# Proteomische und molekulare Untersuchungen zur ökophysiologischen Differenzierung von Deschampsia wibeliana (Sond.) Parl. und Deschampsia cespitosa (L.) P. Beauv. s. str.

## **Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades

des Fachbereiches Biologie

der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Volker Ambroselli

aus Wilhelmshaven Hamburg, Juni 2013 Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg auf Antrag von Professor Dr. U. WIENAND Weiterer Gutachter der Dissertation: Priv. Doz. Dr. K. V. SCHWARTZENBERG Tag der Disputation: 09. August 2013

Hamburg, den 23. Juli 2013

Professor Dr. C. Lohr Vorsitzender des Fach-Promotionsausschusses Biologie



Abkü	rzun	ngsverzeichnis	VI
1. Ei:	nleit	tung	1
1.1	Des	champsia cespitosa (L.) P. Beauv und Deschampsia wibeliana (Sond.) P	arl1
1.2	Übe	erflutungsregime – divergente Umweltfaktoren für die ökologische	
	Diff	erenzierung von <i>D. cespitosa</i> und <i>D. wibeliana</i>	3
1.3	Phy	siologische Auswirkungen von überflutungsbedingtem Stress	3
1.4	Anp	oassungsstrategien von Pflanzen an Überflutungsstress	5
1.5	Phy	siologische und molekulare Grundlagen der Überflutungstoleranz	
	von	Pflanzen	7
1.5	5.1	Sicherstellung der Energieversorgung durch den fermentativen	
		Metabolismus	7
1.5	5.2	Sensorische Erfassung von Sauerstoffmangel und Regulation von Al	98
1.6	Ziel	setzung der Arbeit	11
2. Ma	ater	ial und Methoden	12
2.1	Mat	erial	12
2.1	l.1	Chemikalien, Radiochemikalien und Enzyme	12
2.1	1.2	Medien und Reagenzien	13
2.1	1.3	Größenstandards	13
2.1	l.4	Oligonukleotide	13
2.1	l.5	Reaktionskomplettausstattungen (Kits)	13
2.1	l.6	Vektoren und Bakterienstämme	14
2.2	Ana	llyse von DNA	14
2.2	2.1	Molekularbiologische Standardmethoden	14
2.2	2.2	Ligation von DNA-Fragmenten und Transformation von E. coli	14
2.2	2.3	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien und enzymatischer	
		Restriktionsverdau	15
2.2	2.4	DNA-Gelelektrophorese	15

2	2.2.5	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	15
2	2.2.6	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse	15
2.3	Analy	yse von RNA	16
2	2.3.1	Isolierung von Gesamt-RNA nach Kluth et al., 2002 (modifiziert)	16
2	2.3.2	Isolierung von Gesamt-RNA mittels peqGOLD TriFast-Reagenz	17
2	2.3.3	Konzentrationsbestimmung von RNA	17
2	2.3.4	Northern-Blot-Analyse	17
	2.3.4.1	Herstellung einer Adh1 3' UTR-DNA-Sonde	17
	2.3.4.2	Radioaktive Markierung einer DNA-Sonde	18
	2.3.4.3	RNA-Agarose-Gelelektrophorese	18
	2.3.4.4	Northern-Blot-Transfer und Hybridisierung mit einer spezifischen	
		Adh1-DNA-Sonde	.19
2.4	Analy	yse von Proteinen	20
2	2.4.1	Extraktion von löslichem Gesamtprotein	20
2	2.4.2	Quantifizierung von Proteinen	20
2	2.4.3	Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)	20
2	2.4.4	Western-Blot-Transfer von Proteinen und immunologischer	
		Nachweis immobilisierter Proteine	21
2	2.4.5	Probenvorbereitung für die 2-dimensionale SDS-PAGE	22
2	2.4.6	Präparative 2D-SDS-Gele	22
2	2.4.7	2D Difference Gel Electrophoresis (2D-DIGE)	23
	2.4.7.1	Proteinmarkierung mit Fluoprobes-Fluoreszenzfarbstoffen	
		(Interchim, Montluçon, Frankreich)	23
	2.4.7.2	Proteinmarkierung mit CyDye-DIGE-fluors (GE-Healtcare, Freiburg)	24
	2.4.7.3	Rehydratisierung von immobilisierten pH-Gradientengelen (IPG-Strips)	24
	2.4.7.4	Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)	25
	2.4.7.5	Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts	
		mittels SDS-PAGE (2. Dimension)	26
	2.4.7.6	Kolloidale Coomassiefärbung präparativer SDS-Gele	27
	2.4.7.7	Aquisition von 2D-DIGE-Gelbildern	27
	2.4.7.8	Quantitative Gelanalyse	27
2	2.4.8	Bestimmung der Alkoholdehydrogenase (ADH) Enzymaktivität	28

2	.5	Tran	skriptomsequenzierung von <i>D. cespitos</i> a und <i>D. wibelian</i> a sowie	
		Erste	ellung von Transkriptomdatenbanken	29
2	.6	Mass	senspektrometrische Analyse von Proteinen	29
	2.6.	.1	Präparation von Protein-Spots aus 2-dimensionalen SDS-Gelen	29
	2.6.	.2	Proteinanalysen mittels Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization	
			(MALDI) und Linear Trap Quadrupole (LTQ)-Orbitrap	
			Massenspektrometrie	30
	2	.6.2.1	Entsalzung von Peptidlösungen mit Zip Tips	31
	2.6.	.3	Protein-Identifizierung durch Tandem-Massenspektrometrie	31
2	.7	Raste	erelektronenmikroskopische (REM) Analysen	32
	2.7.	.1	Präparation von Pflanzenmaterial für	
			rasterelektronenmikroskopische (REM) Analysen	32
	2.7.	.2	Trocknung von Pflanzenmaterial mittels des	
			Kritischen-Punkt-Verfahrens	32
	2.7.	.3	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Blattpräparaten	33
2	.8	Com	puterprogramme, Sequenzanalysen und Datenbankrecherchen	33
2	.9	Expe	rimentelles Design von Labor- und Freilandexperimenten zur	
		Über	flutung von Testpflanzen	34
	2.9.	.1	Laborbasierte Versuche in der Klimakammer	34
	2	.9.1.1	Pflanzenmaterial	34
	2	.9.1.2	Überflutungsversuche in der Klimakammer	35
	2.9.	.2	Reziprokes Verpflanzungsexperiment im Freiland	37
	2	.9.2.1	Experimentelle Standorte	37
	2	.9.2.2	Konzeption und Probennahme	39
2	E	~ a la	iaaa	40
3.	EIŞ	gebn	isse	42
3	.1	Labo	rbasierte Experimente in der Klimakammer	43
	3.1.	.1	Vergleichende Untersuchungen zur Genexpression, zum Proteinprofil	
			und zur Enzymaktivität des Hypoxie-Markers Alkoholdehydrogenase	
			(ADH) unter Überflutungsbedingungen in Blättern von	
			Deschampsia cespitosa und D. wibeliana	43

3.1.1	1.1 Überflutungsexperimente zur Identifizierung eines experimentell
	sinnvollen Probennahmezeitpunktes44
3.1.1	1.2 Untersuchung der Enzymaktivität, Protein- und Genexpression der
	Alkoholdehydrogenase nach dreiwöchiger periodischer Überflutung 47
3.1.2	Identifizierung überflutungsinduzierter Proteine in Deschampsia cespitosa
	und D. wibeliana nach dreiwöchiger periodischer Überflutung in der
	Klimakammer durch 2-dimensionale DIGE-Analysen
	( <u>D</u> ifferences <u>In Gel Electrophoresis</u> )52
3.1.2	2.1 Erstellung von Taxa-spezifischen Transkriptomdatenbanken52
3.1.2	2.2 2D-DIGE – Technisches Prinzip, experimentelle Möglichkeiten
	und Limitierungen53
3.1.2	2.3 2D-DIGE-Analyse von überflutungsinduzierten Proteinen in <i>D. cespitosa</i>
	und D. wibeliana nach drei Wochen periodischer Überflutung
	in der Klimakammer53
3.1.2	2.4 Identifizierung der detektierten Proteine durch Massenspektrometrie 59
3.1.2	2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der 2D-DIGE-Analyse nach
	dreiwöchiger periodischer Überflutung von Deschampsia cespitosa und
	D. wibeliana in der Klimakammer65
3.2 Ur	itersuchungen im Freiland68
3.2.1	Ergebnisse der Pegelstandsmessungen am Standort Kollmar68
3.2.2	Untersuchungen zur Enzymaktivität der Alkoholdehydrogenase in
	Blättern von Deschampsia cespitosa und D. wibeliana im Verlaufe
	des reziproken Verpflanzungsexperiments im Freiland70
3.2.3	Identifizierung adaptationsrelevanter Proteine in
	Deschampsia cespitosa und D. wibeliana nach sechswöchiger
	reziproker Verpflanzung im Freiland durch 2D-DIGE76
3.2.3	3.1 Identifizierung von Proteinen mittels Nano Electrospray Tandem Mass
	Spectrometry (MS-MS)81
3.2.3	3.2 Zusammenfassung der Ergebnisse der 2D-DIGE-Analyse nach
	sechswöchiger reziproker Verpflanzung von Deschampsia cespitosa
	und <i>D. wibeliana</i> im Freiland90

3.2	2.4	Morphologische Untersuchung der Blätter von Deschampsia cespito	)sa
		und <i>D. wibeliana</i> nach sechswöchiger Verpflanzung im Freiland mit	ttels
		Rasterelektronenmikroskopie (REM)	93
<b>4. D</b> i	iskus	sion	98
4.1	Prot	eomanalysen in Deschampsia	98
4.1	1.1	Proteinextraktion und 2D-DIGE-Analysen von D. cespitosa und	
		D. wibeliana	99
4.1	1.2	Transkriptomsequenzierung und Proteinidentifizierung durch	
		Massenspektrometrie	101
4.2	Unte	ersuchungen zur Überflutungstoleranz von <i>D. cespitosa</i> und	
	D. w	ibeliana unter kontrollierten Bedingungen in der Klimakammer	104
4.3	Unte	ersuchungen zur Überflutungstoleranz von <i>D. cespitosa</i> und	
	D. w	ribeliana im Freiland	109
4.4	Verg	leich der Ergebnisse aus Labor und Freilandexperimenten	117
4.5	Mole	ekulare und physiologische Aspekte der ökologischen Differenzierun	ıg
	von .	Deschampsia cespitosa und D. wibeliana	119
5. Aı	usbli	ck	122
6. Zı	ısam	menfassung	124
7. Li	terat	urverzeichnis	126

# Abkürzungsverzeichnis

#### Chemikalien und Lösungen

ACN Acetonitril AMP Ampicillin

APS Ammoniumperoxodisulfat

BSA Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)

CHAPS 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat

DTT 1,4-Dithio-L-Threitol

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure FA Ameisensäure (formic acid)

IAA Iodacetamid

IPTG Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid HCCA  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxyzimtsäure

HCl Salzsäure

HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)- ethansulfonsäure

LB Luria-Bertani NaAc Natriumacetat

PMSF Phenylmethylsulfonylfluorid SDS Natriumdodecylsulfat

SSC Natriumchlorid-Natriumcitrat TEMED Tetramethylethylendiamin

TFA Trifluoressigsäure (trifluoroacetic acid)
TRIS Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

X-GAL 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

#### Molekularbiologische und biochemische Abkürzungen

AS Aminosäure

ATP Adenosintriphosphat

bp Basenpaare

cDNA komplementäre DNA

Ci Curie

DNA Desoxyribonukleinsäure

dNTP Desoxyribonukleosidtriphosphat

E. coli Escherichia coli

EST expressed sequence tag: teilweise sequenzierte cDNA in Datenbanken

NADH Nikotinamidadenindinukleotid-H<sub>2</sub>

nr nicht redundant nt Nukleotid

RNA Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)

#### Einheiten und weitere Abkürzungen

1Deindimensional2DzweidimensionalAoptische Absorption

°C Grad Celsius Da Dalton

DIGE Differenzielle Gelelektrophorese (Difference Gel Electrophoresis)

#### Abkürzungsverzeichnis

et al. et alii

×g Gravitiationsbeschleunigung IEF Isoelektrische Fokussierung IPG Immobilisierter pH Gradient

kb Kilobasenpaare kDa Kilodalton M Molar mA Milliampère

MALDI-TOF MS Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass

Spectrometry

min Minute(n)

µg Mikrogramm

µl Mikroliter

mg Milligramm

ml Milliliter

mM Millimolar

mmol Millimol

mRNA Boten-RNA (messenger RNA)

MW Molekulargewicht

m/z Masse-zu-Ladungs-Verhältnis

ng Nanogramm nkat Nanokatal OD Optische Dichte

PAGE Polyacrylamidgelelektrophorese

PCR Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)

pH potentis hydrogenii pI isoelektrischer Punkt

pmol Pikomol

rpm Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)

RT Raumtemperatur
h Stunde(n)
sec Sekunde(n)
Taq Thermus aquaticus

U unit

UTR nicht translatierte Region

Gewicht/Volumen

UV ultraviolettes Licht

ÜF überflutet
NÜF nicht-überflutet
ÜN über Nacht
V Volt
Vh Voltstunden
V% Volumenprozent
v/v Volumen/Volumen

w/v Gewie W Watt

## 1. Einleitung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Anpassung zweier nah verwandter Süßgräser, der Rasenschmiele (*Deschampsia cespitosa*) und der Elbe-Schmiele (*D. wibeliana*), an ihre jeweiligen Lebensräume.

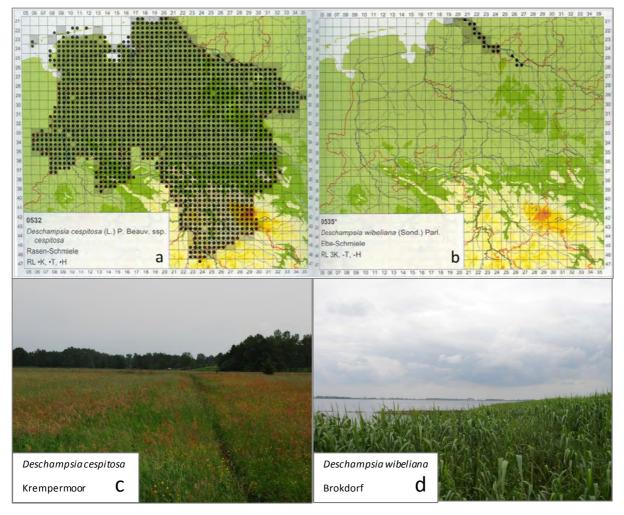
# 1.1 Deschampsia cespitosa (L.) P. Beauv und Deschampsia wibeliana (Sond.) Parl.

Deschampsia cespitosa und Deschampsia wibeliana gehören zur Familie der Poaceae und hier zur Unterfamilie Pooidae. Es sind wintergrüne Horstgräser, die mit Trivialnamen Rasenschmiele (D. cespitosa) und Elbe-Schmiele (D. wibeliana) heißen.

Deschampsia cespitosa ist ein nordhemisphärisches Taxon, das nahezu circumpolar und somit auch in Norddeutschland weit verbreitet ist (Hultén, 1962; Garve, 2007). Die Pflanze toleriert trockene bis staunasse Lebensräume und besiedelt sandige bis wechselfeuchte Böden, aber ebenso anmoorige bis moorige Standorte (Weihe & Reese, 1968; Abb. 1 (a) und (c)).

Deschampsia wibeliana hingegen ist ein Lokalendemit. Die Pflanze besiedelt die tidebeeinflussten oligohalinen Marschen des Elbeästuars. Sie wächst auf sandigen bis schwach lehmigen Böden der Uferbereiche. Dort tolerieren die Pflanzen tideabhängige, zweimal tägliche Überflutung mit Süß- oder Brackwasser (Weihe & Reese, 1968) in deren Verlauf sie standortabhängig 4 bis 7 Stunden vollständig von Wasser bedeckt sind (Abb. 1 (b) und (d)).

Auf morphologischer Ebene unterscheiden sich beide Taxa vor allem hinsichtlich ihrer Blätter (Weihe & Reese, 1968). Während *D. cespitosa* sehr feste, raue Blätter hat, sind die Blätter von *D. wibeliana* sehr flexibel und zeigen eine weiche Blattoberfläche. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal betrifft den Blühzeitpunkt. *Deschampsia cespitosa* blüht im Juni und Juli, *D. wibeliana* hingegen beginnt bereits im April und Mai zu blühen (Weihe & Reese, 1968; Albers, 1972; Jäger & Werner, 2005).



**Abb. 1: Verbreitung und Habitate von** *D. cespitosa* **und** *D. wibeliana*. Oben: Verbreitung von *D. cespitosa* (a) und *D. wibeliana* (b) im Raum Niedersachsen. Ein Rasterkästchen entspricht der Fläche von 1 km². Unten: Typische Habitate von *D. cespitosa* im Krempermoor (c) und *D. wibeliana* in Brokdorf (d). (Kartenmaterial: Garve, 2007; Fotos: Ambroselli & Müller, Universität Hamburg)

Durch eine AFLP-Analyse (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) konnte von Heydel (2008) gezeigt werden, dass eine distinkte genetische Distanz zwischen beiden Taxa besteht. *D. cespitosa* und *D. wibeliana* reagieren außerdem mit unterschiedlicher Biomasseproduktion auf verschiedene Überflutungsregime. Trotz dieser Differenzen konnte von Albers gezeigt werden, dass die Taxa zur Hybridbildung *in vitro* fähig sind (Albers, 1972), auch wenn nach heutigem Kenntnisstand bisher keine Hybridformen unter natürlichen Bedingungen beobachtet werden konnten.

# 1.2 Überflutungsregime – divergente Umweltfaktoren für die ökologische Differenzierung von *D. cespitosa* und *D. wibeliana*

Die ökologische Differenzierung von *Deschampsia cespitosa* und *Deschampsia wibeliana* geht mit einer Besonderheit einher: der Zeitpunkt der Divergenz beider Taxa kann, in entwicklungsgeschichtlichen Maßstäben, sehr genau bestimmt werden. Denn die Marschen der Elbe sind postglazial durch den Einfluss der Gezeiten erst vor 7500 Jahren (Schmidtke & Lammers, 1993) entstanden. Die rezent ansässige Flora muss daher im Laufe der letzten 7500 Jahre entweder aus angrenzenden Lebensräumen eingewandert oder evolutiv in den vielfältigen Habitaten der Elbe entstanden sein, die sich infolge des Endes der Weichsel-Kaltzeit vor ca. 10.000 Jahren gebildet haben.

Ein komplexer Lebensraum wie die Elbmarschen, in denen die ansässige Flora standortabhängig unterschiedlichen Überflutungs- und Salzgradienten ausgesetzt ist (Jensen, 2007), bietet die Voraussetzungen für eine ökologische Artbildung, die durch Trennung von Populationen aufgrund von Adaptation an ökologische Faktoren geschieht (Rundle & Nosil, 2005).

Überflutungsereignisse sind abiotische Stressfaktoren, die sich drastisch auf das Wachstum und letztlich das Überleben von Pflanzen auswirken (Sauter, 2000; Bailey-Serres & Voesenek, 2008, Jackson & Colmer, 2005). Sie üben daher einen Selektionsdruck auf terrestrische Pflanzen in Feuchtgebieten aus (Jackson *et al.*, 2009). Überflutungsdauer und Höhe der Wasserstände wirken dabei selektiv auf unterschiedliche überflutungsassoziierte Eigenschaften und determinieren Vorkommen und Verbreitung von Arten in Überflutungsgebieten (Armstrong *et al.*, 1985; Pennings & Callaway, 1992; Emery *et al.*, 2001).

## 1.3 Physiologische Auswirkungen von überflutungsbedingtem Stress

Überflutete Pflanzen sind bei kompletter Überflutung mit einem zentralen Problem konfrontiert: die Diffusionsrate von Gasen in Wasser ist gegenüber Luft etwa 10.000-fach herabgesetzt (Armstrong, 1979). In Verbindung mit der geringen Wasserlöslichkeit von Sauerstoff kommt es zu einer Verminderung des Gasaustausches

und damit verbunden zur Limitierung der CO<sub>2</sub> – und O<sub>2</sub> – Konzentrationen. Sinkt das interzelluläre Sauerstoffniveau, setzt ein Wechsel vom aeroben zum fermentativen Metabolismus ein (Mendelssohn *et al.*, 1981). Aufgrund der geringen ATP-Ausbeute der Glykolyse können Energiedefizite auftreten, die wiederum zu cytoplasmatischer Acidose sowie zu Beschädigungen zellulärer Komponenten führen können (Felle, 2006; Roberts *et al.*, 1984; Colmer & Voesenek, 2009). Zusätzlich beeinträchtigen geringe Lichtintensitäten unter Wasser die Photosynthese (Sand-Jensen, 1989; Vervuren *et al.*, 2003) und können einen Kohlenhydratmangel verursachen, der letztendlich zum Zelltod führen kann (Bailey-Serres & Voesenek, 2008).

Ein weiteres Problem, dem Pflanzen unter hypoxischen Bedingungen ausgesetzt sind, ist das Auftreten von oxidativem Stress. Vor allem bei der Rückkehr zu normoxischen Bedingungen, wenn Sauerstoff in hypoxisches Gewebe eintritt, kommt es in vermehrtem Maße zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und damit zu oxidativem Stress (Blokhina *et al.*, 2003). Erhöhte Konzentrationen von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Superoxid ( $O_2$ ) oder Singulett-Sauerstoff ( $O_2$ ), können die Peroxidation von Membranlipiden, Denaturierung von Proteinen und DNA-Mutationen zur Folge haben (Bowler *et al.*, 1992; Yan *et al.*, 1996).

Im Wurzelraum sind Pflanzen toxischen Bodenpartikeln ausgesetzt (Ponnamperumo, 1972), die durch Reduktion von Bodenkomponenten entstehen. Diese können aufgrund ihrer Wasserlöslichkeit von den Wurzeln aufgenommen werden und in der Pflanze akkumulieren (Koch & Mendelssohn, 1989). Zusätzlich kann es durch pH-Änderungen im Wurzelbereich zu einer verminderten Nährstoffverfügbarkeit kommen (Keeley, 1979). Denitrifizierende Mikroorganismen können diesen Mangel durch Verbrauch von Stickstoffreserven verstärken (Ponnamperumo, 1972; Lamers *et al.*, 2006).

Anoxische Bodenverhältnisse (Sauerstoffgehalt 0%) können darüber hinaus zu Beschädigung der Wurzeln führen. Eine Ansäuerung des Cytoplasmas führt hier zu einer Reduzierung der Wasseraufnahme durch Inhibition der Wurzelpermeabilität (Tournaire-Roux *et al.*, 2003). Aus diesem Grund kann es auch unter Überflutungsbedingungen zu Trockenstress in der Pflanze kommen (Insausti *et al.*, 2001; Fukao *et al.*, 2011).

Die Folgen von Überflutung betreffen den Pflanzenkörper somit ganzheitlich und können gravierende Folgen für den Organismus haben oder sogar zum Tod der Pflanze führen (Bailey-Serres & Voesenek, 2008; Mommer & Visser, 2005). Dennoch tolerieren viele Arten Überflutung unterschiedlichen Ausmaßes und sind somit in der Lage, Nischen in Überflutungsgebieten zu besetzen (Banach *et al.*, 2009; Vervuren *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2013). Im Folgenden sollen einige dieser Anpassungsstrategien zusammenfassend dargestellt werden.

## 1.4 Anpassungsstrategien von Pflanzen an Überflutungsstress

Damit anhaltender Sauerstoffmangel nicht zum Absterben führt, haben Pflanzen im Laufe der Evolution verschiedene Strategien entwickelt, um Schwankungen der Sauerstoffkonzentration zu überstehen. Zahlreiche Anpassungsmechanismen finden sich auf morphologischer, aber auch auf physiologischer und genetischer Ebene. Dabei können zwei grundlegende Formen der Anpassung unterschieden werden: die Vermeidung und die Toleranz von Sauerstoffmangel (Bailey-Serres & Voesenek, 2008; Colmer & Voesenek, 2009).

Vermeidungsstrategien, die von Bailey-Serres & Voesenek (2008) unter der Kategorie Low Oxygen Escape Syndrome (LOES) zusammengefasst wurden, beschreiben morphologische Anpassungen von Pflanzen an Überflutung. Durch Initiierung des Streckungswachstums unter Überflutungsbedingungen können Spross oder Blätter der Pflanze an die Wasseroberfläche gelangen, um dort die Sauerstoffversorgung des Organismus zu gewährleisten (Sauter, 2000; Bailey-Serres & Voesenek, 2008). Außerdem kann der interne Sauerstofftransport in der Pflanze z. B. durch die Bildung von Aerenchym verbessert werden.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Ausbildung morphologisch angepasster Blätter unter Wasser. Diese *aquatischen* Blätter sind bis zu 20 % dünner als terrestrische Blätter und weisen dadurch eine höhere spezifische Blattfläche auf. Eine zusätzliche Verringerung der Cuticula führ zu einem verbesserten Gasaustausch und zur erhöhten Aufnahme von Sauerstoff aus dem Wasser. Darüber hinaus kann CO<sub>2</sub> direkt in die

Mesophyllzellen diffundieren und somit die Assimilation von Kohlenstoff stark erhöhen (Bailey-Serres & Voesenek, 2008; Mommer *et al.*, 2004).

Auch wenn eine Vermeidungsstrategie das Überleben in Überflutungsgebieten sichern kann, gehen damit einige Nachteile einher: so ist z.B. das rapide Wachstum sehr energieintensiv (Setter & Laureles, 1996). Wird die Wasseroberfläche bis zum Verbrauch der Kohlenhydratreserven nicht erreicht, droht der Pflanze der Tod (Jackson, 2008). Eine Vermeidungsstrategie ist für die Pflanze somit nur dann rentabel, wenn der Überflutungszustand lange andauert und die Wasserstände niedrig genug sind, um überwunden werden zu können (Voesenek *et al.*, 2004).

Arten, die in ihren Lebensräumen kurzweiligen oder sehr tiefen Überflutungen ausgesetzt sind, haben daher eine andere Strategie entwickelt: Sie passen ihren Stoffwechsel den verringerten Sauerstoffkonzentrationen an. Der Energiemetabolismus wird von aerober auf anaerobe Energiegewinnung umgeschaltet. Gleichzeitig limitiert die Pflanze das Wachstum sowie andere ATP-verbrauchende Vorgänge wie den Anabolismus und die Ribosomenbiogenese (Branco-Price, 2005; Baena-Gonzáles *et al.*, 2007). Energie- und Kohlenhydratverbrauch unter Wasser werden somit reduziert und die Pflanze ist in der Lage, mit den geringen Mengen ATP aus der Glykolyse zu überleben Bailey-Serres *et al.*, 2012; Perata & Voesenek, 2007).

Diese Strategie der Überflutungstoleranz wurde von Colmer & Voesenek (2009) als *Low Oxygen Quiescence Syndrome* (LOQS) bezeichnet. Unabhängig davon, ob die Anpassung an Überflutung durch eine Vermeidung von Überflutungsstress (LOES) oder in Form einer Justierung des Stoffwechsels geschieht (LOQS), müssen die physiologischen Adaptationsmechanismen auf zellulärer Ebene einer strikten Regulation unterliegen (Bailey-Serres & Voesenek 2008). Neben der sensorischen Wahrnehmung von Sauerstoffmangel und der Regulation des Kohlenhydratverbrauchs und der ATP-Synthese, müssen die Folgen dieser physiologischen Umstellungen, der Ansäuerung des Cytosols sowie die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) kontrolliert werden (Bailey-Serres & Voesenek, 2008).

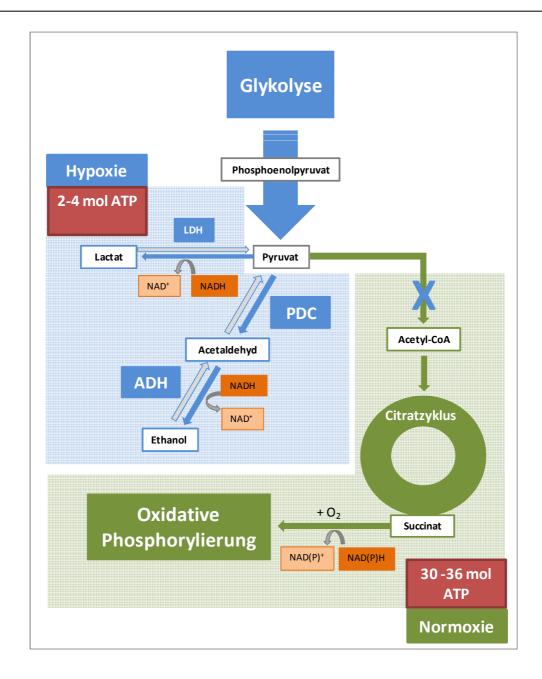
## 1.5 Physiologische und molekulare Grundlagen der Überflutungstoleranz von Pflanzen

# 1.5.1 Sicherstellung der Energieversorgung durch den fermentativen Metabolismus

Die abnehmende  $O_2$ -Konzentration im Pflanzengewebe bei Überflutung führt zu einer Hemmung der oxidativen Phosphorylierung in der mitochondrialen Atmungskette, da Sauerstoff in der Atmungskette als Elektronenakzeptor nicht zur Verfügung steht (Abbildung 2).

Die Versorgung der Zelle mit Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) erfolgt bei anhaltendem O<sub>2</sub>-Mangel hauptsächlich über die Glykolyse (Rocha *et al.*, 2010). Die dafür notwendige Regeneration von NAD+ wird über die Fermentation gewährleistet. Neben Lactat wird hierbei hauptsächlich Ethanol gebildet (Perata & Alpi, 1993). Dem Enzym Alkoholdehydrogenase kommt dabei eine zentrale Rolle zu. Pyruvat, das als metabolisches Zwischenprodukt der Glykolyse entsteht, wird nicht in den Citratzyklus eingeschleust, sondern durch das Enzym Pyruvatdecarboxylase (PDC) decarboxyliert und das entstehende Acetaldehyd durch ADH zu Ethanol reduziert. Über den fermentativen Metabolismus werden so 2 bis 4 Moleküle ATP pro Molekül Hexose gewonnen.

Neben der Pyruvatdecarboxylase ist die Alkoholdehydrogenase ein Schlüsselenzym der Fermentation (Sachs & Ho, 1986). Bei ADH handelt es sich um eine Genfamilie, von deren Mitgliedern ADH1 das bekannteste Hypoxie-induzierte Mitglied ist (Hake *et al.*, 1985; Freeling & Benett, 1985). Eine Hypoxie-bedingte Induktion der Transkriptmenge, Proteinanwesenheit und Enzymaktivität von ADH1 konnte in den letzten Jahrzehnten in verschiedenen Studien mit der Toleranz gegenüber Hypoxie in Verbindung gebracht werden (Wignarajah & Greenway, 1976; Johnson *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 2006).



**Abb. 2: Schematische Darstellung des aeroben und anaeroben Metabolismus in Pflanzen.** Grün hinterlegt: Oxidativer Metabolismus. Blau hinterlegt: Fermentativer Metabolismus. Blaue Pfeile zeigen Stoffwechselwege, die bei Hypoxie aktiv sind, graue und grüne Pfeile weisen auf inhibierte Reaktionen hin.

# 1.5.2 Sensorische Erfassung von Sauerstoffmangel und Regulation von ADH

Die Regulation der ADH1-Aktivität steht in engem Zusammenhang mit der Wahrnehmung von zellulärem Sauerstoffmangel, der indirekt über die Erfassung veränderter Konzentrationen von ATP und ADP sowie Kohlenhydraten und Pyruvat erfolgen kann. Auch eine Änderung des cytosolischen pH-Wertes sowie Änderungen der

Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und das vermehrte Auftreten von ROS können als Signale für die Erfassung von Sauerstoffmangel dienen (Baxter-Burrell, 2002; Bailey-Serres & Chang, 2005). So erfolgt bei Sauerstoffmangel die Aktivierung eines G-Proteins (Rop), das in Verbindung mit einer erhöhten  $Ca^{2+}$ -Konzentration zu einer erhöhten  $H_2O_2$ -Produktion durch eine calciumabhängige NADPH-Oxidase führt. Die erhöhte Wasserstoffperoxidkonzentration führt schließlich zu einer Induktion von ADH1 (Baxter-Burrell, 2002).

Eine Möglichkeit zellulären weitere sensorischen Erfassung der zur Sauerstoffkonzentration erfolgt über die veränderte intrazelluläre Gaszusammensetzung bei Überflutung. Aufgrund des verminderten Gasaustausches in überfluteten Pflanzen sowie einer erhöhten Ethylen-Produktion kommt es zu einer Akkumulation von Ethylen im Pflanzenkörper (Vreeburg et al., 2005). In Arabidopsis und Reis wurde eine Gruppe von Ethylen-Response-Faktoren (Gruppe VII ERFs) identifiziert, die sowohl in Vermeidungs- als auch in Toleranzstrategien involviert ist (Bailey-Serres et al., 2012). Bei Ethylen-Response-Faktoren handelt es sich um ethyleninduzierte Transkriptionsfaktoren. In Reis bewirkt der ERF SUB1A eine Expression von Adh1 (Fukao et al., 2006; Xu et al., 2006; Fukao et al., 2011). Gleichzeitig erfolgt eine Verminderung des Wachstums durch Hemmung der Ethylenproduktion und Verringerung der Sensitivität gegenüber des Wachstumshormons Gibberellinsäure. Darüber hinaus wird der Kohlenhydratverbrauch durch Repression von Genen des Kohlenhydratkatabolismus limitiert (Fukao et al., 2006). Bei Abwesenheit von SUB1A oder der Expression der Gruppe VII ERFs SK1 und SK2 hingegen wird eine Vermeidungsstrategie durch Initiierung des Streckungswachstums initiiert (Hattori et al., 2009).

In *Arabidopsis* wird eine *Quiescence*-Strategie durch die Ethylen-Response-Faktoren RAP2.12, RAP2.2, HRE1 und HRE2 induziert (Hinz *et al.*, 2010; Licausi *et al.*, 2011; Licausi, 2013). Eine Vermeidungsstrategie, wie sie in einigen Reiskultivaren identifiziert werden konnte, wird in *Arabidopsis thaliana* nicht initiiert. Die Regulation der Ethylen-Response-Faktoren und damit der von ihnen induzierten physiologischen Prozesse erfolgt in *Arabidopsis* über den ubiquitinabhängigen *N-end rule pathway*. Hierbei wird das N-terminale Methionin durch eine Methioninaminopeptidase entfernt, wenn die zweite N-terminale Aminosäure des Proteins ein Cystein ist. Das Cystein wird daraufhin

oxidiert, ein Arginin durch Arginintransferase N-terminal konjugiert und das Protein in einem nächsten Schritt durch Ubiquitinierung für die Degradation im Proteasom markiert (Licausi *et al.*, 2011).

Unter Normoxie liegt RAP2.12 in der Plasmamembran vor und wird dort durch die Bindung an das Membranprotein ACBP vor Degradierung durch den *N-end rule pathway* geschützt. Bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen dissoziiert RAP2.12 von ACBP und wird in den Zellkern transportiert, wo es als Transkriptionsfaktor auf die Expression von Hypoxie-assoziierten Genen, darunter ADH und PDC, wirkt. Bei Rückkehr zu normoxischen Bedingungen wird es durch den *N-end rule pathway* abgebaut. Dadurch nimmt die Expression von ADH sowie von anderen durch RAP2.12 induzierten Genen ab (Licausi *et al.*, 2011).

Die Auswirkungen von Überflutungsstress auf die Pflanze sowie die molekularen, physiologischen und morphologischen Anpassungsstrategien, die Pflanzen im Laufe der Evolution entwickelt haben, sind in den letzten Jahrzehnten intensiv untersucht worden (zusammengefasst in: Ernst, 1990; Voesenek *et al.*, 1992; Armstrong *et al.*, 1994; Voesenek *et al.*, 2006; Bailey-Serres & Voesenek, 2008; Bailey-Serres *et al.*, 2012). Erkenntnisse liegen vor allem für monokotyle und dikotyle Modellorganismen wie Reis, Mais, *Arabidopsis* und *Rumex* vor. Auch in einigen Nicht-Modellorganismen wurden molekulare und physiologische Untersuchungen zur Überflutungstoleranz durchgeführt (zusammengefasst in: Bailey-Serres *et al.*, 2012).

Diese Erkenntnisse auf andere Taxa auszuweiten ist von allgemeinem Interesse für die Grundlagenforschung. Physiologische und molekulare Daten zur Überflutungstoleranz von *D. cespitosa* und *D. wibeliana* hingegen sind bis zum heutigen Zeitpunkt nicht veröffentlicht worden. Jedoch konnte von Heydel (2008) gezeigt werden, dass *Deschampsia cespitosa* und *D. wibeliana* mit unterschiedlicher Biomasseregeneration auf Überflutung reagieren.

#### 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Deschampsia cespitosa und D. wibeliana gehören zur Familie der Poaceae. Es sind wintergrüne Horstgräser, die unter den Trivialnamen Rasenschmiele und Elbe-Schmiele bekannt sind. Beide Taxa wurden evolutionär vor erst ungefähr 7500 Jahren getrennt, als postglacial die Habitate des heutigen Elbeästuars entstanden. Deschampsia cespitosa und *D. wibeliana* zeigen innerhalb dieses Lebensraumes eine deutliche Habitatdifferenzierung. Deschampsia cespitosa ist ein circumpolar verbreitetes Taxon. Es besiedelt sandige bis moorige Standorte. Im Gegensatz dazu ist das Taxon D. wibeliana ein Endemit des Elbeästuars. Dort besiedelt es oligohaline und Süßwassermarschen, in denen die Pflanzen zweimal täglich tideabhängig überflutet werden. Es wird angenommen, dass der mit Überflutung einhergehende physiologische Stress ein divergierender Faktor in der evolutionären Artbildung sein kann. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die zellulären Antworten auf Überflutungsstress in D. wibeliana und D. cespitosa zu untersuchen, um somit Hinweise auf die molekularen und physiologischen Ursachen der ökophysiologischen Differenzierung beider Taxa zu erlangen.

Zu diesem Zweck sollte eine vergleichende Untersuchung der Überflutungstoleranz beider *Deschampsia-*Taxa mittels des bekannten Hypoxiemarkers Alkoholdehydrogenase (ADH) durchgeführt werden.

Um darüber hinaus Aufschluss bezüglich der zellulären Antwort auf Überflutung zu erhalten, sollten die Proteinexpressionsmuster beider Taxa verglichen werden. Daher wurde eine Proteomanalyse von *D. cespitosa* und *D. wibeliana* mithilfe eines differenziellen Proteinscreenings durchgeführt. Beide experimentellen Ansätze sollten sowohl unter kontrollierten Bedingungen im Labor als auch im Freiland durchgeführt werden.

#### 2. Material und Methoden

#### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Radiochemikalien und Enzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden im Reinheitsgrad *zur Analyse* (p.A.) von folgenden Firmen bezogen:

- Amersham Biosciences (Freiburg)
- AppliChem (Darmstadt)
- Applied Biosystems (Darmstadt)
- Biomol (Hamburg)
- Biozym (Oldenburg)
- Duchefa (Haarlem, NL)
- Enzo Life Sciences (Lörrach)
- Fluka (Neu-Ulm)
- GE Healthcare (Freiburg)
- Hartmann Analytic (Braunschweig)
- Invitrogen (Karlsruhe)
- Merck (Darmstadt)
- Qiagen (Hilden)
- Roche Diagnostics (Mannheim)
- Roth (Karlsruhe)
- Serva (Heidelberg)
- Sigma Aldrich (München)
- Stratagene (Heidelberg)
- Thermo Scientific (Schwerte)

Die verwendeten Enzyme wurden von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), Thermo Scientific (Schwerte) und New England Biolabs (Frankfurt am Main) bezogen.

Die Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren erfolgte mit  $\alpha$ -[ $^{32}$ P]-dCTP (3000 Ci/mmol) der Firma Hartmann Analytic (Braunschweig).

#### 2.1.2 Medien und Reagenzien

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Lösungen und Reagenzien wurden mit doppelt destilliertem Wasser angesetzt, das über eine *Millipore Milli-Q Plus* (Millipore, Billerica, USA) Wasseraufbereitungsanlage aufgereinigt wurde. Wenn nicht angegeben, wurden alle genannten Standardrezepte nach Sambrook *et al.* (1989) angesetzt.

#### 2.1.3 Größenstandards

Die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel wurde mit dem  $GeneRuler^{TM}$  DNA Ladder Mix (Thermo Scientific, Schwerte) durchgeführt. Die Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen erfolgte mit dem  $PageRuler^{TM}$  Prestainded Protein Ladder (Thermo Scientific, Schwerte).

#### 2.1.4 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und MWG Biotech AG (Ebersberg) hergestellt.

#### 2.1.5 Reaktionskomplettausstattungen (Kits)

pGem T-easy (Promega, Mannheim)

NucleoSpin® Extract II (Machery-Nagel, Düren)

High-Speed Plasmid Mini-Kit, Avegene (Hsi Chih, Taiwan)

Gel DNA-Fragments-Extraktions-Kit (Avegene, Taipei, Taiwan)

2-D Quant Kit (GE-Healthcare, Freiburg)

*MicroSpin-Columns S300* HR (Amersham Biosciences, Freiburg)

Protein Assay, (BioRad, München)

#### 2.1.6 Vektoren und Bakterienstämme

Alle Klonierungen dieser Arbeit wurden mit den E. coli-Bakterien der Stämme XL1-Blue kanR (DNA Cloning Service, Hamburg) und XL1-Blue tetR (DNA Cloning Service, Hamburg) durchgeführt (Bullock *et al.*, 1987). Die Klonierung von DNA-Fragmenten erfolgte in den Klonierungsvektor *pGem T-easy* der Firma Promega (Mannheim).

#### 2.2 Analyse von DNA

#### 2.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Die molekularbiologischen Arbeiten wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Bei Verwendung molekularbiologischer Kits wurde, sofern nicht anders vermerkt, nach Herstellerangaben verfahren.

#### 2.2.2 Ligation von DNA-Fragmenten und Transformation von E. coli

Die Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren wurde mit Hilfe des *pGem T-easy* Kits der Firma Promega (Mannheim) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Für die Transformation von *E.coli*-Zellen (DNA Cloning Service, Hamburg) wurde 1 μg Plasmid-DNA zu den Zellen gegeben. Die Transformation erfolgte anschließend durch Hitzeschock bei 42 °C für 30 sec im Wasserbad. Die Zellen wurden für 1 min auf Eis gekühlt, mit dem fünffachen Volumen LB-Medium versetzt, 1 h bei 37 °C / 160 rpm in einem Schüttler inkubiert und auf LB/AMP¹00/IPTG/X-Gal-Agarplatten ausplattiert. Die Selektion positiver Klone geschah mittels blau/weiß-Selektion nach ÜN Inkubation bei 37 °C.

# 2.2.3 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien und enzymatischer Restriktionsverdau

Die Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte mit dem *High-Speed Plasmid Mini Kits* der Firma Avegene (Taipei, Taiwan). Der enzymatische Restriktions-Verdau von DNA wurde mit *Fast Digest (FD) Restriktionsenzymen* der Firma Thermo Scientific (Schwerte) durchgeführt.

#### 2.2.4 DNA-Gelelektrophorese

Die größenabhängige Auftrennung von Nukleinsäuren wurde mittels einer horizontalen Elektrophorese in einem 1 % Agarosegel (50 ml-120 ml) durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte konstant bei 90 - 130 V in 1× TAE-Puffer. Zur Beladung des Agarosegels sind alle Proben mit Ladepuffer versetzt worden (1 Orange G (Thermo Scientific, Schwerte)). Zur Visualisierung der Nukleinsäuren unter UV-Licht wurden die Agarosegele mit 100 ng/ml – 500 ng/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines Transilluminators und einer integrierten Digitalkamera (Gene Genius, Syngene, England).

#### 2.2.5 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit dem *Avegene Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit* der Firma Avegene (Taipei, Taiwan) nach Herstellerangaben.

#### 2.2.6 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von DNA wurde von der Firma Eurofins MWG (Ebersberg) durchgeführt.

#### 2.3 Analyse von RNA

#### 2.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA nach Kluth et al., 2002 (modifiziert)

Die Isolierung von Gesamt-RNA, die als Grundlage für die Transkriptomsequenzierung beider Deschampsia-Taxa verwendet wurde (2.5) wurde mit Modifizierungen nach Kluth *et al.*, 2002 durchgeführt.

Zur Extraktion von Gesamt-RNA wurden ca. 200 mg Blattmaterial in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der Aufschluss des Blattmaterials erfolgte unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff in einer Schwingmühle (Retsch, Haan) mit Hilfe flankierenden Stahlkugeln bei 30 Schlägen/Sekunde für 3 min. Die aufgeschlossenen Proben wurden mit 1 ml RNA-Extraktionspuffer (200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCL (pH 8,0; 10 mM EDTA (pH 8.0); 1 % SDS) versetzt und auf dem Vortex homogenisiert. 3 ml Phenol wurden in 50 ml Falcons mit Wachsverschluss (MaXtract High Density 50 ml, Qiagen, Hilden) vorgelegt. Die Proben wurden hinzugegeben und bei 4°C im Kühlraum zunächst 20 min und nach anschließender Zugabe von 1,5 ml Chloroform weitere 10 min geschüttelt. Nach 5 min Zentrifugation (4 °C, 5000  $\times g$ ) wurden 2 ml Phenol und 2 ml Chloroform zu der wässrigen Phase gegeben. Die Proben wurden 20 min bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation (4 °C, 5000 ×g) wurden 3 ml Chloroform zu der wässrigen Phase hinzugegeben. Die Proben sind erneut bei 4 °C für 20 min geschüttelt und anschließend bei 4 °C, 5000 ×g zentrifugiert worden. Die wässrige Phase wurde in ein 30 ml Zentrifugenröhrchen (Corex) überführt und mit 1/10 Vol M 3 NaAc (pH 5,2) und 2,5 Vol vorgekühltem Ethanol versetzt. Nach 30 min Inkubation bei -20 °C wurden die Proben 25 min bei 4 °C, 10.000 ×g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 800 µl H<sub>2</sub>O (AppliChem) aufgenommen, in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 800 µl 8M LiCl über Nacht bei 4 °C gefällt. Nach 30 min Zentrifugation bei 4 °C und 20.000 ×g wurde das Pellet mit 70 % Ethanol überschichtet und erneut bei 4 °C und 20.000 ×g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde bei RT getrocknet in 50 µl H<sub>2</sub>0 bei 45 °C auf dem Schüttler 20 min resuspendiert.

#### 2.3.2 Isolierung von Gesamt-RNA mittels *peqGOLD TriFast*-Reagenz

Gesamt-RNA, die für *Northern-Blot*-Analysen benötigt wurde, wurde mittels *peqGOLD TriFast*-Reagenz extrahiert. Für die Gesamt-RNA-Extraktion aus *Deschampsia*-Blättern wurde das Protokoll von Chomezynski *et al.* (1987), verbessert nach Puissant & Houdebine (1990) und beschrieben in Lorbiecke & Sauter (1998), modifiziert.

Für die Extraktion von Gesamt-RNA wurde Blattmaterial wie unter (2.3.1) beschrieben aufgeschlossen. 200 mg des Pulvers wurden mit 1 ml  $peqGOLD\ TriFast$ -Reagenz (Peqlab, Erlangen) versetzt und auf dem Vortex homogenisiert. Nach 5 min Inkubation wurden die Proben mit Chloroform/Isoamylalkohol (99:1, v/v) versetzt und auf dem Vortex gemischt. Nach 15 min Zentrifugation bei 4 °C und 20.000  $\times g$  wurde die obere Phase abgenommen und unter Zugabe von 1 Vol Chloroform und anschließender Zentrifugation (10 min bei 4 °C und 20.000  $\times g$ ) extrahiert. Dieser Schritt wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Die wässrige Phase wurde anschließend mit 500  $\mu$ l Isopropanol sowie 70  $\mu$ l 3 M Natriumacetat (pH 5,0) versetzt und ÜN bei -20 °C gefällt. Am nächsten Tag wurden die Probe für 30 min bei 4 °C und 20.000  $\times g$  zentrifugiert. Die pelletierte RNA wurde durch Überschichtung mit 70 % Ethanol und anschließender Zentrifugation für 10 min mit 20.000  $\times g$  bei 4 °C gewaschen und anschließend bei RT getrocknet. Das Pellet wurde anschließend in 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O (Applichem) aufgenommen und für 15 min bei 45 °C auf dem Schüttler gelöst.

#### 2.3.3 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die isolierte Menge Gesamt-RNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt und die Integrität durch eine Agarosegelelektrophorese überprüft.

#### 2.3.4 *Northern-Blot-*Analyse

#### 2.3.4.1 Herstellung einer Adh1 3' UTR-DNA-Sonde

Die Herstellung einer spezifischen *Adh1 3' UTR-DNA-Sonde* wurde mittels *Polymerasekettenreaktion* (PCR) auf cDNA durchgeführt, die aus Gesamt-RNA (2.3.2) synthetisiert worden ist. Die cDNA-Synthese erfolgte nach DNase I Verdau mit der

Revert Aid H Minus Reverse Transcriptase von Thermo Scientific (Schwerte) nach Herstellerangaben. Da zum Zeitpunkt der Analyse keine Sequenzinformationen zu den beiden *Deschampsia-*Taxa vorlagen, wurden heterologe Primer aus *AdH1-*Genen nah verwandter *Poaceae* Arten abgeleitet.

Adh1\_3'-UTR- FW: 5'- GTCTCCCAGCCTGCTTTCGC -3'

Adh1\_3'-UTR-Rev: 5'- CTGGCTCAAGAAGGCGAAACC -3'

Die PCR wurde mit der *Pfu*-DNA-Polymerase (Thermo Scientific, Schwerte) unter folgenden Parametern durchgeführt:

3 min	94 °C	Denaturierung		
30 sec	94 °C	Denaturierung	←	
30 sec	60 °C	Anlagerung		x34
30 sec	72 °C	Elongation		
10 min	72 °C	Elongation		

#### 2.3.4.2 Radioaktive Markierung einer DNA-Sonde

Für die Hybridisierung von *Northern-Blot*-Membranen wurden die *Adh1-3' UTR-DNA-Sonde* durch Einbau von  $\alpha$ -[ $^{32}$ P]-dCTP radioaktiv markiert. Dafür wurde das *Prime it II*-Kit der Firma Stratagene (La Jolla, USA) verwendet. Pro Markierungsansatz wurden 20 -  $^{30}$  µg DNA und 5 µl  $\alpha$ -[ $^{32}$ P]-dCTP ( $^{3000}$  Ci/mmol) eingesetzt. Die Markierungsreaktion wurde für 3 h bei  $^{37}$  °C in einem Heizblock durchgeführt. Nichteingebaute Nukleotide wurden mittels *MicroSpin-Columns S300* HR (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Herstellerangaben entfernt.

#### 2.3.4.3 RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA erfolgte nach Sambrook *et al.* (1989) in einem formaldehyhaltigen Agarosegel (1 % w/v Agarose; 1 % MOPS-Puffer (40 mM 4-Morpholinopropansulfonsäure; 10 mM Natriumacetat; 1mM Na-EDTA pH 7,2); 6 % (v/v) Formaldehyd). Gleiche Mengen RNA jeder Probe wurden auf 50  $\mu$ l mit H<sub>2</sub>O (Applichem) aufgefüllt und mit 1/10 Vol 1 M NaAc und 2 Vol Ethanol ÜN gefällt. Nach 30 min Zentrifugation bei 4 °C und 20.000 ×g wurden die Proben durch Überschichtung mit

70 % Ethanol und anschließender Zentrifugation bei 4 °C für 10 min und  $20.000 \times g$  gewaschen. Die Proben wurden bei RT getrocknet und in 35  $\mu$ l Probenpuffer (95 % (v/v) Formamid; 0,025 % (w/v) SDS; 0,025 % (w/v) Bromphenolblau; 0,025 % (w/v) Xylencyanol; 0,025 % (w/v) Bromphenolblau; 0,025 % (w/v) Ethidiumbromid; 0,5 mM EDTA) aufgenommen und 5 min bei 60 °C denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1× MOPS bei 4 Volt/cm Gellänge.

#### 2.3.4.4 Northern-Blot-Transfer und Hybridisierung mit einer spezifischen Adh1-DNA-Sonde

Der Übertrag von RNA-Proben auf eine geladene Nylonmembran (Hybond N+, Amersham, Braunschweig) erfolgte mittels Kapillartransfer über Nacht in 10× SSC. Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran in 2× SSC geschwenkt und mittels 1200 mJ UV-Bestrahlung (Stratalinker, Stratagen, Heidelberg) fixiert. Die Einfärbung der RNA erfolgte durch 10 min Inkubation der Membran in Methylenblau-Färbelösung (0,05 % (w/v) Methylenblau; 0,3 M Natriumacetat pH 5,0). Nach Differenzierung der Membran mit H<sub>2</sub>O konnten sichtbare RNA-Banden erhalten werden. Die Membran wurde eingescannt (CanoScan 8800F, Canon (Krefeld)) und als Beladekontrolle des Northern-Blots verwendet.

Die Hybridisierung der immobilisierten RNA mit einer *Adh1*-spezifischen DNA-Sonde (2.3.4.1) erfolgte nach 3 h Prähybridisierung ÜN bei 68 °C in Dextransulfatpuffer (10 % *Dextransulfat (w/v); 1 % (w/v) SDS; 100 µg/ml Fischsperma-DANN; 1M NaCl)* in einem Hybridisierungsofen. Zur Abtrennung nichtgebundener Moleküle wurde die Membran erst 10 min mit 1× SSC und anschließend für 10 min 1× SSC/ 1 % (w/v) SDS bei 68 °C gewaschen. Die Exposition radioaktiver Signale erfolgte in Abhängigkeit der Strahlungsintensität für 24 h bis 3 Wochen bei -80 °C auf Hyperfilm MP (Amersham, Braunschweig).

#### 2.4 Analyse von Proteinen

#### 2.4.1 Extraktion von löslichem Gesamtprotein

Für die Extraktion von löslichem Gesamtprotein wurden gefrorene Blätter in einer MM301 Schwingmühle (Retsch, Haan) unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff gemahlen (30 Schläge/Sekunde, 3 min). Das gemahlene Blattmaterial wurde in K-Phosphat-Puffer (50mM  $KH_2PO_4$ ; 50 mM  $K_2HPO_4$ , pH 7,5; 1mM EDTA) aufgenommen, auf dem Vortex gelöst und für 10 min auf Eis inkubiert. Unlösliches Material wurde durch zwei aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte (10 min, 4 °C, 20.000  $\times g$  und 30 min, 4 °C, 20.000  $\times g$ ) aus dem Extrakt entfernt. Für die Proteinbestimmung wurde das Bradford Reagenz der Firma BioRad (München) verwendet. Das Proteinextrakt wurde für die ADH-Enzymassays und für die 1-dimensionale SDS-PAGE verwendet. Für die Extraktion von Gesamtprotein, das einer 2-dimensionalen Auftrennung unterzogen werden sollte, wurde dem K-Phosphatpuffer 1 mM PMSF hinzugefügt.

#### 2.4.2 Quantifizierung von Proteinen

Die Quantifizierung von Proteinen wurde mit dem Protein Assay der Firma BioRad (München, Deutschland) durchgeführt. Der Assay erfolgt auf der Grundlage der Methode von Bradford (1976). Als Referenz wurde eine Eichgerade mit Rinderserumalbumin (BSA, Serva, Heidelberg) erstellt.

Alternativ erfolgte die Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels des 2D-Quant-Kits der Firma GE-Healthcare (Freiburg).

#### 2.4.3 Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

30 µg lösliches Gesamtprotein (2.4.1) wurden in vierfach Solubilisierungspuffer aufgenommen (250 mM Tris, pH 6.8; 40 % (w/v) Glycerin; 20 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 4 % (w/v) SDS; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau) und bei 95 °C für 10 min denaturiert. Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht mittels SDS-PAGE erfolgte in 10 % Acrylamidgelen (*Precise Tris-Hepes Gels*, Thermo Scientific, Schwerte). Der Gellauf erfolgte in einer *Xcell SureLock* Gelkammer (Invitrogen, Karlsruhe) unter Verwendung

von 1×HEPES-Laufpuffer (100 mM Tris; 100 mM HEPES; 0,1 % SDS; pH 8,0) bei 35 mA für 2 bis 2,5 Stunden. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde ein Proteinmarker (*Prestained Protein Molecular Weight Marker*, Thermo Scientific, Schwerte) auf demselben SDS-Gel aufgetrennt.

# 2.4.4 Western-Blot-Transfer von Proteinen und immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine

Der *Western-Blot*-Transfer sowie der immunologische Nachweis von Proteinen wurde zu gleichen Teilen in Zusammenarbeit mit David Müller (Universität Hamburg) durchgeführt.

Der Transfer von Proteinen erfolgte mittels Elektroblot auf eine Nitrocellulosemembran (Amersham Bioscience, Freiburg) im *semi-dry-*Verfahren mit einer Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell Elektroblotapparatur (BioRad, München). Der Transfer erfolgte zunächst für 70 min bei 70 mA und anschließend für 60 min bei 40 mA. Anschließend wurde die Membran zur Kontrolle der Transfereffizienz mit Ponceau S (1 % Essigsäure; 0,5 % Ponceau S) und das Acrylamidgel mit G250 Coomassie gefärbt. Konnten auf der Membran nach der Ponceau S Färbung Banden sichtbar gemacht werden, wurde der Farbstoff über dreimaliges Waschen mit TBS (10 mM Tris-HCL pH 7,5; 7,5 mM NaCl) restlos entfernt. Nach dem Waschen wurde die Membran für eine Stunde mit 0,5 % Milchpulver in TBS blockiert. Die Membran wurde im Anschluss zweimal für je 5 min mit TBS-T (10 mM Tris-HCL pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Tween 20) und einmal mit TBS gewaschen. Die spezifische Detektion der Alkoholdehydrogenase erfolgte mit einem primären ADH-Antikörper (Agrisera, Vännäs, Schweden, Art no: AS10 685). Der Antikörper wurde im Verhältnis 1:3000 in Blockierungspuffer (0,5 % Milchpulver in TBS) verwendet und über Nacht bei 4 °C auf der Membran inkubiert. Die spezifische Detektion der großen Untereinheit Ribulose-1,5-bisphosphatvon carboxylase/oxygenase (Rbcl) erfolgte mit einem Anti-Rbcl Antikörper der Firma Agrisera (Vännäs, Schweden, Art no: ASO3 037) im Verhältnis 1:2000 in Blockierungspuffer (0,5 % Milchpulver in TBS). Am folgenden Tag wurde die Membran erneut dreimal je 5 min mit TBS-T gewaschen und anschließen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem zweiten Antikörper (goat anti-rabbit (Thermo Scientific, Schwerte), 1:2000 in TBS) inkubiert. Nach viermaligem Waschen der Membran mit TBS-T erfolgte die Detektion des spezifisch gebundenen sekundären Antikörpers durch Zugabe des *West Dura Extended Duration Substrate* (Thermo Scientific (Schwerte), 1:10 Verdünnung mit TBS) für 5 min. Die entstehende Chemilumineszenz wurde durch Exposition auf einen Röntgenfilm (*Amersham Hyperfilm TM MP*, GE Healthcare (Freiburg) übertragen.

#### 2.4.5 Probenvorbereitung für die 2-dimensionale SDS-PAGE

Für die Herstellung präparativer Gele wurde nach der Proteinbestimmung (2.4.2) das Volumen für die benötigte Menge Gesamtprotein mit dem fünffachen Volumen -20 °C kalten Aceton versetzt, gemischt und ÜN bei -20 °C gefällt. Die Probe wurde anschließend mit  $20.000 \times g$  für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Zur Entfernung von Kontaminationen wurde das Proteinpräzipitat erneut in 500  $\mu$ l -20 °C Aceton auf dem Vortex resuspendiert und 10 min mit  $20.000 \times g$  zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Das Präzipitat wurde anschließend 10 min bei RT im offenen 2 ml Reaktionsgefäß getrocknet, um das verbleibende Aceton restlos zu entfernen.

#### 2.4.6 Präparative 2D-SDS-Gele

Zur Herstellung von präparativen 2D-SDS-Gelen wurden ca. 400 μg Gesamtprotein eingesetzt. Nach der Acetonfällung (2.4.5) wurden die Proteinpellets in 60 μl Urea-Probenpuffer (7M Urea; 2 M Thiourea; 2 % (w/v) CHAPS; 40 mM DTT) aufgenommen und durch 2 min Sonifizierung im Ultraschallbad gelöst. Die gelösten Proteine wurden entweder direkt der isoelektrischen Fokussierung unterzogen (2.4.7.3, 2.4.7.4) oder bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

#### 2.4.7 2D Difference Gel Electrophoresis (2D-DIGE)

# 2.4.7.1 Proteinmarkierung mit Fluoprobes-Fluoreszenzfarbstoffen (Interchim, Montluçon, Frankreich)

Bei einer 2D-DIGE-Analyse (Unlü *et al.*, 1997) werden Proteine mittels fluoreszierender Farbstoffe markiert, in dem fluoreszierende Cyanine kovalent an die Lysinreste von Proteinen gebunden werden. Durch die Verwendung von Cyaninen mit unterschiedlichen Absorbtionsmaxima (Cy2, Cy3, Cy5) können bis zu drei Proben auf einem 2-dimensinalen SDS-Gel aufgetrennt werden. Für die 2D-DIGE-Analyse wurden die präzipitierten Proteine nach der Acetonfällung (2.4.5) in 30 µl Labeling-Puffer (*7M Urea; 2 M Thiourea; 2 % (w/v) CHAPS*) aufgenommen und auf dem Vortex sowie durch Sonifizierung für 2-4 min im Ultraschallbad gelöst. Anschließend wurde die Konzentration des Proteinextraktes mit Hilfe des 2D-Quant–Kits (GE-Healthcare, Freiburg) bestimmt. Da für eine optimale Markierungsreaktion der pH-Wert des Proteinextraktes zwischen pH 8 und pH 9 liegen sollte, wurde der pH-Wert mit Hilfe von pH-Indikatorpapier bestimmt (pH Indikator 0-14, Merck, Darmstadt).

Die Fluoreszenzmarkierung wurde mit 8 pmol Fluoreszenzfarbstoff (Fluoroprobe, Interchim, Montluçon, Frankreich) pro ug Gesamtprotein durchgeführt. Um farbstoffspezifische Artefakte auszuschließen, wurde bei der Fluoreszenzmarkierung ein Randomisierungsschema durchgeführt, sodass sowohl überflutete als auch nichtüberflutete Proben mit Cy3 bzw. Cy5 markiert worden sind. Ein interner Standard, der sich aus gleichen Teilen aller Proben des Projekts zusammensetzt, wurde mit Cy2 markiert. Um die Markierungsreaktion in allen Proben gleichzeitig zu starten, wurde der Farbstoff zunächst an die Wand der Reaktionsgefäße pipettiert. Der Reaktionsstart erfolgte dann durch gleichzeitige Zentrifugation aller Proben. Die Proben wurden anschließend auf dem Vortex gemischt, kurz zentrifugiert und 30 min im Dunkeln und auf Eis inkubiert. Die Markierungsreaktion wurde durch Zugabe von 1 μl 10 mM Lysin und 10 min Inkubation bei RT gestoppt. Zur Kontrolle der Markierungseffizienz wurden 0,5 µl jeder Probe mittels 1-dimensionaler SDS-PAGE (2.4.3) aufgetrennt. Die fluoreszenzmarkierten Proben wurden entweder direkt einer isoelektrischen Fokussierung unterzogen (2.4.7.4) oder bis zur Weiterverwendung bei -80 °C lichtgeschützt eingefroren.

#### 2.4.7.2 Proteinmarkierung mit *CyDye-DIGE-fluors* (GE-Healtcare, Freiburg)

Für die Markierung von Gesamtprotein mit *CyDye-DIGE-fluors* (GE-Healtcare, Freiburg) wurden zunächst 100  $\mu$ g Gesamtprotein mit -20 °C kaltem Aceton versetzt und 15 min bei -20 °C gefällt. Anschließend wurde die Probe bei 16.000  $\times$  g für 15 min zentrifugiert und dann für 3 min in einer *speed vac* bei Raumtemperatur getrocknet. Die Proteinpräzipitate wurden in 30  $\mu$ l Probenpuffer aufgenommen (*7M Urea; 2 M Thiourea; 2 % (w/v) CHAPS; 30 mM Tris-HCL pH 9*) und auf dem Vortex sowie durch Sonifizierung für 30 sec mittels eines Sonifizierungsstabes solubilisiert.

Für eine 2D-DIGE-Analyse erfolgte mit 4 pmol *fluorescent cyanine dyes* (GE-Healtcare, Freiburg) pro  $\mu$ g Gesamtprotein für 30 min im Dunklen und auf Eis markiert. Proben überfluteter Pflanzen wurden mit Cy3, Proben nicht-überfluteter Pflanzen mit Cy5 markiert. Ein gepoolter interner Standard, der sich aus gleichen Mengen aller Proben des Projektes zusammensetzt, wurde mit Cy2 markiert. Die Markierungsreaktion wurde durch Zugabe von 1  $\mu$ l 10 mM Lysin und einer weiteren Inkubation für 10 min im Dunklen bei Raumtemperatur gestoppt. Die Markierungseffizienz wurde mittels 1-dimensionaler SDS-PAGE (2.4.3) überprüft. Die fluoreszenzmarkierten Proben wurden anschließend mittels IEF entsprechend ihres isoelektrischen Punktes aufgetrennt (2.4.7.3, 2.4.7.4).

#### 2.4.7.3 Rehydratisierung von immobilisierten pH-Gradientengelen (*IPG-Strips*)

Die isoelektrische Fokussierung wurde mit Hilfe immobilisierter pH-Gradienten Gelstreifen ( $\mathit{IPG-Strips}$ ) der Firma GE-Healthcare (Freiburg) durchgeführt. Es wurden 24 cm lange IPG-Strips mit einem nicht-linearen pH-Bereich von 3-10 verwendet. Die Proteinproben (2.4.1) wurden auf ein Volumen von 450  $\mu$ l mit  $\mathit{DeStreak}$   $\mathit{Reagent}$  (GE-Healthcare, Freiburg) aufgefüllt. Diese Reagenz verhindert die Oxidation von Thiolgruppen und minimiert waagerechte Verzerrungen von Proteinspots ( $\mathit{Streaking}$ ) in den basischen Bereichen des 2D-SDS-Gels. Die Proben wurden mit  $\mathit{IPG-Buffer}$  pH 3-10 NL (GE Healthcare, Freiburg) versetzt, sodass die Endkonzentration der Ampholyte im Proteinextrakt 0,5 % betrug. Zur Pelletierung unlöslicher Partikel wurden die Proben für 30 min mit 20.000  $\times \mathit{g}$  bei RT zentrifugiert und anschließend Luftblasenfrei in den  $\mathit{Reswell}$   $\mathit{Tray}$  in der  $\mathit{IPG-Box}$  (GE Healthcare, Freiburg) pipettiert.

Die Applizierung der IPG-Strips erfolgte unter Vermeidung von Luftblasen mit der Gelseite nach unten. Die Rehydratisierung der IPG-Strips erfolgte für 16-20 Stunden bei RT.

#### 2.4.7.4 Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)

Die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrem spezifischen isoelektrischen Punkt (isoelektrische Fokussierung, IEF) geschah Probenabhängig bei unterschiedlichen Parametern und erfolgte mit einem IPGphor 3 der Firma GE-Healthcare (Freiburg).

Proteine, die aus Klimakammer-Pflanzen extrahiert wurden, sind anhand folgender Parameter fokussiert worden.

1	500	V	$\rightarrow$	01:00	h
2	1000	V	$\rightarrow$	07:00	h
3	8000	V	$\rightarrow$	03:00	h
4	8000	V	$\rightarrow$	05:00	h
5	10.000	V	$\rightarrow$	03:00	h
6	10.000	V	$\rightarrow$	04:00	h
Total				37.500	Vh

Aufgrund des hohen Salzgehaltes von Proben, die aus Freilandpflanzen extrahiert wurden, wurde ein Entsalzungsschritt von 3500 Vh eingefügt. Die IEF von Proteinen aus Blättern von Freilandpflanzen erfolgte daher wie folgt:

1	500	V	$\rightarrow$	3500	Vh
2	1000	V	$\rightarrow$	800	Vh
3	8000	V	$\rightarrow$	16.500	Vh
5	10.000	V	$\rightarrow$	34.700	Vh
6	500	V	$\rightarrow$	10:00	h
Total				60.500	Vh

# 2.4.7.5 Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts mittels SDS-PAGE (2. Dimension)

Nach der IEF wurden die Strips mit H<sub>2</sub>O von dem *Cover Fluid* (GE-Healthcare, Freiburg) befreit und in zwei aufeinanderfolgenden Equilibrierungsschritten für jeweils 15 min in 15 ml Equilibrierungspuffer (6 M Urea; 75 mM Tris HCl pH 8,8; 29,3 % Glycerol; 2 % SDS; 0,002 % Bromphenol Blau) inkubiert. Zur Reduktion von Disulfidbrücken wurde der Equilibrierungspuffer im ersten Schritt mit 200 mM DTT versetzt. Im zweiten Schritt wurden dem Equilibrierungspuffer zur Alkylierung von Thiolgruppen 144 mM Iodacetamid hinzugefügt. Zwischen sowie nach den Equilibrierungsschritten wurden die **IPG-Strips** mit  $H_2O$ und abschließend 15 ml gespült in 1× Laemmli-SDS-Elektrophoresepuffer (0,1 % SDS; 25 mM Tris Base; 192 mM Glycin) equilibiert.

Die größenabhängige Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte in einem diskontinuierlichem 12 % Acrylamidgel nach Laemmli (1970) mit Modifikationen (für 100 ml: 43,5 ml H<sub>2</sub>O; 25 ml Tris-HCL pH 8,8; 1 ml 10 % SDS; 30 ml Acrylamid (40 % Acrylamid/Bis-Acrylamid (37, 5:1), 750 µl 10 % APS; 75 µl TEMED). Als Proteinstandard wurde der Prestained Protein Molecular Weight Marker der Firma Thermo Scientific (Schwerte) verwendet. Die IPG-Strips wurden unter Vermeidung von Luftblasen auf die Laemmli-SDS-Gele appliziert und mit Agaroselösung (1 × Laemmli-SDS-Elektrophoresepuffer; 0,5 % (w/v) Agarose; 0,002 (w/v) Bromphenol-blau) fixiert. Die SDS-PAGE wurden in einem Ettan DALTsix bzw. einem Ettan DALTtwelve System der Firma GE Healthcare (Freiburg) durchgeführt.

Der Gellauf erfolgte über Nacht bei konstant 3 Watt in 1 × *Laemmli*-SDS-Elektrophoresepuffer (modifiziert: *0,2 % SDS; 25 mM Tris Base; 192 mM Glycin*) in der unteren Gelkammer sowie 2 × *Laemmli*-SDS-Elektrophoresepuffer in der oberen Gelkammer bis die Bromphenolblaulinie an der Unterkante des Gels angekommen war.

#### 2.4.7.6 Kolloidale Coomassiefärbung präparativer SDS-Gele

Die Färbung von 2-dimensionalen SDS-Gelen, aus denen Proteine für die Massenspektrometrie präpariert werden sollten, erfolgte mit Modifikationen nach Neuhoff *et al.* (1988). Die Gele wurden für 48 h in der kolloidalen Coomassiefärbelösung unter leichtem Schütteln gefärbt (8 % Ammoniumsulfat; 0,8 % Phosphorsäure; 0,08 % Coomassie Blue G-250; 20 % Methanol) und bis zur gewünschten Intensität der Protein-Spots durch H<sub>2</sub>O differenziert.

#### 2.4.7.7 Aquisition von 2D-DIGE-Gelbildern

2D-DIGE-Gele, die mit *Fluoprobes*-Fluoreszenzfarbstoffen der Firma Interchim (Montluçon, Frankreich) angefertigt wurden, sind mit Hilfe des *VersaDoc IMAGING SYSTEM 4000MP* sowie der Software *Quantity One* (BioRad Laboratories, München) photographisch erfasst worden. Dabei wurden folgende Anregungs- /Emissionsfilter verwendet: Cy2: 480 nm/530 nm; Cy3: 540 nm/595 nm; Cy5: 635 nm/680 nm. Die Belichtungszeit wurde in Abhängigkeit der Emissionsintensität der Cyanin-Farbstoffe Cy2, Cy3 und Cy5 so gewählt, dass sich der intensivste Proteinspot eines Gels kurz vor der Sättigung befand.

2D-DIGE-Gele, die mit *CyDye-DIGE-fluors* der Firma GE-Healtcare (Freiburg) angefertigt wurden, sind mit Hilfe des *Ettan DIGE Imagers* gescannt und mit der Software *Image Quant* (GE-Healthcare, Freiburg) validiert worden. Dabei wurden die oben genannten Anregungs- /Emissionsfilter verwendet. Die Expositionszeit wurde in Abhängigkeit der Emissionsintensität der Cyanin-Farbstoffe (Cy2, Cy3, Cy5) so gewählt, dass der intensivste Proteinspot den maximal erreichten Grauwert darstellte.

#### 2.4.7.8 Quantitative Gelanalyse

Die quantitative Auswertung der 2D-DIGE erfolgte mit Hilfe der Software Delta2D v 4.2 der Firma Decodon (Greifswald). Vor der Detektion und Quantifizierung von Proteinspots wurden die Gelbilder des internen Standards aller Replikat-Gele virtuell übereinandergelegt und korrespondierende Protein-Spots einander zugeordnet (Warping). Im nächsten Schritt wurde ein virtuelles Fusion image erstellt, das alle

Protein-Spots des Projektes enthielt. Auf diesem virtuellen Gelbild wurde die Detektion von Protein-Spots automatisch sowie manuell durchgeführt. Jedem Protein-Spot wurde dabei ein Messbereich zugeordnet, anhand dessen die Quantifizierung des Protein-Spots vorgenommen wurde. Im nächsten Schritt wurden die Messbereiche der Protein-Spots auf alle 2D-Gele des Projekts übertragen. Die Normalisierung der Protein-Spot-Intensitäten erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden die Intensitäten aller detektierten Protein-Spots summiert. Im ersten Normalisierungsschritt wurde dann die Spotintensität eines Protein-Spots A im Verhältnis zu dieser summierten Intensität aller Protein-Spots bestimmt. In einem zweiten Schritt wurde die (bereits normalisierte) Intensität von A gegen die Intensität seines Pendants im internen Standard normalisiert. Da alle Protein-Spots gegen denselben internen Standard normalisiert wurden, konnten Protein-Spots gelübergreifend verglichen werden. Die Angabe der Protein-Spot-Intensitäten nach Normalisierung erfolgte in Volumen-Prozent (V%).

#### 2.4.8 Bestimmung der Alkoholdehydrogenase (ADH) Enzymaktivität

Die Untersuchungen zur ADH-Enzymaktivität wurden zu gleichen Teilen mit David Müller (Universität Hamburg) durchgeführt.

Die Bestimmung der ADH-Enzymaktivität erfolgte in Richtung der Reaktion von Acetaldehyd zu Ethanol. Dabei wurde die ADH-abhängige Umwandlung von NADH zu NAD+ bei 340 nm photospektrometrisch gemessen. Die Reaktion erfolgte in einem 1 ml Reaktionsansatz (100  $\mu$ l 50 mM MgSO<sub>4</sub>; 30  $\mu$ l 5 mM NADH; 50  $\mu$ l 200 mM Acetaldehyd; 20 – 60  $\mu$ l lösliches Gesamtproteinextrakt (2.4.1); ad 1 ml mit K-Phosphatpuffer (2.4.1)). Um die unspezifische Oxidation von NADH zu dokumentieren, wurde die Oxidation von NADH zunächst in Abwesenheit des Substrats für 1 min gemessen. Die spezifische ADH-Enzymaktivität wurde daraufhin durch Zugabe von Acetaldehyd gestartet und über einen Zeitraum von 2 min im Abstand von 10 sec bestimmt. Die unspezifische ADH-Aktivität wurde von der spezifischen ADH-Aktivität subtrahiert. Die spezifische ADH-Aktivität wird in nkat  $^{-1}$  mg $^{-1}$ löslichem Gesamtprotein angegeben.

### 2.5 Transkriptomsequenzierung von *D. cespitosa und D. wibeliana* sowie Erstellung von Transkriptomdatenbanken

Die Sequenzierung der Transkriptome von *D. cespitosa* und *D. wibeliana* wurde von der Firma MWG eurofins (Ebersberg) durchgeführt. Die cDNA-Bibliotheken wurden in einem *Illumina HiSeq 2000* Sequencer mit einem 2× 100 bp *paired-end read module* und *Chemie v3* erstellt. Das bedeutet, dass jedes Transkript von beiden Seiten mit bis zu 100 bp sequenziert wurde. Ein Normalisierungsschritt mittels PCR wurde nicht durchgeführt. Die *de novo* Assemblierung der erhaltenen Daten erfolgte mit Hilfe der Programme *Velvet* und *Oasis*.

Die Annotierung der erhaltenen Transkriptdaten wurde von Malik Alawi (UKE Hamburg) durchgeführt. Die erhaltenen Transkripte wurden gegen die *NCBI Sequence Reference (RefSeq)* Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq) annotiert. Für die Identifizierung von Proteinen nach massenspektrometrischer Analyse wurde eine Proteindatenbank aus den annotierten Transkripten erstellt.

#### 2.6 Massenspektrometrische Analyse von Proteinen

#### 2.6.1 Präparation von Protein-Spots aus 2-dimensionalen SDS-Gelen

Die Präparation von Protein-Spots, die durch Massenspektrometrie analysiert werden sollten, erfolgte mittels eines Skalpells oder mit Hilfe einer abgeschnittenen Pipettenspitze. Zur Minimierung von Kontaminationen wurde die Präparation unter der Sterilbank durchgeführt. Die 2-dimensionalen SDS-Gele, aus denen die Protein-Spots präpariert werden sollten, wurden eingescannt und im Verhältnis 1:1 ausgedruckt. Die ausgedruckten Gelbilder wurden unter eine Glasplatte gelegt und die mittels kolloidalem Coomassie gefärbten 2D-SDS-Gele deckungsgleich auf der Glasplatte platziert.

## 2.6.2 Proteinanalysen mittels *Matrix-Assisted Laser*Desorption/Ionization (MALDI) und Linear Trap Quadrupole (LTQ)Orbitrap Massenspektrometrie

Die ausgeschnittenen Protein-Spots wurden wie bei Jehmlich et~al.~(2008) beschrieben entfärbt und proteolytisch über Nacht oder für 36 h bei 37 °C mit Trypsin (Sigma-Aldrich, München) verdaut. Das Peptidgemisch wurde zweimal mit 100 % Acetonitril extrahiert und anschließend mittels 15 min Vakuumzentrifugation aufkonzentriert. Die tryptisch verdauten Peptide wurden in  $10~\mu l~0,1~\%$  (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) aufgenommen und für 10~min bei RT in einem Thermomixer bei 14~000~rpm inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit  $1~\mu l~$  Matrixlösung versetzt ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxyzimtsäure~(HCCA,~10~mg/ml)~in~Acetonitril~:~TFA~(50~%/0,1~%~(v/v)~)~ und auf einen Edelstahlträger aufgetragen. Die MALDI-MS-Analyse erfolgte in einem Ultraflex~lll~ tandem~time-of-flight, TOF/TOF, Massenspektrometer der Firma Bruker Daltonics (Bremen). Die Analyse wurde im positive-ion reflector~mode~ durchgeführt. Die Kalibrierung des Massenspektrometers erfolgte mit einem standardisierten Peptidgemisch des Herstellers.

Die Detektion von Peaks wurde mit Hilfe des Programms FLEXANALYSIS (v3.0, Bruker Daltonics) durchgeführt. Die Selektion von Peaks erfolgte in einem m/z-Bereich von 1000 bis 3000 Da. Die Identifizierung von Proteinen erfolgte mit Hilfe der Programme *BioTools* (v3.0 Bruker Daltonics) und *Mascot* v2.2.04 (Matrix Science, London, UK) gegen die Datenbanken von die Transkriptomdatenbanken von *D. wibeliana* und *D. cespitosa* (2.5) unter Verwendung folgender Parameter: *Precursor mass tolerance*: 100 p.p.m, *fragment mass tolerance*: 0,6 Da. Außerdem wurden folgende Modifikationen erlaubt: *methionine oxidation*, carbamidomethylation of cysteine, *one missed tryptic cleavage*.

Um die Identifikationsrate zu verbessern, wurde von der Arbeitsgruppe um Dr. Janina Tomm (Zentrum für Umweltforschung Leipzig, Abteilung Proteomik) eine *linear trap quadrupole (LTQ)-Orbitrap-*Analyse durchgeführt. Die Identifizierung von Proteinen erfolgte gegen die Transkriptomdatenbanken von *D. wibeliana* und *D. cespitosa*.

#### 2.6.2.1 Entsalzung von Peptidlösungen mit Zip Tips

Da Puffersubstanzen die MS-Analyse erschweren können, wurden die Peptidlösungen für die *linear trap quadrupole (LTQ)-Orbitrap*-Analyse mittels des *Zip Tip*-Verfahrens entsalzt. Bei diesem Verfahren erfolgt die Aufreingung von Proben über C<sub>18</sub> *Reversed-Phase* Chromatographiematerial, das in Pipettenspitzen befestigt ist (*Millipore Zip Tip Pipettenspitzen*, Merck, Darmstadt). Durch mehrfaches Hoch- und Runterpipettieren werden die Peptide zunächst an Chromatographiematerial gebunden und anschließend in einem Lösungsmittel eluiert.

Für die Aufreinigung mittels Zip-Tips wurden die Proben zunächst in 10 µl 0,1 % Ameisensäure (FA) gelöst und für 10 min bei 20 °C und 14000 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Die Zip-Tip-Spitzen wurden durch dreimaliges Hoch- und Runterpipettieren in 50 % Acetonitril (ACN) / 0,1 % FA befeuchtet und anschließend durch dreimaliges Hoch- und Runterpipettieren in 0,1 % FA equilibriert, wobei die Lösungen nach jedem Pipettiervorgang verworfen wurden. Bindung Die der Peptide das Chromatographiematerial erfolgte daraufhin durch zehnmaliges Hochund Runterpipettieren der Peptidlösung. Durch zweimaliges Hoch- und Runterpipettieren in 0,1 % FA (Lösungen wurden zwischen den Pipettierschritten verworfen) wurden die Proben gewaschen und schließlich durch fünfmaliges Hoch- und Runterpipettieren in 60 % ACN / 0,1 % FA eluiert. Die Proben wurden anschließend für 30 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 15 µl 0,1 % FA gelöst.

#### 2.6.3 Protein-Identifizierung durch *Tandem-Massenspektrometrie*

Die Identifizierung von Proteinen wurde von der Arbeitsgruppe um PD Dr. Friedrich Buck am Institut für Klinische Chemie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf mittels *Nano Electrospray Tandem Mass Spectrometry* in einem Q-TOF II Massenspektrometer (*quadrupole Time Of Elight* = Q-TOF; Micromass, Manchester, UK) durchgeführt.

Für die nach tryptischem Verdau erhaltenen Peptide wurden nach manueller Precursor-Selektion MS/MS-Spektren aufgenommen und mit dem *Mascot MS/MS search algorithm* version 2.2 (Matrix Sciences, London, UK) ausgewertet. Die Datenbanksuche wurde gegen die NCBI- und Swiss-Prot-Datenbanken mit den folgenden Einstellungen durchgeführt: precursor mass tolerance: 1,4 Da, fragment mass tolerance: 0,6 Da, erlaubte Modifikationen:

carbamidomethyl cysteine, monooxidized methionin, deamidated asparagine and glutamine, one missed tryptic cleavage. MS/MS-Spektren, mit denen in diesen Datenbanken kein Protein identifiziert werden konnte, wurden manuell ausgewertet und mit der erhaltenen Sequenz wurden unter Benutzung der BLAST-Funktion des Programmes *Protein Lynx Global Server* V2.5.2 (Waters, Eschborn) die *Deschampsia-*Transkriptom-Datenbanken (2.5) durchsucht.

#### 2.7 Rasterelektronenmikroskopische (REM) Analysen

### 2.7.1 Präparation von Pflanzenmaterial für rasterelektronenmikroskopische (REM) Analysen

Für die REM-Analyse wurden ca. 1,5 cm lange Bereiche aus den Blättern beider *Deschampsia*-Taxa entnommen, in Probenkörbchen aus Metall überführt und 24 h in FAA-Lösung (Formaldehyd-Alcohol-Acetic acid) (100 ml: *5 ml Formaldehyd (37 %); (5 ml ) Essigsäure (96 %); 56 ml Ethanol (96 %)* fixiert. Die FAA-Lösung wurde dabei etwa alle 8 h gewechselt. Nach der ÜN-Fixierung wurden die Proben anschließend zur Vorentwässerung für 24 h in Formaldehyd-Dimethyl-Acetat überführt.

### 2.7.2 Trocknung von Pflanzenmaterial mittels des *Kritischen-Punkt-Verfahrens*

Die Trocknung von fixiertem und vorentwässertem Blattmaterial erfolgte mittels des *Kritischen-Punkt-Verfahrens* in einem BAL-TEC CPD 030 (Leica, Wetzlar). Das Blattmaterial wurde zunächst in der auf 3 °C heruntergekühlten Probenkammer des Gerätes drei- bis siebenmal für drei bis fünf Minuten mit flüssigem Kohlendioxid geflutet. Daraufhin wurde die Temperatur in der Probenkammer innerhalb von 15 min auf 42 °C erhöht. Dabei wurde der Druck in der Probenkammer auf 80 - 90 bar gehalten. Bei einer Temperatur von 31 °C und einem Druck von 72 bar tritt das Kohlendioxid schlagartig von der flüssigen in die Gasphase über (*Kritischer Punkt*). Jenseits des *Kritischen Punktes* sind die flüssige und die Gasförmige Phase von Kohlendioxid nicht mehr zu unterscheiden. Bei einer Temperatur von konstant 42 °C wurde das CO<sub>2</sub> über einen Zeitraum von 10 min aus der Probenkammer entlassen. Bei diesem Schritt darf es zu keiner Kondensation des CO<sub>2</sub> kommen, um die Proben nicht zu beschädigen.

Nachdem der Normaldruck in der Probenkammer wieder hergestellt worden war, wurden die Proben bei RT für 1 h getrocknet und anschließend in einem Exsikkator gelagert.

#### 2.7.3 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Blattpräparaten

Die Goldbedampfung von präpariertem Pflanzenmaterial wurde mittels eines BAL-TEC SCD 050 (Leica, Wetzlar) durchgeführt. Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Blattpräparate erfolgte mit einem Quanta 2500 Rasterelektronenmikroskop der Firma FEI (Eindhoven, Niederlande).

### 2.8 Computerprogramme, Sequenzanalysen und Datenbankrecherchen

#### The National Center of Biotechnology (NCBI)

www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq

#### **Swiss-Prot**

www.uniprot.org

#### **Auswertung von DNA- und Proteinsequenzen**

FinchTV (Geospiza Inc.)

GeneDoc (Nicholas & Nicholas, 1997)

Reverse Complement (Stothard, 2000)

ExPASy Proteomics Server (Gasteiger et al., 2003)

NCBI blast (Altschul et al., 1990)

#### Visualisierung fluoreszenzmarkierter Proteine

Quantity one (Bio-Rad, München)

Image Quant (GE-Healthcare, Freiburg)

#### **Quantitative Auswertung von 2D-DIGE-Gelen**

Delta2D v 4.2 (Decodon, Greifswald)

#### **Densitometrische Auswertung**

Image J (Schneider et al., 2012)

#### Auswertung von massenspektrometrischen Daten

Flexanalysis v3.0 (Bruker Daltonics, Bremen)
BioTools v3.0 (Bruker Daltonics, Bremen)
Mascot v2.2.04 (Matrix Science, London, UK)

### 2.9 Experimentelles Design von Labor- und Freilandexperimenten zur Überflutung von Testpflanzen

Das experimentelle Design wurde zu gleichen Teilen in Zusammenarbeit mit David Müller (Universität Hamburg) entwickelt.

#### 2.9.1 Laborbasierte Versuche in der Klimakammer

#### 2.9.1.1 Pflanzenmaterial

Pflanzen von *Deschampsia cespitosa* und *D. wibeliana* wurden aus zwei ihrer natürlichen Standorte in Schleswig-Holstein entnommen. Dabei handelte es sich um oligohaline Marschen am Elbeästuar (*D. wibeliana*: Kollmar, 53°43'46.11"N / 9°28'14.31"E; Brokdorf, 53°50'9.77"N / 9°21'48.36"E) bzw. 10 km von der Elbe im Landesinneren lokalisierte Feuchtwiesen (*D. cespitosa*: Liether Moor, 53°43'29.36"N / 9°41'27.92"E; Krempermoor, 53°52'26.22"N / 9°29'33.46"E). Die Pflanzen wurden dann in Rameten (genetisch identische Individuen) geteilt und in 8x8 cm Töpfe mit Substrat bestehend aus 1/3 Floraton 3 (Floragard, Ramsloh) und 2/3 Sand überführt. Sie wurden zweimonatlich mit NPK Düngestäbchen (17 + 4 + 9, Beckmann & Brehm, Beckeln) gedüngt. Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte unter folgenden Bedingungen: 22 °C, 60-70 % Luftfeuchte, 200 μmol m-2 s-1 Licht (Tag, 08.00 Uhr – 20.00 Uhr); 18 °C, 80-90 % Luftfeuchte, kein Licht (Nacht, 20.00 Uhr – 08.00 Uhr).

#### 2.9.1.2 Überflutungsversuche in der Klimakammer

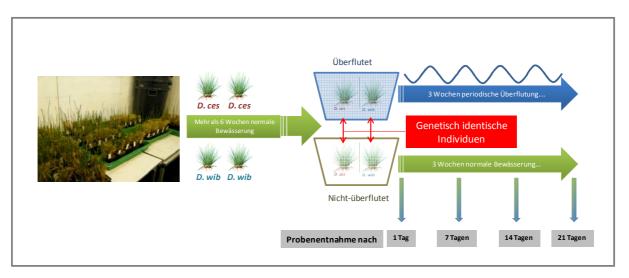
Nach mindestens sechswöchiger Kultivierung in der Klimakammer unter normaler Bewässerung (ohne Austrocknung und Staunässe) wurden Individuen beider *Deschampsia*-Sippen in handelsübliche Plastiktonnen gestellt und mittels eines automatischen Pumpensystems drei Wochen zweimal am Tag für jeweils fünf Stunden überflutet (00.00 Uhr-05.00 Uhr, 12.00 Uhr-17.00 Uhr.). Genetisch identische Pflanzen wurden ebenfalls in Plastiktonnen gestellt, unter den oben genannten Wässerungsbedingungen weiter kultiviert und als nicht-überflutete Kontrollen verwendet

In Abbildung 3a und 3b ist die Probennahme während des Überflutungsexperiments schematisch dargestellt: Blattmaterial von überfluteten und nicht-überfluteten Pflanzen wurde sowohl nach erstmaliger Überflutung (Initialüberflutung) als auch über den Zeitraum von drei Wochen (periodische Überflutung) in wöchentlichem Abstand entnommen. Dabei wurden Proben zu folgenden Zeitpunkten entnommen:

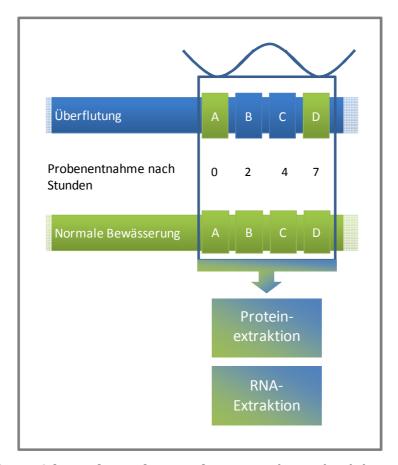
**A= unmittelbar vor einem Überflutungsereignis** (alle Proben unter Normoxie entnommen)

B= nach zweistündiger Überflutung (überflutete Proben unter Wasser genommen)
C= nach vierstündiger Überflutung (überflutete Proben unter Wasser genommen)
D= drei Stunden nach Überflutung (alle Proben unter Normoxie genommen).

Proben von überfluteten und nicht-überfluteten Pflanzen wurden stets parallel entnommen. Wenn nicht anders angegeben, bestand jede Probe generell aus dem basalen ca. 5 cm langen Bereich über der Ligula dreier Blätter pro Individuum. Das Blattmaterial wurde unmittelbar nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C aufbewahrt.



**Abb. 3a: Schematische Darstellung des experimentellen Designs.** Nach mindestens sechs Wochen Kultivierung unter normalen Wässerungsbedingungen wurden während erstmaliger Überflutung sowie im wöchentlichen Abstand über einen Zeitraum von drei Wochen Blattproben von überfluteten sowie nicht-überfluteten klonalen Pflanzen beider *Deschampsia-*Taxa entnommen.



**Abb. 3b: Detailliertes Schema der Probenentnahme.** Bei jeder wöchentlichen Entnahme wurden Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen (A-D). Blau gekennzeichnete Proben wurden unter Wasser genommen, grün markierte Proben unter normalen Sauerstoffbedingungen an der Luft.

#### 2.9.2 Reziprokes Verpflanzungsexperiment im Freiland

#### 2.9.2.1 Experimentelle Standorte

Ein reziprokes Verpflanzungsexperiment wurde nach Ende der Blühzeit beider Deschampsia-Taxa in den Monaten August bis Oktober des Jahres 2012 durchgeführt. Für das Experiment wurden der Deschampsia wibeliana Standort Kollmar (53°43'46.11"N / 9°28'14.31"E) sowie der *D. cespitosa* Standort Krempermoor (53°52'26.22"N / 9°29'33.46"E) ausgesucht. Die Entscheidung für die genannten Standorte wurde aufgrund ihrer Eignung für die Durchführung Verpflanzungsexperimente getroffen (Zugänglichkeit, Vorhandensein eines geschützten Areals für den experimentellen Aufbau, hohe Populationsdichte). Bei dem Standpunkt Kollmar handelt es sich um eine oligohaline Marsch am Elbeästuar, die zweimal täglich tidebedingt überflutet wird. Der Standort Krempermoor befindet sich innerhalb eines Feuchtwiesenhabitats, das ca. 10 km entfernt von der Elbe im Landesinneren liegt und dessen Bodenfeuchte niederschlagsabhängig von Staunässe bis starker Trockenheit variiert.

In Abbildung 4 sind die gewählten Standorte kartographisch eingeordnet sowie fotographisch abgebildet.

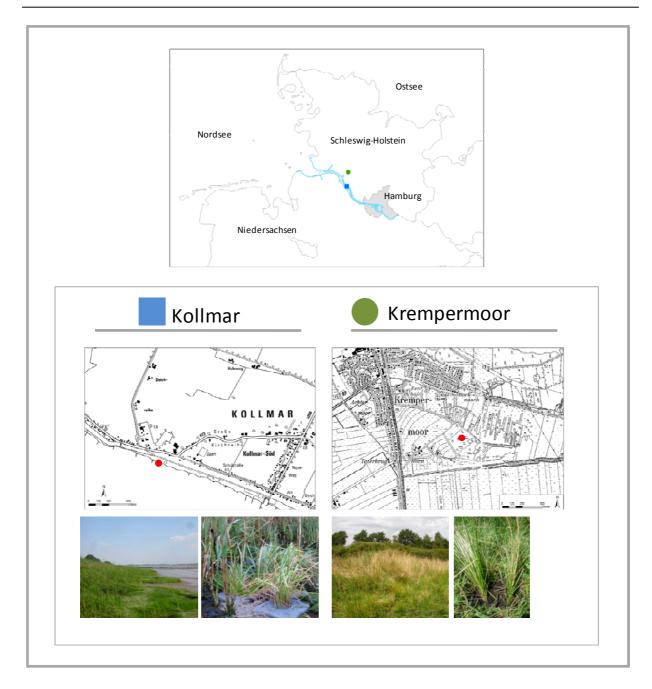


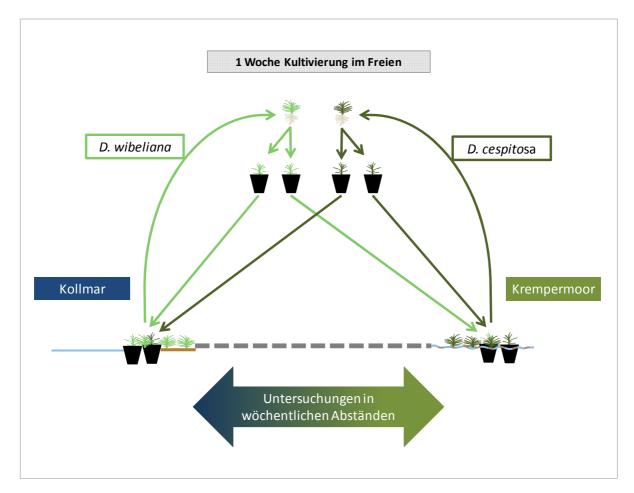
Abb. 4: Kartographische Einordnung der für das reziproke Verpflanzungsexperiment ausgewählten Standorte. Oben: Übersichtskarte über Norddeutschland. Die Habitate, in denen das Verpflanzungsexperiment durchgeführt wurde sind mit einem grünen Punkt (Krempermoor) und einem blauen Quadrat (Kollmar) markiert und darunter im Detail dargestellt. Die Elbe ist bis Hamburg hellblau markiert. Die für die Auspflanzung ausgewählten Flächen sind in den Detailkarten mit einem roten Punkt markiert. Darunter: Fotographische Abbildung der Habitate sowie ausgepflanzter Horste an den jeweiligen Standorten (Kartenmaterial: © GeoBasis-DE/LVermGeo SH (www.LVermGeoSH.schleswigholstein.de); Fotomaterial: D. Müller & V. Ambroselli, Universität Hamburg).

#### 2.9.2.2 Konzeption und Probennahme

Pro Standort wurden 15 Pflanzen der jeweiligen *Deschampsia*-Taxa entnommen, vor Ort in zwei genetisch identische Horste (Rameten) geteilt und in 11×11 cm große Töpfe umgesetzt. Die eine Hälfte der Pflanzen wurde im ursprünglichen Substrat belassen während die andere Hälfte in das Substrat des jeweilig anderen Standortes verpflanzt wurde. Pro *Deschampsia*-Sippe entstanden so 30 Pflanzen, 15 im Substrat des Standorts Krempermoor und 15 im Substrat des Standorts Kollmar.

Nach dem Umtopfen wurden die Pflanzen zur Akklimatisierung und Wurzelbildung eine Woche im Freien unter normalen Wässerungsbedingungen (ohne Austrocknen und Staunässe) kultiviert. Die reziproke Auspflanzung der Horste erfolgte daraufhin wie folgt:

Pro Standort wurden 15 Individuen beider *Deschampsia*-Sippen ausgepflanzt, sodass zu jedem Individuum in Kollmar ein Ramet im Krempermoor korrespondierte. Das Verpflanzungsschema ist in Abbildung 5 dargestellt. Die Auspflanzung erfolgte in Plastiktöpfen. Zur Befestigung der Pflanzen wurden die Töpfe am Standort Kollmar zusätzlich mit Nylon-Gaze überzogen.



**Abb. 5: Schematische Darstellung des reziproken Verpflanzungsexperiments.** Blaue Linie links (Kollmar): Symbolisch für die Elbe. Blau-braun-gestrichelte Linie rechts (Krempermoor): Symbolisch für wechselfeuchten Feuchtwiesenboden. Die Trennung beider Habitate ist durch eine gestrichelte graue Linie in der Mitte dargestellt. Erklärung des experimentellen Ablaufs siehe Abschnitt 2.9.2.2. Abbildung nach David Müller (Universität Hamburg) mit Modifikationen.

Während eines Zeitraums von sechs Wochen wurden wöchentlich Blattproben von allen verpflanzten Horsten entnommen. Die Zeitpunkte der Probennahme variierten hierbei in Abhängigkeit des Tidehubs am Standort Kollmar. Da eine Probennahme unter Wasser im Freiland technisch nicht umsetzbar war, wurden grundsätzlich alle Proben unter normalen Sauerstoffbedingungen (Normoxie) genommen.

Entsprechend der Probennahmen während der Klimakammerexperimente (2.9.1.2) bestanden die Proben aus dem ca. 5 cm langen basalen Blattbereich über der Ligula von je drei Blättern pro Pflanze. Generell wurden alle Blätter nach Abtrennung in  $_{dest}H_2O$  gewaschen und mit Hilfe von "fusselfreien" Tüchern bestmöglich von Verschmutzungen befreit. Alle Proben wurden schnellstmöglich in Plastikgefäße überführt und in

flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung bis zur Weiterverarbeitung erfolgte bei -80 °C.

Über den Zeitraum des Verpflanzungsexperiments wurden in Kollmar begleitende Daten zu Pegelständen und Temperatur erhoben. Zu diesem Zweck wurde eine Pegelsonde (Schlumberger Water Services, Delfi, Niederlande) in Höhe der experimentellen Fläche installiert. Die Sonde wurde in einem Plastikrohr ca. 1,5 m in den Boden versenkt und dokumentierte die Summe des über ihr entstehenden Wasser- sowie Luftdrucks. Eine zweite Sonde, die ca. 20 m von der Wasserkante entfernt in einer Baumkrone befestigt wurde, zeichnete ebenfalls den Luftdruck auf. Zur Berechnung des Pegelstands wurde der gemessene Luftdruck (Sonde 2) vom Gesamtdruck (Sonde 1) subtrahiert. Die Umgebungstemperatur wurde von beiden Sonden aufgezeichnet.

#### 3. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der molekularen und physiologischen Aspekte der Anpassung der *Poaceae*-Taxa *Deschampsia cespitosa* und *D. wibeliana* an ihre jeweiligen Lebensräume (1.1). Zu diesem Zweck sollten adaptativrelevante Proteine und Enzyme identifiziert und analysiert werden, die mit der ökologischen Differenzierung von *Deschampsia cespitosa* und *D. wibeliana* korreliert werden können.

Der erste Teil der Arbeit wurde unter kontrollierten Bedingungen im Labor durchgeführt. In einer Klimakammer wurde eine Überflutungsanlage installiert, mit deren Hilfe Pflanzen beider Deschampsia-Taxa zweimal täglich unter tideähnlichen Bedingungen überflutet wurden (2.9.1.2).Nach dreiwöchiger, periodisch wiederkehrender Überflutung wurde die Überflutungstoleranz beider Deschampsia-Taxa mittels einer vergleichenden Analyse der Enzymaktivität, Proteinabundanz und Genexpression des Hypoxiemarkers Alkoholdehydrogenase in Blättern überfluteter Pflanzen beider Taxa untersucht. Mittels differenzieller 2-dimensionaler Gelelektrophorese (3.1.2) sollten in einem nächsten Schritt die Proteinantworten von *Deschampsia cespitosa* und *D. wibeliana* auf periodisch wiederkehrende Überflutung untersucht werden. Auf diese Weise sollten Hinweise auf physiologische Mechanismen erhalten werden, die mit der Adaptation beider Deschampsia-Taxa in Verbindung gebracht werden können.

Der zweite Teil dieser Arbeit basiert auf einem reziproken Verpflanzungsexperiment im Freiland. Pflanzen beider *Deschampsia*-Taxa wurden an je einem ihrer natürlichen Standorte entnommen und in das Habitat des jeweilig anderen Taxon verpflanzt (2.9.2). Über einen Zeitraum von sechs Wochen wurde in wöchentlichen Abständen die Überflutungstoleranz beider Taxa mittels einer Analyse der Enzymaktivität des Hypoxiemarkers Alkoholdehydrogenase überprüft (3.2.2). Zusätzlich wurden sechs Wochen nach Verpflanzung die Proteomprofile der verpflanzten Taxa mittels 2D-DIGE-Analyse vergleichend untersucht (3.2.3). Des weiteren wurden Untersuchungen der Blattoberflächen von Blättern der reziprok im Freiland verpflanzten Rameten von

*D. cespitosa* und *D. wibeliana* mittels Rasterelektronenmikroskopie (3.2.4) durchgeführt, um mögliche morphologische Veränderungen zu dokumentieren, die mit der Verpflanzung in den jeweils fremden Lebensraum korreliert werden konnten.

#### 3.1 Laborbasierte Experimente in der Klimakammer

In diesem Teil der Arbeit sollten vergleichende Untersuchungen Überflutungstoleranz von *Deschampsia cespitosa* und *D. wibeliana* unter kontrollierten Bedingungen im Labor durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurde ein Überflutungssystem in der Klimakammer etabliert, in dem Pflanzen beider Deschampsia-Taxa unter tidesimulierenden Bedingungen überflutet wurden (2.9.1.2). Während eines Zeitraumes von drei Wochen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Analysen des Hypoxie-Markers Alkoholdehydrogenase auf Enzym-, Protein- und Genebene durchgeführt (3.1.1). Darüber hinaus sollten in einem proteomischen Ansatz Proteine identifiziert werden, die infolge periodisch wiederkehrender Überflutung differenziell zwischen Deschampsia cespitosa und D. wibeliana exprimiert werden (3.1.2).

# 3.1.1 Vergleichende Untersuchungen zur Genexpression, zum Proteinprofil und zur Enzymaktivität des Hypoxie-Markers Alkoholdehydrogenase (ADH) unter Überflutungsbedingungen in Blättern von Deschampsia cespitosa und D. wibeliana

Im diesem Versuchsteil sollte das Enzym Alkoholdehydrogenase aufgrund seiner Hypoxie-indizierenden Eigenschaft (Keeley, 1979) als ein Marker für den Grad der Überflutungstoleranz beider *Deschampsia-*Sippen untersucht werden. Es wurde sowohl die Enzymaktivität als auch die Protein- und Genexpression der ADH in einem Überflutungsexperiment (2.9.1.2) analysiert.

Die Analyse der Genexpression von *Adh1* erfolgte mittels *Northern-Blot*-Detektion mit Hilfe einer genspezifischen 3' UTR-Sonde (2.3.4). In jedem Experiment wurden pro *Deschampsia*-Taxa Blätter aus einem Pool von 4-10 Pflanzen verwendet (2.9.1.2). Jeder *Northern-Blot* wurde gleichmäßig mit 25-30 µg der zu dem jeweiligen Zeitpunkt

entnommenen RNA beladen. Als Kontrolle gleichmäßiger Beladung diente die Methylenblaugefärbte RNA nach Transfer auf die Nylonmembran.

### 3.1.1.1 Überflutungsexperimente zur Identifizierung eines experimentell sinnvollen Probennahmezeitpunktes

Um einen experimentell sinnvollen Zeitpunkt für die Untersuchungen zu finden, wurden die Experimente zur Enzymaktivität und *Adh*1-Genexpression zunächst zu vier Zeitpunkten während eines einzigen fünfstündigen Überflutungsereignisses ("Initial-Überflutung") durchgeführt. Darauffolgend sollten während einer dreiwöchigen "periodischen Überflutung" mittels ADH-Enzymaktivitätsassays weitere Daten in wöchentlichen Abständen erhoben werden (2.9.1.2).

Die Expressionsanalysen von *Adh1* erfolgte über eine *Northern-Blot*-Detektion unter Verwendung einer *Adh1* 3'-UTR-spezifischen Sonde. Da zum Zeitpunkt des Experiments keine Sequenzinformationen vorlagen, musste eine *Adh1* 3'-UTR-Sonde aus *D. cespitosa* und *D. wibeliana* heterolog kloniert werden (2.3.4.1). Da Sequenzvergleiche keine signifikanten Unterschiede zwischen *D. cespitosa* und *D. wibeliana* zeigten, wurde für die *Northern-Blot*-Detektion ein kloniertes *Adh1* 3'-UTR cDNA-Fragment aus *D. wibeliana* verwendet.

Für die Analyse der Expression von *Adh1* wurden fünf *Northern-Blot*-Experimente (Wiederholungen mit unabhängigen Pflanzenpools) durchgeführt. Die Autoradiogramme wurden mittels des Programms *ImageJ* (Schneider *et al.*, 2012) densitometrisch vermessen. Die Korrektur des Beladefehlers erfolgte nach densitometrischer Auswertung der Methylenblau gefärbten ribosomalen RNA nach Transfer auf die Nylonmembran (2.3.4.4). Die relativen Transkriptmengen wurden summiert und sind in Abbildung 6 dargestellt.

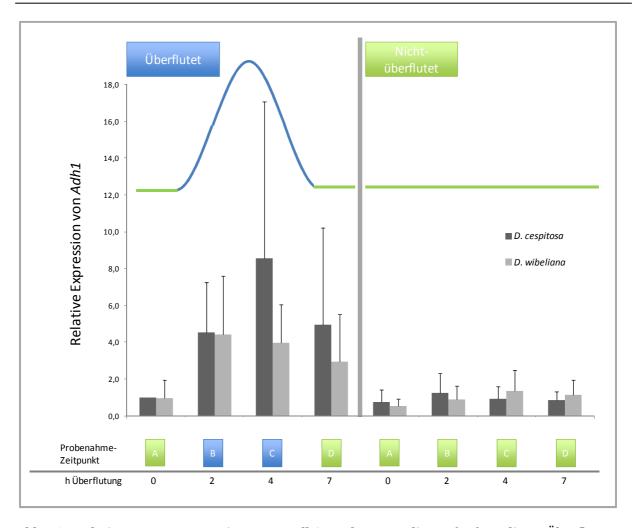


Abb. 6: Relative mRNA-Expression von *Adh1* nach erstmaliger, fünfstündiger Überflutung (Initialüberflutung) in der Klimakammer. Die Analysen wurden während der Überflutung zu vier Zeitpunkten durchgeführt (A-D). Die Autoradiogramme von fünf unabhängigen *Northern-Blot*-Analysen wurden densitometrisch vermessen und die Ergebnisse summiert. Die Transkriptmenge überfluteter Pflanzen von *D. cespitosa* zum Zeitpunkt 0 h wurde gleich 1 gesetzt und alle anderen Werte im Verhältnis zu diesem Wert berechnet. Grüne Kästchen = Probennahme-Zeitpunkte nicht-überflutet, blaue Kästchen = Probennahme-Zeitpunkte überflutet. Blaue wellenförmige Linie = schematische Skizzierung des initialen Überflutungsverlaufes. Grüne Linie = keine Überflutung während desselben Zeitraumes. Mittelwerte sind mit Standardabweichungen (SD) dargestellt.

Während initialer Überflutung zeigt die *Northern-Blot*-Analyse einen transienten Anstieg der *Adh1*-Transkriptmenge in Blättern von überfluteten Pflanzen beider Taxa. Unterschiede im überflutungsinduzierten Expressionsmuster von *Adh1* zwischen den Taxa waren jedoch nicht nachweisbar. Die Transkriptmengen in Blättern nicht- überfluteter Pflanzen zeigten zu keinem Probennahmezeitpunkt signifikante Änderungen.

Die Bestimmung der relativen ADH-Enzymakivität erfolgte wie beschrieben (2.4.8) in nkat  $\mu g^{-1}$  Gesamtprotein in Richtung der Reaktion von Acetaldehyd zu Ethanol

(Abbildung 2) durch photometrische Messung der Oxidation von NADH bei 340 nm. Die Enzymspezifität der Reaktion wurde durch die Aufnahme eines Leerwertes (Absorptionsänderung bei 340 nm bei Abwesenheit des Substrats Acetaldehyd) sichergestellt, der als unspezifischer NADH-Umsatz von der substratgesättigten Messung subtrahiert wurde. Für die Berechnung der relativen Aktivität pro µg Gesamtprotein wurde die Proteinkonzentration des Proteinextrakts nach Bradford bestimmt (2.4.2).

Die ADH-Enzymaktivität wurde 2-3 Pflanzen Bestimmung der mit pro *Deschampsia*-Taxon (biologische Replikate) durchgeführt (2.9.1).Nach einer Kultivierungszeit von mindestens sechs Wochen unter normaler Bewässerung in der Klimakammer konnten während initialer Überflutung keine Änderungen der relativen ADH-Enzymaktivität gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Erste Aktivitäts-Unterschiede waren erst nach einer Woche periodischer Überflutung photometrisch messbar. Im Vergleich zu nicht-überfluteten Kontrollpflanzen war die ADH-Enzymaktivität in Blättern überfluteter Pflanzen beider Taxa deutlich gestiegen. Ein weiterer Anstieg der ADH-Aktivität konnte nach zwei Wochen periodischer Überflutung verzeichnet werden. Nach Überflutungswoche 3 hingegen war keine weitere Erhöhung der ADH-Aktivität mehr erkennbar (Abb. 7).

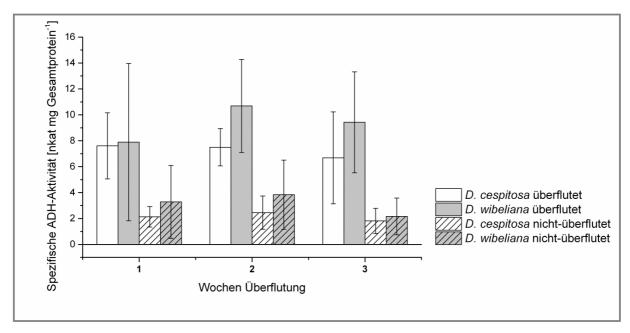


Abb. 7: Enzymaktivität der Alkoholdehydrogenase nach einer, zwei sowie drei Wochen periodischer Überflutung von *Deschampsia wibeliana* und *D. cespitosa* in der Klimakammer. Die Messungen wurden jede Woche jeweils zu Zeitpunkt C (= nach vierstündiger Überflutung) durchgeführt.

Basierend auf den Erkenntnissen der Vorversuche wurden die Experimente zur Enzymaktivität, Proteinabundanz und Genexpression von ADH schließlich nach dreiwöchiger periodischer Überflutung zu den Zeitpunkten A (0 h) und C (4 h) (2.9.1.2) durchgeführt. Diese Messzeitpunkte wurden gewählt, um den Einfluss einer akuten Überflutung innerhalb einer periodisch wiederkehrenden Überflutungssituation zu untersuchen.

### 3.1.1.2 Untersuchung der Enzymaktivität, Protein- und Genexpression der Alkoholdehydrogenase nach dreiwöchiger periodischer Überflutung

#### 3.1.1.2.1 Änderungen in der ADH-Enzymaktivität

Die Untersuchungen zur ADH-Enzymaktivität wurden mit 17 Individuen beider *Deschampsia*-Taxa durchgeführt. Die Auswertung der Daten zur Enzymaktivität nach dreiwöchiger periodischer Überflutung erfolgte mittels einer multifaktoriellen ANOVA. Mit Hilfe dieser statistischen Methode sollte überprüft werden, ob bezüglich der ADH-Enzymaktivität

- (a) generell Unterschiede zwischen überfluteten und nicht-überfluteten Pflanzen existieren
- (b) Unterschiede zwischen den beiden Deschampsia-Taxa nachweisbar sind
- (c) der Zeitpunkt der Probennahme einen Einfluss auf die ADH-Enzymaktivität besitzt sowie
- (d) eine gegenseitige Beeinflussung der drei Faktoren festzustellen ist (Interaktion)

Als Signifikanzniveau, das eine Differenzierung zwischen signifikanten und nichtsignifikanten Unterschieden der verglichenen Proben erlaubt, wurde eine
Überschreitungswahrscheinlichkeit von 5 % festgelegt. Daraus folgend sind in diesem
Experiment nur solche Unterschiede als signifikant bezeichnet worden, die mit einem
p-Wert < 0,05 bewertet worden sind.

Die Ergebnisse der multifaktoriellen ANOVA zeigen einen signifikanten Effekt für den Faktor *periodische Überflutung* (a) (ANOVA; n = 17; p < 0,001), d.h. periodisch überflutete Pflanzen beider Arten weisen eine signifikant höhere ADH-Aktivität auf als nicht-überflutete Pflanzen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden

Deschampsia-Taxa (b) wird jedoch nicht gefunden (p = 0,13). Auch hinsichtlich des Faktors Zeitpunkt der Probennahme (c) wird kein signifikanter Unterschied festgestellt (p = 0,47). Nach dreiwöchiger periodischer Überflutung ist die ADH-Enzymaktivität demnach in Blättern beider Sippen auf dem gleichen Niveau, unabhängig davon, ob die Proben direkt vor einsetzender Überflutung oder nach vier Stunden vollständigen Untertauchens genommen worden sind. Die ANOVA indiziert außerdem einen Unterschied in der Reaktion beider Deschampsia-Taxa auf periodische Überflutung (d) (p = 0,069). Während die ADH-Aktivität in nicht-überfluteten Pflanzen aller Gruppen gleich ist, zeigen überflutete Pflanzen von Deschampsia wibeliana nach dreiwöchiger periodischer Überflutung eine tendenziell höhere ADH-Aktivität als überflutete Pflanzen von D. cespitosa.

#### 3.1.1.2.2 Änderungen in der Genexpression von Adh1

Die *Northern-Blot*-Analysen nach dreiwöchiger periodischer Überflutung wurden, wie beschrieben (2.3.4), mit einem Pool aus Blättern von vier Pflanzen (*D. wibeliana*) bzw. zwei Pflanzen (*D. cespitosa*) durchgeführt, die zuvor für die Untersuchungen zur ADH-Enzymaktivität benutzt worden waren.

Die Ergebnisse zeigen deutliche Unterschiede in der Adh1-Transkriptmenge zwischen Pflanzen von *D. wibeliana* und *D. cespitosa*. Die Expression von *Adh1* ist demnach in *D. wibeliana* höher als in *D. cespitosa*. Diese Unterschiede sind jedoch offensichtlich weder überflutungsinduziert noch abhängig vom Zeitpunkt der Probennahme (A, C). Eine überflutungsinduzierte Expressionsänderung lässt sich, auch unter Berücksichtigung der Beladungsunterschiede, in keiner der beiden Sippen erkennen, auch wenn in *D. wibeliana* eine Tendenz zu einer erhöhten Transkriptmenge in überfluteten Pflanzen zu Zeitpunkt A erkennbar ist.

#### 3.1.1.2.3 Änderungen der ADH-Proteinexpression

Die Untersuchungen zur überflutungsbedingten Proteinexpression von ADH wurden mittels *Western-Blot*-Detektion durchgeführt (2.4.4). Zur Detektion der ADH wurde ein kommerzieller polyklonaler Anti-ADH-Antikörper (Prod.-Nr.: AS10 685) der Firma Agrisera (Vännäs, Schweden) verwendet. Jeder *Western-Blot* wurde gleichmäßig mit

30 μg des zum jeweiligen Zeitpunkt entnommenen Gesamtproteins beladen. Zur Überprüfung der gleichmäßigen Beladung wurde eine Detektion der großen RuBisCO-Untereinheit auf jedem *Western-Blot* mit einem Anti- RbcL Antikörper (Prod.-Nr.: AS03 037, Agrisera, Vännäs, Schweden) durchgeführt. RbcL wurde als Ladekontrolle ausgewählt, da das Protein in quantitativen Proteinscreenings wiederholt nicht reguliert vorlag (3.1.2, 3.2.3).

Der immunologische Nachweis über die Anwesenheit von ADH erfolgte nach drei Wochen periodischer Überflutung. Für die Analysen wurden Pools aus Blättern von drei Individuen pro Taxon verwendet. Wie für die *Northern-Blot-*Analysen beschrieben handelte es sich hierbei um dieselben Pflanzen, die bereits für die ADH-Aktivitätsassays verwendet worden waren. Die Ergebnisse der *Western-Blot-*Analysen wurden durch drei Wiederholungen mit jeweils unabhängigen Pflanzenpools überprüft.

Die Ergebnisse der *Western-Blot-*Analysen zeigen einen deutlichen Anstieg der Proteinmenge in den überfluteten Pflanzen beider Taxa. Signifikante Unterschiede lassen sich jedoch weder zwischen den Sippen noch in Abhängigkeit der Probennahme-Zeitpunkte A und C (2.9.1.2) mit Sicherheit feststellen. In nicht-überfluteten Pflanzen sind ist die Proteinmenge in zu Zeitpunkt A deutlich höher als zu Zeitpunkt B.

In Abbildung 8 sind die Ergebnisse der ADH-Aktivitätsassays, *Western-Blot*-Analysen sowie *Northern-Blot*-Analysen zusammenfassend dargestellt.

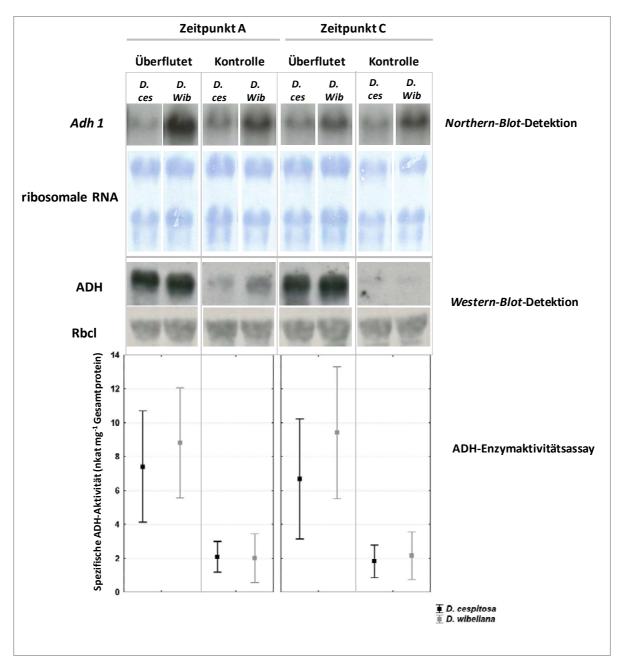


Abb. 8: Ergebnisse von ADH-Enzymaktivitätsassay, ADH-Western-Blot-Detektion sowie Adh1-Northern-Blot-Detektion. Gezeigt werden die Ergebnisse nach dreiwöchiger periodischer Überflutung von Deschampsia cespitosa und D. wibeliana in der Klimakammer. Zeitpunkt A: Proben unmittelbar vor einem Überflutungsereignis genommen (unter normalen Sauerstoffbedingungen) C: Probennahme nach vierstündiger Überflutung (unter Wasser). Die Ergebnisse der ADH-Enzymassays sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen (SD) dargestellt. Western-Blot-Detektion: Abgebildet ist eines von drei typischen Experimenten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die ADH-Enzymaktivität in Blättern von *D. cespitosa* und *D. wibeliana* erst infolge periodisch auftretender Überflutung signifikant angestiegen ist. Auch der immunologische Nachweis über die Anwesenheit von ADH war erst nach drei Wochen periodischer Überflutung reproduzierbar möglich. Die Genexpression von *Adh1* hingegen wurde bereits nach 2 h erstmaliger Überflutung initiiert. Ein transientes Expressionsmuster von *Adh1* war erkennbar, die Schwankungen zwischen den Replikaten jedoch sehr hoch. Nach dreiwöchiger periodischer Überflutung konnte kein signifikanter Unterschied in der *Adh1*-Genexpression zwischen Blättern überfluteter und nicht-überfluteter Pflanzen festgestellt werden.

Bezüglich der Unterschiede zwischen beiden Deschampsia-Taxa zeigte sich, dass die ADH-Enzymaktivität in Blättern überfluteter Pflanzen von D. wibeliana nach dreiwöchiger periodischer Überflutung in der Klimakammer tendenziell höher war als überfluteter Pflanzen von in Blättern D. cespitosa. Bezüglich ADH-Proteinanwesenheit konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Taxa festgestellt werden. Die Adh1-Transkriptmengen waren in allen überfluteten und nichtüberfluteten Blättern von *D. wibeliana* höher, verglichen zu *D. cespitosa*. Überflutungsinduzierte Unterschiede zwischen den Taxa ließen sich jedoch nicht erkennen.

Auf Grundlage dieser Erkenntnisse sollten in einem nächsten Klimakammerversuch Proteine identifiziert werden, die zwischen *Deschampsia cespitosa* und *D. wibeliana* infolge dreiwöchiger periodischer Überflutung differenziell reguliert waren.

# 3.1.2 Identifizierung überflutungsinduzierter Proteine in *Deschampsia* cespitosa und *D. wibeliana* nach dreiwöchiger periodischer Überflutung in der Klimakammer durch 2-dimensionale DIGE-Analysen (<u>Differences In Gel Electrophoresis</u>)

#### 3.1.2.1 Erstellung von Taxa-spezifischen Transkriptomdatenbanken

Bei einem Vergleich zwischen genetisch nicht identischen Organismen kann es zu einer hohen Variabilität im 2D-SDS-Gel kommen. Eine Ursache können unterschiedliche Proteinsequenzen sowie posttranskriptionale und posttranslationale Modifikationen sein (Davis *et al.*, 2009; Wright *et al.*, 2010). Außerdem kann die Identifizierung von Proteinen in heterologen Datenbanken zu einer geringen Identifizierungsrate führen (Davis *et al.*, 2009; Bindschedler & Cramer, 2011). Um durch massenspektrometrische Analyse eine optimale Identifizierung von Proteinen aus *D. cespitosa* und *D. wibeliana* zu erreichen, wurden Taxa-spezifische Transkriptomdatenbanken erstellt (2.5).

Durch die Transkriptomsequenzierung konnten in *D. wibeliana* 379.813 und in *D. cespitosa* 223.090 Transkripte mit einer Größe von mehr als 500 bp erhalten werden. Die erhaltenen Transkripte wurden von Malik Alawi (UKE Hamburg) gegen die *RefSeq*-Datenbank in NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq) annotiert. Nach Abzug redundanter Gene konnten in *D. wibeliana* 35.968 und in *D. cespitosa* 27.769 einzelne Gene identifiziert werden. 20.159 dieser Gene waren in *D. cespitosa* und *D. wibeliana* identisch.

Aufgrund dieser Ergebnisse war zu erwarten, dass durch Massenspektrometrie analysierte Proteine mit großer Wahrscheinlichkeit in beiden *Deschampsia*-Datenbanken identifiziert werden können. Darüber hinaus konnte angenommen werden, dass die Wahrscheinlichkeit für proteomische Variationen, die auf unterschiedlichen Gensequenzen beruhen, relativ gering ist. Um jedoch sicherzustellen, dass es sich bei den quantifizierten Protein-Spots um homologe Proteine handelte, wurden einzelne differenziell exprimierte Proteine sowohl aus 2D-DIGE-Gelen von *D. cespitosa* als auch von *D. wibeliana* analysiert.

### 3.1.2.2 2D-DIGE – Technisches Prinzip, experimentelle Möglichkeiten und Limitierungen

Bei der 2D-DIGE-Technik (*Differences In Gel Electrophoresis*) erfolgt die Markierung von Proteinen mittels kovalenter Bindung von fluoreszierenden Farbstoffen (Cyaninen) an die Aminosäure Lysin. Die Verwendung von drei verschiedenen Cyaninen (Cy2, Cy3, Cy5), die bei unterschiedlichen Wellenlängen angeregt werden, erlaubt die gemeinsame Auftrennung von bis zu drei Proben auf einem 2D-Gel. Somit ist eine Minimierung der Variabilität zwischen den 2D-Gelen eines Projektes möglich (Tonge *et al.*, 2001). Die Verwendung eines internen Standards, der aus gleichen Teilen aller Proben eines Projektes besteht, ermöglicht eine Quantifizierung detektierter Protein-Spots zwischen verschiedenen 2D-DIGE-Gelen (Alban *et al.*, 2003; Renaut *et al.*, 2006; Bindschedler & Cramer, 2011). Ein weiterer großer Vorteil der 2D-DIGE-Technologie ist die hohe Sensitivität der Proteinmarkierung. So liegen die Nachweisgrenzen von Coomassie Färbungen bei ungefähr 8–100 ng, von Silberfärbung bei ungefähr 1–10 ng und von Cy-Farbstoff-Färbungen bei 100–200 pg (Miller *et al.*, 2006).

## 3.1.2.3 2D-DIGE-Analyse von überflutungsinduzierten Proteinen in *D. cespitosa* und *D. wibeliana* nach drei Wochen periodischer Überflutung in der Klimakammer

In diesem Versuch sollten mit Hilfe der 2D-DIGE- Analyse die überflutungsinduzierten Proteomantworten von *D. cespitosa* und *D. wibeliana* miteinander verglichen werden. Dadurch sollten Hinweise bezüglich adaptationsrelevanter Unterschiede zwischen beiden *Deschampsia*-Sippen auf Proteinebene erhalten werden. Im Mittelpunkt des Interesses standen Proteine, die im Vergleich zu normal gewässerten Pflanzen Expressionsänderungen nach periodischer Überflutung zeigten. Proteine, die diese Eigenschaft erfüllten, sollten sowohl innerhalb der beiden Sippen als auch zwischen *D. cespitosa* und *D. wibeliana* identifiziert werden. Darüber hinaus sollten Proteine gefunden werden, deren Expressionsniveau unterschiedlich im Vergleich zwischen nicht-überfluteten Pflanzen beider Sippen ausgeprägt war.

Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse aus den Untersuchungen zur Alkoholdehydrogenase (3.1.1) wurde die DIGE-Analyse mit Proben durchgeführt, die

nach dreiwöchiger periodischer Überflutung zu Zeitpunkt C entnommen worden sind (2.9.1.2).

Die analysierten Individuen von *D. cespitosa* entstammten dem Standort Liether Moor. Die verwendeten Pflanzen von *D. wibeliana* wurden am Standort Kollmar entnommen. Mit allen Individuen wurde bis zu Beginn der periodischen Überflutung wie unter (2.9.1.1) beschrieben verfahren.

Um individuelle Unterschiede im 2D-Proteinprofil berücksichtigen zu können, wurde die DIGE-Analyse mit drei Pflanzen pro *Deschampsia*-Sippe durchgeführt (drei biologische Replikate). Jedes überflutete Individuum korrespondierte mit jeweils einem nicht-überfluteten Individuum.

Es wurden 150  $\mu$ g Gesamtprotein pro Probe eingesetzt. 100  $\mu$ g Gesamtprotein jeder überfluteten Probe wurde, wie unter (2.4.7.2) beschrieben, mit dem fluoreszierenden Cyanin Cy5 markiert. Die Markierung nicht-überfluteter Proben erfolgte mit Cy3. Für den internen Standard wurden die verbleibenden 50  $\mu$ g aller Proben zusammengegeben und mit Cy2 markiert. 100  $\mu$ g jeder überfluteten Probe wurde mit 100  $\mu$ g der jeweils genetisch korrespondierenden nicht-überfluteten Probe sowie 100  $\mu$ g internen Standard gemischt und gemeinsam hinsichtlich ihres isoelektrischen Punktes sowie anschließend gemäß ihres Molekulargewichtes 2-dimensional aufgetrennt. In Abbildung 9 ist die Markierung der Proteinextrakte schematisch dargestellt.

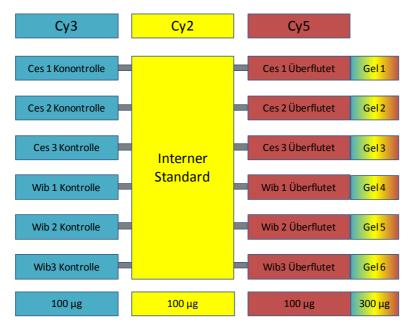


Abb. 9: Schematische Darstellung der Cyanin-Markierung von Gesamtprotein für die DIGE-Analyse von *Deschampsia cespitosa* und *D. wibeliana* nach dreiwöchiger periodischer Überflutung in der Klimakammer. 100 µg nicht-überfluteter Kontrollproben beider Sippen wurden mit Cy3, 100 µg der jeweils genetisch identischen überfluteten Proben mit Cy5 gefärbt und zusammen mit 100 µg gepooltem Cy2-gefärbten internen Standard (aus gleichen Mengen Protein aller Proben) auf jeweils einem 2D-DIGE – Gel aufgetrennt. Ces bzw. Wib 1-3 = biologische Replikate von *Deschampsia cespitosa* bzw. *D. wibeliana*.

Die Auswertung der 2D-DIGE-Gele erfolgte wie unter (2.4.7.8) beschrieben mit der Software Delta2D (Version 4.2.) der Firma Decodon (Greifswald, Deutschland). Die Gele wurden probenentsprechend in vier verschiedene Gruppen mit jeweils drei biologischen Replikaten unterteilt (*D. cespitosa* nicht-überflutet, *D. wibeliana* nicht überflutet, *D. cespitosa* überflutet, *D. wibeliana* überflutet). Nach Transfer der Messbereiche aller detektierten Spots auf alle Gelbilder des Projektes wurde mittels der Software-eigenen *Spot regions*-Funktion die korrekte Position des Messbereichs um jeden Spot in allen Gelbildern überprüft. Diese Funktion erlaubt die visuelle Verifizierung der Spot-Überlagerungen und Messbereiche aller Spots in allen Gelen und stellt einen wichtigen Schritt vor der statistischen Auswertung der Gele dar.

Die Identifizierung differenziell exprimierter Proteinspots erfolgte zwischen:

- (A) D. cespitosa überflutet versus D. cespitosa nicht-überflutet,
- (B) D. wibeliana überflutet versus D. wibeliana nicht-überflutet
- (C) Nicht-überflutet: *D. wibeliana versus D. cespitosa sowie*
- (D) Überflutet: *D. wibeliana versus D. cespitosa* (Abbildung 10)

#### anhand folgender Kriterien:

Der nicht-parametrische *Wilcoxon/Mann-Whitney-*Test wurde zunächst zur Identifizierung von Spots herangezogen, die im Mittelwertvergleich signifikante Expressionsänderungen zwischen den jeweiligen Gruppen zeigten. Der Wilcoxon/Mann-Whitney-Test wurde gewählt, da dieser die Analyse von Datensätzen erlaubt, deren Normalverteilung, wie im vorliegenden Fall, nicht klar ist. Die Analyse wurde über nichttransformierte Daten durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde  $\alpha$ = 5 % gewählt. Dementsprechend wurden alle Expressionsänderungen, für die ein p-Wert < 0,05 vorhergesagt wurde, als signifikant betrachtet.

In einem zweiten Schritt wurden die selektierten Spots mittels Definition einer *expression fold change* (Quotient der Mittelwerte) von < -1,5 oder > 1,5 gefiltert. Nur Spots, die mindestens eine 1,5-fache negative bzw. positive Expressionsänderung sowie im Mittelwertvergleich einen p-Wert < 0,05 zeigten, wurden für die weitere Analyse ausgewählt.

Da aufgrund hoher Variabilität zwischen den biologischen Replikaten viele regulierte Protein-Spots durch die statistischen Tests aussortiert wurden, sind entsprechende Proteine gesondert überprüft worden. Wenn im Vergleich zweier Gruppen die Quotienten aller drei Einzelwerte den Quotienten des Mittelwertes bestätigten, wurde das Protein in die weitere Auswertung übernommen.

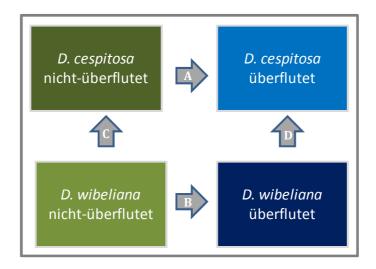


Abb. 10: Schematische Darstellung der Identifizierung differenziell exprimierter Proteine in der DIGE-Analyse von *Deschampsia cespitosa* und *D. wibeliana* nach dreiwöchiger periodischer Überflutung in der Klimakammer.

Insgesamt konnten in den vier Vergleichen ca. 400 Proteine detektiert werden. Anhand der gesetzten Kriterien wurden davon 94 als signifikant reguliert eingestuft, und 25 mittels Massenspektrometrie identifiziert (2.6.2).

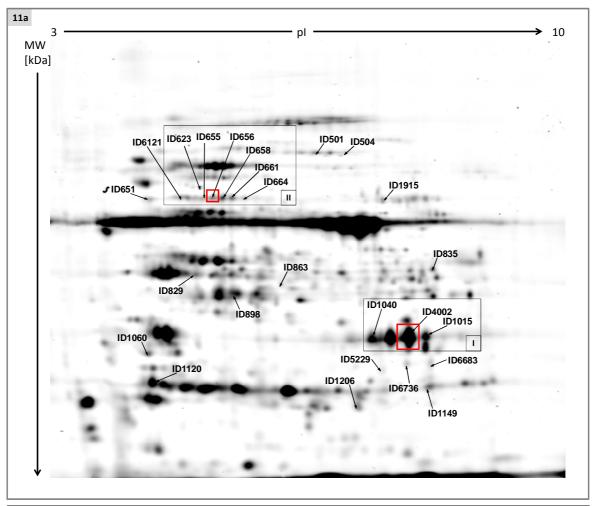
In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der Proteindetektion zwischen den vier Gruppen (A-D) zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 1. Anzahl und Verteilung mittels 2D-DIGE detektierter Protein-Spots nach dreiwöchiger Überflutung in der Klimakammer

Gruppe	Identifizierte Protein-Spots / Gruppe	Via MS-MS identifizierte Protein-Spots	Differenziell exprimierte Protein- Spots	Detektierte Protein-Spots insgesamt		
A	11 (21)		94			
В	19 (56)	25		Ca. 400		
C	11 (15)	23				
D	12 (26)					

Gezeigt wird die Anzahl der mittels Wilcoxon/Mann-Whitney-Test und *expression fold change* sowie aufgrund der auf Grundlage eines manuellen Mittelwertvergleiches (siehe Text) detektierten Protein-Spots zwischen den vier Gruppen A-D (siehe Text). In Klammern: Anzahl insgesamt detektierter Spots. Da einige Protein-Spots in mehreren Gruppen identifiziert worden sind, entspricht die Summe der in den Gruppen angegebenen Anzahlen nicht der Anzahl via MS-MS identifizierter Protein-Spots.

In Abbildung 11a werden alle identifizierten Protein-Spots auf einem ausgewählten 2D-DIGE-Bild dargestellt. Abbildung 11b zeigt eine detaillierte Darstellung von zwei anhand des Expressionsverhaltens sowie der physiologischen Bedeutung ausgewählten Spots.



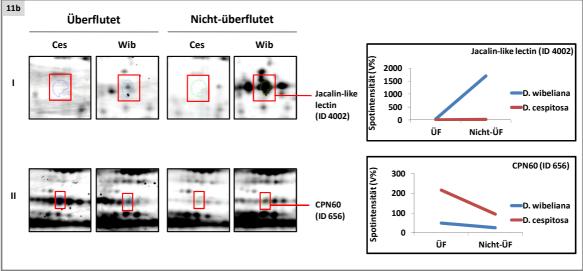


Abb. 11a/b: Repräsentatives 2D-Gelbild der DIGE-Analyse zur Identifizierung überflutungsinduzierter Proteine zwischen Deschampsia cespitosa und D. wibeliana nach dreiwöchiger periodischer Überflutung in der Klimakammer. 11a: 1 von 12 Gelen der DIGE-Analyse (D. wibeliana nicht-überflutet). Alle differenziell regulierten Protein-Spots sind markiert (Nummern = Spot-IDs). Interessante Spot-Regionen, sind umrandet und mit I & II nummeriert. 11b: detaillierte Ansicht interessanter Spots (Expressionsprofil und biologische Funktion) aus 11a. Pro Taxon ist der Ausschnitt je 1 von 3 Replikaten gezeigt. Farbige Umrandungen um die Spots: Messbereiche von Delta2D. Grafik rechts: Mittelwerte der Spotintensitäten aus je drei Replikaten (V%) für die vier Vergleichsgruppen (siehe Text). Ces= Deschampsia cespitosa, Wib = Deschampsia wibeliana.

#### 3.1.2.4 Identifizierung der detektierten Proteine durch Massenspektrometrie

Nach Analyse der Cy-gefärbten DIGE-Gele wurden diese mit kolloidalem Coomassie gefärbt (2.4.7.6). Differenziell exprimierte Proteine wurden manuell aus den gefärbten Gelen ausgeschnitten (2.6.1) und für die Identifizierung mittels *linear trap quadrupole* (LTQ)-Orbitrap Massenspektrometrie präpariert (2.6.2). Um sicherzustellen, dass es sich bei den quantifizierten Protein-Spots um dieselben Proteine in beiden Taxa handelte, wurden für die massenspektrometrische Analyse einzelne Protein-Spots aus 2D-DIGE-Gelen von *D. cespitosa* und *D. wibeliana* ausgeschnitten.

Die Identifizierung der Proteine wurde am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ) in Leipzig von der Arbeitsgruppe *Proteomik* durchgeführt. Die aus den 2-dimensionalen SDS-Gelen ausgeschnittenen Proteinspots wurden zunächst mittels *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight* (MALDI-TOF) Massenspektrometrie (2.6.2) analysiert. Mit Hilfe der MALDI- Analyse konnten nicht alle Proteine identifiziert werden. Um die Identifizierungsraten zu erhöhen, wurden die nicht identifizierten Proteine über hochsensitive *Linear Trap Quadrupole (LTQ)-Orbitrap MS* analysiert. Mit den erhaltenen massenspektrometrischen Daten wurde mit Hilfe des Programms Mascot (v2.1.1) eine Datenbankanalyse gegen die *Deschampsia-*Transkriptom-Datenbanken sowie gegen die Datenbanken von Swiss-Prot durchgeführt (www.uniprot.org).

Durch diese Analysen konnten 15 Proteine identifiziert werden (siehe Anhang 1). Um die Zahl der identifizierten Proteine zu erhöhen, wurden die 2D-DIGE-Gele des Klimakammerversuchs softwarebasiert (Delta2D, Decodon, Greifswald) mit den 2D-DIGE-Gelen des Freilandversuchs (3.2.3) verglichen. Daraufhin wurden die Ergebnisse der Klimakammerversuche um 10 Proteine ergänzt, die sowohl in der Klimakammer als auch im Freiland reguliert waren (siehe Anhang 2). Diese Proteine sind in Tabelle 2 mit einer 1 gekennzeichnet. Um die Reproduzierbarkeit der Proteinidentifikation zu überprüfen, wurden außerdem einzelne Proteine aus 2D-Gelen unabhängiger Proben massenspektrometrisch mehrfach analysiert. Detailierte Informationen zu den identifizierten Proteinen sind in Anhang 1 und 2 aufgeführt.

In Tabelle 2 sind die durch *(LTQ)-Orbitrap-MS* identifizierten Proteine dargestellt. Die Proteine wurden aufgrund ihrer Expressionsprofile in drei unterschiedliche Gruppen aufgeteilt:

- (I) in *D. cespitosa* reguliert
- (II) in *D. wibeliana* reguliert
- (III) in beiden Deschampsia-Taxa reguliert

#### Gruppe I: In D. cespitosa regulierte Proteine

In Gruppe I sind sechs Proteine zusammengefasst, die nach dreiwöchiger periodischer Überflutung in der Klimakammer, verglichen zu nicht-überfluteten Rameten, ausschließlich in *D. cespitosa* induziert waren. In dieser Gruppe konnten 3 Isoformen des chloroplastidären Chaperonin 60 subunit beta 1 (CPN60, Spot-ID 658, 661, 664) gefunden werden. Chaperonin 60 ist das am häufigsten vorkommende molekulare Chaperon in Chloroplasten (Schmitz *et al.*, 1996). Das Protein ist in die Faltung und Stabilisierung von Proteinen involviert und spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase unter abiotischem Stress (Wang *et al.*, 2004). Es wird außerdem vermutet, dass CPN60 an dem Transport von Proteinen in die Chloroplasten beteiligt ist (Vierling, 1991; Jackson-Constan *et al.*, 2001) und eine Rolle in unterschiedlichen Stressantworten spielt (Timperio *et al.*, 2008; Salvucci, 2007) ist.

Außerdem wurde ein Protein der Bekämpfung von oxidativem Stress (Flavodoxinähnliche Quinonreduktase 1 (FQR1), Spot-ID 1206) identifiziert. FQR1 wird als primärer Auxinrezeptor beschrieben und spielt eine Rolle bei der Bekämpfung von (auxininduziertem) oxidativem Stress (Laskowski *et al.*, 2002).

Aus der Photosynthese wurde in *D. cespitosa* die Alpha-Untereinheit der chloroplastidären ATP-Synthase CF1 (Spot-ID 1915) identifiziert, die ein Protein der photosynthetischen Lichtreaktion ist.

Ein weiteres Protein, das als Phosphoglyceratmutase (Spot-ID 623) identifiziert wurde, konnte der Glykolyse zugeordnet werden.

Tabelle 2: Mittels 2D-DIGE und Massenspektrometrie identifizierte Proteine nach periodischer Überflutung von *Deschampsia cespitosa* und *D. wibeliana* in der Klimakammer

			Expression fold-change				
Spot ID	Proteinname	Biologische Funktion	Ces ÜF/NÜF	Wib ÜF/NÜF	NÜF Wib/Ces	ÜF Wib/Ces	
(I) D. ce	(I) D. cespitosa ↑ / D. wibeliana =						
658	Chaperonin 60 subunit beta 1, chloroplastic	Proteinfaltung / Proteinstabilisierung	3,1	1,4	-2,3	<u>-5,2</u>	
661	Chaperonin 60 subunit beta 1, chloroplastic	Proteinfaltung / Proteinstabilisierung	<u>4,0</u>	1,2	-1,9	<u>-6,5</u>	
664	Chaperonin 60 subunit beta 1, chloroplastic	Proteinfaltung / Proteinstabilisierung	<u>6,7</u>	1,7	-1,6	<u>-6,2</u>	
623 <sup>1</sup>	Phosphoglyceromutase	Glykolyse	2,5	1,8	1,2	-1,1	
1206	Flavodoxin-like quinone reductase 1	Bekämpfung von Auxin-induziertem oxidativen Stress	<u>2,2</u>	1,5	1,0	-1,5	
1915	ATP synthase CF1 alpha subunit (chloroplast)	Oxidative Phosphorylierung	<u>1,8</u>	1,3	1,0	-1,4	
(II) D. V	Vibeliana ↑↓ / D. cespitosa =						
1060	FerredoxinNADP reductase, leaf isozyme, chloroplastic	Photosynthese	1,2	<u>2,3</u>	-1,3	1,4	
6121	Chaperonin 60 subunit beta 1, chloroplastic	Proteinfaltung / Proteinstabilisierung	-1,0	<u>11,9</u>	-8,7	1,4	
656 <sup>1</sup>	Chaperonin 60 subunit beta 1, chloroplastic	Proteinfaltung / Proteinstabilisierung	2,3	2,0	-3,8	<u>-4,4</u>	
655 <sup>1</sup>	Chaperonin 60 subunit beta 1, chloroplastic	Proteinfaltung / Proteinstabilisierung	2,4	4,0	-5,1	<u>-3,1</u>	
651 <sup>1</sup>	CPN-60 alpha	Proteinfaltung / Proteinstabilisierung	-1,0	<u>12,9</u>	-5,7	2,3	
829 <sup>1</sup>	Glutamine synthetase	Photorespiration; Stickstoffmetabolismus	1,3	<u>1,6</u>	-1,1	1,1	
835 <sup>1</sup>	Glycerate dehydrogenase	Photorespiration	-1,3	2,5	-2,9	1,1	
898 <sup>1</sup>	Fructose-bisphosphate aldolase	Glykolyse	1,0	<u>2,6</u>	<u>-2,6</u>	-1,0	
863	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	Citratzyklus; Alanin-2-Oxoglutarat- Stoffwechselweg /Zelluläre pH-Regulation	-2,3	<u>4,7</u>	-5,7	1,9	
1120	20 kDa chaperonin	Proteinfaltung / Proteinstabilisierung	-1,2	<u>-3,2</u>	<u>2,0</u>	-1,3	
1015 <sup>1</sup>	Mannose/glucose-specific Jacalin-like lectin	Stickstoffspeicherung; Biotische/abiotische Stressantwort	2,1	-11,0	<u>6,6</u>	-3,5	
1040	Mannose/glucose-specific Jacalin-like lectin	Stickstoffspeicherung; Biotische/abiotische Stressantwort	1,0	-2,9	13320,4	4673,5	
4002	Mannose/glucose-specific Jacalin-like lectin	Stickstoffspeicherung; Biotische/abiotische Stressantwort	6,5	<u>-48,0</u>	<u>1565,2</u>	5,1	

Legende folgt!

#### Tabelle 2 (fortgesetzt)

			Expression fold-change					
Spot			Ces	Wib	NÜF	ÜF		
ID	Proteinname	Biologische Funktion	ÜF/NÜF	ÜF/NÜF	Wib/Ces	Wib/Ces		
(III) D.	(III) D. cespitosa ↑ / D. wibeliana ↑							
1149	Catalytic/ oxidoreductase, acting on NADH or NADPH	Katalyse von Redoxreaktionen	3,1	2,6	-3,1	<u>-3,7</u>		
5229	Fructose-bisphosphate aldolase cytoplasmic isozyme	Glykolyse	2,9	3,5	-3,1	<u>-2,6</u>		
6736	Peroxidase 1	Reduktion von Wasserstoffperoxid	<u>3,5</u>	2,2	-1,1	-1,7		
501 <sup>1</sup>	Methionine synthase	Methioninbiosynthese	2,1	4,2	-1,7	1,2		
504 <sup>1</sup>	Methionine synthase	Methioninbiosynthese	3,3	<u>4,9</u>	-1,3	1,2		
6683	Cadmium/zinc-transporting ATPase 3-like	ATP-Biosynthese	3,5	<u>5,0</u>	-1,6	-1,1		

Die mittels *linear trap quadrupole (LTQ)-Orbitrap MS* identifizierten Proteine sind hinsichtlich ihres Expressionsprofils in vier Gruppen unterteilt. Für jedes Protein wird gezeigt: Spot-ID (korrespondierend zu Protein-Spot auf 2D-Geldbild, (Abb. 11a), Proteinname, biologische Funktion, Quotient der Mittelwerte (*Expression fold change*) der vier Gruppenvergleiche: Grenzwerte der Expression fold change: < -1,5 oder > 1,5. Fett gedruckt: Signifikant entsprechend Quotient des Mittelwerts = Quotient seiner Einzelwerte (Erklärung siehe Text). Fett markiert und unterstrichen: Signifikant entsprechend Wilcoxon/Mann-Whitney-Test, p< 0,05. Hochregulierte Proteine sind rot, herunterregulierte grün markiert. <sup>1</sup>: Proteine wurden nach einem Vergleich mit den 2D-DIGE-Gelbildernder der Freilandversuche (3.2.3) hinzugefügt.

#### Gruppe II: In *D. wibeliana* regulierte Proteine

Dreizehn Proteine, die ausschließlich in *D. wibeliana* reguliert waren, sind in Gruppe II zusammengefasst. Nach dreiwöchiger Überflutung waren neun dieser dreizehn Proteine hoch- und vier Proteine herunterreguliert. Von den neun hochregulierten Proteinen wurden vier Proteine der Faltung und Stabilisierung von Proteinen zugeordnet. Von diesen vier Proteinen wurden drei als chloroplastidäre Isoformen von CPN60 beta 1 (Spot-IDs 6121, 656, 655) sowie eines als alpha-Untereinheit von CPN60 (Spot-ID 651) identifiziert. Auffällig ist, dass die Proteinlevel von zwei der vier CPN60 beta Isoformen auch nach überflutungsbedingter Induktion in *D. wibeliana* deutlich niedriger waren als in *D. cespitosa* (Spot-IDs 469, 461).

Zwei in *D. wibeliana* induzierte Proteine sind in die Photorespiration involviert (Glyceratdehydrogenase, Spot-ID 835; Glutaminsynthetase, Spot-ID 829). Die Glutaminsynthetase ist ein Schlüsselenzym des Stickstoffmetabolismus und spielt eine Rolle bei der Reassimilation von  $NH_3/NH_4^{+1}$ , das während der Photorespiration entsteht. (Miflin & Habash, 2002).

Zwei weitere induzierte Proteine konnten dem Kohlenhydratmetabolismus zugeordnet werden. Die Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase (Spot-ID 898) ist ein Protein der Glykolyse, die unter hypoxischen Bedingungen maßgeblich zur ATP-Versorgung der Zelle beiträgt (Rocha *et al.*, 2010). Die Malatdehydrogenase (MDH, Spot-ID 863) katalysiert die reversible Umwandlung von Oxalacetat zu Malat und ist sowohl im Citratzyklus als auch im Hypoxie-assoziierten Alanin-2-Oxoglutarat-Stoffwechselweg involviert (Rocha *et al.*, 2010). Da eine Akkumulation von Malat unter hypoxischen Bedingungen zur Acitose führen kann, spielt die MDH durch den Verbrauch von Malat eine Rolle bei der pH-Regulierung der Zelle (Roberts *et al.*, 1992). In *D. wibeliana* wurde die MDH nach periodischer Überflutung um den Faktor 4,7 hochreguliert. Im Vergleich zwischen den nicht-überfluteten Pflanzen beider Taxa war die MDH-Proteinmenge in *D. wibeliana* deutlich geringer als in *D. cespitosa*. Nach Hochregulierung war das Proteinniveau von MDH in *D. wibeliana* jedoch knapp zweifach höher als in *D. cespitosa*.

 $<sup>^{\</sup>rm 1}$  Das Equilibrium von NH $_{\rm 3}$  / NH $_{\rm 4}^{\rm +}$  ist abhängig vom pH-Wert.

Von den vier reprimierten Proteinen in *D. wibeliana* wurde ein weiteres Chaperonin identifiziert (20k Da Chaperonin, Spot-ID 1120). Ein besonders auffälliges Expressionsprofil zeigten die drei anderen reprimierten Proteine, die als Isoformen eines Jacalin-ähnlichen Lektins identifiziert worden sind. Mitglieder dieser Familie sind putative Stickstoffspeicherproteine. Darüber hinaus werden sie mit Stressreaktionen auf verschiedene biotische und abiotische Faktoren assoziiert (van Damme *et al.*, 2008). Die extremen Expressionsunterschiede zwischen *D. wibeliana* und *D. cespitosa* rühren von einer annähernd vollständigen Abwesenheit des Proteins in *D. cespitosa* her. In *D. wibeliana* hingegen liegt das Protein als hoch abundanter Proteinspot vor (Abbildung 11b).

#### Gruppe III: Proteine, die in beiden Deschampsia-Taxa reguliert sind

In Gruppe III wurden sechs Proteine zusammengefasst, die nach dreiwöchiger periodischer Überflutung in der Klimakammer in beiden *Deschampsia*-Taxa reguliert worden sind. Drei der sechs identifizierten Proteine zeigten verglichen mit *D. wibeliana* ein signifikant höheres Proteinniveau in *D. cespitosa*. Diese Proteine konnten der Glykolyse (Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase, Spot-ID 5229) dem Energiestoffwechsel (Catalytic/oxidoreductase, acting on NADH or NADPH) sowie dem Schutz vor oxidativem Stress (Peroxidase 1, Spot-ID 6736) zugeordnet werden. Mit der Cadmium/Zink-transportierenden ATPase 3 (Spot-ID 6683) wurde ein weiteres Protein des Energiestoffwechsels identifiziert.

Bei zwei weiteren Proteinen handelte es sich um Methioninsynthasen (Spots 501, 504), die eine Rolle bei der Synthese von Methionin und folglich von S-Adenosylmethionin spielen. S-Adenosylmethionin ist eine Vorstufe von Ethylen (Hesse *et al.*, 2004), einem Schlüsselhormon bei der sensorischen Erfassung von Hypoxie. Ethylen spielt eine Rolle in unterschiedlichen Adaptationsmechanismen von Pflanzen an Überflutungsstress (Pierik *et al.*, 2006; Colmer & Voesenek, 2009). Methioninreste an Proteinen sind außerdem durch ihre Fähigkeit zur Oxidation in der Lage, reaktive Sauerstoffspezies zu reduzieren. Sie spielen somit eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der Funktionalität von Proteinen bei erhöhten ROS-Konzentrationen (Levine *et al.*, 1999).

## 3.1.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der 2D-DIGE-Analyse nach dreiwöchiger periodischer Überflutung von *Deschampsia cespitosa* und *D. wibeliana* in der Klimakammer

Drei Wochen nach periodischer Überflutung konnten mittels 2D-DIGE und Massenspektrometrie 25 Proteine identifiziert werden, die eine differenzielle Expression zwischen *D. cespitosa* und *D. wibeliana* zeigten. Die identifizierten Proteine ließen sich nach Literaturrecherche neun putativen biologischen Funktionen zuordnen (Tabelle 3).

Die Ergebnisse zeigten, dass in überfluteten Pflanzen das Proteinniveau bei 8 von 25 Proteinen in *D. wibeliana* signifikant niedriger war als in *D. cespitosa*.

Bei diesen Proteinen handelte es sich um Isoformen von CPN 60 (Spot-IDs 658, 661, 664, 656, 655), eine katalytische Oxidoreduktase (Spot-ID 1149), eine Aldolase (Spot-ID 5229) sowie eine Peroxidase 1 (Spot-ID 6736).

Bei drei Proteinen war das Proteinniveau in überfluteten Pflanzen von *D. wibeliana* deutlich höher als in *D. cespitosa*. Bei diesen Proteinen handelte es sich um ein Jacalin-ähnliches Lektin, Spot-IDs 1040, 1015, 4002 sowie um Malatdehydrogenase, (MDH, Spot-ID 863). Dieser Unterschied beruhte nur im Falle von MDH auf einer Zunahme der Proteinmenge. Bei zwei Isoformen des Mannose/Glucose-bindenden Jacalin-änlichen Lektins lag auch nach Herunterregulierung in *D. wibeliana* ein Vielfaches der Proteinmenge von *D. cespitosa* vor.

Tabelle 3: Aufschlüsselung der Anzahl der mittels 2D-DIGE und MS-Analyse identifizierten Proteine zu den ihnen zugeordneten Stoffwechselwegen (Klimakammerversuch)

	Anzahl		iell expri				
Putative Biologische Funktion	Ces ÜF/NÜF	Wib ÜF/NÜF	NÜF Wib/Ces	ÜF Wib/Ces	Spot ID		
Photosynthese	1	1	-	-	1915, 1060		
Glycolyse	2	2	1	1	898, 623, 5229		
Methioninbiosynthese	2	2	1	-	501, 504		
ROS-Abwehr	2	1	-	1	1206, 6736		
ATP-Synthese	3	2	1	1	1915,1149, 6683		
Proteinfaltung / Proteinstabilisierung	3	4 1	4 1 3 1		1 3 1 5		658, 661,664,6121,656,655, 651,1120
Stickstoffspeicherung; Biotische/ abiotische Stressantwort	-	3 3		2	4002, 1040, 1015		
Photorespiration	-	2	-	-	829, 835		
Citratzyklus; Alanin-2-Oxoglutarat- Stoffwechselweg / Regulation des zellulären pH-Wertes	-	1	1	1	863		

Die Anzahl der den jeweiligen biologischen Funktionen zugeordneten Proteine ist für jeden Vergleich angegeben. Rot: Anzahl hochregulierter Proteine, grün: Anzahl herunterregulierter Proteine. Die Proteine können mehr als einer putativen biologischen Funktion zugeordnet worden sein.

Von den neun identifizierten Stoffwechselwegen und biologischen Prozessen wurden sechs in beiden *Deschampsia*-Taxa angesprochen. Die Proteinfaltung und -stabilisierung war dabei in beiden Taxa der am stärksten vertretende Prozess. Dabei muss erwähnt werden, dass es sich mit einer Ausnahme (Chaperonin 20, Spot-ID 1120) um Isoformen bzw. unterschiedliche Untereinheiten des Chaperonin 60 handelte, die offensichtlich differenziell zwischen den Taxa reguliert waren. Bezüglich der Regulation der identifizierten Proteine ist auffällig, dass mit Ausnahme eines 20 kDa Chaperonins (Spot-ID 1120) sowie vierer Isoformen eines Jacalin-ähnlichen Lektins (Spot-IDs 1040, 1015, 4002) alle identifizierten Proteine nach dreiwöchiger periodischer Überflutung hochreguliert vorlagen.

In *D. wibeliana* kam es zu veränderter Expression in drei Stoffwechselwegen, die *D. cespitosa* nicht zugeordnet werden konnten. Dabei handelt es sich um die Photorespiration, den Citratzyklus, den Alanin-2-Oxoglutarat-Stoffwechselweg bzw. die zelluläre pH-Regulation, in denen die Malatdehydrogenase aktiv ist. Außerdem wurden Proteine der Stickstoffspeicherung/Stressantwort auf biotischen und abiotischen Stress nur in *D. wibeliana* gefunden. Den deutlichsten Unterschied auf Proteinebene zeigte ein stark reguliertes Mannose/Glucose-spezifisches Jacalin-ähnliches Lektin (Spots 1040, 1015, 4002), das als drei Isoformen vorlag. Interessanterweise wird dieses Protein in *D. wibeliana* bei Überflutung stark reprimiert. Nach dreiwöchiger periodischer Überflutung befand sich die Proteinmenge dieses Lektins auf demselben Niveau wie in *D. cespitosa* (Abbildung 11b).

Eine technische Einschätzung bezüglich der Möglichkeit vergleichender Proteinanalysen zwischen verschiedenen Taxa mittels 2D-DIGE-Analyse fällt aufgrund der erhaltenen Ergebnisse positiv aus. Alle Protein-Spots, die aus 2D-Gelen beider Taxa identifiziert wurden, konnten mittels Massenspektrometrie als identische Proteine identifiziert werden. Jedoch hatte die Analyse von biologischen Replikaten eine enorme Variabilität in den 2D-Proteinspotprofilen zur Folge. Insbesondere die Überlagerung der 2D-DIGE-Gele wurde dadurch sehr erschwert. Darüber hinaus wurde auch die statistische Auswertung der Gele beeinträchtigt.

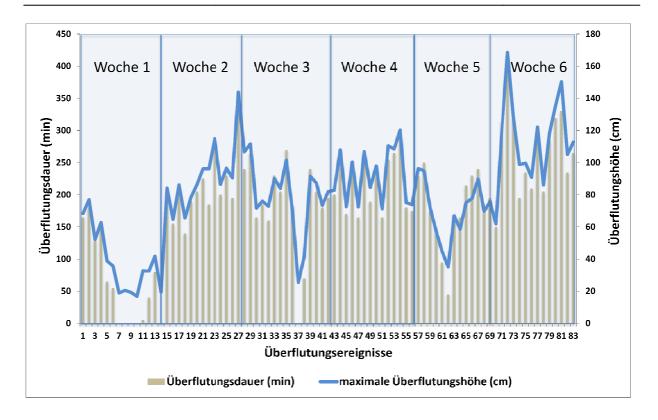
Die gewonnenen Erkenntnisse lieferten wertvolle Informationen, die für die Konzeptionierung eines zweiten DIGE-Experiments, in dem differenzielle Proteine nach reziproker Verpflanzung beider *Deschampsia-*Taxa in einem Freilandversuch identifiziert werden sollten, herangezogen wurden (3.2.3).

### 3.2 Untersuchungen im Freiland

In diesem Teil der Arbeit wurden physiologische und morphologische Untersuchungen an den Deschampsia-Taxa D. cespitosa und D. wibeliana in einem Freilandexperiment durchgeführt. Dazu wurden 15 Pflanzen beider Deschampsia-Taxa aus ihren natürlichen Lebensräumen entnommen (D. wibeliana: Kollmar; D. cespitosa: Krempermoor; 2.9.2.1) und in jeweils zwei Rameten geteilt. Diese Rameten wurden anschließend reziprok zwischen ihren Habitaten verpflanzt, sodass es zu jedem Individuum in Kollmar einen Rameten im Krempermoor gab (2.9.2.2). Im Verlaufe des Verpflanzungsexperiments wurden vergleichende Analysen Enzymaktivität des Hypoxie-Markers zur Alkoholdehydrogenase (3.2.2), zur Proteomantwort (3.2.3) sowie zur Morphologie der Blätter (3.2.4) zwischen Deschampsia wibeliana und D. cespitosa durchgeführt. Ziel des Versuches war es, ökologisch relevante Daten zu erheben, die zur Aufklärung der ökophysiologischen Differenzierung von Deschampsia wibeliana und D. cespitosa verwendet werden können. Darüber hinaus sollten die Daten helfen, die Ergebnisse der laborbasierten Versuche (3.1) zu verifizieren.

### 3.2.1 Ergebnisse der Pegelstandsmessungen am Standort Kollmar

Um kontrollieren zu können, ob die Versuchspflanzen am Standort Kollmar tatsächlich über den Zeitraum des Verpflanzungsexperiments vollständig überflutet wurden, sind begleitende Pegelstandsdaten in Kollmar mittels einer Pegelsonde aufgezeichnet worden (2.9.2.2). Aus den gewonnen Daten wurde die Überflutungsdauer sowie –höhe jedes Überflutungsereignisses errechnet. Nur Überflutungsereignisse mit einem Pegelstand von mindestens 30 cm wurden in die Auswertung einbezogen. Dieser Wert wurde gewählt, da nach Beobachtung bei diesem Wasserstand alle für das Experiment verwendeten Pflanzen vollständig überflutet wurden. Die Ergebnisse der Pegelstandsmessungen sind in Abbildung 12a dargestellt.



**Abb. 12a: Gemessene Überflutungsdauer und -höhe am Standort Kollmar, gemessen im Verlaufe eines sechswöchigen Verpflanzungsexperiments.** Nur Überflutungsereignisse mit einem Pegelstand von mindestens 30 cm wurden in die Auswertung einbezogen. Fehlende Angabe zur Überflutungsdauer (Ereignis 7, 8, 9, 10, 37): Pflanzen wurden nicht vollständig überflutet.

Die Auswertung der Pegelstandsmessungen zeigte, dass eine starke Korrelation zwischen maximaler Überflutungshöhe und Überflutungsdauer existierte, die auf länger dauernde Zu- und Abflussgeschwindigkeiten bei stärkeren Tidehub zurückgeführt werden kann. Darüber hinaus wird deutlich, dass die Anzahl der Überflutungen tidebedingt zwischen den Wochen schwankte. Auch die Überflutungshöhe fluktuierte stark. Dennoch lässt sich eine Tendenz zwischen den sechs Wochen erkennen. Danach war die Überflutungsintensität (Überflutungshöhe und -dauer) in Woche 1 am geringsten, ist in Woche 2 – 4 tendenziell angestiegen, in Woche 5 geringfügig abgefallen und erreichte einen maximalen Wert in Woche 6. Zur Veranschaulichung sind die wöchentlichen Mittelwerte in Abbildung 12b dargestellt.

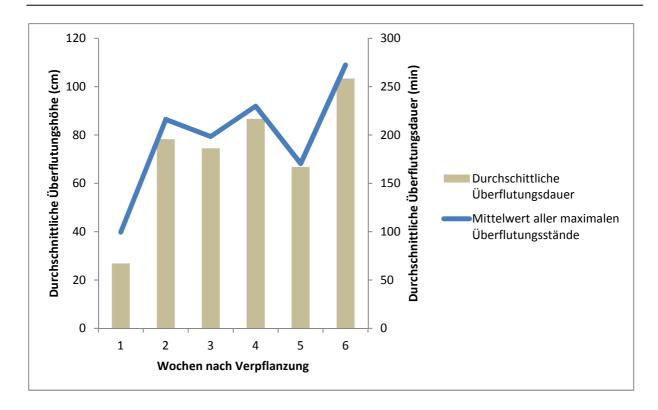


Abb. 12b: Durchschnittliche wöchentliche Überflutungsdauer und Überflutungshöhe am Standort Kollmar. Die in Abb. 12a gezeigten Werte wurden wochenweise gemittelt.

Mit Hilfe der Pegelstandsmessungen am Standort Kollmar konnte gezeigt werden, dass die Pflanzen im Verlaufe des Experiments regelmäßig vollständig überflutet worden sind. Diese Information ist sehr wichtig, um die Resultate der folgenden Experimente mit der tidebedingten vollständigen Überflutung korrelieren zu können. Die Informationen bezüglich Höhe und Dauer der einzelnen Überflutungsereignisse können darüber hinaus Hinweise über die Intensität des überflutungsbedingten Stresses geben.

# 3.2.2 Untersuchungen zur Enzymaktivität der Alkoholdehydrogenase in Blättern von *Deschampsia cespitosa* und *D. wibeliana* im Verlaufe des reziproken Verpflanzungsexperiments im Freiland

In diesem Versuch sollte mittels des Hypoxie-Markers Alkoholdehydrogenase (ADH) die Überflutungstoleranz von *Deschampsia cespitosa* und *D. wibeliana* unter natürlichen Bedingungen im Freiland untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die Enzymaktivität der ADH im Verlauf eines sechswöchigen Verpflanzungsexperiments im Freiland analysiert.

Mit Hilfe der im Freiland erhobenen Daten sollten die gewonnen Erkenntnisse dazu beitragen, die ökologische Relevanz des Enzyms Alkoholdehydrogenase für die ökologische Differenzierung beider *Deschampsia*-Taxa einschätzen zu können. Darüber hinaus sollten mit Hilfe der erhaltenen Daten die Ergebnisse zur ADH-Aktivität nach periodischer Überflutung in der Klimakammer (3.1.1) verglichen werden.

Die ADH-Enzymmessungen wurden wie unter 2.4.8 beschrieben mit Blattproben von sechs Pflanzen pro Taxon und Standort (biologische Replikate) nach einer bis vier sowie sechs Wochen nach Verpflanzung durchgeführt. Zur Überprüfung des Verpflanzungseffekts wurden in der vierten Woche an beiden Standorten jeweils sechs Pflanzen entnommen, die in unmittelbarer Nähe der experimentellen Fläche wuchsen und nicht für das Experiment ausgepflanzt worden waren.

Im Verlaufe vierwöchiger tidebedingter Überflutung am Standort Kollmar konnte bei allen Pflanzen von *Deschampsia cespitosa* ein sukzessives Absterben der Blätter beobachtet werden. Gleichzeitig wurden während desselben Zeitraums neue Blätter gebildet, die morphologisch deutlich von den alten Blättern unterschieden werden konnten. Nach der Probennahme vier Wochen nach Beginn des Experiments konnten an Pflanzen von *D. cespitosa* keine weiteren für die Analyse verwertbaren Blätter mehr in ausreichender Zahl entnommen werden. Da die neugebildeten Blätter zu diesem Zeitpunkt noch keine ausreichende Differenzierung erreicht hatten, wurde von einer Probennahme nach fünf Wochen abgesehen. Die ADH-Enzymaktivitätsanalyse nach sechs Wochen wurde dann mit neu gebildeten, ausdifferenzierten Blättern von *D. cespitosa* durchgeführt. Blätter von *Deschampsia wibeliana* zeigten im selben Zeitraum keine morphologisch auffällige Entwicklung. Bei der Probennahme von *D. wibeliana* wurde daher nicht zwischen älteren und neugebildeten Blättern unterschieden.

Die Auswertung der Aktivitätsdaten erfolgte mittels einer multifaktoriellen ANOVA. Zur Erfüllung des Kriteriums der Varianzhomogenität wurden die Daten einer Box-Cox Transformation unterzogen. Im Anschluss an die ANOVA wurde ein *Tukey-HSD post hoc Test* durchgeführt. Signifikante und nichtsignifikante Ereignisse wurden durch die Festlegung eines Signifikanzniveaus von  $\alpha = 5$ % unterschieden. Demzufolge waren alle Ereignisse mit einem p-Wert < 0,05 als signifikant einzuschätzen.

Die Analyse der ADH-Aktivität in wild wachsenden Pflanzen, die nicht durch das Experiment beeinflusst worden waren, wurde mittels eines t-Tests durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde ebenfalls  $\alpha$  = 5 % gewählt.

Die Ergebnisse der Enzymaktivitätsanalyse sind in Abbildung 13, 14 und 15 zusammenfassend dargestellt.

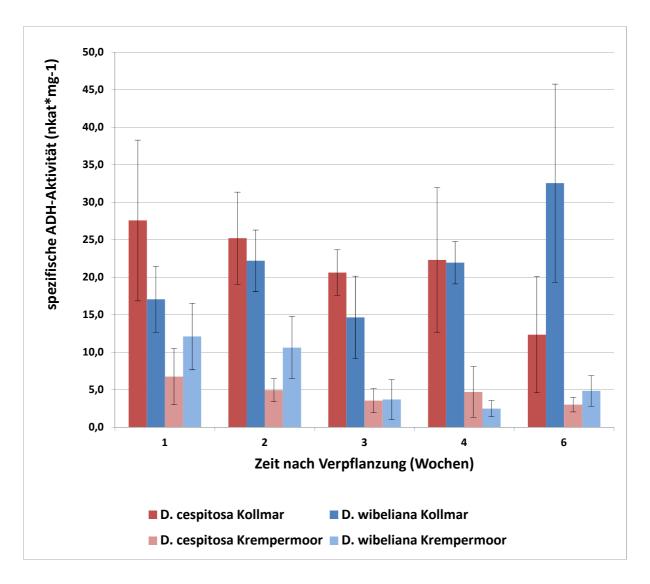


Abb. 13: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der ADH-Enzymassays während sechswöchiger tidebedingter Überflutung im Freiland. Pro Messzeitpunkt wurden sechs Individuen pro Taxon und Standort analysiert. Die Grafik zeigt die Mittelwerte aus der Summe der erhobenen Daten mit Standardabweichungen (SD).

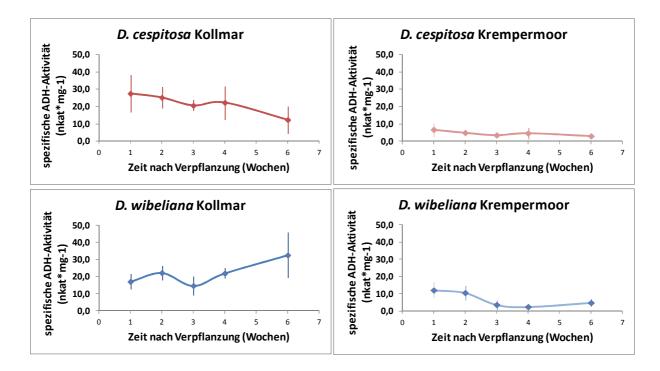
Eine Woche nach Verpflanzung zeigten die Blätter periodisch überfluteter Pflanzen von Deschampsia cespitosa in Kollmar ein signifikant höheres ADH-Aktivitätsprofil im Vergleich zu Blättern nicht-überfluteter Rameten im Krempermoor (Tukey-HSD post hoc Test, p < 0,001). In den Wochen 2-4 verringerte sich das ADH-Aktivitätsniveau in Blättern überfluteter Pflanzen von *D. cespitosa* im Vergleich zur ersten Woche tendenziell, jedoch nicht signifikant.

Die ADH-Enzymaktivität in neu gebildeten Blättern, die nach sechs Wochen tidebedingter Überflutung entnommen wurden, war im Vergleich zu den in Woche 1 und 2 analysierten älteren Blättern signifikant niedriger (Woche 1, p = 0,003; Woche 2, p = 0,014) und unterschied sich überdies nicht signifikant von den Aktivitätswerten der nicht überfluteten Rameten nach Woche 1 und 2. Innerhalb der nicht-überfluteten Pflanzen von *D. cespitosa* waren zu keinem Zeitpunkt des sechswöchigen Experiments signifikante Änderungen der ADH-Enzymaktivität erkennbar.

In Blättern überfluteter Pflanzen von *Deschampsia wibeliana* war die ADH-Enzymaktivität generell höher, verglichen zu nicht-überfluteten Blattproben, die aus genetisch identischen Pflanzen im Krempermoor entnommen wurden. Ein statistisch signifikanter Anstieg des ADH-Enzymaktivitätsniveaus ist ab Woche 3 nach Verpflanzung nachweisbar (p < 0,01). Die Daten in Abbildung 13 zeigen jedoch, dass dieser Unterschied nicht auf einem ab Woche 3 zu verzeichnenden Anstieg der ADH-Enzymaktivität in den überfluteten Pflanzen beruht. Der Grund für die unterschiedlichen Werte der ADH-Enzymaktivität ist vielmehr die abnehmende ADH-Aktivität nicht-überfluteter Pflanzen im Krempermoor. Diese ging dort sukzessiv im Verlaufe der ersten vier Wochen nach Verpflanzung zurück (Woche 3, p = 0,016; Woche 4, p < 0,002). Ein signifikanter Anstieg der ADH-Enzymaktivität ist in überfluteten Pflanzen von D. wibeliana in Kollmar nach der 6. Woche nachweisbar (im Vergleich zu Woche 1, p = 0,034; Woche 3, p = 0,002).

Ein Vergleich der ADH-Enzymaktivitätslevel beider Taxa in Kollmar ergibt keine signifikanten Unterschiede zwischen *D. cespitosa* und *D. wibeliana* in den ersten vier Wochen des Experiments. Ein Vergleich mit neugebildeten Blättern von *D. cespitosa* nach Woche 6 zeigt jedoch ein signifikant höheres ADH-Aktivitätsniveau in Blättern von *D. wibeliana* (p < 0,001). Am Standort Krempermoor ließen sich hinsichtlich der Enzymaktivität von ADH zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen beiden Taxa feststellen.

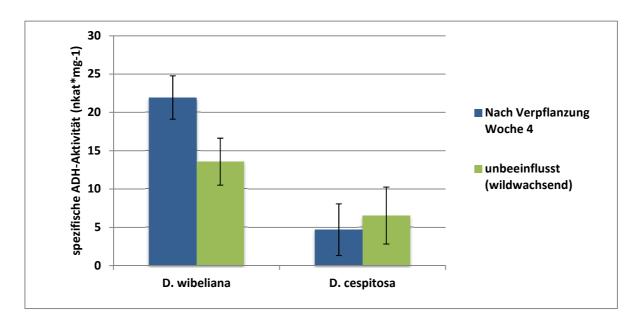
Dieses Experiment macht deutlich, dass *D. cespitosa* und *D. wibeliana*, bezogen auf die ADH-Enzymaktivität, unterschiedlich auf die reziproke Verpflanzung reagierten. Im zeitlichen Verlauf des Experiments nahm die Intensität dieser Divergenz zu. Wie in Abbildung 14 zu erkennen ist, ist in *D. wibeliana* die ADH-Enzymaktivität im Verlauf des Verpflanzungsexperiments in Kollmar angestiegen. Im selben Zeitraum sank die Enzymaktivität von ADH in *D. cespitosa* auf ein Niveau unterhalb des Wertes von Woche 1. Im Krempermoor ist die ADH-Enzymaktivität in Blättern von *D. wibeliana* über den Zeitraum des Experiments gesunken, während in Blättern von *D. cespitosa* keine signifikanten Änderungen im zeitlichen Verlauf gemessen werden konnten.



**Abb. 14: Aufgeschlüsselte Darstellung Ergebnisse der ADH-Enzymassays während sechswöchiger Überflutung im Freiland pro Taxon und Standort.** Gezeigt wird die Entwicklung der ADH-Enzymaktivität separat für beide *Deschampsia* Taxa am Standort Kollmar sowie am Standort Krempermoor. Der Abbildung liegen dieselben Daten zugrunde wie Abb. 13. Werte = Mittelwerte mit Standardabweichungen (SD).

Die Ergebnisse der ADH-Enzymaktivitätsmessungen in Blättern wild wachsender, nicht durch das Experiment beeinflusster Vertreter beider Taxa zeigen, dass es am Standort Kollmar einen geringen, jedoch signifikanten Unterschied in der ADH-Enzymaktivität zwischen ausgepflanzten und unbeeinflussten Pflanzen von *D. wibeliana* gab (p < 0,001). Dennoch war die ADH-Enzymaktivität in wild wachsenden Pflanzen am Standort

Kollmar deutlich höher als in verpflanzten und wild wachsenden Pflanzen von *D. cespitosa* am Standort Krempermoor. Die ADH-Enzymaktivität verpflanzter Individuen von *D. cespitosa* im Krempermoor unterschied sich jedoch nicht signifikant von unbeeinflussten, wild wachsenden Pflanzen an diesem Standort (Abbildung 15).



**Abb. 15: Vergleich der ADH-Enzymaktivität von verpflanzten und nicht-verpflanzten, wild wachsenden Vertretern beider Taxa in ihren natürlichen Habitaten.** In Kollmar wurden die Enzymaktivität von sechs wild wachsenden Pflanzen von *D. wibeliana*, im Krempermoor von sechs wild wachsenden Pflanzen des Taxon *D. cespitosa* analysiert. Werte = Mittelwerte mit Standardabweichungen (SD).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass *D. cespitosa* und *D. wibeliana* auf physiologischer Ebene unterschiedlich auf die Verpflanzung in das jeweils fremde Habitat des Schwestertaxons reagiert haben. Ein deutlicher Hinweis wurde erhalten, dass sich tidebedingt wiederkehrende Überflutung im Vergleich beider *Deschampsia*-Taxa unterschiedlich auf die Aktivität der Alkoholdehydrogenase ausgewirkt hat.

Um Proteine und Stoffwechselwege zu identifizieren, die infolge reziproker Verpflanzung im Freiland differenziell zwischen beiden *Deschampsia*-Taxa beeinflusst wurden, sollte im folgenden Versuch ein differenzielles Proteinscreening durchgeführt werden.

# 3.2.3 Identifizierung adaptationsrelevanter Proteine in *Deschampsia* cespitosa und *D. wibeliana* nach sechswöchiger reziproker Verpflanzung im Freiland durch 2D-DIGE

In diesem Versuch wurde eine vergleichende Analyse der Proteomantworten von *Deschampsia cespitosa* und *D. wibeliana* nach reziproker Verpflanzung im Freiland (2.9.2) durchgeführt. Durch eine 2-dimensionale DIGE-Analyse (*Differences In Gel Electrophoresis*) sollten adaptationsrelevante Proteine identifiziert werden, die mit der ökophysiologischen Differenzierung der beiden Taxa korreliert werden können. Mit Hilfe der erhaltenen Daten sollten darüber hinaus die Ergebnisse zur überflutungsinduzierten Proteinregulation nach periodischer Überflutung in der Klimakammer überprüft werden (3.1.2).

Zu diesem Zweck wurden 2D-DIGE-Analysen von *D. cespitosa* und *D. wibeliana* aus beiden Standorten (2.9.2.1) durchgeführt. Differenziell exprimierte Proteine sollten sowohl am Standort Kollmar als auch am Standort Krempermoor zwischen beiden Taxa identifiziert werden. Darüber hinaus wurde ein Vergleich innerhalb der Taxa vorgenommen, um differenziell exprimierte Proteine zwischen den verpflanzten Rameten zu identifizieren.

Die Probennahmen fanden sechs Wochen nach reziproker Verpflanzung statt. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, um die Analyse mit neugebildeten Blättern durchzuführen, die von Pflanzen des Taxon *D. cespitosa* am Standort Krempermoor ausgebildet worden waren (3.2.2). Grund dafür war, dass ältere, von *D. cespitosa* noch im ursprünglichen Habitat Krempermoor gebildete Blätter, vier Wochen nach Verpflanzung bereits abgestorben waren.

Beim gewählten Versuchsdesign wurde eine Pooling-Strategie gekoppelt mit vier technischen Replikaten durchgeführt. Eine Pooling-Strategie ist im besonderen dann sinnvoll, wenn, wie im vorliegenden Falle, die zu erwartende biologische Variabilität hoch ist und der Fokus der Untersuchung nicht auf individuellen Unterschieden innerhalb der zu vergleichenden Populationen liegt, sondern vielmehr die grundsätzlichen Unterschiede zwischen den Populationen untersucht werden sollen (Karp & Lilley, 2008).

Von jedem Taxon wurde pro Standort ein Pool aus 30 Blättern von 15 Pflanzen entnommen, sodass insgesamt vier gepoolte Proben für die Analyse zur Verfügung standen:

- (1) Deschampsia wibeliana Kollmar
- (2) D. cespitosa Kollmar
- (3) D. wibeliana Krempermoor
- (4) D. cespitosa Krempermoor

Von jeder dieser vier Proben wurden jeweils vier 2D-Gele angefertigt und als technische Replikate analysiert.

Die Markierung von Gesamtprotein (2.4.7.1) mittels Cyanin-Farbstoffen (*CyDyes*) erfolgte mit 8 pmol Cyanin-Farbstoff pro  $\mu$ g Gesamtprotein. Für die DIGE-Analyse wurden 300  $\mu$ g Gesamtprotein pro Probe eingesetzt. Jede Probe wurde in vier Replikate mit jeweils 50  $\mu$ g Gesamtprotein aufgeteilt. Um in der Auswertung der DIGE-Gele die Detektion artifizieller Ereignisse zu verhindern, die auf spezifischen Färbeeigenschaften oder Variabilität der Färbeeffizienz von Cy5 und Cy3 beruhen, wurde die CyDye-Markierung der Replikate nach einem Randomisierungsschema vorgenommen. Hierzu wurden pro Probe jeweils zwei Replikate mit Cy5 und zwei Replikate mit Cy3 markiert und, wie in Abbildung 16 dargestellt, kombiniert. Ein interner Standard wurde durch Vereinigung der verbleibenden 100  $\mu$ g aller Proben erstellt und mit Cy2 markiert. 50  $\mu$ g des internen Standards wurden anschließend mit 50  $\mu$ g Cy3- und 50  $\mu$ g Cy5-markiertem Proteinextrakt gemischt und gemeinsam 2-dimensional aufgetrennt.

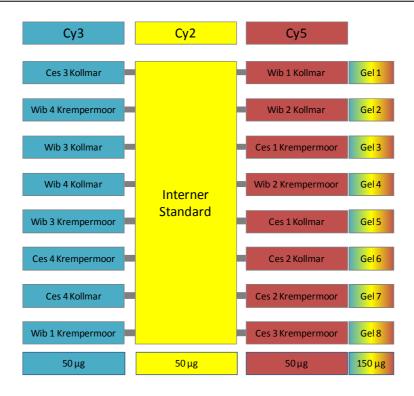


Abb. 16: Schematische Darstellung der Cyanin-Markierung von Gesamtprotein für die DIGE-Analyse von *Deschampsia cespitosa* und *D. wibeliana* nach sechswöchiger reziproker Verpflanzung im Freiland. Erläuterung siehe Text.

Die Auswertung der 2D-Gele erfolgte wie beschrieben (2.4.7.8) mit dem Programm Delta2D Version 4.2 der Firma Decodon (Greifswald, Germany). Die vier Replikatgele wurden entsprechend der jeweiligen Probenzugehörigkeit in vier Gruppen unterteilt: (1) *Deschampsia wibeliana* Kollmar; (2) *D. cespitosa* Kollmar; (3) *D. wibeliana* Krempermoor; (4) *D. cespitosa* Krempermoor. Das *Warping* der Gele, die Erstellung des *Fusion images* sowie die Spotdetektion erfolgten wie beschrieben (2.4.7.8). Der korrekte Transfer der Messbereiche aller detektierten Spots auf alle Gele des Projektes wurde mittels der Software-eigenen *Spot image regions*-Funktion überprüft.

Die Detektion differenziell exprimierter Proteine erfolgte zwischen

- (A) Deschampsia wibeliana Kollmar versus D. wibeliana Krempermoor
- (B) D. cespitosa Kollmar versus D. cespitosa Krempermoor
- (C) D. wibeliana Krempermoor versus D. cespitosa Krempermoor
- (D) D. wibeliana Kollmar versus D. cespitosa Kollmar

anhand folgender Kriterien:

Da aufgrund der Analyse gepoolter Proben eine parametrische Statistik durchgeführt werden konnte (Bedon et~al., 2012), wurden mittels eines t-Tests zunächst Proteine identifiziert, deren Mittelwerte im Vergleich zwischen den Gruppen signifikante Unterschiede zeigten. Die Analyse wurde mit allen Permutationen und einer false~discovery~rate~(FDR), die den Anteil falschpositiver Ergebnisse auf 10 begrenzt, über Log2 transformierte Daten durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde  $\alpha$ = 5 % gewählt. Alle Expressionsänderungen, die einen p-Wert < 0,05 aufwiesen, wurden damit als signifikant eingestuft.

Zur Identifizierung von Spots, die eine Interaktion zwischen Standort und Taxa zeigten, wurde außerdem eine zweifaktorielle ANOVA (analysis of variance) mit folgenden Parametern durchgeführt: Analyse über Log2-transformierte Daten; 1000 Permutationen; p < 0,05; Standardkorrektur falschpositiver Ereignisse.

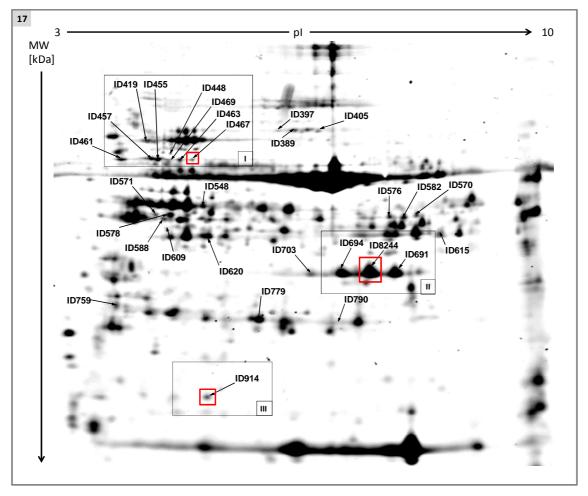
Aus der mittels t-Test und *two-way* ANOVA erhaltenen Gruppe von Proteinen wurden anschließend diejenigen Proteinspots gefiltert, deren Expressionsänderung im Mittelwertvergleich mindestens -1,5 bzw. + 1,5 betrug (ANOVA -1,4 bzw. + 1,4).

Mittels dieser 2D-DIGE-Analyse konnten insgesamt ca. 300 Proteine (Summe aller Spots auf allen Gelen des Experiments) detektiert werden. 41 Proteine wurden entsprechend den oben genannten Kriterien als differenziell exprimiert eingestuft. 29 davon konnten durch *Nano Electrospray Tandem Mass Spectrometry* identifiziert werden (2.6.3). In Gruppe A (*Deschampsia wibeliana* Kollmar *versus D. wibeliana* Krempermoor) wurden 19 differenziell exprimierte Spots gefunden. In Gruppe B (*D. cespitosa* Kollmar *versus D. cespitosa* Krempermoor) und Gruppe C (*D. wibeliana* Krempermoor *versus D. cespitosa* Krempermoor) konnten 9 Proteine identifiziert werden. Gruppe D (*D. wibeliana* Kollmar *versus D. cespitosa* Kollmar) wurden 21 differenziell exprimierte gefunden. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der Protein-Spot-Detektion zwischen den vier Gruppen (A-D) zusammenfassend dargestellt. Abbildung 17 zeigt ein ausgewähltes 2D-DIGE-Bild, auf dem die identifizierten Protein-Spots dargestellt sind. In Abbildung 18 werden ausgewählte Proteine im Detail gezeigt.

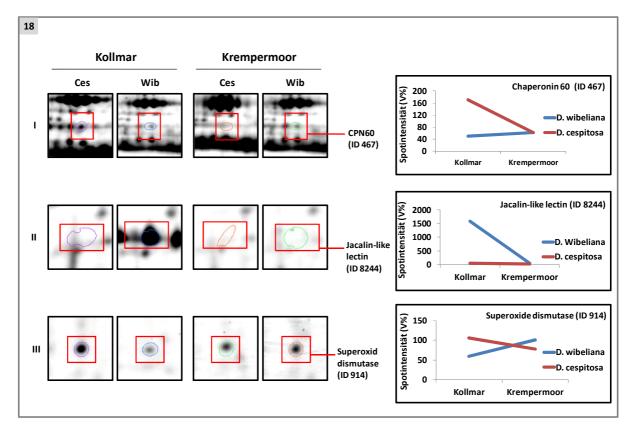
Tabelle 4. Anzahl und Verteilung mittels 2D-DIGE detektierter Protein-Spots nach sechswöchiger Verpflanzung im Freiland

Gruppe	Protein- Spots / Gruppe	Via MS-MS identifizierte Protein-Spots	Differenziell exprimierte Protein- Spots	Detektierte Protein-Spots insgesamt	
A	19				
В	9	29	41	Ca. 300	
C	9	29	71		
D	21				

Gezeigt wird die Anzahl der mittels t-Test und *expression fold change* detektierten Protein-Spots zwischen den vier Gruppen A-D. Da einige Protein-Spots in mehreren Gruppen identifiziert worden sind, entspricht die Summe der in den Gruppen angegebenen Anzahlen nicht der Anzahl via MS-MS identifizierter Protein-Spots.



**Abb. 17: Repräsentatives 2D-Gelbild der DIGE-Analyse zur Identifizierung überflutungsinduzierter Proteine zwischen** *Deschampsia cespitosa* **und** *D. wibeliana*. Gezeigt ist eines von 16 Gelen der DIGE-Analyse (*D. wibeliana* Kollmar), auf dem alle identifizierten Protein-Spots des DIGE-Screenings markiert sind (Nummern = Spot-IDs). Regionen, die interessante Protein-Spots enthalten, sind umrandet und mit I-III nummeriert und werden in Abb. 18 detailliert dargestellt.



**Abb. 18: Detailansicht der in Abb. 17 umrandeten Proteine.** Die dargestellten Proteine wurden aufgrund ihres Expressionsprofils bzw. ihrer biologischen Funktion ausgewählt (Erläuterung siehe Text). Pro Taxon und Standort ist der Ausschnitt je eines von vier Replikat-Gelen gezeigt. Farbige Umrandungen um die Spots: Messbereiche von Delta2D. Die graphische Darstellung rechts zeigt die mittels Delta2D erhaltenen Mittelwerte der Spotintensitäten (V%) aus je vier Replikaten für die vier Vergleichsgruppen (siehe Text). Ces= *Deschampsia cespitosa*, *Wib = Deschampsia wibeliana*.

### 3.2.3.1 Identifizierung von Proteinen mittels *Nano Electrospray Tandem Mass Spectrometry* (MS-MS)

Für die Isolierung der mittels 2D-DIGE detektierten Proteinspots wurde ein Proteingemisch bestehend aus ca. 400 µg Gesamtprotein aller für das DIGE-Screening verwendeter Proben zweidimensional aufgetrennt (2.4.6) und mittels kolloidalem Coomassie gefärbt (2.4.7.6). Das resultierende 2D-Gel (*Mastergel*) wurde gescannt, in Delta2D v 4.2 (Decodon, Greifswald, Germany) eingelesen und mittels der Softwareeigenen *Warping*-Funktion über das in Abbildung 16 gezeigte 2D-Gelbild gelegt. 29 der 41 detektierten Protein-Spots konnten so im Coomassiegel identifiziert werden und wurden für die massenspektrometrische Analyse aus dem *Mastergel* ausgeschnitten.

Die Massenspektrometrische Analyse der isolierten Protein-Spots wurde von PD Dr. Friedrich Buck (Abteilung Massenspektrometrie, UKE Hamburg) mittels *Nano Electrospray Tandem Mass Spectrometry* durchgeführt (2.6.3). Die Identifizierung der Proteine erfolgte durch eine Datenbankanalyse, die mit Hilfe des Programms Mascot (www.matrixscience.com) gegen die freiverfügbaren Datenbanken von NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) und Swiss-Prot (www.uniprot.org) wurde. Proteine, die in diesen Datenbanken nicht identifiziert werden konnten, wurden mittels des Programms Protein Lynx Global Server V2.5.2 auf Grundlage der *Deschampsia*-Transkriptomdaten identifiziert. Detailierte Informationen zu den identifizierten Proteinen sind in Anhang 2 aufgeführt.

Die nach 2D-DIGE-Screening und *Nano Electrospray Tandem Mass Spectrometry* (MS-MS) identifizierten Proteine wurden entsprechend ihres Expressionsprofils in fünf Gruppen eingeteilt.

In Kollmar nach sechs Wochen tidebedingter Überflutung:

- (I) in *D. cespitosa* reguliert
- (II) in *D. wibeliana* reguliert
- (III) in beiden Deschampsia-Taxa reguliert
- (IV) in beiden *Deschampsia*-Taxa gegensätzlich reguliert
- (V) unterschiedliche Expressionslevel, jedoch nicht reguliert

In Tabelle 5 sind die nach massenspektrometrischer Analyse identifizierten Proteine aufgeführt. Für jedes gefundene Protein ist die *expression fold change* der jeweiligen Mittelwertvergleiche sowie die biologische Funktion angegeben.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die Expressionsänderungen der Proteine relativ zum Krempermoor am Standort Kollmar bzw. relativ zu *D. cespitosa* in *D. wibeliana* dargestellt.

Tabelle 5: Mittels 2D-DIGE und *Nano Electrospray Tandem Mass Spectrometry* identifizierte Proteine nach sechswöchiger reziproker Verpflanzung von *Deschampsia cespitosa* und *D. wibeliana* im Freiland

			Expression fold change			
			Ces	Wib	Kre	Kol
Spot- ID	Protein-Name	Putative biologische Funktion	Kol/Kre	Kol/Kre	Wib/Ces	Wib/ces
	espitosa ↑↓/ D. wibeliana =					
588	Glutamine synthetase	Stickstoffmetabolismus; Photorespiration	<u>1,5</u>	1,4	-1,2	-1,3
448	Phosphoglyceromutase	Glycolyse	<u>1,6</u>	1,0	1,1	-1,4
582	Fructose-bisphosphate aldolase	Glycolyse	<u>1,6</u>	1,3	-1,0	-1,3
461	CPN-60 alpha	Proteinfaltung/Proteinstabilisierung	<u>1,5</u>	-1,1	-1,1	-1,7
455	Chaperonin 60 subunit beta 1	Proteinfaltung/Proteinstabilisierung	<u>1,6</u>	-1,2	1,0	-1,8
457	Chaperonin 60 subunit beta 1	Proteinfaltung/Proteinstabilisierung	<u>1,7</u>	-1,0	-1,2	-2,0
469	Chaperonin 60 subunit beta 1	Proteinfaltung/Proteinstabilisierung	<u>2,2</u>	-1,2	1,2	-2,2
467	Chaperonin 60 subunit beta 1	Proteinfaltung/Proteinstabilisierung	<u>2,7</u>	-1,2	-1,0	-3,4
609	Quinone-Oxidoreductase	Detoxifikation von Quinonen	<u>1,7</u>	-1,1	-2,8	-5,4
548	Phosphoglycerate kinase	Glycolyse	<u>-1,7</u>	-1,2	-1,1	1,3
	GAPDH	Glycolyse				
578	RuBisCO activase A/ B	Photosynthese	<u>-1,6</u>	-1,4	1,3	1,5
571	RuBisCO activase A	Photosynthese	<u>-1,9</u>	-1,5	1,3	1,7
(II) D.	 wibeliana ↑↓ / D. cespitosa =					
419	HSC70	Proteinfaltung /Proteinstabilisierung	1,1	<u>-2,5</u>	<u>1,8</u>	-1,4
703	Mannose/glucose-specific Jacalin-like	e Stickstoffspeicherung; Biotische/abiotische 1,7 58,6		-1,1	31,8	
694	Mannose/glucose-specific Jacalin-like	Stickstoffspeicherung; Biotische/abiotische Stressantwort  1,6  31,2		1,3	23,8	

Legende folgt!

**Tabelle 5: (fortgesetzt)** 

			Expression fold change			
Spot			Ces	Wib	Kre	Kol
ID	Protein-Name	Putative biologische Funktion	Kol/Kre	Kol/Kre	Wib/Ces	Wib/ces
(III) D.	wibeliana ↑ / D. cespitosa ↑					
691	Mannose/glucose-specific Jacalin-like	Stickstoffspeicherung; Biotische/abiotische Stressantwort	2,0	<u>13,3</u>	1,1	7,5
8244	Mannose/glucose-specific Jacalin-like	Stickstoffspeicherung; Biotische/abiotische Stressantwort	2,3	<u>29,2</u>	2,1	27,3
(IV) <i>D.</i>	wibeliana / D. cespitosa ↑↓					
463	Chaperonin 60 subunit beta 1	Proteinfaltung/Proteinstabilisierung	2,2*	-1,5*	1,2	-2,7*
389	Methionine synthase	Methioninbiosynthese	1,5*	-1,5*	1,1	-2,0*
405	Methionine synthase	Methioninbiosynthese	1,4*	-1,4*	1,0	-1,9*
914	Superoxide dismutase [Cu-Zn] 2	ROS-Abwehr	1,4*	-1,7*	1,3	-1,8*
(V) D.	wibeliana ≠ D. cespitosa, nicht reguliert					
620	Fructose-bisphosphate aldolase	Glycolyse	-1,1	-1,4	-1,2	<u>-1,5</u>
397	Methionine synthase	Methioninbiosynthese	1,2	-1,3	-1,1	<u>-1,7</u>
779	Oxygen-evolving enhancer protein 2	Photosynthese	-1,1	-1,4	<u>1,7</u>	1,3
759	2-Cys peroxiredoxin BAS1	Abwehr von Oxidantien in Chloroplasten	-1,3	-1,2	<u>1,8</u>	<u>1,8</u>
	20 kDa chaperonin	Proteinfaltung/Proteinstabilisierung				
790	PR-1 like protein	Pathogenabwehr	1,1	-1,2	<u>-1,7</u>	<u>-2,2</u>
	Oxygen-evolving enhancer protein 2	Photosynthese				
576	Glycerate dehydrogenase	Photorespiration	1,0	1,3	<u>-1,6</u>	-1,3
570	Glycerate dehydrogenase	Photorespiration	-1,1	-1,2	<u>-1,5</u>	<u>-1,6</u>
615	NAD dependent epimerase/dehydratase	Kohlenhydratmetabolismus	-1,4	-1,3	<u>-1,5</u>	-1,5
	GAPDH	Glycolyse				

Die mittels *Nano Electrospray Tandem Mass Spectrometry* identifizierten Proteine sind hinsichtlich ihres Expressionsprofils in vier Gruppen unterteilt. Für jedes Protein wird gezeigt: Spot-ID (korrespondierend zu Protein-Spot auf 2D-Geldbild, (Abb. 17), Proteinname, putative biologische Funktion, Quotient der Mittelwerte (*Expression fold change*) der vier Gruppenvergleiche. Grenzwerte der Expression fold change: < -1,5 oder > 1,5.

Fett gedruckt: Signifikant entsprechend Quotient des Mittelwerts = Quotient seiner Einzelwerte (Erklärung siehe Text). Fett markiert und unterstrichen: Signifikant entsprechend t-Test, p < 0,05. Interaktiv-signifikante Proteine (multifaktorielle ANOVA, p < 0,05; Expression fold change < -1,4 oder >1,4) sind mit einem Stern versehen. Hochregulierte Proteine sind rot, herunterregulierte grün markiert.

#### Gruppe I: Proteine, die ausschließlich in D. cespitosa reguliert waren

In der größten der vier gebildeten Cluster, Gruppe I, können zwölf Proteine zusammengefasst werden, die nach sechswöchiger tidebedingter Überflutung ausschließlich zwischen den verpflanzten Rameten von *Deschampsia cespitosa* reguliert waren. Neun der zwölf Proteine waren hochreguliert, drei Proteine herunterreguliert. Im Vergleich der Expressionslevel zwischen den Taxa in Kollmar ist auffällig, dass die in *D. cespitosa* hochregulierten Proteine das Expressionslevel von *D. wibeliana* überstiegen, sieben Proteine zeigten signifikante Unterschiede zwischen den Expressionsniveaus.

Von den neun hochregulierten Proteinen wurden fünf als Chaperonine identifiziert (Spot-IDs 461, CPN60-alpha; 455, 457, 469, 467, Chaperonin 60 subunit beta 1). CPN60-Proteine spielen aufgrund ihrer Fähigkeit zur Proteinfaltung und -stabilisierung eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase unter abiotischem Stress (Wang *et al.*, 2004). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass CPN60 an dem Transport von Proteinen in die Chloroplasten beteiligt ist (Jackson-Constan *et al.*, 2001) und als Teil verschiedener Stressantworten reguliert wird (Timperio *et al.*, 2008; Salvucci, 2007).

Bei dem sechsten Protein handelte es sich um eine Quinon-Oxidoreduktase (Spot-ID 609), die bei der Detoxifikation von Quinonen involviert ist.

Ein weiteres in *D. cespitosa* induziertes Protein konnte dem Stickstoffmetabolismus (Glutaminsynthetase, Spot-ID 588) zugeordnet werden. Die Glutaminsynthetase ist ein zentrales Enzym des Stickstoffmetabolismus und an der Reassimilation von NH<sub>3</sub> / NH<sub>4</sub>+<sup>2</sup> beteiligt, das bei der Photorespiration sowie beim Abbau von Proteinen entsteht (Miflin & Habash, 2002).

Drei in *D. cespitosa* regulierte Proteine konnten der Glykolyse zugeordnet werden, von denen zwei Proteine induziert (Spot-IDs 448, Phosphoglyceromutase; 582, Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase) und ein Protein reprimiert vorlag (Spot-ID 548, Phosphoglyceratkinase). In Proteinspot 548 wurde ein zweites Peptid identifiziert, das der Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase B (GAPDH B) zugeordnet werden konnte und ebenfalls in der Glykolyse involviert ist.

-

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Das Equilibrium von NH<sub>3</sub> / NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ist abhängig vom pH-Wert.

Zwei weitere ausschließlich in *D. cespitosa* reprimierte Proteine konnten als RuBisCO-Aktivase A und B (Rca A und B, Spot-IDs 578 und 571) identifiziert und mit der Photosynthese assoziiert werden. RuBisCO-Aktivase ist ein katalytisches Chaperon, das für die Aktivierung der RuBisCO verantwortlich ist (Portis, 1992) und dem die Rolle eines Schlüsselenzyms bei der Regulation der Photosynthese zukommt. Das Protein lag in zwei Isoformen vor (A & B). In den meisten Pflanzen sind beide Isoformen an der Aktivierung von RuBisCO beteiligt (Carmo-Silva & Salvucci, 2013). In einigen Arten jedoch besitzt ausschließlich die größere Isoform A eine Aktivasefunktion (Zhang & Portis, 1999). Während in Protein-Spot 571 nur ein Peptid für RcaA gefunden wurde, konnte in Protein-Spot 578 noch ein zweites Peptid für Isoform RcaB identifiziert werden. CPN60 kann bei Hitzestress an Rca binden und das Protein so vor Denaturierung schützen (Salvucci *et al.*, 2007).

#### Gruppe II: Proteine, die ausschließlich in D. wibeliana reguliert waren

In Gruppe II konnten drei Proteine identifiziert werden, die am Standort Kollmar, verglichen zu den jeweiligen Rameten im Krempermoor, in *D. wibeliana* reguliert waren. Von den drei identifizierten Proteinen wurde ein Protein hochreguliert und zwei Proteine herunterreguliert.

Bei dem in *D. wibeliana* reprimierten Protein (Spot-ID 419) handelt es sich um ein Hitzeschock-Protein (Hsp70). Hsp70 ist neben der Stabilisierung und Faltung von Proteinen auch in der Signaltransduktion unterschiedlicher Stressantworten sowie beim Transport von Proteinen in die Chloroplasten involviert (Mayer & Bukau, 2005; Jackson-Constan *et al.*, 2001).

Bei den zwei in D. wibeliana induzierten Proteinen handelte es sich um Isoformen eines Mannose/Glucose-spezifischen Jacalin-ähnlichen Lektins, das in der Literatur als Stickstoffspeicherprotein oder als Teil einer Signalkaskade infolge von biotischem und abiotischem Stress beschrieben wird (zusammengefasst von van Damme et al., 2008). Das Lektin wurde bereits in Pflanzen von *D. wibeliana* nach drei Wochen periodischer Überflutung in der Klimakammer identifiziert (3.1.2.4).Unter Klimakammerbedingungen lag das Protein in überfluteten Pflanzen von D. wibeliana um das etwa 50-fache stärker exprimiert vor als in nicht-überfluteten Pflanzen von D. wibeliana. Interessanterweise zeigte das Lektin im freilandbasierten

Verpflanzung im Freiland lag das Lektin als vier hoch abundante Proteinspots in überfluteten Pflanzen von *D. wibeliana* am Standort Kollmar vor. In nicht-überfluteten Pflanzen von *D. wibeliana* war das Protein hingegen kaum nachweisbar. In überfluteten Pflanzen von *D. cespitosa* in Kollmar Pflanzen wurden lediglich zwei Isoformen exprimiert (Spot-ID 691, 8244 Gruppe III). Am Standort Krempermoor befanden sich die Proteinlevel des Lektins in beiden Taxa mit Ausnahme der Isoform (Spot-ID 8244) auf dem gleichen Niveau (Abbildung 18).

### Gruppe III: Proteine, die tidebedingt in beiden *Deschampsia-*Taxa reguliert wurden

Nur ein Protein, das als zwei Isoformen vorlag, wurde in beiden Taxa induziert. Wie im vorangegangen Abschnitt erwähnt, wurden in Gruppe III zwei Isoformen des Mannose/Glucose-spezifischen Jacalin-ähnlichen Lektins identifiziert (Spot-IDs 691, 8244).

## Gruppe IV: Proteine, die gegensätzlich zwischen den Taxa exprimiert wurden (interaktionssignifikant)

Mittels einer multifaktoriellen ANOVA wurde für 24 der identifizierten Proteine eine signifikante Interaktion für die Faktoren Verpflanzung und Taxon gezeigt. Dies bedeutet, dass ein Großteil der identifizierten Proteine aufgrund der reziproken Verpflanzung gegensätzlich in beiden Deschampsia-Taxa exprimiert worden ist. Die gezeigten Interaktionen waren jedoch in nahezu allen Fällen sehr schwach, die relativen Expressions-Ratios bewegten sich im Bereich 1,1- bis 1,4-fach positiver oder negativer Expressionsänderung. Dennoch ist dieses Ergebnis höchst interessant, denn es zeigt, dass beide Deschampsia-Taxa einen Großteil der mittels DIGE detektierbaren Proteine an den jeweils fremden Standorten gegensätzlich zu dem jeweils heimischen Taxon regulierten. Die vier am stärksten exprimierten Proteine (Expressionsänderung  $\geq$  1,4 bzw.  $\leq$  -1,4) sind in Gruppe IV zusammengefasst und als besonders interessant eingestuft, da sie einen Hinweis auf die physiologische Toleranz im eigenen und jeweils fremden Habitat liefern können. Diese Informationen wiederum können helfen, die Frage nach den physiologischen Ursachen der ökologischen Differenzierung beider Deschampsia-Taxa zu beantworten. Bei den vier interaktionsrelevanten Proteinen

handelte es sich um ein Chaperonin 60 B (Spot-ID 463) sowie um zwei Isoformen der Methionin-Synthase (Spot-ID 389, 405). Methionin ist in der Synthese und Regeneration von S-Adenosylmethionin essentiell, einer Vorstufe von Ethylen (Hesse *et al.*, 2004). Ethylen ist ein Schlüsselhormon bei der sensorischen Erfassung von Hypoxie und spielt eine Rolle in unterschiedlichen Adaptationsmechanismen von Pflanzen an Überflutungsstress (zusammengefasst in: Bailey-Serres *et al.*, 2012). Darüber hinaus spielen Methioninreste an Proteinen aufgrund ihrer Eigenschaft zur Oxidation reaktiver Sauerstoffspezies eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Funktionalität von Proteinen (Levine *et al.*, 1999).

Bei dem vierten Protein dieser Gruppe (Spot-ID 419) handelte es sich um eine Kupfer-Zink-Superoxiddismutase (SOD). Superoxiddismutasen spielen eine große Rolle bei der Detoxifikation von radikalen Sauerstoffspezies (ROS) (Alscher *et al.*, 2002). In Reaktion auf diverse biotische und abiotische Stressfaktoren kann die ROS-Konzentration in verschiedenen Organellen stark zunehmen (Alscher *et al.*, 2002). SODs sind somit Teil von Stressantworten auf verschiedene biotische und abiotische Stressoren (Bowler *et al.*, 1992) und werden z. B. bei Überflutungs- und Trockenstress reguliert (Monk *et al.*, 1987; Burke *et al.*, 1984; Blokhina *et al.*, 2003). In Bezug auf Überflutungsstress können SODs sowohl exprimiert als auch reprimiert werden. Erhöhte SOD-Aktivitäten finden sich vor allem nach Überflutung aufgrund des vermehrten Auftretens von ROS bei Wiedereintritt von Sauerstoff in hypoxisches Gewebe (Blokhina *et al.*, 2003; Monk *et al.*, 1987). In langzeitüberfluteten Maispflanzen wurde hingegen eine abnehmende SOD-Aktivität festgestellt (Yan *et al.*, 1996). Alle vier interaktionssignifikanten Proteine wurden am Standort Kollmar nach sechswöchiger tidebedingter Überflutung hochreguliert, in *D. wibeliana* jedoch im Vergleich zum Krempermoor reprimiert.

### Gruppe V: Proteine, die an beiden Standorten unterschiedliche Expressionslevel zeigten, aber nicht zwischen den Rameten reguliert waren

Das zweitgrößte Cluster bildet Gruppe V. Acht Proteine, deren Expressionslevel sich signifikant im Vergleich zwischen den Taxa an beiden Standorten unterschieden, jedoch keine Expressionsänderung zwischen den verpflanzten Rameten eines Taxons zeigten, sind dieser Gruppe zugeordnet. Sechs der acht Protein-Spots zeigten differenzielle Expressionslevel zwischen den Taxa am Standort Kollmar. Sechs Proteine waren unterschiedlich zwischen Taxa im Krempermoor exprimiert und drei Proteine zeigten differenzielle Expressionslevel an beiden Standorten.

Von den fünf Protein-Spots, deren Expressionslevel am Standort Kollmar in *D. wibeliana* signifikant niedriger waren als in *D. cespitosa*, wurde eines als Methioninsynthase identifiziert (Spot-IDs 397) und konnte dem Methioninbiosyntheseweg zugeordnet werden.

Ein zweites Protein wurde als Fructose-1,6-bisphosphataldolase (Aldolase) identifiziert. Die Aldolase ist ein Enzym der Glykolyse. Die Glykolyse ist bei hypoxiebedingter Einschränkung oder Ausfall der aeroben Energiegewinnung hauptsächlich für die ATP-Versorgung der Zelle verantwortlich (Rocha *et al.*, 2010).

Bei einem weiteren Protein des Kohlenhydratmetabolismus, das in *D. wibeliana* im Vergleich zu *D. cespitosa* ein geringeres Proteinniveau zeigte, wurde eine NADabhängige Epimerase/Dehydratase identifiziert. In dem Protein-Spot wurde außerdem ein Peptid des Enzyms Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) gefunden, das in der Glykolyse involviert ist und dort stromabwärts von der Fructose-1,6-bisphosphataldolase wirkt.

Zwei weitere Proteine wurden als Glyceratdehydrogenasen (GDH, Spot-IDs 570, 578) identifiziert. Das Protein ist in die Photorespiration involviert. Bei einem Protein, das verglichen zu *D. cespitosa* in *D. wibeliana* an beiden Standorten ein geringeres Proteinniveau zeigte, handelte es sich um ein PR-1-ähnliches Protein (Spot-ID 790). PR-1 ist ein Fungizid, das eine Rolle bei Pathogenabwehr von Pilzen spielt (Niderman *et al.*, 1995; Metzler *et al.*, 1991). Ein zweites Peptid konnte einem Oxygen-evolving-enhancer-Protein zugeordnet werden.

Von den zwei Proteinen, die verglichen zu *D. cespitosa* in *D. wibeliana* höhere Expressionslevel zeigten, handelte es sich bei einem um eine Peroxidase (2-Cys peroxiredoxin BAS1, Spot-ID 759), bzw. um ein Chaperonin 20, dem ein zweites Peptid, das in dem Protein-Spot identifiziert wurde, zugeordnet werden konnte (siehe Anhang 2). Beide Proteine können mit der Abwehr von oxidativem Stress in Verbindung gebracht werden. BAS1 ist ein Protein, das als Peroxidase in die ROS-Abwehr in Chloroplasten involviert ist. Unter der HSP20-Familie werden häufig Chaperone im Größenbereich von 15-22 kDa (sHSPs) subsumiert. Mitglieder dieser Familie weisen die bereits beschriebenen Eigenschaften von Chaperoninen auf (Proteinfaltung und – stabilisierung) und können neben Hitzestress in verschiedenen abiotischen Stressantworten involviert sein, darunter in UV-, oxidativem und osmotischem Stress (Waters *et al.*, 2008). Bei dem zweiten Protein handelte es sich um ein Oxygen-evolvingenhancer-Protein, das eine Rolle im Photosystem II spielt und damit in die Photosynthese involviert ist.

## 3.2.3.2 Zusammenfassung der Ergebnisse der 2D-DIGE-Analyse nach sechswöchiger reziproker Verpflanzung von *Deschampsia cespitosa* und *D. wibeliana* im Freiland

Sechs Wochen nach Verpflanzung konnten mittels 2D-DIGE und *Nano Electrospray Tandem Mass Spectrometry* 29 Proteine identifiziert werden, die eine differenzielle Expression zwischen *D. cespitosa* und *D. wibeliana* zeigten. Die identifizierten Proteine ließen sich nach Literaturrecherche neun putativen biologischen Funktionen zuordnen (Tabelle 6).

Tabelle 6: Einordnung der mittels 2D-DIGE und Nano Electrospray Tandem Mass Spectrometry identifizierten Proteine (Freilandversuch)

	Anzahl differenziell exprimierter Proteine							
Putative biologische Funktion	_	es /Kre	Wib Kol/Kre		re /Ces		ol /Ces	Spot-ID
Schutz vor oxidativem Stress		2	1	1	1	2	1	914, 759, 609
Photorespiration		1	-	:	2		1	570, 588, 576
Aminosäuresynthese		2	2		-	:	3	397, 389, 405
Proteinfaltung / Proteinstabilisierung		6	2		2	6	1	419, 455, 457, 469, 467, 463, 759, 461
Stickstoffspeicherung; Biotische/abiotische Stressantwort		2	4		1	,	4	8244, 691, 703, 694
Glycolyse	2	2	-		1	:	2	615, 448, 582, 620, 548
Photosynthese		2	-	1	1	1	1	790, 571, 578
Pathogenabwehr		-	-		1		1	790
Kohlenhydratmetabolismus		-	-		1		1	615

Die Anzahl der den jeweiligen biologischen Funktionen zugeordneten Proteine ist für jeden Vergleich angegeben. Rot: Anzahl induzierte Proteine, grün: Anzahl reprimierte Proteine.

### Vergleich der Proteinniveaus von *D. cespitosa* und *D. wibeliana* am Standort Kollmar

Das Ergebnis der DIGE-Analyse machte deutlich, dass im Vergleich zu *D. cespitosa* 15 von 29 Proteinen (ca. 52 %) in *D. wibeliana* signifikant niedrigere und 6 von 29 Proteinen (ca. 21 %) höhere Proteinniveaus am Standort Kollmar zeigten. Proteine, die verglichen zu *D. cespitosa* ein niedrigeres Expressionsniveau in *D. wibeliana* zeigten, konnten allen in Tabelle 6 aufgeführten Stoffwechselwegen und biologischen Funktionen zugeordnet werden. Proteine, die im Vergleich zu *D. cespitosa* ein erhöhtes Proteinniveau in *D. wibeliana* zeigten, wurden nur in den biologischen Funktionen Photosynthese, Schutz vor oxidativem Stress sowie Proteinfaltung und -stabilisierung identifiziert.

### Vergleich der Proteinniveaus von *D. cespitosa* und *D. wibeliana* am Standort Krempermoor

Im Krempermoor zeigten verglichen zu *D. cespitosa* nur 5 von 29 identifizierten Proteinen (ca. 17 %) niedrigere Proteinniveaus in *D. wibeliana*. 4 von 29 Proteinen zeigten ein höheres Proteinniveau in *D. wibeliana* (ca. 14 %). Die reprimierten Proteine fanden sich in den biologischen Funktionen Aminosäuresynthese, Kohlenhydratmetabolismus und Glykolyse, Photosynthese, Schutz vor oxidativem Stress und Pathogenabwehr von Pilzen. Hochregulierte Proteine konnten dem Schutz vor oxidativem Stress sowie der Stickstoffspeicherung/Antwort auf biotischen und abiotischen Stress zugeordnet werden.

Diese Expressionsunterschiede zwischen *D. cespitosa* und *D. wibeliana* beruhten zum einen auf einer differenziellen Regulation der jeweiligen Proteine innerhalb der Taxa (Gruppen I-IV) und zum anderen auf generellen Expressionsunterschieden, die auf Proteinebene zwischen beiden Taxa existieren (Gruppe V).

### Vergleich der regulierten Proteine in D. cespitosa und D. wibeliana

Bezüglich der Regulation der identifizierten Proteine ist auffällig, dass sechs Wochen nach Verpflanzung in *D. cespitosa* am Standort Kollmar 15 der 29 identifizierten Proteine (ca. 52 %) induziert und nur drei Proteine reprimiert (ca. 10 %) wurden. Bei den induzierten Proteinen handelte es sich um Proteine der Aminosäuresynthese, der Glykolyse, der Stickstoffspeicherung/Antwort auf biotischen und abiotischen Stress, der Proteinfaltung und -stabilisierung sowie dem Schutz vor oxidativem Stress. Reprimiert wurden Proteine der Glykolyse und Photosynthese.

Deutlich wird, dass in *D. cespitosa* 10 der 15 induzierten Proteine ein höheres Expressionsniveau zeigten verglichen zu *D. wibeliana*. Diese Proteine konnten Stressreaktionen zugeordnet werden (Proteinfaltung und -stabilisierung, ROS-Abwehr). In *D. wibeliana* lagen alle Stress-assoziierten Proteine sechs Wochen nach Verpflanzung in Kollmar nicht- oder herunterreguliert vor. Proteine der Photosynthese und Glykolyse wurden nicht signifikant reguliert, befanden sich aber auf einem Niveau mit den regulierten Proteinen aus *D. cespitosa*. Bei dem einzigen in *D. wibeliana* induzierten Protein handelte es sich um vier Isoformen eines Jacalin-ähnlichen Lektins

(Gruppe IV & V), das nach sechswöchiger Überflutung in *D. wibeliana* ungefähr um den Faktor 13-59 stärker exprimiert war als in *D. cespitosa*.

Vier der regulierten Proteine wurden darüber hinaus gegensätzlich zwischen den Taxa reguliert. Eine Isoform von Chaperonin 60 sowie zwei Methioninsynthasen und eine Superoxiddismutase lagen infolge einer Reprimierung in *D. wibeliana* und einer Exprimierung in *D. cespitosa* am Standort Kollmar in *D. cespitosa* in ungefähr 2- bis 3-fach höherer Konzentration vor als in *D. wibeliana*. Alle vier gegensätzlich exprimierten Proteine können direkt oder indirekt mit der Bekämpfung von ROS oder der Stabilisierung und Aufrechterhaltung der Funktionalität von Proteinen zugeordnet werden.

Den deutlichsten Unterschied auf Proteinebene zeigte ein Mannose/Glucosespezifischen Jacalin-ähnliches Lektin (Spots 1040, 1015, 4002), das in Form von drei Isoformen vorlag und ausschließlich in *D. wibeliana* am Standort Kollmar exprimiert wurde.

# 3.2.4 Morphologische Untersuchung der Blätter von *Deschampsia* cespitosa und *D. wibeliana* nach sechswöchiger Verpflanzung im Freiland mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Zur Dokumentation möglicher morphologischer Veränderungen an Blättern von *Deschampsia cespitosa* und *D. wibeliana*, die mit der Standortveränderung nach reziproker Verpflanzung im Freiland (2.9.2.2) korreliert werden können, wurden Untersuchungen der Blattoberflächen von Pflanzen beider *Deschampsia-*Taxa mittels Rasterelektronenmikroskopie durchgeführt. Blattmaterial von Pflanzen beider Taxa wurde sechs Wochen nach Verpflanzung an beiden Standorten entnommen und für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung präpariert (2.7) Am Standort Kollmar wurden Blätter von *D. cespitosa* entnommen, die unter dort vorherrschenden Bedingungen neu gebildet worden waren.

In Abbildung 19 sind Ergebnisse der REM-Analyse dargestellt. Von jedem Standort wurden Blätter von drei Pflanzen pro Taxon untersucht.

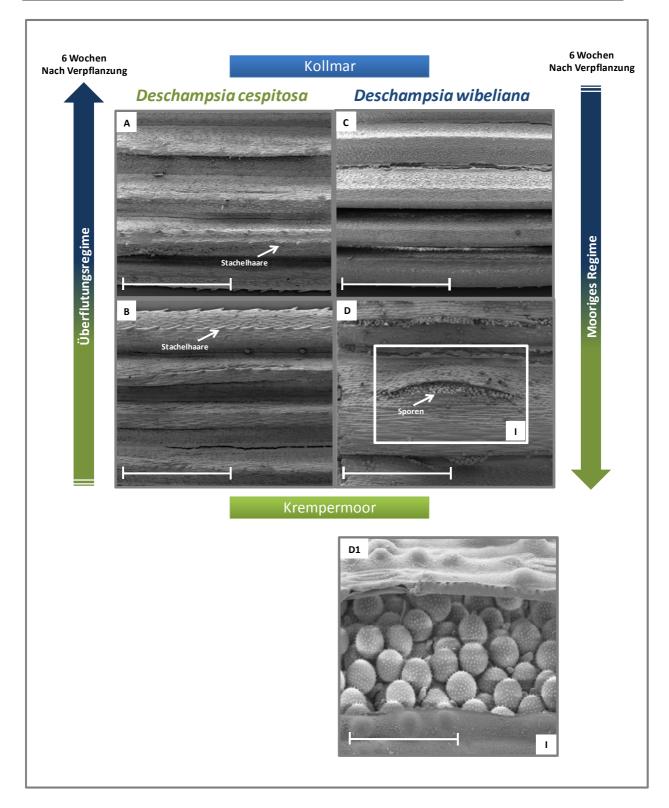


Abb. 19: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der adaxialen Blattoberflächen von *D. cespitosa* und *D. wibeliana* nach sechswöchiger reziproker Verpflanzung im Freiland. A: *D. cespitosa* Kollmar, B. *D. cespitosa* Krempermoor, C: *D. wibeliana* Kollmar, D: *D. wibeliana* Krempermoor. D1: Vergrößerter Ausschnitt eines *D. wibeliana*-Blattes im Krempermoor, in dem Sporen unter der aufgebrochenen Epidermis zu erkennen sind. Der Größenstandard entspricht 1 mm (Abb. A-D) bzw. 50 µm (Abb. D1).

Die Ergebnisse der morphologischen Untersuchungen zeigen, dass nach sechswöchiger Verpflanzung deutliche Unterschiede an den Blättern beider *Deschampsia*-Taxa zu erkennen waren. Auf den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen ist zu erkennen, dass neugebildete Blätter von *D. cespitosa* wesentlich weniger *Stachelhaare* zeigten als Blätter von Pflanzen im Krempermoor. Bei diesen stachelartigen Auswüchsen handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um kurzzellige Auswüchse der Epidermis, die mit Kieselsäure gefüllt sind (Esau, 1969). Dieses Ergebnis stimmte mit der Beobachtung überein, dass die von *D. cespitosa* am Standort Kollmar gebildeten Blätter eine wesentlich weichere Struktur aufwiesen als Blätter, die von *D. cespitosa* bereits am natürlichen Standort gebildet worden waren. Im Krempermoor konnten an Pflanzen von *D. cespitosa* keine vergleichbaren Blätter gefunden werden.

Blätter von *D. wibeliana* waren sechs Wochen nach Verpflanzung am Standort Krempermoor von starkem Pilzbefall gekennzeichnet. Die REM-Aufnahmen (Abbildung 19) zeigten einen massiven Befall mit Pilzsporen, die unter aufgebrochenen Bereichen der Epidermis deutlich erkennbar waren.

Zur quantitativen Erfassung des Befalls wurden im Krempermoor je 15 verpflanzte Individuen beider Taxa hinsichtlich ihres Pilzbefalls untersucht. Es wurden fünf Kategorien gebildet, die den Pilzbefall von wenig befallen (maximal ein Viertel der Blätter mit Pilzinfektion) bis vollständig befallen (alle Blätter zeigen Pilzinfektionen) beschreiben. Die untersuchten Pflanzen wurden entsprechend ihres Befalls den jeweiligen Kategorien zugeordnet (Tabelle 7).

Tabelle 7: Kategorische Einordnung befallener Pflanzen von *D. cespitosa* und *D. wibeliana* im Krempermoor

		Pflanzen von	Pflanzen von
Kategorie	Befall %	D. wibeliana	D. cespitosa
1	0-25	0	1
2	25-50	0	4
3	50-75	0	3
4	75-99	5	7
5	100	10	0

In Abbildung 20 sind die erhaltenen Kategorien-Werte mittels eines Box-Whisker-Plot-Diagramms dargestellt.

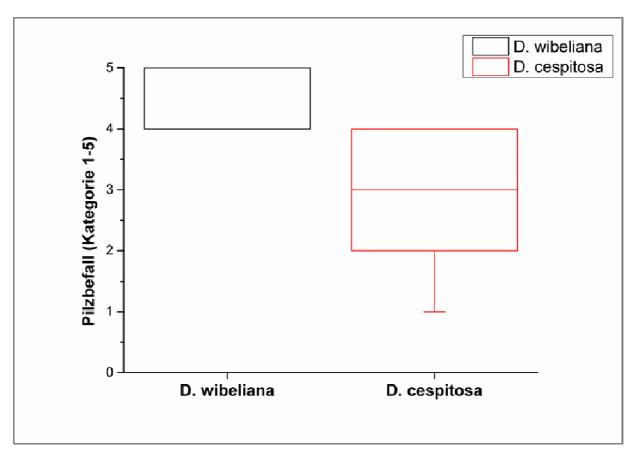


Abb. 20: Box-Whisker-Plot-Diagramm zur Darstellung des Pilzbefalls von *D. cespitosa* und *D. wibeliana* im Krempermoor. Der Wertebereich des kategorischen Pilzbefalls wird anhand der rechteckigen Boxen dargestellt. *D. wibeliana*: Untere Linie der Box (Minimum): niedrigste zugewiesene Kategorie. Obere Linie der Box (Maximum): höchste zugewiesene Kategorie. *D. cespitosa*: Untere Linie der Box: 25 % der Werte. Obere Linie der Box (Maximum): höchste zugewiesene Kategorie. Waagerechter Strich inmitten der Box (*D. cespitosa*): Median. *Whisker* (T-Balken): niedrigste zugewiesene Kategorie (Minimum).

Die Analyse des Pilzbefalls im Krempermoor zeigte deutliche Unterschiede in der Intensität des Pilzbefalls zwischen *D. cespitosa* und *D. wibeliana*. Bei zweidrittel der untersuchten Pflanzen von *D. wibeliana* konnte ein Pilzbefall von 100 % festgestellt werden, eindrittel war zu 75 – 99 % befallen. Bei *D. cespitosa* hingegen waren 7 von 15 Pflanzen zu 75 – 99 % befallen. Über die Hälfte der Pflanzen zeigten einen Befall von 25 - 75 %. Ein Individuum, das in Abbildung 20 durch einen *Whisker* dargestellt ist, war nur zu maximal 25 % befallen.

Mit Hilfe der REM-Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass beide Taxa nach sechs Wochen im jeweils fremden Habitat des Schwester-Taxons phänotypische Veränderungen der Blätter zeigten. Blätter an Pflanzen von *D. cespitosa*, die im heimischen Habitat gebildet worden waren, starben im Verlaufe der ersten drei Wochen nach Verpflanzung in Kollmar ab. Neugebildete Blätter zeigten eine wesentlich weichere Blattstruktur. Durch die REM-Untersuchungen wurde deutlich, dass diese Blätter weniger ausgeprägte Stachelhaare ausgebildet hatten als Blätter der Rameten im Krempermoor. Blätter an Pflanzen von *D. wibeliana* am Standort Krempermoor zeigten keine morphologischen Veränderungen, die mit der Standortveränderung assoziiert werden konnten. Blätter von *D. wibeliana* waren jedoch signifikant stärker von Pilzbefall betroffen als Blätter von *D. cespitosa*. Ein Pilzbefall am Standort Kollmar konnte weder bei *D. cespitosa* noch bei *D. wibeliana* festgestellt werden.

In der folgenden Diskussion sollen die auf physiologischer und morphologischer Ebene erhobenen Daten hinsichtlich ihrer Relevanz für die ökophysiologische Differenzierung der Deschampsia-Taxa D. cespitosa und D. wibeliana diskutiert werden. Dabei werden technische Probleme, die sich bei der molekularbiologischen Arbeit mit Nicht-Modellorganismen ergeben, besprochen. Außerdem erfolgt ein kritischer Vergleich von labor- und freilandbasierten Experimenten für die Beantwortung ökologischer Fragestellungen. Letztlich soll eine Einschätzung der Relevanz der in dieser Arbeit erhobenen physiologischen Daten für die Beantwortung der Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Deschampsia cespitosa und Deschampsia wibeliana im Kontext des bisherigen Forschungsstandes erfolgen.

### 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollten Proteine identifiziert und untersucht werden, die mit der ökologischen Differenzierung von D. cespitosa und D. wibeliana in Verbindung gebracht werden können. Dazu wurde die Überflutungstoleranz beider Deschampsia-Taxa mittels des Hypoxiemarkers Alkoholdehydrogenase (ADH) untersucht. Außerdem wurden durch ein 2-dimensionales Proteinscreening Proteine identifiziert, die nach periodisch wiederkehrender Überflutung in D. cespitosa und D. wibeliana differenziell reguliert waren. Die Untersuchungen wurden sowohl unter kontrollierten Bedingungen im Labor als auch während eines reziproken Verpflanzungsexperiments im Freiland durchgeführt.

### 4.1 Proteomanalysen in Deschampsia

Ein wichtiger Teil dieser Arbeit beinhaltete die Identifizierung überflutungsinduzierter Proteine in *Deschampsia cespitosa und D. wibeliana*. Zu diesem Zweck wurde ein differenzielles Screening auf Proteinebene mit anschließender Proteinidentifizierung durch Massenspektrometrie durchgeführt. Da Proteomanalysen Informationen über die biochemisch verantwortlichen Moleküle der Zelle liefern, ist die Aussagekraft von Proteomdaten, verglichen zu Transkriptomdaten, sehr hoch (Rose *et al.*, 2004). Der Grund dafür ist, dass Transkriptomdaten nur einen Teilaspekt der physiologischen Aktivität der Zelle darstellen. Die Korrelation zwischen mRNA-Level und Proteinabundanz ist häufig unterschiedlich (Gygi *et al.*, 1999; Greenbaum *et al.*, 2003) und Änderungen auf der Transkriptebene müssen nicht zwangsläufig zu Änderungen auf der Proteinebene führen.

### 4.1.1 Proteinextraktion und 2D-DIGE-Analysen von *D. cespitosa* und *D. wibeliana*

Proteinanalysen in Pflanzen stellen eine spezielle Herausforderung dar. Eine rigide Zellwand, die Anwesenheit großer Mengen Zucker, Phenole, hydrolytischer Enzyme, Pigmente und Sekundärmetabolite können die Proteinextraktion extrem erschweren (Weiss & Görg, 2007; Breci & Haynes, 2007). Die Herstellung eines Proteinextraktes, der kompatibel mit 2-dimensionaler Gelelektrophorese ist, stellt jedoch den kritischsten Schritt in jeder Proteomanalyse dar (Rose *et al.*, 2004). Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit Vorversuche zur Optimierung des Proteinextraktes durchgeführt.

In der Literatur findet sich eine Vielzahl von Protokollen, mit deren Hilfe die Extraktion von Proteinen in vielen Organismen deutlich verbessert worden ist (z. B. zu finden in Thiellement *et al.*, 2007). Dennoch muss die Proteinextraktion für jeden Organismus angepasst oder entwickelt werden (Görg *et al.*, 2004). Diese Erfahrungen wurden auch von Cui *et al.* (2009) in Bezug auf die 2D-Analyse von Gesamtprotein aus Blättern der *Poaceae Phragmites communis* (Schilfrohr) gemacht. Gängige Protokolle zur Extraktion mit gepuffertem Phenol einer TCA/Aceton-Extraktion oder detergenzienhaltigen Puffern (Islam *et al.*, 2004; Isaacson *et al.*, 2006; Méchin *et al.*, 2007) führten in Vorversuchen mit *Deschampsia* zu hohen Kontaminationen in den Proben und zu Verunreinigungen der 2-dimensionalen SDS-Gele. Letztendlich erwies sich ein K-Phosphat-Puffer (2.4.1) ohne Detergenzien als optimal geeignet. Der Proteinextrakt konnte sowohl für die Alkoholdehydrogenase-Enzymassays (2.4.8) als auch für 1-dimensionale (2.4.3) und 2-dimensionale SDS-Gelelektrophorese (2.4.5) verwendet werden.

dieser Arbeit wurde mittels 2-dimensionaler Gelelektrophorese lösliches Gesamtprotein aus Blättern von D. cespitosa und D. wibeliana analysiert. Die Untersuchung der löslichen Proteinfraktion ermöglicht einen umfassenden Überblick über das Blattproteom. Ein Problem bei der Analyse von Gesamtprotein besteht jedoch in der hohen Abundanz basaler Zellproteine, die in einem Bereich 10<sup>5</sup> bis 10<sup>6</sup> Kopien in der Zelle vorliegen können. Geringer vorkommende Proteine, z.B. Transkriptionsfaktoren und Rezeptormoleküle, liegen in einer Kopienzahl von < 100 Molekülen pro Zelle vor (Görg et al., 2004; Weiss & Görg, 2007). Auch durch die in dieser Arbeit verwendeten hochsensitiven Cy-Farbstoffe (deren Nachweisgrenze 100–200 pg beträgt) können keine regulatorischen Proteine detektiert werden. Dass im Rahmen

dieser Arbeit keine regulatorischen Proteine detektiert werden konnten, entspricht somit einer technischen Limitierung von 2D-DIGE-Analysen.

## Durch 2D-DIGE-Analysen konnten bis zu 400 Proteine in Deschampsia cespitosa und D. wibeliana detektiert werden

Durch die Anfärbung von Proteinen mit fluoreszierenden Cyaninen können in eukaryotischen Zellen etwa 2000 Proteine routinemäßig detektiert werden (Görg et al., 2004). In Blättern von Deschampsia wurden jedoch nur ca. 400 Protein-Spots (Pflanzen aus der Klimakammer, 3.1.2) bzw. ca. 300 Protein-Spots (Freilandpflanzen, 3.2.3) gefunden. Dies kann mit dem geringen Proteingehalt von grünem Pflanzenmaterial zusammenhängen, der nur etwa 2 % beträgt (im Vergleich zu 20 % bei Säugetieren und Bakterien) (Weiss & Görg, 2007). Auch die starke Anwesenheit der Ribulose-1,5bisphosphat-carboxylase/oxygenase (RuBisCO) in den Blättern von D. cespitosa und D wibeliana könnte eine Ursache für die vergleichsweise geringe Protein-Vielfalt sein. RuBisCO kann bis zu 40 % des Blattproteingehalts ausmachen (Rose et al., 2004). Vor allem in löslichem Gesamtprotein aus Blättern von Freilandpflanzen wurden in dieser Arbeit sehr große Mengen RuBisCO detektiert. Je höher der RuBisCO-Gehalt einer Zelle ist, desto geringer ist die Abundanz aller anderen Proteine in einer definierten Menge löslichen Gesamtextrakts. Hinzu kommt, dass sehr intensive Protein-Spots weniger abundante **Protein-Spots** überlagern können. die ähnliches Proteine. ein Molekulargewicht besitzen wie RuBisCO, können somit leicht im 2D-Gel überlagert werden.

In anderen 2D-DIGE-Studien an Blättern von Süßgräsern (*Poaceae*) konnten ähnliche Ergebnisse beobachtet werden. So wurden in Weizen (*Triticum aestivum*) 219 Protein-Spots identifiziert (Tétard-Jones *et al.*, 2013). Ashoub *et al.* (2013) identifizierten insgesamt 301 Protein-Spots in Gerste (*Hordeum vulgare*). Beide Proteinextraktionen wurden ohne Detergenzien durchgeführt.

Eine höhere Zahl detektierter Proteine fanden hingegen Hlavackova *et al.* (2013) in Blättern von Gerste (*Hordeum vulgare* (L.) cv Luxor) mit 600-700 Proteinen. Cui *et al.* (2009) detektierten ca. 500 Proteine in Schilfrohrblättern (*Phragmites communis*). In diesen Studien erfolgte der Gewebeaufschluss jedoch in Gegenwart von Detergenzien, was eine höhere Proteinausbeute erklären könnte. Aus diesem Grund liegt die

Vermutung nahe, dass die vergleichsweise geringe Zahl detektierter Proteine aus *Deschampsia cespitosa* und *D. wibeliana* mit der Proteinextraktion, die in Abwesenheit von Detergenzien durchgeführt wurde, zusammenhängt. Es ist daher anzunehmen, dass in dieser Arbeit aufgrund der Proteinextraktionsmethode nur ein Teil des löslichen Proteoms untersucht werden konnte.

### 4.1.2 Transkriptomsequenzierung und Proteinidentifizierung durch Massenspektrometrie

Die zuverlässige Identifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie setzt das Vorhandensein von artspezifischen Sequenzdatenbanken voraus. Aus diesem Grund ist der größte Teil der publizierten Proteomanalysen in Modellorganismen durchgeführt worden, für die entsprechend vollständige genomische Daten vorliegen (Champagne & Boutry, 2013).

Bei *Deschampsia cespitosa* und *D. wibeliana* handelt es sich um Wildpflanzen, für die zu Beginn dieser Arbeit keine molekularen Daten vorlagen, anhand derer eine Einschätzung bezüglich der Homologie auf Transkriptebene hätte erfolgen können.

## Proteomanalysen zwischen Nicht-Modellorganismen stellen eine Herausforderung dar

Vergleichende Proteinuntersuchungen mittels 2-dimensionaler Gelelektrophorese zwischen genetisch nicht identischen Organismen sind nicht trivial (Davis *et al.*, 2009; Wright *et al.*, 2010; Whitehill *et al.*, 2011). Auch geringe Unterschiede auf genetischer Ebene können zu Unterschieden im Proteom führen, wenn sie z. B. einen Aminosäureaustausch zur Folge haben. Selbst bei absoluter Identität der Genome können unterschiedlich vorgenommene Modifikationen auf Transkript- und Proteinebene (z. B. Splicevarianten eines Gens, posttranslationale Modifikationen) Unterschiede bezüglich des Molekulargewichtes und / oder des isoelektrischen Punktes bewirken (Davis *et al.*, 2009; Wright *et al.*, 2010). Als Folge davon können homologe Proteine an unterschiedlichen Stellen im 2D-Gel vorkommen oder nicht homologe Proteine zufällig an dieselbe Position im 2D-Gel migrieren (Davis *et al.*, 2009). Diese Faktoren können eine Auswertung des Experimentes stark erschweren (Davis *et al.*, 2009; Leitsch *et al.*, 2006).

Bei einer vergleichenden 2D-Gel-basierten Analyse zwischen Nicht-Modellorganismen kommt die geringe Verfügbarkeit molekularer Daten erschwerend hinzu. Ein Problem bei der Auswertung stellt die Proteinidentifizierung in heterologen Datenbanken dar (Carpentier *et al.*, 2008; Davis *et al.*, 2009; Bindschedler & Cramer, 2011). Eine Analyse in heterologen Datenbanken führt oftmals zu einer geringen Identifizierungsrate und birgt die Gefahr falsch-positiver Identifizierungen (Champagne & Boutry, 2013). Durch die Erstellung Taxa-spezifischer Transkriptomdatenbanken von *D. cespitosa* und *D. wibeliana* sollten diese Probleme verhindert und eine Grundlage für die Identifizierung der detektierten Proteine geschaffen werden.

## Durch die Transkriptomsequenzierung von Deschampsia cespitosa und D. wibeliana konnten über 20.000 identische Transkripte in beiden Deschampsia-Taxa identifiziert werden

In *D. wibeliana* wurden durch eine Transkriptomsequenzierung von Blatt-RNA (2.5) 379.813 und in *D. cespitosa* 223.090 Transkripte mit mehr als 500 bp erhalten. Abzüglich redundanter Transkripte konnten in *D. wibeliana* 35.968 und in *D. cespitosa* 27.769 einzelne Transkripte in der *RefSeq*-Datenbank annotiert werden (Malik Alawi, UKE Hamburg). Die unterschiedliche Anzahl annotierter Transkripte hängt vermutlich mit der unterschiedlichen Gesamtzahl der in *D. cespitosa* und *D. wibeliana* sequenzierten Transkripte zusammen. Als Ursache kommen vermutlich technische Artefakte im Sequenzierungsprozess in Frage, auch wenn ein biologischer Hintergrund nicht ausgeschlossen werden kann.

Li *et al.* (2010) konnten 25.800 Transkripte im Maisblatt identifizieren. Daher kann angenommen werden, dass durch die Transkriptomsequenzierung ein großer Teil des *Deschampsia*-Transkriptoms aus Blättern annotiert werden konnte.

In *Deschampsia cespitosa* und *D. wibeliana* wurden 20.159 identische Transkripte identifiziert. Bei den übrigen Sequenzen kann es sich um differenziell exprimierte Transkripte sowie um Transkripte handeln, deren Nukleotidsequenzen signifikant voneinander abweichen. Auch können sich artifizielle Sequenzen unter den nichtidentischen Transkripten befinden, die aufgrund einer fehlerhaften Sequenzierung oder Assemblierung entstanden sind. Da bei der Erstellung der Transkriptomdatenbanken kein Normalisierungsschritt über PCR stattgefunden hat, wäre ein Vergleich der

Transkripthäufigkeit mit der gemessenen Proteinexpression eines Gens prinzipiell möglich. Jedoch wurden für die Transkriptomsequenzierung nur nicht-überflutete Pflanzen verwendet. Dadurch fehlen Transkriptomdaten zu überflutungsinduzierten Unterschieden.

In Vergleichen zwischen zwei Sinorhizobium meliloti-Stämmen konnte gezeigt werden, dass die Vergleichbarkeit zweier Proteinpopulationen mit der Ähnlichkeit der DNA zunimmt. Eine hohe Ähnlichkeit auf DNA-Ebene führte zu einer sehr hohen Vergleichbarkeit der 2D-Gele (Mathesius et al., 2002). Die Ergebnisse der Transkriptomsequenzierung aus D. cespitosa und D. wibeliana ließen daher erwarten, dass die Zahl proteomischer Variationen, die auf unterschiedlichen Gensequenzen beruhen, gering sein würde. Darüber hinaus wurde erwartet, dass die durch Massenspektrometrie analysierten Proteine mit großer Wahrscheinlichkeit in beiden Deschampsia-Datenbanken identifiziert werden können. Modifikationen auf Transkript-Proteinebene, die unterschiedliche Positionen homologer 2-dimensionalen SDS-Gel zur Folge haben können, sind durch die vergleichende Analyse von Nukleotidsequenzen jedoch nicht zu erfassen. Um sicherzustellen, dass es sich bei den quantifizierten Protein-Spots um homologe Proteine handelte, wurden einzelne Proteine aus 2D-DIGE-Gelen beider Deschampsia-Taxa präpariert und durch Massenspektrometrie analysiert.

## Die Verwendung Taxa-spezifischer Transkriptomdatenbanken konnte die Identifizierung von Proteinen in Deschampsia deutlich erhöhen

Proteine beider Taxa konnten in den Transkriptomdatenbanken identifiziert werden. Signifikante Unterschiede auf Proteinebene zwischen den beiden *Deschampsia-*Taxa wurden nicht festgestellt. Durch die Verwendung Taxa-spezifischer Datenbanken konnte auch Proteine identifiziert werden, deren signifikante Identifizierung in keiner der verfügbaren Online-Datenbanken gelang. Dies betraf vor allem kleine Proteine, aus denen nach tryptischem Verdau nur wenige Peptide entstehen. Ein Beispiel für einen solchen Fall ist ein Jacalin-ähnliches Lektin (Abb. 11b, Spot-ID 4002; Abb. 18, Spot-ID 8244). Der tryptische Verdau dieses Proteins, das eine Gesamtlänge von 306 aa aufweist, generierte reproduzierbar Peptide aus schwach konservierten Bereichen (Anhang 2). Bei einer Datenbanksuche mit den entsprechenden Peptiden wurden auch in nah

verwandten *Poaceae* keine signifikanten Treffer erzielt. Weitere Peptide, die in konservierteren Bereichen liegen, wurden nicht erhalten. Die Identifizierung des Jacalinähnlichen Lektins wäre ohne die angefertigten Transkriptomdatenbanken nur mit großem Aufwand, z. B. durch Verdau mit alternativen Proteasen oder durch Edmann-Abbau, möglich. In Übereinstimmung mit der Literatur (Lücker *et* al., 2009; Lopez-Casado *et al.*, 2012) kann aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit die Verwendung Taxaspezifischer Transkriptdatenbanken bei der massenspektrometrischen Identifizierung von Proteinen in Nicht-Modellorganismen empfohlen werden.

## 4.2 Untersuchungen zur Überflutungstoleranz von *D. cespitosa* und *D. wibeliana* unter kontrollierten Bedingungen in der Klimakammer

Mit Hilfe des Hypoxiemarkers Alkoholdehydrogenase (ADH) sollte die Überflutungstoleranz von *D. cespitosa und D. wibeliana* untersucht werden. Außerdem sollten Proteine, die überflutungsbedingt zwischen beiden Taxa differenziell exprimiert waren, durch ein 2-dimensionales Proteinscreening identifiziert werden.

Zu diesem Zweck wurden Pflanzen beider *Deschampsia*-Taxa mit Hilfe eines Überflutungssystems unter kontrollierten Bedingungen im Labor überflutet. In Anlehnung an die Überflutungsbedingungen, wie sie für die Habitate von *D. wibeliana* beschrieben sind (Weihe & Reese, 1968), wurde eine tideähnliche Überflutung simuliert. Die Pflanzen wurden zweimal am Tag im Abstand von 7 h für 5 h überflutet ("periodische Überflutung"). Im Gegensatz zu vielen Arbeiten, in denen die Enzymaktivität, Protein-Abundanz oder Genexpression von ADH infolge langfristiger Überflutung untersucht worden ist (z. B. Keeley, 1979; Sachs *et al.*, 1996; Benz *et al.*, 2007), wurde in dieser Arbeit der Einfluss kurzer, aber periodisch wiederkehrender Überflutung untersucht. In der Literatur findet sich nur eine Arbeit, der ein vergleichbarer Versuchsaufbau zugrunde liegt (Wetson *et al.*, 2012).

Dreiwöchige periodische Überflutung unter kontrollierten Bedingungen in der Klimakammer induzierte die Proteinabundanz und Enzymaktivität der Alkoholdehydrogenase in D. cespitosa und D. wibeliana

Während einmaliger, fünfstündiger Überflutung konnte in Pflanzen beider Taxa zunächst eine transiente Expression von *Adh1* mittels *Northern-Blot*-Experimenten nachgewiesen werden (3.1.1.2.2). Ein ähnliches Expressionsmuster wurde in mehreren Studien zur *Adh1*-Genexpression unter anoxischen oder hypoxischen Bedingungen erhalten (Rowland & Strommer, 1986; Drew, 1990; Paul & Ferl, 1991; Andrews *et al.*, 1993; Benz *et al.*, 2007).

Eine signifikante Erhöhung der Proteinabundanz und Enzymaktivität von ADH konnte gegenüber nicht-überfluteten Pflanzen in diesem Versuch jedoch in keiner der beiden *Deschampsia*-Taxa nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis entspricht den Beobachtungen von Fennoy *et al.* (1998), die unter Sauerstoffmangel in Wurzeln von Mais nachweisen konnten, dass nur eine geringe Korrelation zwischen mRNA-Akkumulation und Proteinmenge von ADH besteht. In einer Untersuchung zur ADH-Expression unter Sauerstoffmangel in Maiswurzeln konnten Sachs *et al.* (1980) zeigen, dass ADH1 erst nach fünfstündiger Anoxie nachweisbar ist. Die Induktion von *Adh1* in Blättern beider *Deschampsia*-Taxa könnte daher als eine "Schockreaktion" auf einsetzenden Sauerstoffmangel verstanden werden, der aufgrund rascher Rückkehr zur Normoxie keine Proteinsynthese folgte.

Nach dreiwöchiger periodischer Überflutung wurden im Vergleich zwischen überfluteten und nicht-überfluteten Blättern beider Taxa keine Unterschiede in der Transkriptmenge von *Adh1* festgestellt. Auch eine Induktion von *Adh1* schien nach dreiwöchiger periodischer Überflutung nicht mehr stattzufinden, denn die Transkriptmengen waren nicht beeinflusst davon, ob die Blätter von *D. cespitosa* und *D. wibeliana* unter Normoxie oder Hypoxie entnommen wurden. Auch konnte keine Korrelation zwischen Transkriptlevel und Proteinabundanz festgestellt werden (Abbildung 8). Die Proteinmenge von ADH in Blättern überfluteter Pflanzen beider Taxa war gegenüber Blättern nicht-überfluteter Pflanzen jedoch signifikant erhöht, und zwar unabhängig davon, ob die analysierten Blattproben unter Wasser oder an der Luft entnommen worden waren. Ein Vergleich zwischen den nicht-überfluteten Pflanzen

beider Taxa deutete darauf hin, dass die ADH-Proteinmenge in beiden Taxa zu Zeitpunkt A (12:00 Uhr) wesentlich höher war als zu Zeitpunkt C (16:00 Uhr). Dieses Ergebnis könnte auf eine circadiane Regulation von ADH hinweisen. Da die Proteinmenge in nicht-überfluteten Pflanzen jedoch zwischen den experimentellen Wiederholungen stark schwankte (Daten nicht gezeigt), ist eine Interpretation der Ergebnisse schwierig.

Ein Vergleich der Transkript- und Proteinmengen von ADH weist darauf hin, dass die ADH-Proteinsynthese in Blättern von *D. cespitosa* und *D. wibeliana* zeitlich versetzt zur Genexpression von *Adh1* eingesetzt hat. Tatsächlich konnten Fennoy & Bailey-Serres (1995) sowie Fennoy *et al.* (1998) in Wurzeln von Mais zeigen, dass die ADH-Proteinsynthese (auch) posttranskriptional durch die bevorzugte Translation von *Adh1*-mRNAs gesteuert wird, wodurch eine zeitliche Verschiebung zwischen Transkription und Translation von ADH auftreten kann. Dieser Regulationsmechanismus könnte auch das konstante *Adh1*-Expressionsniveau nach drei Wochen periodischer Überflutung erklären. Die unter normoxischen Bedingungen vorliegende mRNA-Menge wäre somit ausreichend, um die benötigte Menge ADH bei Überflutung zu synthetisieren.

Bezüglich der Proteinmengen und Enzymaktivität von ADH ließen sich unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen keine Unterschiede in Blättern überfluteter Pflanzen feststellen. Jedoch ist darauf hinzuweisen, dass mit dem in dieser Arbeit durchgeführten Enzymaktivitätstest die maximale Aktivitätsrate von ADH unter Optimalbedingungen bestimmt worden ist. Die gemessenen ADH-Aktivitätswerte müssen somit als maximale Kapazität zur fermentativen Energiegewinnung verstanden werden (Burdick & Mendelssohn, 1990). Da nach Rückgang der Überflutung aufgrund zunehmender Verfügbarkeit von Sauerstoff eine Umstellung von der fermentativen auf die oxidative Energiegewinnung stattfindet, ist es unwahrscheinlich, dass die in vitro gemessene ADH-Aktivität der Aktivität unter normoxischen Bedingungen in vivo entsprochen hat. Die Daten zeigen jedoch, dass die theoretische Kapazität zur Fermentation unter normoxischen Bedingungen nicht inhibiert wurde. Ein Vergleich zwischen den Taxa brachte keine Hinweise auf signifikante Unterschiede bezüglich der überflutungsbedingten Genexpression, Proteinmenge und Enzymaktivität von ADH. Allerdings konnte nach dreiwöchiger periodischer Überflutung im Vergleich zu D. cespitosa eine tendenziell höhere ADH-Enzymaktivität in Blättern von D. wibeliana festgestellt werden (Abbildung 8).

Da gezeigt wurde, dass ein einmaliges Überflutungsereignis keine Erhöhung der Proteinmenge und Enzymaktivität von ADH zur Folge hatte, stellt sich die Frage nach der Ursache für die ADH-Synthese, da zwischen den Überflutungsphasen mit großer Sicherheit kein zellulärer Sauerstoffmangel akut war. Eine mögliche Erklärung für die Zunahme der Proteinabundanz und Enzymaktivität von ADH in Folge periodischer Überflutung ist die Akkumulation der ADH-Proteinmenge. Meguro *et al.* (2006) konnten zeigen, dass die Proteinmenge von ADH in Maiskeimlingen erst 48 h nach Überflutung zurückging. Bei einer normoxischen Phase von mehr als 7 h würde die ADH-Abundanz somit vor Erreichen des nächsten Überflutungsereignisses nicht zurückgehen und bei stetiger Translation im Laufe der Zeit möglicherweise zunehmen.

# Dreiwöchige periodische Überflutung unter kontrollierten Bedingungen in der Klimakammer induzierte die Regulation verschiedener stressrelevanter Proteine in D. cespitosa und D. wibeliana

Durch das 2-dimensionale Proteinscreening konnten nach dreiwöchiger periodischer Überflutung in der Klimakammer 12 regulierte Proteine in *D. cespitosa* und 19 regulierte Proteine in *D. wibeliana* identifiziert werden. In beiden Taxa waren nahezu alle diese Proteine hochreguliert. Somit konnte gezeigt werden, dass durch periodische Überflutung neben der ADH auch andere Proteine in *D. cespitosa* und *D. wibeliana* induziert wurden. Diese identifizierten Proteine konnten neun unterschiedlichen Stoffwechselwegen und biologischen Funktionen zugeordnet werden, von denen vor allem die Proteine der Glykolyse unmittelbar mit der Reaktion auf Sauerstoffmangel assoziiert werden konnten (Sachs *et al.*, 1996; Tabelle 2). Außerdem wurden in beiden *Deschampsia*-Taxa Proteine der Proteinstabilisierung (CPN60) und ROS-Abwehr identifiziert. Die beiden ROS-detoxifizierenden Proteine FQR1 (Flavoxoxin-like quinone reductase) und Peroxidase 1 spielen eine Rolle bei der enzymatischen Spaltung von Wasserstoffperoxid unter hypoxischem (FQR1) oder oxidativem Stress (Peroxidase 1) bei Reoxygenierung (Amor *et al.*, 2000; Laskowski *et al.*, 2002).

Interessant ist, dass es sich bei dem in beiden Taxa am häufigsten identifizierten Protein um ein 60 kDa Chaperonin (CPN60) handelt. CPN60 spielt eine Rolle bei der Stabilisierung von Proteinen und nimmt dadurch eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase unter abiotischem Stress ein (Wang *et al.*, 2004).

CPN60 wird infolge unterschiedlicher abiotischer Stressfaktoren induziert (Salvucci, 2007; Timperio *et al.*, 2008). In der Literatur konnte jedoch kein Hinweis auf eine überflutungsbedingte Induktion von CPN60 gefunden werden. Allerdings wurde in anderen proteomischen Studien eine Induktion von CPN60 infolge von Trockenstress festgestellt (Burke *et al.*, 1985; Xu *et al.*, 2006; Cui *et al.*, 2009; Huerta-Ocampo *et al.*, 2009; Oliver *et al.*, 2011; Falvo *et al.*, 2012). Diese Hinweise können als ein Indiz für Trockenstress in Blättern periodisch überfluteter Pflanzen von *D. cespitosa* und *D wibeliana* aufgefasst werden.

Eine mögliche Ursache für das Auftreten von Trockenstress in überfluteten Blättern von *D. cespitosa* und *D. wibeliana* findet sich im Wurzelraum der überfluteten Pflanzen. Denn wiederkehrende Überflutung bewirkt eine ständige Bodenfeuchte. Ein damit einhergehender Sauerstoffmangel kann zu einer Ansäuerung des Cytosols in Wurzelzellen führen. Dies kann eine reduzierte Aquaporinpermeabilität zur Folge haben und die Wasseraufnahme durch die Wurzel inhibieren (Tournaire-Roux *et al.*, 2003; Chaumont *et al.*, 2005) was letztlich zu Trockenstress in Blättern überfluteter Pflanzen führt (Insausti *et al.*, 2001; Fukao *et al.*, 2011).

Die Rückkehr zur Normoxie bei ablaufendem Wasser stellt ebenfalls einen Stressfaktor für die Pflanzen dar. Denn gerade in Phasen des Wiedereintritts von Sauerstoff in hypoxisches (oder anoxisches) Gewebe kommt es zur vermehrten Produktion von Sauerstoffradikalen und damit zu oxidativem Stress (Monk *et al.*, 1987; Bowler *et al.*, 1992; Pfister-Sieber & Brändle, 1994; Biemelt *et al.*, 1998; Blokhina *et al.*, 2003). Da oxidativer Stress infolge von Reoxygenierung 2-16 h nach Ablauf des Wassers andauern kann (Biemelt *et al.*, 1998), stehen den Pflanzen möglicherweise nur sehr kurze regenerative Phasen zur Verfügung.

#### Periodische Überflutung ist ein multipler Stressfaktor

Während eines Überflutungsereignisses treten drei Phasen auf: Hypoxie, Anoxie und oxidativer Stress bei Reoxygenierung (Blokhina *et al.*, 2003). Während periodischer Überflutung folgen hypoxischer und oxidativer Stress nach Reoxygenierung in kurzen Abständen aufeinander. Zusätzlich kann es zu Trockenstress kommen, der durch Anoxie im Wurzelraum ausgelöst wird. Es kann daher vermutet werden, dass periodische Überflutung einen multiplen Stressfaktor darstellt. Die Ergebnisse der ADH-Enzymmessungen und des Proteinscreenings bestätigen diese Vermutung. In beiden Taxa konnten Hinweise für physiologische Toleranzmechanismen in Bezug auf verschiedene Stressfaktoren identifiziert werden, die während periodischer Überflutung auftreten können. Eindeutige Hinweise auf eine erhöhte Überflutungstoleranz von *Deschampsia wibeliana*, die Rückschlüsse auf die physiologischen Ursachen der ökologischen Differenzierung erlauben, wurden unter kontrollierten Bedingungen im Labor jedoch nicht erhalten.

## 4.3 Untersuchungen zur Überflutungstoleranz von *D. cespitosa* und *D. wibeliana* im Freiland

Um die Überflutungstoleranz von D. cespitosa und D. wibeliana unter natürlichen Bedingungen zu untersuchen, wurde ein reziprokes Verpflanzungsexperiment im Freiland durchgeführt (2.9.2). Dafür wurden Pflanzen beider Taxa an ihren natürlichen Lebensräumen entnommen (D. wibeliana: Kollmar; D. cespitosa: Krempermoor; 2.9.2.1). Die Pflanzen wurden jeweils in zwei genetisch identische Rameten geteilt und sowohl im ursprünglichen Habitat als auch im Habitat des Schwestertaxons ausgepflanzt. Über einen Zeitraum von sechs Wochen wurden wöchentlich Messungen der ADHdurchgeführt. Wochen nach Verpflanzung Enzymaktivität Sechs wurden Proteomanalysen zwischen den verpflanzten Rameten durchgeführt und es wurde nach Proteinen gesucht, die mit der Anpassung von D. cespitosa und D. wibeliana an ihre Lebensräume korreliert werden können.

## Deschampsia wibeliana besitzt im Gegensatz zu D. cespitosa eine erhöhte Kapazität zur fermentativen ATP-Produktion im tidebedingt überfluteten Lebensraum

Die Ergebnisse der ADH-Aktivitätsmessungen im Freiland machen deutlich, dass *Deschampsia cespitosa* und *D. wibeliana* bezüglich der ADH-Aktivität unterschiedliche Reaktionen auf die reziproke Verpflanzung zeigten. Nachdem die Pflanzen beider Taxa eine Woche im Freien ohne Überflutung akklimatisiert worden waren, stieg die ADH-Aktivität in Blättern beider Taxa in Kollmar im Laufe der ersten drei Wochen nach Verpflanzung an. Während die ADH-Aktivität im weiteren Verlaufe des Experimentes in Blättern von *D. wibeliana* am Standort Kollmar jedoch zunahm, ging sie in *D. cespitosa* in Kollmar zurück. Im Krempermoor hingegen nahm die ADH-Aktivität in Blättern von *D. wibeliana* weiter ab, während sie in Blättern von *D. cespitosa* unverändert blieb (3.2.2, Abbildung 13 und 14).

Um den Effekt der Rametenherstellung und des Umtopfens auszuschließen, wurde die Messung der ADH-Aktivität in Blättern von wild wachsenden *D. wibeliana*-Pflanzen gemessen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass auch wild wachsende Pflanzen von *D. wibeliana* in ihrem Lebensraum über eine erhöhte Kapazität zur fermentativen Energiegewinnung verfügen. Diese fermentative Kapazität ist offensichtlich nicht konstitutiv erhöht, da sie bei ausbleibender Überflutung im Krempermoor deutlich abnahm. Daher kann angenommen werden, dass eine erhöhte Kapazität zur Fermentation in *D. wibeliana* eine Anpassung an ihren überfluteten Lebensraum darstellt.

In überfluteten Pflanzen von *D. cespitosa* hingegen ist die Enzymaktivität von ADH nur in den Blättern gestiegen, die bereits im ursprünglichen Lebensraum Krempermoor gebildet worden waren. Diese Blätter waren nach vier Wochen tidebedingter Überflutung in Kollmar abgestorben. In neugebildeten Blättern wurde eine deutlich geringere ADH-Aktivität gemessen als in den ursprünglichen Blättern. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Pflanzen von *D. cespitosa* über eine geringere Kapazität zur Fermentation unter tidebedingter Überflutung im Freiland verfügen als Pflanzen von *D. wibeliana*. Jedoch konnte unter kontrollierten Bedingungen im Labor gezeigt werden, dass Pflanzen von *D. cespitosa* eine ähnliche Kapazität zur anaeroben Energiegewinnung besitzen (3.1.1). Denkbar wäre, dass die neu gebildeten Blätter aufgrund ihrer Morphologie besser in der Lage sind, Sauerstoff aus dem Wasser aufzunehmen und

daher die aerobe ATP-Produktion länger aufrechterhalten können. Dies würde eine Hemmung der Fermentation und damit eine geringere ADH-Aktivität zur Folge haben.

In mehreren Studien zur Überflutungstoleranz von Pflanzen konnte gezeigt werden, dass die ADH-Aktivität mit der Überflutungstoleranz in Verbindung steht (Schwartz, 1969; Johnson et al., 1994; Ismond et al., 2003; Xu et al., 2006). Wignarajah & Greenway (1976) kamen zu dem Ergebnis, dass überflutungstolerante Arten im Vergleich zu überflutungsintoleranten Arten eine erhöhte ADH-Aktivität in Wurzeln aufweisen. Allerdings finden sich auch Gegenbeispiele, in denen eine erhöhte ADH-Aktivität nicht mit gesteigerter Überflutungstoleranz in Verbindung gebracht werden konnte (Roberts et al., 1989) oder Pflanzen trotz gesteigerter ADH-Aktivität eine hohe Intoleranz gegenüber Überflutung zeigten. Die Autoren schlossen daraus, dass eine erhöhte ADH-Aktivität ein Indikator für überflutungsbedingten Stress ist, da eine erhöhte Fermentation mit einer potentiellen Vergiftung durch das Endprodukt der Fermentation, Ethanol, einhergeht. Eine erhöhte ADH-Aktivität sei daher ein Indikator für Überflutungsintoleranz (zusammengefasst von Keeley, 1979). Dass auch wild wachsende Pflanzen von D. wibeliana im Vergleich zu nicht-überfluteten Individuen beider Taxa eine höhere ADH-Enzymaktivität aufwiesen, lässt jedoch den Schluss zu, Kapazität zur Fermentation dass der erhöhten Anpassungsmechanismus handelt. Möglicherweise ist die Pflanze durch eine erhöhte Enzymaktivität von ADH in der Lage, unter Sauerstoffmangel zusätzliches ATP zu synthetisieren. Bei starkem Tidehub, in denen Pflanzen von D. wibeliana bis zu 160 cm über einen Zeitraum von ca. 7 h überflutet sind (3.2.1), könnte eine erhöhte fermentative Kapazität von großer Bedeutung für die Energieversorgung der Zellen sein. Die Umstellung von der aeroben auf die fermentative ATP-Versorgung ist ein Teil der sogenannten quiescence-Strategie, die für überflutungstolerante Arten beschrieben wird (Bailey-Serres & Voesenek, 2008; Bailey-Serres et al., 2012).

## Reziproke Verpflanzung induzierte eine gegensätzliche Expression von stressrelevanten Proteinen in D. cespitosa und D. wibeliana

Die differenzielle Proteomanalyse nach reziproker Verpflanzung zeigte, dass 24 von 29 identifizierten Proteinen gegensätzlich zwischen den Taxa reguliert waren (4 dieser 24 Proteine waren signifikant reguliert, (siehe Tabelle 5). Dieses Ergebnis bestätigt die

Resultate der ADH-Aktivitätsmessungen und zeigt, dass sich *D. cespitosa* und *D. wibeliana* bei Verpflanzung in den Lebensraum des Schwestertaxons bezüglich der Proteinregulation gegensätzlich zueinander verhalten.

Durch das differenzielle Proteinscreening wurden Proteine identifiziert, die sich acht verschiedenen biologischen Prozessen zuordnen ließen. Wie auch bei den Proteomanalysen in der Klimakammer wurden darunter Proteine der Glykolyse und Photosynthese gefunden. Proteine der Glykolyse wurden von beiden Taxa sowohl induziert als auch reprimiert. In *D. cespitosa* wurden zwei RuBisCO-Aktivasen in Kollmar herunterreguliert, was auf eine Herunterregulation der Photosynthese unter Überflutungsbedingungen hinweisen könnte. Darüber hinaus wurden darunter Proteine identifiziert, die infolge verschiedener abiotischer Stressoren reguliert werden. Hierbei handelte es sich um Proteine der ROS-Abwehr und Proteinstabilisierung. Chaperonin 60 (CPN60) und die Methioninsynthase wurden bereits im Proteinscreening nach Überflutung in der Klimakammer identifiziert (3.1.2). Nach sechswöchiger tidebedingter Überflutung im Freiland wurden zusätzlich eine Superoxiddismutase (SOD), ein Hitzeschockprotein 70 (HSC70) sowie eine Quinonreduktase gefunden. Diese Proteine wurden von beiden Taxa im jeweils fremden Habitat induziert und erreichten dort im Vergleich zum Schwestertaxon ein vergleichbares oder höheres Expressionsniveau.

#### D. cespitosa und D. wibeliana könnten aufgrund einer cross-tolerance gegenüber multiplen abiotischen Stressfaktoren im Habitat des Schwestertaxons überleben

Die Induktion von SOD, CPN60, HSP70 und der Methioninsynthase könnte in beiden Taxa Teil einer *cross-tolerance* darstellen. Besonders die Superoxiddismutase ist ein Enzym, das die Anpassung an verschiedene Stressoren ermöglicht (Bowler *et al.*, 1992; Monk *et al.*, 1989). Zum einen wird vermutet, dass periodische Überflutung ein multipler Stressfaktor ist, in dem neben Hypoxie auch oxidativer Stress und Trockenstress auftreten können. Im Krempermoor können Pflanzen von *D. wibeliana* hingegen mit Trockenstress, Hitzestress und Staunässe konfrontiert werden. Da die Produktion von ROS und die Gefahr der Proteindenaturierung bei Trockenstress, Hitzestress sowie hypoxischem und oxidativem Stress zunimmt (Scandalios, 1993; Yan *et al.*, 1996; Blokhina *et al.*, 2003; Fukao & Bailey-Serres, 2004; Timperio *et al.*, 2008; Pucciariello *et al.*, 2012; Vassileva *et al.*, 2012) könnte die Toleranz gegen einen dieser Faktoren die Toleranz gegen andere abiotische Stressfaktoren begünstigen. Somit wären sowohl *D. cespitosa* als auch *D. wibeliana* aufgrund der Toleranz gegen abiotischen Stress im eigenen Lebensraum in der Lage, abiotische Stressfaktoren im fremden Lebensraum zu tolerieren.

## Stellt die hohe Expression eines Jacalin-ähnlichen Lektins in D. wibeliana eine Anpassung an Überflutung dar?

In Blättern von *D. wibeliana* am Standort Kollmar wurde ein stark exprimiertes Jacalinähnliches Lektin identifiziert. Das Lektin ist das am stärksten differenziell exprimierte Protein, das in der 2D-DIGE-Analyse gefunden wurde und daher besonders interessant. Mit Ausnahme des Lektins zeigten die durch 2D-DIGE identifizierten Proteine eine 1,5-bis 2,8-fache positive oder negative Expressionsänderung. Gegenüber überfluteten Pflanzen von *D. cespitosa* war die Expression des Lektins hingegen um etwa den Faktor 32 erhöht. Bei ausbleibender Überflutung im Krempermoor nahm die Expression des Lektins in *D. wibeliana* stark ab, sodass sechs Wochen nach Beginn des Experiments keine Unterschiede im Proteinniveau von *D. cespitosa* und *D. wibeliana* festgestellt werden konnten.

Jacaline können aufgrund verschiedener biotischer und abiotischer Stressfaktoren sowie durch Methyljasmonat induziert werden (Chen *et al.*, 2002; van Damme *et al.*, 2004; Grunwald *et al.*, 2007; Lannoo *et al.*, 2007; Babosha, 2008; Bertini *et al.*, 2009). Induzierbare Lektine liegen in sehr geringer Konzentration vor oder sind vor Induktion nicht nachweisbar. Liegen Lektine hoch abundant vor, wird ihnen die Funktion von Speicherproteinen zugeschrieben, die eine zusätzliche Funktion in der Pathogenabwehr besitzen können (van Damme *et al.*, 1998; van Damme *et al.*, 2008). Aufgrund der hohen Abundanz des Jacalin-ähnlichen Lektins in *D. wibeliana* ist es der Argumentation von van Damme *et al.* (2008) folgend wahrscheinlich, dass es sich nicht um ein Protein einer Signalkaskade sondern um ein Speicherprotein handelt. Grundsätzlich wird davon ausgegangen, dass Pflanzen große Mengen des Lektins in Speicherorganen akkumulieren. Der so gespeicherte Stickstoff kann bei Bedarf mobilisiert und dem Stoffwechsel zur Verfügung gestellt werden (van Damme *et al.*, 2008).

In überfluteten Habitaten kann die Stickstoffverfügbarkeit im Boden gering sein und einen Stickstoffmangel in der Pflanze zur Folge haben (Ponnamperuma, 1972). Überflutungsbedingter Stickstoffmangel wiederum kann zu Blattchlorose und Blattseneszenz führen (Drew, 1990). Insofern wäre es denkbar, dass Stickstoffspeicher in Blättern eine erhöhte Toleranz in stickstoffarmen Gebieten vermitteln kann. Der Stickstoffgehalt des Elbwassers schwankt saisonal (www.fgg-elbe.de). Ein Stickstoffspeicher könnte beispielsweise in Phasen hohen Stickstoffeintrags durch das Elbwasser angelegt und in Zeiten geringer Stickstoffverfügbarkeit für den Stoffwechsel bereitgestellt werden. Entsprechende Hinweise sind in der Literatur jedoch nicht zu finden.

Sollte es sich trotz der hohen Abundanz um ein Stressprotein handeln, könnte es sich um einen Toleranzmechanismus gegenüber Trocken- oder Salzstress am Standort Kollmar handeln. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass für keine der beiden Möglichkeiten Daten vorliegen. Die genaue Funktion des Jacalin-ähnlichen Lektins in beiden *Deschampsia* Taxa konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden.

Die Abnahme der Proteinmenge bei ausbleibender Überflutung in *D. wibeliana* deutet jedoch darauf hin, dass eine Korrelation zu den Umweltbedingungen in Kollmar besteht. Kontrollexperimente zeigten, dass das Lektin auch in wild wachsenden Pflanzen von *D. wibeliana* stark exprimiert ist (Daten nicht gezeigt). Eine artifizielle Expression in den

Pflanzen des Freilandexperiments ist somit unwahrscheinlich. Ein signifikanter Anstieg des Proteins ist bei Überflutung auch in *D. cespitosa* nachweisbar. Wie beschrieben war das Niveau des Jacalins jedoch auch nach Induktion deutlich niedriger als in *D. wibeliana*. Dies könnte auf eine wesentlich höhere Kapazität zur Ausprägung eines Anpassungsmechanismus in *D. wibeliana* hinweisen, der möglicherweise in beiden *Deschampsia*-Taxa existiert.

#### Reziproke Verpflanzung im Freiland induzierte morphologische Veränderungen der Blätter von D. cespitosa

Vier Wochen nach Auspflanzung waren die Blätter von *D. cespitosa*, die noch im Krempermoor gebildet worden waren, abgestorben. Neue Blätter, die von *D. cespitosa* unter den Bedingungen in Kollmar gebildet worden waren, zeigten eine veränderte Morphologie. Die neuen Blätter waren wesentlich dünner und glatter als die ursprünglichen Blätter. Morphologisch ähnlich auffallende Blätter konnten an Pflanzen im Krempermoor nicht gefunden werden. Eine rasterelektronenmikroskopische Untersuchung zeigte, dass die neugebildeten Blätter im geringeren Maße die charakteristischen Stachelhaare zeigten, die für die rauen Blattoberflächen von *Deschampsia cespitosa* verantwortlich sind. In diesem Punkt ähnelten sie den Blättern von *D. wibeliana*, die ebenfalls sehr glatte Blattoberflächen besitzen. Jedoch waren sie wesentlich dünner und schmaler als Blätter von *D. wibeliana* und konnten gut von diesen unterschieden werden.

Blattseneszenz infolge von Überflutung ist ein bekanntes Symptom (Yan *et al.*, 1996) und kann auf erhöhte Proteolyse, Chlorophyllabbau, Membranpermeabilität und Peroxidation zurückgeführt werden (Trippi & Thimann, 1983). Phänotypische Plastizität, die zur Ausbildung morphologisch angepasster Blätter in Überflutungsgebieten führt, wird darüber hinaus für viele überflutungstolerante und überflutungsintolerante Arten beschrieben (Mommer *et al.*, 2007). Diese *aquatischen* Blätter besitzen dünnere Zellwände, eine dünnere Cuticula, weniger Spaltöffnungen und haben Chloroplasten in der Epidermis eingelagert (Mommer *et al.*, 2005). Die spezifische Blattfläche (Fläche/Trockengewicht) von aquatischen Blättern ist gegenüber terrestrischen Blättern erhöht (Nielsen, 1993). Dadurch kommt es zu einem verbesserten Gasaustausch unter Wasser und u. a. zu erhöhten O<sub>2</sub>-Konzentrationen in

der Pflanze (Mommer *et al.*, 2004). Die neugebildeten Blätter von *D. cespitosa* waren ebenfalls auffällig dünn. Erste Auswertungen zeigen zudem, dass die spezifische Blattfläche dieser neuen Blätter im Vergleich zu typischen *D. cespitosa*-Blättern signifikant höher ist (David Müller, Universität Hamburg, unveröffentlichte Daten). Eine erhöhte Sauerstoffkonzentration in neu gebildeten Blättern von *D. cespitosa* könnte zu einer geringeren Fermentationsrate führen. Dies könnte die geringe Enzymaktivität von ADH erklären, die in neu gebildeten Blättern von *D. cespitosa* gemessen wurde.

#### D. cespitosa und D. wibeliana haben möglicherweise unterschiedliche Anpassungsstrategien an Überflutung entwickelt

Sollte die Ausbildung von neuen Blättern in D. cespitosa auf einen Anpassungsmechanismus zurückzuführen sein, könnten sich D. cespitosa und D. wibeliana hinsichtlich ihrer Anpassungsstrategien an Überflutung wesentlich voneinander unterscheiden. Aufgrund der erhaltenen Daten wird eine erhöhte ADH-Aktivität in *D. wibeliana* als ein Anpassungsmechanismus an Überflutung verstanden. Einen weiteren Hinweis auf eine Anpassung auf Proteinebene wurde durch die Identifikation des in *D. wibeliana* unter Überflutung hoch abundanten Lektins erhalten. Während aber physiologische Anpassungen auf einen "echten" Toleranzmechanismus hinweisen, werden morphologische Anpassungen als Vermeidungsstrategien angesehen, die auf eine Überflutungsintoleranz hindeuten (Bailey-Serres & Voesenek, 2008). Um zu untersuchen, ob in Kollmar gebildete Blätter von D. cespitosa tatsächlich Merkmale aquatischer Blätter zeigen, müssen weitere morphologische und physiologische Versuche durchgeführt werden.

## Ist ein biotischer Faktor ursächlich für die Abwesenheit von D. wibeliana in Lebensräumen des Schwestertaxons D. cespitosa?

Sechs Wochen nach Auspflanzung waren Blätter von *D. cespitosa* und *D. wibeliana* im Krempermoor von Rostpilzen befallen. Bei einer quantitativen Erfassung des Befalls wurde festgestellt, dass in allen untersuchten Pflanzen von *D. wibeliana* nahezu 100 % der Blätter befallen waren. Bei *D. cespitosa* waren es hingegen maximal 75 % aller Blätter einer Pflanze. Eventuell steht die Identifizierung eines Pathogen-Resistenz-Proteins (PR-1) in Verbindung mit dem unterschiedlich intensiven Befall. PR-1 ist ein

fungitoxisches Protein, dass die Toleranz der Pflanze gegen verschiedene Pilze erhöhen kann (Niderman *et al.*, 1995). Das Proteinniveau von PR-1 war in *D. wibeliana* um das 1,7-fache niedriger als in *D. cespitosa* und könnte somit mit der geringeren Resistenz von *D. wibeliana* gegen den Pilzbefall in Verbindung stehen. In Kollmar konnte an keiner der beiden Taxa ein Befall mit Rostpilzen festgestellt werden. Möglicherweise macht die tidebedingte Überflutung einen Pilzbefall unmöglich.

#### 4.4 Vergleich der Ergebnisse aus Labor und Freilandexperimenten

Die Untersuchungen zur Überflutungstoleranz von *D. cespitosa* und *D. wibeliana* sind in zwei separaten Ansätzen durchgeführt worden. Im ersten Ansätz wurde eine periodisch wiederkehrende Überflutung in der Klimakammer unter kontrollierten Bedingungen simuliert. Im zweiten Ansätz wurde ein reziprokes Verpflanzungsexperiment im Freiland durchgeführt. Ein Vergleich der ADH-Aktivität zwischen den Taxa zeigte, dass im Labor und im Freiland gegensätzliche Ergebnisse erzielt wurden. Im Laborversuch zeigten Pflanzen von *D. wibeliana* nach drei Wochen periodischer Überflutung eine höhere ADH-Enzymaktivität als Pflanzen von *D. cespitosa*. Im Freiland hingegen wurde in Pflanzen von *D. cespitosa* nach dreiwöchiger periodischer Überflutung eine höhere ADH-Aktivität gemessen. Diese Ergebnisse konnten durch ein vorangegangenes Freilandexperiment bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Daher wurde die physiologische Interpretation der ADH-Enzymaktivität auf Grundlage der Freilanddaten vorgenommen.

Ein Labor-Freiland-Vergleich der 2D-DIGE-Analysen deutet ebenfalls auf eine geringe Korrelation zwischen den erhobenen Daten hin. In *D. cespitosa* stimmten die Daten zur Proteinexpression tendenziell überein. In *D. wibeliana* jedoch wurden einige Proteine, die unter kontrollierten Bedingungen induziert wurden, im Freiland reprimiert (und umgekehrt). Das gravierendste Beispiel dafür stellt das Jacalin-ähnliche Lektin dar. Unter kontrollierten Bedingungen in der Klimakammer war dieses Protein in nicht-überfluteten Blättern von *D. wibeliana* etwa um den Faktor 50 stärker exprimiert als in Blättern überfluteter Pflanzen. Im Freilandversuch hingegen lag das Protein in überfluteten Pflanzen von *D. wibeliana* um etwa den Faktor 30 stärker vor als in nicht-überfluteten Pflanzen. Diese Ergebnisse waren in Kontrollexperimenten reproduzierbar

(Daten nicht gezeigt). Da das Protein in wild wachsenden Pflanzen von *D. wibeliana* am Standort Kollmar stark exprimiert wurde, wird eine artifizielle Expression des Lektins unter Klimakammerbedingungen vermutet.

## Labordaten allein sind für die Beantwortung ökologischer Fragestellungen nicht ausreichend

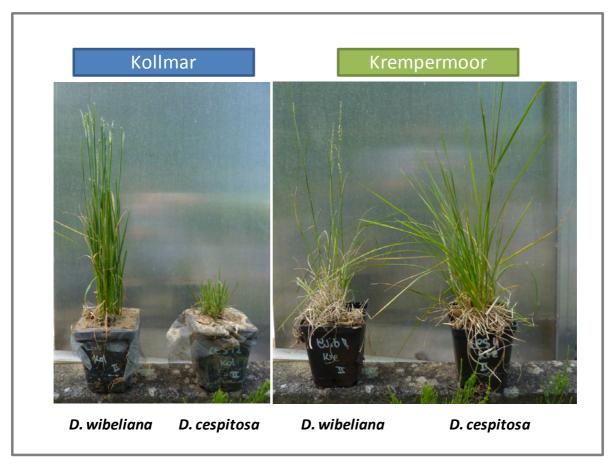
Ein Vergleich der in dieser Arbeit erhaltenen Daten aus Freiland- und Laborversuchen zeigt, dass im Labor neben reproduzierbaren Daten auch artifizielle Ergebnisse produziert wurden, die sich im Feld nicht wiederfinden ließen. Eine Schlussfolgerung dieser Arbeit ist somit, dass Labordaten für die Beantwortung einer ökologischen Fragestellung nicht ausreichend sind. Damit werden Ergebnisse anderer Arbeiten bestätigt, in denen artifizielle Ergebnisse unter Laborbedingungen zu einer geringen Korrelation zwischen Labor- und Felddaten führten und somit für die Fragestellungen im Feld ungeeignet waren (Nelson *et al.*, 1991; Såstad, 1999). Die Verifizierung von Labordaten im Feld ist demnach für die Beantwortung ökologischer Fragestellungen außerordentlich wichtig (Pennings & Callaway, 1992).

## 4.5 Molekulare und physiologische Aspekte der ökologischen Differenzierung von *Deschampsia cespitosa* und *D. wibeliana*

In dieser Arbeit wurden Hinweise erhalten, dass *D. cespitosa* und *D. wibeliana* zwei unterschiedliche Anpassungsstrategien an Überflutungsstress ausgebildet haben. Während *D. wibeliana* aufgrund einer hohen Kapazität zur fermentativen ATP-Produktion hypoxische Verhältnisse tolerieren könnte, vermeidet *D. cespitosa* möglicherweise zelluläre Hypoxie durch die Ausbildung aquatischer Blätter. Demnach würde *D. wibeliana* eine Anpassung im Sinne einer Toleranzstrategie zeigen, die mit einer Justierung des Stoffwechsels einhergeht. *D. cespitosa* hingegen hätte eine Anpassung im Sinne einer Vermeidungsstrategie entwickelt. Entsprechende Anpassungsmechanismen wurden von Colmer & Voesenek (2009) zusammenfassend beschrieben. Unterschiedliche Anpassungsstrategien zwischen nah verwandten Pflanzen sind nicht ungewöhnlich (Schlichting, 1986) und werden z. B. in Reis zwischen verschiedenen Kultivaren gefunden (Xu *et al.*, 2006; Bailey-Serres *et al.*, 2012).

#### D. cespitosa und D. wibeliana können nach Verpflanzung im Habitat des Schwestertaxons überleben

Tatsächlich zeigen erste Ergebnisse neun Monate nach reziproker Verpflanzung (Mai 2013), dass Pflanzen beider Taxa den Winter im fremden Habitat überlebt haben (Abbildung 21). Deutlich wird jedoch auch, dass sowohl *D. cespitosa* als auch *D. wibeliana* in ihrem Lebensraum mehr Biomasse gebildet haben als das verpflanzte Schwestertaxon. Diese Beobachtung entspricht den Untersuchungen von Heydel (2008). Heydel hatte die regenerierte Biomasse von *D. cespitosa* und *D. wibeliana* unter verschiedenen hydrologischen Regimen untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl *D. wibeliana* als auch *D. cespitosa* mehr Biomasse unter den Bedingungen des eigenen Lebensraumes regenerierten als unter den Bedingungen des jeweils fremden Lebensraumes.



**Abb. 21:** Pflanzen von *Deschampsia wibeliana* und *D. cespitosa* nach neunmonatiger reziproker **Verpflanzung im Freiland.** Gezeigt ist eine Pflanze pro Taxon und Standort. Links: *D. wibeliana* und *D. cespitosa* am *D. wibeliana*-Standort Kollmar. Rechts: *D. wibeliana* und *D. cespitosa* am *D. cespitosa*-Standort Krempermoor.

Für *D. cespitosa* konnte außerdem von Banach *et al.* (2008) gezeigt werden, dass die Pflanzen nach reziproker Verpflanzung sechs Wochen komplette Überflutung überleben können, ihre Biomasse dabei jedoch stark abnimmt. Hinweise auf Seneszenz und Neubildung von Blättern finden sich in der genannten Arbeit nicht.

Aufgrund dieser Ergebnisse stellt sich die Frage nach den Ursachen der ökologischen Differenzierung von *D. cespitosa* und *D. wibeliana*. Vermutet werden kann, dass die beiden Taxa im Habitat des Schwestertaxons langfristig in Konkurrenz unterlegen sind. Da an Pflanzen von *D. wibeliana* ein stärkerer Pilzbefall festgestellt werden konnte als an *D. cespitosa*, ist möglicherweise ein biotischer Faktor für die Abwesenheit von *D. wibeliana* in Habitaten von *D. cespitosa* verantwortlich.

Zu bedenken ist zudem, dass in dem Verpflanzungsexperiment adulte Pflanzen verpflanzt wurden. Unter natürlichen Umständen herrscht durch unterschiedliche Blühzeitpunkte eine reproduktive Barriere zwischen beiden *Deschampsia-*Taxa

(Weihe & Reese, 1968; Albers, 1972). Denkbar ist, dass eine Keimung im Habitat des Schwestertaxons nicht möglich ist oder bereits die Keimlinge in Konkurrenz unterliegen. Weitere Untersuchungen zur Keimungsbiologie von *D. cespitosa* und *D. wibeliana* sind nötig, um diese Fragen zu klären.

Die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen *D. cespitosa* und *D. wibeliana* sind bis heute nicht abschließend geklärt (Chiapalla, 2007; Jäger & Werner, 2005). Heydel (2008) konnte durch AFLP-Analysen (amplified fragment-length polymorphism) nachweisen, dass eine genetische Distanz zwischen den *Deschampsia*-Taxa *D. cespitosa* und *D. wibeliana* besteht. Es wurden jedoch Hinweise darauf erzielt, dass der Genfluss zwischen beiden Taxa nicht vollständig unterbrochen ist. In dieser Arbeit wurden Hinweise erhalten, dass sich *D. cespitosa* und *D. wibeliana* auf physiologischer und Proteomebene unterscheiden. Nach neunmonatiger Verpflanzung konnten beide Taxa nach wie vor phänotypisch klar unterschieden werden. Dass es sich bei *D. cespitosa* und *D. wibeliana* um Ökotypen eines Taxons handelt, deren Unterschiede auf phänotypischer Plastizität beruhen, ist daher unwahrscheinlich. Weitere Experimente sind jedoch notwendig, um die Ursachen der ökophysiologischen Differenzierung von *Deschampsia cespitosa* und *D. wibeliana* aufzudecken.

#### 5. Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der molekularen und proteomischen Aspekte der ökologischen Differenzierung von *D. cespitosa* und *D. wibeliana*. Ein wichtiger Teil bestand in der Identifizierung von Proteinen, die infolge von periodisch wiederkehrender Überflutung differenziell zwischen den Taxa reguliert waren. Hierzu wurden proteomische Analysen mit Hilfe von 2-dimensionaler Gelelektrophorese durchgeführt. Aufgrund der limitierten Sensitivität dieser Methode konnte nur ein Teil des Blattproteoms analysiert werden. Bei weiteren gelbasierten Analysen könnte die hoch abundante RuBisCO (Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase) mittels Immunopräzipitation aus dem Proteinextrakt entfernt werden (Kim *et al.*, 2013). Dadurch könnte die Zahl detektierbarer Proteine deutlich steigen. Eine weitere Möglichkeit ist die Proteinanalyse mittels Vorfraktionierung und LC-MS/MS (*liquid chromatography mass spectrometry*). Mit dieser Methode können auch schwach exprimierte Proteine quantitativ identifiziert werden (Baginsky *et al.*, 2005).

Der finale Nachweis über die physiologische Relevanz von Proteinen erfolgt über die Bestimmung der proteinspezifischen Metabolite (Arbona *et al.*, 2013). *Metabolomics* in Pflanzen wurden bereits in verschiedenen Arbeiten erfolgreich durchgeführt (Obata & Fernie, 2012). Eine metabolomische Analyse könnte die in dieser Arbeit erhaltenen Proteindaten ergänzen und verifizieren. Aufgrund der positiven Ergebnisse der Transkriptomsequenzierung beider *Deschampsia*-Taxa könnte zudem eine vergleichende quantitative Transkriptomanalyse durchgeführt werden. Mit Hilfe von transkriptomischen, proteomischen und metabolomischen Daten wäre eine umfassende physiologische Beschreibung der zellulären Reaktionen auf Überflutungsstress in beiden *Deschampsia*-Taxa besser möglich.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass sich *D. cespitosa* und *D. wibeliana* grundsätzlich bezüglich ihrer Anpassungsmechanismen an Überflutungsstress unterscheiden. In *D. wibeliana* wurden Hinweise auf eine *quiescence-*Strategie erhalten. Diese Strategie geht mit einer Herunterregulierung energieverbrauchender Prozesse bei gleichzeitiger Hochregulierung der anaeroben Energiegewinnung einher (Colmer & Voesenek, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass *D. wibeliana* in ihrem Lebensraum

über eine erhöhte Kapazität zur fermentativen Energiegewinnung verfügt. ATP-Gehaltes, Ethanolkonzentration, Vergleichende Messungen des der Kohlenhydratumsatzes sowie der Enzymaktivitätsraten weiterer glykolytischer Enzyme sind notwendig, um Aufschluss über die Stoffwechselaktivitäten zu erhalten. Eine solche Analyse wurde bereits von Rocha et al. (2010) in Klee (Lotus japonicus) erfolgreich durchgeführt.

Um herauszufinden, ob die von *D. cespitosa* bei Überflutung neu gebildeten Blätter die Kriterien aquatischer Blätter erfüllen (Mommer *et al.*, 2007), müssen die spezifische Blattfläche, die Blatthydrophobizität sowie die internen Sauerstoffkonzentrationen von *D. cespitosa*-Blättern vergleichend untersucht werden.

In dieser Arbeit ist beobachtet worden, dass Pflanzen beider *Deschampsia*-Taxa im Habitat des Schwestertaxons mehrere Monate überleben können. Allerdings wurde auch beobachtet, dass die Pflanzen im fremden Habitat im Vergleich zum heimischen Taxon deutlich weniger Biomasse produziert haben. Von großem Interesse ist, ob die Pflanzen über mehrere Vegetationsperioden im fremden Habitat überleben können. Ein Keimungsversuch ist notwendig, um zu untersuchen, ob oder ab welchem Stadium die Taxa im fremden Lebensraum unterliegen. Eine Kombination dieser Ansätze sollte wesentlich zur Beantwortung der Frage nach den Ursachen der ökophysiologischen Differenzierung von *D. cespitosa* und *D. wibeliana* beitragen können.

#### 6. Zusammenfassung

Deschampsia cespitosa (Rasenschmiele) und D. wibeliana (Elbe-Schmiele) sind zwei nah verwandte immergrüne Horstgräser, die zu der Familie der Poaceae gehören. D. cespitosa ist weltweit verbreitet und toleriert trockene bis staunasse Lebensräume. D. wibeliana hingegen ist ein Lokalendemit des Elbeästuars und besiedelt die sandigen Uferbereiche der Elbe. D. wibeliana hat sich an diese Umgebung angepasst und toleriert tidebedingt wiederkehrende vollständige Überflutung.

Die beiden *Deschampsia*-Taxa wurden evolutionär erst vor ungefähr 7500 Jahren getrennt, als postglacial die Habitate des heutigen Elbeästuars entstanden. Um Hinweise über die physiologischen Hintergründe der ökophysiologischen Differenzierung beider *Deschampsia*-Taxa zu erhalten, wurden in dieser Arbeit auf Proteinebene die molekularen Antworten auf Überflutungsstress in *D. wibeliana* und *D. cespitosa* vergleichend untersucht.

Hierzu wurde zunächst die Überflutungstoleranz beider Taxa mit Hilfe des Hypoxiemarkers Alkoholdehydrogenase (ADH) analysiert. Zur Untersuchung der proteomischen Antworten beider Taxa auf Überflutung wurde eine vergleichende Proteomanalyse mittels 2-dimensionaler Gelelektrophorese und anschließender Massenspektrometrie durchgeführt. Die Untersuchungen wurden sowohl unter kontrollierten Bedingungen im Labor als auch während eines reziproken Verpflanzungsexperiments im Freiland durchgeführt.

Unter Laborbedingungen konnte gezeigt werden, dass periodisch wiederkehrende Überflutung in beiden *Deschampsia*-Taxa Induktion des Hypoxiemarkers Alkoholdehydrogenase auslöst. Außerdem wurden in beiden Taxa Proteine induziert, die mit der zellulären Reaktion auf Sauerstoffmangel assoziiert werden können. Jedoch wurden auch Proteine identifiziert, die nicht mit der Reaktion auf Hypoxie in Verbindung stehen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass periodische Überflutung ein multipler abiotischer Stressfaktor ist. Hinweise bezüglich der Überflutungstoleranz von *D. cespitosa* oder *D. wibeliana* konnten unter Laborbedingungen jedoch nicht erhalten werden.

Die Untersuchungen der ADH-Enzymaktivität beider *Deschampsia*-Taxa im Freiland wiesen darauf hin, dass Pflanzen von *D. wibeliana* im überfluteten Lebensraum eine höhere Kapazität zur anaeroben Energiegewinnung besitzen als Pflanzen von *D. cespitosa*. In überfluteten Pflanzen von *D. wibeliana* wurde außerdem ein hoch abundantes Jacalin-ähnliches Lektins identifiziert, dessen Expressionsniveau bei ausbleibender Überflutung in Blättern von *D. wibeliana* stark zurückging und in *D. cespitosa* generell in deutlich geringeren Mengen vorlag. Es wird vermutet, dass dieses Lektin die Funktion eines Stickstoffspeichers einnimmt und eine Anpassung an den tidebedingt überfluteten Lebensraum von *D. wibeliana* darstellt.

Die Ergebnisse der Proteomanalyse zeigten auch, dass sich *D. cespitosa* und *D. wibeliana* im Habitat des Schwestertaxons bezüglich der Regulation von Stressproteinen gegensätzlich zueinander verhielten. Dies deutet darauf hin, dass *D. cespitosa* und *D. wibeliana* eine Toleranz gegenüber diversen abiotischen Stressoren besitzen, die ihnen das Überleben im Lebensraum des Schwestertaxons prinzipiell ermöglichen.

Vier Wochen nach reziproker Verpflanzung beider Taxa waren die Blätter von *D. cespitosa* im Lebensraum von *D. wibeliana* abgestorben. Die neugebildeten Blätter zeigten morphologische Merkmale von *aquatischen Blättern* und könnten eine Anpassung an die Überflutungsbedingungen im fremden Habitat darstellen.

In dieser Arbeit konnten somit Hinweise darauf erhalten werden, dass sich *D. cespitosa* und *D. wibeliana* bezüglich ihrer Toleranzstrategien grundsätzlich voneinander unterscheiden. Während *D. wibeliana* eine Toleranzstrategie gegenüber Überflutung entwickelt hat, die mit physiologischen Adaptationen, z. B. einer erhöhten anaeroben Energiegewinnung, einhergeht, initiiert *D. cespitosa* durch die Neubildung von Blättern möglicherweise eine Vermeidungsstrategie bei Überflutung.

Neun Monate nach Verpflanzung zeigte sich, dass beide Taxa im Habitat des Schwestertaxons überlebt haben. Jedoch war zu beobachten, dass sich die Pflanzen im fremden Lebensraum hinsichtlich ihrer Biomasseproduktion drastisch von den Pflanzen des heimischen Taxons unterschieden. Im Falle von *D. wibeliana* wurden außerdem Hinweise erhalten, dass ein intensiver Pilzbefall für die Abwesenheit im Lebensraum von *D. cespitosa* verantwortlich sein könnte.

#### 7. Literaturverzeichnis

- Alban, A., David, S.O., Bjorkesten, L., Andersson, C., Sloge, E., Lewis, S., Currie, I., 2003. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. Proteomics 3, 36–44.
- Albers, F., 1972. Cytotaxonomie und B-Chromosomen bei Deschampsia cespitosa (L.) P. B. und verwandten Arten. Beiträge zur Biologie der Pflanzen 1–62.
- Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, L.S., 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. J. Exp. Bot. 53, 1331–1341.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215, 403–410.
- Amor, Y., Chevion, M., Levine, A., 2000. Anoxia pretreatment protects soybean cells against H2O2-induced cell death: possible involvement of peroxidases and of alternative oxidase. FEBS Letters 477, 175–180.
- Andrews, D.L., Cobb, B.G., Johnson, J.R., Drew, M.C., 1993. Hypoxic and anoxic induction of alcohol dehydrogenase in roots and shoots of seedlings of zea mays (Adh transcripts and enzyme activity). Plant Physiol 101, 407–414.
- Arbona, V., Manzi, M., Ollas, C., Gómez-Cadenas, A., 2013. Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. International Journal of Molecular Sciences 14, 4885–4911. Armstrong, W., Brandle, R., Jackson, M., 1994. Mechanisms of Flood Tolerance in Plants. Acta Bot. Neerl. 43, 307–358.
- Armstrong, W., Wright, E.J., Lythe, S., Gaynard, T.J., 1985. Plant zonation and the effects of the spring-neap tidal cycle on soil aeration in a humber salt marsh. Journal of Ecology 73, 323–339.
- Armstrong, W., 1979. Aeration in higher Plants. Advances in botanical research 7, 225–232.
- Ashoub, A., Beckhaus, T., Berberich, T., Karas, M., Brüggemann, W., 2013. Comparative analysis of barley leaf proteome as affected by drought stress. Planta 237, 771–781.
- Babosha, A.V., 2008. Inducible lectins and plant resistance to pathogens and abiotic stress. Biochemistry (Moscow) 73, 812–825.
- Baena-González, E., Rolland, F., Thevelein, J.M., Sheen, J., 2007. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. Nature 448, 938–942.
- Baginsky, S., Kleffmann, T., von Zychlinski, A., Gruissem, W., 2005. Analysis of shotgun proteomics and RNA profiling data from arabidopsis thaliana chloroplasts. J. Proteome Res. 4, 637–640.

- Bailey-Serres, J., Fukao, T., Gibbs, D.J., Holdsworth, M.J., Lee, S.C., Licausi, F., Perata, P., Voesenek, L.A.C.J., van Dongen, J.T., 2012. Making sense of low oxygen sensing. Trends Plant Sci. 17, 129–138.
- Bailey-Serres, J., Chang, R., 2005. Sensing and signalling in response to oxygen deprivation in plants and other organisms. Ann Bot 96, 507–518.
- Bailey-Serres, J., Voesenek, L.A.C.J., 2008. Flooding Stress: acclimations and genetic diversity. Annual Review of Plant Biology 59, 313–339.
- Banach, K., Banach, A.M., Lamers, L.P.M., De Kroon, H., Bennicelli, R.P., Smits, A.J.M., Visser, E.J.W., 2008. Differences in flooding tolerance between species from two wetland habitats with contrasting hydrology: implications for vegetation development in future floodwater retention areas. Annals of Botany 103, 341–351.
- Baxter-Burrell, A., 2002. RopGAP4-Dependent Rop GTPase rheostat control of *Arabidopsis* oxygen deprivation tolerance. Science 296, 2026–2028.
- Bedon, F., Villar, E., Vincent, D., Dupuy, J.-W., Lomenech, A.-M., Mabialangoma, A., Chaumeil, P., Barré, A., Plomion, C., Gion, J.-M., 2012. Proteomic plasticity of two Eucalyptus genotypes under contrasted water regimes in the field. Plant, Cell & Environment 35, 790–805.
- Benz, B.R., Rhode, J.M., Cruzan, M.B., 2007. Aerenchyma development and elevated alcohol dehydrogenase activity as alternative responses to hypoxic soils in the *Piriqueta caroliniana* complex. Am. J. Bot. 94, 542–550.
- Bertini, L., Proietti, S., Caporale, C., Caruso, C., 2009. Molecular characterization of a wheat protein induced by vernalisation. Protein J. 28, 253–262.
- Biemelt, S., Keetman, U., Albrecht, G., 1998. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. Plant Physiol. 116, 651–658.
- Bindschedler, L.V., Cramer, R., 2011. Quantitative plant proteomics. Proteomics 11, 756–775.
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V., 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Ann. Bot. 91 Spec No, 179–194.
- Bowler, C., Montagu, M. van, Inze, D., 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. Annual review of plant biology 43, 83–116.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254.
- Branco-Price, C., 2005. Genome-wide analysis of transcript abundance and translation in *Arabidopsis* seedlings subjected to oxygen deprivation. Annals of Botany 96, 647–660.
- Breci, L., Haynes, P.A., 2007. Two-dimensional nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry of proteins extracted from rice leaves and roots. Methods Mol. Biol. 355, 249–266.

- Bullock, W.O., Fernandez, J.M., Short, J.M., 1987. A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. Biotechniques 5, 376–378.
- Burdick, D.M., Mendelssohn, I.A., 1990. Relationship between anatomical and metabolic responses to soil waterlogging in the coastal grass *Spartina patens*. J. Exp. Bot. 41, 223–228.
- Burke, J.J., Hatfield, J.L., Klein, R.R., Mullet, J.E., 1985. Accumulation of heat shock proteins in field-grown cotton. Plant Physiol. 78, 394–398.
- Carmo-Silva, A.E., Salvucci, M.E., 2013. The regulatory properties of rubisco activase differ among species and affect photosynthetic induction during light transitions. Plant Physiol 161, 1645–1655.
- Carpentier, S.C., Panis, B., Vertommen, A., Swennen, R., Sergeant, K., Renaut, J., Laukens, K., Witters, E., Samyn, B., Devreese, B., 2008. Proteome analysis of non-model plants: a challenging but powerful approach. Mass Spectrometry Reviews 27, 354–377.
- Champagne, A., Boutry, M., 2013. Proteomics of nonmodel plant species. Proteomics 13, 663–673.
- Chaumont, F., Moshelion, M., Daniels, M.J., 2005. Regulation of plant aquaporin activity. Biology of the Cell 97, 749–764.
- Chen, Y., Peumans, W.J., Hause, B., Bras, J., Kumar, M., Proost, P., Barre, A., Rougé, P., Van Damme, E.J.M., 2002. Jasmonic acid methyl ester induces the synthesis of a cytoplasmic/nuclear chito-oligosaccharide binding lectin in tobacco leaves. FASEB J. 16, 905–907.
- Chiapella, J., 2007. A molecular phylogenetic study of Deschampsia (Poaceae: Aveneae) inferred from nuclear ITS and plastid trnL sequence data: support for the recognition of Avenella and Vahlodea. Taxon 56, 55–64.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162, 156–159.
- Colmer, T.D., Voesenek, L.A.C.J., 2009. Flooding tolerance: suites of plant traits in variable environments. Funct. Plant Biol. 36, 665–681.
- Cui, S., Hu, J., Yang, B., Shi, L., Huang, F., Tsai, S.-N., Ngai, S.-M., He, Y., Zhang, J., 2009. Proteomic characterization of Phragmites communis in ecotypes of swamp and desert dune. Proteomics 9, 3950–3967.
- Damme, E.J.M.v., Lannoo, N., Peumans, W.J., 2008. Plant Lectins, in: Jean-Claude Kader and Michel Delseny (Ed.), Advances in Botanical Research. Academic Press, pp. 107–209.
- Damme, E.J.M.v., Peumans, W.J., Barre, A., Rougé, P., 1998. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. Critical Reviews in Plant Sciences 17, 575–692.

- Damme, E.J.M.v., Zhang, W., Peumans, W.J., 2004. Induction of cytoplasmic mannose-binding jacalin-related lectins is a common phenomenon in cereals treated with jasmonate methyl ester. Commun. Agric. Appl. Biol. Sci. 69, 23–31.
- Davis, P.H., Chen, M., Zhang, X., Clark, C.G., Townsend, R.R., Stanley, S.L., 2009. Proteomic comparison of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar and the role of E. histolytica alcohol dehydrogenase 3 in virulence. PLoS Neglected Tropical Diseases 3, e415.
- Drew, M., 1990. Sensing soil oxygen. Plant Cell Environ. 13, 681–693.
- Emery, N.C., Ewanchuk, P.J., Bertness, M.D., 2001. Competition and salt-marsh plant zonation: stress tolerators may be dominant competitors. Ecology 82, 2471–2485.
- Ernst, W.H.O., 1990. Ecophysiology of plants in waterlogged and flooded environments. Aquatic Botany 38, 73–90.
- Esau, K., 1969. Pflanzenanatomie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Falvo, S., Di Carli, M., Desiderio, A., Benvenuto, E., Moglia, A., America, T., Lanteri, S., Acquadro, A., 2012. 2-D DIGE analysis of UV-C radiation-responsive proteins in globe artichoke leaves. Proteomics 12, 448–460.
- Felle, H.H., 2006. Apoplastic pH during low-oxygen stress in barley. Ann Bot 98, 1085–1093.
- Fennoy, S.L., Bailey-Serres, J., 1995. Post-transcriptional regulation of gene expression in oxygen-deprived roots of maize. The Plant Journal 7, 287–295.
- Fennoy, S.L., Nong, T., Bailey-Serres, J., 1998. Transcriptional and post-transcriptional processes regulate gene expression in oxygen-deprived roots of maize. The Plant Journal 15, 727–735.
- Freeling, M., Bennett, D.C., 1985. Maize Adhl. Annual review of genetics 19, 297–323. Fukao, T., Bailey-Serres, J., 2004. Plant responses to hypoxia is survival a balancing act? Trends in Plant Science 9, 449–456.
- Fukao, T., Bailey-Serres, J., 2004. Plant responses to hypoxia is survival a balancing act? Trends in Plant Science 9, 449–456.
- Fukao, T., Ronald, P. C., Bailey-Serres, J., 2006. A variable cluster of ethylene response factor-like genes regulates metabolic and developmental acclimation responses to submergence in rice. The plant cell online 18, 2021–2034.
- Fukao, T., Yeung, E., Bailey-Serres, J., 2011. The submergence tolerance regulator SUB1A mediates crosstalk between submergence and drought tolerance in rice. Plant Cell 23, 412–427.
- Garve, E., 2007. Verbreitungsatlas der Farn- und Blütenpflanzen in Niedersachsen und Bremen, Band 48, Naturschutz und Landschaftspflege in Niedersachsen. Hannover.

- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D., Bairoch, A., 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. Nucleic Acids Research 31, 3784-3788.
- Görg, A., Weiss, W., Dunn, M.J., 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. Proteomics 4, 3665–3685.
- Greenbaum, D., Colangelo, C., Williams, K., Gerstein, M., 2003. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. Genome Biol 4, 117.
- Grunwald, I., Heinig, I., Thole, H.H., Neumann, D., Kahmann, U., Kloppstech, K., Gau, A.E., 2007. Purification and characterisation of a jacalin-related, coleoptile specific lectin from Hordeum vulgare. Planta 226, 225–234.
- Gygi, S.P., Rochon, Y., Franza, B.R., Aebersold, R., 1999. Correlation between Protein and mRNA Abundance in Yeast. Mol Cell Biol 19, 1720–1730.
- Hake, S., Kelley, P.M., Taylor, W.C., Freeling, M., 1985. Coordinate induction of alcohol dehydrogenase 1, aldolase, and other anaerobic RNAs in maize. J. Biol. Chem. 260, 5050–5054.
- Hattori, Y., Nagai, K., Furukawa, S., Song, X.-J., Kawano, R., Sakakibara, H., Wu, J., Matsumoto, T., Yoshimura, A., Kitano, H., Matsuoka, M., Mori, H., Ashikari, M., 2009. The ethylene response factors SNORKEL1 and SNORKEL2 allow rice to adapt to deep water. Nature 460, 1026–1030.
- Heydel, F., 2008. Populationsbiologische Untersuchungen an *Deschampsia wibeliana* (Sond.) *Parl. und Deschampsia cespitosa* (L.) P. Beauv. s. str. Diplomarbeit Universität Hamburg.
- Hesse, H., Kreft, O., Maimann, S., Zeh, M., Hoefgen, R., 2004. Current understanding of the regulation of methionine biosynthesis in plants. Journal of Experimental Botany 55, 1799–1808.
- Hinz, M., Wilson, I.W., Yang, J., Buerstenbinder, K., Llewellyn, D., Dennis, E.S., Sauter, M., Dolferus, R., 2010. Arabidopsis RAP2.2: an ethylene response transcription factor that is important for hypoxia survival. Plant Physiology 153, 757–772.
- Hlavackova, I., Vitamvas, P., Santrucek, J., Kosova, K., Zelenkova, S., Prasil, I.T., Ovesna, J., Hynek, R., Kodicek, M., 2013. Proteins involved in distinct phases of cold hardening process in frost resistant winter barley (*Hordeum vulgare* L.) cv Luxor. International journal of molecular sciences 14, 8000–8024.
- Huerta-Ocampo, J.Á., Briones-Cerecero, E.P., Mendoza-Hernández, G., León-Rodríguez, Rosa, A.P.B. de la, 2009. Proteomic Analysis of Amaranth (Amaranthus hypochondriacus L.) Leaves under Drought Stress. International Journal of Plant Sciences 170, 990–998.
- Hultén, E., 1962. The circumpolar plants 8, 1-275.
- Insausti, P., Grimoldi, A.A., Chaneton, E.J., Vasellati, V., 2001. Flooding induces a suite of adaptive plastic responses in the grass Paspalum dilatatum. New Phytologist 152, 291–299.

- Isaacson, T., Damasceno, C.M.B., Saravanan, R.S., He, Y., Catalá, C., Saladié, M., Rose, J.K.C., 2006. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. Nature Protocols 1, 769–774.
- Islam, N., Lonsdale, M., Upadhyaya, N.M., Higgins, T.J., Hirano, H., Akhurst, R., 2004. Protein extraction from mature rice leaves for two-dimensional gel electrophoresis and its application in proteome analysis. Proteomics 4, 1903–1908.
- Ismond, K.P., Dolferus, R., Pauw, M.D., Dennis, E.S., Good, A.G., 2003. Enhanced low oxygen survival in Arabidopsis through increased metabolic flux in the fermentative pathway. Plant Physiol. 132, 1292–1302.
- Jackson, M.B., Colmer, T.D., 2005. Response and adaptation by plants to flooding stress. Annals of Botany 96, 501–505.
- Jackson, M.B., 2008. Ethylene-promoted elongation: an adaptation to submergence stress. Ann Bot (Lond) 101, 229–248.
- Jackson, M.B., Ishizawa, K., Ito, O., 2009. Evolution and mechanisms of plant tolerance to flooding stress. Annals of Botany 103, 137–142.
- Jackson-Constan, D., Akita, M., Keegstra, K., 2001. Molecular chaperones involved in chloroplast protein import. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research 1541, 102–113.
- Jäger, E. J., Werner, K., 2005. Rothmaler 4 Exkursionsflora von Deutschland. Gefäßpflanzen: Kritischer Band. Spektrum Akademischer Verlag, München.
- Jehmlich, N., Schmidt, F., von Bergen, M., Richnow, H.-H., Vogt, C., 2008. Protein-based stable isotope probing (Protein-SIP) reveals active species within anoxic mixed cultures. ISME J 2, 1122–1133.
- Jensen, K., 2007. Röhrichte in Ästuaren: Verbreitung, Ökosystem-funktionen und Gefährdung. BFG Veranstaltungen 2, 5–19.
- Johnson, J.R., Cobb, B.G., Drew, M.C., 1994. Hypoxic induction of anoxia tolerance in roots of Adh1 null *Zea mays* L. Plant Physiol 105, 61–67.
- Karp, N.A., Lilley, K.S., 2008. Investigating sample pooling strategies for DIGE experiments to address biological variability. Proteomics 9, 388–397.
- Keeley, J.E., 1979. Population differentiation along a flood frequency gradient: physiological adaptations to flooding in nyssa sylvatica. Ecological Monographs 49, 89–108.
- Kim, Y.J., Lee, H.M., Wang, Y., Wu, J., Kim, S.G., Kang, K.Y., Park, K.H., Kim, Y.C., Choi, I.S., Agrawal, G.K., Rakwal, R., Kim, S.T., 2013. Depletion of abundant plant RuBisCO protein using the protamine sulfate precipitation method. Proteomics. (Von März 2013, nur online)
- Kluth, A., Sprunck, S., Becker, D., Lorz, H., Lutticke, S., 2002. 5' deletion of a gbss1 promoter region from wheat leads to changes in tissue and developmental specificities. Plant Mol.Biol. 49, 669–682.

- Koch, M.S., Mendelssohn, I.A., 1989. Sulphide as a soil phytotoxin: differential responses in two marsh species. Journal of Ecology 77, 565–578.
- Lamers, L.P.M., Loeb, R., Antheunisse, A.M., Miletto, M., Lucassen, E.C.H.E.T., Boxman, A.W., Smolders, A.J.P., Roelofs, J.G.M., 2006. Biogeochemical constraints on the ecological rehabilitation of wetland vegetation in river floodplains. Hydrobiologia 565, 165–186.
- Laemmli, U., 1970. Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. Nature 227, 680–685.
- Lannoo, N., Vandenborre, G., Miersch, O., Smagghe, G., Wasternack, C., Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M., 2007. The jasmonate-induced expression of the *Nicotiana tabacum* leaf lectin. Plant and Cell Physiology 48, 1207–1218.
- Laskowski, M.J., Dreher, K.A., Gehring, M.A., Abel, S., Gensler, A.L., Sussex, I.M., 2002. FQR1, a novel primary auxin-response gene, encodes a flavin mononucleotide-binding quinone reductase. Plant Physiol. 128, 578–590.
- Leitsch, D., Wilson, I.B., Paschinger, K., Duchêne, M., 2006. Comparison of the proteome profiles of *Entamoeba histolytica* and its close but non-pathogenic relative *Entamoeba dispar*. Wiener klinische Wochenschrift 118, 37–41.
- Levine, R.L., Berlett, B.S., Moskovitz, J., Mosoni, L., Stadtman, E.R., 1999. Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. Mechanisms of Ageing and Development 107, 323–332.
- Li, P., Ponnala, L., Gandotra, N., Wang, L., Si, Y., Tausta, S.L., Kebrom, T.H., Provart, N., Patel, R., Myers, C.R., Reidel, E.J., Turgeon, R., Liu, P., Sun, Q., Nelson, T., Brutnell, T.P., 2010. The developmental dynamics of the maize leaf transcriptome. Nat Genet 42, 1060–1067.
- Licausi, F., Kosmacz, M., Weits, D.A., Giuntoli, B., Giorgi, F.M., Voesenek, L.A.C.J., Perata, P., van Dongen, J.T., 2011. Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization. Nature 479, 419–422.
- Licausi, F., Kosmacz, M., Weits, D.A., Giuntoli, B., Giorgi, F.M., Voesenek, L.A.C.J., Perata, P., van Dongen, J.T., 2011. Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization. Nature 479, 419–422.
- Licausi, F., 2013. Molecular elements of low-oxygen signaling in plants. Physiologia Plantarum 148, 1–8.
- Lopez-Casado, G., Covey, P.A., Bedinger, P.A., Mueller, L.A., Thannhauser, T.W., Zhang, S., Fei, Z., Giovannoni, J.J., Rose, J.K.C., 2012. Enabling proteomic studies with RNA-Seq: the proteome of tomato pollen as a test case. Proteomics 12, 761–774.
- Lorbiecke, R., Sauter, M., 1998. Induction of cell growth and cell division in the intercalary meristem of submerged deepwater rice (Oryza sativa L.). Planta 204, 140–145.
- Lücker, J., Laszczak, M., Smith, D., Lund, S.T., 2009. Generation of a predicted protein database from EST data and application to iTRAQ analyses in grape (Vitis vinifera cv. Cabernet Sauvignon) berries at ripening initiation. BMC Genomics 10, 50.

- Mathesius, U., Imin, N., Chen, H.C., Djordjevic, M.A., Weinman, J.J., Natera, S.H.A., Morris, A.C., Kerim, T., Paul, S., Menzel, C., Weiller, G.R., Rolfe, B.G., 2002. Evaluation of proteome reference maps for cross-species identification of proteins by peptide mass fingerprinting. Proteomics 2, 1288–1303.
- Mayer, M.P., Bukau, B., 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. Cellular and Molecular Life Sciences 62, 670–684.
- Méchin, V., Damerval, C., Zivy, M., 2007. Total protein extraction with TCA-acetone, in: Plant Proteomics. Springer, pp. 1–8.
- Meguro, N., Tsuji, H., Suzuki, Y., Tsutsumi, N., Hirai, A., Nakazono, M., 2006. Analysis of Expression of Genes for Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase in Maize during Submergence and Following Re-aeration. Breeding Science 56, 365–370.
- Mendelssohn, I.A., McKee, K.L., Patrick, W.H., Jr, 1981. Oxygen deficiency in *Spartina alterniflora* roots: metabolic adaptation to anoxia. Science 214, 439–441.
- Metzler, M.C., Cutt, J.R., Klessig, D.F., 1991. Isolation and characterization of a gene encoding a PR-1-like protein from Arabidopsis thaliana. Plant physiology 96, 346–348.
- Miflin, B.J., Habash, D.Z., 2002. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. Journal of Experimental Botany 53, 979–987.
- Miller, I., Crawford, J., Gianazza, E., 2006. Protein stains for proteomic applications: which, when, why? Proteomics 6, 5385–5408.
- Mommer, L., Pons, T.L., Wolters-Arts, M., Venema, J.H., Visser, E.J.W., 2005. Submergence-Induced Morphological, Anatomical, and Biochemical Responses in a Terrestrial Species Affect Gas Diffusion Resistance and Photosynthetic Performance. Plant physiology 139, 497–508.
- Mommer, L., Pedersen, O., Visser, E.J.W., 2004. Acclimation of a terrestrial plant to submergence facilitates gas exchange under water. Plant, Cell & Environment 27, 1281–1287.
- Mommer, L., Visser, E.J.W., 2005. Underwater photosynthesis in flooded terrestrial plants: a matter of leaf plasticity. Annals of Botany 96, 581–589.
- Mommer, L., Wolters-Arts, M., Andersen, C., Visser, E.J.W., Pedersen, O., 2007. Submergence-induced leaf acclimation in terrestrial species varying in flooding tolerance. New Phytologist 176, 337–345.
- Monk, L.S., Fagerstedt, K.V., Crawford, R.M., 1989. Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress. Physiologia Plantarum 76, 456–459.
- Monk, L.S., Fagerstedt, K.V., Crawford, R.M.M., 1987. Superoxide dismutase as an anaerobic polypeptide a key factor in recovery from oxygen deprivation in *Iris pseudacorus*? Plant Physiol. 85, 1016–1020.

- Nelson, B.D., Helms, T.C., Olson, M.A., 1991. Comparison of laboratory and field evaluations of resistance in soybean to *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Disease 75, 662-665.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W., 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. Electrophoresis 9, 255–262.
- Nicholas, K. B., Nicholas, H.B.Jr., 1997. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. EMBNEW.NEWS 4, 14.
- Niderman, T., Genetet, I., Bruyere, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., Fritig, B., Mosinger, E., 1995. Pathogenesis-Related PR-1 Proteins Are Antifungal (Isolation and Characterization of Three 14-Kilodalton Proteins of Tomato and of a Basic PR-1 of Tobacco with Inhibitory Activity against Phytophthora infestans). Plant Physiol. 108, 17–27.
- Nielsen, S.L., 1993. A comparison of aerial and submerged photosynthesis in some Danish amphibious plants. Aquatic Botany 45, 27–40.
- Obata, T., Fernie, A.R., 2012. The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. Cell. Mol. Life Sci. 69, 3225–3243.
- Oliver, M.J., Jain, R., Balbuena, T.S., Agrawal, G., Gasulla, F., Thelen, J.J., 2011. Proteome analysis of leaves of the desiccation-tolerant grass, *Sporobolus stapfianus*, in response to dehydration. Phytochemistry 72, 1273–1284.
- Paul, A.L., Ferl, R.J., 1991. In vivo footprinting reveals unique cis-elements and different modes of hypoxic induction in maize Adh1 and Adh2. Plant Cell 3, 159–168.
- Pennings, S., Callaway, R., 1992. Salt-marsh plant zonation the relative importance of competition and physical factors. Ecology 73, 681–690.
- Perata, P., Alpi, A., 1993. Plant responses to anaerobiosis. Plant Science 93, 1–17.
- Perata, P., Voesenek, L.A.C.J., 2007. Submergence tolerance in rice requires Sub1A, an ethylene-response-factor-like gene. Trends Plant Sci. 12, 43–46.
- Pfister-Sieber, M., Brändle, R., 1994. Aspects of plant behaviour under anoxia and post-anoxia. Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Section B: Biology 102, 313–324.
- Pierik, R., Tholen, D., Poorter, H., Visser, E.J.W., Voesenek, L.A.C.J., 2006. The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. Trends Plant Sci. 11, 176–183.
- Ponnamperuma, F.N., 1972. The chemistry of submerged soils. Advances in Agronomy 24, 29–95.
- Portis Jr, A.R., 1992. Regulation of ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity. Annual review of plant biology 43, 415–437.
- Pucciariello, C., Parlanti, S., Banti, V., Novi, G., Perata, P., 2012. Reactive oxygen species-driven transcription in *Arabidopsis* under oxygen deprivation. Plant Physiology 159, 184–196.

- Puissant, C., Houdebine, L.M., 1990. An improvement of the single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. BioTechniques 8, 148–149.
- Renaut, J., Hausman, J.F., Wisniewski, M.E., 2006. Proteomics and low-temperature studies: bridging the gap between gene expression and metabolism. Physiol. Plant. 126, 97–109.
- Roberts, J.K.M., Callis, J., Wemmer, D., Walbot, V., Jardetzky, O., 1984. Mechanisms of cytoplasmic pH regulation in hypoxic maize root tips and its role in survival under hypoxia. Proc Natl Acad Sci U S A 81, 3379–3383.
- Roberts, J.K.M., Chang, K., Webster, C., Callis, J., Walbot, V., 1989. Dependence of ethanolic fermentation, cytoplasmic pH regulation, and viability on the activity of alcohol dehydrogenase in hypoxic maize root tips 1. Plant Physiol 89, 1275–1278.
- Roberts, J.K.M., Hooks, M.A., Miaullis, A.P., Edwards, S., Webster, C., 1992. Contribution of Malate and Amino Acid Metabolism to Cytoplasmic pH Regulation in Hypoxic Maize Root Tips Studied Using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Plant Physiol. 98, 480–487.
- Rocha, M., Licausi, F., Araújo, W.L., Nunes-Nesi, A., Sodek, L., Fernie, A.R., Dongen, J.T. van, 2010. Glycolysis and the Tricarboxylic Acid Cycle Are Linked by Alanine Aminotransferase during Hypoxia Induced by Waterlogging of Lotus japonicus. Plant Physiol. 152, 1501–1513.
- Rose, J.K.C., Bashir, S., Giovannoni, J.J., Jahn, M.M., Saravanan, R.S., 2004. Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. Plant J. 39, 715–733.
- Rowland, L.J., Strommer, J.N., 1986. Anaerobic treatment of maize roots affects transcription of Adh1 and transcript stability. Molecular and cellular biology 6, 3368–3372.
- Rundle, H.D., Nosil, P., 2005. Ecological speciation. Ecology Letters 8, 336–352.
- Sachs, M.M., Freeling, M., Okimoto, R., 1980. The anaerobic proteins of maize. Cell 20, 761–767.
- Sachs, M.M., Ho, T.H.D., 1986. Alteration of gene expression during environmental stress in plants. Annual Review of Plant Physiology 37, 363–376.
- Sachs, M.M., Subbaiah, C.C., Saab, I.N., 1996. Anaerobic gene expression and flooding tolerance in maize. J. Exp. Bot. 47, 1–15.
- Salvucci, M.E., 2007. Association of rubisco activase with chaperonin-60: a possible mechanism for protecting photosynthesis during heat stress. Journal of Experimental Botany 59, 1923–1933.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, N.Y.
- Sand-Jensen, K., 1989. Environmental variables and their effect on photosynthesis of aquatic plant communities. Aquatic Botany 34, 5–25.

- Såstad, S.M., 1999. Genetic and environmental sources of variation in leaf morphology of *Sphagnum fallax* and *Sphagnum isoviitae* ( *Bryopsida* ): comparison of experiments conducted in the field and laboratory. Canadian Journal of Botany 77, 1–10.
- Sauter, M., 2000. Rice in deep water: "How to take heed against a sea of troubles". Naturwissenschaften 87, 289–303.
- Scandalios, J.G., 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. Plant Physiol 101, 7–12.
- Schlichting, C.D., 1986. The evolution of phenotypic plasticity in plants. Annual Review of Ecology and Systematics 17, 667–693.
- Schmidtke, K.-D., Lammers, W., 1993. Die Entstehung Schleswig-Holsteins, 2. Aufl. ed. K. Wachholtz, Neumünster.
- Schmitz, G., Schmidt, M., Feierabend, J., 1996. Comparison of the expression of a plastidic chaperonin 60 in different plant tissues and under photosynthetic and non-photosynthetic conditions. Planta 200, 326–334.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat Meth 9, 671–675.
- Schwartz, D., 1969. An example of gene fixation resulting from selective advantage in suboptimal conditions. Am. Nat. 103, 479–481.
- Setter, T.L., Laureles, E.V., 1996. The beneficial effect of reduced elongation growth on submergence tolerance of rice. J. Exp. Bot. 47, 1551–1559.
- Stothard, P., 2000. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. Biotechniques 28, 1102-1104.
- Tétard-Jones, C., Shotton, P.N., Rempelos, L., Cooper, J., Eyre, M., Orr, C.H., Leifert, C., Gatehouse, A.M.R., 2013. Quantitative proteomics to study the response of wheat to contrasting fertilisation regimes. Mol. Breed. 31, 379–393.
- Thiellement, H., Zivy, M., Damerval, C., Méchin, V. (Eds.), 2007. Plant Proteomics, Methods in Molecular Biology. Humana Press.
- Timperio, A.M., Egidi, M.G., Zolla, L., 2008. Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). Journal of Proteomics 71, 391–411.
- Tonge, R., Shaw, J., Middleton, B., Rowlinson, R., Rayner, S., Young, J., Pognan, F., Hawkins, E., Currie, I., Davison, M., 2001. Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. Proteomics 1, 377–396.
- Tournaire-Roux, C., Sutka, M., Javot, H., Gout, E., Gerbeau, P., Luu, D.-T., Bligny, R., Maurel, C., 2003. Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. Nature 425, 393–397.
- Trippi, V., Thimann, K.V., 1983. The exudation of solutes during senescence of oat leaves. Physiologia Plantarum 58, 21–28.

- Unlü, M., Morgan, M.E., Minden, J.S., 1997. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. Electrophoresis 18, 2071–2077.
- Vassileva, V., Demirevska, K., Simova-Stoilova, L., Petrova, T., Tsenov, N., Feller, U., 2012. Long-term field drought affects leaf protein pattern and chloroplast ultrastructure of winter wheat in a cultivar-specific manner. J. Agron. Crop Sci. 198, 104–117.
- Vierling, E., 1991. The roles of heat shock proteins in plants. Annual review of plant biology 42, 579–620.
- Voesenek, L., Vandersman, A., Harren, F., Blom, C., 1992. An Amalgamation Between Hormone Physiology and Plant Ecology a Review. J. Plant Growth Regul. 11, 171–188.
- Voesenek, L.A.C.J., Colmer, T.D., Pierik, R., Millenaar, F.F., Peeters, A.J.M., 2006. How plants cope with complete submergence. New Phytologist 170, 213–226.
- Voesenek, L.A.C.J., Rijnders, J.H.G.M., Peeters, A.J.M., van de Steeg, H.M., de Kroon, H., 2004. Plant hormones regulate fast shoot elongation under water: from genes to communities. Ecology 85, 16–27.
- Vreeburg, R.A.M., Benschop, J.J., Peeters, A.J.M., Colmer, T.D., Ammerlaan, A.H.M., Staal, M., Elzenga, T.M., Staals, R.H.J., Darley, C.P., McQueen-Mason, S.J., Voesenek, L.A.C.J., 2005. Ethylene regulates fast apoplastic acidification and expansin A transcription during submergence-induced petiole elongation in Rumex palustris. The Plant Journal 43, 597–610.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A., 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. Trends in Plant Science 9, 244–252.
- Waters, E.R., Aevermann, B.D., Sanders-Reed, Z., 2008. Comparative analysis of the small heat shock proteins in three angiosperm genomes identifies new subfamilies and reveals diverse evolutionary patterns. Cell Stress Chaperones 13, 127–142.
- Weihe, K. v., Reese, G., 1968. *Deschampsia wibeliana* (Sonder) Parlatoren Beiträge zur Monographie einer Art des Tidegebietes, Botanische Jahrbücher 88, 1–48.
- Weiss, W., Görg, A., 2007. Two-dimensional electrophoresis for plant proteomics, in: Thiellement, H., Zivy, M., Damerval, C., Méchin, V. (Eds.), Plant Proteomics, Methods in Molecular Biology. Humana Press, pp. 121–143.
- Wetson, A.M., Zoerb, C., John, E.A., Flowers, T.J., 2012. High phenotypic plasticity of *Suaeda maritima* observed under hypoxic conditions in relation to its physiological basis. Ann. Bot. 109, 1027–1036.
- Whitehill, J.G.A., Popova-Butler, A., Green-Church, K.B., Koch, J.L., Herms, D.A., Bonello, P., 2011. Interspecific proteomic comparisons reveal ash phloem genes potentially involved in constitutive resistance to the emerald ash borer. PLoS ONE 6, e24863.
- Wignarajah, K., Greenway, H., 1976. Effect of anaerobiosis on activities of alcohol dehydrogenase and pyruvate decarboxylase in roots of *Zea mays*. New Phytologist 77, 575–584.

- Wright, J.C., Beynon, R.J., Hubbard, S.J., 2010. Cross species proteomics. Methods Mol. Biol. 604, 123–135.
- Xu, K., Xu, X., Fukao, T., Canlas, P., Maghirang-Rodriguez, R., Heuer, S., Ismail, A.M., Bailey-Serres, J., Ronald, P.C., Mackill, D.J., 2006. Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. Nature 442, 705–708.
- Yan, B., Dai, Q., Liu, X., Huang, S., Wang, Z., 1996. Flooding-induced membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in corn leaves. Plant and soil 179, 261–268.
- Ye, C., Zhang, K., Deng, Q., Zhang, Q., 2013. Plant communities in relation to flooding and soil characteristics in the water level fluctuation zone of the Three Gorges Reservoir, China. Environ. Sci. Pollut. Res. 20, 1794–1802.
- Zhang, N., Portis Jr, A.R., 1999. Mechanism of light regulation of Rubisco: a specific role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f. Proceedings of the National Academy of Sciences 96, 9438–9443.

#### Internetquellen

Daten der FGG Elbe; Datenquelle: www.fgg-elbe.de.; abgerufen am 11.06.13

#### 8. Anhang

**Anhang 1: Identifizierte Proteine aus** *Deschampsia* (Klimakammerversuch). Ergänzend zu Tabelle 2 sind die Zugangsnummern (*NCBI Sequence Reference Database* (RefSeq), Swiss-Prot) der Proteine aufgeführt, gegen die die homologen Proteine aus *Deschampsia* annotiert wurden. Außerdem sind für jedes Protein die massenspektrometrische Methode, der *Mascot-Score* und die Zahl der identifizierten Peptide aufgeführt.

Spot-ID	Proteinname	Zugangsnummer	Mascot score	Zahl identifizierter Peptide	Taxonomie	Massenspektrometrische Methode
658	RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta, chloroplastic	Q43831	134	7	Secale cereale	LTQ-Orbitrap-MS
661	PREDICTED: Chaperonin 60 subunit beta 1, chloroplastic-like	XP_003557154.1	1020	20	Triticum aestivum	LTQ-Orbitrap-MS
664	PREDICTED: Chaperonin 60 subunit beta 1, chloroplastic-like	XP_003557154.1	331	9	Triticum aestivum	LTQ-Orbitrap-MS
863	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	NP_001105603.1	923	23	Zea mays	LTQ-Orbitrap-MS
4002	PREDICTED: Mannose/glucose-specific lectin-like	XP_003578759.1	131	2	Brachypodium distachyon	LTQ-Orbitrap-MS
1040	PREDICTED: Mannose/glucose-specific lectin-like	XP_003578759.1	885	23	Brachypodium distachyon	LTQ-Orbitrap-MS
1120	PREDICTED: 20 kDa chaperonin, chloroplastic-like	XP_003578175	240	4	Brachypodium distachyon	MALDI-TOF
1149	Catalytic/ oxidoreductase, acting on NADH or NADPH	NP_001147354.1	49	3	Zea mays	MALDI-TOF
1206	Flavodoxin-like quinone reductase 1	NP_200261.1	124	3	Arabidopsis. Thaliana	MALDI-TOF
1915	ATP synthase CF1 alpha subunit (chloroplast)	YP_874733.1	153	4	Agrostis stolonifera	LTQ-Orbitrap-MS
5229	Fructose-bisphosphate aldolase cytoplasmic isozyme	XP_003564871.1	398	13	Brachypodium distachyon	LTQ-Orbitrap-MS
6683	PREDICTED: Cadmium/zinc-transporting ATPase 3-like	XP_003561282	230	5	Brachypodium distachyon	MALDI-TOF
6736	PREDICTED: Peroxidase 1	XP_003567636.1	756	14	Brachypodium distachyon	LTQ-Orbitrap-MS
6121	PREDICTED: Chaperonin 60 subunit beta 1, chloroplastic-like	XP_003557154.1	461	12	Triticum aestivum	LTQ-Orbitrap-MS
1060	FerredoxinNADP reductase, leaf isozyme	NP_001149023.1	84	6	Zea mays	MALDI-TOF

Anhang 2: Identifizierte Proteine aus *Deschampsia* (Freilandversuch). Ergänzend zu Tabelle 5 sind die Zugangsnummern (NCBI, Swiss-Prot) der Proteine aufgeführt, gegen die die homologen Proteine aus *Deschampsia* annotiert wurden. Außerdem werden für jedes Protein die m/z-Werte sowie die Aminosäuresequenz der gefundenen Peptide gezeigt. k. A = Keine Angaben zu den entsprechenden Peptiden, da die Identifizierung manuell auf Grundlage der Transkriptomdatenbanken von *D. cespitosa* und *D. wibeliana* durchgeführt wurde. In Klammern: Spot-IDs von Proteinen aus dem Klimakammerversuch, die durch einen softwarebasierten Gelvergleich zugeordnet werden konnten.

Spot-ID	Masse m/z	Proteinname	Zugangsnummer	Peptidsequenz	Start-Ende	Datenbank	Taxonomie
469 (655)	850.9036	CPN-60 beta 1	P21240	K.AAVEEGIVVGGGCTLLR.L	459 – 475	Swiss-Prot	Arabidopsis thaliana
914	828.80	Superoxide dismutase [Cu-Zn] 2	078310	GTSQVEGVVTLTQEDDGPTSVSVR		Swiss-Prot	Arabidopsis thaliana
570 (835)	784.8036	Glycerate dehydrogenase	NP_001045589	M.AKPISIEVWNPSGK.Y	2 - 15	NCBInr	Oryza sativa
612	819.4036	RuBisCO activase A	Q40073	K.GIFQTDNVSDESVVK.I	308 - 322	Swiss-Prot	Hordeum vulgare
	941.9036			K.IVDTFPGQSIDFFGALR.A	323 - 339		
620	796.9036	Fructose-bisphosphate aldolase	ACG36798	K.IVDILVEQGIVPGIK.V	122 - 136	NCBInr	Zea mays
	694.3036		Q40677	R.LASIGLENTEANR.Q	73 - 85	Swiss-Prot	Oryza sativa
389 (501)	866.9036	Methionine synthase(1)	BAD34660	K.AAGASWIQFDEPTLVK.D	197 – 212	NCBInr	Hordeum vulgare
	600.8036			K.FALESFWDGK.S	19 - 28		
405 (504)	900.5036	Methionine synthase(2)	CAJ01714	K.TLTSLSGVTAYGFDLVR.G	254 – 270	NCBInr	Hordeum vulgare
	866.9036	Methionine synthase(1/2)		K.AAGASWIQFDEPTLVK.D	197 - 212		
	704.8036	RuBisCO large subunit	003042	K.LTYYTPEYETK.D	22 - 32	Swiss-Prot	Arabidopsis thaliana
455	850.9036	CPN-60 beta 1(2/3)	P21240	K.AAVEEGIVVGGGCTLLR.L	459 – 475	Swiss-Prot	Arabidopsis thaliana
	642.8036	CPN-60 beta	Q43831	R.DLINVLEEAIR.G	95 - 105	Swiss-Prot	Secale cereale
457	850.9036	CPN-60 beta 1(2/3)	P21240	K.AAVEEGIVVGGGCTLLR.L	459 – 475	Swiss-Prot	Arabidopsis thaliana
790	613.8036	PR-1 like protein	BAA34937	K.WSYSLANAASR.L	71 - 81	NCBInr	Camellia sinensis
	622.8036	Oxygen-evolving enhancer protein 2	Q00434	K.QYYSITVLTR.T	198 - 207	Swiss-Prot	Triticum aestivum
448 (623)	717.8036	Phosphoglyceromutase	P30792	R.GWDAQVLGEAPYK.F	224 - 236	Swiss-Prot	Zea mays
	933.9036		NP_001044625	K.ASDQYLPPFVIVDESGK.S	253 – 269	NCBInr	Oryza sativa

#### Fortsetzung von Anhang 2

Spot-ID	Masse m/z	Proteinname	Zugangsnummer	Peptidsequenz	Start-Ende	Datenbank	Taxonomie
571	819.4036	RuBisCO activase A	Q40073	K.GIFQTDNVSDESVVK.I	308 - 322	Swiss-Prot	Hordeum vulgare
	941.9036			K.IVDTFPGQSIDFFGALR.A	323 - 339		
582	666.8036	Fructose-bisphosphate aldolase	P08440	K.GILAADESTGTIGK.R	25 - 38	Swiss-Prot	Zea mays
	673.8036		BAA02729	K.VAPEVIAEYTVR.T	238 - 249	NCBInr	Oryza sativa
759	743.8036	2-Cys peroxiredoxin BAS1	Q6ER94	K.SFGVLIPDQGIALR.G	177 - 190	Swiss-Prot	Oryza sativa
	1005.9036	2-Cys peroxiredoxin BAS1	P80602	K.APDFAAEAVFDQEFINVK.L	24 - 41	Swiss-Prot	Triticum aestivum
	974.0036	20 kDa chaperonin	XP_003578175	K.VAEAEEETSGGLLLTQATK.E	168 - 186	NCBInr	Brachypodium distachyon
779	622.3036	Oxygen-evolving enhancer protein 2	Q00434	K.QYYSITVLTR.T	198 - 207	Swiss-Prot	Triticum aestivum
	925,4	Oxygen-evolving enhancer protein 2		K.TDSEGGFESDAVAhgNVLESSAPVVDG			
548	882.0036	Phosphoglycerate kinase	XP_003568189	K.LVAALPNGAVLLLENVR.F	179 - 195	NCBInr	Brachypodium distachyon
	550.7036	Phosphoglycerate kinase	P12782	K.IGVIESLLEK.C	278 – 287	Swiss-Prot	Triticum aestivum
	803.8036	S-adenosylmethionine synthase 1	A6XMY9	R.NIGFISDDVGLDADR.C	77 - 91	NCBInr	Triticum monococcum
620 (898)	796.9036	Fructose-bisphosphate aldolase	ACG36798	K.IVDILVEQGIVPGIK.V	122 - 136	NCBInr	Zea mays
	694.3036		Q40677	R.LASIGLENTEANR.Q	73 - 85	Swiss-Prot	Oryza sativa
463 (656)	850.8036	Chaperonin 60 subunit beta 1	P21240	K.AAVEEGIVVGGGCTLLR.L	459 – 475	Swiss-Prot	Arabidopsis thaliana
	833.9036	CPN60-1(chaperonin)	BAK05600	K.LLEQDNTDLGYDAAK.G	500 - 514	NCBInr	Hordeum vulgare
419	839.9036	AtHsc70-3	065719	K.NQVAMNPINTVFDAK.R	60 - 74	Swiss-Prot	Arabidopsis thaliana
	719.8036	AtHsp70-18	Q9C7X7	K.VQQLLQDFFNGK.E	352 - 363	Swiss-Prot	Arabidopsis thaliana
461 (651)	748.9036	CPN-60 alpha	P08823	R.GYISPQFVTNLEK.S	198 - 210	Swiss-Prot	Triticum aestivum
	886.0036	CPN-60 alpha		R.AIELANPMENAGAALIR.E	59 - 75	NCBInr	Triticum aestivum
609	k. A	PREDICTED: quinone oxidoreductase-like protein At1g23740, chloroplastic-like	XP_003574429.1	FVVTSDGSVLTK	k. A	NCBI RefSeq	Brachypodium distachyon
467	655.8036	Chaperonin 60 subunit beta 1	XP_003557154	K.VIAAGANPVQITR.G	160 - 172	NCBInr	Brachypodium distachyon
	776.9036	T-complex protein 1 subunit theta	XP_003619011	K.VAVFAGGVDTSATETK.G	211 - 226	NCBInr	Medicago truncatula

#### Fortsetzung von Anhang 2

Spot-ID	Masse m/z	Proteinname	Zugangsnummer	Peptidsequenz	Start-Ende	Datenbank	Taxonomie
615	628.8036	NAD dependent epimerase/dehydratase	XP_002512541	K.GFDVVYDINGR.E	132 - 142	NCBInr	Ricinus communis
	692.8036	GADPH	CAA30152	R.AAALNIVPTSTGAAK.A	248 - 262	NCBInr	Zea mays
576	702.8036	Glycerate dehydrogenase	P13443	R.EGMATLAALNVLGK.I	330 - 343	Swiss-Prot	Cucumis sativus
	562.8036	Glycerate dehydrogenase-like	XP_003573386	R.IVEADQFMR.A	138 - 146	NCBInr	Brachypodium distachyon
588 (829)	905.6036	Glutamine synthetase	Q06378	K.IIAEYIWIGGSGMDLR.S	19 - 34	Swiss-Prot	Hordeum vulgare
578	819.9036	RCAA	Q40073	K.GIFQTDNVSDESVVK.I	308 - 322	Swiss-Prot	Hordeum vulgare
	1045.0036	RCAA,RCAB	Q42450	R.VPIIVTGNDFSTLYAPLIR.D	265 - 283	Swiss-Prot	Hordeum vulgare
	941.9036	RCAA,RCAB		K.IVDTFPGQSIDFFGALR.A		Swiss-Prot	Hordeum vulgare
548	710.8036	Phosphoglycerate kinase	P12782	K.ELDYLDGAVSNPK.R	250 - 262	Swiss-Prot	Triticum aestivum
	787.8036	3-phosphoglycerate kinase	ACO40260	K.GVTTNIGGGDSVAAVEK.V	276 – 292	NCBInr	Henrardia persica
	892.9036	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogena	XP_003558903	R.ENSPLEVVVINDSGGVR.N	103 - 119	NCBInr	Brachypodium distachyon
397	866.9036	Methionine synthase	BAD34660	K.AAGASWIQFDEPTLVK.D	197 – 212	NCBInr	Hordeum vulgare
	1134.9036			K.EVEDLEAGGIQVIQIDEAALR.E	590 - 610		
8244	k. A.	PREDICTED: mannose/glucose-specific	XP_003578759.1	TTQTVIQSLK	k. A	NCBI RefSeq	Brachypodium distachyon
703		lectin-like		TSGTPFDAEVPEDK			
694							
691 (1015)				VELGPNEIVK			
				TSGTPFDAELPEDK			
				MQSLPTLTK			

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Kai Jensen, Prof. Eva-Maria Pfeiffer und Prof. Annette Eschenbach dafür bedanken, dass ich meine Promotion im Rahmen von *ESTRADE* anfertigen durfte. Ich würde mich sehr freuen, wenn "unsere" Graduiertenschule noch weiteren Doktorandengenerationen die Möglichkeit einer so hervorragenden Ausbildung bietet.

Mein besonderer Dank geht an Prof. Udo Wienand, der mich vor fünf Jahren in seine Arbeitsgruppe aufgenommen und stets unterstützt hat. Danke für Deine Betreuung! Und danke dafür, dass du Dich auch über den Laboralltag hinaus so engagierst. Ich hoffe, noch mindestens zwei Betriebsausflügen beiwohnen zu dürfen!

Ich möchte mich bei PD Dr. Klaus von Schwartzenberg dafür bedanken, dass er das Zweitgutachten meiner Arbeit übernommen hat.

Und natürlich bedanke ich mich bei meinen Kollegen der Arbeitsgruppe AMPI. Ich kann mich an kaum einen Tag erinnern, an dem ich nicht gerne ins Labor gekommen bin. Ich danke Dagmar und Edelgard für ihre gute Laune am Morgen und Helga für ihre große Hilfsbereitschaft. Danke Ulrike, dass Du mich in Deinem Labor aufgenommen hast, es war eine lustige Zeit! Jantje und Reinhold danke ich für die vielen Gespräche, auch über die Biologie hinaus und Jantje im Besonderen für ihre klugen Korrekturen. Danke Katja für's Bekanntmachen mit Tanja © und für die (holländischen) Backstunden. Danke Kerstin und Kayo... es ist zu ruhig seit ihr weg seit...

Ein großer Dank geht an meine ESTRADE-Kollegen, für die interessanten und schönen Veranstaltungen, die wir in den letzten Jahren zusammen erlebt haben (Danke Tobi, Danke Andrea!).

Nicht zu guter Letzt – aber in besonderem Maße – danke ich meinem Kollegen und guten Freund David Müller für die vielen Stunden an der Elbe und am Photometer (und gelegentlich am Tresen), bei bester kultureller Begleitung. MILK, Kollege!

Ich danke meinen Eltern und meinen Großeltern für die jahrelange Unterstützung und meinen Freunden dafür, dass sie immer da sind, wenn ich sie brauche!

Ohne René wären die letzten Jahre nicht das gewesen, was sie geworden sind. Ich danke Dir für die Möglichkeiten, die Du mir eröffnet hast! Ich habe viel von Dir gelernt.