dem Substrat der 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphat Synthase (EPSPS). Dieses Enzym ist in Pflanzen bislang nur wenig untersucht worden. Der optimale pH-Bereich der Reaktion liegt bei etwa 9 und es werden Mg<sup>2+</sup>-Ionen für die Aktivität benötigt. An Enzymextrakten aus *Sorghum* konnte gezeigt werden, daß sich Kaffeesäure und Coumarsäure hemmend auf die SK auswirken [28]. Auch das Herbizid 2,4-D inhibiert die SK [124]. Die Regulation der SK, von der bisher nur chloroplastidäre Isoformen beschrieben wurden [209, 282], scheint abhängig vom Ladungszustand des Chloroplasten zu sein [124].



**Abbildung 1.7:** Reaktion der Shikimat Kinase.

### 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat Synthase

Durch die 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat Synthase (EPSPS, EC 2.5.1.19) wird in einer reversiblen Reaktion ein zweites Molekül PEP durch Kondensation mit Shikimat-3-Phosphat zu 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat (EPSP) in den Stoffwechselweg eingeführt (Abb. 1.8).



**Abbildung 1.8:** Reaktion der 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat Synthase.

Dieses Enzym ist neben der DAHPS im Shikimatstoffwechsel am besten untersucht, da es den Hauptangriffspunkt für das Totalherbizid 'Roundup' mit dem Wirkstoff Glyphosat darstellt [302]. Bei dieser Hemmung verbindet sich Glyphosat mit dem Enzym-Substrat Komplex aus EPSPS und Shikimat-3-Phosphat und verhindert so die Bildung von EPSP [21]. Mittlerweile wurden durch gentechnische Methoden zahlreiche glyphosattolerante Pflanzen entweder durch Überproduktion der pflanzeigenen EPSPS [290] oder durch Übertragung eines glyphosatinsensitiven EPSPS Allels aus *Agrobacterium tumefaciens* CP4 erzeugt. Diese werden bereits häufig in der Landwirtschaft eingesetzt [223, 239].

Die EPSPS zählt zu den Enzymen des Shikimatstoffwechsels, die in Isoformen auftreten. So konnten in *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicon esculentum* und *Zea mays*

bislang je zwei [71, 85, 150] und aus *Sorghum bicolor* 3 Isoenzyme identifiziert werden [261]. Beide Isoformen von Mais sind chloroplastidär lokalisiert [72]. Direkt nach der Applikation von Elicitoren stieg die Aktivität von Isoform II während Isoform I erst 3 Tage nach der Behandlung induziert war [73]. Auch in der Erbse wurde EPSPS-Aktivität vor allem in den Chloroplasten gefunden, während die cytosolische Fraktion nur wenig Aktivität aufwies [209]. Die Analyse chloroplastidärer Importsequenzen ergab mit bis zu 76 Aminosäuren Länge relativ lange cTP-Sequenzen [48], die bei der Aufnahme des Enzyms in das Chloroplasten-Lumen abgespalten wurden [42]. Bei der Untersuchung verschiedener Organe von Petunien wurden organspezifische Expressionsmuster entdeckt. So wurde in Petalen die höchste, in Antheren weniger und in den Blättern die geringste EPSPS-Expression verzeichnet [85]. Die EPSPS in Tomaten-Zellkulturen konnte auch durch verschiedene Elicitoren induziert werden [95].

### Chorismat Synthase

In der letzten enzymatischen Reaktion des Shikimatstoffwechsels, die von der Chorismat Synthase (CS, EC 4.2.3.5) katalysiert wird, entsteht schließlich durch *trans*-1,4 Elimination von Phosphat aus EPSP das Endprodukt Chorismat, welches einen wichtigen Verzweigungspunkt für weiterführende Synthesewege darstellt (Abb. 1.9).

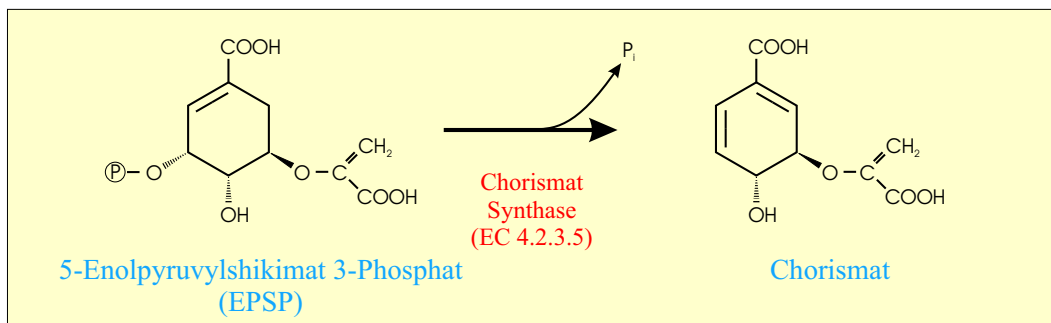


Abbildung 1.9: Reaktion der Chorismat Synthase.

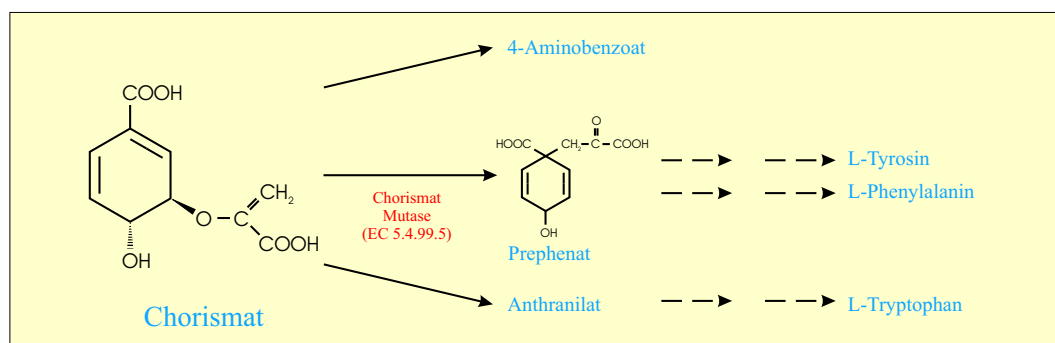
Bei dieser Reaktion, die trotz insgesamt redoxneutralen Ablaufs Flavin benötigt, wird unter Bildung einer Cyclohexadien-Struktur die zweite Doppelbindung in den Shikimatstoffwechsel eingeführt [14]. Je nach Organismus unterscheidet man die monofunktionelle CS, die extern reduziertes Flavin benötigen und die bifunktionelle CS, bei der eine NADP-abhängige Flavin-Reduktase im selben Polypeptid positioniert ist. Bei Pflanzen wurde bislang nur die monofunktionelle EPSPS-Variante nachgewiesen [124]. Bezüglich der benötigten Kofaktoren, der kinetischen Eigenschaften, des isoelektrischen Punkts und des pH Optimums sind sich die CS-Enzyme aus Pflanzen, Bakterien und Pilzen sehr ähnlich [279].

Die CS ist das einzige Enzym des Shikimatstoffwechsels, für das bisher gezeigt wurde, daß die chloroplastidäre Form erst nach Abspaltung der cTP enzymatisch aktiv

wird [93, 280]. Da bisher noch keine cytosolische Form des Enzyms gefunden wurde, scheint der letzte Schritt des Shikimatstoffwechsels, die Synthese von Chorismat, auf den Chloroplasten als Reaktionsraum beschränkt zu sein. Die beiden CS-Isoenzyme aus Tomate werden organspezifisch differentiell exprimiert, wobei eine Isoform vor allem in Wurzeln und Blüten vorkommt [93]. Die Aktivität derselben Isoform wurde in Tomaten-Zellkulturen auch durch einen pilzlichen Elicitor stimuliert [95].

### Enzymatische Umsetzung von Chorismat

Chorismat dient als Substrat für die Bildung von Anthranilat und Prephenat, den Vorstufen der aromatischen Aminosäuren, durch die Enzyme Anthranilat Synthase (AS, EC 4.1.3.27) und Chorismat Mutase (CM, EC 5.4.99.5) sowie für die Bildung von Isochorismat, einem Vorläufer der Salicylsäure [283], durch die Isochorismat-Synthase (ICS, EC 5.4.99.6). Die CM katalysiert, wie in Abbildung 1.10 dargestellt, die Umwandlung von Chorismat zu Prephenat, einer Vorstufe der aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tyrosin, wobei die Enolpyruvyl-Seitenkette intramolekular umgelagert wird.



**Abbildung 1.10:** Enzymatische Umsetzungen von Chorismat.

Während in manchen Bakterien die CM als bifunktionelles Enzym in Kombination mit einer Prephenat Dehydratase oder Prephenat Dehydrogenase Aktivität auftritt, sind in Pflanzen zwei Varianten einer monofunktionellen CM bekannt. Man unterscheidet die chloroplastidäre CM1, die durch Tryptophan aktiviert und durch Phenylalanin sowie Tyrosin gehemmt werden kann, von der cytosolischen CM2, die keiner Regulation durch aromatische Aminosäuren unterliegt [46, 89].

Beide Varianten der CM konnten mittlerweile aus verschiedenen Pflanzenspezies isoliert werden [46, 89, 162, 298]. Die chloroplastidäre Variante der CM verfügt, wie die entsprechenden Isoenzyme des Shikimatstoffwechsel-Hauptwegs über eine cTP-Sequenz [86]. Sowohl die cytosolische als auch eine plastidäre CM-Isoform aus *Arabidopsis thaliana* wiesen organspezifische Expressionsmuster auf. Nach Verwundung, Elicitorbehandlung und Pathogeninfektion wurde allerdings vor allem ein plastidäres

Isoenzym aktiviert, während das andere plastidäre und das putative cytosolische Isoenzym weniger stark reguliert wurden [62, 202].

Während in verwundeten Kartoffelknollen eine deutliche Steigerung der CM1-Aktivität festzustellen war, wurde in Blättern eine höhere Aktivität der CM2 gemessen [162]. Wie bereits für die DAHPS beschrieben, konnte auch im Fall der CM der Anstieg der enzymatischen Aktivität durch Verwendung der Transkriptions- und Translationshemmstoffe Actinomycin D und Cycloheximid verhindert werden, was auf eine transkriptionelle Regulation der CM hindeutet [161].

### 1.4.3 Subzelluläre Lokalisation des Shikimatstoffwechsels

Während Übereinstimmung darüber herrscht, daß die Synthese von Chorismat aus den Substraten E4P und PEP in Chloroplasten höherer Pflanzen ablaufen kann, steht der Beweis für einen vollständigen Shikimatstoffwechsel im pflanzlichen Cytosol auch heute noch aus. Die Existenz dieser beiden Shikimatstoffwechsel-Varianten wurde als 'dual pathway' Hypothese diskutiert [135, 208]. Man ging davon aus, daß der plastidäre Weg vor allem für die Synthese aromatischer Aminosäuren sorgt, während der cytosolische Weg Vorstufen für Sekundärmetabolite wie Flavonoide und Phenylpropane bereitstellt, deren Synthese nicht in den Chloroplasten stattfindet [135, 329].

Da die Gene des Shikimatstoffwechsels kernkodiert sind und die entsprechenden Enzyme an cytosolischen Ribosomen synthetisiert werden, besitzen alle Isoenzyme des plastidären Shikimatstoffwechsels ein N-terminales chloroplastidäres Transitpeptid (cTP), welches den Import der Proteine in das Lumen der Chloroplasten steuert und danach vom funktionellen Polypeptidteil abgespalten wird. Entsprechende cDNA-Sequenzen wurden mittlerweile für alle am Shikimatstoffwechsel beteiligten Enzyme gefunden [19, 284, 329], was die Existenz eines plastidären Shikimatstoffwechsels belegt. Für die Enzyme DAHPS, SK und EPSPS wurde gezeigt, daß der cTP-gesteuerte Protein-Import in isolierte Chloroplasten unter Abspaltung der cTP auch *in vitro* stattfinden kann [48, 282, 347].

Die Hypothese einer cytosolischen Variante des Shikimatstoffwechsels basiert vor allem auf Untersuchungen von durch Saccharose-Gradienten-Zentrifugation erhaltenen subzellulären Fraktionen, bei denen Aktivitäten der DAHPS [84, 194], DHQD/SD [210], EPSPS [209] und CM [46, 194] gefunden wurden. Allerdings sind manche Isoenzyme mit N-terminaler cTP, die dem plastidären Shikimatstoffwechsel zugerechnet werden, auch im Cytosol, also noch vor Abspaltung der cTP, aktiv [18, 48, 61, 282], so daß hierdurch der Eindruck einer cytosolischen Stoffwechselweg-Variante entstehen kann. Die cytosolische Synthese von Chorismat ist aber wohl nicht möglich, da CS im Gegensatz zu SK und EPSPS nur nach Abspaltung der cTP, also nicht im Cytosol, aktiv zu sein scheint [120]. Auch wurde für eine cytosolische Isoform der DAHPS gezeigt, daß sie eine sehr geringe Substratspezifität aufweist und es sich damit bei der DAHPS-Aktivität dieses Isoenzym wahrscheinlich nur um eine Nebenreaktion handelt [283].

## 1.5 Die Biosynthese von Ethylen

Seit Craker 1971 [44] über die Bildung von Ethylen in ozonexponierten Pflanzen berichtete, beschäftigten sich zahlreiche Autoren mit der Induktion dieses gasförmigen Phytohormons, seiner Vorläufersubstanz 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) und der an der Ethylen-Biosynthese beteiligten Gene unter dem Einfluß von Ozon. Bereits früh wurde die Empfindlichkeit von Pflanzen gegenüber Ozon mit der Ethylenbildung in Verbindung gebracht [196], und die Messung von Ethylen als zuverlässige Methode etabliert, um den durch Ozon verursachten Streß in Pflanzen zu quantifizieren [309]. Durch Hemmung der Ethylenbiosynthese gelang es, die Ausbreitung des ozonbedingten Zelltods in Tomatenpflanzen zu reduzieren [203, 313].

Ethylen wird durch die Enzyme ACC Synthase (ACS) und ACC Oxidase (ACO) über die Zwischenstufe ACC aus *S*-Adenosyl-*L*-Methionin (SAM) gebildet [342]. ACC kann allerdings auch durch die Enzyme ACC-Malonyltransferase und  $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase mit Malonat oder Glutamat konjugiert werden, wobei gebundenes ACC in Form von Malonyl-ACC und Glutamyl-ACC entsteht. Bei Koniferen konnte anhand von Tages- und Jahresgängen der ACC-Konjugate gezeigt werden, daß diese Konjugate auch wieder aufgespaltet werden können [337, 343].

Die Enzyme ACS und ACO werden in verschiedenen Pflanzenarten durch Genfamilien kodiert. So wurden zum Beispiel in Tomate bereits acht Isoformen der ACC-Synthase [231, 295] und vier Isoformen der ACC-Oxidase gefunden [9, 219]. Wegen der sehr hohen Sequenzhomologie ist es allerdings schwierig, die einzelnen Isoformen bei Genexpressionsuntersuchungen zu differenzieren [9]. Es wurde gezeigt, daß einzelne Isoformen der ACS und ACO nicht nur abhängig von Entwicklungsstadium und dem untersuchten Organ, sondern auch durch Umwelteinflüsse wie Pathogeninfektionen oder Verwundung differentiell induziert werden können [5, 153, 178, 180]. Auch die Exposition mit dem Schadgas Ozon führte in Tomatenpflanzen zu einer Stimulation der Ethylenbiosynthese [313], die von einer biphasischen Induktion mehrerer ACS und ACO Isoformen begleitet wurde [203]. Schon nach eintägiger Ozonbehandlung beobachteten Vahala et al. [318] in der Birke die Bildung von Ethylen und eine Induktion der Gene ACS und ACO. Auch in 4-jährigen Buchenjungepflanzen wurde in Zusammenhang mit der Ausbildung ozonbedingter Blattläsionen bereits die Akkumulation von ACC und die Emission von Ethylen gemessen [2]. In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich zur Messung von Ethylen und ACC auch die ozonbedingte Expression einzelner Isoformen der ACS und ACO mittels quantitativer Realtime-PCR bestimmt.



## 1.6 Themenstellung

Im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 607 ('Wachstum und Parasitenabwehr') sollte die Hypothese untersucht werden, ob es bei der europäischen Buche (*Fagus sylvatica* L.) unter dem Einfluß von Streß zu einer Umsteuerung zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel kommt. Zur differenzierten Betrachtung von biotischem und abiotischem Streß sollten einerseits der Erreger der Buchenblattbräune (*Apiognomonina errabunda*) und andererseits das Schadgas Ozon verwendet werden.

Durch den Shikimatstoffwechsel werden Moleküle des Primärstoffwechsels in Vorläufersubstanzen umgewandelt, aus denen sich nahezu alle aromatischen Inhaltsstoffe in höheren Pflanzen ableiten. Die Regulation dieses Stoffwechselwegs ist damit von zentraler Bedeutung für die Regulation zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel und stand daher in dieser Arbeit im Mittelpunkt des Interesses. Zur molekularbiologischen Untersuchung des Shikimatstoffwechsels sollten sowohl an jungen Buchen im Gewächshaus als auch an adulten Buchen unter Freilandbedingungen Ozonexpositionsversuche durchgeführt werden. Dabei sollten regelmäßige Probennahmen und die Bonitur ozonbedingter Blattläsionen durchgeführt werden.

Für die Analyse der Genexpression mittels quantitativer Realtime-PCR sollten zunächst cDNA-Sequenzen für jedes der am Shikimatstoffwechsel beteiligten Enzyme kloniert werden. Mittels spezifischer Antikörper sollten zudem in Westernblot-Analysen auch auf Proteinebene die streßbedingte Regulation einzelner Enzyme untersucht werden. Mittels ozoninduzierter und ozonreprimierter subtraktiver cDNA-Banken sollten darüber hinaus weitere stark ozonregulierte Gene identifiziert werden.

In Zusammenhang mit der Ausbildung ozonbedingter Läsionen wurde bereits häufig die Bildung von Ethylen beobachtet. Daher sollten auch die Emission dieses gasförmigen Phytohormons, die Akkumulation des direkten Vorläufermoleküls 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure und die Genexpression einzelner Isoformen der an der Ethylenbiosynthese beteiligten Enzyme untersucht werden. Durch die Analyse weiterer Signalmoleküle und sekundärer phenolischer Inhaltsstoffe sollte das Bild einer potentiellen streßbedingten Umsteuerung des pflanzlichen Stoffwechsels abgerundet werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben wurden Chemikalien vom Reinheitsgrad p.A. verwendet. Diese wurden über die Firmen Biozym (Oldendorf, D), Linde (Unterschleißheim, D), Merck (Darmstadt, D), Riedel de Haen (Seelze, D), Roth (Karlsruhe, D), Serva (Heidelberg, D), Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D) und usb (Cleveland, USA) bezogen.

#### Molekularbiologische Reagenzien

Für alle molekularbiologischen Reagenzien und Kits wurden, soweit nicht anders angegeben, die Protokolle der Hersteller verwendet.

**Tabelle 2.1:** Molekularbiologische Reagenzien

ABsolute SYBR Green ROX Mix	ABgene (Surrey, UK)
<i>Alu</i> I	MBI Fermentas (St.Leon-Rot, D)
Ampicillin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
BugBuster-Puffer	Merck (Schwalbach, D)
Complete Mini Prot Inh Mix	Roche (Mannheim, D)
Cy <sup>TM</sup> 3	Amersham (Freiburg, D)
Cy <sup>TM</sup> 5	Amersham (Freiburg, D)
DNase RQ1	Promega (Madison, USA)
dNTPs	MBI Fermentas (St.Leon-Rot, D)
<i>Eco</i> RI	MBI Fermentas (St.Leon-Rot, D)
E.Z.N.A. <sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit	Peqlab GmbH (Erlangen, D)
GeneRacer <sup>TM</sup> -Kit	Invitrogen (Carlsbad, USA)
<i>Hpa</i> II	MBI Fermentas (St.Leon-Rot, D)
Kanamycin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Lambda DNA/ <i>Eco</i> 47I ( <i>Ava</i> II) Marker 13	MBI Fermentas (St. Leon-Rot, D)
Lysozym	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Nucleon PytoPure Resin	Amersham (Freiburg, D)
oligo-dT(15)-Primer	Promega (Madison, USA)
Oligotex <sup>®</sup> mRNA Midi Kit	Qiagen (Hilden, D)
PCR-Select <sup>TM</sup> cDNA Subtraction Kit	BD Biosciences Clontech (Palo Alto, USA)
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Promega (Madison, USA)
pGEM <sup>®</sup> -T Easy Vektor System	Promega (Madison, USA)
Protein-Marker P7702S, P7708S	New England BioLabs (Beverly, USA)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden, D)
Qiaquick PCR-Purification-Kit	Qiagen (Hilden, D)
RNAse A	usb (Cleveland, USA)
Superscript II	Invitrogen (Carlsbad, USA)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Wizard <sup>®</sup> SV Gel Kit	Promega (Madison, USA)

**Puffer, Lösungen und Medien**

Für alle wäßrigen Lösungen, Medien und Puffer wurde doppelt destilliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) verwendet.

**Tabelle 2.2:** Puffer, Lösungen und Medien

Bakterien-Aufschlußpuffer	12,5	ml	BugBuster-Puffer	
	250	$\mu$ l	0,1 M Tris (pH8)	
	2,5	mg	Lysozym	
	1/2	Tabl.	Complete Mini (Roche)	
	0,75	ml	ddH <sub>2</sub> O	
Borat-Extraktionspuffer	200	mM	Borat/Borsäure	pH 8,8
	2	mM	EDTA	
	0,5	mM	EGTA	
	1,5%	(w/v)	PVPP	
	5	mM	DTT	
	1	á 10ml	Complete Mini (Roche)	
Bradford-Lösung	70	mg	Serva Blau Gel	
	50	ml	Ethanol	
	100	ml	Orthophosphorsäure (85%)	
	850	ml	ddH <sub>2</sub> O	
CDNB-Lösung	30	mM	CDNB in ETOH	
Chloroform-IAA-Lösung	96%	(v/v)	Chloroform	
	4%	(v/v)	Isoamylalkohol	
Coomassieblau-Färbelösung	0,05%	(w/v)	Coomassie R250	
	45%	(v/v)	Methanol	
	9%	(v/v)	Essigsäure	
	45,95%	(v/v)	ddH <sub>2</sub> O	
DAB-Lösung	1,7	mM	DAB	pH 7,6
	50	mM	Tris	
	0,05%	(v/v)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
DNA-Chip-Waschpuffer I	0,1%	(w/v)	SDS in 1 x SSC	
DNA-Chip-Waschpuffer II	0,1%	(w/v)	SDS in 0,1 x SSC	
DNA-Ladepuffer (10x)	50%	(v/v)	Glycerin	
	0,1%	(v/v)	Bromphenolblau	
	49,9%	(v/v)	ddH <sub>2</sub> O	
Entfärbelösung	10%	(v/v)	Methanol	
	10%	(v/v)	Essigsäure	
	80%	(v/v)	ddH <sub>2</sub> O	
Glycerin-LB-Medium	1%	(w/v)	Trypton	
	0,5%	(w/v)	Hefe-Extrakt	
	0,5%	(w/v)	Natriumchlorid	
	36	mM	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
	13,2	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
	0,4	mM	MgSO <sub>4</sub>	
	1,7	mM	Natriumcitrat	
	8,8	mM	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
4,4%	(v/v)	Glycerin		
GSH-Lösung	22	mM	Glutathion	pH 8,0
	0,1	M	Tris	

**Tabelle 2.2:** Puffer, Lösungen und Medien - Fortsetzung

Haferflockenmedium A	2%	(w/v)	Haferflocken	
	5%	(v/v)	V8-Saft	
	1,5%	(w/v)	Agar-Agar	
Haferflockenmedium B	2%	(w/v)	Haferflocken	
	0,5%	(w/v)	Malzextrakt	
	1,5%	(w/v)	Agar-Agar	
Hybridisierungspuffer	25%	(v/v)	20x SSC	
	50%	(v/v)	Formamid	
	0,1%	(w/v)	SDS	
	1%	(w/v)	Salmon sperm	
Hydrolysepuffer	1	M	NaOH	
	100	mM	Ascorbinsäure	
	0,2%	(w/v)	NaBH <sub>4</sub>	
Kaliumphosphat-Puffer	95%	(v/v)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Lösung (1M)	pH 8,5-8,7
	5%	(v/v)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Lösung (1M)	
Laufmittel A (HPLC Salicylsäure)	27	mM	Natriumacetat	pH 5,0
	30	mM	Zitronensäure	
Laufmittel B (HPLC Salicylsäure)	27	mM	Natriumacetat	
	30	mM	Zitronensäure	
	95%	(v/v)	Methanol	
Laufmittel A' (HPLC Phenole)	20	ml	5% NH <sub>4</sub> -Formiat in HCOOH	
	980	ml	ddH <sub>2</sub> O	
Laufmittel B' (HPLC Phenole)	20	ml	5% NH <sub>4</sub> -Formiat in HCOOH	
	96	ml	ddH <sub>2</sub> O	
	882	ml	Methanol	
LB-Medium	1%	(w/v)	Trypton	pH 7,0
	0,5%	(w/v)	Hefe-Extrakt	
	1%	(w/v)	Natriumchlorid	
LB-Medium + Agar	1%	(w/v)	Trypton	pH 7,0
	0,5%	(w/v)	Hefe-Extrakt	
	1%	(w/v)	Natriumchlorid	
	0,7%	(w/v)	Agar-Agar	
Malzmedium	3%	(w/v)	Malzextrakt	
	1,2%	(w/v)	Agar-Agar	
Na-Borhydridlösung	100	mM	NaBH <sub>4</sub>	
	200	ml	PBS	
	75	ml	Ethanol	
Oxidationslösung	2/3	(v/v)	Gesättigte NaClO-Lösung	
	1/3	(v/v)	Gesättigte NaOH-Lösung	
PAGE-Puffer	192	mM	Glycin	
	25	mM	Tris	
	0,1%	(w/v)	SDS	
PBS-Puffer	10	mM	Natriumphosphat	pH 7,5
	130	mM	NaCl	
PEG-Lösung	30%	(w/v)	PEG 8000	
	30	mM	MgCl <sub>2</sub>	
Phosphatpuffer	0,1	M	Kaliumphosphat	pH 6,4

**Tabelle 2.2:** Puffer, Lösungen und Medien - Fortsetzung

Phosphat-Waschpuffer	0,5%	(v/v)	Kaliumphosphat-Puffer (1M)	
	84,25%	(v/v)	Ethanol (95%)	
	15,25%	(v/v)	ddH <sub>2</sub> O	
Phosphat-Elutionspuffer	0,04%	(v/v)	Kaliumphosphat-Puffer (1M)	
	99,6%	(v/v)	ddH <sub>2</sub> O	
Prähybridisierungspuffer	25%	(v/v)	20x SSC	
	0,1%	(w/v)	SDS	
	0,1%	(w/v)	BSA	
Psi-Medium	2%	(w/v)	Trypton	pH 7,6 (KOH)
	0,5%	(w/v)	Hefe-Extrakt	
	0,5%	(w/v)	Magnesiumsulfat	
RNA-Aufschlußpuffer	100	mM	Tris-HCl	pH 8,0
	25	mM	EDTA	
	2	M	NaCl	
	2%	(w/v)	CTAB	
	2%	(w/v)	PVPP	
	0,5%	(w/v)	Spermidin	
SDS-Gel-Ladepuffer (2x)	0,5	M	Tris/HCl	pH 6,8
	20%	(v/v)	Glycerin	
	4%	(v/v)	Mercaptoethanol	
	0,2%	(w/v)	Bromphenolblau	
	4%	(w/v)	SDS	
SOC-Medium	2%	(w/v)	Trypton	
	0,5%	(w/v)	Hefe-Extrakt	
	0,5%	(w/v)	Natriumchlorid	
	20	mM	Glucose	
Spot-Puffer (2x)	3	M	Betain in 6x SSC-Lösung	
SSC (20x)	0,3	M	Natriumcitrat/HCl	pH 7,0
	3	M	NaCl	
Suspensionslösung für die Infektion mit <i>Apiognomonía errabunda</i>	62,5	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	pH 6,0
	5,5	mM	Glucose	
	0,1%	(v/v)	Tween 20	
TAE-Puffer (1x)	40	mM	Tris-Acetat	pH 8,0
	1	mM	EDTA	
TBS-Puffer	50	mM	Tris	pH 7,6
	137	mM	NaCl	
TBST-Puffer	50	mM	Tris	pH 7,6
	137	mM	NaCl	
	0,1%	(v/v)	Tween 20	
TBST-MP	50	mM	Tris	pH 7,6
	137	mM	NaCl	
	0,1%	(v/v)	Tween 20	
	5%	(w/v)	fettfreies Milchpulver	
TE-Puffer	10	mM	Tris/HCl	pH 8,0
	1	mM	EDTA	

**Tabelle 2.2:** Puffer, Lösungen und Medien - Fortsetzung

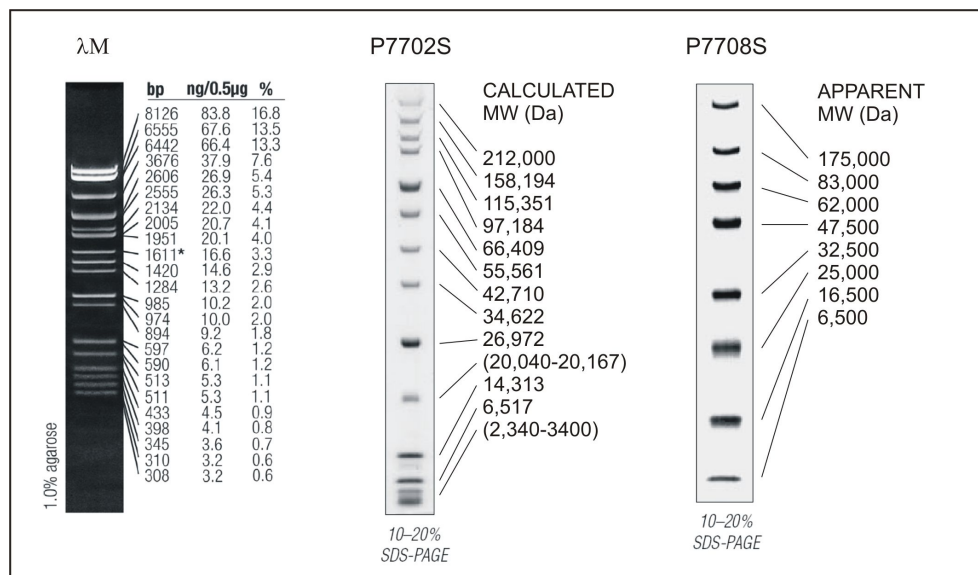
TfbI-Lösung	30	mM	Kalium-Acetat	pH 5,8
	100	mM	Rubidiumchlorid	
	10	mM	Calziumchlorid	
	50	mM	Manganchlorid	
	15%	(v/v)	Glycerin	
TfbII-Lösung	10	mM	MOPS	pH 6,5 (NaOH)
	10	mM	Rubidiumchlorid	
	75	mM	Calziumchlorid	
	15%	(v/v)	Glycerin	
Westernblot-Transferpuffer	50	mM	Tris	
	40	mM	Glycin	
	20%	(v/v)	Methanol	

### PCR-Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden am Institut für Pathologie (GSF, Neuherberg) von U. Linzner mit einem ABI Synthesizer 394 (Applied Biosystems, Weiterstadt, D) mittels der Di-Phosphoramidit-Methode hergestellt. Alle Primersequenzen sind im Anhang (Tab. 6.2, S. 203) aufgeführt.

### DNA- und Protein-Standards

Die verwendeten DNA- und Protein-Standards sind in Abbildung 2.1 dargestellt.



**Abbildung 2.1:** DNA-Standard: λM = Lambda DNA/*Eco47I* (*AvaII*) Marker 13 sowie Protein-Standards P7702S und P7708S (vorgefärbt).

## Plasmide

**Tabelle 2.3:** Plasmide zur Klonierung von PCR-Produkten und Erstellung von Expressionsvektoren

Plasmide	pGEM <sup>®</sup> -T Easy	pDONR <sup>TM</sup> 221	pDEST <sup>TM</sup> 15
Länge	3015 bp	4762 bp	7013 bp
Resistenzen	Ampicillin	Kanamycin	Ampicillin
Promotor	T7 / SP6	-	T7
Hersteller	Promega	Invitrogen	Invitrogen

## Bakterienstämme

- *E. coli* JM109 (*endA1*, *recA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* ( $r_{k^-}$ ,  $m_{k^+}$ ), *relA1*, *supE44*,  $\Delta(lac-proAB)$ , [F', *traD36*, *proAB*, *laq*<sup>q</sup> $\Delta$ M15])
- *E. coli* DH5 $\alpha$  (*supE44*,  $\Delta lacU169$  ( $\Phi 80 lacZ \Delta M15$ ), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*)
- *E. coli* BL21(DE3) (F<sup>-</sup>, *dcm*, *ompT*, *hsdS*, ( $r_{B^-}$ ,  $m_{B^-}$ ), *gal*,  $\lambda$ (DE3))

## 2.2 Pflanzenkultur und Ernte von Blattproben

Für die Gewächshausversuche wurden 3- und 4-jährige Buchen (*Fagus sylvatica* L., 60 bzw. 80-120 cm) der Herkunft 81024 (Alpenvorland) von der Baumschule Karl Schlegel KG (Riedlingen) bezogen. Die Pflanzen wurden jeweils im Oktober wurzel-nackt geliefert und sofort nach der Lieferung gepflanzt (2.2.1). Das Probenmaterial für Versuch D wurde von ozonbehandelten und unbehandelten Ästen der Sonnenkro-ne 50-60 Jahre alter Buchen am Versuchsstandort 'Kranzberger Forst' (2.4.4, S. 32) entnommen.

### 2.2.1 Pflanzung und Überwinterung

Das Pflanzsubstrat für die Versuchsvarianten A und B (2.4, S. 31) bestand aus einer Mischung von sandigem Lehm und Torfkultursubstrat zu gleichen Teilen. In Versuchs-variante C wurde zum Topfen der Versuchspflanzen der A<sub>h</sub>-Horizont eines Naturstand-orts der Buche (Höglwald bei Augsburg, 48,2892°Nord, 11,0708°Ost) verwendet.

Die Buchen-Jungpflanzen wurden im Herbst vor dem jeweiligen Versuchsbeginn einzeln in TEKU Pflanzcontainer (BC33) gepflanzt. Um Stauässe zu vermeiden wur-de am Boden der Töpfe eine ca. 4 cm hohe Drainage-Schicht aus Blähton eingefügt. Für die Überwinterung der Jungbäume im Pflanzgarten des Instituts für Biochemische Pflanzenpathologie (GSF, Neuherberg) wurden die Pflanzcontainer seitlich und 5 bis 10 cm über Substrathöhe mit Rindenmulch umgeben, um die Wurzelballen vor Flüs-sigkeitsverlust bei starkem Frost zu schützen.

### 2.2.2 Technische Ausstattung im Gewächshaus

In Expositions- und Kontroll-Kabine standen jeweils 8 Tische mit einer Stellfläche von jeweils 2 m<sup>2</sup> zur Verfügung. Auf jeden Tisch wurden bis zu 12 Versuchspflanzen gestellt und durch die automatische Tröpfchenbewässerungsanlage mit entionisiertem Wasser versorgt. Das Ozon für die Expositionsversuche wurde aus reinem Sauerstoff erzeugt (Fischer Ozon Generator 500, Neckenheim, D) und durch einen Ventilator in die Expositions-kabine eingeblasen. Für eine gute Verteilung des Ozons sorgten zudem 6 Ventilatoren. Ozonkonzentration sowie Temperatur, Luftfeuchte und der Lichteinfall durch die UV-durchlässigen Scheiben wurden fortlaufend automatisch ermittelt und durch Regelung der Ozonzuspeisung, Außenschattierung, Wasservernebelung und Lüftung mit den Klima-Sollwerten (2.2.3) abgeglichen.

### 2.2.3 Klimabedingungen im Gewächshaus

In beiden verwendeten Gewächshaus-Kabinen (Ozonapplikation und Kontrolle) wurden bei allen Gewächshausversuchen die folgenden Klimaparameter eingestellt:

- Temperatur untertags (6:00 bis 20:00): 22-25°C
- Temperatur nachts: 17-20°C
- 70-80% relative Luftfeuchte
- keine künstliche Belichtung.

An Tagen mit hoher Sonneneinstrahlung wurde durch die Außenschattierung des Gewächshauses sichergestellt, daß der Maximalwert von 30 kLux nicht überschritten wurde. Um die Ozonkonzentration in der Kabine möglichst wenig zu beeinflussen, wurde erst ab einer Temperatur von 28°C die Seitenlüftung geöffnet. Zusätzlich zu der Wasser-Vernebelungsanlage wurden pro Kabine je zwei Gewächshaustische etwa 4 cm hoch mit Wasser geflutet und zur besseren Verdunstung durch Ventilatoren mit Luft angeströmt, um den Sollwert der Luftfeuchte auch an heißen Tagen einzuhalten.

### 2.2.4 Bewässerung und Düngung

Die Versuchspflanzen wurden durch eine automatische Tröpfchen-Bewässerungsanlage täglich mit ca. 250 ml Wasser pro Topf versorgt. Da sich die Dauer der Versuche auf maximal 3 Monate der Vegetationsperiode beschränkte, wurde auf eine zusätzliche Nährstoff-Nachlieferung verzichtet.

### 2.2.5 Schädlings- und Unkrautbekämpfung

Vor dem Knospenaustrieb wurden die Buchen-Jungpflanzen im Überwinterungsbe-  
reich mit dem biologischen Austriebsspritzmittel Promanal<sup>®</sup> (auf Rapsöl-Basis, Neu-  
dorf, Emmerthal, D) behandelt. Darüber hinaus wurden keine chemischen Pflanzen-  
schutzmittel verwendet. Die Buchenwollschildlaus (*Cryptococcus fagisuga*) wurde



bei wöchentlichen Kontrollgängen mechanisch und durch den Einsatz der Nützlinge *Chrysoperla carnea* (Florfliegen-Larven) und *Episyrphus balteatus* (Schwebfliege) bekämpft. Gegen Thripse wurden zusätzlich Raubmilben (*Amblyseius cucumeris*) und Raubwanzen (*Orius majusculus*) im Bestand ausgebracht. Unkraut wurde vor dem Einstellen der Pflanzen ins Gewächshaus und danach etwa alle zwei Wochen aus den Töpfen entfernt.

### **2.2.6 Ernte und Lagerung der Blattproben**

Bei der Probennahme von Buchenblättern wurde jeweils die Blattspreite des von der Spitze aus gezählt dritten Blattes eines bislang unbeprobten Astes ohne die Blattstiele geerntet, in Alutüten verpackt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Proben bis zur Aufarbeitung erfolgte dann bei -80°C. Die einzelnen Erntezeitpunkte sind bei den entsprechenden Versuchen aufgeführt (2.4, S. 31).

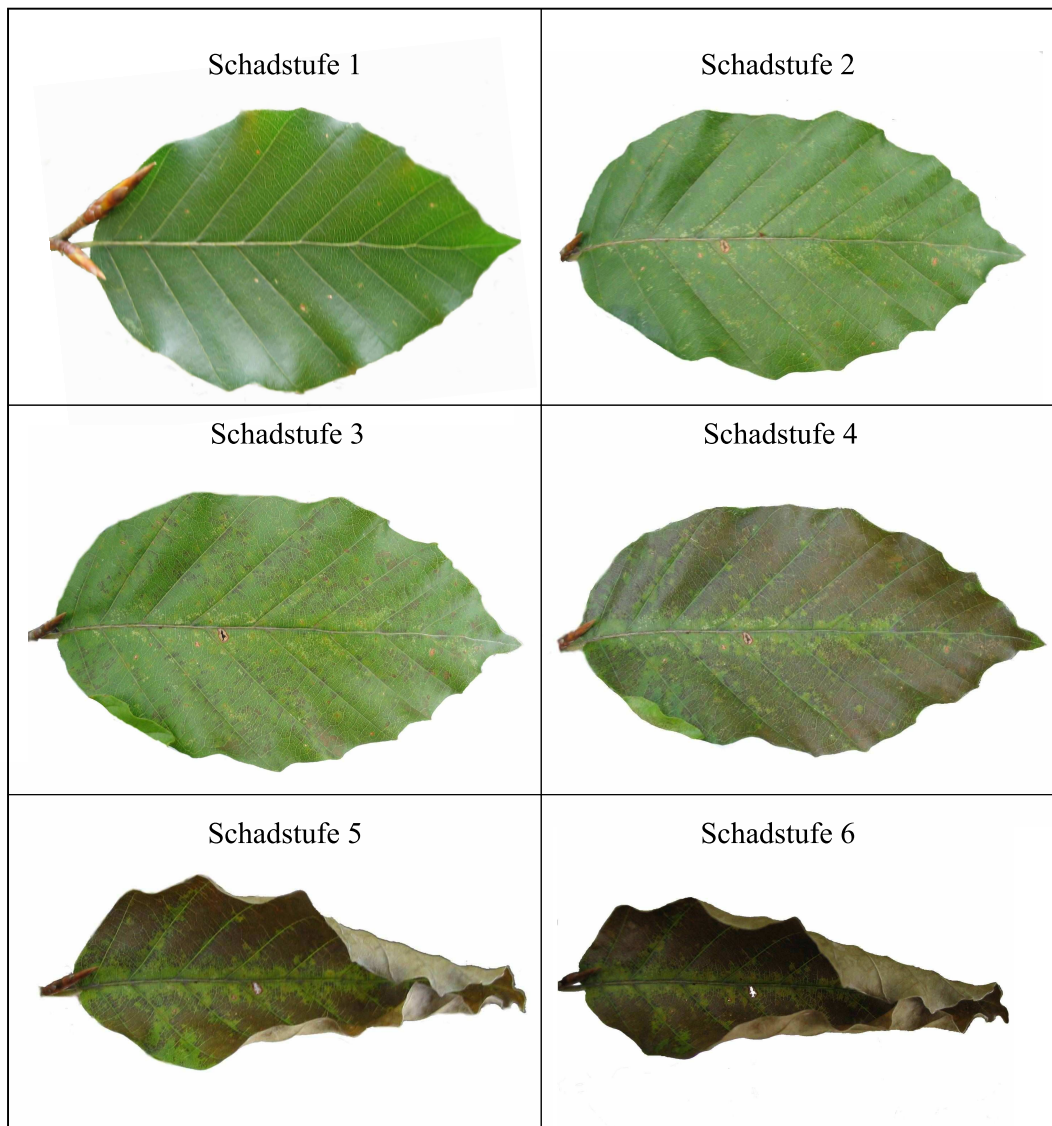
## **2.3 Bonitur der Versuchspflanzen**

### **2.3.1 Knospenaustrieb**

Vor dem Beginn der Gewächshausversuche A, B und C wurde regelmäßig der Knospenaustrieb der überwinterten Jungpflanzen im Gewächshaus nach dem Schema von Sabine Anegg [2] bonitiert. Für die Ozonexpositionsversuche wurden nur Pflanzen verwendet, deren Blätter vollständig entfaltet waren.

### **2.3.2 Ozonsymptome**

Während der Gewächshausversuche A, B und C wurden die durch Ozon verursachten Läsionen an den Blättern photographisch dokumentiert und gemäß Tabelle 2.4, S. 30 bonitiert. In Abbildung 2.2, S. 30 sind ozonbehandelte Blätter aus Versuch B abgebildet, deren Läsionsausprägung den einzelnen Boniturstufen entspricht.



**Abbildung 2.2:** Skala zur optischen Bonitur ozonbedingter Blattsymptome.

**Tabelle 2.4:** Bonitur der Ozonsymptome an Buchenblättern.

Stufe	Symptome
1	Keine sichtbaren Läsionen
2	Einzelne punktförmige Läsionen
3	Viele kleine Läsionen auf der gesamten Blattspreite
4	Läsionen auf etwa 50% der Blattspreite
5	Läsionen auf etwa 70% der Blattspreite (Blätter beginnen sich aufzurollen)
6	Läsionen auf mehr als 90% der Blattspreite (Blätter fallen ab)

## 2.4 Ozon-Expositionsversuche

### 2.4.1 Versuch A: Erstellung ozonregulierter cDNA-Banken

Ziel dieses Versuches war die Identifizierung ozonregulierter Gene in der europäischen Buche mittels subtraktiver cDNA-Banken.

Am 17. Februar 2003 wurden 40 3-jährige Buchen in das Versuchsgewächshaus gestellt, woraufhin wöchentlich der Knospenaustrieb bonitiert wurde. Am 2.4.2003 wurden dann je 9 Pflanzen mit vollständig entfaltenen Blättern auf Expositions- und Kontrollkabine verteilt. Die Behandlung mit 300 nl/l Ozon (9:00 bis 17:00) in der Expositions-kabine erfolgte ab diesem Tag bis zum 1.5.2003. Pro Baum wurde 4, 8, 24 und 32 Stunden sowie 2, 3, 4, 5, 7, 9, 12, 15, 22, 26 und 30 Tage nach Versuchsbeginn jeweils 1 Blatt geerntet. Die Ernte erfolgte hierbei jeweils um 16:00 Uhr des entsprechenden Tages.

### 2.4.2 Versuch B: Expressionsanalyse von Genen des Shikimatstoffwechsels unter dem Einfluß von Ozon

Im Rahmen von Versuch B sollte die ozonbedingte Expression verschiedener Gene des Shikimatstoffwechsels im Verlauf einer mehrwöchigen Ozonexposition untersucht werden.

Jeweils 9 3-jährige Buchen wurden über den Sommer 2003 im Freiland kultiviert und am 1.9.2003 in die Expositions- und die Kontrollkabine des Gewächshauses überführt. Ab dem 8.9.2003 wurden die Pflanzen in der Expositions-kabine täglich von 9:00 bis 17:00 mit 200 nl/l Ozon behandelt. Die erste Probenahme erfolgte direkt vor dem Beginn der Ozonapplikation, weitere jeweils zwischen 15:00 und 17:00 nach 2, 7, 15, 24, 32, 39 und 46 Tagen. Zu diesen Zeitpunkten wurde auch die ozonbedingte Schädigung der Bäume bonitiert und photographisch festgehalten.

### 2.4.3 Versuch C: Quantifizierung von Transkripten und Enzymen des Shikimatstoffwechsels unter biotischem und abiotischem Streß

Auch in diesem Versuch stand die Regulation des Shikimatstoffwechsels unter dem Einfluß von Ozon in Mittelpunkt des Interesses, wobei nicht nur die Genexpression sondern auch die Akkumulation ausgewählter Enzyme des Shikimatstoffwechsels untersucht werden sollte.

Bei Versuch C wurde die Dauer der Ozonbehandlung im Gewächshaus auf knapp 3 Monate ausgedehnt (2.6.2004 bis 25.8.2004). Die tägliche Ozonbehandlung (von 9:00 bis 17:00) begann am 2.6.2004 mit zunächst 150 nl/l und wurde nach zwei Wochen (ab dem 15.6.2004) bis zum Versuchsende mit 190 nl/l (8 h/d) weitergeführt. Durch

gezielte Infektion mit dem Erreger der Buchenblattbräune (*Apiognomonina errabunda*) sollte der Einfluß eines biotischen Stressors untersucht werden.

Zur Kombinationen von biotischem und abiotischem Streß wurden mehrere Versuchsvarianten durchgeführt, die in Tabelle 2.5 näher erläutert werden.

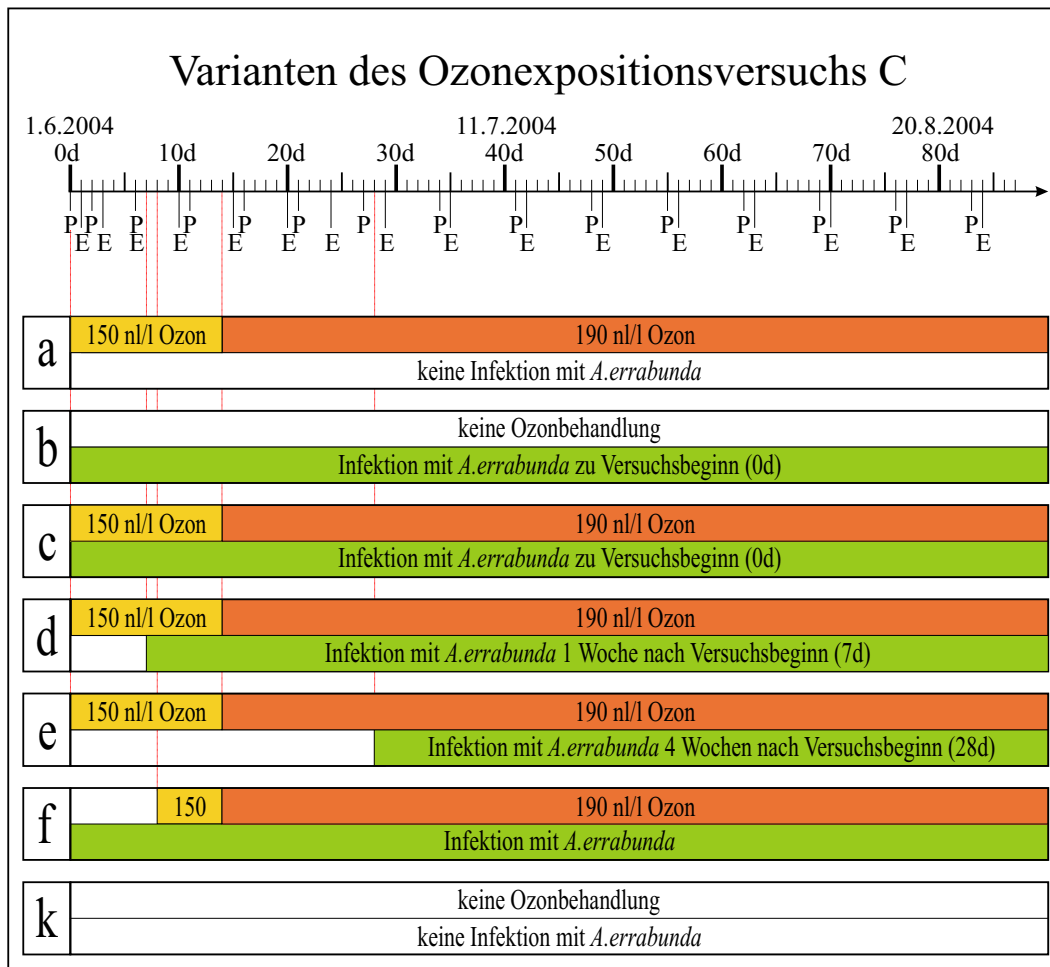
**Tabelle 2.5:** Varianten des Ozonexpositionsversuchs C

Variante	Behandlung mit Ozon	Infektion mit <i>A. errabunda</i>	Pflanzen
a	2.6.2004 bis 24.8.2004	Keine Infektion	12
b	Keine Ozonbehandlung	Infektion am 1.6.2004	12
b	2.6.2004 bis 24.8.2004	Infektion am 1.6.2004	12
d	2.6.2004 bis 24.8.2004	Infektion am 8.6.2004	12
e	2.6.2004 bis 24.8.2004	Infektion am 29.6.2004	12
f	9.6.2004 bis 24.8.2004	Infektion am 1.6.2004	12
k	Keine Ozonbehandlung	Keine Infektion	24

In jeder Versuchsvariante wurden 9 Bäume an den Tagen 0, 2, 6, 11, 16, 21, 27, 34, 41, 48, 55, 62, 69, 76 und 83 - jeweils um 16:00 Uhr - einzeln beprobt, wobei pro Baum jeweils 2 bis 3 Blätter geerntet wurden. Von weiteren drei Bäumen pro Versuchsvariante wurde nach 1, 3, 6, 10, 15, 20, 24, 29, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 und 84 Tagen je ein Blatt abgenommen und für die Ethylenbestimmung (2.14.1, S. 53) verwendet. Nach 0, 3, 7, 13, 17, 24, 30, 36, 42, 45, 50, 56, 62, 71, 78 und 85 Tagen wurde die Schädigung der Bäume durch Ozon bonitiert und photographisch festgehalten. Um Positionseffekte zu vermeiden wurden die Versuchsvarianten wöchentlich innerhalb der Behandlungs- bzw. der Kontrollkabine umgestellt. Zur Schädlingskontrolle wurden die Pflanzen wöchentlich auf Befehl untersucht und es wurden alle zwei Wochen Nützlinge ausgebracht. Einen Überblick über den Ablauf und die einzelnen Varianten von Versuch C gibt Abbildung 2.3, S. 33.

#### 2.4.4 Versuch D: Expressionsanalyse von Genen des Shikimatstoffwechsels an ausgewachsenen Buchen unter dem Einfluß von Ozon im Freiland

Bei dem Freiland-Versuchsstandort 'Kranzberger Forst' in der Nähe von Freising (bei München, 48,418°Nord, 11,656°Ost, 490 m üNN [255]) handelt es sich um einen etwa 50 - 60 Jahre alten Buchen-Fichten-Bestand auf Parabraunerde [288]. Der Kronenraum einer Gruppe von ausgewachsenen Buchen und Fichten wurde dort im Rahmen des SFB 607 mit einem Teflonschlauch-System ausgestattet, das eine kontinuierliche Kronenbegasung mit Ozon ermöglichte [331]. Seit Mai 2000 wurde ein Teil der Bäume durch dieses System mit gegenüber der Umgebungsluft ( $1xO_3$ ) verdoppelter Ozonkonzentration ( $2xO_3$ ) behandelt, wobei eine Obergrenze von 150 nl/l nicht überschritten



**Abbildung 2.3:** Schematische Übersicht der Behandlungsvarianten a, b, c, d, e, f und k in Versuch C (150-190 nl/l Ozon, 8 h/d). P = Probenahmezeitpunkte, E = Zeitpunkte der Ethylenmessungen, d = Tage nach Beginn der Ozonbehandlung, *A. errabunda* = *Apiognomonía errabunda*.

wurde. Drei Gerüsttürme mit Verbindungsplattformen auf vier Ebenen ermöglichten die Beobachtung und Beprobung der Sonnen- und Schattenkrone der Bäume. Eine detaillierte Beschreibung der forstlichen Klassifizierung des Standorts und der verwendeten technischen Ausstattung findet sich bei Nunn [226]. Die Probennahmen aus der Sonnenkrone unter  $1xO_3$  und  $2xO_3$  Bedingungen erfolgten am 15.6., 28.7., 14.9. und am 5.10.2004.

## 2.5 Allgemeine molekularbiologische Methoden

### Photometrische Quantifizierung von DNA und RNA

DNA- und RNA-Konzentrationen in wässrigen Lösungen wurden an den Photometern ULTROSPEC 3100 PRO (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden) und Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, USA) durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm ( $OD_{260}$ ) bestimmt. Ein  $OD_{260}$ -Wert von 1 entspricht bei der Messung von RNA 40  $\mu\text{g/ml}$  und bei der Messung von DNA 50  $\mu\text{g/ml}$ . Die Reinheit der Nukleinsäurelösungen wurde anhand des Quotienten der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm ( $OD_{260}/OD_{280}$ ) ermittelt.

### Fällung von DNA und RNA

Zur Fällung von DNA wurden der wässrigen Lösung 0,1 Volumen 4 M NaAc-Lösung (pH 5,2) und 2 Volumen Ethanol oder ein Volumen Isopropanol zugegeben. RNA wurde mit 4 Volumen Ethanol gefällt. Nach vorsichtigem Mischen der Lösungen und 5- bis 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die gefällte DNA bzw. RNA durch Zentrifugation (10 min, 20000 g) pelletiert und nach vollständiger Entfernung des Überstandes bei Raumtemperatur 5 Minuten getrocknet.

Um die PCR-Produkte bei der Herstellung der DNA-Chips und der Sequenzierung von Verunreinigungen durch Primerdimere zu reinigen wurde die PEG-Fällung eingesetzt, da hierbei nur länger-kettige DNA präzipitiert. Je ein Volumen der DNA-Lösung wurde mit 2 Volumen PEG-Lösung und 3 Volumen TE-Puffer gut gemischt und eine Stunde bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (30 min, 4000 g, 4°C) wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 2 Volumen 70% Ethanol vorsichtig überschichtet und wiederum zentrifugiert (30 min, 4000 g, 4°C). Nach restlosem Entfernen des Überstandes wurde das Pellet an der Luft getrocknet.

### Klonierung von PCR-Produkten

Für die Klonierung von PCR-Produkten wurde der Vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega, Madison, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Abgesehen von der Erstellung der subtraktiven cDNA-Banken wurden zur Transformation von *E. coli* selbst hergestellte kompetente Zellen des Stammes DH5 $\alpha$  verwendet. Ausgehend von einer Einzelkolonie wurde eine 5 ml Übernachtskultur in LB-Medium angesetzt (200 rpm, 37°C) und am nächsten Morgen mit 500 ml Psi-Medium gemischt. Die Bakterien suspension wurde dann bis zu einer  $OD_{550}$  von 0,48 bei 37°C unter ständigem Schwenken inkubiert und anschließend für 15 Minuten auf Eis abgekühlt. Die Bakterien wurden bei 4000 g pelletiert (5 min, 4°C), in 200 ml TfbI-Lösung resuspendiert und wieder 15 Minuten auf Eis gekühlt. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 4000 g, 4°C) wurden die Zellen in 20 ml TfbII-Lösung aufgenommen, wieder für 15 Minuten auf Eis inkubiert und dann in Aliquots von je 50  $\mu\text{l}$  in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Bei der thermischen Transformation wurden 50  $\mu\text{l}$  kompetenter *E. coli*-Zellen der Stämme JM109 oder DH5 $\alpha$  auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit 1  $\mu\text{l}$  des Ligationsansatzes vermischt. Nach einer halbstündigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien für 40 Sekunden einer Temperatur von 42°C im Wasserbad ausgesetzt und danach sofort wieder auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 900  $\mu\text{l}$  SOC-Medium und einstündiger Inkubation im Wärmeschüttler (100 rpm, 37°C) wurden 100  $\mu\text{l}$  der Bakterien-Suspension auf festem Selektiv-Medium (LB-Medium, 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin, 6% Agar) in einer Petri-Schale ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Die Kontrolle der Klonierung erfolgte mittels Kolonie-PCR. Für den Mastermix wurden pro Reaktion folgende Komponenten verwendet: 2,5  $\mu\text{l}$  PCR10xPuffer, 1  $\mu\text{l}$  MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,5  $\mu\text{l}$  dNTP (10 mM), 0,5  $\mu\text{l}$  M13f Primer, 0,5  $\mu\text{l}$  M13r Primer, 0,1  $\mu\text{l}$  Taq-Polmerase (0,5u/ $\mu\text{l}$ ), 19,9  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde ein Teil einer transformierten Bakterienkolonie in das PCR-Reaktionsgefäß überführt und als DNA-Vorlage verwendet. Das PCR-Programm bestand aus einem Denaturierungszyklus (94°C, 3 min), 35 Amplifikationszyklen (94°C, 30 sec; 50°C, 45 sec; 70°C, 60 sec) und einer abschließenden Inkubation bei 72°C für 5 Minuten.

### Isolierung von Plasmiden

Die beiden Kits E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit (Peqlab, Erlangen) und QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) wurden nach Angaben der Hersteller zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Flüssigkulturen transformierter *E. coli*-Stämme verwendet.

### DNA Sequenzierung

Sequenzierungen wurden entweder bei MGW Biotech (Ebersberg) in Auftrag gegeben oder an der GSF (Neuherberg) mit einem ABI3100 Sequencer (Applied Biosystems) durchgeführt. Hierzu wurden für jede Sequenzierungsreaktion folgender PCR-Ansatz hergestellt: 1  $\mu\text{l}$  Big Dye Terminator Mix, 1  $\mu\text{l}$  Reaktionspuffer (5x), 1  $\mu\text{l}$  sequenzspezifischer Primer (10 mM), 2  $\mu\text{l}$  Plasmid oder PCR-Produkt (ca. 50 bis 100 ng). Das verwendete PCR-Programm bestand aus einem anfänglichen Denaturierungszyklus (95°C, 1 min) und 35 Amplifikationszyklen (95°C, 10 sec; 50°C, 5 sec; 60°C, 4 min). Die PCR-Reaktionen wurden in 96-well PCR-Platten durchgeführt, durch PEG-Fällung gereinigt und in je 25  $\mu\text{l}$  HPLC-reinem Wasser aufgenommen.

### Restriktionsverdau von DNA mit Endonucleasen

Die DNA-Endonucleasen *AluI* und *HpaII* wurden zur Restriktion von PCR-Produkten und Plasmiden nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

### **Agarosegel-Elektrophorese**

DNA- und RNA-Proben wurden in TAE-Agarosegelen mit 1-2% Agarose (Biozym, Oldendorf) bei 90-120 Volt für 30-60 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auswertung der Gele erfolgte an der Gel-Dokumentationsanlage *ImageMaster<sup>®</sup>VDS* (Amersham, Freiburg).

### **Elution von DNA aus Agarosegelen**

Aus präparativen Agarosegelen wurden auf dem UV-Transilluminator IL 350M (Bachofer, Reutlingen, D) DNA-Banden mittels Skalpell ausgeschnitten. Die DNA wurde dann mit dem Wizard<sup>®</sup>SV Gel Kit (Promega, Madison, USA) nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

### **Isolierung von RNA und DNA**

Für die Isolierung von RNA und DNA aus Buchenblättern wurde eine Methode verwendet, die gut für Pflanzen mit hohem Gehalt an Phenolen geeignet ist [148].

Pro Probe wurde 1 ml RNA-Aufschlußpuffer mit 30  $\mu$ l Mercapto-Ethanol gemischt und auf 65°C erwärmt. Je 80 mg unter flüssigem Stickstoff gemörserter Buchenblatt-Homogenat wurden dem Aufschlußpuffer zugegeben und 5 Minuten lang mit dem Vortex-Gerät gut suspendiert. Nach Zugabe von 500  $\mu$ l Chloroform-IAA-Lösung, Mischen, Zugabe von 70  $\mu$ l Nucleon-PytoPure-Resin und erneutem Mischen wurde mittels Zentrifugation (5 min, 20000 g, 4°C) eine erste Trennung von organischer und wäßriger Phase durchgeführt. Der wäßrige Überstand wurde abgenommen, in einem neuen Reaktionsgefäß mit 500  $\mu$ l Chloroform-IAA-Lösung gut gemischt und wieder abzentrifugiert (10 min, 20000 g, 4°C). Die wäßrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und zur Ausfällung der Nukleinsäuren mit einem Volumen Isopropanol versetzt. Nach Inkubation bei RT (10 min) wurde die Nukleinsäure durch Zentrifugation pelletiert (10 min, 20000 g, 4°C), ca. 10 Minuten luftgetrocknet und in 80  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

Für die weitere Analyse der RNA bzw. DNA wurde ein DNase-Verdau mit der DNase RQ1 (Promega, Madison, USA) bzw. ein RNase-Verdau mit RNaseA (usb, Cleveland, USA) nach den Angaben der Hersteller durchgeführt.

### **Aufreinigung von mRNA aus Gesamt-RNA**

Die Aufreinigung von mRNA aus Gesamt-RNA wurde mit dem Oligotex<sup>®</sup> mRNA Midi Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### **Synthese von cDNA durch reverse Transkription**

Für die cDNA-Synthese wurden 5  $\mu$ g Gesamt-RNA auf ein Volumen von 14,5  $\mu$ l verdünnt und zusammen mit je einem  $\mu$ l dNTP (10mM) und oligo-dT(15) Primer (0,5



$\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) für 5 Minuten bei  $65^{\circ}\text{C}$  inkubiert und dann sofort auf Eis gestellt. Nach Zugabe von  $5 \mu\text{l}$  Reaktionspuffer (5x),  $2 \mu\text{l}$  DTT (100 mM) und  $1 \mu\text{l}$  Superscript II wurde der Ansatz für 4 h bei  $42^{\circ}\text{C}$  und danach, zum Abstoppen der Reaktion, für 10 Minuten bei  $70^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

## 2.6 Genexpressionsanalyse mit quantitativer Realtime-PCR

Die quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR) wurde in den Versuchen A und B mit dem Gerät *ABI Prism 7700 Sequence Detector* (Applied Biosystems) und in den Versuchen C und D mit dem Gerät *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems) durchgeführt.

Frisch extrahierte RNA wurde in doppelter Messung photometrisch quantifiziert und für die cDNA-Synthese verwendet, wobei pro Reaktion jeweils  $5 \mu\text{g}$  Gesamt-RNA eingesetzt wurden. Jeder qRT-PCR-Ansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:  $12,5 \mu\text{l}$  Absolute SYBR Green ROX Mix,  $0,5 \mu\text{l}$  genspezifischer Primer 1 ( $10 \mu\text{M}$ ),  $0,5 \mu\text{l}$  genspezifischer Primer 2 ( $10 \mu\text{M}$ ),  $0,5 \mu\text{l}$  cDNA,  $11 \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ . Die zur Genexpressionsanalyse verwendeten Primerpaare und die zugehörigen Nukleotid-Sequenzen sind im Anhang aufgeführt (Tabellen 6.13, S. 220 und 6.2, S. 203). Das PCR-Programm bestand aus je einem Zyklus bei  $50^{\circ}\text{C}$  (2 min) und  $95^{\circ}\text{C}$  (10 min) und 40 Amplifikationszyklen ( $95^{\circ}\text{C}$ , 15 sec;  $60^{\circ}\text{C}$ , 1 min). Vor ihrer Verwendung in der qRT-PCR wurde die Funktionalität aller Primerpaare mittels PCR durch Ermittlung einer Schmelzkurve für die PCR-Produkte validiert.

Durch Auswertung der Fluoreszenzsignale des Detektor-Farbstoffs SYBR Green im Verlauf der PCR-Reaktion mit der '7500 System Software' wurde für jede untersuchte Probe ein CT-Wert ermittelt. Da die Höhe des CT-Wertes direkt mit der in der analysierten Probe ursprünglich vorhandenen Kopienanzahl des untersuchten Gens zusammenhängt, wurden für die Analyse der relativen Genexpression zwischen zwei Proben (A und K) die entsprechenden CT-Werte nach folgender Formel ins Verhältnis gesetzt.

$$\text{Relative Genexpression} = 2^{\Delta\text{CT}(K-A)}$$

Zur Verringerung des Einflusses von Pipettier-Ungenauigkeiten wurden bei der Auswertung von Versuch C zudem die Expression der Zielgene jeweils ins Verhältnis zur Expression des Referenzgens *Fs-26SrRNA* gesetzt.

$$\text{Relative Genexpression} = \frac{2^{\Delta\text{CT}(K_{\text{Zielgen}} - A_{\text{Zielgen}})}}{2^{\Delta\text{CT}(K_{\text{Referenzgen}} - A_{\text{Referenzgen}})}}$$

## 2.7 Erstellung ozonregulierter subtraktiver cDNA-Banken

### 2.7.1 Subtraktive Hybridisierung und Suppressions-PCR

Mit Probenmaterial aus Versuch A wurden zwei cDNA-Banken nach der Methode der subtraktiven Suppressions-Hybridisierung (SSH) [45] hergestellt, die im Folgenden als SSH1 und SSH2 (früh und spät ozonregulierte Gene) bezeichnet werden. Mit der SSH-Methode (Abb. 2.4, S. 39) können jeweils zwei mRNA-Populationen zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene miteinander verglichen werden. Die Probe mit differentiell exprimierten Genen wird dabei als *Tester* und die Referenz-Probe als *Driver* bezeichnet. Zur Durchführung der SSH wurde das *Clontech PCR-Select<sup>TM</sup> cDNA Subtraction Kit* der Firma BD Biosciences Clontech (Palo Alto, USA) verwendet.

### 2.7.2 Erstellung der subtraktiven cDNA-Banken SSH1 und SSH2

Für die subtraktiven cDNA-Banken SSH1 bzw. SSH2 wurde gemörsertes Blattmaterial der Probenzeitpunkte 1 bis 8 (4 h bis 5 d) bzw. 9 bis 15 (7 d bis 30 d) von Behandlung sowie Kontrolle aus Versuch A (2.4.1, S. 31) in gleichen Gewichtsanteilen vereinigt und für die Extraktion von Gesamt-RNA verwendet. Durch den Austausch von *Tester* und *Driver* wurden in beiden cDNA-Banken sowohl ozoninduzierte (SSH1ind und SSH2ind) als auch ozonreprimierte Gene (SSH1rep und SSH2rep) erfaßt.

#### cDNA-Synthese

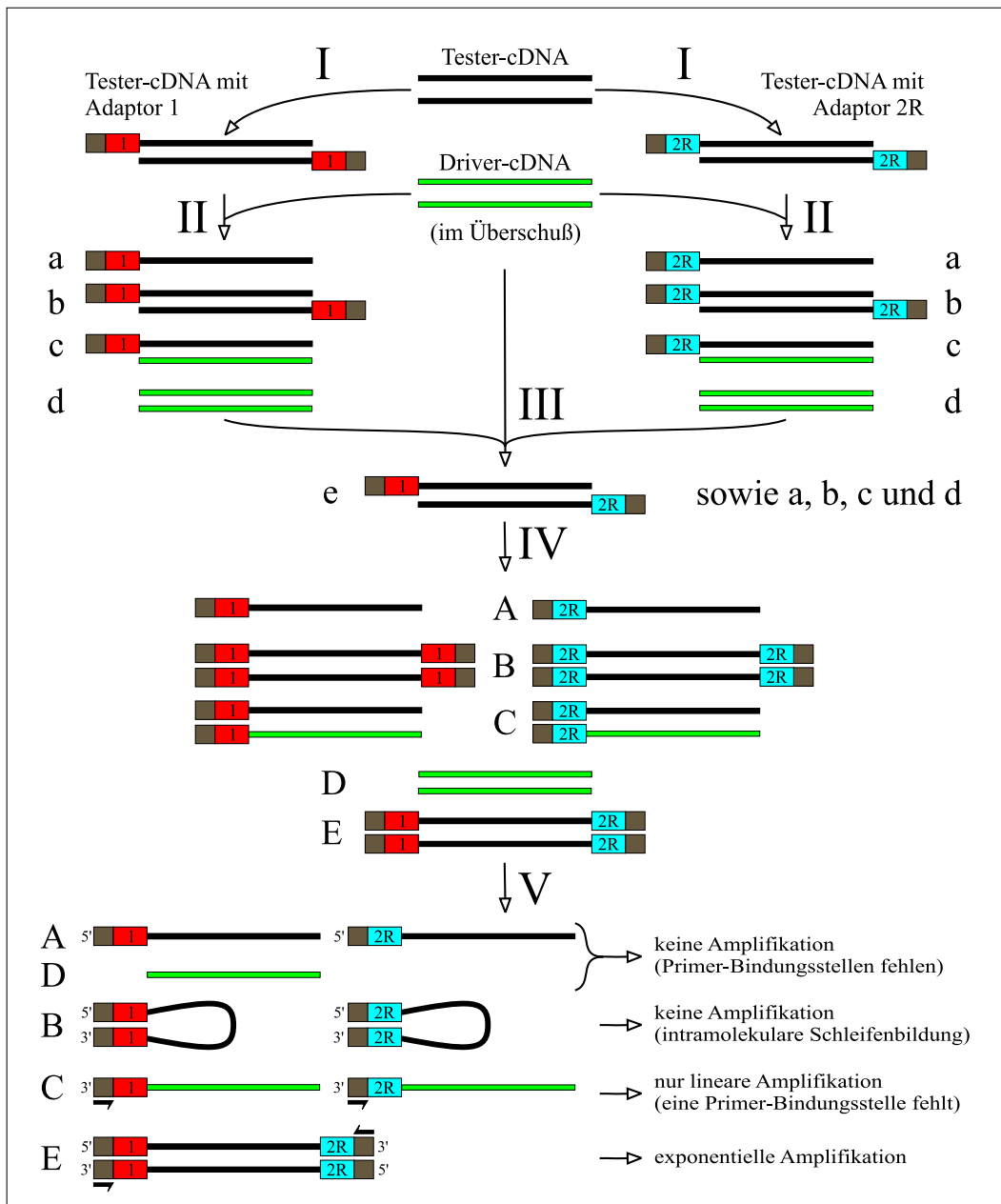
Von O<sub>3</sub>-Behandlung und Kontrolle wurden jeweils 2 mg Gesamt-RNA isoliert. Aus dieser wurde jeweils die mRNA aufgereinigt, von der je 2 µg für die cDNA-Doppelstrang-Synthese nach dem Hersteller-Protokoll verwendet wurden.

#### Vorbereitung der cDNA für die Hybridisierungen

Nach der Restriktion mit der Endonuclease *RsaI* (3 h, 37°C) wurde jeder *Tester* in 2 Aliquots aufgeteilt und entweder mit dem Adaptor 1 oder mit dem Adaptor 2R ligiert.

#### Hybridisierungen zur Anreicherung differentiell exprimierter Gensequenzen

Bei der ersten Hybridisierung wurden diese beiden Ligationen in separaten Reaktionen jeweils mit den entsprechenden *Drivern* (im etwa 100-fachen Überschuß) vereinigt und durch Hitze denaturiert. Beim Abkühlen der Reaktionen bildeten sich die Konstrukte vom Typ a, b, c und d (Abb. 2.4, S. 39). Auf diese Weise wurde in Typ a eine Normalisierung häufiger und seltener Genfragmente erreicht, da aufgrund der Reaktionskinetik häufig vorkommende Gensequenzen schneller wieder zu Doppelsträngen



**Abbildung 2.4:** Ablauf bei der Erstellung einer subtraktiven cDNA-Bank. I: Adaptor-Ligation (Adaptor 1 und 2R werden an zwei Aliquots des *Testers* gebunden), II: Hybridisierung 1 (Vereinigung von *Tester* und *Driver*, Denaturierung bei 68°C, Bildung der Hybridisierungs-Produkte a, b, c und d), III: Hybridisierung 2 (Vereinigung der Produkte aus beiden Reaktionen der ersten Hybridisierung. Erneute Zugabe von *Driver*. Bildung der Hybridisierungs-Produkte a, b, c, d und e), IV: Komplementäre Ergänzung der Adaptorsequenzen (Inkubation bei 75°C. Bildung der Konstrukte A, B, C, D und E), V: Suppressions-PCR (nur Hybride vom Typ E werden exponentiell amplifiziert).

vom Typ b, c oder d hybridisieren. Zusätzlich dazu wurden differentiell exprimierte Gene in Typ a angereichert, da ubiquitär exprimierte Gene durch den Überschuß an *Driver*-cDNA vorrangig Konstrukte vom Typ c bildeten. Im zweiten Hybridisierungsschritt wurden die beiden Teilreaktionen der ersten Hybridisierung kombiniert, wodurch sich aus dem Typ a der beiden Reaktionen ein Hybrid vom Typ e bilden konnte (Abb. 2.4, S. 39). Nach einer weiteren Zugabe von *Driver*-cDNA wurden die überhängenden Enden der doppelsträngigen Hybridisierungs-Konstrukte mit DNA-Polymerase komplementär ergänzt.

### Suppressions-PCR Reaktionen

In einer ersten PCR mit Adaptor 1- und Adaptor 2R-spezifischen Primern wurden nun ausschließlich die Konstrukte vom Typ E exponentiell amplifiziert, da nur diese beide Primer-Anlagerungsstellen besitzen.

Die Produkte einer zweiten PCR mit *nested* Primern wurden schließlich in den Vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy inkloniert. Diese Ligationsprodukte wurden dann durch thermische Transformation in hochkompetente *E. coli*-Zellen vom Stamm MJ109 (Promega) eingeführt. Nach der Transformation wurden regenerierte Einzelkolonien vom Selektivnährboden in 96-well Mikrotiterplatten mit 100  $\mu$ l Glycerin-LB-Medium je Kavität überführt, über Nacht bei 37°C ohne Schütteln kultiviert und dann bei -80°C eingefroren. Für die cDNA-Banken SSH1 und SSH2 wurden jeweils 5 Mikrotiterplatten mit ozoninduzierten cDNA-Klonen und zwei bzw. eine Platte mit ozonreprimierten cDNA-Klonen angelegt. Die Benennung der cDNA-Klone aus SSH1 und SSH2 erfolgte nach ihrer Position in diesen Mikrotiterplatten, so daß beispielsweise der cDNA-Klon aus der cDNA-Bank SSH2, der sich auf der fünften Mikrotiterplatte an Position C07 befand, mit SSH2P5C07 bezeichnet wurde.

### 2.7.3 Sequenzierung und Klassifikation der cDNA-Klone

Die Klone der beiden subtraktiven Banken wurden unter Verwendung des Primers SSHnP1 sequenziert und mittels 'Blastn' (<http://blast.cbr.nrc.ca/>, [1]) auf Homologien mit Datenbankeinträgen bekannter Nukleotid-Sequenzen untersucht. Anhand des Blast-Ergebnisses mit der höchsten Homologie wurden die SSH cDNA-Klone beider subtraktiven cDNA-Banken gemäß dem Klassifizierungsschema des 'EU *Arabidopsis* Genom Projekts' [68] in 12 funktionelle Gruppen eingeteilt.

## 2.8 DNA-Chip Analysen

Um den Erfolg der subtraktiven Suppressions-Hybridisierungen bei der Erstellung der cDNA-Banken zu überprüfen, wurden die Klone der beiden subtraktiven Banken auf einem DNA-Chip zusammengestellt. Die Methode der Fluoreszenzhybridisierung wurde hierbei in Anlehnung an das Protokoll von Huang et al. [130] durchgeführt.

## 2.8.1 Herstellung der DNA-Chips

### Amplifikation der cDNA-Klone mittels PCR

Je ein Mikroliter der *E. coli*-Stammkulturen der SSH cDNA-Klone wurden zur Amplifikation der inklonierten cDNA in einer 125  $\mu$ l PCR-Reaktion zusammen mit folgenden weiteren Bestandteilen eingesetzt: 12,5  $\mu$ l PCR Puffer (10x), 5  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2,5  $\mu$ l dNTP (10 mM), 1,25  $\mu$ l Primer SSHnP1 (10  $\mu$ M), 1,25  $\mu$ l Primer SSHnP2R (10  $\mu$ M), 0,3  $\mu$ l *Taq*-Polmerase (0,5u/ $\mu$ l), 102,2  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Das verwendete PCR-Programm bestand aus einem Denaturierungszyklus (94°C, 3 min), 40 Amplifikationszyklen (94°C, 30 sec; 50°C, 45 sec; 70°C, 60 sec) und einer abschließenden Inkubation bei 72°C für 5 Minuten.

### Aufreinigung der PCR-Produkte und Aufnahmen im Spot-Puffer

Um Bakterien-Zellbestandteile aus den PCR-Reaktionen zu entfernen wurden diese zunächst bei 4000 g für 15 Minuten zentrifugiert. Vom Überstand wurden vorsichtig je 100  $\mu$ l abgenommen und mit Isopropanol gefällt. Zur Aufnahme in Spot-Puffer wurden die DNA-Pellets in jeweils 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O gelöst und dann mit je 10  $\mu$ l sterilfiltriertem 2xSpot-Puffer gemischt.

### Übertragung der PCR-Produkte auf Glas-Objektträger

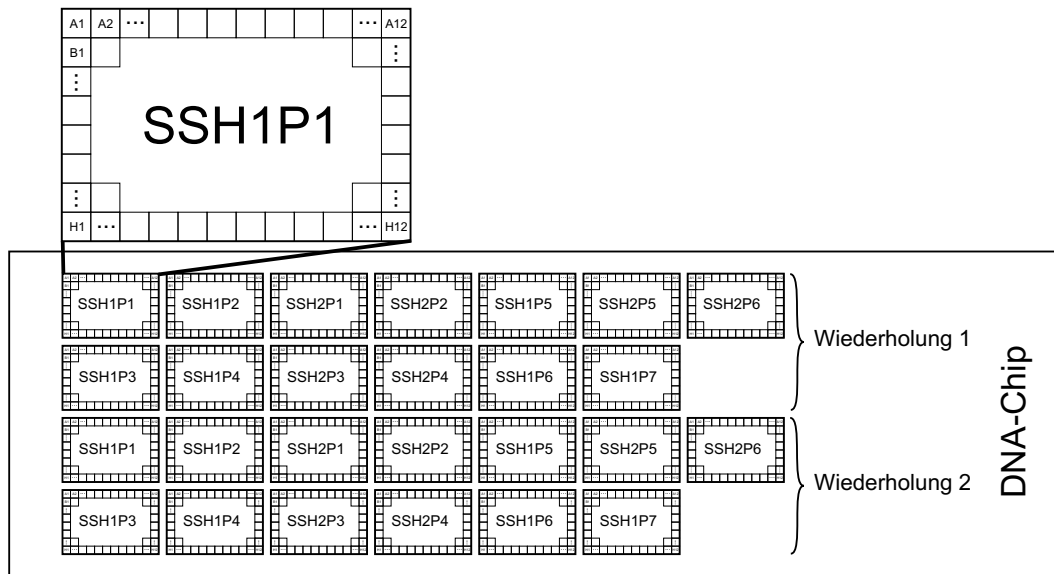
Die gereinigten PCR-Produkte wurden zunächst in Platten mit je 384 Kavitäten überführt. Folgende PCR-Platten wurden in diesen 'Spotter'-Platten A, B, C und D zusammengefaßt.

- Spotter-Platte A: SSH1\_P1, SSH1\_P2, SSH1\_P3, SSH1\_P4
- Spotter-Platte B: SSH2\_P1, SSH2\_P2, SSH2\_P3, SSH2\_P4
- Spotter-Platte C: SSH1\_P5, SSH1\_P6, SSH1\_P7, SSH2\_P5
- Spotter-Platte D: SSH2\_P6

Mithilfe des Spotters *Microgrid II* (Biorobotics, Cambridge, UK) und einem Werkzeug mit 4 Edelstahl-Hohlnadeln (Microspot 2500 microarray pins, BioRobotics, Cambridge, UK) wurden die DNA-Lösungen gemäß Abbildung 2.5, S. 42 in zweifacher Wiederholung auf beschichtete Glas-Objektträger (k2630, Genetix, Hampshire, UK) gedruckt. Durch die Aldehyd-Beschichtung wurden die aufgetragenen Nukleinsäuren kovalent an die Oberfläche gebunden.

### Vorbereiten der DNA-Chips für die Hybridisierung

Die bedruckten Objektträger wurden etwa 2 Tage bei Raumtemperatur gelagert und dann von ungebundener DNA und Spot-Puffer gereinigt. Für die im Folgenden aufgeführten Wasch- und Inkubationsschritte wurden die Objektträger, soweit nicht anders



**Abbildung 2.5:** Anordnung der cDNA-Klone auf den DNA-Chips. P1-P7 = Mikrotiterplatte 1-7 (2.7.2, S. 38).

vermerkt, jeweils in Falcon-Röhrchen (50 ml) unter ständigem Schütteln in ca. 35 ml der angegebenen Lösungen inkubiert.

Die bedruckten Objektträger wurden zunächst bei Raumtemperatur 2 mal für 2 Minuten mit SDS-Lösung (0,1%, w/v) und daraufhin 2 mal für 2 Minuten mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Dann wurden sie 5 Minuten lang in einer Glaswanne in frisch angesetzter Na-Borhydrid-Lösung inkubiert. In einer neuen Glaswanne wurden die Objektträger dann 3 Minuten lang in 95-100°C heißem ddH<sub>2</sub>O geschwenkt und schließlich wieder bei Raumtemperatur 2 mal für eine Minute in SDS-Lösung (0,1%, w/v) und 2 mal für eine Minute in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Um ein schlierenfreies Abtrocknen der Objektträger zu gewährleisten, wurden diese kurz in Ethanol getaucht und dann mit Stickstoff aus der Druckflasche trockengeblasen. In diesem Zustand wurden die erstellten DNA-Chips bis zur Hybridisierung gelagert.

## 2.8.2 Hybridisierung der DNA-Chips mit cDNA

### Erstellung und Aufreinigung der cDNA-Sonden für die Hybridisierung

Für die Herstellung der cDNA-Sonden wurde zunächst Gesamt-RNA aus ozonbehandelten und unbehandelten Pflanzen gewonnen. Nach Quantifizierung der RNA am Photometer wurden je Probe 30 µg Gesamt-RNA in 14,5 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen, mit je 4 µl oligo-dT(15) Primer gemischt und für 10 Minuten bei 70°C im PCR-Block inkubiert. Die Reaktionen wurden 2 Minuten auf Eis abgekühlt und dann mit 11,5 µl cDNA-Synthese Mastermix (6 µl first strand buffer (5x), 3 µl 0,1 M DTT, 0,6 µl

Aminoallyl-dNTP-Mix (50x), 2  $\mu\text{l}$  SuperScript II (200 u/ $\mu\text{l}$ ) gemischt. Die cDNA-Synthese erfolgte über Nacht bei 42°C im PCR-Block. Der Aminoallyl-dNTP-Mix (50x) setzte sich aus je 5 Teilen 100 mM dATP, dGTP und dCTP, 3 Teilen dTTP und 2 Teilen Aminoallyl-dUTP zusammen. Zum Hydrolysieren der RNA wurden die cDNA-Produkte mit jeweils 10  $\mu\text{l}$  1 M NaOH und 10  $\mu\text{l}$  0,5 M EDTA versetzt, gut gemischt und bei 65°C für 15 Minuten inkubiert. Danach wurde der pH-Wert durch Zugabe von je 10  $\mu\text{l}$  1 M HCl wieder abgesenkt.

Die Aufreinigung der cDNA wurde mit dem Qiaquick PCR-Purification-Kit (Qiagen, Hilden, D) durchgeführt. Da allerdings das in Wasch- und Elutions-Puffer dieses Kits enthaltene Reagenz Tris bei der Kopplung der Farbstoffe an die Aminoallyl-markierte cDNA stören würde, wurden beim ersten Aufreinigungsschritt entsprechende Puffer ohne Tris verwendet (Phosphat-Waschpuffer, Phosphat-Elutionspuffer). Abgesehen von der Verwendung dieser Puffer erfolgte die Aufreinigung der einzelsträngigen cDNA nach dem Herstellerprotokoll. Das Eluat (60  $\mu\text{l}$ ) wurde dann im Rotationsverdampfer (RE 111, Büchi, Flavil, CH) für ca. 40 Minuten vollständig eingedampft.

Die cDNA aus den ozonbehandelten und den nicht behandelten Pflanzen wurden mit jeweils einem der Fluoreszenz-Farbstoffe Cy<sup>TM</sup>3 und Cy<sup>TM</sup>5 markiert. Da die Intensität der Markierung auch abhängig vom gewählten Farbstoff schwanken kann, wurde ein sogenannter 'Dye-swap' durchgeführt. Hierbei wird die für eine erste Hybridisierung gewählte Zuordnung von cDNA und Farbstoff in einer zweiten Hybridisierung ausgetauscht. Für die Markierungsreaktion wurden die cDNA-Pellets in je 4,5  $\mu\text{l}$  0,1 M Natriumcarbonat-Puffer resuspendiert und mit 4,5  $\mu\text{l}$  des jeweiligen Farbstoffs nach gründlichem Mischen für 3 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurden die cDNA-Sonden mit je 35  $\mu\text{l}$  100 mM Natriumacetat (pH 5,2) gemischt, mit dem Qiaquick PCR-Purification-Kit gemäß dem Herstellerprotokoll aufgereinigt und durch zweifache Elution (s.o.) in 60  $\mu\text{l}$  Elutionspuffer aufgenommen.

### Prähybridisierung und Hybridisierung

Für jeden Hybridisierungs-Ansatz wurden die jeweils unterschiedlich markierten cDNA-Sonden von Kontrolle und Behandlung vereinigt und im Rotationsverdampfer ca. 60 Minuten lang eingedampft. Die gemäß 2.8.1, S. 41 hergestellten DNA-Chips wurden zur Prähybridisierung in die auf 42°C vorgewärmten Hybridisierungskammern (VersArray<sup>TM</sup>, Biorad, Hercules, USA) gelegt. Dann wurden je 60  $\mu\text{l}$  ebenfalls auf 42°C vorgewärmte Prähybridisierungslösung auf die DNA-Chips gegeben und durch Auflegen eines Deckgläschens auf dem gesamten bedruckten Bereich des DNA-Chips blasenfrei verteilt. Zur Prähybridisierung wurden die geschlossenen Hybridisierungskammern für 60 Minuten bei 42°C inkubiert. Die Prähybridisierungslösung wurde daraufhin, nach dem vorsichtigen Ablösen des aufliegenden Deckglases, mit ddH<sub>2</sub>O vollständig entfernt.

Die einrotierten Sonden wurden in 60  $\mu\text{l}$  Hybridisierungspuffer resuspendiert, für 3 Minuten im PCR-Gerät bei 95°C denaturiert und bis zur Verwendung im Dunkeln auf Eis gelagert. Nach dem Erwärmen der prähybridisierten DNA-Chips auf 42°C wur-

den die denaturierten Sonden auf diesen mittels eines Deckglases blasenfrei verteilt. Die Hybridisierungskammern wurden dicht verschlossen und unter Lichtabschluß bei 42°C für 16 bis 20 h im Hybridisierungssofen inkubiert.

Nach der Hybridisierung wurde zunächst das Deckglas in 42°C warmem DNA-Chip-Waschpuffer I (1xSSC, 0,1% SDS) entfernt. Danach folgten unter ständigem Schwenken je zwei weitere Waschschrte mit DNA-Chip-Waschpuffer I (je 2 min), DNA-Chip-Waschpuffer II (je 1 min) und ddH<sub>2</sub>O (je 2 min). Schließlich wurden die DNA-Chips mittels Stickstoff aus der Druckluftflasche getrocknet und bis zum Scannen im Dunkeln aufbewahrt.

### Scannen und Auswertung der DNA-Chip-Hybridisierungen

Zum Einscannen der DNA-Chips wurde der GenePix4000A-Scanner mit der zugehörigen Software GenepixPro6.0 (Axon Instruments, Union City, USA) verwendet. Für jeden Punkt auf dem DNA-Chip wurden hierbei nach Anregung durch entsprechende Laser die Intensitäten der beiden verwendeten Fluoreszenz-Farbstoffe ermittelt. Das Verhältnis dieser Intensitäten für ein untersuchtes Gen entspricht dem quantitativen cDNA-Verhältnis aus Kontrolle und Behandlung und damit dem behandlungsabhängigen Induktions- bzw. Repressionsfaktor. Um den Einfluß einer besseren Markierungseffizienz eines der beiden Farbstoffe zu reduzieren, wurden einerseits die Intensitäten der Laser aufeinander abgestimmt und andererseits nach dem Scannen eine Normalisierung der Daten bezüglich des jeweiligen Fluoreszenz-Hintergrunds vorgenommen. Da jede cDNA zweifach auf den DNA-Chip aufgetragen und für beide Hybridisierungsexperimente ein 'Dye-swap' (2.8.2, S. 42) durchgeführt wurde, ergaben sich für jedes Gen auf dem DNA-Chip vier Meßwerte.

## 2.9 Klonierungen mit degenerierten Primerpaaren

Zur Erstellung der degenerierten Primerpaare wurden bereits publizierte cDNA-Sequenzen der gesuchten Enzyme aus anderen Pflanzen mittels dem Programm MULTALIN [213] verglichen und auf konservierte Bereiche untersucht. Aus diesen Bereichen wurden dann, zur Amplifikation des jeweiligen Gens aus der Buche, degenerierte Primer abgeleitet. Tabelle 2.6, S. 45 gibt einen Überblick über alle verwendeten degenerierten Primer und die Akzessionsnummern aller zum Homologievergleich herangezogenen cDNA-Sequenzen. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt (6.2, S. 203).

Für jedes untersuchte Gen wurden 8 identische PCR-Reaktionen (25 µl) mit je 2,5 µl Reaktionspuffer (10x), 1 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,5 µl dNTP (je 10 mM), 0,5 µl von jedem der beiden degenerierten Primer (10 µM), 0,2 µl cDNA (von 3-jährigen Buchen), 0,1 µl Taq-Polymerase und 19,7 µl ddH<sub>2</sub>O angesetzt. In der darauffolgenden PCR-Reaktion (Denaturierung: 94°C, 3 min; 35 Amplifikationszyklen: 30 sec 94°C, 50 sec 45-60°C, 1 min 72°C) wurde während der Amplifikation ein Temperatur-Gradient



**Tabelle 2.6:** Klonierungen mit degenerierten Primern. Angegeben sind die Bezeichnungen der verwendeten Primerpaare und die Akzessionsnummern (AccNr) der Nukleotidsequenzen, die zur Ableitung der Primersequenzen verwendet wurden. Die Abkürzungen der Genbezeichnungen sind unter 6.1, S. 202 im Anhang erläutert.

Gen	Primer f	Primer r	AccNr homologer cDNA-Sequenzen
<i>Fs-ACS2</i>	ACS-d-f	ACS-d-r	AY120898, AF386518, AB034993, AB033503
<i>Fs-CM</i>	CM-d-f	CM-d-r	NM_113844, AJ004916, AY103806, AP003239
<i>Fs-CS</i>	CS-d-f	CS-d-r	AF457954, AX60544, NM_103779, AZ21796
<i>Fs-DAHPS</i>	DAHPS-d-f	DAHPS-d-r	M74819, M95201, Z21792, Y15113
<i>Fs-DHQD/SD</i>	DHQD/SD-d-f	DHQD/SD-d-r	AF033194, L32794, Z34521, NM_111510
<i>Fs-DHQS</i>	DHQS-d-f	DHQS-d-r	L46847, AY142020, AY104307,
<i>Fs-EPSPS</i>	EPSPS-d-f	EPSPS-d-r	AF440389, X51475, NM_103780, M21071
<i>Fs-rbcS</i>	rbcS-d-f	rbcS-d-r	AB006080, Y07779, L24497, X65494
<i>Fs-SK</i>	SK-d-f	SK-d-r	NM_127763, NM_120114, X63560, AK117791

verwendet, um die Anlagerung der Primer zu optimieren. Die PCR Produkte wurden wie unter 2.5, S. 34 beschrieben inkloniert und sequenziert.

### Klonierung von Isoformen der *DAHPS*

Basierend auf einem Sequenzvergleich der bekannten *DAHPS*-Isoenzyme von *Arabidopsis thaliana* und einem putativen cDNA-Fragment der *DAHPS* aus der Buche, das mit den Primern *DAHPS*-d-f und *DAHPS*-d-r amplifiziert worden war, wurden neue degenerierte Primer (*DAHPS*Iso123-dF, *DAHPS*Iso123-dR) entworfen, um weitere *DAHPS*-Isoformen der Buche zu erhalten. Nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte in einem 1,5%-igen Agarose-Gel wurden diese aus dem Gel eluiert, in den Vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy inkloniert und zur Transformation von *E. coli* verwendet. Aus 24 regenerierten Bakterienkolonien wurde Plasmid-DNA isoliert und nach einem Restriktionsverdau mit den Endonukleasen *AluI* oder *HpaII* (jeweils 1 h, 37°C) in einem 1,5%-igen Agarose-Gel aufgetrennt. Plasmide mit unterschiedlichem Restriktionsmuster wurden sequenziert.

## 2.10 RACE-Methoden

Zur Durchführung der RACE (rapid amplification of cDNA ends) wurde das GeneRacer<sup>TM</sup>-Kit von Invitrogen (Carlsbad, USA) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Hierbei handelt es sich um die sogenannte RLM-RACE (RNA-Ligase mediated RACE), bei der vor den PCR-Reaktionen die CAP-Struktur am 5'-Ende intakter mRNA-Moleküle enzymatisch durch ein RNA-Oligonukleotid ersetzt wird (Abb. 2.6, S. 47). Dieses RNA-Oligonukleotid dient am 5' Ende, wie der poly-A<sup>+</sup>-Schwanz

am mRNA-3'-Ende, als Primer-Anlagerungsstelle zur Amplifikation der unbekanntes cDNA-Enden bei den PCR Reaktionen der RACE.

### Erstellung der PCR-Vorlage

Aus den Blättern 3-jähriger Buchen wurden 500 ng mRNA isoliert und für die Ligations-Reaktion mit dem RNA-Oligonukleotid verwendet. Die gemäß 2.5, S. 36 transkribierte cDNA diente als Vorlage für die jeweils erste PCR-Reaktion von 3'-RACE und 5'-RACE.

### Erste PCR der 3'- und 5'-RACE

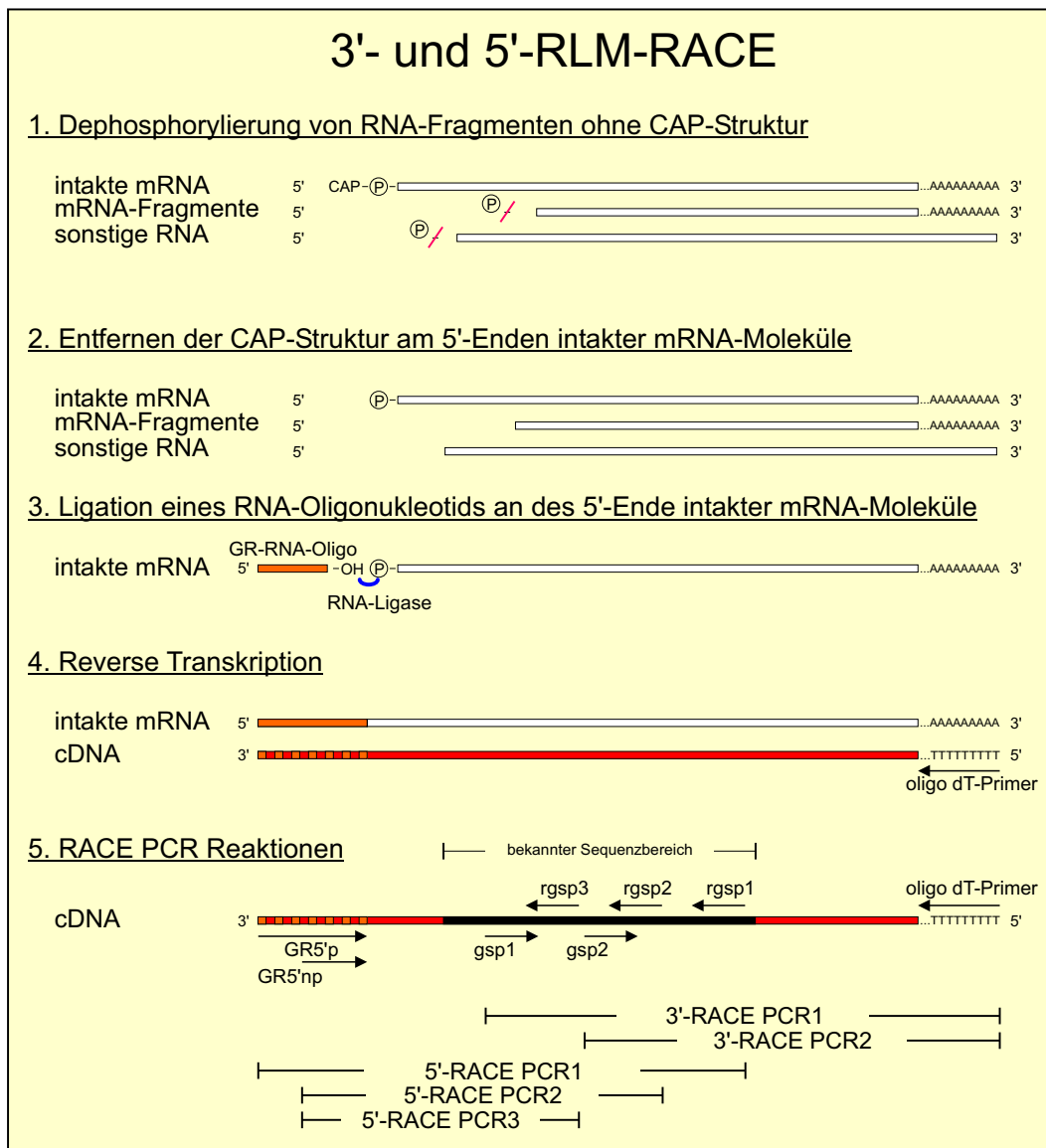
Die für jedes der untersuchten Gene durchgeführte erste PCR-Reaktion der 3'-RACE (3R-PCR1) setzte sich aus jeweils 5  $\mu$ l PCR Puffer (10x), 2  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1  $\mu$ l dNTP (je 10 mM), 1,5  $\mu$ l X-3R-gsp1 (10  $\mu$ M), 4,5  $\mu$ l oligo-dT(15) (10  $\mu$ M), 1  $\mu$ l cDNA, 34,5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O und 0,5  $\mu$ l *Taq*-Polymerase (Invitrogen) zusammen.

Bei den entsprechenden Reaktionsansätzen der ersten 5'-RACE-PCR (5R-PCR1) wurden anstelle der Primer X-3R-gsp1 und oligo-dT(15) die Primer X-5R-rgsp und GR5'p verwendet. Das 'X' in der Primer-Bezeichnung steht dabei für die jeweilige Abkürzung des untersuchten Gens (z.B. *DAHPS*). Die Sequenzen aller verwendeten RACE-Primer finden sich im Anhang unter Tabelle 6.2, S. 203. Folgendes Temperaturschema galt für 3R-PCR1 und 5R-PCR1: 1 Zyklus: 94°C (2 min); 5 Zyklen: 94°C (30 sec), 70°C (45 sec), 72°C (60 sec); 5 Zyklen: 94°C (30 sec), 65°C (45 sec), 72°C (60 sec); 20 Zyklen: 94°C (30 sec), 60°C (45 sec), 72°C (60 sec); 1 Zyklus 72°C (10 min).

### Zweite PCR der 3'- und 5'-RACE

Die Produkte der Reaktionen von 3R-PCR1 und 5R-PCR1 wurden mit dem Wizard<sup>®</sup>SV Gel Kit (Promega, Madison, USA) aufgereinigt und als Vorlage für eine zweite PCR mit den jeweiligen genspezifischen Primern X-3R-gsp2 bzw. X-5R-rgsp2 für 3'-RACE bzw. 5'-RACE verwendet (3R-PCR2 und 5R-PCR2). Die PCR-Reaktionen für 3'-RACE bzw. 5'-RACE setzten sich aus 5  $\mu$ l PCR Puffer (10x), 2  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1  $\mu$ l dNTP (je 10 mM), 1  $\mu$ l X-3R-gsp2 (10  $\mu$ M) bzw. 1  $\mu$ l X-5R-rgsp2, 1  $\mu$ l odT-Anker (10  $\mu$ M) bzw. 1  $\mu$ l GR5'np, 1  $\mu$ l gereinigtes PCR-Produkt, 39,7  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O und 0,3  $\mu$ l *Taq*-Polymerase (Invitrogen) zusammen.

Folgendes Temperaturschema galt für 3R-PCR2 und 5R-PCR2: 1 Zyklus: 94°C (2 min); 25 Zyklen: 94°C (30 sec), 65°C (30 sec), 72°C (2 min); 1 Zyklus 68°C (10 min). Im Falle der 5'-RACE wurden die PCR-Produkte aus 5R-PCR2 erneut aufgereinigt und wiederum als Vorlage für eine dritte PCR verwendet (5R-PCR3). Bis auf die Verwendung von neuen genspezifischen Primern (X-5R-rgsp) entsprachen Zusammensetzung und Temperaturschema der zweiten PCR (5R-PCR2).



**Abbildung 2.6:** Ablauf der RLM-RACE (RNA-Ligase mediated rapid amplification of cDNA ends) gemäß dem Generacer-Kit (Invitrogen). GR = Generacer, p = Primer, np = nested Primer, gsp = genspezifischer Primer, rgsp = rückwärts genspezifischer Primer.

Nach jeder PCR wurden zwei Mikroliter der entsprechenden RACE-PCR-Reaktion in einem 1,5%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf DNA-Fragmente von erwarteter Größe hin untersucht. DNA-Fragmente aus 3R-PCR2 und 5R-PCR3 wurden mithilfe des Wizard<sup>®</sup>SV Gel Kits aus den Agarose-Gelen eluiert, in den Vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy inkloniert und sequenziert. Die Position der genspezifischen Primer sowie der Ablauf der RACE-Methode sind in Abbildung 2.6 schematisch zusammengefaßt.

## 2.11 Allgemeine Methoden der Proteinbiochemie

### 2.11.1 Isolierung löslicher Proteine aus Buchenblättern

Die Isolierung löslicher Proteine aus Buchenblättern wurde nach einer von Liegl [177] entwickelten Methode durchgeführt. Dazu wurden je 80 mg unter flüssigem Stickstoff fein gemahlene Blattmaterial mit 1 ml Borat-Extraktionspuffer versetzt und gut gemischt. Die Suspension wurde auf Eis stehend einer Ultraschallbehandlung mit dem Gerät *Sonifier cell disruptor B15* (Branson, Danbury, USA) unterzogen (1 min, output level 2) und danach abzentrifugiert (5 min, 15000 g, 4°C). Durch wiederholtes Zentrifugieren unter diesen Bedingungen wurde ein klarer Überstand gewonnen.

### 2.11.2 Protein-Quantifizierung mittels Bradford-Reagenz

Proteinextrakte aus Bakterien und Blattmaterial wurden nach Bradford [29] quantifiziert. Die Messungen wurden in Mikrotiterplatten mit dem 'Thermomax microplate reader' (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) durchgeführt. Als Eichkurve wurden je 10  $\mu\text{l}$  einer Verdünnungsreihe von BSA (100 - 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) in dreifacher Wiederholung in der Mikrotiterplatte vorgelegt. Je 10  $\mu\text{l}$  der Proteinproben wurden unverdünnt, 1:2 und 1:4 verdünnt ebenfalls in dreifacher Wiederholung quantifiziert. Zu den vorgelegten 10  $\mu\text{l}$  Probe bzw. Protein-Standard wurden 200  $\mu\text{l}$  Bradford-Lösung gegeben und vor der Messung 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

### 2.11.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Größenauftrennung von Proteinextrakten wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) verwendet. Die 0,75 mm, 1 mm und 1,5 mm dicken Gele wurden in der *Mighty small Dual-Gel-Caster* Apparatur der Firma Amersham (Freiburg, D) nach Angaben des Herstellers angefertigt.

Auspolymerisierte SDS-Polyacrylamid-Gele wurden in der Elektrophorese-Vorrichtung 'Hoefer<sup>TM</sup> SE250' mit PAGE-Puffer überschichtet, mit den im Verhältnis 1:1 in SDS-Gel-Ladepuffer (2x) aufgenommenen Proteinproben und einem Protein-Größenstandard beladen und während der elektrophoretischen Auftrennung (50 mA, 70-90 min) durch im Gerät zirkulierendes eiskaltes Wasser gekühlt.

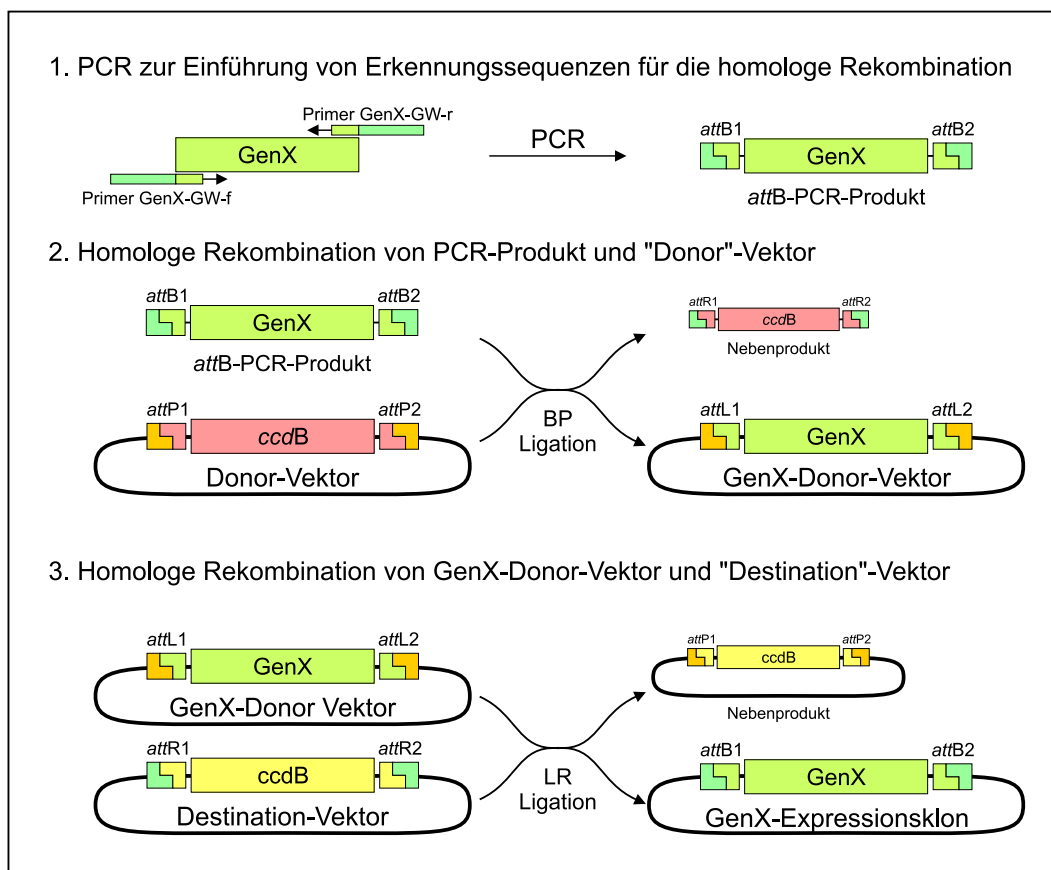
### 2.11.4 Färben und Auswertung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Um die Größenauftrennung sichtbar zu machen wurden die Gele nach der Elektrophorese für 45 Minuten in Coomassieblau-Färbelösung inkubiert und anschließend in Entfärbelösung von ungebundenem Farbstoff gereinigt (45 min). Die Auswertung der gefärbten Gele erfolgte an der Gel-Dokumentationsanlage *ImageMaster<sup>®</sup>VDS* (Amersham). PVDF-Membranen wurden mit einem HP Scanjet 3970 (Hewlett packard, Palo Alto, USA) eingescannt.

## 2.12 Nachweis von Enzymen des Shikimatstoffwechsels

### 2.12.1 Herstellung der Expressionskonstrukte

Für die heterologe Expression der klonierten Gene aus dem Shikimatstoffwechsel der Buche wurde das Gateway<sup>TM</sup>-System der Firma Invitrogen (Carlsbad, USA) verwendet. Die Expressions-Konstrukte wurden hierbei durch homologe Rekombination erstellt.



**Abbildung 2.7:** Herstellung von Expressionsklonen mit dem Gateway<sup>TM</sup>-System. Schritt 1: Amplifikation der vollständigen kodierenden cDNA-Sequenz mit *Pfu*-DNA-Polymerase und Einführung der für die homologe Rekombination notwendigen Sequenzbereiche in das PCR-Produkt. Schritt 2: Übertragung der kodierenden Sequenz in einen 'Donor'-Vektor. Schritt 3: Erstellung des Expressionsklons durch Übertragung der kodierenden Sequenz vom 'Donor'-Vektor zu einem 'Destination'-Vektor.

Zunächst wurden die durch PCR mit degenerierten Primern und RACE-Methoden gefundenen kodierenden Sequenzbereiche aller untersuchten Gene aus dem Shikimat-

stoffwechsel (*Fs-DAHPS3*, *Fs-DHQS*, *Fs-DHQD/SD*, *Fs-SK*, *Fs-EPSPS*, *Fs-CS*, *Fs-CM*) ausgehend von cDNA mit *Pfu*-Polymerase und für jedes Gen spezifischen Primerpaaren mittels PCR amplifiziert. Die PCR-Reaktionen bestanden aus je 5  $\mu$ l Reaktionspuffer (10x), 1  $\mu$ l dNTP (je 10mM), 1  $\mu$ l Primer 1 (10  $\mu$ M), 1  $\mu$ l Primer 2 (10  $\mu$ M), 0,5  $\mu$ l cDNA, 0,5  $\mu$ l Pfu DNA Polymerase (Promega) und 41  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O. Die genspezifischen Primerpaare (*DAHPS3-GW-f*, *DAHPS3-GW-r*; *DHQS-GW-f*, *DHQS-GW-r*; *DHQD/SD-GW-f*, *DHQD/SD-GW-r*; *SK-GW-f*, *SK-GW-r*; *EPSPS-GW-f*, *EPSPS-GW-r*; *CS-GW-f*, *CS-GW-r*; *CM-GW-f*, *CM-GW-r*) wurden nach Angaben des Herstellerprotokolls so entworfen, daß sie jeweils am 5'-Ende eine Erkennungssequenz für die homologe Rekombination aufwiesen. Das PCR-Programm setzte sich aus einem Denaturierungszyklus (94°C, 3 min), 35 Amplifikationszyklen (94°C, 30 sec; 55°C, 45 sec; 72°C, 3 min) und einer abschließenden Inkubation bei 72°C (10 min) zusammen.

In einer ersten Rekombinations-Reaktion (BP-Ligation) wurden die PCR-Produkte in den Vektor pDONR<sup>TM</sup>221 integriert. Die Expressionskonstrukte wurden dann durch eine zweite Rekombination (LR-Ligation) der jeweiligen pDONR<sup>TM</sup>221-Konstrukte mit dem Gateway<sup>TM</sup>-Expressions-Plasmid pDEST<sup>TM</sup>15 hergestellt. Dieses Plasmid wurde gewählt, da es die heterologe Expression der untersuchten Proteine in Bakterien als GST-Fusionsprotein ermöglicht, was deren Aufreinigung und den Nachweis der erfolgreichen Expression erleichtert. Abbildung 2.7, S. 49 zeigt schematisch das Vorgehen bei der Erstellung der Expressionskonstrukte.

## 2.12.2 Heterologe Proteinexpression

### Heterologe Proteinexpression in *E. coli*

Die Expressionskonstrukte für GST-DAHPS3 und GST-DHQD/SD wurden für die Expressionsversuche in kompetente Zellen des *E. coli*-Stamms BL21 (DE3) eingeführt. Dieser Stamm gewährleistet eine hohe Proteinproduktion, die durch Zugabe von IPTG induziert werden kann.

Für die heterologe Expression der Enzyme DAHPS3 und DHQD/SD wurden jeweils 5 ml LB-Medium (+ 80  $\mu$ g /ml Ampicillin) mit einer Einzelkolonie der mit dem entsprechenden Expressionskonstrukt transformierten BL21(DE3)-Zellen angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag wurden diese Flüssigkulturen dann im Verhältnis 1:100 mit frischem LB-Medium versetzt und unter Schütteln bei 37°C bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) von 0,6 kultiviert. Nach Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,5 bis 1,5 mM) zur Induktion der Protein-Synthese wurden die Kulturen für weitere 3 Stunden bei 37°C im Schüttler inkubiert. Ein Aliquot jeder Expressions-Kultur wurde parallel dazu als Kontrolle ohne Zugabe von IPTG kultiviert. Die Bakterienkulturen wurden danach abzentrifugiert (10 min, 3000 g, 4°C) und entweder in Bakterien-Aufschlußpuffer resuspendiert oder als Pellets bei -80°C aufbewahrt.

Zur Überprüfung der heterologen Expression wurde jeweils ein kleiner Teil des Bakterienpellets in PBS-Puffer aufgenommen. Von jeder Probe und den nicht in-

duzierten Kontrollen wurden 10  $\mu$ l mit 10  $\mu$ l 2x-SDS-Gel-Ladepuffer versetzt, für 5 Minuten auf 95°C erhitzt, zusammen mit dem Größenmarker P7702S auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. An der Gel-Dokumentationsanlage wurde überprüft, ob durch IPTG induzierte Proteine der erwarteten Größe gebildet worden waren.

### **Aufreinigung und Nachweis der heterolog exprimierten Proteine**

Je 2,7 ml des Bakterien-Aufschlusses (2.12.2, S. 50) wurden bei Raumtemperatur für 15 min sanft geschwenkt und dann mit 3 ml PBS und 30  $\mu$ l Mercapto-Ethanol versetzt, kurz gemischt und abzentrifugiert (10 min, 16000 g, 4°C). Der klare Überstand wurde dann mit GSH-Sepharose (Amersham, Freiburg) im Verhältnis 20:1 gemischt und auf Poly-Prep<sup>®</sup>-Säulchen (Biorad, Hercules, USA) aufgetragen. Die Elution der heterolog exprimierten Proteine aus der GST-Sepharose-Matrix erfolgte in drei Schritten durch Zugabe von je 60  $\mu$ l GSH-Lösung.

Für die Aktivitätsmessung wurden jeweils 10  $\mu$ l des Eluats mit 1 ml Phosphatpuffer, 40  $\mu$ l CDNB-Lösung und 40  $\mu$ l GSH-Lösung in einer Quarz-Küvette gut gemischt und sofort photometrisch bei 340 nm vermessen. Die Veränderung der Absorption wurde alle 12 Sekunden erfaßt.

### **2.12.3 Herstellung monoklonaler Antikörper**

Die erhaltenen GST-Fusions-Proteine von DAHPS3 und DHQD/SD wurden im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Elisabeth Kremmer (GSF, München, Hämatologikum) als Antigene bei der Synthese monoklonaler Antikörper verwendet. Für Fs-DAHPS3 konnten 5 und für Fs-DHQD/SD 7 verschiedene monoklonale Antikörper gewonnen werden, die wie unter 2.12.4 und 2.12.5, S. 52 beschrieben auf ihre Eignung für die Enzymquantifizierung untersucht wurden.

### **2.12.4 Validierung der monoklonalen Antikörper**

Alle monoklonalen Antikörper wurden mittels Dotblot daraufhin überprüft, ob sie Bindungsstellen für den verwendeten sekundären Antikörper (Peroxidase-konjugiert, Ziege-Anti-Ratte, IgG + IgM (Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA)) aufwiesen. Hierzu wurden eine PVDF-Membran (Amersham, Freiburg) in mehrere Felder unterteilt, mit den Antikörperbezeichnungen beschriftet und mit je 10  $\mu$ l der entsprechenden Antikörperlösung versehen. Das weitere Procedere bis hin zum Nachweis des gebundenen sekundären Antikörpers entsprach dem unter 2.12.5, S. 52 beschriebenen Protokoll.

### 2.12.5 Westernblot-Methode

Nach der Quantifizierung (2.11.2, S. 48) frischer Proteinextrakte aus Buchenblättern wurden diese in SDS-Gel-Ladepuffer aufgenommen und ohne zusätzliche Denaturierung bei 95°C in einem 1,5 mm dicken SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (70 min, 50 mA). Für den anschließenden Elektrottransfer der aufgetrennten Proteine vom SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran wurden 6 Blätter Whatman-Papier 3MM (Brentford, UK) und die Membran auf die Größe des SDS-Polyacrylamid-Gels zu rechtgeschnitten. Nach kurzem Benetzen der Membran mit Methanol und dem Entfernen des Methanols mittels ddH<sub>2</sub>O wurde diese, ebenso wie das Whatman-Papier und das SDS-Polyacrylamid-Gel, für 15 Minuten in Westernblot-Transferpuffer äquilibriert. Daraufhin wurden Membran und SDS-Polyacrylamid-Gel zwischen je 3 Lagen Whatman-Papier blasenfrei übereinandergelegt und im *TransBlot SD Semidry Blotting System* (Biorad, Hercules, USA) für 45 Minuten einer konstanten Transferspannung von 45 Volt ausgesetzt.

Die im Folgenden aufgeführten Inkubationsschritte wurden, soweit nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur in einer kleinen Schale unter leichtem Schwenken (40 rpm) in einem Volumen von jeweils 20 ml durchgeführt. Hierbei wurden die Puffer TBS, TBST, TBST+MP und die DAB-Lösung für die Peroxidase-Reaktion verwendet. Als primäre Antikörper für die Quantifizierung von Fs-DAHPS und Fs-DHQD/SD wurden die monoklonalen Ratten-Antikörper DAHPS-3F10 bzw. DHQD/SD-6F2 benutzt, als sekundärer Antikörper ein Peroxidase-konjugierter Ziege-Anti-Ratte Antikörper (2.12.4, S. 51).

- Äquilibrieren der Membran in TBST, 10 min
- Absättigung freier Bindungsstellen der Membran mit TBST+MP, 60 min
- Waschen der Membran in TBST, 5 min
- Waschen der Membran in TBST, 10 min
- Bindung des primären Antikörpers (1:200 in TBST+MP), über Nacht bei 4°C
- Waschen der Membran in TBST+MP, 5 min
- Waschen der Membran in TBST+MP, 10 min
- Bindung des sekundären Antikörpers (1:2000 in TBST+MP), 60 min
- Waschen der Membran in TBST, 5 min
- Waschen der Membran in TBS, 10 min
- Inkubation in DAB-Lösung, 5-10 min

Um ein Verbräunen der Membran zu verhindern wurde die Peroxidase-Reaktion nach dem Sichtbarwerden von Signalen durch Spülen der Membran in destilliertem Wasser abgestoppt. Daraufhin wurde die Membran getrocknet und eingescannt.



## 2.13 Infektion von Buchen mit dem Pilz *Apiognomonina errabunda*

Etwa 2 Monate vor dem Infektionstermin wurden, ausgehend von Stammkulturen, Malzmedium-Kulturschalen mit Myzel des Pilzes *Apiognomonina errabunda* inokuliert und im Dunkel bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach 4 Wochen wurden aus dem mittlerweile mit Myzel bewachsenen Malzmedium etwa 0,5 cm<sup>3</sup> große Würfel herausgeschnitten und mit dem Myzel nach unten auf je 10 Kulturschalen mit Haferflockenmedium A bzw. B aufgelegt. Nach weiteren 2 Wochen Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur hatte sich das Myzel auf der Oberfläche des Mediums ausgebreitet, woraufhin die Kulturplatten zur Induktion der Sporulation ans Fenster gestellt wurden.

Zur Aufnahme der Pilzsporen in der Suspensionslösung wurden jeweils 10 ml dieser Lösung auf die Kulturplatten pipettiert. Mittels einer Impföse wurden die Sporen dann von der Oberfläche abgelöst und nach kurzer Inkubation bei Raumtemperatur durch ein steriles Sieb in ein Becherglas abgegossen und damit von größeren Verunreinigungen durch Myzel-Bruchstücke gereinigt. Die gereinigte Sporensuspension wurde schließlich mit frischer Suspensionslösung im Verhältnis 1:24 verdünnt und gut gemischt, woraufhin die Sporenzahl pro Mikroliter durch mehrfache Auszählung unter dem Mikroskop bestimmt wurde. Bei einer Sporendichte von 2000 Sporen pro Milliliter wurden 10 ml für die Infektion eines Baums verwendet.

Die Applikation der Sporensuspension erfolgte mittels einer handelsüblichen Sprühflasche. Die Bäume wurden dazu vollständig in große Plastiktüten gehüllt, woraufhin im Inneren der Tüten die Sporensuspension versprüht wurde. Um ein Abtrocknen der Blätter zu vermeiden und damit die Infektion mit dem Pilz zu fördern, wurden die Tüten erst am Morgen des nächsten Tages wieder entfernt.

## 2.14 Analyse von Sekundärmetaboliten und Signalstoffen

### 2.14.1 Ethylen

Zur Bestimmung der Ethylenemission (nach Anegg [2]) wurde pro Messung jeweils ein Buchenblatt mit Stiel geerntet, mit der Unterseite nach oben auf einen feuchten Filterpapier-Streifen gelegt, zusammen mit diesem vorsichtig eingerollt und mittels Pinzette in ein Glasröhrchen überführt. Um eine Austrocknung des Blattes zu vermeiden wurde der Blattstiel mit etwa 250 µl Wasser am Boden des Röhrchens befeuchtet. Die Röhrchen wurden mit einem gasdichten Septum verschlossen und bei Raumtemperatur im Dunkeln für 60 Minuten aufbewahrt. Nach der Inkubation wurde mit einer Insulin-Einwegspritze ein Milliliter der Gasphase aus dem Röhrchen entnommen und in einen Gaschromatographen (AutoSystem XL, Perkin Elmer, Überlingen) mit Porapak-Q-Säure (Durchmesser 1/8", Länge 60 cm) und Flammen-

Ionisationsdetektor eingespritzt.

Die Temperaturen von Injektor, Säule und Detektor betragen 150, 140 und 200°C. Die Flußraten für das Trägergas (Stickstoff 5.0, Linde), synthetische Luft und Wasserstoff lagen bei 30, 450 und 45 ml/min. Die Retentionszeit von Ethylen belief sich unter diesen Bedingungen auf 45 Sekunden. Da vor der Inkubation das Frischgewicht der untersuchten Blätter ermittelt wurde, konnten die vom Gerät gemessenen Flächeneinheiten (FE) des Ethylenpeaks nach folgender Formel in die Einheit [nmol gFG<sup>-1</sup>] umgerechnet werden.

$$\text{Ethylen}[\text{nmol gFG}^{-1}] = 0,0641 \text{nmol ml}^{-1} \cdot \frac{\text{Probenpeak [FE]}}{\text{Eichgaspeak [FE]}} \cdot \frac{6,5 \text{ ml}}{\text{Frischgewicht [g]}}$$

In diese Formel gehen neben dem Verhältnis der Flächeneinheiten von Proben- und Eichpeak die Ethylenkonzentration des Eichgases (0,0641 nmol/ml), das Volumen des Inkubationsröhrchens (6,5 ml) und das Frischgewicht des beprobten Blattes ein.

### 2.14.2 Freie und konjugierte 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure

Gehalte an freier und konjugierter 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) wurden nach folgendem, an Tuomainen et al. [313] angelehnten Protokoll ermittelt.

Je 200 mg Homogenat von unter flüssigem Stickstoff gemörserten Buchenblättern wurden zusammen mit einer Spatelspitze PVPP (Polyvinylpolypyrrolidon) in 1,2 ml Metaphosphorsäure (2%-ig, v/v) aufgenommen und 15 Minuten bei Raumtemperatur im Schüttler inkubiert. Nach Aufreinigung des Überstandes durch zweimalige Zentrifugation (15 min, 20000 g, 4°C) wurde dieser bei -80°C bis zur ACC-Messung aufbewahrt.

#### Bestimmung von freiem ACC

Für die Bestimmung der Konzentration an freiem ACC wurden in einem auf Eis stehenden Glasröhrchen 200 µl des Extraktes mit 500 µl ddH<sub>2</sub>O und 100 µl HgCl<sub>2</sub>-Lösung (10mM) vermischt, woraufhin das Röhrchen mit einem gasdichten Septum verschlossen wurde. Die Umsetzung von ACC zu Ethylen erfolgte nach dem Einspritzen von 200 µl Oxidationslösung in die Probenröhrchen, die daraufhin 10 sec kräftig mit dem Vortex-Gerät durchmischt, dann 2,5 Minuten auf Eis inkubiert und wieder für 10 sec durchmischt wurden. Mit einer Insulin-Spritze wurde 1 ml der Gasphase abgezogen und wie unter 2.14.1, S. 53 beschrieben mit dem Gaschromatographen auf den Ethylengehalt hin untersucht.

#### Bestimmung von Gesamt-ACC

In einem zweiten Ansatz wurde der Gesamt-ACC-Gehalt ermittelt. Dazu wurden 200 µl Extrakt (s.o.) nach Zugabe von 40 µl 12 N HCl einer sauren Hydrolyse unterzogen (3 h, 120°C), die, nach dem Abkühlen der Probe auf Eis, durch Zugabe von 240

$\mu\text{l}$  2 N NaOH abgestoppt wurde. Daraufhin wurden die Proben mit je 220  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O und 100  $\mu\text{l}$  HgCl<sub>2</sub> versetzt. Ethylen wurde wie oben beschrieben durch Zugabe der Oxidations-Lösung freigesetzt und am Gaschromatographen gemessen. Der Gehalt an konjugiertem ACC errechnete sich durch Subtraktion der Menge an freiem ACC vom Gesamt-ACC-Gehalt. Folgende Formel wurde zur Berechnung des ACC-Gehalts verwendet.

$$ACC [nmol gFG^{-1}] = \frac{\text{Probenpeak [FE]} \cdot \text{ACC-Standard [nmol]}}{\text{Eichgaspeak [FE]} \cdot \text{Frischgewicht [g]}} \cdot k_v$$

$$\text{wobei } k_v = \frac{\text{Gesamtvolumen Extrakt [ml]} \cdot \text{Volumen Glasröhrchen [ml]}}{\text{Probenvolumen Extrakt [ml]} \cdot \text{Volumen Probengas [ml]}}$$

### 2.14.3 Salicylsäure und Gentisinsäure

#### Extraktion

Salicyl- und Gentisinsäure (SA und GA) wurden in Anlehnung an die von Meuwly und Métrau [198] verwendete Methode aus gemörsertem Buchenblatt-Homogenat extrahiert. Hierzu wurden jeweils 100 mg Pflanzenmaterial mit 5 ml Methanol versetzt und eine Minute lang bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min, 30000 g, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 4 ml Methanol erneut extrahiert. Der Überstand einer zweiten Zentrifugation unter obigen Bedingungen wurde dann mit dem ersten Überstand vereinigt und im Vakuum mit einem Rotationsverdampfer (RE 111, Büchi, Flawil, CH) bei 38°C einrotiert.

Nach Aufnahme der Extrakte in 2 ml Ameisensäure (20%, v/v) und Absenkung des pH-Werts auf < 1,5 durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  Salzsäure (32%, v/v) wurden die Proben zunächst mit 5 ml und dann mit 3 ml Ethylacetat:Cyclohexan (1:1, v/v) ausgeschüttelt. Die organischen Phasen, welche die freie SA und GA enthielten, wurden vereinigt und im Vakuum wie oben beschrieben verdampft. Zur Analyse der konjugierten SA und GA wurden die wässrigen Phasen in Pyrexgläsern mit jeweils 1,3 ml Salzsäure (32%) vermischt. Die Gläsern wurden verschlossen und zur Hydrolyse für 60 Minuten bei 80°C in den Heizofen gestellt. Nach erneutem zweifachen Ausschütteln der Proben wurden die organischen Überstände vereinigt und einrotiert.

#### HPLC-Analyse

Für die HPLC-Analyse wurden die Proben in je 500  $\mu\text{l}$  Auftragspuffer (Laufpuffer A + 20% Methanol, v/v) aufgenommen, abzentrifugiert (10 min, 20000 g, 4°C) und zur Messung (je 20  $\mu\text{l}$  pro Probe) bei 4°C in den 'Autosampler Basic Marathon' (Spark, Holland) gestellt.

Die verwendete HPLC-Anlage bestand neben dem Autosampler aus der 'Intelligent Pump 1 6200A' (Merck, Darmstadt), einer 'RP-C-18 Nucleosil'-Säule (150 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 120 A, Bischoff, Leonberg), einem Fluoreszenz-Detektor 'RF-535' (Shimadzu, München) und einem 'Chromato-Integrator D 2500' (Merck, Darmstadt). Der

Fluoreszenzdetektor benutzte die Wellenlängen 305 nm und 407 nm für Anregung und Detektion. Die Flußrate betrug konstant 1,5 ml/min, wobei folgender Gradient der Laufmittel A und B verwendet wurde:

- 20 Minuten isokratisch Laufmittel A
- lineare Erhöhung auf 100% Laufmittel B in 5 Minuten
- 10 Minuten isokratisch Laufmittel B
- lineare Absenkung auf 100% Laufmittel A in 5 Minuten
- 5 Minuten isokratisch Laufmittel A

Die Retentionszeiten für GA und SA betragen etwa 5 bzw. 11 Minuten. Die Gehalte an freier SA wurden nach folgender Formel errechnet:

$$\text{freie SA} [\text{nmol gFG}^{-1}] = k \cdot \frac{\text{Probenpeak [FE]}}{\text{SA-Standard-Peak [FE]} \cdot \text{Frischgewicht [g]}}$$

$$\text{mit } k = \frac{\text{Anteil SA-Standard in } 20 \mu\text{l [nmol]}}{\text{gemessener Probenanteil} \cdot \text{SA-Wiederfindungsrate}} = \frac{0,0724}{0,04 \cdot 0,75} = 2,41 [\text{nmol}]$$

Bei der Messung der konjugierten Salicylsäure wurde ebenfalls obige Formel verwendet. Allerdings lag die Wiederfindungsrate mit 0,7 etwas niedriger, so daß sich hier ein  $k = 0,0724 / (0,04 \cdot 0,7) = 2,586$  ergab.

#### 2.14.4 Lösliche und zellwandgebundene phenolische Inhaltsstoffe

##### Probenaufarbeitung

In mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Dismembratorbechern wurden je 100 mg tiefgefrorenen Blatt-Homogenats eingewogen und mit je 100 mg *Diatomaceous Earth* (Sigma D-5384) versetzt. Im 'Mikrodismembrator S' (Braun, Melsungen) wurden die Proben dann für 2,5 Minuten bei 2500 rpm dismembriert.

##### Methanolische Extraktion

Die Proben wurden mit je 450  $\mu\text{l}$  Methanol für die Chromatographie (Merck) versetzt, durch Vortexen gut gemischt und über Nacht im Kühlschrank extrahiert. Am nächsten Tag wurden die Proben langsam auf Raumtemperatur erwärmt, gut mit dem Vortex-Gerät gemischt und abzentrifugiert (10 min, 9000 g). Der klare Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zur HPLC-Analyse bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Rückstände der methanolischen Extraktion wurden mit je 1 ml Methanol überschichtet und bis zur Durchführung der Zellwandhydrolyse bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **Zellwandhydrolyse**

Die Proben-Rückstände aus der methanolischen Extraktion wurden auf Raumtemperatur erwärmt und dann mit Methanol (3 x 1 ml) und ddH<sub>2</sub>O (1 x 1 ml) gewaschen. Hierbei wurden die Proben mit dem Lösungsmittel versetzt, mit einem Vortex-Gerät gut gemischt, 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und abzentrifugiert (4 min, 9000 g). Der Überstand wurde jeweils dekantiert und verworfen.

Für die Zellwandhydrolyse wurden die Proben in jeweils 150  $\mu$ l Hydrolysepuffer aufgenommen, gut gemischt und über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Proben wurden am nächsten Morgen nochmals gut gemischt, mit 150  $\mu$ l 1,5 M Ameisensäure versetzt, wieder gut gemischt und mit 300  $\mu$ l Methanol versetzt. Nach gründlicher Durchmischung der Proben wurden diese abzentrifugiert (10 min, 9000 g). Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zur HPLC-Messung bei -80°C gelagert.

### **Messung löslicher phenolischer Inhaltsstoffe mittels HPLC**

Die Extrakte wurden auf Raumtemperatur gebracht und gut gemischt. 75  $\mu$ l vom Extrakt wurden mit 25  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O versetzt, abzentrifugiert (10 min, 9000 g) und in HPLC-Probengefäße überführt. Von jeder Probe wurden 10  $\mu$ l in die HPLC eingespritzt. Die Temperatur der Säule (Bischoff Spherisorb ODS, Type NC, 5  $\mu$ m mit Vorsäule) lag bei 20°C. Im HPLC-Protokoll wurde bei einer Flußrate von 1 ml/min folgender Gradient bezüglich Laufmittel A' und Laufmittel B' verwendet:

- 5 Minuten lang isokratisch Laufmittel A'
- lineare Erhöhung auf 50% Laufmittel B' in 50 Minuten
- lineare Erhöhung auf 100% Laufmittel B' in 30 Minuten
- 5 Minuten lang isokratisch Laufmittel B'
- Pufferwechsel von Laufmittel B' zu Laufmittel A' (1 Minute)

### **Messung zellwandgebundener Inhaltsstoffe mittels HPLC**

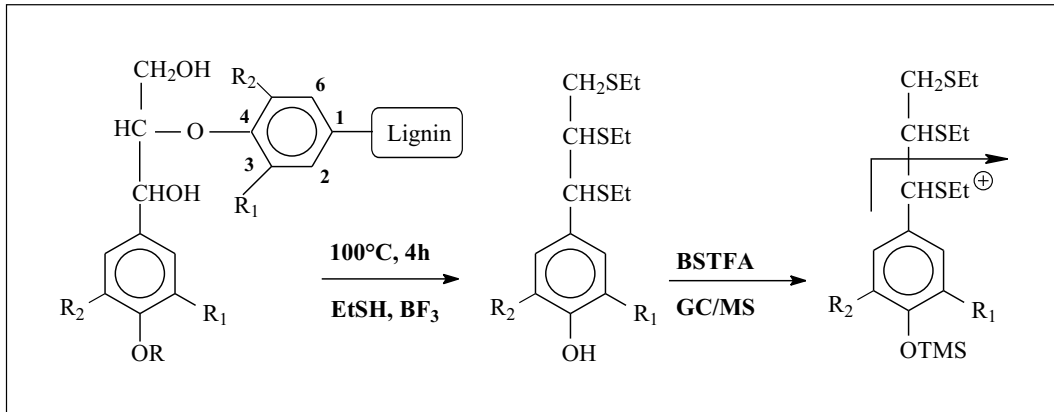
Nach Erreichen der Raumtemperatur wurden die Hydrolysate gut gemischt und für 10 Minuten bei 9000 g abzentrifugiert. Bis auf die Erhöhung des Injektionsvolumens auf 20  $\mu$ l und den im Folgenden aufgeführten modifizierten Gradienten zwischen Laufmittel A' und B' entsprachen die HPLC-Bedingungen den oben beschriebenen.

- 5 Minuten lang isokratisch Laufmittel A'
- lineare Erhöhung auf 100% Laufmittel B' in 40 Minuten
- 5 Minuten lang isokratisch Laufmittel B'
- Pufferwechsel von Laufmittel B' zu Laufmittel A' (5 Minuten)

Für die Messungen wurden ein UV-Detektor (Beckman Diodenarray-Detektor 168) und ein Fluoreszenzdetektor (Shimadzu RF10A XL) verwendet.

### 2.14.5 Analyse von Lignin

Die Analyse von Lignin erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. C. Lapierre (INRA, Versailles, Frankreich) an ungeschädigten Blättern der Schadstufe 1 (S1), mäßig geschädigten Blättern der Schadstufe 3 bis 4 (S2) und stark geschädigten Blättern der Schadstufe 6 (S3) von 3-jährigen Buchen aus Versuch B (Schadstufen: Abb. 2.2, S. 30).



**Abbildung 2.8:** Schema der Thioacidolyse von Lignin nach Fournand et al. [74]. Die in  $\beta$ -O-4 Position gebundenen p-Hydroxyphenyl ( $R_1 = R_2 = H$ ), Guaiacyl ( $R_1 = OCH_3$ ,  $R_2 = H$ ) und Syringyl ( $R_1 = R_2 = OCH_3$ ) Lignineinheiten werden zu H, G and S Thioacidolyse-Monomeren umgewandelt und können massenspektrographisch quantifiziert werden. EtSH =  $\beta$ -Mercaptoethanol, BSTFA = N,O-bis-(Trimethylsilyl) Trifluoroacetamid, GC/MS = Gaschromatograph/Massenspektrograph. Abbildung aus Cabané et al. [37].

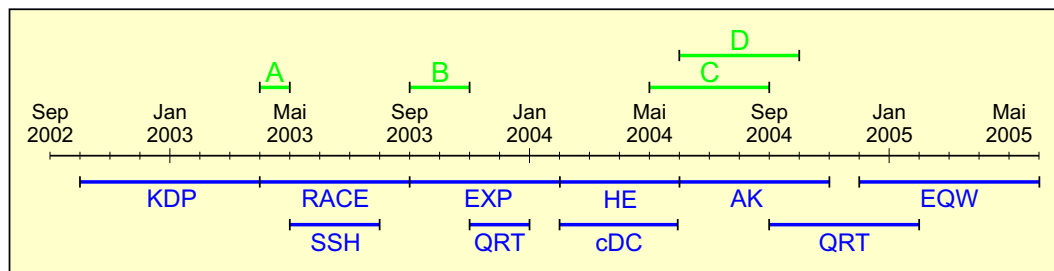
Die Blattproben S1, S2 und S3 wurden getrocknet, gemörsert und in drei Schritten mit Ethanol/Toluol (1:2, v/v), Ethanol und Wasser extrahiert. Die Bestimmung von Klason Lignin erfolgte nach Dence [49] aus den Rückständen dieser Extraktionsschritte. Die Ligninstruktur wurde durch Thioacidolyse, ausgehend von 20 bis 30 mg extrahiertem Probenmaterial, bestimmt [74]. Hierbei wurde der Anteil an ausschließlich  $\beta$ -O-4 gebundenen Lignineinheiten H (p-Hydroxyphenyl), G (Guaiacyl) und S (Syringyl) bestimmt (Abb. 2.8), die bei einem Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) von 239, 269 und 299 massenspektrographisch detektiert werden konnten. Das Verhältnis dieser Monomere zum Klason Ligningehalt ( $\mu\text{mol/g}$  Klason Lignin) entspricht dem Anteil von ausschließlich  $\beta$ -O-4 gebundenen Lignineinheiten am Gesamt-Lignin und ermöglicht damit eine Aussage über den Kondensationsgrad der Lignin-Moleküle.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Ozonexpositionsversuche

Zur molekularbiologischen Untersuchung von Streßantworten der europäischen Buche unter dem Einfluß von Ozon wurden im Rahmen dieser Arbeit vier Ozonexpositionsversuche durchgeführt (siehe Kapitel 2.4, S. 31), wobei in den Versuchen A und B dreijährige, in Versuch C vierjährige und in Versuch D adulte Pflanzen verwendet wurden.

In den Versuchen A, B und C wurden die Jungpflanzen in Expositionskabinen des Versuchsgewächshauses (Abbildung 3.2, S. 60) über die jeweilige Versuchsdauer für 8 Stunden pro Tag mit 150 bis 300 nI/l Ozon behandelt, während die Kontrollpflanzen in benachbarten Kabinen unter den gleichen klimatischen Bedingungen subambienten Ozonkonzentration (< 15 nI/l) ausgesetzt waren. Die zu analytischen Zwecken erhöhten Ozonkonzentrationen lagen damit deutlich über dem normalerweise unter Freilandbedingungen beobachteten Niveau der Ozonbelastung. Versuch D wurde am Versuchsstandort 'Kranzberger Forst' (Abb. 1.1, S. 2, [226]) durchgeführt, an dem im Rahmen des SFB 607 seit Mai 2000 die Kronen adulter Versuchsbäume (Buchen und Fichten) über die gesamte Vegetationsperiode mit doppelt ambienter Ozonkonzentration behandelt werden. Abbildung 3.1 gibt einen Überblick über den zeitlichen Ablauf der Ozonexpositionsversuche und die durchgeführten molekularbiologischen Untersuchungen.



**Abbildung 3.1:** Zeitliche Übersicht der Ozonexpositionsversuche mit dreijährigen (A, B), vierjährigen (C) und adulten Buchen (D) sowie der molekularbiologischen Untersuchungen. KDP = Klonierungen mittels degenerierter Primer, RACE = Analyse der 5'- und 3'-cDNA-Enden von Genen des Shikimatstoffwechsels, EXP = Herstellung von Expressionsklonen, HE = Heterologe Expression von Genen des Shikimatstoffwechsels, AK = Antikörpersynthese, EQW = Enzymquantifizierung mittels Westernblot, SSH = Erstellung von subtraktiven cDNA-Banken, CDC = Analyse ozonregulierter cDNA-Klone mittels DNA-Chips, QRT = Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Realtime-PCR.



**Abbildung 3.2:** Blick in die Kontrollkabine (Teilbild A) und die Ozonexpositions-kabine (Teilbild B) des Versuchsgewächshauses der GSF. Gezeigt sind vierjährige Buchen vor dem Beginn des Ozonexpositionsexperiments C (150-190 nI/l, 8 h/d, 84 d).



### Versuch A

Das Ziel von Versuch A, der im April 2003 durchgeführt wurde, war die Identifizierung von ozoninduzierten und -reprimierten Genen der europäischen Buche mittels subtraktiver cDNA-Banken. Hierzu wurden im Verlauf der Ozonbehandlung (300 nl/l, 8 h/d, 30 d) zu 15 Erntezeitpunkten (2.4.1, S. 31) je ein Blatt von 9 behandelten und 9 unbehandelten Pflanzen geerntet. Blattmaterial dieser Ernten wurde für die Erstellung der subtraktiven cDNA-Banken SSH1 (Erntezeitpunkte 1 bis 8, 4 h bis 5 Tage nach Versuchsbeginn) und SSH2 (Erntezeitpunkte 9 bis 15, 7 bis 30 Tage nach Versuchsbeginn) verwendet. Aus methodischen Überlegungen wurde in Versuch A eine sehr hohe Ozonkonzentration gewählt, um eine starke differentielle Genexpression zu induzieren.

### Versuch B

Um den Einfluß von Ozon auf die Regulation der Genexpression von Shikimatstoffwechsel und Ethylenbiosynthese in der europäischen Buche am Ende einer Wachstumsperiode zu untersuchen, wurden in Versuch B (September - Oktober 2003) dreijährige Buchen über einen Zeitraum von 46 Tagen mit 200 nl/l Ozon (8 h/d) behandelt. Die zu 8 Zeitpunkten genommenen Blattproben (2.4.2, S. 31) wurden für die Expressionsanalyse von Genen aus Shikimatstoffwechsel und Ethylenbiosynthese mittels quantitativer Realtime-PCR (qRT-PCR) verwendet.

### Versuch C

Aufbauend auf den Ergebnissen aus Versuch B sollten in Versuch C (Juni - September 2004) die Expressionsdaten der putativen Gene aus Shikimatstoffwechsel und Ethylenbiosynthese überprüft werden und in den Kontext von Inhaltsstoffanalysen sowie der Quantifizierung einzelner Enzyme des Shikimatstoffwechsels auf Proteinebene gestellt werden. Zudem sollte die Interaktion von biotischem Streß durch den Erreger der Buchenblattbräune (*Apiognomonia errabunda*) und abiotischem Streß durch Ozon untersucht werden. Die Ozonkonzentration der täglichen 8-stündigen Ozonbehandlung betrug zu Beginn 150 nl/l und wurde nach zwei Wochen auf 190 nl/l erhöht.

### Versuch D

In Versuch D sollte im Hinblick auf die Ergebnisse aus den Versuchen B und C auch die ozonbedingte Genexpression an adulten Buchen untersucht werden. Dazu wurden im Sommer 2004 zu vier Zeitpunkten von je 4 Bäumen unter doppelt und einfach ambientem Ozonregime Blattproben genommen und für die Expressionsanalyse verwendet.

## 3.2 Entwicklung von Blattläsionen

### 3.2.1 Ozonbedingte Blattläsionen

Im Verlauf der Expositionsversuche A, B und C kam es nur bei den ozonbehandelten Pflanzen zur Ausbildung typischer Blattläsionen [228]. Die Läsionen traten bei den einzelnen Versuchsbäumen zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf und manche Pflanzen blieben bis zum Ende der Versuche ohne sichtbare Symptome. In Versuch D waren bis zur letzten Probenahme weder unter einfachem noch unter doppelt ambientem Ozonregime Blattläsionen zu erkennen.

Das für die Bonitur der Ozonläsionen verwendete Stufenschema (Tabelle 2.4, S. 30) bildet den typischen Ablauf bei der Entwicklung ozonbedingter Blattläsionen ab. Zunächst entstanden an kräftig grünen Blättern (Stufe 1) kleine, punktförmige Läsionen von bräunlicher bis olivgrüner Färbung in den Interkostalfeldern (Stufe 2), die sich daraufhin rasch über die gesamte Blattspreite ausbreiteten (Stufe 3). Nach dem Zusammenfließen der punktförmigen Läsionen zu größeren Bereichen (Stufe 4) begannen sich die Blätter aufzurollen (Stufe 5) und fielen schließlich vom Baum ab, wenn nur noch etwa 10% der Blattfläche keine Läsionen aufwies (Stufe 6).

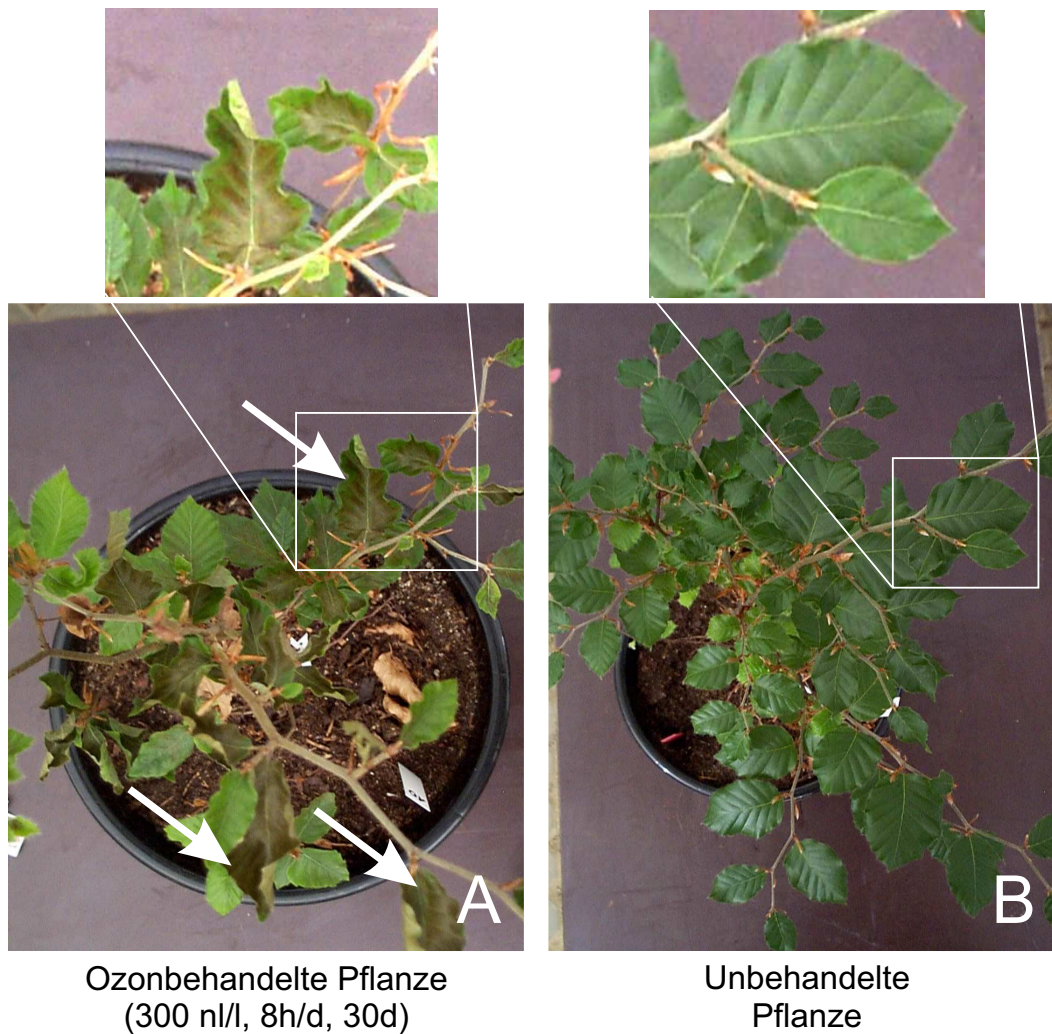
#### Versuch A

Nach 30-tägiger Ozonbehandlung hatten sich bei drei der neun ozonbehandelten dreijährigen Buchen deutliche Läsionen (bis Boniturstufe 6, siehe 2.3.2, S. 29) entwickelt. Drei Bäume wiesen weniger starke Läsionen auf (bis maximal Boniturstufe 4) und drei weitere blieben ohne erkennbare Symptome. Bei den Versuchsbäumen unter Kontrollbedingungen war bis zum Versuchende keine ozonbedingte Schädigung der Blätter zu erkennen. Abbildung 3.3, S. 63 zeigt einen ozonbehandelten Baum mit deutlichen Ozonschäden (Teilbild A) und einen Baum der Kontrollgruppe ohne erkennbare Symptome am letzten Tag von Versuch A.

#### Versuch B

Um den Verlauf der Entstehung der ozonbedingten Blattläsionen zu erfassen, wurden im Versuch B je fünf ozonbehandelte und fünf unbehandelte Bäume in regelmäßigen Abständen auf das Vorhandensein von ozonbedingten Läsionen untersucht.

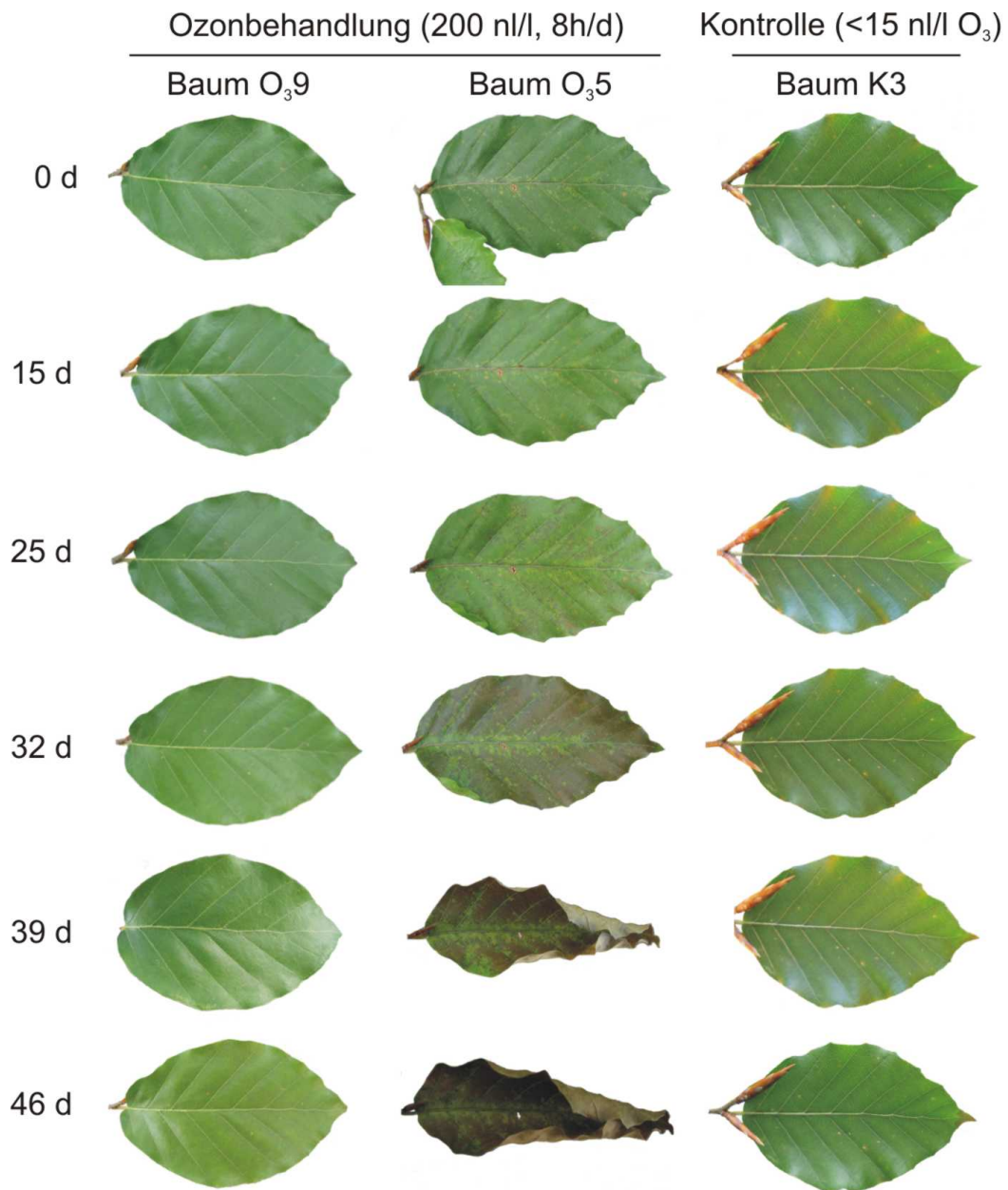
In Abbildung 3.4, S. 64 ist die Entwicklung von Läsionen an einem Blatt des ozonbehandelten Baums O<sub>3</sub>5 im Vergleich zu dem unbehandelten Baum K3 und einem weiteren ozonbehandelten Baum (O<sub>3</sub>9) dargestellt. An Baum O<sub>3</sub>5 zeigten sich erste Symptome bereits zwei Tage nach Beginn der Ozonbehandlung. Die Symptomentwicklung an diesem Baum schritt rasch voran, so daß bereits 32 Tage nach Versuchsbeginn alle Blätter punktförmige Läsionen aufwiesen und zum Ende des Versuchs mehr als die Hälfte aller Blätter stark geschädigt oder bereits abgefallen waren (Boniturstufe 5 bis 6). Die Blätter der anderen vier bonitierten ozonexponierten Bäume erreichten bis zum



**Abbildung 3.3:** Symptomausprägung an einer dreijährigen Buche (Teilbild A) nach 30-tägiger Ozonbehandlung (Versuch A, 300 n/l, 8 h/d) und Kontrollpflanze (<15 n/l  $O_3$ ) ohne Symptome (Teilbild B). Die Pfeile kennzeichnen stark geschädigte Blätter der Boniturstufe 5 (siehe Tabelle 2.4, S. 30)

Versuchsende maximal die Boniturstufe 4. Baum  $O_39$  blieb als einziger ozonbehandelter Baum bis zum Ende des Versuchs ohne erkennbare Symptome.

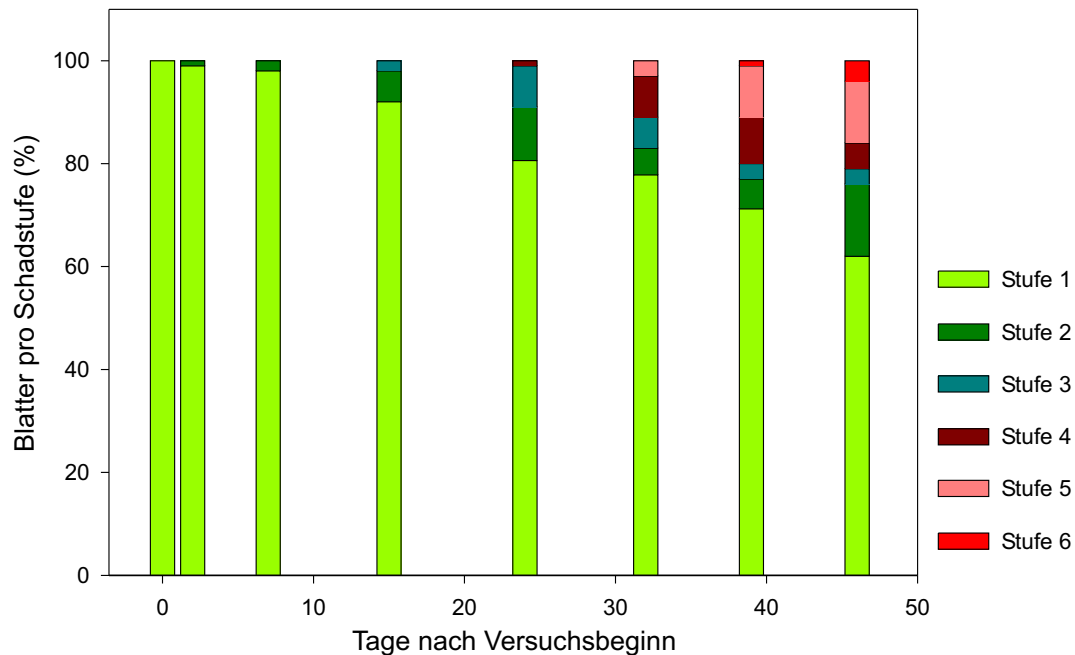
Alle Bäume der Kontrollgruppe wiesen ebenso, wie der in Abbildung 3.4, S. 64 dokumentierte Baum K3, zum Ende des Versuchs keinerlei ozonbedingte Läsionen auf. Die Boniturergebnisse von Versuch B sind in Abbildung 3.5, S. 65 zusammengefasst. Dargestellt ist der Anteil der 6 Stufen des visuellen Boniturschemas ozonbedingter Blattsymptome (siehe 2.3.2, S. 29) an der Gesamtzahl der Blätter von fünf Bäumen.



**Abbildung 3.4:** Entwicklung von Blattläsionen im Verlauf des Ozonexpositionsversuchs B (200 nl/l O<sub>3</sub>, 8 h/d, 46 d).

### Versuch C

Wegen der in Versuch A und B festgestellten baumspezifisch sehr unterschiedlich raschen Symptomentwicklung wurden in Versuch C alle 12 Bäume jeder der sieben Versuchsvarianten (a, b, c, d, e, f, k, siehe Abb. 2.3, S. 33) während der Ozonbehandlung in

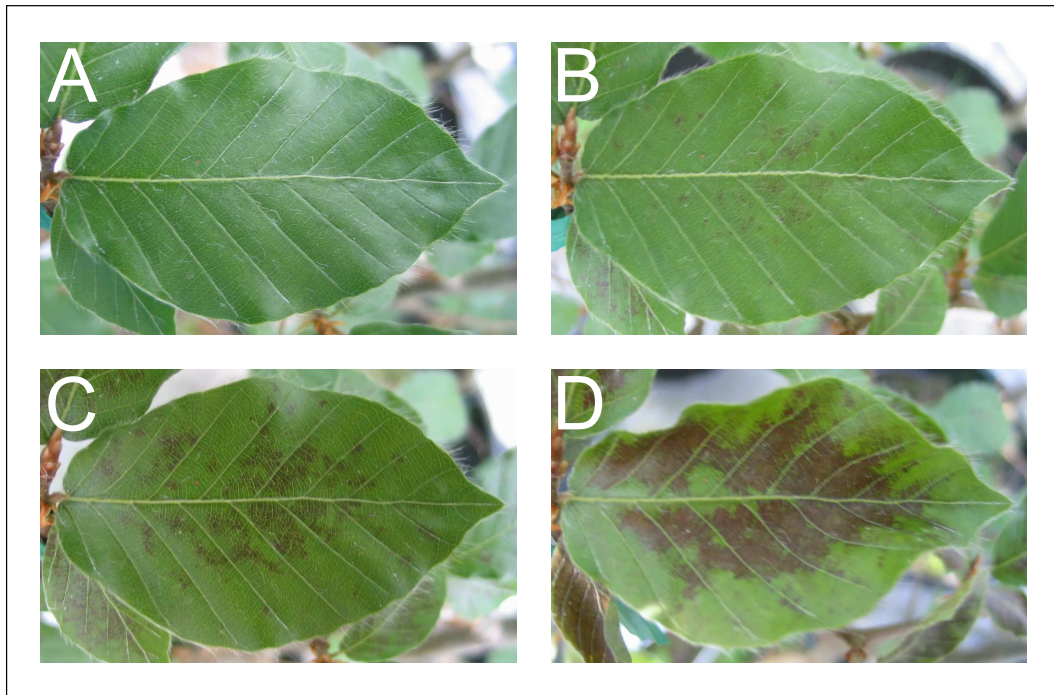


**Abbildung 3.5:** Anteil der Blätter mit ozonbedingten Läsionen gemäß den verwendeten Boniturstufen (siehe 2.3.2, S. 29) bei fünf dreijährigen Buchen in Versuch B (200 nl/l O<sub>3</sub>, 8 h/d, 46 d).

regelmäßigen Abständen auf die Bildung von ozonbedingten Läsionen hin untersucht und nach dem oben erläuterten Stufenschema bonitiert. Bei einzelnen Bäumen der ozonbehandelten Versuchsvarianten a, c, d, e und f kam es 42 Tage nach Versuchsbeginn zur Ausbildung erster ozonbedingter Läsionen, die sich in der Regel rasch weiterentwickelten, bis es zum Aufrollen und schließlich zum Abfall der betroffenen Blätter kam. Noch ungeschädigte Blätter der betroffenen Bäume wiesen bald darauf ebenfalls erste Symptome auf. So erreichten einzelne Blätter eines Baums der Versuchsvariante a, die 42 Tagen nach Versuchsbeginn erste ozonbedingte Symptome gezeigt hatten, innerhalb von 14 Tagen die Boniturstufe 6 und fielen ab.

In Versuchsvariante c, d, e und f wurde diese Boniturstufe nach 62, 50, 56 und 56 Tagen zum ersten Mal erreicht, also im Falle eines Baums der Versuchsvariante c bereits 8 Tage nach dem Auftreten der ersten Symptome. Die Hälfte der untersuchten Bäume wiesen in den Varianten a, c, d und e nach 62, 78, 62, 56 Tagen ozonbedingte Blattläsionen auf. In Versuchsvariante f zeigten bis zum Ende des Versuchs nur 5 der 12 Bäume Symptome. In den Versuchsvarianten a, c, d und e blieben jeweils nur 3, 5, 3 und 3 Bäume ohne Läsionen. Der ozonbedingte Verlust aller Blätter wurde nur bei einem Baum der Versuchsvariante a festgestellt.

Alle Bäume der nicht mit Ozon behandelten Bäume aus den Versuchsvarianten b und k blieben bis zum Ende des Versuchs C kräftig grün gefärbt und ohne erkennbare Läsionen.

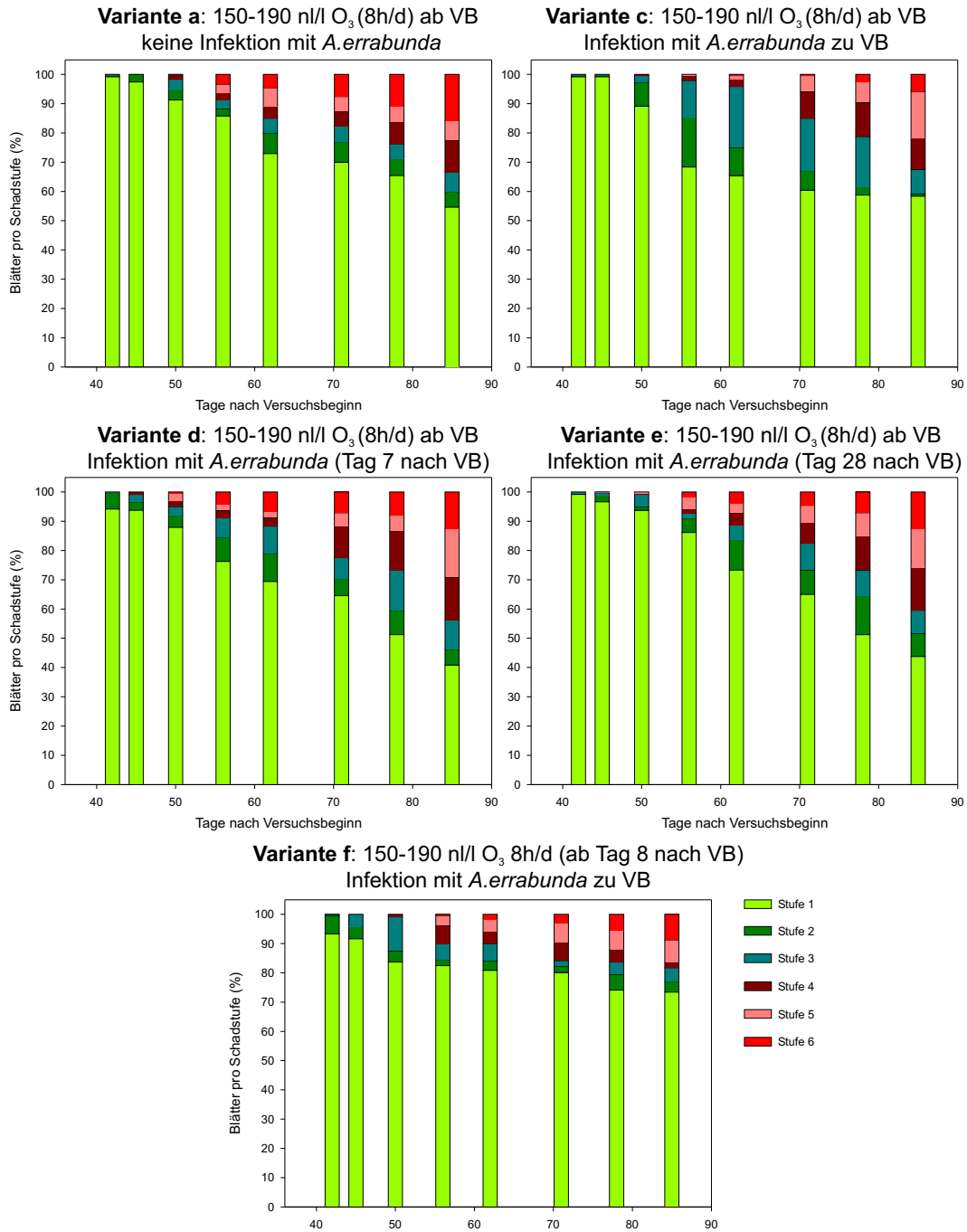


**Abbildung 3.6:** Entwicklung von Läsionen an einem ozonexponierten Buchenblatt im Verlauf von Versuch C (150-190 nl/l O<sub>3</sub>, 8 h/d, 84 d). Die Teilbilder A, B, C und D wurden 42, 49, 55 und 63 Tage nach Beginn der Ozonbehandlung aufgenommen.

In Abbildung 3.6 ist beispielhaft die Entwicklung der ozonbedingten Läsionen an einem ozonexponierten Buchenblatt 42, 49, 55 und 63 Tage nach Beginn der Ozonbehandlung dargestellt. Teilbild A zeigt das makroskopisch noch ungeschädigte Blatt (Boniturstufe 1), während in den Teilbildern B, C und D die Ausbildung von Blattläsionen gemäß den Boniturstufen 2, 3 und 4 dokumentiert wird.

Die Entwicklung ozonbedingter Läsionen bei Versuch C ist in Abbildung 3.7, S. 67 zusammengefasst. Zum jeweiligen Bonitur-Zeitpunkt zeigt die Abbildung den prozentualen Anteil der Boniturstufen 1 bis 6 als Mittelwert der 12 Bäume der Versuchsvarianten a, c, d, e und f. Die Varianten b und k von Versuch C sind in dieser Graphik nicht aufgeführt, da diese nicht mit Ozon behandelt wurden und bis zum Versuchsende keine ozonbedingte Ausbildung von Läsionen beobachtet wurde.

Die Zahl der Blätter mit ozonbedingten Läsionen belief sich in den Versuchsvarianten a, c, d und e am Ende von Versuch C auf etwa 50%. Bei Pflanzen der Versuchsvariante f, in der die Ozonbehandlung erst eine Woche später als bei den Varianten a, c, d und e begann, waren es dagegen nur 27%. Der ozonbedingte Verlust von Blättern über die gesamte Dauer von Versuch C betrug in den ozonbehandelten Versuchsvarianten zwischen 6% und 16%.



**Abbildung 3.7:** Anteil der Blätter mit ozonbedingten Läsionen gemäß den verwendeten Boniturstufen (siehe 2.3.2, S. 29) bei jeweils 12 Bäumen der Versuchsvarianten a, c, d, e und f in Versuch C (150-190 n/l O<sub>3</sub>, 8 h/d, 84 d). In den nicht mit Ozon behandelten Versuchsvarianten b und k kam es nicht zur Ausbildung von Läsionen. VB = Versuchsbeginn.

**Versuch D**

Bei dem in Versuch D geernteten Blattmaterial aus der Sonnenkrone der 60-jährigen Versuchsbäume wurde weder unter einfachem noch unter doppelt ambientem Ozonregime die Ausbildung von Läsionen beobachtet.

**3.2.2 Ausbildung von Blattläsionen nach Infektion mit *Apiognomonium errabunda***

Für die Bäume der Varianten b, c, d, e, und f von Versuch C wurde nach der Infektion mit dem Erreger der Buchenblattbräune *Apiognomonium errabunda* wöchentlich der prozentuale Anteil der durch den Pilz geschädigten Blattfläche bonitiert. Allerdings trat bei keinem der infizierten Bäume das typische Schadbild von *A. errabunda*, wie es in Abbildung 3.8 dargestellt ist, auf. Die nicht infizierten Bäume der Versuchsvarianten a und k blieben erwartungsgemäß bis zum Versuchsende ebenfalls ohne derartige Läsionen.



**Abbildung 3.8:** Typische Schädigung eines Buchenblattes durch den Erreger der Buchenblattbräune (*Apiognomonium errabunda*) [8]. Das Bild wurde im August 2003 im 'Kranzberger Forst' aufgenommen und freundlicherweise von G. Bahnweg zur Verfügung gestellt.



### 3.3 Klonierung von Gensequenzen aus *Fagus sylvatica*

Trotz der großen Bedeutung der europäischen Buche für die Forstwirtschaft in Zentraleuropa und einer besorgniserregenden Entwicklung des allgemeinen Gesundheitszustands der deutschen Buchenbestände [321] gibt es bis heute nur wenige molekularbiologische Untersuchungen zur Reaktion der Buche auf schädigende Umwelteinflüsse wie Ozon oder Infektionen mit Schadpilzen. Zu den wenigen bekannten ozonregulierten Enzymen bei Waldbäumen zählen Zimtalkohol Dehydrogenase (CAD) [82, 83, 352], Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) [266], Chalcon Synthase (CHS) [266],  $\beta$ -1,3-Glucanase ( $\beta$ -Gluc) [143, 166], Chitinase [143, 166] und das PR-Protein PR1 [143]. Die entsprechenden molekularbiologischen Arbeiten wurden allerdings meist auf translationeller oder enzymatischer Ebene und nur selten an der europäischen Buche [166], sondern vornehmlich an Kiefer oder Fichte [82, 83, 143, 266, 352] durchgeführt.

Auch die Gensequenzen der sieben Enzyme des Shikimatstoffwechsels (SSW), der im Fokus der Untersuchungen dieser Arbeit stehen sollte, waren bisher weder von der europäischen Buche noch von einer anderen Baumart bekannt, so daß zu Beginn der Arbeit keine entsprechenden DNA-Sequenzinformationen für Studien der streßbedingten Genexpression zur Verfügung standen.

Um die angestrebten molekularbiologischen Untersuchungen durchführen zu können, mußten daher zunächst geeignete Gensequenzen der europäischen Buche kloniert werden. Dabei wurden drei Strategien verfolgt:

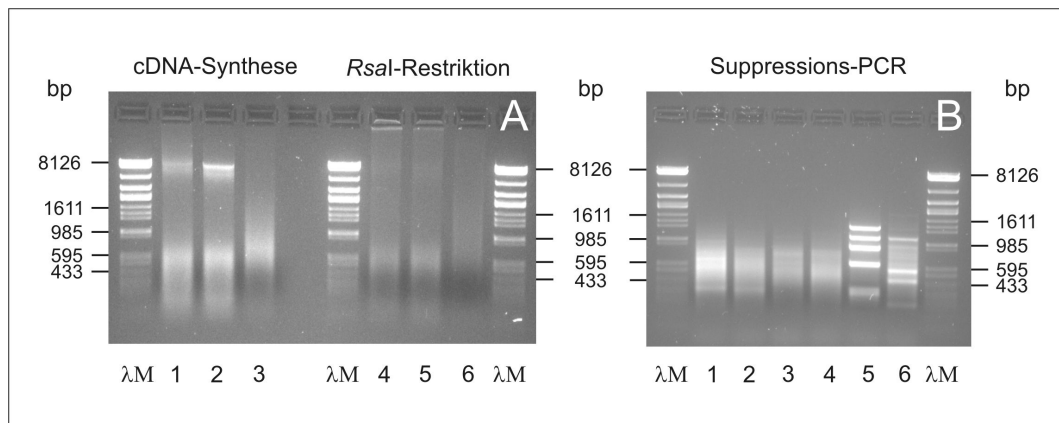
1. Erstellung ozoninduzierter subtraktiver cDNA-Banken durch Klonierung differentiell exprimierter cDNA-Sequenzen. Unterscheidung kurzfristiger und langfristiger pflanzlicher Antworten auf das Schadgas Ozon.
2. Klonierung von cDNA-Sequenzen putativer Gene des Shikimatstoffwechsels durch PCR mit degenerierten Primern.
3. Klonierung der gesamten kodierenden Sequenzen einzelner putativer Gene des Shikimatstoffwechsels mittels RACE-Methoden.

#### 3.3.1 Erstellung ozoninduzierter subtraktiver cDNA-Banken

##### Herstellung der subtraktiven cDNA-Banken

Durch die Methode der subtraktiven Suppressionshybridisierung (SSH) können Gene identifiziert werden, die zwischen zwei Behandlungsvarianten differentiell induziert oder reprimiert sind [45]. Um einen Überblick über das Spektrum streßinduzierter Gene von Pflanzen zu bekommen, wurde diese Methode bereits in mehreren Studien mit krautigen Pflanzen erfolgreich angewendet [267, 268].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden, basierend auf dem Ozonexpositionsversuch A, zwei differentiell regulierte cDNA-Banken erstellt, durch die frühzeitig (SSH1)



**Abbildung 3.9:** Erstellung der subtraktiven cDNA-Bank SSH1. Teilbild A: Spur 1 und 2: doppelsträngige cDNA von ozonbehandelten und nicht behandelten Blättern, Spur 3: nicht pflanzliche Kontroll-cDNA, Spur 4-6: *RsaI*-Restriktionsverdau der Proben aus Spur 1-3. Teilbild B: Spur 1-6: cDNA aus ozonbehandelten Blättern (1,2), nicht behandelten Blättern (3,4) bzw. Kontroll-cDNA (5,6) mit (1,3,5) und ohne (2,4,6) subtraktive Suppressionshybridisierung nach der zweiten PCR-Reaktion. λM = DNA Größenstandard (bp).

und spät (SSH2) ozonregulierte Gene identifiziert werden sollten. Zur Erstellung der cDNA-Banken wurde im Falle der SSH1 Probenmaterial der ersten acht Probenahme-Zeitpunkte (4 h bis 5 d nach Expositionsbeginn) und im Falle der SSH2 Probenmaterial der späteren Ernten (7 d bis 30 d nach Expositionsbeginn) verwendet.

Für jede cDNA-Bank wurden aus den behandelten und den Kontrollpflanzen mRNA isoliert und in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Diese wurde mit der Endonuclease *RsaI* in kleinere Fragmente zerschnitten, mit Adaptoren ligiert und in zwei Hybridisierungsschritten für die selektive Amplifikation differentiell exprimierter DNA-Fragmente durch zwei Suppressions-PCR Reaktionen vorbereitet. Abbildung 3.9 zeigt die erhaltenen PCR-Produkte bei der Herstellung der cDNA-Bank SSH1.

Insgesamt konnten für SSH1 und SSH2 672 bzw. 576 ozonregulierte cDNA-Fragmente kloniert werden. Alle cDNA-Klone wurden, ausgehend von den Bakterien-Stammkulturen mittels PCR amplifiziert, durch PEG-Fällung gereinigt und schließlich sequenziert. Nach dem Entfernen flankierender Vektor-Sequenzbereiche wurden alle erhaltenen Sequenzdaten durch den 'Blastn'-Algorithmus [1] mit Einträgen aus öffentlichen Sequenz-Datenbanken verglichen.

Bezugnehmend auf den Datenbankeintrag mit der größten Homologie wurden die cDNA-Klone aus SSH1 und SSH2 dann nach dem Klassifizierungsschema des 'EU *Arabidopsis* Genom Projekts' [68] in die funktionellen Kategorien Primärstoffwechsel, Sekundärstoffwechsel, Energiestoffwechsel, Transkription, Proteinsynthese, Proteinmodifikation, Transporter, Intrazellulärer Transport, Zellstruktur, Signalweiterleitung und Krankheit/Abwehr eingeteilt.

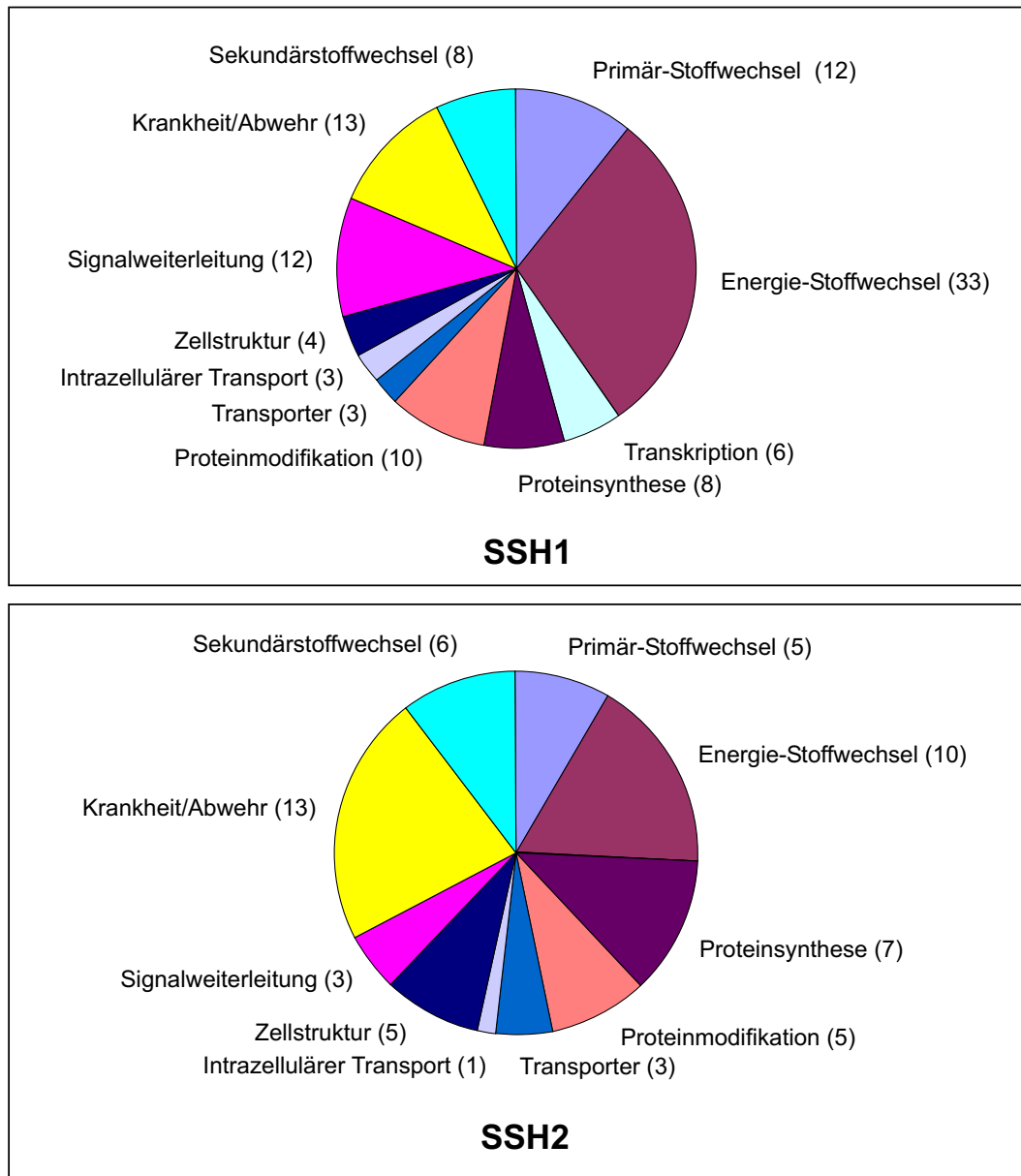
In diese Klassifizierung wurden nur solche cDNA-Sequenzen miteinbezogen, die

in einem Abschnitt von mindestens 30 Basen eine Homologie mit einem 'Blastn'-Erwartungswert (für eine zufällige Homologiezuordnung) von maximal  $10^{-4}$  zu einer veröffentlichten pflanzlichen DNA-Sequenz aufwiesen. So wurden beispielsweise die SSH-Klone SSH1P2D01 und SSH1P6F12 dem Bereich 'Energiestoffwechsel' zugeordnet, da diese mit 'Blastn'-Erwartungswerten von  $1^{-149}$  und  $5^{-97}$  sehr hohe Homologie zu publizierten cDNA-Sequenzen eines Chlorophyll a/b bindenden Proteins bzw. zu RUBISCO Aktivase aufwiesen. Durch dieses Selektionskriterium verblieben, nach Abzug redundanter cDNA-Sequenzen, in SSH1 und SSH2 213 und 100 cDNA-Klone. Eine Liste aller auf diese Weise funktionell klassifizierten cDNA-Klone aus SSH1 und SSH2 ist im Anhang unter 6.12, S. 214, zusammen mit der Akzessionsnummer, unter der sie bei NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) veröffentlicht wurden, aufgeführt. Sequenzen, die nicht eindeutig klassifiziert werden konnten oder am meisten Homologie zu unbekanntem Proteinen aufwiesen, sind in dieser Liste nicht berücksichtigt (101 bzw. 43 cDNA-Klone aus SSH1 und SSH2). Abbildung 3.10, S. 72 veranschaulicht die funktionelle Zuordnung der nicht redundanten cDNA-Klone aus SSH1 und SSH2.

In SSH1 wurden nahezu doppelt so viele nicht redundante cDNA-Sequenzen isoliert wie in SSH2, was einerseits auf die insgesamt höhere Zahl der Klone in SSH1, vor allem aber auf die höhere Redundanz innerhalb von SSH2 zurückzuführen ist. So wurden durch den 'Blastn'-Algorithmus [1] allein 81 der cDNA-Klone aus SSH2, die Homologie zu bekannten DNA-Sequenzen aufwiesen, als putative Kaffeesäure-*O*-Methyltransferase klassifiziert. Für weitere 12 cDNA-Klone wurde eine Ähnlichkeit zu dem PR-Gen *PR1* festgestellt. Mit Ausnahme von 55 cDNA-Klonen, die als putative 26S rRNA identifiziert wurden, wies die cDNA-Bank SSH1 dagegen kaum Redundanzen auf.

Die cDNA-Banken SSH1 und SSH2 waren bezüglich der funktionellen Klassifizierung der jeweiligen nicht redundanten cDNA-Klone in ihrer prozentualen Zusammensetzung relativ ähnlich (Abb. 3.10, S. 72). In der cDNA-Bank SSH1 wurden im Bereich 'Energie-Stoffwechsel' mit 33 nicht redundanten cDNA-Klonen deutlich mehr Sequenzen dieser Kategorie identifiziert als in SSH2, wobei 25 der entsprechenden homologen Gensequenzen im Bereich Photosynthese angesiedelt waren. Mit 12 im Gegensatz zu 3 cDNA-Klonen konnten in SSH1 auch deutlich mehr Sequenzen als in SSH2 identifiziert werden, die mit Signalweiterleitung assoziiert waren. Neben putativen Genen der Abscisinsäure-, Gibberellinsäure- und Ethylen-Biosynthese handelte es sich hierbei vor allem um Protein-Kinasen und -Phosphatasen. cDNA-Klone mit Homologie zu Genen der Transkriptionsregulation wurden ausschließlich zu Beginn der Ozonbehandlung (SSH1, 4 h bis 5 d) gefunden, nicht aber in SSH2 (7 d bis 30 d).

In absoluten Zahlen wiesen etwa gleich viele nicht redundante cDNA-Klone aus SSH1 und SSH2 Homologien zu Genen aus den Bereichen 'Sekundärstoffwechsel' und 'Krankheit/Abwehr' auf. Homologe Sequenzen aus dem Sekundärstoffwechsel stellten in beiden cDNA-Banken neben *O*-Methyltransferasen vor allem Gene aus der Flavonoid-Biosynthese dar, wobei drei der identifizierten cDNA-Klone sowohl in SSH1 als auch SSH2 vorlagen. Von den jeweils 13 cDNA-Sequenzen aus SSH1 und SSH2, die der funktionellen Gruppe 'Krankheit/Abwehr' zugeordnet worden



**Abbildung 3.10:** Funktionelle Zuordnung der nicht redundanten cDNA-Klone aus den subtraktiven cDNA-Banken SSH1 und SSH2 (Versuch A) gemäß dem Klassifizierungsschema des 'EU *Arabidopsis* Genom Projekts' [68]. SSH1 = früh ozonregulierte Gene (4 h bis 5 d), SSH2 = spät ozonregulierte Gene (7 d bis 30 d).

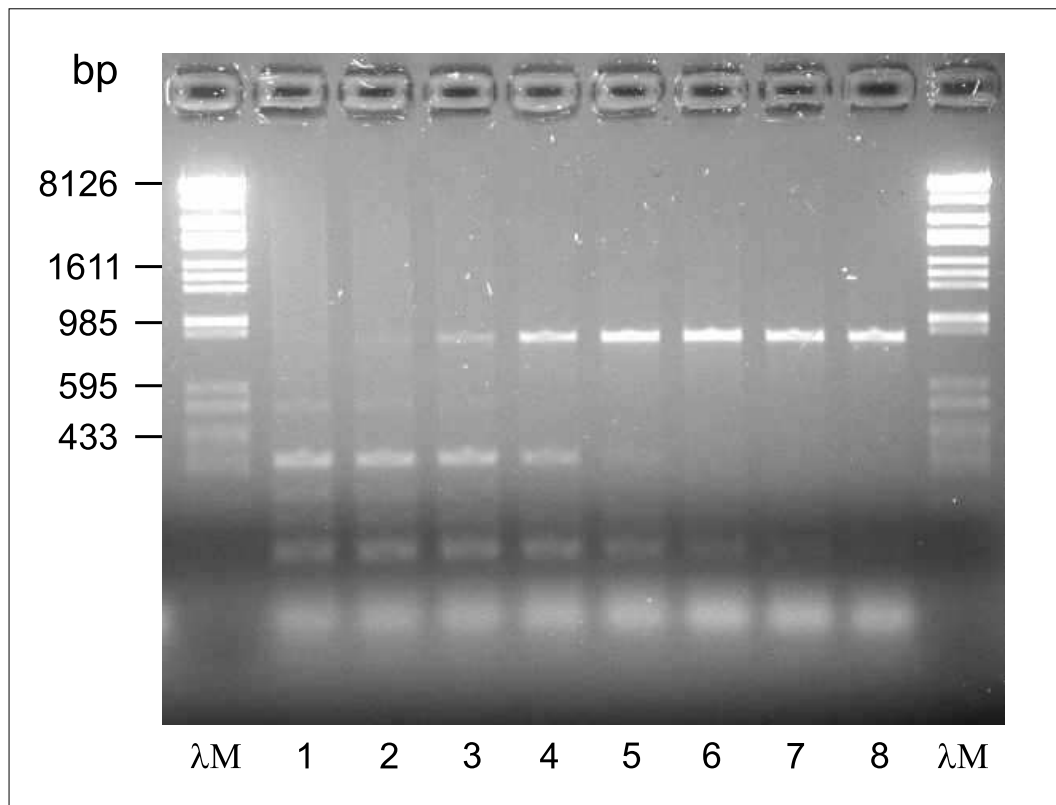
waren, konnten nur zwei, ein Catalase- und ein Lipoxygenase-Homolog, in beiden cDNA-Banken gefunden werden. Bei den anderen 11 cDNA-Klonen dieser Gruppe handelte es sich im Falle der SSH1 vor allem um PR-Proteine, Peroxidasen und 'heat shock'-Proteine, während im Falle der SSH2 neben *PR1* und weiteren Catalasen auch Glutathion-S-Transferasen identifiziert werden konnten (Tab. 6.12, S. 214). Gene des Shikimatstoffwechsels wurden weder in SSH1 noch in SSH2 kloniert. Mögliche Ursachen für diesen Befund werden unter 4.3, S. 146 diskutiert.

### 3.3.2 Klonierung von cDNA-Sequenzen putativer Gene des Shikimatstoffwechsels mit degenerierten Primern

Als Hauptziel der Genexpressionsstudien wurde der Shikimatstoffwechsel wegen seiner zentralen Bedeutung bei der Synthese aromatischer Vorstufen vieler, auch streßinduzierter Sekundärmetabolite ausgewählt. Deshalb wurde die Klonierung von mindestens einer Isoform für jedes der am Shikimatstoffwechsel beteiligten Gene 3-Deoxy-*D-arabino*-Heptulosonat 7-Phosphat Synthase (*DAHPS*), 3-Dehydroquinat Synthase (*DHQS*), 3-Dehydroquinat Dehydratase / Shikimat Dehydrogenase (*DHQD/SD*), Shikimat Kinase (*SK*), 5-Enolpyruvylshikimat 3-Phosphat Synthase (*EPSPS*) und Chorismat Synthase (*CS*) (siehe 1.4, S. 9) angestrebt. Zusätzlich zu den Enzymen des Shikimatstoffwechsel-Hauptwegs wurde versucht, eine Isoform der Chorismat Mutase (*CM*) zu klonieren, da dieses Enzym einerseits die direkte Fortsetzung des Shikimatstoffwechsels in Richtung der Synthese von Phenylalanin darstellt und andererseits bereits Untersuchungen zur Induzierbarkeit der *CM* durch Elicitoren vorliegen [190]. Um die ozonbedingte Regulation des Shikimatstoffwechsels in einen größeren Kontext pflanzlicher Reaktionen stellen zu können [228], wurde darüber hinaus die Klonierung von cDNA-Sequenzen aus der Ethylenbiosynthese und der Photosynthese angestrebt.

Für jedes dieser Gene wurden zunächst in der Sequenzdatenbank von NCBI je 4 bereits veröffentlichte cDNA-Sequenzen aus anderen Pflanzen ausgewählt und mit dem Programm MULTALIN [213] auf homologe Sequenzbereiche untersucht. Wenn möglich wurden hierbei cDNA-Sequenzen aus verholzenden Pflanzen ausgewählt. Die Sequenzen der degenerierten Primer wurden dann aus den ermittelten homologen Sequenzbereichen abgeleitet.

Je niedriger die Homologie zwischen den Vergleichssequenzen war, um so höher war die Anzahl der unbekannt Basen in den degenerierten Primern. Daher wurde zur Amplifikation der gesuchten cDNA-Fragmente aus der Buche eine Gradienten-PCR verwendet, um den unbekannt Anlagerungstemperaturen der degenerierten Primerpaare Rechnung zu tragen. Abbildung 3.11, S. 74 zeigt beispielhaft für die Klonierungen mit degenerierten Primern die elektrophoretische Auftrennung eines Gradienten-PCR-Ansatzes zur Klonierung eines Fragments der *DAHPS* aus der europäischen Buche. Man sieht deutlich, wie mit steigender Primer-Anlagerungstemperatur die Spezifität der PCR zunimmt und die Bildung von unerwünschten Nebenprodukten zurückgeht. In diesem Fall wurde das PCR-Fragment aus Spur 8 kloniert und sequenziert.



**Abbildung 3.11:** Gradienten-PCR mit degenerierten Primern zur Klonierung einer zwischen konservierten Bereichen liegenden Nukleinsäure-Sequenz, die für das Enzym DAHPS in der europäischen Buche kodiert. Primer-Anlagerungstemperaturen in den Spuren 1 bis 8: 45-60 °C. Das etwa 800 bp große Fragment aus Spur 8 wurde kloniert und sequenziert.

Für alle in folgender Liste aufgeführten Gene wurden durch PCR mit degenerierten Primern homologe cDNA-Fragmente aus der europäischen Buche amplifiziert. In Klammern sind jeweils die Bezeichnungen angegeben, unter denen in dieser Arbeit auf die klonierten cDNA-Fragmente Bezug genommen wird.

- 3-Deoxy-*D*-arabino-Heptulose-7-Phosphat Synthase 1 (*Fs-DAHPS1*)
- 3-Deoxy-*D*-arabino-Heptulose-7-Phosphat Synthase 2 (*Fs-DAHPS2*)
- 3-Deoxy-*D*-arabino-Heptulose-7-Phosphat Synthase 3 (*Fs-DAHPS3*)
- 3-Dehydroquinate Synthase (*Fs-DHQS*)
- 3-Dehydroquinate Dehydratase / Shikimate Dehydrogenase (*Fs-DHQD/SD*)
- Shikimate Kinase (*Fs-SK*)
- 5-Enolpyruvylshikimate 3-Phosphat Synthase (*Fs-EPSPS*)
- Chorismate Synthase (*Fs-CS*)
- Chorismate Mutase (*Fs-CM*)
- ACC Synthase 2 (*Fs-ACS2*)
- RUBISCO, kleine Untereinheit (*Fs-rbcS*)

Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden in den Vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy inkloniert und sequenziert. Bei dem Vergleich mit öffentlichen Datenbanken durch das Programm 'Blastn' (<http://blast.cbr.nrc.ca/>, [1]) wurde für alle Sequenzen ein Erwartungswert für eine zufällige Homologiezuordnung zu publizierten Sequenzen von weniger als 5<sup>-33</sup> ermittelt. Wegen dieser großen Homologie zu den veröffentlichten cDNA-Sequenzen ist anzunehmen, daß es sich bei den klonierten PCR-Produkten tatsächlich um Fragmente der gesuchten Gene handelte.

In Tabelle 3.1 sind die aus Buche klonierten cDNA-Fragmente sowie der Datenbankeintrag mit der höchsten Homologie zu dem entsprechenden cDNA-Fragment aufgeführt. Für die homologen cDNA-Sequenzen sind jeweils deren Akzessionsnummer, die Genbezeichnung, die paarweise Identität zwischen dem Buchen-cDNA-Klon und der homologen Sequenz und der durch 'Blastn' errechnete Erwartungswert einer zufälligen Homologiezuordnung angegeben.

**Tabelle 3.1:** Mit degenerierten Primern klonierte cDNA-Fragmente aus der europäischen Buche. Der Homologievergleich der cDNA-Klone wurde mittels 'Blastn' (<http://blast.cbr.nrc.ca/>, [1]) durchgeführt. AccNr. = Akzessionsnummer, PWI = paarweise Identität, E = 'Blastn' Erwartungswert einer zufälligen Homologiezuordnung.

cDNA-Fragmente		Homologe cDNA-Sequenz			
Bezeichnung	bp	AccNr.	Gen	PWI	E
<i>Fs-DAHPS1</i>	841	Y15113	<i>DAHPS3</i>	624/759 (82%)	1 <sup>-113</sup>
<i>Fs-DAHPS2</i>	841	U50544	<i>DAHPS</i>	629/748 (84%)	4 <sup>-150</sup>
<i>Fs-DAHPS3</i>	841	Y14797	<i>DAHPS1</i>	697/824 (82%)	2 <sup>-176</sup>
<i>Fs-DHQS</i>	744	L46847	<i>DHQS</i>	346/425 (81%)	7 <sup>-53</sup>
<i>Fs-DHQD/SD</i>	1085	AF033194	<i>DHQD/SD</i>	359/452 (79%)	8 <sup>-38</sup>
<i>Fs-SK</i>	285	X63560	<i>SK</i>	144/167 (86%)	5 <sup>-33</sup>
<i>Fs-EPSPS</i>	1157	AY150520	<i>EPSPS</i>	773/910 (81%)	0
<i>Fs-CS</i>	725	X60544	<i>CS</i>	586/722 (81%)	3 <sup>-89</sup>
<i>Fs-CM</i>	492	AJ004916	<i>CM</i>	210/255 (82%)	8 <sup>-33</sup>
<i>Fs-ACS2</i>	600	AY120898	<i>ACS2</i>	210/248 (85%)	3 <sup>-45</sup>
<i>Fs-rbcS</i>	562	AB006080	<i>RUBISCO</i> , kleine Untereinheit	555/563 (99%)	0

Die DNA-Sequenzen von *Fs-rbcS* und *Fs-ACS2* wurden unter den Akzessionsnummern AY705444 und AY705445 veröffentlicht. Angaben zu den Akzessionsnummern der putativen *DAHPS*-Isoformen *Fs-DAHPS1* und *Fs-DAHPS2* sowie der vollständigen kodierenden Sequenz von *Fs-DAHPS3*, *Fs-DHQS*, *Fs-DHQD/SD*, *Fs-SK*, *Fs-EPSPS*, *Fs-CS* und *Fs-CM* sind im Anhang unter 6.2, S. 203 aufgeführt.

### Klonierung von putativen Isoformen der *DAHPS* aus der europäischen Buche

Mit den degenerierten Primern *DAHPS*-d-f und *DAHPS*-d-r war zunächst nur eine Isoform der Buchen-*DAHPS* kloniert worden. Nach einem Vergleich dieses klonierten DNA-Fragments mit den Sequenzen dreier *DAHPS*-Isoformen von *Arabidopsis thaliana* (AccNr.: M74819, M74820, NM\_102090) wurden erneut degenerierte Primer

entworfen (*DAHPS*iso123-dF, *DAHPS*iso123-dR), um zu versuchen, in einer PCR-Reaktion ein Gemisch verschiedener *DAHPS*-Sequenzen der Buche zu amplifizieren.

Das erhaltene PCR-Produkt wurde in den Vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy inkloniert. Aus 24 Klonen wurde dann Plasmid-DNA isoliert, die in je zwei getrennten Reaktionen mit den Endonukleasen *AluI* und *HpaII* verdaut wurde. Beide Enzyme schneiden wegen ihrer kurzen Erkennungssequenz (jeweils 4 bp) durchschnittlich alle 256 Basen, so daß für jedes Restriktionsenzym etwa drei Schnitte innerhalb der inklonierten *DAHPS*-Fragmente (ca. 850 bp) zu erwarten waren. Die Restriktionsansätze wurden in einem Agarose-Gel (2%) aufgetrennt und auf unterschiedliche Restriktionsmuster hin untersucht, woraufhin die entsprechenden Klone sequenziert wurden.

Auf diese Weise konnten zwei weitere, zu dem bereits zuvor sequenzierten putativen *DAHPS*-Fragment sehr homologe cDNA-Fragmente kloniert werden. Im Vergleich mit öffentlichen Datenbanken ('Blastn', [1]) wiesen die drei putativen *DAHPS*-Sequenzen aus der Buche am meisten Homologie zu *DAHPS*-Sequenzen von *Morinda citrifolia* (AccNr. Y15113, Y14797) und *Medicago sativa* (AccNr. U50544) mit sehr niedrigen Erwartungswerten für eine zufällige Homologiezuordnung ( $1^{-113}$ ,  $2^{-176}$ ,  $4^{-150}$ ). Somit scheint es sich bei allen drei klonierten cDNA-Fragmenten um *DAHPS*-Isoformen zu handeln.

### Klassifizierung der putativen *DAHPS*-Isoformen aus *Fagus sylvatica*

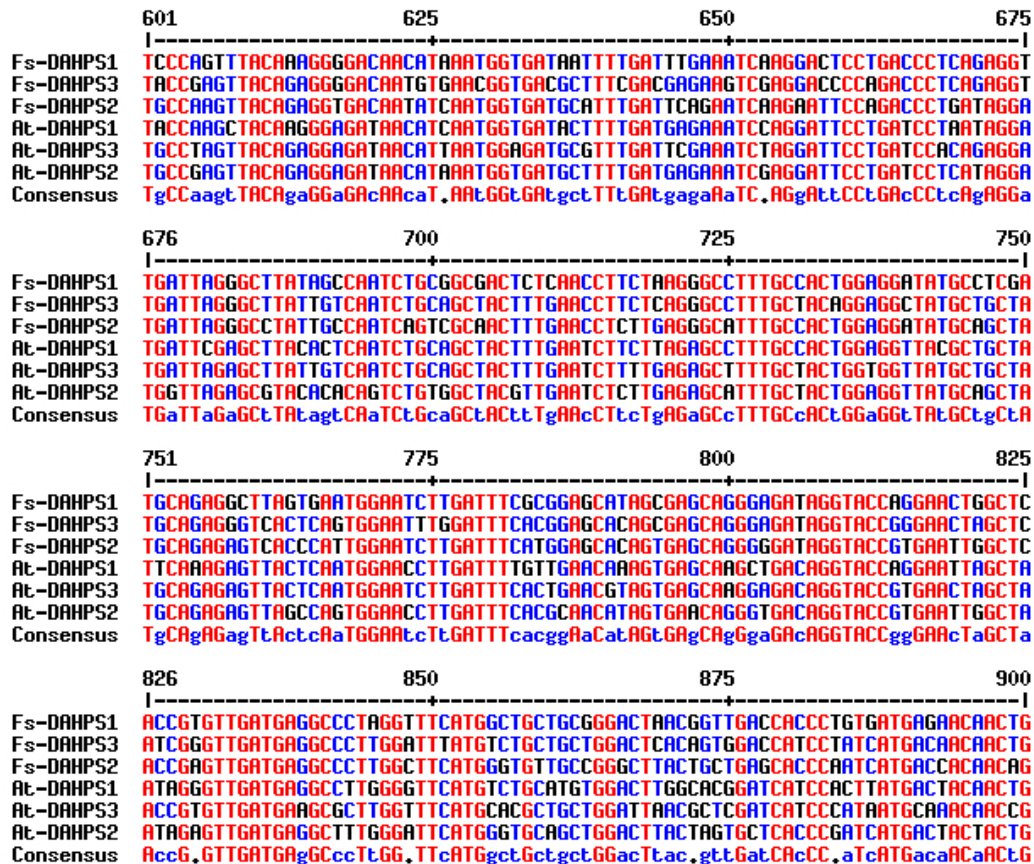
Zur Klassifizierung der aus *Fagus sylvatica* klonierten putativen *DAHPS*-Sequenzen (A, B und C) wurden diese mithilfe der Programme MULTALIN [213] und CLUSTALW (<http://clustalw.genome.jp/>) mit den beiden bekannten *DAHPS* Isoformen (*At-DAHPS1*, *At-DAHPS2*; AccNr.: M74819, M74820) [145] und einer putativen *DAHPS*-Sequenz (AccNr.: NM\_102090) aus *A. thaliana* auf Sequenzhomologien verglichen, wobei die Höhe der paarweisen Identität (PWI) zwischen diesen Sequenzen auf der Ebene der DNA- und der abgeleiteten Proteinsequenz bestimmt wurde.

Die putative *DAHPS*-Isoform aus *A. thaliana* weist in der kodierenden Sequenz mit 65% und 67% PWI hohe Homologie zu *At-DAHPS1* und *At-DAHPS2* auf. Die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Homologie-Zuordnung dieser Sequenz zu den beiden annotierten *DAHPS* Isoformen 1 und 2 liegt gemäß dem 'Blastn'-Algorithmus bei nur  $4^{-56}$  bzw.  $4^{-62}$ . Es scheint sich bei dieser cDNA-Sequenz also um eine dritte *DAHPS*-Isoform (*At-DAHPS3*) aus *A. thaliana* zu handeln. Darüber hinaus gibt es im Genom von *A. thaliana* keine weitere putative *DAHPS*-Sequenz mit einer ähnlich großen Homologie zu *At-DAHPS1* und *At-DAHPS2*.

In Abbildung 3.12 ist ein Ausschnitt des Alignments der drei putativen *DAHPS*-Fragmente aus der Buche mit diesen drei *DAHPS*-Sequenzen aus *A. thaliana* dargestellt. Es handelt sich hierbei um einen Teil der für die funktionelle Domäne der *DAHPS* kodierenden cDNA-Sequenz ('InterProScan', [346]).

Tabelle 3.2, S. 78 gibt die Prozentwerte der paarweisen Identitäten (PWI) beim Vergleich des homologen Sequenzbereichs (841 bp bzw. 280 Aminosäuren) der untersuchten cDNA-Sequenzen aus Buche und *A. thaliana* auf DNA- und Proteinebene an.





**Abbildung 3.12:** Alignment von drei putativen 3-Deoxy-*D*-arabino-Heptulosonat 7-Phosphat Synthase (*DAHPS*)-Isoformen aus *Fagus sylvatica* mit drei *DAHPS*-Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana*. Für die Erstellung des Alignments wurde das Programm MULTALIN [213] verwendet. Dargestellt ist eine Teil der cDNA-Sequenz, die für die funktionelle Domäne der *DAHPS* in *A. thaliana* kodiert.

Alle drei klonierten cDNA-Fragmente aus der Buche wiesen auf DNA-Ebene PWI-Werte zwischen von 76% bis 81% und auf Proteinebene PWI-Werte zwischen 83% und 92% zu den Sequenzen aus *A. thaliana* auf. Die höchste Identität ergab sich auf DNA-Ebene mit 81% PWI zwischen der *A. thaliana*-Sequenz für das Gen *DAHPS2* und dem Fragment B aus der Buche, während die entsprechenden PWI-Werte von Fragment A und C nur bei 78% und 77% lagen. Da es sich bei diesem Fragment also vermutlich um die zweite Isoform der *DAHPS* aus Buche handelte, wurde diese putative *DAHPS*-Isoform als *Fs-DAHPS2* bezeichnet.

Fragment A und C wiesen mit jeweils 79% PWI auf DNA-Ebene gleich hohe Homologie zu der putativen *DAHPS3*-Sequenz aus *A. thaliana* auf. Gegenüber der *DAHPS1* aus *A. thaliana* unterschieden sich die entsprechenden PWI-Werte der beiden Fragmente mit 77% und 76% nur leicht. Auf Proteinebene war die Homologie zwi-

**Tabelle 3.2:** Klassifizierung der putativen 3-Deoxy-*D*-arabino-Heptulosonat 7-Phosphat Synthase (*DAHPS*)-Isoformen A, B und C aus *Fagus sylvatica* anhand publizierter *DAHPS*-Isoformen aus *Arabidopsis thaliana* [145]. Die dargestellten Werte entsprechen dem durch das Programm CLUSTALW errechneten prozentualen Anteil der paarweisen Identität (PWI) beim Vergleich des 841 bp bzw. 280 Aminosäuren langen homologen Bereichs

	Publizierte <i>DAHPS</i> -Isoformen aus <i>A. thaliana</i>					
	<i>DAHPS1</i> M74819	<i>DAHPS2</i> M74820	<i>DAHPS3</i> NM_102090	<i>DAHPS1</i> M74819	<i>DAHPS2</i> M74820	<i>DAHPS3</i> NM_102090
	DNA-Sequenz (PWI in %)			Proteinsequenz (PWI in %)		
A	77	78	79	83	83	87
B	76	81	78	83	89	89
C	76	77	79	85	89	92

schen Fragment C und der putativen *DAHPS3* Isoform aus *A. thaliana* mit 92% PWI gegenüber einem Wert von 87% für Fragment A deutlich erhöht. Auf dieser Grundlage wurden die klonierten cDNA-Fragmente A und C als mutmaßliche *DAHPS*-Isoformen 1 und 3 klassifiziert und mit *Fs-DAHPS1* bzw. *Fs-DAHPS3* bezeichnet.

Die DNA-Sequenzen von *Fs-DAHPS1*, *Fs-DAHPS2* und *Fs-DAHPS3* wurden bei NCBI unter den Akzessionsnummern DQ166519, DQ166520 und DQ166521 veröffentlicht und sind im Anhang unter 6.2, S. 203 zu finden.

### 3.3.3 Anwendung von RACE-Methoden zur Klonierung der vollständigen kodierenden Sequenz einzelner Isoenzyme aus dem Shikimatstoffwechsel der Buche

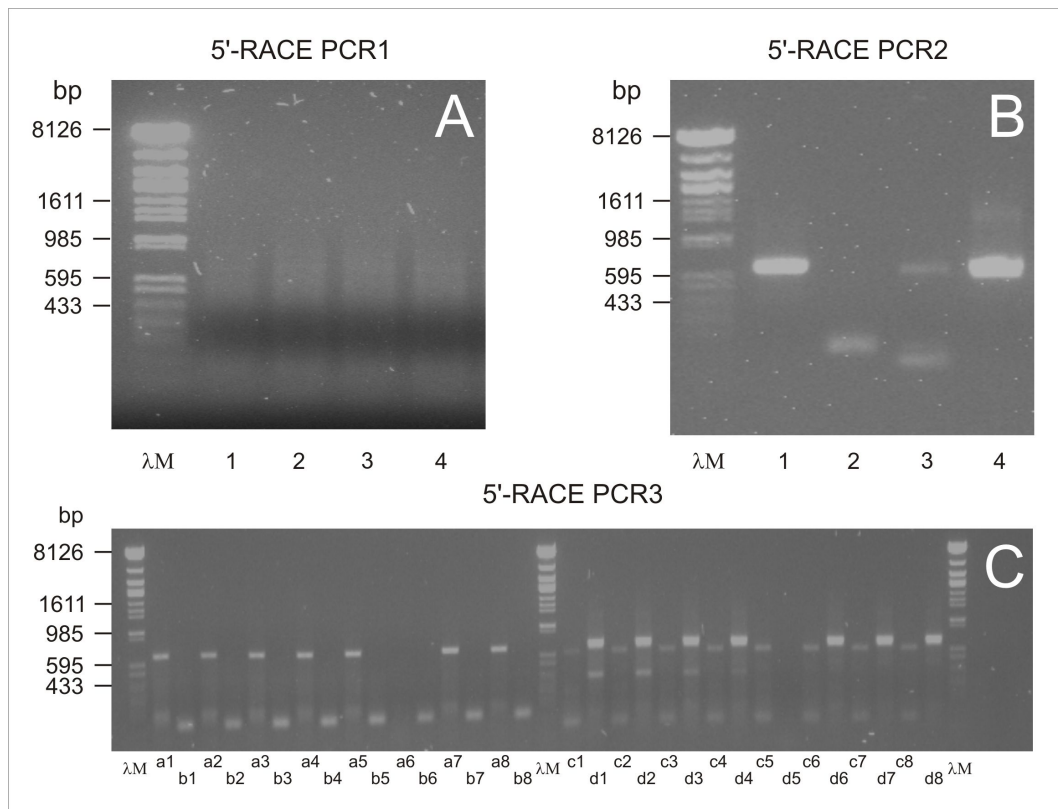
Zur genaueren Charakterisierung der mit degenerierten Primern klonierten Gen-Fragmente aus dem Shikimatstoffwechsel sollten die noch unbekanntes 3'- und 5'-Enden der cDNA mittels RACE-Methoden amplifiziert werden. Zudem sollte mittels der vollständigen kodierenden cDNA-Sequenz ausgewählte Enzyme des Shikimatstoffwechsels heterolog in *E. coli* exprimiert und als Antigen für die Synthese monoklonaler Antikörper verwendet werden. Mithilfe dieser Antikörper sollte, ergänzend zu den Genexpressionsuntersuchungen, eine Immunoblot-gestützte Quantifizierung der entsprechenden Enzyme des Shikimatstoffwechsels im Verlauf der Ozonexposition von Versuch C durchgeführt werden.

Die im Generacer-Kit der Firma Invitrogen realisierte RLM-RACE-Methode (RNase mediated rapid amplification of cDNA ends) begünstigte die Klonierung vollständiger cDNA-Sequenzen, da als Vorlage für die PCR-Schritte der RACE nur unbeschädigte mRNA verwendet wurde. Basierend auf dieser in cDNA transkribierten mRNA wurden jeweils drei bzw. zwei gestaffelte PCR-Reaktionen mit einem sequenzspezifischen und einem unspezifischen Primer durchgeführt, um die 5'- bzw. 3'-Enden der mit degenerierten Primern klonierten *Fs-DAHPS3*-, *Fs-DHQS*-, *Fs-DHQD/SD*-, *Fs-SK*-, *Fs-EPSPS*-, *Fs-CS*- und *Fs-CM*-Fragmente zu erhalten.

Die Verwendung von 'nested' Primern in der zweiten und, im Falle der 5'-RACE, dritten PCR stellte die Spezifität der jeweiligen PCR-Reaktion für das gesuchte cDNA-Ende sicher. Die spezifischen Primer für die Amplifikation der 5'- und 3'-cDNA Enden einer putativen *DAHPS*-cDNA-Sequenz wurden von dem mit degenerierten Primern amplifizierten cDNA-Fragment *Fs-DAHPS3* abgeleitet, da diese *Fs-DAHPS*-Isoform als Erste kloniert worden war und die Versuche zur Klonierung der anderen beiden *Fs-DAHPS*-Isoformen erst später durchgeführt wurden.

Abbildung 3.13, S. 80 zeigt die Produkte der 3 PCR-Reaktionen zur Amplifikation der 5'-cDNA-Enden der Gene *Fs-DAHPS3*, *Fs-DHQD/SD*, *Fs-SK* und *Fs-CS*. Bei der ersten PCR (Teilbild A) ist für keines der untersuchten Gene eine diskrete DNA-Bande im Agarose-Gel auszumachen, was vor allem auf die geringe Zahl der PCR-Zyklen zurückzuführen ist. Teilbild B zeigt die zweite RACE-PCR, bei der das gereinigte PCR-Produkt der ersten PCR mit 'nested'-Primern amplifiziert wurde. Hier zeichnen sich bereits konkrete DNA-Banden vom Hintergrund unspezifischer Amplifikate ab. In der dritten RACE-PCR (Teilbild C) konnten dann durch Verwendung eines Temperaturgradienten für die Primeranlagerungstemperatur singuläre DNA-Banden amplifiziert werden, die durch Elution aus einem Agarose-Gel aufgereinigt, einkloniert und sequenziert wurden.

Auf diese Weise wurde mittels RLM-RACE für jedes der putativen Gene des Shikimatstoffwechsels *Fs-DAHPS3*, *Fs-DHQS*, *Fs-DHQD/SD*, *Fs-SK*, *Fs-EPSPS*, *Fs-CS* und *Fs-CM* aus der Buche das entsprechende 3'- und 5'-cDNA-Ende amplifiziert, klo-



**Abbildung 3.13:** RACE-PCR Reaktionen zur Klonierung von 5'-Enden mutmaßlicher Gene des Shikimatstoffwechsels aus der europäischen Buche. Teilbild A und B: Die Spuren 1-4 enthalten die Produkte der ersten bzw. zweiten RACE-PCR-Reaktion für die Gene *Fs-DAHPS3*, *Fs-DHQD/SD*, *Fs-SK* und *Fs-CS*. Teilbild C: Die Spuren a1-a8, b1-b8, c1-c8 und d1-d8 enthalten jeweils die acht PCR-Reaktionen einer Gradienten-PCR (dritte 5'-RACE-PCR) für die Gene *Fs-DAHPS3*, *Fs-DHQD/SD*, *Fs-SK* und *Fs-CS*. Abkürzungen siehe 6.1, S. 202.

niert und sequenziert. Nach Zusammenführung der DNA-Sequenzinformationen aus den Klonierungen mit degenerierten Primern und aus 3'- und 5'-RACE konnte für jedes Gen ein offener Leserahmen mit hoher Homologie zu veröffentlichten Genen des Shikimatstoffwechsels ermittelt werden.

Tabelle 3.3, S. 81 gibt die Gesamtlänge der durch RLM-RACE und degenerierte Primer PCR erhaltenen cDNA-Sequenzen der putativen Gene des Shikimatstoffwechsels aus der Buche, die Länge des postulierten offenen Leserahmens und Informationen zur dessen Homologie mit bereits veröffentlichten cDNA-Sequenzen von Genen des Shikimatstoffwechsels aus anderen Pflanzen an. Es handelt sich hierbei, mit Ausnahme der *DAHPS*, um die ersten vollständigen cDNA-Sequenzen des Shikimatstoffwechsels, die aus Bäumen isoliert werden konnten.

Die kodierende Sequenz aller in Tabelle 3.3, S. 81 aufgeführten putativen Gene des Shikimatstoffwechsels aus der Buche wurde, wie unter 3.8.1, S. 130 beschrieben, aus-

**Tabelle 3.3:** Homologievergleich der kodierenden Sequenz putativer Gene des Shikimatstoffwechsels aus der Buche mit öffentlichen Datenbanken mittels 'Blastn' [1]. OLR = Offener Leserahmen (bp), AccNr. = Akzessionsnummer, PWI = paarweise Identität, E = 'Blastn'-Erwartungswert einer zufälligen Homologiezuordnung.

cDNA aus der Buche		Homologe cDNA-Sequenz				
Bezeichnung	cDNA/OLR	AccNr.	Pflanze	Gen	PWI	E
<i>Fs-DAHPS3</i>	1989/1620	M64261	<i>N. tabacum</i>	<i>DAHPS</i>	969/1147	0
<i>Fs-DHQS</i>	1741/1380	NM_180948	<i>A. thaliana</i>	<i>DHQS</i>	581/695	3 <sup>-130</sup>
<i>Fs-DHQD/SD</i>	2060/1611	AY578144	<i>N. tabacum</i>	<i>DHQD/SD</i>	367/456	9 <sup>-45</sup>
<i>Fs-SK</i>	982/909	X63560	<i>L. esculentum</i>	<i>SK</i>	262/324	4 <sup>-33</sup>
<i>Fs-EPSPS</i>	2085/1563	AY150520	<i>Vitis vinifera</i>	<i>EPSPS</i>	842/993	0
<i>Fs-CS</i>	1643/1305	AB122084	<i>Oryza sativa</i>	<i>CS</i>	550/659	5 <sup>-123</sup>
<i>Fs-CM</i>	1302/972	AJ004916	<i>Prunus avium</i>	<i>CM</i>	266/327	3 <sup>-37</sup>

gehend von cDNA mit *Pfu*-Polymerase amplifiziert. Für jedes untersuchte Gen wurde hierbei ein PCR-Amplifikat erzielt, das der erwarteten Länge der kodierenden Sequenz entsprach. Die erhaltenen Sequenzinformationen aus der Sequenzierung dieser Amplifikate wurden unter den Akzessionsnummern DQ166521 bis DQ166527 veröffentlicht und sind im Anhang unter 6.2, S. 203 aufgeführt.

## **3.4 Analyse der ozoninduzierten Genexpression mittels DNA-Chips**

### **3.4.1 Anfertigung der DNA-Chips**

Auf den in dieser Arbeit erstellten DNA-Chips wurden alle cDNA-Klone der beiden subtraktiven cDNA-Banken SSH1 und SSH2 zusammengefaßt. Die cDNA-Klone wurden dazu ausgehend von Bakterien-Stammkulturen mittels PCR amplifiziert, durch Isopropanol-Fällung aufgereinigt und dann nach dem in Abbildung 2.5, S. 42 aufgeführten Muster auf Aminoallyl-beschichtete Glas-Objektträger aufgebracht.

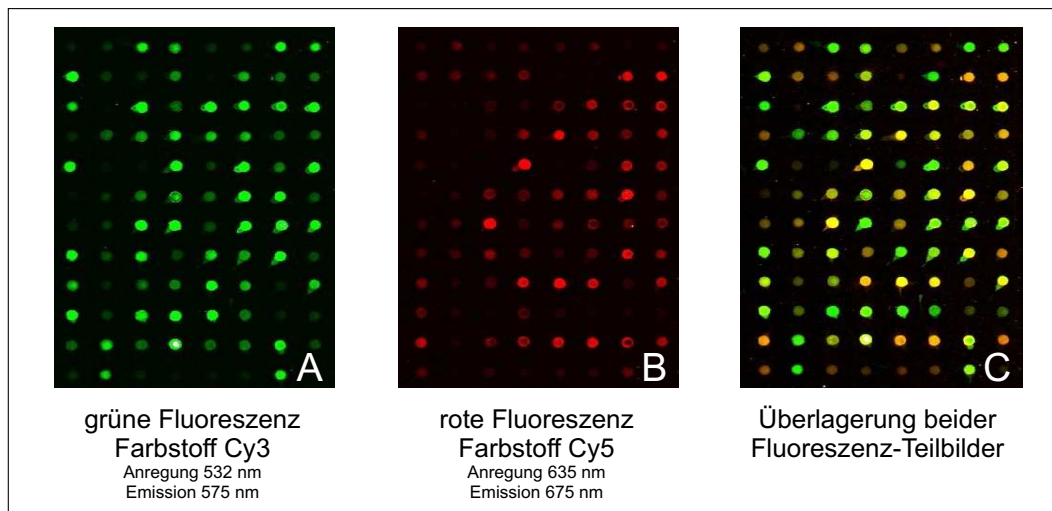
### **3.4.2 Untersuchung der cDNA-Banken SSH1 und SSH2 nach ozonregulierten cDNA-Klonen**

Zur Untersuchung der ozonregulierten Genexpression mittels der DNA-Chips wurde RNA aus Blattmaterial der gleichen Erntezeitpunkte von Versuch A isoliert, die bereits bei der Erstellung der subtraktiven cDNA-Banken verwendet worden waren. Für die Analyse früher und später ozonbedingter Genregulation wurde einerseits RNA der Erntezeitpunkte 4 h bis 5 d nach Versuchsbeginn (entspricht SSH1) und andererseits RNA der Erntezeitpunkte 7 d bis 30 d (entspricht SSH2) zu jeweils gleichen Teilen vereinigt und nach Transkription in cDNA zur Herstellung fluoreszenzmarkierter Sonden verwendet.

Beide Hybridisierungs-Experimente wurden auf einem zweiten DNA-Chip mit vertauschten Fluoreszenzmarkierungen der cDNA-Sonden wiederholt. Die hybridisierten DNA-Chips wurden im Scanner GenePix4000A eingelesen und anschließend mit der zugehörigen Software GenePixPro6.0 ausgewertet. Da jede cDNA-Sequenz in 2-facher Wiederholung auf die DNA-Chips aufgebracht worden war, konnten hierbei für Kontrolle und Behandlung jeweils 4 Meßwerte der Genexpression pro untersuchter cDNA erfaßt werden. Jeder dieser Meßwerte wurde durch die verwendete Software aus dem Unterschied der Fluoreszenzsignal-Intensitäten von Behandlung und Kontrolle errechnet.

Die Berechnung der Mittelwerte und des Mittelwert-Standardfehlers (SEM) aus den 4 Meßwerten pro Hybridisierungs-Experiment wurde in einem Tabellenkalkulationsprogramm durchgeführt. Abbildung 3.14, S. 83 zeigt für 96 Klone die Fluoreszenzsignale beider gemessenen Wellenlängen bei der Hybridisierung eines DNA-Chips mit cDNA-Sonden der späten Behandlungszeitpunkte von Versuch A (Teilbilder A und B) und die Überlagerung der beiden Fluoreszenz-Signale (Teilbild C).

Die Auswertung der Hybridisierungs-Experimente mit cDNA aus Blattmaterial der frühen Erntezeitpunkte (4 h bis 5 d) von Versuch A ergab sehr ähnliche Expressionswerte in den ozonbehandelten und den Kontrollproben. Die Genexpressionfaktoren der untersuchten cDNA-Sequenzen bewegten sich dabei in einem Bereich von 1,3-facher Induktion bis zu 1,2-facher Repression. Weder die schwach induzierten noch die



**Abbildung 3.14:** Ausschnitt eines Fluoreszenz-markierten DNA-Chips bei der Analyse ozonregulierter Gene. Die cDNA-Sonde der Kontrollprobe wurde hier mit dem Farbstoff Cy3 markiert, die der ozonbehandelten Probe mit Cy5. Das aus der Überlagerung der Teilbilder A und B resultierende Fluoreszenzsignal (Teilbild C) stellt für jeden Datenpunkt ein Maß für die Genexpression des entsprechenden cDNA-Klons dar.

schwach reprimierten cDNA-Klone konnten mehrheitlich funktionellen Gruppen wie dem Sekundärstoffwechsel oder dem Bereich 'Krankheit/Abwehr' zugeordnet werden. So befanden sich zum Beispiel cDNA-Sequenzen mit Homologie zu Genen der Photosynthese, aber auch zu Isoenzymen der Catalase sowohl unter den leicht induzierten als auch unter den leicht reprimierten cDNA-Klonen. Wegen der insgesamt schwachen Genexpressionsraten wurde dieses Hybridisierungs-Experiment nicht weitergehend ausgewertet.

Bei der Hybridisierung der DNA-Chips mit cDNA, die aus Blattmaterial der späten Erntezeitpunkte (7 d bis 30 d) von Versuch A isoliert worden war, konnte mit Expressionsfaktoren von 33-facher Induktion bis zu dreifacher Repression einzelner cDNA-Klone eine deutlich stärkere Genregulation beobachtet werden. Die am stärksten induzierten und reprimierten cDNA-Klone aus SSH1 und SSH2 sind, zusammen mit einer durch den 'Blastn'-Algorithmus [1] ermittelten homologen DNA-Sequenz aus öffentlichen Datenbanken, in Tabelle 3.4, S. 84 aufgeführt.

**Tabelle 3.4:** Analyse der ozonbedingten Genexpression von Klonen der subtraktiven cDNA-Banken SSH1 und SSH2 mittels DNA-Chips (Versuch A, 300 n/l O<sub>3</sub>, 8 h/d, 30 d). Der Homologievergleich der cDNA-Klone wurde mittels 'Blastn' [1] durchgeführt. SSH-Nr. = Nummer des SSH-cDNA-Klons, AccNr. = Genbank-Akzessionsnummer, EF = Expressionsnummer, SEM = Standardfehler des Mittelwerts, PWI = paarweise Identität, E = 'Blastn'-Erwartungswert.

Expression der cDNA-Klone		Publizierte DNA-Sequenz mit der höchsten Homologie zu dem SSH-cDNA-Klon					
SSH-Nr.	EF	SEM	AccNr.	Gen	Funktion	PWI	E
<b>ozoninduziert</b>							
SSH2P6C08	33	±2,1	AF220491	<i>O</i> -Methyltransferase	Sekundärstoffwechsel	53/61 (87%)	3-5
SSH1P3A04	25	±1,6	AF212316	Kaffeensäure- <i>O</i> -Methyltransferase	Sekundärstoffwechsel	73/84 (87%)	5-7
SSH2P5B01	22	±3,3	AJ130889	PR Protein <i>PR1</i>	Krankheit/Abwehr	69/77 (90%)	1-12
SSH2P1F12	15	±1,8	AY652864	Glutathion- <i>S</i> -Transferase (GST180)	Krankheit/Abwehr	97/117 (83%)	5-10
SSH1P3C09	8,7	±0,7	Y10464	Peroxidase	Krankheit/Abwehr	103/118 (87%)	1-22
SSH1P3A02	7,6	±0,7	DQ022748	putative endo-1,3,1,4- $\beta$ - <i>D</i> -Glucanase	Krankheit/Abwehr	125/151 (83%)	2-18
SSH2P6G01	6,8	±0,2	AJ417550	Gen für Allergen Cas s1 (ypr10)	Krankheit/Abwehr	60/67 (90%)	2-13
SSH2P1F05	6,4	±0,5	AJ420190	ACC Oxidase 1	Signalweiterleitung	248/248 (100%)	1-136
SSH2P3D05	5,4	±0,3	AY154649	ACC Oxidase 2	Signalweiterleitung	84/88 (96%)	4-31
SSH2P3B09	5,3	±1,1	U92650	ABC Transporter	Transporter	101/121 (84%)	4-13
SSH2P5G11	4,7	±0,5	AF048978	Glutathion- <i>S</i> -Transferase (GSTa)	Krankheit/Abwehr	79/92 (86%)	1-11
SSH1P1E03	4,5	±0,2	D55645	Catalase	Krankheit/Abwehr	135/158 (85%)	1-28
SSH2P3C10	4,0	±0,2	AJ278457	Flavanon-3-Hydroxylase (F3H)	Sekundärstoffwechsel	98/116 (85%)	3-15
<b>ozonreprimiert</b>							
SSH1P6F08	-1,9	±0,05	AY823263	Aquaporin (PIP2-1)	Transporter	108/120 (90%)	2-29
SSH1P4A12	-1,9	±0,03	U01964	Chlorophyll <i>a/b</i> -bind. Protein Typ I	Energiestoffwechsel	263/308 (85%)	2-64
SSH1P6G02	-2,0	±0,04	U01964	Chlorophyll <i>a/b</i> -bind. Protein (lhcb1*7)	Energiestoffwechsel	219/260 (84%)	5-49
SSH1P7E12	-2,2	±0,06	AB080194	9- <i>cis</i> -Epoxycarotenoid Dioxygenase	Signalweiterleitung	50/56 (89%)	2-7
SSH1P6F12	-2,2	±0,05	Z21794	RUBISCO Aktivase	Energiestoffwechsel	340/394 (86%)	5-97
SSH1P4E03	-2,3	±0,02	X16535	Chlorophyll <i>a/b</i> -bind. Protein <i>Cab4</i>	Energiestoffwechsel	105/119 (88%)	2-26
SSH1P6G12	-2,7	±0,04	AY492006	Fructose-bisphosphat Aldolase	Energiestoffwechsel	476/548 (87%)	1-143
SSH1P6G06	-3,2	±0,03	AY691333	MAPKK	Signalweiterleitung	128/155 (83%)	3-16



Die am stärksten induzierten cDNA-Klone wiesen vor allem Homologie zu Genen aus den funktionellen Bereichen 'Sekundärstoffwechsel' und 'Krankheit/Abwehr' auf, während sich unter den am stärksten reprimierten cDNA-Klonen vor allem solche mit Homologie zu Genen des Energiestoffwechsels fanden. Sowohl induzierte als auch reprimierte cDNA-Klone konnten den Bereichen 'Signalweiterleitung' und 'Transport' zugeordnet werden.

Aus dem Bereich 'Sekundärstoffwechsel' waren zwei putative *O*-Methyltransferasen am stärksten (33- und 25-fach) und eine putative Flavanon-3-Hydroxylase schwächer (4-fach) induziert. Unter den induzierten cDNA-Klonen, die dem Bereich 'Krankheit/Abwehr' zugeordnet worden waren, befanden sich vor allem PR-Gene und antioxidative Enzyme. Zwei putative Isoformen der ACC Oxidase aus dem Bereich 'Signalweiterleitung' waren mit Expressionsfaktoren von 6 und 5 ebenfalls deutlich induziert.

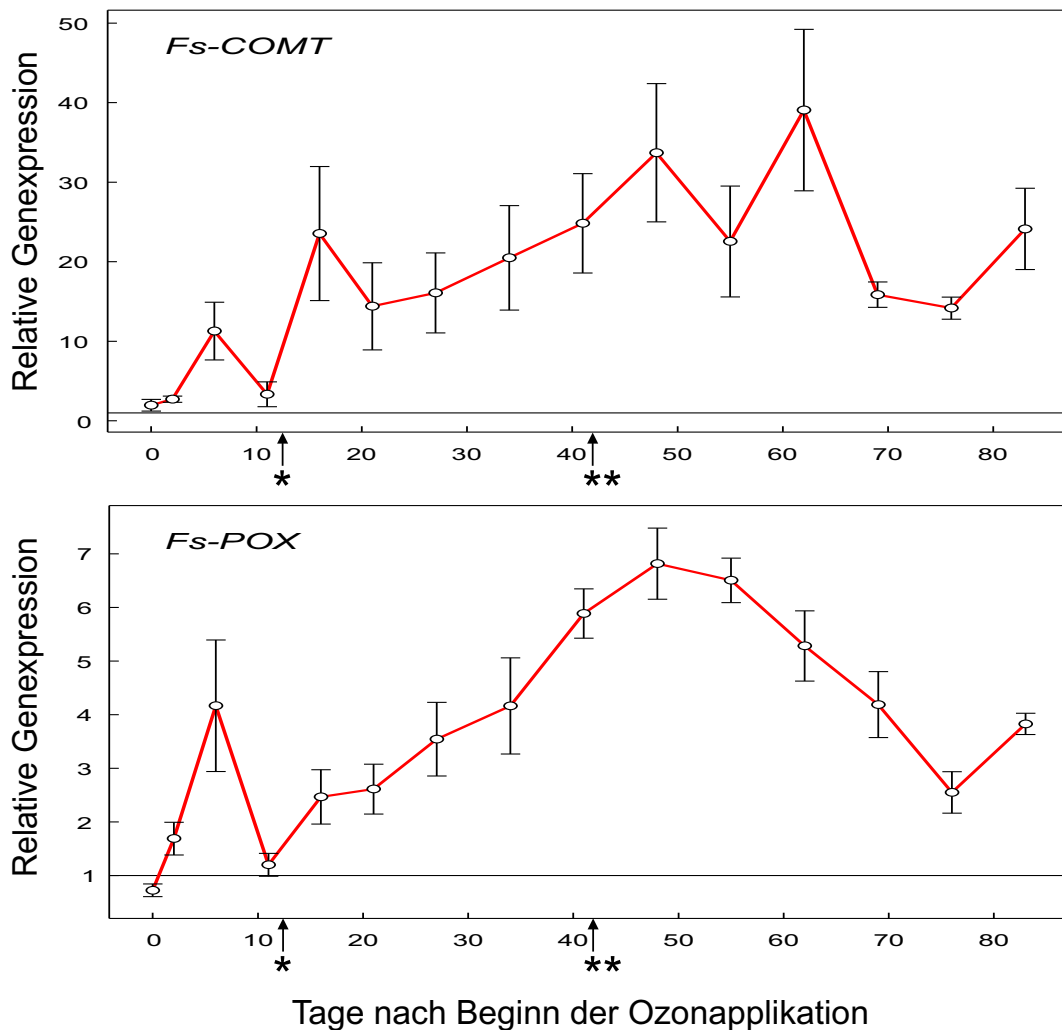
Bei den reprimierten cDNA-Klonen aus diesem funktionellen Bereich handelte es sich um homologe Sequenzen zu einer MAPKK (Mitogen aktivierte Protein Kinase Kinase) und dem an der Abscisinsäure-Biosynthese beteiligten Enzym 9-*cis*-Epoxy-carotinoid Dioxigenase, die in der ozonbehandelten Probe 3,2- bzw. 2,2-fach herunterreguliert waren. Die am stärksten reprimierten cDNA-Klone mit Homologie zu Genen des Energiestoffwechsels wurden gemäß 'Blastn'-Analyse als putative Chlorophyll-a/b-bindende Proteine, RUBISCO Aktivase und Fructose-Bisphosphat Aldolase identifiziert und waren zwischen 1,9-fach und 2,7-fach reprimiert.

### 3.4.3 Analyse der Genexpression einzelner SSH-Klone mittels quantitativer Realtime-PCR

Für zwei Klone aus den subtraktiven cDNA-Banken SSH1 und SSH2 wurde die in den DNA-Chip-basierten Hybridisierungsexperimenten ermittelte Genexpressionsrate durch quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR) überprüft. Hierzu wurden die stark ozoninduzierten cDNA-Klone SSH1P3C09 und SSH1P3A04 ausgewählt, die Homologie zu einer Peroxidase aus *Spinacia oleracea* und einer Kaffeesäure-*O*-Methyltransferase aus *Capsicum annuum* aufwiesen. Da weder in SSH1 noch in SSH2 Gene aus dem Shikimatstoffwechsel kloniert werden konnten, wurden diese beiden Gene, die hier als *Fs-POX* und *Fs-COMT* bezeichnet werden, für die Überprüfung der Hybridisierungsergebnisse ausgewählt. Wegen ihrer mutmaßlichen Beteiligung an der Ligninbiosynthese (4.6.4, S. 178) ist deren Regulation für die hier behandelte Fragestellung einer streßinduzierten Umsteuerung zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel ebenfalls von Interesse.

Die Genexpression von *Fs-COMT* und *Fs-POX* wurde im Verlauf der Ozonexposition C (150-190 n/l O<sub>3</sub>, 8 h/d, 84 d) ermittelt und ist in Abbildung 3.15, S. 86 dokumentiert. Sechs Tage nach Behandlungsbeginn zeigten *Fs-COMT* und *Fs-POX* ein erstes Maximum der Genexpression. Am elften Tag nach Behandlungsbeginn ging die Genexpression beider Gene wieder deutlich zurück, stieg nach der Erhöhung der

Ozonkonzentration von 150 n/l auf 190 n/l (8 h/d) am 13. Versuchstag wieder bis auf 33- und 7-faches Niveau an (48. Versuchstag) und nahm danach bis zum Versuchsende wieder ab. Die Maximalwerte der Genexpression wurden damit für beide Gene kurz nach dem Auftreten der ersten ozonbedingten Blattläsionen (42 Tage nach Behandlungsbeginn) ermittelt und liegen in der selben Größenordnung wie die Genexpressionsergebnisse der DNA-Chip-Hybridisierungen (Tab. 3.4, S. 84).



**Abbildung 3.15:** Analyse der ozonbedingten Genexpression von *Fs-COMT* und *Fs-POX* (Versuch C, 150-190 n/l, 8 h/d, 84 d). *COMT*: Kaffeesäure-*O*-Methyltransferase, *POX*: Peroxidase. Dargestellt ist jeweils der auf das Referenz-Gen *Fs-26SrRNA* normalisierte Mittelwert der Genexpression von 4 ozonbehandelten Pflanzen (Versuchsvariante a) relativ zum Mittelwert der Genexpression von 4 Kontrollpflanzen (Versuchsvariante k)  $\pm$  SEM. \* = Erhöhung der Ozonkonzentration von 150 n/l auf 190 n/l (8 h/d), \*\* = erste ozonbedingte Läsionen.

## 3.5 Regulation von Genen des Shikimatstoffwechsels

Zur Genexpressionsanalyse der putativen Gene des Shikimatstoffwechsels aus der Buche wurde die quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR) verwendet. Dazu wurden von den klonierten cDNA-Fragmenten *Fs-DAHPS1*, *Fs-DAHPS2*, *Fs-DAHPS3*, *Fs-DHQS*, *Fs-DHQD/SD*, *Fs-SK*, *Fs-EPSPS*, *Fs-CS* und *Fs-CM* Primerpaare zur Amplifikation eines jeweils etwa 100 bp großen PCR-Produkts abgeleitet und vor dem Einsatz in der qRT-PCR auf ihre Funktionalität überprüft.

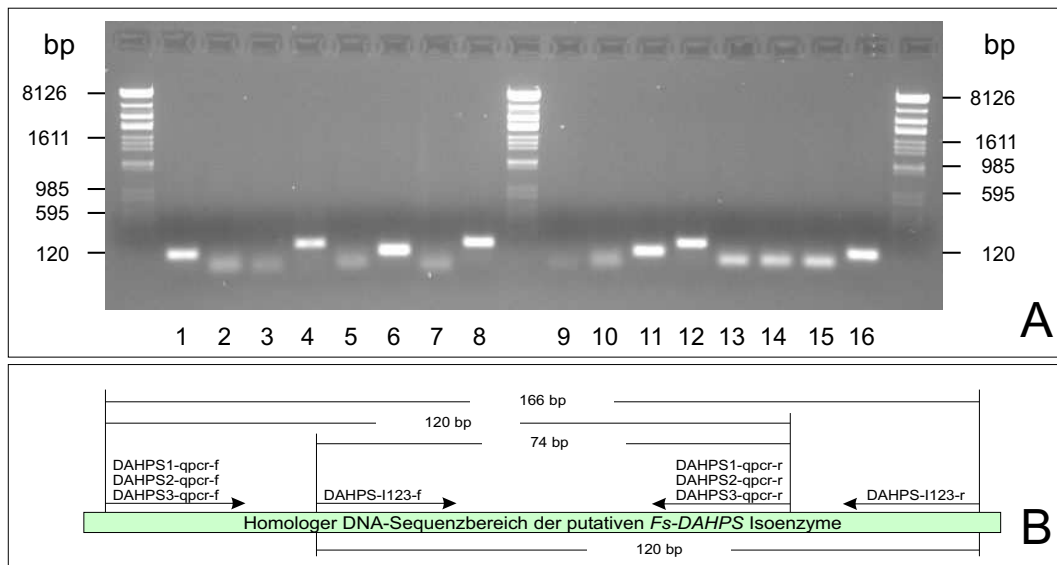
### 3.5.1 Differenzierung der DAHPS-Isoformen aus der europäischen Buche mittels quantitativer Realtime-PCR

Im Falle der drei putativen DAHPS-Isoformen *Fs-DAHPS1*, *Fs-DAHPS2* und *Fs-DAHPS3* wurden die entsprechenden qRT-PCR Primer in einem Sequenzbereich mit möglichst großen Unterschieden zwischen den einzelnen Isoformen gesetzt, um eine spezifische Amplifikation jeder Isoform bei der qRT-PCR zu erreichen. Die Überprüfung dieser Spezifität erfolgte mittels PCR unter den in der qRT-PCR verwendeten Reaktionsbedingungen und lieferte die in Abbildung 3.16, S. 88 gezeigten PCR-Produkte.

In 16 PCR-Reaktionen wurden die jeweils 3 Isoform-spezifischen Vorwärts- und Rückwärtsprimer und ein degeneriertes Primerpaar, mit dem alle *Fs-DAHPS*-Isoformen amplifiziert werden konnten, in allen möglichen Paarungen vor Vorwärts- und Rückwärts-Primern kombiniert. Tabelle 3.5, S. 88 faßt diese Primerkombinationen und die erwarteten PCR-Amplifikate zusammen.

In Teilbild A ist erkennbar, daß erwartungsgemäß nur mit den jeweils zueinander gehörenden Primerpaaren der putativen DAHPS-Isoformen ein diskretes PCR-Produkt von 120 bp Länge erhalten werden konnte. Die Kombinationen der spezifischen Primer mit Isoform-unspezifischen Primern lieferte, wie in Tabelle 3.5, S. 88 errechnet, PCR-Fragmente von 166 bzw. 74 bp Länge. Bei den Kombinationen unterschiedlicher isoformspezifischer Primer wurde in keinem Fall ein deutliches PCR-Amplifikat erhalten. Teilbild B gibt schematisch die Position der verwendeten Primer in dem homologen Bereich der putativen *Fs-DAHPS*-Isoformen und die erwartete Größe der PCR-Produkte an.

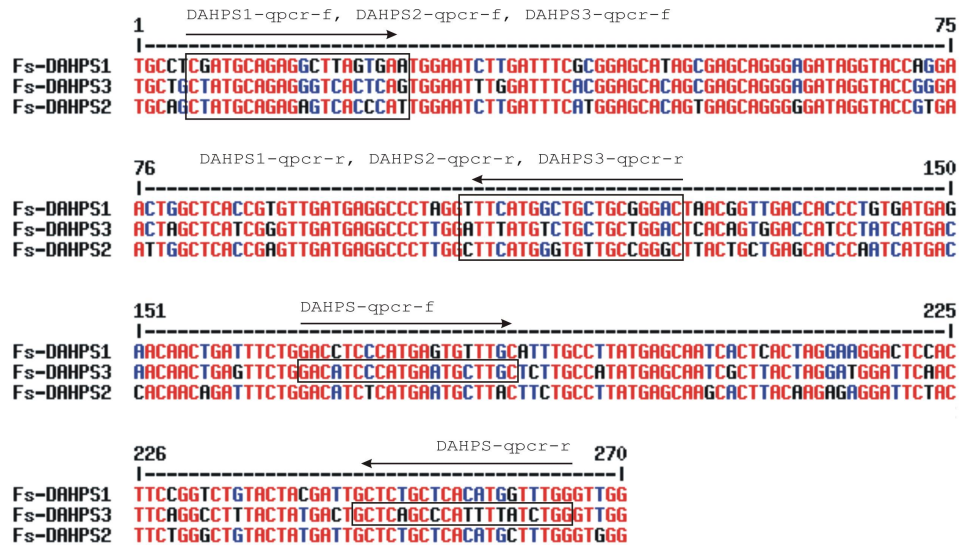
Die Expression der Gene *Fs-DAHPS1* und *Fs-DAHPS2* konnte erst bei Versuch C und D ermittelt werden, da die Sequenzen dieser beiden Isoformen zum Zeitpunkt der qRT-PCR-Analysen von Versuch A und B noch nicht isoliert worden waren. In den ersten beiden Versuchen wurde daher für die Bestimmung der relativen Genexpression der putativen DAHPS-Isoform *Fs-DAHPS3* noch nicht das für diese Isoform spezifische Primerpaar *DAHPS3-qpcr-f* und *DAHPS3-qpcr-r*, sondern das Primerpaar *DAHPS-qpcr-f* und *DAHPS-qpcr-r* verwendet.



**Abbildung 3.16:** Überprüfung der qRT-PCR Primer für die Genexpressionsanalyse der drei putativen *Fs-DAHPS*-Isoformen auf Spezifität. Teilbild A: 16 PCR-Reaktionen mit unterschiedlichen Primer-Kombinationen (siehe Tabelle 3.5) zur Analyse der Selektivität der qRT-PCR-Primer für das jeweilige *Fs-DAHPS*-Isoenzym.  $\lambda$ M = DNA-Größenstandard. B: Schematische Darstellung der Position der verwendeten Primer und der erwarteten Länge der PCR-Amplifikate.

**Tabelle 3.5:** Primerkombinationen zum Nachweis der Selektivität der qRT-PCR Primer für die drei putativen *DAHPS* Isoformen aus der Buche.

PCR-Produkt	Primer f	Primer r	Amplifikat	Amplifikat-Länge
Kombination 1	<i>DAHPS1</i> -qpcr-f	<i>DAHPS1</i> -qpcr-r	<i>DAHPS</i> Isoform 1	120 bp
Kombination 2	<i>DAHPS1</i> -qpcr-f	<i>DAHPS2</i> -qpcr-r	kein Produkt	
Kombination 3	<i>DAHPS1</i> -qpcr-f	<i>DAHPS3</i> -qpcr-r	kein Produkt	
Kombination 4	<i>DAHPS1</i> -qpcr-f	<i>DAHPS-I123</i> -r	<i>DAHPS</i> Isoform 1	166 bp
Kombination 5	<i>DAHPS2</i> -qpcr-f	<i>DAHPS1</i> -qpcr-r	kein Produkt	
Kombination 6	<i>DAHPS2</i> -qpcr-f	<i>DAHPS2</i> -qpcr-r	<i>DAHPS</i> Isoform 2	120 bp
Kombination 7	<i>DAHPS2</i> -qpcr-f	<i>DAHPS3</i> -qpcr-r	kein Produkt	
Kombination 8	<i>DAHPS2</i> -qpcr-f	<i>DAHPS-I123</i> -r	<i>DAHPS</i> Isoform 2	166 bp
Kombination 9	<i>DAHPS3</i> -qpcr-f	<i>DAHPS1</i> -qpcr-r	kein Produkt	
Kombination 10	<i>DAHPS3</i> -qpcr-f	<i>DAHPS2</i> -qpcr-r	kein Produkt	
Kombination 11	<i>DAHPS3</i> -qpcr-f	<i>DAHPS3</i> -qpcr-r	<i>DAHPS</i> Isoform 3	120 bp
Kombination 12	<i>DAHPS3</i> -qpcr-f	<i>DAHPS-I123</i> -r	<i>DAHPS</i> Isoform 3	166 bp
Kombination 13	<i>DAHPS-I123</i> -f	<i>DAHPS1</i> -qpcr-r	<i>DAHPS</i> Isoform 1	74 bp
Kombination 14	<i>DAHPS-I123</i> -f	<i>DAHPS2</i> -qpcr-r	<i>DAHPS</i> Isoform 2	74 bp
Kombination 15	<i>DAHPS-I123</i> -f	<i>DAHPS3</i> -qpcr-r	<i>DAHPS</i> Isoform 3	74 bp
Kombination 16	<i>DAHPS-I123</i> -f	<i>DAHPS-I123</i> -r	alle <i>DAHPS</i> Isoformen	166 bp



**Abbildung 3.17:** Position der zur Expressionsanalyse der drei putativen *F<sub>s</sub>*-DAHPS-Isoformen aus der europäischen Buche verwendeten quantitativen Realtime-PCR-Primer.

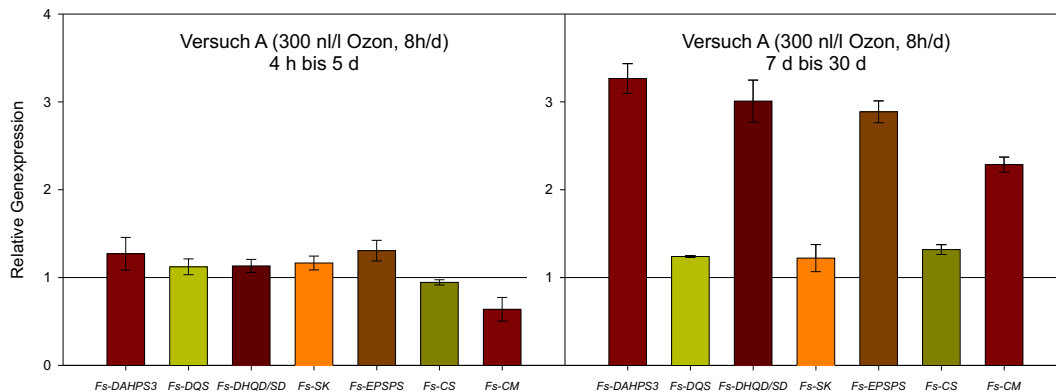
Wegen der großen Homologie der Sequenzen von *F<sub>s</sub>*-DAHPS1, *F<sub>s</sub>*-DAHPS2 und *F<sub>s</sub>*-DAHPS3 ist für dieses Primerpaar bei Versuch A und B nicht auszuschließen, daß neben *F<sub>s</sub>*-DAHPS3 auch die anderen beiden putativen *F<sub>s</sub>*-DAHPS-Isoformen in der qRT-PCR amplifiziert wurden. Abbildung 3.17 zeigt die Lage der verwendeten Primerpaare in dem entsprechenden Ausschnitt eines Alignments der drei klonierten putativen *F<sub>s</sub>*-DAHPS-Isoformen.

### 3.5.2 Versuch A: Erstellung ozonregulierter cDNA-Banken

Die ersten Untersuchungen zur Expression der klonierten putativen Gene aus dem Shikimatstoffwechsel der Buche wurden mit den gleichen cDNA-Proben aus Versuch A durchgeführt, die auch zur Herstellung der subtraktiven cDNA-Banken SSH1 und SSH2 verwendet worden waren.

Die durch zwei qRT-PCR-Analysen in je drei Wiederholungen ermittelte relative Expression der putativen Gene des Shikimatstoffwechsels *F<sub>s</sub>*-DAHPS3, *F<sub>s</sub>*-DHQS, *F<sub>s</sub>*-DHQD/SD, *F<sub>s</sub>*-SK, *F<sub>s</sub>*-EPSPS, *F<sub>s</sub>*-CS und *F<sub>s</sub>*-CM von den ozonbehandelten relativ zu den Kontrollbäumen der frühen und späten Erntezeitpunkte ist in Abbildung 3.18, S. 90 dargestellt. Wie unter 3.5.1, S. 87 erläutert, wurde bei dieser Untersuchung die putative DAHPS-Isoform *F<sub>s</sub>*-DAHPS3 mit dem Primerpaar DAHPS-qpcr-f und DAHPS-qpcr-r amplifiziert.

Zu den frühen Erntezeitpunkten von Versuch A (4 h bis 5 d nach Beginn der Ozonexposition) ist, mit Ausnahme einer 1,6-fachen Repression des Gens *F<sub>s</sub>*-CM, keine deutliche Regulation der Expression der untersuchten putativen Gene des Shikimat-



**Abbildung 3.18:** Analyse der ozonbedingten Genexpression putativer Gene des Shikimatstoffwechsels (*Fs-DAHPS3*, *Fs-DHQ*, *Fs-DHQD/SD*, *Fs-SK*, *Fs-EPSPS*, *Fs-CS*, *Fs-CM*) in den Blättern von je 9 ozonbehandelten und 9 unbehandelten dreijährigen Buchen zu frühen (4 h bis 5 d) und späten (7 d bis 30 d) Erntezeitpunkten (Versuch A, 300 n/l O<sub>3</sub>, 8 h/d, 30 d). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwerts (SEM) von 3 Wiederholungen an. Abkürzungen siehe 6.1, S. 202.

stoffwechsels zu erkennen. In der ozonbehandelten Probe sind die Gene *Fs-DAHPS3*, *Fs-DHQ*, *Fs-DHQD/SD*, *Fs-SK* und *Fs-EPSPS* bis maximal 1,3-fach gegenüber der Kontrollprobe induziert, während die Genexpression von *Fs-CS* in Behandlung und Kontrolle nahezu gleich hoch ist.

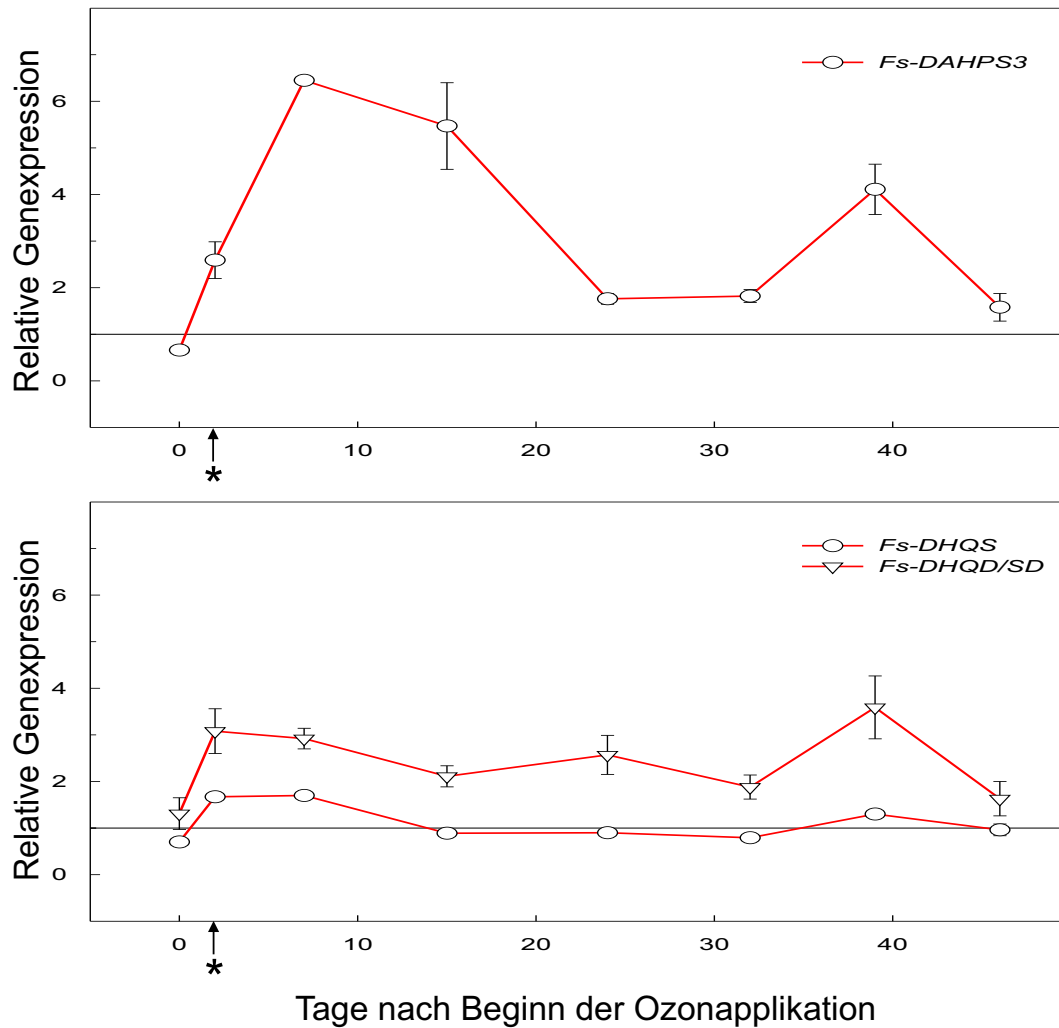
Im Gegensatz dazu wurden zu den späten Erntezeitpunkten von Versuch A (7 d bis 30 d) die Gene *Fs-DAHPS3*, *Fs-DHQD/SD*, *Fs-EPSPS* und *Fs-CM* mit Induktionsfaktoren von 2,8 bis 3,3 durch die Ozonbehandlung signifikant induziert (Tab. 6.14, S. 220). Eine leichte aber nicht signifikante Induktion (maximal 1,3-fach) konnte auch für die Gene *Fs-DHQ*, *Fs-SK* und *Fs-CS* beobachtet werden.

### 3.5.3 Versuch B: Expressionsanalyse von Genen des Shikimatstoffwechsels unter dem Einfluß von Ozon

In Versuch B wurde an dreijährigen Buchen der Einfluß von Ozon (200 n/l, 8 h/d, 46 d) auf die Expression der putativen Gene des Shikimatstoffwechsels *Fs-DAHPS3*, *Fs-DHQ*, *Fs-DHQD/SD*, *Fs-SK*, *Fs-EPSPS*, *Fs-CS* und *Fs-CM* am Ende einer Wachstumsperiode untersucht.

Wie unter 3.5, S. 87 erläutert, wurden für die Amplifikation des Gens *Fs-DAHPS3* die qRT-PCR Primer *DAHPS-qpcr-f* und *DAHPS-qpcr-r* verwendet. Die relative Genexpression zwischen ozonbehandelten und Kontrollpflanzen wurde neben den oben erwähnten putativen Genen des Shikimatstoffwechsels auch für die Gene *Fs-rbcS* und *Fs-PR1* ermittelt, die Homologie zur kleinen Untereinheit von *Ribulose-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (RUBISCO)* bzw. zum PR-Gen *PR1* aufweisen.

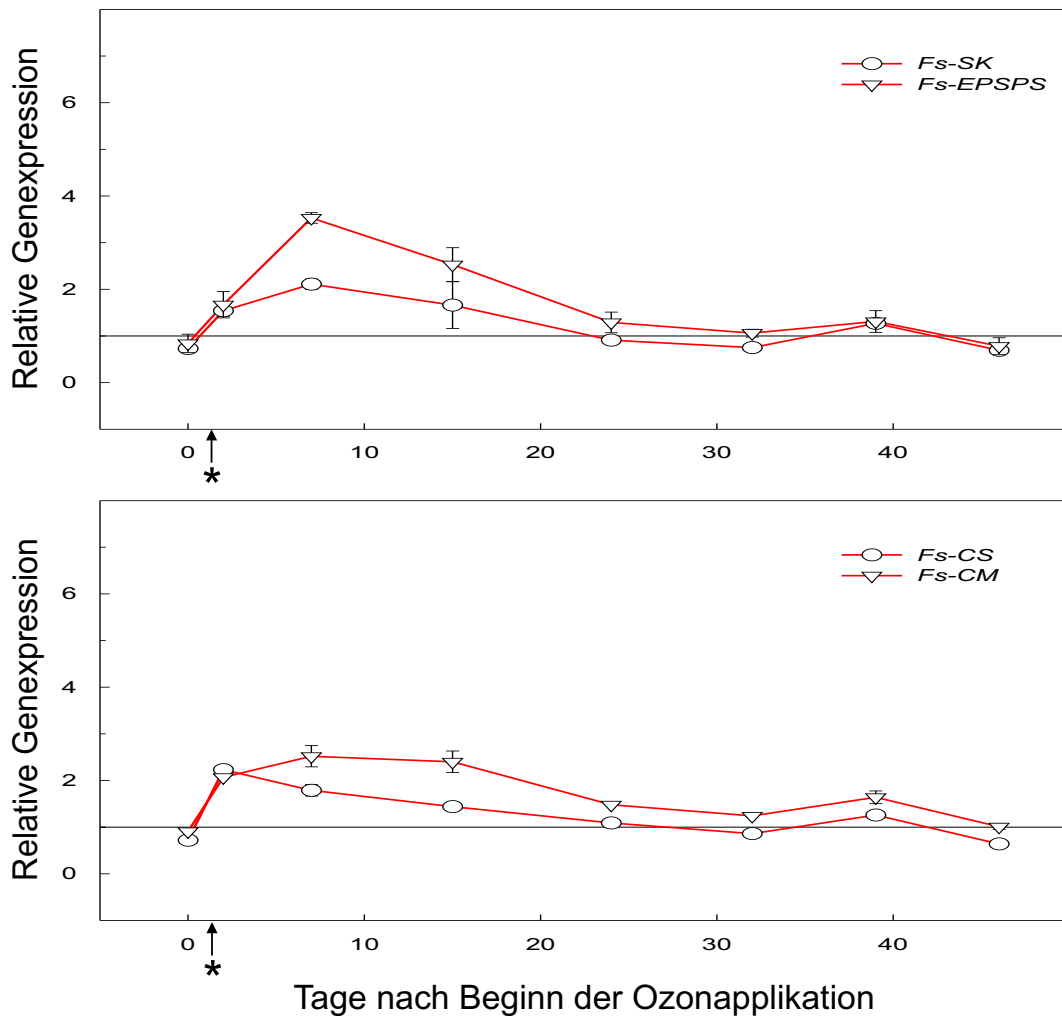
Die höchste relative Genexpression aller putativen Gene des Shikimatstoffwech-



**Abbildung 3.19:** Analyse der ozonbedingten Expression der putativen Gene des Shikimatstoffwechsels *Fs-DAHPS3*, *Fs-DHQS* und *Fs-DHQD/SD* (Versuch B, 200 nl/l, 8 h/d, 46 d). Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der relativen Genexpression zwischen 9 ozonbehandelten und 9 unbehandelten Versuchspflanzen  $\pm$  SEM (2-3 Wiederholungen). \* = erste ozonbedingte Läsionen. Abkürzungen siehe 6.1, S. 202.

sels wurde für *Fs-DAHPS3* ermittelt. Dieses Gen war in den ozonbehandelten Pflanzen bereits 2 Tage nach Beginn der Exposition, als an einer der Pflanzen die ersten ozonbedingten Symptome sichtbar wurden, mit dem Faktor 2,6 signifikant induziert und erreichte mit 6,5-facher Induktion ein Maximum nach 7 Tagen (siehe Abb. 3.19, Tab. 6.15, S. 221). Danach sank die Induktion bis zum 32. Tag auf den Faktor 1,8 ab. 39 Tage nach Behandlungsbeginn stieg die Genexpression von *Fs-DAHPS3* wieder auf den Faktor 4,1 an und reduzierte sich bis zum Versuchsende auf ein Niveau von 1,6-facher Induktion gegenüber der Kontrolle. *Fs-DHQS* war, mit Ausnahme einer leichten In-

duktion zwei bis sieben Tagen nach Versuchsbeginn, in den ozonbehandelten Buchen gegenüber den Kontrollbäumen kaum induziert (siehe Abb. 3.19, S. 91). Gegen Versuchsende war dieses Gen sogar leicht reprimiert. Zum Zeitpunkt der ersten sichtbaren Ozonsymptome, zwei Tage nach Versuchsbeginn, war das Gen *Fs-DHQD/SD* bereits 3,1-fach induziert. Die Expression blieb danach über den gesamten Versuchszeitraum in den ozonbehandelten Pflanzen mit bis zu 3,6-facher Induktion gegenüber den Kontrollpflanzen auf einem deutlich erhöhten Niveau.



**Abbildung 3.20:** Analyse der ozonbedingten Expression der putativen Gene des Shikimatstoffwechsels *Fs-SK*, *Fs-EPSPS*, *Fs-CS* und *Fs-CM* (Versuch B, 200 n/l, 8 h/d, 46 d). Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der relativen Genexpression zwischen 9 ozonbehandelten und 9 unbehandelten Versuchspflanzen  $\pm$  SEM (2-3 Wiederholungen). \* = erste ozonbedingte Läsionen. Abkürzungen siehe 6.1, S. 202.

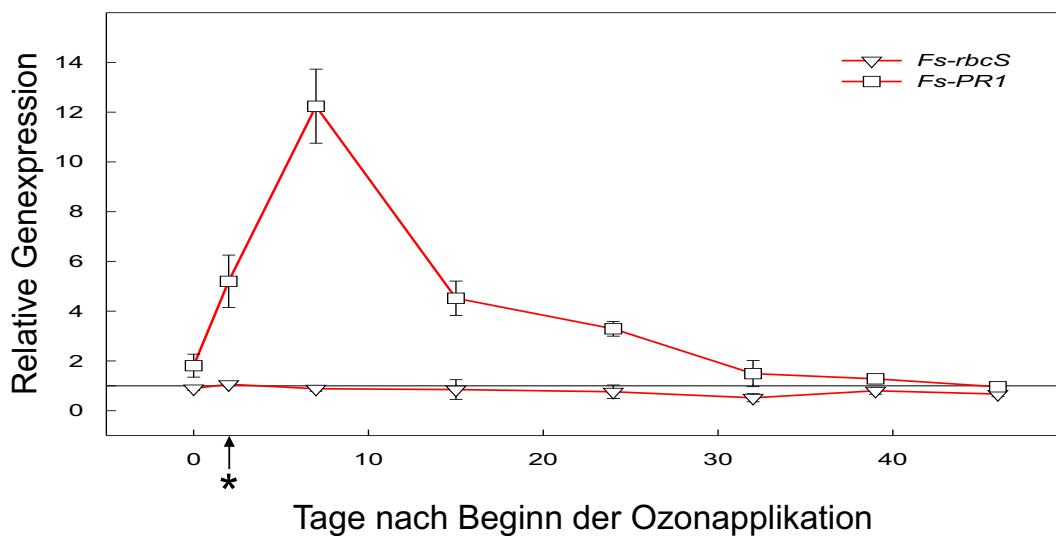
Die Expressionskinetiken der Gene *Fs-SK*, *Fs-EPSPS*, *Fs-CS* und *Fs-CM* gleichen sich bei diesem Versuch stark in ihrem Verlauf (Abb. 3.20). Alle vier Gene wiesen



zwei Tage nach Behandlungsbeginn eine erhöhte relative Genexpression auf, wobei *Fs-CS* und *Fs-CM* zu diesem Zeitpunkt etwa 2-fach, *Fs-SK* und *Fs-EPSPS* dagegen nur etwa 1,5-fach induziert waren. Während die Induktion der Gene *Fs-SK*, *Fs-EPSPS* und *Fs-CM* bis 7 Tage nach Versuchsbeginn noch anstieg, nahm die relative Genexpression von *Fs-CS* hier bereits wieder ab. Ab diesem Zeitpunkt reduzierte sich die ozonbedingte Induktion der Genexpression von *Fs-SK*, *Fs-EPSPS*, *Fs-CS* und *Fs-CM*, abgesehen von einem schwachen Anstieg der Induktionsfaktoren am 39. Tag, über den gesamten weiteren Expositionsverlauf.

### *Fs-rbcS* und *Fs-PR1*

Während die putative kleine Untereinheit der *RUBISCO* (*Fs-rbcS*) aus Buche im Verlauf der Ozonexposition von Versuch B bis zu 1,9-fach in ozonbehandelten Pflanzen gegenüber Kontrollpflanzen reprimiert war, erhöhte sich die Expression des Gens *Fs-PR1* bis zum siebten Tag nach Beginn der Ozonbehandlung auf ein Maximum von 12-facher Induktion (Abb. 3.21). Die Induktion von *Fs-PR1* ging von diesem Zeitpunkt an, trotz stetiger Zunahme der Blattläsionen, kontinuierlich auf ein ausgeglichenes Niveau zwischen den ozonbehandelten und den Kontrollpflanzen zurück.



**Abbildung 3.21:** Analyse der ozonbedingten Expression der Gene *Fs-rbcS* und *Fs-PR1* (Versuch B, 200 n/l, 8 h/d, 46 d). Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der relativen Genexpression zwischen 9 ozonbehandelten und 9 unbehandelten Versuchspflanzen  $\pm$  SEM (2-3 Wiederholungen). \* = erste ozonbedingte Läsionen. Abkürzungen siehe 6.1, S. 202.

### 3.5.4 Versuch C: Quantifizierung von Transkripten und Enzymen des Shikimatstoffwechsels unter biotischem und abiotischem Streß

In Versuch C wurde an vierjährigen Buchen im Gewächshaus die ozonbedingte Expression ausgewählter Gene über einen Zeitraum von etwa 3 Monaten untersucht. Hierbei sollten einerseits die Genexpressionsdaten aus Versuch A und B überprüft werden und andererseits Zusammenhänge zwischen der Genexpression, der Bildung von Sekundärmetaboliten und der Akkumulation von Enzymen des Shikimatstoffwechsels hergestellt werden. Die Ozonkonzentration lag zu Versuchbeginn bei 150 nl/l (8 h/d) und wurde ab dem 13. Tag auf 190 nl/l erhöht. Für die Genexpressionsanalyse wurden jeweils 4 Bäume pro Versuchsvariante verwendet. Die in der qRT-PCR ermittelten CT-Werte von behandelten und unbehandelten Bäumen wurden mittels der unter 2.6, S. 37 angegebenen Formel und unter Verwendung des Referenz-Gens *Fs-26SrRNA* in relative Genexpressionswerte umgerechnet.

Neben der ozonbehandelten Versuchsvariante a und der Kontrolle k wurden zudem, wie in Abbildung 2.3, S. 33 erläutert, die Versuchsvarianten b, c, d, e und f durchgeführt, um die Interaktion von biotischem Streß durch den Erreger der Buchenblattbräune (*A. errabunda*) und abiotischem Streß durch Ozon untersuchen zu können. Um den Erfolg der Infektion zu überprüfen, wurde neben der makroskopischen Bonitur der behandelten Pflanzen (3.2.2, S. 68) auch die quantitative Realtime PCR verwendet. Dabei wurde zum einen mit pathogenspezifischen Primern, die freundlicherweise von Günther Bahnweg zur Verfügung gestellt wurden, der Pilz-DNA-Anteil an der aus Blattproben extrahierten Gesamt-DNA bestimmt und andererseits die Genexpression der Gene *Fs-PRI* und *Fs-rbcL* für je 4 Bäume aller Versuchsgruppen (a, b, c, d, e, f, k) bestimmt. Als Zeitpunkt für diese Analysen wurde der 62. Tag nach Versuchsbeginn ausgewählt.

Weder in den mit Sporensuspension behandelten, noch in den unbehandelten Versuchsvarianten konnte durch Quantifizierung von Pilz-DNA mit pathogenspezifischen Primern mittels quantitativer Realtime-PCR ein Befall mit *A. errabunda* festgestellt werden. Dies entsprach den Befunden der optischen Bonitur (3.2.2, S. 68).

Die Genexpressionswerte in den sowohl ozonbehandelten als auch mit dem Pilz infizierten Versuchsvarianten c, d, e und f lagen im Falle von *Fs-PRI* mit einer durchschnittlich 15-fachen Induktion relativ zur Kontrollvariante k etwas niedriger als bei der ausschließlich mit Ozon behandelten Versuchsvariante a mit 21-facher Induktion. Das Gen *Fs-rbcL* war in Versuchsvariante a etwas stärker reprimiert als in den Versuchsvarianten c, d, e und f.

Zwischen der Genexpression von *Fs-rbcL* und *Fs-PRI* in der nicht ozonbehandelten, sondern ausschließlich mit dem Pilz infizierten Versuchsvariante b und der unbehandelten Versuchsvariante k konnte kein deutlicher Unterschied beobachtet werden. Tabelle 3.6, S. 95 zeigt für die Gene *Fs-rbcL* und *Fs-PRI* die Mittelwerte der Genexpression von je 4 Bäumen der Versuchsvarianten a, b, c, d, e und f relativ zum

**Tabelle 3.6:** Genexpression des *Fs-PRI*-Gens und der großen Untereinheit von RUBISCO aus der europäischen Buche (*Fs-rbcL*) in den Varianten a bis f des Ozonexpositionsversuchs C relativ zur unbehandelten Kontrollvariante k 62 Tage nach Versuchsbeginn. Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) von je 4 Versuchspflanzen  $\pm$  SEM.

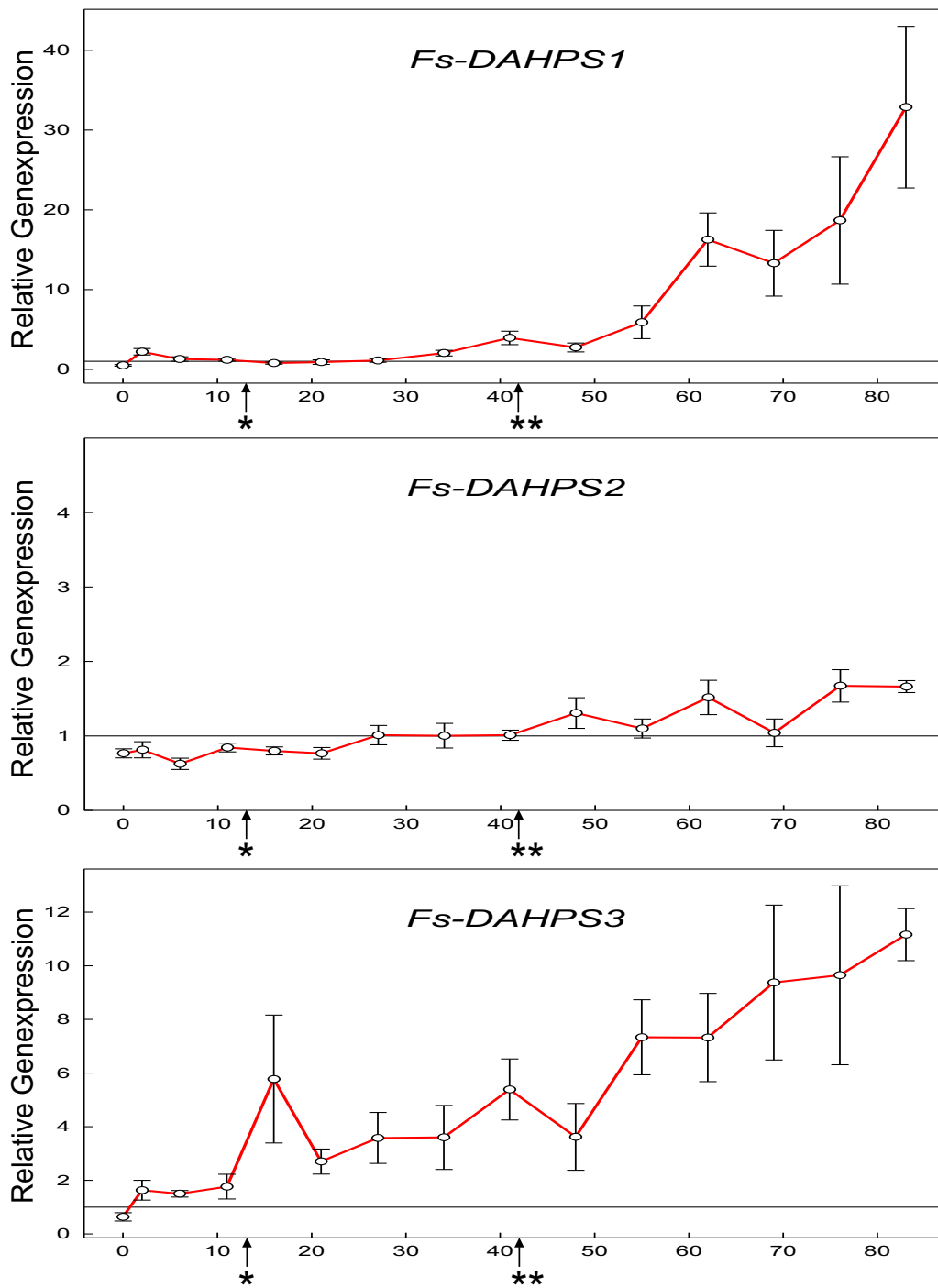
Variante	<i>PRI</i>		<i>rbcL</i>	
	MW	SEM	MW	SEM
a	21,27	$\pm 1,34$	0,29	$\pm 0,06$
b	1,01	$\pm 0,21$	1,00	$\pm 0,04$
c	12,08	$\pm 1,57$	0,40	$\pm 0,06$
d	14,33	$\pm 1,82$	0,43	$\pm 0,02$
e	18,94	$\pm 2,88$	0,40	$\pm 0,04$
f	13,26	$\pm 1,30$	0,35	$\pm 0,06$

Mittelwert der Genexpressionsdaten von 4 Bäumen der Kontrollvariante k.

Da der Nachweis einer erfolgreichen Infektion der Versuchsbäume aus den Varianten b, c, d, e und f mit *Apignomonía errabunda* weder mittels optischer Bonitur noch durch DNA-Quantifizierung geführt werden konnte, und bei der Genexpressionsanalyse von *Fs-PRI* und *Fs-rbcL* zwischen den Varianten b und k keine Unterschiede festgestellt werden konnte, wurde die weitere Genexpressionsanalyse von Genen des Shikimatstoffwechsels und der Ethylenbiosynthese auf den Streßfaktor Ozon und damit die beiden Versuchsvarianten a und k beschränkt.

### ***Fs-DAHPS1*, *Fs-DAHPS2* und *Fs-DAHPS3***

In Versuch C konnten erstmals die verschiedenen putativen *DAHPS*-Isoformen der Buche *Fs-DAHPS1*, *Fs-DAHPS2* und *Fs-DAHPS3* bei der ozonbedingten Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR differenziert werden. Die Tatsache, daß sich im Expressionsmuster der drei *DAHPS*-Isoformen starke Unterschiede zeigten, ist ein Hinweis darauf, daß die angestrebte Differenzierung der drei Isoformen erfolgreich war. Während die relative Genexpression der Isoform *Fs-DAHPS2* in den ozonbehandelten Bäumen über den gesamten Versuchszeitraum annähernd unverändert blieb und bis zum 27. Tag nach Behandlungsbeginn sogar eine leichte Reprimierung dieser Isoform zu erkennen war, waren die beiden Isoformen *Fs-DAHPS1* und *Fs-DAHPS3* zum Ende der Ozonbehandlung mit etwa 30-facher, bzw. 11-facher Genexpression in den ozonbehandelten Pflanzen signifikant gegenüber den unbehandelten Kontrollpflanzen induziert (Tab. 6.16, S. 222). In Abbildung 3.22, S. 96 sind die Zeitverläufe der relativen Genexpression der drei putativen *DAHPS*-Isoformen aus der Buche dargestellt.



Tage nach Beginn der Ozonapplikation

**Abbildung 3.22:** Ozonbedingte Expression von drei putativen 3-Deoxy-D-arabino-Heptulosonat 7-Phosphat Synthase Isoformen aus der Buche (Versuch C, 150-190 nl/l, 8 h/d, 84 d). Dargestellt ist jeweils der auf das Referenz-Gen *Fs-26SrRNA* normalisierte Mittelwert der Genexpression von 4 ozonbehandelten (Versuchsvariante a) relativ zum Mittelwert der Genexpression von 4 Kontrollpflanzen (Versuchsvariante k)  $\pm$  SEM. \* = Erhöhung der Ozondosis von 150 nl/l auf 190 nl/l, \*\* = erste ozonbedingte Läsionen. Man beachte die unterschiedliche Skalierung der Ordinaten.

Auch *Fs-DAHPS1* und *Fs-DAHPS3* unterschieden sich im Induktionsverlauf. So war für *Fs-DAHPS3* im Gegensatz zu *Fs-DAHPS1* ein konstanter Anstieg der Induktion ab Versuchsbeginn zu verzeichnen. Auch hatte die Erhöhung der Ozonkonzentration von 150 n/l auf 190 n/l scheinbar nur einen Einfluß auf die Expression von *Fs-DAHPS3*, nicht aber auf die von *Fs-DAHPS1*. Die Induktion von *Fs-DAHPS1* blieb 16 Tage nach Versuchsbeginn unverändert niedrig, während sich das Induktionsniveau von *Fs-DAHPS3* zu diesem Zeitpunkt mehr als verdreifachte. Die Expression von *Fs-DAHPS1* blieb unter dem Einfluß von Ozon zunächst auf niedrigem Niveau und nahm erst nach dem Auftreten erster Ozonläsionen deutlich zu.

### ***Fs-DHQS***

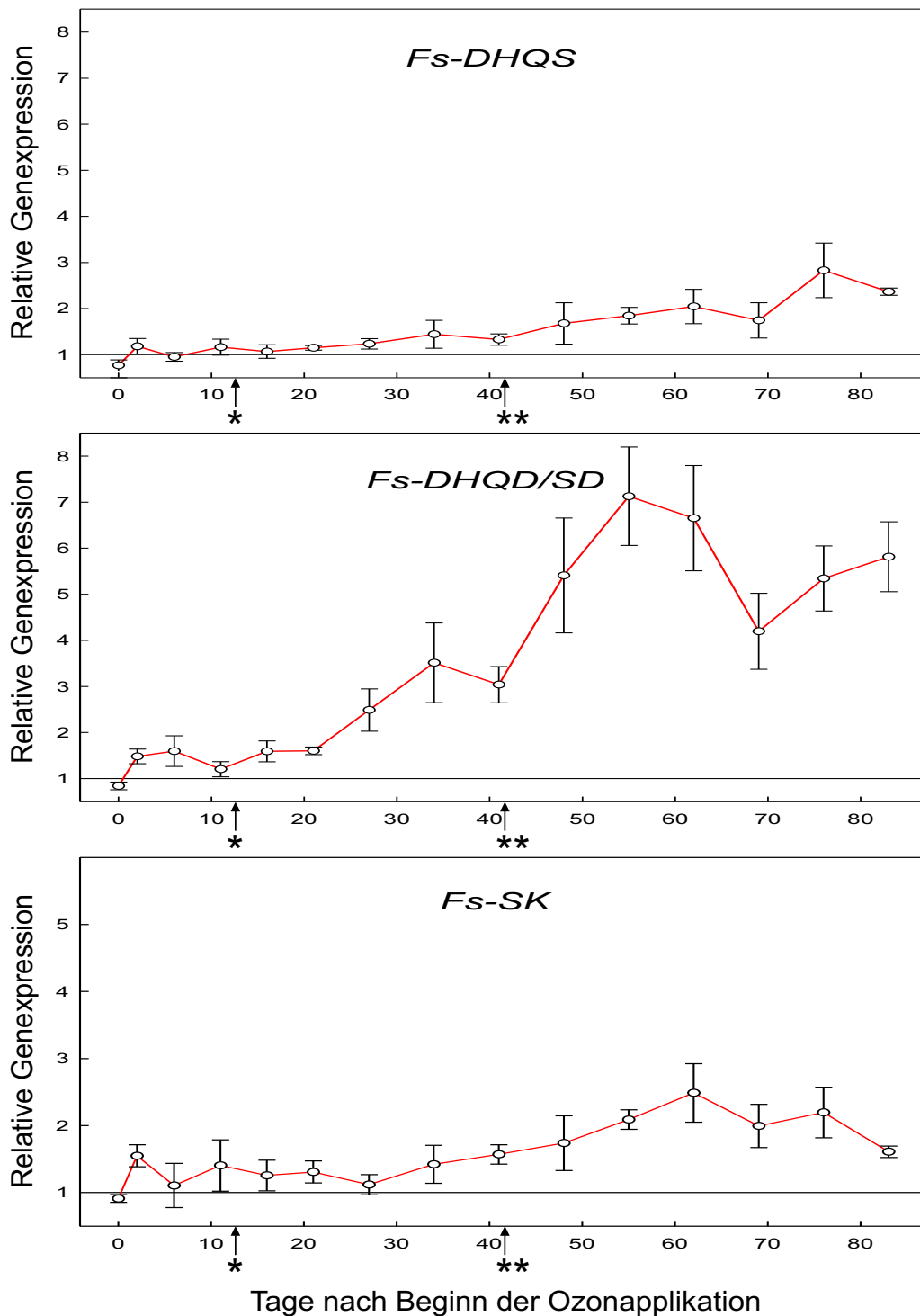
Wie Abbildung 3.23, S. 98 verdeutlicht, wurde die Expression der putativen *DHQS*-Isoform der Buche *Fs-DHQS* durch die Ozonbehandlung nur in geringem Umfang reguliert. Nach einem stetigen Anstieg konnte bis zum Versuchsende etwa eine Verdoppelung der Genexpression in den behandelten Pflanzen gegenüber den Kontroll-Bäumen festgestellt werden. Die Erhöhung der Ozonkonzentration und die Ausbildung erster makroskopischen Läsionen hatten keinen merklichen Einfluß auf die relative Genexpression von *Fs-DHQS*.

### ***Fs-DHQD/SD***

Bereits zwei Tage nach Beginn der Ozonbehandlung war das Gen *Fs-DHQD/SD* in den behandelten Pflanzen um 50% gegenüber der Kontrolle induziert. Nach der Erhöhung der Ozonkonzentration von 150 auf 190 n/l (8 h/d) erfolgte eine kontinuierliche Zunahme der Genexpression und erreichte nach 55 Tagen, 10 Tage nach dem Auftreten erster Ozonläsionen, mit 7-facher Induktion ein Maximum. Gegen Versuchsende reduzierte sich die relative Genexpression auf ein Niveau von vierfacher Induktion nach 69 Tagen. Bei der letzten Probenahme war das Gen *Fs-DHQD/SD* etwa 5-fach induziert. Der Verlauf der Genexpression von *Fs-DHQD/SD* in Versuch C kann der Abbildung 3.23, S. 98 entnommen werden.

### ***Fs-SK***

Der Genexpressionsverlauf der klonierten putativen Shikimat Kinase Isoform *Fs-SK* entsprach etwa der Induktionskinetik des Gens *Fs-DHQS*. Insgesamt war die ozonbedingte Induktion etwas deutlicher als bei *Fs-DHQS* und erreichte einen Maximalwert von 2,4 nach 62 Tagen, der allerdings bis zum Versuchsende wieder auf einen Wert von 1,5 zurückging. Die Erhöhung der Ozonkonzentration von 150 auf 190 n/l (8 h/d) und das Auftreten erster Blattläsionen schienen keinen Einfluß auf die Genexpression zu haben (Abb. 3.23, S. 98).



**Abbildung 3.23:** Analyse der ozonbedingten Expression der Gene *Fs-DHQS*, *Fs-DHQD/SD* und *Fs-SK* (Versuch C, 150-190 nl/l, 8 h/d, 84 d). Dargestellt ist jeweils der auf das Referenz-Gen *Fs-26S rRNA* normalisierte Mittelwert der Genexpression von 4 ozonbehandelten Pflanzen (Versuchsvariante a) relativ zum Mittelwert der Genexpression von 4 Kontrollpflanzen (Versuchsvariante k)  $\pm$  SEM. \* = Erhöhung der Ozondosis von 150 nl/l auf 190 nl/l (8 h/d), \*\* = erste ozonbedingte Läsionen. Abkürzungen siehe 6.1, S. 202.

### ***Fs-EPSPS***

Von allen putativen Genen des Shikimatstoffwechsels war die *Fs-EPSPS* zwei Tage nach Beginn der Ozonbehandlung mit einem Geninduktionsfaktor von 2,6 gegenüber der Kontrolle am stärksten induziert. Bis zur Erhöhung der Ozonkonzentration von 150 auf 190 nI/l (8 h/d) 13 Tage nach Versuchsbeginn blieb die Genexpression von *Fs-EPSPS* relativ konstant im Bereich 2-facher Induktion und erhöhte sich danach noch einmal kurzfristig um etwa 50%. Nach einem Abfall des Induktions-Niveaus auf 1,8 am 21. Versuchstag kam es bis zum Ende der Ozonexposition zu einer konstanten Zunahme der relativen Genexpression von *Fs-EPSPS* in den ozonbehandelten Pflanzen.

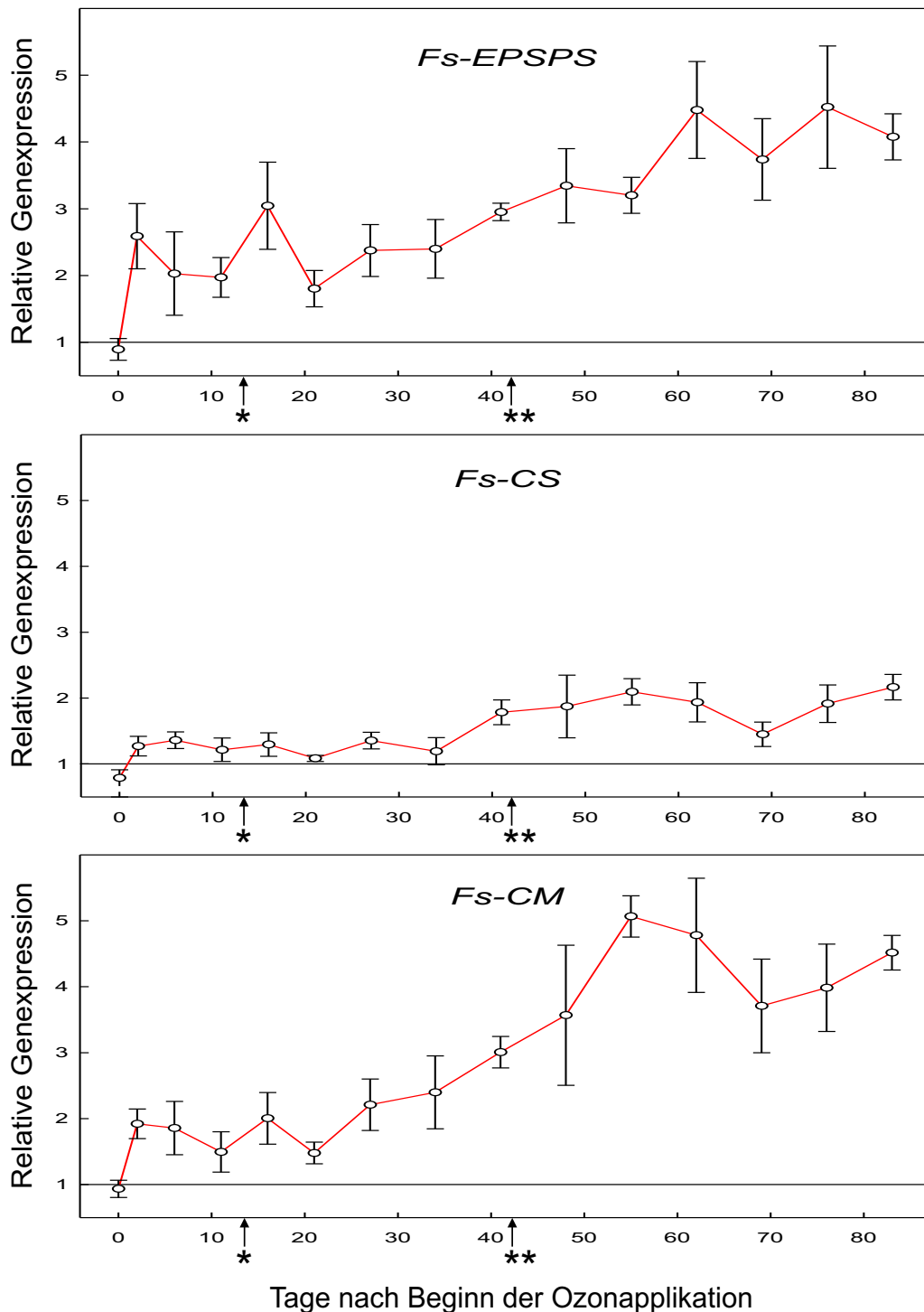
Wie aus Abbildung 3.24, S. 100 hervorgeht, waren die Induktionsverläufe von *Fs-EPSPS* und *Fs-DAHPS3* sehr ähnlich. Allerdings war *Fs-EPSPS* im Vergleich mit der putativen *DAHPS*-Isoform zu Beginn der Behandlung stärker und ab der Erhöhung der Ozonkonzentration bis zum Ende des Versuchs mit bis zu 4,5-facher Geninduktion weniger deutlich exprimiert als *Fs-DAHPS3*.

### ***Fs-CS***

Über den gesamten Verlauf des Versuchs war die putative Chorismat Synthase Isoform aus der Buche *Fs-CS*, ähnlich wie *Fs-DHQS* und *Fs-SK*, nur relativ schwach induziert. Die Erhöhung der Ozonkonzentration von 150 auf 190 nI/l (8 h/d) hatte keine erkennbaren Auswirkungen auf die Expression dieses Gens und erst während der Ausprägung erster makroskopischer Ozonläsionen erhöhte sich die Genexpression in den Bereich etwa 2-facher Induktion. Nach einem Rückgang auf 1,5-fache Induktion 62 Tage nach Versuchsbeginn wurde dieses Niveau bis zur letzten Probenahme wieder erreicht (Abb. 3.24, S. 100).

### ***Fs-CM***

Der in Abbildung 3.24, S. 100 dargestellte Expressionsverlauf der klonierten putativen Chorismat Mutase aus der Buche *Fs-CM* entsprach in Wesentlichen dem der *Fs-DHQD/SD*. *Fs-CM* war zwar mit einer Verdopplung der Genexpression gegenüber der Kontrolle zu Versuchsbeginn etwas stärker induziert als *Fs-DHQD/SD*, erreichte aber nach 55 Tagen mit 5-facher relativer Genexpression nicht ganz das Niveau der *Fs-DHQD/SD* zu diesem Zeitpunkt. Wie bei *Fs-DHQD/SD* wurde 69 Tage nach Versuchsbeginn ein Abfall und zum Versuchsende eine neuerliche Erhöhung der Genexpression mit Induktionswerten von 3,7 bzw. 4,5 beobachtet.

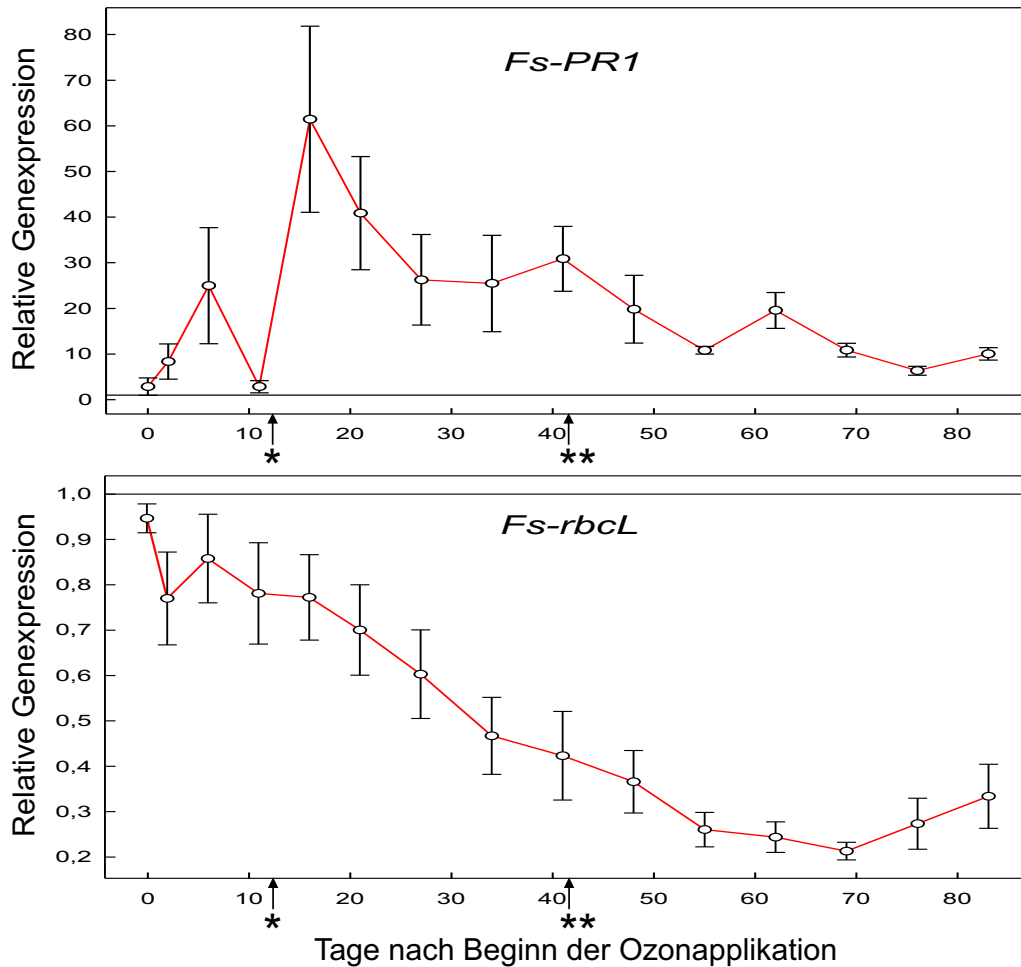


**Abbildung 3.24:** Analyse der ozonbedingten Expression *Fs-EPSPS*, *Fs-CS* und *Fs-CM* (Versuch C, 150-190 n/l, 8 h/d, 84 d). Dargestellt ist jeweils der auf das Referenz-Gen *Fs-26SrRNA* normalisierte Mittelwert der Genexpression von 4 ozonbehandelten Pflanzen (Versuchsvariante a) relativ zum Mittelwert der Genexpression von 4 Kontrollpflanzen (Versuchsvariante k)  $\pm$  SEM. \* = Erhöhung der Ozondosis von 150 n/l auf 190 n/l (8 h/d), \*\* = erste ozonbedingte Läsionen. Abkürzungen siehe 6.1, S. 202.



***Fs-rbcL* und *Fs-PR1***

Auch in Versuch C wurden, neben der Genexpression der oben beschriebenen putativen Gene des Shikimatstoffwechsels, der Induktionsverlauf der Gene *Fs-PR1* und *Fs-rbcL* gemessen. Abbildung 3.25 zeigt die Expression beider Gene während der gesamten Versuchsdauer.



**Abbildung 3.25:** Analyse der ozonbedingten Expression der Gene *Fs-PR1* und *Fs-rbcL* (Versuch C, 150-190 n/l, 8 h/d, 84 d). Dargestellt ist jeweils der auf das Referenz-Gen *Fs-26SrRNA* normalisierte Mittelwert der Genexpression von 4 ozonbehandelten Pflanzen (Versuchsvariante a) relativ zum Mittelwert der Genexpression von 4 Kontrollpflanzen (Versuchsvariante k)  $\pm$  SEM. \* = Erhöhung der Ozondosis von 150 n/l auf 190 n/l (8 h/d), \*\* = erste ozonbedingte Läsionen. Abkürzungen siehe 6.1, S. 202.

Wie in Versuch B war auch hier die Expression von *Fs-PR1* schon nach wenigen Tagen deutlich erhöht und erreichte nach 6 Tagen mit 25-facher Induktion gegenüber der Kontrolle ein erstes Maximum. Fünf Tage später hatte sich die Induktion von *Fs-*

*PR1* wieder auf einen Wert von 3 reduziert. Die Erhöhung der Ozonkonzentration von 150 auf 190 nl/l (8 h/d) am 13. Tag nach Beginn der Behandlung hatte einen signifikanten Anstieg der Genexpression von *Fs-PR1* auf ein maximales Niveau von 61-facher Induktion 16 Tage nach Behandlungsbeginn zur Folge (Tab. 6.17, S. 223). Von diesem Zeitpunkt an ging das Expressionsniveau dieses Gens kontinuierlich zurück.

Die Genexpression der großen Untereinheit von RUBISCO (*Fs-rbcL*) nahm im Verlauf der Ozonbehandlung in der behandelten Gruppe der Versuchsbäume stetig ab, bis sie 69 Tage nach Behandlungsbeginn nur noch 0,21 betrug, was einem Repressionsfaktor von 4,7 entspricht. Weder die Erhöhung der Ozonkonzentration auf 190 nl/l (8 h/d) noch das Auftreten der ersten makroskopisch sichtbaren Ozonsymptome hatte einen merklichen Einfluß auf die Reduktionsrate der relativen Genexpression.

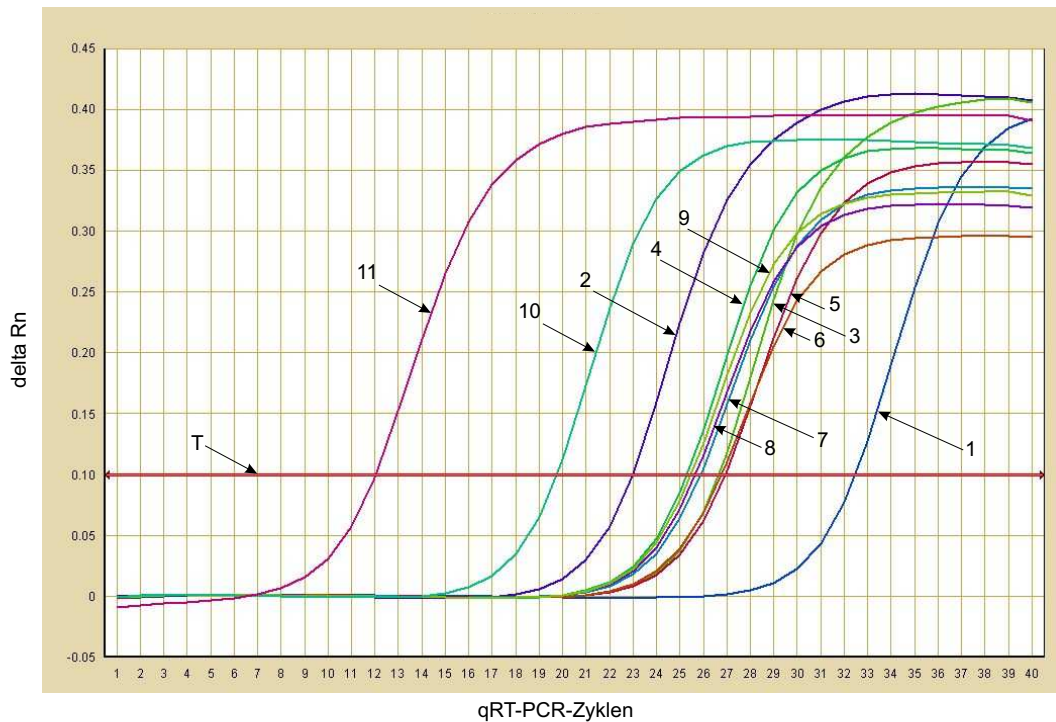
### **Expressionsverhältnis der putativen Gene des Shikimatstoffwechsels in der Buche**

Die bisher vorgestellten Genexpressionswerte basieren auf den CT-Wert-Differenzen von ozonbehandelten und Kontrollpflanzen und treffen damit Aussagen über den Einfluß von Ozon auf die relative Genexpression in den Buchenjungepflanzen zwischen beiden Behandlungsvarianten.

Um das Expressions-Verhältnis zwischen den einzelnen putativen Genen des Shikimatstoffwechsels zu untersuchen, wurde darüber hinaus für jedes Gen der Mittelwert aller CT-Werte der unbehandelten Pflanzen gebildet. Geht man davon aus, daß bei der qRT-PCR im für die Ableitung der CT-Werte verwendeten Zeitraum eine PCR-Effizienz von 2 vorlag, so entspricht die Differenz von zwei auf diese Weise errechneten Mittelwerten dem Logarithmus zur Basis 2 des absoluten Expressionsunterschieds zwischen den betrachteten Genen. So ergab sich zum Beispiel 69 Tage nach Behandlungsbeginn für die Gene *Fs-DAHPS1* und *Fs-DAHPS2* eine durchschnittliche CT-Wert-Differenz von 7,844, was einer  $2^{7,844} = 230$ -mal höheren Genexpression von *Fs-DAHPS2* gegenüber *Fs-DAHPS1* entspricht.

Beim Vergleich aller putativen Gene des Shikimatstoffwechsels zeigte sich, daß in den Kontrollpflanzen im Mittel über den gesamten Versuchszeitraum von dem Gen *Fs-DAHPS1* die wenigsten und von *Fs-DAHPS2* die meisten Transkripte vorlagen. So war das Gen *Fs-DAHPS2* im Versuchsverlauf durchschnittlich 6 mal häufiger als *Fs-DAHPS3*, 3 mal häufiger als *Fs-DHQS* und *Fs-CS*, 5 mal häufiger als *Fs-EPSPS* und *Fs-CM* und 9 bzw. 10 mal häufiger als *Fs-SK* bzw. *Fs-EPSPS* exprimiert.

Auffällig ist, daß die häufigsten Transkripte wie *Fs-DAHPS2*, *Fs-DHQS* und *Fs-CS* nur schwach durch Ozon reguliert wurden, während seltenere Transkripte wie *Fs-DHQD/SD* und *Fs-DAHPS3* einer deutlichen Regulation unterlagen. Beispielhaft sind in Graphik 3.26, S. 103 die CT-Werte aller untersuchten putativen Gene des Shikimatstoffwechsels für einen nicht mit Ozon behandelten Baum 69 Tage nach Versuchsbeginn dargestellt.



**Abbildung 3.26:** Expressionsniveau aller untersuchten putativen Gene des Shikimatstoffwechsels aus der europäischen Buche. Dargestellt sind beispielhaft die qRT-PCR Daten eines nicht ozonexponierten Baums 69 Tage nach dem Beginn von Versuch C (Variante k). Die CT-Werte der untersuchten Gene *Fs-DAHPS1*(1), *Fs-DAHPS2*(2), *Fs-DAHPS3*(3), *Fs-DHQS*(4), *Fs-DHQS/SD*(5), *Fs-SK*(6), *Fs-EPSPS*(7), *Fs-CS*(8), *Fs-CM*(9), *Fs-PRI*(10) und *Fs-rbcL*(11) leiten sich aus den Schnittpunkten der sigmoiden Kurven mit dem Schwellenwert T ab. delta Rn = normalisierte Fluoreszenz-Intensität. Abkürzungen siehe 6.1, S. 202.

### Varianzanalyse der Zeitkinetiken

Die Expressionsverläufe aller putativen Gene des Shikimatstoffwechsels und der Gene *Fs-rbcL* und *Fs-PRI* wurden zusammen mit Herrn Welzl (IDG, GSF Neuherberg) durch ein sogenanntes 'gemischtes statistisches Modell' in zweierlei Hinsicht analysiert. Einerseits wurde durch ein *lineares Modell* die Behauptung überprüft, daß die Ozonbehandlung einen Einfluß auf die gemessenen CT-Werte hatte. Andererseits wurde durch einen *globalen Test*, unter Berücksichtigung wiederholter Messungen an den einzelnen Bäumen, ermittelt, ob diese Unterschiede innerhalb der Zeitverläufe konsistent sind. In Tabelle 3.7, S. 104 sind die aus diesem Modell resultierenden p-Werte zusammengefaßt. Danach konnte für alle untersuchten putativen Gene des Shikimatstoffwechsels mit Ausnahme des nur schwach induzierten Gens *Fs-DAHPS2* und für die Gene *Fs-rbcL* und *Fs-PRI* gezeigt werden, daß sich die jeweiligen Zeitverläufe der Genexpression zwischen Ozonbehandlung und Kontrolle mindestens auf dem 5%-Niveau signifikant unterschieden.

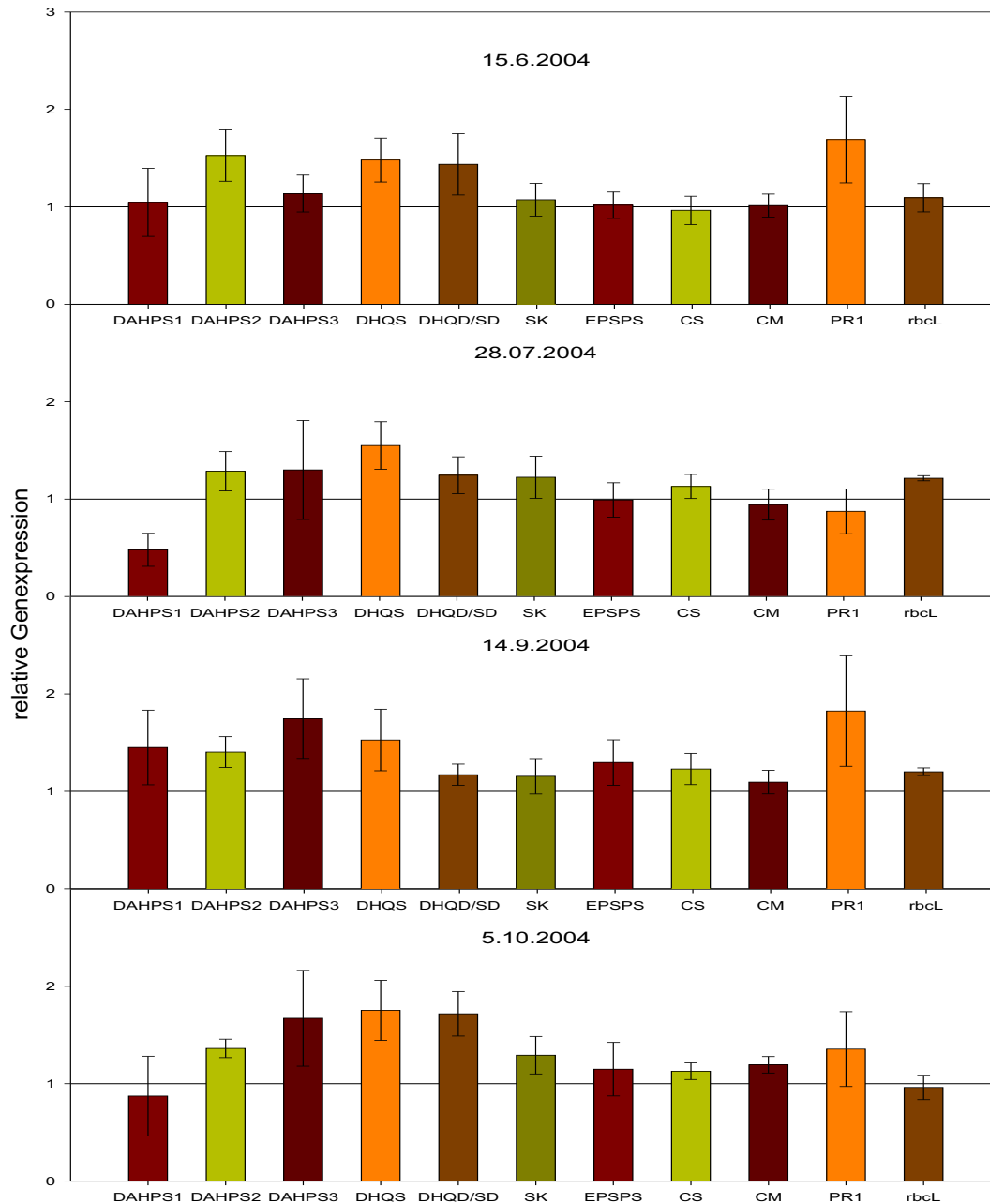
Gen	p-Wert	SN	Gen	p-Wert	SN
<i>Fs-DAHPS1</i>	0,00509	**	<i>Fs-EPSPS</i>	0,00009	***
<i>Fs-DAHPS2</i>	0,15051	n.s.	<i>Fs-CS</i>	0,00217	**
<i>Fs-DAHPS3</i>	0,00020	***	<i>Fs-CM</i>	0,00005	***
<i>Fs-DHQS</i>	0,01150	*	<i>Fs-PRI</i>	0,00009	***
<i>Fs-DHQD/SD</i>	0,00045	***	<i>Fs-rbcL</i>	0,00017	***
<i>Fs-SK</i>	0,00069	***			

**Tabelle 3.7:** Analyse der Genexpressionsverläufe aller untersuchten putativen Gene des Shikimatstoffwechsels mit einem gemischten statistischen Modell. Die p-Werte geben an, auf welchem Signifikanzniveau (SN) eine Differenzierung der Genexpressionsverläufe zwischen ozonbehandelten und Kontrollpflanzen bezüglich der Einwirkung von Ozon möglich ist. \*, \*\*, \*\*\* = 5%, 1% und 0,1% Signifikanzniveau. Abkürzungen siehe 6.1, S. 202.

### 3.5.5 Versuch D: Expressionsanalyse von Genen des Shikimatstoffwechsels an ausgewachsenen Buchen unter dem Einfluß von Ozon im Freiland

Für die Analyse der ozonbedingten Expression der putativen Gene des Shikimatstoffwechsels *Fs-DAHPS1*, *Fs-DAHPS2*, *Fs-DAHPS3*, *Fs-DHQS*, *Fs-DHQD/SD*, *Fs-SK*, *Fs-EPSPS*, *Fs-CS*, *Fs-CM* und der Gene *Fs-rbcL* und *Fs-PRI* in adulten Buchen wurden am Versuchsstandort 'Kranzberger Forst' im Rahmen von Versuch D zu 4 Erntezeitpunkten Buchenblätter aus der Sonnenkrone von je 4 Buchen unter einfachem und doppelt ambientem Ozonregime geerntet und für qRT-PCR Analysen verwendet.

Im Gegensatz zu den Gewächshaus-Versuchen A, B und C konnten in Versuch D nur in der Tendenz eine ozonbedingte Induktion des Shikimatstoffwechsels verzeichnet werden (Abb. 3.27, S. 105). Ein t-Test der in der qRT-PCR ermittelten CT-Werte von je 4 ozonbehandelten und 4 Kontrollbäumen zeigte, daß in keinem Fall signifikante Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsvarianten vorlagen (Tab. 6.19, S. 224). Die Gene *Fs-DAHPS2*, *Fs-DAHPS3*, *Fs-DHQD/SD* und *Fs-SK* wiesen zu allen Erntezeitpunkten eine leicht erhöhte Induktion unter dem doppelt ambienten Ozonregime auf, während *Fs-CS* erst ab dem zweiten und *Fs-EPSPS* sowie *Fs-CM* erst ab dem dritten Erntezeitpunkt schwach induziert waren. Die Induktion von *Fs-DAHPS1* unterschied sich dadurch von den anderen untersuchten Genen des Shikimatstoffwechsels, daß keine tendenzielle Zunahme im Verlauf des Jahres festzustellen war. Vielmehr war diese *DAHPS*-Isoform am zweiten und vierten Erntezeitpunkt tendenziell reprimiert und wies nur am dritten Erntezeitpunkt eine leichte Induktion auf. Die Expression des PR-Gens *Fs-PRI* war mit Ausnahme des zweiten Erntezeitpunktes unter doppelt ambientem Ozonregime tendenziell leicht erhöht. Ebenso war auch das Gen *Fs-rbcL* unter dem Einfluß der zusätzlichen Ozonbehandlung leicht induziert.



**Abbildung 3.27:** Analyse der ozonbedingten Expression der putativen Gene des Shikimatstoffwechsels bei adulten Buchen unter doppelt ambientem Ozonregime (Versuch D). Dargestellt sind für 4 Beobachtungszeitpunkte die aus qRT-PCR-Daten ermittelten Mittelwerte der Genexpressionsniveaus von 4 ozonbehandelten Bäumen relativ zu 4 Kontrollbäumen  $\pm$  SEM. Abkürzungen siehe 6.1, S. 202.

## 3.6 Regulation von Genen der Ethylenbiosynthese

Unter dem Einfluß von Ozon wurde wie bei krautigen Pflanzen auch bei der Buche bereits die Bildung von Ethylen beobachtet [2, 228]. Man geht heute davon aus, daß diese Ethylenemission ursächlich mit dem Auftreten von ozonbedingtem Zelltod und Läsionen verknüpft ist [203, 228]. In Zusammenhang mit der Bestimmung von Ethylen und dessen Vorstufe ACC wurden bei den Expositionsversuchen B und C auch die Expression einzelner Gene der Ethylenbiosynthese unter dem Einfluß von Ozon untersucht. Dabei handelte es sich um je zwei putative Isoformen der ACC Synthase und der ACC Oxidase, die entweder bereits bekannt waren (*Fs-ACSI*, *Fs-ACO1*, AccNr.: AJ420188, AJ420190) oder im Rahmen dieser Arbeit kloniert wurden (*Fs-ACS2*, *Fs-ACO2*, AccNr.: AY705445, AM062963).

### 3.6.1 Differenzierung der Isoformen von ACC Synthase und ACC Oxidase aus der europäischen Buche

Wie aus Studien mit Tomate bekannt ist, können große Multigenfamilien der ACC Synthase und ACC Oxidase existieren, deren einzelne Mitglieder zum Teil sehr hohe Homologie zueinander aufweisen [9, 203]. Daher war es bei der Genexpressionsanalyse wichtig, die Primersequenzen für die qRT-PCR nach Möglichkeit aus Bereichen mit geringer Homologie zwischen den jeweiligen Isoformen abzuleiten, wie im Folgenden erläutert wird.

#### Klassifizierung von *Fs-ACSI* und *Fs-ACS2*

Von den Isoformen *Fs-ACSI* und *Fs-ACS2* sind nur partielle cDNA Sequenzen bekannt, wobei sich im Vergleich mit mehreren ACC Synthase Isoformen der Tomate zeigte, daß der bekannte Sequenzbereich von *Fs-ACSI* eher am 3'-Ende und derjenige von *Fs-ACS2* eher am 5'-Ende der cDNA-Konsensus-Region positioniert ist. Ein 114 bp langer mittlerer Sequenzbereich, in dem beide Isoformen homolog sind, weist gemäß CLUSTALW eine paarweise Identität (PWI) von 66% auf. Da die verwendeten qRT-PCR Primerpaare nicht ausschließlich aus diesem homologen Bereich abgeleitet werden konnten, kann nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, daß diese für die jeweilige Isoform absolut spezifisch sind.

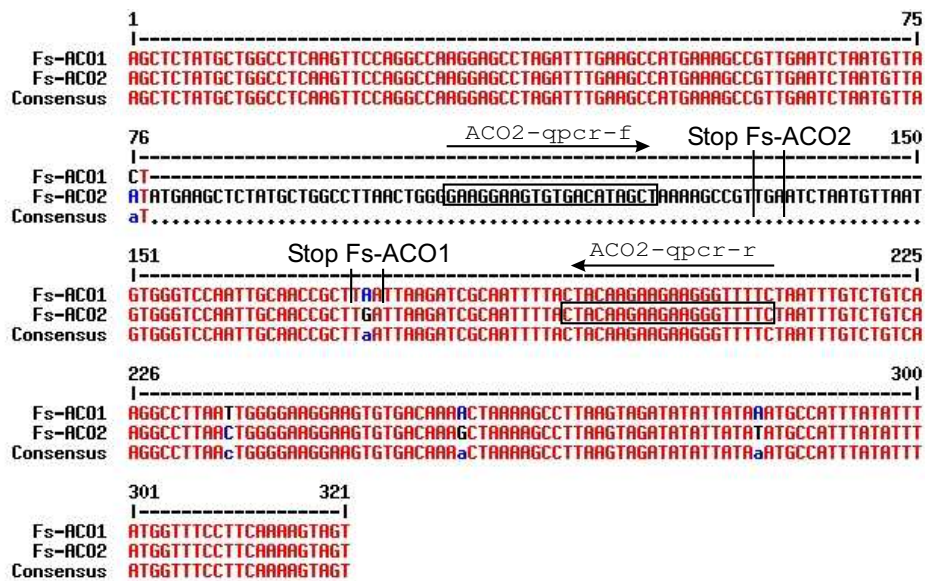
Die Bezeichnung der klonierten Isoform als *Fs-ACS2* begründet sich in Homologievergleichen mit bereits veröffentlichten DNA-Sequenzen aus anderen Pflanzen. Zunächst konnte die fragliche cDNA-Sequenz aus der Buche bei einem mit CLUSTALW durchgeführten Vergleich keiner der neun bekannten ACC Synthase Isoformen der Tomate eindeutig zugeordnet werden, da sie zu den Isoformen *ACS1A*, *ACS1B*, *ACS2* oder *ACS6* (AccNr.: U72389, U72390, AY326958, AF179249) eine jeweils gleich hohe paarweise Identität von 70% aufwies. Ausschlaggebend für die Wahl der Bezeichnung *Fs-ACS2* war die CLUSTALW-Analyse eines 600 bp langen homologen Bereichs

der putativen ACS-Sequenz aus Buche und zweier ACS Isoformen aus der Birke (*Betula pendula*). Hierbei wies *Fs-ACS2* mit 82% PWI eine deutlich höhere Homologie zu der ACC Synthase 2 aus Birke (AccNr. AY120898, [318]) auf, als zur ACC Synthase 1 (70% PWI, AccNr. AY120897, [318]).

### Klassifizierung von *Fs-ACO1* und *Fs-ACO2*

Die klonierte Sequenz *Fs-ACO2* ist dem 3'-Ende des offenen Leserahmens von *Fs-ACO1* (AccNr. AJ420190, [38]) mit 97% PWI in einem 195 bp langen homologen Bereich sehr ähnlich. Eine 'Blastn'-Analyse [1] lieferte einen sehr niedrigen Erwartungswert von nur  $1^{-92}$  für die Hypothese, daß diese Homologiezuordnung von *Fs-ACO1* und *Fs-ACO2* zufälliger Natur ist.

*Fs-ACO2* zeichnet sich gegenüber *Fs-ACO1* durch eine Insertion von 73 bp im Endbereich der kodierenden Region aus, die zu einer C-terminalen Verlängerung der Proteinsequenz von *Fs-ACO2* um 12 Aminosäuren gegenüber *Fs-ACO1* führt. Durch die Positionierung eines der qRT-PCR-Primer für *Fs-ACO2* innerhalb dieser Insertion wurde die isoformspezifische Amplifikation dieses Gens in der qRT-PCR angestrebt.



**Abbildung 3.28:** Position der qRT-PCR-Primer im homologen 3'-cDNA Bereich von *Fs-ACO1* und *Fs-ACO2* zur Unterscheidung der beiden putativen ACC Oxidase Isoformen. Der Primer *ACO2-qpcr-f* liegt innerhalb einer 73 bp langen Insertion von *Fs-ACO2* und ist damit spezifisch für diese Isoform. Für beide Isoformen ist das Ende des offenen Leserahmens gekennzeichnet.

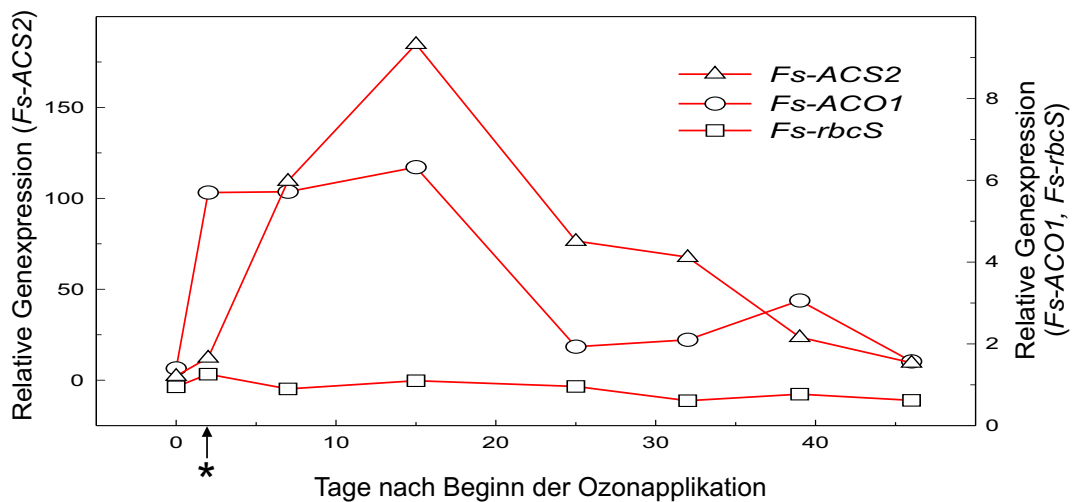
Die Verschiebung des Stop-Codons durch die Insertion und die Lage der qRT-PCR Primer für *Fs-ACO2* innerhalb der Insertion wird in Abbildung 3.28 verdeutlicht. Für die Primer der Isoform *Fs-ACO1* konnte eine entsprechende Isoform-Spezifität nicht

sichergestellt werden, da diese bereits vor der Klonierung der Isoform *Fs-ACO2* von einem kodierenden Bereich der cDNA von *Fs-ACO1* abgeleitet wurden. Die Sequenzierung von *Fs-ACO2* lieferte keine homologe Sequenzinformation zu diesem cDNA-Abschnitt, so daß keine Aussage über die Ähnlichkeit von *Fs-ACO1* und *Fs-ACO2* in diesem Bereich getroffen werden kann.

### 3.6.2 Versuch B

Die ozonbedingte Regulation der Ethylenbiosynthese wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst in Versuch B (200 nl/l O<sub>3</sub>, 8 h/d, 46 d) bezüglich der Genexpression von *Fs-ACS2* und *Fs-ACO1* untersucht [228].

Wie Abbildung 3.29 verdeutlicht, ergab sich die höchste ozonbedingte Genexpressionsveränderung für das Gen *Fs-ACS2*. So wurde bereits nach 2 Tagen ein 12-fache und nach 15 Tagen eine 185-fache relative Expression dieses Gens im Vergleich zur nicht mit Ozon behandelten Kontrollgruppe ermittelt. Nach diesem Maximum nahm die Induktion dieses Gens im Lauf des Versuches stetig ab, bis sie zum Versuchsende auf den Faktor 10 abgesunken war.



**Abbildung 3.29:** Analyse der ozonbedingten Expression der Gene *Fs-ACS2*, *Fs-ACO1* und *Fs-rbcS* (Versuch B, 200 nl/l O<sub>3</sub>, 8 h/d, 46 d). Man beachte die unterschiedliche Skalierung der Ordinaten. Abkürzungen siehe 6.1, S. 202. Aus Nunn et al. [228].

Das Gen *Fs-ACO1* war zwar in den ozonbehandelten Pflanzen auch bereits nach 2 Tagen 5,7-fach induziert, blieb damit aber deutlich unter dem Niveau der *Fs-ACS2*. Die Genexpression von *Fs-ACO1* stabilisierte sich bis 25 Tage nach Versuchsbeginn im Bereich 6-facher Induktion und reduzierte sich nach 24 Tagen deutlich auf den Faktor 2. Abgesehen von einer leichten Induktion um etwa 50% 39 Tage nach Versuchsbeginn blieb die Genexpression bis zum Ende des Versuchs in diesem Bereich.



Der Genexpressionsverlauf von *Fs-rbcS* wurde bereits unter 3.5.3, S. 90 erläutert und diente in der zugrundeliegenden Publikation [228] als Referenz.

### 3.6.3 Versuch C

In Versuch C wurde die ozonbedingte Genexpression der bereits publizierten Gene *Fs-ACSI* und *Fs-ACO1* und der, im Rahmen dieser Arbeit klonierten, putativen Ethylenbiosynthese-Gene *Fs-ACS2* und *Fs-ACO2* an vierjährigen Jungbuchen untersucht. Wie die Abbildungen 3.30, S. 110 und 3.31, S. 112 zeigen, wurden alle vier Gene im Verlauf der 12-wöchigen Ozonbehandlung induziert, wobei die Induktion für die beiden Isoformen *Fs-ACS2* und *Fs-ACO2* am stärksten ausfiel.

Die untersuchten ACC Synthase Isoformen der Buche *Fs-ACSI* und *Fs-ACS2* wiesen in den ozonbehandelten Pflanzen einen unterschiedlichen Verlauf der relativen Genexpression auf, was für eine erfolgreiche Differenzierung der beiden ACS-Isoformen durch die qRT-PCR-Primer spricht. Im Vergleich mit dem Induktionsverhalten der putativen Gene des Shikimatstoffwechsels wurde innerhalb der 4 beprobten ozonbehandelten Bäume eine von Pflanze zu Pflanze stark unterschiedliche Induktion von *Fs-ACSI* und *Fs-ACS2* festgestellt, wodurch sich die hohen statistischen Fehler bei der Schätzung der entsprechenden Mittelwerte erklären.

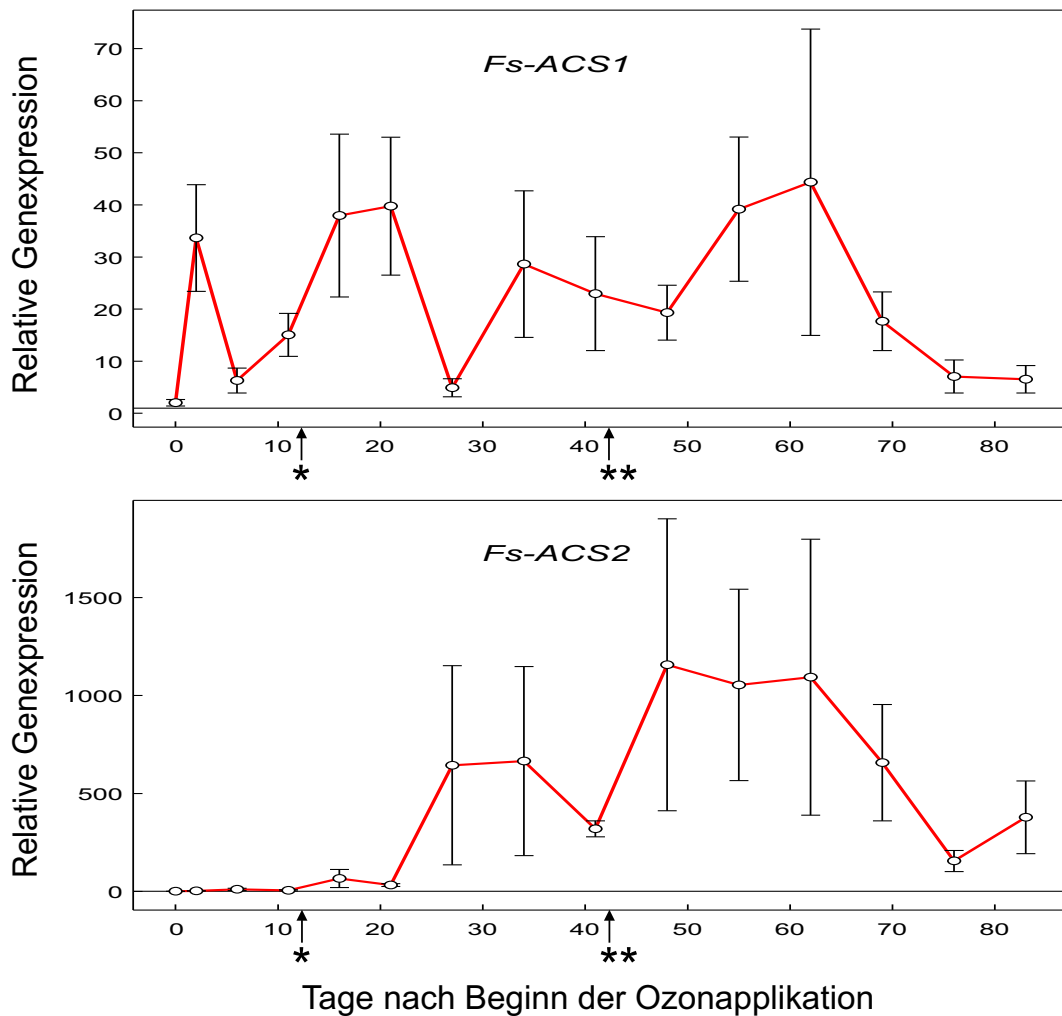
#### *Fs-ACSI*

*Fs-ACSI* war in den behandelten Pflanzen bereits 2 Tage nach Beginn der Ozonexposition mit 34-facher Genexpression relativ zu den Kontrollpflanzen stark induziert. Nach einem raschen Rückgang der Genexpression auf ein Niveau 6-facher Induktion am darauffolgenden Erntezeitpunkt wurde, nach Erhöhung der Ozonkonzentration von 150 nl/l auf 190 nl/l (8 h/d), bis zum 21. Tag nach Behandlungsbeginn mit 40-facher Induktion ein neues Maximum der Genexpression gemessen.

Nach weiteren 6 Tagen hatte sich die Genexpression von *Fs-ACSI* wieder deutlich auf eine 5-fache Induktion reduziert, erhöhte sich aber dann wieder, parallel zum Auftreten der ersten Blattsymptome, bis 3 Wochen vor Versuchsende mit einem Induktionsfaktor von 44 ein absolutes Maximum verzeichnet wurde. Ab diesem Zeitpunkt nahm die Induktion dieses Gens stetig ab und war in den ozonbehandelten Pflanzen zum Versuchsende nur noch sechsmal so hoch wie in den Kontrollpflanzen.

#### *Fs-ACS2*

Die höchste relative Genexpression aller in dieser Arbeit untersuchten Gene wurde für die putative ACC Synthase *Fs-ACS2* ermittelt. Im Gegensatz zu *Fs-ACSI* kam es bei diesem Gen direkt nach Beginn der Ozonexposition nicht zu einem starken Anstieg der Genexpression. 21 Tage nach Versuchsbeginn hatte die Expression von *Fs-ACS2* allerdings das Induktionsniveau von *Fs-ACSI* erreicht und stieg im Verlauf der nächsten



**Abbildung 3.30:** Analyse der ozonbedingten Expression der ACC Synthase Isoformen *Fs-ACS1* und *Fs-ACS2* (Versuch C, 150-190 n/l, 8 h/d, 84 d). Dargestellt ist jeweils der auf das Referenz-Gen *Fs-26SrRNA* normalisierte Mittelwert der aus qRT-PCR-Daten errechneten Genexpression von 4 ozonbehandelten relativ zu 4 Kontrollpflanzen  $\pm$  SEM. \* = Erhöhung der Ozondosis von 150 n/l auf 190 n/l (8 h/d), \*\* = erste ozonbedingte Läsionen. Man beachte die unterschiedliche Skalierung der Ordinaten.

Wochen stark an, bis 48 Tage nach Versuchsbeginn mit Werten von über 1000-facher relativer Genexpression ein Maximum erreicht wurde.

Die hohe Induktion blieb 2 Wochen lang relativ konstant und ging zum selben Zeitpunkt wie bei *Fs-ACS1*, aber auf höherem Niveau, wieder deutlich zurück, wobei in den ozonbehandelten Pflanzen zum Versuchsende immer noch eine im Mittel knapp 400-fach gegenüber den Kontrollpflanzen erhöhte Genexpression gefunden werden konnte.

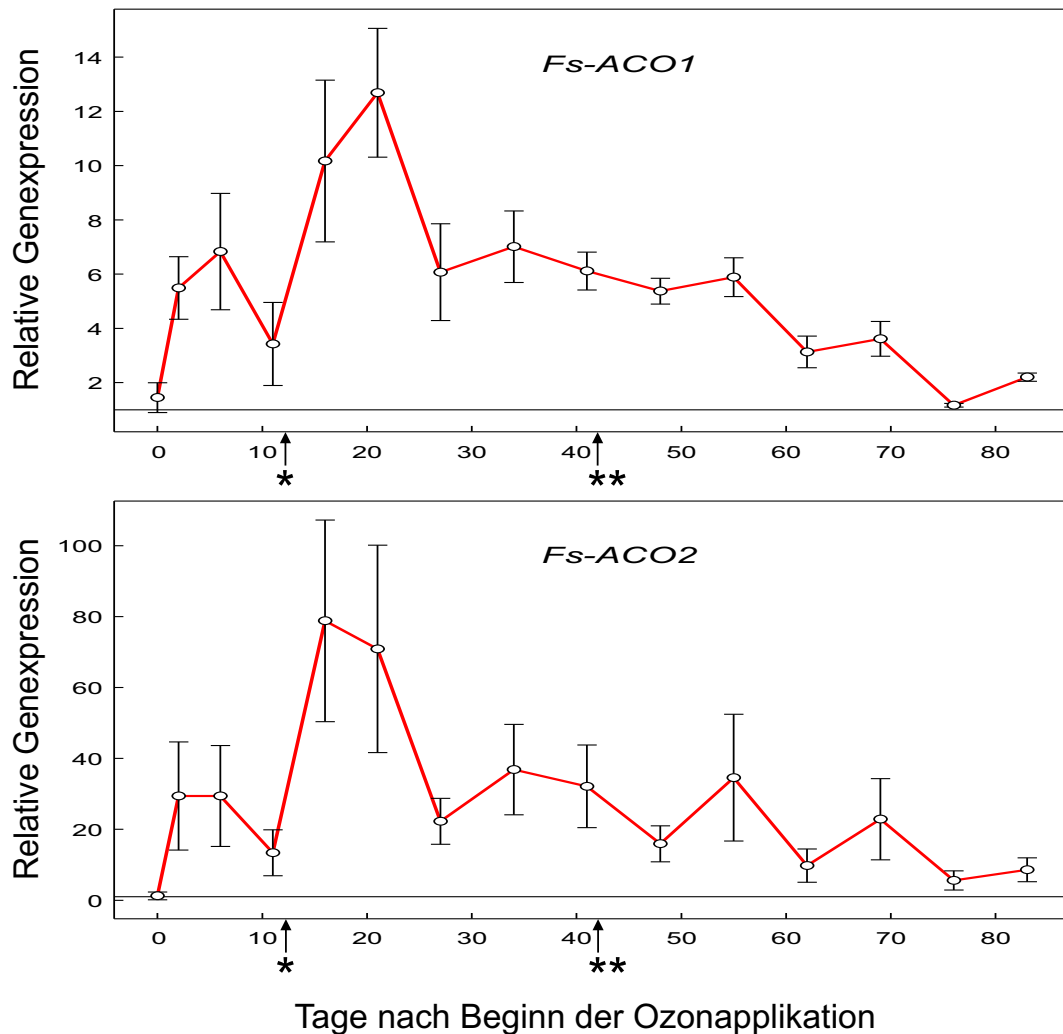
***Fs-ACO1***

Von allen untersuchten Genen aus der Ethylenbiosynthese fiel die Induktion von *Fs-ACO1* am niedrigsten aus. Der Beginn der Ozonexposition führte zu einer Zunahme der *Fs-ACO1* Transkripte, so daß 6 Tage danach in den ozonbehandelten Pflanzen ein 7-fach gegenüber der Kontrolle erhöhtes Expressionsniveau dieses Gens zu finden war. Einem Rückgang der Genexpression innerhalb der nächsten 4 Tagen auf 3-faches Niveau folgte nach Erhöhung der Ozonkonzentration von 150 auf 190 nl/l (8 h/d) ein neuerlicher Anstieg auf den für dieses Gen im Zeitverlauf maximalen Wert 13-facher Induktion gegenüber der Kontrolle. Daraufhin nahm die Genexpression zunächst deutlich und später langsamer ab, bis *Fs-ACO1* zum Versuchsende nur noch 2-fach durch die Ozonbehandlung induziert war.

***Fs-ACO2***

Die putative ACO Synthase *Fs-ACO2* hatte im Prinzip einen mit *Fs-ACO1* vergleichbaren Induktionsverlauf, allerdings auf durchwegs höherem Niveau. Auch hier resultierten aus dem Beginn der Ozonbehandlung und der Erhöhung der Ozonkonzentration von 150 auf 190 nl/l (8 h/d) die stärksten Induktionszunahmen, wobei zunächst ein etwa 30-faches und im letzteren Fall ein fast 80-faches Induktionsniveau erreicht wurden. Wie bei *Fs-ACS2* reagierten die einzelnen Versuchsbäume im Bezug auf die Expression von *Fs-ACO2* unterschiedlich auf die Ozonbehandlung, so daß sich auch hier eine relativ große Streuung bei der Schätzung der Mittelwerte ergab.

Wie bei *Fs-ACO1* ging die Expression von *Fs-ACO2* bereits 27 Tage nach Versuchsbeginn relativ stark auf 22-faches Niveau zurück und nahm danach weiterhin langsam ab, bis zum Versuchsende nur noch eine 8-fache Induktion dieses Gens in den ozonbehandelten Bäumen festgestellt werden konnte. Die Ausbildung erster makroskopischer Symptome an den ozonbehandelten Buchenblättern hatte weder bei *Fs-ACO1* noch bei *Fs-ACO2* eine merkliche Veränderung der Genexpression zur Folge.



**Abbildung 3.31:** Analyse der ozonbedingten Expression der ACC Oxidase Isoformen *Fs-ACO1* und *Fs-ACO2* (Versuch C, 150-190 nl/l, 8 h/d, 84 d). Dargestellt ist jeweils der auf das Referenz-Gen *Fs-26SrRNA* normalisierte Mittelwert der aus qRT-PCR-Daten errechneten Genexpression von 4 ozonbehandelten relativ zu 4 Kontrollpflanzen  $\pm$  SEM. \* = Erhöhung der Ozondosis von 150 nl/l auf 190 nl/l (8 h/d), \*\* = erste ozonbedingte Läsionen. Man beachte die unterschiedliche Skalierung der Ordinaten.

## 3.7 Regulation von Signalstoffen und Sekundärmetaboliten

### 3.7.1 Ethylen

Im Verlauf des Ozonexpositionsversuchs C wurde zu 16 Zeitpunkten die Ethylenemission aus frisch geernteten Blättern von jeweils 3 vierjährigen Bäumen aller Versuchsvarianten gemäß 2.14.1, S. 53 bestimmt. Um zu verhindern, daß es durch das Abtrennen einer zu großen Anzahl an Blättern zur verletzungsbedingten Bildung von Ethylen kommt, wurden von diesen Bäumen darüber hinaus keine weiteren Proben für andere molekularbiologische Messungen entnommen.

In allen ozonbehandelten Versuchsvarianten (a, c, d, e und f) wurde bei einzelnen Pflanzen eine deutliche ozonbedingte Stimulation der Ethylenemission beobachtet, während dies bei keiner der Pflanzen aus den Versuchsvarianten k und b der Fall war. Abhängig von der individuellen Pflanze zeigten sich allerdings in allen Versuchsvarianten deutliche Unterschiede in der Höhe der Ethylenemission, die mit den Ergebnissen der optischen Bonitur ozonbedingter Läsionen positiv korrelierten (3.2.1, S. 62). Dabei ging dem Auftreten makroskopischer Blattläsionen bei allen betroffenen Pflanzen, unabhängig von der Versuchsvariante, ein Anstieg der Ethylenemission voraus. Die absolute Menge an gebildetem Ethylen unterschied sich deutlich zwischen den betroffenen Pflanzen.

Die drei untersuchten Bäume der Versuchsvariante a aus Versuch C (150-190 n/l  $O_3$ , 8 h/d, 84 d) verhielten sich bezüglich der Ethylenemission sehr unterschiedlich (Abb. 3.32, S. 115). Vor dem Auftreten der ersten Ozonläsionen kam es bei Baum a10, 20 Tage nach Versuchsbeginn, zu einer ersten Erhöhung der Ethylenemission auf 0,45 nmol/(gFG · h). Daraufhin folgte eine starke Zunahme bis nach weiteren 17 Tagen ein Maximum der Ethylenemission mit 11,2 nmol/(gFG · h) gemessen wurde. In keiner anderen Versuchsvariante wurde dieser Wert zu irgendeinem Zeitpunkt überschritten. Im weiteren Versuchsverlauf nahm die Ethylenemission dann, mit fortschreitendem Blattverlust des Baumes, wieder deutlich ab, bis zum Versuchsende in den letzten verbliebenen Blättern keine Ethylenemission mehr nachgewiesen werden konnte.

Wie bei Baum a10 wurde auch für Baum a11 mit einem Wert von 0,6 nmol/(gFG · h) der erste deutliche Anstieg der Ethylenemission 20 Tage nach Versuchsbeginn verzeichnet. Danach stabilisierte sich dieser Wert allerdings im Gegensatz zu Baum a10 in diesem Bereich. Die ersten Ozonsymptome traten erst 36 Tage später auf. Zu diesem Zeitpunkt wurde für den Baum a11 auch das absolute Maximum der Ethylenemission mit einem Wert von 1,5 nmol/(gFG · h) ermittelt. Bis zum Versuchsende nahm die Ethylenemission stetig ab, während sich die ozonbedingten Blattsymptome ausweiteten, bis schließlich alle am Baum verbliebenen Blätter Ozonsymptome zeigten. Das Ausmaß dieser Läsionen war allerdings geringer als im Falle von Baum a10.

Die Ethylenemission von Baum a12 blieb im Mittel bei etwa 0,06 nmol/(gFG · h) und stieg erst bei der letzten Probenahme auf ein Niveau von 0,6 nmol/(gFG · h) an.

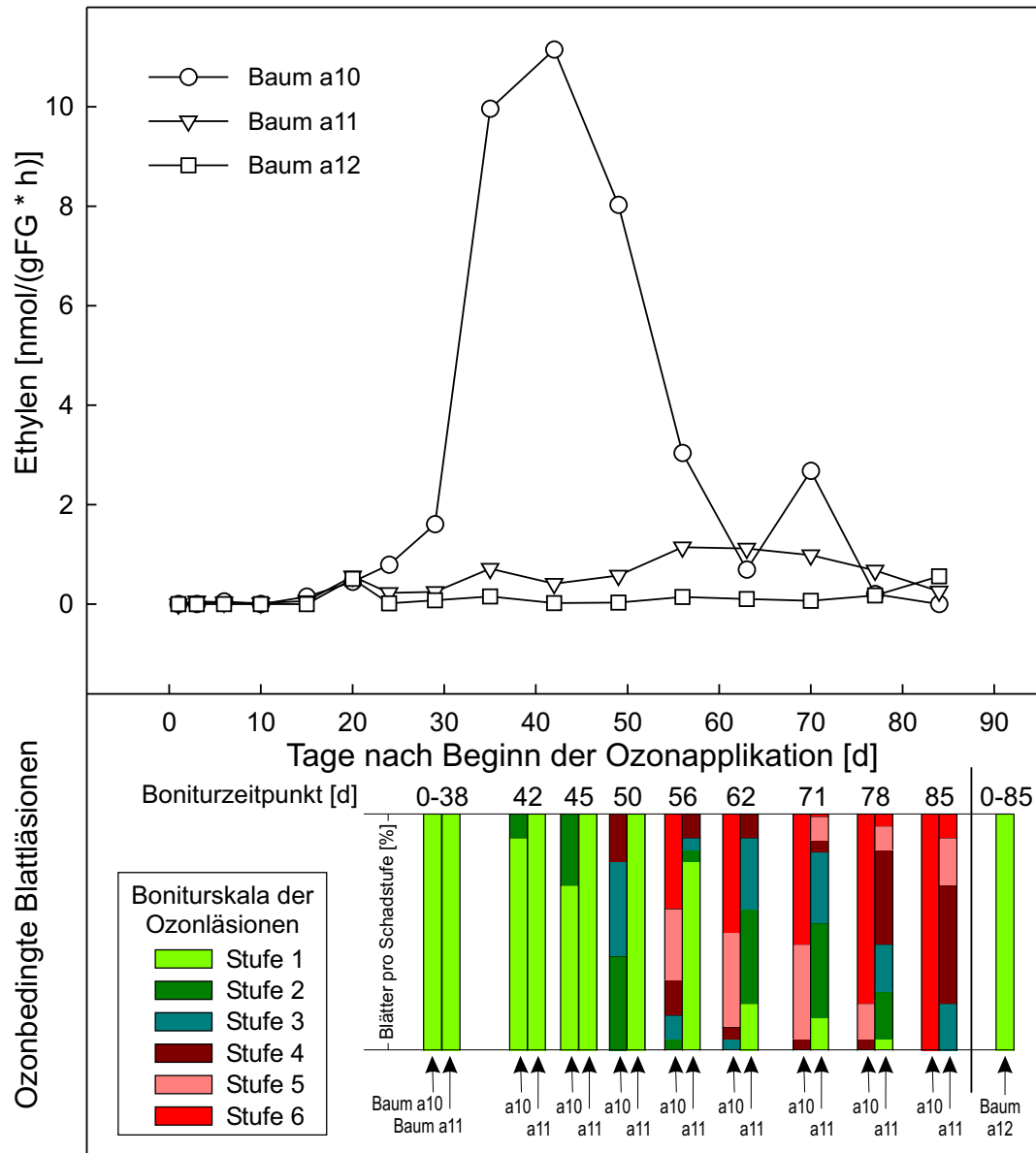
Dieser Baum zeigte bis zum letzten Versuchstag keine ozonbedingten Symptome. In Abbildung 3.32, S. 115 sind die gemessenen Ethylenemissionen und die Ergebnisse der optischen Bonitur ozonbedingter Blattläsionen der drei Bäume aus Versuchsvariante a von Expositionsversuch C zusammengefaßt.

Die Behandlung der Bäume mit Sporen des Pilzes *Apiognomonia errabunda* in Versuch C hatte keinen erkennbaren Einfluß auf die Bildung von Ethylen. So kam es ohne Ozonbehandlung (b) weder zur Ausbildung von Läsionen noch zu einer Erhöhung der Ethylenemission, während diese Symptomatik bei allen Versuchsvarianten, die zusätzlich zur Infektion auch mit Ozon behandelt wurden (c, d, e und f), beobachtet werden konnte. Auch in diesen Versuchsvarianten waren einzelne Bäume davon besonders stark betroffen, während andere bis zum Versuchsende ohne Symptome blieben und keine Induktion der Ethylenemission zeigten.

In Abbildung 3.33, S. 116 sind die Ethylenemissionen der jeweils 3 Bäume aus den Versuchsvarianten a, c, d und e des Ozon-Expositionsversuchs C in Form einer Boxplot-Grafik zusammengefaßt, um den Zusammenhang zwischen der Dauer der Ozonbehandlung und der Ethylenemission zu verdeutlichen. Variante f wurde nicht in diese Graphik miteinbezogen, da hier die Ozonbehandlung zu einem späteren Zeitpunkt begonnen hatte als bei den anderen 4 Varianten. Trotz der extrem unterschiedlichen Ethylenemission der einzelnen Bäume als Reaktion auf die Ozonbehandlung ist eine von der Behandlungsdauer abhängige Zunahme der Ethylenemission erkennbar.

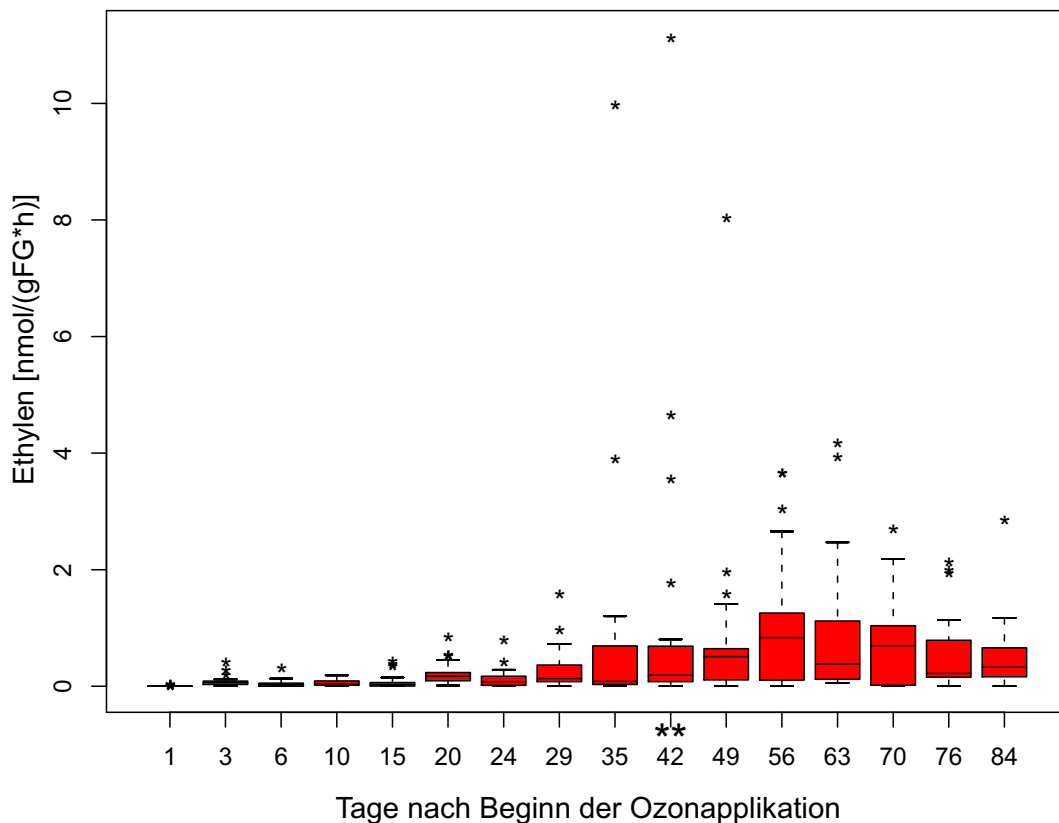
### 3.7.2 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure

Der Gehalt an freier und konjugierter 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC), der direkten Vorläufersubstanz von Ethylen (1.5, S. 20), wurde im Rahmen des Versuchs C zu 15 Erntezeitpunkten ermittelt. Dabei wurde jeweils das Blattmaterial von 9 Bäumen der ozonbehandelten Versuchsvariante c bzw. der Kontrollvariante k des Ozonexpositionsversuchs C zu gleichen Anteilen vereinigt und hinsichtlich der Menge an freiem und konjugiertem ACC untersucht. Die Entwicklung der Gehalte an freiem und konjugiertem ACC verlief in Versuch C annähernd parallel, wobei der Anteil an konjugiertem ACC stets deutlich größer war (Abb. 3.34, S. 117). Während in der Kontrollprobe über die gesamte Behandlungsdauer nie mehr als 0,56 nmol/gFG freies ACC gemessen wurde, stiegen der Gehalt an freiem ACC in der ozonbehandelten Probe ab dem 16. bis zum 48. Versuchstag langsam und daraufhin bis zum 62. Versuchstag schneller auf einen Maximalwert von 22,1 nmol/gFG an. Nach einem raschen Rückgang auf 10,2 nmol/gFG eine Woche danach, erreichte der Gehalt an freiem ACC zum Versuchsende einen Wert von 13,1 nmol/gFG.



**Abbildung 3.32:** Zeitkinetik der ozoninduzierten Ethylenemission von drei vierjährigen Jungbuchen in Ozonexpositionsversuch C (Variante a, 150-190  $\text{nl/l O}_3$ , 8 h/d, 84 d). An 16 Zeitpunkten wurde für die drei Versuchsbäume a10, a11 und a12 die Ethylenemission eines Blattes bestimmt. Zum Vergleich sind die Ergebnisse der optischen Bonitur der ozonbedingten Blattläsionen im unteren Bereich dargestellt. Baum a12 blieb über den gesamten Versuchszeitraum ohne erkennbare ozonbedingte Blattläsionen. Zur Erläuterung der Boniturstufen siehe Tabelle 2.4, S. 30.

Während der ersten drei Versuchswochen lag der Gehalt an konjugiertem ACC in der ozonbehandelten Probe bei etwa 10 nmol/gFG. Bis zum 41. Tag nach Versuchsbe-



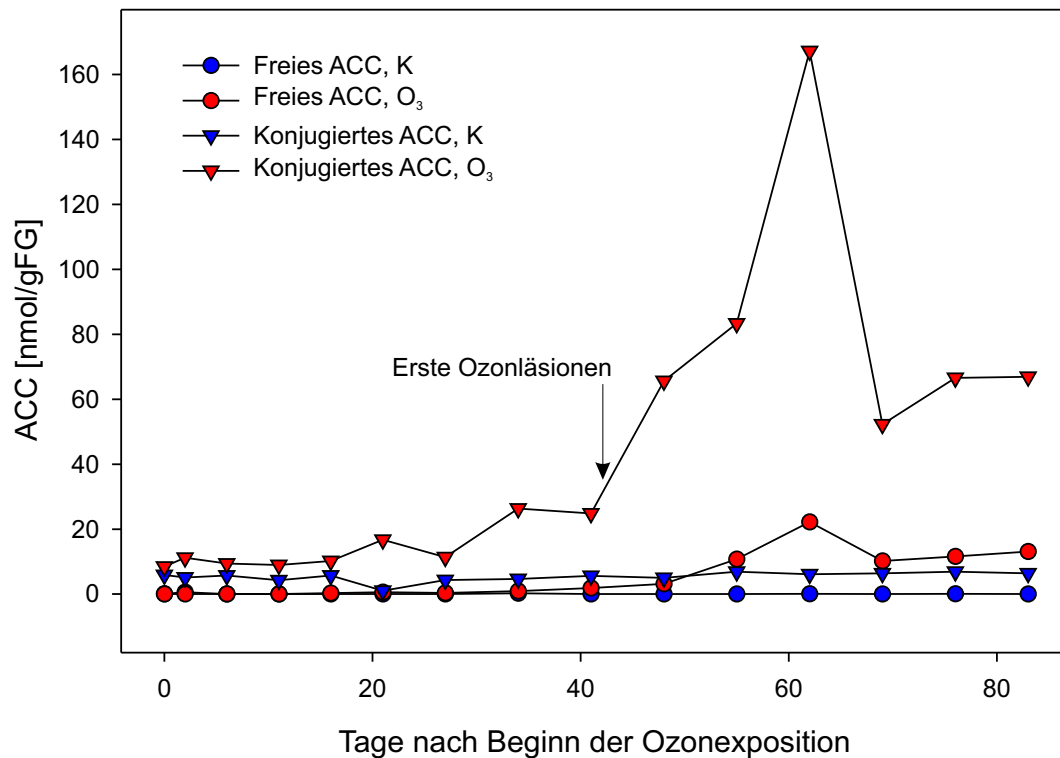
**Abbildung 3.33:** Boxplot-Darstellung der mittleren Ethylenemission von je 3 ozonbehandelten Bäumen der Versuchsvarianten a, c, d und e im Rahmen des Ozonexpositionsversuchs C (150-190 nl/l, 8 h/d, 84 d). Obere Begrenzung, Mitte und untere Begrenzung der Box entsprechen den 75%, 50% und 25%-Perzentilen der Beobachtungen.

ginn nahm er auf einen Wert von 25 nmol/gFG zu und erhöhte sich mit dem Auftreten der ersten makroskopischen Ozonläsionen noch schneller, bis 62 Tage nach Versuchsbeginn mit einem Wert von 176,2 nmol/gFG ein absolutes Maximum an konjugiertem ACC gemessen wurde. Wie bereits bei der Ermittlung des Gehalts an freiem ACC, kam es auch beim konjugierten ACC eine Woche danach zu einem starken Rückgang um mehr als zwei Drittel auf einen Wert von 52,3 nmol/gFG. In den letzten beiden Versuchswochen erhöhte sich dieser Wert noch einmal leicht auf 67 nmol/gFG.

### 3.7.3 Salicylsäure und Gentisinsäure

Für die Messung der Gehalte an freier und konjugierter Salicylsäure sowie an konjugierter Gentisinsäure wurden, ebenso wie bei der Bestimmung von freiem und konjugiertem ACC (3.7.2, S. 114), Blattproben verschiedener Erntezeitpunkte von je 9 Bäumen aus der ozonbehandelten Variante c und der unbehandelten Variante k des Expositionsversuchs C verwendet und als Sammelproben gemessen.



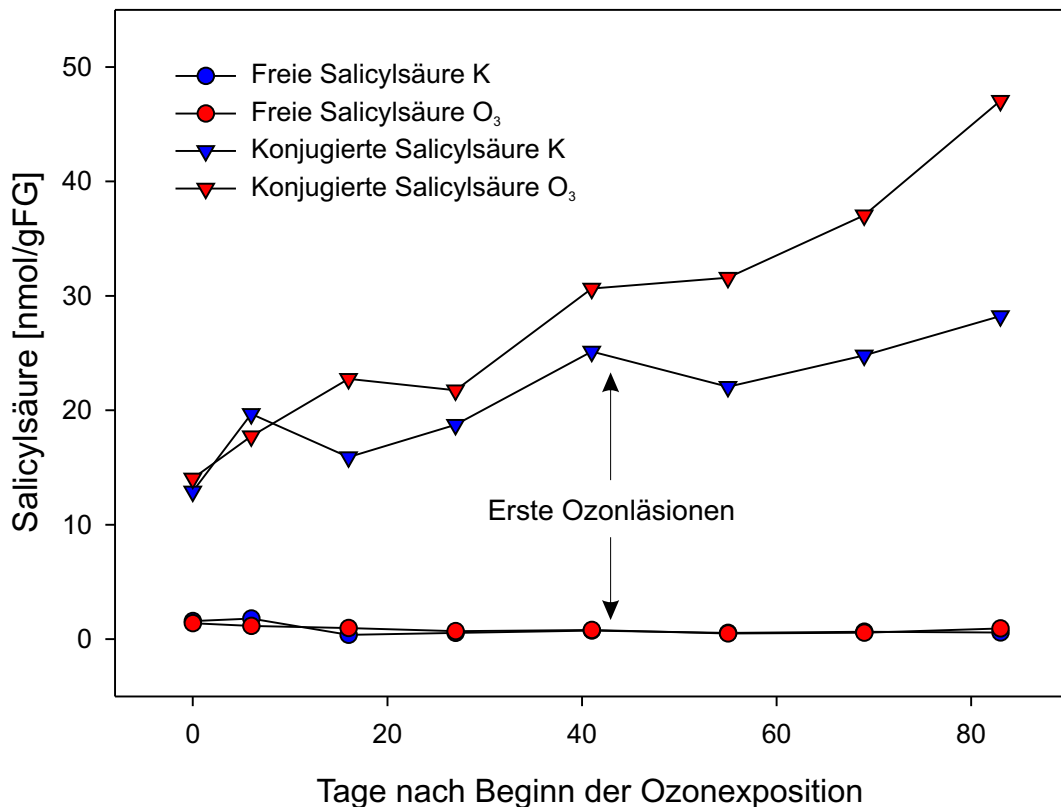


**Abbildung 3.34:** Ozonbedingte Regulation der freien und konjugierten 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) in vierjährigen Buchen (Versuch C, 150-190 nl/l, 8 h/d, 84 d). Dargestellt sind die ACC-Gehalte von Blattproben aus je 9 ozonbehandelten (Variante c) und 9 Kontrollbäumen (Variante k). K = Kontrollbäume, O<sub>3</sub> = ozonexponierte Bäume, FG = Frischgewicht.

### Freie und konjugierte Salicylsäure

Sowohl in der ozonbehandelten Variante c als auch in der unbehandelten Kontrollvariante k lagen die Gehalte an freier Salicylsäure im gesamten Verlauf des Versuchs C mit mittleren Werten von 0,85 bzw. 0,88 nmol/gFG auf sehr niedrigem Niveau. Die Ausbildung von Läsionen in der ozonbehandelten Versuchsvariante c hatte auf den Gehalt an freier Salicylsäure keinen erkennbaren Einfluß.

Im Gegensatz dazu nahm die Menge an konjugierter Salicylsäure unter dem Einfluß von Ozon stetig zu und erreichte am Versuchsende mit einem Wert von 47,1 nmol/gFG mehr als das Dreifache des Anfangsgehaltes, der bei 14,1 nmol/gFG lag (Abb. 3.35, S. 118). Auch in der Kontrollvariante k nahmen die Salicylsäure-Konjugate im Verlauf des Versuchs zu, allerdings nicht so stark wie in der ozonbehandelten Variante. Hier wurden anfangs 12,9 nmol/gFG und bei der letzten Probenahme 28,2 nmol/gFG konjugierte Salicylsäure gemessen, was etwa einer Verdopplung des Ausgangswertes entsprach. Der Anstieg verlief in beiden Fällen kontinuierlich und wies keine extremen Schwankungen auf.

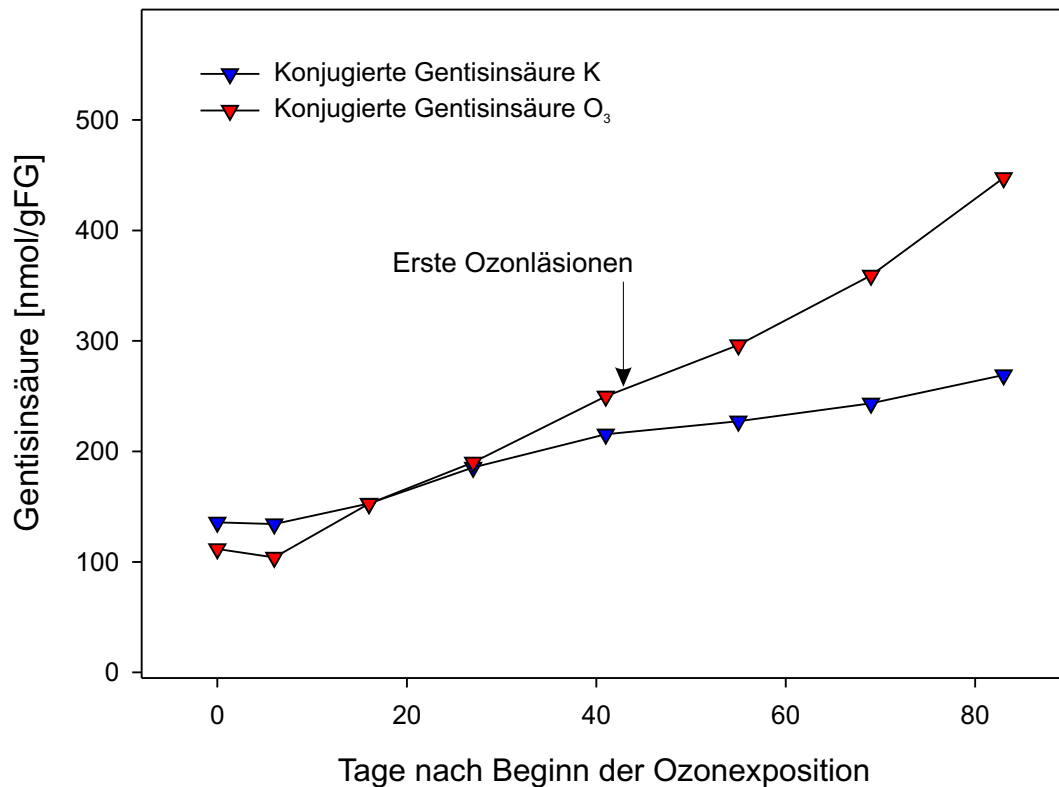


**Abbildung 3.35:** Zeitlicher Verlauf der freien und konjugierten Salicylsäure in vierjährigen Buchen unter dem Einfluß von Ozon in Versuch C (Variante c, 150-190 nl/l O<sub>3</sub>, 8 h/d, 84 d). Dargestellt sind die Salicylsäure-Gehalte von Blattproben aus je 9 ozonbehandelten und 9 Kontrollbäumen. SA = Salicylsäure, K = Kontrollbäume, O<sub>3</sub> = ozonexponierte Bäume, FG = Frischgewicht.

### Gentisinsäure

Während freie Gentisinsäure weder in der ozonbehandelten noch in der Kontrollvariante von Versuch C gefunden werden konnte, ergab sich für die Gentisinsäure-Konjugate ein ähnliches Bild wie für die Konjugate der Salicylsäure.

Auch hier kam es zu einem stetigen Anstieg im Verlauf der Ozonbehandlung. Nach 83 Tagen Ozonbehandlung hatte sich der Gehalt an konjugierter Gentisinsäure in der ozonbehandelten Probe von 111,7 nmol/gFG auf 447,6 nmol/gFG mehr als vervierfacht, während die Zunahme dieses Wertes in der Kontrolle von 135,9 nmol/gFG auf 269,2 nmol/gFG nur knapp einer Verdopplung entsprach. Der Gehalt an konjugierter Gentisinsäure übertraf damit den Gehalt an konjugierter Salicylsäure im Mittel über den gesamten Versuchverlauf um mehr als das Achtfache. Abbildung 3.36, S. 119 veranschaulicht die Entwicklung der Gehalte an konjugierter Gentisinsäure im Verlauf von Versuch C.



**Abbildung 3.36:** Zeitlicher Verlauf der gebundenen Gentisinsäure in vierjährigen Buchen unter dem Einfluß von Ozon in Versuch C (Variante c, 150-190 n/l O<sub>3</sub>, 8 h/d, 84 d). Dargestellt sind die Gentisinsäure-Gehalte von Blattproben aus je 9 ozonbehandelten und 9 Kontrollbäumen. GA = Gentisinsäure, K = Kontrollbäume, O<sub>3</sub> = ozonexponierte Bäume, FG = Frischgewicht.

### 3.7.4 Phenolische Inhaltsstoffe

Im Rahmen der ozonbedingten Veränderung von Inhaltsstoffen wurde in Versuch C mittels HPLC ein breites Spektrum löslicher und zellwandgebundener phenolischer Inhaltsstoffe untersucht. Dabei wurde Blattmaterial derselben 4 Bäume aus den Versuchsvarianten a (150-190 n/l O<sub>3</sub>, 8 h/d, 84 d) und k (kein O<sub>3</sub>) verwendet, das auch zur Bestimmung der Genexpression putativer Shikimatstoffwechsel- und Ethylenbiosynthese-Gene verwendet worden war. Der Gehalt an phenolischen Inhaltsstoffen wurde am Tag vor dem Beginn der Ozonexposition, 11, 34 und 62 Tage nach Versuchsbeginn und zum Versuchsende (nach 83 Tagen) ermittelt.

Anhand der jeweiligen HPLC-Chromatogramme (Abb. 3.37, S. 121 und 3.40, S. 126) wurden 15 lösliche und 7 zellwandgebundene phenolische Inhaltsstoffe differenziert und im Zeitverlauf von Versuch C quantitativ untersucht. Den einzelnen Substanzen wurde anhand der Absorptionsspektren im UV-Bereich, der HPLC-Retentionszeiten und Vergleichsspektren bekannter Substanzen in Absprache mit Wer-

ner Heller (GSF, Neuherberg) jeweils die mutmaßlich zugrundeliegende phenolische Stoffklasse zugeordnet. Wegen der geringen analysierten Stoffmengen war es leider nicht möglich, diese Substanzen, z.B. durch eine massenspektrographische Analyse, exakt zu charakterisieren.

### **Lösliche phenolische Inhaltsstoffe**

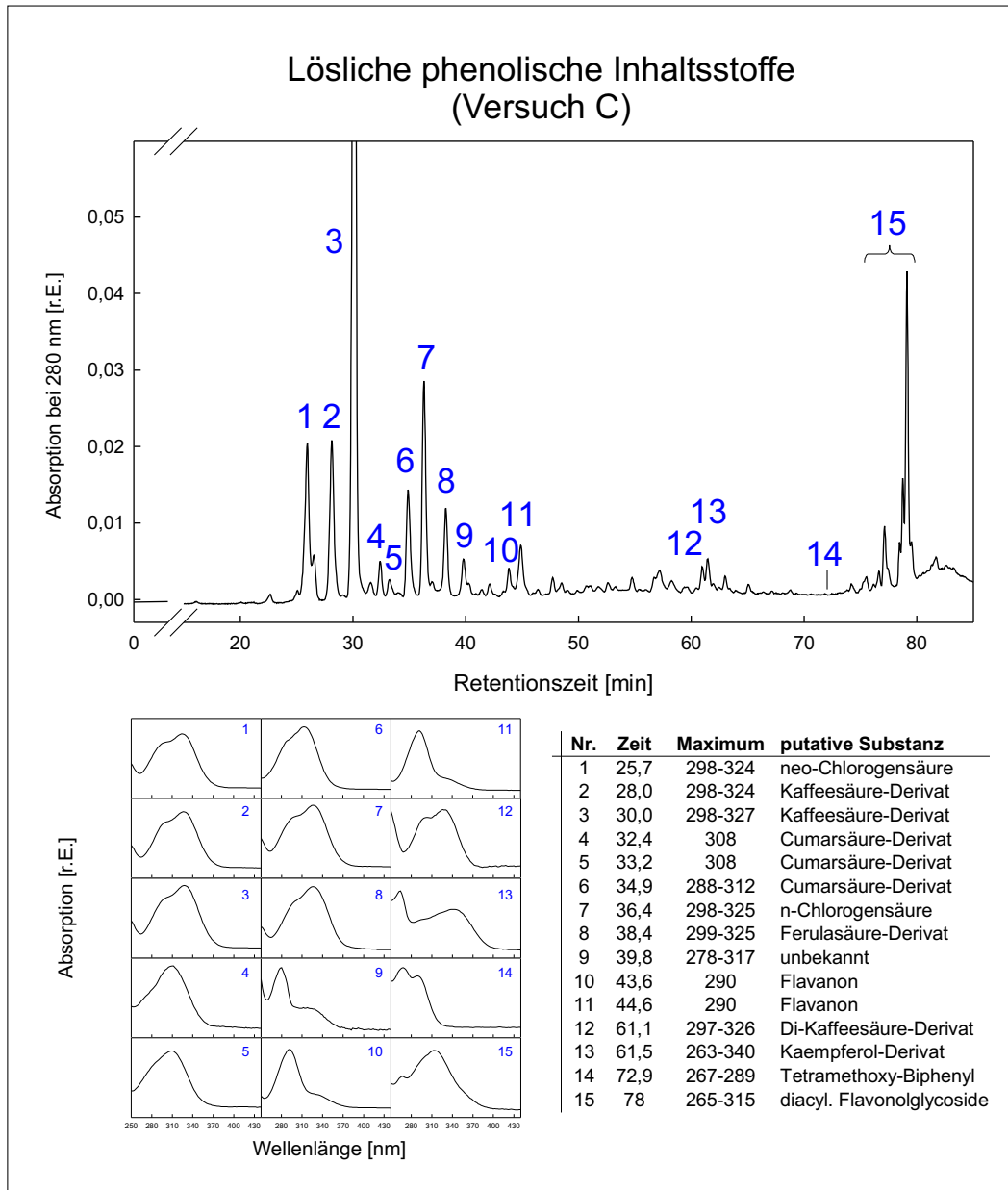
Anhand der Retentionszeit und der Einzelpeak-Spektren ließen sich bei den löslichen phenolischen Inhaltsstoffen in Versuch C 15 verschiedene Peaks putativen Substanzen zuordnen. Dabei handelte es sich, wie in Abbildung 3.37, S. 121 erläutert, mutmaßlich um neo-Chlorogensäure (Peak 1), Kaffeesäurederivate (Peak 2 und 3), Cumarsäurederivate (Peak 4 bis 6), n-Chlorogensäure (Peak 7), ein Ferulasäurederivat (Peak 8), zwei Flavanone (Peak 10 und 11), ein Di-Kaffeesäurederivat (Peak 12), ein Kampferolderivat (Peak 13), 3,3',4,4'-Tetramethoxy-Biphenyl (Peak 14) und diacylierte Flavonolglycoside (Peak 15). Peak 9 konnte keine Stoffklasse zugeordnet werden.

Die Summe aller identifizierten Einzelpeaks der löslichen Phenole ging mit und ohne Ozonbehandlung im Verlauf des Versuchs deutlich zurück und war durch die Ozonbehandlung gegenüber der Kontrolle nicht erhöht. Auch bei den Einzelsubstanzen ergaben sich wegen der großen Streuung innerhalb der untersuchten Bäume kaum Unterschiede zwischen Ozonbehandlung und Kontrolle. Allerdings war für viele putative Substanzen in der Tendenz erkennbar, ob Ozon eher einen förderlichen oder hemmenden Einfluß auf die Bildung dieser Substanz hatte.

Der Gehalt an putativer neo-Chlorogensäure (Peak 1) war 11 Tage nach Versuchsbeginn in der ozonbehandelten Variante gegenüber den unbehandelten Kontrollbäumen weniger als halb so groß und nahm bis zum Versuchsende weiterhin ab. Allerdings kam es ab dem 11. Versuchstag auch in der Kontrollgruppe zu einer Verminderung dieser Substanz, bis in beiden Behandlungsvarianten zum Versuchsende ähnlich niedrige Werte gemessen wurden, die etwa ein Fünftel des Ausgangswertes betragen (Abb. 3.38, S. 123).

Bei den beiden putativen Kaffeesäurederivaten (Peak 2 und 3) entwickelten sich die Gehalte im Versuchsverlauf deutlich unterschiedlich. Peak 2 nahm zunächst bis 11 Tage nach Versuchsbeginn in Kontrolle und Behandlung zu, blieb dann bis 62 Tage vor Versuchsende auf etwa diesem Niveau und ging schließlich wieder auf etwas weniger als den Anfangswert zurück. Dabei lagen ab Tag 34 höhere Gehalte dieser Substanz in den ozonbehandelten Proben vor. Peak 3 dagegen nahm während der Versuchsdurchführung sowohl in Kontrolle als auch in der Behandlung stetig ab und erreichte etwa ein Viertel seines Ausgangswertes. Ein Einfluß von Ozon auf den Gehalt dieser Substanz konnte nicht festgestellt werden (Abb. 3.38, S. 123).

Für die drei identifizierten putativen Cumarsäurederivate (Peak 4 bis 6) wurde ein einheitlicher Verlauf der entsprechenden Gehalte ermittelt. In den Kontrollpflanzen kam es jeweils zu einer beständigen Abnahme dieser Peaks, bis zu Versuchsende nur noch etwa ein Drittel bis ein Fünftel der jeweiligen Substanz nachgewiesen werden konnte. In der ozonbehandelten Variante lagen die Gehalte bei der ersten und letzten



**Abbildung 3.37:** Chromatogramm und Einzelpeak-Absorptions-Spektren der HPLC-Analyse löslicher phenolischer Inhaltsstoffe aus ozonbehandelten Buchenblättern in Versuch C (Variante a, 150-190 nl/l, 8 h/d, 84 d). In Absprache mit Dr. Werner Heller wurde den einzelnen Substanzen anhand der HPLC-Retentionszeiten und im Vergleich mit UV-Absorptions-Spektren bekannter Substanzen die vermutlich zugrundeliegende phenolische Stoffklasse zugeordnet. r.E. = relative Einheiten.

Probenahme zwar auf dem selben Niveau wie bei den Kontrollpflanzen, bei der Betrachtung des Zeitverlaufs fällt aber auf, daß es unter dem Einfluß von Ozon zunächst

zu einem stärkeren Rückgang und bis zum 62. Tag nach Versuchbeginn wieder zu einem Anstieg dieser Substanzen kam, dem ein neuerlicher Rückgang bis zum Versuchsende folgte (Abb. 3.38, S. 123).

Peak 7, bei dem es sich wahrscheinlich um n-Chlorogensäure handelt, nahm im Mittel bis zum 11. Versuchstag in den unbehandelten Bäumen zu und in der ozonbehandelten Gruppe ab. Von diesem Zeitpunkt bis zum Versuchsende lag der Gehalt dieser Substanz unter dem Einfluß von Ozon bei etwa einem Drittel des Wertes in der Kontrolle (Abb. 3.38, S. 123).

Der Gehalt des putativen Ferulasäurederivats (Peak 8) nahm unter dem Einfluß von Ozon zunächst leicht zu, sank dann aber bis zum Versuchsende wieder deutlich ab. In der Kontroll-Variante kam es dagegen bis zur vorletzten Messung, 62 Tage vor Versuchsende, zu einem leichten Anstieg des entsprechenden Wertes. Erst bei der letzten Messung ging dieser dann auf etwa das 1,5-fache des in der Ozonbehandlung gemessenen Wertes zurück (Abb. 3.38, S. 123).

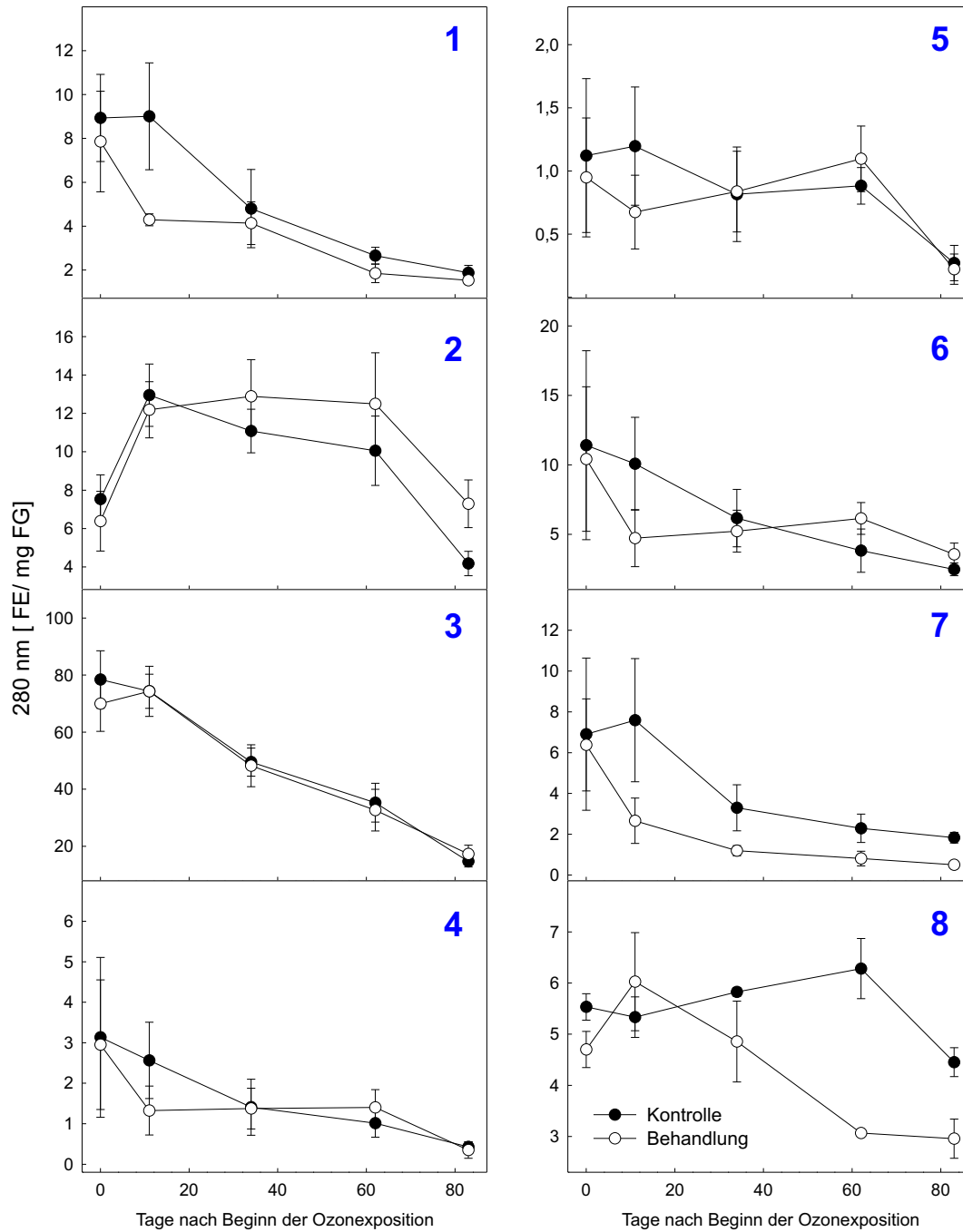
Im Verlauf des Versuchs C nahm der Gehalt an Peak 9 bis 62 Tage nach Versuchbeginn sowohl in der Kontrollvariante als auch unter dem Einfluß von Ozon zu. Dabei fiel der Anstieg in den nicht ozonbehandelten Pflanzen deutlicher aus. Danach reduzierte sich der entsprechende Wert wieder in beiden Behandlungsvarianten und lag am Versuchsende in den Kontrollbäumen mehr als Doppelt so hoch wie in den ozonbehandelten Bäumen (Abb. 3.39, S. 124).

Die beiden Flavanone (Peak 10 und 11) zeigten unter dem Einfluß von Ozon einen ähnlichen Induktionsverlauf. Beide Substanzen waren bis zum 11. Versuchstag in Kontrolle und Behandlung etwa ähnlich häufig, nahmen danach aber in der ozonbehandelten Variante auf etwa das Doppelte des Wertes der Kontrollpflanzen zu und blieben bis zum Versuchsende auf diesem Niveau induziert (Abb. 3.39, S. 124).

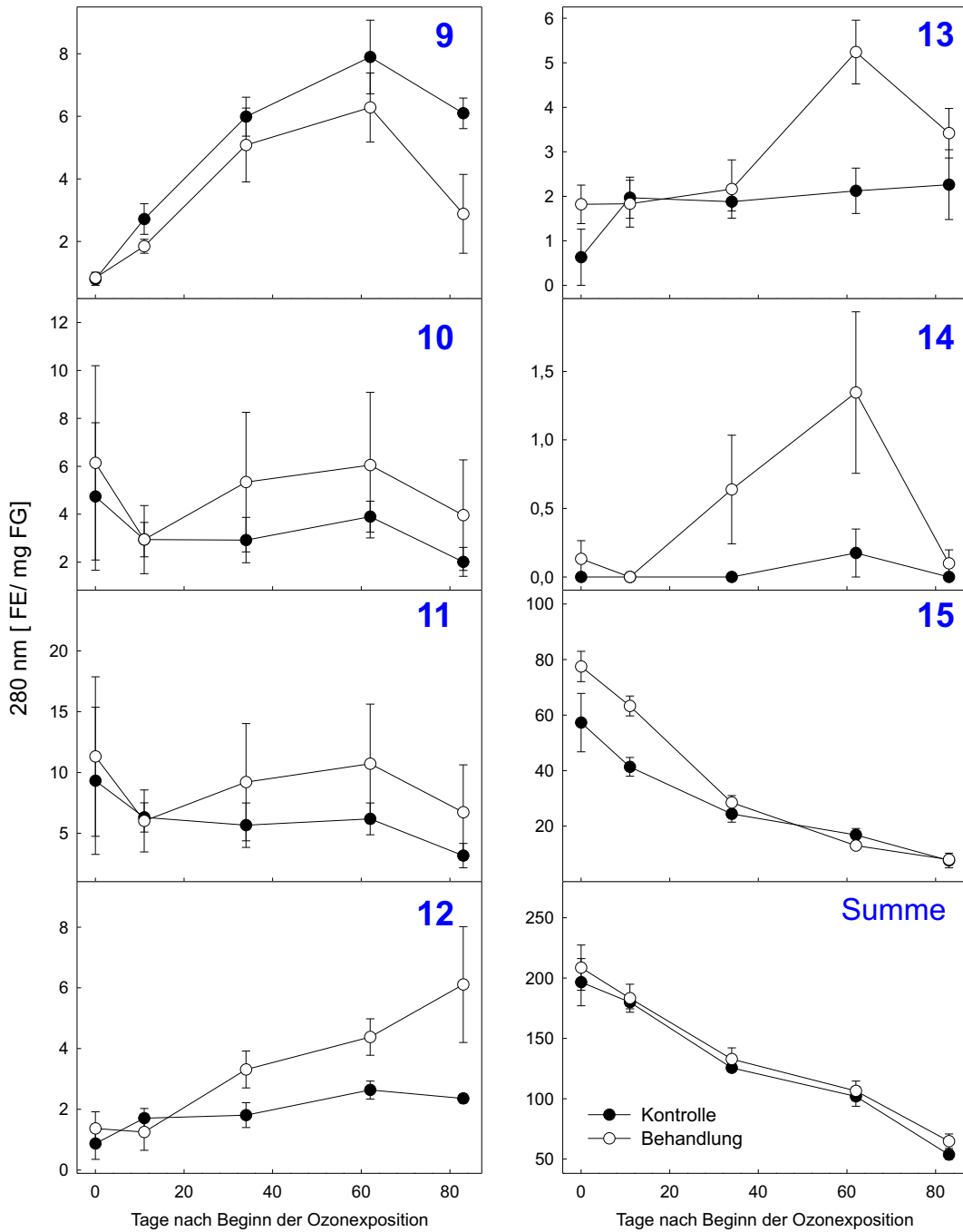
Eine Induktion durch Ozon konnte ebenfalls für das mutmaßliche Di-Kaffeesäurederivat (Peak 12) festgestellt werden. Der Gehalt dieser Substanz stieg in den ozonbehandelten Pflanzen bis zum Versuchsende um mehr als das vierfache an. Ein entsprechender Anstieg in den Kontrollpflanzen war weniger ausgeprägt. Bei der letzten Probenahme war Peak 12 in den ozonbehandelten Pflanzen mehr als 2,5 mal so groß wie in den Kontrollpflanzen (Abb. 3.39, S. 124).

Das putative Kaempferolderivat (Peak 13) lag bis 34 Tage nach Versuchbeginn in Kontrolle und Ozonbehandlung auf etwa demselben Niveau. Vier Wochen später wiesen die ozonbehandelten Pflanzen im Vergleich mit den Kontrollpflanzen mehr als doppelt soviel von dieser phenolischen Substanz auf. Am letzten Versuchstag ging deren Gehalt unter dem Einfluß von Ozon wieder leicht zurück, blieb aber höher als unter Kontrollbedingungen (Abb. 3.39, S. 124).

Durch die Ozonbehandlung wurde auch das putative 3,3',4,4'-Tetramethoxy-Biphenyl (Peak 14) induziert. Dessen Gehalt nahm ab dem 34. Versuchstag stark zu und erreichte am 62. Tag nach Versuchbeginn ein Maximum. Der Mittelwert des Gehalts dieser Substanz in den ozonbehandelten Pflanzen lag zu diesem Zeitpunkt um mehr als das siebenfache über dem der Kontrollpflanzen, welcher über den gesamten Versuchsverlauf relativ niedrig blieb. Zum Ende des Versuchs ging auch in den ozonex-



**Abbildung 3.38:** Lösliche phenolische Inhaltsstoffe: Peak 1 bis 8 (Versuch C, 150-190 nl/l O<sub>3</sub>, 8 h/d, 84 d). Dargestellt sind die Mittelwerte von je 4 ozonbehandelten (Versuchsvariante a) und 4 Kontrollbäumen (Versuchsvariante k) ± SEM. Rechts oben: Peaknummer (siehe Abbildung 3.37, S. 121).



**Abbildung 3.39:** Lösliche phenolische Inhaltsstoffe: Peak 9 bis 15 (Versuch C, 150-190 nI/l O<sub>3</sub>, 8 h/d, 84 d). Dargestellt sind die Mittelwerte von je 4 ozonbehandelten (Versuchsvariante a) und 4 Kontrollbäumen (Versuchsvariante k) ± SEM. Rechts oben: Peaknummer (siehe Abbildung 3.37, S. 121).



ponierten Pflanzen der Gehalt an putativem 3,3',4,4'-Tetramethoxy-Biphenyl wieder zurück und erreichte schließlich etwa den Ausgangswert (Abb. 3.39, S. 124).

Die Gruppe der diacylierten Flavonolglycoside (Peak 15) unterschied sich im Gehalt zwischen Kontrolle und behandelten Pflanzen bereits vor Beginn der Behandlung. Dieser Unterschied nahm dann im Verlauf der Behandlung, bei insgesamt sinkender Tendenz der entsprechenden Gehalte, immer mehr ab, bis die Werte am Versuchsende nahezu identisch waren (Abb. 3.39, S. 124).

### Zellwandgebundene phenolische Inhaltsstoffe

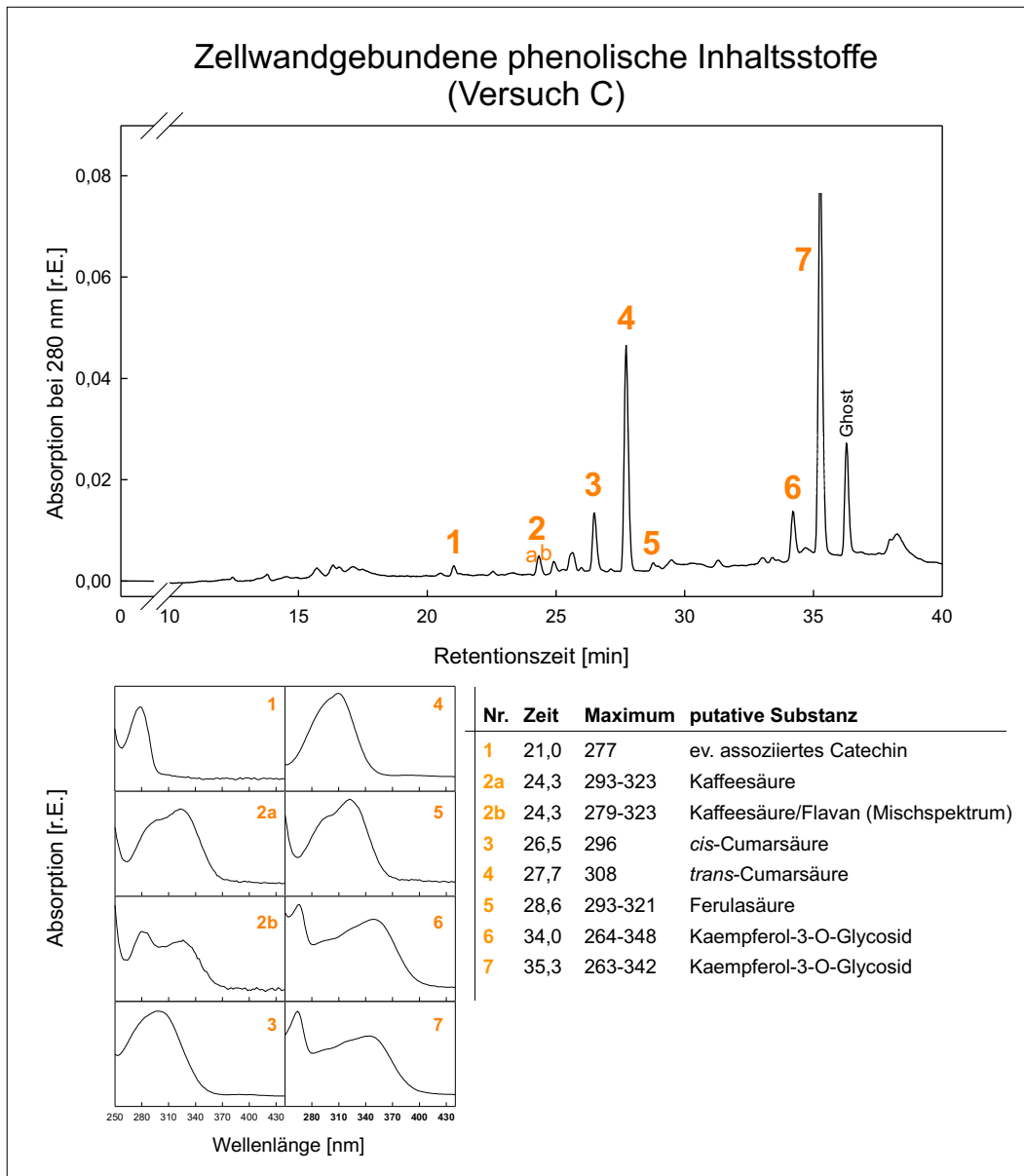
Bei der Analyse zellwandgebundener phenolischer Inhaltsstoffe wurden 7 Peaks unterschieden und, wie aus Abbildung 3.40, S. 126 ersichtlich, bezüglich ihrer HPLC-Retentionszeit und dem jeweiligen UV-Absorptions-Spektrum bekannten Substanzen zugeordnet. Im Einzelnen handelt es sich wahrscheinlich bei Peak 1 um ein assoziiertes Catechin, bei Peak 2a um Kaffeesäure, bei Peak 2b um ein Mischspektrum aus Kaffeesäure und einem Flavan, bei Peak 3 um *cis*-Cumarsäure, bei Peak 4 um *trans*-Cumarsäure, bei Peak 5 um Ferulasäure und bei den Peaks 6 und 7 um Kaempferol-3-*O*-Glycoside.

Sowohl in den ozonbehandelten als auch in den Kontrollpflanzen nahm die Konzentration an zellwandgebundenen phenolischen Substanzen im Versuchsverlauf bis zum 62. Tag nach Versuchsbeginn zu und in den letzten drei Versuchswochen wieder ab. In den Pflanzen unter erhöhtem Ozon lagen die Werte dabei bis zur vorletzten Probenahme tendenziell, aber nicht signifikant, über den Werten der Kontrollpflanzen. Der Unterschied der entsprechenden Mittelwerte war allerdings zu keinem Zeitpunkt signifikant. Am Versuchsende wurden in der Summe in Kontrolle und Ozonbehandlung gleiche Mengen an zellwandgebundenen phenolischen Substanzen gefunden.

Peak 1, bei dem es sich vermutlich um ein assoziiertes Catechin handelt, kam sowohl in den ozonbehandelten Pflanzen als auch in der Kontrollpflanzen nur in geringer Menge vor. Bereits vor Versuchsbeginn war in den Bäumen der Kontrollgruppe ein etwas höherer Gehalt dieser Substanz gefunden worden. Dieser Unterschied blieb bis zur letzten Probenahme im etwa selben Ausmaß bestehen (Abb. 3.41, S. 128).

Die zellwandgebundene phenolische Substanz von Peak 2 war als Einzige deutlich unter dem Einfluß von Ozon reprimiert. Ihr Wert nahm in den Kontrollpflanzen bei Versuchsbeginn bis zum 34. Tag stetig zu, während er in der Ozonbehandlung leicht abnahm. Bis zum 62. Versuchstag hatte sich in beiden Versuchsvarianten der Gehalt dieser putativen Substanz erhöht und sank bis zum Versuchsende wieder ab, im Falle der ozonbehandelten Pflanzen auf das Anfangsniveau und im Falle der Kontrollpflanzen auf ein knapp darüberliegendes Niveau (Abb. 3.41, S. 128).

Hinsichtlich Peak 3 war die zugrundeliegende phenolische Substanz, wahrscheinlich *cis*-Cumarsäure, bereits 11 Tage nach Versuchsbeginn in den ozonbehandelten Pflanzen gegenüber den Kontrollpflanzen leicht induziert. Die Tendenz der Gehalte an dieser Substanz war bis zum Versuchsende in Kontrolle und Ozonbehandlung leicht fallend wobei der Gehalt in der ozonbehandelten Probe stets 10 bis 20% über dem der



**Abbildung 3.40:** Chromatogramm und Einzelpeak-Absorptions-Spektren der HPLC-Analyse zellwandgebundener phenolischer Inhaltsstoffe aus ozonbehandelten Buchenblättern in Versuch C (Variante a, 150-190 nl/l, 8 h/d, 84 d). In Absprache mit Dr. Werner Heller wurde den einzelnen Substanzen anhand der HPLC-Retentionszeiten und im Vergleich mit UV-Absorptions-Spektren bekannter Substanzen die vermutlich zugrundeliegende phenolische Stoffklasse zugeordnet. r.E. = relative Einheiten.

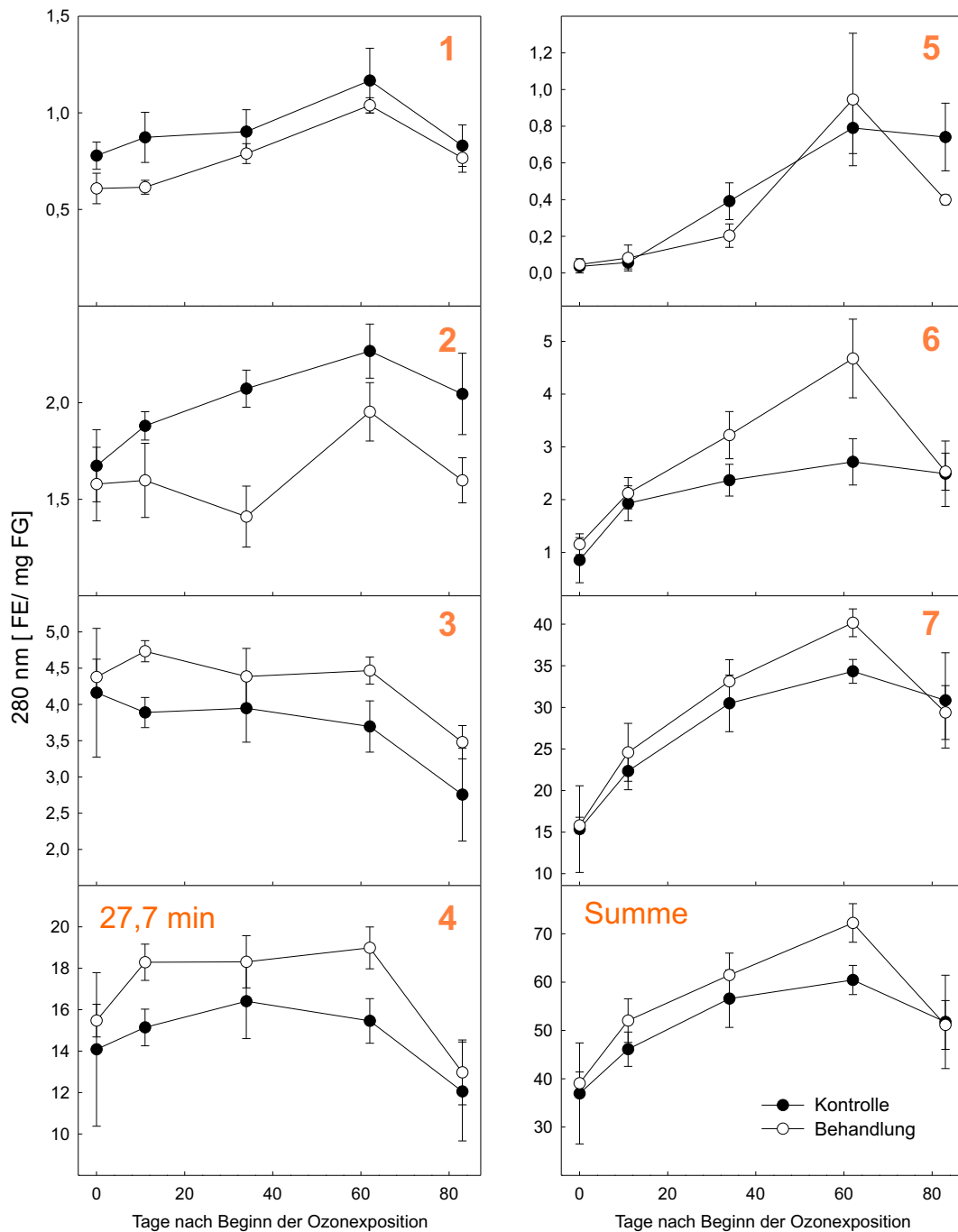
Kontrollprobe blieb (Abb. 3.41, S. 128).

Auch bei der putativen *trans*-Cumarsäure (Peak 4) war die Tendenz einer Induktion

durch Ozon zu beobachten. Allerdings stiegen die Gehalte hier bis zum 34. Tag nach Versuchsbeginn zunächst in Kontrolle und Behandlung an und sanken daraufhin auf weniger als das Anfangsniveau. Auch der Gehalt an putativer *trans*-Cumarsäure blieb in der ozonbehandelten Probe um etwa 10 bis 20% gegenüber der Kontrolle erhöht (Abb. 3.41, S. 128).

Für die nur in geringem Umfang vorkommende putative Ferulasäure (Peak 5) konnte weder eine Induktion noch eine Repression durch Ozon festgestellt werden. Der insgesamt zunehmende Gehalt dieser Substanz verlief bei Kontrolle und Ozonbehandlung parallel und ging erst bei der letzten Probenahme leicht zurück. Dieser Rückgang war bei den ozonbehandelten Pflanzen etwas stärker ausgeprägt (Abb. 3.41, S. 128).

Bei Peak 6 und 7 handelte es sich um zwei putative Kaempferol-3-*O*-Glycoside, die unter dem Einfluß von Ozon einen ähnlichen Induktionsverlauf zeigten. Bei beiden Substanzen kam es mit dem Beginn des Versuchs in den ozonbehandelten Pflanzen zu einer deutlicheren Zunahme der jeweiligen Substanz als in den Kontrollpflanzen. Am 62. Tag nach Versuchsbeginn war der größte Unterschied zwischen Kontrolle und Ozonbehandlung mit 72%-iger und 17%-iger Induktion der beiden putativen Kaempferol-3-*O*-Glycoside erreicht. Am Versuchsende lagen die Gehalte beider Substanzen in ozonbehandelten und Kontrollpflanzen wieder auf demselben Niveau (Abb. 3.41, S. 128).



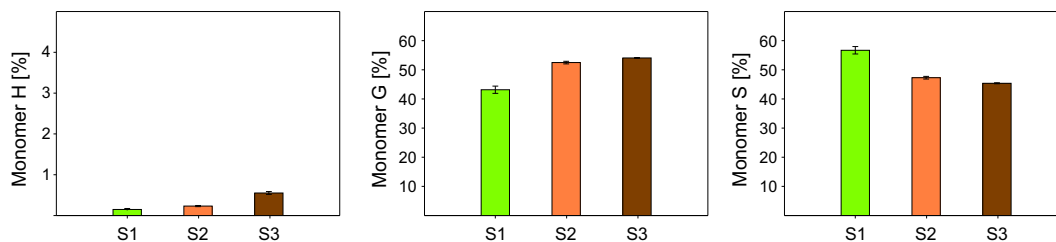
**Abbildung 3.41:** Zellwandgebundene phenolische Inhaltsstoffe (Versuch C, 150-190 n/l O<sub>3</sub>, 8 h/d, 84 d). Dargestellt sind die Mittelwerte von je 4 ozonbehandelten (Versuchsvariante a) und 4 Kontrollbäumen (Versuchsvariante k)  $\pm$  SEM. Rechts oben: Peaknummer (siehe Abbildung 3.40, S. 126).

### 3.7.5 Lignin

Für die Analyse von Lignin wurden nach dem Abschluß der Ozonbehandlung in Versuch B (200 nl/l O<sub>3</sub>, 8 h/d, 46 d) Blattproben genommen und in Kooperation mit Frau Dr. C. Lapierre (INRA, Versailles, Frankreich) hinsichtlich des Klason-Ligningehalts [49] untersucht. Hierbei wurden Blätter geerntet, die keine, mittlere und deutliche Ozonsymptome zeigten. Die Ozonsymptome dieser drei Blattproben (S1, S2 und S3) entsprachen den Boniturstufen 1, 2-4 und 5-6 gemäß Tabelle 2.4, S. 30. Zudem erfolgte eine Bestimmung der Anteile an den Lignin-Monomeren p-Hydroxyphenyl (H), Guaiacyl (G) und Syringyl (S) durch massenspektrographische Analyse von Thioacidolyse-Produkten [74].

Beim Ligningehalt nach Klason [49] ergaben sich zwischen den einzelnen Proben nur geringe Unterschiede. Wie Tabelle 6.26, S. 230 zu entnehmen ist, lag der entsprechende Ligninanteil des Trockengewichts von Probe S1 mit 26% Lignin etwas höher als bei Probe S2 (23% Lignin). Mit 30% Lignin-Anteil war der Gehalt in Probe S3 am höchsten.

In allen drei Proben lag der Anteil des Monomers H an den durch Thioacidolyse [74] aufgeschlossenen Lignin-Monomeren bei unter einem Prozent und war damit im Vergleich zu den Monomeren G und S sehr gering. Die Monomere G und S kamen im Durchschnitt über alle drei Proben etwa gleich häufig vor. Mit zunehmender Schädigung der Blätter unter dem Einfluß von Ozon reduzierte sich allerdings der Anteil des Monomers S, während sich der Gehalt der Monomere H und G erhöhte. Die zugrundeliegenden Meßwerte sind in Tabelle 6.27, S. 230 zusammengefaßt. Abbildung 3.42 zeigt die ozonbedingte Veränderung in der Zusammensetzung der einzelnen Monomere anhand der entsprechenden GC-MS Chromatogramme der Proben S1, S2 und S3.



**Abbildung 3.42:** Prozentuale Zusammensetzung der p-Hydroxyphenyl-, Guaiacyl- und Syringyl-Monomere (H, G und S) bei der Lignin-Thioacidolyse von nicht (S1), mittel (S2) und stark (S3) ozongeschädigten Buchenblättern (Versuch B, 200 nl/l O<sub>3</sub>, 8 h/d, 46 d). Die Ozonsymptome der Proben S1, S2 und S3 entsprachen den Boniturstufen 1, 2-4 bzw. 5-6 gemäß Tabelle 2.4, S. 30.

## 3.8 Akkumulation putativer Shikimatstoffwechsel-Enzyme

Parallel zur Genexpressionsanalyse des Shikimatstoffwechsels wurde auch auf Proteinebene mittels spezifischer Antikörper der Einfluß von Ozon auf die Akkumulation ausgewählter Enzyme aus diesem Stoffwechselweg untersucht.

### 3.8.1 Herstellung der Expressionskonstrukte

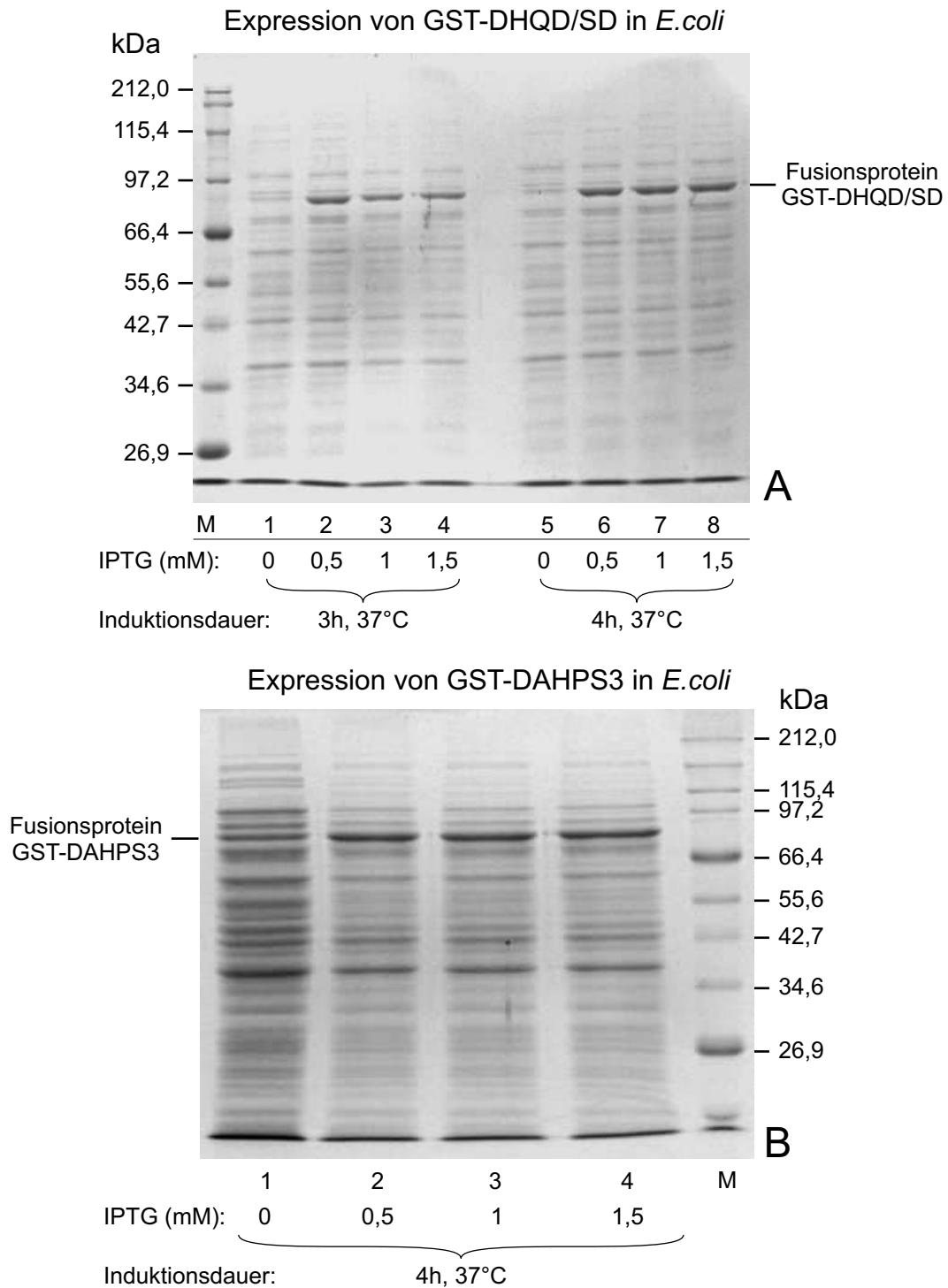
Da zu Beginn dieser Arbeiten noch keine Genexpressionsdaten für die klonierten putativen Gene des Shikimatstoffwechsels unter dem Einfluß von Ozon zur Verfügung standen, wurde für jedes an diesem Stoffwechselweg beteiligte Enzym (DAHPS, DHQS, DHQD/SD, SK, EPSPS, CS) und für CM ein Expressionsplasmid für die heterologe Proteinsynthese hergestellt.

Um die vollständige kodierende Sequenz der entsprechenden Gene zu erhalten, wurden mittels RACE-Methoden die durch PCR mit degenerierten Primern amplifizierte cDNA-Fragmente um die fehlenden 3'- und 5'-Enden ergänzt. Zur Herstellung von Konstrukten für die heterologe Proteinexpression wurden die offenen Leserahmen dieser Gene, ausgehend von cDNA, mit *Pfu*-DNA-Polymerase amplifiziert, wobei durch die entsprechenden Primer die für die homologe Rekombination notwendigen Sequenzbereiche vor dem Start- und nach dem Stop-Codon an die kodierenden Sequenzen der Gene angefügt wurden. Zur Verifizierung der vollständigen kodierenden Sequenz wurde diese noch einmal sequenziert.

Als Expressionsvektor wurde das Plasmid pDEST<sup>TM</sup>15 von Invitrogen (Carlsbad, USA) verwendet. Da dieser Vektor vor der Klonierungsstelle die kodierende Sequenz einer Glutathion-S-Transferase (GST) aufweist, führt die heterologen Proteinsynthese mit diesem Expressionsvektor zur Bildung von GST-Fusionsproteinen aus GST und dem einklonierten Gen, was die Aufreinigung der heterolog exprimierten Proteine deutlich erleichtert.

### 3.8.2 Heterologe Proteinexpression in *E. coli*

Die Expressionskonstrukte wurden zur heterologen Proteinexpression in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3) einkloniert. Für jedes Expressionskonstrukt wurden mehrere Einzelkolonien regeneriert und als Glycerinkultur bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Aufgrund der bei Versuch B beobachteten ozonbedingten Genexpressionsregulation von Fs-DAHPS3 und Fs-DHQD/SD wurden diese beiden Enzyme für die weitergehenden Arbeiten der heterologen Expression zur Synthese von Antikörpern ausgewählt.



**Abbildung 3.43:** Heterologe Expression der Fusionsproteine GST-DHQD/SD und GST-DAHPS3. Optimierung der Expressionsbedingungen durch verschiedene IPTG-Konzentrationen und Induktionszeitspannen. IPTG = Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-Galactopyranosid, M = Protein-Marker P7702S

Die Glycerinkulturen der beiden Expressionsklone für DAHPS3 und DHQD/SD wurden zunächst rekultiviert und in kleinem Maßstab (5 ml) auf die Effizienz der heterologen Proteinsynthese hin untersucht. Nach der Induktion mit verschiedenen Konzentrationen an IPTG (Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-Galactopyranosid) wurde die Proteinsynthese bei 37°C nach 2, 3 oder 4 Stunden beendet. Aus den induzierten Bakterienkulturen wurden dann die löslichen Proteine extrahiert und in SDS-Polyacrylamidgelen nach der Größe aufgetrennt. Der bakterielle Extrakt wurde zudem, wie unter 2.12.2, S. 51 beschrieben, durch die photometrische Bestimmung der GST-Aktivität auf die Bildung von GST-Fusionsproteinen untersucht.

Aufgrund dieser Analysen wurden zwei Expressionsklone ausgewählt, bei denen nach vierstündiger Induktion mit 1mM IPTG eine deutliche Expression der Fusionsproteine GST-DAHPS3 bzw. GST-DHQD/SD zu erkennen war (Abb. 3.43, S. 131). Die durch Zugabe von IPTG induzierbaren Proteinbanden von jeweils ca. 86 kDa entsprachen der erwarteten Größe der Fusionsproteinen GST-DAHPS3 und GST-DHQD/SD (87,6 kDa bzw. 85,8 kDa). Bei beiden Expressionsklonen hatte die zur Induktion verwendete IPTG-Konzentration keinen deutlichen Einfluß auf die erzeugte Proteinmenge.

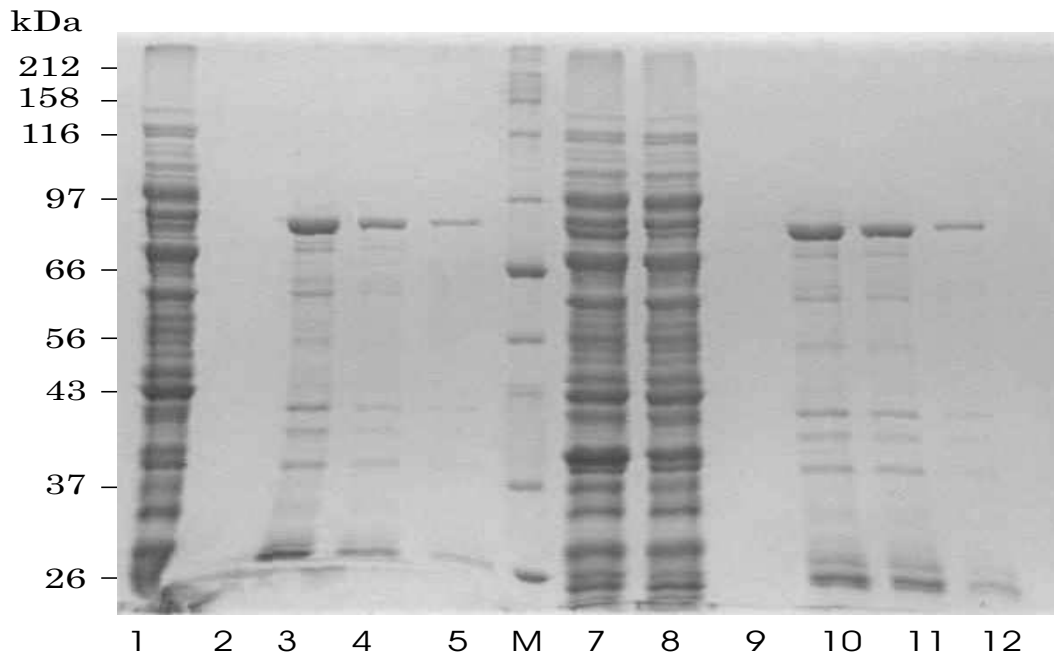
Um für die Antikörperproduktion ausreichende Mengen an Fusionsprotein zu erhalten wurden die ausgewählten Expressionsklone im 500 ml Maßstab angesetzt, mit 1 mM IPTG induziert und danach 4 Stunden lang kultiviert.

### **3.8.3 Aufreinigung der GST-Fusionsproteine zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen DAHPS3 und DHQD/SD**

Die Aufreinigung der induzierten Bakterienkulturen erfolgte in Affinitäts-Säulen mit immobilisiertem Glutathion. Zusätzlich zur SDS-Polyacrylamidgel-Analyse von Rohextrakt, Säulendurchfluß und den Eluaten wurden diese Lösungen nach der Aufreinigung auch auf GST-Aktivität untersucht (2.12.2, S. 51). Abbildung 3.44, S. 133 zeigt ein 10%-iges SDS-Gel, in dem die Eluate der aufgereinigten Fusionsproteine GST-DAHPS3 und GST-DHQD/SD aufgetrennt wurden.

Bei der Aufreinigung beider Fusionsproteine trat hierbei eine Bande am deutlichsten hervor, die etwa der rechnerischen Größe von 87,6 kDa im Falle von GST-DAHPS3 und 85,8 kDa im Falle von GST-DHQD/SD entsprach. Obwohl nach dem letzten Waschschrift weder bei der Aufreinigung von GST-DAHPS3 noch bei GST-DHQD/SD verbleibende Protein-Verunreinigungen zu sehen waren, wurden bei der Elution auch kleiner Fragmente von der Säule gelöst. Hierbei handelte es sich möglicherweise um Fragmente der Fusionsproteine. Die Eluate von GST-DAHPS3 und GST-DHQD/SD wurden bei -20°C aufbewahrt und in Kooperation mit Dr. Elisabeth Kremmer (GSF, Hämatologikum) zur Synthese monoklonaler Antikörper verwendet.





**Abbildung 3.44:** Aufreinigung der Fusionsproteine GST-DAHPS3 und GST-DHQD/SD aus dem bakteriellen Rohextrakt mittels GSH-Affinitätschromatographie. Spur 1-5: Aufreinigung von GST-DAHPS3, Spur 8-12: Aufreinigung von GST-DHQD/SD. Dargestellt ist der ungebundene Säulendurchlauf (Spur 1 und 8), der Durchlauf des letzten Waschschrtes (Spur 2 und 9), je 3 Elutionen mit jeweils 500  $\mu$ l Elutionspuffer (Spur 3-5 und 10-12) und der bakterielle Rohextrakt des GST-DHQD/SD Expressionsklons (Spur 7). M = Proteinmarker P7702S.

### 3.8.4 Validierung der monoklonalen Antikörper gegen DAHPS3 und DHQD/SD

Gegen die Antigene GST-DAHPS3 und GST-DHQD/SD wurden sieben bzw. fünf verschiedene monoklonale Ratten-Antikörper erzeugt. In einem Immunoblot wurde zunächst überprüft, ob diese von dem sekundären Antikörper (Peroxidase-gekoppelt, Ziege anti-Ratte) erkannt wurden. Dazu wurden die monoklonalen Antikörper direkt auf eine PVDF-Membran aufgetropft und nach gründlichem Waschen mit dem sekundären Antikörper hybridisiert. Der immunologische Nachweis der primären Antikörper mittels Peroxidase-Reaktion zeigte, daß im Falle von GST-DAHPS3 nur einer und im Falle von GST-DHQD/SD nur drei der monoklonalen Antikörper ein deutliches Signal lieferten. Bei den anderen Antikörpern war das Präzipitat der Peroxidase-Reaktion entweder gar nicht oder nur sehr schwach zu erkennen.

Die nachweisbaren Antikörper wurden daraufhin bezüglich ihrer Spezifität für die Proteine DAHPS3 und DHQD/SD untersucht. Dazu wurden Extrakte aus ozonbehandelten Buchenblättern in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und, wie unter 2.12.5, S. 52 beschrieben, mittels Elektrophoretik auf PVDF-Membranen über-

tragen. Für die Überprüfung eines monoklonalen Antikörpers wurde eine solche PVDF-Membran zunächst mit diesem Antikörper und daraufhin mit dem sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörper hybridisiert. Es zeigte sich, daß nur dann Peroxidase-Signale erhalten werden konnten, wenn auf ein Aufkochen der Proben im SDS-Probenauftrage-Puffer verzichtet wurde.

Für die weitere Untersuchung der Akkumulation von DAHPS3 und DHQD/SD in ozonexponierten Buchenblättern wurde jeweils der monoklonale Antikörper mit dem besten spezifischen Bindevermögen für das jeweilige Antigen ausgewählt (DAHPS3-3F10 und DHQD/SD-6F2).

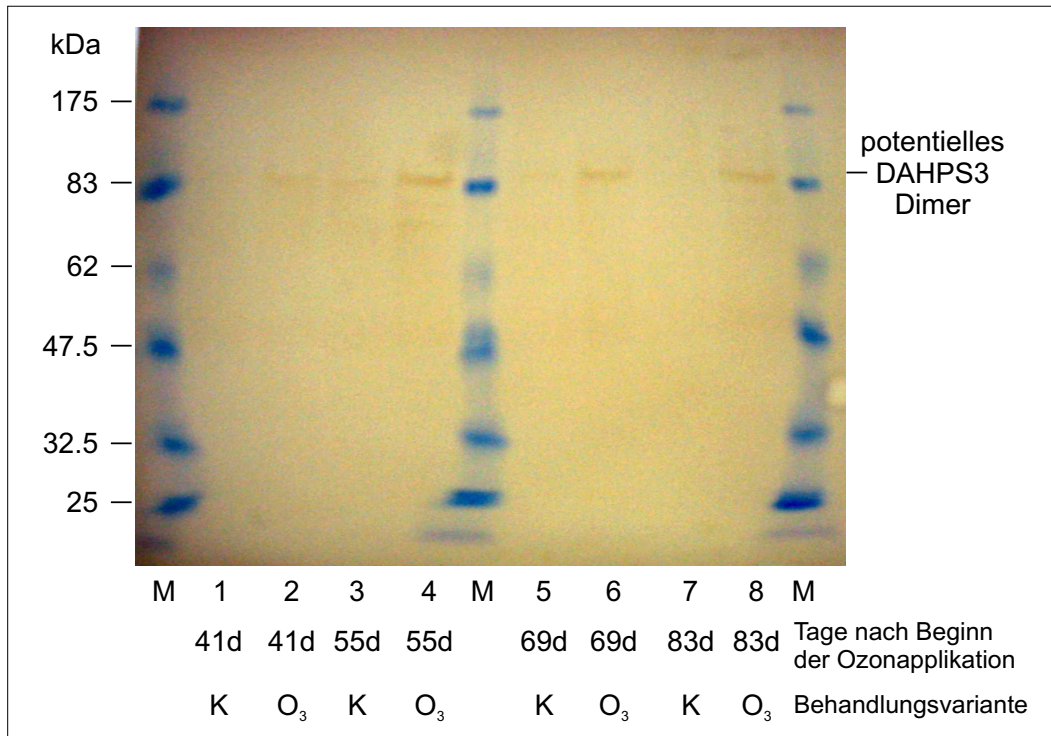
### **3.8.5 Westernblot-Analyse der Akkumulation von DAHPS3 und DHQD/SD im Verlauf der Ozonexposition von Versuch C**

#### **Quantifizierung des Proteins DAHPS3**

Die ozonbedingte Akkumulation des Enzyms DAHPS3 wurde anhand von ozonbehandeltem und nicht ozonbehandeltem Blattmaterial aus Versuch C (150-190 nl/l, 8 h/d, 84 d) überprüft. In einem ersten, zwischen Ozonbehandlung und Kontrolle vergleichenden Versuch wurden Proteinrohextrakte aus Buchenblättern isoliert, die 41, 55, 69 und 83 Tage nach Versuchsbeginn geerntet worden waren. Diese Extrakte wurden quantifiziert, in gleichen Mengen zusammen mit dem Protein-Größenstandard P7708S in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Elektrophorese auf eine PVDF-Membran übertragen. Nach der Hybridisierung dieser Membran mit dem primären DAHPS3-Antikörper DAHPS3-F10 und dem sekundären Peroxidase-konjugierten Antikörper wurde diese für etwa 5-10 Minuten in Peroxidase-Puffer inkubiert, bis Signale zu erkennen waren (Abb. 3.45, S. 135).

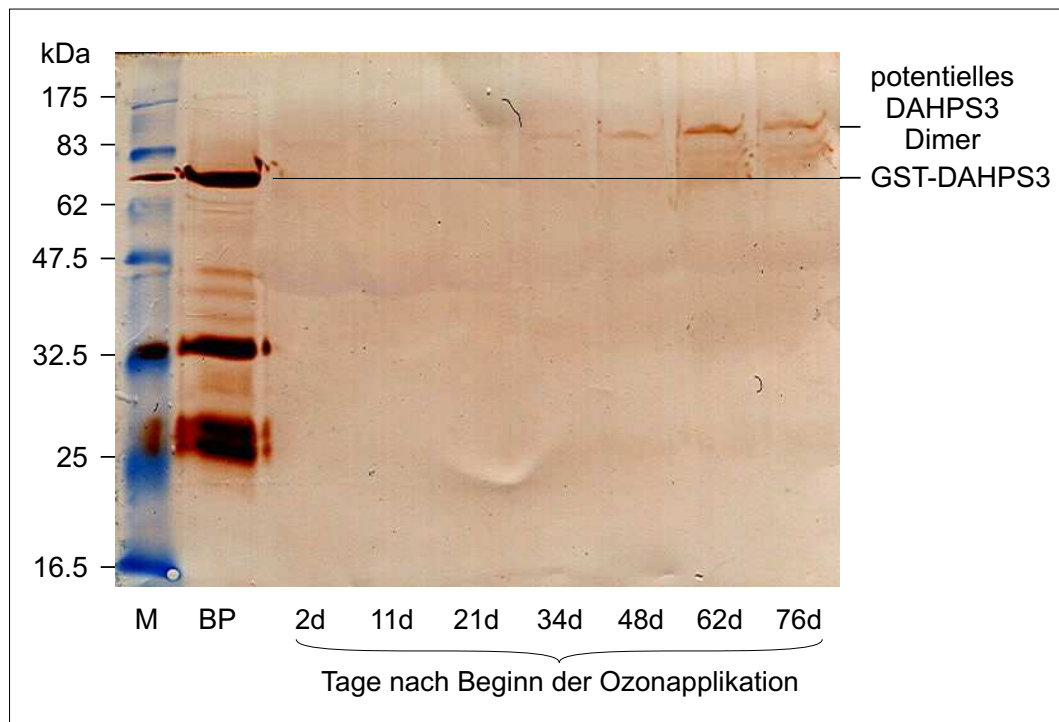
In den Proteinextrakten der ozonbehandelten Bäume konnte 55, 69 und 83 Tage nach Beginn der Behandlung mittels der Peroxidase-Reaktion eine singuläre Proteinbande nachgewiesen werden, nicht aber bei den entsprechenden Kontrollproben. Nach 41 Tagen war weder unter dem Einfluß von Ozon noch in der Kontrollvariante ein deutliches Signal zu erkennen.

Die detektierte Proteinbande lag mit mehr als 83 und weniger als 175 kDa deutlich über der für das Protein DAHPS3 erwarteten Größe von 53 kDa. Dieser Wert ergibt sich rechnerisch aus der Aminosäuresequenz von DAHPS3, wenn man davon ausgeht, daß die gemäß 'TargetP' [65, 224] prognostizierte 65 Aminosäuren lange chloroplastidäre Importsequenz des Enzym-Vorläufermoleküls von dem prozessierten Enzym bereits abgespalten wurde. Da die Proteine vor dem Probenauftrag nicht auf 100°C erhitzt wurden und die Elektrophorese bei niedrigen Temperaturen (4-10°C) durchgeführt wurde, handelt es sich bei der fraglichen Proteinbande möglicherweise um das ca. 106 kDa große Homodimer aus zwei gleichen DAHPS3-Untereinheiten, was dem nativen Zustand pflanzlicher DAHP Synthasen entsprechen würde [122]. Es ist bekannt, daß die Auftrennung von Oligomeren auch in SDS-Polyacrylamid-Gelen möglich ist, wenn auf ein Erhitzen der Proben vor der Elektrophorese verzichtet wird [152, 301].



**Abbildung 3.45:** Differentielle Akkumulation des putativen Enzyms DAHPS3 unter dem Einfluß von Ozon in Versuch C (150-190 nl/l O<sub>3</sub>, 8 h/d, 84 d). DAHPS3-spezifische Hybridisierung einer PVDF-Membranen mit je 50 µg Proteinextrakt aus ozonbehandelten (Spur 2, 4, 6 und 8) bzw. unbehandelten (Spur 1, 3, 5 und 7) Buchenblättern 41, 55, 69 bzw. 83 Tage nach Versuchsbeginn. M = Protein-Marker P7708S.

Um die zeitliche Entwicklung der Akkumulation des oben beschriebenen putativen DAHPS3-Dimers zu untersuchen, wurden in einem weiteren Ansatz die Proteinextrakte von Buchenblättern nach 2 bis 76 Tagen Ozonbehandlung verwendet. Als Größenvergleich wurde bakterieller Rohextrakt des Expressionsklons GST-DAHPS3 zusammen mit diesen Proben in einem SDS-Gel aufgetrennt, auf PVDF Membran transferiert und, wie oben beschrieben, mit den beiden Antikörpern inkubiert. Im bakteriellen Extrakt des Expressionsklons GST-DAHPS3 wurden drei verschiedene Proteinbanden mit einer Größe von ca. 75, 34 und 26 kDa durch den primären Antikörper DAHPS3-F10 erkannt (Abb. 3.46, S. 136). Keines dieser Signale entspricht der erwarteten Größe des GST-DAHPS3 Fusionsproteins, das rechnerisch 87,6 kDa aufweist. Während es sich bei den kleineren detektierten Proteinen wahrscheinlich um Fragmente des Fusionsproteins handelt, wie sie bereits bei der Aufreinigung dieses Proteins gefunden wurden (3.8.3, S. 132), entspricht das größte Fragment vermutlich dem Fusionsprotein GST-DAHPS3, das durch die unvollständige Denaturierung vor der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese möglicherweise schneller im Gel transportiert wurde und damit kleiner erscheint.



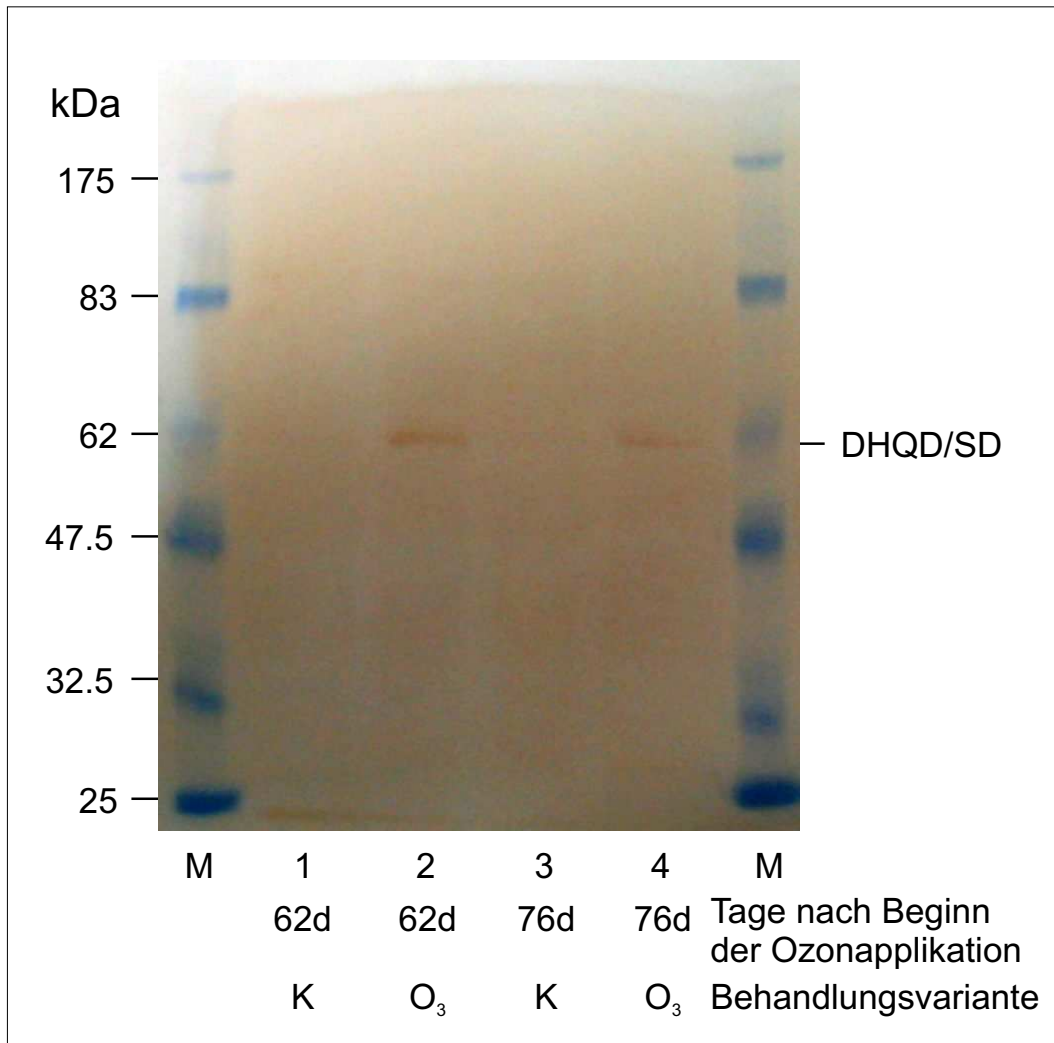
**Abbildung 3.46:** Zeitkinetik der Akkumulation des putativen Enzyms DAHPS3 im Verlauf der Ozonexposition von Versuch C (150-190 nl/l, 8 h/d, 84 d). Hybridisierung mit DAHPS3-spezifischem Antikörper. Proben auf der PVDF-Membran: Protein-Marker P7708S (M), 25  $\mu\text{g}$  bakterieller Proteinextrakt des *E. coli* GST-DAHPS3-Expressionsklons (BP) und je 70  $\mu\text{g}$  Proteinextrakt aus ozonbehandelten Buchenblättern 2, 11, 21, 34, 48, 62 und 76 Tage nach Versuchsbeginn. GST = Glutathion-S-Transferase, GST-DAHPS3 = Fusionsprotein aus GST und DAHPS3.

Auch bei diesem Experiment trat gegen Ende des Versuchs eine Akkumulation des putativen DAHPS3-Dimers auf. Diese begann etwa 34 Tage nach Versuchsbeginn. Das Maximum der Akkumulation wurde 62 Tage nach Versuchsbeginn erreicht. Der Verlauf der Akkumulation des putativen Proteins DAHPS3 entsprach damit gut dem ozonbedingten Genexpressionsverlauf von *Fs-DAHPS3* in Versuch C (siehe Abb. 3.22, S. 96).

### Quantifizierung des Proteins DHQD/SD

Wie für DAHPS3 wurde auch für das Enzym DHQD/SD die ozonbedingte Akkumulation in Blattmaterial aus Versuch C (150-190 nl/l, 8 h/d, 84 d) bestimmt. Als sekundärer, DHQD/SD-spezifischer Antikörper wurde hierbei der Antikörper DHQD/SD-6F2 verwendet. Die entsprechenden Westernblots wurden, wie unter 2.12.5, S. 52 beschrieben, durchgeführt. Auch hier wurden die Proteinproben vor dem Auftragen auf das SDS-Polyacrylamidgel nicht aufgekocht.

Im Vergleich ozonbehandelter und unbehandelter Blattproben 62 und 76 Tage nach Beginn des Versuchs war unter dem Einfluß von Ozon eine Proteinbande nachweisbar, die in den unbehandelten Kontrollproben nicht zu sehen war (Abb. 3.47). Diese wies eine Größe von etwa 60 kDa auf, was rechnerisch der erwarteten Größe von DHQD/SD entspricht. Sowohl 62 als auch 76 Tage nach Versuchsbeginn war zwischen Ozonbehandlung und Kontrolle ein Unterschied in der Akkumulation des putativen Proteins DHQD/SD zu beobachten.

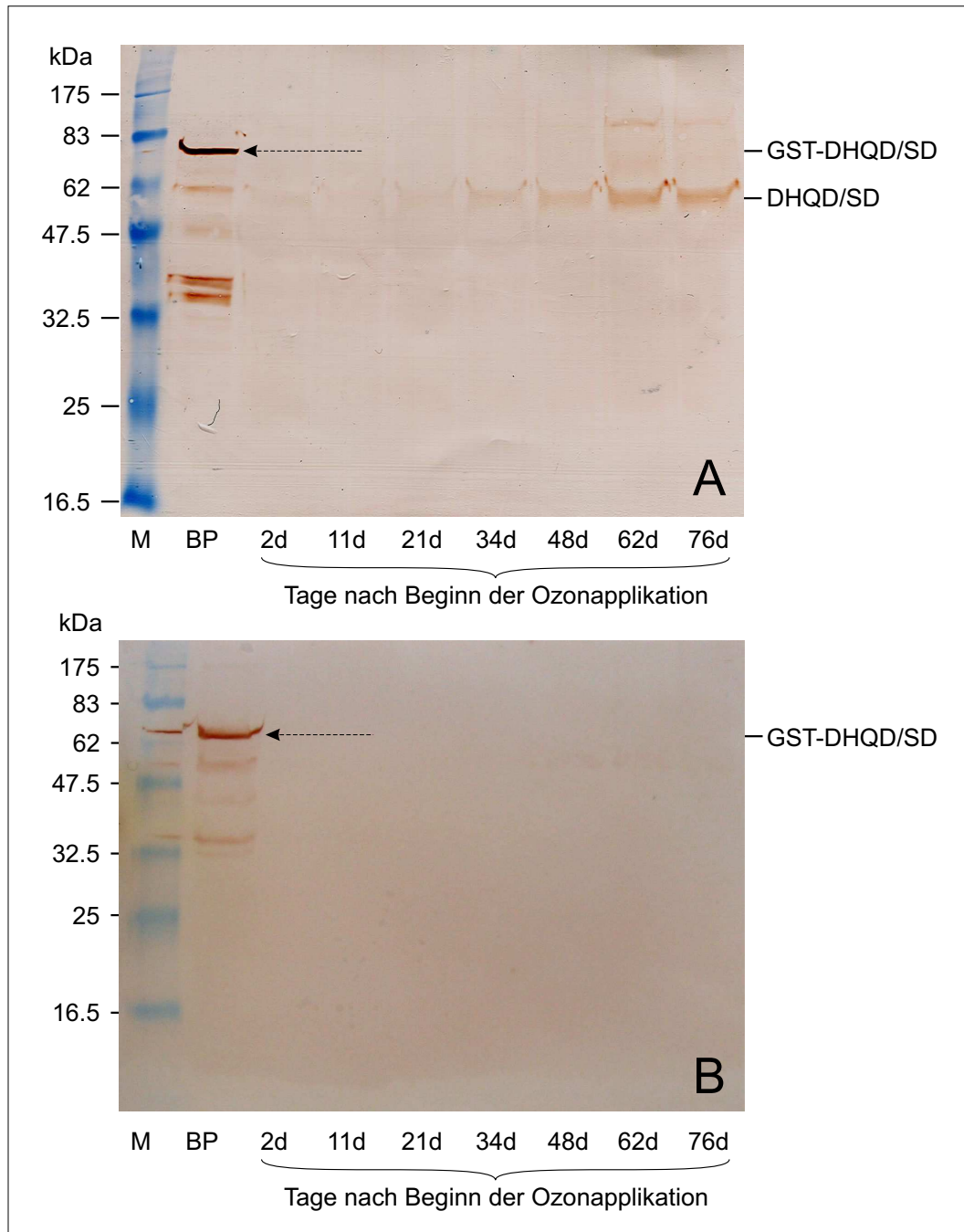


**Abbildung 3.47:** Differentielle Akkumulation des putativen Enzyms DHQD/SD unter dem Einfluß von Ozon in Versuch C (150-190 nl/l O<sub>3</sub>, 8 h/d, 84 d). DHQD/SD-spezifische Hybridisierung einer PVDF-Membran mit je 50 µg Proteinextrakt aus ozonbehandelten (Spur 2 und 4) bzw. unbehandelten (Spur 1 und 3) Buchenblättern 62 bzw. 76 Tage nach Versuchsbeginn. M = vorgefärbter Protein-Marker P7708S.

In zwei weiteren Westernblot-Analysen wurde die Akkumulation von DHQD/SD im Verlauf von Versuch C untersucht. Hierzu wurden, wie unter 3.8.5, S. 134, Proben der Erntezeitpunkte 2, 11, 21, 34, 48, 62 und 76 Tage nach Versuchsbeginn verwendet. In getrennten Hybridisierungen wurden einerseits die Proteinextrakte der ozonbehandelten und andererseits die der unbehandelten Proben, jeweils zusammen mit einem bakteriellem Extrakt des GST-DHQD/SD-Expressionsklons auf die Quantität des Proteins DHQD/SD hin analysiert (Abb. 3.48, S. 139).

Wie bei der Analyse des GST-DAHPS3-Expressionsklons (3.8.5, S. 134) hybridisierte auch hier der verwendete monoklonale Antikörper mit mehreren Proteinbanden des Proteinextrakts des GST-DHQD/SD-Expressionsklons. Auch in diesem Fall blieb das scheinbare Gewicht des größten markierten Fragments mit etwa 75 kDa hinter dem rechnerisch erwarteten Gewicht von 86 kDa zurück. Kleinere Fragmente wiesen Größen von etwa 62, 38 und 34 kDa auf. Es ist möglich, daß die eventuell unzureichende Denaturierung des Fusionsproteins GST-DHQD/SD auch hier Einfluß auf das Laufverhalten dieses Proteins hatte.

Im Vergleich der Teilbilder A und B von Abbildung 3.48, S. 139 sieht man, daß es nur bei den ozonbehandelten Proben aus Versuch C zu einer Bindung des monoklonalen Antikörpers DHQD/SD-6F2 kam. Das markierte Proteinfragment wies mit etwa 60 kDa die rechnerisch für DHQD/SD erwartete Größe auf. Die Akkumulation dieses Proteins begann etwa 21 Tage nach Beginn von Versuch C und erreichte ihren Höhepunkt nach 62 Tagen, woraufhin ein leichter Rückgang erfolgte. Dieser Befund steht im Einklang mit der für das Gen *Fs-DHQD/SD* ermittelten Genexpression im Verlauf von Versuch C (3.5.4, S. 94).

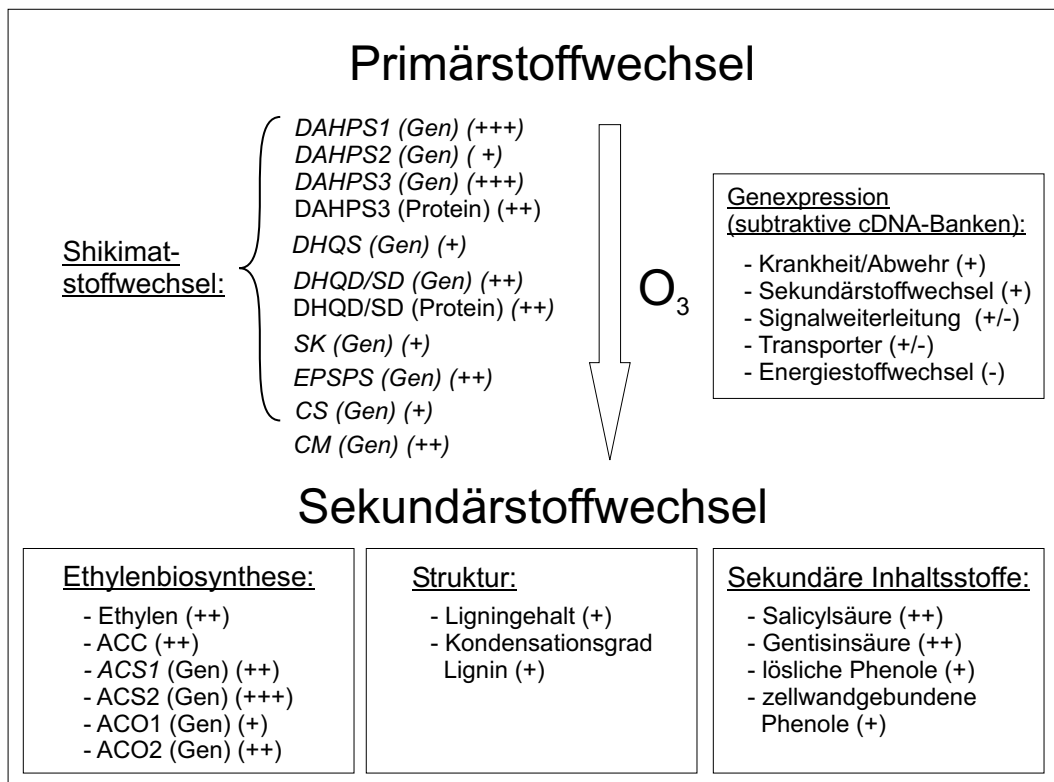


**Abbildung 3.48:** Zeitkinetik der Akkumulation des putativen Enzyms DHQD/SD im Verlauf der Ozonexposition von Versuch C (150-190 nl/l, 8 h/d, 84 d) mittels Westernblot. Hybridisierung mit DHQD/SD-spezifischem Antikörper. Proben auf der PVDF-Membran: Protein-Marker P7708S (M), 25 µg bakterieller Proteinextrakt des *E. coli* GST-DHQD/SD-Expressionsklons (BP) und je 70 µg Proteinextrakt aus ozonbehandelten (A) und unexponierten (B) Buchenblättern 2, 11, 21, 34, 48, 62 und 76 Tage nach Versuchsbeginn. GST = Glutathion-S-Transferase, GST-DHQD/SD = Fusionsprotein aus GST und DHQD/SD.

## 4. Diskussion

### 4.1 Umsteuerung zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel

Vor allem in den Gewächshausversuchen konnten deutliche Anzeichen für eine ozonbedingte Umsteuerung zwischen Primär- und Sekundärmetabolismus auf molekularer Ebene gefunden werden. So waren einzelne Gene der Shikimatstoffwechsels, der in Pflanzen wohl die wichtigste Verbindung zwischen Primär- und Sekundärmetabolismus darstellt, durch die Ozonbehandlung zum Teil deutlich induziert und auch auf Proteinebene konnte erstmals für zwei Enzyme dieses Stoffwechselwegs eine ozonbedingte Akkumulation nachgewiesen werden.



**Abbildung 4.1:** Umsteuerung zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel unter dem Einfluß von Ozon gemäß Beobachtungen aus den durchgeführten Ozonexpositionsversuchen. Entsprechend der relativen Intensität sind die Induktionen mit (+++), (++) und (+) gekennzeichnet. Abkürzungen siehe 6.1, S. 202

Dieser Befund läßt vermuten, daß es in den gestreßten Pflanzen zu einer Anreicherung von Vorläufersubstanzen für phenolische sekundäre Inhaltsstoffe kam. Tatsäch-



lich wurde für die an der pflanzlichen Abwehr beteiligten phenolischen Verbindungen Salicylsäure und Gentsinsäure und in der Tendenz auch für ein breites Spektrum weiterer löslicher und zellwandgebundener Phenole eine solche Induktion ermittelt. Sowohl der Gehalt als auch der Kondensationsgrad des Strukturpolymers Lignin nahmen parallel zur Ausbildung ozonbedingter Läsionen zu. Bei der Analyse der ozonregulierten subtraktiven cDNA-Banken fanden sich viele ozoninduzierte Gene aus den Bereichen 'Krankheit/Abwehr' und 'Sekundärstoffwechsel', während Gene aus dem Energiestoffwechsel der Buche deutlich reprimiert wurden. Auch eine starke ozonbedingte Induktion der Ethylenbiosynthese konnte auf Gen- und Metabolitebene nachgewiesen werden. In Abbildung 4.1, S. 140 sind diese Befunde unter Verweis auf stärkere und schwächere Induktionen zusammengefaßt.

Die im SFB 607 formulierte zentrale Hypothese einer streßbedingten Umsteuerung zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel kann also unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen angenommen werden. Die ozonbedingte Induktion aller Enzyme des Shikimatstoffwechsels wurde hier erstmals als Indiz für eine solche Umsteuerung in höheren Pflanzen auf molekularbiologischer Ebene dokumentiert. Es konnte zudem gezeigt werden, daß auch in einer verholzenden Pflanze wie der Buche unter dem Einfluß von Streß ähnliche Genexpressionsmuster, Regelmechanismen und Metabolite gefunden werden können, wie in krautigen Pflanzen.

## 4.2 Ozonexpositionsversuche

### 4.2.1 Einflußfaktoren der Wirkung von Ozon auf Bäume

Ozon ist der für Wälder wohl bedeutendste Luftschadstoff [191, 200, 299] und kann in Pflanzen wie ein Elicitor Abwehrreaktionen auf verschiedenen Ebenen stimulieren [276]. Bei der Frage nach den Auswirkungen von Ozon auf Bäume müssen unterschiedliche Einflußfaktoren berücksichtigt werden, die im Folgenden, bezugnehmend auf die hier durchgeführten Ozonexpositionsversuche, erläutert werden.

- Dauer und Intensität der Ozonbelastung (chronisch, akut)
- Alter der Bäume
- Genetische Variabilität
- Skalierungsebene der Auswirkungen von Ozon (Zelle, Blatt, Ast, Baum)
- Klima- und Expositionsbedingungen
- Quantifizierung der Schadwirkungen von Ozon

#### **Dauer und Intensität der Ozonbelastung**

Häufig wird, je nach Expositionsdauer und Ozonkonzentration, zwischen 'chronischer' und 'akuter' Belastung durch Ozon unterschieden. Trotz gleicher kumulativer

Ozondosis können bei akuter und chronischer Ozonbehandlung unterschiedliche Effekte auftreten [263]. So führt chronischer Ozonstreß meist zu einer verfrühten herbstlichen Seneszenz, während eine akute Ozonexposition, die im Freiland sehr selten ist, Membranschädigungen und oxidativen Zelltod induzieren kann [192, 259].

Um dem großen Einfluß höherer Ozonkonzentrationen Rechnung zu tragen, wurden zur Quantifizierung der Ozonbelastung Indizes wie der AOT40 eingeführt (1.3.3, S. 7), welche nur Konzentrationen oberhalb eines bestimmten Schwellenwertes berücksichtigen. Diese Modelle ermöglichten allerdings keine Aussage über die Menge an Ozon, welche tatsächlich in die Pflanze gelangt und bezogen auch die nächtliche Ozonexposition meist nicht ein, obwohl man heute weiß, daß auch diese zur Schädigung durch Ozon beitragen kann [100, 189]. Deshalb sind mittlerweile verschiedene Indizes in der Diskussion, die auf der kumulativen Aufnahme (CU) von Ozon durch die Stomata in den Interzellularraum der Blätter basieren [66, 193] und verschiedene Klimaparameter wie Einstrahlung und Luftfeuchtigkeit miteinbeziehen. Ziel ist die Ermittlung des physiologisch und ökologisch wirksamen Anteils dieses Schadgases [88, 98, 193]. Matyssek et al. [193] stellten erst vor kurzem ein Modell vor, bei dem der stomatare O<sub>3</sub>-Flux auf das antioxidative Potential der Bäume bezogen wurde, um ökologisch sinnvolle Standards zum Schutz vor Ozon zu definieren. Unter Verwendung dieses Modells konnte bereits eine gute Korrelation zwischen Blattschäden und Ozonaufnahme hergestellt werden, so daß Expositionsindizes wie AOT40 möglicherweise bald durch derartige Fluxmodelle abgelöst werden können [193].

Schon vor knapp 20 Jahren wurde auf die chronische Belastung von Bäumen durch Ozon hingewiesen [263], von der heute vermutlich große Teile Europas betroffen sind [133]. Die Auswirkungen einer chronischen Ozonbelastung waren allerdings bisher nur in Ausnahmefällen spezifisch auf den Einfluß von Ozon zurückzuführen [272]. Dagegen sind die Symptome einer akuten Ozonexposition meist klar durch die Ausbildung feiner brauner Punkte auf der Blattspreite zu erkennen [133]. Während sich derartige Symptome bei einigen krautigen Pflanzen oft schon nach wenigen Stunden entwickeln [167, 312], können die Blätter von Bäumen auch bei hohen Ozonkonzentrationen von bis zu 300 nl/l über mehrere Wochen ohne makroskopisch sichtbare Symptome bleiben [169].

Bei den in der vorliegenden Arbeit im Gewächshaus durchgeführten Ozonexpositionsversuchen A, B und C (2.4, S. 31) wurden drei- bzw. vierjährige Buchenjungepflanzen über einen Zeitraum von 30, 46 und 84 Tagen für jeweils 8 Stunden pro Tag mit Ozonkonzentrationen von 300, 200 und 150-190 nl/l behandelt. Dabei ergaben sich im Verlauf der Versuche A, B und C in der Expositions kabine jeweils AOT40-Werte von 62, 59 und 97  $\mu\text{l/l} \cdot \text{h}$ , während in der Kontroll-Kabine in keinem Versuch mehr als 0,5  $\mu\text{l/l} \cdot \text{h}$  erreicht wurde. Am Versuchsstandort 'Kranzberger Forst' wurden der Einfluß von Ozon auf 60-jährige Buchen unter einfach und doppelt ambientem Ozonregime untersucht (Versuch D), wobei hier die gemessene kumulative Ozonbelastung gemäß AOT40 bis zur letzten Probenahme 17 bzw. 69  $\mu\text{l/l} \cdot \text{h}$  entsprach.

Die hier ermittelten AOT40-Werte lagen damit in derselben Größenordnung wie bei den von Nunn et al. [228, 230] und Langebartels et al. [169] zur Ozonexposition

junger und adulter Buchen verwendeten Ozonregimes. Die hohe Ozonkonzentration von 300 nl/l in Versuch A wurde gewählt, um mittels der subtraktiven Suppressions-hybridisierung vor allem stark ozonregulierte Gene erfassen zu können.

### Alter der Bäume

Ozon scheint auf junge Bäume einen stärkeren Einfluß zu haben als auf ausgewachsene Bäume [156]. So fanden Fredericksen et al. [77] zum Beispiel vermehrt Blattschäden an jungen Bäumen der ozonempfindlichen Art *Prunus serotina*, während ältere Pflanzen weniger Ozonsymptome aufwiesen. Bei 2-jährigen Buchen wurde schon bei einem AOT40-Wert von 8  $\mu\text{l/l}\cdot\text{h}$  eine 10%-ige Reduktion der Biomasse festgestellt [87], während bei adulten Buchen unter einer höheren Ozonbelastung (AOT40 = 71  $\mu\text{l/l}$ ) kaum Biomasseverluste auftraten [229]. Eine doppelt ambiente Ozonkonzentration führte bei jungen Buchen in Phytotronen zu einer starken Ausprägung von Blattläsionen, was bei adulten Bäumen im 'Kranzberger Forst' unter einem vergleichbaren Ozonregime nicht beobachtet werden konnte [230]. Obwohl bislang nur wenige direkt vergleichende Studien zu diesem Themenkomplex vorliegen, scheint es fraglich, ob die anhand von Experimenten mit jungen Buchen postulierte kritische Schwelle für einen 10%-igen Biomasseverlust (AOT40 = 10  $\mu\text{l/l}\cdot\text{h}$ ) [80] auch bei ausgewachsenen Bäumen uneingeschränkt Verwendung finden kann.

Bezüglich der Empfindlichkeit gegenüber Ozon spielt bei der Buche neben dem Alter des Baumes vermutlich auch das Alter der Blattorgane eine Rolle. So zeigten Polle et al. [253], daß nicht nur junge und alte Blätter der Buche im Vergleich mit differenzierten Blättern eine höhere Sensitivität gegenüber oxidativem Streß aufweisen, sondern daß sich die Sensitivität auch in den vollständig ausgebildeten Buchenblättern im Verlauf eines Jahres verändert. Die Heterogenität der Befunde aus verschiedenen Ozonexpositionsversuchen mit jungen und ausgewachsenen Buchen bezüglich der zeitlichen Entwicklung von Biomasseverlust und makroskopischer Läsionsausprägung [12, 87, 179, 228, 230] sind daher zum Teil wohl auch auf unterschiedliche Entwicklungsstadien der Blätter und der Pflanzen zurückzuführen.

Bei den Versuchen A und C (2.4, S. 31) wurde mit der Ozonexposition direkt im Anschluß an die vollständige Entfaltung aller Blätter begonnen. Im Gegensatz dazu wurde Versuch B erst gegen Ende der Vegetationsperiode durchgeführt. Die in Versuch B früher als bei Versuch C auftretende Ausbildung ozonbedingter Läsionen wurde also vermutlich auch durch das unterschiedliche Alter der Bäume und deren Blätter in diesen beiden Versuchen beeinflußt. In Versuch D traten an den 60-jährigen Buchen im 'Kranzberger Forst' trotz einer kumulativen Ozonexposition von AOT40 = 69  $\mu\text{l/l}\cdot\text{h}$  keine ozonspezifischen Läsionen auf, während in den Gewächshausexperimenten bei einer vergleichbaren Ozondosis zum Teil deutliche ozonbedingte Symptome beobachtet werden konnten. Das Alter der untersuchten Bäume spielte, neben den bei den Gewächshausversuchen höheren absoluten Ozonkonzentrationen, für diesen Befund vermutlich auch eine entscheidende Rolle.

### Genetische Variabilität

Unterschiede in der Ozonsensitivität zwischen verschiedenen Pflanzenarten sind bereits gut dokumentiert [16, 24, 133, 320]. Für die Buche [25, 35, 36, 179, 226] und andere Arten [114, 133, 300] wurden darüber hinaus in einigen Studien auch auf die unterschiedliche Toleranz oder Anfälligkeit einzelner Individuen gegenüber Ozon hingewiesen.

So zeigte Buche, die ursprünglich als eher ozonsensitiv eingeschätzt worden war [80], im Vergleich mit Pappel [24] und 14 anderen verholzenden Arten [320] erst spät makroskopisch sichtbare Symptome. In verschiedenen Untersuchungen entstanden an den Blätter einzelner Buchenpflanzen deutliche ozonbedingte Läsionen, während diese bei anderen Individuen nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß auftraten [25, 35, 36, 179, 226].

Auch in den hier durchgeführten Gewächshausversuchen A, B und C (2.4, S. 31) bildeten sich bei einzelnen Buchen besonders deutliche ozonbedingte Läsionen, während diese bei anderen Individuen nicht auftraten. Trotz der relativ hohen Ozonkonzentrationen von 150 bis 300 n/l (8 h/d) blieben 32% und 35% der ozonbehandelten Pflanzen aus Versuch A und C bis zum Versuchsende ohne makroskopisch sichtbare Läsionen, während diese bei anderen Individuen an allen Blättern beobachtet werden konnten.

Wenige Tage vor der Ausbildung von Läsionen wurde in den ozonbehandelten Pflanzen stets ein Anstieg der Emissionsrate von Ethylen gemessen (3.7.1, S. 113), was bei Buchenjungpflanzen auch von Nunn et al. beobachtet worden war [228]. Bei Versuchspflanzen, die keine Läsionen aufwiesen, kam es dagegen entweder gar nicht oder erst kurz vor Ende des Beobachtungszeitraums zu einer vermehrten Emission von Ethylen.

Derartige Unterschiede zwischen einzelnen Individuen sind vermutlich hauptsächlich auf die genetische Variabilität der Versuchspflanzen zurückzuführen. Dieser Variabilität kann sich dabei nicht nur in physiologischen oder morphologischen Unterschieden äußern. So wurden große Unterschiede in der Ozonsensitivität von Tabaksorten gefunden, die physiologisch und morphologisch vergleichbar waren [272].

### Skalierungsebene der Auswirkungen von Ozon

Matyssek et al. [192] wiesen darauf hin, daß bei Forstbäumen eine differenzierte Betrachtung des Einflusses von Ozon auf den Ebenen der Zelle, des Blattes, der Äste und der gesamten Pflanze erfolgen sollte. An adulten Buchen im 'Kranzberger Forst' wurde mit Ausnahme des Parameters 'Stammzuwachs' auf allen Ebenen Unterschiede zwischen einfachem und doppelt ambientem Ozonregime beobachtet [229]. Unter dem Einfluß von Ozon wurden hierbei neben einer Akkumulation von konjugiertem ACC auch Einschränkungen der Photosynthese, die Bildung ozonbedingter Läsionen und eine Verkürzung der Vegetationsperiode festgestellt.

Bei adulten Buchen muß darüber hinaus auf Blattebene noch berücksichtigt wer-

den, daß in Sonnen- und Schattenkrone morphologisch unterschiedliche 'Sonnenblätter' und 'Schattenblättern' ausgebildet werden. So unterschieden sich Sonnen- und Schattenblätter einerseits in biochemischen Parametern und in der Photosyntheseleistung. Andererseits kam es nur in Sonnenblättern zur Ausbildung ozonbedingter Läsionen [226]. In Schattenblättern waren zudem deutlich häufiger Infektionen mit dem Erreger der Buchenblattbräune (*Apiognomonía errabunda*) nachweisbar [8].

### **Klima- und Expositionsbedingungen**

Verschiedene Klimaparameter wie Temperatur, Einstrahlung, Feuchtigkeit und Luftumwälzung können die Versuchsergebnisse maßgeblich beeinflussen. So können eine höhere Temperatur zu einem verstärkten Längenwachstum [241], stärkere Belichtung zu mehr oxidativem Streß, und eine Erhöhung der Luft- und Bodenfeuchte sowie der Luftumwälzung zu einer erhöhten Aufnahme von Ozon in die Blätter der Pflanzen führen [215, 314, 316, 317]. Benton et al. [15] nennen neben der Ozonkonzentration das Dampfdruckdefizit und die Globalstrahlung als die wichtigsten Einflußfaktoren für die Ausbildung von ozonbedingten Symptomen. Eine direkte Extrapolation der Ergebnisse aus Klimakammern auf das Verhalten junger Bäume unter Freilandbedingungen erscheint daher nicht zuletzt wegen der unterschiedlichen Klima- und Lichtverhältnisse problematisch [156].

Gewächshausversuche, wie die hier durchgeführten Expositionsexperimente A, B und C (2.4, S. 31), sind allerdings besser als Freilanduntersuchungen dazu geeignet, unter Kontrolle vieler klimatischer Parameter mechanistische Aussagen zum Einfluß eines bestimmten Stressors wie Ozon zu treffen, ohne daß die pflanzlichen Reaktionen durch schwankende Umwelteinflüsse überlagert werden, wie dies im Freiland der Fall sein kann [230].

### **Quantifizierung der Schadwirkungen von Ozon**

Die Schädigung von Pflanzen durch Ozon wird bislang vor allem durch den Biomasseverlust quantifiziert [80]. Landolt et al. [164] wiesen eine Abnahme der Biomasse von Buche mit zunehmenden Ozonkonzentrationen nach. Da die Veränderung der Biomasse allerdings nur mit destruktiven Methoden exakt ermittelt werden kann, wurde im Verlauf der Expositionsversuche B und C (2.4, S. 31) zur Quantifizierung der aufgetretenen Ozonschäden die Entwicklung ozonspezifischer Blattläsionen [108, 126, 179] herangezogen.

### **4.2.2 Interaktion zwischen Ozon und biotischen Stressoren**

Die bisher verfügbaren Studien, welche sich mit der Interaktion zwischen einer erhöhten Ozonkonzentration und dem Befall von Pflanzen durch Pathogene beschäftigen, lassen erkennen, daß Ozon hierbei sowohl positive als auch negative Auswirkungen auf Pflanzen haben kann [187]. So bieten durch Ozon hervorgerufene Läsionen zwar

häufig Eintrittspforten für eine anschließende Pathogeninfektion, Ozon kann aber auch zur Ausbildung einer erhöhten Resistenz führen [140, 187]. Heagle zeigte schon 1975, daß das Wachstum von obligat parasitischen Pilzen unter dem Einfluß von Ozon beeinträchtigt sein kann [110]. Ausgelöst durch Ozon kann es in der Pflanze sowohl zur Synthese von Abwehrstoffen als auch zur Veränderung der Cuticula kommen, wodurch eine Pathogeninfektion erschwert werden kann [250, 273]. In anderen Fällen führte Ozon zu einer Schwächung der pflanzlichen Abwehr, die zum Beispiel durch eine Reduktion der Photosyntheseleistung bedingt sein kann [272, 277]. Obwohl die optimalen Infektionsbedingungen für Pathogene oft nicht mit dem Auftreten der maximalen Ozonkonzentrationen zusammenfallen, können persistente Ozoneffekte das Abwehrverhalten der Pflanzen über längere Zeiträume beeinflussen [169, 273].

Zur Untersuchung dieser Wechselwirkungen bei der Buche sollte in Versuch C zusätzlich zur Ozonbehandlung Infektionen mit dem Erreger der Buchenblattbräune (*Apiognomonium errabunda*) durchgeführt werden. Allerdings entwickelten sich an den mit Sporen von *A. errabunda* behandelten Bäumen im Verlauf des Versuchs C weder die für eine Infektion mit diesem Pilz typischen Blattsymptome (Abb. 3.8, S. 68), noch ergab die spezifische Quantifizierung der DNA dieses Pilzes mittels qRT-PCR Unterschiede zwischen den behandelten und den unbehandelten Bäumen. Es ist daher davon auszugehen, daß keine ausreichende Infektion mit *A. errabunda* stattgefunden hat. Die Ursache hierfür ist vermutlich auf einen oder mehrere der folgenden drei Faktoren zurückzuführen:

- Der verwendete Stamm von *A. errabunda* hat durch die wiederholte Subkultivierung auf Nährmedium möglicherweise im Laufe der Zeit seine Virulenz eingebüßt.
- Niedrige Temperaturen von etwa 10-15 °C können die Infektion mit *A. errabunda* begünstigen (pers. Mitteilung von Günther Bahnweg), so daß die Temperatur zum Zeitpunkt der Infektion eventuell zu hoch war (ca. 18-20°C).
- Wegen der Lichtbedingungen bei der Anzucht der jungen Buchenpflanzen entsprach die Blattmorphologie vermutlich eher der von 'Sonnenblättern'. Bahnweg et al. [8] berichten aber, daß bei adulten Buchen auf Sonnenblättern deutlich seltener Infektionen mit *A. errabunda* zu finden waren, als in der Schattenkrone.

### 4.3 Ozoninduzierte Gene aus den cDNA-Banken SSH1 und SSH2

Da Pflanzen nicht wie Tiere die Möglichkeit haben, ungünstige Umweltbedingungen zu vermeiden, müssen sie sich durch strukturelle, physiologische und chemische Anpassung schützen. Das Schadgas Ozon induziert derartige Anpassungsprozesse wie die Bildung von Phytoalexinen, PR-Proteinen, Signalsubstanzen und die Synthese zellulärer Barrieren [276]. Man weiß heute allerdings noch relativ wenig über die an diesen Abwehrreaktionen beteiligten Rezeptoren und Signalketten und deren vermutlich

hauptsächlich transkriptionelle Regulation. Die Wahrnehmung von Ozon und seinen Abbauprodukten erfolgt möglicherweise durch noch unbekannte apoplastische Rezeptorproteine, Signalmoleküle auf Lipidbasis aus dem ozoninduzierten Abbau der Plasmamembran oder durch eine Veränderung des Redox-Gleichgewichts in der Zelle [142].

In den letzten Jahren konnte der Einfluß von Ozon auf die Regulation verschiedener Gene aus Primär- und Sekundärstoffwechsel nachgewiesen werden. Durch die Methode der DNA-Chip-basierten Genexpressionsanalyse ist es heute möglich, gleichzeitig große Ausschnitte des pflanzlichen Transkriptom unter dem Einfluß von Stressoren zu untersuchen und dabei nicht nur Aussagen über die Regulation einzelner Gene, sondern auch über deren Zusammenhang mit dem gesamten pflanzlichen Stoffwechsel zu treffen.

Da zu Beginn dieser Arbeit für eine derartige Untersuchung der Genexpression zu wenige Gene der Buche bekannt waren, wurden zunächst mittels subtraktiver Suppressionshybridisierung [45] entsprechende ozoninduzierte und -reprimierte cDNA-Sequenzen kloniert. Durch subtraktive cDNA-Banken konnten bei *Pisum sativum* bereits jeweils spezifisch durch Ozon oder andere Stressoren wie UV-Licht und Verwundung induzierte Gene identifiziert werden [267].

Wegen der erforderlichen Mengen an Pflanzenmaterial wurden bei der Erstellung der subtraktiven cDNA-Banken SSH1 und SSH2 jeweils die Blattproben der frühen Erntezeitpunkte (bis 5 Tage nach Versuchsbeginn, SSH1) und der späten Erntezeitpunkte (7 bis 30 Tage nach Versuchsbeginn, SSH2) aus Versuch A (300 nL/l, 8 h/d, 30 d) zusammengefaßt. Durch dieses Vorgehen wurde zudem angestrebt, vor allem stark oder dauerhaft ozoninduzierte Gene zu identifizieren. Die kurzfristige Regulation von Genen fiel dagegen, durch die gemeinsame Analyse mehrere Meßzeitpunkte, weniger ins Gewicht.

Beim Vergleich der erhaltenen cDNA-Sequenzen mit öffentlichen Datenbanken mittels 'Blastn' [1] fiel zunächst auf, daß für jeweils mehr als 300 Klone aus SSH1 und SSH2 kein homologer Datenbankeintrag gefunden werden konnte. Dieser Befund dürfte einerseits auf die teilweise sehr kurze cDNA-Sequenz einzelner SSH-Klone zurückzuführen sein, spricht aber andererseits auch dafür, daß eine gewisse Anzahl an cDNA-Fragmenten kloniert werden konnte, für die es in öffentlichen Datenbanken noch keine homologen Sequenzdaten gibt. Da das Genom einiger krautiger Pflanzen bereits zu großen Teilen bekannt ist, könnte es sich hierbei um Gene handeln, die mit der Regulation des Stoffwechsels bei verholzenden Pflanzen in Verbindung stehen.

Sowohl in SSH1 als auch in SSH2 wurden einige redundante cDNA-Sequenzen kloniert. Besonders auffällig war hier bei der cDNA-Bank SSH2, in der insgesamt mehr Redundanzen zu finden waren als in SSH1, das Auftreten von 81 Klonen mit Homologie zu einer Kaffeesäure-O-Methyltransferase. Die trotz der Normalisierungsstrategie der SSH-Methodik erfolgte mehrfache Klonierung dieses Gens, das vermutlich an der Ligninbiosynthese beteiligt ist, deutet auf eine starke transkriptionelle Induktion dieses Stoffwechselweges gegen Ende des Expositionsversuchs A hin.

Weder in SSH1 noch in SSH2 wurden cDNA-Fragmente mit Homologie zu Ge-

nen des Shikimatstoffwechsels identifiziert. Während dies für die Gene *Fs-DAHPS2*, *Fs-DHQS*, *Fs-SK* und *Fs-CS*, deren Genexpression während des Ozonexpositionsversuchs C nur gering war (3.5, S. 87), nicht verwunderlich ist, wäre die Klonierung einer der Isoformen *Fs-DAHPS1*, *Fs-DAHPS3*, *Fs-DHQD/SD* oder *Fs-EPSPS* mittels der SSH-Methode wegen der in Versuch C beobachteten höheren ozonbedingten Induktionsfaktoren denkbar gewesen. Das Fehlen dieser und anderer ozoninduzierter cDNA-Sequenzen aus dem Shikimatstoffwechsel in den cDNA-Banken SSH1 und SSH2 erklärt sich einerseits durch die eingeschränkte Zahl an klonierten und sequenzierten cDNA-Klonen. Andererseits wurde die Induktion dieser Gene in Versuch C vor allem zu späteren Zeitpunkten beobachtet, so daß es im Verlauf des nur 30-tägigen Versuchs A möglicherweise zu keiner ausreichend starken differentiellen Genexpression kam.

### Zusammensetzung der cDNA-Banken SSH1 und SSH2

Abzüglich der Sequenzen, die mittels 'Blastn' [1] einem noch unbekanntem oder nicht genau klassifizierten Protein zugeordnet worden waren, verblieben in SSH1 112 und in SSH2 57 nicht redundante cDNA-Klone. Die geringere Anzahl an nicht redundanten Klonen in SSH2 erklärt sich möglicherweise auch dadurch, daß hier keine ausreichende Normalisierung zwischen stark und schwach regulierten Transkripten stattgefunden hat, so daß in den entsprechenden PCR-Reaktionen überwiegend stark exprimierte Gene amplifiziert wurden. Zu den frühen Erntezeitpunkten von Versuch A war dagegen das Niveau der Genexpression zwischen den ozonbehandelten und den nicht behandelten Pflanzen vermutlich ausgeglichener, was die Klonierung einer größeren Anzahl an nicht redundanten Klonen in SSH1 ermöglichte. Die funktionelle Klassifizierung der SSH-Klone erfolgte gemäß dem Schema des 'EU *Arabidopsis* Genom Projekts' [68] in die Kategorien 'Primärstoffwechsel', 'Energie-Stoffwechsel', 'Transkription', 'Proteinsynthese', 'Proteinmodifikation', 'Transporter', 'Intrazellulärer Transport', 'Zellstruktur', 'Signalweiterleitung', 'Krankheit/Abwehr' und 'Sekundärstoffwechsel'.

Die Verteilung der nicht redundanten cDNA-Klone aus SSH1 und SSH2 auf die entsprechenden funktionellen Gruppen gibt eine Vorstellung, welche Bereiche des pflanzlichen Stoffwechsels zu welchem Zeitpunkt besonders stark reguliert wurden. So dominierten in SSH1 die Bereiche 'Primär- und Energiestoffwechsel' mit 40% der cDNA-Klone, während in SSH2 nur etwa 26% diesem Bereich zugeordnet wurden (Abb. 3.10, S. 72). Auch der Anteil der cDNA-Klone aus den Bereichen 'Signalweiterleitung' und 'Transkription' war in SSH2 geringer als in SSH1. Zu den späten Zeitpunkten in Versuch A verlagerte sich die Genregulation offensichtlich eher in Richtung 'Zellstruktur', 'Sekundärstoffwechsel' und 'Krankheit/Abwehr'. So gehören von den cDNA-Klonen aus SSH1 nur 4%, 7% und 12% diesen funktionellen Gruppen an, während dies für 9%, 10% und 23% der cDNA-Klone aus SSH2 der Fall ist. Tamaoki et al. [307] hatten bei DNA-Chip Untersuchungen ozonbehandelter *Arabidopsis*-Pflanzen ebenfalls eine Zunahme der Induktion von Genen aus dem Bereich 'Krankheit/Abwehr' und eine Repression von Genen aus dem Bereich 'Energiestoffwechsel' beobachtet.



Durch Zusammenstellung aller cDNA-Klone aus SSH1 und SSH2 auf DNA-Chips und deren Hybridisierung mit dem gleichen Probenmaterial aus Versuch A, das auch schon zur Herstellung der subtraktiven cDNA-Banken verwendet worden war, sollte überprüft werden, in welchem Ausmaß die klonierten Gene unter dem Einfluß von Ozon reguliert werden. Hierbei ergaben sich Werte von bis zu 33-facher Induktion und bis zu 3-facher Repression einzelner Gene. Da bisher nur sehr wenige Arbeiten über die Genexpression unter dem Einfluß einer langandauernden Ozonbehandlung bei Bäumen verfügbar sind, werden zur Diskussion der Genexpression dieser cDNA-Klone im Folgenden auch entsprechende Befunde aus krautigen Pflanzen unter kurzfristiger Ozonbehandlung herangezogen. In Versuchen mit Pappel konnten Koch et al. [154] zeigen, daß z.B. das Genexpressionsniveau von *PR1* oder einer *O*-Methyltransferase auch bei einer mehrtägigen Ozonbehandlung von jeweils 6 Stunden (300 nl/l) ähnlichen Schwankungen unterliegt, wie sie in krautigen Pflanzen bei einmaliger Ozonbehandlung gefunden werden.

### Genexpressionsanalyse der cDNA-Klone aus SSH1 und SSH2

Die DNA-Chips mit den cDNA-Klonen aus SSH1 und SSH2 wurden zur Untersuchung früher und später ozonbedingter Regulation der einzelnen Gene sowohl mit cDNA aus Probenmaterial der frühen (bis 5 Tage nach Versuchsbeginn) als auch der späten (7 bis 30 Tage nach Versuchsbeginn) Erntezeitpunkte aus Versuch A hybridisiert. Während bei der Analyse der späten Genexpression unter dem Einfluß von Ozon 6 cDNA-Klone mehr als 2-fach reprimiert und 31 mehr als 2-fach induziert waren, konnten bei der Analyse der frühen Erntezeitpunkte keine Unterschiede dieser Größenordnung zwischen der Genexpression in den ozonbehandelten und den Kontrollbäumen verzeichnet werden. Eine mögliche Ursache hierfür ist darin zu sehen, daß aufgrund der zur Hybridisierung der DNA-Chips benötigten großen cDNA-Mengen die differentielle Genexpression nicht für jeden Erntezeitpunkt einzeln analysiert werden konnte. Der durch gemeinsame Verwendung mehrerer cDNA-Populationen von verschiedenen Erntezeitpunkten gebildete Durchschnitt der Genexpression im Verlauf der ersten Tage von Versuch A unterschied sich möglicherweise zwischen den beiden Behandlungsvarianten zu wenig, um mittels DNA-Chip Analyse ozonregulierte Gene nachweisen zu können. Die im Folgenden aufgeführten Genexpressionsdaten beziehen sich daher nur auf die Untersuchung der Genexpression zu den späten Erntezeitpunkten (7 d bis 30 d) von Versuch A.

### Ozoninduzierte Gene

Fast alle der hier identifizierten stark durch Ozon induzierten cDNA-Klone (Tab. 3.4, S. 84) besitzen Homologie zu Genen, deren Induzierbarkeit durch Ozon zum Teil bereits mehrfach in meist krautigen Pflanzen nachgewiesen werden konnte. So fanden Ludwиков et al. [184] in ozonbehandelten *Arabidopsis*-Pflanzen eine 9-fache Induktion der Kaffeesäure-*O*-Methyltransferase während Koch et al. [154] in Pappel die ozon-

bedingte 25-fache Akkumulation einer *O*-Methyltransferase beobachteten. Die zwei Klone SSH1P3A04 und SSH2P6C08 sind zu diesen beiden Enzymen homolog und wurden bei Versuch A im Rahmen der DNA-Chip Hybridisierung mit 25-facher und 33-facher Genexpression am deutlichsten durch Ozon induziert.

**Tabelle 4.1:** Zusammenstellung der funktionellen Zuordnung stark ozoninduzierter und ozonreprimierter Klone aus den subtraktiven cDNA-Banken SSH1 und SSH2.

ozoninduzierte cDNA-Klone	putative funktionelle Zuordnung
SSH2P5B01, SSH1P3A02, SSH2P6G01, SSH2P1F12	Krankheit/Abwehr
SSH2P5G11, SSH1P3C09, SSH1P1E03	Krankheit/Abwehr
SSH2P6C08, SSH1P3A04, SSH2P3C10	Sekundärstoffwechsel
SSH2P1F05, SSH2P3D05	Signalweiterleitung
SSH2P3B09	Transporter
ozonreprimierte cDNA-Klone	putative funktionelle Zuordnung
SSH1P4A12, SSH1P6G02, SSH1P6F12	Energiestoffwechsel
SSH1P4E03, SSH1P6G12	Energiestoffwechsel
SSH1P7E12, SSH1P6G06	Signalweiterleitung
SSH1P6F08	Transporter

Bei der Kaffeesäure-*O*-Methyltransferase handelt es sich um ein Enzym der Ligninbiosynthese und auch Koch et al. [154] gehen bei der von ihnen gefundenen ozoninduzierten *O*-Methyltransferase von einer Beteiligung an diesem Stoffwechselweg aus. Auch die 9-fache Induktion einer putativen Peroxidase (SSH1P3C09) steht möglicherweise in Verbindung mit der Synthese von Lignin. Die ozonbedingte Induktion von Peroxidasen wurden bereits bei *Arabidopsis* [184, 307] und bei *Petroselinum crispum* im Rahmen kurzfristiger Expositionsversuche eher zu späteren Zeitpunkten gefunden [63].

Eine typische Reaktion in Pflanzen unter dem Einfluß von Ozon ist die Induktion sogenannter PR-Proteine (PR = 'pathogenesis related') [276]. Zu dieser Gruppe gehören sowohl die Gene *PR1* und *PR10* [63, 154, 240], zu denen die 22-fach und 9-fach ozoninduzierten Klone SSH2P5B01 und SSH2P6G01 homolog sind, als auch die basische  $\beta$ -1,3-Glucanase, deren transkriptionelle Stimulation unter dem Einfluß von Ozon in Tabak und *Arabidopsis* ebenfalls bereits bekannt ist [7, 286, 307]. Der Klon SSH1P3A02 ist homolog zu einer putativen 'endo-1,3;1,4- $\beta$ -D-Glucanase aus *Fragaria x ananassa* (AccNr.: DQ022748) und wurde in den ozonbehandelten Pflanzen im Mittel 8-mal stärker exprimiert als in den Kontrollpflanzen.

Zwei 15- und 5-fach induzierte Klone (SSH2P1F12, SSH2P5G11) sind zu unterschiedlichen Formen der Glutathion-S-Transferase homolog. Über die ozonbedingte Induktion dieser Enzyme, die an Entgiftungs- und Transportaufgaben innerhalb der pflanzlichen Zelle beteiligt sind, wurde ebenfalls bereits von mehreren Gruppen berichtet [43, 184, 291, 307]. Ein weiteres bekanntermaßen ozoninduziertes Entgiftungsenzym, das ebenfalls in mehreren Isoformen in Pflanzen vorkommt ist die Catalase

[338]. Ein zu Catalase 1 aus *Cucurbita pepo* (AccNr.: D55645) homologes cDNA-Fragment der Buche (SSH1P1E03) wurde 5-fach unter dem Einfluß von Ozon induziert.

Wie unter 4.5, S. 172 näher beschrieben, ist die Bildung von Ethylen als Reaktion auf die Applikation von Ozon bereits bei vielen Pflanzenarten beobachtet worden. Die Synthese des gasförmigen Ethylens, das entscheidend für die Ausbildung ozonbedingter Läsionen ist [228, 238], wird zum Beispiel in der Tomate durch die Regulation verschiedener Isoformen der beteiligten Enzyme gesteuert [203]. Die cDNA-Klone SSH2P1F05 und SSH2P3D05 besitzen hohe Homologie zu veröffentlichten Isoformen der ACC Oxidase (Tab. 3.4, S. 84) und wurden mit 6- und 5-facher Expression stark unter dem Einfluß von Ozon induziert.

Bei den 5-fach und 4-fach ozoninduzierten SSH Klonen SSH2P3B09 und SSHP3C10 handelt es sich vermutlich um cDNA-Fragmente eines ABC Transporters und der an der Flavonoid-Biosynthese beteiligten Flavanon-3-Hydroxylase (F3H). Diese beiden Enzyme wurden als einzige der oben aufgeführten in der wissenschaftlichen Literatur noch nicht als ozoninduzierbar beschrieben.

In *Arabidopsis* kennt man heute etwa 100 verschiedene Gene aus der großen Familie der ABC-Transporter in Pflanzen. Die vielfältigen Aufgaben dieser Enzyme reichen von der Entgiftung schädlicher Kataboliten über den Abtransport von Glutathion-Konjugaten und Abbauprodukten des Chlorophylls [311] bis hin zur Regulation der Stomata [188]. Pearson und Mansfield konnten bereits eine ozonbedingte Veränderung der Stomataöffnung bei der Buche nachweisen [244] und die Reduktion der Photosynthese sowie die Induktion von Glutathion-S-Transferasen sind ebenfalls bekannte Auswirkungen von Ozon auf Pflanzen [40, 43, 184, 291, 307]. Die Induktion des klonierten putativen ABC-Transporters ist daher vermutlich als weiteres Element der pflanzlichen Abwehrreaktionen gegenüber Ozon zu verstehen.

Die Genexpression des Schlüsselenzyms des Phenylpropan-Stoffwechsels, der Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL) [7, 63, 240, 154, 312] und die in dieser Studie dargelegte Induktion des Shikimatstoffwechsels unter dem Einfluß von Ozon (3.5, S. 87) ermöglichen eine Akkumulation von Vorläufersubstanzen der Flavonoidbiosynthese und lassen die Induktion der Flavanon-3-Hydroxylase plausibel erscheinen. Auch für zwei weitere Gene der Flavonoidbiosynthese, die Chalkon Synthase und die 4-Cumarat: CoA Ligase wurde bereits eine erhöhte Genexpression unter dem Einfluß von Ozon nachgewiesen [7, 63].

### Ozonreprimierte Gene

Unter den ozonreprimierten cDNA-Klonen aus der Buche befanden sich auffällig viele aus dem Bereich der Photosynthese. So war die Genexpression einiger putativer Chlorophyll *a*-bindender (*cab*) Proteine und der RUBISCO Aktivase 1,9- bis 2,3-fach durch Ozon reduziert (SSH1P4A12, SSH1P7E12, SSH1P4E03, SSH1P6F12). Eine derartige Regulation chloroplastidärer Proteine ist ein typisches Merkmal ozoninduzierter pflanzlicher Streßreaktionen [43, 262, 272] die sowohl für *cab*-Proteine als auch für die

RUBISCO Aktivase bereits von anderen Autoren beschrieben wurde [43, 249, 307].

Der cDNA-Klon SSH1P6F08 mit Homologie zu einem Aquaporin aus *Vitis vinifera* wurde ebenfalls durch Ozon 1,9-fach reprimiert. Die große Familie der Aquaporine, die in *Arabidopsis thaliana* 35 Mitglieder zählt [257], ist an der Regulation der Wasserdurchlässigkeit von Zellmembranen sowohl im Verlauf der pflanzlichen Entwicklung als auch unter dem Einfluß von verschiedenen Stressoren wie Kälte, Nährstoffmangel, Trockenheit oder einem erhöhtem Salzgehalt im Boden beteiligt [348]. Die Reduzierung der Durchlässigkeit von Membranen durch Repression von Aquaporinen erscheint sinnvoll, wenn die Membranintegrität durch Ozon oder sekundär gebildete reaktive Sauerstoffspezies bereits gefährdet ist.

Ein SSH-Klon mit Homologie zur 9-*cis*-Epoxy-carotenoid Dioxygenase (NCED) (SSH1P7E12) wurde durch Ozon mehr als zweifach reprimiert. *NCED* ist ein Schlüsselenzym der Abscisinsäure-Biosynthese und benötigt als Kofaktor Ascorbat, weshalb unter Ascorbat-Mangel bereits eine Aktivierung der Transkription dieses Gens beobachtet wurde [243]. Da das Phytohormon Abscisinsäure unter anderem den Verschluß der Stomata reguliert, könnten Berichte über modifizierte stomatäre Leitfähigkeiten unter dem Einfluß von Ozon [244] auch im Zusammenhang mit der Repression von *NCED* stehen.

Über die ozonbedingte Regulation der Fructose-bisphosphat Aldolase ist bislang nichts bekannt. Der zu diesem Gen aus dem Primärstoffwechsel homologe Klon SSH1P6G12 wurde hier etwa 3-fach durch Ozon reprimiert. Dieser Befund deutet, wie auch schon die Repression verschiedener Gene aus dem Energiestoffwechsel und die Induktion einiger Gene aus dem Shikimatstoffwechsel (3.5, S. 87) auf eine Umsteuerung vom Primärstoffwechsel zum Sekundärstoffwechsel in den ozonbehandelten Pflanzen hin.

Der ebenfalls etwa 3-fach ozonreprimierte cDNA-Klon SSH1P6G06 besitzt Homologie zu einer *MAPKK* aus *Lycopersicon esculentum*, die bei der Abwehrreaktionen gegen Pathogene identifiziert wurde [245]. In Pflanzen sind 'Mitogen aktivierte Protein Kinasen' (MAPK), MAPK Kinasen (MAPKK) und MAPKK Kinasen (MAPKKK) an den Antworten auf biotische und abiotische Stressoren beteiligt und regulieren sich in sogenannten MAPK Kaskaden gegenseitig [131]. Während die hier klonierte putative MAPKK deutlich reprimiert wurde, fanden Samuel et al. [270] in Tabak eine *MAPK*, deren Transkription unter dem Einfluß von Ozon zunahm.

Zusammenfassend sieht man, daß in Versuch A die Beobachtungen zur Induktion von Genen der Buche während der 30-tägigen Ozonbehandlung mit den durch kurzfristige Ozonexposition bei krautigen Versuchspflanzen gesammelten Erkenntnissen vergleichbar sind. Die Tatsache, daß in den beiden cDNA-Banken viele cDNA-Klone enthalten sind, die Homologie zu Genen aufweisen, welche bereits zuvor als ozonreguliert beschrieben wurden, läßt den Schluß zu, daß die Methode der subtraktiven Suppressionshybridisierung hier erfolgreich angewendet werden konnte, um ozoninduzierte und ozonreprimierte Gene aus der Buche zu identifizieren.

Die Expressionsergebnisse aus den Hybridisierungen der DNA-Chips wurden für

die putativen Gene Kaffeesäure-*O*-Methyltransferase (Fs-COMT) und Peroxidase (Fs-POX) auch mittels qRT-PCR überprüft (Abb. 3.15, S. 86). Die im Verlauf von Versuch C für *Fs-COMT* und *Fs-POX* gemessenen ozonbedingten Genexpressionsniveaus entsprachen hierbei den Hybridisierungsdaten aus Versuch A. Auch in Versuch C konnte vor allem zu den späteren Versuchszeitpunkten eine Induktion der Gene *Fs-COMT* und *Fs-POX* beobachtet werden.

## 4.4 Regulation des Shikimatstoffwechsels

Man geht davon aus, daß die Regulation des Shikimatstoffwechsels bei höheren Pflanzen ausschließlich auf genetischer Ebene erfolgt, da zur Kontrolle der Enzyme dieses Stoffwechselwegs im Gegensatz zu Mikroorganismen bei Pflanzen bis heute noch keine 'feedback'-Regulation gefunden wurde [124].

Trotz der großen Bedeutung des Shikimatstoffwechsels für die Synthese von Vorstufen für die Bildung der aromatischen Aminosäuren und zahlreicher sekundärer Inhaltsstoffe (1.4, S. 9), gibt es bislang nur wenige Erkenntnisse über die Regulation der Gene dieses Stoffwechselwegs unter Streßbedingungen in höheren Pflanzen. Die bisherigen diesbezüglichen Untersuchungen konzentrierten sich vor allem auf die Regulation des ersten Enzyms des Shikimatstoffwechsels, der 3-Deoxy-*D*-arabino-Heptulose-7-Phosphat Synthase (DAHPS). Dabei konnte gezeigt werden, daß viele Faktoren wie Stickstoffmangel [315], Licht verschiedener Wellenlängen [92, 119, 182, 294], Verwundung [59, 145, 211, 294], Pathogeninfektion [145] und die Verwendung von Elicitoren [95, 119, 145, 194, 217] eine Stimulation der DAHPS auf Transkript- oder Aktivitätsebene hervorrufen können. Über die streßbedingte Regulation der Gene 3-Dehydroquinate Synthase (DHQS), 3-Dehydroquinate Dehydratase / Shikimat Dehydrogenase (DHQD/SD), Shikimat Kinase (SK), 5-Enolpyruvylshikimat 3-Phosphat Synthase (EPSPS) und Chorismat Synthase (CS) in höheren Pflanzen war bisher nur bekannt, daß Elicitor-Behandlung eine Induktion dieser Gene bewirken kann [18, 73, 95]. Erst kürzlich zeigten Janzik et al. [134] für die ozonempfindliche Tabaksorte 'Bel W3', daß auch eine Ozonbehandlung (5 h, 160 nl/l) die Genexpression von Enzymen des Shikimatstoffwechsels induzieren kann.

Die streßbedingte Genexpression aller am Shikimatstoffwechsel beteiligten Enzyme wurde bisher ausschließlich bei Nachtschattengewächsen in Versuchen mit einer Dauer von maximal 72 Stunden untersucht [18, 95, 134] und wird in der vorliegenden Arbeit am Beispiel der Buche erstmals für verholzende höhere Pflanzen und für einen Zeitraum von bis zu 84 Tagen beschrieben. Mit Ausnahme der *DAHPS*-Isoformen handelt es sich hierbei um die ersten aus Bäumen isolierten cDNA-Sequenzen des Shikimatstoffwechsels. Auch wurde die Expression putativer Gene des pflanzlichen Shikimatstoffwechsels in dieser Arbeit erstmals mit der sensitiven Methode der quantitativen Realtime-PCR (qRT-PCR) untersucht. Ozon wurde als Stimulus zur Analyse streßbedingter Genexpression in der europäischen Buche verwendet, da dieses Schadgas durch Induktion von Genen, Enzymen und Streßmetaboliten, die an antioxidativen

und phytopathologischen Abwehrreaktionen beteiligt sind, wie ein 'abiotischer Elicitor' fungiert [272, 276] und damit gut geeignet ist, Streßantworten in der Pflanze zu induzieren.

Im Folgenden werden die einzelnen klonierten cDNA-Sequenzen der sieben Shikimatstoffwechselenzyme anhand von Homologie-Kriterien und charakteristischen Sequenz-Motiven bezüglich ihrer subzellulären Lokalisation und, wenn möglich, nach Isoformen klassifiziert. Die Expressionsmuster der jeweiligen Gene in den Ozonexpositionsversuchen A (300 nl/l O<sub>3</sub>, 8 h/d, 30 d), B (250 nl/l O<sub>3</sub>, 8 h/d, 46 d), C (150-190 nl/l O<sub>3</sub>, 8 h/d, 84 d) und D (2xO<sub>3</sub>, vier Monate) werden dabei jeweils in den Kontext streßbedingter Expression des Shikimatstoffwechsels bei anderen Pflanzen gestellt.

#### 4.4.1 3-Deoxy-D-arabino-Heptulosonat 7-Phosphat Synthase

##### Charakterisierung von *Fs-DAHPS1*, *Fs-DAHPS2* und *Fs-DAHPS3*

Gegenwärtig sind vollständige cDNA-Sequenzen der *DAHPS* oder dazu homologe Sequenzen von sieben höheren Pflanzen in öffentlichen Gen-Datenbanken publiziert. Dazu zählen die zweikeimblättrigen Pflanzen *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicon esculentum*, *Morinda citrifolia*, *Nicotiana tabacum* und *Solanum tuberosum* sowie die einkeimblättrigen Pflanzen *Oryza sativa* und *Zea mays*. Bei manchen dieser Pflanzen wurden bereits bis zu drei verschiedene Isoformen der *DAHPS* gefunden. Von sechs weiteren Pflanzen, *Lactuca sativa*, *Medicago sativa*, *Putterlickia verrucosa*, *Solanum tuberosum*, *Triticum aestivum* und *Vitis vinifera* existieren Datenbankeinträge zu entsprechenden cDNA-Teilsequenzen.

Die beiden als *DAHPS* beschriebenen und eine weitere, dazu homologe cDNA-Sequenz aus *A. thaliana* (AccNr.: NM\_120162, NM\_119505, NM\_102090), scheinen subzellulär im Chloroplasten lokalisiert zu sein, da sie alle ein mittels 'TargetP' [65, 224] prognostiziertes 47 bis 51 Aminosäuren langes N-terminales chloroplastidäres Transitpeptid (cTP) aufweisen, welches beim Import des Enzym-Vorläufermoleküls aus dem Cytosol in den Chloroplasten vom funktionellen Enzym abgespalten wird. Auch die abgeleitete Aminosäure-Sequenz von *Fs-DAHPS3* weist ein solches cTP auf, was für eine chloroplastidäre Lokalisation auch dieses Enzyms spricht. Das cTP von *Fs-DAHPS3* ist mit 65 Aminosäuren länger als bei *Arabidopsis* (47 bis 51 Aminosäuren) und kürzer als das 74 bp lange cTP der *DAHPS* aus Tabak (AccNr.: M64261).

Da für die cDNA-Fragmente *Fs-DAHPS1* und *Fs-DAHPS2* keine Sequenz-Informationen über die jeweiligen 5'-cDNA-Enden vorliegen und keine cDNA-Sequenzen cytosolischer *DAHPS*-Enzyme aus anderen Pflanzen für einen Homologievergleich zur Verfügung stehen, kann keine eindeutige Aussage über die subzelluläre Lokalisation dieser beiden Isoformen getroffen werden. Es ist allerdings anzunehmen, daß es sich, aufgrund der großen Ähnlichkeit der drei putativen *DAHPS*-Isoformen aus der Buche im homologen Sequenz-Bereich, um drei chloroplastidäre Isoformen handelt.

Wie unter 3.3.2, S. 76 beschrieben, erfolgte die Benennung der drei aus der Buche

isolierten putativen *DAHPS*-Isoformen *Fs-DAHPS1*, *Fs-DAHPS2* und *Fs-DAHPS3* anhand des Homologievergleichs mit den drei *DAHPS*-Isoformen aus *A. thaliana* (AccNr.: NM\_120162, NM\_119505, NM\_102090). In Tabelle 4.2, S. 156 sind die Ergebnisse eines mittels CLUSTALW (<http://clustalw.genome.jp/>) durchgeführten Vergleichs der vollständigen kodierenden DNA-Sequenz und der daraus abgeleiteten Proteinsequenz von *Fs-DAHPS3* mit den bekannten Isoformen aus *A. thaliana*, *Lycopersicon esculentum* und *Nicotiana tabacum* aufgeführt. Sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene weist die *Fs-DAHPS3* hierbei die größte Ähnlichkeit zur veröffentlichten *DAHPS* aus Tabak (AccNr.: M64261) auf. Im Gegensatz zu dem in Tabelle 3.2, S. 78 beschriebenen Homologievergleich der mit degenerierten Primern amplifizierten *DAHPS*-Fragmente (841 bp) kann auf der Ebene der gesamten kodierenden Sequenz für die *Fs-DAHPS3* keine eindeutige Entsprechung unter den *DAHPS*-Isoformen von *A. thaliana* gefunden werden. Beim Vergleich der jeweils um die prognostizierten cTP-Sequenzen (65, 47, 47 und 51 Aminosäuren) verkürzten abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *Fs-DAHPS3*, NM\_120162, NM\_119505 und NM\_102090 ergab sich aber wieder eine etwas größere Homologie zwischen *Fs-DAHPS3* und NM\_102090 als zwischen *Fs-DAHPS3* und NM\_119505 (Tab. 4.2, S. 156).

Bei der Untersuchung der vollständigen kodierenden Sequenz von *Fs-DAHPS3* mit dem Programm 'InterProScan' [346] konnte im Bereich der Aminosäuren 86 bis 523 die funktionelle Domäne der *DAHPS*-Synthase Klasse II, die nur in höheren Pflanzen vorkommt, identifiziert werden. Auch den beiden jeweils 279 Aminosäuren langen Proteinsequenzen von *Fs-DAHPS1* und *Fs-DAHPS2* konnte diese Domäne zugeordnet werden.

### **Ozonbedingte Genexpression von *Fs-DAHPS1*, *Fs-DAHPS2* und *Fs-DAHPS3***

Wie oben erwähnt wurden bereits zahlreiche Studien zur Regulation der *DAHPS* unter verschiedenen Umwelteinflüssen durchgeführt. Dabei wurde einerseits gezeigt, daß die Aktivität cytosolischer und plästidärer *DAHPS* Synthasen durch Verwundung und Elicitor-Behandlung differentiell modifiziert sein kann [194, 211], und andererseits verschiedene Isoformen der chloroplastidären *DAHPS* oft eine unterschiedlich regulierte Genexpression aufweisen [95, 134, 145]. Durch pilzliche Elicitoren und Verwundung wurde die Aktivität einer chloroplastidären *DAHPS* (*DAHPS*-Mn<sup>2+</sup>) bis zu 4-fach induziert, während eine cytosolische *DAHPS* (*DAHPS*-Co<sup>2+</sup>) keiner solchen Regulation unterlag [194, 211]. Licht führte nach 2 bis 8 Stunden zu einer transienten Genexpressionssteigerung einer nicht näher charakterisierten *DAHPS* in Zellkulturen von *Petroselinum crispum* [119]. Über die transkriptionelle Regulation cytosolischer *DAHPS*-Isoenzyme gibt es noch keine Erkenntnisse, da bislang keine entsprechenden Nukleinsäuresequenzen bekannt sind.

Die differentielle Genexpression mehrerer chloroplastidärer *DAHPS*-Isoformen konnte in verwundeten oder mit dem Pathogen *Pseudomonas syringae* behandelten Blättern von *A. thaliana* [145], Elicitor-behandelten Tomaten-Zellkulturen [95] und ozonbehandelten Tabakpflanzen der Sorte 'Bel W3' nachgewiesen werden [134]. Da-

**Tabelle 4.2:** Paarweise Identität (DNA-Ebene, rot) bzw. Homologie (Protein-Ebene, blau) zwischen der kodierenden Sequenz von *Fs-DAHPS3* und dazu homologen Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana* (*A.t.*), *Lycopersicon esculentum* (*L.e.*) und *Nicotiana tabacum* (*N.t.*) mit (A) und ohne (B) den für das chloroplastidäre Transitpeptid (cTP) kodierenden Sequenzbereich. In Klammern sind jeweils die Akzessionsnummern angegeben, unter denen die cDNA-Sequenzen bei NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) veröffentlicht worden sind.

**A: Paarweise Identität bzw. Homologie der putativen *DAHPS*-Sequenzen**

Identität / Homologie	<i>Fs-DAHPS3</i>	<i>A.t.1</i>	<i>A.t.2</i>	<i>A.t.3</i>	<i>L.e.1</i>	<i>L.e.2</i>	<i>N.t.</i>
<i>Fs-DAHPS3</i> (DQ166521)	-	64	69	69	67	77	78
<i>A.t.1</i> (NM_120162)	76	-	68	65	68	63	63
<i>A.t.2</i> (NM_119505)	79	75	-	67	66	68	67
<i>A.t.3</i> (NM_102090)	79	76	75	-	67	68	67
<i>L.e.1</i> (Z21792)	79	79	76	75	-	67	67
<i>L.e.2</i> (Z21793)	81	73	77	77	77	-	90
<i>N.t.</i> (M64261)	83	74	78	79	78	90	-

**B: Paarweise Identität bzw. Homologie der putativen *DAHPS*-Sequenzen ohne cTP**

Identität / Homologie	<i>Fs-DAHPS3</i>	<i>A.t.1</i>	<i>A.t.2</i>	<i>A.t.3</i>	<i>L.e.1</i>	<i>L.e.2</i>	<i>N.t.</i>
<i>Fs-DAHPS3</i> (DQ166521)	-	71	76	76	73	78	78
<i>A.t.1</i> (NM_120162)	80	-	74	71	75	71	71
<i>A.t.2</i> (NM_119505.2)	85	80	-	74	73	75	74
<i>A.t.3</i> (NM_102090)	86	81	82	-	73	75	75
<i>L.e.1</i> (Z21792)	83	84	81	82	-	73	74
<i>L.e.2</i> (Z21793)	87	80	84	86	82	-	91
<i>N.t.</i> (M64261)	88	82	83	86	82	94	-

bei kam es bei *Arabidopsis* bereits 90 Minuten nach der Verwundung bzw. 6 h nach der Infektion zu 4- bzw. 3-facher Induktion einer *DAHPS*-Isoform, während die andere Isoform unter diesen Bedingungen nicht reguliert wurde [145]. In den Tomaten-Zellkulturen waren die Transkripte einer *DAHPS*-Isoform nach vier Stunden bis zu 11-fach angereichert, während für die andere untersuchte Isoform keine Reaktion beobachtet werden konnte. Die Expression von drei *DAHPS*-Isoformen aus Tabak wurden unter dem Einfluß einer 5-stündigen Behandlung mit 160 n/l Ozon ebenfalls unterschiedlich reguliert [134].

Ein direkter Vergleich der Expressionsdaten von Genen des Shikimatstoffwechsels aus der wissenschaftlichen Literatur mit den Beobachtungen der vorliegenden Studie wird vor allem durch zwei Faktoren erschwert. Einerseits sind die Untersuchungszeiträume in dieser Arbeit mit bis zu 84 Tagen gegenüber den bisher verwendeten Versuchsdauern von maximal 72 Stunden erheblich länger. Zum anderen wurden bisher alle Genexpressionsstudien des Shikimatstoffwechsels an krautigen Pflanzen durch-



geführt, wobei meist abgetrennte Pflanzenteile oder Zellsuspensionen und nur selten intakte Pflanzen verwendet wurden.

Übereinstimmungen mit anderen Studien sind darin zu sehen, daß auch in der vorliegenden Arbeit Isoformen der *DAHPS* gefunden wurden, die unter dem Einfluß von Streß induziert waren (*Fs-DAHPS1*, *Fs-DAHPS3*), während für eine andere Isoform (*Fs-DAHPS2*) nahezu keine Regulation beobachtet wurde. Auch hier wurde, wie bei Tabak [134], sowohl in Versuch B als auch in Versuch C als direkte Reaktion auf die Applikation von Ozon eine Induktion von *DAHPS*-Isoformen beobachtet. Diese erfolgte allerdings in den Buchen-Jungpflanzen im Rahmen mehrerer Tage und erreichte in Versuch B erst nach sieben Tagen ihr Maximum, während sie in den Tabakpflanzen bereits nach 4 Stunden wieder zurückging. Bei der langfristigen Ozonexposition konnte in Versuch C die kontinuierlich zunehmende Induktion der Isoform *Fs-DAHPS3* von der erst gegen Versuchsende deutlich erkennbaren Induktion der Isoform *Fs-DAHPS1* unterschieden werden.

Bei einem Vergleich der Expositionsversuche A, B und C (2.4, S. 31) sieht man, daß trotz unterschiedlicher Beobachtungszeiträume und Ozonkonzentrationen stets eine Induktion von *DAHPS*-Isoformen unter dem Einfluß von Ozon beobachtet wurde. In Versuch A war die *Fs-DAHPS3* im Zeitraum von 7 bis 30 Tagen nach Versuchsbeginn 3,3-fach gegenüber den unbehandelten Pflanzen induziert, und auch in den Versuchen B und C lag die Induktion der *Fs-DAHPS3* während dieses Zeitraums im Mittel in der gleichen Größenordnung. In Versuch D konnte dagegen keine signifikante Regulation der Isoformen *Fs-DAHPS1*, *Fs-DAHPS2* und *Fs-DAHPS3* beobachtet werden, was vermutlich vor allem auf die geringeren maximalen Ozonkonzentrationen und das höhere Alter der untersuchten Bäume zurückzuführen ist.

In Versuch C blieb die Expression des Gens *Fs-DAHPS3* zunächst bei einer Ozonkonzentration von 150 nl/l Ozon mit nur 2-facher Induktion nach 11 Tagen deutlich unter dem zu diesem Zeitpunkt im Versuch B (200 nl/l, 8 h/d, 46 d) beobachteten Niveau von 6-facher Induktion. Erst die Erhöhung der Ozonkonzentration auf 190 nl/l nach 12 Tagen führte auch in Versuch C zu einem deutlichen Anstieg der *Fs-DAHPS3*, so daß nach 16 Tagen eine 6-fache Induktion erreicht wurde. Nach einem in beiden Versuchen zunächst beobachteten Rückgang der Induktionswerte von *Fs-DAHPS3* kam es allerdings in Versuch C über den gesamten Versuchsverlauf in den ozonbehandelten Pflanzen zu einer stetigen und signifikanten transkriptionellen Zunahme dieses Gens, während in Versuch B am Versuchsende keine differentielle Genexpression zwischen den Behandlungsvarianten mehr festgestellt werden konnte. Eine mögliche Ursache für diesen Befunde ist in einer vermutlich unterschiedlichen Empfindlichkeit der Blätter gegenüber oxidativem Streß zu Beginn und gegen Ende der Vegetationsperiode zu sehen [253].

Auch die Isoform *Fs-DAHPS1* wurde in Versuch C deutlich durch die Ozonbehandlung induziert. Abgesehen von einem transienten Anstieg auf 2-fache Expression bereits nach 2 Tagen, erfolgte diese Induktion allerdings erst deutlich später parallel zum Auftreten der ersten ozonbedingten Blattschäden. Ab dem 41. Versuchstag konnten signifikante Unterschiede in der Genexpression zwischen ozonbehandelten und

Kontrollpflanzen festgestellt werden, die sich bis zum Versuchsende auf 24-faches Niveau steigerten. Die Expression von *Fs-DAHPS2* wurde im Vergleich mit den anderen beiden *DAHPS*-Isoformen durch die Ozonbehandlung am wenigsten beeinflusst. Ausgehend von einer leichten aber nicht signifikanten Repression zu Versuchsbeginn erhöhte sich die Expression von *Fs-DAHPS2* nur sehr langsam in den ozonbehandelten Pflanzen und erreichte erst am 76. Versuchstag mit 1,7-fachem Niveau eine signifikant gegenüber den unbehandelten Pflanzen erhöhte Geninduktion.

Aufgrund der deutlich unterschiedlichen Expressionsmuster von *Fs-DAHPS1*, *Fs-DAHPS2* und *Fs-DAHPS3* kann davon ausgegangen werden, daß in Versuch C die drei *DAHPS*-Isoformen mittels qRT-PCR erfolgreich differenziert werden konnten. Die eher konstitutiv exprimierte *Fs-DAHPS2*, welche mit Abstand die häufigste *DAHPS*-Isoform in der Buche darstellt (Abb. 3.26, S. 103), sorgt vermutlich dafür, daß ein bestimmter Anteil des fixierten Kohlenstoffs unabhängig von den Umweltbedingungen in Richtung Chorismat umgewandelt wird. Die weniger häufig exprimierte *Fs-DAHPS3* und die noch seltenere *Fs-DAHPS1* übernehmen dagegen offenbar regulative Funktionen. So wurde *Fs-DAHPS3* stark durch den Umweltreiz Ozon beeinflusst, während die Expression von *Fs-DAHPS1* erst später mit dem Auftreten der ersten Blattläsionen deutlich induziert wurde. Die erhöhte Genexpression der *Fs-DAHPS1* könnte damit in Verbindung mit der Bildung von 3,3',4,4'-Tetramethoxybiphenyl stehen, das vor allem im Bereich der ozonbedingten Läsionen von Buchenblättern gefunden wird (pers. Mitteilung: Werner Heller, GSF).

#### **Quantifizierung des Enzyms *Fs-DAHPS3* unter dem Einfluß von Ozon**

Durch Westernblot-Analysen wurde im Verlauf des Versuchs C auch die Akkumulation des Enzyms *Fs-DAHPS3* analysiert. Ab dem 34. Versuchstag konnte dabei die Hybridisierung des gegen das Enzym *Fs-DAHPS3* gerichteten monoklonalen Antikörpers mit einer Proteinbande beobachtet werden, deren Quantität nur in den ozonbehandelten Bäumen bis zum Versuchsende erkennbar zunahm. Die markierte Proteinbande wies mit ca. 100 kDa etwa die doppelte Größe der funktionellen, um die prognostizierte cTP-Sequenz (65 Aminosäuren) verkürzten *Fs-DAHPS3* auf. Aus diesem Grund wurde vermutet, daß es sich bei dem beobachteten ozoninduzierten Protein um das Dimer der *Fs-DAHPS3* handelt. Diese Vermutung stützt sich einerseits darauf, daß das Enzym *DAHPS* in höheren Pflanzen nicht als Monomer, sondern als Dimer vorkommt [122]. Andererseits wurde als Antigen für die Herstellung der monoklonalen Antikörper kein aus der Pflanze aufgereinigtes Protein sondern ein heterolog in Bakterien synthetisiertes Fusionsprotein aus Glutathion-S-Transferase und *Fs-DAHPS3* verwendet, so daß eine Kreuzreaktivität des Antikörpers mit einem anderen pflanzlichen Protein eher unwahrscheinlich ist.

Da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, daß die Hybridisierungseffizienz stark unter dem Aufkochen der Proben vor dem Auftrag auf das Polyacrylamid-SDS-Gel litt, wurde auf diesen Schritt für die hier vorgestellten Westernblot-Analysen verzichtet. Unter diesen Bedingungen ist es möglich, daß Oligomere elektrophoretisch aufgetrennt wer-

den, ohne in ihre Untereinheiten zu zerfallen [152, 301].

Wenn man also davon ausgeht, daß es sich bei dem differentiell translatierten Protein um die Fs-DAHSP3 handelt, so steht dieser Befund im Einklang mit der für das putative Gen *Fs-DAHPS3* verzeichneten Expression, die ebenfalls gegen Ende von Versuch C die höchsten Werte erreichte.

Janzik et al. [134] beobachteten bei der Hybridisierung denaturierter Proteinextrakte aus Blättern der ozonempfindlichen Tabaksorte 'Bel W3' mit einem gegen DAHPS aus Kartoffel gerichteten Antikörper etwa 30 Stunden nach der Behandlung mit Ozon (5 h, 160 nl/l) die schwache Akkumulation einer putativen DAHPS-Isoform. Die Konzentration einer weiteren putativen DAHPS-Isoform blieb dagegen unter dem Einfluß von Ozon unverändert.

## 4.4.2 3-Dehydroquinat Synthase

### Charakterisierung von Fs-DHQS

Im Jahr 1996 wurde erstmals eine *DHQS*-Sequenz aus Tomate isoliert [18], als bereits für alle anderen Enzyme des Shikimatstoffwechsels entsprechende cDNA-Sequenzen aus höheren Pflanzen zur Verfügung standen. Seitdem ist keine weitere *DHQS* aus Pflanzen charakterisiert worden und nur wenige dazu homologe Sequenzen wurden veröffentlicht. Diese stammen ausschließlich von krautigen Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Zea mays*) und es handelt sich zum Teil nur um cDNA-Fragmente. Bei *A. thaliana* wurde nur eine putative *DHQS*-Isoform gefunden, und da deren vollständige genomische Sequenz mittlerweile veröffentlicht ist, kann man davon ausgehen, daß es sich hierbei um die einzige *DHQS*-Isoform dieser Pflanze handelt. Auch Bischoff et al. [18] kamen aufgrund von Southern-Blot Analysen zu dem Schluß, daß es vermutlich nur eine oder wenige Isoformen dieses Enzyms in Tomate gibt. Damit ist die *DHQS* das einzige Enzym des Shikimatstoffwechsels, von dem bisher nur eine Isoform gefunden wurde.

Die aus Buche isolierte 1377 bp lange cDNA-Sequenz *Fs-DHQS* (AccNr.: DQ166522) weist im prognostizierten offenen Leserahmen von 459 Aminosäuren Länge auf DNA- und Proteinebene mit 68% und 74% hohe paarweise Homologie zur *DHQS* aus Tomate auf. Wie Tabelle 4.3, S. 160 zeigt, liegt die Ähnlichkeit zu homologen Sequenzen aus Reis und *A. thaliana* mit 72% und 74% auf dem selben Niveau.

Gemäß 'TargetP' [65, 224] besitzen alle vier veröffentlichten, teils putativen *DHQS*-Sequenzen eine cTP-Sequenz von bis zu 76 Aminosäuren Länge. Das cTP des Enzyms *Fs-DHQS* ist mit nur 58 Aminosäuren am kürzesten. Alle vier Sequenzen sind also vermutlich chloroplastidär lokalisiert. cDNA-Sequenzen cytosolischer Formen der *DHQS* sind bislang nicht beschrieben worden. Mittels dem Programm 'InterProScan' [346] wurde in der von der cDNA-Sequenz abgeleiteten Proteinsequenz das funktionelle Motiv der Dehydroquinat Synthase gefunden. Dieses ist 311 Aminosäuren lang und erstreckt sich von Aminosäure 111 bis 422.

**Tabelle 4.3:** Paarweise Identität (DNA-Ebene, rot) bzw. Homologie (Protein-Ebene, blau) zwischen der kodierenden Sequenz von *Fs-DHQS* und dazu homologen cDNA-Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana* (*A.t.*), *Lycopersicon esculentum* (*L.e.*) und *Oryza sativa* (*O.s.*). In Klammern sind jeweils die Akzessionsnummern angegeben, unter denen die cDNA-Sequenzen bei NCBI veröffentlicht wurden.

Identität / Homologie [%]	<i>Fs-DHQS</i>	<i>A.t.</i>	<i>L.e.</i>	<i>O.s.</i>
<i>Fs-DHQS</i> (DQ166522)	-	65	68	61
<i>A.t.</i> (NM_126010)	74	-	62	59
<i>L.e.</i> (L46847)	74	75	-	59
<i>O.s.</i> (AK071977)	72	73	69	-

### Ozonbedingte Genexpression von *Fs-DHQS*

Über die streßbedingte Regulation der Genexpression der *DHQS* in höheren Pflanzen ist bisher nur wenig bekannt. Bischoff et al. [18] berichten von einer etwa 9-fachen transkriptionellen Induktion der *DHQS* in Zellkulturen von Tomate fünf Stunden nach einer Elicitor-Behandlung. Die Expression der *DQHS* in Tabakpflanzen ging während einer 5-stündigen Ozonexposition (160 n/l) im Verlauf der ersten vier Stunden zunächst um etwa 30% zurück, stieg daraufhin auf 1,7-faches Niveau an und nahm dann bis zum Ende der Untersuchung wieder auf das Niveau der Kontrollpflanzen ab [134]. Wie für andere Gene aus dem Shikimatstoffwechsel wurden hierbei, abhängig vom Erntezeitpunkt, auch in der Kontrollprobe veränderliche Transkriptmengen der *DHQS* beobachtet [134], was möglicherweise auf circadiane Genexpressionsmuster zurückzuführen ist.

Auch in der hier vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression der *DHQS* unter dem Einfluß von Ozon in allen Ozonexpositionsversuchen nur schwach stimuliert. In Versuch A und D konnte im Gegensatz zu Versuch B und C (2.4, S. 31) keine signifikante Induktion dieses Gens ermittelt werden. In Versuch B wurde zwei Tage nach Beginn der Ozonexposition zunächst ein signifikanter Anstieg der Genexpression von *Fs-DHQS* um den Faktor 1,7 verzeichnet. Bis zum Ende der Behandlung nach 46 Tagen ging diese Induktion allerdings wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Im Gegensatz dazu nahm in Versuch C die Genexpression von *DHQS* unter dem Einfluß von Ozon anfangs nur sehr langsam zu. Erst 48 Tage nach Versuchsbeginn, als es zur Ausbildung erster makroskopischer Blattläsionen kam, konnte bezüglich der Expression von *Fs-DHQS* ein signifikanter Unterschied zwischen den ozonbehandelten und den unbehandelten Pflanzen beobachtet werden, der bis zum Versuchsende 2-faches Niveau erreichte. Bezüglich der absoluten Transkriptmenge wies die *Fs-DHQS* von allen untersuchten putativen Genen des Shikimatstoffwechsels nach der *Fs-DAHPS2* das zweithöchste Niveau auf.

### 4.4.3 3-Dehydroquinat Dehydratase / Shikimat Dehydrogenase

#### Charakterisierung von *Fs*-DHQD/SD

Seit mehr als 30 Jahren weiß man, daß in höheren Pflanzen die enzymatischen Reaktionen der 3-Dehydroquinat Dehydratase und der Shikimat Dehydrogenase von einem bifunktionellen Enzym katalysiert werden [26]. Neben dieser vermutlich im Chloroplasten lokalisierten 3-Dehydroquinat Dehydratase / Shikimat Dehydrogenase (DHQD/SD) existieren möglicherweise auch monofunktionelle cytosolische Isoformen der beiden Enzyme [237], von denen allerdings bislang keine entsprechenden Sequenzinformationen bekannt sind. Mittlerweile ist neben einem cDNA-Fragment aus *Pisum sativum* (AccNr.: Z34521, [47]) auch die vollständige kodierende Sequenz der *DHQD/SD* aus *Lycopersicon esculentum* (AccNr.: AF033194, [19]) und *Nicotiana tabacum* (AccNr.: AY578144, [20]) in öffentlichen Datenbanken verfügbar. Dazu homologe cDNA-Sequenzen wurden für *Triticum aestivum* (AccNr.: BT009591, BT009197), *A. thaliana* (AccNr.: NM\_111510), *Oryza sativum* (AccNr.: NM\_193870, NM\_193872) und *Zea mays* (AccNr.: AY104970) bei NCBI veröffentlicht. In *A. thaliana* scheint nur eine Isoform dieses Enzyms zu existieren, während die homologen cDNA-Sequenzen aus *Triticum aestivum* und *Oryza sativum* darauf hindeuten, daß es in diesen Pflanzen mindestens zwei DHQD/SD-Isoformen gibt. Aufgrund von Isoenzymanalysen postulierten Díaz et al. [50] sogar die Existenz von fünf verschiedenen Isoenzymen der Shikimat Dehydrogenase in *Capsicum annuum*. Bei Isoenzymanalysen der Shikimat Dehydrogenase in Buche fand sich allerdings bislang nur ein entsprechender Locus dieses Enzyms [183].

Die cDNA-Sequenz *Fs*-DHQD/SD (AccNr.: DQ166523) aus der Buche weist in einem 1611 bp langen offenen Leserahmen auf DNA- bzw. Proteinebene 75% und 72% paarweise Identität zu der *DHQD/SD*-Sequenz aus Tomate auf (Tab. 4.4, S. 162). Die Homologie zu den entsprechenden Sequenzen aus *A. thaliana* und *Nicotiana tabacum* sind etwas geringer und die beiden putativen *DHQD/SD* Isoformen aus *Oryza sativa* besitzen die geringste Ähnlichkeit mit *Fs*-DHQD/SD.

Aufgrund des nur 42 bp kurzen 5'-Endes der cDNA von *Fs*-DHQD/SD liegt die Vermutung nahe, daß hier mittels der 5'-RACE nur ein Teil des gesuchten cDNA-Endes kloniert werden konnte. Da sich allerdings oberhalb des putativen Start-Codons im Leserahmen der *Fs*-DHQD/SD ein Stop-Codon befindet und auch für die cDNA-Sequenzen der *DHQD/SD* aus Tabak und Tomate nur ein ebenso kurzes 5'-Ende gefunden wurde [19, 20], ist es wahrscheinlich, daß tatsächlich die vollständige kodierende Sequenz von *Fs*-DHQD/SD kloniert werden konnte.

Die cDNA-Sequenz *Fs*-DHQD/SD ist die einzige der hier klonierten putativen cDNA-Sequenzen aus dem Shikimatstoffwechsel der Buche, für die mittels dem Programm 'TargetP' [65, 224] kein cTP prognostiziert wurde. Allerdings war dies, wahrscheinlich wegen der ungewöhnlich kurzen 5'-cDNA Enden, auch für die beiden cDNA-Sequenzen aus Tomate und Tabak (AccNr.: AF033194, AY578144, [19, 20]) der Fall, obwohl Bischoff et al. [19] mehrere Gründe für eine vermutlich chloroplasti-

**Tabelle 4.4:** Paarweise Identität (DNA-Ebene, rot) bzw. Homologie (Protein-Ebene, blau) zwischen der kodierenden Sequenz von *Fs-DHQD/SD* und dazu homologen Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana* (*A.t.*), *Lycopersicon esculentum* (*L.e.*), *Nicotiana tabacum* (*N.t.*), *Oryza sativum* (*O.s.*) und *Zea mays* (*Z.m.*). In Klammern sind jeweils die Akzessionsnummern angegeben, unter denen die cDNA-Sequenzen bei NCBI veröffentlicht worden sind.

Identität / Homologie [%]	<i>Fs-DHQD/SD</i>	<i>L.e.</i>	<i>A.t.</i>	<i>O.s.1</i>	<i>O.s.2</i>	<i>N.t.</i>	<i>Z.m.</i>
<i>Fs-DHQD/SD</i> (DQ166523)	-	75	73	54	61	74	72
<i>L.e.</i> (AF033194)	72	-	67	54	56	86	67
<i>A.t.</i> (NM_111510)	71	66	-	54	57	62	66
<i>O.s.1</i> (NM_193870)	58	58	60	-	91	52	69
<i>O.s.2</i> (P003204)	58	60	60	91	-	56	69
<i>N.t.</i> (AY578144)	69	84	60	56	58	-	66
<i>Z.m.</i> (AY104970)	69	68	68	68	66	67	-

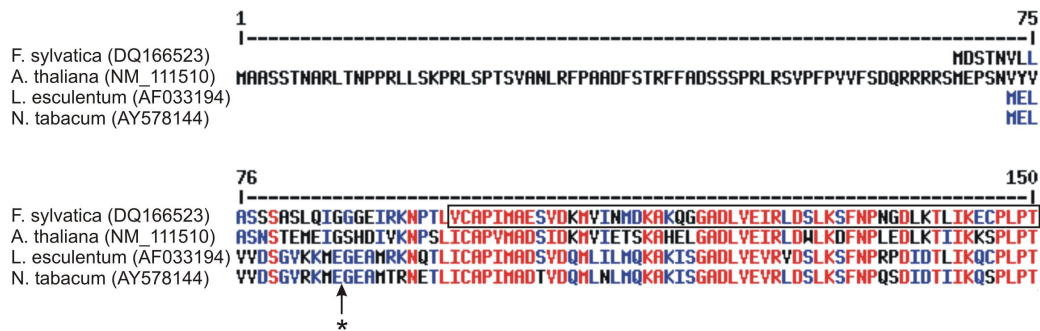
däre Lokalisation dieser beiden Proteine anführten.

Ein Sequenzvergleich der 5'-cDNA Enden von *Fs-DHQD/SD* und den beiden *DHQD/SD*-Sequenzen aus Tomate und Tabak läßt vermuten, daß auch *Fs-DHQD/SD*, wie Tomate und Tabak nur eine sehr kurze cTP-Sequenz von etwa 18 Aminosäuren Länge aufweist (Abb. 4.2, S. 163). Damit wäre sie etwas länger als das postulierte cTP der *DHQD/SD* aus Tomate (13 Aminosäuren), aber deutlich kürzer als das mittels 'TargetP' [65, 224] prognostizierte 66 Aminosäuren lange cTP einer putativen *DHQD/SD*-Sequenz aus *Arabidopsis thaliana*.

Die mittels 'InterProScan' [346] prognostizierte funktionelle Domäne der 3-Dehydroquinase (Type I), die der 3-Dehydroquinat Dehydratase entspricht, beginnt bei der abgeleiteten Proteinsequenz von *Fs-DHQD/SD* mit Aminosäure 29 kurz nach dem putativen cTP und hat eine Länge von 220 Aminosäuren. Am C-terminalen Ende des Proteins *Fs-DHQD/SD* wurde zwischen Aminosäure 372 und 491 die funktionelle Domäne der Shikimat/Quinat Dehydrogenase identifiziert.

### Ozonbedingte Genexpression von *Fs-DHQD/SD*

Die einzigen Untersuchungen zur streßinduzierten Genexpression der *DHQD/SD* bei intakten Pflanzen wurden vor kurzem von Janzik et al. veröffentlicht [134]. Dabei wurde während einer 5-stündigen Behandlung mit 160 n/l Ozon in Tabakpflanzen der ozonsensitiven Sorte 'Bel W3' zunächst eine leichten Repression der *DHQD/SD* beobachtet, während 10 Stunden nach dem Beginn der Behandlung eine etwa 2-fache Induktion ermittelt wurde. Die Transkriptmengen der *DHQD/SD* veränderten sich auch abhängig vom Meßzeitpunkt in den Kontrollpflanzen [134]. Unter dem Einfluß einer Elicitor-Behandlung war zuvor von Bischoff et al. [19] in Tomatenzellkulturen bereits



**Abbildung 4.2:** Alignment der von *Fs-DHQD/SD* (AccNr.: DQ166523) abgeleiteten N-terminalen Proteinsequenz mit dazu homologen Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicon esculentum* und *Nicotiana tabacum*. Das Symbol '\*' markiert das Ende des von Bischoff et al. [19] postulierten N-terminalen chloroplastidären Transitpeptids der Sequenzen aus Tomate und Tabak (AccNr.: AF033194, AY578144). Der Rahmen um die putative DHQD/SD-Sequenz aus Buche stellt den Beginn der funktionellen Domäne der Shikimat Dehydrogenase dar.

nach 5 Stunden mit etwa 7-facher Induktion eine sehr viel ausgeprägtere Regulation der *DHQD/SD* beobachtet worden.

Während in Versuch D in adulten Buchen unter doppelt ambientem Ozonregime über den gesamten Versuchszeitraum nur in der Tendenz eine leichte Induktion der *DHQD/SD* beobachtet werden konnte, war die Expression dieses Gens in der Ozonexpositionsversuchen A, B und C (2.4, S. 31) bei 3- und 4-jährigen Buchen signifikant erhöht. Die Ausbildung von makroskopisch sichtbaren Läsionen fiel in den Versuchen B und C zeitlich mit einer deutlichen ozonbedingten Induktion der *Fs-DHQD/SD* zusammen. In Versuch C erfolgte zudem eine erste signifikante Induktion der Genexpression von *Fs-DHQD/SD* nach der Erhöhung der Ozonkonzentration von 150 auf 190 n/l.

Die in allen Expositionsversuchen beobachtete, teils über lange Zeiträume signifikante Induktion der *Fs-DHQD/SD* deutet auf eine wichtige Funktion dieses Enzyms im Shikimatstoffwechsel hin. Während die streßbedingte Induktion der *DAHPS* plausibel zu erklären ist (s. o.), erschließen sich die Ursachen einer Regulation der *DHQD/SD* im sequentiell strukturierten Shikimatstoffwechselweg nicht auf den ersten Blick. Eine Induktion der *DHQD/SD* ist möglicherweise dadurch zu begründen, daß das Produkt der 3-Dehydroquinat Dehydratase Reaktion, das 3-Dehydroshikimat, in Pflanzen z.B. durch Bildung von Protocatechusäure und Gallussäure für eine weitere Umsetzung zu Chorismat verlorengehen kann [123, 216, 237]. Durch Zunahme der *DHQD/SD*-Aktivität würde ein solcher Verlust reduziert. Darüber hinaus konnte in *Pinus taeda* gezeigt werden, daß die Shikimat Dehydrogenase als Substrat ebenfalls Quinat akzeptiert [236], was bei einer Induktion der *DHQD/SD* eine Zunahme von Shikimatstoffwechsel-Intermediaten durch Umsetzung von Quinat in 3-Dehydroquinat

zur Folge haben könnte.

### Quantifizierung des Enzyms Fs-DHQD/SD unter dem Einfluß von Ozon

Wegen der häufigen Verwendung der SD-Aktivität als molekularen Marker bei der Isoenzymanalyse gibt es bereits einige Studien zur streßinduzierten Zunahme der SD-Aktivität in Pflanzen [50, 51, 99]. So wurden zwei SD-Isoformen aus *Capsicum annuum* etwa elf Tage nach der Zugabe von Kupfersulfat in die Nährlösung bzw. 8 Tage nach einer Verwundung bis zu 2,5-fach induziert [50, 51]. Bei der Behandlung einer pathogenresistenten Tomatensorte mit Ozon (3 h, 150 nl/l) war die SD-Aktivität 24 Stunden nach Behandlungsbeginn etwa 3-fach induziert [99].

Bei den hier durchgeführten Westernblot-Analysen hybridisierte der gegen die klonierte Fs-DHQD/SD Isoform gerichtete monoklonale Antikörper mit einem etwa 60 kDa großen Protein, was in etwa der rechnerisch erwarteten Größe der Fs-DHQD/SD entspricht. Am 21. Tag von Versuch C begann die Akkumulation dieses Proteins, erreichte am 62. Tag ihren Höhepunkt und nahm daraufhin wieder leicht ab. Eine vergleichbare Entwicklung konnte auch bei der Genexpressionsanalyse für die Transkripte der Fs-DHQD/SD beobachtet werden. Da die DHQD/SD in höheren Pflanzen als Monomer vorkommt [14] und eine Kreuzreaktivität des verwendeten Antikörpers mit anderen pflanzlichen Proteinen wegen des zur Antikörper-Erstellung verwendeten Protein-Expressionssystems unwahrscheinlich ist (s.o.), kann man davon ausgehen, daß es sich bei diesem Protein tatsächlich um ein DHQD/SD-Isoenzym der Buche handelt.

#### 4.4.4 Shikimat Kinase

##### Charakterisierung von Fs-SK

Die erste cDNA-Sequenz einer Shikimat Kinase (SK) aus höheren Pflanzen wurde 1992 von Schmid et al. [282] für *Lycopersicon esculentum* beschrieben (AccNr.: X63560). Die Autoren zeigten, daß es sich hierbei vermutlich um die einzige Isoform der SK in Tomate handelte. Seitdem wurden nur wenige dazu homologe pflanzliche DNA-Sequenzen in öffentlichen Datenbanken publiziert. Dazu zählen zwei Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana* (AccNr.: AK117791, NM\_201778), je eine Sequenz aus *Zea mays* (AccNr.: BT016432) und *Triticum aestivum* (AccNr.: BT009514) und drei SK Isoformen aus *Oryza sativa* (AccNr.: AB188834, AB188835, AB188836) [144]. Es scheinen also auch im Falle der SK, wie für die meisten anderen Gene des Shikimatstoffwechsels, je nach Pflanzenart unterschiedlich viele Isoformen dieses Enzyms vorzuliegen.

Die isolierte putative Shikimat Kinase *Fs-SK* (AccNr.: DQ166524) besitzt mit nur 906 bp Länge den kürzesten offenen Leserahmen aller identifizierten putativen Gene des Shikimatstoffwechsels der Buche. Dieser weist mit 67% und 57% Identität und Homologie die größte Ähnlichkeit mit dem offenen Leserahmen der SK-Sequenz



aus Tomate (AccNr.: X63560) auf (Tab. 4.5). Im Vergleich mit den drei bekannten SK-Isoformen aus Reis ist Fs-SK mit 55% Homologie der dritten Isoform (AccNr.: AB188836) am ähnlichsten, während nur jeweils 47% Sequenzhomologie zu den anderen beiden SK-Isoformen aus Reis besteht. Mit diesen relativ geringen Werten weist Fs-SK von allen untersuchten Shikimatstoffwechsel-Enzymen die größten Unterschiede zu homologen Sequenzen aus anderen höheren Pflanzen auf.

**Tabelle 4.5:** Paarweise Identität (DNA-Ebene, rot) bzw. Homologie (Protein-Ebene, blau) zwischen der kodierenden Sequenz von *Fs-SK* und dazu homologen Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana* (*A.t.*), *Lycopersicon esculentum* (*L.e.*) und *Oryza sativa* (*O.s.*). In Klammern sind jeweils die Akzessionsnummern angegeben, unter denen die cDNA-Sequenzen bei NCBI veröffentlicht worden sind.

Identität / Homologie [%]	<i>Fs-SK</i>	<i>A.t.1</i>	<i>A.t.2</i>	<i>L.e.</i>	<i>O.s.1</i>	<i>O.s.2</i>	<i>O.s.3</i>
<i>Fs-SK</i> (DQ166524)	-	54	62	67	47	46	52
<i>A.t.1</i> (AK117791)	52	-	78	51	41	41	46
<i>A.t.2</i> (NM_201778)	53	69	-	63	46	43	46
<i>L.e.</i> (X63560)	57	52	53	-	43	43	46
<i>O.s.1</i> (AB188834)	47	41	47	43	-	77	69
<i>O.s.2</i> (AB188835)	47	41	43	42	76	-	54
<i>O.s.3</i> (AB188836)	55	49	50	48	62	62	-

Wie für die SK-Sequenz aus der Tomate prognostiziert der 'TargetP' Algorithmus [65, 224] auch für Fs-SK ein cTP von 29 Aminosäuren Länge und damit eine chloroplastidäre Lokalisation. Für die drei SK-Isoformen aus *Oryza sativa* ermittelt 'TargetP' allerdings nur im Falle der SK3 (AccNr.: AB188836) ein cTP und im Falle der Sequenzen SK1 und SK2 (AccNr.: AB188834, AB188835) ein mitochondriales Transitpeptid, obwohl Kasai et al. [144] zeigen konnten, daß alle drei Isoformen in Chloroplasten importiert werden können. Da noch bei keiner Pflanze ein Import von Shikimatstoffwechsellzymen in Mitochondrien beobachtet werden konnte, ist eher davon auszugehen, daß ein Klassifizierungsfehler des Programms 'TargetP' vorliegt. Da bislang keine Sequenzhomologien innerhalb von cTPs gefunden wurden, stützt sich deren Prognose nur auf Häufigkeitsanalysen bestimmter Aminosäuren, und ist damit relativ fehleranfällig.

Das funktionelle Motiv der Shikimat Kinase wurde in der von der cDNA-Sequenz abgeleiteten Proteinsequenz der Fs-SK gemäß 'InterProScan' [346] zwischen den Aminosäuren 114 und 290 identifiziert.

### Ozonbedingte Genexpression von *Fs-SK*

In dieser Arbeit wird erstmals die Induktion der SK unter Streßbedingungen an intakten Pflanzen beschrieben. Bei früheren Experimenten zur elicitorinduzierten Regu-

lation der SK in Zellkulturen von Tomate [95] und an Kalli von Reis [144] erfolgte bereits nach 60 bzw. 30 Minuten eine deutliche Induktion dieses Gens, die im Falle der Tomaten-Zellkulturen nach 2 Stunden ein Maximum von 13-facher Genexpression erreichte. Die nicht genau quantifizierte Induktion der SK in Reis-Kalli betraf nur die Isoformen SK1 und SK2, nicht aber die Isoform SK3. Die putative Shikimat Kinase *Fs-SK* aus der Buche wurde in allen Ozonexpositionsversuchen ebenfalls nur schwach induziert. Sie ist somit nicht nur bezüglich ihrer Sequenz sondern auch hinsichtlich der streßbedingten Regulation der Isoform SK3 (AccNr.: AB188836) aus Reis am ähnlichsten.

Während unter dem Einfluß einer kurzfristigen Ozonbehandlung (5 h, 160 nl/l) keine Regulation der SK in ozonsensitiven Tabakpflanzen der Sorte 'Bel W3' gefunden wurde [134], konnten hier in Versuch B und C (2.4, S. 31) eine signifikante Induktion der *Fs-SK* beobachtet werden. So lag in Versuch B die Genexpression der *Fs-SK* sieben Tage nach dem Beginn der Exposition in den behandelten Pflanzen 2,1-fach über dem Niveau der unbehandelten Pflanzen und nahm ab diesem Zeitpunkt bis zum Versuchsende wieder kontinuierlich ab. In Gegensatz dazu blieb die Expression der *Fs-SK* in Versuch C zunächst auf etwa demselben Niveau wie in der Kontrolle und erhöhte sich erst ab dem 34. Tag signifikant. Die anschließende Zunahme der Induktion erfolgte sehr langsam, bis zum Versuchsende ein ozonbedingt 2,5-fach erhöhtes Expressions-Niveau erreicht wurde. In Versuch A und D konnte dagegen über den gesamten Versuchszeitraum keine signifikante Erhöhung der *Fs-SK* gemessen werden.

#### 4.4.5 5-Enolpyruvylshikimat 3-Phosphat Synthase

##### Charakterisierung von *Fs-EPSPS*

Da die Wirkung des kommerziell wichtigen Herbizid-Wirkstoffs Glyphosat auf der Hemmung der 5-Enolpyruvylshikimat 3-Phosphat Synthase (EPSPS) beruht, ist dieses Enzym intensiver als alle anderen Shikimatstoffwechsel-Enzyme untersucht worden. So sind mittlerweile cDNA-Fragmente von mehr als 30 höheren Pflanzen wie z.B. *Eleusine indica* (AccNr.: AJ417034) [6], *Lycopersicon esculentum* (AccNr.: M21071) [85], *Nicotiana tabacum* (AccNr.: M61904) [327], *Petunia hybrida* (AccNr.: M21084) [85] und *Zea mays* (AccNr.: X63374) [71] veröffentlicht. Während man bei den meisten Arten bisher nur eine Isoform dieses Gens gefunden hat, beschrieben Yuan et al. und Forlani et al. bei *Dicliptera chinensis* bzw. *Zea mays* zwei verschiedene EPSPS-Isoformen (AccNr.: AF371965, AF371966, AF413082, AB016765) [71, 344]. Auch im Genom von *Arabidopsis thaliana* finden sich zwei putative EPSPS-Sequenzen (AccNr.: NM\_130093, NM\_103780).

Mit 2088 Basenpaaren ist die cDNA-Sequenz von *Fs-EPSPS* (AccNr.: DQ166525) die längste der hier beschriebenen putativen Gene des Shikimatstoffwechsels aus der Buche. Die von einem 1560 bp langen offenen Leserahmen abgeleitete Proteinsequenz der *Fs-EPSPS* ist mit 520 Aminosäuren ähnlich groß wie die EPSPS anderer Pflanzen (517-522 Aminosäuren).

Im Vergleich mit dem homologen Sequenzbereich verschiedener putativer *EPSPS*-Sequenzen aus *Dicliptera chinensis*, *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicon esculentum* und *Nicotiana tabacum* wies der offene Leserahmen von *Fs-EPSPS* mit 77% und 80% paarweiser Identität auf DNA- bzw. Proteinebene die größte Ähnlichkeit zu der *EPSPS*-Sequenz aus Tabak auf. Die Ähnlichkeit zwischen den *EPSPS*-Sequenzen erhöhte sich auf 83% bis 88%, wenn die Proteinsequenzen ohne die mittels 'TargetP' [65, 224] für alle Enzyme prognostizierten cTP-Sequenzen verglichen wurden (Tab. 4.6)

**Tabelle 4.6:** Paarweise Identität (DNA-Ebene, rot) bzw. Homologie (Protein-Ebene, blau) zwischen der kodierenden Sequenz von *Fs-EPSPS* und dazu homologen Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana* (*A.t.*), *Dicliptera chinensis* (*D.c.*), *Lycopersicon esculentum* (*L.e.*) und *Nicotiana tabacum* (*N.t.*) mit (A) und ohne (B) dem für das chloroplastidäre Transitpeptid (cTP) kodierenden Sequenzbereich. In Klammern sind jeweils die Akzessionsnummern angegeben, unter denen die cDNA-Sequenzen bei NCBI veröffentlicht worden sind.

<b>A: Paarweise Identität bzw. Homologie der putativen <i>EPSPS</i>-Sequenzen</b>							
<b>Identität / Homologie [%]</b>	<i>Fs-EPSPS</i>	<i>A.t.1</i>	<i>A.t.2</i>	<i>L.e.</i>	<i>D.c.1</i>	<i>D.c.2</i>	<i>N.t.</i>
<i>Fs-EPSPS</i> (DQ166525)	-	76	70	70	69	69	77
<i>A.t.1</i> (NM_130093.2)	75	-	85	66	64	63	72
<i>A.t.2</i> (NM_103780.3)	74	89	-	66	64	64	66
<i>L.e.</i> (M21071)	78	75	73	-	66	70	92
<i>D.c.1</i> (AF371965)	78	73	70	76	-	98	67
<i>D.c.2</i> (AF371966)	78	73	70	77	99	-	67
<i>N.t.</i> (M61904)	80	73	73	93	79	80	-

<b>B: Paarweise Identität bzw. Homologie der putativen <i>EPSPS</i>-Sequenzen ohne cTP</b>							
<b>Identität / Homologie [%]</b>	<i>F.s.</i>	<i>A.t.1</i>	<i>A.t.2</i>	<i>L.e.</i>	<i>D.c.1</i>	<i>D.c.2</i>	<i>N.t.</i>
<i>F.s.</i> (DQ166525)	-	78	78	79	79	79	81
<i>A.t.1</i> (NM_130093.2)	83	-	94	76	72	72	75
<i>A.t.2</i> (NM_103780.3)	83	97	-	76	72	72	75
<i>L.e.</i> (M21071)	86	83	83	-	75	75	93
<i>D.c.1</i> (AF371965)	86	81	80	84	-	98	77
<i>D.c.2</i> (AF371966)	87	81	80	85	99	-	77
<i>N.t.</i> (M61904)	88	82	82	96	86	86	-

Alle in Tabelle 4.6 aufgeführten *EPSPS*-Sequenzen einschließlich der *Fs-EPSPS* sind vermutlich chloroplastidär lokalisiert. Die cTP-Sequenz von *Fs-EPSPS* ist mit 76 Aminosäuren länger als die der anderen sechs *EPSPS*-Sequenzen (39 bis 69 Aminosäuren). Die mittels 'InterProScan' [346] identifizierte funktionelle Domäne der *EPSPS* erstreckt sich bei der abgeleiteten Proteinsequenz von *Fs-EPSPS* über einen Bereich von 429 Aminosäuren und beginnt bei Aminosäure 85.

### Ozonbedingte Genexpression von *Fs-EPSPS*

Nach Behandlung der als glyphosattolerant geltenden Pflanze *Dicliptera chinensis* mit sublethalen Mengen dieses Herbizidwirkstoffs stellten Yuan et al. [344] fest, daß nach 25 Stunden anstelle einer Repression, wie sie bei *Ageratum houstonianum* beobachtet wurde, sowohl eine Aktivitätssteigerung der EPSPS als auch eine Zunahme der Transkripte dieses Enzyms erfolgte. Bei Zellkulturen von Tomate wurde bereits 90 Minuten nach Beginn einer Elicitor-Behandlung eine 5-fache Induktion der Genexpression von EPSPS ermittelt, die bis 4 Stunden nach Behandlungsbeginn auf 17-faches Niveau zugenommen hatte [95]. Bei der Untersuchung der Auswirkungen von Elicitoren auf die Aktivität zweier EPSPS-Isoformen in Mais-Zellkulturen beobachtete Forlani eine rasche Induktion der einen Isoform schon nach einer Stunde, parallel zur Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, und die Induktion einer zweiten Isoform nach weiteren drei Stunden [73]. Die erste Isoform erreichte mit 11-facher Induktion ihr Aktivitätsmaximum nach 3 Stunden, die zweite dagegen mit 8-facher Induktion erst nach 5 Stunden. Unter dem Einfluß einer Infektion mit *Phytophthora infestans* erfolgte ebenfalls eine leichte Induktion der EPSPS in Tomatenpflanzen. Bereits nach einer Stunde hatte sich die Transkriptmenge verdoppelt und erreichte bei 4-fachem Induktionsniveau nach 3 Stunden ihr Maximum [95]. Die EPSPS der ozonempfindlichen Tabaksorte 'Bel W3' reagierte auf eine kurze Ozonbehandlung (5 h, 160 nl/l) zunächst mit einer leichten Repression von etwa 30% nach 2 Stunden und war dann nach 10 Stunden 1,7-fach induziert [134].

Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Ozonexpositionsversuchen wurde die Genexpression der EPSPS bis maximal 4,5-fach, teils signifikant induziert. Zu Beginn der Gewächshaus-Versuche A, B und C (2.4, S. 31) war die EPSPS von allen untersuchten Genen des Shikimatstoffwechsels am deutlichsten induziert. Das Expressionsniveau der EPSPS in den ozonbehandelten Pflanzen lag dabei in Versuch B sieben Tage nach Versuchsbeginn 3,5-fach über dem der Kontrollpflanzen und nahm von diesem Zeitpunkt an stetig ab, bis zum Versuchsende wieder das Ausgangsniveau erreicht wurde. In Versuch C war die *Fs-EPSPS* bereits nach 2 Tagen signifikant 2,6-fach unter dem Einfluß von Ozon induziert. Einem leichten Rückgang der Induktion, wie er in Versuch B beobachtet worden war, folgte ein weiterer Anstieg auf 3-faches Expressionsniveau nach Erhöhung der Ozonkonzentration von 150 nl/l auf 190 nl/l. Bis zum Ende von Versuch C blieb die *Fs-EPSPS* signifikant induziert. Im Verlauf von Versuch D wurde eine leichte, aber nicht signifikante ozonbedingte Zunahme der Genexpression von *Fs-EPSPS* beobachtet. Möglicherweise waren neben den verwendeten Ozonkonzentration auch das unterschiedliche Blattalter und das Alter der Versuchsbäume für die unterschiedliche Entwicklung der Genexpression von *Fs-EPSPS* im Verlauf der Versuche B und C verantwortlich (siehe 4.2.1, S. 141).

## 4.4.6 Chorismat Synthase

### Charakterisierung von Fs-CS

Die erste in höheren Pflanzen beschriebene Chorismat Synthase wurde aus *Corydalis sempervirens* isoliert (AccNr: X60544) [280]. Weitere, dazu homologe Sequenzen sind von den Pflanzen *Arabidopsis thaliana* (AccNr: NM\_103779), *Glycine max* (AccNr: DQ075204), *Lycopersicon esculentum* (AccNr: Z21791, Z21796) [93] und *Oryza sativa* (AccNr: AK099850, AB122084) in der Genbank von NCBI veröffentlicht. Bei *Lycopersicon esculentum* und *Oryza sativa* sind bereits mehrere CS-Isoformen gefunden worden.

Die 1656 bp lange cDNA der *Fs-CS* (AccNr.: DQ166526) enthält einen offenen Leserahmen von 1302 bp Länge, der, wie alle anderen bisher veröffentlichten putativen CS-Sequenzen auch ein cTP kodiert. Somit ist auch die *Fs-CS* vermutlich chloroplastidär lokalisiert. Das cTP ist mit 46 Aminosäuren im Vergleich zu den cTP-Sequenzen der CS-Gene aus den oben genannten Pflanzen (39 - 64 Aminosäuren) relativ kurz.

Auf Proteinebene weisen alle in Tabelle 4.7 aufgeführten CS-Sequenzen der oben genannten Pflanzen ein ähnliches Homologieniveau zu *Fs-CS* auf, wobei die Sequenz aus *Arabidopsis thaliana* mit 79% Homologie am meisten und die Sequenz aus Reis mit 70% Homologie am wenigsten Ähnlichkeit mit *Fs-CS* besitzt (Tab. 4.7).

**Tabelle 4.7:** Paarweise Identität (DNA-Ebene, rot) bzw. Homologie (Protein-Ebene, blau) zwischen der kodierenden Sequenz von *Fs-CS* und dazu homologen Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana* (*A.t.*), *Corydalis sempervirens* (*C.s.*), *Glycine max* (*G.m.*), *Lycopersicon esculentum* (*L.e.*) und *Oryza sativa* (*O.s.*). In Klammern sind jeweils die Akzessionsnummern angegeben, unter denen die cDNA-Sequenzen bei NCBI veröffentlicht worden sind.

Identität / Homologie [%]	<i>Fs-CS</i>	<i>A.t.</i>	<i>L.e.1</i>	<i>L.e.2</i>	<i>O.s.</i>	<i>G.m.</i>	<i>C.s.</i>
<i>Fs-CS</i> (DQ166526)	-	75	70	73	63	76	70
<i>A.t.</i> (NM_103779)	79	-	70	73	62	73	70
<i>L.e.1</i> (Z21791)	77	76	-	85	65	69	69
<i>L.e.2</i> (Z21796)	76	77	87	-	63	73	67
<i>O.s.</i> (AK099850)	70	66	71	68	-	63	64
<i>G.m.</i> (DQ075204)	76	76	72	73	66	-	68
<i>C.s.</i> (X60544)	76	75	75	74	67	74	-

Das 350 Aminosäuren lange funktionelle Motiv der Chorismat Synthase befindet sich gemäß 'InterProScan' [346] bei der abgeleiteten Proteinsequenz von *Fs-CS* zwischen den Aminosäuren 56 und 406.

### Ozonbedingte Genexpression von *Fs-CS*

Görlach et al. [95] untersuchten die Genexpression der CS in Tomaten-Zellkulturen unter dem Einfluß von pilzlichen Elicitoren und fanden zwei Stunden nach Behandlungsbeginn bei einer der beiden CS-Isoformen eine etwa 2-fache Induktion, die sich innerhalb der nächsten 4 Stunden noch bis zu einem Maximalwert von 18-facher Induktion erhöhte. Die andere untersuchte CS-Isoform zeigte keine Reaktion auf die Elicitor-Behandlung. Durch die Infektion von Tomatenpflanzen mit dem Pathogen *Phytophthora infestans* wurde ebenfalls nur die Genexpression der elicitorinduzierbaren CS-Isoform auf maximal 4-faches Niveau erhöht, während die zweite CS-Isoform nicht induziert wurde [95].

Bei der Behandlung der Tabaksorte 'Bel W3' mit Ozon (5 h, 160 nl/l) wurde die klonierte Isoform der CS 10 Stunden nach Behandlungsbeginn mit 2,5-facher Induktion relativ stark im Vergleich mit anderen Genen des Shikimatstoffwechsels induziert, wobei auch in den nicht ozonbehandelten Pflanzen abhängig vom Meßzeitpunkt unterschiedliche Transkriptmengen verzeichnet wurden [134].

Die aus Buche isolierte putative CS-Isoform *Fs-CS* erreichte dagegen in allen Expositionsversuchen nie ein mehr als 2,2-faches ozonbedingtes Induktionsniveau. In Versuch B erfolgte die höchste Induktion von *Fs-CS* deutlich früher als in Versuch C und ging im Versuchsverlauf wieder auf das Ausgangsniveau zurück, während in Versuch C die Maximalwerte erst gegen Versuchsende erreicht wurden. Sowohl in Versuch A als auch in Versuch D konnten keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression von *Fs-CS* zwischen den ozonbehandelten und den unbehandelten Pflanzen festgestellt werden.

### 4.4.7 Chorismat Mutase

#### Charakterisierung von *Fs-CM*

Von der Chorismat Mutase, welche die Umwandlung von Chorismat in Prephenat katalysiert, sind aus höheren Pflanzen bereits einige cDNA-Sequenzen bekannt. Während in den meisten Fällen nur eine Isoform pro Spezies veröffentlicht worden ist, liegen von *Petroselinum crispum* zwei (AccNr.: AF012866, AF012867) und von *A. thaliana* drei (NM\_113844, NM\_121125, AF131219) [61, 62, 202] entsprechende Datenbankeinträge vor. Bei beiden Pflanzen wird, im Gegensatz zu den cDNA-Sequenzen aus dem Shikimatstoffwechsel-Hauptweg, jeweils eine der gefundenen Isoformen ausdrücklich als cytosolische Isoform bezeichnet. Da es sich bei den beiden Sequenzen aus *Petroselinum crispum* nur um cDNA-Fragmente handelt, wurden diese, ebenso wie das einzige aus einer Baumart verfügbare 394 bp lange cDNA-Fragment aus *Prunus avium* (AccNr.: AJ004916), nicht in den Homologievergleich der offenen Leserahmen von *Fs-CM* und anderen Pflanzenarten mitaufgenommen (Tab. 4.8, S. 171).

Die cDNA-Sequenz von *Fs-CM* (AccNr.: DQ166527) ist 1302 bp lang und enthält einen 969 bp langen offenen Leserahmen, der im N-terminalen Bereich für ein 55

**Tabelle 4.8:** Paarweise Identität (DNA-Ebene, rot) bzw. Homologie (Protein-Ebene, blau) zwischen der kodierenden Sequenz von *Fs-CM* und dazu homologen Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana* (*A.t.*), *Hyacinthus orientalis* (*H.o.*), *Oryza sativa* (*O.s.*) und *Zea mays* (*Z.m.*). In Klammern sind jeweils die Akzessionsnummern angegeben, unter denen die cDNA-Sequenzen bei NCBI veröffentlicht worden sind.

Identität / Homologie [%]	<i>Fs-CM</i>	<i>A.t.1</i>	<i>A.t.2</i>	<i>A.t.3</i>	<i>O.s.</i>	<i>Z.m.</i>	<i>H.o.</i>
<i>Fs-CM</i> (DQ166527)	-	63	57	58	58	57	61
<i>A.t.1</i> (NM_113844)	66	-	57	58	57	57	63
<i>A.t.2</i> (NM_121125)	51	50	-	55	48	58	40
<i>A.t.3</i> (AF131219)	60	56	50	-	55	55	57
<i>O.s.</i> (AK068983)	61	58	50	56	-	80	61
<i>Z.m.</i> (AY103806)	59	57	49	56	78	-	60
<i>H.o.</i> (AY389761)	53	52	41	50	60	57	-

Aminosäuren langes cTP und direkt im Anschluß daran (Aminosäuren 57-323) für die funktionelle Domäne der Chorismat Mutase ('InterProScan', [346]) kodiert. Die Ähnlichkeit der *Fs-CM* zu cDNA-Sequenzen aus krautigen Pflanzen ist mit maximal 66% paarweiser Identität auf Proteinebene recht gering. Bei *Fs-CM* handelt es sich wahrscheinlich um eine chloroplastidär lokalisierte CM-Isoform, da einerseits die höchste Homologie zu der chloroplastidären Isoform NM\_113844 von *A. thaliana* besteht und andererseits für *Fs-CM* mittels 'TargetP' [65, 224] ein entsprechendes cTP prognostiziert werden konnte.

### Ozonbedingte Genexpression von *Fs-CM*

Bereits 1988 untersuchten Kuroki et al. [161] den Einfluß einer Verwundung von Kartoffelknollen auf die Aktivität des Enzyms CM. Die hierdurch induzierte erhöhte Aktivität ließ sich durch Verwendung von Transkriptions- und Translationshemmstoffen unterdrücken, was als Zeichen für eine 'de-novo' Synthese des Enzyms unter Streß gedeutet wurde. Auch in Hafer (*Avena sativa*) konnte eine etwa 2-fache Induktion der CM durch Verwundung und Elicitor-Behandlung induziert werden, wobei allerdings nur eines der beiden Isoenzyme reguliert zu sein schien [190]. In *A. thaliana* beobachteten Mobley et al. [202] eine differentielle Regulation der drei bekannten CM-Isoformen unter dem Einfluß von Verwundung und einer Infektion mit *Pseudomonas syringae*. Während das Genexpressionsniveau der cytosolischen CM-Isoform nach der Verwundung unverändert blieb, wurden die beiden chloroplastidären Isoformen unterschiedlich stark durch diese Behandlung induziert. Die Infektion mit *Pseudomonas syringae* führte in einer *Arabidopsis*-Mutante mit kompatibler Pathogenreaktion nur zu einer leichten Induktion eines chloroplastidären Isoenzym (AccNr.: NM\_113844), während die Genexpression desselben Isoenzym im Wildtyp 12 Stunden nach der Be-

handlung stark erhöht war. Die zweite chloroplastidäre Isoform (AccNr.: NM\_121125) blieb im Wildtyp relativ konstant und nahm, wie das cytosolische CM-Isoenzym, nur in der Mutante leicht zu [202].

Mit Ausnahme des Versuchs D war die Genexpression der putativen CM-Isoform *Fs-CM* unter dem Einfluß von Ozon bei allen durchgeführten Expositionsexperimenten signifikant unter dem Einfluß von Ozon erhöht. In Versuch A war *Fs-CM* allerdings während der frühen Erntezeitpunkte im Mittel 1,6-fach reprimiert und erst danach etwa 2,3-fach induziert.

In den Versuchen B und C (2.4, S. 31) kam es jeweils nach 2 Tagen etwa zu einer Verdopplung der *Fs-CM* Transkriptmenge in den ozonbehandelten Pflanzen. Während dieses Expressionsniveau in Versuch B noch leicht auf 2,5-fache Induktion zunahm und nach 15 Tagen bis zum Versuchsende langsam wieder auf das Niveau der Kontrollpflanzen zurückging, nahm die Expression von *Fs-CM* in Versuch C zunächst wieder ab und erhöhte sich erst wieder nach der Erhöhung der Ozonkonzentration von 150 auf 190 n/l. Ab diesem Zeitpunkt war die Expression der *Fs-CM* bis zum Versuchsende stets signifikant bis zu 5-fach durch Ozon induziert.

Im Verlauf von Versuch C wurde neben der Induktion von *Fs-CM* auch eine leichte, nicht signifikante Akkumulation löslicher und zellwandgebundener Phenole unter dem Einfluß von Ozon beobachtet (3.7.4, S. 119). Angesichts der Tatsache, daß die CM den ersten enzymatischen Schritt bei der Umwandlung von Chorismat zu Phenylalanin katalysiert und diese aromatische Aminosäure die wichtigste Vorläufersubstanz für die Bildung phenolischer Inhaltsstoffe der Pflanze darstellt, erscheinen diese beiden Befunde konsistent.

## 4.5 Regulation der Ethylenbiosynthese

Mittlerweile konnte, wie zuvor bei krautigen Pflanzen [173], auch für die Buche gezeigt werden, daß das Vorhandensein von Ethylen eine Voraussetzung für das Auftreten des ozoninduzierten Zelltods ist und maßgeblichen Einfluß auf den Grad der ozonbedingten Läsionsausprägung hat [142, 228]. Während bei krautigen Pflanzen die Bildung von Ethylen oft schon innerhalb weniger Stunden nach einer Ozonexposition beobachtet wurde [167, 203, 218] und als eine der frühesten Streß-Antworten auf Ozon gilt [203], kommt es in Bäumen oft erst deutlich später zu einer länger andauernden ozonbedingten Stimulation der Ethylenbiosynthese [168, 228, 297, 319], die durch eine Akkumulation von freiem und/oder konjugiertem ACC begleitet wird.

Auch in der hier vorliegenden Arbeit wurde bei Versuch C in 4-jährigen Buchen unter dem Einfluß von Ozon eine Stimulation der Ethylenbiosynthese und eine Akkumulation von freiem und konjugiertem ACC beobachtet. Die Menge an gebildetem Ethylen war von Baum zu Baum sehr unterschiedlich, korrelierte aber gut mit dem Ausmaß der Ozonsymptome, die bei dem jeweiligen Baum beobachtet werden konnten. Bei keinem untersuchten Baum kam es zur Bildung von Ozonsymptomen, wenn nicht zuvor eine erhöhte Synthese von Ethylen festgestellt worden war. Derar-



tige Unterschiede in der ozonbedingten Ethylenbiosynthese und Symptomausprägung zwischen einzelnen Individuen einer Pflanzenart wurden auch bei krautigen Pflanzen beschrieben [196, 307].

Im Mittel über alle untersuchten Bäume fiel das Maximum der Ethylenbildung mit dem Maximum der Akkumulation von freiem und konjugiertem ACC und der höchsten Induktion der ACC Synthase Gene *Fs-ACS1* und *Fs-ACS2* zusammen. Dabei erhöhte sich die Konzentration des freien ACCs mit dem Auftreten der ersten ozonbedingten Läsionen deutlich von 0,5 auf 22 nmol/gFG. Die mehr als 17-fache Zunahme an konjugiertem ACC begann bereits etwa 10 Tage früher auf einem Niveau von 10 nmol/g FG und erreichte ihr Maximum am 62. Versuchstag mit 176 nmol/g FG. Der deutliche Rückgang von ACC in freier und konjugierter Form ab dem 69. Versuchstag entsprach der ab diesem Zeitpunkt stark rückläufigen Expression der Gene *Fs-ACS1* und *Fs-ACS2*.

Die ozonbedingte Induktion von Genen, die an der Ethylenbiosynthese beteiligt sind, ist bereits in mehreren Pflanzenarten untersucht worden [203, 218, 281, 313, 318]. Dabei wurde festgestellt, daß die beteiligten Enzyme in Multigenfamilien organisiert sind. So existieren in der Tomate mindestens 9 Isoformen der ACC Synthase (ACS) und 4 Isoformen der ACC Oxidase (ACO) [345]. Viele dieser Isoformen wurden bereits unter dem Einfluß von Ozon untersucht und es zeichneten sich sowohl für die ACS als auch die ACO differentielle Expressionsmuster ab [218, 313]. Es wurde mehrfach beobachtet, daß Isoformen der ACO vor ACS-Isoformen induziert wurden [203, 218, 313], obwohl diese beiden Enzyme in der umgekehrten Reihenfolge an der Ethylenbiosynthese beteiligt sind.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde neben der Ethylenemission und der Akkumulation von ACC auch die ozonbedingte Genexpression von je zwei putativen Isoformen der ACS und der ACO bestimmt (3.6.1, S. 106). Da bei den ACS-Isoformen allerdings zu wenig Sequenzinformationen für eine isoform-spezifische qRT-PCR-Primerwahl zur Verfügung stand und im Falle der ACO-Isoformen sehr hohe Homologie in den bekannten Sequenzbereichen vorlag (3.6.1, S. 107), konnte die Möglichkeit einer teilweise isoformunspezifischen Amplifikation in der qRT-PCR nicht vollständig ausgeschlossen werden. Während sich die Expressionsmuster der untersuchten ACS-Isoformen im Verlauf von Versuch C deutlich unterschieden, was für eine erfolgreiche Trennung der Isoformen spricht, verlief die Expression der Gene *Fs-ACO1* und *Fs-ACO2* auf unterschiedlichem Niveau annähernd parallel. Neben der Möglichkeit, daß diese beiden Isoformen einer ähnlichen Regulation unterliegen, ist also nicht auszuschließen, daß sich in den Genexpressionsdaten der Isoform *Fs-ACO1* die Ergebnisse der stärker exprimierten Isoform *Fs-ACO2* widerspiegeln.

*Fs-ACS1* war bereits 2 Tage nach dem Beginn von Versuch C mehr als 30-fach unter dem Einfluß von Ozon induziert. Im weiteren Versuchsverlauf traten dann Schwankungen der ozonbedingten Genexpression zwischen 5- und 40-fachem Niveau auf. Für *Fs-ACS2* wurde sowohl in Versuch B als auch in Versuch C die maximale ozonbedingte Genexpression während der Ausbildung ozonbedingter Blattsymptome beobachtet. Die hierbei ermittelte, teils über 1000-fache Induktion der *Fs-ACS2* scheint im

Hinblick auf Ergebnisse vergleichbarer Größenordnung bei der ozonbedingten Induktion bestimmter Isoformen der Ethylenbiosynthese-Gene in Tomate (bis zu 4000-fach) [218] plausibel. Die Genexpression der Isoformen *Fs-ACO1* und *Fs-ACO2* wurde vor allem zu Beginn der Expositionsversuche B und C (2.4, S. 31) unter dem Einfluß von Ozon stark induziert und ging dann im weiteren Versuchsverlauf wieder fast bis auf das Ausgangsniveau zurück. Wie bei der Bonitur von Blattschäden und der Messung der Ethylenemission variierte in Versuch C auch die Expression der Gene *Fs-ACS1*, *Fs-ACS2*, *Fs-ACO1* und *Fs-ACO2* zwischen den einzelnen untersuchten Bäumen.

Die beobachtete differentielle Genexpression der ACS- und ACO-Isoformen, die Akkumulation von ACC und die Emission von Ethylen unter dem Einfluß von Ozon sind klare Anzeichen dafür, daß die hier beobachtete Entwicklung von Blattläsionen in der Buche auf das durch Ethylen gesteuerte Fortschreiten des ozonbedingten Zelltods zurückzuführen ist.

## 4.6 Signalstoffe und Sekundärmetabolite

### 4.6.1 Salicylsäure

Bei der Induktion der 'systemisch erworbenen Resistenz' (SAR) und der 'hypersensitiven Reaktion' (HR), zweier Abwehrreaktionen von Pflanzen gegenüber Pathogenbefall, spielt die Salicylsäure eine Schlüsselrolle [258, 292]. So kommt es im Zuge von Pathogeninfektionen neben der Induktion verschiedener PR-Gene auch häufig zur Akkumulation von freier und konjugierter Salicylsäure [265]. Dabei ist die Stimulation der PR-Gene nicht lokal begrenzt, und es wird vermutet, daß die Salicylsäure als Signalmolekül zur Induktion der Abwehr in der gesamten Pflanze dient [58]. Es wurde zudem postuliert, daß eine starke Anreicherung von Salicylsäure in Pflanzen zu 'programmiertem Zelltod' führen kann [142, 258].

Bis vor wenigen Jahren ging man davon aus, daß sich die Salicylsäure in höheren Pflanzen ausschließlich von Phenylalanin ableitet und über die Intermediate Zimtsäure und Benzoessäure gebildet wird. Mittlerweile wurde allerdings auch in Pflanzen ein alternativer Weg zur Bildung von Salicylsäure gefunden, den man bislang nur aus Prokaryonten kannte. Dabei wird durch die Isochorismat Synthase und die Isochorismat Pyruvat Lyase die Umwandlung von Chorismat, dem Endprodukt des Shikimatstoffwechsels, über die Zwischenstufe Isochorismat hin zur Salicylsäure katalysiert [197, 216, 289]. Wildermuth et al. [336] vermuten, daß es sich hierbei sogar um den Hauptweg der Salicylsäurebildung in Pflanzen handelt, da die Hemmung der Isochorismat-Synthase eine Anreicherung von Salicylsäure verhinderte.

Ozon kann, wie eine Pathogeninfektion, die Akkumulation von Salicylsäure, die Induktion von PR-Genen und anderen mit der pflanzlichen Abwehr assoziierten Genen wie Glutathion-S-Transferase oder *PAL* und eine anschließende SAR-Reaktion hervorrufen [115, 292, 340]. Die Anreicherung von Salicylsäure verstärkt dabei die antioxidativen Antworten der Zelle und ist entscheidend für die ozonabhängige Bil-

dung von Ethylen [258, 260]. Auch bei der Buche wurde bereits die Akkumulation von konjugierter Salicylsäure unter dem Einfluß von Ozon beobachtet [229].

Die Blattproben aus Versuch C wiesen nur geringe Mengen an freier Salicylsäure auf, ohne daß eine ozonbedingte Akkumulation erkennbar war. Hinsichtlich der Salicylsäure-Konjugate wurde dagegen in den ozonbehandelten Proben eine im Versuchsverlauf kontinuierliche Zunahme beobachtet. Die Anreicherung der Salicylsäurekonjugate war auch hier von der transkriptionellen Induktion des PR-Gens *F<sub>s</sub>-PRI* begleitet.

### 4.6.2 Gentisinsäure

Gentisinsäure entsteht durch Hydroxylierung aus Salicylsäure und kann ebenfalls antioxidativ wirken [3]. In Tomatenpflanzen wurde gezeigt, daß sowohl Pathogeninfektion als auch die Applikation von Salicylsäure zu einer Anreicherung dieser Substanz führen können [13]. Die Akkumulation der größtenteils konjugierten Gentisinsäure erreichte dabei nach sieben Tagen ihren Höhepunkt und ging mit der Aktivierung von PR-Proteinen einher [13]. Bei der Untersuchung adulter Buchen unter doppelt ambientem Ozonregime fanden Nunn et al. [229] ebenfalls eine ozonbedingte Akkumulation der konjugierten Gentisinsäure. Die freie Gentisinsäure war dagegen, wie die freie Salicylsäure, nur in sehr geringen Anteilen vertreten und wurde nicht signifikant unter dem Einfluß von Ozon reguliert.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde bei Versuch C ein konstanter ozonbedingter Anstieg der konjugierten Gentisinsäure beobachtet, der mit einer Vervierfachung der Konzentration noch deutlicher ausfiel als bei der konjugierten Salicylsäure.

Beide Synthesewege der Salicylsäure und Gentisinsäure benötigen als Substrate Chorismat, oder die daraus abgeleitete aromatische Aminosäure Phenylalanin, welche, angesichts der ozonbedingten Stimulation des Shikimatstoffwechsels auf Gen- und Proteinebene (3.5, S. 87 und 3.8, S. 130) vermutlich in erhöhter Menge zur Verfügung standen. Die hier ermittelten Ergebnisse decken sich mit früheren Befunden zur Bildung dieser beiden phenolischen Säuren in verschiedenen Pflanzenarten unter dem Einfluß von Ozon [115, 229, 258, 260, 292, 293, 340].

### 4.6.3 Phenolische Inhaltsstoffe

Zusätzlich zur Analyse der Salicylsäure und Gentisinsäure wurde mittels HPLC ein breites Spektrum weiterer freier und zellwandgebundener Phenole unter dem Einfluß von Ozon gemessen. Unter der Bezeichnung 'Phenole' wird eine große Gruppe pflanzlicher Inhaltsstoffe zusammengefaßt, deren aromatische Strukturen sich hauptsächlich von Phenylalanin, einem Folgeprodukt des Shikimatstoffwechsels ableiten [116]. Zu den vielfältigen Aufgaben dieser Stoffgruppe gehört vor allem der Schutz vor Fraßfeinden, Pathogenen und abiotischen Einflüssen wie ultravioletter Strahlung sowie die Anlockung von Bestäubern durch Farb- oder Duftstoffe. Phenolische Substanzen können in freier Form für Pflanzen toxisch sein und werden häufig in derivatisierter, meist

glycosylierter Form, in der pflanzlichen Vakuole gespeichert [107]. In einigen Fällen können diese dann in den apoplastischen Raum sezerniert und in die Zellwandmatrix integriert werden. Die Bildung von Polyphenolen, die als Radikalfänger fungieren können [22, 23], gilt als induzierbare Reaktion von Pflanzen auf biotischen und abiotischen Streß [170].

Die Behandlung von Pflanzen mit dem Schadgas Ozon führt oft zu einer transienten Induktion der PAL, des Schlüsselenzyms des Phenylpropanwegs, und in der Folge auch zu einer Anreicherung von phenolischen Substanzen [276, 341]. So wurden in Petersilie ozoninduzierte Furanocumarine und *O*-Malonyl Glycoside [63] und in *Phaseolus vulgaris* eine Anreicherung von Kaffeesäure gefunden [129]. Biolley et al. [17] fanden in der Sojabohne eine ozonbedingte Repression eines nicht konjugierten Hydroxymzimtsäurederivats sowie die Induktion eines Quercetin-3-*O*-Glycosids und eines Kaempferol-3-*O*-Glycosids.

Auch in Bäumen wurde die Regulation der phenolischen Inhaltsstoffe unter dem Einfluß von Ozon bereits mehrfach beobachtet [168, 310]. In Fichte wurde unter doppelt ambientem Ozonregime ein linearer Anstieg des Catechingehalts [118] und bei der Kiefer im Zusammenhang mit einer Induktion der Enzyme PAL, Chalkon Synthase und Stilbensynthase auch die Anreicherung von Stilbenen gefunden [117, 266, 274]. Sowohl in ozontoleranten als auch ozonempfindlichen Klonen der Birke (*Betula pendula*) wiesen Saleem et al. [269] einen bis zu 16%-igen Anstieg des Gesamtphenolgehalts unter dem Einfluß von Ozon nach. Dabei waren in den ozonbehandelten Pflanzen vor allem die Gehalte an Catechin, Chlorogensäure sowie verschiedene Cumarsäure- und Quercetinderivaten erhöht.

Im Rahmen einer 4-wöchigen Ozonbehandlung (150 nl/l, 8 h/d, 5 Tage pro Woche) untersuchte Zielke in Johannistrieben von Buchenjungpflanzen zahlreiche phenolische Inhaltsstoffe [349]. Zu den am stärksten regulierten Substanzen gehörten acht Flavonolglycoside, fünf Kaffeesäurederivate und ein Biphenyl. Von den Flavonolglycosiden ging ein Kaempferolderivat leicht zurück, während fünf weitere, ebenso wie zwei Quercetinderivate, zum Teil deutlich unter dem Einfluß der Ozonbehandlung zunahmen. Eine phenolische Substanz mit einem Kaffeesäure-Rest nahm ab, während drei weitere Kaffeesäure- und ein Dikaffeesäurederivat akkumulierten. Weiterhin wurde von Zielke et al. erstmals die Bildung von 3,3',4,4'-Tetramethoxybiphenyl unter dem Einfluß von Ozon nachgewiesen [350].

Durch HPLC-Analyse von Blattproben mehrerer Erntezeitpunkte aus Versuch C wurden auch in der vorliegenden Arbeit sowohl für lösliche als auch für zellwandgebundene phenolische Inhaltsstoffe ozonabhängige Veränderungen im Versuchsverlauf beobachtet. Dabei wurden mittels vergleichender Chromatographie und Diodenarray-Spektroskopie 15 lösliche und 7 zellwandgebundene phenolische Inhaltsstoffe differenziert und unterschiedlichen phenolischen Stoffklassen zugeordnet (Abb. 3.37, S. 121 und 3.40, S. 126). Eine eindeutige Bestimmung der gefundenen phenolischen Inhaltsstoffe mittels Massenspektrographie konnte wegen des geringen verfügbaren Probenmaterials nicht durchgeführt werden.

Unabhängig von der Ozonbehandlung wurde im Verlauf von Versuchs C eine Ab-



leichte Induktion unter dem Einfluß von Ozon im Lauf von Versuch C festgestellt. Die ozonbedingte Akkumulation solcher Derivate ist bereits aus der Fichte und der Buche bekannt [147, 349]. Das Maximum der Anreicherung des putativen 3,3',4,4'-Tetramethoxy-Biphenyls wurde nach 61 Tagen, und damit zum selben Zeitpunkt erreicht, an dem auch die höchste Akkumulation von ACC vorlag. Dabei lag die Konzentration dieser phenolischen Substanz in den ozonbehandelten Pflanzen mehr als siebenfach über dem Niveau in den Kontrollpflanzen. Zielke ermittelte mit vier- bis sechsfacher ozonbedingter Induktion ähnliche Werte [350, 349] und auch Nunn fand eine vermehrte Bildung dieser Substanz unter dem Einfluß von Ozon [226].

Biolley et al. [17] berichten auch über einen ozonbedingten Rückgang einzelner phenolischer Substanzen. In der vorliegenden Arbeit war dies für zwei Chlorogensäure- und ein Ferulasäurederivat und ein nicht näher charakterisiertes Phenol (Peak 9, Abb. 3.37, S. 121) der Fall. Die Konzentration dreier Cumarsäurederivate ging auch unter dem Einfluß von Ozon zunächst zurück, erhöhte sich dann aber wieder über das Niveau in den Kontrollpflanzen. Jungblut et al. [139] hatten bei Buchen-Zellkulturen nach einer Elicitor-Behandlung eine Anreicherung von freien und zellwandgebundenen Cumarsäurederivaten beobachtet.

Vier der sieben identifizierten zellwandgebundenen Phenole akkumulierten unter dem Einfluß von Ozon in Versuch C. Dabei handelte es sich vermutlich um *cis*- und *trans*-Cumarsäure sowie zwei Kaempferol-3-*O*-Glycoside. Die putativen Substanzen Catechin und Kaffeesäure waren dagegen eher reduziert. Die Konzentration der putativen Ferulasäure wurde unter dem Einfluß von Ozon nicht reguliert.

#### 4.6.4 Lignin

Lignin ist ein komplexes Biopolymer, das sich hauptsächlich aus *p*-Hydroxyphenyl (H), Guaiacyl- (G) und Syringyl-Monomeren (S) zusammensetzt, welche über kovalente intermolekulare C-C und C-O Bindungen miteinander verknüpft sind. Wie Abbildung 4.3, S. 177 zeigt, leiten sich diese Ligninmonomere von der aromatischen Aminosäure Phenylalanin und damit aus dem Shikimatstoffwechsel ab. Lignin ist nach der Zellulose das häufigste Biopolymer auf der Erde und dient vor allem als mechanische Barriere gegen Pathogene und zur Gewährleistung von Strukturstabilität [323]. Die Bildung von Lignin erfolgt nicht nur im Holz der Bäume, sondern zum Beispiel auch im Leitgewebe krautiger Pflanzen [176] und kann als Abwehrreaktion von Pflanzen induziert werden [168]. So wurde zum Beispiel bei der Kiefer eine dosisabhängige Induktion der Zimtalkohol-Dehydrogenase (CAD) unter dem Einfluß von Ozon beobachtet [83, 274].

#### Bedeutung von *O*-Methyltransferasen und Peroxidasen bei der Ligninbildung

An der Synthese der Ligninmonomere sind verschiedene Enzyme beteiligt, die mittlerweile alle bekannt sind (Abb. 4.3, S. 177). Eine besondere Rolle spielen dabei die *O*-Methyltransferasen (OMT), welche durch die Methylierung des aromati-

schen Rings der entsprechenden Zimtsäurederivate die Bildung der Guaiacyl- und Syringyl-Monomere ermöglichen [11]. In höheren Pflanzen existieren oft mehrere *O*-Methyltransferasen, die an der Ligninbiosynthese beteiligt sind [27]. In Angiospermen wurden auch schon OMTs identifiziert, die unterschiedliche Affinität für die beiden Substrate Kaffeesäure und 5-Hydroxy-Ferulasäure aufwiesen [27, 34]. Von drei in Tabak identifizierten OMT-Isoformen war eine auf hohem Niveau konstitutiv exprimiert, während zwei weitere bei einer HR-Reaktion stark induziert wurden [247]. Derart streßinduzierbare *OMT*-Gene, die möglicherweise in Zusammenhang mit einer ozonbedingten Veränderung der Ligninbiosynthese stehen, wurden auch in der vorliegenden Arbeit bei der Analyse der ozonregulierten cDNA-Banken SSH1 und SSH2 gefunden.

Man vermutet, daß an der oxidativen Polymerisation von Cumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol vor allem Peroxidasen und Laccasen beteiligt sind [27]. Díaz et al. [50] fanden zum Beispiel eine erhöhte Peroxidaseaktivität in verwundeten Paprikapflanzen im Zusammenhang mit einer verstärkten Lignifizierung der Pflanzen. Eine in den subtraktiven cDNA-Banken gefundene ozoninduzierte Peroxidase (*Fs-POX*) ist möglicherweise ebenfalls an der Synthese von Lignin beteiligt.

### Zusammensetzung und Struktur von Lignin unter Streß

Mittels der Methode der Thioacidolyse kann der Anteil an H, G und S-Monomeren, die nur durch eine  $\beta$ -*O*-4 Bindung verknüpft sind (Abb. 2.8, S. 58), in den Lignin-Molekülen bestimmt werden. Schon 1988 postulierten Walter et al. [324] Strukturunterschiede zwischen gewöhnlichem 'Stützignin' und Lignin, das unter dem Einfluß einer Pathogeninfektion gebildet worden war, und vermuteten eine unterschiedliche Aktivität der an der Ligninbildung beteiligten Enzyme. Sieben Jahre später wurde dann erstmals mittels Thioacidolyse die Zusammensetzung von Elicitor-induziertem Streßlignin in *Picea abies* untersucht, wobei einerseits eine stärkere Verknüpfung der Monomere und andererseits höhere Anteile an *p*-Hydroxyphenyl-Bausteinen gemessen wurden [165].

Vor kurzem konnten Cabané et al. [37] zeigen, daß auch in den Blättern der Pappel unter dem Einfluß von Ozon (60 - 120 nl/l) stärker intermolekular verknüpftes Lignin mit einem erhöhten Anteil an H-Monomeren gebildet wurde. Neben einer ozonbedingten Induktion des Gesamt-Ligningehalts nach Klason wurde auch eine Aktivitätszunahme des Enzyms Shikimat Dehydrogenase aus dem Shikimatweg gefunden.

Ähnliche Beobachtungen wurden auch in der vorliegenden Arbeit bei der Analyse von Blattproben aus Versuch B gemacht. Der Anteil an H-Monomeren in Blattproben mit mittleren und schweren Ozonsymptomen war im Vergleich mit den Proben ohne Symptome doppelt bzw. fünfmal so groß. Diese deutliche Zunahme der H-Monomere unter dem Einfluß von Streß entspricht den Befunden von Lange et al. [165] und Cabané et al. [37] und kommt daher möglicherweise als potentieller Biomarker für pflanzlichen Streß in Betracht. Die Abnahme der S-Monomere mit steigender Schädigung der Blätter durch Ozon und eine entsprechende Zunahme an G-Monomeren

entsprach den Beobachtungen bei ozonbehandelten Pappeln [37], fiel aber bei Buche sehr viel deutlicher aus. Diese Veränderungen in der Zusammensetzung des Lignins führen zu einer Erweiterung des Konzepts des SFB 607, da hier offenbar nicht nur eine streßbedingte Verschiebung zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel, sondern auch innerhalb des Sekundärstoffwechsels stattfindet.

Während der Gesamtligningehalt nach Klason in den Blattproben ohne Schäden erwartungsgemäß niedriger war als in den stark geschädigten Blättern, wurde in den Blättern der mittleren Schädigungsstufe ein relativ niedriger Lignin-Gehalt gemessen. Möglicherweise waren nicht auffällig gewordene Unterschiede in der Morphologie des geernteten Blattmaterials dafür verantwortlich.

Setzt man die Ergebnisse aus der Thioacidolyse ins Verhältnis zu den nach Klason bestimmten Ligningehalten (Tab. 6.28, S. 231), so fällt auf, daß mit zunehmender Schädigung durch Ozon der Gehalt an aufgeschlossenen Thioacidolyse-Monomeren abnimmt. Da durch die Thioacidolyse, wie oben erwähnt, ausschließlich die schwach durch nur eine  $\beta$ -O-4 Bindung verknüpften Lignineinheiten bestimmt werden können, deutet dieser Befund darauf hin, daß es auch bei der Buche unter dem Einfluß von Ozon zu einer stärkeren Kondensierung der Ligninmoleküle gekommen ist.



## 4.7 Zusammenfassung der Arbeit

In höheren Pflanzen nimmt der Shikimatstoffwechsel eine Schlüsselposition zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel ein, da sich nahezu alle aromatischen Sekundärmetabolite aus dessen Endprodukt Chorismat ableiten. Zur Prüfung einer zentralen Hypothese des SFB 607, daß es unter dem Einfluß von Streß in Pflanzen zu einer Umsteuerung zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel kommt, wurde daher in der vorliegenden Arbeit die Regulation dieses Stoffwechselwegs in der europäischen Buche unter dem Einfluß von Ozon untersucht. Durch die beständige Zunahme der troposphärischen Ozonkonzentration in den letzten Jahren hat die Schadwirkung dieses Gases auf Feldfrüchte und Waldbäume immer mehr an Bedeutung gewonnen. Die Wirkung von Ozon auf die Regulation des Shikimatstoffwechsels wurde bislang kaum untersucht und wird hier erstmals bei verholzenden Pflanzen vor allem im Hinblick auf langfristige Induktionsmuster vorgestellt.

In drei Expositionsversuchen wurden 3- bis 4-jährige Buchen über einen Zeitraum von 30 bis 85 Tagen Ozonkonzentrationen von 150-300 nl/l (8 h/d) ausgesetzt. Die Entwicklung von makroskopisch sichtbaren Blattschäden wurde dabei photographisch und durch Bonitur dokumentiert. Die ozoninduzierte Expression von Genen des Shikimatstoffwechsels wurde zudem an 60-jährigen Buchen am Versuchsstandort 'Kranzberger Forst' untersucht.

Für jedes der sieben Enzyme des Shikimatstoffwechsels wurde mittels degenerierter Primer und durch RACE-Methoden eine vollständige cDNA-Sequenz ermittelt. Mit einer Ausnahme handelt es sich hierbei um die ersten aus Bäumen isolierten Sequenzen des Shikimatstoffwechsels. Darüber hinaus wurden für weitere Genexpressionsstudien einzelne Gene aus der Ethylenbiosynthese und der Photosynthese kloniert und zwei ozonregulierte subtraktive cDNA-Banken erstellt. Die funktionelle Zuordnung der cDNA-Fragmente aus den cDNA-Banken ergab, daß im Verlauf der Ozonbehandlung der Anteil differentiell exprimierter Gene aus den Bereichen 'Krankheit und Abwehr' und 'Sekundärstoffwechsel' zunahm, während vor allem der Anteil an Genen aus dem 'Energistoffwechsel' stark zurückging. Auch bei der Analyse der ozonbedingten Regulation mittels DNA-Chips wiesen die am stärksten induzierten Klone aus diesen cDNA-Banken hohe Homologie zu PR-Proteinen, Lipoxygenase, O-Methyltransferase, ACC Oxidasen, Catalase, Peroxidasen und weiteren Genen aus dem Sekundärstoffwechsel und pflanzlichen Entgiftungsreaktionen auf. Die reprimierten Gene stammten hauptsächlich aus dem Primärstoffwechsel und der Photosynthese.

Alle untersuchten putativen Gene des Shikimatstoffwechsels wurden in unterschiedlichem Ausmaß durch die Ozonbehandlungen induziert. Vor allem die Expression der putativen Gene 3-Dehydroquinat Dehydratase / Shikimat Dehydrogenase (*Fs-DHQD/SD*), 5-Enolpyruvylshikimat 3-Phosphat Synthase (*Fs-EPSPS*), Chorismat Mutase (*Fs-CM*) und zweier Isoformen der 3-Deoxy-D-arabino-Heptulosonat 7-Phosphat Synthase (*Fs-DAHPS*) war dabei in den ozonbehandelten Pflanzen deutlich erhöht. Die Expression der putativen Gene 3-Dehydroquinat Synthase (*Fs-DHQS*), Shikimat Kinase (*Fs-SK*), Chorismat Synthase (*Fs-CS*) und einer weiteren *DAHPS*-

Isoform wurde dagegen nur schwach durch Ozon induziert. Adulte Buchen unter doppelt ambientem Ozonregime im 'Kranzberger Forst' unterschieden sich bezüglich der Transkription der putativen Gene des Shikimatstoffwechsels zwar in der Tendenz aber nicht signifikant von der Kontrollgruppe unter ambienter Ozonkonzentration. Erwartungsgemäß wurde unter dem Einfluß von Ozon auch eine starke Stimulation der Expression des PR-Gens *PR1* und mehrerer Gene aus der Ethylenbiosynthese beobachtet, während beide Untereinheiten der Ribulose-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (*RUBISCO*) zum Teil deutlich reprimiert wurden.

Neben der Bonitur ozonbedingter Blattläsionen wurde in regelmäßigen Abständen die Emission von Ethylen und die Akkumulation der Ethylen-Vorstufe 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) untersucht. Hierbei wurden große Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchspflanzen beobachtet. Während einzelne Bäume nahezu alle Blätter infolge der Ozonexposition verloren, wurden andere nur schwach geschädigt oder blieben über die gesamte Versuchsphase ohne erkennbare Blattläsionen. Die Emission von Ethylen ging dabei stets der Ausbildung von Läsionen voraus.

Neben einem breiten Spektrum löslicher und zellwandgebundener phenolischer Inhaltsstoffe wurde die Akkumulation der phenolischen Substanzen Salicyl- und Gentisinsäure gemessen und die Zusammensetzung von Lignin analysiert. Die Konzentration der konjugierten Salicyl- und Gentisinsäure nahm in den ozonbehandelten Pflanzen deutlich zu. Auch für die Summe der löslichen und zellwandgebundenen Phenole war unter dem Einfluß von Ozon eine leichte, aber nicht signifikante Erhöhung erkennbar. Lignin nahm in Blättern mit Ozonläsionen gegenüber ungeschädigten Blättern leicht zu und war strukturell in der Tendenz stärker kondensiert.

Durch Westernblot-Analysen wurden für ausgewählte Enzyme aus dem Shikimatstoffwechsel die Ergebnisse aus den Genexpressionsstudien überprüft. Dazu wurden zunächst Konstrukte für die heterologe Expression einer *DAHPS*-Isoform und der *Fs-DHQP/SD* angefertigt. Die aufgereinigten Proteine wurden dann als Antigene für die Herstellung monoklonaler Antikörper verwendet. Analog zu den Genexpressionsdaten wurde mittels dieser Antikörper eine deutliche Akkumulation beider Proteine unter dem Einfluß von Ozon beobachtet.

Zusammenfassend sprechen die deutliche ozonbedingte Induktion der Genexpression und die Akkumulation von Enzymen des Shikimatstoffwechsels, die differentielle Regulation der subtraktiven cDNA-Banken, die Stimulation der Ethylenbiosynthese auf der Gen- und Metabolitebene und die Anreicherung von Salicyl- und Gentisinsäure sowie weiterer löslicher und zellwandgebundener phenolischer Inhaltsstoffe für die Annahme der Hypothese des SFB 607, daß es unter dem Einfluß von Streß zu einer Umsteuerung zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel kommt.

# Literaturverzeichnis

- [1] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402
- [2] Anegg S (1999) Untersuchungen zur Wirkung von CO<sub>2</sub> und Ozon auf die Polyamin- und Ethylenbiosynthese sowie Wachstum und Symptomentwicklung bei Buchen und Fichten. Dissertation, LMU München
- [3] Ashidate K, Kawamura M, Mimura D, Tohda H, Miyazaki S, Teramoto T, Yamamoto Y, Hirata Y (2005) Gentisic acid, an aspirin metabolite, inhibits oxidation of low-density lipoprotein and the formation of cholesterol ester hydroperoxides in human plasma. *Eur J Pharmacol* 513, 173-179
- [4] Ashmore MR (2005) Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant Cell Environ* 28, 949-964
- [5] Avni A, Bailey BA, Mattoo AK, Anderson JD (1994) Induction of ethylene biosynthesis in *Nicotiana tabacum* by a *Trichoderma viride* xylanase is correlated to the accumulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase and ACC oxidase transcripts. *Plant Physiol* 106, 1049-1055
- [6] Baerson SR, Rodriguez DJ, Tran M, Feng Y, Biest NA, Dill GM (2002) Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Plant Physiol* 129, 1265-1275
- [7] Bahl A, Loitsch S, Kahl G (1995) Transcriptional activation of plant defence genes by short-term air pollution stress. *Environ Pollut* 89, 221-227
- [8] Bahnweg G, Heller W, Stich S, Knappe C, Betz G, Heerdt C, Kehr RD, Ernst D, Langebartels C, Nunn AJ, Rothenburger J, Schubert R, Wallis P, Müller-Starck G, Werner H, Matyssek R, Sandermann H (2005) Beech leaf colonization by the endophyte *Apiognomonina errabunda* dramatically depends on light exposure and climatic conditions. *Plant Biol* 7, 695-669
- [9] Barry CS, Blume B, Bouzayen M, Cooper W, Hamilton AJ, Grierson D (1996) Differential expression of the *1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase* gene family of tomato. *Plant J* 9, 525-535
- [10] Bartlett PA, Satake K (1988) Does dehydroquinase synthase synthesize dehydroquinone? *J Am Chem Soc* 110, 1628-1630
- [11] Baucher M, Monties B, Van Montagu M, Boerjan W (1998) Biosynthesis and Genetic Engineering of Lignin. *Crit Rev Plant Sci* 17, 125-197
- [12] Baumgarten M, Werner H, Häberle KH, Emberson LD, Fabian P, Matyssek R (2000) Seasonal ozone response of mature beech trees (*Fagus sylvatica*) at high altitude in the Bavarian forest (Germany) in comparison with young beech grown in the field and in phytotrons. *Environ Pollut* 109, 431-442
- [13] Bellés JM, Garro R, Fayos J, Navarro P, Primo J, Conejero V (1999) Gentisic acid as a pathogen-inducible signal, additional to salicylic acid for activation of plant defenses in tomato. *American Phytopathol Soc* 12, 227-235
- [14] Bentley R (1990) The shikimate pathway - a metabolic tree with many branches. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 25, 307-384
- [15] Benton J, Fuhrer J, Gimeno BS, Skärby L, Palmer-Brown D, Roadknight C, Sanders-Mills G (1996) The critical level of ozone for visible injury on crops and natural vegetation (ICP-Crops). In: Kärenlampi L, Skärby L (Hrg.) *Critical Levels for Ozone in Europe: Testing and Finalizing the Concepts*, Univ. of Kuopio, Dept. of Ecol. and Environ. Sci. 44-57

- [16] Bergmann E, Bender J, Weigel HJ (1999) Ozone threshold doses and exposure-response relationships for the development of ozone injury symptoms in wild plant species. *New Phytol* 144, 423-435
- [17] Biolley JP, Lauga B, Cagnon C, Duran R, Salvado JC, Goulas P (1998) Phenolic pattern of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as an indicator of chronic ozone stress. *Water Air Soil Pollut* 106, 355-368
- [18] Bischoff M, Rösler J, Raesecke HR, Görlach J, Amrhein N, Schmid J (1996) Cloning of a cDNA encoding a 3-dehydroquinase synthase from a higher plant, and analysis of the organ-specific and elicitor-induced expression of the corresponding gene. *Plant Mol Biol* 31, 69-76
- [19] Bischoff M, Schaller A, Bieri F, Kessler F, Amrhein N, Schmid J (2001). Molecular characterization of tomato 3-dehydroquinase dehydratase-shikimate:NADPH oxidoreductase. *Plant Physiol* 125, 1891-1900
- [20] Bonner CA, Jensen RA (1994) Cloning of a cDNA encoding the bifunctional dehydroquinase shikimate dehydrogenase of aromatic amino acid biosynthesis in *Nicotiana tabacum*. *Biochem J* 302, 11-14
- [21] Boocock MR, Coggins JR (1983) Kinetics of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase inhibition by glyphosate. *FEBS Lett* 154, 127-133
- [22] Bors W, Michel C, Schikora S (1995) Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials: A pulse radiolysis study. *Free Rad Biol Med* 19, 45-52
- [23] Bors W, Heller W, Michel C (1998) The chemistry of flavonoids. In: Rice-Evans CA, Packer L (Hrg.) *Flavonoids in health and disease*, Marcel Dekker, New York, 111-136
- [24] Bortier K, De Temmerman L, Ceulemans R (2000) Effects of ozone exposure in open-top chambers on poplar (*Populus nigra*) and beech (*Fagus sylvatica*): a comparison. *Environ Pollut* 109, 509-516
- [25] Bortier K, Vandermeiren K, De Temmerman L, Ceulemans R (2001) Growth, photosynthesis and ozone uptake of young beech (*Fagus sylvatica* L.) in response to different ozone exposures. *Trees* 15, 75-82
- [26] Boudet AM, Lécussan R (1974) Studies on the association of 5-dehydroquinase hydrolase and shikimate: NADP+-oxidoreductase in higher plants. *Planta* 119, 71-79
- [27] Boudet AM, Lapiere C, Grima-Pettenati J (1995) Biochemistry and molecular biology of lignification. *New Phytol* 129, 203-236
- [28] Bowen JR, Kosuge T (1979) In vivo activity, purification and characterization of shikimate kinase from *Sorghum*. *Plant Physiol* 64, 382-386
- [29] Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254
- [30] Braun HJ (1982) *Lehrbuch der Forstbotanik*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- [31] Brødersen P, Malinovsky FG, Hématy K, Newman M-A, Mundy J (2005) The role of salicylic acid in the induction of cell death in *Arabidopsis* acd11. *Plant Physiol* 138, 1037-1045
- [32] Brown KA, Carpenter EP, Watson KA, Coggins JR, Hawkins AR, Koch MHJ, Svergun DI (2003) Twists and turns: a tale of two shikimate-pathway enzymes. *Biochem Soc Trans* 31, 543-547
- [33] Brunner AM, Busov VB, Strauss SH (2004) Poplar genome sequence: functional genomics in an ecologically dominant plant species. *Trends Plant Sci* 9, 49-56
- [34] Bugos RC, Chiang VLC, Campbell WH (1991) cDNA cloning, sequence analysis and seasonal expression of lignin-bispecific caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase of aspen. *Plant Mol Biol* 17, 1203-1215
- [35] Bussotti F, Schaub M, Cozzi A, Krauchi N, Ferretti M, Novak K, Skelly JM (2003) Assessment of ozone visible symptoms in the field: perspectives of quality control. *Environ Pollut* 125, 81-89

- [36] Bussotti F, Agati G, Desotgiu R, Matteini P, Tani C (2005) Ozone foliar symptoms in woody plant species assessed with ultrastructural and fluorescence analysis. *New Phytol* 166, 941-955
- [37] Cabané M, Pireaux J-C, Léger E, Weber E, Dizengremel P, Pollet B, Lapiere C (2004) Condensed lignins are synthesized in poplar leaves exposed to ozone. *Plant Physiol* 134, 586-594
- [38] Calvo AP, Nicolás C, Lorenzo O, Nicolás G, Rodríguez D (2004) Evidence for positive regulation by gibberellins and ethylene of ACC oxidase expression and activity during transition from dormancy to germination in *Fagus sylvatica* L. seeds. *J Plant Growth Regul* 23, 44-53
- [39] Chappelka AH, Samuelson LJ (1998) Ambient ozone effects on forest trees of the eastern United States: a review. *New Phytol* 139, 91-108
- [40] Clark AJ, Landolt W, Bucher JB, Strasser RJ (2000) Beech (*F. sylvatica*) response to ozone exposure assessed with a chlorophyll *a* fluorescence performance index. *Environ Pollut* 109, 501-507
- [41] Coggins JR, Abell C, Evans LB, Frederickson M, Robinson DA, Roszak AW, Laphorn AP (2003) Experiences with the shikimate-pathway enzymes as targets for rational drug design. *Biochem Soc Trans* 31, 548-552
- [42] Comai L, Larson-Kelly N, Kiser J, Manu CJD, Pokalsky AR, Shewmaker CK, McBride K, Jones A, Stalker DM (1988) Chloroplast import of a ribulose biphosphate carboxylase small subunit-5-enolpyruvyl-3-phosphoshikimate synthase chimeric protein requires part of mature small subunit in addition to the transit peptide. *J Biol Chem* 263, 15104-109
- [43] Conklin PL, Last RL (1995) Differential accumulation of antioxidant mRNAs in *Arabidopsis thaliana* exposed to ozone. *Plant Physiol* 109, 203-212
- [44] Craker L (1971) Ethylene production from ozone-injured plants. *Environ Pollut* 1, 299-304
- [45] Diatchenko L, Lau Y-FC, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD (1996) Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 6025-6030
- [46] d'Amato TA, Ganson RJ, Gaines CG, Jensen RA (1984) Subcellular localization of chorismate-mutase isoenzymes in protoplasts from mesophyll and suspension-cultured cells of *Nicotiana glauca*. *Planta* 162, 104-108
- [47] Deka RK, Anton IA, Dunbar B, Coggins JR (1994) The characterisation of the shikimate pathway enzyme dehydroquinase from *Pisum sativum*. *FEBS Lett* 349, 397-402
- [48] Della-Cioppa G, Bauer SC, Klein BK, Shah DM, Fraley RT, Kishore GM (1986) Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 6873-6877
- [49] Dence CW (1992) The determination of lignin. In: Lin SY, Dence CW (Eds) *Methods in Lignin Chemistry*, Springer, Heidelberg, 33-61
- [50] Díaz J, Fuencisla M (1997) Shikimate dehydrogenase from pepper *Capsicum annuum* seedlings. *Physiol Plant* 100, 147-152
- [51] Díaz J, Angeles B, Federico P, Fuencisla M (2001) Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. *Plant Sci* 161, 179-188
- [52] Dixon RA, Dey PM, Lamb CJ (1983) Phytoalexins: enzymology and molecular biology. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 55, 1-136
- [53] Dixon RA, Palva NL (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7, 1085-1097
- [54] Dizengremel P (2001) Effects of ozone on the carbon metabolism of forest trees. *Plant Physiol Biochem* 39, 729-742
- [55] Dobbertin M, Brang P (2001) Crown defoliation improves tree mortality models. *For Ecol Manage* 141, 271-284

- [56] Dohmen GP, Koppers A, Langebartels C (1990) Biochemical response of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) towards 14-month exposure to ozone and acid mist: Effects on amino acid, glutathione and polyamine titers. *Environ Pollut* 64, 375-383
- [57] Doong RL, Gander JE, Ganson RJ, Jensen RA (1992) The cytosolic isoenzyme of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase in *Spinacia oleracea* and other higher plants: Extreme substrate ambiguity and other properties. *Physiol Plant* 84, 351-360
- [58] Durner J, Shah J, Klessig DF (1997) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci* 2, 266-274
- [59] Dyer W, Henstrand J, Handa A, Herrmann K (1989) Wounding induces the first enzyme of the shikimate pathway in *Solanaceae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 7370-7373
- [60] Ebel J (1986) Phytoalexin Synthesis: The Biochemical Analysis of the Induction Process. *Annu Rev Phytopathol* 24, 235-264
- [61] Eberhard J, Raesecke H-R, Schmid J, Amrhein N (1993) Cloning and expression in yeast of a higher plant chorismate mutase: Molecular cloning, sequencing of the cDNA and characterization of the *Arabidopsis thaliana* enzyme expressed in yeast. *FEBS Lett* 334, 233-236
- [62] Eberhard J, Ehrler TT, Epple P, Felix G, Raesecke H-R, Amrhein N, Schmid J (1996) Cytosolic and plastidic chorismate mutase isozymes from *Arabidopsis thaliana*: molecular characterization and enzymatic properties. *Plant J* 10, 815-822
- [63] Eckey-Kaltenbach H, Ernst D, Heller W, Sandermann H (1994) Biochemical plant responses to ozone: IV. Cross-induction of defensive pathways in parsley (*Petroselinum crispum* L.) plants. *Plant Physiol* 104, 67-74
- [64] Ellenberg H (1996) Vegetation Mitteleuropas mit den Alpen in ökologischer, dynamischer und historischer Sicht. 5. Auflage, UTB, Stuttgart
- [65] Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* 300, 1005-1016
- [66] Emberson LD, Ashmore MR, Cambridge HM, Simpson D, Tuovinen J-P (2000) Modelling stomatal ozone flux across Europe. *Environ Pollut* 109, 403-413
- [67] Entus R, Poling M, Herrmann KM (2002) Redox regulation of *Arabidopsis* 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase. *Plant Physiol* 129, 1866-1871
- [68] EU *Arabidopsis* Genome Project, Bevan M, Bancroft I, Bent E, Love K, Goodman H, Dean C, Bergkamp R, Dirkse W, Van Staveren M et al. (1998) Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 391, 485-488
- [69] Eykmann JF (1891) Über die Shikimisäure. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 24, 1278-1303
- [70] Feierabend J, Brassel D (1976) Subcellular localization of shikimate dehydrogenase in higher plants. *Z Pflanzenphysiol* 82, 334-346
- [71] Forlani G, Parisi B, Nielsen E (1994) 5-enol-pyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase from *Zea mays* cultured cells. *Plant Physiol* 105, 1107-1114
- [72] Forlani G (1997) Properties of the 5-enol-pyruvyl-shikimate 3-phosphate synthase isoforms isolated from maize cultured cells. *J Plant Physiol* 150, 369-375
- [73] Forlani G (2002) Differential expression of 5-enol-pyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase isoforms in elicitor-treated, cultured maize cells. *Funct Plant Biol* 29, 1483-1490
- [74] Fournand D, Mila I, Lapiere C (2002) Capillary zone electrophoresis of syringyl and guaiacyl monomers resulting from lignin thioacidolysis. *Phytochem Anal* 13, 338-342
- [75] Fowler D, Cape JN, Coyle M, Flechard C, Kuylenstierna J, Hicks K, Derwent D, Johnson C, Stevenson D (1999) The Global Exposure of Forests to Air Pollutants. *Water Air Soil Pollut* 116, 5-32
- [76] Frank H (1984) Waldschäden durch Photooxidantien? *Nachr Chem Tech Lab* 32, 298-305

- [77] Fredericksen TS, Skelly JM, Steiner KC, Kolb TE, Kouterick KB (1996) Size-mediated foliar response to ozone in black cherry trees. *Environ Pollut* 91, 53-63
- [78] Friedler E, Soll J, Schultz G (1982) The formation of homogentisate in the biosynthesis of tocopherol and plastoquinone in spinach chloroplasts. *Planta* 155, 511-515
- [79] Fuhrer J (1994) The critical level for ozone to protect agricultural crops - An assessment of data from European open-top chamber experiments. In: Fuhrer J, Ackermann B (Hrg.) Critical levels of ozone - a UN-ECE Workshop report, Vol 16, Federal Reserach Station for Agricultural Chemistry and Environmental Hygiene, Liebefeld-Bern, Schweiz, 42-57
- [80] Fuhrer J, Skärby L, Ashmore MR (1997) Critical levels for ozone effects on vegetation in Europe. *Environ Pollut* 97, 91-106
- [81] Gäb S, Hellpointner E, Turner WV, Kote F (1984) Hydroxymethyl hydroperoxide and bis(hydroxymethyl) peroxide from gas-phase ozonolysis of naturally occurring alkenes. *Nature* 316, 535 - 536
- [82] Galliano H, Cabané M, Eckerskorn C, Lottspeich F, Sandermann H, Ernst D (1993) Molecular cloning, sequence analysis and elicitor-/ozone-induced accumulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase from Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Mol Biol* 23, 145-156
- [83] Galliano H, Heller W, Sandermann H (1993) Ozone induction and purification of spruce cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Phytochemistry* 32, 557-563
- [84] Ganson RJ, d'Amato TA, Jensen RA (1986) The 2-isozyme system of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase in *Nicotiana sylvestris* and other higher plants. *Plant Physiol* 82, 203-210
- [85] Gasser CS, Winters JA, Hironaka CM, Shah DM (1988) Structure, Expression, and Evolution of the 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthase Genes of Petunia and Tomato. *J Biol Chem* 263, 4280-4289
- [86] Gavel Y, von Heijne G (1990) A conserved cleavage site motif in chloroplast transit peptides. *FEBS Lett* 261, 455-458
- [87] Gerosa G, Marzuoli R, Bussotti F, Pancrazi M, Ballarin-Denti A (2003) Ozone sensitivity of *Fagus sylvatica* and *Fraxinus excelsior* young trees in relation to leaf structure and foliar ozone uptake. *Environ Pollut* 125, 91-98
- [88] Gerosa G, Marzuoli R, Cieslik S, Ballarin-Denti A (2004) Stomatal ozone fluxes over a barley field in Italy. 'Effective exposure' as a possible link between exposure- and flux-based approaches. *Atmos Environ* 38, 2421-2432
- [89] Goers SK, Jensen RA (1984) Separation and characterization of two chorismate-mutase isoenzymes from *Nicotiana sylvestris*. *Planta* 162, 109-116
- [90] Goers SK, Jensen RA (1984) The differential allosteric regulation of two chorismate-mutase isoenzymes of *Nicotiana sylvestris*. *Planta* 162, 117-124
- [91] González-García MP, Rodríguez D, Nicolás C, Rodríguez PL, Nicolás G, Lorenzo O (2003) Negative regulation of abscisic acid signaling by the *Fagus sylvatica* FsPP2C1 plays a role in seed dormancy regulation and promotion of seed germination. *Plant Physiol* 133, 135-144
- [92] Görlach J, Beck A, Henstrand JM, Handa AK, Herrmann KM, Schmid J, Amrhein N (1993) Differential expression of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) genes encoding shikimate pathway isoenzymes. I. 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase. *Plant Mol Biol* 23, 697-706
- [93] Görlach J, Schmid J, Amrhein N (1993) Differential expression of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) genes encoding shikimate pathway isoenzymes. II. Chorismate synthase. *Plant Mol Biol* 23, 707-716
- [94] Görlach J, Schmid J, Amrhein N (1994) Abundance of transcripts specific for genes encoding enzymes of the prechorismate pathway in different organs of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants. *Planta* 193, 216-233

- [95] Görlach J, Raesecke HR, Rentsch D, Regenass M, Roy P, Zala M, Keel C, Boller T, Amrhein N, Schmid J (1995) Temporally distinct accumulation of transcripts encoding enzymes of the prechorismate pathway in elicitor treated, cultured tomato cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 3166-3170
- [96] Gosset G, Bonner CA, Jensen RA (2001) Microbial origin of plant type 2-keto-3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthases, exemplified by the chorismate- and tryptophan-regulated enzyme from *Xanthomonas campestris*. *J Bacteriol* 183, 4061-4070
- [97] Großkopf E, Wegener-Strake A, Sandermann H, Ernst D (1994) Ozone-induced metabolic changes in Scots pine: mRNA isolation and analysis of in vitro translated proteins. *Can J For Res* 24, 2030-2033
- [98] Grünhage L, Krupa SV, Legge AH, Jäger H-J (2004) Ambient flux-based critical values of ozone for protecting vegetation: differing spatial scales and uncertainties in risk assessment. *Atmos Environ* 38, 2433-2437
- [99] Guidi L, Degl'Innocenti E, Genovesi S, Soldatini GF (2005) Photosynthetic process and activities of enzymes involved in the phenylpropanoid pathway in resistant and sensitive genotypes of *Lycopersicon esculentum* L. exposed to ozone. *Plant Sci* 168, 153-160
- [100] Günthardt-Goerg MS (1996) Different responses to ozone of tobacco, poplar, birch and alder. *J Plant Physiol* 148, 207-214
- [101] Günthardt-Goerg MS, Matyssek R, Scheidegger C, Keller T (1993) Differentiation and structural decline in the leaves and bark of birch (*Betula pendula*) under low ozone concentrations. *Trees* 7, 104-114
- [102] Günthardt-Goerg MS, McQuattie CJ, Maurer S, Frey B (2000) Visible and microscopic injury in leaves of five deciduous tree species related to current critical ozone levels. *Environ Pollut* 109, 489-500
- [103] Haagen-Smit AJ, Darley EF, Zaitlin M, Hull H, Nobel WM (1952) Investigation of injury to plants from air pollution in the Los Angeles area. *Plant Physiol* 27, 18-34
- [104] Haagen-Smit AJ, Fox MM (1956) Ozone formation in photochemical oxidation of organic substances. *Ind Eng Chem Res* 48, 1484-1487
- [105] Hahlbrock K, Scheel D (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40, 347-369
- [106] Harborne JB (1980) Plant phenolics. In: Bell EA, Charlwood BV (Hrg.) *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, Vol 8, Secondary plant products, Springer, Berlin, 329-402
- [107] Harborne JB (1993) *Introduction to ecological biochemistry*, 4<sup>th</sup> edn. Academic Press, London
- [108] Hartmann G, Nienhaus F, Butin H (1988) *Farbatlas Waldschäden*. Ulmer Verlag, Stuttgart
- [109] Haslam E (1993) Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites. In: John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom
- [110] Heagle AS (1975) Response of three obligate parasites to ozone. *Environ Pollut* 9, 91-95
- [111] Heath RL, Taylor GE (1997) Physiological processes and plant responses to ozone exposure. In: Sandermann H, Wellburn AR, Heath RL (Hrg.) *Forest Decline and Ozone: A Comparison of Controlled Chamber and Field Experiments*. *Ecol. Studies* Vol. 127, Springer, Berlin, 317-368
- [112] Heck WW, Taylor OC, Adams R, Bingham G, Miller J, Preston E, Weinstein L (1982) Assessment of crop loss from ozone. *J Air Pollut Control Assoc* 32, 353-361
- [113] Heggstad HE, Middleton JT (1959) Ozone in high concentrations as cause of tobacco leaf injury. *Science* 129, 208-210
- [114] Heggstad HE (1991) Origin of Bel-W3, Bel-C and Bel-B tobacco varieties and their use as indicators of ozone. *Environ Pollut* 74, 264-291
- [115] Heiden AC, Hoffmann T, Kahl J, Kley D, Klockow D, Langebartels C, Mehlhorn H, Sandermann H, Schraudner M, Schuh G, Wildt J (1999) Emission of volatile organic compounds from ozone-exposed plants. *Ecol Appl* 9, 1160-1167



- [116] Heller W (1994) Topics in the biosynthesis of plant phenols. *Acta Hort* 381, 46-73
- [117] Heller W, Ernst D, Langebartels C, Sandermann H (1995) Induction of polyphenol biosynthesis in plants during development and environmental stress. In: Brouillard R, Jay M, Scalbert A (Hrg.) *Polyphenols 94.*, INRA, Paris, 67-78
- [118] Heller W, Rosemann D, Osswald WF, Benz B, Schoenwitz R, Lohwasser K, Kloos M, Sandermann H (1990) Biochemical response of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) towards 14-month exposure to ozone and acid mist. Part I. Effects on polyphenol and monoterpene metabolism. *Environ Pollut* 64, 353-366
- [119] Henstrand JM, McCue KF, Brink K, Handa AK, Herrmann KM, Conn EE (1992) Light and fungal elicitor induce 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase mRNA in suspension cultured cells of parsley (*Petroselinum crispum* L.). *Plant Physiol* 98, 761-763
- [120] Henstrand JM, Schmid J, Amrhein N (1995) Only the mature form of the plastidic chorismate synthase is enzymatically active. *Plant Physiol* 108, 1127-1132
- [121] Herlander A, Lino-Neto T, Tavares R (2003) An improved method for high-quality RNA isolation from needles of adult maritime pine trees. *Plant Mol Biol Rep* 21, 333-338
- [122] Herrmann KM (1995) The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. *Plant Physiol* 107, 7-12
- [123] Herrmann KM (1995) The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* 7, 907-919
- [124] Herrmann KM, Weaver LM (1999) The shikimate pathway. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol* 50, 473-503
- [125] Hertzberg M, Sievertzon M, Aspeborg H, Nilsson P, Sandberg G, Lundeberg J (2001) cDNA microarray analysis of small plant tissue samples using a cDNA tag target amplification protocol. *Plant J* 25, 585-591
- [126] Hewitt CN, Lucas P, Wellburn AR, Fall R (1990) Chemistry of ozone damage to plants. *Chem Ind* 15, 478-481
- [127] Higuchi T (1985) *Biosynthesis and biodegradation of wood components.* Academic Press, Orlando
- [128] Hough AM, Derwent RG (1990) Changes in the global concentration of tropospheric ozone due to human activities. *Nature* 344, 645-648
- [129] Howell RK (1970) Influence of air pollution on quantities of caffeic acid isolated from leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology* 60, 1626-1629
- [130] Huang X, von Rad U, Durner J (2002) Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells. *Planta* 215, 914 - 923
- [131] Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, Kreis M, Zhang S, Hirt H et al. (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci* 7, 301-308
- [132] Innes JL (1998) An assessment of the use of crown structure for the determination of the health of beech (*Fagus sylvatica*). *Forestry* 71, 113-130
- [133] Innes JL, Skelly JM, Schaub M (2001) Ozon, Laubholz- und Krautpflanzen. Ein Führer zum Bestimmen von Ozonsymptomen. In: Haupt P (Hrg.) *Birmensdorf, Eidgenössische Forschungsanstalt WSL. Bern, Stuttgart, Wien*
- [134] Janzik I, Preiskowski S, Kneifel H (2005) Ozone has dramatic effects on the regulation of the prechorismate pathway in tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bel W3). *Planta* 223, 20-27
- [135] Jensen RA (1985) The shikimate/arogenate pathway: link between carbohydrate metabolism and secondary metabolism. *Physiol Plant* 66, 164-168
- [136] Jung E, Zamir LO, Jensen R A (1986) Chloroplasts of higher plants synthesize L-phenylalanine via L-arogenate. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 7231-7235

- [137] Jung T, Blaschke H, Oßwald W (2000) Involvement of soilborne *Phytophthora* species in Central European oak decline and the effect of site factors on the disease. *Plant Pathol* 49, 706-718
- [138] Jung T, Nechwatal J, Cooke DEL, Hartmann G, Blaschke M, Oßwald WF, Duncan JM, Delatour C (2003) *Phytophthora pseudosyringae* sp. nov., a new species causing root and collar rot of deciduous tree species in Europe. *Mycological Research* 107, 772-789
- [139] Jungblut TP, Heller W, Hertkorn N, Lintelmann J, Sandermann H (1993) Isolation and identification of induced secondary metabolites from cell suspension cultures of *Fagus sylvatica*. *Acta Hort* 381, 470-473
- [140] Khan MR, Khan MW (1998) Interactive effects of ozone and powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) on bottle gourd (*Lagenaria siceraria*). *Agric, Ecosyst Environ* 70, 109-118
- [141] Kangasjärvi J, Talvinen J, Utriainen M, Karjalainen R (1994) Plant defence systems induced by ozone. *Plant Cell Environ* 17, 783-794
- [142] Kangasjärvi J, Jaspers P, Kollist H (2005) Signalling and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Cell Environ* 28, 1021-1036
- [143] Kärenlampi SO, Airaksinen K, Miettinen ATE, Kokko HI, Holopainen JK, Kärenlampi LV, Karjalainen RO (1994) Pathogenesis-related proteins in ozone-exposed Norway spruce (*Picea abies* [Karst] L.). *New Phytol* 126, 81-89
- [144] Kasai K, Kanno T, Akita M, Ikejiri-Kanno Y, Wakasa K, Tozawa Y (2005) Identification of three shikimate kinase genes in rice: characterization of their differential expression during panicle development and of the enzymatic activities of the encoded proteins. *Planta* 222, 438-447
- [145] Keith B, Dong X, Ausubel FM, Fink GR (1991) Differential induction of 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate synthase genes in *Arabidopsis thaliana* by wounding and pathogenic attack. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 8821-8825
- [146] Kerstiens G, Lenzian K (1989) Interactions between ozone and plant cuticles. I. Ozone deposition and permeability. *New Phytol* 112, 13-19
- [147] Kicinski HG, Kettrup A, Boss KS, Masuch G (1988) Single and combined effects of continuous and discontinuous O<sub>3</sub> and SO<sub>2</sub> emission on Norway spruce needles. II Metabolic changes. *Int J Environ Anal Chem* 32, 213-241
- [148] Kiefer E, Heller W, Ernst D (2000) A simple and efficient protocol for isolation of functional RNA from plant tissues rich in secondary metabolites. *Plant Mol Biol Rep* 18, 33-39
- [149] Kleanthous C, Deka R, Davis K, Kelly SM, Cooper A, Harding SE, Price NC, Hawkins AR, Coggins JR (1992) A comparison of the enzymological and biophysical properties of two distinct classes of dehydroquinase enzymes. *Biochem J* 282, 687-695
- [150] Klee HJ, Muskopf YM, Gasser CS (1987) Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Mol Gen Genet* 210, 437-442
- [151] Knaggs AR (2003) The biosynthesis of shikimate metabolites. *Nat Prod Rep* 20, 119-136
- [152] Knight EJ, Fahey D (1981) Human fibroblast interferon. An improved purification. *J Biol Chem* 256, 3609-3611
- [153] Knoester M, Bol JF, Van Loon LC, Linthorst HJM (1995) Virus-induced gene expression for enzymes of ethylene biosynthesis in hypersensitively reacting tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* 8, 177-180
- [154] Koch JR, Scherzer AJ, Eshita SM, Davis KR (1998) Ozone sensitivity in hybrid poplar is correlated with a lack of defense-gene activation. *Plant Physiol* 118, 1243-1252
- [155] Koch JR, Creelman RA, Eshita SM, Seskar M, Mullet JE, Davis KR (2000) Ozone sensitivity in hybrid poplar correlates with insensitivity to both salicylic acid and jasmonic acid. The role of programmed cell death in lesion formation. *Plant Physiol* 123, 487-496
- [156] Kolb TE, Matyssek R (2001) Limitations and perspectives about scaling ozone impacts in trees. *Environ Pollut* 115, 373-393

- [157] Koshiha T (1978) Purification of two forms of the associated 3-dehydroquinone hydrolase and shikimate:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase in *Phaseolus mungo* seedlings. *Biochem Biophys Acta* 522, 10-18
- [158] Kremer BP (1984) Steinbachs Naturführer: Bäume. Mosaik Verlag, München
- [159] Krupa SV, Grünhage L, Jäger H-J, Nosal M, Manning WJ, Legge AH, Hanewald K (1995) Ambient ozone (O<sub>3</sub>) and adverse crop response: A unified view of cause and effect. *Environ Pollut* 87, 119-126
- [160] Krzakowa M, Matras J (2005) Genetic variability among beech (*Fagus sylvatica* L.) populations from the Sudety Mountains, in respect of peroxidase and malate dehydrogenase loci. *J Appl Genet* 46, 271 - 277
- [161] Kuroki GW, Conn EE (1988) Increased chorismate mutase levels as a response to wounding in *Solanum tuberosum* L. tubers. *Plant Physiol* 89, 895-898
- [162] Kuroki GW, Conn EE (1989) Differential activities of chorismate mutase isoenzymes in tubers and leaves of *Solanum tuberosum* L. *Plant Physiol* 89, 472-479
- [163] Laisk A, Kull O, Moldau H (1989) Ozone concentration in leaf intercellular air spaces is close to zero. *Plant Physiol* 90, 1163-1167
- [164] Landolt W, Bühlmann U, Bleuler P, Bucher JB (2000) Ozone exposure-response relationships for biomass and root/shoot ratio of beech (*Fagus sylvatica*), ash (*Fraxinus excelsior*), Norway spruce (*Picea abies*) and Scots pine (*Pinus sylvestris*). *Environ Pollut* 109, 473-478
- [165] Lange BM, Lapierre C, Sandermann H (1995) Elicitor-induced spruce stress lignin: Structural similarity to early developmental lignins. *Plant Physiol* 108, 1277-1287
- [166] Langebartels C, Heller W, Kerner K, Leonardi S, Rosemann D, Schraudner M, Trost M, Sandermann H (1990) Ozone-induced defence reactions in plants. In: H. D. Payer, T. Pfirrmann and P. Mathy (Eds) *Environmental Research with Plants in Closed Chambers. Air Pollution Research Reports, Vol. 26*, CEC, Brüssel, 358-368
- [167] Langebartels C, Kerner K, Leonardi S, Schraudner M, Trost M, Heller W, Sandermann H (1991) Biochemical plant responses to ozone. I. Differential induction of polyamine and ethylene biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol* 95, 882-889
- [168] Langebartels C, Ernst D, Heller W, Lütz C, Payer HD, Sandermann H (1997) Ozone responses of trees. Results from controlled chamber exposures at the GSF phytotron. In: Sandermann H, Wellburn AR, Heath RL (Hrg.) *Forest Decline and Ozone: A Comparison of Controlled Chamber and Field Experiments, Vol. 127*, Springer, Berlin, 163-200
- [169] Langebartels C, Heller W, Führer G, Lippert M, Simons S, Sandermann H (1998) Memory effects in the action of ozone on conifers. *Ecotox Environ Safe* 41, 62-72
- [170] Langebartels C, Schraudner M, Heller W, Ernst D, Sandermann H (2002) Oxidative stress and defense reactions in plants exposed to air pollutants and UV-B radiation. In: Inzé D, Van Montagu M (Hrg.) *Oxidative stress in plants*, Taylor and Francis, London, 105-135
- [171] Langebartels C, Ernst D, Kangasjärvi J, Sandermann H (2002) Ozone effects on plant defense. *Meth Enzymol* 319, 520-535
- [172] Langebartels C, Wohlgemuth H, Kschieschan S, Grün S, Sandermann H (2002) Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiol Biochem* 40 (6-8), 567-575
- [173] Langebartels C, Kangasjärvi J (2004) Ethylene and jasmonate as regulators of cell death in disease resistance. In: Sandermann H (Hrg.) *Molecular Ecotoxicology of plants, Ecological Studies Vol. 170*, Springer, Berlin, 75-109
- [174] Lefohn A (1992) Ozone standards and their relevance for protecting vegetation. In: Lefohn A (Hrg.) *Surface Level Ozone Exposures and their Effects on Vegetation*, Lewis Publ, Chelsea, 325-359
- [175] Levy HII, Mahlman JD, Moxim WJ (1985) Tropospheric ozone: the role of transport. *J Geophys Res* 93, 15879-15888

- [176] Lewis NG, Yamamoto E (1990) Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41, 455-496
- [177] Liegl I (1999) UV-B induzierte Genexpression bei der Buche *Fagus sylvatica* L. Dissertation, LMU München
- [178] Lincoln JE, Campbell AD, Oetiker J, Rottmann WH, Oeller PW, Shen NF, Theologis A (1993) LE-ACS4, a fruit ripening and wound-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J Biol Chem* 268, 19422-19430
- [179] Lippert M, Steiner K, Payer H-D, Simons S, Langebartels C, Sandermann H (1996) Assessing the impact of ozone on photosynthesis of European beech (*Fagus sylvatica* L.) in environmental chambers. *Trees* 10, 268-275
- [180] Liu D, Li N, Dube S, Kalinski A, Herman E, Mattoo AK (1993) Molecular characterization of a rapidly and transiently wound-induced soybean (*Glycine max* L.) gene encoding 1-aminocyclopropan-1-carboxylate synthase. *Plant Cell Physiol* 34, 1151-1157
- [181] Logan JA (1985) Tropospheric ozone: Seasonal behaviour, trends and anthropogenic influence. *J Geophys Res* 90, 10463-10882
- [182] Logemann E, Tevernaro A, Schulz W, Somssich IE, Hahlbrock K (2000) UV light selectively coinduces supply pathways from primary metabolism and flavonoid secondary product formation in parsley. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 1903-1907
- [183] Longauer R, Gomory D, Paule L, Blada I, Popescu F, Mankovska B, Müller-Starck G, Schubert R, Percy K, Szaro RC, Karnosky DF (2004) Genetic effects of air pollution on forest tree species of the Carpathian Mountains. *Environ Pollut* 130, 85-92
- [184] Ludwikow A, Gallois P, Sadowski J (2004) Ozone-induced oxidative stress response in *Arabidopsis*: Transcription profiling by microarray approach. *Cell Mol Biol Lett* 9, 829-842
- [185] Luethy-Krause B, Pfenninger I, Landolt W (1990) Effects of ozone on organic acids in needles of Norway spruce and Scots pine. *Trees* 4, 198-204
- [186] Malnoy M, Reynoird JP, Mourgues F, Chevreau E, Simoneau P (2001) A method for isolating total RNA from pear leaves. *Plant Mol Biol Rep* 19, 69a-69f
- [187] Manning WJ, von Tiedemann A (1995) Climate change: Potential effects of increased atmospheric carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), ozone (O<sub>3</sub>), and ultraviolet-B (UV-B) radiation on plant diseases. *Environ Pollut* 88, 219-245
- [188] Martinoia E, Klein M, Geisler M, Bovet L, Forestier C, Kolukisaoglu Ü, Müller-Röber B, Schulz B (2002) Multifunctionality of plant ABC transporters - more than just detoxifiers. *Planta* 214, 345-355
- [189] Massman WJ (2004) Toward an ozone standard to protect vegetation based on effective dose: a review of deposition resistances and a possible metric. *Atmos Environ* 38, 2323-2337
- [190] Matsukawa T, Ishihara A, Iwamura H (2002) Differential induction of chorismate mutase isoforms by elicitors in oat leaves. *Plant Physiol Biochem* 40, 795-802
- [191] Matyssek R, Innes JL (1999) Ozone - a Risk Factor for Trees and Forests in Europe? *Water Air Soil Pollut* 116, 199-226
- [192] Matyssek R, Sandermann H (2003) Impact of ozone on trees: an ecophysiological perspective. *Prog Bot* 64, 350-404
- [193] Matyssek R, Wieser G, Nunn AJ, Kozovits AR, Reiter IM, Heerd C, Winkler JB, Baumgarten M, Haerberle K-H, Grams TEE, Werner H, Fabian P, Havranek WM (2004) Comparison between AOT40 and ozone uptake in forest trees of different species, age and site conditions. *Atmos Environ* 38, 2271-2281
- [194] McCue KF, Conn EE (1989) Induction of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase activity by fungal elicitor in cultures of *Petroselinum crispum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 7374-7377

- [195] McCue KF, Conn EE (1990) Induction of shikimic acid pathway enzymes by light in suspension cultured cells of parsley (*Petroselinum crispum*). *Plant Physiol* 94, 597-610
- [196] Mehlhorn H, Wellburn AR (1987) Stress ethylene formation determines plant sensitivity to ozone. *Nature* 327, 417-418
- [197] Métraux J-P (2002) Recent breakthroughs in the study of salicylic acid biosynthesis. *Trends Plant Sci* 7, 332-334
- [198] Meuwly P, Métraux JP (1993) Ortho-anisic acid as internal standard for the simultaneous quantitation of salicylic acid and its putative biosynthetic precursors in cucumber leaves. *Anal Biochem* 214, 500-505
- [199] Mikkelsen TN, Heide-Jorgensen HS (1996) Acceleration of leaf senescence in *Fagus sylvatica* L. at low levels of tropospheric ozone demonstrated by leaf colour, chlorophyll fluorescence and chloroplast ultrastructure. *Trees* 10, 145-156
- [200] Miller PR, McBride JR (1999) Oxidant Air Pollution Impacts in the Montane Forests of Southern California. Springer, Berlin, 317-336
- [201] Minamikawa T, Kojima M, Uritani I (1966) Dehydroquinase hydro-lyase and shikimate: NADP oxidoreductase in sliced roots of sweet potato. *Arch Biochem Biophys* 117, 194-205
- [202] Mobley EM, Kunkel BN, Keith B (1999) Identification, characterization and comparative analysis of a novel chorismate mutase in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 240, 115-123
- [203] Moeder W, Barry CS, Tauriainen A, Betz C, Tuomainen J, Utriainen M, Grierson D, Sandermann H, Langebartels C, Kangasjärvi J (2002) Ethylene synthesis regulated by bi-phasic induction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase genes is required for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation and cell death in ozone-exposed tomato. *Plant Physiol* 130, 1918-1926
- [204] Montchamp JL, Peng JR, Frost JW (1994) Inversion of an asymmetric center in carbocyclic inhibitors of 3-dehydroquinase synthase: examining and exploiting the mechanism for syn-elimination during substrate turnover. *J Org Chem* 59, 6999-7007
- [205] Montchamp JL, Frost JW (1997) Cyclohexenyl and cyclohexylidene inhibitors of 3-dehydroquinase synthase: active site interactions relevant to enzyme mechanism and inhibitor design. *J Am Chem Soc* 119, 7645-7653
- [206] Moore TC (1989) *Biochemistry and Physiology of Plant Hormones*. Springer, Berlin
- [207] Morreel K, Ralph J, Lu F, Goeminne G, Busson R, Herdewijn P, Goeman JL, Van der Eycken J, Boerjan W, Messens E (2004) Phenolic Profiling of Caffeic Acid O-Methyltransferase-Deficient Poplar Reveals Novel Benzodioxane Oligolignols. *Plant Physiol* 136, 4023-4036
- [208] Morris PF, Doong RL, Jensen RA (1989) Evidence from *Solanum tuberosum* in support of the dual pathway hypothesis of aromatic biosynthesis. *Plant Physiol* 89, 10-14
- [209] Mousdale DM, Coggins JR (1985) Subcellular localization of the common shikimate pathway enzymes in *Pisum sativum* L. *Planta* 163, 241-249
- [210] Mousdale DM, Campbell MS, Coggins JR (1987) Purification and characterization of bifunctional dehydroquinase-shikimate:NADP oxidoreductase from pea seedlings. *Phytochemistry* 26, 2665-2670
- [211] Muday G, Muday G, Herrmann K (1992) Wounding induces one of two isoenzymes of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase in *Solanum tuberosum*. *Plant Physiol* 98, 496-500
- [212] Müller JF, Brasseur G (1995) IMAGES: a three-dimensional chemical transport model of the global troposphere. *J Geophys Res* 100, 16445-16490
- [213] Corpet F (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 16, 10881-10890
- [214] Musselman RC, Younglove T, McCool PM (1994) Response of *Phaseolus vulgaris* L. to differing ozone regimes having identical total exposure. *Atmos Environ* 28, 2727-2731

- [215] Musselman RC, Hale BA (1997) Methods for controlled and field ozone exposures of forest tree species in North America. In: Sandermann H, Wellburn AR, Heath RL (Hrg.) Forest Decline and Ozone: A Comparison of Controlled Chamber and Field Experiments, Ecological Studies 127, Springer, Berlin, 227-315
- [216] Mustafa NR, Verpoorte R (2005) Chorismate derived C6C1 compounds in plants. *Planta* 222, 1-5
- [217] Nakane E, Kawakita K, Doke N, Yoshioka H (2003) Elicitation of primary and secondary metabolism during defense in the potato. *J Gen Plant Pathol* 69, 378-384
- [218] Nakajima N, Matsuyama T, Tamaoki M, Saji H, Aono M, Kubo A, Kondo N (2001) Effects of ozone exposure on the gene expression of ethylene biosynthesis enzymes in tomato leaves. *Plant Physiol Biochem* 39, 993-998
- [219] Nakatsuka A, Murachi S, Okunishi H, Shiomi S, Nakano R, Kubo Y, Inaba A (1998) Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. *Plant Physiol* 118, 1295-1305
- [220] Nali C, Pucciariello C, Lorenzini G (2002) Ozone distribution in central Italy and its effect on crop productivity. *Agric, Ecosyst Environ* 90, 277-289
- [221] Nechwatal J, Oßwald W (2001) Comparative studies on the fine root status of healthy and declining spruce and beech trees in the Bavarian Alps and occurrence of *Phytophthora* and *Pythium* species. *Forest Pathology* 31, 257-273
- [222] Nicolás C, Nicolás G, Rodríguez D (1998) Transcripts of a gene, encoding a small GTP-binding protein from *Fagus sylvatica*, are induced by ABA and accumulated in the embryonic axis of dormant seeds. *Plant Mol Biol* 36, 487-491
- [223] Nida DL, Kolacz KH, Buehler RE, Deaton WR, Shuler WR, Armstrong TA, Taylor ML, Ebert CC, Rogan GJ, Padgett SR, Fuchs RL (1996) Glyphosate-tolerant cotton: genetic characterization and protein expression. *J Agric Food Chem* 44, 1960-1966
- [224] Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 10, 1-6
- [225] Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49, 249-279
- [226] Nunn AJ (2005) Risiko-Einschätzung der chronisch erhöhten Ozonbelastung mittels 'Free-Air'-Begasung von Buchen (*Fagus sylvatica*) und Fichten (*Picea abies*) eines forstlich begründeten Mischbestandes. Dissertation, TU München
- [227] Nunn AJ, Reiter IM, Häberle K-H, Werner H, Langebartels C, Sandermann H, Heerdt C, Fabian P, Matyssek R (2002) 'Free-Air' ozone canopy fumigation in an old-growth mixed forest: Concept and observations in beech. *Phyton (Österreich)* 42, 105-119
- [228] Nunn AJ, Anegg S, Betz G, Simons S, Kalisch G, Seidlitz H, Grams TEE, Häberle K-H, Matyssek R, Bahnweg G, Sandermann H, Langebartels C (2005) Role of ethylene in the regulation of cell death and leaf loss in ozone-exposed European beech. *Plant Cell Environ* 28, 886-897
- [229] Nunn AJ, Reiter IM, Häberle K-H, Langebartels C, Bahnweg G, Pretzsch H, Sandermann H, Matyssek R (2005) Response patterns in adult forest trees to chronic ozone stress: identification of variations and consistencies. *Environ Pollut* 136, 365-369
- [230] Nunn AJ, Kozovits AR, Reiter IM, Heerdt C, Leuchner M, Lütz C, Liu X, Löw M, Winkler JB, Grams TEE, Häberle K-H, Werner H, Fabian P, Rennenberg H, Matyssek R (2005) Comparison of ozone uptake and sensitivity between a phytotron study with young beech and a field experiment with adult beech (*Fagus sylvatica*). *Environ Pollut* 137, 494-506
- [231] Oetiker JH, Olson DC, Shiu OY, Yang SF (1997) Differential induction of seven 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes by elicitor in suspension cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Mol Biol* 34, 275-286

- [232] Ogino T, Garner C, Markley JL, Herrmann KM (1982) Biosynthesis of aromatic compounds: C13 spectroscopy of whole *Escherichia coli* cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 5828-5832
- [233] Olbrich M, Betz G, Gerstner E, Langebartels C, Sandermann H, Ernst D (2005) Transcriptome analysis of ozone-responsive genes in leaves of European beech (*Fagus sylvatica* L.). *Plant Biol* 7, 670-676
- [234] Oltmans SJ, Komhyr WD, Franchois PR, Matthews WA (1989) Tropospheric ozone: variations from surface and ECC ozone sonde observations. In: Bojkov RD, Fabian P (Hrg.) *Ozone in the Atmosphere, Proc Quadrennial Ozone Symp 1988 and Tropospheric Ozone Workshop*. Deepak, Hampton, Virginia, 539-543
- [235] Oltmans SJ, Levy HII (1994) Surface ozone measurements from a global network. *Atmos Environ* 28, 9-24
- [236] Ossipov V, Bonner C, Ossipova S, Jensen R (2000) Broad-specificity quinate (shikimate) dehydrogenase from *Pinus taeda* needles. *Plant Physiol Biochem* 38, 923-928
- [237] Ossipov V, Salminen J-P, Ossipova S, Haukioja E, Pihlaja K (2003) Gallic acid and hydrolysable tannins are formed in birch leaves from an intermediate compound of the shikimate pathway. *Biochem Syst Ecol* 31, 3-16
- [238] Overmyer K, Tuominen H, Kettunen R, Betz C, Langebartels C, Sandermann H, Kangasjärvi J (2000) Ozone-sensitive *Arabidopsis rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. *Plant Cell* 12, 1849-1862
- [239] Padgett SR, Kolacz KH, Delannay X, XRe DB, La Vallee BJ (1995) Development, identification and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Sci* 35, 1451-1461
- [240] Pääkkönen E, Seppänen S, Holopainen T, Kokko H, Kärenlampi S, Kärenlampi L, Kangasjärvi J (1998) Induction of genes for the stress proteins PR-10 and PAL in relation to growth, visible injuries and stomatal conductance in birch (*Betula pendula*) clones exposed to ozone and/or drought. *New Phytol* 138, 295-305
- [241] Paludan-Müller G, Saxe H, Leverenz JW (1999) Responses to ozone in 12 provenances of European beech (*Fagus sylvatica*): genotypic variation and chamber effects on photosynthesis and dry-matter partitioning. *New Phytol* 144, 261-273
- [242] Paulson SE, Seinfeld JH (1992) Development and evaluation of a photooxidation mechanism for isoprene. *J Geophys Res* 97, 20703-20715
- [243] Pastori GM, Kiddle G, Antoniw J, Bernard S, Veljovic-Jovanovic S, Verrier PJ, Noctor G, Foyer CH (2003) Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *Plant Cell* 15, 939-951
- [244] Pearson M, Mansfield TA (1993) Interacting effects of ozone and water stress on the stomatal resistance of beech (*Fagus sylvatica* L.). *New Phytol* 123, 351-358
- [245] Pedley KF, Martin GB (2004) Identification of MAPKs and their possible MAPK kinase activators involved in the Pto-mediated defense response of tomato. *J Biol Chem* 279, 49229-49235
- [246] Pell EJ, Schlagnhauser CD, Arteca RN (1997) Ozone-induced oxidative stress: Mechanisms of action and reaction. *Physiol Plant* 100, 264-273
- [247] Pellegrini L, Geoffroy P, Fritig B, Legrand M (1993) Molecular cloning and expression of a new class of ortho-diphenol-*O*-methyltransferases induced in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves by infection or elicitor treatment. *Plant Physiol* 103, 509-517
- [248] Pellinen R, Palva T, Kangasjärvi J (1999) Subcellular localization of ozone-induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells. *Plant J* 20, 349-356
- [249] Pelloux J, Jolivet Y, Fontaine V, Banvoy J, Dizengremel P (2001) Changes in Rubisco and Rubisco activase gene expression and polypeptide content in *Pinus halepensis* M. subjected to ozone and drought. *Plant Cell Environ* 24, 123-131

- [250] Percy KE, Awmack CS, Lindroth RL, Kubiske ME, Kopper BJ, Isebrands JG, Pregitzer KS, Hendrey GR, Dickson RE, Zak DR, Oksanen E, Sober J, Harrington R, Karnosky DF (2002) Altered performance of forest pests under atmospheres enriched by CO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub>. *Nature* 420, 403-407
- [251] Pinto JEBP, Suzich JA, Herrmann KM (1986) 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase from potato tuber (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Physiol* 82, 1040-1044
- [252] Pinto JEBP, Dyer WE, Weller SC, Herrmann KM (1988) Glyphosate induces 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase in potato (*Solanum tuberosum* L.) cells grown in suspension culture. *Plant Physiol* 87, 891-893
- [253] Polle A, Schwanz P, Rudolf C (2001) Developmental and seasonal changes of stress responsiveness in beech leaves (*Fagus sylvatica* L.). *Plant Cell Environ* 24, 821-829
- [254] Polley LD (1978) Purification and characterization of 3-dehydroquinase hydrolase and shikimate oxidoreductase. *Biochem Biophys Acta* 528, 259-266
- [255] Pretzsch H, Kahn M, Grote R (1998) Die Fichten-Buchen-Mischbestände des Sonderforschungsbereiches 'Wachstum oder Parasitenabwehr?' im Kranzberger Forst. *Forstwissenschaftliches Zentralblatt* 117, 241-257
- [256] Pye JM (1988) Impact of ozone on the growth and yield of trees: A review. *J Environ Qual* 17, 347-360
- [257] Quigley F, Rosenberg JM, Shachar-Hill Y, Bohnert HJ (2001) From genome to function: the *Arabidopsis* aquaporins. *Genome Biology* 3, 1-17
- [258] Rao MV, Davis KR (1999) Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: The role of salicylic acid. *Plant J* 17, 603-614
- [259] Rao MV, Davis KR (2001) The physiology of ozone induced cell death. *Planta* 213, 682-690
- [260] Rao MV, Lee HI, Davis KR (2002) Ozone-induced ethylene production is dependent on salicylic acid, and both salicylic acid and ethylene act in concert to regulate ozone-induced cell death. *Plant J* 32, 447-456
- [261] Ream JE, Steinrücken HC, Porter CA, Sikorski JA (1988) Purification and properties of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from dark-grown seedlings of *Sorghum bicolor*. *Plant Physiol* 87, 232-238
- [262] Reddy GN, Arteca RN, Dai YR, Flores HE, Negm FB, Pell EJ (1993) Changes in ethylene and polyamines in relation to mRNA levels of the large and small subunits of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase in ozone-stressed potato foliage. *Plant Cell Environ* 16, 819-826
- [263] Reich PB (1987) Quantifying plant response to ozone: A unifying theory. *Tree Physiol* 3, 63-91
- [264] Reinbothe C, Ortel B, Parthier B, Reinbothe S (1994) Cytosolic and plastid forms of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in *Euglena gracilis* are differentially expressed during light-induced chloroplast development. *Mol Gen Genet* 245, 616-622
- [265] Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD (1996) Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* 8, 1809-1819
- [266] Rosemann D, Heller W, Sandermann H (1991) Biochemical plant responses to ozone. II. Induction of stilbene biosynthesis in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *Plant Physiol* 97, 1280-1286
- [267] Sävenstrand H, Brosché M, Ängelsten M, Strid A (2000) Molecular marker for ozone stress isolated by suppression subtractive hybridization: specificity of gene expression and identification of a novel stress-regulated gene. *Plant Cell Environ* 23, 689-700
- [268] Sahr T (2003) Untersuchungen zur Transkriptionsänderung in *Arabidopsis thaliana* nach Cäsium- und Radiocäsium-Applikation. Dissertation, TU München
- [269] Saleem A, Loponen J, Pihlaja K, Oksanen E (2001) Effects of Long-Term Open-Field Ozone Exposure on Leaf Phenolics of European Silver Birch (*Betula pendula* Roth). *J Chem Ecol* 27, 1049 - 1062



- [270] Samuel MA, Miles GP, Ellis BE (2000) Ozone treatment rapidly activates MAP kinase signaling in plants. *Plant J* 22, 367-376
- [271] Sander T, König S, Rothe GM, Janssen A, Weisgerber H (2000) Genetic variation of European beech (*Fagus sylvatica* L.) along an altitudinal transect at mount Vogelsberg in Hesse, Germany. *Mol Ecol* 9, 1349-1361
- [272] Sandermann H (1996) Ozone and plant health. *Annu Rev Phytopathol* 34, 347-366
- [273] Sandermann H (2000) Ozone/biotic disease interactions: molecular biomarkers as a new experimental tool. *Environ Pollut* 108, 327-332
- [274] Sandermann H, Schmitt R, Heller W, Rosemann D, Langebartels C (1989) Ozone-induced early biochemical reactions in conifers. In: Longhurst JWS (Hrg.) *Acid deposition. Sources, effects and controls*, British Library, London 243-254
- [275] Sandermann H, Wellburn AR, Heath RL (1997) Forest decline and ozone: synopsis. In: Sandermann H, Wellburn AR, Heath RL (Hrg.) *Forest Decline and Ozone: A Comparison of Controlled Chamber and Field Experiments*, Ecological Studies 127, Springer, Berlin, 369-377
- [276] Sandermann H, Jr, Ernst D, Heller W, Langebartels C (1998) Ozone: an abiotic elicitor of plant defence reactions. *Trends Plant Sci* 3, 47-50
- [277] Sandermann H, Matyssek R (2004) Scaling up from molecular to ecological processes. In: Sandermann H (Hrg.) *Molecular Ecotoxicology of Plants*, Vol 170, Springer, Berlin, 207-226
- [278] Scalfi M, Troggio M, Piovani P, Leonardi S, Magnaschi G, Vendramin GG, Menozzi P (2004) A RAPD, AFLP and SSR linkage map, and QTL analysis in European beech (*Fagus sylvatica* L.). *Theor Appl Genet* 108, 433-441
- [279] Schaller A, van Afferden M, Windhofer V, Bülow S, Abel G, Schmid J, Amrhein N (1991) Purification and characterization of chorismate synthase from *Euglena gracilis*. Comparison with chorismate synthases from plant and microbial origin. *Plant Physiol* 97, 1271-1279
- [280] Schaller A, Schmid J, Leibinger U, Amrhein N (1991) Molecular cloning and analysis of a cDNA coding for chorismate synthase from the higher plant *Corydalis sempervirens* Pers. *J Biol Chem* 266 (32), 21434-21438
- [281] Schlaghaufer CD, Glick RE, Arteca RN, Pell EJ (1995) Molecular cloning of an ozone-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase cDNA and its relationship with a loss of *rbcS* in potato (*Solanum tuberosum* L.) plants. *Plant Mol Biol* 28, 93 - 103
- [282] Schmid J, Schaller A, Leibinger U, Boll W, Amrhein N (1992) The in vitro synthesized tomato shikimate kinase precursor is enzymatically active and is imported and processed to the mature enzyme by isolated chloroplasts. *Plant J* 2, 375-383
- [283] Schmid J, Nikolaus A (1995) Molecular organization of the shikimate pathway in higher plants. *Phytochemistry* 39, 737-749
- [284] Schmid J, Amrhein N (1999) The shikimate pathway. In: Singh B (Hrg.) *Plant Amino Acids: Biochemistry and biotechnology*, Marcel Dekker, New York, 147-169
- [285] Schraudner M (1992) Frühe Reaktionen von Tabak und Buche auf Ozon: Induktion des Pyramin- und Polyaminstoffwechsels. Dissertation, LMU München
- [286] Schraudner M, Ernst D, Langebartels C, Sandermann H (1992) Biochemical plant responses to ozone. III. Activation of the defense-related proteins  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase in tobacco leaves. *Plant Physiol* 99, 1321-1328
- [287] Schraudner M, Langebartels C, Sandermann H (1997) Changes in the biochemical status of plant cells induced by the environmental pollutant ozone. *Physiol Plant* 100, 274-280
- [288] Schuhbäck T (2004) Nährelementstatus und Bodenzustand an der Bestandesgrenze Buche. Fichte im Mischwaldbestand Kranzberger Forst. Diplomarbeit. Fachgebiet für Waldernährung und Wasserhaushalt - Department für Ökologie, TU München
- [289] Shah J (2003) The salicylic acid loop in plant defense. *Curr Opin Plant Biol* 6, 365-371

- [290] Shah DM, Horsch RB, Klee HJ, Kishore G, Winter JA, Tumer NE, Hironaka CM, Sanders PR, Gasser CS, Aykent S, Siegel NR, Rogers SG, Fraley RT (1986) Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science* 233, 478-481
- [291] Sharma YK, Davis KR (1994) Ozone-induced expression of stress-related genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 105, 1089-1096
- [292] Sharma YK, León J, Raskin I, Davis KR (1996) Ozone-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: The role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. *Proc Nat Acad Sci USA* 93, 5099-5104
- [293] Sharma YK, Davis KR (1997) The effects of ozone on antioxidant responses in plants. *Free Radical Biol Med* 23, 480-488
- [294] Sharma R, Mukesh J, Bhatnagar RK, Bhalla-Sarin N (1999) Differential expression of *DAHPh synthase* and *chorismate mutase* in various organs of *Brassica juncea* and the effect of external factors on enzyme activity. *Physiol Plant* 105, 739-745
- [295] Shiu OY, Oetiker JH, Yip WK, Yang SF (1998) The promoter of LE-ACS7, an early flooding-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of tomato, is tagged by a Sol3 transposon. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 10334-10339
- [296] Shneier A, Harris J, Kleanthous C, Coggins JR, Hawkins AR, Abell C (1993) Evidence for opposite stereochemical courses for the reactions catalyzed by type I and type II dehydroquinases. *Bioorg Med Chem* 5, 323-334
- [297] Simons S (1993) Biochemische Effekte und Symptomentwicklung bei Buchen (*Fagus sylvatica* L.) und Nadelgehölzen unter realen und proportional erhöhten Ozonkonzentrationen. Dissertation, LMU München
- [298] Singh BK, Lonergan SG, Conn EE (1986) Chorismate mutase isoenzymes from selected plants and their immunological comparison with the isoenzymes from *Sorghum bicolor*. *Plant Physiol* 81, 717-722
- [299] Skärby L, Ro-Poulsen H, Wellburn FAM, Sheppard LJ (1998) Impacts of ozone on forests: a European perspective. *New Phytol* 139, 109-122
- [300] Soldatini GF, Lorenzini G, Filippi F, Nali C, Guidi L (1998) Photosynthesis of two poplar clones under longterm exposure to ozone. *Physiol Plant* 104, 707-712
- [301] Spelbrink REJ, Kolkman A, Slijper M, Killian JA, de Kruijff B (2005) Detection and Identification of Stable Oligomeric Protein Complexes in *Escherichia coli* Inner Membranes: A proteomics approach. *J Biol Chem* 280, 28742-28748
- [302] Steinrücken HC, Amrhein N (1980) The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid 3-phosphate synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 94, 1207-1212
- [303] Stockwell WR, Kramm G, Scheel HE, Mohnen VA, Seiler W (1997) Ozone formation, destruction and exposure in Europe and the United States. In: Sandermann H, Wellburn AR, Heath RL (Hrg.) *Forest Decline and Ozone. A Comparison of Controlled Chamber and Field Experiments*. *Ecol. Studies Vol. 127*, Springer, Berlin, 1-38
- [304] Sundberg B (2001) Tree physiology goes genomics. In: Huttenen S, Heikkilä H, Bucher J, Sundberg B, Jarvis P, Matyssek R (Hrg.) *Trends in European Forest Tree Physiology Research*, Kluwer Academic Publishers Dordrecht, 225-227
- [305] Suzich JA, Dean JFD, Herrmann KM (1985) 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase from carrot root (*Daucus carota*) is a hysteretic enzyme. *Plant Physiol* 79, 765-770
- [306] Suzuki N, Sakuta M, Shimizu S, Komamine A (1995) Changes in the activity of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase in suspension-cultured cells of *Vitis*. *Physiol Plant* 94, 591-596
- [307] Tamaoki M, Matsuyama T, Kanna M, Nakajima N, Kubo A, Aono M, Saji H (2003) Differential ozone sensitivity among *Arabidopsis* accessions and its relevance to ethylene synthesis. *Planta* 216, 552 - 560

- [308] Tanksley SD, Orton TJ (1983) Developments in plant genetics and breeding. In: Isozymes in plant genetics and breeding (part A), New York, Elsevier
- [309] Tingey DT, Standley C, Field RW (1976) Stress ethylene evolution: A measure of ozone effects on plants. *Atmos Environ* 10, 969-974
- [310] Tingey DT, Wilhour RG, Standley C (1976) The effect of chronic ozone exposures on the metabolite content of Ponderosa pine seedlings. *For Sci* 22, 234-241
- [311] Tommasini R, Vogt E, Fromenteau M, Hortensteiner 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
- [312] Tuomainen J, Pellinen R, Roy S, Kiiskinen M, Eloranta T, Karjalainen R, Kangasjärvi J (1996) Ozone affects birch (*Betula pendula* Roth) phenylpropanoid, polyamine and active oxygen detoxifying pathways at biochemical and gene expression level. *J Plant Physiol* 148, 179-188
- [313] Tuomainen J, Betz C, Kangasjärvi J, Ernst D, Yin ZH, Langebartels C, Sandermann H (1997) Ozone induction of ethylene emission in tomato plants: Regulation by differential accumulation of transcripts for the biosynthetic enzymes. *Plant J* 12, 1151-1162
- [314] Uddling J, Günthardt-Goerg MS, Matyssek R, Oksanen E, Pleijel H, Sellden G, Karlsson PE (2004) Biomass reduction of juvenile birch is more strongly related to stomatal uptake of ozone than to indices based on external exposure. *Atmos Environ* 38, 4709-4719
- [315] Umeda M, Hara C, Matsubayashi Y, Li HH, Liu Q, Tadokoro F, Aotsuka S, Uchimiya H (1994) Expressed sequence tags from cultured cells of rice (*Oryza sativa* L.) under stressed conditions: analysis of transcripts of genes engaged in ATP-generating pathways. *Plant Mol Biol* 25, 469-478
- [316] Unsworth MH, Heagle AS, Heck WW (1984) Gas exchange in open-top field chambers - I. Measurement and analysis of atmospheric resistance to gas exchange. *Atmos Environ* 18, 373-380
- [317] Unsworth MH, Heagle AS, Heck WW (1984) Gas exchange in open-top field chambers - II. Resistances to ozone uptake by soybeans. *Atmos Environ* 18, 381-385
- [318] Vahala J, Ruonala R, Keinänen M, Tuominen H, Kangasjärvi J (2003) Ethylene Insensitivity Modulates Ozone-Induced Cell Death in Birch. *Plant Physiol* 132, 185-195
- [319] Van den Driessche R, Langebartels C (1994) Foliar symptoms, ethylene biosynthesis and water use of young Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) exposed to drought and ozone. *Water Air Soil Pollut* 78, 153-168
- [320] VanderHeyden D, Skelly J, Innes J, Hug C, Zhang J, Landolt W, Bleuler P (2001) Ozone exposure thresholds and foliar injury on forest plants in Switzerland. *Environ Pollut* 111, 321-331
- [321] <http://www.verbraucherministerium.de/index-00066A5826F7110E93A16521C0A8D816.html>
- [322] Volz A, Kley D (1988) Evaluation of the Montsouris series of ozone measurements made in the nineteenth century. *Nature* 332, 240-242
- [323] Walter MH (1992) Regulation of lignification in defence. In: Boller T, Moing F (Hrg.) *Advances in Plant Gene Research, Vol 8: Genes Involved in Plant Defense*, Springer, Wien
- [324] Walter MH, Grima-Pettenati J, Grand C, Boudet AM, Lamb CJ (1988) Cinnamyl-alcohol dehydrogenase, a molecular marker specific for lignin synthesis: cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 5546-5550
- [325] Wang Y, Herrmann KM, Weller SC, Goldsbrough PB (1991) Cloning and nucleotide sequence of a complementary DNA encoding 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase from tobacco. *Plant Physiol* 97, 847-848
- [326] Wang KS (2004) Gene flow in european beech (*Fagus sylvatica* L.). *Genetica* 122, 105-113
- [327] Wang YX, Jones JD, Weller SC, Goldsbrough PB (1991) Expression and stability of amplified genes encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in glyphosate-tolerant tobacco cells. *Plant Mol Biol* 17, 1127-1138

- [328] Warneck P (1988) The chemistry of the natural atmosphere. Academic Press, New York
- [329] Weaver LM, Herrmann KM (1997) Dynamics of the shikimate pathway in plants. *Trends Plant Sci* 2, 346-351
- [330] Weeden NF, Gottlieb LD (1980) The genetics of chloroplast enzymes. *J Hered* 71, 392-396
- [331] Werner H, Fabian P (2002) Free-air fumigation of mature trees. *Environ Sci Pollut Res* 9, 117-121
- [332] Whetten R, Sederoff R (1995) Lignin biosynthesis. *Plant Cell* 7, 1001-1013
- [333] Whetten R, Sun Y-H, Zhang Y, Sederoff R (2001) Functional genomics and cell wall biosynthesis in loblolly pine. *Plant Mol Biol* 47, 275-291
- [334] WHO report 2000, Chapter 12: Effects of ozone on vegetation: critical levels. WHO Regional office of Europe, Copenhagen, Denmark.  
[www.euro.who.int/document/a/q/12ozonelevel.pdf](http://www.euro.who.int/document/a/q/12ozonelevel.pdf)
- [335] Widlanski T, Bender SL, Knowles JR (1989) Dehydroquinase synthase: the use of substrate analogues to probe the late steps of the catalyzed reaction. *Biochemistry* 28, 7572-7582
- [336] Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414, 562-565
- [337] Wilksch W, Schmitt V, Wild A (1998) Ethylene-biosynthesis in conifers: investigations on the emissions of ethylene and the content of ACC and MACC in norway spruce *Picea abies* and silver fir *Abies alba*. *Chemosphere* 36, 883-888
- [338] Willekens H, Van Camp W, Van Montagu M, Inzé D, Langebartels C, Sandermann H (1994) Ozone, sulfur dioxide, and ultraviolet B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *Plant Physiol* 106, 1007-1014
- [339] Wullschlegel SD, Jansson S, Taylor G (2002) Genomics and forest biology. *Populus* emerges as the perennial favorite. *Plant Cell* 14, 2651-2655
- [340] Yalpani N, Enyedi AJ, León J, Raskin I (1994) Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Planta* 193, 372-376
- [341] Yamaji K, Julkunen-Tiitto R, Rousi M, Freiwald V, Oksanen E (2003) Ozone exposure over two growing seasons alters root-to-shoot ratio and chemical composition of birch (*Betula pendula* Roth). *Global Change Biology* 9, 1363 - 1377
- [342] Yang SF, Hoffman NE (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* 35, 155-189
- [343] Yang C, Wessler A, Wild A (1993) Studies on the diurnal courses of the contents of abscisic acid, 1-aminocyclopropane carboxylic acid and its malonyl conjugate in needles of damaged and undamaged spruce trees. *Plant Physiol* 14, 624-626
- [344] Yuan CI, Chaing MY, Chen YM (2002) Triple mechanisms of glyphosate-resistance in a naturally occurring glyphosate-resistant plant *Dicliptera chinensis*. *Plant Sci* 163, 543-554
- [345] Zarembinski TI, Theologis A (1994) Ethylene biosynthesis and action: A case of conservation. *Plant Mol Biol* 26, 1579-1597
- [346] Zdobnov EM, Apweiler R (2001) InterProScan - an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics application note* 18, 847-848
- [347] Zhao J, Weaver LM, Herrmann KM (2002) Translocation of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase precursor into isolated chloroplasts. *Planta* 216, 180-186
- [348] Zhu C (2005) Effects of abiotic stimuli and the phytohormone ABA on the expression of the aquaporin gene family in maize roots. Dissertation, LMU München
- [349] Zielke H (1994) Phenolische Inhaltsstoffe in Blättern der Buche und ihre Bedeutung im Rahmen der neuartigen Waldschäden. Dissertationsverlag NG Kopierladen GmbH, München

- [350] Zielke H, Sonnenbichler J (1990) Natural occurrence of 3,3',4,4'-tetramethoxy-1,1'-biphenyl in leaves of stressed European beech. *Naturwissenschaften* 77, 384-385
- [351] Zierl B (2002) Relations between crown condition and ozone and its dependence on environmental factors. *Environ Pollut* 119, 55-68
- [352] Zinser C (1996) Induktion der Gene der Zimtalkohol-Dehydrogenase und der Stilbensynthese durch Ozon und UV-B in der Kiefer (*Pinus sylvestris* L.). Dissertation, LMU München

# 6. Anhang

## 6.1 Abkürzungsverzeichnis

26SrRNA	=	26S ribosomale RNA
1xO <sub>3</sub>	=	Ambiente Ozonkonzentration
2xO <sub>3</sub>	=	Doppelt ambiente Ozonkonzentration
ACC	=	1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure
AccNr	=	Akzessionsnummer der Gendatenbank
ACO	=	ACC Oxidase
ACS	=	ACC Synthase
<i>A. errabunda</i>	=	<i>Apiognomonina errabunda</i>
AFLP	=	Amplified Fragment Length Polymorphism
AOT40	=	Akkumulierte Ozondosis über einer Konzentration von 40 $nl/l[\mu/l \cdot h]$
Blastn	=	Basic Local Alignment Search Tool (Nukleotid-Nukleotid)
bp	=	Basenpaare
CDNB	=	1-Chloro-2,4-dinitrobenzen
CM	=	Chorismat Mutase
COMT	=	Kaffeesäure <i>O</i> -Methyltransferase
CS	=	Chorismat Synthase
CTAB	=	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromid
d	=	Tage
DAB	=	3,3-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
DAHPh	=	3-Deoxy- <i>D</i> -arabino-heptulose-7-Phosphat
DAHPS	=	3-Deoxy- <i>D</i> -arabino-heptulose-7-Phosphat Synthase
ddH <sub>2</sub> O	=	Doppelt destilliertes Wasser
DHQ	=	3-Dehydroquinat
DHQD/SD	=	3-Dehydroquinat Dehydratase / Shikimat Dehydrogenase
DHQS	=	3-Dehydroquinat Synthase
DNA	=	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	=	Äquimolare Mischung der desoxy-Nukleotide dATP, dCTP, dGTP, dTTP
DTT	=	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	=	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	=	Ethylen glycol bis( $\beta$ -aminoethyl ether) N,N,N',N'-tetraacetic acid
EPSP	=	5-Enolpyruvylshikimat 3-Phosphat
EPSPS	=	5-Enolpyruvylshikimat 3-Phosphat Synthase
FE	=	Flächeneinheit
FG	=	Frischgewicht
<i>Fs</i>	=	<i>Fagus sylvatica</i> L.
GA	=	Gentisinsäure
GSH	=	Glutathion
h	=	Stunden
HPLC	=	High performance liquid chromatography
IAA	=	Isoamylalkohol
IPTG	=	Isopropyl-1-thio- $\beta$ - <i>D</i> -Galactopyranosid
ITS	=	Internal transcribed spacer
$\lambda$ M	=	Lambda DNA/ <i>Eco</i> 47I ( <i>Ava</i> II) Marker 13
min	=	Minuten
MW	=	Mittelwert

O <sub>3</sub>	=	Ozon
PAGE	=	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	=	Polymerase Kettenreaktion
PEG	=	Polyethylenglycol
POX	=	Peroxidase
PR1	=	Pathogenesis related protein 1
PVPP	=	Polyvinylpyrrolidon
PWI	=	Paarweise Identität
qRT-PCR	=	Quantitative Realtime-PCR
QTL	=	Quantitative Trait Loci
RACE	=	Rapid Amplification of cDNA Ends
RAPD	=	Random Amplified Polymorphic DNA
rbcL	=	Große Untereinheit der RUBISCO
rbcS	=	Kleine Untereinheit der RUBISCO
RNA	=	Ribonukleinsäure
RUBISCO	=	Ribulose-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase
SA	=	Salicylsäure
SD	=	Shikimat Dehydrogenase
SDS	=	Sodium Dodecyl Sulfat
SFB 607	=	Sonderforschungsbereich 607
SK	=	Shikimat Kinase
SUM0	=	Akkumulierte Ozonosis im Beobachtungszeitraum [ $\mu/l \cdot h$ ]
TEMED	=	N,N,N,N-Tetramethyl-Ethylendiamin
Tris	=	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

## 6.2 Nukleotid- und Aminosäure-Sequenzen

### Oligonukleotide

**Tabelle 6.2:** Oligonukleotid-Sequenzen

Primer	Nukleotid-Sequenz (5' - 3')
26S rRNA-qpcr-f	CGGCTCTTCC TATCATTGTG
26S rRNA-qpcr-r	AACCTGTCTC ACGACGGTCT
ACO1-qpcr-f	CTGGTGGGAT CATCTTACTC
ACO1-qpcr-r	CAATAGAATG GCGCATAGGG
ACO2-qpcr-f	GAAGGAAGTG TGACATAGCT
ACO2-qpcr-r	GAAAACCCTT CTTCTTGTAG
ACS1-qpcr-f	GGTCTTCACT GAAGGTCTTG
ACS1-qpcr-r	CTGCTCTTTG AGTAGGTGAC
ACS2-qpcr-f	TCCAAACCGC ATAGTCATGG
ACS2-qpcr-r	TGGTGAGGGC ACAAGAAAAG
ACS-d-f	TCTTTCARGA YTATCATGGM TTGCC
ACS-d-r	GGGVTTCCCT GGMVYAGRG TYGGC
Apio-qpcr-f	TTTGTGAATA CTACCTAAAATG
Apio-qpcr-r	AGATGATATT ACAAAAACAAGAGT
CM-3R-gsp1	GACAGGAAAA AACTGATGGA TATGC
CM-3R-gsp2	CAGTGAATGT AGAGGAAGAT GAAGC
CM-5R-rgsp1	TGTGTCACAA ACAGCAGTTG ATCCGC
CM-5R-rgsp2	CCTTCCTCAA CTAATCTCGG GATGAG
CM-5R-rgsp3	TTGTAAAGGT GGCAACAATG GGTCCG
CM-d-f	MAGGTTGGKA GRTWYAAGAG YCC
CM-d-r	CTCYTTKGT ARMGGCATGA TYC
CM-GW-f	GGGGACAAGT TTGTACAAAA AAGCAGGCTT CATGGAGGCC AAAGTGTAG G
CM-GW-r	GGGGACCACT TTGTACAAGA AAGCTGGGTC TCAATCCAAC CTCTAAGCA G

Tabelle 6.2: Oligonukleotid-Sequenzen - Fortsetzung

Primer	Nukleotid-Sequenz (5' - 3')
CM-qpcr-f	GGCCAAAAC TATGCCAAG
CM-qpcr-r	CCCCATATAG ATCAGCAACC
COMT-qpcr-f	TGCGGTTTGT GTCACATGAG
COMT-qpcr-r	TGTTGGTGGT GGAAGTGGGA
CS-3R-gsp1	AACCAACCGC TCTGGCGGGA TACAG
CS-3R-gsp2	CTACTATTTC AAGGAAGCAG CAAAC
CS-5R-rgsp1	AGCAAATATC TCTGTTCTG CGAGGC
CS-5R-rgsp2	AAGGATTTTC TTGGCAACAG CCCCAG
CS-5R-rgsp3	TTCTCTTGCT GAAGATCCAC CACCAC
CS-d-f	GATCAGMGAG GAMWTGAYTA CAGTG
CS-d-r	CCATSGCTTC MACCATTTGGM ACAGC
CS-GW-f	GGGGACAAGT TTGTACAAAA AAGCAGGCTT CATGGCATCC TCGTCTCTCT C
CS-GW-r	GGGGACCACT TTGTACAAGA AAGCTGGGTC TCAAAGGGT ACATGGGCTG
CS-qpcr-f	GTTGACCTTG ACAGAAGGAG
CS-qpcr-r	CATTCCTTCA GAAACGCCTG
DAHPS1-qpcr-f	CGATGCAGAG GCTTAGTGAA
DAHPS1-qpcr-r	GTCCCGCAGC AGCCATGAAA
DAHPS2-qpcr-f	CTATGCAGAG AGTCACCCAT
DAHPS2-qpcr-r	GCCCCGCAAC ACCCATGAA
DAHPS3-GW-f	GGGGACAAGT TTGTACAAAA AAGCAGGCTT CATGGCTCTC ACAAGCAGTA G
DAHPS3-GW-r	GGGGACCACT TTGTACAAGA AAGCTGGGTC CTATGGGGAA AAAGATTGCT G
DAHPS3-qpcr-f	CTATGCAGAG GGTCACCTCAG
DAHPS3-qpcr-r	GTCCAGCAGC AGACATAAAT
DAHPS-3R-gsp1	GGGAGCTGAA AACATGAGAG TGAAG
DAHPS-3R-gsp2	CACTATAAAG GCTCCCTGCG GTCTG
DAHPS-5R-rgsp1	CGCCATTCTT CCAACCTTGA CAACAG
DAHPS-5R-rgsp2	ACCTTGACAA CAGGCATTTG ACCACC
DAHPS-5R-rgsp3	CGACACCCAT TTGGAGAAGG ATTCTG
DAHPS-d-f	ATCAAGGTKG GWAGRATGGC
DAHPS-d-r	CTYCCTTCTT GATCATGVAC
DAHPS-I123-f	YGAGCAGGGR GATAGGTACC
DAHPS-I123-r	GAKGTCCAGA AMTCWGTGT
DAHPSIso123-d-f	ATCAAGGTKG GWAGRATGGC
DAHPSIso123-d-r	CTYCCTTCTT GATCATGVAC
DAHPS-qpcr-f	GACATCCCAT GAATGCTTGC
DAHPS-qpcr-r	CCAGATAAAA TGGGCTGAGC
DHQD/SD-3R-gsp1	GGGGCTGGAG GTGCTGGCAA GGCAC
DHQD/SD-3R-gsp2	TTGCTGATAC TGTGGAGGA CAAGC
DHQD/SD-5R-rgsp1	AACTGTCCAA TCGGATCTCC ACAAGG
DHQD/SD-5R-rgsp2	TCGGCACCAC CTTGTTTTGC CTTATC
DHQD/SD-5R-rgsp3	TCACCATCTT ATCAACCGAT TCCGCC
DHQD/SD-d-f	GGAAGGKGGT MAGTATGMWG GTG
DHQD/SD-d-r	GGSGTMTGMT CAACMTTGTG TTG
DHQD/SD-GW-f	GGGGACAAGT TTGTACAAAA AAGCAGGCTT CATGGATTCT ACCAACGTTT TG
DHQD/SD-GW-r	GGGGACCACT TTGTACAAGA AAGCTGGGTC TTAGTATTTT GCCATAATTT TC
DHQD/SD-qpcr-f	CTGGTAAGCT CTTTGTGGTC
DHQD/SD-qpcr-r	GTGCGATTGG CAATCACAAAC
DHQS-3R-gsp1	TGAATTTTTT GAGTGGCAGG AGAAG
DHQS-3R-gsp2	GGAAAGTGA CTGAGGGCAA CACTG
DHQS-5R-rgsp1	CACCAATCAC ACCACCTCCA AGGGC
DHQS-5R-rgsp2	GTACTTCTCA CCATCCGGTA AAATC
DHQS-5R-rgsp3	TTATCATTAG TAACTACAAG AACCC
DHQS-d-f	CGKAGYTAYC CGATYTAYAT YGG
DHQS-d-r	CSGCRACSGC YTCYCCATGR AGC
DHQS-GW-f	GGGGACAAGT TTGTACAAAA AAGCAGGCTT CATGGCTTCC ACCGCCAACC C
DHQS-GW-r	GGGGACCACT TTGTACAAGA AAGCTGGGTC TCAGGGCTTA ACAAATGCAC
DHQS-qpcr-f	GGCTAAGTTG CCTACTTTCC
DHQS-qpcr-r	GAGCCTTAGT AGTCCATCAG
EPSPS-3R-gsp1	GGAGAGTGAA AGAGACAGAA CGGATG
EPSPS-3R-gsp2	GAAGCTGGGA GCAACAGTTG AAGAAG
EPSPS-5R-rgsp1	GAATTTCCAC CTGCAACGGT AACTGC
EPSPS-5R-rgsp2	CGCATTGCTG TTCCTGCATT TCCAAG



Tabelle 6.2: Oligonukleotid-Sequenzen - Fortsetzung

Primer	Nukleotid-Sequenz (5' - 3')
EPSPS-5R-rgsp3	TGCCTTGCT TCTTCCACAC GTAGTC
EPSPS-d-f	AATCGKATYC TSCTTCTYGC
EPSPS-d-r	TTRATRGTSA YTGGAACATC
EPSPS-GW-f	GGGGACAAGT TTGTACAAAA AAGCAGGCTT CATGGCTCAA GTGAGCAAAA TC
EPSPS-GW-r	GGGGACCACT TTGTACAAGA AAGCTGGGTC TCAATGCTTT GTAAACCTCT G
EPSPS-qpcr-f	GCTGTAGTTG CCCTTTTTGC
EPSPS-qpcr-r	GTTCTGTGCA AACGCAATC
GR5 <sup>np</sup>	GGACTGAC AUGGACTGAA GGAGTA
GR5 <sup>p</sup>	CGACTGGAGC ACGAGGACAC TGA
GR-RNA-Oligo	CGACUGGAGC ACGAGGACAC UGACAUGGAC UGAAGGAGUA GAAA
M13f	TGTA AACGA CGCCAGT
M13r	CAGGAAACAG CTATGACC
oligo-dT(15)	TTTTTTTTTT TTTTT
POX-qpcr-f	CCTTCCGCAT TGCTTGTTGA
POX-qpcr-r	TCCAAGTGAG CAGGAGGCAC
PR1-qpcr-f	AGAGGAAGTT AAGGCTGGTA
PR1-qpcr-r	ACACAAGGTT TAGTTGTAGG
rbcL-qpcr-f	CTGGTACATG GACAACTGTG
rbcL-qpcr-r	CTTTCTTCTC CAGCAACTGG
rbcS-d-f	TGGCYTSYTC HATGATTTC
rbcS-d-r	GGAGGCTTGT ARGCRATGAA
rbcS-qpcr-f	ATGATGGACG TFACTGGGTG
rbcS-qpcr-r	GGATAAGTCT TACTGGCCTC
SK-3R-gsp1	CGTTGGTGGG GCAGGATGTT GATGC
SK-3R-gsp2	ATCGACTTGT TGTTTCTACT GGTGG
SK-5R-rgsp1	GCATCAAAGA CAGCTTTCGC AGTACC
SK-5R-rgsp2	TCTCTGAAGA AGCCCTCTCC ATAGAG
SK-5R-rgsp3	TTGCATCAAC ATCCTGCTCC ACCAAC
SK-d-f	GATGGGYTSY GGRAAAAC
SK-d-r	WGCYAADGCT TCTARAGG
SK-GW-f	GGGGACAAGT TTGTACAAAA AAGCAGGCTT CATGGACGGT AAAGTTGCAA ATG
SK-GW-r	GGGGACCACT TTGTACAAGA AAGCTGGGTC CTACAATGCA AAATCTCCAT TC
SK-qpcr-f	GGTTTCCTTG GAAGACGTTG
SK-qpcr-r	GCCCTCGATT TGTTCAAGTG
SSHnP1	TCGAGCGGCC GCCCGGCAG GT
SSHnP2R	AGCGTGGTCG CGGCCGAGGT

### Nukleinsäure- und abgeleitete Aminosäure-Sequenzen der klonierten putativen Gene aus dem Shikimatstoffwechsel der Buche

1	K V G R	M A G Q F	A K P R S	D Q F E E	K D G V K	25
1	NTC AAG GTG GGA AGG	ATG GCT GGT CAG TTT	GCG AAG CCA AGA TCG	GAT CAA TTT GAG GAG	AAG GAT GGT GTG AAG	75
26	L P V Y K	G D N I N	G D N F D	L K S R T	P D P Q R	50
76	CTC CCA GTT TAC AAA	GGG GAC AAC ATA AAT	GGT GAT AAT TTT GAT	TTG AAA TCA AGG ACT	CCT GAC CCT CAG AGG	150
51	L I R A Y	S Q S A A	T L N L L	R A F A T	G G Y A S	75
151	TTG ATT AGG GCT TAT	AGC CAA TCT GCG GCG	ACT CTC AAC CTT CTA	AGG GCC TTT GCC ACT	GGA GGA TAT GCC TCG	225
76	M Q R L S	E W N L D	F A E H S	E Q G D R	Y Q E L A	100
226	ATG CAG AGG CTT AGT	GAA TGG AAT CTT GAT	TTC GCG GAG CAT AGC	GAG CAG GGA GAT AGG	TAC CAG GAA CTG GCT	300
101	H R V D E	A L G F M	A A A G L	T V D H P	V M R T T	125
301	CAC CGT GTT GAT GAG	GCC CTA GGT TTC ATG	GCT GCT GCG GGA CTA	ACG GTT GAC CAC CCT	GTG ATG AGA ACA ACT	375
126	D F W T S	H E C L H	L P Y E Q	S L T R K	D S T S G	150
376	GAT TTC TGG ACC TCC	CAT GAG TGT TTG CAT	TTG CCT TAT GAG CAA	TCA CTC ACT AGG AAG	GAC TCC ACT TCC GGT	450
151	L Y Y D C	S A H M V	W V G E R	T R Q L D	G A H V E	175
451	CTG TAC TAC GAT TGC	TCT GCT CAC ATG GTT	TGG GTT GGG GAG CGT	ACC CGG CAA CTG GAT	GGT GCC CAC GTA GAG	525
176	F L R G V	A N P L G	I K V S N	K M D P K	D L V N L	200
526	TTC CTT AGA GGA GTT	GCC AAT CCC CTT GGC	I K V S N	K M D P K	D L V N L	600
201	I E I L N	P H N K P	G R I T I	I A R M G	A E N M R	225
601	ATT GAG ATC CTG AAT	CCC CAT AAC AAG CCA	GGA AGG ATC ACA ATA	ATT GCA AGA ATG GGT	GCT GAG AAC ATG AGA	675
226	V K F P H	M I R A V	R R A G Q	I V T W V	C D P M H	250
676	GTT AAG TTT CCC CAT	ATG ATC AGG GCT GTC	CGC AGG GCT GGG CAA	ATT GTG ACC TGG GTC	TGT GAT CCA ATG CAT	750
251	G N T I K	A P C G L	K T R P F	D A I R A	E V R A F	275
751	GGA AAC ACC ATA AAG	GCT CCC TGC GGT CTG	AAA ACT CGC CCC TTC	GAT GCC ATC AGG GCG	GAG GTG AGA GCG TTC	825
276	F D V H D					
826	TTT GAT GTC CAT GAT	CA				842

**Tabelle 6.3:** cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz des klonierten Fragments der putativen 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat 7-Phosphat Synthase Isoform 1 (*Fs-DAHPS1*) aus der europäischen Buche. AccNr = DQ166519.

1	K V G R	M A G Q F	A K P R S	D S F E E	K D G V K	25
1	NTC AAG GTG GGG AGA	ATG GCG GGT CAG TTT	GCA AAG CCA AGA TCA	GAT TCA TTT GAG GAG	AAG GAT GGA GTG AAG	75
26	L P S Y R	G D N I N	G D A F D	S E S R I	P D P D R	50
76	CTG CCA AGT TAC AGA	GGT GAC AAT ATC AAT	GGT GAT GCA TTT GAT	TCA GAA TCA AGA ATT	CCA GAC CCT GAT AGG	150
51	M I R A Y	C Q S V A	T L N L L	R A F A T	G G Y A A	75
151	ATG ATT AGG GCC TAT	TGC CAA TCA GTC GCA	ACT TTG AAC CTC TTG	AGG GCA TTT GCC ACT	GGA GGA TAT GCA GCT	225
76	M Q R V T	H W N L D	F M E H S	E Q G D R	Y R E L A	100
226	ATG CAG AGA GTC ACC	CAT TGG AAT CTT GAT	TTC ATG GAG CAC AGT	GAG CAG GGG GAT AGG	TAC CGT GAA TTG ACT	300
101	H R V D E	A L G F M	G V A G L	T A E H P	I M T T T	125
301	CAC CGA GTT GAT GAG	GCC CTT GGC TTC ATG	GGT GTT GCC GGG CTT	ACT GCT GAG CAC CCA	ATC ATG ACC ACA ACA	375
126	D F W T S	H E C L L	L P Y E Q	A L T R E	D S T S G	150
376	GAT TTC TGG ACA TCT	CAT GAA TGC TTA CTT	CTG CCT TAT GAG CAA	GCA CTT ACA AGA GAG	GAT TCT ACT TCT GGG	450
151	L Y Y D C	S A H M L	W V G E R	T R Q L D	G A H V E	175
451	CTG TAC TAT GAT TGC	TCT GCT CAC ATG CTT	TGG GTG GGA GAA CGC	ACC CGC CAA CTT GAT	GGT GCC CAT GTC GAG	525
176	F L R G V	S N P L G	I K V S D	K M D P N	E L V R L	200
526	TTT TTG AGA GGA GTT	TCG AAT CCT CTT GGC	ATC AAG GTG AGT GAC	AAA ATG GAT CCA AAT	GAG CTT GTT AGG CTC	600
201	I D I L N	P K N K A	G R I T V	I V R M G	A E N M R	225
601	ATA GAC ATT CTA AAC	CCT AAA AAT AAA GCA	GGA AGA ATA ACG GTA	ATT GTA AGA ATG GGA	GCT GAG AAC ATG AGA	675
226	V K L P H	L I R A V	R R A G Q	F V T W V	S D P M H	250
676	GTG AAG CTT CCT CAT	CTG ATC AGA GCC GTC	CGT AGA GCA GGT CAA	TTT GTC ACT TGG GTT	AGT GAC CCC ATG CAT	750
251	G N T I K	A P C G L	K T R S F	D A I R A	E V R A F	275
751	GGG AAT ACC ATT AAA	GCT CCT TGT GGA CTT	AAA ACC CGG TCT TTC	GAT GCA ATC AGG GCT	GAG GTG AGA GCA TTC	825
276	F D V H D					
826	TTT GAT GTA CAT GAT	CA				842

**Tabelle 6.4:** cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz des klonierten Fragments der putativen 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat 7-Phosphat Synthase Isoform 2 (*Fs-DAHPS2*) aus der europäischen Buche. AccNr = DQ166520.

1	TGG ACA CTG ACA TGG	ACT GAA GGA GTA GAA	AAA ATC TCT CTC TCT	CTC CCT CTC TCT CTC	TCT CTC TCT CTC TCT	75
					M	1
76	CTC TCT GTT TTT CAT	AAT ATT TAA TTT TAC	TAC TAC CAA GAG AGA	GAA GGG AAA TTA AAA	CCC AAA AAA GCA ATG	150
2	A L T S S	S G S S V	V I P T K	S F I Q T	Q S L V P	26
151	GCT CTC ACA AGC AGT	AGC GGA AGC AGT GTT	GTG ATT CCC ACC AAA	TCC TTC ATT CAA ACC	CAA TCT TTG GTA CCT	225
27	S L K S H	Q P S F S	I K P R S	L P S I S	A V H A A	51
226	TCT CTC AAA TCC CAC	CAA CCT TCC TTT TCA	ATC AAA CCC AGA TCA	CTC CCT TCA ATC TCA	GCC GTC CAC GCC GCT	300
52	E P A K N	P I V S D	K P V K Q	Q I T P T	T T K T T	76
301	GAG CCT GCT AAG AAC	CCC ATC GTC TCT GAT	AAG CCG GTG AAG CAG	CAA ATA ACA CCG ACG	ACG ACG AAA ACG ACG	375
77	T S T H N	A V P G K	W T L E S	W K T K K	A L Q L P	101
376	ACG TCG ACT CAC AAT	GCG GTT CCG GGG AAG	TGG ACC TTG GAG AGC	TGG AAG ACA AAG AAG	GCG CTT CAG CTT CCT	450
102	E Y P D Q	E A F N S	V L E T L	E A F P P	I V F A G	126
451	GAG TAT CCG GAT CAG	GAA GCG TTT AAC TCG	GTG CTT GAG ACA CTC	GAG GCT TTC CCT CCG	ATT GTT TTC GCT GGT	525
127	E A R N L	E E K L G	E A A M G	N A F L L	Q G G D C	151
526	GAG GCT AGG AAC CTA	GAG GAG AAG CTG GGT	GAG GCT GCC ATG GGA	AAC GCT TTT CTT CTT	CAA GGT GGT GAT TGC	600
152	A E S F K	E F N A N	N I R D T	F R I L L	Q M G V V	176
601	GCT GAG AGC TTC AAG	GAA TTC AAT GCA AAT	AAC ATT CGT GAC ACT	TTC AGA ATC CTT CTC	CAA ATG GGT GTC GTT	675
177	L M F G G	Q M P V V	K V G R M	A G Q F A	K P R S D	201
676	TTG ATG TTC GGT GTC	CAA ATG CCT GTT GTC	AAG GTT GGA AGA ATG	GCG GGT CAG TTT GCA	AAG CCA AGA TCA GAT	750
202	P F E E K	N G V K L	P S Y R G	D N V N G	D A F D E	226
751	CCA TTT GAA GAG AAG	AAC GGT GTG AAA TTA	CCG AGT TAC AGA GGG	GAC AAT GTG AAC GGT	GAC GCT TTC GAC GAG	825
227	K S R T P	D P Q R L	I R A Y C	Q S A A T	L N L L R	251
826	AAG TCG AGG ACC CCA	GAC CCT CAG AGG TTG	ATT AGG GCT TAT TGT	CAA TCT GCA GCT ACT	TTG AAC CTT CTC AGG	900
252	A F A T G	G Y A A M	Q R V T Q	W N L D F	T E H S E	276
901	GCC TTT GCT ACA GGA	GCC TAT GCT ACT ATG	CAG AGG GTC ACT CAG	TGG AAT TTG GAT TTC	ACG GAG CAC ACG GAG	975
277	Q G D R Y	R E L A H	R V D E A	L G F M S	A A G L T	301
976	CAG GGA GAT AGG TAC	CGG GAA CTA GCT CAT	CGG GTT GAT GAG GCC	CTT GGA TTT ATG TCT	GCT GCT GGA CTC ACA	1050
302	V D H P I	M T T T E	F W T S H	E C L L L	P Y E Q S	326
1051	GTG GAC CAT CCT ATC	ATG ACA ACA ACT GAG	TTC TGG ACA TCC CAT	GAA TGC TTG CTC TTG	CCA TAT GAG CAA TCG	1125
327	L T R M D	S T S G L	Y Y D C S	A H F I W	V G E R T	351
1126	CTT ACT AGG ATG GAT	TCA ACT TCA GGC CTT	TAC TAT GAC TGC TCA	GCC CAT TTT ATC TGG	GTT GGG GAA CGT ACC	1200
352	R Q L D G	A H I E F	L R G V A	N P L G I	K V S D K	376
1201	AGG CAG CTG GAT GGT	GCC CAT ATT GAG TTT	CTA AGA GGG GTT GCT	AAT CCC CTA GGC ATT	AAG GTG AGT GAT AAG	1275
377	M D P N E	L V K L I	E I L N P	Q N K P G	R I T V I	401
1276	ATG GAT CCT AAT GAG	CTT GTC AAG CTC ATT	GAG ATT TTG AAT CCT	CAG AAC AAA CCT GGG	AGG ATT ACA GTG ATC	1350
402	T R M G A	E N M R V	K L P H L	I R A V R	R A G Q I	426
1351	ACA AGA ATG GGA GAT	GAA AAC ATG AGA GTG	AAG CTT CCT CAT CTA	ATT AGG GCA GTC CGC	AGA GCA GGT CAA ATT	1425
427	V T W V S	D P M H G	N T I K A	P C G L K	T R P F D	451
1426	GTC ACA TGG GTT AGT	GAT CCT ATG CAT GGA	AAC ACT ATA AAG GCT	CCC TGC GGT CTG AAA	ACT CGC CCC TTC GAT	1500
452	A I R A E	V R A F F	D V H D Q	E G S H P	G G V H L	476
1501	GCC ATC AGG GCG GAG	GTG AGA GCG TTC TTT	GAT GTG CAT GAC CAA	GAA GGA AGC CAT CCT	GGAGGA GTT CAT TTA	1575
477	E M T G Q	N V T E C	I G G S R	T V T F D	D L S S R	501
1576	GAG ATG ACA GGC CAG	AAC GTG ACA GAG TGC	ATT GGT GGG TCA CGA	ACG GTG ACT TTT GAT	GAC CTA AGT TCA CGT	1650
502	Y H T H C	D P R L N	A S Q S L	E L A F I	I A E R L	526
1651	TAC CAC ACC CAC TGT	GAC CCT AGG CTC AAT	GCT TCA CAA TCT CTT	GAG CTT GCC TTC ATT	ATT GCT GAG CGC CTG	1725
527	R K T R I	R S Q Q S	F S P *			
1726	AGA AAG ACC AGG ATC	AGA TCT CAG CAA TCT	TTT TCC CCA TAG GGA	TCT ACA TTC TAC AAT	GAG GCT TTA AGA GCT	1800
1801	TCC CAC CAA TAT GTT	TGC TCT TTT TCT TAA	GTT AGT CGT GGT TGT	ATT TGC ACT ATC GGA	TTT TTT TAG TTA TTT	1875
1876	TGT TGT GTA TTG TAT	GTA TAC TAA AGG GAA	GTG ATG GTT TGA GAC	TAT GGA AGC AAA TTG	GAA TAA ATG CAT AAC	1950
1951	AAT ATA TTT ATT CCA	TAA GAAAAA AAAAA	AAAAA AAAAA			1989

**Tabelle 6.5:** cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz der putativen 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat 7-Phosphat Synthase Isoform 3 (*Fs-DAHPS3*) aus der europäischen Buche. AccNr = DQ166521.



1	GAA AAA AAA CAC AAA	M D S T GCA ATG GAT TCT ACC	N V L L A AAC GTT CTG CTT GCT	S S S A S TCT TCT TCT GCT AGC	L Q I G G TTA CAA ATT GGA GGA	19 75
20	G E I R K	N P T L V	C A P I M	A E S V D	K M V I N	44
76	GGAGAA ATA AGG AAG	AAT CCA ACA CTA GTT	TGT GCT CCT ATA ATG	GCG GAA TCG GTT GAT	AAG ATG GTG ATT AAT	150
45	M D K A K	Q G G A D	L V E I R	L D S L K	S F N P N	69
151	ATG GAT AAG GCA AAA	CAA GGT GGT GCC GAC	CTT GTG GAG ATC CGA	TTG GAC AGT TTG AAG	AGC TTC AAT CCT AAT	225
70	G D L K T	L I K E C	P L P T L	F T Y R P	K W E G G	94
226	GGA GAT CTC AAA ACC	CTA ATT AAA GAG TGT	CCA TTG CCC ACA CTA	TTC ACT TAC AGA CCA	AAA TGG GAA GGT GGT	300
95	Q Y D G D	E K K R L	D A L R L	A M E F G	A D Y I D	119
301	CAG TAT GAT GGT GAT	GAA AAG AAG CGA TTG	GAT GCC CTT CGA TTA	GCC ATG GAG TTT GGA	GCT GAT TAC ATT GAT	375
120	V E L Q V	A Q E F N	E S I Y G	K K P E M	F K V I V	144
376	GTT GAG CTT CAG GTT	GCT CAA GAG TTC AAT	GAA TCC ATT TAT GGA	AAG AAG CCT GAA ATG	TTC AAA GTT ATT GTA	450
145	S S H N Y	Q N T P S	V E D L G	N L V A R	I Q A T G	169
451	TCT TCT CAC AAT TAT	CAA AAT ACT CCA TCT	GTG GAG GAT CTA GGC	AAT CTT GTG GCA AGA	ATA CAA GCA ACT GGT	525
170	A D I V K	F A T T A	L E I T D	V A R I F	Q I I V H	194
526	GCT GAT ATA GTG AAG	TTT GCA ACA ACT GCC	TTG GAT GCC ACT GAT	GTG GCA CGC ATT TTC	CAA ATA ATT GTG CAT	600
195	S Q V S S	V P I I A	I V M G E	R G F I S	R I L C P	219
601	TCT CAA GTA AGC AGC	GTT CCA ATT ATA GCA	ATT GTT ATG GGT GAG	AGG GGT TTC ATC TCA	CGG ATA CTA TGT CCA	675
220	K F G G F	L S F G T	I E S G I	V S A P G	Q P I M K	244
676	AAA TTT GGT GGT TTT	CTC TCG TTT GGT ACC	ATT GAG TCA GGA ATA	GTT TCA GCT CCT GGT	CAA CCA ATA ATG AAG	750
245	D L L H L	Y N F R Q	I G P D T	K V F G I	I G K P V	269
751	GAT CTT TTA CAT CTA	TAC AAC TTC AGA CAG	ATC GGG CCA GAT ACG	AAA GTG TTT GGC ATA	ATT GGG AAA CCC GTT	825
270	G H S K S	P I L Y N	E A F K S	V G F N G	V Y V L S	294
826	GGC CAC AGC AAA TCA	CCT ATT TTA TAC AAT	GAA GCA TTC AAG TCA	GTT GGT TTC AAT GGA	GTT TAT GTC CTT TCT	900
295	W W M T C	K I S P D	L L I L R	F A G F S	I T I P H	319
901	TGG TGG ATG ACA TGC	AAA ATT TCT CCA GAC	CTA CTC ATC CTC AGA	TTT GCT GGA TTC AGT	ATT ACA ATT CCT CAC	975
320	K E A A L	K C C D E	V D P V A	K S I G A	V N C I V	344
976	AAG GAG GCT GCT CTT	AAG TGT TGT GAT GAG	GTC GAT CCA GTT GCA	AAG TCA ATA GGA GCT	GTG AAT TGC ATG GTA	1050
345	R R S T D	G K I F G	Y N T D Y	V G A I S	A I E D G	369
1051	AGG AGA TCA ACT GAT	GGA AAG ATA TTT GGT	TAC AAT ACT GAC TAT	GTT GGT GCG ATT TCT	GCT ATT GAA GAT GGA	1125
370	L R G S K	N I S Y A	A D S P L	A G K L F	V V I G A	394
1126	CTA CGA GGT TCT AAA	AAT ATC AGC TAT GCT	GCT GAT TCG CCC TTA	GCT GGT AAG CTC TTT	GTG GTC ATT GGG GCT	1200
395	G G A G K	A L A Y G	A K E K G	A R V V I	A N R T Y	419
1201	GGA GGT GCT GGC AAG	GCA CTT GCG TAC GGT	GCA AAA GAA AAG GGA	GCT CGA GTT GTG ATT	GCC AAT CGC ACT TAT	1275
420	E R A K E	I A D T V	G G Q A L	S L A D L	E N F H P	444
1276	GAG CGA GCC AAA GAA	ATT GCT GAT ACT GTT	GGAGGACAA GCT TTA	TCT CTT GCT GAT CTA	GAA AAT TTC CAT CCA	1350
445	E D G M I	L A N T T	S I G M Q	P K V D E	T P I P K	469
1351	GAG GAT GGT ATG ATT	CTT GCA AAT ACA ACA	TCA ATT GGA ATG CAA	CCA AAA GTT GAT GAA	ACA CCC ATT CCT AAG	1425
470	H A L R S	Y S V V F	D A V Y T	P K I T R	L L R E S	494
1426	CAT GCT CTG AGA TCT	TAC TCA GTA GTT TTT	GAT GCT GTT TAC ACC	CCC AAA ATT ACT AGA	CTT TTG AGG GAA TCA	1500
495	E E S G A	I I V T G	V E M F I	G Q A F E	Q F E R F	519
1501	GAA GAA TCT GGA GCC	ATA ATT GTT ACA GGG	GTG GAG ATG TTC ATA	GGG CAG GCA TTT GAG	CAG TTC GAG AGG TTT	1575
520	T G L P A	P K E L F	K K I M A	K Y *		
1576	ACT GGG TTG CCT GCG	CCA AAG GAA CTT TTT	AAG AAA ATT ATG GCA	AAA TAC TAA TGA GGT	TTG TTT GGC TAC TCT	1650
1651	TTA CAT GCA GCT GAT	TCT TTT TTC CCT TGT	AGC TCA ATA TGA GCT	TCT TTT TCT GTT TCT	TTT ATC CTC GAG AAA	1725
1726	TTT AAT GCC AGT TAG	TTT CAT CTG TCA CTG	TTG ATT ATT TCA CAT	TGA TTA TAT TAG ACT	TTT ATT TCT ACG ATT	1800
1801	CAT ATT GGC TTT GAT	AAA GTT TCA AGG ATG	TTT ATG CGA GTA TTG	TAC CAC TCC CTT GCT	CTC TTT GAC TTG GTG	1875
1876	AGC AAT ATC TGT TGC	AAA AGT TAA TAT TGC	TAC ACT GCT GTG TTG	CGT TCT AAT TCG ATG	ATT AAG AGT GTA TTC	1950
1951	AAG CCT CTT AAT ATG	TGC TTT GAC CTC TTT	GTT TGG GGT GCA AGA	AGA ATG TGT AAT GTT	ATA CAT TCC TTA AAA	2025
2026	TAC TTT GTA ACT TCA	AAAAAAA AAAAAA	AAA AA			2060

**Tabelle 6.7:** cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz der putativen 3-Dehydroquinat Dehydratase / Shikimat Dehydrogenase (*Fs-DHQD/SD*) aus der europäischen Buche. AccNr = DQ166523.

1	TGA AGA TTG ATT TGA	AGT TAT TAG AGA AAA	M D G K TCA ATG GAC GGT AAA	V A N G L GTT GCA AAT GGT TTG	V V S P R GTG GTT TCG CCG CGG	14 75
15	I G S E R	F A R R T	C G S V R	V S R R F	R E Q D R	39
76	ATC GGT TCG GAG AGA	TTC GCG AGG AGA ACC	TGT GGT TCC GTA CCG	GTT TCT CGG CGA TTC	AGA GAG CAA GAT AGG	150
40	L P V L V	S A Q L Q	D K T R N	S N W H K	T A S L E	64
151	CTT CCG GTG CTA GTC	TCT GCT CAG CTT CAG	GAT AAA ACA AGG AAT	TCG AAT TGG CAC AAA	ACG GCG TCA TTG GAG	225
65	V S C S Y	K N F P A	S V L E S	G G I H A	P F D D A	89
226	GTT TCC TGT TCT TAT	AAG AAC TTT CCA GCT	TCA GTT TTG GAA TCT	GGAGGT ATT CAT GCT	CCT TTT GAT GAT GCT	300
90	L I L K N	K S Q E I	E P Y L S	G R C I Y	L V G M M	114
301	CTG ATT TTG AAG AAT	AAG TCA CAA GAG ATC	GAG CCA TAT TTA AGT	GGA CGC TGT ATA TAT	CTT GTT GGC ATG ATG	375
115	G S G K T	T V G K V	L S Q V L	S Y A F F	D S D T L	139
376	GGA TCT GGA AAA ACA	ACA GTG GGC AAG GTT	TTG TCA CAA GTA CTT	AGC TAT GCC TTT TTT	GAT AGT GAC ACG TTG	450
140	V E Q D V	D A N S V	A E I F N	L Y G E G	F F R D K	164
451	GTG GAG CAG GAT GTT	GAT GCA AAT TCT GTT	GCT GAA ATA TTC AAT	CTC TAT GGAGAG GGC	TTC TTC AGA GAT AAG	525
165	E T E V L	R K L S L	M H R L V	V S T G G	G A V V R	189
526	GAG ACT GAG GTA CTG	CGA AAG CTG TCT TTG	ATG CAT CGA CTT GTT	GTT TCT ACT GGT GGA	GGT GCA GTT GTT CGG	600
190	P I N W K	Y M Q K G	I S V W L	D V P L E	A L A R R	214
601	CCC ATC AAC TGG AAA	TAT ATG CAG AAG GGG	ATA AGT GTC TGG TTA	GAT GTT CCT TTG GAA	GCC TTG GCT CGT AGA	675
215	I A A V G	T G S R P	L L H H D	S G D A Y	T K T F M	239
676	ATT GCA GCT GTA GGA	ACT GGT TCT CGC CCC	CTT TTG CAT CAT GAT	TCG GGT GAT GCA TAC	ACA AAG ACT TTC ATG	750
240	R L T S L	M E E R S	E A Y A N	A N A R V	S L E D V	264
751	CGC CTG ACT TCT CTT	ATG GAG GAG AGG AGT	GAA GCA TAT GCA AAT	GCA AAT GCG CGG GTT	TCC TTG GAA GAC GTT	825
265	A A K L G	H R D V S	N L T P T	A I A I E	A L E Q I	289
826	GCA GCT AAA CTA GGA	CAC AGA GAT GTG TCC	AAT CTC ACG CCC ACT	GCC ATA GCA ATT GAG	GCA CTT GAA CAA ATC	900
290	E G F L K	E E N G D	F A L *			
901	GAG GGC TTT CTA AAG	GAA GAG AAT GGA GAT	TTT GCA TTG TAG TCC	AAG GAG CTT ATA TGT	ATG CGT AAT CAC TAG	975
976	TGA ATT C					982

**Tabelle 6.8:** cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz der putativen Shikimat Kinase (*Fs-SK*) aus der europäischen Buche. AccNr = DQ166524.

1	GAC ACT GAC ATG GAC	TGA AGG AGT AGA AGA	ATC CTT CTC AAT CTA	CTG GCC CAA AAA AGA	AAA CAA ATA CAC CAA	75
76	CCA CAC TAG TAC AAC	ATT TCC AGC GCA ACG	TAC AAG CAC TCA CAG	CAC AAA AAA AAA CAA	TCA TTC ATC ATC TTC	150
151	TCT CAA AAT TTC TGG	TAG CAG AGT TTG GTT	TGG TAA ACC CTC ATC	TGA GTG AGT CAA TTC	AAC AAA CAC CTA TTG	225
226	CAC CAA AAC CAA AAG	CTC CCT CAT ACA AAA	CGC ATT TGA GAA ATT	GAG AGT TAA AAG AGA	GAG AGA AAG CTC GAA	300
301	TTA GAG AAA ATG GCT	M A Q V S K I CAA GTG AGC AAA ATC	C S G A Q TGT AGT GGA GCT CAA	S T Q I F AGC ACC CAA ATC TTT	H N N P K CAC AAC AAT CCC AAA	22 375
23	P Q K P K	S I G F I	S F G S Q	L L G S S	T S W T L	47
376	CCC CAA AAA CCC AAA	TCT ATC GGT TTC ATC	TCT TTT GGG TCA CAG	TTG TTG GGC TCT TCA	ACG TCT TGG ACT TTG	450
48	K N K H V	C A V G S	A K V G T	F R V S A	S V A T A	72
451	AAG AAC AAG CAT GTT	TGC GCG GTG GGT AGT	GCT AAA GTT GGT ACA	TTT AGG GTT TCA GCT	TCA GTT GCC ACA GCT	525
73	E K P S T	V P E I V	L Q P I K	D I S G T	I K L P G	97
526	GAG AAA CCG TCA ACG	GTA CCG GAG ATC GTG	TTG CAA CCC ATC AAA	GAT ATC TCC GGT ACT	ATC AAG TTG CCA GGG	600
98	S K S L S	N R I L L	L A A L S	E G T T V	V D N L L	122
601	TCC AAA TCG CTT TCA	AAT CGG ATT CTG CTT	CTG GCT GCT CTC TCT	GAG GGA ACA ACT GTT	GTA GAC AAC TTG TTG	675
123	N S D D I	H Y M L G	A L K T L	G L R V E	E D K A I	147
676	AAT AGT GAT GAT ATT	CAT TAC ATG CTT GGT	GCA TTG AAA ACC CTA	GGA CTA CGT GTG GAA	GAA GAC AAG GCA ATA	750
148	K R A I V	E G C G G	L F P V G	K E S R D	E I Q L F	172
751	AAA AGA GCA ATT GTG	GAA GGA TGT GGC GGT	CTC TTT CCA GTG GGT	AAA GAA TCA AGG GAT	GAA ATT CAA CTT TTC	825
173	L G N A G	T A M R P	L T A A V	T V A G G	N S S Y V	197
826	CTT GGA AAT GCA GGA	ACA GCA ATG CCG CCA	TTG ACA GCT GCA GTT	ACC GTT GCA GGT GGA	AAT TCA AGC TAC GTA	900
198	L D G V P	R M R E R	P I G D L	V D G L Q	Q L G A N	222
901	CTC GAT GGG GTG CCC	CGA ATG AGA GAG AGA	CCA ATT GGG GAT TTA	GTC GAT GGT CTT CAG	CAG CTT GGT GCA AAT	975
223	V D C F L	G T K C P	P V R V F	G K G G L	P G G K V	247
976	GTT GAC TGT TTT CTT	GGC ACA AAG TGT CCC	CCT GTC CGT GTA TTT	GGG AAG GGG GGT CTT	CCA GGG GGT AAG GTA	1050
248	K L S G S	I S S Q Y	L T A L V	M A A P L	A L G D V	272
1051	AAG CTC TCT GGA TCT	ATT AGT AGT CAA TAC	TTG ACT GCT TTG GTG	ATG GCT GCT CCT CTT	GCT CTT GGA GAT GTG	1125
273	E I E I I	D K L I S	V P Y V E	M T L K L	M E R F G	297
1126	GAA ATA GAA ATC ATT	GAC AAA TTG ATT TCT	GTT CCT TAT GTT GAG	ATG ACT TTG AAG TTG	ATG GAA CGC TTT GGG	1200
298	I S V E H	N D S W D	R F L I R	G G Q K Y	K S P G N	322
1201	ATC TCT GTA GAA CAC	AAT GAT AGC TGG GAT	CGG TTC TTG ATC CGA	GGA GGT CAA AAG TAC	AAG TCT CCT GGA AAT	1275
323	A Y V E G	D A S S A	S Y F L A	G A A V T	G G T V T	347
1276	GCC TAT GTT GAA GGT	GAT GCT TCA AGT GCT	AGT TAC TTC TTA GCT	GGT GCA GCA GTC ACT	GGT GGG ACA GTT ACT	1350
348	V E G C G	T S S L Q	G D V K F	A E V L E	K M G A K	372
1351	GTT GAA GGT TGT GGG	ACA AGC AGT TTG CAG	GGA GAC GTA AAA TTC	GCC GAA GTT CTT GAG	AAG ATG GGT GCT AAA	1425
373	V T W S E	T S V T V	T G P P Q	D S S K K	K H L R A	397
1426	GAT ACC TGG TCA GAG	ACT AGT GTC ACC GTC	ACT GGA CCA CCG CAA	GAT TCT TCC AAA AAA	AAA CAC TTG CGA GCT	1500
398	I D V N M	N K M P D	V A M T L	A V V A L	F A D G P	422
1501	ATT GAT GTC AAC ATG	AAC AAA ATG CCG GAT	GTT GCC ATG ACT CTT	GCT GTA GTT GCC CTT	TTT GCC GAT GGA CCC	1575
423	T A I R D	V A S W R	V K E T E	R M I A V	C T E L R	447
1576	ACT GCT ATA AGA GAC	GTG GCG AGT TGG AGA	GTG AAA GAG ACA GAA	CGG ATG ATT GCC GTT	TGC ACA GAA CTC AGG	1650
448	K L G A T	V E E G P	D Y C V I	T P P E K	L N V T D	472
1651	AAG CTG GGA GCA ACA	GTT GAA GAA GGG CCA	GAT TAT TGT GTG ATC	ACT CCA CCA GAG AAA	CTC AAT GTG ACA GAT	1725
473	I D T Y D	D H R M A	M A F S L	A A C G D	V P V T I	497
1726	ATT GAC ACA TAT GAT	GAT CAC AGA ATG GCC	ATG GCA TTC TCA CTT	GCT GCC TGT GGA GAT	GTT CCT GTC ACC ATC	1800
498	N D P G C	T R K T F	P D Y F E	V L Q R F	T K H *	
1801	AAC GAC CCC GGT TGC	ACC CGG AAA ACA TTC	CCA GAC TAC TTT GAA	GTC CTC CAG AGG TTT	ACA AAG CAT TGA ATA	1875
1876	GCC CTT TAA AAT ATA	AAT GTG TGA AAG AAA	ATA TAA TCC CTG TCA	CTA CAA CCA AAG CGG	CAG GGA GCC ATC CCA	1950
1951	CCC TAT TTT TCT ATG	TTG CCT TGT AAT TTT	TTA TGA TAT GTA ATT	GCA AGT TGA GCT TGT	TGT TTG TAA GAC TAA	2025
2026	TTT AAT TTC TAC TTA	ATG CAT TCT CTC TCT	CAC TCT CTG GCA AAA	AAAAA AAA AAA AAA		2085

**Tabelle 6.9:** cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz der putativen 5-Enolpyruvylshikimat 3-Phosphat Synthase (*Fs-EPSPS*) aus der europäischen Buche. AccNr = DQ166525.

1	AAA AAT TTC ACC AAC	CCA TTT CTC TCT CTC	TGT TTC TCT CTT GTG	TTC TTT GTG AGA GAG	TGA TCC ATG GCA TCC	M A S	3
4	S S L S T	K P F L G	A S R I H	S F S R L	P S D L R		28
76	TCG TCT CTC TCA ACG	AAG CCA TTT CTT GGA	GCC TCA AGA ATT CAC	AGC TTC TCT CGA CTG	CCT TCA GAT CTT CGT		150
29	P S L H I	S F R T S	T P K K L	Q I Q A A	G S T H G		53
151	CCC TCC CTA CAC ATC	TCT TTC CGT ACA TCT	ACC CCC AAG AAG CTC	CAG ATT CAG GCT GCT	GGT AGT ACA CAT GGA		225
54	N Y F R V	T T F G E	S H G G G	V G C I I	D G C P P		78
226	AAC TAT TTT CGT GTA	ACG ACT TTT GGAGAA	TCT CAT GGGGGA GGT	GTT GGT TGT ATC ATT	GAT GGA TGC CCT CCT		300
79	R L P L S	E A D M Q	V D L D R	R R P G Q	S R I T T		103
301	AGA CTT CCC CTA TCA	GAA GCT GAT ATG CAA	GTT GAC CTT GAC AGA	AGG AGG CCA GGT CAG	AGT CGG ATT ACT ACG		375
104	P R K E T	D T C R I	L S G V S	E G M T T	G T P I A		128
376	CCA AGGAAG GAG ACT	GAT ACG TGT AGA ATA	CTT TCA GGC GTT TCT	GAA GGA ATG ACT ACT	GGC ACA CCA ATA GCT		450
129	V L V P N	T D Q R G	H D Y S E	M S I A Y	R P S H A		153
451	GTA CTT GTT CCC AAT	ACT GAT CAG AGA GGA	CAT GAT TAC AGC GAA	ATG TCA ATA GCT TAT	AGG CCT TCT CAT GCA		525
154	D A T Y D	M K Y G V	R A V Q G	G G R S S	A R E T I		178
526	GAT GCA ACT TAT GAC	ATG AAA TAT GGT GTC	AGA GCA GTG CAG GGT	GGT GGT AGA TCT TCA	GCA AGA GAA ACT ATT		600
179	G R V A A	G A V A K	K I L K S	L A G T E	I F A Y V		203
601	GGA AGA GTT GCT GCT	GGG GCT GTT GCC AAG	AAA ATC CTT AAG AGC	CTC GCA GGA ACA GAG	ATA TTT GCT TAT GTC		675
204	S Q V H K	V V L P E	D L V D P	Y T L T L	D Q I E S		228
676	TCT CAA GTT CAC AAG	GTT GTA CTT CCC GAG	GAT TTG GTT GAT CCT	TAC ACT CTG ACA CTT	GAT CAG ATT GAG AGT		750
229	N I V R C	P D P E Y	A E K M I	A A I D A	V R V R G		253
751	AAT ATT GTT AGG TGC	CCA GAT CCA GAA TAT	GCT GAA AAG ATG ATT	GCT GCT ATA GAT GCT	GTC CGT GTG AGA GGG		825
254	D S I G G	V V T C I	V R R C P	R G L G S	P V F D K		278
826	GAT TCT ATT GGT GGT	GTT GTC ACA TGC ATT	GTG AGG AGA TGC CCA	CGA GGG CTT GGT TCG	CCA GTT TTT GAC AAG		900
279	L E A E L	A K A A M	S L P A T	K G F E F	G S G F A		303
901	CTT GAA GCT GAG CTG	GCT AAA GCT GCC ATG	TCA TTA CCT GCA ACG	AAG GGT TTC GAG TTT	GGC AGT GGC TTT GCA		975
304	G T T L C	G S E H N	D E F F T	D E N G R	I R T R T		328
976	GGT ACT ACG TTG TGT	GGG AGC GAA CAT AAT	GAT GAG TTC TTC ACT	GAT GAA AAT GGA AGA	ATC AGG ACA AGA ACC		1050
329	N R S G G	I Q G G I	S N G E V	I N M R V	A F K P T		353
1051	AAC CGC TCT GCG GGG	ATA CAG GGA GGA ATC	TCA AAT GGG GAA GTC	ATA AAT ATG AGA GTA	GCT TTC AAG CCA ACA		1125
354	A T I S R	K Q Q T V	T R E K K	E I E L I	A R G R H		378
1126	GCT ACT ATT TCA AGG	AAG CAG CAA ACA GTG	ACT CGA GAG AAAAAA	GAA ATA GAA CTC ATT	GCT CGT GGC CGC CAT		1200
379	D P C V V	P R A V P	M V E A M	V A L V L	A D Q L M		403
1201	GAT CCT TGT GTT GTT	CCG CGA GCT GTA CCA	ATG GTA GAA GCA ATG	GTA GCT CTG GTG CTT	GCA GAT CAA TTG ATG		1275
404	S Q Y A Q	C N L F P	I N P D L	Q E P F S	L P R F E		428
1276	TCA CAA TAT GCG CAA	TGT AAT CTA TTT CCA	ATC AAT CCA GAT CTA	CAA GAA CCC TTT TCA	TTG CCA AGG TTT GAG		1350
429	P A H V P	F *					
1351	CCA GCC CAT GTA CCC	TTT TGA AAG ATG ACA	AAG CAC AGC TAT AGC	ATT ATT TAG TCA TTG	CCC TCC ACC CAA ATT		1425
1426	TAC TTC ATG GGG GCA	AAT TTT CCC ACA ATA	TGA GGC TTG CAA TGT	CTA TTA GAA GGA TAG	TTC AAT GTT CAT TTT		1500
1501	CCG CTT TTT AGG TGT	GTA TTA CCT ATT TCT	TAA TCC ATG AAA TTC	AGG GTT TCA TGT TGT	ATG AAA AGG CAA GGT		1575
1576	TAA TGT TGT ATG AAT	TGT TTG TTT TTC AAT	GTG CTT TAT TGC TGA	CAAAAAAAAAAAAAA	AAAAAAAA AA		1643

**Tabelle 6.10:** cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz der putativen Chorismat Synthase (*Fs-CS*) aus der europäischen Buche. AccNr = DQ166526.



1	GAC ACT GAC ATG GAC	TGA AGG AGT AGA AAG	GGT TTT AAC GGG TTT	CTC TTT TGG TTC TTC	CIT GCC CTC TCT TTC	75
	M E A	K L L G A	A S S A V	T A P P H	A S R F S	23
76	GTT TCA ATG GAG GCC	AAA CTG TTA GGA GCT	GCC TCT TCT GCC GTT	ACA GCT CCT CCT CAT	GCT TCC AGA TTT TCG	150
24	R P I S R	F V L Q T	R L N F S	F R F Q G	S S L A K	48
151	AGA CCC ATT AGC CGT	TTT GTC CTC CAG ACC	AGG CTG AAT TTT TCT	TTC AGG TTC CAA GGT	TCA AGC TTG GCA AAA	225
49	R G F Q S	V Q A A A	T S I G S	L S I K K	R V D V S	73
226	AGA GGC TTT CAA TCT	GTA CAA GCT GCT GCA	ACC TCC ATT GGA TCA	TTG TCA ATA AAG AAA	AGG GTG GAT GTG AGT	300
74	E N L T L	D G I R I	S L I R Q	E D S I I	F S L L E	98
301	GAG AAC TTG ACA CTA	GAT GGT ATA AGA ATT	TCC TTA ATT CGA CAA	GAG GAT AGC ATT ATA	TTT AGC CTT TTG GAG	375
99	R A Q Y C	Y N A D T	Y N P N A	F S M D G	F H G S L	123
376	AGA GCT CAA TAT TGT	TAT AAT GCG GAT ACA	TAT AAC CCT AAT GCT	TTC TCC ATG GAT GGG	TTC CAT GGC TCT TTA	450
124	V E Y M V	K E T E K	L H A Q V	G R Y K S	P D E H P	148
451	GTT GAA TAC ATG GTC	AAA GAA ACT GAA AAG	CTT CAT GCT CAG GTG	GGT AGA TAC AAG AGC	CCT GAT GAA CAT CCT	525
149	F F P D D	L P D P L	L P P L Q	Y P Q V L	H P F A D	173
526	TTT TTC CCA GAT GAC	CTA CCG GAC CCA TTG	TTG CCA CCT TTA CAA	TAC CCA CAG GTA TTA	CAT CCT TTT GCA GAC	600
174	S I N I N	K K V W D	M Y F R D	L I P R L	V E E G D	198
601	TCA ATT AAT ATA AAT	AAG AAA GTC TGG GAC	ATG TAT TTT AGA GAT	CTC ATC CCG AGA TTA	GTT GAG GAA GGA GAT	675
199	D G N C G	S T A V C	D T M C L	Q A L S K	R M H Y G	223
676	GAT GGA AAT TGC GGA	TCA ACT GCT GTT TGT	GAC ACA ATG TGC TTG	CAG GCT CTG TCA AAA	AGA ATG CAT TAT GGT	750
224	K F V A E	A K F R A	S P D A Y	E A A I R	A Q D R K	248
751	AAA TTT GTA GCA GAG	GCC AAA TTT CGA GCC	TCT CCA GAT GCC TAT	GAA GCT GCC ATT AGG	GCT CAG GAC AGG AAA	825
249	K L M D M	L T Y S E	V E E A I	R K R V E	M K A K T	273
826	AAA CTG ATG GAT ATG	CTG ACT TAC TCA GAA	GTT GAA GAG GCA ATT	AGA AAG AGA GTA GAG	ATG AAG GCC AAA ACT	900
274	Y A Q E V	T V N V E	E D E A E	P V Y K I	E P S L V	298
901	TAT GCCCAA GAG GTG	ACA GTG AAT GTA GAG	GAA GAT GAA GCT GAA	CCG GTT TAC AAA ATA	GAG CCA AGC TTG GTT	975
299	A D L Y G	D W I M P	L T K E V	Q V E Y L	L R R L D	323
976	GCT GAT CTA TAT GGG	GAC TGG ATC ATG CCA	TTG ACA AAG GAA GTT	CAA GTA GAG TAC CTG	CTT AGA AGG TTG GAT	1050
	*					
1051	TGA ATG GAG TTA CAG	TCA CTT TCT TAT TTT	GAT GAA TGA ATA GAG	CTA CGG TGT CCC ACT	ATT TAT GAT TGT CTT	1125
1126	TGT AAT TGT TGT ATT	TAA GAG GCT CTG AGA	TGC AAT AAT AGA GAA	TTT GTG ATG TAA AAC	AAG CAT GTA GGC ACT	1200
1201	TCT ATT CCA AAT GGT	ATA AAT TTC GTG AAA	TGG ATG GAT GTA GAT	GGA AAT TGC CTC ATA	TTC ATC TTT TAC CTT	1275
1276	GGT TAC CAAAAAAA	AAAAAAA				1302

**Tabelle 6.11:** cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz der putativen Chorismat Mutase (*Fs-CM*) aus der europäischen Buche. AccNr = DQ166527.

## 6.3 Informationen zur Klonierung von cDNA-Sequenzen aus der Buche

### Liste der nicht redundanten cDNA-Klone aus SSH1 und SSH2

**Tabelle 6.12:** Liste der nicht redundanten Klone aus den subtraktiven cDNA-Banken SSH1 und SSH2 mit funktioneller Zuordnung gemäß dem Klassifizierungsschema des 'EU *Arabidopsis* Genom Projekts' [68]. Der Homologievergleich der cDNA-Klone wurde mittels 'Blastn' (<http://blast.cbr.nrc.ca/>, [1]) durchgeführt. SSH-Nr. = Nummer des SSH-Klons, AccNr. = Genbank-Akzessionsnummer, EF = Expressionsfaktor, SEM = Standardfehler des Mittelwerts, PWI = paarweise Identität, E = 'Blastn'-Erwartungswert.

SSH-Klon		Publizierte DNA-Sequenz mit der höchsten Homologie zu dem SSH-Klon			
SSH-Nummer	ACC-Nr.	Bezeichnung	Funktionelle Zuordnung	PWI	E
<b>SSH1</b>					
SSH1P1E07	AM062784	10 kDa photosystem II polypeptide	Energie-Stoffwechsel	124/146	3E-23
SSH1P2A03	AM062795	photosystem I psaL subunit	Energie-Stoffwechsel	307/394	2E-18
SSH1P2A12	AM062828	glutaredoxin I	Energie-Stoffwechsel	190/228	3E-34
SSH1P2D01	DT317612	chlorophyll a/b-binding protein (Lhcb-Pp2)	Energie-Stoffwechsel	519/604	1E-149
SSH1P2D12	AM062831	PS I reaction center subunit X psaK	Energie-Stoffwechsel	212/258	9E-35
SSH1P2F06	AM062810	chlorophyll a/b-binding protein LHCII type III	Energie-Stoffwechsel	232/278	9E-57
SSH1P2H08	AM062819	water-oxidizing complex 33 kDa polypeptide	Energie-Stoffwechsel	65/71	1E-17
SSH1P3A08	AM062861	NADP-specific GAPDH	Energie-Stoffwechsel	515/601	1E-142
SSH1P3B12	AM062859	amine oxidase	Energie-Stoffwechsel	44/50	3E-4
SSH1P3C07	DT317617	malic enzyme	Energie-Stoffwechsel	272/327	5E-55
SSH1P3D07	AM062846	photosystem I reaction center subunit III	Energie-Stoffwechsel	224/289	2E-8
SSH1P3E06	DT317619	photosystem I reaction center subunit XI	Energie-Stoffwechsel	95/113	2E-12
SSH1P3H07	AM062849	chlorophyll a/b binding protein CP29	Energie-Stoffwechsel	317/378	9E-70
SSH1P4A12	AM062882	chlorophyll a/b-binding protein type I	Energie-Stoffwechsel	263/308	2E-64
SSH1P4C02	AM062888	ferredoxin-NADP+ oxidoreductase precursor	Energie-Stoffwechsel	468/559	1E-102
SSH1P4E03	AM072444	chlorophyll a/b-binding protein Cab4	Energie-Stoffwechsel	105/119	2E-26
SSH1P4F09	AM062875	PS I reaction center subunit psaN prec	Energie-Stoffwechsel	202/235	7E-51
SSH1P4G12	AM062885	PS II 10 kD protein	Energie-Stoffwechsel	117/143	9E-13
SSH1P4H04	AM062867	chlorophyll a/b-binding protein CAB11 gene	Energie-Stoffwechsel	100/114	2E-22
SSH1P5F07	DT317625	NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase	Energie-Stoffwechsel	77/95	2E-5
SSH1P5H04	AM062894	psaDa gene for PSI-D2	Energie-Stoffwechsel	209/254	1E-36
SSH1P5H10	AM072442	6.1 kDa polypeptide of photosystem II	Energie-Stoffwechsel	156/191	9E-20
SSH1P6D07	AM062918	carbonic anhydrase	Energie-Stoffwechsel	180/229	1E-7
SSH1P6F12	AM062927	RUBISCO activase	Energie-Stoffwechsel	340/394	5E-97

Tabelle 6.12: Fortsetzung

SSH-Klon		Publizierte DNA-Sequenz mit der höchsten Homologie zu dem SSH-Klon				
SSH-Nummer	ACC-Nr.	ACC-Nr.	Bezeichnung	Funktionelle Zuordnung	PWI	E
SSH1P6G02	AM062908	U01964.1	chlorophyll a/b-bindingprotein (lhcb1*7)	Energie-Stoffwechsel	219/260	5E-49
SSH1P6G03	DT317632	X75327.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Energie-Stoffwechsel	282/333	2E-67
SSH1P6G12	AM062928	AY492006.1	fructose-bisphosphate aldolase	Energie-Stoffwechsel	476/548	1E-143
SSH1P6H11	AM062925	X64198.1	chlorophyll a/b-binding protein LHC-I	Energie-Stoffwechsel	43/48	1E-6
SSH1P7B01	AM062942	X81962.1	chlorophyll a/b binding protein type II	Energie-Stoffwechsel	327/401	4E-53
SSH1P7B08	AM062948	NM_124675.1	thylakoid lumen 15.0 kDa protein	Energie-Stoffwechsel	167/197	4E-34
SSH1P7C08	AM062949	AB043960.2	oxygen evolving enhancer protein 1 prec	Energie-Stoffwechsel	136/159	7E-29
SSH1P7F07	AM062947	X15258.1	CAB-8 gene	Energie-Stoffwechsel	134/162	8E-14
SSH1P7G02	DT317635	AY705444.1	RUBISCO small subunit (rbcS)	Energie-Stoffwechsel	323/332	1E-165
SSH1P3A05	DT317616	Y15628.1	nuclear protein HCF136	Intrazellulärer Transport	206/256	2E-21
SSH1P3H12	DT317623	D45420.1	ADP-ribosylation factor	Intrazellulärer Transport	352/411	8E-98
SSH1P5H12	AM062905	AF402773.1	putative organic cation transport protein	Intrazellulärer Transport	72/87	4E-4
SSH1P1B09	AM062790	AY291285.1	chitinase-like protein	Krankheit/Abwehr	348/427	1E-59
SSH1P1D08	AM072437	AY600419.1	resistance protein-like	Krankheit/Abwehr	60/69	8E-8
SSH1P1E03	DT317608	D55645.1	catalase (cat1)	Krankheit/Abwehr	135/158	1E-28
SSH1P2E07	AM062814	AJ404331.1	lipoygenase	Krankheit/Abwehr	223/260	1E-58
SSH1P3A01	AM062835	AF085275.1	DnaJ protein	Krankheit/Abwehr	437/513	1E-118
SSH1P3A02	AM062858	DQ022748.1	putative endo-1,3;1,4- $\beta$ -D-glucanase	Krankheit/Abwehr	125/151	2E-18
SSH1P3C09	DT317618	Y10464.1	peroxidase	Krankheit/Abwehr	103/118	1E-22
SSH1P3E07	AM062847	AJ717306.1	peroxiredoxin	Krankheit/Abwehr	302/374	4E-35
SSH1P4C12	AM062884	AY148471.1	stromal ascorbate peroxidase	Krankheit/Abwehr	339/398	2E-88
SSH1P5F09	DT317626	AY640382.1	NIM1-like protein 1	Krankheit/Abwehr	36/37	9E-8
SSH1P6A02	AM062926	U92815.1	heat shock protein 70 precursor	Krankheit/Abwehr	188/231	2E-25
SSH1P7E09	AM062952	AY233203.1	putative glycolate oxidase (Gox)	Krankheit/Abwehr	158/185	1E-36
SSH1P7G08	AM062950	AY380778.1	Bax inhibitor	Krankheit/Abwehr	170/211	4E-16
SSH1P1D05	AM062774	X75020.1	phosphoglycerate mutase	Primär-Stoffwechsel	510/600	1E-133
SSH1P1G08	DT317611	NM_119466.2	cochlaurine N-methyltransferase, putative	Primär-Stoffwechsel	57/64	4E-10
SSH1P2B09	AM062820	AY099834.1	anthranilate synthase beta subunit	Primär-Stoffwechsel	180/220	5E-24
SSH1P3A12	AM062857	AF064786.1	beta-galactosidase precursor	Primär-Stoffwechsel	59/65	2E-14
SSH1P5A04	AM062893	AF070943.1	ribulose-phosphate 3-epimerase	Primär-Stoffwechsel	242/275	2E-73

Tabelle 6.12: Fortsetzung

SSH-Klon	ACC-Nr.	Publizierte DNA-Sequenz mit der höchsten Homologie zu dem SSH-Klon	Bezeichnung	Funktionelle Zuordnung	PWI	E
SSH1P5C11	AM062903	AB088360.1	nucleoside diphosphate kinase	Primär-Stoffwechsel	99/113	4E-22
SSH1P5H07	AM062898	U79769.1	aminomethyltransferase precursor	Primär-Stoffwechsel	303/377	2E-36
SSH1P6B04	AM062909	L31900.1	glyoxysomal malate dehydrogenase	Primär-Stoffwechsel	283/347	2E-42
SSH1P6C10	AM062924	L34836.1	malate dehydrogenase	Primär-Stoffwechsel	285/347	9E-54
SSH1P6E02	AM062907	AY497475.1	xyloglucan endotransglucosylase-hydrolase	Primär-Stoffwechsel	117/137	4E-22
SSH1P7A01	AM062937	M73707.1	phosphoribulokinase	Primär-Stoffwechsel	221/258	1E-53
SSH1P7D12	AM062958	X97434.1	thiazole biosynthetic enzyme	Primär-Stoffwechsel	222/267	3E-52
SSH1P1B08	AM062787	AY091326.1	putative ubiquitin-conjugating enzyme E2	Proteinmodifikation	100/117	6E-20
SSH1P2H03	AM062800	AK222071.1	aminopeptidase like protein	Proteinmodifikation	163/204	6E-12
SSH1P2H12	AM062833	AF417575.1	growth-on protein	Proteinmodifikation	190/226	8E-37
SSH1P3B07	AM062845	Y09603.1	serine carboxypeptidase I	Proteinmodifikation	49/55	2E-6
SSH1P3F06	DT317621	X58527.1	thioredoxin	Proteinmodifikation	190/229	2E-29
SSH1P4F04	AM062866	U41385.1	protein disulphide isomerase	Proteinmodifikation	104/126	9E-11
SSH1P6B09	AM062922	AY082005.1	ubiquitin-conjugating enzyme E2	Proteinmodifikation	249/293	1E-62
SSH1P6D08	AM062921	U93166.1	cysteine protease	Proteinmodifikation	355/435	1E-68
SSH1P6D11	DT317628	AF332134.1	FtsH protease (FtsH)	Proteinmodifikation	329/388	1E-77
SSH1P7G11	DT317636	X76269.1	thioredoxin M	Proteinmodifikation	242/293	3E-41
SSH1P1B04	AM062770	AK221273.1	DEAD BOX RNA helicase RH15 - like protein	Proteinmodifikation	364/443	4E-66
SSH1P2F05	AM062807	AB001583.1	ribosomal protein L5	Proteinsynthese	44/48	2E-8
SSH1P3G12	DT317622	AF479132.1	26S ribosomal RNA	Proteinsynthese	594/603	0E+0
SSH1P4B09	AM062874	U80269.1	translation initiation factor 2 beta (eIF-2beta)	Proteinsynthese	259/289	1E-89
SSH1P4F06	DT317624	X57079.1	31kD chloroplast ribonucleoprotein	Proteinsynthese	36/39	5E-5
SSH1P6C07	AM062929	AJ277533.1	S6 ribosomal protein	Proteinsynthese	260/298	2E-76
SSH1P6E11	DT317629	AY114008.1	putative L5 ribosomal protein	Proteinsynthese	98/121	4E-6
SSH1P6E12	DT317630	AJ278460.1	60S ribosomal protein (rib 60S)	Proteinsynthese	275/320	4E-68
SSH1P1D07	AM062783	AY581048.1	anthocyanidin synthase	Sekundärstoffwechsel	146/167	4E-41
SSH1P2A06	AM062834	AJ278457.1	flavanone 3-hydroxylase	Sekundärstoffwechsel	323/383	2E-77
SSH1P2D08	DT317613	AY748246.1	acetoacetyl-coenzyme A thiolase	Sekundärstoffwechsel	217/255	5E-51
SSH1P2E05	AM072438	AF135127.1	isoflavone reductase homolog	Sekundärstoffwechsel	196/218	1E-64
SSH1P2F07	AM062815	AF296158.2	beta-carotene hydroxylase	Sekundärstoffwechsel	337/401	3E-78

Tabelle 6.12: Fortsetzung

SSH-Klon		Publizierte DNA-Sequenz mit der höchsten Homologie zu dem SSH-Klon				
SSH-Nummer	ACC-Nr.	ACC-Nr.	Bezeichnung	Funktionelle Zuordnung	PWI	E
SSH1P2H02	AM072439	AY595417.1	chalcone isomerase 4	Sekundärstoffwechsel	189/234	2E-20
SSH1P3A04	DT317615	AF212316.1	caffeine O-methyltransferase	Sekundärstoffwechsel	73/84	5E-7
SSH1P3E09	DT317620	AF002017.1	arginine decarboxylase	Sekundärstoffwechsel	95/116	4E-8
SSH1P1F03	AM062769	AJ420192.1	gibberellin 20-oxidase 1	Signalweiterleitung	500/505	0E+0
SSH1P1G07	AM062785	AJ420190.1	ACC oxidase 1	Signalweiterleitung	377/384	0E+0
SSH1P2D05	AM062806	AJ575100.1	putative mitogen-activated protein kinase 1	Signalweiterleitung	111/130	6E-20
SSH1P3E02	AM062837	AF272572.1	14-3-3 protein	Signalweiterleitung	197/233	5E-42
SSH1P3F12	AM062860	AJ005836.1	GDP dissociation inhibitor	Signalweiterleitung	354/405	1E-115
SSH1P4E11	AM062879	AY027437.1	serine/threonine/tyrosine kinase	Signalweiterleitung	68/81	3E-5
SSH1P4G01	AM062889	AJ313509.1	protein tyrosine phosphatase	Signalweiterleitung	70/76	3E-19
SSH1P6B07	AM062917	AF075582.1	protein phosphatase-2C (PP2C)	Signalweiterleitung	233/275	7E-52
SSH1P6C06	AM062914	NM_180364.2	protein kinase (AFC1)	Signalweiterleitung	109/133	4E-10
SSH1P6G06	DT317633	AY691333.1	MAPKK	Signalweiterleitung	128/155	3E-16
SSH1P7E12	AM062959	AB080194.1	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 4	Signalweiterleitung	50/56	2E-7
SSH1P7H03	AM062943	AY051051.1	putative protein kinase	Signalweiterleitung	115/138	1E-15
SSH1P1B02	AM051088	NM_119881.2	myb family transcription factor	Transkription	82/98	7E-9
SSH1P1F07	DT317610	U34742.1	24 kDa RNA binding protein	Transkription	85/100	3E-12
SSH1P2F04	DT317614	AF308451.1	homeodomain transcription factor KNAT7	Transkription	162/193	5E-30
SSH1P5G02	DT317627	AY456272.1	WRKY6	Transkription	156/182	1E-34
SSH1P6H12	DT317634	AY221168.2	leucine zipper protein (ZIP)	Transkription	248/301	3E-41
SSH1P7F11	AM062957	AF281656.1	putative transcription factor	Transkription	177/213	1E-30
SSH1P1E04	DT317609	AJ605574.1	aquaporin (Pip1-1 gene)	Transporter	124/134	3E-44
SSH1P4G11	AM062880	AJ286744.1	phosphate transporter	Transporter	191/233	5E-28
SSH1P6F08	DT317631	AY823263.1	aquaporin	Transporter	108/120	2E-29
SSH1P2G07	AM062816	AF048824.1	histone H2B	Transporter	236/278	2E-54
SSH1P3G10	AM062854	AY093153.1	histone deacetylase	Zellstruktur	138/173	1E-10
SSH1P4A09	AM062873	AJ279695.1	alpha-tubulin	Zellstruktur	657/731	0E+0
SSH1P5F08	AM062899	L38856.1	nucleosome assembly protein 1 (SNAP-1)	Zellstruktur	270/331	9E-42

Tabelle 6.12: Fortsetzung

SSH-Klon		Publizierte DNA-Sequenz mit der höchsten Homologie zu dem SSH-Klon				
SSH-Nummer	ACC-Nr.	ACC-Nr.	Bezeichnung	Funktionelle Zuordnung	PWI	E
<b>SSH2</b>						
SSH2PIH04	DT317639	AB006080.1	RUBISCO small subunit	Energie-Stoffwechsel	229/233	1E-114
SSH2P2F04	AM062973	AF010228.1	proton ATPase proteolipid subunit	Energie-Stoffwechsel	203/233	4E-60
SSH2P3B04	AM062987	AB086372.1	plasma membrane H <sup>+</sup> -ATPase	Energie-Stoffwechsel	260/303	2E-65
SSH2P3E03	AM062986	AF241524.1	chlorophyll a/b-binding protein type I	Energie-Stoffwechsel	219/269	1E-31
SSH2P4F09	AM062987	AF406809.1	glutaredoxin	Energie-Stoffwechsel	99/116	6E-17
SSH2P5A06	AM063013	M71235.1	aminolevulinic acid dehydratase	Energie-Stoffwechsel	87/107	6E-11
SSH2P6B06	AM063013	X63606.1	gamma subunit of ATP synthase (atpC)	Energie-Stoffwechsel	272/333	6E-49
SSH2P6E02	AM063022	AF421145.1	GAPDH	Energie-Stoffwechsel	185/212	5E-51
SSH2P6E07	AM063033	M21317.1	chlorophyll a/b binding protein	Energie-Stoffwechsel	247/286	5E-61
SSH2P6E10	AM063038	X61664.1	photosystem I psaH protein	Energie-Stoffwechsel	198/232	9E-51
SSH2P4D09	AM063005	AJ421017.1	ADP-ribosylation factor	Intrazellulärer Transport	479/542	1E-161
SSH2P1F12	AM062968	AY652864.1	glutathione S-transferase (GST180)	Krankheit/Abwehr	97/117	5E-10
SSH2P2E02	AM062971	DQ023268.1	RFO1 (RFO1) gene	Krankheit/Abwehr	95/107	3E-23
SSH2P2G11	DT317642	AJ496418.1	catalase	Krankheit/Abwehr	424/496	1E-114
SSH2P3G01	AM062996	AF243371.1	glutathione S-transferase GST 16	Krankheit/Abwehr	49/57	5E-4
SSH2P4C02	AM062985	AJ404331.1	lox gene for lipoxygenase	Krankheit/Abwehr	260/331	6E-18
SSH2P4F10	AM062996	AJ132444.1	catalase 1	Krankheit/Abwehr	193/229	8E-39
SSH2P4G08	AM063008	AY154650.1	beta-cyanoalanine synthase	Krankheit/Abwehr	340/372	1E-135
SSH2P4H04	DT317650	AJ496419.1	catalase (cat2 gene)	Krankheit/Abwehr	431/509	1E-108
SSH2P5B01	AM063008	AJ130889	stress and pathogenesis-related protein	Krankheit/Abwehr	69/77	1E-12
SSH2P5G11	AM063019	AF048978.1	glutathione S-transferase (GSTa)	Krankheit/Abwehr	79/92	1E-11
SSH2P6G01	AM072435	AJ417550.1	ypri10 gene for allergen Cas s 1	Krankheit/Abwehr	60/67	2E-13
SSH2P6H07	AM063034	M20363.1	heat-shock protein (Gmhsp26-A)	Krankheit/Abwehr	77/93	4E-7
SSH2P1E04	DT317637	U39228.1	beta-glucosidase	Primär-Stoffwechsel	123/147	2E-18
SSH2P1F04	AM062969	AF141602.1	cystathionine-gamma-synthase precursor	Primär-Stoffwechsel	320/398	3E-51
SSH2P2A08	DT317640	AJ251333.1	acetylhydroxy acid isomeroreductase	Primär-Stoffwechsel	193/227	3E-44
SSH2P4A06	AM063004	AF257322.1	triosephosphate isomerase (TPI)	Primär-Stoffwechsel	169/190	3E-51
SSH2P5A01	AM063021	AF429383.1	acetyl Co-A acetyltransferase	Primär-Stoffwechsel	232/276	9E-44
SSH2P2E05	AM062974	AY316293.1	SKP1/ASK1-like protein	Proteinmodifikation	198/238	5E-37

Tabelle 6.12: Fortsetzung

SSH-Klon		Publizierte DNA-Sequenz mit der höchsten Homologie zu dem SSH-Klon				
SSH-Nummer	ACC-Nr.	ACC-Nr.	Bezeichnung	Funktionelle Zuordnung	PWI	E
SSH2P3C03	AM062985	AJ313384.1	aspartic proteinase	Proteinmodifikation	319/376	4E-81
SSH2P3D02	DT317644	X76269.1	thioredoxin M	Proteinmodifikation	242/293	3E-41
SSH2P5G01	AM063017	AJ415386.1	cysteine proteinase	Proteinmodifikation	188/216	1E-54
SSH2P5G06	AM063014	AJ311666.1	peptidylprolyl isomerase	Proteinmodifikation	46/51	1E-6
SSH2P1D10	AM062967	AF516352.1	translation initiation factor 5A isoform III	Proteinsynthese	212/239	1E-71
SSH2P2H01	AM062983	AJ225027.1	ribosomal protein L24	Proteinsynthese	47/52	3E-9
SSH2P5A08	AM063016	AB043975.1	ribosomal protein L27	Proteinsynthese	49/56	4E-7
SSH2P5C02	AM063010	AF334839.1	ribosomal protein L18a	Proteinsynthese	148/172	2E-38
SSH2P5G05	AM063012	AY389581.1	ribosomal protein L19	Proteinsynthese	74/90	1E-4
SSH2P6B09	AM063012	AJ012654.1	ribosomal protein S28	Proteinsynthese	43/48	2E-5
SSH2P6H09	AM063037	AF508969.1	translation initiation factor	Proteinsynthese	51/58	6E-8
SSH2P1C10	AM062966	AY665682.1	polyphenoloxidase (PPO3)	Sekundärstoffwechsel	72/83	3E-11
SSH2P2B09	DT317641	U16793.1	caffeic acid O-methyl transferase	Sekundärstoffwechsel	90/106	4E-13
SSH2P2C12	AM062982	AF135127.1	isoflavone reductase homolog	Sekundärstoffwechsel	195/218	6E-63
SSH2P3A05	AM062989	AJ223291.1	putative chalcone reductase	Sekundärstoffwechsel	84/99	2E-11
SSH2P3C10	DT317643	AJ278457.1	flavanone 3-hydroxylase (F3H)	Sekundärstoffwechsel	98/116	3E-15
SSH2P6C08	DT317643	AF220491.1	O-methyltransferase	Sekundärstoffwechsel	53/61	3E-5
SSH2P1F05	DT317638	AJ420190.1	ACC oxidase 1	Sekundärstoffwechsel	248/248	1E-136
SSH2P2E10	AM062980	NM_202582.1	transmembrane proteinkinase	Signalweiterleitung	252/311	2E-33
SSH2P3D05	AM062990	AY154649.1	ACC Oxidase 2	Signalweiterleitung	84/88	4E-31
SSH2P1G05	AM062962	AF156696.1	inorganic phosphate transporter	Transporter	53/61	1E-6
SSH2P3B09	AM062994	U92650.1	ABC transporter mRNA	Transporter	101/121	4E-13
SSH2P4G04	AM063001	AJ581745.1	sulphate transporter	Transporter	87/105	1E-7
SSH2P4A04	AM063000	AF024716.1	histone 3	Zellstruktur	147/168	3E-36
SSH2P4E09	DT317648	X04401.1	light inducible tissue-specific ST-LS1 gene	Zellstruktur	127/153	1E-17
SSH2P4F12	DT317651	X66010.1	chloroplast Rieske FeS precursor protein 2	Zellstruktur	63/70	8E-14
SSH2P5H09	AM063018	X82030.1	RNP1 chloroplast RNA binding protein	Zellstruktur	115/140	6E-13
SSH2P6E05	AM063027	AY305732.1	actin (ACT11) mRNA	Zellstruktur	431/466	0E+0

## Primer für die quantitative Realtime-PCR

**Tabelle 6.13:** Primer für die quantitative Realtime-PCR. Abkürzungen siehe 6.1, S. 202.

Primer	Amplifikat
26SrRNA-qpcr-f, 26SrRNA-qpcr-r	26SrRNA
ACO1-qpcr-f, ACO1-qpcr-r	ACO1
ACO2-qpcr-f, ACO2-qpcr-r	ACO2
ACS1-qpcr-f, ACS1-qpcr-r	ACS1
ACS2-qpcr-f, ACS2-qpcr-r	ACS2
Apio-qpcr-f, Apio-qpcr-r	ITS-Region von <i>Apiognomonia errabunda</i>
CM-qpcr-f, CM-qpcr-r	CM
COMT-qpcr-f, COMT-qpcr-r	COMT
CS-qpcr-f, CS-qpcr-r	CS
DAHPS-qpcr-f, DAHPS-qpcr-r	DAHPS (nicht isoformspezifisch)
DAHPS1-qpcr-f, DAHPS1-qpcr-r	DAHPS1
DAHPS2-qpcr-f, DAHPS2-qpcr-r	DAHPS2
DAHPS3-qpcr-f, DAHPS3-qpcr-r	DAHPS3
DHQD/SD-qpcr-f, DHQD/SD-qpcr-r	DHQD/SD
DHQS-qpcr-f, DHQS-qpcr-r	DHQS
EPSPS-qpcr-f, EPSPS-qpcr-r	EPSPS
POX-qpcr-f, POX-qpcr-r	Peroxidase
PR1-f, PR1-r	PR1
rbcL-qpcr-f, rbcL-qpcr-r	rbcL
rbcS-qpcr-f, rbcS-qpcr-r	rbcS
SK-qpcr-f, SK-qpcr-r	SK

## 6.4 Daten der Genexpressionsanalyse

### Versuch A (300 n/l Ozon, 8 h/d, 30 d)

**Tabelle 6.14:** Daten der relativen Genexpression in Versuch A (300 n/l O<sub>3</sub>, 8 h/d, 30 d). Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 Messungen der relativen Genexpression zwischen 9 ozon-behandelten und 9 unbehandelten 3-jährigen Buchen ± SEM. Signifikante Unterschiede der zugrundeliegenden CT-Werte auf dem 5%, 1% und 0,1%-Niveau sind mit \*, \*\* und \*\*\* gekennzeichnet. Abkürzungen siehe 6.1, S. 202.

Gen	Frühe Erntezeitpunkte (4 h -5 d)		Späte Erntezeitpunkte (7 d - 30 d)	
	MW	SEM	MW	SEM
<i>Fs-DAHPS3</i>	1,27	±0,18	<i>Fs-DAHPS3</i>	3,26** ±0,16
<i>Fs-DHQS</i>	1,12	±0,08	<i>Fs-DHQS</i>	1,23 ±0,01
<i>Fs-DHQD/SD</i>	1,13	±0,07	<i>Fs-DHQD/SD</i>	3,00* ±0,23
<i>Fs-SK</i>	1,16	±0,07	<i>Fs-SK</i>	1,22 ±0,15
<i>Fs-EPSPS</i>	1,30	±0,11	<i>Fs-EPSPS</i>	2,88* ±0,12
<i>Fs-CS</i>	0,94	±0,02	<i>Fs-CS</i>	1,31 ±0,05
<i>Fs-CM</i>	0,63*	±0,13	<i>Fs-CM</i>	2,28** ±0,08



**Versuch B (250 nl/l O<sub>3</sub>, 8 h/d, 46 d)**

**Tabelle 6.15:** Daten der relativen Genexpression in Versuch B (250 nl/l O<sub>3</sub>, 8 h/d, 46 d). Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) von je 3 Messungen an 9 ozonbehandelten und 9 unbehandelten 3-jährigen Buchen  $\pm$  SEM. Für das Gen *Fs-ACS2* konnte kein SEM errechnet werden, da hier nur eine Messwert pro Zeitpunkt ermittelt wurde. Signifikante Unterschiede der zugrundeliegenden CT-Werte auf dem 5%, 1% und 0,1%-Niveau sind mit \*, \*\* und \*\*\* gekennzeichnet. d = Tage nach Versuchsbeginn. Abkürzungen siehe 6.1, S. 202.

Tag	0 d		2 d		7 d		15 d	
Gen	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
<i>Fs-DAHPS3</i>	0,66	$\pm 0,08$	2,59**	$\pm 0,39$	6,45***	$\pm 0,06$	5,47**	$\pm 0,93$
<i>Fs-DhQS</i>	0,70**	$\pm 0,01$	1,67**	$\pm 0,06$	1,70***	$\pm 0,01$	0,89*	$\pm 0,02$
<i>Fs-DhQD/SD</i>	1,31	$\pm 0,34$	3,08*	$\pm 0,48$	2,92*	$\pm 0,22$	2,11*	$\pm 0,23$
<i>Fs-SK</i>	0,73	$\pm 0,05$	1,54	$\pm 0,12$	2,11**	$\pm 0,11$	1,66	$\pm 0,50$
<i>Fs-EPSPS</i>	0,84	$\pm 0,20$	1,67	$\pm 0,28$	3,53*	$\pm 0,11$	2,53	$\pm 0,36$
<i>Fs-CS</i>	0,72**	$\pm 0$	2,23**	$\pm 0,01$	1,79*	$\pm 0,12$	1,44*	$\pm 0,05$
<i>Fs-CM</i>	0,91*	$\pm 0$	2,07*	$\pm 0,01$	2,52**	$\pm 0,23$	2,40*	$\pm 0,23$
<i>Fs-rbcS</i>	0,89	$\pm 0,07$	1,06	$\pm 0,04$	0,88	$\pm 0,10$	0,85	$\pm 0,40$
<i>Fs-PR1</i>	1,81	$\pm 0,46$	5,20**	$\pm 1,05$	12,24***	$\pm 1,49$	4,52**	$\pm 0,69$
<i>Fs-ACS2</i>	2,32		12,30		109,55		184,85	
<i>Fs-ACO1</i>	1,40**	$\pm 0,03$	5,70***	$\pm 0,06$	5,72**	$\pm 0,16$	6,32**	$\pm 0,11$
Tag	24 d		32 d		39 d		46 d	
Gen	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
<i>Fs-DAHPS3</i>	1,76**	$\pm 0,12$	1,82*	$\pm 0,14$	4,11**	$\pm 0,54$	1,58	$\pm 0,30$
<i>Fs-DhQS</i>	0,90	$\pm 0,04$	0,79	$\pm 0,03$	1,30	$\pm 0,03$	0,96	$\pm 0,13$
<i>Fs-DhQD/SD</i>	2,57**	$\pm 0,42$	1,88*	$\pm 0,26$	3,59**	$\pm 0,67$	1,63	$\pm 0,37$
<i>Fs-SK</i>	0,91	$\pm 0,01$	0,75*	$\pm 0,03$	1,27*	$\pm 0,05$	0,69	$\pm 0,09$
<i>Fs-EPSPS</i>	1,29	$\pm 0,22$	1,06	$\pm 0,08$	1,31	$\pm 0,23$	0,78	$\pm 0,18$
<i>Fs-CS</i>	1,09	$\pm 0,05$	0,86	$\pm 0,05$	1,26	$\pm 0,05$	0,64*	$\pm 0,05$
<i>Fs-CM</i>	1,48*	$\pm 0,01$	1,24*	$\pm 0,02$	1,64*	$\pm 0,14$	1,01	$\pm 0,06$
<i>Fs-rbcS</i>	0,76	$\pm 0,27$	0,52	$\pm 0,16$	0,80	$\pm 0,14$	0,67	$\pm 0,11$
<i>Fs-PR1</i>	3,29**	$\pm 0,30$	1,49	$\pm 0,53$	1,28	$\pm 0,20$	0,96	$\pm 0,17$
<i>Fs-ACS2</i>	76,54		67,66		23,62		9,56	
<i>Fs-ACO1</i>	1,93	$\pm 0,19$	2,10	$\pm 0,15$	3,06*	$\pm 0,23$	1,57	$\pm 0,07$

**Versuch C (150-190 nl/l O<sub>3</sub>, 8 h/d, 84 d)**

**Tabelle 6.16:** Daten der relativen Genexpression in Versuch C (150-190 nl/l O<sub>3</sub>, 8 h/d, 84 d) - Teil 1. Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) der Genexpression von 4 ozonbehandelten im Verhältnis zum Mittelwert von 4 unbehandelten 4-jährigen Buchen  $\pm$  SEM für die klonierten putativen Gene des Shikimatstoffwechsels aus der Buche. Signifikante Unterschiede der zugrundeliegenden CT-Werte auf dem 5%, 1% und 0,1%-Niveau sind mit \*, \*\* und \*\*\* gekennzeichnet. d = Tage nach Versuchsbeginn. Abkürzungen siehe 6.1, S. 202.

Gen	<i>F<sub>s</sub>-DAHPS1</i>		<i>F<sub>s</sub>-DAHPS2</i>		<i>F<sub>s</sub>-DAHPS3</i>		<i>F<sub>s</sub>-DHQS</i>		<i>F<sub>s</sub>-DHQD/SD</i>	
Tag	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0 d	0,50	$\pm 0,10$	0,76	$\pm 0,06$	0,64	$\pm 0,15$	0,77	$\pm 0,12$	0,84	$\pm 0,08$
2 d	2,21**	$\pm 0,41$	0,81	$\pm 0,11$	1,63	$\pm 0,37$	1,18	$\pm 0,17$	1,48	$\pm 0,16$
6 d	1,30	$\pm 0,28$	0,63	$\pm 0,08$	1,50**	$\pm 0,12$	0,95	$\pm 0,09$	1,60	$\pm 0,33$
11 d	1,19	$\pm 0,16$	0,84	$\pm 0,06$	1,76	$\pm 0,46$	1,16	$\pm 0,17$	1,20	$\pm 0,17$
16 d	0,78	$\pm 0,13$	0,80	$\pm 0,05$	5,78**	$\pm 2,38$	1,07	$\pm 0,15$	1,59*	$\pm 0,23$
21 d	0,90	$\pm 0,29$	0,77	$\pm 0,08$	2,70*	$\pm 0,47$	1,15*	$\pm 0,05$	1,60**	$\pm 0,08$
27 d	1,11	$\pm 0,22$	1,01	$\pm 0,13$	3,58**	$\pm 0,95$	1,23*	$\pm 0,11$	2,49*	$\pm 0,46$
34 d	2,04	$\pm 0,36$	1,00	$\pm 0,17$	3,60*	$\pm 1,19$	1,44	$\pm 0,30$	3,51**	$\pm 0,86$
41 d	3,94*	$\pm 0,83$	1,01	$\pm 0,07$	5,39**	$\pm 1,14$	1,33	$\pm 0,12$	3,04***	$\pm 0,39$
48 d	2,74*	$\pm 0,56$	1,31	$\pm 0,21$	3,62**	$\pm 1,24$	1,68***	$\pm 0,45$	5,41***	$\pm 1,25$
55 d	5,90**	$\pm 2,04$	1,10	$\pm 0,13$	7,33***	$\pm 1,40$	1,84**	$\pm 0,18$	7,13***	$\pm 1,07$
62 d	16,27***	$\pm 3,34$	1,52	$\pm 0,23$	7,32***	$\pm 1,65$	2,05**	$\pm 0,37$	6,65***	$\pm 1,14$
69 d	13,30***	$\pm 4,12$	1,04	$\pm 0,19$	9,37***	$\pm 2,89$	1,74*	$\pm 0,38$	4,20***	$\pm 0,82$
76 d	18,67**	$\pm 7,99$	1,67*	$\pm 0,22$	9,65**	$\pm 3,34$	2,83*	$\pm 0,59$	5,34**	$\pm 0,71$
83 d	32,88***	$\pm 10,14$	1,66**	$\pm 0,08$	11,16***	$\pm 0,97$	2,37**	$\pm 0,08$	5,81***	$\pm 0,76$
Gen	<i>F<sub>s</sub>-SK</i>		<i>F<sub>s</sub>-EPSPS</i>		<i>F<sub>s</sub>-CS</i>		<i>F<sub>s</sub>-CM</i>			
Tag	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM		
0 d	0,91	$\pm 0,06$	0,89	$\pm 0,16$	0,79	$\pm 0,12$	0,94	$\pm 0,13$		
2 d	1,55*	$\pm 0,16$	2,59*	$\pm 0,49$	1,27	$\pm 0,15$	1,92*	$\pm 0,22$		
6 d	1,11	$\pm 0,33$	2,03*	$\pm 0,62$	1,36	$\pm 0,13$	1,86*	$\pm 0,40$		
11 d	1,40	$\pm 0,38$	1,97*	$\pm 0,30$	1,22	$\pm 0,18$	1,49	$\pm 0,31$		
16 d	1,25	$\pm 0,23$	3,05**	$\pm 0,65$	1,29*	$\pm 0,18$	2,00**	$\pm 0,39$		
21 d	1,31**	$\pm 0,16$	1,80*	$\pm 0,27$	1,08	$\pm 0,05$	1,48*	$\pm 0,16$		
27 d	1,12	$\pm 0,15$	2,37**	$\pm 0,39$	1,35**	$\pm 0,13$	2,21**	$\pm 0,39$		
34 d	1,42*	$\pm 0,28$	2,40**	$\pm 0,44$	1,19	$\pm 0,21$	2,40**	$\pm 0,55$		
41 d	1,57**	$\pm 0,14$	2,95***	$\pm 0,13$	1,78*	$\pm 0,19$	3,01***	$\pm 0,24$		
48 d	1,74**	$\pm 0,41$	3,34***	$\pm 0,55$	1,87*	$\pm 0,47$	3,57***	$\pm 1,06$		
55 d	2,09**	$\pm 0,15$	3,20***	$\pm 0,27$	2,10**	$\pm 0,20$	5,07***	$\pm 0,31$		
62 d	2,49***	$\pm 0,44$	4,48***	$\pm 0,73$	1,94**	$\pm 0,30$	4,78***	$\pm 0,87$		
69 d	1,99**	$\pm 0,32$	3,74***	$\pm 0,61$	1,45*	$\pm 0,18$	3,71***	$\pm 0,71$		
76 d	2,20*	$\pm 0,38$	4,52**	$\pm 0,92$	1,92*	$\pm 0,28$	3,98**	$\pm 0,66$		
83 d	1,61**	$\pm 0,09$	4,08***	$\pm 0,34$	2,17***	$\pm 0,19$	4,52***	$\pm 0,26$		

**Tabelle 6.17:** Daten der relativen Genexpression in Versuch C (150-190 nl/l O<sub>3</sub>, 8 h/d, 84 d) - Teil 2. Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) der relativen Genexpression von 4 ozonbehandelten gegenüber 4 unbehandelten 4-jährigen Buchen ± SEM für die putativen Gene *Fs-ACSI*, *Fs-ACS2*, *Fs-ACO1*, *Fs-ACO2*, *Fs-COMT*, *Fs-POX*, *Fs-rbcL* und *Fs-PRI*. Signifikante Unterschiede der zugrundeliegenden CT-Werte auf dem 5%, 1% und 0,1%-Niveau sind mit \*, \*\* und \*\*\* gekennzeichnet. d = Tage nach Versuchsbeginn. Abkürzungen siehe 6.1, S. 202.

Gen	<i>Fs-ACSI</i>		<i>Fs-ACS2</i>		<i>Fs-ACO1</i>		<i>Fs-ACO2</i>	
Tag	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0 d	2,02	±0,63	0,81	±0,25	1,45	±0,55	1,26	±1,10
2 d	33,64***	±10,22	2,49	±0,79	5,49**	±1,15	29,41	±15,24
6 d	6,29**	±2,39	10,89*	±5,94	6,83**	±2,15	29,41*	±14,24
11 d	15,05***	±4,13	5,95	±3,48	3,43	±1,53	13,40	±6,47
16 d	37,95***	±15,62	66,60**	±46,16	10,17**	±2,98	78,80*	±28,46
21 d	39,76***	±13,23	32,73**	±7,50	12,69**	±2,37	70,88*	±29,26
27 d	4,89*	±1,74	643,91**	±508,16	6,07**	±1,78	22,28*	±6,47
34 d	28,63**	±14,06	665,42***	±482,78	7,01***	±1,32	36,84*	±12,75
41 d	22,97**	±10,94	319,47***	±40,61	6,11***	±0,70	32,13*	±11,64
48 d	19,31***	±5,27	1156,37***	±744,88	5,37***	±0,47	15,92*	±5,07
55 d	39,19***	±13,86	1053,97***	±488,29	5,89***	±0,71	34,58	±17,89
62 d	44,35*	±29,42	1093,25***	±703,95	3,13*	±0,59	9,78	±4,68
69 d	17,67**	±5,62	656,90***	±296,85	3,61**	±0,64	22,88	±11,45
76 d	7,06*	±3,16	155,59**	±53,78	1,17	±0,07	5,59	±2,69
83 d	6,52*	±2,63	378,27***	±185,49	2,20***	±0,15	8,61	±3,38
Gen	<i>Fs-COMT</i>		<i>Fs-POX</i>		<i>Fs-rbcL</i>		<i>Fs-PRI</i>	
Tag	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0 d	1,95	±0,73	0,72	±0,12	0,95	±0,03	2,86	±1,93
2 d	2,71*	±0,39	1,69	±0,30	0,77	±0,10	8,34*	±3,86
6 d	11,27**	±3,63	4,16**	±1,23	0,86	±0,10	24,98*	±12,72
11 d	3,33	±1,56	1,20	±0,21	0,78*	±0,11	2,84	±1,34
16 d	23,54**	±8,42	2,46*	±0,51	0,77	±0,09	61,45***	±20,40
21 d	14,39**	±5,47	2,61*	±0,46	0,70	±0,10	40,87**	±12,38
27 d	16,08*	±5,02	3,54**	±0,69	0,60	±0,10	26,27*	±9,93
34 d	20,48***	±6,57	4,16***	±0,90	0,47*	±0,08	25,46***	±10,55
41 d	24,82***	±6,25	5,89***	±0,46	0,42	±0,10	30,86***	±7,10
48 d	33,69***	±8,70	6,82***	±0,66	0,37	±0,07	19,81***	±7,43
55 d	22,54***	±6,97	6,50***	±0,42	0,26***	±0,04	10,83***	±0,83
62 d	39,07***	±10,15	5,28**	±0,66	0,24***	±0,03	19,56***	±3,93
69 d	15,85***	±1,60	4,19***	±0,62	0,21***	±0,02	10,86***	±1,49
76 d	14,16***	±1,39	2,55**	±0,39	0,27***	±0,06	6,34***	±0,96
83 d	24,12***	±5,12	3,83***	±0,20	0,33**	±0,07	10,04***	±1,36

**Tabelle 6.18:** Genexpression des Referenzgens *Fs-26SrRNA* in Verlauf von Versuch C (150-190 nl/l O<sub>3</sub>, 8 h/d, 84 d). Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) der CT-Werte von 4 ozonbehandelten (O<sub>3</sub>) und 4 unbehandelten (K) 4-jährigen Buchen ± SEM.

Tage	Behandlung	MW	SEM	Tage	Behandlung	MW	SEM
0 d	K	7,50	±0,09	41 d	K	7,61	±0,32
	O <sub>3</sub>	7,20	±0,16		O <sub>3</sub>	7,22	±0,05
2 d	K	7,04	±0,09	48 d	K	7,13	±0,04
	O <sub>3</sub>	7,04	±0,15		O <sub>3</sub>	6,71	±0,24
6 d	K	6,75	±0,17	55 d	K	6,45	±0,07
	O <sub>3</sub>	6,47	±0,12		O <sub>3</sub>	6,23	±0,09
11 d	K	6,53	±0,05	62 d	K	6,50	±0,10
	O <sub>3</sub>	6,61	±0,19		O <sub>3</sub>	6,31	±0,20
16 d	K	6,96	±0,14	69 d	K	6,79	±0,17
	O <sub>3</sub>	6,71	±0,17		O <sub>3</sub>	6,45	±0,08
21 d	K	6,56	±0,18	76 d	K	7,19	±0,14
	O <sub>3</sub>	6,26	±0,10		O <sub>3</sub>	6,88	±0,14
27 d	K	7,10	±0,12	83 d	K	7,11	±0,07
	O <sub>3</sub>	6,84	±0,05		O <sub>3</sub>	6,77	±0,17
34 d	K	6,77	±0,08				
	O <sub>3</sub>	6,43	±0,09				

### Versuch D ('Kranzberger Forst', 1xO<sub>3</sub> und 2xO<sub>3</sub>)

**Tabelle 6.19:** Daten der relativen Genexpression in Versuch D ('Kranzberger Forst', 1xO<sub>3</sub> und 2xO<sub>3</sub>). Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) der Genexpression von 4 ozonbehandelten gegenüber 4 unbehandelten adulten Buchen aus dem 'Kranzberger Forst' ± SEM für *Fs-rbcL* und *Fs-PR1* sowie putative Gene des Shikimatstoffwechsels. Abkürzungen siehe 6.1, S. 202.

Erntezeitpunkt	15.6.04		28.7.04		14.9.04		5.10.04	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
<i>Fs-DAHPS1</i>	1,04	±0,35	0,48	±0,17	1,45	±0,38	0,87	±0,41
<i>Fs-DAHPS2</i>	1,53	±0,26	1,29	±0,20	1,40	±0,16	1,36	±0,09
<i>Fs-DAHPS3</i>	1,14	±0,19	1,30	±0,51	1,75	±0,41	1,67	±0,49
<i>Fs-DHQS</i>	1,48	±0,23	1,55	±0,24	1,53	±0,32	1,75	±0,31
<i>Fs-DHQS/SD</i>	1,44	±0,31	1,25	±0,19	1,17	±0,11	1,72	±0,23
<i>Fs-SK</i>	1,07	±0,17	1,22	±0,22	1,15	±0,18	1,29	±0,19
<i>Fs-EPSPS</i>	1,02	±0,14	0,99	±0,18	1,30	±0,23	1,15	±0,28
<i>Fs-CS</i>	0,96	±0,15	1,13	±0,12	1,23	±0,16	1,13	±0,09
<i>Fs-CM</i>	1,01	±0,12	0,94	±0,16	1,09	±0,12	1,19	±0,08
<i>Fs-PR1</i>	1,69	±0,44	0,87	±0,23	1,82	±0,57	1,36	±0,38
<i>Fs-rbcL</i>	1,09	±0,15	1,21	±0,03	1,20	±0,04	0,96	±0,13

## 6.5 Analyse von Signalstoffen und Sekundärmetaboliten

### Freie und konjugierte 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure

**Tabelle 6.20:** Gehalte an 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (Versuch C, 150-190 nl/l, 8 h/d, 84 d) gemäß der gemeinsamen Analyse von je 9 ozonbehandelten (O<sub>3</sub>) und 9 unbehandelten (K) 4-jährigen Buchen.

Tage	ACC <sub>frei</sub> [nmol/gFG]		ACC <sub>gesamt</sub> [nmol/gFG]		ACC <sub>konjugiert</sub> [nmol/gFG]	
	K	O <sub>3</sub>	K	O <sub>3</sub>	K	O <sub>3</sub>
0	0,1	0,0	6,0	8,5	5,9	8,5
2	0,6	0,0	5,6	11,2	5,1	11,2
6	0,0	0,0	5,7	9,4	5,7	9,4
11	0,0	0,0	4,3	9,0	4,3	9,0
16	0,0	0,3	5,7	10,5	5,7	10,2
21	0,0	0,6	1,0	17,3	1,0	16,7
27	0,0	0,3	4,3	11,7	4,3	11,4
34	0,3	0,9	4,9	27,3	4,6	26,4
41	0,0	1,9	5,6	26,7	5,6	24,8
48	0,0	3,1	5,0	68,8	5,0	65,6
55	0,0	10,8	6,9	94,1	6,9	83,4
62	0,1	22,2	6,2	189,4	6,1	167,2
69	0,0	10,2	6,4	62,5	6,4	52,3
76	0,1	11,6	7,0	78,2	6,9	66,6
83	0,0	13,1	6,4	80,0	6,4	66,9

**Ethylenemission**

**Tabelle 6.21:** Emission von Ethylen (mmol/(gFG·h)) unter dem Einfluß von Ozon in Versuch C (150-190 nl/l, 8 h/d, 84 d). Dargestellt sind die Meßergebnisse von je drei Bäumen (10-12) der Versuchsvarianten a, b, c, d, e, f und k im Versuchsverlauf.

Tage	1	3	6	15	20	24	29	35	42	49	56	63	70	77	84
a10	0,0	0,0	0,1	0,1	0,4	0,8	1,6	10,0	11,1	8,0	3,0	0,7	2,7	0,2	0,0
a11	0,0	0,1	0,0	0,1	0,6	0,2	0,2	0,7	0,4	0,6	1,1	1,1	1,0	0,7	0,3
a12	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,1	0,2	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,6
b10	0,0	0,4	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
b11	0,0	0,2	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0
b12	0,0	0,3	0,3	0,0	0,2	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,2	0,1
c10	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,2	1,0	3,9	0,7	0,6	1,2	2,4	1,8	0,8	1,1
c11	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,4	0,5	0,7	3,5	0,5	1,0	2,5	2,2	1,9	0,9
c12	0,0	0,1	0,0	0,0	0,5	0,3	0,3	0,1	0,8	1,3	2,7	1,0	0,7	0,7	0,8
d10	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,3	0,5	1,3	0,4	0,9	2,0	1,2
d11	0,0	0,0	0,0	0,4	0,2	0,1	0,1	0,0	0,2	0,1	0,8	0,2	0,2	0,2	0,7
d12	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,2	0,2	0,1	0,6	3,7	3,9	1,0	0,3	0,7
e10	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,4	0,7	0,7	1,4	1,1	1,2	1,0	0,5	0,3
e11	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,4	0,5	4,7	1,6	3,6	4,2	2,0	2,1	2,9
e12	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,6	0,7	0,7	0,8	0,8	0,4
f10	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,7	1,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3
f11	0,0	0,1	0,0	0,0	0,2	0,1	0,1	0,0	1,8	2,0	1,5	0,8	0,8	1,1	0,5
f12	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,0	0,1	0,1	0,0	0,2
k13	0,0	0,0	0,1	0,3	0,2	0,0	0,1	0,0	0,2	0,1	0,2	0,2	0,0	0,2	0,2
k14	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1	0,2
k15	0,0	0,0	0,1	0,3	0,1	0,3	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1

**Freie und gebundene Salicylsäure**

**Tabelle 6.22:** Gehalte an freier und gebundener Salicylsäure sowie gebundener Gentsinsäure (mmol/gFG) unter dem Einfluß von Ozon (Versuch C, 150-190 nl/l O<sub>3</sub>, 8 h/d) gemäß der gemeinsamen Analyse von je 9 ozonbehandelten (O<sub>3</sub>) und 9 unbehandelten (K) 4-jährigen Buchen.

Tage	SA <sub>frei</sub>		SA <sub>gebunden</sub>		GA <sub>gebunden</sub>	
	K	O <sub>3</sub>	K	O <sub>3</sub>	K	O <sub>3</sub>
0	1,6	1,4	12,9	14,0	135,9	111,7
6	1,8	1,2	19,7	17,7	134,2	104,0
16	0,4	1,0	15,9	22,7	152,9	152,7
27	0,5	0,7	18,7	21,8	185,6	190,1
41	0,8	0,8	25,1	30,6	215,6	249,8
55	0,5	0,5	22,0	31,6	227,4	296,2
69	0,6	0,6	24,8	37,0	243,6	359,3
83	0,6	0,9	28,2	47,1	269,2	447,5

**Lösliche und zellwandgebundene Phenole**

**Tabelle 6.23:** Gehalte an löslichen phenolischen Inhaltsstoffen unter dem Einfluß von Ozon in Versuch C (Versuch C, 150-190 nl/l O<sub>3</sub>, 8 h/d). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM der Messungen von je 4 ozonbehandelten (O<sub>3</sub>) und 4 unbehandelten (K) 4-jährigen Buchen für die Diodenarray-Peaks 1 bis 8.

<b>Lösliche phenolische Inhaltsstoffe [Flächeneinheiten /mg FG]</b>									
Diodenarray-Peak:		<b>1</b>		<b>2</b>		<b>3</b>		<b>4</b>	
Tage	Behandlung	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0	K	8,9	2,0	7,5	1,3	78,4	10,1	3,1	2,0
11	K	9,0	2,4	13,0	1,6	74,3	6,0	2,6	0,9
34	K	4,8	1,8	11,1	1,1	49,5	4,9	1,4	0,7
62	K	2,7	0,4	10,1	1,8	35,3	6,8	1,0	0,3
83	K	1,9	0,3	4,2	0,6	14,7	2,0	0,4	0,1
0	O <sub>3</sub>	7,9	2,3	6,4	1,6	70,0	9,7	3,0	1,6
11	O <sub>3</sub>	4,3	0,3	12,2	1,5	74,3	8,8	1,3	0,6
34	O <sub>3</sub>	4,1	1,0	12,9	1,9	48,2	7,3	1,4	0,5
62	O <sub>3</sub>	1,9	0,4	12,5	2,7	32,7	7,3	1,4	0,4
83	O <sub>3</sub>	1,5	0,2	7,3	1,2	17,3	3,0	0,4	0,2
Diodenarray-Peak:		<b>5</b>		<b>6</b>		<b>7</b>		<b>8</b>	
Tage	Behandlung	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0	K	1,1	0,6	11,4	6,8	6,9	3,7	5,5	0,3
11	K	1,2	0,5	10,1	3,3	7,6	3,0	5,3	0,4
34	K	0,8	0,4	6,2	2,1	3,3	1,1	5,8	0,1
62	K	0,9	0,1	3,8	1,6	2,3	0,7	6,3	0,6
83	K	0,3	0,1	2,5	0,5	1,8	0,3	4,5	0,3
0	O <sub>3</sub>	0,9	0,5	10,4	5,2	6,4	2,3	4,7	0,4
11	O <sub>3</sub>	0,7	0,3	4,7	2,1	2,7	1,1	6,0	1,0
34	O <sub>3</sub>	0,8	0,3	5,2	1,5	1,2	0,2	4,9	0,8
62	O <sub>3</sub>	1,1	0,3	6,1	1,1	0,8	0,4	3,1	0,0
83	O <sub>3</sub>	0,2	0,1	3,6	0,8	0,5	0,1	3,0	0,4

**Tabelle 6.24:** Gehalte an löslichen phenolischen Inhaltsstoffen unter dem Einfluß von Ozon in Versuch C (Versuch C, 150-190 nl/l O<sub>3</sub>, 8 h/d). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Messungen von je 4 ozonbehandelten (O<sub>3</sub>) und 4 unbehandelten (K) 4-jährigen Buchen für die Diodenarray-Peaks 9 bis 15 und die Summe der Peaks 1 bis 15.

<b>Lösliche phenolische Inhaltsstoffe [Flächeneinheiten /mg FG]</b>									
Diodenarray-Peak:		<b>9</b>		<b>10</b>		<b>11</b>		<b>12</b>	
Tage	Behandlung	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0	K	0,8	0,2	4,7	3,1	9,3	6,1	0,9	0,5
11	K	2,7	0,5	2,9	0,7	6,3	1,2	1,7	0,3
34	K	6,0	0,6	2,9	0,9	5,7	1,8	1,8	0,4
62	K	7,9	1,2	3,9	0,6	6,2	1,3	2,6	0,3
83	K	6,1	0,5	2,0	0,6	3,2	1,0	2,4	0,1
0	O <sub>3</sub>	0,8	0,2	6,1	4,1	11,3	6,6	1,4	0,6
11	O <sub>3</sub>	1,8	0,2	2,9	1,4	6,0	2,5	1,3	0,6
34	O <sub>3</sub>	5,1	1,2	5,3	2,9	9,2	4,8	3,3	0,6
62	O <sub>3</sub>	6,3	1,1	6,0	3,0	10,7	4,9	4,4	0,6
83	O <sub>3</sub>	2,9	1,3	4,0	2,3	6,7	3,9	6,1	1,9
Diodenarray-Peak:		<b>13</b>		<b>14</b>		<b>15</b>		<b>Summe</b>	
Tage	Behandlung	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0	K	0,6	0,6	0,0	0,0	57,3	10,5	196,6	19,6
11	K	2,0	0,5	0,0	0,0	41,3	3,4	180,0	5,4
34	K	1,9	0,2	0,0	0,0	24,4	3,0	125,6	3,0
62	K	2,1	0,5	0,2	0,2	16,8	2,3	102,0	8,2
83	K	2,3	0,8	0,0	0,0	7,6	2,7	53,7	3,9
0	O <sub>3</sub>	1,8	0,4	0,1	0,1	77,5	5,5	208,7	18,8
11	O <sub>3</sub>	1,8	0,5	0,0	0,0	63,3	3,6	183,3	11,6
34	O <sub>3</sub>	2,2	0,7	0,6	0,4	28,5	2,5	132,9	9,2
62	O <sub>3</sub>	5,2	0,7	1,3	0,6	13,0	1,2	106,5	8,2
83	O <sub>3</sub>	3,4	0,6	0,1	0,1	7,9	1,1	64,9	6,0



**Tabelle 6.25:** Gehalte an zellwandgebundenen phenolischen Inhaltsstoffen unter dem Einfluß von Ozon in Versuch C (Versuch C, 150-190 nl/l O<sub>3</sub>, 8 h/d). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM der Messungen von je 4 ozonbehandelten (O<sub>3</sub>) und 4 unbehandelten (K) 4-jährigen Buchen für die Diodenarray-Peaks 1 bis 7 und deren Summe.

<b>Zellwandgebundene phenolische Inhaltsstoffe [Flächeneinheiten /mg FG]</b>									
Diodenarray-Peak:		<b>1</b>		<b>2a+b</b>		<b>3</b>		<b>4</b>	
Tage	Behandlung	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0	K	0,8	0,1	1,7	0,2	4,2	0,9	14,1	3,7
11	K	0,9	0,1	1,9	0,1	3,9	0,2	15,1	0,9
34	K	0,9	0,1	2,1	0,1	3,9	0,5	16,4	1,8
62	K	1,2	0,2	2,3	0,1	3,7	0,4	15,5	1,1
83	K	0,8	0,1	2,0	0,2	2,8	0,6	12,1	2,4
0	O <sub>3</sub>	0,6	0,1	1,6	0,2	4,4	0,2	15,5	0,8
11	O <sub>3</sub>	0,6	0,0	1,6	0,2	4,7	0,1	18,3	0,9
34	O <sub>3</sub>	0,8	0,1	1,4	0,2	4,4	0,4	18,3	1,3
62	O <sub>3</sub>	1,0	0,0	2,0	0,2	4,5	0,2	19,0	1,0
83	O <sub>3</sub>	0,8	0,1	1,6	0,1	3,5	0,2	13,0	1,6
Diodenarray-Peak:		<b>5</b>		<b>6</b>		<b>7</b>		<b>Summe</b>	
Tage	Behandlung	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0	K	0,0	0,0	0,9	0,4	15,4	5,2	36,9	10,5
11	K	0,1	0,0	1,9	0,3	22,3	2,2	46,1	3,5
34	K	0,4	0,1	2,4	0,3	30,5	3,4	56,6	6,0
62	K	0,8	0,1	2,7	0,4	34,3	1,4	60,4	3,0
83	K	0,7	0,2	2,5	0,6	30,8	5,7	51,8	9,7
0	O <sub>3</sub>	0,0	0,0	1,2	0,2	15,8	1,0	39,0	2,4
11	O <sub>3</sub>	0,1	0,1	2,1	0,3	24,6	3,5	52,0	4,5
34	O <sub>3</sub>	0,2	0,1	3,2	0,4	33,1	2,6	61,4	4,6
62	O <sub>3</sub>	0,9	0,4	4,7	0,7	40,2	1,7	72,2	4,0
83	O <sub>3</sub>	0,4	0,0	2,5	0,4	29,4	3,2	51,1	5,1

**Ligningehalte****Tabelle 6.26:** Ligningehalte nach Klason in ozonexponierten Buchenblättern (Versuch B, 200 nl/l O<sub>3</sub>, 8 h/d, 46 d). Die Ozonsymptome der Proben S1, S2 und S3 entsprachen den Boniturstufen 1, 2-4 bzw. 5-6 gemäß Tabelle 2.4, S. 30.

Probe S1	mg	Klason Lignin [mg]	% Klason Lignin	MW S1	SEM S1
S1a	199,9	53,2	26,61	26,37	0,24
S1b	200,9	52,5	26,13		
Probe S2	mg	Klason Lignin [mg]	% Klason Lignin	MW S2	SEM S2
S2a	199,8	45,9	22,97	23,07	0,18
S2b	199,6	46,6	23,35		
S2c	199,7	45,7	22,88		
Probe S3	mg	Klason Lignin [mg]	% Klason Lignin	MW S3	SEM S3
S3a	199,7	60,6	30,35	30,36	0,04
S3b	200,8	61,1	30,43		
S3c	200,2	60,7	30,32		

**Tabelle 6.27:** Durch Thioacidolyse bestimmte Gehalte der p-Hydroxyphenyl-, Guaiacyl- und Syringyl-Monomere von Lignin (H, G und S) in ozonexponierten Buchenblättern in  $\mu\text{mol}$  pro Gramm extrahierter Probe (Versuch B, 200 nl/l O<sub>3</sub>, 8 h/d, 46 d). Die Ozonsymptome der Proben S1, S2 und S3 entsprachen den Boniturstufen 1, 2-4 bzw. 5-6 gemäß Tabelle 2.4, S. 30.

Probe S1	$\mu\text{mol}$ H	$\mu\text{mol}$ G	$\mu\text{mol}$ S	H+S+G	S/G	% H	% G	% S
S1a	0,18	60,00	83,00	143,18	1,38	0,13	41,91	57,97
S1b	0,25	64,00	79,90	144,15	1,25	0,17	44,40	55,43
MW S1	0,22	62,00	81,45	143,67	1,32	0,15	43,15	56,70
SEM S1	0,04	2,00	1,55	0,48	0,07	0,02	1,25	1,27
Probe S2	$\mu\text{mol}$ H	$\mu\text{mol}$ G	$\mu\text{mol}$ S	H+S+G	S/G	% H	% G	% S
S2a	0,27	58,10	51,40	109,77	0,88	0,25	52,93	46,83
S2b	0,26	62,00	56,90	119,16	0,92	0,22	52,03	47,75
MW S2	0,27	60,05	54,15	114,47	0,90	0,23	52,48	47,29
SEM S2	0,00	1,95	2,75	4,69	0,02	0,01	0,45	0,46
Probe S3	$\mu\text{mol}$ H	$\mu\text{mol}$ G	$\mu\text{mol}$ S	H+S+G	S/G	% H	% G	% S
S3a	0,68	62,70	52,30	115,68	0,83	0,59	54,20	45,21
S3b	0,58	60,40	51,00	111,98	0,84	0,52	53,94	45,54
MW S3	0,63	61,55	51,65	113,83	0,84	0,55	54,07	45,38
SEM S3	0,05	1,15	0,65	1,85	0,01	0,03	0,13	0,17

**Tabelle 6.28:** Durch Thioacidolyse bestimmte Gehalte der p-Hydroxyphenyl-, Guaiacyl- und Syringyl-Monomere von Lignin (H, G und S) in ozonexponierten Buchenblättern in  $\mu\text{mol}$  pro Gramm Klason-Lignin (Versuch B, 200 nl/l  $\text{O}_3$ , 8 h/d, 46 d). Die Ozonsymptome der Proben S1, S2 und S3 entsprachen den Boniturstufen 1, 2-4 bzw. 5-6 gemäß Tabelle 2.4, S. 30

Probe S1	$\mu\text{mol H}$	$\mu\text{mol G}$	$\mu\text{mol S}$	H+S+G	S/G	% H	% G	% S
S1a	0,67	227,70	314,80	543,17	1,38	0,12	41,92	57,96
S1b	0,93	242,80	302,90	546,63	1,25	0,17	44,42	55,41
MW S1	0,80	235,25	308,85	544,90	1,32	0,15	43,17	56,68
SEM S1	0,13	7,55	5,95	1,73	0,07	0,02	1,25	1,27
Probe S2	$\mu\text{mol H}$	$\mu\text{mol G}$	$\mu\text{mol S}$	H+S+G	S/G	% H	% G	% S
S2a	1,15	251,90	222,70	475,75	0,88	0,24	52,95	46,81
S2b	1,11	268,90	246,60	516,61	0,92	0,21	52,05	47,73
MW S2	1,13	260,40	234,65	496,18	0,90	0,23	52,50	47,27
SEM S2	0,02	8,50	11,95	20,43	0,02	0,01	0,45	0,46
Probe S3	$\mu\text{mol H}$	$\mu\text{mol G}$	$\mu\text{mol S}$	H+S+G	S/G	% H	% G	% S
S3a	2,23	206,70	172,40	381,33	0,83	0,58	54,21	45,21
S3b	1,92	199,00	168,00	368,92	0,84	0,52	53,94	45,54
MW S3	2,08	202,85	170,20	375,13	0,84	0,55	54,07	45,37
SEM S3	0,15	3,85	2,20	6,20	0,01	0,03	0,13	0,16

## 6.6 Bonitur der ozonbedingten Blattläsionen

**Tabelle 6.29:** Ozonabhängige Blattläsionen in Versuch B (200 nl/l  $\text{O}_3$ , 8 h/d, 46 d). Dargestellt ist der Anteil an Blättern mit ozonbedingten Läsionen gemäß den verwendeten Boniturstufen (siehe 2.3.2, S. 29) bei 5 ozonbehandelten Bäumen.

Tage	Boniturstufen					
	1	2	3	4	5	6
1	100	0	0	0	0	0
2	99	1	0	0	0	0
7	98	2	0	0	0	0
15	92	6	2	0	0	0
42	80,6	10,4	8	1	0	0
32	77,8	5,2	6	8	3	0
39	70,8	6,2	3	9	10	1
46	61	15	3	5	12	4

**Tabelle 6.30:** Ozonabhängige Blattläsionen in Versuch C (150-190 n/l O<sub>3</sub>, 8 h/d). Dargestellt ist der Anteil an Blättern mit ozonbedingten Läsionen gemäß den verwendeten Boniturstufen (siehe 2.3.2, S. 29) für jeweils 12 Bäume der Versuchsvarianten a, c, d, e und f.

<b>a</b>							<b>c</b>						
	Boniturstufen							Boniturstufen					
Tag	1	2	3	4	5	6	Tag	1	2	3	4	5	6
42	99,2	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	42	99,2	0,8	0,1	0,0	0,0	0,0
45	97,4	2,6	0,0	0,0	0,0	0,0	45	99,2	0,8	0,1	0,0	0,0	0,0
50	91,3	3,8	3,3	1,7	0,0	0,0	50	89,2	8,2	2,3	0,3	0,0	0,0
56	85,8	2,5	2,9	2,5	2,9	3,3	56	68,3	17,1	12,5	1,7	0,4	0,0
62	72,9	7,1	5,0	4,2	6,3	4,6	62	65,4	9,6	20,8	2,5	1,3	0,4
71	69,9	7,1	5,4	5,0	5,0	7,6	71	60,4	6,7	17,9	9,2	5,4	0,4
78	65,4	5,8	5,0	7,5	5,4	10,8	78	58,8	2,9	17,1	11,7	7,1	2,5
85	54,6	5,4	6,7	10,8	6,7	15,8	85	58,3	0,8	8,3	10,8	15,8	5,8
<b>d</b>							<b>e</b>						
	Boniturstufen							Boniturstufen					
Tag	1	2	3	4	5	6	Tag	1	2	3	4	5	6
42	97,1	2,5	0,4	0,0	0,0	0,0	42	99,2	0,4	0,4	0,0	0,0	0,0
45	93,8	2,9	2,5	0,8	0,0	0,0	45	96,7	2,3	0,8	0,2	0,1	0,0
50	87,9	4,2	2,9	2,1	2,5	0,4	50	93,8	1,3	4,2	0,4	0,4	0,0
56	76,3	8,3	6,7	2,5	2,1	4,2	56	86,2	4,9	1,7	1,4	4,2	1,7
62	69,4	9,6	9,3	2,9	2,1	6,7	62	73,3	10,4	5,0	4,2	3,3	3,8
71	64,6	5,8	7,1	10,8	4,6	7,1	71	65,0	8,3	9,2	7,1	5,8	4,6
78	51,3	8,3	13,8	13,3	5,4	7,9	78	51,3	13,3	8,8	11,7	7,9	7,1
85	40,8	5,4	10,0	14,6	16,7	12,5	85	43,8	7,9	7,9	14,6	13,3	12,5
<b>f</b>													
	Boniturstufen												
Tag	1	2	3	4	5	6	Tag	1	2	3	4	5	6
42	93,3	6,3	0,4	0,0	0,0	0,0							
45	91,7	4,2	4,2	0,0	0,0	0,0							
50	83,8	3,8	11,7	0,8	0,0	0,0							
56	82,5	2,1	5,4	6,3	3,3	0,4							
62	80,8	3,3	5,8	4,2	4,2	1,7							
71	80,1	2,3	1,8	6,3	6,7	2,9							
78	74,1	5,4	4,2	4,3	6,7	5,4							
85	73,4	3,8	4,6	1,8	7,7	8,8							

Dipl.-Ing. agr. (Univ.)  
**Gunter Andreas Betz**



München, 27. Dezember 2005

Kleinstraße 44  
D-81379 München  
gunter.betz@web.de

geboren am 30. Januar 1974  
in München  
deutsche Staatsbürgerschaft  
verheiratet

## Curriculum Vitae

### Ausbildung

- Sep 1984 - Jun 1993 • Otto-von-Taube Gymnasium Gauting, Abitur am 09.07.1993
- Nov 1994 - Okt 1996 • Studium der Betriebswirtschaftslehre, LMU München  
Vordiplom am 30.09.1996
- Nov 1996 - Okt 1998 • Studium der Gartenbauwissenschaften, TU München  
Vordiplom am 10.11.1998, Prädikat: 'sehr gut bestanden'
- Nov 1998 - Sep 1999 • Studiumsbegleitende Praktika
  - Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Grünbach
  - Botanischer Garten, München
  - Bundessortenamt, Bamberg
- Nov 1999 - Mai 2002 • Studium der Gartenbauwissenschaften TU München  
Hauptdiplom am 23.05.2002, Prädikat: 'sehr gut bestanden'
- Sep 2002 - Dez 2005 • Promotion an der GSF GmbH, Neuherberg

### Wissenschaftliche Arbeiten

- Projekt Einsatz von Antibiotika bei der Züchtung von Kartoffel (*Solanum tuberosum*) mittels Protoplastenfusion.
- Projekt Untersuchungen von Glutathion-S-Transferasen in *Typha latifolia* und deren mögliche Bedeutung in biologischen Kläranlagen.
- Diplomarbeit Gentechnische Modifikation der Flavonoid-Biosynthese bei *Solanum tuberosum* zur Steigerung der Resistenz gegen pilzliche und bakterielle Infektionen.
- Publikation Nunn AJ, Anegg S, Betz G, Simons S, Kalisch G, Seidlitz H, Grams TEE, Häberle K-H, Matyssek R, Bahnweg G, Sandermann H, Langebartels C (2005) Role of ethylene in the regulation of cell death and leaf loss in ozone-exposed European beech. *Plant Cell Environ* 28, 886-897.
- Publikation Bahnweg G, Heller W, Stich S, Knappe C, Betz G, Heerdt C, Kehr RD, Ernst D, Langebartels C, Nunn AJ, Rothenburger J, Schubert R, Wallis P, Müller-Starck G, Werner H, Matyssek R, Sandermann H (2005) Beech leaf colonization by the endophyte *Apiognomonium errabunda* dramatically depends on light exposure and climatic conditions. *Plant Biol* 7, 695-669.
- Publikation Olbrich M, Betz G, Gerstner E, Langebartels C, Sandermann H, Ernst D (2005) Transcriptome analysis of ozone-responsive genes in leaves of European beech (*Fagus sylvatica* L.). *Plant Biol* 7, 670-676.



## Publikationen und Tagungen:

### Publikationen:

- Nunn AJ, Anegg S, Betz G, Simons S, Kalisch G, Seidlitz H, Grams TEE, Häberle K-H, Matyssek R, Bahnweg G, Sandermann H, Langebartels C (2005) Role of ethylene in the regulation of cell death and leaf loss in ozone-exposed European beech. *Plant Cell Environ* 28, 886-897.
- Bahnweg G, Heller W, Stich S, Knappe C, Betz G, Heerdt C, Kehr RD, Ernst D, Langebartels C, Nunn AJ, Rothenburger J, Schubert R, Wallis P, Müller-Starck G, Werner H, Matyssek R, Sandermann H (2005) Beech leaf colonization by the endophyte *Apiognomonium errabunda* dramatically depends on light exposure and climatic conditions. *Plant Biol* 7, 695-669.
- Olbrich M\*, Betz G\*, Gerstner E, Langebartels C, Sandermann H, Ernst D (2005) Transcriptome analysis of ozone-responsive genes in leaves of European beech (*Fagus sylvatica* L.). *Plant Biol* 7, 670-676. (\* = Erstautoren)
- Betz G, Bahnweg G, Langebartels C, Sandermann H, Ernst D (2004) Ozone-induction of the shikimate pathway genes in European beech (*F.sylvatica* L.). Botanikertagung 2004, Braunschweig. Poster.

### Tagungen:

- Conference of Plant Stress, Reactive Oxygen and Antioxidants. Freising-Weißenstephan, 10. bis 13. September 2003.
- 11. Arbeitstagung 'Mikromethoden in der Proteinchemie', Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, 21. bis 24. Juni 2004.
- Botanikertagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft in Braunschweig, 5. bis 10. September 2004.





## Danksagung

Bei meinem Doktorvater PD Dr. Christian Langebartels möchte ich mich herzlich für die Vergabe des Themas und die fortgesetzte Betreuung meiner Dissertation trotz seines Wechsels in die wissenschaftliche Geschäftsführung der GSF bedanken. Prof. Dr. Gerhard Wenzel danke ich für die Übernahme des Koreferats und Herrn Prof. Dr. Rainer Matyssek für den Vorsitz in der Prüfungskommission sowie seinen unermüdlichen Einsatz für den SFB 607.

Für die Unterstützung und das Interesse an meiner Arbeit am Institut für Biochemische Pflanzenpathologie danke ich Herrn Prof. Dr. Heinrich Sandermann und Dr. Dieter Ernst. Die anregenden Diskussionen mit Dr. Werner Heller waren nicht nur in biochemischer Hinsicht immer ein echter Gewinn.

An Herrn Dr. Günther Bahnweg und Claudia Knappe geht mein Dank für die Bereitstellung der *Apiognomonium errabunda*-Kulturen und die Unterstützung bei den Infektionsversuchen mit Rat und Tat.

Auf dem langen Weg der Westernblot-Analysen waren mir Dr. Toni Schöffner und Dr. Burkhard Messner bei der Wahl des heterologen Proteinexpressions-Systems, Dr. Elisabeth Kremmer (Hämatologikum, GSF, München) durch die Herstellung der monoklonalen Antikörper und Dr. Sebastian Grün durch seine Erfahrungsberichte aus der Proteinanalytik eine große Hilfe.

Herzlich danken möchte ich auch Dr. Olaf Neuschäfer-Rube und Dr. Uta von Rad für die Einweisung in die DNA-Chip-Analyse und Maren Olbrich für die Hilfe bei der Sequenzierung der subtraktiven cDNA-Banken.

Bei Elke Gerstner, Susanne Stich, Lucia Gößl und Rosina Ludwig möchte ich mich besonders für die unermüdliche Hilfe bei Klonierungen und Inhaltsstoffanalysen sowie die guten Ratschläge aus ihrem reichen Erfahrungsschatz bedanken. Die Hilfe von Frau Dr. C. Lapierre (INRA, Versailles, Frankreich) war für die Analyse von Lignin von entscheidender Bedeutung.

Herrn Dr. Gerhard Welzl gebührt mein Dank für die geduldige Unterstützung bei der statistischen Auswertung meiner Daten und deren graphischer Darstellung.

Bei der Durchführung der Ozonexpositionsversuche im Gewächshaus waren mir die Techniker Dietrich Strube und Peter Kary eine große Hilfe. Ihnen und den Technikern und Wissenschaftlern vom Versuchsstandort 'Kranzberger Forst' einen besonderen Dank für die reibungslose Instandhaltung der nötigen technischen Infrastruktur. Dagmar Schneider möchte ich in diesem Zusammenhang für die gewissenhafte Durchführung des Pflanzenschutzes im Gewächshaus danken.

Dank vieler netter und humorvoller Kollegen herrschte in BIOP eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre, die ich sehr genossen habe und die mich gerne an die hier verbrachte Zeit zurückdenken lassen wird.

Die vorliegende Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgesellschaft und der GSF Neuherberg im Rahmen des SFB 607 finanziert.