

**Beitrag axialer und radialer Parenchyme zur
Kernholzbildung in *Robinia pseudoacacia* L.**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades an der Fakultät für
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,
Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Andreas Kampe

Hamburg, 2015

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Prof. Dr. E. Magel
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Priv.-Doz. Dr. M. FLADUNG
Tag der Disputation: 02. Juli 2015



Professor Dr. D. Hanelt
Vorsitzender des
Fach-Promotionsausschusses Biologie

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand an der Universität Hamburg, Zentrum Holzwirtschaft.

Für die Unterstützung möchte ich mich bei folgenden Personen bedanken.

Prof. Dr. Elisabeth Magel für die Betreuung während der Promotion, die vielen konstruktiven Gespräche sowie die abschließende Begutachtung meiner Arbeit.

PD Dr. Matthias Fladung, für die Bereitschaft das Zweitgutachten zu übernehmen.

Auch bei den weiteren Mitgliedern des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Jörg Ressel, Prof. Dr. Andreas Krause und Prof. Dr. Michael Köhl möchte ich mich bedanken.

Tanja Plambeck und Muriel Gatzke danke ich für die Mitarbeit an diesem Projekt im Rahmen ihrer Bachelorarbeiten.

Mein spezieller Dank gilt dem Gärtner-Team des Thünen Instituts, im Besonderen Uwe Werth, ohne den die Probenahme nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke allen Mitarbeitern der AG, speziell Ute Moreth sowie den zahlreichen Doktoranden und Praktikanten für ihre Hilfe und die gute Atmosphäre im Team.

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Biologische und biochemische Grundlagen der Kernholzbildung (Typ 1).....	4
1.2	Die Rolle axialer und radialer Parenchyme bei der Kernholzbildung	6
1.3	Genexpressionsstudien zur Kernholzbildung	9
1.4	Die Robinie als Modellbaum der Kernholzbildung	10
1.5	Untersuchte Marker- und Kandidatengene	12
1.5.1	Die heat shock 70 Genfamilie (HS70).....	12
1.5.2	Die 14-3-3 Genfamilie.....	14
1.5.3	Chalkonsynthese	19
1.5.4	Phenylalanin-Ammonium-Lyase	20
1.6	Lasermikrodissektion	21
1.7	Ziele der Arbeit	23
2	Material und Methoden	25
2.1	Pflanzenmaterial	25
2.1.1	Proben des Jahres 2012.....	25
2.1.2	Proben des Jahres 2008.....	28
2.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	28
2.3	Lasermikrodissektion zur Isolierung von Axial- und Radialparenchym	32
2.3.1	Prinzip der Lasermikrodissektion	32
2.3.2	Vorbereitung des Probenmaterials.....	34
2.3.3	Durchführung der Lasermikrodissektion.....	36
2.4	Extraktion von Nukleinsäuren	37
2.4.1	Extraktion von Gesamt-RNA aus Gesamtgewebe	37
2.4.2	Extraktion von RNA aus mikrodissektiertem Probenmaterial	39
2.5	Aufbereitung der extrahierten Nukleinsäuren	41
2.5.1	DNase-Verdau.....	41
2.5.2	Reverse Transkription.....	41
2.5.3	Amplifikation des gesamten Transkriptoms.....	42

2.6	Amplifikation der cDNA mittels PCR	43
2.6.1	Prinzip der PCR.....	43
2.6.2	Primerdesign	45
2.6.3	Durchführung der PCR mit cDNA-Template, erhalten aus Gesamtgewebe.....	45
2.7	Agarosegelelektrophorese	46
2.8	Aufreinigung der PCR-Produkte.....	47
2.9	Sequenzierung und Sequenzanalyse.....	48
2.10	Klonierung von Genfragmenten	49
2.10.1	Ligation, Transformation und Kultivierung auf LB-Agarplatten.....	50
2.10.2	M13 PCR und Flüssigkulturen	51
2.11	Genexpressionsstudien mittels Real-Time PCR.....	52
2.11.1	Prinzip der Real-Time PCR und der relativen Expression	52
2.11.2	Primerdesign	53
2.11.3	Durchführung der Real-Time PCR	53
2.11.4	Ermittlung der Amplifikationseffizienz und der relativen Expression	55
3	Ergebnisse	57
3.1	Überprüfung der RNA-Qualität, des DNase-Verdau und der reversen Transkription	57
3.2	Identifizierung der Gensequenz der Kandidatengene.....	59
3.2.1	Erarbeitung von degenerierten Primern	59
3.2.2	Amplifikation und Sequenzierung mit degenerierten Primern.....	62
3.2.3	Erarbeitung genspezifischer Primer	63
3.2.4	Amplifikation und Sequenzierung mit genspezifischen Primern	64
3.3	Ergebnisse der Klonierungen.....	65
3.4	Erarbeitung und Überprüfung von Primern für die Real-Time PCR	73
3.5	Ergebnisse der Genexpressionsstudien an RNA aus Gesamtgewebe	78
3.5.1	Relative Expressionen der <i>Rp14-3-3</i> Genfamilie.....	79
3.5.2	Relative Expression von <i>RpHS70</i>	90
3.5.3	Relative Expression von <i>RpCHS3</i>	93

3.5.4	Relative Expression von <i>RpPAL1</i>	96
3.6	Isolierung axialer und radialer Parenchyme mittels Lasermikrodissektion	97
3.6.1	Aufbereitung des dissektierten Materials	100
3.7	Ergebnisse der Genexpressionsstudien an RNA, erhalten aus Radialparenchym	102
3.7.1	Relative Expression von <i>Rp14-3-3Gen1</i>	102
3.7.2	Relative Expression von <i>Rp14-3-3Gen2</i>	103
3.7.3	Relative Expression von <i>Rp14-3-3Gen3</i>	104
3.7.4	Relative Expression von <i>RpHS70</i>	105
3.7.5	Relative Expression von <i>RpCHS3</i>	106
3.7.6	Relative Expression von <i>RpPAL1</i>	107
3.8	Ergebnisse der Genexpressionsstudien an RNA, erhalten aus Axialparenchym.....	108
4	Diskussion	111
4.1	Extraktion, Aufarbeitung und Qualität der Gesamt-RNA aus Gesamtgewebe	111
4.2	Identifizierung der Kandidatengene	112
4.3	Klonierung und Einteilung der Gene innerhalb der Genfamilien.....	114
4.3.1	Klonierung des 14-3-3 Genfragments	114
4.3.2	Klonierung des HS70 Genfragments	115
4.4	Real-Time PCR-basierte Genexpressionsstudien.....	116
4.5	Genexpressionsstudien an RNA aus Gesamtgewebe.....	120
4.5.1	Die <i>Rp14-3-3</i> Genfamilie	120
4.5.2	Das <i>RpHS70</i> Gen.....	124
4.5.3	Die Markergene <i>RpPAL1</i> und <i>RpCHS3</i>	125
4.5.4	Fazit der Genexpressionsstudien an RNA aus Gesamtgewebe	128
4.6	Erstellen eines Assays zur Lasermikrodissektion und Aufbereitung des dissektierten Parenchymmaterials.....	128
4.7	Genexpressionsstudien an axialen und radialen Parenchymenten und deren Beitrag zur Kernholzbildung	132

4.8	Schlussfolgerung und Ausblick	135
5	Zusammenfassung	137
6	Abkürzungsverzeichnis.....	139
7	Literaturverzeichnis.....	141
8	Anhang	164

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1:	Übersicht der verschiedenen Gewebe im Stamm.....	2
Abbildung 1-2:	Zusammenhang zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel während der Kernholzbildung.....	6
Abbildung 1-3:	Radialschnitt von <i>Robinia pseudoacacia</i>	11
Abbildung 2-1:	Querschnitt eines Robinienstammes.....	27
Abbildung 2-2:	Aufbau des PALM [®] MicroBeam Systems.....	33
Abbildung 2-3:	Schematische Darstellung des Strahlengangs im PALM [®] MicroBeam.	34
Abbildung 2-4:	Thermoprofil der Real-Time PCR-Experimente.....	55
Abbildung 3-1:	Agarosegel (1,5 %) zur Überprüfung der Gesamt-RNA-Extraktion aus Gesamtgewebe.....	58
Abbildung 3-2:	Überprüfung des DNase-Verdau und der reversen Transkription.	59
Abbildung 3-3:	Beispiel für ein Sequenzchromatogramm mit überlagernden Peaks...	63
Abbildung 3-4:	Dokumentation der M13 PCR.....	66
Abbildung 3-5:	Nukleotidsequenzalignment (5'-3') der Klone des 14-3-3 Genfragments.	67
Abbildung 3-6:	Alignment der Aminosäuresequenz der Klone des 14-3-3 Genfragments.....	69
Abbildung 3-7:	Nukleotidsequenzalignment (5'-3') der Klone des HS70 Genfragments.	71
Abbildung 3-8:	Alignment der Aminosäuresequenz der Klone des HS70 Genfragments.....	71
Abbildung 3-9:	Sequenzchromatogramm nach Amplifikation mit Real-Time PCR- Primern.....	76
Abbildung 3-10:	Schmelzkurven nach Real-Time PCR-Lauf zur Ermittlung der Amplifikationseffizienzen.....	78

Abbildung 3-11: Relative Expression des <i>Rp14-3-3Gen1</i> in den verschiedenen Gewebezonen der Proben von 2008 und 2012 im Jahresverlauf.	80
Abbildung 3-12: Relative Expression des <i>Rp14-3-3Gen1</i> in der Splint-Kern-Übergangszone der Proben von 2008 und 2012 im Jahresverlauf.	82
Abbildung 3-13: Relative Expression des <i>Rp14-3-3Gen2</i> in den verschiedenen Gewebezonen der Proben von 2008 und 2012 im Jahresverlauf.	84
Abbildung 3-14: Relative Expression des <i>Rp14-3-3Gen2</i> in der Splint-Kern-Übergangszone der Proben von 2008 und 2012 im Jahresverlauf.	86
Abbildung 3-15: Relative Expression des <i>Rp14-3-3Gen3</i> in den verschiedenen Gewebezonen der Proben von 2008 und 2012 im Jahresverlauf.	87
Abbildung 3-16: Relative Expression des <i>Rp14-3-3Gen3</i> in der Splint-Kern-Übergangszone der Proben von 2008 und 2012 im Jahresverlauf.	89
Abbildung 3-17: Relative Expression von <i>RpHS70</i> in den verschiedenen Gewebezonen der Proben von 2008 und 2012 im Jahresverlauf.	91
Abbildung 3-18: Relative Expression von <i>RpHS70</i> in der Splint-Kern-Übergangszone der Proben von 2008 und 2012 im Jahresverlauf.	92
Abbildung 3-19: Relative Expression von <i>RpCHS3</i> in den verschiedenen Gewebezonen der Proben von 2008 und 2012 im Jahresverlauf.	94
Abbildung 3-20: Relative Expression von <i>RpCHS3</i> in der Splint-Kern-Übergangszone der Proben von 2008 und 2012 im Jahresverlauf.	95
Abbildung 3-21: Relative Expression von <i>RpPAL1</i> in der Splint-Kern-Übergangszone der Proben von 2008 und 2012 im Jahresverlauf.	97
Abbildung 3-22: Radialschnitt von <i>Robinia pseudoacacia</i> unter dem Mikroskop des PALM [®] MicroBeam Systems.	99
Abbildung 3-23: Mikroskopische Überprüfung der LMPC.	100
Abbildung 3-24: Überprüfung der Transkriptomamplifikation mittels 18S PCR.	101
Abbildung 3-25: Relative Expression des <i>Rp14-3-3Gen1</i> in den Radialparenchymen der Splint-Kern-Übergangszone der Proben von 2012 im Jahresverlauf.	103
Abbildung 3-26: Relative Expression des <i>Rp14-3-3Gen2</i> in den Radialparenchymen der Splint-Kern-Übergangszone der Proben von 2012 im Jahresverlauf.	104
Abbildung 3-27: Relative Expression des <i>Rp14-3-3Gen3</i> in den Radialparenchymen der Splint-Kern-Übergangszone der Proben von 2012 im Jahresverlauf.	105
Abbildung 3-28: Relative Expression des <i>RpHS70</i> Gens in den Radialparenchymen der Splint-Kern-Übergangszone der Proben von 2012 im Jahresverlauf.	106
Abbildung 3-29: Relative Expression des <i>RpCHS3</i> Gens in den Radialparenchymen der Splint-Kern-Übergangszone der Proben von 2012 im Jahresverlauf.	107

Abbildung 3-30: Relative Expression des <i>RpPAL1</i> Gens in den Radialparenchymenten der Splint-Kern-Übergangszonen der Proben von 2012 im Jahresverlauf.	108
Abbildung 3-31 Dissoziations- und Amplifikationskurven der Genexpressionsstudie an <i>RpCHS3</i> aus Axialparenchym der Proben des Jahres 2012.	110
Abbildung 4-1: Tangentialschnitt der Robinie zur Bestimmung der durchschnittlichen Größe von radialen Parenchymzellen.	131

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Probennummer, Fällort und Fällzeitpunkt der Robinienproben des Jahres 2012/2013.	26
Tabelle 2-2: Probennummer, Fällzeitpunkt und als Holzmehl vorhandene Gewebezonen der Robinienproben des Jahres 2008.	28
Tabelle 2-3: Verwendete Geräte.	29
Tabelle 2-4: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.	30
Tabelle 2-5: Verwendete Kits.	32
Tabelle 2-6: Extraktion von Gesamt-RNA aus Gesamtgewebe mit dem Qiagen RNeasy® Plant Mini Kit.	38
Tabelle 2-7: Extraktion von RNA mit dem Qiagen RNeasy® Plus Universal Mini Kit.	40
Tabelle 2-8: Ansatz des DNase-Verdau.	41
Tabelle 2-9: Mastermix 1 der reversen Transkription mit dem SuperScript® III First-Strand Synthesis Kit von Thermo Scientific.	42
Tabelle 2-10: Mastermix 2 der reversen Transkription mit dem SuperScript® III First-Strand Synthesis Kit von Thermo Scientific.	42
Tabelle 2-11: Reaktionsansätze zur Transkriptomamplifizierung mittels Qiagen QuantiTect Whole Transcriptome Kit.	43
Tabelle 2-12: Temperaturprogramm zur Transkriptomamplifizierung mittels Qiagen QuantiTect Whole Transcriptome Kit.	43
Tabelle 2-13: Pipettierschema des Qiagen Taq PCR Core Kit.	46
Tabelle 2-14: Temperaturprogramm der PCR mit dem Qiagen Taq PCR Core Kit.	46
Tabelle 2-15: Zusammensetzung von Gel, Laufpuffer und MOPS Puffer für RNA-Gele unter denaturierenden Bedingungen.	47
Tabelle 2-16: Protokoll der Aufreinigung mit dem QIAquick® PCR Purification Kit.	48
Tabelle 2-17: Zusammensetzung des LB-Mediums zur Kultivierung der transformierten Zellen.	50
Tabelle 2-18: Temperaturprogramm der M13 PCR.	51

Tabelle 2-19: Zusammensetzung des Mastermix mit dem Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix.....	54
Tabelle 3-1: 14-3-3 und HS70 GenBank Sequenzen verschiedener Fabaceae.....	60
Tabelle 3-2: IUPAC Nukleotid-Codes und die dazugehörigen Basen.....	61
Tabelle 3-3: Degenerierte Primer zur Amplifikation eines 14-3-3 Genabschnitts.....	61
Tabelle 3-4: Degenerierte Primer zur Amplifikation eines HS70 Genabschnitts.....	61
Tabelle 3-5: Eingesetzte Kombinationen von degenerierten Primern zur Amplifikation eines 14-3-3 Genabschnitts.....	62
Tabelle 3-6: Kombinationen von degenerierten Primern zur Amplifikation eines HS70 Genabschnitts.....	62
Tabelle 3-7: Genspezifische Primer zur Amplifikation eines 14-3-3 Genabschnitts. ...	64
Tabelle 3-8: Genspezifische Primer zur Amplifikation eines HS70 Genabschnitts.....	64
Tabelle 3-9: Eingesetzte Kombinationen von genspezifischen Primern zur Amplifikation eines 14-3-3 Genabschnitts.....	64
Tabelle 3-10: Eingesetzte Kombinationen von genspezifischen Primern zur Amplifikation eines HS70 Genabschnitts.....	65
Tabelle 3-11: Übersicht der für Genexpressionsstudien verwendeten Real-Time PCR-Primer.....	74
Tabelle 3-12: Hang zur Bildung von Sekundärstrukturen und Schmelzpunkte der verwendeten Real-Time PCR-Primer.....	75
Tabelle 3-13: Amplifikationseffizienzen der verwendeten Primerkombinationen für die Real-Time PCR.....	77

1 Einleitung

Die Bildung von „echtem“ oder obligatem Kernholz in den innersten, lebenden Xylemgeweben vieler Bäume ist einer der ökologisch und ökonomisch wichtigsten sekundären Differenzierungsprozesse verholzter Achsen. Der Prozess ist genetisch determiniert und wird von endogenen wie exogenen Faktoren gesteuert.

In den Querschnitten frisch gefällter Stämme lassen sich in zahlreichen Bäumen zwei Zonen erkennen: Das eher helle Splintholz und das davon eingeschlossene Kernholz, das meist eine dunklere Farbe aufweist. Abbildung 1-1 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Gewebe des Stammes. Definiert ist Kernholz als „der innere Bereich des Stammes im stehenden Baum, in dem keine physiologisch aktiven Zellen vorliegen, und in welchem Reservesubstanzen abtransportiert oder in Kerninhaltsstoffe umgewandelt wurden“ (IAWA 1964). Die Hauptfunktion des Splintholzes besteht im Transport von Wasser aus den Wurzeln zu den Blättern, es stellt damit den physiologisch aktiven Teil des Holzes dar (Taylor et al. 2002). Kernholz hingegen enthält weder lebende Zellen noch Reservesubstanzen, daher wird ihm keine physiologische Rolle zugeschrieben (Hillis 1987).

Zwischen Splint- und Kernholz ist die „transition zone“ (TZ, zu deutsch Splint-Kern-Übergangszone) lokalisiert. In diesem Gewebe findet die Kernholzbildung statt (Hillis 1987; Magel et al. 1991; Magel et al. 1994; Hillinger et al. 1996; Magel und Hübner 1997; Magel et al. 2001a; Magel et al. 2001b; Beritognolo et al. 2002).

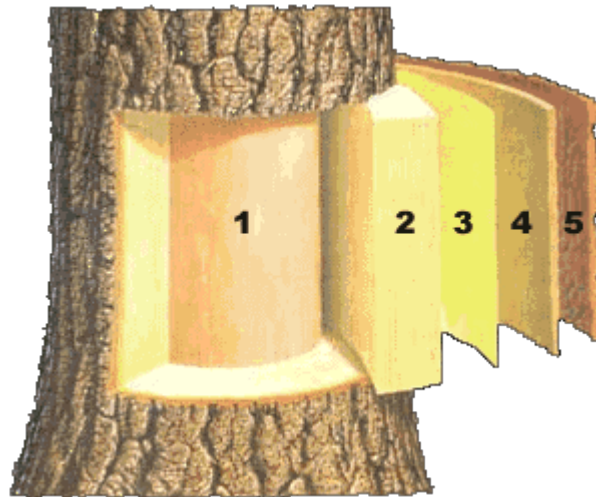


Abbildung 1-1: Übersicht der verschiedenen Gewebe im Stamm.1: Kernholz; 2: Splintholz; 3: Kambium; 4: Bast; 5: Borke (Quelle: www.wald.de).

Die obligate Kernholzbildung wird als sekundärer Differenzierungsprozess des Xylems betrachtet und ist ein Teil des Alterungsprozesses der Pflanze, der mit dem programmierten Zelltod endet (Spicer 2005). Es wird angenommen, dass durch die Kernholzbildung der Splintholzanteil auf ein optimales Level reguliert wird (Bamber 1976; Taylor et al. 2002; Spicer 2005).

Das Splintholz/Kernholzverhältnis ist artabhängig. Der Splintanteil reicht dabei von 1-2 Jahrringen bei *Catalpa speciosa* bis zu 80-100 bei *Nyssa sylvatica* (Hillis 1987). Das Verhältnis ist einerseits genetisch bestimmt, aber auch Umweltfaktoren spielen eine Rolle (Shigo und Hillis 1973).

Das herausragende Charakteristikum des Kernholzes sind die Kerninhaltsstoffe (meist phenolische Komponenten). Diese Sekundärmetabolite sorgen für die dunklere Farbe und verleihen dem Kernholz eine „natürliche Dauerhaftigkeit“ (Freudenberg und Hartmann 1954). Typische Klassen von Kerninhaltsstoffen sind: Tannine, Terpene, Flavonoide, Stilbene, Lignine, aromatische Verbindungen und Lektine (Hillis 1987). Diese penetrieren die Zellwände und weisen antimikrobielle Effekte auf, was dem Holz eine Resistenz gegen holzerstörende Organismen, wie Pilzen und Bakterien, verleiht (Hillis 1987). In *Robinia pseudoacacia* L. kommen die Kerninhaltsstoffe frei vor und nicht in konjugierter Form wie bspw. als Glykosid. In der Robinie sind die Flavonoide Dihydrorobinetin und Robinetin die wichtigsten Kerninhaltsstoffe (Roux und Paulus 1962). Als dritte Hauptkomponente gilt Hydroxyzimtsäure (Magel et al. 1994). Dihydrorobinetin und Robinetin akkumulieren in der Splint-Kern-Übergangszone. Da Robinetin in hohen Konzentrationen im Kernholz gefunden wurde, wird vermutet, dass die Vorstufe Dihydrorobinetin im inneren Teil der Übergangszone in Robinetin

umgewandelt wird. Ob dies durch enzymatische Katalyse oder Oxidationsprozesse geschieht, ist noch unklar (Hahlbrock 1981; Magel 2000)

Zwei Typen der obligaten Kernholzbildung werden unterschieden:

Typ 1 oder *Robinia-Typ* zeichnet sich dadurch aus, dass die phenolischen Komponenten ausschließlich in der Splint-Kern-Übergangszone akkumuliert werden (*in situ*-Synthese). Im alternden, physiologisch aktiven Splintholz liegen keine Vorstufen, wie Glykoside, dieser Komponenten vor (Magel et al. 1991; Magel et al. 1994).

Typ 2 oder *Juglans-Typ* ist dadurch charakterisiert, dass im Splintholz mit zunehmendem Alter phenolische Komponenten (z.B. glykosidische Vorstufen) zentripetal akkumulieren. Im Kernholz sind diese Komponenten nicht zu finden. Während der Kernholzbildung kommt es sowohl zur Transformation der Vorstufen zu Kerninhaltsstoffen sowie zur Neusynthese weiterer Inhaltsstoffe (Dellus et al. 1997b; Dellus et al. 1997a; Burtin et al. 1998; Mayer et al. 2006).

Eine weitere Kategorie der Kernholzbildung stellt die fakultative Kernholzbildung oder Falschkernbildung dar. Anders als bei der obligaten Kernholzbildung ist dieser Prozess nicht genetisch determiniert, sondern auf exogene Faktoren, wie beispielsweise Umweltfaktoren, und mechanische Verletzungen des Xylems und damit einhergehenden Pathogenbefall zurückzuführen. Der Farbkern stellt eine Antwort des Xylems auf die Verwundung dar. Das verwundete Holzgewebe wird dabei von unverletztem Gewebe räumlich abgeschottet. Eine Ausbreitung des Holzpathogens wird so verhindert (Hart und Johnson 1970). Diese Abwehrmechanismen wurden im CODIT- (compartmentalization of decay in trees) Modell zusammengefasst (Shigo und Marx 1977; Shigo 1979, 1984). Der Begriff „decay“ wurde im Weiteren durch „damage“ ersetzt (Liese und Dujesiefken 1989) und das Modell schließlich zum CODIT-Prinzip erweitert (Dujesiefken und Liese 2008). Nach diesem Prinzip sind die durch Verwundung induzierten Reaktionen des Baums in erster Linie auf die Sicherung des Transpirationsstroms, insbesondere durch Verschluss der Gefäße, zu betrachten. Die Abschottung der Pathogene erfolgt im Anschluss. Da es sich bei dieser Art der Kernholzbildung nicht um einen genetisch gesteuerten Prozess, sondern um eine individuelle Wundreaktion handelt, wird in dieser Arbeit ausschließlich die obligate Kernholzbildung untersucht.

1.1 Biologische und biochemische Grundlagen der Kernholzbildung (Typ 1)

Die Kernholzbildung ist der letzte Schritt im Lebenszyklus lebender Xylemzellen auf die der programmierte Zelltod folgt. In der Übergangszone zwischen Splint- und Kernholz sterben die Parenchymzellen. Dieser Vorgang wird genetisch gesteuert. Es erfolgt eine vorübergehende Aktivierung des Primärstoffwechsels, ein Anstieg von Glykolyse und Zellatmung (Höll und Lenzian 1973) sowie schließlich ein Umschalten der metabolischen Aktivitäten vom substrat- und energieliefernden Primär- zum Sekundärstoffwechsel, durch Regulation der Genexpression (Ziegler 1968; Höll und Lenzian 1973; Hillis 1987; Magel 2000), was zur *in situ*-Synthese der Kerninhaltsstoffe führt. Der Zusammenhang zwischen Primär- und Sekundärmetabolismus ist in Abbildung 1-2 in Anlehnung an Ziegler (1968) sowie Magel (2000) schematisch und vereinfacht (2000) dargestellt. Wie bei Alterungsprozessen in krautigen Pflanzen scheint die Aktivierung der Enzyme, die die Synthese der Kerninhaltsstoffe katalysieren, in Zusammenhang mit der Ethylenproduktion zu stehen (Shain und Hillis 1973; Ke und Saltveit jr. 1988; Magel 2000). Die Lipid- und Stärkereserven der Parenchymzellen werden dabei durch Aktivierung von hydrolisierenden Enzymen, wie Amylasen, Phosphatasen und Lipasen, gespalten, im Weiteren zu phenolischen Verbindungen umgesetzt und in umliegendes Gewebe abgegeben (Magel et al. 1997).

Die Splint-Kern-Übergangszone stellt ein „*sink*“-Gewebe dar (Ort hohen Kohlenstoffverbrauchs). Das Ungleichgewicht zwischen Kohlenstoffgerüsten, die in der Übergangszone verfügbar sind, und Kohlenstoffgerüsten, die als phenolische Komponenten im Kernholz fixiert sind, wird durch den steigenden Import von Saccharose aus äußerem Splintgewebe über die Radialparenchyme ausgeglichen. Für die Robinie ergab die Messung der radialen Verteilung nicht struktureller Kohlenhydrate ein „*sink*“-Verhalten der Splint-Kern-Übergangszone im Spätsommer und Herbst (Magel et al. 1994). Die Spaltung der Saccharose dient zunächst hauptsächlich der Energiegewinnung und weniger der Synthese von Kerninhaltsstoffen, ein Umschalten zum Sekundärmetabolismus folgt erst später. (Höll und Lenzian 1973; Magel und Höll 1993). Im Weiteren dienen die Kohlenhydrate (bzw. Kohlenstoffgerüste) als Bausteine für den Sekundärstoffwechsel. Es folgt, von Spätsommer bis Spätherbst, ein Abbau der Stärkereserven, bei gleichzeitig gesteigerten Aktivitäten der Enzyme Saccharose Synthase (SuSy) und Neutrale Invertase, in der Splint-Kern-Übergangszone. Messungen in diesem Gewebe ergaben

ebenfalls erhöhte Transkriptmengen für SuSy im Sommer (Hauch und Magel 1998). Das codierende Gen für das Saccharose spaltende Enzym SuSy gilt daher als Marker für „*sink*“-Gewebe (Xu et al. 1989) und die Kernholzbildung.

Im Weiteren akkumulieren erste phenolischen Komponenten im Cytosol und könnten den mitochondrialen Elektronenfluss inhibieren, daher wird angenommen, dass Mitochondrien als erste Organellen ihre Aktivität einstellen (Ziegler 1968; Hillis 1987). Kohlenstoffgerüste, die aufgrund der inaktiven Mitochondrien akkumulieren, werden zusammen mit Produkten des nun beschleunigten oxidativen Pentosephosphatwegs (Magel et al. 2001b), zunehmend für die Synthese von Kerninhaltsstoffen verwendet. Dieses Umschalten vom Primärmetabolismus zum Sekundärmetabolismus und damit zum oxidativen Pentosephosphatweg wurde bereits histochemisch wie quantitativ bewiesen (Hillis 1987; Magel 2001). Die Synthese der Kerninhaltsstoffe erfolgt schließlich auf dem Weg des Phenylpropanstoffwechsels (Baqui und Shah 1985; Nobuchi und Harada 1985; Hillis 1987; Magel et al. 1991; Magel et al. 1994; Magel und Hübner 1997; Hauch und Magel 1998). Gleichzeitig erfolgt die Expression und Aktivierung von Schlüsselenzymen dieses Sekundärstoffwechselweges, die der Bildung von Kerninhaltsstoffen dienen und als Markergene der Kernholzbildung bezeichnet werden, wie beispielsweise Chalkonsynthase (CHS) und Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) (Magel und Hübner 1997). Der enge Zusammenhang zwischen primärem und sekundärem Stoffwechsel zeigt sich auch in der Korrelation der katalytischen Aktivitäten von SuSy und CHS, bzw. SuSy und PAL von 0,956 und 0,970 (Magel 2000).

In Zusammenhang mit der Akkumulation der Kerninhaltsstoffe kommt es zu einer Copolymerisation zwischen den phenolischen Derivaten und Komponenten der existierenden Zellwände, inklusive der Lignin und Lignin-Polysaccharid-Komplexe. Dieser Mechanismus ist enzymatisch initiiert und chemisch gesteuert. Dies erklärt den relativen Anstieg von Lignin im Kernholz. Da es sich also nicht um eine *de novo*-Synthese handelt, wurde der Begriff „sekundäre Lignifizierung“ (Hergert 1977) durch „Pseudo Lignifizierung“ ersetzt (Magel 2000).

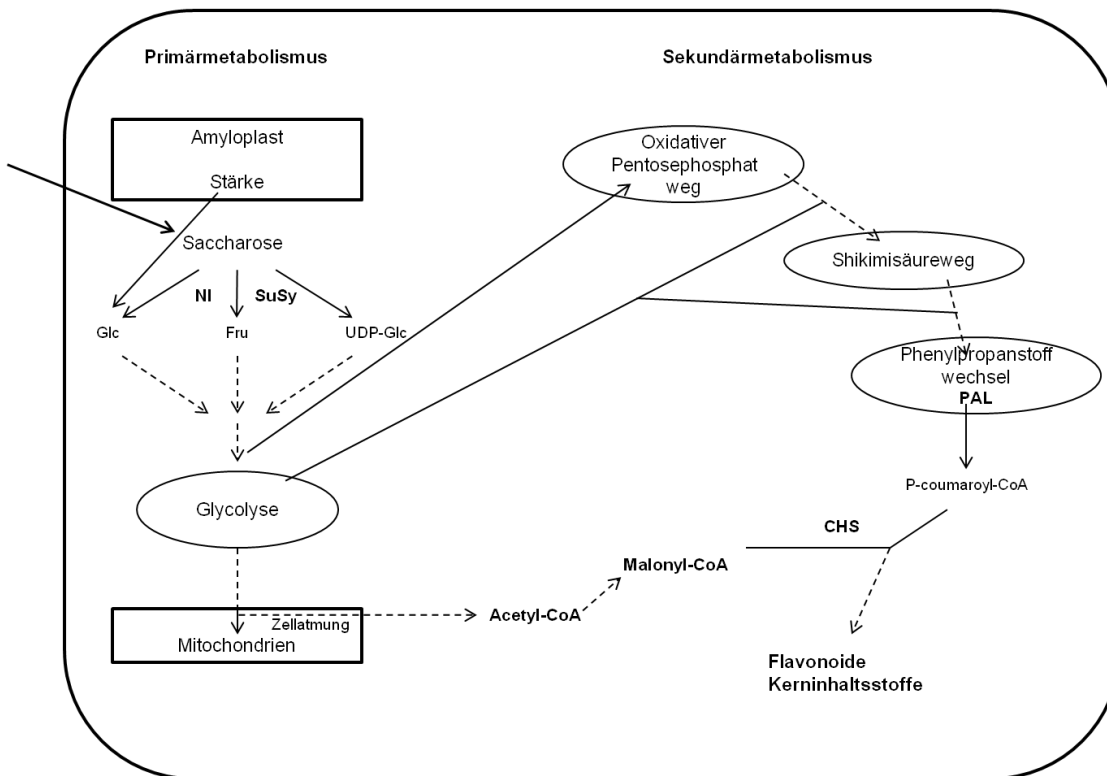


Abbildung 1-2: Zusammenhang zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel während der Kernholzbildung. Schematisierte Darstellung an einer einzeln betrachteten Parenchymzelle in der Übergangszone. Zunächst werden Produkte des Saccharose-Synthase-Wegs, der Glycolyse und Zellatmung zur Energiegewinnung zugeführt. Es folgt ein Umschalten hin zum Sekundärstoffwechsel und dem oxidativem Pentosephosphatweg. NI = Neutrale Invertase; Glc = Glucose; Fru = Fructose; UDP-Glc = Uridindiphosphat-Glucose; CHS = Chalkonsynthase; PAL = Phenylalanin-Ammonium-Lyase.

1.2 Die Rolle axialer und radialer Parenchyme bei der Kernholzbildung

Im sekundären Xylem der Bäume werden zwei Arten von Parenchym unterschieden: Das in Längsrichtung des Stammes ausgerichtete Axialparenchym sowie das in radialer Stammrichtung verlaufende Radialparenchym (Holzstrahlen). Der Anteil am Gesamtgewebe schwankt zwischen verschiedenen Baumarten beträchtlich. Beim Holz der Robinie liegt der Anteil des Radialparenchyms bei 21 %, der des Axialparenchyms bei 6 %. Die restlichen Gewebe bilden Fasern (58 %) und Gefäße (15 %). Beide Parenchyme können als zusammenhängende Grundgewebe bezeichnet werden (Wagenführ 2007).

Eine der wichtigsten Funktionen der Parenchyme ist das Speichern von Reservestoffen. Als Reservestoffe werden hauptsächlich lösliche Kohlenhydrate, Stärke, Fette und Proteine gespeichert. Während bei Nadelhölzern nahezu

ausschließlich die radialen Parenchyme beteiligt sind, sind bei Laubböhlzern auch die axialen Parenchymgewebe von Bedeutung. Bei *Robinia pseudoacacia* L. (Robinie) stellt Stärke den dominierenden Reservestoff dar und findet sich hauptsächlich in den Holzstrahlen wieder (Ziegler 1964; Magel et al. 1997; Sauter und Witt 1997).

Die Lebensdauer der Parenchyme differiert zwischen Angiospermen und Gymnospermen. In den meisten Gymnospermen wird eine Abnahme der lebenden Zellen vom Splintholz in Richtung der Splint-Kern-Übergangszone beobachtet. Bei Angiospermen finden sich hingegen lebende Zellen bis in das innerste Splintholz. Erst in der Übergangszone zum Kernholz wird ein abrupter Abfall beobachtet (Spicer 2005).

Die Parenchymzellen im Splintholz erfahren in ihrem Lebenszyklus, von der Differenzierung im Kambium bis zum Tod in der Splint-Kern-Übergangszone, starke zytologische Veränderungen. Im Kernholz finden sich schließlich keine intakten Protoplasten mehr. Ein weiterer Aspekt ist die Verthyllung von Gefäßen und damit einhergehend deren Abschottung. Im Weiteren ändern sich Gehalt, Form und Größe der Zellen. Es kommt zur Akkumulation von Kerninhaltsstoffen und schließlich zur Degenerierung des Nukleus (Hillis 1987; Taylor et al. 2002; Spicer 2005; Song et al. 2011), ein unwiderlegbares Zeichen für den Zelltod.

Die Desintegration der Parenchymzellen geht mit dem Abbau von Reservesubstanzen wie Stärke, nicht-strukturellen Kohlenhydraten und Triglyceriden einher. Es erfolgt eine graduelle Abnahme von Stärkekörnern vom mittleren Splintholz in Richtung der Splint-Kern-Übergangszone. Phosphatasen hydrolysieren die Stärke im mittleren Splintholz zu Zuckerphosphaten, diese stellen Vorstufen für die spätere Synthese von Lipiden oder Kerninhaltsstoffen dar. Im Axial- und Radialparenchym des äußeren Splintholzes finden sich lipophile Tröpfchen. Die Größe dieser Tröpfchen nimmt in Zellen des mittleren und inneren Splintholzes sowie der Splint-Kern-Übergangszone deutlich zu. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass diese Gewebe Kohlenstoffgerüste für die Synthese von Kerninhaltsstoffen zur Verfügung stellen. Das Kernholz beinhaltet keine Reservesubstanzen. Diese werden während der Kernholzbildung degradiert und spielen so eine wichtige Rolle als Kohlenstoffgerüste für die Biosynthese von phenolischen Komponenten und damit dem Alterungsprozess von radialen Parenchymzellen (Nair et al. 1981; Bhat und Patel 1982; Baqui und Shah 1985; Hillis 1987; Magel 2000, 2002; Lamlo und Savidge 2006; Song et al. 2011; Ucar und Ucar 2011). Da Stärke als wichtigster Reservestoff der Robinie und anderer Bäume hauptsächlich in den Holzstrahlen gefunden wurde, wird vermutet, dass radiale Parenchyme bei der Kerninhaltsstoffsynthese der Robinie die dominierende Rolle spielen (Bamber und Fukazawa 1985; Hillis 1987; Climent et al. 1998).

Im Splint sowie der Splint-Kern-Übergangszone von *Bridelia retusa* sind Nuklei im Radial- wie im Axialparenchym zu finden, wobei sie in der Übergangszone eine fusiforme Gestalt annehmen (Nair et al. 1981). Die Zellen in *Acacia auriculiformis* akkumulieren argininreiche Histone. Hier zeigen die Nuklei gefäßbegleitender und nicht-gefäßbegleitender Axial- bzw. Radialparenchyme unterschiedliche Grade der Desintegrität auf, wobei die gefäßbegleitenden Parenchyme eine höhere Aktivität aufweisen (Bhat und Patel 1980; Bhat und Patel 1982). In *Pinus* wurde der Einfluss benachbarter Zellen auf den Zelltod der Parenchyme während der Kernholzbildung nachgewiesen. Radiale Parenchymzellen, die in Kontakt mit Strahltracheiden stehen, sterben früher als andere Zellen des Strahlparenchyms. Weiter konnten auch keine Polyphenole in diesen kurzlebigen Zellen nachgewiesen werden, was den Schluss zulässt, dass diese Zellen nicht in die Kernholzbildung involviert sind (Nakaba et al. 2008). Weitere Untersuchungen zum zeitlichen Eintreten des Zelltods wiesen darauf hin, dass die Axialparenchyme vor den Radialparenchyms absterben (Nakaba et al. 2012).

Radiale Parenchyme sind in den Mineralstofftransport vom Splint- in das Kernholz involviert (Okada et al. 2011). Der Transport wurde in *Cryptomeria japonica* nachgewiesen. Diese Art lagert große Mengen an Wasser und Mineralien im Kernholz ein (Oda et al. 1994). Da die Splint-Kern-Übergangszone durch eine niedrige Feuchtigkeit gekennzeichnet ist und somit eine natürliche Barriere des radialen Stofftransports darstellt, können Mineralien nur über die lebenden Radialparenchyme in das Kernholz gelangen (Ziegler 1965). Durch Injektion von Rubidium in das Splintholz konnte ein aktiver Transport in das Kernholz, sowohl in der Wachstums-, als auch in der Ruhephase, nachgewiesen werden (Okada et al. 2011, 2012).

Axial- und Radialparenchym synthetisieren bei dieser Art unterschiedliche Komponenten zur Ausprägung des Kernholzfarbtons. Spektrometrische Untersuchungen ergaben, dass im Normalfall das rote Farbspektrum der Längsparenchyme die Farbe des Kernholzes dominiert. Durch die Synthese von terpen-ähnlichen Stoffen, seitens des Strahlparenchyms, kann es zu Verfärbungen kommen (Kuroda und Shimaji 1983).

Generell wird davon ausgegangen, dass sowohl Axial- als auch Radialparenchym Kerninhaltsstoffe synthetisieren (und somit an der Kernholzbildung beteiligt sind). Allerdings synthetisieren sie anscheinend verschiedene Kerninhaltsstoffe und spielen somit unterschiedliche Rollen in diesem Prozess, wie Immunolabelversuche in *Cryptomeria japonica* (Nagasaki et al. 2002), sowie Hybridisationsversuche (Kwon et al. 2001) zeigten.

1.3 Genexpressionsstudien zur Kernholzbildung

Trotz der ökonomischen und ökologischen Bedeutung von Kernholz ist die Regulation der Kernholzbildung auf Genexpressionsebene weitgehend unverstanden. Die geringe Anzahl lebender Zellen in der Splint-Kern-Übergangszone geht mit einem geringen Gehalt und einer geringen Qualität an DNA und RNA einher (Fukazawa und Higuchi 1966; De Filippis und Magel 1998; Magel et al. 2002; Rachmayanti et al. 2009; Abe et al. 2011). Molekulare Methoden stoßen daher bei Untersuchungen dieses Gewebes an ihre Grenzen. Zudem stellen die phenolischen Komponenten einen Störfaktor für derartige Untersuchungen dar (Magel 2002; Magel et al. 2002; Déjardin et al. 2010). Aus diesen Gründen sind molekularbiologische Studien zur Kernholzbildung begrenzt. Die Untersuchung von Genexpressionsprofilen durch Yang und Mitarbeiter (2003), in den verschiedenen Geweben von *Robinia pseudoacacia* erbrachten ein Set von 2.278 „expressed sequence tags“ (ESTs). Gene, die in Zusammenhang mit dem sekundären Stoffwechsel stehen, sind in der Splint-Kern-Übergangszone gegenüber den anderen Geweben deutlich überrepräsentiert. Besonders Gene, die für die Flavonoidbiosynthese codieren zeigen starke Expressionen in der Übergangszone, während Gene, die für Zuckertransportprozesse codieren, eine stärkere Expression im Splintholz aufweisen. Codierende Gene für Chromatin und DNA-Metabolismus, Abwehrreaktionen, Primärmetabolismus, Proteinbiosynthese und Signaltransduktion sind in der Splint-Kern-Übergangszone im Juli stärker exprimiert als Ende November (Yang et al. 2003).

Untersuchungen der CHS und PAL Genfamilien, zweier Schlüsselgene des Sekundärstoffwechsels, zeigen in der Splint-Kern-Übergangszone der Robinie eine saisonale Hochregulierung in den Sommermonaten (Lange 2009).

Eine funktionelle Einteilung der ESTs der Splint-Kern-Übergangszone von *Cryptomeria* zeigt, dass die dort exprimierten Gene u.a. mit posttranslationalen Modifikationen, Protein-Turnover, Chaperonen, vesikulärem Transport, Signaltransduktionsprozessen, Lipid-Transport und Metabolismus, Transkription, RNA-Modifikation, Kohlenhydrat-Transport und Metabolismus sowie Sekundärmetabolismus und Abwehrreaktionen in Zusammenhang stehen (Yoshida et al. 2007; Yoshida et al. 2012).

Studien anhand von cDNA-Microarrays, in der Splint-Kern-Übergangszone von *Robinia* und *Juglans*, bestätigen die Hochregulierung von Genen, die eine Rolle bei Abwehrreaktionen, Genexpression und RNA-Metabolismus, Proteinsynthese,

Sekundärmetabolismus und Signaltransduktion spielen (Yang et al. 2004; Huang et al. 2010).

1.4 Die Robinie als Modellbaum der Kernholzbildung

Die Kernholzbildung findet in *Robinia pseudoacacia* zwischen Hochsommer und Spätwinter statt. Der schnellste Zuwachs der Kernholzzone findet dabei zwischen Hochsommer und Frühherbst statt (Nobuchi et al. 1984). In den Parenchymen der Übergangszone zwischen Splint und Kern findet die *in situ*-Synthese der Kerninhaltsstoffe, bei gleichzeitigem Abbau der Reservestoffe (Stärke) statt. Dieser Vorgang konnte bei der Robinie auf den Frühherbst datiert werden (Nobuchi et al. 1984; Magel et al. 1994). Der Zelltod der Parenchyme, durch den die Kernholzbildung abgeschlossen wird, beginnt im Herbst.

Die gebänderten Axialparenchyme verlaufen bei der Robinie oft paratracheal, der Bau ist stockwerkartig, was makroskopisch aber kaum zu erkennen ist.

Das homozellulare Radialparenchym verläuft mehrreihig mit sechs bis acht Strahlen pro Millimeter. Die Breite beträgt zwei bis sechs Zellen (Richter und Dallwitz 2000). Abbildung 1-3 zeigt die verschiedenen Gewebe der Robinie im Radialschnitt.

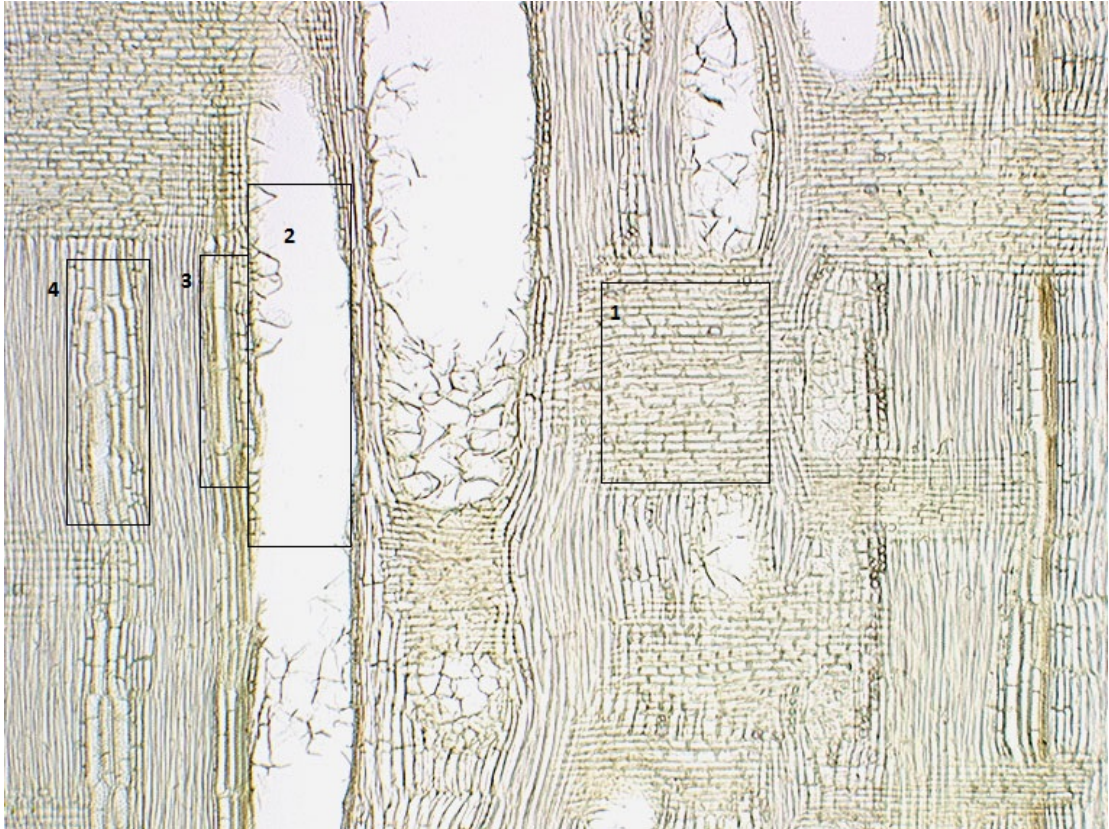


Abbildung 1-3: Radialschnitt von *Robinia pseudoacacia*. Markiert sind die verschiedenen Gewebe. 1: Radialparenchym; 2: Gefäß; 3: paratracheales Axialparenchym; 4: Axialparenchym (Quelle: modifiziert nach Richter und Dallwitz 2000).

Die Robinie gehört zur Familie der Fabaceae. Diese Familie beinhaltet viele Nutzpflanzen, wie beispielsweise *Pisum sativum* (Erbsen), *Vigna radiata* (Mungbohne), *Cicer arietinum* (Kichererbsen) und *Glycine max* (Sojabohne). Viele Gene dieser Nutzpflanzen sind bereits vollständig sequenziert, was die Identifizierung bisher unbekannter Genen der Robinie vereinfacht.

Die Robinie ist raschwüchsig und bildet bereits nach vier bis sechs Jahren Kernholz. Sie wird forstlich genutzt und ist in Deutschland weit verbreitet. Das Holz gilt als zäh und wertvoll, da es eine hohe natürliche Dauerhaftigkeit besitzt. Die Jahrringe sind relativ breit (Schütt 2006; Wagenführ 2007; Matyssek et al. 2010). Da die Robinie auch als Park-, Allee- und Zierbaum genutzt wird (Richter und Waitkus 2001), waren Proben für diese Arbeit leicht verfügbar.

Die Robinie besitzt eine scharfe Splint-Kerngrenze. Das Kernholz fluoresziert unter UV-Licht gelblich-grün (Wagenführ 2007), was die Aufarbeitung der Übergangszone zwischen Splint und Kern (TZ) vereinfacht.

Zahlreiche andere zytologische, molekularbiologische und holzchemische Studien beschäftigten sich bereits mit der Kernholzbildung der Robinie (Freudenberg und Hartmann 1954; Roux und Paulus 1962; Nobuchi et al. 1984; Nobuchi und Harada 1985; Magel et al. 1991; Magel et al. 1994; Magel und Hübner 1997; De Filippis und Magel 1998; Hauch und Magel 1998; Magel et al. 2001b; Yang et al. 2003; Yang et al. 2004; Lange 2009; De Filippis und Magel 2012; Nakaba et al. 2012).

1.5 Untersuchte Marker- und Kandidatengene

Die Microarrayexperimente von Yang et al. (2004) zu saisonalen Änderungen der Genexpression in der Splint-Kern-Übergangszone der Robinie zeigen einige Gene auf, die als Markergene der Kernholzbildung in Betracht kommen. Die Genfamilie 14-3-3 sowie die Multigenfamilie der heat shock 70 Gene sollen in dieser Arbeit auf ihre Eignung als Markergene der Kernholzbildung überprüft werden und werden im weiteren Verlauf als Kandidatengene bezeichnet. Des Weiteren wurde das von Lange (2009) charakterisierte Chalkonsynthase Gen *RpCHS3* untersucht. Chalkonsynthase (CHS) als Schlüsselgen der Flavonoidsynthese gilt als starkes Markergen der Kernholzbildung (Magel und Hübner 1997; Beritognolo et al. 2002; Lange 2009). Ein weiteres Markergen der Kernholzbildung stellt Phenylalanin-Ammonium-Lyase dar, welches für das Eingangsenzym des Phenylpropanstoffwechsels (PPS) codiert. Auch dieses Gen wurde von Lange (2009) für Robinie (*RpPAL1*) charakterisiert und anhand von Genexpressionsstudien untersucht. In der vorliegenden Arbeit sollen Genexpressionsstudien an *RpPAL1* in der Splint-Kern-Übergangszone die Ergebnisse der anderen Gene, speziell im Hinblick auf den unterschiedlichen Einfluss von Axial- und Radialparenchym, auf die Kernholzbildung validieren. Für die beiden Markergene PAL und CHS wurde jeweils die am stärksten exprimierte Isoform (*RpPAL1*, *RpCHS3*) ausgewählt. In beiden Genfamilien treten keine funktionellen Unterschiede zwischen den Isoformen auf. Unterschiedliche Genexpressionen in der Robinie sind rein quantitativer Natur (Lange 2009).

1.5.1 Die heat shock 70 Genfamilie (HS70)

Die heat shock 70 Superfamilie (HS70) kommt universell in Tieren, Mikroorganismen und Pflanzen vor. Es handelt sich um eine evolutionär konservierte Genfamilie, die für 70 kDa Proteine codiert. Diese Proteine werden den molekularen Chaperonen

zugeordnet. Die hohe Konservierung zeigt sich durch Sequenzvergleiche zwischen verschiedenen Pflanzen: Homologie 80-92 % sowie Vergleichen zwischen Pflanze und Ratte: Homologie bis zu 76 % (Lindquist und Craig 1988; Ellis und van der Vies 1991; Gething und Sambrook 1992; Wu et al. 1994; Wisniewski et al. 1996). Für *Arabidopsis* codieren 14 Gene für heat shock Faktoren (Gething und Sambrook 1992; Sung et al. 2001b).

Das heat shock Protein ist in vier Untergruppen aufgeteilt, diese sind im Cytosol, dem endoplasmatischen Retikulum, in den Mitochondrien und in den Plastiden lokalisiert (Sung et al. 2001a).

Unterschieden werden heat shock Proteine (HSP) und heat shock cognates (HSC). Erstere werden durch Hitzestress aktiviert, während HSCs bei normalen Wachstumsbedingungen synthetisiert werden (Lindquist und Craig 1988).

Das heat shock Protein 70 setzt sich aus zwei Domänen zusammen: Einer ATPase-Domäne im N-terminalen Bereich des Proteins von ca. 40 kDa und einer Peptidbindungs-Domäne im C-terminalen Bereich von 25 kDa. Dazwischen befindet sich eine Region, die anfällig für die Spaltung durch Proteasen ist. Das N-terminale Ende zeichnet sich durch ein sequenzvariables Transitpeptid in der Präkursor Form aus, was den Import in verschiedene Zellorganellen ermöglicht. Eine C-terminale Subdomäne von 5 kDa oder weniger ist für bestimmte Interaktionen mit Co-Chaperonen erforderlich (Sung et al. 2001a).

HS70 spielen Rollen beim Transport, beispielsweise cytosolischer Proteine in das endoplasmatische Retikulum (Miernyk et al. 1992; Sung et al. 2001a), und Falten von Proteinen, sowie bei der Aufrechterhaltung zellulärer Homöostase und korrekter Proteinsynthese während Kältephasen (Anderson et al. 1994). Sie schützen Stress ausgesetzten Zellen, indem sie freiwerdende Polypeptide (Substrate), unstrukturierte Regionen und hydrophobe Abschnitte von Aminosäuren erkennen. Als Chaperone translokalisieren oder falten sie durch Stress denaturierte Proteine und verhindern so irreversible Bindungen mit anderen Proteinen („falschen“ Bindungspartnern) in der Zelle (Parsell und Lindquist 1993; Bukau und Horwich 1998; Morimoto 1998; Nollen und Morimoto 2002). Ungefaltete Substrate werden in einen transient gefalteten Zustand überführt, ebenfalls um irreversible Bindungen zu verhindern. HS70 katalysiert dabei die Neufaltung der Substrate. Diese Reaktion ist energie- sowie Co-Chaperon-abhängig. HS70 interagiert dabei über die N-terminale ATPase-Domäne mit Co-Chaperonen und über die C-Terminale Substratbindungsdomäne mit Substraten. Diese Möglichkeit der Proteinfaltung fehlt anderen heat shock Faktoren, wie beispielsweise HS90 (Nollen und Morimoto 2002). Die Induktion erfolgt schnell nach Hitzeschocks (37-45 °C) oder auch Kälteschock (5 °C) (Li et al. 1999; Sung et al.

2001b).

HS70 ist auch unter normalen Wachstumsbedingungen (als HSC70) exprimiert, um die Protein-Homöostase durch Regulierung der Proteinfaltungsqualitätskontrolle aufrechtzuerhalten. Die Chaperonaktivität ermöglicht hierbei die Faltung neu synthetisierter Proteine und unterstützt deren Translokation durch intrazelluläre Membranen (Wu et al. 1994; Neupert 1997; Hartl und Hayer-Hartl 2002; Nollen und Morimoto 2002). Auch für die Familie der Fabaceae (hier *Vigna radiata* bzw. *Glycine max*) konnte festgestellt werden, dass heat shock cognates in das Wachstum und die Entwicklung der Pflanze involviert sind (Chen et al. 2004; Soares-Cavalcanti et al. 2012).

HS70 interagiert mit Molekülen, die eine Rolle beim Zelltod sowie bei der Signaltransduktion spielen (Nollen und Morimoto 2002). Beispielsweise erfolgt eine Interaktion mit Bag1 (Bcl-2-associated athanogene family), das bei *Arabidopsis* mit dem Zelltod in Verbindung gebracht wird (Fang et al. 2013). Da die Kernholzbildung mit dem programmierten Zelltod der Parenchyme endet, könnte hier ein Zusammenhang bestehen. Darauf deutet auch die Studie von Yang und Mitarbeitern (2004) hin. Deren Genexpressionsstudien in der Splint-Kern-Übergangszone von Robinie ergaben eine Hochregulierung von heat shock Proteinen im November. Der Beginn des programmierten Zelltods in der Robinie wird auf Herbst datiert (Nobuchi et al. 1984), was eine zeitliche Übereinstimmung bedeutet. Unterstützt werden diese Ergebnisse von de Filippis und Magel (2012). Diese detektierten mittels 2D SDS-PAGE („two-dimensional sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gelelectrophoresis“) und anschließendem ESI-MS/MS („electrospray ionisation tandem mass spectrometry“), heat shock Faktoren in der Splint-Kern-Übergangszone der Robinie (Fällzeitpunkt: Ende Oktober), während diese im Splintholz nicht nachgewiesen werden konnten. Die Tatsache, dass HS70 nicht nur bei Hitzestress, sondern auch bei bspw. Trockenstress induziert wird (Wang et al. 2004) und während der Kernholzbildung ein verringerter Wassergehalt festgestellt wurde (Sachsee 1967; Hillis 1968), lässt weitere Spekulationen über einen Zusammenhang der Prozesse zu (De Filippis und Magel 2012).

1.5.2 Die 14-3-3 Genfamilie

Die 14-3-3 Genfamilie codiert für eine hochkonservierte saure Proteinfamilie, mit einem Molekulargewicht von 25-30 kDa. Diese werden den Chaperonen zugeordnet und können sich frei vom Zytoplasma zum Nukleus und umgekehrt bewegen (Muslin

et al. 1996). Verschiedenste Studien ergaben, dass sie in Eukaryoten ubiquitär vorkommen (Wu et al. 1997; Ferl et al. 1999). Entdeckt wurden diese Proteine in menschlichem Hirngewebe. Ihren Namen erhielten sie aufgrund der Nummer der Fraktion nach einer Ionenaustauschchromatographie und ihrer Wanderungsgeschwindigkeit bei der anschließenden elektrophoretischen Auftrennung (Moore und Perez 1968).

Alle 14-3-3 Proteine haben die Fähigkeit an Targetproteine zu binden. Die verschiedenen Funktionen dieser Proteine, wie Regulierung der Aktivität und Lokalisation, sind alle auf diese Gemeinsamkeit zurückzuführen. Oft kommt es dabei zur Phosphorylation bzw. Dephosphorylation des Targetproteins oder des 14-3-3 Proteins selbst (Aducci et al. 2002), wobei das Targetprotein an Phosphoserin oder Phosphothreonin Motive von 14-3-3 bindet. In Pflanzen wurden über 300 mutmaßliche Targetproteine entdeckt. Dies lässt darauf schließen, dass 14-3-3 Proteine in viele Signaltransduktionswege und physiologische Prozesse involviert sind (Denison et al. 2011).

Die Ankunft zellulärer Signale an einem Zielmolekül und die Aktivierung bzw. Inaktivierung dieses Moleküls beinhaltet oft eine Phosphorylierung des Moleküls. Oft reicht dies aber nicht aus, um die Transduktion dieses regulativen Signals zu gewährleisten. Eine Interaktion mit 14-3-3 Proteinen ist nötig, um die Signaltransduktion abzuschließen (Ferl et al. 1999). Allerdings finden sich auch Targetproteine, die nicht phosphoryliert vorliegen müssen (Fu et al. 2000; Sumioka et al. 2005). Die verschiedenen Isoformen bilden Homo- und Heterodimere aus. Die dimere Struktur erlaubt das Binden von zwei Targetproteinen ausschließlich über den N-Terminus des 14-3-3 Proteins, daher wird vermutet, dass es als Adapterprotein zwischen zwei Proteinen, die ansonsten nicht interagieren könnten, wirkt (Jones et al. 1995). Die Targetproteine binden dabei mit ihrem C-Terminus an 14-3-3 (Oecking und Hagemann 1999). Zudem ist es möglich, dass nicht-phosphorylierte Proteine über Intermediär Proteine mit 14-3-3 interagieren (Johnson et al. 2010).

14-3-3 ist als Multigenfamilie organisiert. Für *Arabidopsis* wurden 15 Gene entdeckt von denen 13 transkribiert sind (DeLille et al. 2001; Rosenquist et al. 2001). Ein Exon basiertes Alignment der Sequenzen ließ Wu und Mitarbeiter (1997) die bis dahin entdeckten zehn Isoformen in Epsilon und Nicht-Epsilon klassifizieren. Bei Untersuchungen an der Fabaceae *Glycine max* wurden 18 Gene entdeckt, von denen 16 exprimiert sind (Li und Dhaubhadel 2011). Kleinere Genfamilien sind für *Nicotiana tabacum* und *Populus* mit jeweils sechs Isoformen (Piotrowski und Oecking 1998; Lapointe et al. 2001) sowie *Eukalyptus* mit vier Isoformen (Furtado et al. 2007) bekannt. Die Genfamilie ist stark konserviert. Die in *Arabidopsis* entdeckten Isoformen

zeigen im „core“ des Proteins eine Übereinstimmung der Aminosäuren von 51 %, im N-Terminus 14 %. Lediglich der C-Terminus ist sehr variabel mit 0 % Homologie der Aminosäuren (Ferl et al. 1999). Eine weitere Studie an *Arabidopsis* ergab eine DNA-Sequenz Homologie von bis zu 86 % zwischen verschiedenen Isoformen (Wu et al. 1997). Die hohe Konservierung von 14-3-3 Proteinen, selbst zwischen Pflanzen und Säugetieren, lässt vermuten, dass alle 14-3-3 Isoformen dieselben Targetproteine binden können, allerdings mit unterschiedlichen Bindungsspezifitäten (Finnie et al. 2000).

Zu Prozessen, in die pflanzliche 14-3-3 Proteine involviert sind, gehören: Kontrolle des Zellzyklus, Differenzierung, Apoptose, zielgenauer Transport von Proteinen zu verschiedenen zellularen Orten sowie die Koordination verschiedener Signaltransduktionswege (Palmgren et al. 1998; Finnie et al. 2000; Roberts 2000; Aducci et al. 2002).

Eine besondere Rolle kommt den 14-3-3 Proteinen im Primärmetabolismus von Pflanzen zu. Far-Western-Blot Versuche zeigten, dass 14-3-3 u.a. Saccharose-Phosphat Synthase, Trehalose-6-Phosphat Synthase und Glutamin Synthetase bindet und damit, durch Regulation der Schlüsselenzyme, am Kohlenstoff bzw. Stickstoffstoffwechsel beteiligt sind (Moorhead et al. 1999). Glutamin Synthetase ist beispielsweise ein Kandidatengenen für die Kernholzbildung, Genexpressionsstudien ergaben in der Splint-Kern-Übergangszone von Robinie im Sommer eine 2,2fach höhere Expression als im Herbst (Yang et al. 2004).

Im Kohlenstoff Metabolismus reguliert 14-3-3 Saccharose-Phosphat Synthase (SPS) auf posttranslationaler Ebene. Dabei wurde sowohl eine Aktivierung als auch eine Inhibierung des Enzyms festgestellt (Toroser et al. 1998; Moorhead et al. 1999). SPS kommt eine Schlüsselrolle bei der Regulierung der Saccharose Synthese zu (Huber und Israel 1982; Stitt et al. 1988). Versuche an transgenen *Arabidopsis* Pflanzen mit reduzierter 14-3-3-Aktivität ergaben eine erhöhte Stärke-Akkumulation. Die Autoren vermuten, dass 14-3-3 die Stärkesynthese inhibiert (Sehnke et al. 2001). Ähnliche Beobachtungen ergaben sich für Kartoffel. Hier führt eine niedrige Expression von 14-3-3 zu erhöhter Aktivität von SPS und Nitratreduktase (NR) und damit zu höheren Saccharose-, Nitrat- und Stärke-Leveln (Zuk et al. 2005). Die gleiche Korrelation zwischen SPS-Aktivität und 14-3-3 Expression wurde für Tomate festgestellt (Wang et al. 2014). Es wird vermutet, dass die Aktivität von 14-3-3 zur Synthese von Kohlenhydraten bzw. deren Speicherung führen kann, oder durch Inaktivierung des Kohlenhydrat Metabolismus und Aktivierung der Stickstoff-Assimilation zur Synthese von Aminosäuren (Comparot et al. 2003).

Der Zusammenhang zwischen SPS und der Kernholzbildung wurde von Hauch und

Magel (1998) mittels Messung von Enzymaktivitäten untersucht. Die Aktivität von SPS war dabei eher gering. Die höchste Aktivität wurde im mittleren und inneren Splint mit bis zu $1,2 \text{ nkat (mg Protein)}^{-1}$ festgestellt. In radialer Richtung (sowohl Richtung Phloem als auch Splint-Kern-Übergangszone) nahm die Aktivität weiter ab. Zudem zeigte die Aktivität eine Saisonabhängigkeit. Im Mai wurde die höchste Aktivität im Vergleich zu anderen Geweben im mittleren Splint gemessen, im November hingegen im inneren Splint. In der Splint-Kern-Übergangszone war die Aktivität von SPS im Januar mit Abstand am höchsten. Hohe SPS-Konzentrationen im inneren Splint, bei gleichzeitig hoher Konzentration von SuSy in der Splint-Kern-Übergangszone im Herbst, lassen vermuten, dass die für die Kernholzbildung benötigte Saccharose u.a. im inneren Splint synthetisiert wird. Die Genexpressionsstudien im Rahmen dieser Arbeit werden zeigen, ob 14-3-3 mit diesem Prozess in Zusammenhang steht.

14-3-3 Proteine sind an der Regulation des Ionentransports beteiligt: Eine Isoform bindet an H^+ -ATPase (Emi et al. 2001). H^+ -ATPase exportiert Protonen, mithilfe eines elektrochemischen Gradienten, durch die Plasmamembran. Dies dient dem Transport von Ionen, Reservesubstanzen und Wasser (Palmgren 1998; Comparot et al. 2003). Ein 14-3-3 Dimer bildet dabei einen Komplex mit der C-terminalen autoinhibitorischen H^+ -ATPase Domäne (Oecking et al. 1997). Die Regulierung von Nitratreduktase und H^+ -ATPase durch 14-3-3 steht bisher im Zusammenhang mit dem Nitratassimilationsweg, der es Pflanzen erlaubt, Nitrat im Boden in verwertbaren Stickstoff umzuwandeln (Fert et al. 1999). H^+ -ATPase ist aber auch in den Prozess der Kernholzbildung involviert. Das Enzym steht im Zusammenhang mit Prozessen, die Energie benötigen. ATPase zeigt hohe Aktivitäten in der Splint-Kern-Übergangszone von *Acacia nilotica*. Studien zur Biosynthese von sekundären Komponenten zeigen, dass deren Bildung nicht ohne Degradierung und Neuaufbau durch Primärmetabolite möglich ist. Dies beinhaltet Schritte, die Energie benötigen. Möglicherweise trifft dies auch auf die Bildung von phenolischen Komponenten zu (Hillis 1977; Shah et al. 1981). In der Splint-Kern-Übergangszone von Robinie ist H^+ -ATPase im Sommer 2,6 stärker exprimiert als im November (Yang et al. 2004).

Peroxidase stellt einen weiteren Bindungspartner der 14-3-3 Familie in *Arabidopsis* dar (Zhang et al. 1997). Ein Zusammenhang von Peroxidasen und der Oxidation von phenolischen Komponenten während der Kernholzbildung (bei *Juglans nigra*) wird diskutiert (Dehon et al. 2002).

Aufgrund der Tatsache, dass 14-3-3 sowohl an Signalwegen der Zuckersynthese (SPS) und Zuckerspeicherung (Stärkesynthese), als auch an der Nährstoffaufnahme (mittels H^+ -ATPase) und Metabolismus (über NR) beteiligt sind, wird vermutet, dass 14-3-3 eine Rolle als globaler Kontrollmechanismus in der Koordination von Energie

und Nährstoffen zukommt, sodass Energiereserven angemessen aufgeteilt werden (Comparot et al. 2003; Roberts 2003; Denison et al. 2011).

Weitere Untersuchungen zur Interaktion mit 14-3-3 Targetproteinen lassen Spekulationen einer Verbindung zur Kernholzbildung zu. So interagieren 14-3-3 Isoformen mit Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise G-Box. G-Box sind moderat konservierte Elemente in Promotoren von Genen, die für die Expression des entsprechenden Gens verantwortlich sind (Comparot et al. 2003). Entsprechende G-Box Sequenzmotive wurden auch an Promotern von Chalkonsynthase Genen, einem starken Marker der Kernholzbildung, gefunden. Untersucht wurden CHS Gene aus *Phaseolus vulgaris*, das wie die Robinie zur Familie der Fabaceae gehört (Faktor et al. 1996).

In *Arabidopsis* wurden 14-3-3 Proteine entdeckt, die ein EF-hand like Motiv in der C-terminalen Region aufweisen, was Interaktionen mit Calcium zulässt (Lu et al. 1994). Bei Genexpressionsstudien an Kandidatengenen für die Kernholzbildung in *Juglans nigra* wurde ein ähnliches Calcium interagierendes EF-hand like Motiv gefunden (*JnCML-like*), das in der Splint-Kern-Übergangszone im Herbst fünfmal stärker exprimiert ist als im Sommer. In anderen Geweben zeigte sich eine deutlich schwächere Expression. Die Autoren vermuten daher einen Zusammenhang von *JnCML-like* und der Kernholzbildung (Huang et al. 2011). In *Glycine max* interagiert 14-3-3 mit dem GmMYB176 Transkriptionsfaktor, vermutlich ist es dabei in den Transport vom Nukleus in das Cytosol eingebunden (Dhaubhadel und Li 2010; Li et al. 2012). GmMYB176 reguliert die Genexpression einer CHS Isoform und beeinflusst so die Isoflavonoidbiosynthese (Yi et al. 2010), was übertragen auf die Robinie, einen indirekten Einfluss auf die Kernholzbildung bedeuten würde.

Weitere Funktionen von 14-3-3 finden sich in der Pathogenabwehr sowie der biotischen und abiotischen Stressabwehr, beispielsweise bei Pappel und *Pseudomonas* (Seehaus und Tenhaken 1998; Lapointe et al. 2001), oder Umwelteinflüssen wie Mineralmangel bei Tomate (Xu und Shi 2006). In Zusammenhang mit der Stressabwehr konnte in der Pappel eine Korrelation von 14-3-3 und PAL festgestellt werden. Nach mechanischer Verwundung sowie unter Induktion der Pathogenabwehr durch Behandlung mit Chitosan und Methyl-Jasmonat kam es zu einer gleichzeitig verstärkten Akkumulation von 14-3-3 und PAL. Das Zusammenspiel der beiden bei Abwehrreaktionen blieb allerdings unverstanden (Lapointe et al. 2001). Das 14-3-3 Gen scheint nicht nur auf transkriptioneller Ebene reguliert zu werden. So zeigten Roberts und Bowles (1999) anhand von Studien an Tomate, dass bei Fusicoccin induzierten Abwehrreaktionen nur vier von zehn 14-3-3 Isoformen eine Steigerung der Transkriptmenge aufweisen.

Die Expression von 14-3-3 bei Trockenstress in *Pinus taeda* (Lorenz et al. 2006) lässt Spekulationen über einen Zusammenhang zum verringerten Wassergehalt während der Kernholzbildung zu.

In *Pisum sativum* formen 14-3-3 Proteine einen Komplex mit HSP70 und für die Chloroplasten bestimmten Präkursor-Proteinen. Der Komplex erleichtert die Translokation (May und Soll 2000).

Es wird vermutet, dass 14-3-3 in vielen weiteren Prozessen eine Rolle spielt. Es gilt als unwahrscheinlich, dass in komplexen Signalwegen oder Netzwerken 14-3-3 nicht zumindest an einer Stelle interagiert (Denison et al. 2011).

1.5.3 Chalkonsynthase

Chalkonsynthase (CHS) ist ein Schlüsselenzym der Flavonoidbiosynthese. Flavonoide stellen in der Robinie die wichtigste Klasse von Kerninhaltsstoffen dar. Das Enzym kommt ubiquitär in höheren Pflanzen vor. CHS ist als Genfamilie organisiert, deren Expression durch exogene und indogene Faktoren reguliert wird. In der Robinie weist die CHS Familie sechs Mitglieder auf (Lange 2009). Das funktionelle CHS-Enzym, ein Homodimer, ist aus zwei CHS-Proteinuntereinheiten mit jeweils gleichem Molekulargewicht aufgebaut (Kreuzaler et al. 1979). Chalkonsynthase ist im Cytosol lokalisiert und mit Mechanismen des Endoplasmatischen Retikulums verknüpft (Hrazdina und Jensen 1992). Aufgrund der Bedeutung der Flavonoide für Wachstum und Entwicklung von Pflanzen wurde die Genfamilie intensiv erforscht.

Das codierende Gen ist ein starker Marker für die Kernholzbildung. Die Kernholzbildung zeichnet sich durch ein Umschalten vom Primär- hin zum Sekundärmetabolismus aus (vgl. Kapitel 1.1). Dabei werden die Reaktionsprodukte der Saccharose Synthase zunächst der Glykolyse zugeführt, im Weiteren dienen sie der Synthese der phenolischen Komponenten (Kerninhaltsstoffe). Dabei gelangen UDP-Glucose, Fructose und Glucose zunächst zum oxidativen Pentosephosphat-Zyklus (oPPZ). Dieser liefert verschiedene Zuckerphosphate u.a. für den Shikimatweg, der ein Bindeglied zwischen Primärmetabolismus und der Synthese aromatischer Verbindungen ist. Der Shikimatweg liefert die Grundbausteine für den Phenylpropanstoffwechsel (PPS), mit PAL als erstem Enzym, und schließlich für die Flavonoidsynthese, mit ihrem Schlüsselenzym CHS (Magel et al. 2001b). Das Enzym katalysiert die Kondensation von Cumaroyl-CoA aus dem PPS mit drei Malonyl-CoA zu Naringenin-Chalkon unter Freisetzung von drei CO₂ und vier Coenzym A. Das resultierende Naringenin-Chalkon ist das Grundgerüst aller Flavonoide (Heller und

Forkmann 1988; Hahlbrock und Scheel 1989). Magel und Mitarbeiter (1991) untersuchten die Aktivität von CHS in Stammquerschnitten der Robinie. Die Aktivität des Enzyms beschränkte sich fast ausschließlich auf die Splint-Kern-Übergangszonen, mit höchsten Aktivitäten gegen Ende der Vegetationsperiode. In dieser Zeit kommt es in der Robinie zur Akkumulation der Kerninhaltsstoffe Dihydrorobinetin und Robinetin (Magel et al. 1994). Saisonale Genexpressionsstudien unterstützen diese Ergebnisse. Es ergab sich eine Expression verschiedener Mitglieder der CHS-Genfamilie nahezu ausschließlich in der Splint-Kern-Übergangszonen, mit höchster Expression in den Sommermonaten (Lange 2009). Microarray Untersuchungen von Yang und Mitarbeitern (2003; 2004) zeigen ebenfalls eine signifikant höhere Expression von CHS in der Splint-Kern-Übergangszonen, verglichen mit Splint und Phloem. Auch hier wurde die stärkste Expression im Sommer gemessen (im Juli 2,8fach höher als im November).

CHS wird, laut den meisten Studien, transkriptionell, also durch die Zu- oder Abnahme von Transkriptmengen reguliert (Lawton und Lamb 1987), so ergaben Western Immunblotting Versuche in *Juglans nigra* (ein obligater Farbkernbildner wie die Robinie) eine Korrelation der Akkumulation von CHS Protein mit der Menge an Transkript (Beritognolo et al. 2002). Auch hier trat die höchste Expression des CHS Gens in der Splint-Kern-Übergangszonen auf. In der Robinie korrelieren Proteingehalt und Enzymaktivität (Magel und Hübner 1997), was ein weiterer Hinweis auf die transkriptionelle Regulierung der Chalkonsynthese ist. Das Enzym konnte dabei ausschließlich in der Splint-Kern-Übergangszonen nachgewiesen werden.

Bei dem in dieser Arbeit untersuchten CHS Gen handelt es sich um das von Lange (2009) identifizierte *RpCHS3* Gen. Von allen CHS Genen dieser Studie wies *RpCHS3* die stärkste Expression in der Splint-Kern-Übergangszonen in den Sommermonaten auf und wurde deshalb ausgewählt. Dieses Gen ist identisch mit dem als genspezifische Sonde genutzten CHS Genfragment von Yang und Mitarbeitern (2004).

1.5.4 Phenylalanin-Ammonium-Lyase

Die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) ist das Eingangs- und Schlüsselenzym des Phenylpropanstoffwechsels, das codierende Gen ist damit ein Markergen der Kernholzbildung. PAL katalysiert die Desaminierung der Aminosäure L-Phenylalanin zu Trans-Zimtsäure. Es folgt die Reaktion zu Cumaroyl-CoA, welches das Ausgangssubstrat der Flavonoidsynthese ist (Hanson und Havir 1981; Magel et al. 1991). Das funktionelle PAL-Enzym setzt sich aus vier Untereinheiten mit jeweils

gleichem Molekulargewicht zusammen, es ist somit ein Homo-Tetramer (Campbell und Ellis 1992). Es ist im Cytosol und den Plastiden lokalisiert, konnte aber auch im Golgi Apparat und am Endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen werden. Auch PAL ist, zumeist als relativ kleine, Genfamilie organisiert, mit beispielsweise vier Mitgliedern für *Arabidopsis* (Goujon et al. 2003) und *Petroselinum crispum* (Logemann et al. 1995). Größere Genfamilien codieren PAL in *Pinus banksiana*, mit acht bis zehn Mitgliedern (Butland et al. 1998) sowie Kartoffel, mit 40-50 Mitgliedern (Joos und Hahlbrock 1992). Untersuchungen an *Robinia pseudoacacia* ergaben vier verschiedene Gene, von denen drei exprimiert werden (Lange 2009). Biochemische Untersuchungen ergaben Enzymaktivitäten sowohl in der Splint-Kern-Übergangszone, als auch im äußersten Jahrring des Splintholzes, während im restlichen Splint keine Aktivität gemessen wurde. Dies zeigt, dass PAL neben der Kerninhaltsstoffsynthese auch an der Synthese von Lignin oder dessen Vorstufen beteiligt ist (Magel et al. 1991). In der Splint-Kern-Übergangszone weist PAL im September und November die höchsten Aktivitäten auf, was mit dem Zeitpunkt der Kernholzbildung übereinstimmt. Genexpressionsstudien an der Robinie (Lange 2009) bestätigen dieses Muster. So konnte Transkript sowohl im differenzierenden Xylem (stärkste Expression im Mai und Juli), als auch in der Splint-Kern-Übergangszone (stärkste Expression im Juli und August) detektiert werden. Auch Yang und Mitarbeiter (2004) zeigten mittels Microarrays eine im Sommer um den Faktor 3,3 erhöhte Transkriptmenge gegenüber dem Herbst. Anders als CHS wird PAL nicht allein auf Genexpressionsebene reguliert. So stellten Magel und Hübner (1997) keine Korrelation zwischen katalytischer Aktivität und dem Enzymproteingehalt fest. Trotz ähnlich hoher Gehalte an PAL-Protein in allen Splintbereichen wurden lediglich im differenzierenden Xylem und in der Splint-Kern-Übergangszone hohe PAL-Aktivitäten, in den mittleren Splintholzbereichen dagegen niedrige oder keine PAL-Aktivität gemessen, was die Autoren auf eine Regulation der Enzymaktivität durch den intrazellulären Zimtsäuregehalt schließen lässt.

1.6 Lasermikrodissektion

Die Lasermikrodissektion (LMD) ist eine vielseitig einsetzbare Technik, die eine kontaktfreie, spezifische Isolation einzelner Zellen aus einem inhomogenen Gewebe erlaubt. Die isolierten Zellen können im Weiteren beispielsweise molekularbiologisch oder biochemisch analysiert werden. Aufbau und Prinzip des in dieser Arbeit verwendeten PALM[®] MicroBeam Systems (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München)

werden in Kapitel 2.3 ausführlich erläutert.

Die Technik fand zunächst in der Medizin Anwendung. Besonders in der Krebsforschung spielt sie eine Rolle. So konnte beispielsweise das Problem der spezifischen Isolierung einzelner Tumorepithelzellen, zur weiteren DNA- bzw. RNA-Analyse, gelöst werden (Rubin 2001). Mittlerweile findet die Lasermikrodissektion auch in der Forschung an Pflanzen Anwendung. So isolierten Asano und Mitarbeiter (2002) einzelne Phloemzellen aus Reis, um eine cDNA-Bibliothek zu generieren. Das Ausgangsmaterial wurde dabei in Aceton fixiert und kryoeingebettet. Nach der Anfertigung von Gefrierschnitten konnten die Proben der Lasermikrodissektion zugeführt werden. Die extrahierte RNA wurde mithilfe der T7-RNA-Polymerase amplifiziert, worauf die reverse Transkription in cDNA folgte. Diese Fixiermethoden sind von Protokollen zur Untersuchung tierischer Zellen abgeleitet und für Holz problematisch. Da Pflanzenzellen Vakuolen aufweisen, verlieren die Gewebe bei Gefrierschnitten an Stabilität. Zudem kommt es zu einem Verlust an Gewebeintegrität durch das Einfrieren und Auftauen während des Prozesses, was die histologische Identifikation einzelner Zellen erschwert (Kerk et al. 2003). Holz lagert in seinen Zellwänden Lignin ein, was eine Fixierung noch erschwert.

Das Ziel der Fixierung ist es biologische Prozesse zu stoppen und die Integrität der Probe während der Isolierung der Zielzellen zu gewährleisten (Day et al. 2005). Für die vorliegende Arbeit ist es wichtig, bei der Fixierung histologische Details zu bewahren, um Radial- und Axialparenchyme identifizieren zu können. Gleichzeitig gilt es, die Integrität der RNA, für darauffolgende Genexpressionsstudien, aufrechtzuerhalten. In der Literatur finden sich zwei Ansätze zur Fixierung von Geweben zur anschließenden Lasermikrodissektion. Auf der einen Seite finden sich vernetzende („cross-linking“) Methoden, unter Verwendung von Formaldehyd. Auf der anderen Seite werden präzipitierende Methoden unter Verwendung von Ethanol-Essigsäure (Farmer-Lösung) oder Aceton-Mischungen beschrieben. Beiden Methoden folgt eine Paraffin- bzw. Kryoeinbettung. Die präzipitierende Methode erwies sich als vorteilhaft, um qualitativ hochwertige RNA aus Mäuseleber zu extrahieren (Goldsworthy et al. 1999). In Pflanzen wurde mit dieser Methode eine um den Faktor drei erhöhte RNA-Ausbeute gegenüber vernetzenden Methoden erreicht, was die Autoren vermuten lässt, dass signifikante Mengen RNA an das Formaldehyd binden (Kerk et al. 2003). Allerdings ist das anschließende Einbetten in Paraffin, inklusive einer Inkubation bei 65 °C, mit einer Degradierung der RNA verbunden. Die resultierende cDNA ist fragmentiert und kann für Genexpressionsstudien nicht mehr verwendet werden (Deeken et al. 2008).

Nakazono und Mitarbeiter (2003) kombinierten als erste Lasermikrodissektion und

Genexpressionsstudien an Pflanzen. Die Dünnschnitte von Maiskeimlingen wurden mit einer Ethanol-Essigsäure-Lösung fixiert und anschließend kryoeingebettet. Es folgten die RNA-Amplifikation und die Hybridisierung an Microarrays.

Vorherige Studien an Holz auf zellulärer Ebene fanden mithilfe manueller Dissektion der Gewebe statt (Goué et al. 2008; Goué et al. 2012). Die Isolierung erfolgte also „von Hand“. Die Lasermikrodissektion stellt somit einen Fortschritt der Dissektionsmethodik dar. Mittlerweile wird die Methode beispielsweise für chemische Holzuntersuchungen auf zellulärer Ebene eingesetzt (Zheng et al. 2014). Die ersten Genexpressionsstudien an lasermikrodissektiertem Material an Holz erfolgten an der Pappel (Larisch et al. 2012; Larisch 2013). Die Mikrotomschnitte wurden hier mittels einer modifizierten Farmer-Lösung fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend erfolgten Genexpressionsstudien mittels Real-Time PCR und Microarrays.

Bei allen genannten molekularbiologischen Studien war eine Amplifikation der RNA nötig, bevor Genexpressionsstudien durchgeführt werden konnten. Mithilfe der Lasermikrodissektion ist es zwar möglich, qualitativ hochreine RNA zu gewinnen, allerdings in sehr geringen Mengen (im Nanogramm- bis Pikogramm-Bereich). Um genug Ausgangsmaterial für die reverse Transkription in cDNA zu erhalten, ist eine Amplifikation der RNA notwendig (Kehr 2003). Das Enzym T7-RNA-Polymerase sowie ähnliche PCR-basierte Methoden wurden in bisherigen Studien vorrangig verwendet. Mittlerweile werden auch kommerzielle Kits vertrieben, die in aktuelleren Studien verwendet wurden (Deeken et al. 2008; Larisch et al. 2012; Larisch 2013; Schuller et al. 2014).

1.7 Ziele der Arbeit

Im ersten Teil dieser Arbeit werden die Kandidatengene für die Kernholzbildung HS70 und 14-3-3 für *Robinia pseudoacacia* L. identifiziert. Dazu wird zunächst mittels PCR, mit eigens zu erstellenden degenerierten und genspezifischen Primern, die DNA-Sequenz eines Genfragments erarbeitet. Eine anschließende Klonierung gibt darüber Aufschluss, ob die Kandidatengene in der Robinie als Genfamilie vorliegen. Im Weiteren werden Genexpressionsstudien für HS70 und 14-3-3, mittels Real-Time PCR, an verschiedenen Geweben des Xylems der Robinie durchgeführt. Anhand der Genexpressionsstudien kann erörtert werden, ob es sich bei den Kandidatengenen tatsächlich um Markergene der Kernholzbildung handelt. Zum Vergleich und als

Validierung werden auch Expressionsdaten für die Markergene *RpCHS3* und *RpPAL1* ermittelt.

Im zweiten Teil wird eine Methode zur getrennten Isolierung von Axial- und Radialparenchym mittels Lasermikrodissektion entwickelt. Zu Beginn dieser Arbeit waren nur wenige und aufwendige Methoden zur Lasermikrodissektion von Zellen mit anschließenden Genexpressionsstudien am Werkstoff Holz bekannt. Daher wird ein reproduzierbares und einfacher zu handhabendes Assay erarbeitet. Das Assay umfasst dabei die Aufarbeitung von Robinienstammquerschnitten, Anfertigung von Dünnschnitten, Fixierung der Dünnschnitte auf einem Objektträger, Lasermikrodissektion von axialen und radialen Parenchymen, Extraktion von RNA, reverse Transkription und Amplifikation des Transkriptoms sowie schließlich Genexpressionsstudien mittels Real-Time PCR. Bei der Entwicklung der Methode ist darauf zu achten, dass einerseits histologische Details nach der Fixierung erkennbar bleiben. Gleichzeitig muss die Qualität und Integrität der RNA erhalten bleiben, um Genexpressionsstudien durchführen zu können. Die Genexpressionsstudien zur Rolle von axialen und radialen Parenchymgeweben werden für die Kandidatengene 14-3-3 und HS70 sowie für die Markergene der Kernholzbildung *RpCHS3* und *RpPAL1* durchgeführt.

Alle bisherigen Genexpressionsstudien zur Kernholzbildung befassten sich mit größeren Gewebeabschnitten. Studien mit einzelnen Zelltypen als Ausgangsmaterial waren zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt. Einzig wenige mikroskopische und biochemische Studien zum Einfluss der verschiedenen Parenchyme zum Prozess der Kernholzbildung wurden bisher veröffentlicht. Anhand der einzeln isolierten Parenchyme werden diese Genexpressionsstudien folgen. Nachdem der genspezifische Beitrag von *RpCHS3* und *RpPAL1* an der Kernholzbildung der Robinie in vorherigen Arbeiten aufgedeckt wurde, wird diese Arbeit die zelluläre Ebene einbeziehen und den Beitrag der Axial- bzw. Radialparenchyme erläutern.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Im Laufe dieser Arbeit wurden zwei Probensets analysiert. Zum einen stand gefriergetrocknetes, homogenisiertes Holzmehl der Robinie zur Verfügung (alter Laborbestand). Es handelte sich dabei um ein Set von zwei Individuen, jeweils an vier Probenzeitpunkten gewonnen, während der Vegetationsperiode des Jahres 2008. Anhand dieser Proben sollte mittels Genexpressionsstudien festgestellt werden, ob es sich bei den untersuchten Kandidatengen um Markergene der Kernholzbildung handelt. Zusätzlich wurde im Laufe des Jahres 2012/2013 ein Set aus jeweils zwei Individuen (Stammquerschnitte) an fünf Probenzeitpunkten selbst zusammengestellt. Diese Proben sollten einerseits die Ergebnisse der ersten Genexpressionsstudie validieren. Zum zweiten sollten Axial- und Radialparenchym mittels Lasermikrodissektion getrennt voneinander aufgearbeitet und analysiert werden. Für Vorversuche wurde der Ast einer ca. 3 Jahre alten Robinie aus dem Arboretum des Thünen Instituts gefriergetrocknet und bei -80 °C gelagert (Probenname Baum 1).

2.1.1 Proben des Jahres 2012

Im Laufe der Vegetationsperiode 2012/2013 wurden Stammquerschnitte von jeweils zwei Bäumen (mit Ausnahme des Julis, hier nur ein Individuum) pro Probenahmezeitpunkt beschafft.

Die Bäume wurden mit Genehmigung der Revierförstereien Volksdorf und Bergedorf an Waldstandorten am Bornkampsweg, Volksdorf, und Walter-Hammer-Weg, Bergedorf gefällt.

Um die RNA für spätere Genexpressionsstudien in einem qualitativ guten Zustand zu bewahren, erfolgte die Probenahme angelehnt an ein Protokoll von Ugglå und Sundberg (2002). Gesunde Robinien mit Stammquerschnitten von 20 bis 40 cm wurden gefällt. Der Transport der Querschnitte erfolgte auf Trockeneis. Im Labor wurden die Proben mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, mit einem Stechbeitel in „Kuchenstücke“ aufgeteilt und bei -80 °C gelagert. Eine Übersicht der beschafften Proben zeigt Tabelle 2-1.

Tabelle 2-1: Probennummer, Fällort und Fällzeitpunkt der Robinienproben des Jahres 2012/2013.

Probennummer	Fällort	Fällzeitpunkt
2012_Jun1	Volksdorf	05.06.2012
2012_Jun2	Bergedorf	13.06.2012
2012_Jul	Volksdorf	25.07.2012
2012_Sep1	Volksdorf	26.09.2012
2012_Sep2	Volksdorf	26.09.2012
2012_Dez1	Volksdorf	13.12.2012
2012_Dez2	Volksdorf	13.12.2012
2013_Mär1	Volksdorf	05.03.2013
2013_Mär2	Volksdorf	05.03.2013

Für Genexpressionsstudien an RNA aus homogenisiertem Material (keine Isolierung der verschiedenen Parenchyme mittels Lasermikrodissektion) wurde jeweils ein „Kuchenstück“ der Querschnitte für sieben Tage gefriergetrocknet und bis zur weiteren Aufarbeitung vakuumverschweisst bei -20 °C gelagert. Zur Präparation der einzelnen Gewebeabschnitte wurden die Proben im Exsikkator auf Raumtemperatur gebracht. Die einzelnen Gewebezonen (vgl. Abbildung 2-1) wurden mithilfe von Stechbeitel und Skalpell unter dem Stereomikroskop (Leica EZ 4; Leica Mikrosysteme, Wetzlar) freigelegt. Die Aufteilung erfolgte in Phloem (Ph), äußerer Splint (OS, etwa ein Jahrring), mittlerer Splint (MS, etwa zwei Jahrringe), innerer Splint (IS, etwa zwei Jahrringe) und Splint-Kern-Übergangszone (TZ, etwa ein Jahrring). Mit einer sterilen Reibe wurden von jeder Zone ca. 50 mg Holzmehl abgetragen. Eine Beschreibung der Aufbereitung von Holzmaterial für die Lasermikrodissektion findet sich in Kapitel 2.3.2.

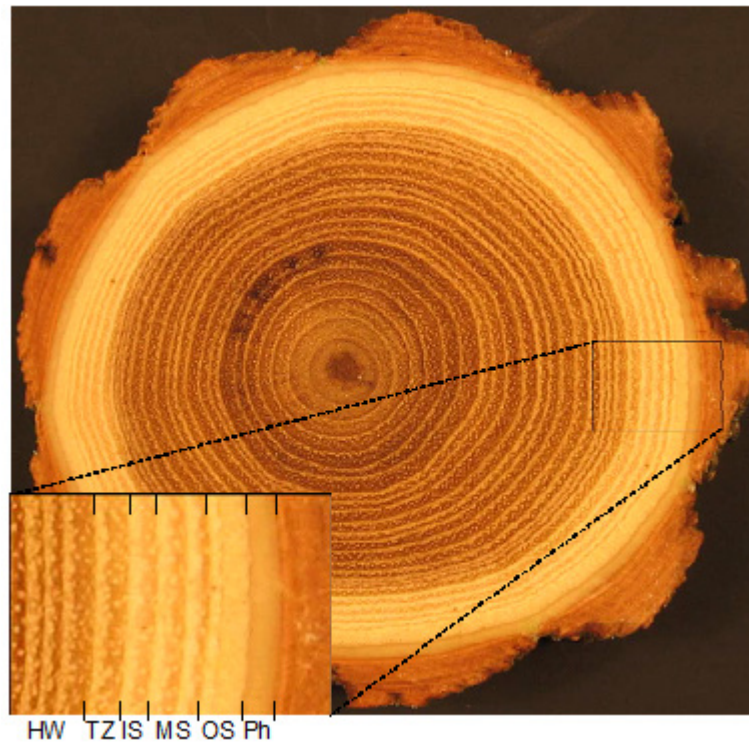


Abbildung 2-1: Querschnitt eines Robinienstammes. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt exemplarisch die einzelnen Gewebezonen. Kernholz (HW), Splint-Kern-Übergangszone (TZ), innerer Splint (IS), mittlerer Splint (MS), äußerer Splint (OS), Phloem (Ph) (Quelle: modifiziert nach Lange 2009).

2.1.2 Proben des Jahres 2008

Bei diesem Probenset handelte es sich um gefriergetrocknetes, bei -80 °C gelagertes, homogenisiertes Holzmehl der verschiedenen Gewebezonen der Robinie. Leider stand nicht für jedes Individuum Holzmehl aller Zonen zur Verfügung. Einen Überblick über die Proben gibt Tabelle 2-2.

Tabelle 2-2: Probennummer, Fällzeitpunkt und als Holzmehl vorhandene Gewebezonen der Robinienproben des Jahres 2008. Für mit x gekennzeichnete Gewebezonen lag für das jeweilige Individuum gefriergetrocknetes Holzmehl vor. Abkürzungen: Phloem (Ph), äußerer Splint (OS), mittlerer Splint (MS), innerer Splint (IS), Übergangszone (TZ).

Probennummer	Fällzeitpunkt	Als Holzmehl vorhandene Gewebezonen				
		Ph	OS	MS	IS	TZ
2008_Apr1	20.04.2008	x	x	x	x	x
2008_Apr2	20.04.2008	x	x	x	x	x
2008_Jun1	23.06.2008	x	x		x	x
2008_Jun2	23.06.2008	x		x	x	
2008_Okt1	28.10.2008	x	x	x	x	x
2008_Okt2	28.10.2008	x	x	x	x	x
2008_Nov1	30.11.2008	x	x	x	x	x
2008_Nov2	30.11.2008	x	x	x	x	x

2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle selbst angesetzten wässrigen Lösungen und Verdünnungen wurden, sofern nicht anders angegeben, unter Verwendung von Reinstwasser angesetzt, welches von einer Reinstwasseranlage „Barnstead Nanopure“ der Firma Thermo Scientific, Waltham, USA aufbereitet wurde. RNase-freies Reinstwasser (DEPC H₂O) wurde folgendermaßen angesetzt: 1 ml Diethylpyrocarbonat wurde in 1 l Reinstwasser emulgiert. Die Lösung wurde anschließend für 30 min bei 121 °C autoklaviert. Vor und nach sämtlichen Versuchen wurden die Oberflächen mit DNA AWAY® (Carl Roth, Karlsruhe) gereinigt, um das Risiko einer Kontamination mit Fremd-DNA zu minimieren. In den folgenden Tabellen sind die verwendeten Geräte (Tabelle 2-3),

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien (Tabelle 2-4) sowie Kits (Tabelle 2-5) dargestellt.

Tabelle 2-3: Verwendete Geräte

Analysewaage	Explorer; OHAUS, USA
Autoklav	Varioklav T25; Thermo Scientific, Waltham, USA
Gelelektrophoreseapparatur	i-MUPID Mini Gel; COSMO BIO Co., Ltd., Tokio, Japan
Geldokumentation	Gel documentation system mit Universal-Haube II; BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Gefriermikrotom	HM 550; Mikrom, Walldorf mit C-Klinge; Jung, Heidelberg
Gefriertrocknungsanlage	Heto Powerdry LL1500; Thermo Scientific, Waltham, USA, mit Vakuumpumpe RZ6; Vacuumbrand, Wertheim
Heizblock	Metallblock-Thermostat VLM LS 2; VLM GmbH, Leopoldshöhe
Kolbenhubpipetten (2,5; 10; 20; 100; 200; 1000 µl)	Eppendorf Research®; Eppendorf AG, Hamburg
Kühl/Gefrierkombination	Bosch
Lasermikrodissektion	PALM® MicroBeam; Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München
Mikrowellengerät	Panasonic
pH-Meter	Five Easy FE20; Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz
Real-Time PCR-Cycler	Mx3005P® QPCR System; Stratagene Agilent Technologies, Böblingen
Rotationsschüttler mit Inkubationshaube	SM 30 control, Inkubationshaube TH 30; Bühler Technologies GmbH, Ratingen
Spektralphotometer	NanoDrop 2000; Thermo Scientific, Waltham, USA
Stereomikroskop	Leica EZ 4; Leica Mikrosysteme, Wetzlar
Systemmikroskop	Systemmikroskop Bx41 mit E-330 Digitalkamera; Olympus, Tokio, Japan

Thermocycler	T-Gradient und T-Personal Thermoblock; Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
Thermoschüttler	Heating Block Thermostat; HLC Biotech, Bovenden
Tiefkühlagerschrank (-80 °C)	HFU 486; Heraeus, Hanau
Vakuumiergerät	Lava V300; Lava, Bad Saulgau
Vortexmischer	MS2 Minishaker; IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Zentrifuge	Biofuge Fresco; Heraeus, Kendro Laboratories, Langenselbold

Tabelle 2-4: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Adhäsive caps	AdhesiveCap 200; Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München
Agar	Oxoid Agar No.1; Thermo Scientific, Waltham, USA
Agarose	Agarose SERVA research grade; SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ampicillin	Ampicillin Natriumsalz $\geq 99\%$; Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Bromphenolblau	Bromphenolblau; Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
DEPC	DEPC $\geq 97\%$; Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Chloroform	ROTIPURAN® Chloroform $\geq 99\%$, p.a.; Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Dimethylformamid	N,N-Dimethylformamid ROTIPURAN® $\geq 99,8\%$, p.a; Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
DNA- Fragmentmarker	GelPilot 100 bp Plus Ladder; Qiagen, Hilden
	GeneRuler™ 100bp DNA Ladder; Thermo Scientific, Waltham, USA
	Invitrogen 100 bp DNA Ladder; Thermo Scientific, Waltham, USA
DNA AWAY®	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
EDTA	EDTA analytical grade; SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ethanol p.a.	ROTIPURAN® Ethanol $\geq 99,5\%$, Ph.Eur., reinst; Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

Ethidiumbromid	Ethidiumbromid ≥ 98 %; Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Essigsäure	Essigsäure 100 %; Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Formaldehyd	Formaldehydlösung 37 % zur Analyse; Merck KGaA, Darmstadt
Glycerin	Glycerin 85 %; Merck KGaA, Darmstadt
Hefeextrakt	Oxoid Yeast Extract; Thermo Scientific, Waltham, USA
Kanamycin	Kanamycinsulfat ≥ 750 I.U./mg; Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
MOPS	MOPS $\geq 99,5$ (titration); Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumacetat	Natriumacetat wasserfrei reinst; Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	NaCl krist. reinst; Merck KGaA, Darmstadt
Objektträger	Objektträger geschliffen 45° ; VWR International GmbH, Darmstadt
RDD-Puffer	RNase-Free DNase Set; Qiagen, Hilden
RNaseOUT™	RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor; Thermo Scientific, Waltham, USA
Saccharose	Sucrose ^{Ultrapure} ; Affymetrix USB, Santa Clara, USA
Salzsäure	ROTIPURAN® Salzsäure ≥ 32 %, p.a.; Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Sterilfilter	Rotilabo® Spritzenfilter, $0,22 \mu\text{m}$; Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Tissue Tec	OCT Tissue Tec; Sakura Finetek Europe B.V., AJ Alphen aan den Rijn, Niederlande
TRIS	TRIS PUFFERAN® $\geq 99,9$ %, p.a; Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Trypton	Oxoid Trypton; Thermo Scientific, Waltham, USA
X-Gal	X-Gal ≥ 99 %; Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

Tabelle 2-5: Verwendete Kits.

Aufreinigung von PCR-Produkten	QIAquick [®] PCR Purification Kit; Qiagen, Hilden
DNase-Verdau	DNase I Kit; Thermo Scientific, Waltham, USA
Extraktion von Gesamt-RNA aus Gesamtgewebe	RNeasy [®] Plant Mini Kit; Qiagen, Hilden
Extraktion von RNA aus disseziertem Material	RNeasy Plus [®] Universal Mini Kit; Qiagen, Hilden
Genomamplifikation	QuantiTect Whole Transcriptome Kit; Qiagen, Hilden
Klonierung	Qiagen PCR Cloning Kit; Qiagen, Hilden
PCR	Taq PCR Core Kit; Qiagen, Hilden
Real-Time PCR	Brilliant II SYBR [®] Green QPCR Master Mix; Agilent Technologies, Böblingen
Reverse Transkription	SuperScript [®] III First-Strand Synthesis System; Thermo Scientific, Waltham, USA

2.3 Lasermikrodissektion zur Isolierung von Axial- und Radialparenchym

2.3.1 Prinzip der Lasermikrodissektion

Die Lasermikrodissektion (LMD) ist eine vielseitig einsetzbare Technik, die eine kontaktfreie, spezifische Isolation einzelner Zellen aus einem inhomogenen Gewebe erlaubt. Die isolierten Zellen können anschließend für Genexpressionsstudien verwendet werden. Für diese Arbeit wurde das PALM[®] MicroBeam System (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München) verwendet, das auf der „Lasermicrodissection and pressure catapulting“- (LMPC) Methode basiert (den Aufbau des Systems zeigt Abbildung 2-2). Dabei werden definierte Gewebe zunächst ausgeschnitten und anschließend katapultiert. Das System beinhaltet einen UV-A-Impulslaser, der an ein Invertmikroskop gekoppelt ist. Das Mikroskop ist mit einer Kamera ausgestattet, die mit einem Rechner verbunden ist. Die Steuerung erfolgt über die mitgelieferte PALM[®] Robo Software.



Abbildung 2-2: Aufbau des PALM® MicroBeam Systems. 1: inverses Mikroskop; 2: RoboStage; 3: zentrale Steuereinheit; 4: Festkörperlaser; 5: Steuereinheit des Lasers; 6: Joystick zur Steuerung des CapMovers; 7: CapMover; 8: Kamera; 9: Rechner zur Steuerung des Systems.

Die Lichtfokussierung erfolgt durch die Objektivlinse, was Schnittdicken von weniger als 1 μm erlaubt (Abbildung 2-3 zeigt den Strahlengang des Lasers schematisch). Nur in diesem Bereich ist die Energie des Lasers ausreichend, um Gewebe zu schneiden. Da das PALM® System einen UV-A-Laser bei einer Wellenlänge von $\lambda = 355 \text{ nm}$ verwendet, entsteht bei dem ohnehin sehr schnellen Schneiden keine Hitze, das umliegende Gewebe bleibt somit unbeschädigt. Über einen angeschlossenen Rechner wird die RoboStage, auf dem der Objektträger mit der Probe fixiert ist, bewegt. Der Laser schneidet dabei entlang einer zuvor mit der Software definierten Linie.

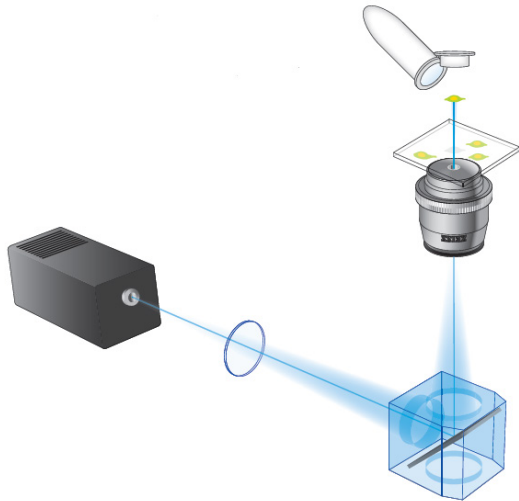


Abbildung 2-3: Schematische Darstellung des Strahlengangs im PALM[®] MicroBeam. Der Laserstrahl wird durch das Mikroskopobjektiv auf die Probe fokussiert. Nach dem Schneiden wird das ausgeschnittene Areal durch einen Laserimpuls in das Sammelgefäß katapultiert (Quelle: Broschüre „The PALM[®] family“, Carl Zeiss MicroImaging GmbH).

Das Katapultieren des ausgeschnittenen Gewebes erfolgt ebenfalls durch den Laser kontaktfrei, durch einen finalen Impuls des Lichts außerhalb der Fokusebene. Die ausgeschnittenen Areale werden dabei mehrere Millimeter gegen die Schwerkraft katapultiert. Dies erlaubt einen kontaktfreien Transport in „adhäsive caps“ (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München). Hierbei handelt es sich um 0,5 ml Reaktionsgefäße deren Deckel mit einem opaken Haftmittel beschichtet sind, was eine pufferfreie Dissekttaufnahme ermöglicht. Über die „Checkpoint“ Position kann mikroskopisch überprüft werden, ob die Gewebestücke vollständig in das „adhäsive cap“ katapultiert wurden. Mithilfe des „CapMovers“ kann die Position des „caps“ dabei verändert werden.

Durch diese kontakt- und kontaminationsfreie Technik können selbst lebendige Organismen wie der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* ausgeschnitten und transportiert werden, ohne die Vitalität der Zellen zu verschlechtern (Quelle: Video-Demonstration, LCM-Workshop 2011, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München).

2.3.2 Vorbereitung des Probenmaterials

Aus den bei -80 °C gelagerten Robinienproben wurden mithilfe von Säge und Stechbeitel ca. 1-2 cm² große Klötzchen angefertigt. Dabei wurden die Borke und zu große Kernholzbereiche entfernt. Diese Arbeiten fanden in der Kühlkammer (-20 °C)

statt, um ein Auftauen der Proben und eine damit einhergehende Zerstörung der RNA zu vermeiden.

Die Herstellung von radialen Längsschnitten erfolgte am Gefriermikrotom (Mikrom, Heidelberg)

Die Klötzchen wurden mit OCT Tissue Tek[®] Medium (Sakura, AJ Alphen aan den Rijn, Niederlande) auf einem Objektisch in der Schnellgefrierstation des Gefriermikrotoms (-60 °C) fixiert. Anschließend wurde der Objektisch in die Halterung des Mikrotoms eingespannt. Die Ausrichtung entsprach dabei dem Faserlauf des fixierten Robinienklötzchens. Zum Schneiden wurde eine scharfe C-Klinge (Jung, Heidelberg) verwendet. Der Schneidewinkel betrug 10°. Zunächst erfolgte ein Trimmen des Klötzchens (Schnittdicke 40 µm). Danach das Anfertigen der Feinschnitte (Schnittdicke 10 µm) in radialer Richtung. Die Schnitte wurden mithilfe eines Zucker/Ethanol-Gemischs (in Anlehnung an persönliche Mitteilungen von Lange und Moreth) auf Objektträgern fixiert. Die Fixierung wird im Folgenden erläutert:

Zunächst wurde die ethanolische Zuckerlösung (70 % Ethanol p.a., 30 % DEPC H₂O, 50 mg/ml Saccharose) in einem 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß angesetzt und auf einem Heizblock auf 60 °C erwärmt. Die Objektträger wurden mehrmals durch eine Spiritusflamme gezogen, um Fettrückstände und RNasen zu entfernen. Nachdem die Objektträger auf dem Heizblock ebenfalls auf 60 °C erwärmt wurden, erfolgte das Pipettieren von 50 µl der Zuckerlösung auf die Objektträger. Die Zuckerschicht wurde mithilfe der Pipettenspitze gleichmäßig verteilt und auf dem Heizblock getrocknet. Nach dem Abkühlen auf -20 °C im Gefriermikrotom waren die Objektträger bereit zur Fixierung der Feinschnitte. Die Feinschnitte wurden vorsichtig mit einer sterilen Pinzette auf die Objektträger gelegt. Um eine Krümmung der Schnitte zu vermeiden, geschah dies auf der Klingenthalterung des Gefriermikrotoms. Die Objektträger wurden mit einem zweiten Objektträger abgedeckt und mit Klammern fixiert. Danach wurden die Schnitte ca. 24 Stunden gefriergetrocknet. Der obere Objektträger wurde abgenommen und die Schnitte an den Enden zusätzlich mit Klebestreifen fixiert. Die Splint-Kern-Übergangszone wurde mithilfe von UV-Licht definiert und angrenzende Splint- bzw. Kernholzbereiche mit Klebestreifen abgedeckt.

Die Lasermikrodissektion erfolgte im direkten Anschluss.

2.3.3 Durchführung der Lasermikrodissektion

Die Lasermikrodissektion wurde mit dem PALM[®] MicroBeam System der Firma Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München, durchgeführt.

Die gefriergetrockneten, auf dem Objektträger fixierten Schnitte wurden im Exsikkator auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend wurden die Objektträger in die RoboStage des PALM[®] Systems eingespannt und die Robo Software gestartet. Bei fünffacher Vergrößerung wurden radiale bzw. axiale Parenchyme gesucht, der Fokus optimiert und die Areale für die spätere Dissektion markiert. Um im Anschluss genügend Ausgangsmaterial für die RNA-Aufarbeitung zu erhalten wurde darauf geachtet, dass die Flächen der markierten Areale für eine Probe in der Summe mindestens 500.000 μm^2 betragen (jeweils für Axial- und Radialparenchym), was bei einer Schnittdicke von 10 μm etwa 1000 Zellen entspricht.

Um optimale Schnittdicken zu erreichen, müssen Fokus und Energie des Lasers akkurat auf die jeweilige Probe eingestellt werden. Aus diesem Grund wurden die einzelnen Areale zunächst mit der Funktion „cut“ geschnitten, während des Schneidens wurden Fokus und Energie optimiert. Das Schneiden erfolgte bei fünffacher Vergrößerung mit den Parametern Energie = 100 % und Fokus = 65-79 %. Im Anschluss wurden die bereits geschnittenen Areale mit der Funktion „close cut and Auto LPC“ noch einmal geschnitten und daraufhin in die „adhäsiven caps“ (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München) katapultiert. Die Parameter für Laserenergie und -fokus blieben dabei unverändert zur „cut“ Funktion. Mithilfe der „Checkpoint“ Position des RoboStage wurde mikroskopisch überprüft, ob das isolierte Gewebe komplett in das „adhäsive cap“ katapultiert wurde. Da das Dissektieren von mindestens 500.000 μm^2 mehrere Stunden Zeit in Anspruch nahm, wurden, um RNA-Abbauprozesse im dissektierten Material zu vermeiden, die „adhäsiven caps“ nach ca. einer Stunde ausgetauscht, mit Lysispuffer (QIAzol Lysis Reagent) versetzt und bei -20 °C gelagert. Sobald genügend dissektiertes Material zur Verfügung stand, wurde umgehend die RNA-Extraktion durchgeführt (vgl. Kapitel 2.4.2).

2.4 Extraktion von Nukleinsäuren

2.4.1 Extraktion von Gesamt-RNA aus Gesamtgewebe

Für spätere Genexpressionsstudien sowie zur Identifizierung der zu untersuchenden Gene wurde Gesamt-RNA benötigt.

Die Extraktion erfolgte mithilfe des RNeasy[®] Plant Mini Kit der Firma Qiagen (Hilden). Als Ausgangsmaterial dienten 25 mg gefriergetrocknetes, homogenisiertes Material verschiedener Gewebe der Robinienproben. Das Schema der Extraktion zeigt Tabelle 2-6. Das Verfahren beinhaltet: Zellyse durch eine Pufferlösung (Schritte 2+3); Entfernung unlöslicher Bestandteile durch Filtration und Zentrifugation (Schritte 4-9); Ethanol-Fällung der RNA (Schritte 10+11); Immobilisierung der RNA an eine Silikat-Matrix (Schritte 12-15); Waschschrirte mit einer Pufferlösung (Schritte 16-21); Elution der RNA von der Matrix durch RNase-freies Wasser (Schritte 23-26).

Tabelle 2-6: Extraktion von Gesamt-RNA aus Gesamtgewebe mit dem Qiagen RNeasy® Plant Mini Kit. Zentrifugationsgeschwindigkeiten und -zeiten wurden modifiziert. Zudem wurde ein dritter Waschschrift eingeführt.

01	Einwaage von 25 mg Holzmehl in 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß
02	Zugabe von 650 µl RLT-Puffer (Zellyse)
03	Inkubation für 10 min bei 27 °C im Thermoschüttler
04	Überführung auf Qia Schredder-Säulen (Entfernung unlöslicher Bestandteile)
05	Zentrifugation für 2 min bei 13.000 rpm
06	Die Lösung ohne Pellet in frisches 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführen
07	Die Säule mit 200 µl RLT-Puffer spülen
08	Zentrifugation für 2 min bei 13.000 rpm
09	Lösung ohne Pellet in das Reaktionsgefäß aus Schritt 06 überführen
10	Zugabe von 425 µl kaltem Ethanol, 99,8 % p.a. (Fällen der RNA)
11	Mischen der Lösung durch sehr vorsichtiges Drehen und Rollen
12	Überführen von 650 µl der Lösung auf Spin Column (Immobilisierung der RNA)
13	Zentrifugation für 25 s bei 8.500 rpm
14	Verwerfen des Filtrats; Überführen der restlichen RNA-Lösung auf die Säule
15	Zentrifugation für 25 s bei 8.500 rpm
16	Verwerfen des Filtrats; Zugabe von 700 µl RW1-Puffer (Waschschrift)
17	Zentrifugation für 25 s bei 8.500 rpm
18	Verwerfen des Filtrats; Zugabe von 500 µl RPE-Puffer (2. Waschschrift)
19	Zentrifugation für 25 s bei 8.500 rpm
20	Die Schritte 18 und 19 wiederholen
21	Zentrifugation für 2 min bei 12.000 rpm
22	Überführung der Spinsäule auf neues 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß
23	Zugabe von 35 µl RNase free water auf die Mitte der Spinsäule (Elution)
24	Inkubation für 5 min bei RT
25	Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm
26	Das Eluat erneut auf die Säule geben und die Schritte 24 bis 25 wiederholen
27	Lagerung bei -20 bzw. -80 °C

2.4.2 Extraktion von RNA aus mikrodisektiertem Probenmaterial

Zur RNA-Extraktion aus Parenchymmaterial, das durch Lasermikrodisektion gewonnen wurde, diente das RNeasy Plus[®] Universal Mini Kit der Firma Qiagen (Hilden) in Kombination mit den RNeasy MinElute[®] Spin Columns des RNeasy Micro[®] Kits (Qiagen, Hilden).

Das RNeasy Plus Universal Mini Kit beinhaltet einen Phenol/Guanidin basierten Lysisschritt, was eine höhere Effektivität der Lysis (bei gleichzeitiger Inhibierung von RNasen) und damit der RNA-Ausbeute gewährleisten soll.

Durch eine Phasentrennung werden DNA und RNA voneinander getrennt, was einen späteren Verdau störender genomischer DNA überflüssig machen soll. Nach mehreren Vorversuchen wurde das Protokoll trotzdem um einen Verdauerschritt erweitert. Dabei wurde DNase I (Thermo Scientific, Waltham, USA) 1:5 mit RDD-Puffer (aus RNase-Free DNase Set; Qiagen, Hilden) verdünnt. Der Verdau fand während der Extraktion direkt auf der Säule statt. Mithilfe der Mini-Spin-Säulen des RNeasy Micro[®] Kits ist es, laut Hersteller, möglich, aus wenigen Zellen verlässlich RNA zu isolieren. Das dissektierte Material befand sich zunächst noch in „adhäsiven caps“ (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München), vgl. Kapitel 2.3.3; daher wurde 50 µl QIAzol Lysis Reagent in die „adhäsiven caps“ pipettiert, daraufhin wurde für 30 s bei 4.000 rpm zentrifugiert. Es folgte ein Spülen des Deckels (50 µl QIAzol Lysis Reagent) und erneutes Zentrifugieren. Die Lösung wurde anschließend in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Das weitere Protokoll kann Tabelle 2-7 entnommen werden.

Die Extraktion beinhaltet die Lysis der Zellen (Schritte 1+2), Phasentrennung (Schritte 3-7), Fällung der RNA (Schritt 8), Immobilisierung der RNA an eine Silikat-Matrix (Schritte 09-12), DNase-Verdau (Schritte 15-17), Waschschrte (Schritte 18-23) und schließlich Elution (Schritte 26-30).

Tabelle 2-7: Extraktion von RNA mit dem Qiagen RNeasy® Plus Universal Mini Kit. Für die Immobilisierung der RNA wurden die RNeasy MinElute® Spin Columns des Qiagen RNeasy Micro® Kits verwendet.

01	Zugabe von 800 µl QIAzol Lysis Reagent (Zellyse)
02	Schütteln und Inkubation für 5 min bei RT
03	Zugabe von 100 µl gDNA Eliminator; mischen
04	Zugabe von 180 µl Chloroform; mischen
05	Inkubation für 3 min bei RT
06	Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 13.000 rpm (Phasentrennung)
07	600 µl der oberen (wässrigen Phase) in frisches 2 ml Reaktionsgefäß überführen
08	Zugabe von 600 µl Ethanol, 99,8 % p.a.; vorsichtiges Mischen (Fällen der RNA)
09	650 µl der Lösung auf MinElute® Columns überführen (Immobilisierung der RNA)
10	Zentrifugation für 15 s bei 10.000 rpm
11	Verwerfen des Filtrats und die restliche RNA-Lösung auf die Säule überführen
12	Zentrifugation für 15 s bei 10.000 rpm
13	Zugabe von 350 µl RWT-Puffer (Waschschritt)
14	Zentrifugation für 15 s bei 10.000 rpm
15	Verwerfen des Filtrats und Zugabe von 50 µl des DNase I/RDD-Puffer Gemischs (1:5)
16	Inkubation für 15 min bei RT (Verdau genomischer DNA)
17	Zentrifugation für 15 s bei 10.000 rpm
18	Verwerfen des Filtrats und Zugabe von von 350 µl RWT-Puffer
19	Zentrifugation für 15 s bei 10.000 rpm
20	Verwerfen des Filtrats und Zugabe von 500 µl RPE-Puffer
21	Zentrifugation für 15 s bei 10.000 rpm
22	Verwerfen des Filtrats und Zugabe von 500 µl RPE-Puffer
23	Zentrifugation für 2 min bei 10.000 rpm
24	Überführen der Säule auf ein collection tube
25	Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm
26	Überführen der Säule auf 1,5 ml Reaktionsgefäß und Zugabe von 30 µl RNase free water (Elution)
27	Inkubation für 5 min bei RT
28	Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm
29	Das Eluat erneut auf die Säule überführen
30	Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm
31	Lagerung bei -20 bzw. -80 °C

2.5 Aufbereitung der extrahierten Nukleinsäuren

2.5.1 DNase-Verdau

Die aus den Gesamt-RNA-Extraktionen aus Gesamtgewebe erhaltenen Eluate enthielten neben RNA auch genomische DNA. Da DNA spätere Quantifizierungsmethoden stört, wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Die verwendeten Pufferlösungen und Enzyme stammten von der Firma Thermo Scientific, Waltham, USA. Das Pipettierschema zeigt Tabelle 2-8.

Tabelle 2-8: Ansatz des DNase-Verdaus.

4 µl	10x Puffer, ohne MnCl ₂	
5 µl	DNase I	Endkonzentration 5 U
0,5 µl	RNase Out	Endkonzentration 20 U
3 µl	RNA	

Es folgte eine Inkubation für 1 h bei 37 °C im Thermocycler. Der Verdau wurde durch Zugabe von 1 µl EDTA (25 mM) und Inkubation für 10 min bei 65 °C gestoppt.

Die Lagerung der DNase-verdauten RNA-Produkte erfolgte bei -20 °C.

2.5.2 Reverse Transkription

Während der reversen Transkription (RT-PCR) wird mRNA in komplementäre cDNA umgeschrieben. Mithilfe von Oligo(dT)-Primern, die am Poly(A)-Schwanz des 3' Endes der eukaryotischen mRNA hybridisieren, werden aus der Gesamt-RNA selektiv mRNA-Moleküle in cDNA transkribiert (Schrimpf 2002). Oligo(dT)-Primer bieten gegenüber Random-Primern (Hexamere) einen weiteren Vorteil, da die Effizienz der reversen Transkription höher ist (Jozefczuk und Adjaye 2011).

Die reverse Transkription von extrahierter RNA aus Gesamtgewebe in komplementäre cDNA wurde mit dem SuperScript® III First-Strand Synthesis System der Firma Thermo Scientific, Waltham, USA durchgeführt. Den Reaktionsansatz zeigt Tabelle 2-9.

Tabelle 2-9: Mastermix 1 der reversen Transkription mit dem SuperScript® III First-Strand Synthesis Kit von Thermo Scientific.

1 µl	DEPC H ₂ O	
10 µl	DNase-verdaute RNA	
1 µl	dNTP Mix	Endkonz. 0,77 mM
1 µl	Oligo(dT) Primer	Endkonz. 1 µg

Der Ansatz wurde zunächst im Thermocycler für 5 min bei 65 °C und anschließend für 1 min auf Eis inkubiert. Es folgte die Zugabe von Mastermix 2 (Tabelle 2-10).

Tabelle 2-10: Mastermix 2 der reversen Transkription mit dem SuperScript® III First-Strand Synthesis Kit von Thermo Scientific.

2 µl	10x RT-Puffer (Tris-HCl pH 8,4; KCl)	Endkonz. Tris-HCl: 40 mM, KCl: 100 mM
4 µl	MgCl ₂ (25 mM)	Endkonz. 10 mM
2 µl	DTT (0,1 M)	Endkonz. 20 mM
1 µl	RNase Out	Endkonz. 20 U
1 µl	SuperScript III RT	Endkonz. 200 U

Es folgten die reverse Transkription im Thermocycler für 50 min bei 50 °C und eine Hitzedeaktivierung für 5 min bei 85 °C. Die cDNA wurde bei 4 bzw. -20 °C gelagert.

2.5.3 Amplifikation des gesamten Transkriptoms

Da die RNA aus lasermikrodissektiertem Material sehr gering konzentriert war, wurde mithilfe des QuantiTect Whole Transcriptome Kit (Qiagen, Hilden) das gesamte Transkriptom voramplifiziert. Mithilfe des Kits ist es, laut Hersteller, möglich, bis zu 40 µg cDNA aus 1 ng RNA zu gewinnen. Am Anfang des Prozesses steht eine reverse Transkription (mithilfe von Oligo(dT)-Primern), gefolgt von einer Ligation der cDNA, die der Hersteller nicht näher erläutert. Am Ende steht eine Amplifikation für zwei oder acht Stunden mithilfe einer REPLI-g DNA-Polymerase. Im Folgenden wird das Protokoll wiedergegeben. Die Reaktionsansätze der Mastermixe für reverse Transkription, Ligation und Amplifikation sind in Tabelle 2-11 dargestellt. Das Temperaturprogramm des Thermocyclers zeigt Tabelle 2-12. Verwendet wurden die Thermocycler Tpersonal und Tgradient der Firma Biometra®, Göttingen. Zu jedem der drei Schritte (reverse Transkription, Ligation, Amplifikation) musste der entsprechende Mastermix frisch angesetzt werden. Qiagen gibt für die Puffer und Enzyme keine Konzentrationen an.

Tabelle 2-11: Reaktionsansätze zur Transkriptomamplifizierung mittels Qiagen QuantiTect Whole Transcriptome Kit.

RT Mix		Ligationsmix		Amplifikationsmix		
2 µl	T-Script Buffer	3 µl	Ligation Buffer	14,5 µl	REPLI-g Midi Reaction Buffer	
0,5 µl	T-Script Enzym	1 µl	Ligation Reagent	0,5 µl	REPLI-g	Midi DNA-Polymerase
		0,5 µl	Ligation Enzyme1			
		0,5 µl	Ligation Enzyme2			

Tabelle 2-12: Temperaturprogramm zur Transkriptomamplifizierung mittels Qiagen QuantiTect Whole Transcriptome Kit. Vor den Temperaturschritten 1, 3 und 4 wurden die angegebenen Mastermixe hinzugegeben.

Schritt	Zeit	Temperatur	Zugabe von
1	30 min	37 °C	RT Mix
2	5 min	95 °C	
3	2 h	22 °C	Ligationsmix
4	8 h	30 °C	Amplifikationsmix
5	5 min	95 °C	

Die erhaltene cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.6 Amplifikation der cDNA mittels PCR

2.6.1 Prinzip der PCR

Die PCR ermöglicht die Amplifikation sehr geringer DNA- bzw. cDNA-Mengen aus verschiedensten Ausgangsmaterialien.

Das Prinzip der PCR basiert darauf, dass zunächst ein DNA-Doppelstrang denaturiert wird und aus beiden Einzelsträngen, mittels spezifischer Primer, je eine Kopie des Zielfragments synthetisiert wird. Dieser Teilschritt (Zyklus) wird 30 bis 40-mal wiederholt. Die Anzahl der DNA-Kopien steigt auf diese Weise exponentiell an. Man erhält am Ende also 2^n Kopien des Ausgangsmaterials, wobei „n“ für die Anzahl der

Zyklen steht.

Um einen Abschnitt der DNA (bspw. ein Genfragment) erfolgreich mittels PCR vervielfältigen zu können, müssen Teilsequenzen des Gens bekannt sein. Mithilfe dieser Teilsequenzen lassen sich spezifische Oligonukleotide (Primer) herstellen. Weitere unverzichtbare Bestandteile eines PCR-Ansatzes sind freie Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs) und eine DNA-Polymerase.

Die einzelnen Schritte werden im Folgenden erläutert.

Der erste Schritt ist die Denaturierung des DNA-Doppelstranges. Eine vollständige Denaturierung ist hier wichtig, da ansonsten die Effektivität der Oligonukleotid-Anlagerung deutlich herabgesetzt wird. Am Anfang einer PCR sollte daher ein einmaliger Denaturierungsschritt von 1-5 Minuten bei 94-95 °C erfolgen.

Nachdem die DNA in Einzelstränge aufgespalten ist, erfolgt die Anlagerung der Primer an die komplementäre Stelle des jeweiligen Einzelstranges. In einem PCR-Ansatz werden ein forward Primer (Sense Primer) sowie ein reverse Primer (Antisense Primer), der sich an den komplementären Einzelstrang anlagert, eingesetzt.

Die Anlagerungstemperatur (Annealing) liegt hierbei, abhängig von der Nukleotidzusammensetzung des Primers, zwischen 40 und 60 °C. Dabei ist der mittlere Schmelzwert der beiden Primer entscheidend. Bei einer zu hoch gewählten Temperatur kann kein Annealing mehr stattfinden und man erhält kein PCR-Produkt. Ist die Annealing-Temperatur zu niedrig, kommt es zu Fehlpaarungen und man erhält ein unspezifisches PCR-Produkt.

Im nächsten Schritt erfolgt die Synthese eines neuen Doppelstrangs mithilfe der DNA-Polymerase und in Gegenwart der dNTPs in 3' - 5' Richtung (Elongation).

Die meist verwendete Polymerase ist die *Taq*-Polymerase. Dieses Enzym entstammt dem grampositiven, thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* und übersteht den Denaturierungsschritt unbeschadet. Die Elongation erfolgt bei 72 °C, dem Temperaturoptimum der *Taq*-Polymerase. Die Elongationszeit hängt von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments ab. Als Faustregel gilt: 60 Sekunden für 1000 bp. Im Anschluss kann der nächste Zyklus beginnen. Nach Beendigung des letzten Zyklus erfolgt ein finaler Extensionsschritt bei 72 °C. In diesem Schritt werden partiell verlängerte Produkte vervollständigt (Müller 2001).

2.6.2 Primerdesign

Bei der Erstellung von genspezifischen Primern (GSP) für die Kandidatengene wurde darauf geachtet, möglichst den Richtlinien zum PCR-Primerdesign zu folgen (PREMIER-Biosoft 1994). Die Länge der Primer sollte dabei 18-22 bp betragen. Diese Länge sollte eine spezifische Bindung an das Template gewährleisten. Die Schmelztemperatur sollte zwischen 52 und 58 °C liegen, sie wurde mithilfe eines MWG Online-tools überprüft (www.ecom.mwgdna.com/services/oligo/appl-oligos.tcl?usca_p=t, Abruf 07.03.2014). Ein GC Gehalt von 40-60 % sollte gewählt werden. Am 3' Ende des Primers, helfen bis zu drei G- oder C-Basen eine spezifische Bindung zum Template aufzubauen. Der Hang zur Ausbildung von Sekundärstrukturen, wie Hairpins, Dimeren und Cross-Dimeren sollte gering sein ($\Delta G \leq 5$ kcal/mol bzw. ≤ 3 kcal/mol für Hairpins). Diese Parameter wurden mithilfe der Primer Premier 5 Software (Lalitha 2000) überprüft. Repeats (mehrmalige Wiederholung einer Dinukleotidfolge) sollten vermieden werden, da diese zu Fehlbindungen führen können. Dies gilt ebenfalls für Runs (mehrmalige Wiederholung eines einzelnen Nukleotids).

2.6.3 Durchführung der PCR mit cDNA-Template, erhalten aus Gesamtgewebe

Die PCR wurde mit dem *Taq* PCR Core Kit der Firma Qiagen in Ansätzen von 12,5 µl durchgeführt. Das Pipettierschema des Mastermix ist in Tabelle 2-13 dargestellt. Zur Kontrolle der PCR-Bedingungen wurde eine Negativkontrolle ohne DNA- bzw. cDNA-Template verwendet. Die Amplifikation erfolgte in den Thermocyclern Tpersonal und Tgradient der Firma Biometra[®], Göttingen. Das Temperaturprogramm der Thermocycler zeigt Tabelle 2-14. Die Annealing-Temperatur sowie die Elongationszeit wurden entsprechend der eingesetzten Primer angepasst.

Tabelle 2-13: Pipettierschema des Qiagen Taq PCR Core Kit. Das Gesamtvolumen des Mastermix betrug 12 µl. Hinzu kamen 0,5 µl Template-DNA.

Bidest	7,775 µl
Q-Solution	2,5 µl
10x Reaktionspuffer	1,25 µl
dNTP Mix	0,25 µl (Endkonzentration 0,2 mM)
forward Primer	0,075 µl (Endkonzentration 0,6 µM)
reverse Primer	0,075 µl (Endkonzentration 0,6 µM)
Taq Polymerase	0,075 µl (Endkonzentration 0,3 U)

Tabelle 2-14: Temperaturprogramm der PCR mit dem Qiagen Taq PCR Core Kit. Die Elongation variierte je nach Länge des zu amplifizierenden Fragments. Die Annealing-Temperatur war von den eingesetzten Primern abhängig.

Schritt	Temperatur	Zeit	
Anfangsdenaturierung	94 °C	4 min	
Denaturierung	94 °C	30 s	35-40 Zyklen
Annealing	50-55 °C	30 s	
Elongation	72 °C	20-60 s	
finaler Extensionsschritt	72 °C	7 min	

2.7 Agarosegelelektrophorese

Die Überprüfung der PCR-Produkte sowie der RNA-Qualität erfolgte mithilfe der Agarosegelelektrophorese.

Agarose ist ein Polysaccharid aus roten Meeresalgen und bildet Poren von 150 bis 500 nm (bei 1 % bzw. 0,16 % Agarose). Diese Methode ist zur Trennung von DNA-Fragmenten geeignet, die eine Länge von 0,5-15 kb aufweisen. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die Fragmente durch die Poren zum positiven Pol. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei umgekehrt proportional zur Größe des Fragments (Sambrook und Russel 2001).

Zur Herstellung eines 2,5 %igen Agarosegels wurden 2,5 g Agarose in 100 ml 0,5 %igem TAE-Puffer (TRIS-Acetat-0,5 M EDTA) gelöst. Als Laufpuffer diente ebenfalls 0,5 %iger TAE-Puffer.

2,5-5 µl PCR-Produkt wurden mit etwa 0,5 µl „Loading buffer“ (0,25 %

Bromphenolblau, 30 % Glycerin in TAE-Puffer) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Das Glycerin erhöht dabei die Dichte des Gemischs und sorgt so für ein Verbleiben der Probe in der Geltasche.

DNA-Fragmentmarker verschiedener Firmen wurden zudem als Längenvergleich auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 25 min bei 135 V.

Es folgte eine Ethidiumbromidfärbung des Amplifikats (2 min in einem 0,00015 %igen Ethidiumbromidbad). Unspezifische Anfärbungen wurden durch einen Waschschrift (20 min in ddH₂O) entfernt. Die Visualisierung erfolgte unter dem Geldoq System der Firma Bio-RAD Laboratories GmbH, München.

Zur Überprüfung der RNA-Qualität wurden 2,5 %ige Formaldehyd-Agarosegele unter denaturierenden Bedingungen analysiert. Dabei wurde 1 µl RNA mit 1 µl „Loading buffer“ versetzt, anschließend wurde für fünf Minuten bei 65 °C denaturiert, gefolgt von einer Minute Inkubation auf Eis. Die Zusammensetzung der Gele und des Laufpuffers zeigt Tabelle 2-15. Die Gelelektrophoresebedingungen waren gleich denen der Standard-Agarosegelelektrophorese, das Anfärben verlief ebenfalls analog.

Tabelle 2-15: Zusammensetzung von Gel, Laufpuffer und MOPS Puffer für RNA-Gele unter denaturierenden Bedingungen. Die Abkürzung MOPS steht für 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure.

10x MOPS Puffer		Laufpuffer		RNA-Gel	
200 mM	MOPS	25 ml	10x MOPS Puffer	2 ml	10x MOPS Puffer
50 mM	Natriumacetat	5 ml	Formaldehyd (37%)	17,6 ml	DEPC H ₂ O
10 mM	EDTA	220 ml	DEPC H ₂ O	0,5 g	Agarose
500 ml	DEPC H ₂ O			400 µl	Formaldehyd (37%)
auf pH 7 einstellen					

2.8 Aufreinigung der PCR-Produkte

Das PCR-Produkt enthält neben der amplifizierten DNA bzw. cDNA auch noch Primer, Salze, Enzyme, Nukleotide und andere Fremdbestandteile. Damit eine optimale Sequenzierung gewährleistet werden kann, müssen diese Bestandteile entfernt werden. Zu diesem Zweck erfolgte eine Aufreinigung mithilfe des QIAquick® PCR Purification Kit der Firma Qiagen.

Das Protokoll (Tabelle 2-16) beinhaltet die Immobilisierung der Nukleinsäuren auf einer Säule (Schritt 02), verschiedene Waschschrirte (Schritte 06 bis 09) sowie die Elution des aufgereinigten PCR-Produkts von der Säule (Schritte 11 bis 13).

Tabelle 2-16: Protokoll der Aufreinigung mit dem QIAquick® PCR Purification Kit.

01	PCR-Produkt mit 100 µl PBI-Puffer versetzen
02	Überführen der Lösung auf Spin Column Säule (Immobilisierung der DNA)
03	Zentrifugation für 30 s bei 8.000 rpm
04	Erneutes Überführen des Filtrats auf die Säule
05	Zentrifugation für 30 s bei 8.000 rpm
06	Filtrat verwerfen und Zugabe von 600 µl PE-Puffer (Waschschritt)
07	Zentrifugation für 30 s bei 8.000 rpm
08	Wiederholung der Schritte 06 und 07
09	Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm
10	Überführen der Spinsäule auf frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß
11	Zugabe von 35 µl EB-Puffer (Elution)
12	Inkubation für 2 min bei RT
13	Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm

2.9 Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die Sequenzierung der DNA-Einzelstränge erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon. Dazu wurden für jede Einzelstrang-Sequenzierung 15 µl aufgereinigtes PCR-Produkt sowie eine ausreichende Menge Primer (3 pmol/µl) zur Verfügung gestellt.

Die Auswertung der Rohdaten, bzw. das Erstellen von Sequenzalignments erfolgte mithilfe der Programme MEGA5 (Tamura et al. 2011) und ClustalW (Larkin et al. 2007). Eine Überprüfung der Sequenzierkurven erfolgte ebenfalls mit MEGA5.

Die Sequenzen wurden mithilfe des „basic local alignment search tools“ (BLAST) mittels des BLASTn Algorithmus (Altschul et al. 1997) gegen die GenBank Datenbank des National Center For Biotechnology Information (NCBI) abgeglichen. Aufgrund der „International Nucleotide Sequence Database Collaboration“ (INSDC) werden durch diesen Abgleich weitere Datenbanken, wie das European Nucleotide Archive (ENA) vom Europäischen Bioinformatik-Institut und die DNA Data Bank of Japan (DDBJ) vom

National Institute of Genetics, abgefragt. So ist sichergestellt, dass die Sequenzen stets mit dem größtmöglichen Datenpool verglichen werden.

2.10 Klonierung von Genfragmenten

Zur Identifizierung der Kandidatengene HS70 und 14-3-3 musste überprüft werden, ob es sich bei den sequenzierten Genfragmenten um ein einzelnes Gen oder um mehrere Mitglieder einer Genfamilie handelt. Daher wurden die Genfragmente kloniert. Die Klonierung ermöglicht die Identifizierung verschiedener Mitglieder einer Genfamilie in einem Amplifikat, die sich durch die Bandenlänge im Agarosegel nicht unterscheiden lassen. Dabei wird das mittels PCR amplifizierte DNA-Fragment in einen Plasmidvektor eingebaut (Ligation). Die mit der *Taq*-Polymerase amplifizierten PCR-Produkte verfügen am 3'-Ende grundsätzlich über einen Adenin-Überhang. Der Klonierungsvektor liegt während der Ligation in linearisierter Form vor und besitzt am 3'-Ende einen Uracil-Überhang. Vektor und PCR-Produkt weisen somit zueinander komplementäre Enden („sticky ends“) auf, die mit hoher Spezifität über UA-Basenpaarung miteinander hybridisieren. Das Resultat ist ein zirkularisiertes, rekombinantes Plasmid. In jeden Vektor wird grundsätzlich nur ein DNA-Fragment eingebaut. Das rekombinante Plasmid wird nun in kompetente *E. coli* Zellen transformiert und über Nacht auf Selektivmedium kultiviert. Zusätzlich findet eine Blau-Weiß-Selektion mithilfe des Substrats X-Gal statt. Durch den Einbau eines DNA-Fragments in das Vektorplasmid wird die Codierung des *lacZ*-Gens unterbrochen. Dieses Gen codiert für das Enzym β -Galactosidase, welches das synthetische Substrat X-Gal spaltet. Unter anschließender Luftoxidation wird ein blauer Farbstoff gebildet. Bei den rekombinanten Klonen kann das Enzym β -Galactosidase nicht exprimiert werden und es wird somit auch kein Farbstoff freigesetzt. Die rekombinanten Zellen bilden daher weiße Kolonien. Nur weiße Kolonien werden „gepickt“. Jede Kolonie ist auf ein einzelnes Bakterium und somit auf ein einziges DNA-Fragment zurückzuführen.

Nach dem „Picken“ einzelner Kolonien erfolgt die Amplifikation mittels M13 Primern, die an einen komplementären Sequenzabschnitt auf dem Vektor binden. Auf diese Weise wird neben dem DNA-Fragment auch ein ca. 250 bp langer Abschnitt des Vektors amplifiziert (Qiagen 2001; Sambrook und Russel 2001).

Die aufgereinigten M13 PCR-Produkte können nun sequenziert werden.

2.10.1 Ligation, Transformation und Kultivierung auf LB-Agarplatten

Die Klonierung von aufgereinigten Amplifikaten erfolgte mithilfe des Qiagen PCR Cloning Kits. Um einen Abbau des Adenin-Überhangs der Amplifikate zu vermeiden, wurden ausschließlich PCR-Produkte desselben Tages verwendet. Für die Ligation des Genfragments in den Vektor wurden 4 µl aufgereinigtes PCR-Produkt mit 5 µl Ligationspuffer (Ligation Mastermix 2x) sowie 1 µl Plasmidvektor (pDrive cloning vector 50 ng/µl) versetzt. Anschließend erfolgte die Ligation für 2 h bei 10 °C im Thermocycler Tpersonal (Biometra). Die Transformation des nun rekombinanten Vektors in die kompetenten *E. coli* Zellen (Qiagen EZ competent cells) erfolgte auf Eis. Die *E. coli* Zellen wurden mit 2 µl des Ligationsprodukts versetzt und für 5 min auf Eis gehalten. Es folgte die Inkubation für 40 s bei 42 °C im Thermoblock (Hitzeschock, Schließen der Zellporen) und für 2 min auf Eis. Schließlich wurde das Gemisch mit 250 µl SOC-Medium („super optimal growth with catabolite repression“), zur Erhöhung der Transformationseffizienz und Ausbildung der Antibiotika-Resistenz, versetzt (Sambrook und Russel 2001).

Die Kultivierung der transformierten Zellen erfolgte auf LB-Medium-Platten („lysogeny broth“). Die Zusammensetzung des Mediums zeigt Tabelle 2-17.

Tabelle 2-17: Zusammensetzung des LB-Mediums zur Kultivierung der transformierten Zellen. Das Medium wurde anschließend für 30 min bei 121 °C autoklaviert.

5 g	Hefeextrakt
10 g	Trypton
10 g	NaCl
1l	Reinstwasser

250 ml der Lösung wurden in eine Schottflasche, zur späteren Kultivierung der Flüssigkulturen, überführt.

Die restlichen 750 ml des Mediums wurden mit 11,25 g Agar (Oxoid Agar No. 1) versetzt.

Beide Medien wurden für 30 min bei 121 °C autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C wurden dem LB-Agar-Medium, unter Benutzung von Sterilfiltern, 4 ml Ampicillin-Lösung (0,05 mg/ml) zugesetzt. Dem Flüssigmedium wurden 1,25 ml Kanamycin (0,05 mg/ml) zugesetzt. Es folgte das Ausgießen des LB-Agar-Mediums auf Petrischalen. Für die spätere Blau-Weiß-Selektion wurden 40 µl X-Gal (5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galactopyranoside 40 mg/ml) auf jeder Platte ausgestrichen. 30-50 µl der

transformierten Zellen wurden ausplattiert. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37 °C im Inkubationsschüttler TH 30 der Firma Edmund Bühler. Tags darauf wurden die LB-Agarplatten für ca. 6 h in den Kühlschrank (4 °C) überführt. Es folgte die Blau-Weiß-Selektion. Einzelne weiße Kolonien wurden mit sterilen Pipettenspitzen von den Platten „gepickt“ und in je 20 µl LB-Flüssigmedium resuspendiert.

2.10.2 M13 PCR und Flüssigkulturen

Aliquote der resuspendierten Kolonien (1:10 bzw. 1:50 mit LB-Flüssigmedium verdünnt) dienten als Template für die M13 PCR. Anhand dieser konnte festgestellt werden, ob die Genfragmente in der erwarteten Länge vorlagen.

Die Amplifikation erfolgte mit den Primern

M13for (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'; $T_m = 52\text{ °C}$) sowie M13rev

(5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'; $T_m = 50\text{ °C}$) (Messing 1983). Für die M13 PCR wurde der standardisierte Mastermix verwendet (vgl. Kapitel 2.6.3). Da die transformierten *E. coli* Bakterien zunächst lysiert werden mussten, wurde der einmalige Denaturierungsschritt des Temperaturprogramms nicht wie üblich bei 94 °C, sondern bei 98 °C durchgeführt (Tabelle 2-18).

Tabelle 2-18: Temperaturprogramm der M13 PCR. Die Anfangsdenaturierung wurde gegenüber der Standard-PCR erhöht, um eine Lysis der *E. coli* Zellen zu gewährleisten.

Schritt	Temperatur	Zeit	
Anfangsdenaturierung	98 °C	4 min	
Denaturierung	94 °C	30 s	40 Zyklen
Annealing	50 °C	30 s	
Elongation	72 °C	20-60 s	
finaler Extensionsschritt	72 °C	7 min	

Die Überprüfung der M13 PCR erfolgte durch Agarosegelelektrophorese. Die M13 PCR-Produkte einer gelungenen Klonierung mussten Fragmentlängen aufweisen, die etwa 250 bp größer sind als die erwartete Länge des Genfragments, da die M13

Primer innerhalb des Plasmidvektors binden und einen Teil dessen ebenfalls amplifizieren (Qiagen 2001). Produkte mit der richtigen Fragmentlänge wurden aufgereinigt und sequenziert.

Aliquote der zu sequenzierenden Produkte wurden in 3 ml LB-Flüssigmedium aufgenommen. Es folgte die Kultivierung über Nacht bei 37 °C im Inkubationsschüttler. Nach einem Medienwechsel erfolgte die Lagerung bei -80 °C in Kryoröhrchen.

2.11 Genexpressionsstudien mittels Real-Time PCR

2.11.1 Prinzip der Real-Time PCR und der relativen Expression

Die quantitative Real-Time PCR (qPCR) erlaubt eine spezifische, sensitive und reproduzierbare Quantifizierung von Nukleinsäuren. Als Detektionshilfsmittel während der PCR werden Fluorophore verwendet.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde die SYBR Green-Detektion verwendet. Dabei lässt das Maß der SYBR Green-Fluoreszenz Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge der Nukleinsäure zu.

Die Methode basiert darauf, dass der Fluoreszenzfarbstoff während der Amplifikation zwischen doppelsträngigen Nukleinsäuren interkaliert wird. Der Farbstoff wird nach jedem PCR-Zyklus durch kurzwelliges UV-Licht angeregt und emittiert daraufhin längerwelliges UV-Licht (Müller 2001). Als Referenzfarbstoff wurde in dieser Arbeit ROX (6-Carboxy-X-rhodamin) verwendet.

Im Anschluss an die Amplifikation kann eine Schmelzkurven-Analyse folgen, um die Spezifität des PCR-Produkts sowie der Primer zu überprüfen. Ein Hinweis auf mangelnde Spezifität wären Peaks mehrerer Schmelzpunkte innerhalb einer Probe (Ririe et al. 1997; Schrimpf 2002). Diese Peaks weisen meist niedrigere Schmelzpunkte als die des spezifischen Produkts auf und sind auf Primer-Dimere bzw. Cross-Dimere zurückzuführen. Da während der Real-Time PCR die gesamte Fluoreszenz erfasst wird (es kann also nicht zwischen spezifischem Produkt und Primer-Dimer unterschieden werden), führt eine mangelnde Spezifität der Amplifikation zu falschen Ergebnissen bei der Berechnung der relativen Expression.

Zur Quantifizierung wird der Anfang der exponentiellen Phase betrachtet. Dabei ist der Wert, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt, entscheidend. Dieser so genannte „threshold cycle“ (C_T) fließt in die spätere

Berechnung der relativen Expression ein. Die Expression eines Zielgens wird mit einem Referenzgen normalisiert, indem die Signale des Referenzgens verwendet werden, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA- oder DNA-Probe auszugleichen.

Als Referenzgen wurde die 18S Untereinheit gewählt, da sie als stabil exprimiert gilt (Kim et al. 2003; Kuchipudi et al. 2012) und für Fabaceae eine zufriedenstellende Normalisierung erbrachte (Martins et al. 2008; Lange 2009).

Die Berechnung der relativen Expression setzt eine optimale PCR-Effizienz voraus (Effizienz = 2 bzw. 100 %), d.h., dass die Anzahl der cDNA-Stränge sich mit jedem PCR-Zyklus verdoppelt. In der Praxis liegt die Effizienz bei 1,7 bis 1,9, was eine Effizienzkorrektur in der Berechnung verlangt (Arya et al. 2005; Holzapfel und Wickert 2007). Damit Zielgen und Referenzgen miteinander verglichen werden können, sollten die Amplifikationseffizienzen der designten Primern ähnlich sein (Jozefczuk und Adjaye 2011).

2.11.2 Primerdesign

Beim Design von Real-Time PCR-Primern müssen deutlich höhere Anforderungen als beim PCR-Primerdesign (vgl. Kapitel 2.6.2) erfüllt werden. Es gilt hier eine sehr hohe Spezifität zu gewährleisten, da anderenfalls eine korrekte Quantifizierung nicht möglich ist (vgl. Kapitel 2.11.1). Die Länge der Primer sollte 19-23 bp betragen. Eine hohe Spezifität soll durch ein kurzes Amplikon (50-210 bp) und eine hohe Schmelztemperatur der Primer (60-68 °C) gewährleistet werden. Der Hang zur Ausbildung von Sekundärstrukturen sollte möglichst gering sein (SABiosciences 2008)

2.11.3 Durchführung der Real-Time PCR

Die Real-Time PCR wurde mit dem Brilliant II SYBR[®] Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, Böblingen) durchgeführt. Als Referenzfarbstoff diente ROX, welcher ebenfalls Bestandteil des genannten Kits war. Die Zusammensetzung des Mastermix ist in Tabelle 2-19 dargestellt. Forward und reverse Primer wurden zunächst auf eine Konzentration von jeweils 1,5 µM in ddH₂O verdünnt (Primermix). Die Endkonzentration der einzelnen Primer im Mastermix betrug 0,3 µM. Der Referenzfarbstoff wurde ebenfalls mit ddH₂O auf eine Konzentration von 2 µM

verdünnt (Endkonzentration im Mastermix 30 nM). Als Template dienten 0,45 µl cDNA. Die Real-Time PCR wurde für jede Probe in Triplikaten durchgeführt.

Die Amplifikation erfolgte mithilfe der erarbeiteten genspezifischen Real-Time PCR-Primer sowie mit Primern, die ein 155 bp langes Fragment der 18S Untereinheit amplifizieren

(forward: 5'-GCTTTTAGGACTCCGCTGG-3', reverse: 5'-GGTAAGTTTCCCCGTGTTGA-3') (Moreth, unveröffentlicht).

Die Durchführung erfolgte im Real-Time Thermocycler MX3005P QPCR System der Firma Agilent Technologies.

Tabelle 2-19: Zusammensetzung des Mastermix mit dem Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix.

ddH ₂ O	3,825 µl
Stratagene Mix	7,5 µl
Primermix (Endkonz. je 0,3 µM)	3 µl
ROX (Endkonz. 30 nM)	0,225 µl
Template	0,45 µl

Das Temperaturprogramm war für alle Versuche identisch und ist in Abbildung 2-4 dargestellt. Im Segment 1 fand die Anfangsdenaturierung, einschließlich der Aktivierung der hot start *Taq*-Polymerase statt. Im 2. Segment erfolgte die Amplifikation mit den Schritten Denaturierung, Primer-Annealing und Elongation. Am Ende jedes Zyklus wurde die Fluoreszenz der Farbstoffe SYBR Green und ROX gemessen. Die Amplifikation fand über 50 Zyklen statt.

Anschließend wurde die Dissoziationskurve aufgenommen, indem zunächst für eine Minute bei 95 °C denaturiert wurde. Im nächsten Schritt wurde von 60 auf 95 °C in Intervallen von 0,5 °C erhitzt und nach jedem Intervall die SYBR Green-Fluoreszenz gemessen. Anhand dieser sollte die Spezifität der Produkte nachgewiesen werden.

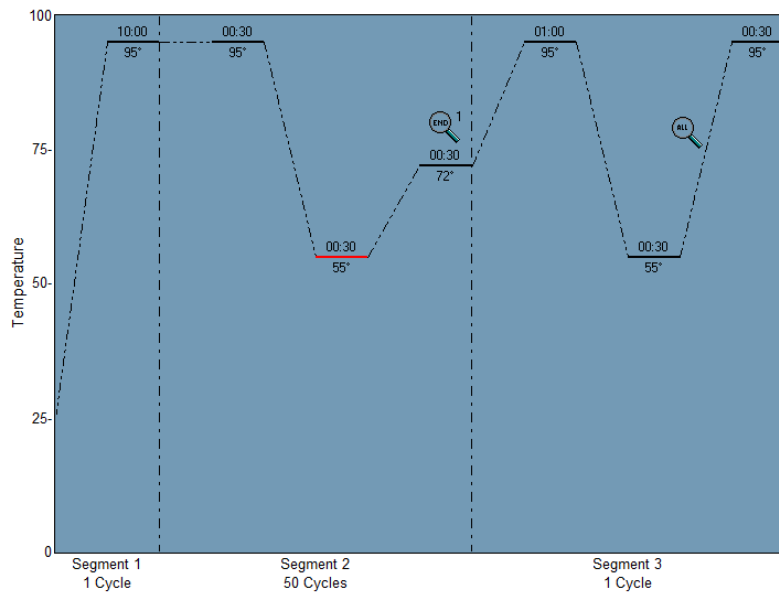


Abbildung 2-4: Thermoprofil der Real-Time PCR-Experimente. Gezeigt werden die einzelnen Segmente: 1. Anfangsdenaturierung u. Aktivierung der hot start *Taq*-Polymerase; 2. Amplifikation mit Fluoreszenzmessung nach jedem Zyklus; 3. Aufnahme der Dissoziationskurve.

2.11.4 Ermittlung der Amplifikationseffizienz und der relativen Expression

Zusätzlich zu den zu analysierenden Proben wurden Real-Time PCR-Läufe mit seriell verdünnten Templates (10^{-2} - 10^{-6}) durchgeführt. Als Template diente hier cDNA aus dem Splintholz von Baum 1. Auch hier wurden für jede Probe Triplikate eingesetzt.

Die erhaltenen C_T -Werte wurden als Funktion des dekadischen Logarithmus des reziproken Verdünnungsfaktors ($1/VF$) graphisch aufgetragen. Aus der Steigung dieser Standardgeraden kann die Amplifikationseffizienz (E) nach der Formel von Pfaffl (2001) berechnet werden:

$$E = 10^{-\frac{1}{\text{Steigung}}} \quad (1)$$

Die Ermittlung der Amplifikationseffizienz wurde unabhängig voneinander in mehreren Real-Time PCR-Einzelläufen durchgeführt. Aus den jeweils fünf berechneten Effizienzen wurde der Mittelwert gebildet.

Mithilfe der Amplifikationseffizienzen kann die relative Expression berechnet werden. Bestimmt wird die relative Expression als Verhältnis (R) des Zielgens in Bezug auf das 18S Referenzgen. Die Formel wurde modifiziert in Anlehnung an Pfaffl (2001):

$$R = \frac{E_{Ref}^{C_{T,Ref}(Probe)}}{E_{Ziel}^{C_{T,Ziel}(Probe)}} * 100 \% \quad (2)$$

R – normalisierte relative Quantität

E_{Ziel} – Amplifikationseffizienz des Zielgens

E_{Ref} – Amplifikationseffizienz des Referenzgens

$C_T(Probe)$ – threshold Wert einer Probe

3 Ergebnisse

3.1 Überprüfung der RNA-Qualität, des DNase-Verdaus und der reversen Transkription

Die Integrität der mithilfe des RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden) extrahierten RNA aus Gesamtgewebe wurde mittels Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen überprüft. Nach gelelektrophoretischer Trennung sollten die Banden der 26S bzw. 18S Untereinheit zu sehen sein, wobei ein Verhältnis der Fluoreszenzintensität von 2:1 auf intakte RNA hindeutet (Sambrook und Russel 2001). Abbildung 3-1 zeigt exemplarisch die erfolgreiche Extraktion intakter Gesamt-RNA. Aus allen fünf Gewebezonen konnte intakte RNA gewonnen werden, wobei generell festgestellt werden kann, dass aus den äußeren Zonen deutlich mehr RNA extrahiert wurde, als aus der Splint-Kern-Übergangszonen, was auf die geringe Anzahl der vitalen Zellen in diesem Gewebe zurückzuführen ist.

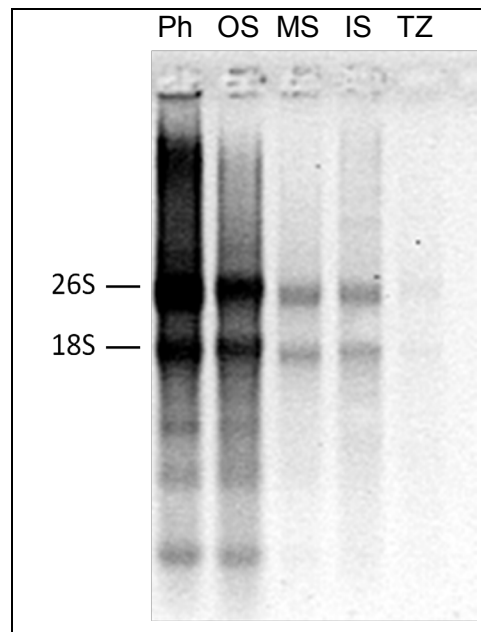


Abbildung 3-1: Agarosegel (1,5 %) zur Überprüfung der Gesamt-RNA-Extraktion aus Gesamtgewebe. Exemplarisch abgebildet ist der Auftrag der fünf Gewebezonen der Probe 2012_Dez2. Zu sehen sind oben die 26S Untereinheit sowie unten die 18S Untereinheit. Die Extraktion von Gesamt-RNA war in allen Geweben erfolgreich.

Da im extrahierten Eluat neben Gesamt-RNA auch Spuren von DNA enthalten sein können und diese spätere Quantifizierungsversuche stören, wurde ein DNase-Verdau durchgeführt und dessen Erfolg mittels PCR überprüft. Ein Fragment der 18S Untereinheit wurde amplifiziert. Als Template dienten Aliquote der DNase-verdauten RNA sowie, in einem zweiten Versuch, die cDNA erhalten nach reverser Transkription. Abbildung 3-2 zeigt exemplarisch die Dokumentation der Versuche durch Gelelektrophorese. Es konnte erfolgreich reine cDNA synthetisiert werden. Nach dem Verdau mit dem DNase I Kit (Thermo Scientific, Waltham, USA) konnte kein Produkt amplifiziert werden, es ist also keine DNA mehr vorhanden. Nach reverser Transkription der mRNA in cDNA mithilfe des SuperScript[®] III First-Strand Synthesis Kits (Thermo Scientific, Waltham, USA) war eine Amplifikation des 155 bp langen 18S Fragments möglich.

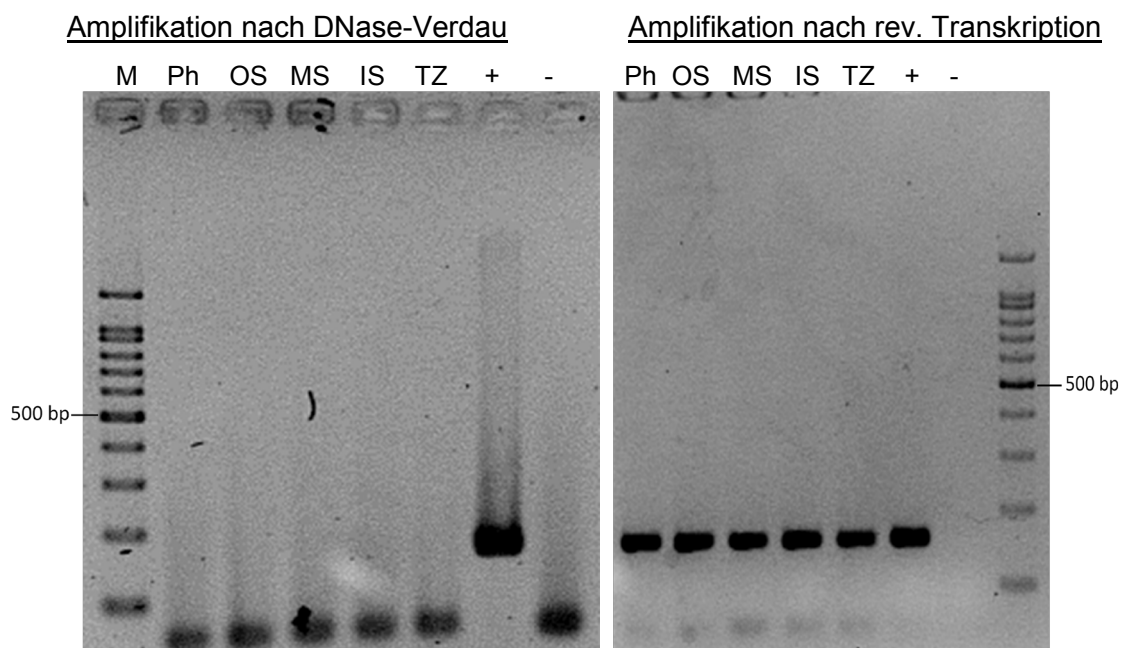


Abbildung 3-2: Überprüfung des DNase-Verdau und der reversen Transkription. Exemplarisch abgebildet ist der Auftrag des mit 18S Primern erhaltenen Amplifikats der fünf Gewebezonen der Probe 2012.Dez2, sowie Positiv- (+) und Negativkontrolle (-) der PCR. Das Eluat enthält neben Gesamt-RNA auch DNA (nicht gezeigt). Nach dem Verdau mit DNase ist keine Amplifikation mehr möglich. Im 3. Schritt wird mRNA erfolgreich in cDNA transkribiert, eine Amplifikation des 155 bp langen 18S Fragments ist möglich.

3.2 Identifizierung der Gensequenz der Kandidatengene

Vor Beginn dieser Untersuchungen, waren weder für die HS70 noch für die 14-3-3 Genfamilie Gensequenzen von *R. pseudoacacia* in der GenBank-Datenbank des NCBI hinterlegt (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Daher mussten diese Gene zunächst identifiziert werden. Die Identifizierung und Klonierung der 14-3-3 Genfamilie sowie die Interpretation der zugehörigen Ergebnisse erfolgte im Rahmen einer Bachelorarbeit in Zusammenarbeit mit Tanja Plambeck (2012).

3.2.1 Erarbeitung von degenerierten Primern

Zunächst wurden HS70 bzw. 14-3-3 Gensequenzen von Angehörigen der Familie der Fabaceae aus GenBank geladen (Tabelle 3-1). Es handelte sich dabei ausschließlich um „coding sequences“ (CDS), also codierende Abschnitte ohne eingeschlossene Introns.

Tabelle 3-1: 14-3-3 und HS70 GenBank Sequenzen verschiedener Fabaceae. Die daraus erstellten multiplen Sequenzalignments dienen dem Design degenerierter Primer.

GenBank-Sequenzen 14-3-3		GenBank-Sequenzen HS70	
Spezies	GenBank-Ref.	Spezies	GenBank-Ref.
<i>Glycine max</i>	U70533.1	<i>Glycine max</i>	XM_003521282.2
<i>Glycine max</i>	NM_001252761.1	<i>Glycine max</i>	XM_003554272.2
<i>Medicago truncatula</i>	BT052799.1	<i>Medicago truncatula</i>	XM_003625439.1
<i>Medicago truncatula</i>	BT052050.1	<i>Nicotiana tabacum</i>	AB689673.1
<i>Pisum sativum</i>	U15036.1	<i>Pisum sativum</i>	Z32537.1
<i>Pisum sativum</i>	AJ238681.2	<i>Ricinus communis</i>	XM_002527690.1
<i>Vicia faba</i>	Z48504.1	<i>Ricinus communis</i>	XM_002532251.1
<i>Vicia faba</i>	Z48505.1	<i>Vigna radiata</i>	AY485987.1
<i>Vigna angularis</i>	AB042299.1	<i>Vigna radiata</i>	AY485988.1

Mithilfe der Programme MEGA5 (Tamura et al. 2011) und ClustalW (Larkin et al. 2007) wurden aus diesen Gensequenzen multiple Sequenzalignments erstellt. Anhand der Alignments konnten homologe Regionen ermittelt werden, die als Grundlage für die Konstruktion degenerierter Primer dienen (Kwok et al. 1994). Diese wurden von der Firma Biomers (Ulm) bezogen. Degenerierte Primer sind ein Primergemisch. Die Anzahl der einzelnen Primer im Gemisch ergibt sich aus dem Grad der Degenerierung, d.h. der Anzahl an unterschiedlichen Basen (Clark und Pazdernik 2009). Die entsprechenden Basen im Primergemisch sind durch IUPAC- (International Union of Pure and Applied Chemistry) Codes für entartete Nukleotide gekennzeichnet; Tabelle 3-2 zeigt diese Codes. Die verwendeten degenerierten Primer für beide Kandidatengene sind in Tabelle 3-3 bzw. Tabelle 3-4 aufgelistet. Da degenerierte Primer unspezifisch binden sollen, wurden allgemeine Anforderungen an Primer weitgehend außer Acht gelassen.

Tabelle 3-2: IUPAC Nukleotid-Codes und die dazugehörigen Basen.

IUPAC Code	Base
M	A oder C
R	A oder G
W	A oder T
S	G oder C
Y	C oder T
K	G oder T
V	A oder G oder C
H	A oder C oder T
D	A oder G oder T
B	G oder T oder C
N	alle vier Basen möglich

Tabelle 3-3: Degenerierte Primer zur Amplifikation eines 14-3-3 Genabschnitts.

Primer	Primersequenz (5'-3')	Grad der Degenerierung
14-3-3deg-1.for	CGTSTACATSGCNAARCTCGC	32
14-3-3deg-2.for	CGHTACGAAGARATGGTVGA	18
14-3-3deg-3.rev	AAGATGAARGGHGATTAYYA	24
14-3-3deg-4.rev	TCAAAAGCRTGRTTTCGAAG	4
14-3-3deg-5.rev	AGTTGCATGATCAAHGTYCT	6

Tabelle 3-4: Degenerierte Primer zur Amplifikation eines HS70 Genabschnitts.

Primer	Primersequenz (5'-3')	Grad der Degenerierung
HS70deg-1.for	TGGCARCAYGAYCGHGTTGA	24
HS70deg-2.for	GGKGGTGGBACHTTYGATGT	12
HS70deg-3.for	GATGTTGTNCTTGTYGGTGG	8
HS70deg-4.for	GATGGTBCARGARGCNGAGA	48
HS70deg-2.rev	ACATCYAAHGTBCCACCKCC	36
HS70deg-3.rev	CCACCYACAAGNACAACATC	8
HS70deg-4.rev	TCTCNGCRTCRTGBACCATC	48
HS70deg-5.rev	TCNACYTCCTCRATCTTDGG	48

3.2.2 Amplifikation und Sequenzierung mit degenerierten Primern

Die Amplifikation von Abschnitten der Kandidatengene erfolgte mithilfe verschiedener Kombinationen degenerierter Primer. Da es sich bei degenerierten Primern um ein Gemisch handelt, wurde die Primerkonzentration auf 1,2 μM verdoppelt. Die Annealing-Temperatur während der PCR wurde mit 50 °C niedrig gewählt, um eine unspezifische Amplifikation zu gewährleisten. Die Elongationszeiten variierten je nach Primerkombination zwischen 30 und 60 s. Die erwarteten Fragmentlängen ergaben sich aus Berechnungen anhand des mit GenBank HSP70 Sequenzen zusammengestellten Alignments. Als Template diente cDNA von Baum 1. Die eingesetzten Primerkombinationen sind in Tabelle 3-5 (14-3-3 Gen) und Tabelle 3-6 (HS70 Gen) dargestellt.

Tabelle 3-5: Eingesetzte Kombinationen von degenerierten Primern zur Amplifikation eines 14-3-3 Genabschnitts.

Primerkombination	Erwartete Fragmentlänge	Elongationszeit
14-3-3deg-1.for/14-3-3deg-3.rev	ca. 370 bp	30 s
14-3-3deg-1.for/14-3-3deg-4.rev	ca. 580 bp	30 s
14-3-3deg-2.for/14-3-3deg-5.rev	ca. 615 bp	30 s

Tabelle 3-6: Kombinationen von degenerierten Primern zur Amplifikation eines HS70 Genabschnitts.

Primerkombination	Erwartete Fragmentlänge	Elongationszeit
HS70deg-1.for/HS70deg-2.rev	ca. 550 bp	30 s
HS70deg-3.for/HS70deg-4.rev	ca. 550 bp	30 s
HS70deg-4.for/HS70deg-5.rev	ca. 350 bp	30 s
HS70deg-1.for/HS70deg-3.rev	ca. 950 bp	60 s
HS70deg-2.for/HS70deg-4.rev	ca. 950 bp	60 s
HS70deg-3.for/HS70deg-5.rev	ca. 900 bp	60 s

Mithilfe der Amplifikationen mit degenerierten Primern und anschließenden Sequenzierungen konnten ein 1767 bp langes HS70 Genfragment und ein ca. 500 bp langes 14-3-3 Genfragment erarbeitet werden (vgl. Abbildungen A 1 und A 2 im Anhang). Die Sequenzen wurden mithilfe des „basic local alignment search tools“ (BLAST) mittels des BLASTn Algorithmus (Altschul et al. 1997) gegen die GenBank Datenbank abgeglichen. Für das 14-3-3 Fragment ergab sich eine Homologie von 81 %, bei einer Sequenzabdeckung von 100 % („query cover“) mit einem 14-3-3 Gen von *Glycine max* (GenBank Referenz: NM_001251460.1). Für das HS70 Genfragment

ergab der Abgleich eine Homologie von 91 % („query cover“ 100 %) mit einer HS70 Sequenz von *Glycine max* (GenBank Referenz: XR_137138.1). Damit liegt eine erste Identifizierung der beiden Kandidatengene vor. Aufgrund der unspezifischen Amplifikation weisen diese Sequenzen allerdings einige Lücken auf, sodass IUPAC Nukleotid Codes verwendet werden müssen. Die Chromatogramme zeigten an einigen Stellen Doppelpeaks, also die Detektion zweier verschiedener Basen an einer Position (vgl. exemplarische Darstellung in Abbildung 3-3), was ein Hinweis auf zwei Amplifikate im aufgereinigten PCR-Produkt ist. Dies kann entweder auf unspezifische Anlagerungen des Primers hindeuten oder es wurden zwei Gene derselben Genfamilie amplifiziert. Auf der Grundlage dieser Sequenzen wurden daher im Folgenden genspezifische Primer für *Robinia pseudoacacia* erarbeitet.

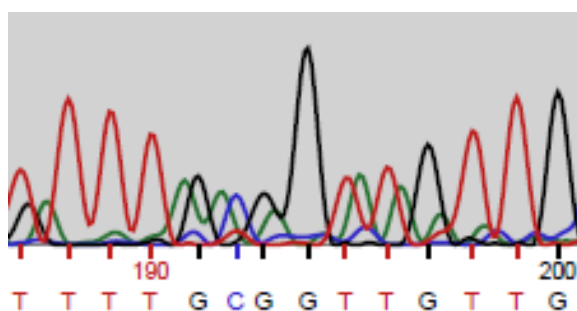


Abbildung 3-3: Beispiel für ein Sequenzchromatogramm mit überlagernden Peaks. Ausschnitt aus dem Sequenzchromatogramm eines HS70 Genfragments nach Amplifikation mit der degenerierten Primerkombination HS70deg-1.for/HS70deg-2.rev. Beispielsweise überlagern sich an Position 191 die Basen G und A.

3.2.3 Erarbeitung genspezifischer Primer

Anhand der mithilfe von degenerierten Primern erarbeiteten Sequenz erfolgte die Konstruktion genspezifischer Primer (GSP). Diese sind in Tabelle 3-7 (14-3-3 Gen) und Tabelle 3-8 (HS70 Gen) aufgeführt. Dabei wurde auf die Richtlinien zur Erstellung von PCR-Primern (vgl. Kapitel 2.6.2) geachtet. Zudem wurden die Primer so gewählt, dass ein möglichst langer Abschnitt amplifiziert werden kann, um beim späteren Design von Real-Time PCR-Primern genug Auswahlmöglichkeiten zu haben. Für die genspezifischen Primer wurden Sequenzabschnitte gewählt, an denen das Chromatogramm der Sequenzierung aus Kapitel 3.2.2 keine Doppelpeaks aufweist.

Tabelle 3-7: Genspezifische Primer zur Amplifikation eines 14-3-3 Genabschnitts.

Primer	Primersequenz (5'-3')
14-3-3GSP-A.for	GAGATGGTGGAGTTCATGGAGAA
14-3-3GSP-B.for	GAGGAACTCACGGTGGAGGAGA
14-3-3GSP-C.rev	ATTCTTAACTCTCCTGATCG
14-3-3GSP-D.rev	CTTGCTCTGAACTTCTC

Tabelle 3-8: Genspezifische Primer zur Amplifikation eines HS70 Genabschnitts.

Primer	Primersequenz (5'-3')
HS70.GSP.1.for	GCTAAGAACCAGGTCGCCAT
HS70.GSP.2.for	ACAAGGGTGAAGAGAAGCAA
HS70.GSP.3.for	CAGGATGGTGAACCACTTCGT
HS70.GSP.4.for	ATTCCAAGGTTCAACAAC
HS70.GSP.1.rev	TTGCTTCTCTTCACCCTTGT
HS70.GSP.2.rev	AATGGTGGTCTGGGCAGTA
HS70.GSP.3.rev	GCAACAGCCTCATCAGGATTG
HS70.GSP.4.rev	GGTACATCTTGGCAATGAT

3.2.4 Amplifikation und Sequenzierung mit genspezifischen Primern

Die Amplifikation von Abschnitten der Kandidatengene erfolgte mithilfe verschiedener Kombinationen genspezifischer Primer. Die Annealing-Temperatur für beide 14-3-3 Primerkombinationen betrug 54 °C. Für die Amplifikationen von HS70 Fragmenten mussten für die verschiedenen Primerkombinationen unterschiedliche Annealing-Temperaturen gewählt werden. Im Folgenden sind die verwendeten Primerkombinationen, erwarteten Fragmentlänge sowie PCR-Parameter für das 14-3-3 Gen (Tabelle 3-9) und das HS70 Gen (Tabelle 3-10) dargestellt.

Tabelle 3-9: Eingesetzte Kombinationen von genspezifischen Primern zur Amplifikation eines 14-3-3 Genabschnitts.

Primerkombination	Erwartete Fragmentlänge	Elongationszeit	Annealing
14-3-3GSP-A.for/14-3-3GSP-C.rev	ca. 450 bp	30 s	54 °C
14-3-3GSP-B.for/14-3-3GSP-D.rev	ca. 430 bp	30 s	54 °C

Tabelle 3-10: Eingesetzte Kombinationen von genspezifischen Primern zur Amplifikation eines HS70 Genabschnitts.

Primerkombination	Erwartete Fragmentlänge	Elongationszeit	Annealing
HS70.GSP.1.for/HS70.GSP.1.rev	ca. 180 bp	20 s	54 °C
HS70.GSP.2.for/HS70.GSP.2.rev	ca. 530 bp	30 s	55,5 °C
HS70.GSP.3.for/HS70.GSP.3.rev	ca. 400 bp	25 s	55,5 °C
HS70.GSP.4.for/HS70.GSP.4.rev	ca. 800 bp	45 s	53 °C

Die Amplifikate der genannten Primerkombinationen wurden sequenziert. Für das 14-3-3 Gen konnte ein 478 bp und für das HS70 Gen ein 1767 bp langes Fragment erarbeitet werden (vgl. Abbildungen A 1 und A 2 im Anhang). Der BLASTn Datenbankabgleich ergab für das 14-3-3 Fragment eine Homologie von 89 % zu einem 14-3-3 Abschnitt von *Glycine max* (GenBank Referenz: NM_001251460), bei einer Sequenzabdeckung von 100 %. Für den HS70 Genabschnitt ergab sich eine Homologie von 92 % (Sequenzabdeckung 100 %) zu einer HS70 Sequenz von *Glycine max* (GenBank Referenz: XM_003554272.2). Beide Kandidatengene konnten also über die Sequenzabschnitte molekular identifiziert werden.

3.3 Ergebnisse der Klonierungen

Zur Überprüfung, ob es sich bei den amplifizierten Fragmenten um ein einzelnes Gen oder mehrere Mitglieder einer Genfamilie handelt, wurde eine Klonierung durchgeführt. Für das HS70 Gen wurde mithilfe der genspezifischen Primer HS70.GSP.2.for/HS70.GSP.2.rev ein ca. 530 bp langes Genfragment amplifiziert und aufgereinigt. Die Primer 14-3-3GSP.B.for/ 14-3-3GSP.D.rev amplifizierten einen ca. 430 langen Abschnitt des 14-3-3 Gens. Auch dieses Amplifikat wurde aufgereinigt. Direkt im Anschluss erfolgte die Ligation. Nach der Transformation in kompetente *E. coli* Zellen und dem Ausplattieren auf Selektivmedium erfolgte die Kultivierung über Nacht.

Im Anschluss an das Blau-Weiß-Screening wurden Kolonien gepickt und mittels M13 PCR amplifiziert. Abbildung 3-4 zeigt exemplarisch das Ergebnis für das HS70 Gen nach Dokumentation durch Gelelektrophorese. In diesem Fall wurden zehn Kolonien (Klone) „gepickt“. Acht von ihnen tragen das HS70 Fragment als Insert, was aus der Länge des Amplikons geschlossen werden kann (550 bp Genfragment+250 bp

Plasmidrest). Die restlichen zwei tragen kein Insert, das Amplikon weist eine Länge von 250 bp auf. Bei allen Klonierungen wurden mindestens 20 Kolonien gepickt, um auch seltenere Transkripte aufzudecken. Amplifikate von zwölf das Insert tragenden 14-3-3 Klonen sowie von 15 HS70 Klonen wurden aufgereinigt und sequenziert.

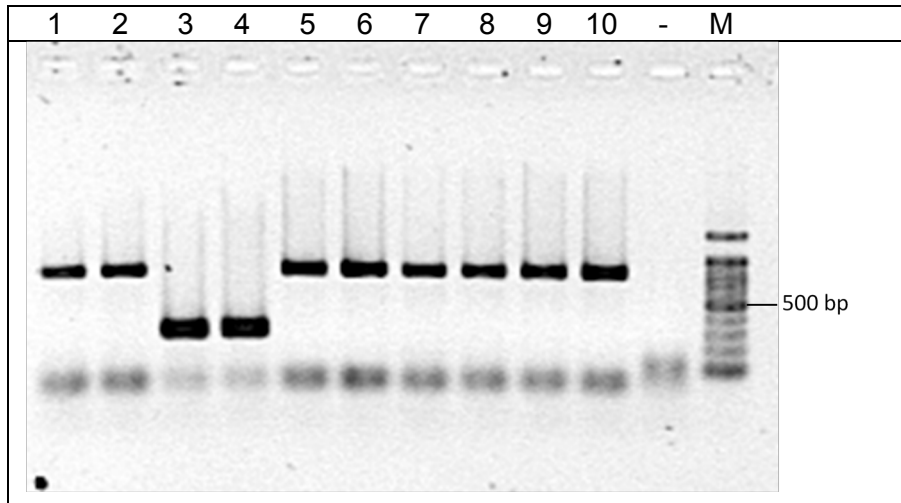


Abbildung 3-4: Dokumentation der M13 PCR. Das Gelbild zeigt die Amplifikate der 10 gepickten HS70 Klone nach M13 PCR sowie Negativkontrolle (-) und Längenmarker (M). Die Klone 3 und 4 tragen kein HS70 Genfragment als Insert. Nur der Plasmidrest wurde amplifiziert. Alle anderen Klone tragen das 550 bp lange Fragment als Insert, wodurch sich eine Amplikonlänge von 800 bp ergibt.

Mithilfe der Software-Programme MEGA5 und ClustalW wurden für beide Gene Sequenzalignments erstellt. Abbildung 3-5 zeigt das Alignment der cDNA-Sequenzen der 14-3-3 Klone.

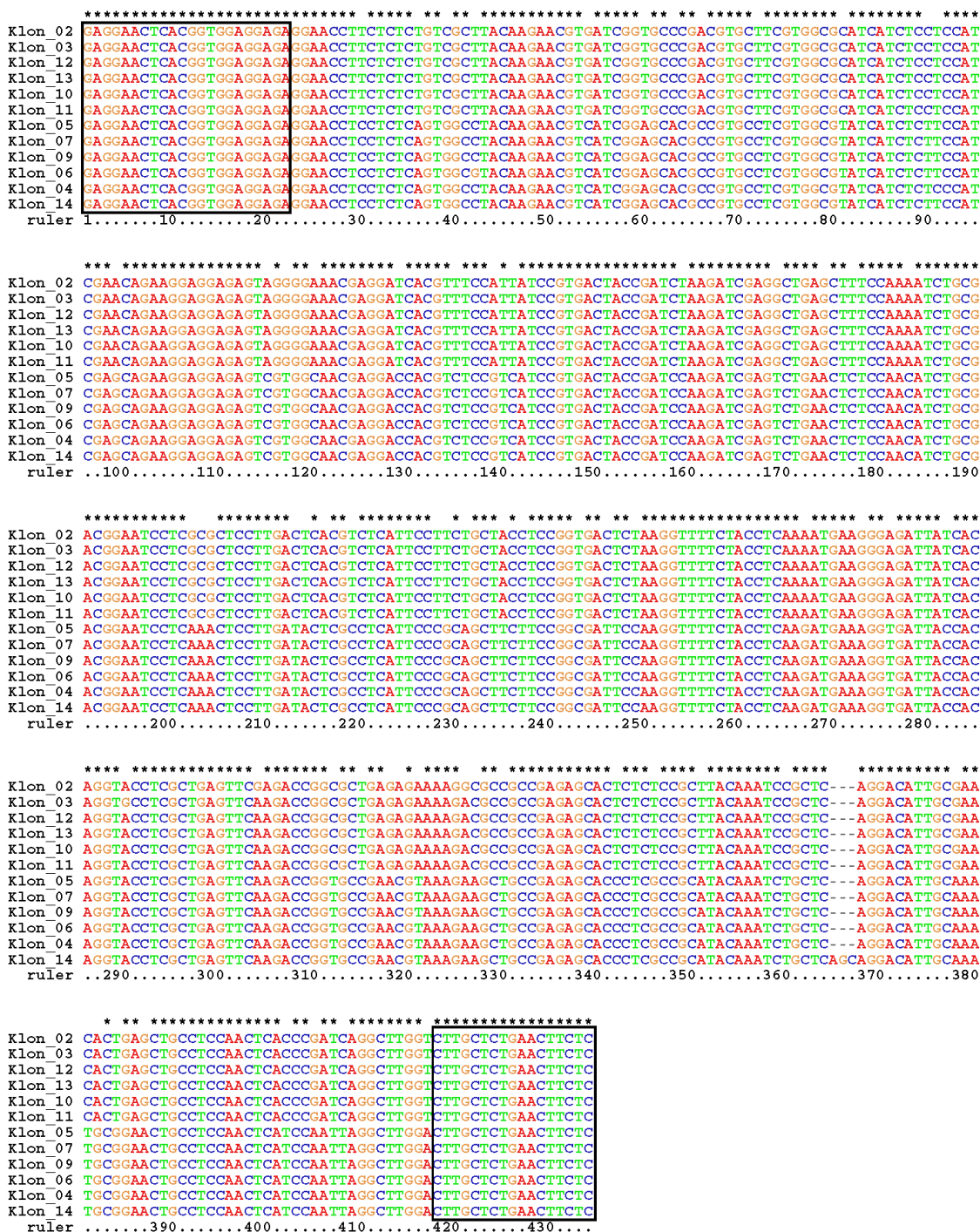


Abbildung 3-5 Nukleotidsequenzalignment (5'-3') der Klone des 14-3-3 Genfragments. Dargestellt sind die Klonsequenzen, erhalten durch M13 PCR. Die vor der Ligation eingesetzten Primer 14-3-3GSP.B.for und 14-3-3GSP.D.rev sind durch Kästen markiert. Die * Symbole stehen für eine Übereinstimmung der jeweiligen Base in allen Klonen.

Eine pairwise distance Analyse der einzelnen Klone mithilfe der MEGA5 Software zeigt, dass drei verschiedene Gene der 14-3-3 Genfamilie amplifiziert wurden. Die Klone werden wie folgt eingeteilt:

Rp14-3-3Gen1: Klon 2, Klon 3, Klon 10, Klon 11, Klon 12, Klon 13

Rp14-3-3Gen2: Klon 4, Klon 5, Klon 6, Klon 7, Klon 9

Rp14-3-3Gen3: Klon 14

Die *Rp14-3-3Gen1* zugeordneten Klone zeigen untereinander eine Homologie von 99,3 bis 100 % in ihrer Nukleotidsequenz. Lediglich Klon 2 und Klon 3 unterscheiden sich in zwei bzw. einer Base von den anderen Klonen dieser Gruppe: Klon 2 an Alignmentposition 304 und 326; Klon 3 an Position 290. Bei allen drei Positionen handelt es sich um eine Transition von G zu A. Die Transition bei Klon 2 bewirkt den Austausch einer Aminosäure an Position 108 der Aminosäuresequenz (Abbildung 3-6), hier wird Threonin durch Alanin ersetzt. An Position 96 der Aminosäuresequenz ersetzt ebenfalls Alanin das Threonin (Klon 3). Alle anderen Klone dieser Gruppe sind sequenzgleich. Für die Aminosäuresequenz ergibt sich daher eine Homologie von 98,6 bis 100 %.

Für die Klone von *Rp14-3-3Gen2* ergibt sich eine Homologie der cDNA-Sequenz von 99,5 bis 100 %. Die Klone 4 und 6 zeigen jeweils eine unterschiedliche Base zu den restlichen (identischen) Klonen der Gruppe. Bei Klon 4 befindet sich an Position 91 eine Transition von C zu T. An Position 42 zeigt Klon 6 ein G statt eines C (Transversion). Die Transition bei Klon 6 bewirkt einen Austausch der Aminosäure Serin durch Prolin (Aminosäuresequenz, Position 14). Die Transversion bei Klon 4 hat keinen Einfluss auf dessen Aminosäuresequenz. Die Aminosäuresequenzen der Klone dieser Gruppe gleichen sich somit zu 99,3 bis 100 %.

Die beschriebenen Klonsequenzen lassen trotz der Basenunterschiede eine Gruppierung in *Rp14-3-3Gen1* und *Rp14-3-3Gen2* zu. Der Austausch der jeweiligen Aminosäure ist konservativ, d.h., strukturell oder funktionell ähnliche Aminosäuren wurden ausgetauscht (Clark und Pazdernik 2009).

Die Nukleotidsequenz des *Rp14-3-3Gen1* weist eine Homologie von 84,7 bis 85,4 % zu *Rp14-3-3Gen3* und *Rp14-3-3Gen2* auf. In der Aminosäuresequenz beträgt die Homologie der ersten Isoform bis zu 62,4 % zu den beiden anderen.

Der einzige Unterschied zwischen *Rp14-3-3Gen2* und *Rp14-3-3Gen3* findet sich in einem Indel ab Alignmentposition 365. Hier findet sich für *Rp14-3-3Gen3* die Basenfolge AGC, welche allen Klonen von *Rp14-3-3Gen2* fehlt. Dieses Basentriplett codiert für die Aminosäure Serin. Aufgrund dieser zusätzlichen Aminosäure soll Klon

14 als *Rp14-3-3Gen3* gruppiert werden. Der Datenbankabgleich mittels BLASTn ergibt für *Rp14-3-3Gen2* und *Rp14-3-3Gen3* Homologien von 90 bzw. 89 % zu einer Sequenz von *Glycine max* (GenBank Referenz: NM_001251460.1). Für *Rp14-3-3Gen1* ergibt sich eine Übereinstimmung von 87 % mit *Lotus japonicus* (GenBank Referenz: AK336483.1). Die Sequenzabdeckung beträgt jeweils 100 %.

```

***** *   *** *   * **.* **.****** ** * * ***** ** * .*.*****.* * .** * *. *****: * **
Klon_02 RNSRWRRGTFSLSLTRT-SVPDVLRGASSPPNRRRRVGETRITFPLSVTTDLRSRLSFPKSATESSRSLTHVSFLLLPVTLRFSTSKREIITG
Klon_03 RNSRWRRGTFSLSLTRT-SVPDVLRGASSPPNRRRRVGETRITFPLSVTTDLRSRLSFPKSATESSRSLTHVSFLLLPVTLRFSTSKREIITG
Klon_12 RNSRWRRGTFSLSLTRT-SVPDVLRGASSPPNRRRRVGETRITFPLSVTTDLRSRLSFPKSATESSRSLTHVSFLLLPVTLRFSTSKREIITG
Klon_13 RNSRWRRGTFSLSLTRT-SVPDVLRGASSPPNRRRRVGETRITFPLSVTTDLRSRLSFPKSATESSRSLTHVSFLLLPVTLRFSTSKREIITG
Klon_10 RNSRWRRGTFSLSLTRT-SVPDVLRGASSPPNRRRRVGETRITFPLSVTTDLRSRLSFPKSATESSRSLTHVSFLLLPVTLRFSTSKREIITG
Klon_11 RNSRWRRGTFSLSLTRT-SVPDVLRGASSPPNRRRRVGETRITFPLSVTTDLRSRLSFPKSATESSRSLTHVSFLLLPVTLRFSTSKREIITG
Klon_05 RNSRWRRGTSSQWPTRTSSHA VPRGVSSLPSRRRRVVA TRTTSPSSVTTDPRSLSNSPTSATESNSLILASFPQLLPAIPRFSTSRKVIITG
Klon_07 RNSRWRRGTSSQWPTRTSSHA VPRGVSSLPSRRRRVVA TRTTSPSSVTTDPRSLSNSPTSATESNSLILASFPQLLPAIPRFSTSRKVIITG
Klon_09 RNSRWRRGTSSQWPTRTSSHA VPRGVSSLPSRRRRVVA TRTTSPSSVTTDPRSLSNSPTSATESNSLILASFPQLLPAIPRFSTSRKVIITG
Klon_06 RNSRWRRGTSSQWPTRTSSHA VPRGVSSLPSRRRRVVA TRTTSPSSVTTDPRSLSNSPTSATESNSLILASFPQLLPAIPRFSTSRKVIITG
Klon_04 RNSRWRRGTSSQWPTRTSSHA VPRGVSSLPSRRRRVVA TRTTSPSSVTTDPRSLSNSPTSATESNSLILASFPQLLPAIPRFSTSRKVIITG
Klon_14 RNSRWRRGTSSQWPTRTSSHA VPRGVSSLPSRRRRVVA TRTTSPSSVTTDPRSLSNSPTSATESNSLILASFPQLLPAIPRFSTSRKVIITG
ruler 1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....

:*****. *   *** ** * * * ***: .****: ** *****
Klon_02 TSLSSRPALREKAPPRALESPLTNPL-RTLRTLSCLQLTRSGLVLLTS
Klon_03 ASLSSRPALREKTPPRALESPLTNPL-RTLRTLSCLQLTRSGLVLLTS
Klon_12 TSLSSRPALREKTPPRALESPLTNPL-RTLRTLSCLQLTRSGLVLLTS
Klon_13 TSLSSRPALREKTPPRALESPLTNPL-RTLRTLSCLQLTRSGLVLLTS
Klon_10 TSLSSRPALREKTPPRALESPLTNPL-RTLRTLSCLQLTRSGLVLLTS
Klon_11 TSLSSRPALREKTPPRALESPLTNPL-RTLRTLSCLQLTRSGLVLLTS
Klon_05 TSLSSRPVPNVKKLPRAPSPHTNLL-RTLQMRNCLQLIQLGLDLLTS-
Klon_07 TSLSSRPVPNVKKLPRAPSPHTNLL-RTLQMRNCLQLIQLGLDLLTS-
Klon_09 TSLSSRPVPNVKKLPRAPSPHTNLL-RTLQMRNCLQLIQLGLDLLTS-
Klon_06 TSLSSRPVPNVKKLPRAPSPHTNLL-RTLQMRNCLQLIQLGLDLLTS-
Klon_04 TSLSSRPVPNVKKLPRAPSPHTNLL-RTLQMRNCLQLIQLGLDLLTS-
Klon_14 TSLSSRPVPNVKKLPRAPSPHTNLL-RTLQMRNCLQLIQLGLDLLTS-
ruler ..100.....110.....120.....130.....140...

```

Abbildung 3-6: Alignment der Aminosäuresequenz der Klone des 14-3-3 Genfragments. Das Alignment basiert auf der cDNA-Sequenz aus Abbildung 3-5. Die (*) Symbole stehen für eine Übereinstimmung der jeweiligen Aminosäure in allen Klonen. Die (.) und (:) Symbole stehen für einen konservativen Unterschied der Aminosäuren.

Analog zum 14-3-3 Gen wurden cDNA-Sequenzalignments der Klone des HS70 Gens erstellt. Abbildung 3-7 zeigt das Alignment. Die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz ist in Abbildung 3-8 dargestellt.


```

*****
Klon01 GAGGACTGCCTGTGAGAGGGCGAAGGAACTCTATCATCTACTGCCAGACCAACATT
Klon02 GAGGACTGCCTGTGAGAGGGCGAAGGAACTCTATCATCTACTGCCAGACCAACATT
Klon05 GAGGACTGCCTGTGAGAGGGCGAAGGAACTCTATCATCTACTGCCAGACCAACATT
Klon06 GAGGACTGCCTGTGAGAGGGCGAAGGAACTCTATCATCTACTGCCAGACCAACATT
Klon07 GAGGACTGCCTGTGAGAGGGCGAAGGAACTCTATCATCTACTGCCAGACCAACATT
Klon08 GAGGACTGCCTGTGAGAGGGCGAAGGAACTCTATCATCTACTGCCAGACCAACATT
Klon09 GAGGACTGCCTGTGAGAGGGCGAAGGAACTCTATCATCTACTGCCAGACCAACATT
Klon10 GAGGACTGCCTGTGAGAGGGCGAAGGAACTCTATCATCTACTGCCAGACCAACATT
Klon12 GAGGACTGCCTGTGAGAGGGCGAAGGAACTCTATCATCTACTGCCAGACCAACATT
Klon13 GAGGACTGCCTGTGAGAGGGCGAAGGAACTCTATCATCTACTGCCAGACCAACATT
Klon14 GAGGACTGCCTGTGAGAGGGCGAAGGAACTCTATCATCTACTGCCAGACCAACATT
Klon17 GAGGACTGCCTGTGAGAGGGCGAAGGAACTCTATCATCTACTGCCAGACCAACATT
Klon18 GAGGACTGCCTGTGAGAGGGCGAAGGAACTCTATCATCTACTGCCAGACCAACATT
Klon19 GAGGACTGCCTGTGAGAGGGCGAAGGAACTCTATCATCTACTGCCAGACCAACATT
Klon20 GAGGACTGCCTGTGAGAGGGCGAAGGAACTCTATCATCTACTGCCAGACCAACATT
ruler ..480.....490.....500.....510.....520.....530...

```

Abbildung 3-7: Nukleotidsequenzalignment (5'-3') der Klone des HS70 Genfragments. Dargestellt sind die Klonsequenzen, erhalten durch M13 PCR. Die vor der Ligation eingesetzten Primer HS70.GSP.2.for und HS70.GSP.D.rev sind durch Kästen markiert. Die * Symbole stehen für eine Übereinstimmung der jeweiligen Base in allen Klonen.

```

*****;*****;*****
Klon01 KGEKQFAAEEISSMVLKMRIEAEAYLGSTIKNAVTVPAFYFNDSSQRQATKDGAVIAGLNVMRIINEPTAAAIAAYGLDKKATSVGEKNVLIFFDL
Klon02 KGEKQFAAEEISSMVLKMRIEAEAYLGSTIKNAVTVPAFYFNDSSQRQATKDGAVIAGLNVMRIINEPTAAAIAAYGLDKKATSVGEKNVLIFFDL
Klon05 KGEKQFAAEEISSMVLKMRIEAEAYLGSTIKNAVTVPAFYFNDSSQRQATKDGAVIAGLNVMRIINEPTAAAIAAYGLDKKATSVGEKNVLIFFDL
Klon06 KGEKQFAAEEISSMVLKMRIEAEAYLGSTIKNAVTVPAFYFNDSSQRQATKDGAVIAGLNVMRIINEPTAAAIAAYGLDKKATSVGEKNVLIFFDL
Klon07 KGEKQFAAEEISSMVLKMRIEAEAYLGSTIKNAVTVPAFYFNDSSQRQATKDGAVIAGLNVMRIINEPTAAAIAAYGLDKKATSVGEKNVLIFFDL
Klon08 KGEKQFAAEEISSMVLKMRIEAEAYLGSTIKNAVTVPAFYFNDSSQRQATKDGAVIAGLNVMRIINEPTAAAIAAYGLDKKATSVGEKNVLIFFDL
Klon09 KGEKQFAAEEISSMVLKMRIEAEAYLGSTIKNAVTVPAFYFNDSSQRQATKDGAVIAGLNVMRIINEPTAAAIAAYGLDKKATSVGEKNVLIFFDL
Klon10 KGEKQFAAEEISSMVLKMRIEAEAYLGSTIKNAVTVPAFYFNDSSQRQATKDGAVIAGLNVMRIINEPTAAAIAAYGLDKKATSVGEKNVLIFFDL
Klon12 KGEKQFAAEEISSMVLKMRIEAEAYLGSTIKNAVTVPAFYFNDSSQRQATKDGAVIAGLNVMRIINEPTAAAIAAYGLDKKATSVGEKNVLIFFDL
Klon13 KGEKQFAAEEISSMVLKMRIEAEAYLGSTIKNAVTVPAFYFNDSSQRQATKDGAVIAGLNVMRIINEPTAAAIAAYGLDKKATSVGEKNVLIFFDL
Klon14 KGEKQFAAEEISSMVLKMRIEAEAYLGSTIKNAVTVPAFYFNDSSQRQATKDGAVIAGLNVMRIINEPTAAAIAAYGLDKKATSVGEKNVLIFFDL
Klon17 KGEKQFAAEEISSMVLKMRIEAEAYLGSTIKNAVTVPAFYFNDSSQRQATKDGAVIAGLNVMRIINEPTAAAIAAYGLDKKATSVGEKNVLIFFDL
Klon18 KGEKQFAAEEISSMVLKMRIEAEAYLGSTIKNAVTVPAFYFNDSSQRQATKDGAVIAGLNVMRIINEPTAAAIAAYGLDKKATSVGEKNVLIFFDL
Klon19 KGEKQFAAEEISSMVLKMRIEAEAYLGSTIKNAVTVPAFYFNDSSQRQATKDGAVIAGLNVMRIINEPTAAAIAAYGLDKKATSVGEKNVLIFFDL
Klon20 KGEKQFAAEEISSMVLKMRIEAEAYLGSTIKNAVTVPAFYFNDSSQRQATKDGAVIAGLNVMRIINEPTAAAIAAYGLDKKATSVGEKNVLIFFDL
ruler 1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....

*****;****;*****;*:*****
Klon01 GGGTFDVSLLTIEEGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRMVNHFVQEFKRKNKDI SGNPRLRRLRTACERAKRRLSSTAQTITI
Klon02 GGGTFDVSLLTIEEGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRMVNHFVQEFKRKNKDI SGNPRLRRLRTACERAKRRLSSTAQTITI
Klon05 GGGTFDVSLLTIEEGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRMVNHFVQEFKRKNKDI SGNPRLRRLRTACERAKRRLSSTAQTITI
Klon06 GGGTFDVSLLTIEEGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRMVNHFVQEFKRKNKDI SGNPRLRRLRTACERAKRRLSSTAQTITI
Klon07 GGGTFDVSLLTIEEGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRMVNHFVQEFKRKNKDI SGNPRLRRLRTACERAKRRLSSTAQTITI
Klon08 GGGTFDVSLLTIEEGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRMVNHFVQEFKRKNKDI SGNPRLRRLRTACERAKRRLSSTAQTITI
Klon09 GGGTFDVSLLTIEEGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRMVNHFVQEFKRKNKDI SGNPRLRRLRTACERAKRRLSSTAQTITI
Klon10 GGGTFDVSLLTIEEGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRMVNHFVQEFKRKNKDI SGNPRLRRLRTACERAKRRLSSTAQTITI
Klon12 GGGTFDVSLLTIEEGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRMVNHFVQEFKRKNKDI SGNPRLRRLRTACERAKRRLSSTAQTITI
Klon13 GGGTFDVSLLTIEEGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRMVNHFVQEFKRKNKDI SGNPRLRRLRTACERAKRRLSSTAQTITI
Klon14 GGGTFDVSLLTIEEGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRMVNHFVQEFKRKNKDI SGNPRLRRLRTACERAKRRLSSTAQTITI
Klon17 GGGTFDVSLLTIEEGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRMVNHFVQEFKRKNKDI SGNPRLRRLRTACERAKRRLSSTAQTITI
Klon18 GGGTFDVSLLTIEEGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRMVNHFVQEFKRKNKDI SGNPRLRRLRTACERAKRRLSSTAQTITI
Klon19 GGGTFDVSLLTIEEGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRMVNHFVQEFKRKNKDI SGNPRLRRLRTACERAKRRLSSTAQTITI
Klon20 GGGTFDVSLLTIEEGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRMVNHFVQEFKRKNKDI SGNPRLRRLRTACERAKRRLSSTAQTITI
ruler ..100.....110.....120.....130.....140.....150.....160.....170.....

```

Abbildung 3-8: Alignment der Aminosäuresequenz der Klone des HS70 Genfragments. Das Alignment basiert auf der cDNA-Sequenz aus Abbildung 3-7. Die (*) Symbole stehen für eine Übereinstimmung der jeweiligen Aminosäure in allen Klonen. Die (.) und (:) Symbole stehen für einen konservativen Unterschied der Aminosäuren.

Der Datenabgleich mittels BLASTn ergab eine Homologie von 92 % zu einer heat shock cognate 70 Sequenz der Fabaceae *Cicer arietinum*, bei einer Sequenzabdeckung von 100 %. Mithilfe der pairwise distance Analyse wurde auf die Homologien zwischen den einzelnen Klonen geschlossen. Dabei ergeben sich Homologien zwischen 99,2 und 100 % zwischen den Nukleotidsequenzen der einzelnen Klone. Die Klone 1,6,7,17 und 20 sind sequenzgleich. An Position 146 des

Alignments zeigen die Klone 1,5,8,9,12 und 14 die Base A, während die restlichen Klone ein T aufweisen. Diese Basen befinden sich an der dritten Stelle des Triplets. Allerdings führt dieser Unterschied zu keinem Austausch der Aminosäure, da sowohl das Codon CGA, als auch CGT die Aminosäure Arginin codieren (vgl. Abbildung 3-8, Position 48).

Klon 2 unterscheidet sich an Position 489 durch ein A statt eines G von den anderen Klonen, dies führt zu einem Austausch der Aminosäure Lysin gegen Glutaminsäure an Position 163 im Alignment der Aminosäuresequenzen.

Klon 8 zeigt an Position 435 der cDNA-Sequenz ein G, alle anderen Klone ein A. Dadurch wird die Aminosäure Lysin an Position 145 durch Glutaminsäure ersetzt.

Klon 9 zeigt zwei Unterschiede: An Position 117 besitzt er die Base C statt T, was keinen Einfluss auf die Aminosäure hat. Der Austausch C statt T an Position 420 führt an Position 140 zur Codierung von Leucin statt Phenylalanin.

An Position 244 ist bei Klon 13 ein A durch ein G ausgetauscht. Dies führt zum Austausch von Lysin durch Arginin an Position 81.

Klon 18 besitzt an Position 498 die Base G, alle anderen Klone ein A. Die Aminosäure Lysin wird an Position 166 durch Glutaminsäure ersetzt.

Klon 19 unterscheidet sich an zwei Positionen. Die Base C statt A (Position 456), bewirkt keine Änderung der Aminosäure. An Position 157 steht die Base G statt A, dadurch findet ein Austausch der Aminosäure Lysin gegen Arginin an Position 52 statt.

Trotz der Unterschiede in der cDNA-Sequenz kann davon ausgegangen werden, dass der Abschnitt eines einzelnen Gens amplifiziert wurde. Die Basenunterschiede bewirken teilweise keinen Austausch der Aminosäuren. Die Homologie der Aminosäuresequenzen reicht von 96,6 bis 100 %. An Stellen, an denen zu Änderungen der Aminosäure kommt, handelt es sich um konservative Unterschiede, d.h., strukturell oder funktionell ähnliche Aminosäuren werden gegeneinander getauscht. Es handelt sich bei den Klonen also nicht um mehrere Mitglieder der HS70 Genfamilie. Daher wird in der Folge von *RpHS70* gesprochen.

Die Analyse des Chromatogramms mithilfe der Finch-TV Software zeigt für die einzelnen Basen aller drei *Rp14-3-3* Gene sowie für das *RpHS70* Gen eindeutige Peaks (Daten nicht gezeigt), sodass davon ausgegangen werden kann, dass Amplifikation und Sequenzierung spezifisch verliefen.

Anhand der Sequenzen konnten im nächsten Schritt Real-Time PCR-Primer für das *RpHS70* Gen sowie für die *Rp14-3-3Gen1*, *Rp14-3-3Gen2*, *Rp14-3-3Gen3* Gruppen erstellt werden.

3.4 Erarbeitung und Überprüfung von Primern für die Real-Time PCR

Anhand der erarbeiteten Sequenzen aus den Klonierungsversuchen wurden Real-Time PCR-Primer konstruiert. Beim Primerdesign wurde versucht, die Anforderungen an Real-Time PCR-Primer (vgl. Kapitel 2.11.2) zu beachten, was aufgrund der begrenzten Fragmentlängen und der damit zusammenhängenden Auswahlmöglichkeiten nicht immer möglich war. Für jedes der vier Gene wurde eine Vielzahl von Primern erstellt und auf Spezifität und Amplifikationseffizienz überprüft. Tabelle 3-11 zeigt die für die Genexpressionsstudien verwendeten Primer für das HS70 Gen sowie für die 14-3-3 Gengruppen. Der Hang zur Bildung von Sekundärstrukturen sowie die Schmelztemperaturen der Primer sind in Tabelle 3-12 dargestellt. Die Markergene der Kernholzbildung *RpCHS3* und *RpPAL1* wurden mithilfe der Primerkombination *RpCHS3for/RpCHS3rev* bzw. *RpPAL1for/RpPAL1rev* amplifiziert. Diese Primer wurden von Lange (2009) erarbeitet.

Tabelle 3-11: Übersicht der für Genexpressionsstudien verwendeten Real-Time PCR-Primer. Dargestellt sind das amplifizierte Genfragment, die Primersequenz und die Länge des Amplikons. Der Primer 14-3-3.RT.G2+3for1 ist doppelt aufgeführt, da er sowohl zur Amplifikation von *Rp14-3-3Gen2* als auch von *Rp14-3-3Gen3* dient.

ampl. Gen	Primer	Sequenz (5'-3')	Fragment
<i>Rp14-3-3Gen1</i>	14-3-3.RT.G1for6	CAGAAGGAGGAGAG TAGGGGAAA	267 bp
	14-3-3.RT.G1rev6	CCTGAGCGGATTTG TAAGCGG	
<i>Rp14-3-3Gen2</i>	14-3-3.RT.G2+3for1	CAGAAGGAGGAGAGT CGTGGCAA	267 bp
	14-3-3.RT.G2rev5	CCTGAGCAGATTTGTATGCGG	
<i>Rp14-3-3Gen3</i>	14-3-3.RT.G2+3for1	CAGAAGGAGGAGAGT CGTGGCAA	267 bp
	14-3-3.RT.G3rev1	GCTGAGCAGATTTGTATGCGG	
<i>RpHS70</i>	HS70.RT8for	CTGTTGTCACTGTTCCCTGC	149 bp
	HS70.RT8rev	CACTCGTTGCCTTCTTGTC	
<i>RpCHS3</i>	<i>RpCHS3for</i>	ACCACAGGTGAAGGACTCG	127 bp
	<i>RpCHS3rev</i>	GATAAAATCCAGGTCCAAAGC	
<i>RpPAL1</i>	<i>RpPAL1for</i>	GGAATGCCTTGGGGAGTG	147 bp
	<i>RpPAL1rev</i>	CGACGCTGTATTGATTTGCC	
<i>Rp18S</i>	<i>Rp18Sfor</i>	GCTTTTAGGACTCCGCTGG	155 bp
	<i>Rp18Srev</i>	GGTAAGTTTCCCGTGTTGA	

Tabelle 3-12: Hang zur Bildung von Sekundärstrukturen und Schmelzpunkte der verwendeten Real-Time PCR-Primer. Gezeigt werden der Hang zur Bildung von Dimeren und Hairpins der jeweiligen Primer sowie der zur Bildung von Cross-Dimeren der verwendeten Primerkombinationen.

Primer	T _m in °C	ΔG in kcal/mol		
		Dimer	Hairpin	Cross-Dimer
14-3-3.RT.G1for6	62,4	0	0	-4,9
14-3-3.RT.G1rev6	61,8	0	0	
14-3-3.RT.G2+3for1	64,2	0	0	-6,1
14-3-3.RT.G2rev5	59,8	-6,1	-2	
14-3-3.RT.G2+3for1	64,2	0	0	-6,1
14-3-3.RT.G3rev1	59,8	-6,1	-2	
HS70.RT8for	56,67	0	0	0
HS70.RT8rev	56,67	0	0	
RpCHS3for	59	0	0	-7,0
RpCHS3rev	56	0	0	
RpPAL1for	58	0	0	0
RpPAL1rev	57	0	0	
Rp18Sfor	58,8	0	0	0
Rp18Srev	57,3	0	0	

Mittels PCR, anschließender Sequenzierung und Analyse der Sequenzen bzw. Chromatogramme wurde bestätigt, dass die verwendeten Primerkombinationen spezifisch den gewünschten Genabschnitt amplifizieren (vgl. exemplarische Abbildung 3-9). Die Chromatogramme weisen keine überlagernden Peaks mehr auf. Es kann somit ausgeschlossen werden, dass mehrere Mitglieder der jeweiligen Genfamilie amplifiziert werden. Für das untersuchte HS70 sowie für alle drei Mitglieder der 14-3-3 Genfamilie bestätigte das Chromatogramm, im Vergleich mit Sequenzen der Klonierung die spezifische Amplifikation des jeweiligen Genfragments. Die Schmelzkurvenanalysen während der Ermittlung der Amplifikationseffizienzen mittels Real-Time PCR stellten eine weitere Überprüfung der Spezifität dar.

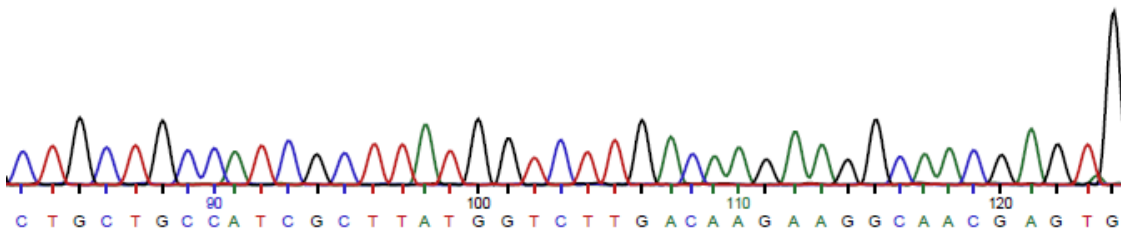


Abbildung 3-9: Sequenzchromatogramm nach Amplifikation mit Real-Time PCR-Primern. Exemplarischer Ausschnitt nach Amplifikation mit der Primerkombination HS70.RT8for/HS70.RT8rev. Der Abschnitt entspricht den Alignmentpositionen 211-255 der Abbildung 3-8. Die erstellten Primer amplifizieren ein spezifisches Produkt. Überlagerungen von Peaks finden nicht statt.

3.4.1.1 Ermittlung der Amplifikationseffizienzen

Die Ermittlung der Amplifikationseffizienzen erfolgte mittels Real-Time PCR. Als Template diente cDNA von Baum 1 in seriellen Verdünnungen von 10^{-2} bis 10^{-6} . Für jede Primerkombination wurden fünf Messungen durchgeführt. Die Berechnung erfolgte mithilfe der Gleichung (1), vgl. Kapitel 2.11.4. Die Mittelwerte für die jeweiligen Gene reichen von 1,69 bis 1,85. Vier der fünf überprüften Primerkombinationen erreichen eine Amplifikationseffizienz zwischen 1,80 und 1,85. Die Effizienzen liegen also relativ nahe beieinander. Mit einer Effizienz von 1,69 fällt allein die Kombination 14-3-3.RT.G1for6/14-3-3.RT.G1rev6 etwas ab. Die Primerkombinationen *RpCHS3for/RpCHS3rev* und *RpPAL1for/RpPAL1rev* wurden bereits in der Dissertation Langes (2009) verwendet. Die Amplifikationseffizienzen von 1,87 bzw. 1,98 werden in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Der Mittelwert der Effizienz für die Primerkombination *Rp18S.RTfor/Rp18S.RT.rev* beträgt 1,85, wird jedoch von Lange (2009) mit 2,02 angegeben. Bei allen weiteren Berechnungen wird der eigens ermittelte Wert verwendet. In Tabelle 3-13 sind die Einzelmessungen sowie der Mittelwert der fünf Messungen dargestellt. Dieser Mittelwert diente später der Berechnung der relativen Expression der Zielgene im Verhältnis zum 18S Referenzgen.

Tabelle 3-13: Amplifikationseffizienzen der verwendeten Primerkombinationen für die Real-Time PCR. Gezeigt werden die fünf Einzelmessungen sowie der Mittelwert, der zur späteren Berechnung der relativen Expression herangezogen wurde.

Primerkombination	Einzelmessungen					Mittelwert
14-3-3.RT.G1for6/14-3-3.RT.G1rev6	1,67	1,72	1,67	1,72	1,65	1,69
14-3-3.RT.G2+3for1/14-3-3.RT.G2rev5	1,81	1,82	1,89	1,79	1,77	1,82
14-3-3.RT.G2+3for1/14-3-3.RT.G3rev1	1,79	1,81	1,84	1,88	1,85	1,84
HS70.RT8for/ HS70.RT8rev	1,75	1,73	1,79	1,84	1,91	1,80
<i>Rp18S.RTfor/Rp18S.RT.rev</i>	1,90	1,91	1,88	1,78	1,78	1,85
<i>RpCHS3for/RpCHS3rev</i>	1,91	1,87	1,91	1,85	1,79	1,87
<i>RpPAL1for/ RpPAL1rev</i>	1,96	2,00	1,97	1,99	1,96	1,98

Die Schmelzkurvenanalyse während der Real-Time PCR belegt die Spezifität der Primer, im erarbeiteten Assay. Die Schmelztemperatur korreliert dabei mit der Fragmentlänge des amplifizierten Produkts. So weisen spezifische Produkte deutlich höhere Schmelztemperaturen auf als bspw. Primer-Dimere. Alle Verdünnungen (10^{-2} bis 10^{-6}) zeigen einen spezifischen Peak auf Höhe der Schmelztemperatur des erwarteten Produkts (ca. 84,5 °C). Allein die Negativkontrolle zeigt einen Peak bei einer niedrigeren Schmelztemperatur (ca. 78,7 °C), was auf Dimerbildung in Abwesenheit des cDNA-Templates zurückzuführen ist. Abbildung 3-10 zeigt exemplarisch die Dissoziationskurven, nach Messung der Amplifikationseffizienz für die Primerkombination 14-3-3.RT.G2+3for1/14-3-3.RT.G3rev1. Die erarbeiteten Primer ermöglichen aufgrund ihrer Spezifität eine korrekte Berechnung der relativen Expression und sind für Genexpressionsstudien verwendbar.

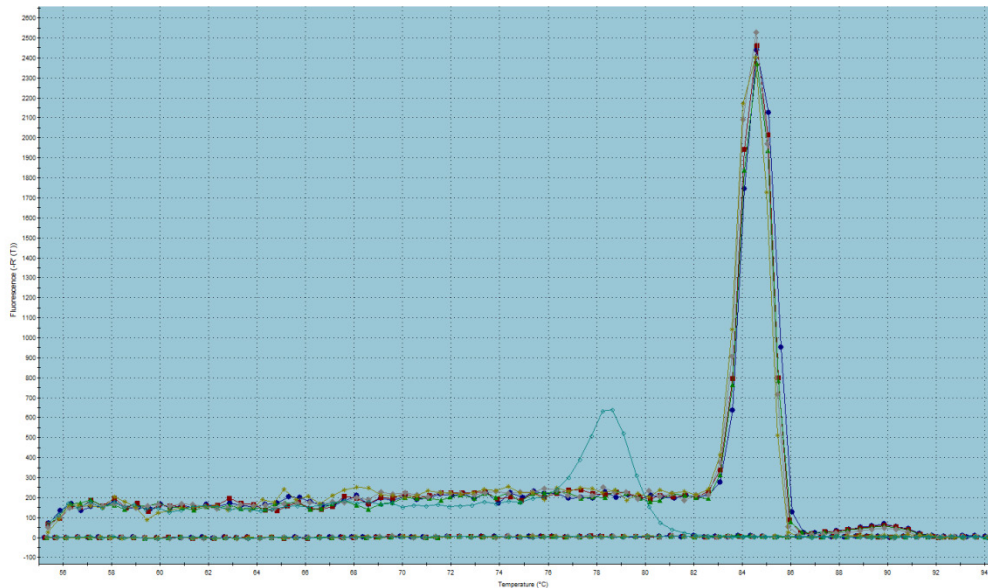


Abbildung 3-10: Schmelzkurven nach Real-Time PCR-Lauf zur Ermittlung der Amplifikationseffizienzen. Die Schmelztemperatur ist gegen die Fluoreszenz aufgetragen. Die Amplifikation erfolgte mithilfe der Primer 14-3-3.RT.G2+3for1/14-3-3.RT.G3rev1. Alle gewählten Verdünnungen (10⁻² bis 10⁻⁶) zeigen einen spezifischen Peak bei ca. 84,5 °C. Die Negativkontrolle zeigt aufgrund von Dimerbildung einen Peak bei 78,7 °C. Die verwendeten Primer amplifizieren spezifisch das cDNA-Template und sind damit für Genexpressionsstudien einsetzbar.

3.5 Ergebnisse der Genexpressionsstudien an RNA aus Gesamtgewebe

Nach erfolgreicher Identifikation der Kandidatengene und dem Erarbeiten des Real-Time PCR-Assays wurden Genexpressionsstudien für alle Kandidaten- und Markergene an Gesamtgewebe durchgeführt. Als Template diente cDNA, erhalten aus den fünf Gewebezonen der jeweiligen Proben aus den Jahren 2008 und 2012. Anhand der gemessenen C_T-Werte konnte mithilfe der zuvor bestimmten Amplifikationseffizienzen die relative Expression, im Verhältnis zum 18S Gen, berechnet werden. Der Jahresverlauf der Expression soll Aufschluss geben, ob es sich bei den untersuchten Genen um Markergene der Kernholzbildung handelt. Die relative Expression der untersuchten Gene ist in diesem Kapitel graphisch dargestellt. Sämtliche (Einzel-) Werte sowie die C_T-Werte finden sich in tabellarischer Form im Anhang. Für die graphische Darstellung aller Gewebezonen wurden Mittelwerte der Parallelproben gebildet, soweit mehr als ein Individuum vorlag (vgl. Kapitel 2.1). Auf die Darstellung der Standardabweichungen vom Mittelwert wird aus graphischen Gründen verzichtet.

3.5.1 Relative Expressionen der *Rp14-3-3* Genfamilie

3.5.1.1 Relative Expression von *Rp14-3-3Gen1*

Die Genexpressionsstudien für *Rp14-3-3Gen1* wurden mittels Real-Time PCR durchgeführt. Die Amplifikation erfolgte mithilfe der Primerkombination 14-3-3.RT.G1for6/14-3-3.RT.G1rev6. Die berechneten relativen Expressionen für die fünf Gewebezonen zu den verschiedenen Fällzeitpunkten der Jahre 2008 und 2012 sind in Abbildung 3-11 dargestellt. Die beiden Individuen eines jeweiligen Fällzeitpunkts sind dabei als Mittelwert zusammengefasst.

Das *Rp14-3-3Gen1* ist in allen Gewebezonen zu allen Zeitpunkten quantifizierbar. Allerdings ist die Expression in Relation zum 18S Referenzgen schwach. Der Expressionsverlauf zeigt, auf alle Gewebe bezogen, einen Peak im Juni des Jahres 2008. 2012 verschiebt sich dieser in den Juli. Eine zweite saisonale Hochregulierung des *Rp14-3-3Gen1* findet sich im Spätherbst (allerdings nur im Jahr 2008). Die stärksten Expressionen finden sich im Phloem der im Spätherbst gefälltten Bäume (2008_Nov: 2,8 %; 2012_Dez: 13,2 %). In beiden Jahren ist *Rp14-3-3Gen1* in diesem Gewebe von Spätherbst bis Frühjahr deutlich stärker exprimiert als im Sommer und Frühherbst. Im Splint unterscheiden sich die Expressionen des Kandidatengens im Jahresverlauf zwischen Proben der Jahre 2008 und 2012 auch qualitativ. Während die relative Expression im äußeren Splint im Jahresverlauf konstant niedrig ist (0,2-0,5 %), zeigt sich im Jahr 2012 eine im Gegensatz zum Frühjahr erhöhte Expression von 8 %. Im mittleren Splint ist die Expression im Jahresverlauf 2012 mit 0,2-1,5 % sehr schwach. Nur im Juli zeigt sich ein Peak von 6,3 %. Für 2008 zeigen sich leicht erhöhte Expressionen im Juni und November (1,5 %). Auch im inneren Splint unterscheiden sich die Jahresverläufe deutlich. Die untersuchten Proben von 2008 weisen, wie im mittleren Splint, erhöhte Expressionen im Juni (2,1 %) und November (1,3 %) auf, während die Expression im Jahr 2012 konstant niedrig ist (0,04-0,5 %), mit einem Peak im Juli (4,1 %).

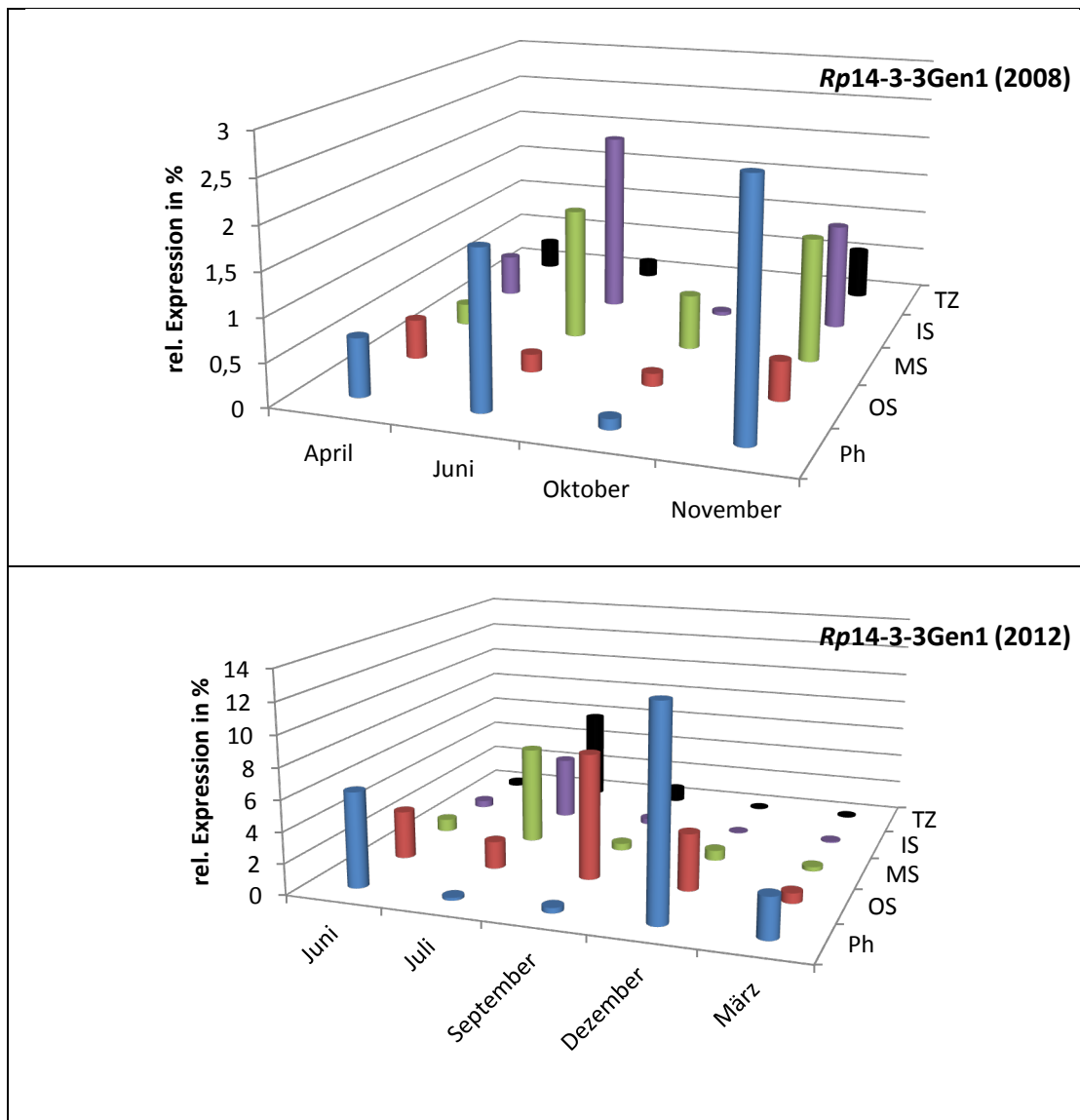


Abbildung 3-11: Relative Expression des *Rp14-3-3Gen1* in den verschiedenen Gewebezonen der Proben von 2008 und 2012 im Jahresverlauf. Die Expression (y-Achse) ist in Bezug zum Zeitpunkt der Probenahme (x-Achse) und dem Gewebeabschnitt (z-Achse) dargestellt. Die relativen Expressionen beziehen sich auf die Expression des 18S Referenzgens. Sie sind als Mittelwerte der jeweils zwei Individuen eines Probenzeitpunkts dargestellt. Für den Juli 2012 sowie die Gewebe MS, OS, TZ vom Juni 2008 lag jeweils nur ein Individuum vor.

Das Expressionsdiagramm der, für die Kernholzbildung entscheidenden, Splint-Kern-Übergangszone ist für beide Jahre der Probenahme in Abbildung 3-12 dargestellt. Für das Jahr 2008 ergibt sich eine konstante Expression (0,2-0,4 %) mit einem leichten Anstieg im November (bis ca. 1 %). Vom Winter bis Frühjahr des Jahres 2012 ist *Rp14-3-3Gen1* nur schwach exprimiert (bis zu 0,4 %). Der höchste Wert findet sich hier im Juli (6 %), im September sinkt die relative Expression auf 1,8 bzw. 0,07 %.

Die Expressionswerte der zwei Individuen eines Fällzeitpunkts unterlagen teils starken Schwankungen, woraus sich hohe Standardabweichungen vom Mittelwert ergeben.

Dies traf auf alle untersuchten Gewebe zu. Da für die Fragestellungen dieser Arbeit die Splint-Kern-Übergangszone ausschlaggebend ist, wird nur diese Zone mit Einzelwerten der Expression dargestellt. Während bspw. die Individuen vom April 2008 eine sehr geringe Standardabweichung vom Mittelwert aufweisen (4 %) und damit der Fehler des Mittelwertes vernachlässigt werden kann, ist der Expressionsunterschied anderer Individuen enorm. So zeigen die Einzelwerte im November 2008 eine Standardabweichung von 60 %. So ist der oben genannte Expressionspeak im November nur auf ein Individuum zurückzuführen. Dasselbe gilt für die Expressionswerte im September 2012 (Standardabweichung 123 %). Für eine spätere Diskussion, ob es sich bei dem Kandidatengen um ein Markergen handelt, sollen daher die Einzelwerte der Individuen betrachtet werden. Zusammenfassend lässt sich für die Splint-Kern-Übergangszone eine im Jahresverlauf konstant niedrige Expression des *Rp14-3-3Gen1* konstatieren (mit Ausnahme des Individuums im Juli 2012). Während Spätsommer und Herbst (Zeitpunkt der Kernholzbildung in der Robinie) ist keine verstärkte Expression in der Splint-Kern-Übergangszone gegenüber anderen Geweben erkennbar. Zumindest im Jahresverlauf 2012 ist während dieser Zeit die Expression innerhalb der Übergangszone gegenüber dem restlichen Jahr verstärkt. Aufgrund der generell schwachen Expression ist *Rp14-3-3Gen1* als Markergen der Kernholzbildung eher ungeeignet. Dies soll im weiteren Verlauf dieser Arbeit noch diskutiert werden.

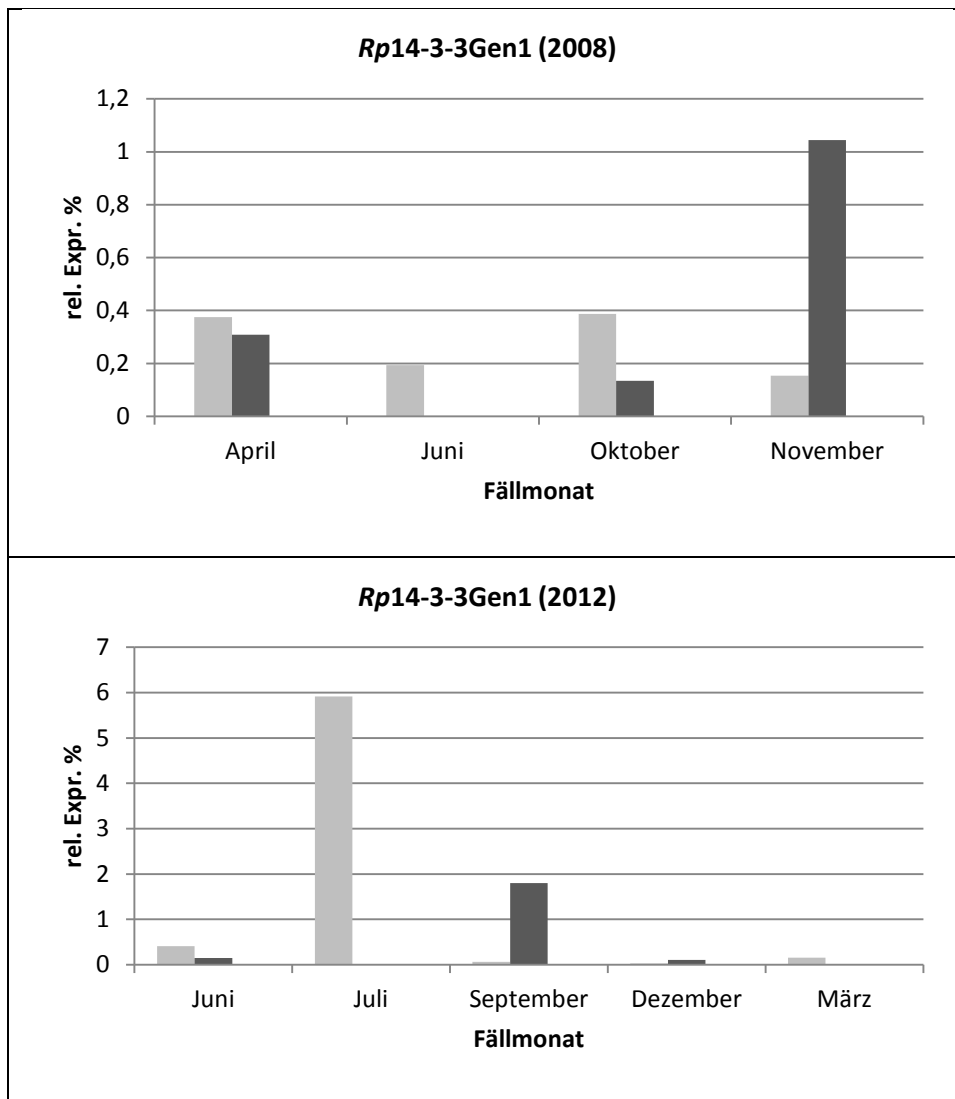


Abbildung 3-12: Relative Expression des *Rp14-3-3Gen1* in der Splint-Kern-Übergangszone der Proben von 2008 und 2012 im Jahresverlauf. Die relativen Expressionen der jeweils zwei Individuen sind dargestellt. Für Juni 2008 und Juli 2012 lag jeweils nur ein Individuum vor.

3.5.1.2 Relative Expression von *Rp14-3-3Gen2*

Die Amplifikation des *Rp14-3-3Gen2* erfolgte mithilfe der Primerkombination 14-3-3.RT.G2+3for1/14-3-3.RT.G2rev5 und mittels Real-Time PCR. Die relativen Expressionswerte aller Gewebezonen sind in Abbildung 3-13 dargestellt. Wie schon bei *Rp14-3-3Gen1* sind die Expressionen im Vergleich zum 18S Referenzgen schwach. Im Jahresverlauf 2012 ergibt sich für das Phloem eine Expression von 39,5 % im Juni, im Sommer und Herbst sinkt die Expression auf nahe 0% bis 0,7 %, ab Spätherbst über das Frühjahr ist wieder ein Anstieg zu verzeichnen (136 % bzw. 8,6 %). Dieser seasonspezifische Expressionsverlauf findet sich auch 2008 wieder. Auch hier ist die Expression im Juni relativ stark (17,2 %), sinkt dann im Herbst ab (0,3 %), um im Spätherbst wieder anzusteigen (2,3 %). Im äußeren Splint ergeben

sich für beide Jahre die höchsten Expressionen im Spätherbst (Nov. 2008: 8,8 %; Dez. 2012: 36 %). In diesem Gewebe ist die Expression im Jahr 2008 ansonsten konstant niedrig (0,5-1,6 %). Im Jahresverlauf 2012 wird ein leichter Anstieg der Expression von Frühjahr (9,5 %) zu Sommer (26,3 %) sichtbar. Nach dem Peak im Spätherbst sinkt die Expression im März wieder (3,5 %). Im mittleren Splint zeigt sich im Jahresverlauf 2008 von Frühjahr bis Herbst eine relativ konstante Expression (April 5%; Juni 10 %; Oktober 6,9 %). Im Spätherbst sinkt diese deutlich ab (0,9 %). Für das Jahr 2012 zeigt sich die stärkste Expression im Juli mit 20 %. Im Spätherbst beträgt die relative Expression 8 %. Im Winter (2,7 %), Frühjahr (2,9 %) und Frühherbst (0,9 %) ist die Expression im Vergleich sehr gering. Im inneren Splint ist *Rp14-3-3Gen2* im Frühjahr und Sommer am stärksten exprimiert (April 2008: 4 %, Juni 2008: 9,3 %; Juni 2012: 4,2 %, Juli 2012: 22,4 %). Von Frühherbst bis Winter ist die Expression im Jahr 2012 deutlich niedriger (0,6 %-1,6 %). Im Jahresverlauf 2008 sinkt die Expression nach dem Frühsommerpeak auf 0,3 % (Oktober), um dann im November wieder leicht anzusteigen (3,7 %). Zusammenfassend ist eine saisonale Hochregulierung des Gens im Juni (Jahr 2008) festzustellen. Im Jahresverlauf 2012 verschiebt sich dieser Peak in den Juli.

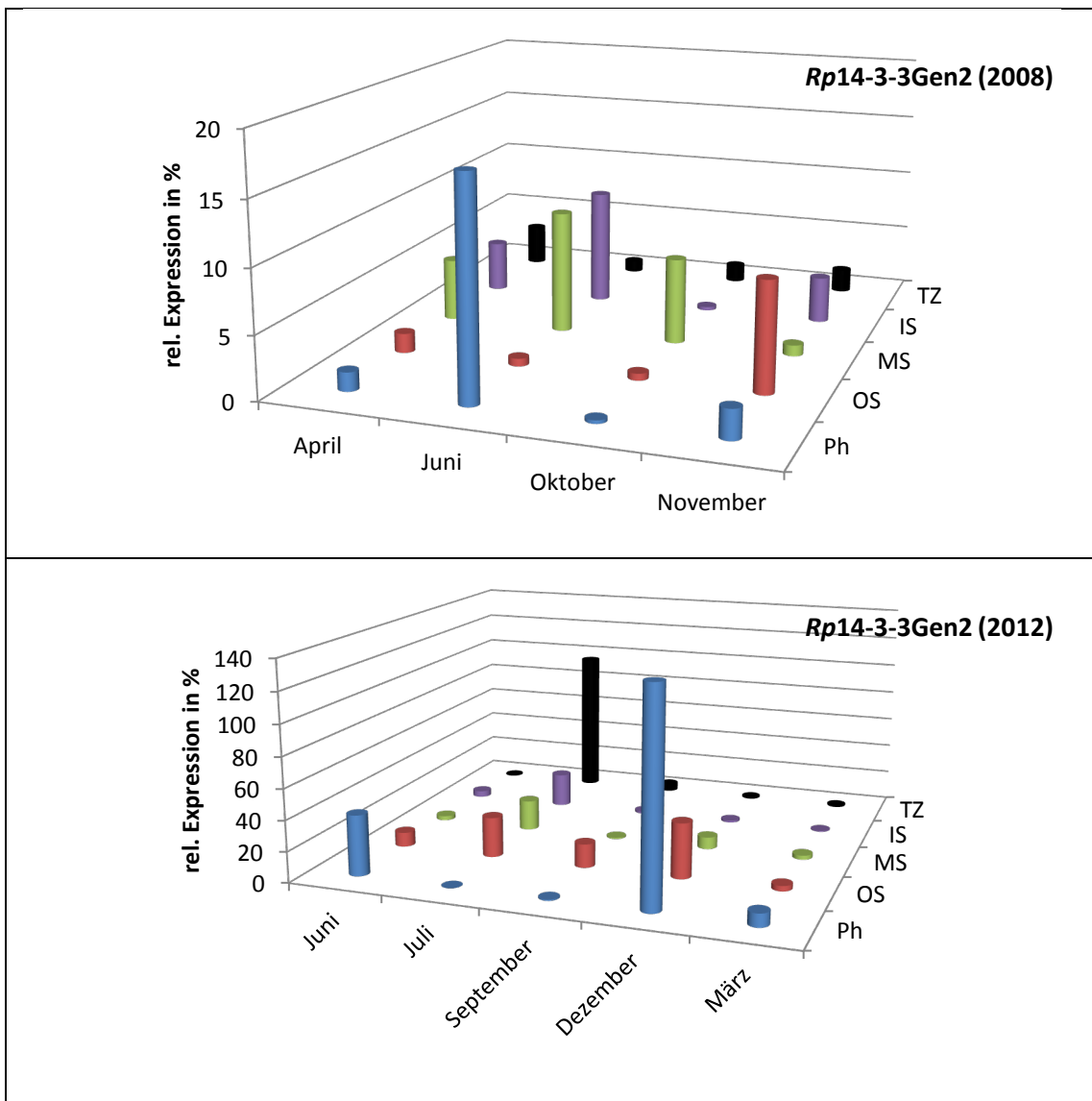


Abbildung 3-13: Relative Expression des *Rp14-3-3Gen2* in den verschiedenen Gewebezonen der Proben von 2008 und 2012 im Jahresverlauf. Die Expression (y-Achse) ist in Bezug zum Zeitpunkt der Probenahme (x-Achse) und dem Gewebeabschnitt (z-Achse) dargestellt. Die relativen Expressionen beziehen sich auf die Expression des 18S Referenzgens. Sie sind als Mittelwerte der jeweils zwei Individuen eines Probenzeitpunkts dargestellt. Für den Juli 2012 sowie die Gewebe MS, OS, TZ vom Juni 2008 lag jeweils nur ein Individuum vor.

Die Expressionswerte für die Splint-Kern-Übergangszone sind zusätzlich als Einzelwerte der Individuen dargestellt (Abbildung 3-14). Auch hier zeigt sich einheitlich ein Muster niedriger Expressionen. Eine Ausnahme bildet das Individuum, das im Juli 2012 gefällt wurde. Die relative Expression von *Rp14-3-3Gen2* beträgt hier 96,3 % in Bezug zum 18S Referenzgen. Im September sinkt diese auf 10 % (für das zweite Individuum). Von Spätherbst bis Frühjahr ist die Expression noch niedriger (unter 2,5 %). Im Jahresverlauf 2008 zeigt sich die Expression von *Rp14-3-3Gen2* ausgeglichener. Der April weist dabei mit bis zu ca. 6 % die höchste Expression auf.

Im Weiteren sinkt diese auf 0,95 % im Juni bzw. 0,4 bis 2,5 % im Oktober, bevor sie im Spätherbst wieder leicht ansteigt (bis zu 3,1 %).

Auch bei *Rp14-3-3Gen2* zeigen die Individuen eines Fällzeitpunkts große Unterschiede in der Expression. Die größte Standardabweichung findet sich mit fast 400 % im April 2008, was auch den Peak gegenüber allen anderen Fällzeitpunkten bewirkt. Allerdings haben die Abweichungen vom Mittelwert, abgesehen vom soeben genannten April 2008, keinen großen Einfluss auf das Expressionsmuster im Jahresverlauf. Auch *Rp14-3-3Gen2* zeigt gegenüber anderen Geweben nicht die für ein Markergen der Kernholzbildung typische starke Expression in der Übergangszone von Sommer bis Herbst. Wiederum zeigt sich innerhalb des Jahresverlaufs in der Übergangszone eine saisonal erhöhte Expression im Sommer 2012. Im Jahr 2008 tritt dieses saisonale Muster in der Splint-Kern-Übergangszone nicht auf. Eine Diskussion über die Einsetzbarkeit des *Rp14-3-3Gen2* als Markergen der Kernholzbildung folgt.

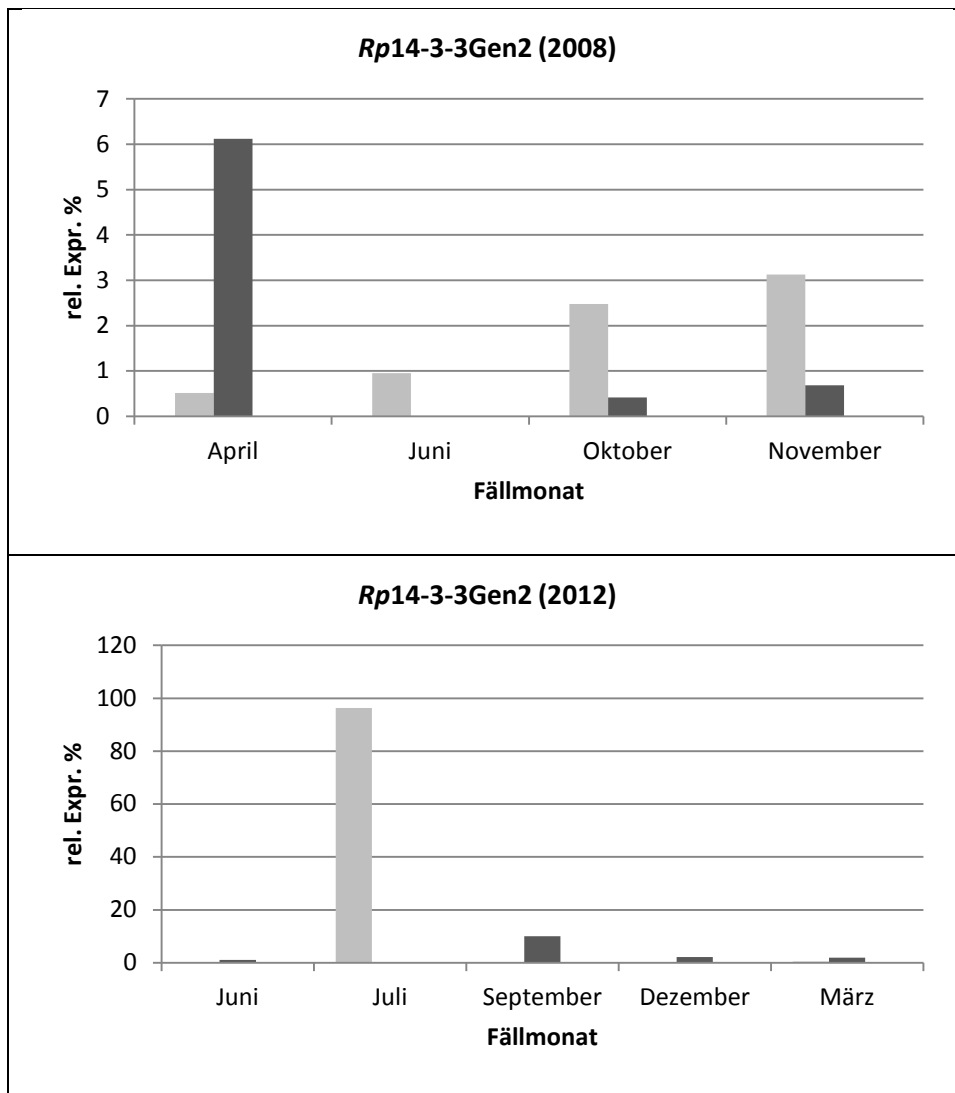


Abbildung 3-14: Relative Expression des *Rp14-3-3Gen2* in der Splint-Kern-Übergangszone der Proben von 2008 und 2012 im Jahresverlauf. Die relativen Expressionen der jeweils zwei Individuen sind dargestellt. Für Juni 2008 und Juli 2012 lag jeweils nur ein Individuum vor.

3.5.1.3 Relative Expression von *Rp14-3-3Gen3*

Die Real-Time PCR-Amplifikation des *Rp14-3-3Gen3* erfolgte mithilfe der Primerkombination 14-3-3.RT.G2+3for1/14-3-3.RT.G3rev1. Die Werte der relativen Expression sind in Abbildung 3-15 graphisch dargestellt. Die Expression ist für dieses Gen seasonspezifisch reguliert. *Rp14-3-3Gen3* ist im Frühjahr beider Jahre in allen Gewebezonen am stärksten exprimiert. Die höchsten Werte für das Jahr 2008 ergeben sich im inneren Splint (5,9 %) und in der Splint-Kern-Übergangszone (5,3 %) der Aprilproben. Im Juni 2012 weist das Phloem (30 %) die höchste Expression auf. In der Splint-Kern-Übergangszone finden sich zu diesem Zeitpunkt die wenigsten Transkripte aller Gewebe (1,6 %). Im Frühsommer 2008 sinkt die Expression in allen Gewebezonen deutlich ab, wobei der mittlere Splint noch den höchsten Wert aufweist

(3,1 %). In den restlichen Geweben ist *Rp14-3-3Gen3* konstant niedriger exprimiert (0,6-0,9 %). Im weiteren Jahresverlauf bleibt die relative Expression in allen Zonen sehr gering (unter 1 %). Im Jahr 2012 sinkt die Expression nach dem Frühjahr noch stärker ab. Im gesamten Verlauf zeigen nur der äußere Splint im September (11 %) und das Phloem im Dezember (20,8 %, bedingt durch das Individuum 2012_Dez2) starke Expressionen. Ansonsten bewegen sich die Werte unter 3 %.

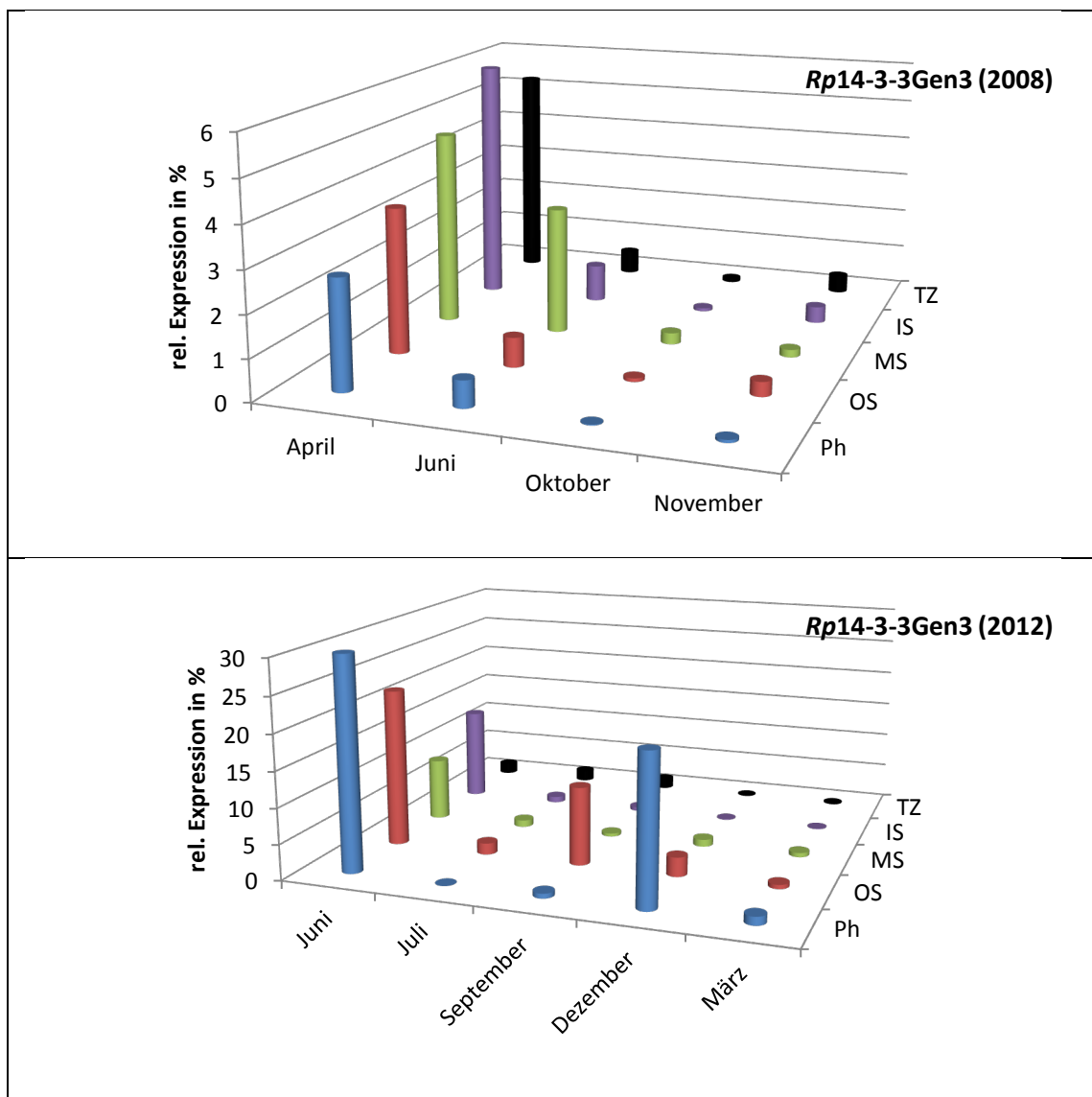


Abbildung 3-15: Relative Expression des *Rp14-3-3Gen3* in den verschiedenen Gewebезonen der Proben von 2008 und 2012 im Jahresverlauf. Die Expression (y-Achse) ist in Bezug zum Zeitpunkt der Probenahme (x-Achse) und dem Gewebeabschnitt (z-Achse) dargestellt. Die relativen Expressionen beziehen sich auf die Expression des 18S Referenzgens. Sie sind als Mittelwerte der jeweils zwei Individuen eines Probenzeitpunkts dargestellt. Für den Juli 2012 sowie die Gewebe MS, OS, TZ vom Juni 2008 lag jeweils nur ein Individuum vor.

Die *Rp14-3-3Gen3* Expressionswerte für die Übergangszone sind in Abbildung 3-16 dargestellt. Für das Jahr 2008 zeigt sich ein deutlicher Peak der relativen Expression im Frühjahr (April: bis 6,9 %). Im weiteren Jahresverlauf ist im Vergleich keine nennenswerte Menge an Transkripten messbar. Die Einzelwerte der jeweils zwei Individuen zeigen dabei keine großen Abweichungen. Der größte Variationskoeffizient findet sich im April (43 %).

Im Jahresverlauf 2012 ist ein saisonales Expressionsmuster in der Splint-Kern-Übergangszone zu beobachten. Trotz insgesamt niedriger Expressionswerte ist eine Hochregulierung des *Rp14-3-3Gen3* von Frühjahr bis Frühherbst zu beobachten. In diesem Fall müssen die Einzelwerte der Individuen berücksichtigt werden. Im Juni und September sind hier starke Abweichungen zu verzeichnen. So ergibt sich der Mittelwert für Juni aus den Einzelwerten 0,06 % und 3,11 %. Eine ähnlich hohe Abweichung der Individuen ergibt sich im September 2012. Aufgrund der schwachen Expressionswerte und des Expressionsverlaufs in der Splint-Kern-Übergangszone im Jahr 2008 erscheint *Rp14-3-3Gen3* als Markergen der Kernholzbildung ungeeignet.

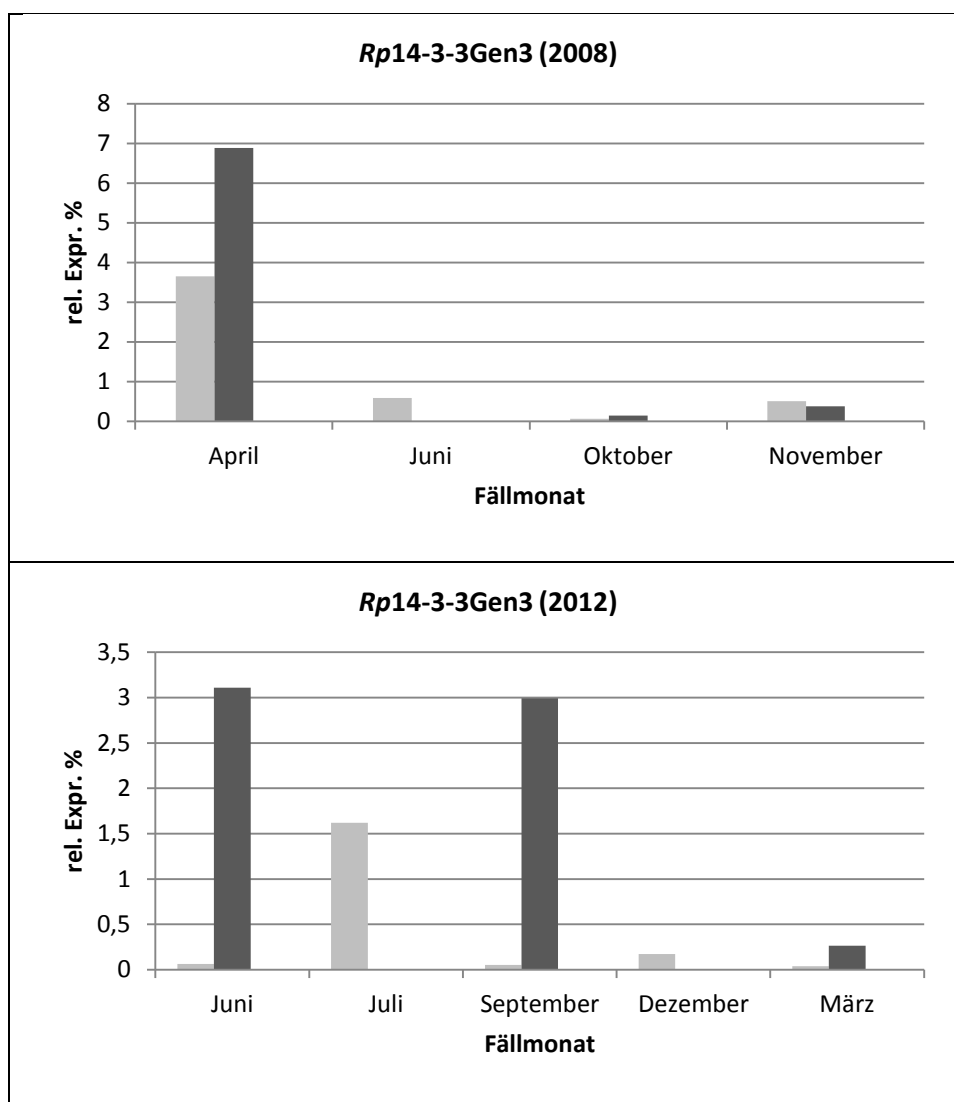


Abbildung 3-16: Relative Expression des *Rp14-3-3Gen3* in der Splint-Kern-Übergangszone der Proben von 2008 und 2012 im Jahresverlauf. Die relativen Expressionen der Individuen sind dargestellt. Für Juni 2008 und Juli 2012 lag jeweils nur ein Individuum vor.

3.5.1.4 Vergleich der Mitglieder der *Rp14-3-3* Genfamilie

Die Transkripte aller drei Mitglieder der *Rp14-3-3* Genfamilie konnten zu allen Jahreszeiten und in allen Gewebezonen quantifiziert werden. Die Gene sind im Jahresverlauf 2012 stärker exprimiert als 2008. Die höchsten Werte finden sich dabei sowohl 2008 als auch 2012 im Phloem. Mit Ausnahme von *Rp14-3-3Gen3* weisen alle Gene eine saisonale Hochregulierung im Juni 2008 auf. Für das Jahr 2012 verschiebt sich diese in den Juli. Die Ausnahme bildet hier wieder *Rp14-3-3Gen3*, welches im Juni am stärksten in allen Gewebezonen exprimiert ist. Eine verstärkte Expression in der Splint-Kern-Übergangszone gegenüber anderen Geweben ist nicht feststellbar. Eine Ausnahme bildet die Einzelmessung der Expression von *Rp14-3-3Gen2* im Juli 2012. Allerdings weisen alle drei Isoformen im Jahresverlauf 2012 eine Hochregulierung im

Sommer gegenüber den Wintermonaten auf. Die *Rp14-3-3* Genfamilie ist in Relation zum 18S Gen deutlich schwächer exprimiert. Die für Markergene der Kernholzbildung typische starke Expression in der Übergangszone während des Sommers oder Herbstes gegenüber anderen Geweben ist in dieser Genfamilie nicht erkennbar.

3.5.2 Relative Expression von *RpHS70*

Mittels Real-Time PCR und der Primerkombination HS70.RT8for/HS70.RT8rev gelang es das *RpHS70* Genfragment in allen Geweben, zu jeder Jahreszeit zu amplifizieren. Die Expressionswerte des Zielgens sind in Abbildung 3-17 dargestellt. Saisonal ähneln sich die Expressionsmuster der Jahre 2008 und 2012. So sind die gewebespezifischen Expressionen im Frühjahr und Sommer jeweils in etwa gleich hoch, mit Ausnahme der Splint-Kern-Übergangszone im Juli 2012, die eine deutlich erhöhte Expression (57,7 %) gegenüber Juni (4 %) zeigt. Im Spätsommer/Frühherbst ist in beiden Jahren ein Absinken der messbaren Transkripte zu beobachten. Eine Ausnahme bildet der äußere Splint im September 2012. Hier steigt die relative Expression mit 17,3 % gegenüber 12,9 % im Juli sogar leicht an. Im Spätherbst 2008 ist wieder ein leichter Anstieg der Expression zu verzeichnen. Dieser bleibt im Spätherbst und Winter im Jahr 2012 aus.

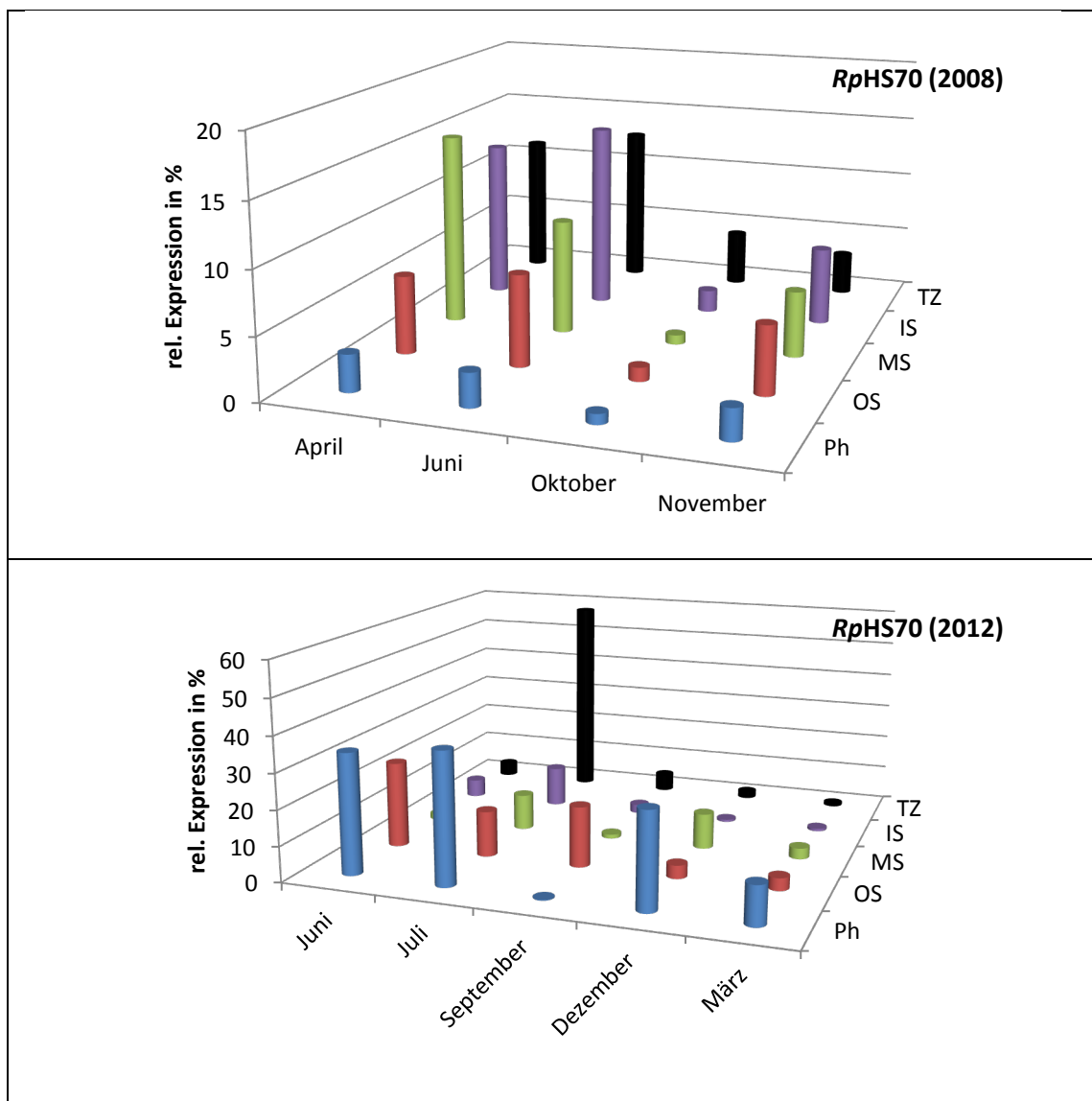


Abbildung 3-17: Relative Expression von RpHS70 in den verschiedenen Gewebезonen der Proben von 2008 und 2012 im Jahresverlauf. Die Expression (y-Achse) ist in Bezug zum Zeitpunkt der Probenahme (x-Achse) und dem Gewebeabschnitt (z-Achse) dargestellt. Die relativen Expressionen beziehen sich auf die Expression des 18S Referenzgens. Sie sind als Mittelwerte der jeweils zwei Individuen eines Probenzeitpunkts dargestellt. Für den Juli 2012 sowie die Gewebe MS, OS, TZ vom Juni 2008 lag jeweils nur ein Individuum vor.

Auffällig ist das unterschiedliche Expressionsmuster in Bezug auf die verschiedenen Gewebe zwischen den Jahren 2008 und 2012. So sind hohe Expressionswerte im Jahr 2012 überwiegend im Phloem zu finden. Im Splint und der Splint-Kern-Übergangszone ist die Zahl der Transkripte deutlich geringer. Für das Jahr 2008 ergibt sich ein umgekehrtes Bild. Hier ist RpHS70 im Phloem im Gegensatz zu Splint und Übergangszone schwächer exprimiert.

Die relative Expression der Splint-Kern-Übergangszone im Jahresverlauf ist in Abbildung 3-18 dargestellt.

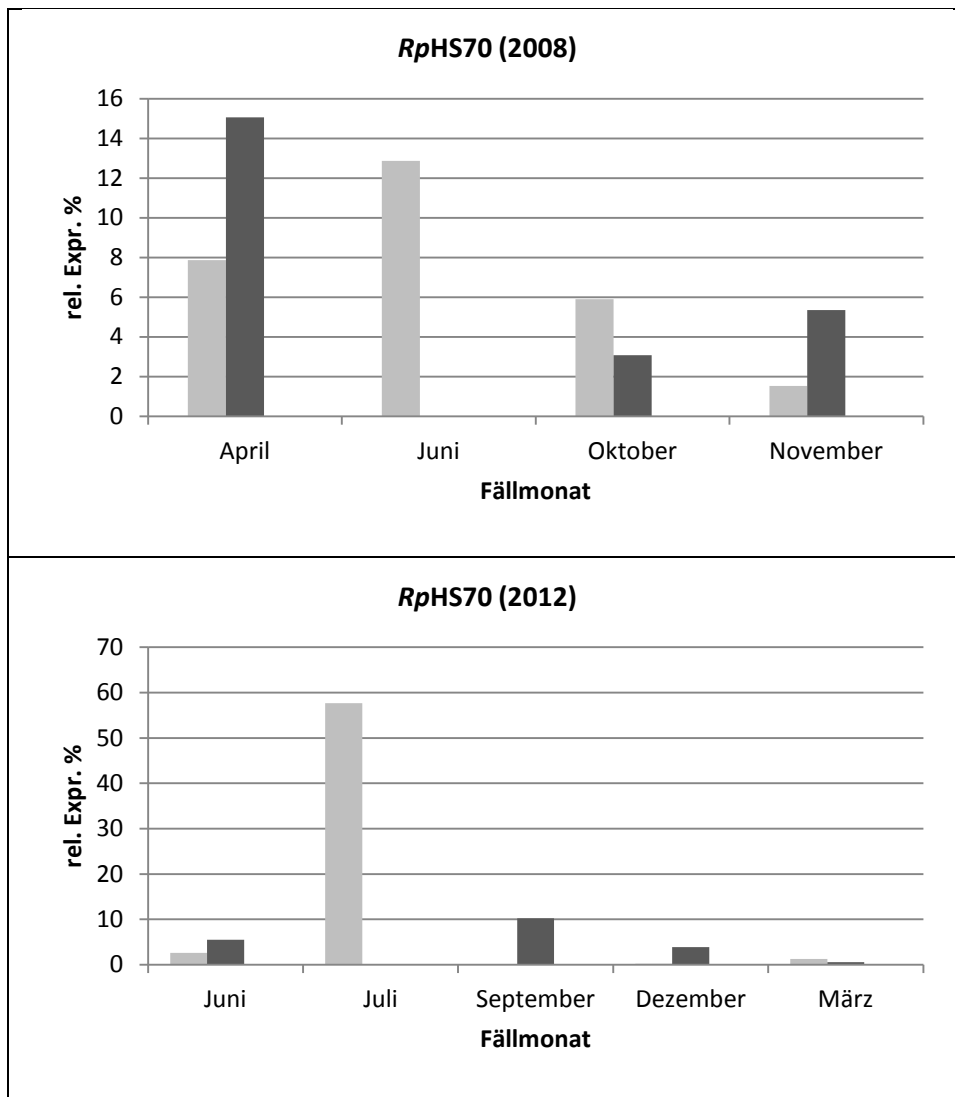


Abbildung 3-18: Relative Expression von RpHS70 in der Splint-Kern-Übergangszone der Proben von 2008 und 2012 im Jahresverlauf. Die relativen Expressionen der Individuen sind dargestellt. Für Juni 2008 und Juli 2012 lag jeweils nur ein Individuum vor.

Im Jahresverlauf 2008 zeigt sich auch in diesem Gewebe die höchste Menge an Transkript im Frühjahr und Frühsommer (April: bis zu 15,1 %; Juni: 12,9 %). Im Herbst und Spätherbst ist RpHS70 in der Übergangszone, mit bis zu 5,9 % im Oktober und 5,4 % im November, weniger stark exprimiert. Trotz Variationskoeffizienten von 44 % im April und 78 % im November wird das Genexpressionsmuster durch die Mittelwerte nicht verfälscht.

Im Jahresverlauf 2012 ist RpHS70 im Juli mit 57,7 % am stärksten exprimiert. Bei der Betrachtung dieses Jahresverlaufs sind die Einzelwerte zu betrachten, da der Mittelwert für September ein verzerrtes Bild des Genexpressionsmusters wiedergibt. Für 2012_Sep1 ergibt sich eine relative Expression von 0,08 %, während der Wert für

2012_Sep2 10,2 % beträgt. Lässt man den ersten Wert außer Acht, ergibt sich im Jahr 2012 ein Expressionspeak im Sommer/Frühherbst.

3.5.3 Relative Expression von *RpCHS3*

Das Markergen der Kernholzbildung *RpCHS3* wurde mithilfe der Primerkombination *RpCHS3for/RpCHS3rev* und mittels Real-Time PCR amplifiziert. Die relative Expression aller Gewebe im Jahresverlauf 2008 und 2012 ist in Abbildung 3-19 dargestellt. Das Genexpressionsmuster ist gewebe- und seasonspezifisch. *RpCHS3* wird fast ausschließlich in der Splint-Kern-Übergangszone exprimiert. Vergleichsweise schwache Signale sind noch im inneren Splint im Juni 2008 (10 %) bzw. September 2012 (5,5 %) nachweisbar. In allen anderen Geweben wurde eine sehr schwache (≤ 1 %), bzw. gar keine Expression des *RpCHS3* Gens detektiert.

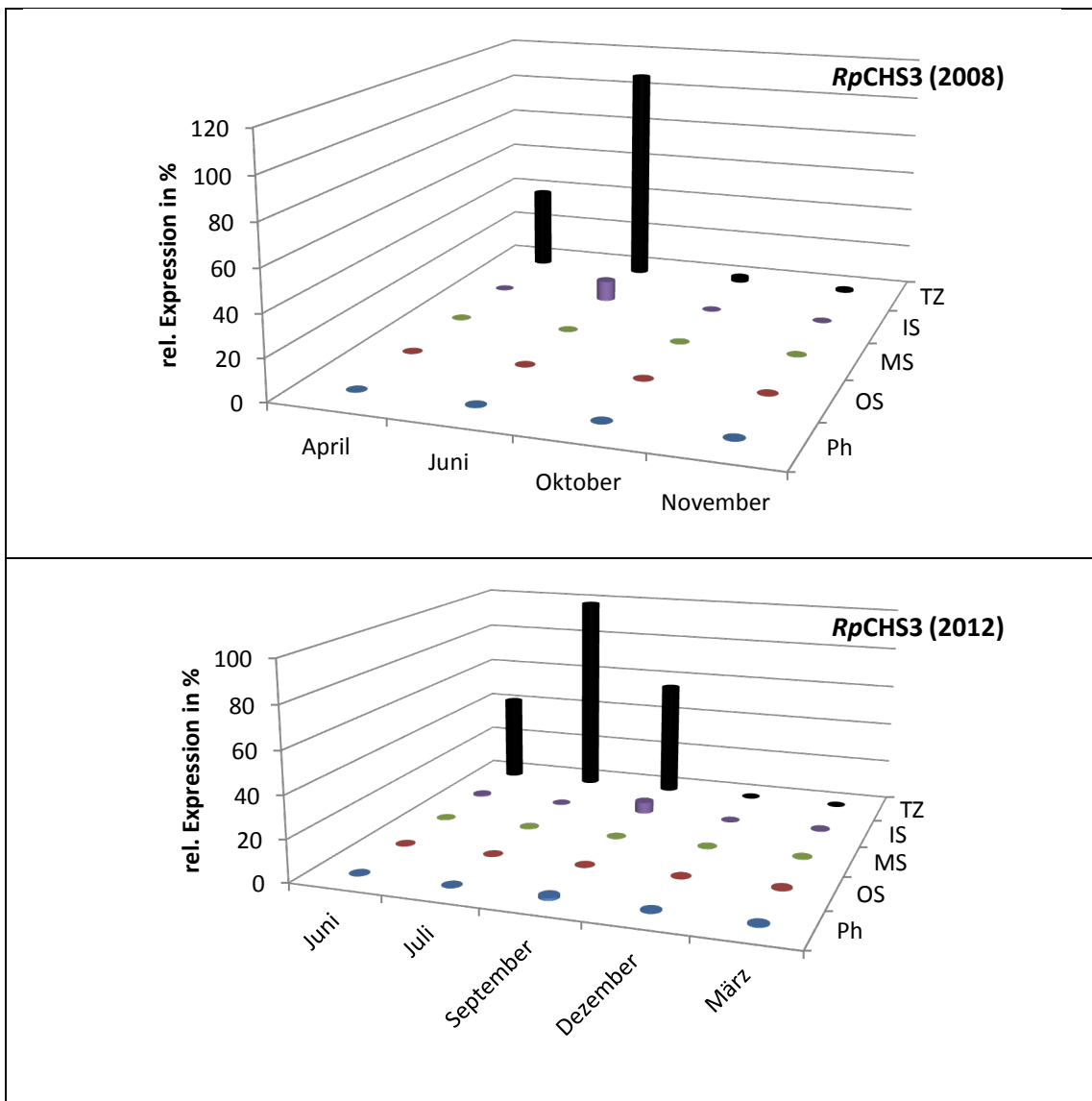


Abbildung 3-19: Relative Expression von RpCHS3 in den verschiedenen Gewebezonen der Proben von 2008 und 2012 im Jahresverlauf. Die Expression (y-Achse) ist in Bezug zum Zeitpunkt der Probenahme (x-Achse) und dem Gewebeabschnitt (z-Achse) dargestellt. Die relativen Expressionen beziehen sich auf die Expression des 18S Referenzgens. Sie sind als Mittelwerte der jeweils zwei Individuen eines Probenzeitpunkts dargestellt. Für den Juli 2012 sowie die Gewebe MS, OS, TZ vom Juni 2008 lag jeweils nur ein Individuum vor.

Zur einfacheren Übersicht sind die Expressionen der Splint-Kern-Übergangszone in Abbildung 3-20 separat von den anderen Geweben dargestellt.

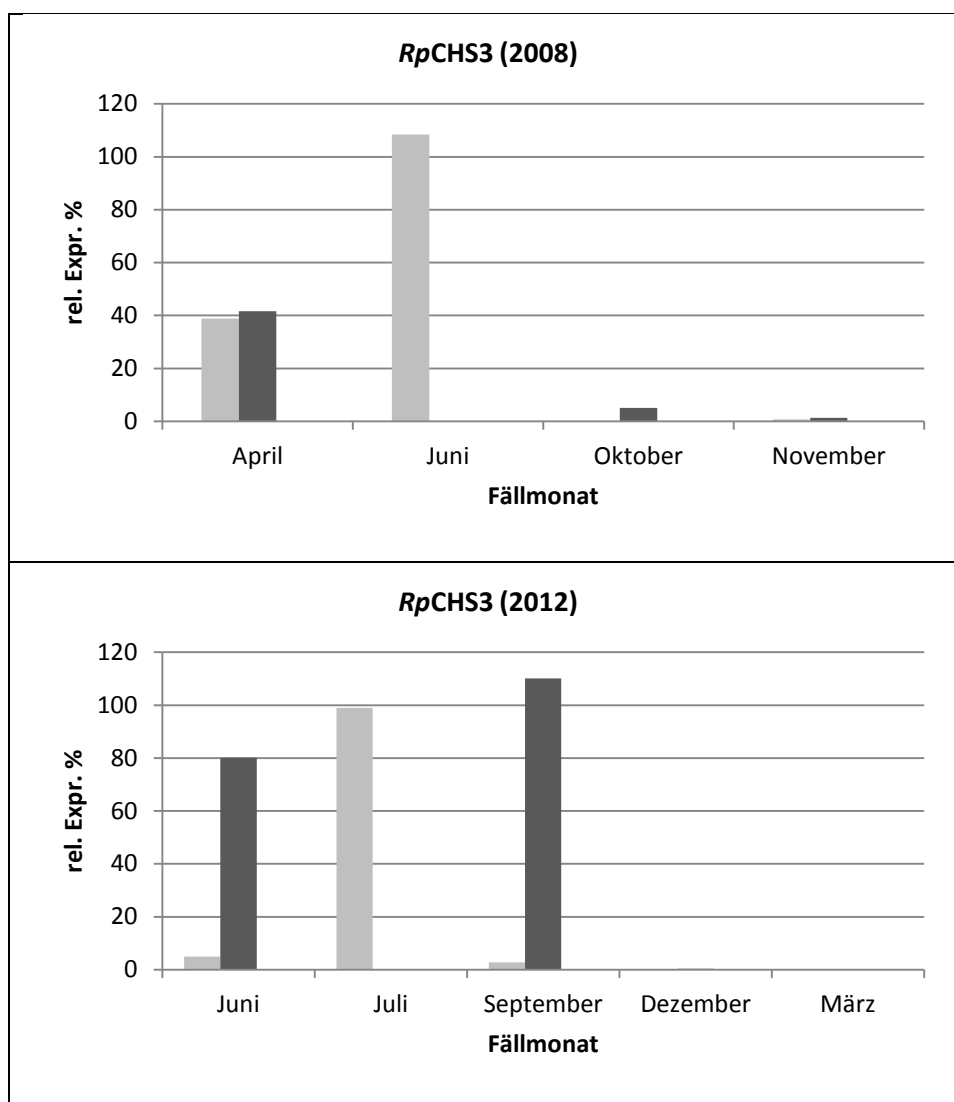


Abbildung 3-20: Relative Expression von RpCHS3 in der Splint-Kern-Übergangszone der Proben von 2008 und 2012 im Jahresverlauf. Die relativen Expressionen der Individuen sind dargestellt. Für Juni 2008 und Juli 2012 lag jeweils nur ein Individuum vor.

Auch wenn die Expressionen der zwei Individuen zum selben Fällzeitpunkt starke Schwankungen aufweisen, ist ein eindeutiges Expressionsmuster erkennbar. Im Spätherbst und Winter ist RpCHS3 kaum bzw. nicht exprimiert. Im Frühjahr steigt die Menge der Transkripte deutlich an. Im Sommer ist das Gen am stärksten exprimiert, wobei im Juni 2008 eine relative Expression von 108,5 % und im Juli 2012 von 99 % detektiert wurde. Im Oktober 2008 sinkt die Menge an Transkript dann wieder ab, im November ist sie mit 1,3 bzw. 0,7 % am niedrigsten. In Übereinstimmung dazu zeigt sich das Genexpressionsmuster für das Jahr 2012. Hier beginnt die Expression von RpCHS3 im Juni mit 80,1 % für das zweite Individuum. Die Transkriptmenge in der Splint-Kern-Übergangszone steigt dann im Juli auf 99 %. Auch im September ist das Markergen (für Individuum zwei) mit 110,2 % stark hochreguliert. Analog zum Jahr

2008 ist die Expression in den Wintermonaten sehr gering oder nicht mehr detektierbar. Die relative Expression schwankt zwischen den Individuen, gerade im Juni und September 2012 sehr stark. So ist für diese Zeitpunkte in jeweils einem Individuum sehr wenig Transkript messbar (2012_Jun1: 4,9 %; 2012_Sep1: 2,8 %), während in dem jeweils zweiten Individuum eine deutliche Hochregulierung festzustellen ist.

3.5.4 Relative Expression von *RpPAL1*

Da das Expressionsmuster von *RpPAL1* nur eine weitere Validierung der Rolle von axialen und radialen Parenchymen zur Kernholzbildung darstellen soll, beschränken sich die Genexpressionsstudien an RNA aus Gesamtgewebe auf die Splint-Kern-Übergangszone. Die Amplifikation erfolgte mit der Primerkombination *RpPAL1rev/RpPAL1rev*.

Abbildung 3-21 zeigt die relative Expression in Bezug zum 18S Referenzgen. In beiden Jahren ist ein seasonspezifisches Muster zu erkennen. Expressionspeaks finden sich im Sommer. Im Juni des Jahres 2008 erreicht die relative Expression mit 27,7 % ihren Höhepunkt. Im Frühjahr wird *RpPAL1* sehr schwach (2008_Apr1: 1,37 %), bzw. in der Splint-Kern-Übergangszone des zweiten Individuums überhaupt nicht exprimiert. Im Oktober und November ist die Transkriptmenge messbar, aber sehr gering. Es ergeben sich relative Expressionen von unter 1 % für alle untersuchten Individuen dieser Zeitpunkte. Das Jahr 2012 zeigt einen ähnlichen Verlauf. Während der Sommermonate Juni und Juli sowie im Frühherbst finden sich Expressionspeaks, während das Markergen im Dezember und März schwach bzw. nicht exprimiert wird. Die Expressionsunterschiede zwischen den Individuen eines Probenzeitpunkts sind sehr hoch. Besonders im Juni und September des Jahres 2012 ist jeweils ein Individuum für den Expressionspeak verantwortlich, während *RpPAL1* im zweiten deutlich schwächer exprimiert ist.

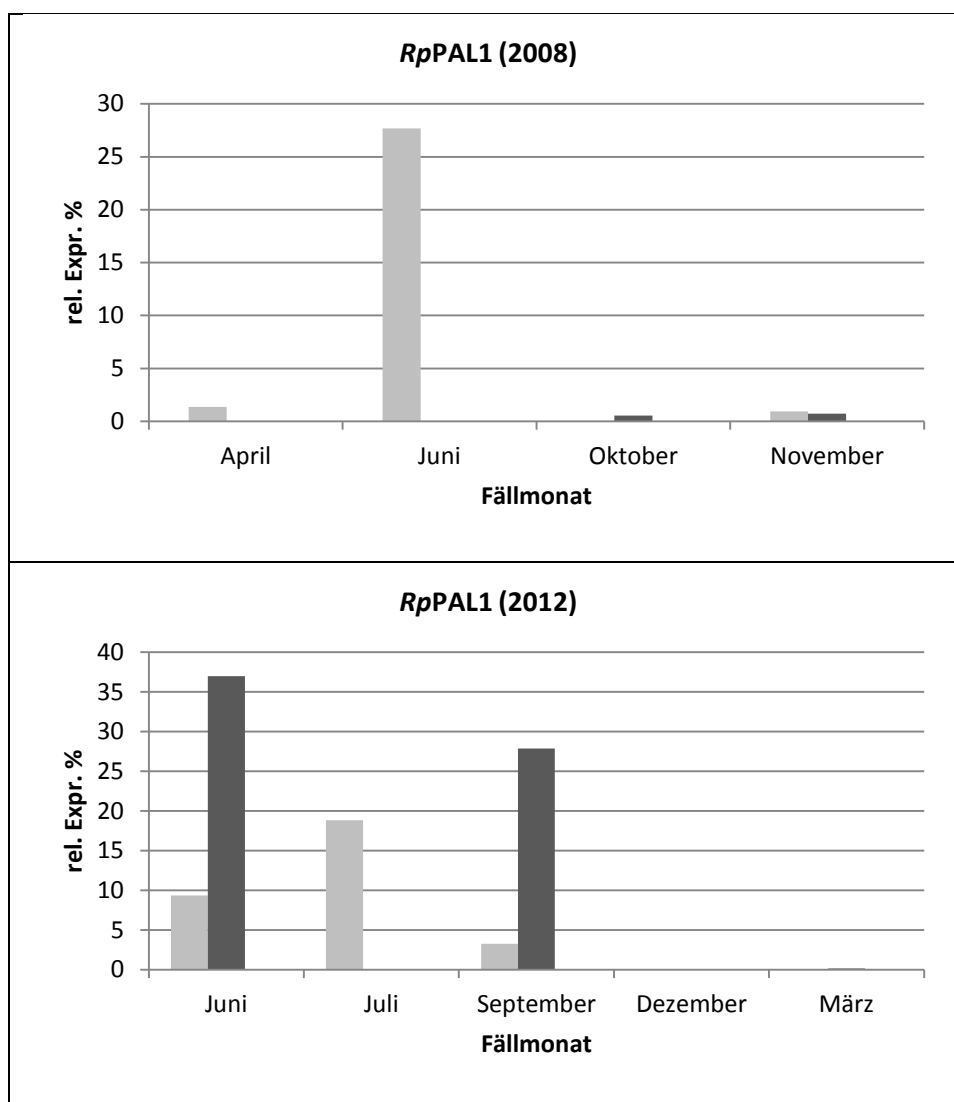


Abbildung 3-21: Relative Expression von RpPAL1 in der Splint-Kern-Übergangszone der Proben von 2008 und 2012 im Jahresverlauf. Die relativen Expressionen der Individuen sind dargestellt. Für Juni 2008 und Juli 2012 lag jeweils nur ein Individuum vor.

3.6 Isolierung axialer und radialer Parenchyme mittels Lasermikrodissektion

Im Verlauf dieser Arbeit wurde ein Assay erarbeitet, das es erlaubt; Axial- und Radialparenchym der Robinienproben in der Splint-Kern-Übergangszone histologisch zu identifizieren und mittels „Lasermicrodissection and pressure catapulting“ (LMPC) zu isolieren. Die Untersuchungen der verschiedenen Parenchymgewebe beschränkten sich dabei auf die Splint-Kern-Übergangszone (TZ), da die Kernholzbildung in diesem Gewebe stattfindet. Die zu untersuchenden Proben wurden vom Zeitpunkt der

Probenahme über die Aufarbeitung mittels Stechbeitel und Säge bis zum Anfertigen von radialen Dünnschnitten (10 µm) im gefrorenen Zustand gehalten, um Qualität und Integrität der RNA nicht zu gefährden. Nachdem die Dünnschnitte mit Zuckerlösung fixiert und ca. 24 h gefriergetrocknet wurden, erfolgte eine weitere Fixierung, bzw. ein Abdecken von Splint- und Kernholzbereichen mit Klebestreifen. Die so präparierten Proben konnten nun der Lasermikrodissektion zugeführt werden.

Durch die beschriebene Fixierung wird eine ausreichend gute histologische Auflösung erreicht, sodass axiale bzw. radiale Parenchyme und andere Gewebe, wie Gefäße, identifiziert werden können. Das Assay erlaubt, bei fünffacher Vergrößerung, mit den Parametern Laserenergie 100 % und Fokus 69-72 % ein reproduzierbares Ausschneiden und Katapultieren von Parenchymgewebe. Abbildung 3-22 zeigt einen 10 µm Radialschnitt unter dem inversen Mikroskop des PALM[®] MicroBeam Systems (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München), mit bereits ausgeschnittenem Radialparenchym. Das Katapultieren durch einen finalen Impuls des Lasers außerhalb der Fokusebene erfolgte in „adhäsive caps“. Die erfolgreiche mikroskopische Überprüfung dieses Vorgangs zeigt Abbildung 3-23. Das Foto zeigt etwa 150.000 µm² erfolgreich isoliertes Radialparenchym. Areale mit einer Fläche von 10.000-30.000 µm² erwiesen sich dabei als optimal für das LMPC Assay, bei größeren Arealen verlief das Katapultieren in das „cap“ nicht immer erfolgreich. Die „adhäsiven caps“ wurden nach Abschluss der LMPC mit 50 µl QIAzol Lysis Reagent (Qiagen) versetzt und das dissektierte Gewebe in das Reagenz zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Anschließend konnte RNA extrahiert und amplifiziert werden.

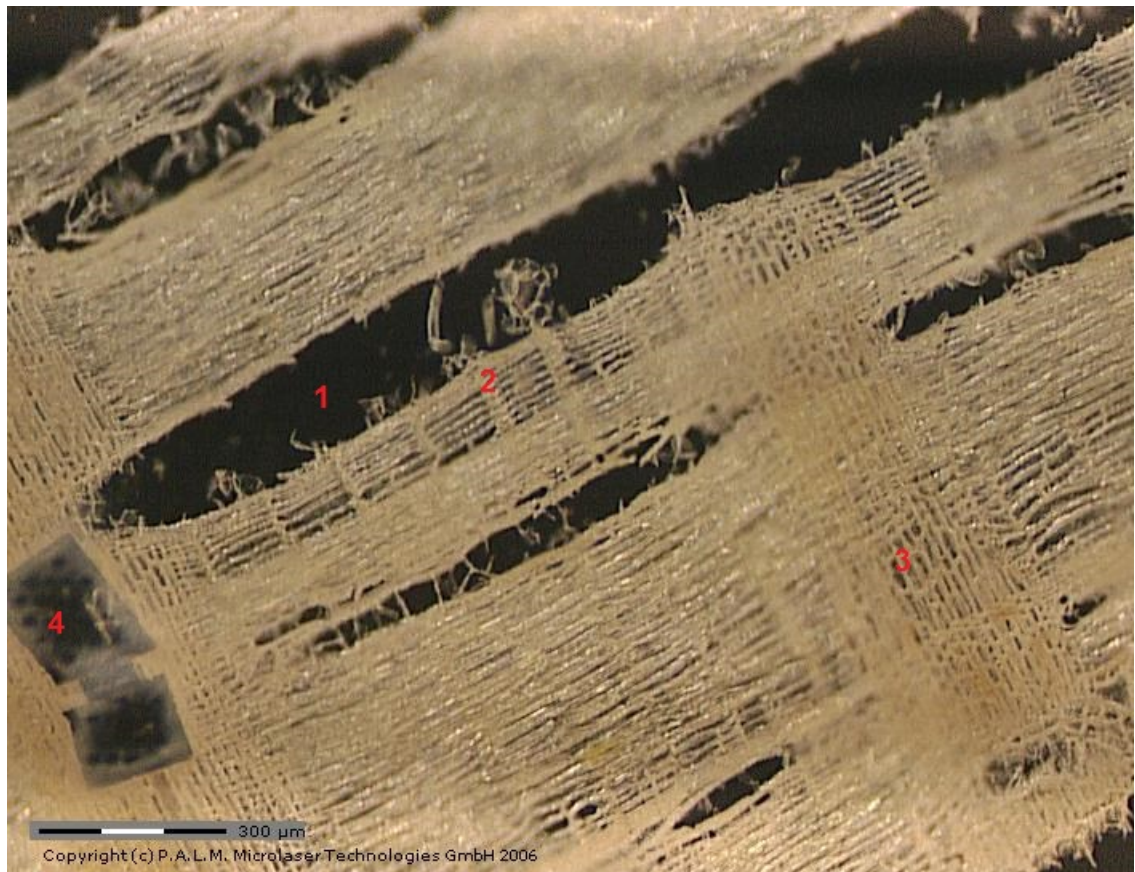


Abbildung 3-22: Radialschnitt von *Robinia pseudoacacia* unter dem Mikroskop des PALM® MicroBeam Systems. Die histologische Auflösung ist hoch genug, um Gefäße (1), gefäßbegleitendes Axialparenchym (2) und Radialparenchym (3) zweifelsfrei identifizieren zu können. Links (4) sind bereits durch LMPC isolierte Abschnitte des Radialparenchyms zu sehen.



Abbildung 3-23: Mikroskopische Überprüfung der LMPC. Abgebildet sind ca. $150.000 \mu\text{m}^2$ Radialparenchym, welches mittels LMPC erfolgreich aus $10 \mu\text{m}$ Dünnschnitten ausgeschnitten und in „adhäsive caps“ katapultiert wurde. Die einzelnen Abschnitte weisen eine Fläche von $10.000\text{-}30.000 \mu\text{m}^2$ auf.

3.6.1 Aufbereitung des dissezierten Materials

Die RNA wurde mithilfe des Qiagen RNeasy Plus[®] Universal Mini Kit aus dem dissezierten Material extrahiert. Die Agarosegelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen erbrachte hier, anders als im Falle von Gesamt-RNA aus Gesamtgewebe (vgl. Kapitel 3.1), keinen Erfolg (nicht gezeigt), was auf die sehr geringe RNA-Konzentration zurückzuführen ist. Eine reverse Transkription in cDNA mithilfe des SuperScript[®] III First-Strand Synthesis System führte ebenfalls zu keinem Erfolg (nicht gezeigt). Aufgrund der sehr geringen RNA-Konzentration der Eluate aus disseziertem Material wurde daher eine Amplifikation der RNA mithilfe des Qiagen QuantiTect Whole Transcriptome Kit durchgeführt. Die RNA wird dabei in cDNA transkribiert, anschließend wird das komplette Transkriptom amplifiziert. Der Hersteller Qiagen empfiehlt, das Amplifikat in darauffolgenden PCR-Versuchen in Verdünnungen einzusetzen. Eine überprüfende Amplifikation der 18S Untereinheit mittels PCR (Primerkombination: *Rp18S.RTfor/Rp18S.RT.rev*) bestätigt die erfolgreiche

Transkriptom-Amplifikation. Abbildung 3-24 zeigt exemplarisch die Geldokumentation der PCR mit Verdünnungen der cDNA, erhalten aus axialem und radialem Parenchym für die Probe 2012.März1. Die dokumentierten Produkte entsprechen der erwarteten Amplikonlänge von etwa 150 bp (vgl. Kapitel 2.11.3). Trotz in etwa gleicher Einsatzmenge an dissektiertem Material (Axialparenchym ca. 700.000 μm^2 ; Radialparenchym ca. 550.000 μm^2 , was in etwa 1000 bis 1500 Zellen entspricht) weisen Axial- und Radialparenchym unterschiedliche RNA-Konzentrationen auf. Eine Amplifikation der cDNA erhalten aus Radialparenchym ist in allen gewählten Verdünnungen (bis 1:300, R1 bis R6 in Abbildung 3-24) möglich. Verdünnungen von cDNA, erhalten aus Axialparenchym, sind in diesem Fall nur bis zu einer Verdünnung von 1:100 (A1, A2 und A6 in Abbildung 3-24) amplifizierbar. Höhere Verdünnungen (A3, A4 und A5) zeigen dagegen nur noch schwache Produktbanden im Gelbild und können daher nicht für die Genexpressionsstudien eingesetzt werden. Dieses Ergebnis war für alle Proben zu beobachten. Mithilfe der Amplifikation des Transkriptoms standen nun cDNA-Templates in genügend hoher Konzentration für die Genexpressionsstudien mittels Real-Time PCR zur Verfügung.

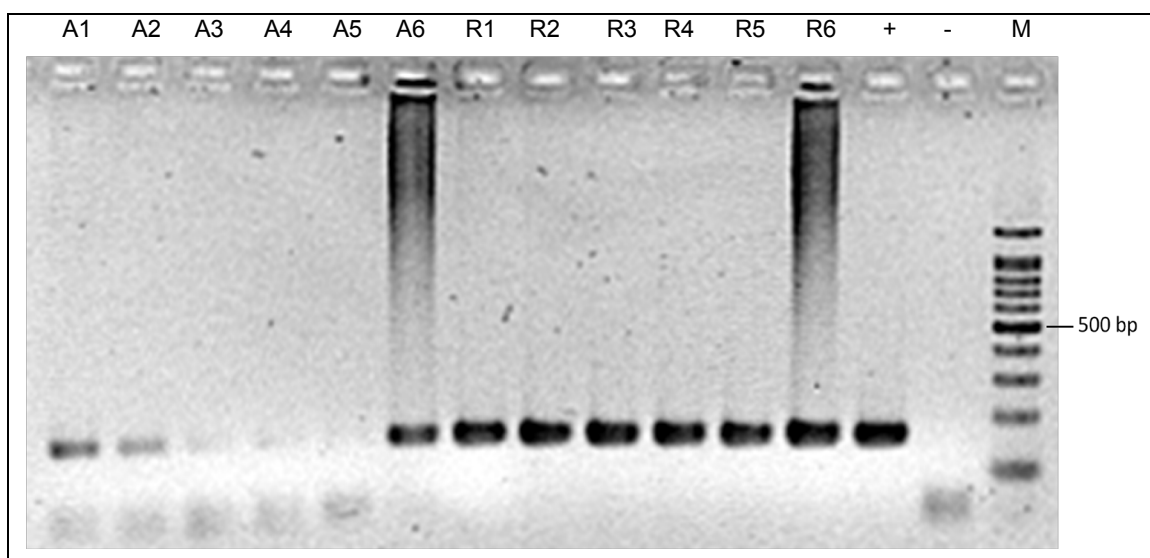


Abbildung 3-24: Überprüfung der Transkriptomamplifikation mittels 18S PCR. Das Gelbild dokumentiert die PCR-Produkte nach Amplifikation mit 18S Primern. Als Template dienten Verdünnungen der durch Transkriptom-Amplifikation erhaltenen cDNA aus Axial- und Radialparenchym. (A) Axialparenchym, (R) Radialparenchym, (1) 1:50; (2) 1:100; (3) 1:200 (4) 1:250, (5) 1:300, (6) unverdünnt, (+) Positivkontrolle, (-) Negativkontrolle, (M) 100 bp Marker. Die Amplifikation von cDNA aus Radialparenchym war in allen gewählten Verdünnungen erfolgreich. Die cDNA aus Axialparenchym ist nur bis zu einer Verdünnung von 1:100 amplifizierbar. Die Amplifikate entsprechen der erwarteten Länge von ca. 150 bp.

3.7 Ergebnisse der Genexpressionsstudien an RNA, erhalten aus Radialparenchym

Nachdem radiale Parenchymzellen der Splint-Kern-Übergangszone mittels Lasermikrodissektion ausgeschnitten und RNA extrahiert, in cDNA transkribiert sowie mithilfe des Qiagen QuantiTect Whole Transcriptome Kit amplifiziert wurde, konnten Genexpressionsstudien anhand von Real-Time PCR-Versuchen durchgeführt werden. Es wurde nur das Probenet des Jahres 2012 untersucht. Die Proben des Jahres 2008 lagen als homogenisiertes Holzmehl vor (alter Laborbestand) und konnten daher nicht der Lasermikrodissektion zugeführt werden. Sämtliche (Einzel-) Werte sowie die C_T -Werte der Versuche finden sich in tabellarischer Form im Anhang.

3.7.1 Relative Expression von *Rp14-3-3Gen1*

Die Amplifikation von *Rp14-3-3Gen1* erfolgte mithilfe der Primerkombination 14-3-3.RT.G1for6/14-3-3.RT.G1rev6.

Abbildung 3-25 zeigt die berechneten relativen Expressionen in der Splint-Kern-Übergangszone der radialen Parenchymzellen in Bezug zum 18S Referenzgen. Dabei wurde für alle Probenzeitpunkte eine messbare Menge an Transkript gefunden. Analog zu den Ergebnissen aus Genexpressionsstudien an RNA aus Gesamtgewebe (vgl. Kapitel 3.5.1.1) wurden die höchsten Transkriptmengen in diesem Gewebe in den Monaten Juli (2,3 %) und September (bis zu 1,2 %) gemessen. Diese Expressionsspeaks stimmen mit dem Zeitpunkt der Kernholzbildung überein. Allerdings finden sich auch hier große Unterschiede zwischen den Individuen. So beträgt die relative Expression im September für das erste Individuum weniger als 0,1 % und für das zweite 1,2 %, was den Mittelwert verfälscht. Für die Monate Juni, Dezember und März ist *Rp14-3-3Gen1* mit deutlich unter 0,5 % nur schwach exprimiert. Die geringe Menge an Transkript zu allen Zeitpunkten in der Splint-Kern-Übergangszone deckt sich mit den Expressionsergebnissen für RNA aus Gesamtgewebe, wobei dort, mit bis zu 5,9 % im Juli, unwesentlich höhere Werte für die relative Expression gemessen wurden. Das Expressionsmuster im Radialparenchym entspricht ansonsten weitgehend dem der RNA aus Gesamtgewebe.

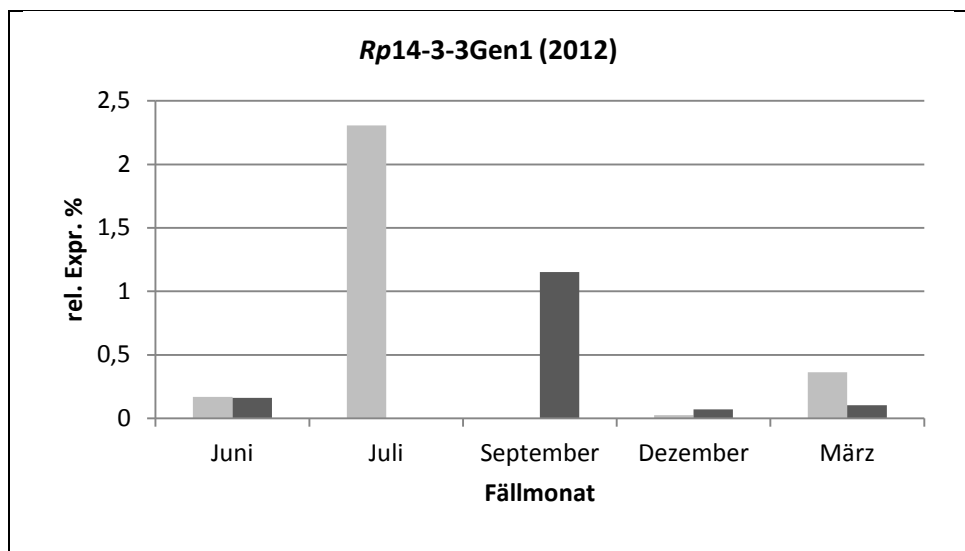


Abbildung 3-25: Relative Expression des *Rp14-3-3Gen1* in den Radialparenchyemen der Splint-Kern-Übergangszone der Proben von 2012 im Jahresverlauf. Die relativen Expressionen sind als prozentuale Anteile in Bezug zur Expression des 18S Referenzgens dargestellt. Die relativen Expressionen der Individuen sind dargestellt. Für den Monat Juli lag nur ein Individuum vor.

3.7.2 Relative Expression von *Rp14-3-3Gen2*

Die Amplifikation des *Rp14-3-3Gen2* erfolgte mithilfe der Primerkombination 14-3-3.RT.G2+3for1/14-3-3.RT.G2rev5.

Abbildung 3-26 zeigt die relative Expression der Individuen im Radialparenchym der Splint-Kern-Übergangszone im Jahresverlauf.

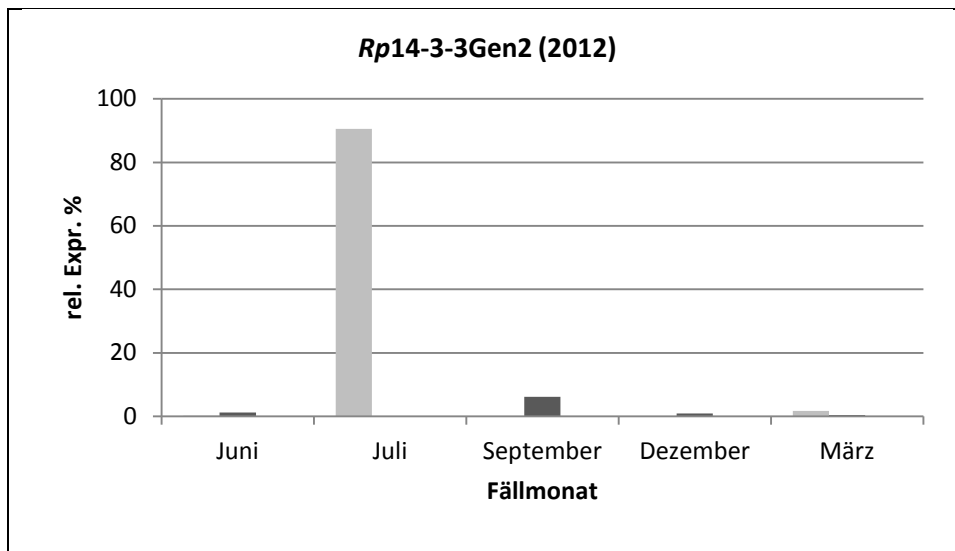


Abbildung 3-26: Relative Expression des *Rp14-3-3Gen2* in den Radialparenchymenten der Splint-Kern-Übergangszone der Proben von 2012 im Jahresverlauf. Die relativen Expressionen sind als prozentuale Anteile in Bezug zur Expression des 18S Referenzgens dargestellt. Die relativen Expressionen der Individuen sind dargestellt. Für den Monat Juli lag nur ein Individuum vor.

Auffällig ist die starke Expression von 90,6 % des Kandidatengens im Individuum mit Fällzeitpunkt Juli. Zu allen anderen Zeitpunkten ist die relative Expression deutlich schwächer. Das zweite Individuum aus dem September 2012 ist noch mit 6,1 % in Bezug zum Referenzgen exprimiert. Analog zu den Untersuchungen für *Rp14-3-3Gen1* weichen auch hier die gemessenen Expressionen der Septemberindividuen stark voneinander ab, das erste Individuum weist dabei eine relative Expression von 0,02 % auf. In den Radialparenchymenten aller anderen Proben wurden für *Rp14-3-3Gen2* Expressionen unter 2 % gemessen. Wie bereits für *Rp14-3-3Gen1* festgestellt, ist auch hier ein Expressionspeak im Sommer und Frühherbst zu konstatieren. Allerdings ist das Niveau der Peaks für *Rp14-3-3Gen2* in diesen Monaten, mit 90,6 bzw. 6,1% gegenüber *Rp14-3-3Gen1* (2,3 bzw. 1,2 %) deutlich höher. Das Expressionsmuster korreliert mit den Ergebnissen der Untersuchungen an RNA aus Gesamtgewebe (vgl. Kapitel 3.5.1.2).

3.7.3 Relative Expression von *Rp14-3-3Gen3*

Die Amplifikation von *Rp14-3-3Gen3*, in der Real-Time PCR erfolgte mithilfe der Primerkombination 14-3-3.RT.G2+3for1/14-3-3.RT.G3rev1. Die aus den C_T -Werten berechneten relativen Expressionen zeigt Abbildung 3-27. Ähnlich wie für *Rp14-3-3Gen1* ist das Niveau der Expression im Jahresverlauf sehr niedrig.

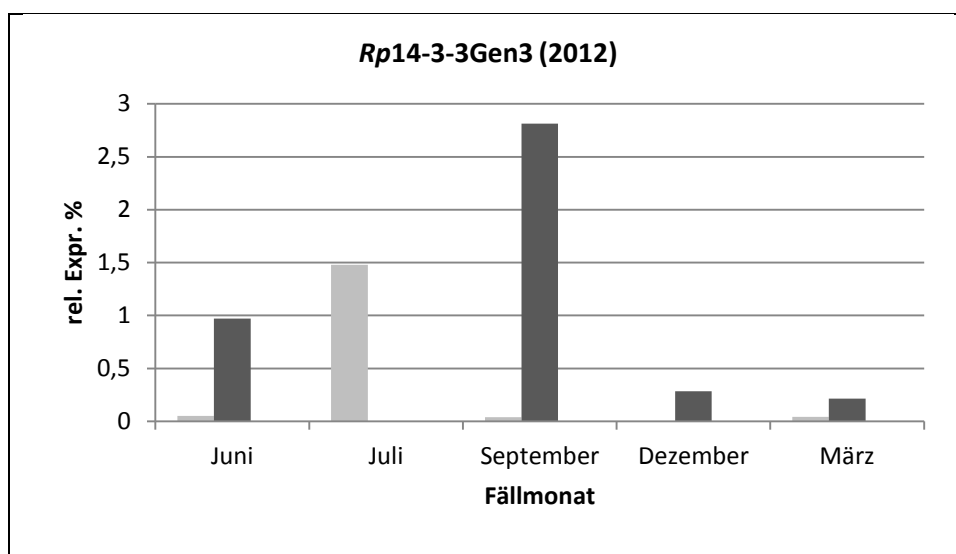


Abbildung 3-27: Relative Expression des *Rp14-3-3Gen3* in den Radialparenchymen der Splint-Kern-Übergangszonen der Proben von 2012 im Jahresverlauf. Die relativen Expressionen sind als prozentuale Anteile in Bezug zur Expression des 18S Referenzgens dargestellt. Die relativen Expressionen der Individuen sind dargestellt. Für den Monat Juli lag nur ein Individuum vor.

Wie schon die beiden anderen identifizierten Gene der 14-3-3 Familie, weist auch *Rp14-3-3Gen3* höhere Expressionen in den Sommer- und Herbstmonaten gegenüber den Wintermonaten auf. Im Gegensatz zu diesen weist das Gen mit 2,8 % die höchste Expression im zweiten Individuum des Septembers auf. Es folgen Juli (1,5 %) und Juni (1 % für das erste Individuum). Im Dezember und März wurden, mit 0,002 bis 0,3 %, nur sehr geringe Mengen an Transkript nachgewiesen. Auffällig ist die Hochregulierung im Juni gegenüber dem Dezember und März, dieses Muster wurde für *Rp14-3-3Gen1* und *Rp14-3-3Gen2* nicht festgestellt. Wie bei allen Untersuchungen sind auch hier die hohen Abweichungen der Expression der zwei Individuen eines Zeitpunkts auffällig. Besonders im Juni und September treten große Unterschiede auf, wobei jeweils ein Individuum eine Expression nahe null aufweist.

3.7.4 Relative Expression von *RpHS70*

Mithilfe der Primerkombination HS70.RT8for/HS70.RT8rev wurde ein Fragment des HS70 Gens amplifiziert.

Abbildung 3-28 zeigt die berechnete relative Expression des Gens in der Splint-Kern-Übergangszonen im Jahresverlauf. Das Expressionsmuster entspricht dabei den Ergebnissen aus Versuchen mit RNA aus Gesamtgewebe (vgl. Kapitel 3.5.2). Auch für das Radialparenchym findet sich eine Hochregulierung von *RpHS70* im Juli (41,5 %).

Der errechnete Wert ist etwas niedriger als der für die Expression der Versuche an RNA aus Gesamtgewebe, der 57,7 % beträgt. Zu allen anderen Zeitpunkten ist auch im Radialparenchym die Transkriptmenge deutlich geringer. Im September wird für das zweite Individuum ein Wert von 6,2 % erreicht. Im Juni beträgt die relative Expression beider Individuen ca. 2,7 %. Im Dezember sinkt sie weiter auf 0,5 %, bis sie im März mit 0,04 % gerade noch messbar ist.

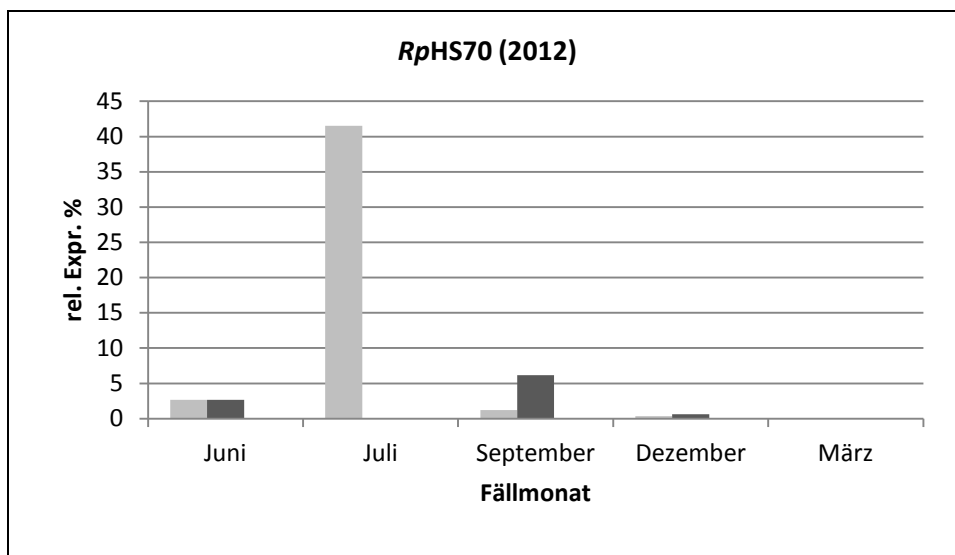


Abbildung 3-28: Relative Expression des *RpHS70* Gens in den Radialparenchymenten der Splint-Kern-Übergangszone der Proben von 2012 im Jahresverlauf. Die relativen Expressionen sind als prozentuale Anteile in Bezug zur Expression des 18S Referenzgens dargestellt. Die relativen Expressionen der Individuen sind dargestellt. Für den Monat Juli lag nur ein Individuum vor.

3.7.5 Relative Expression von *RpCHS3*

Das für Chalkonsynthese codierende Gen *RpCHS3* wurde mithilfe der Primerkombination *RpCHS3for/RpCHS3rev* und Real-Time PCR amplifiziert. Die daraus berechneten Expressionswerte in Relation zum 18S Referenzgen zeigt Abbildung 3-29.

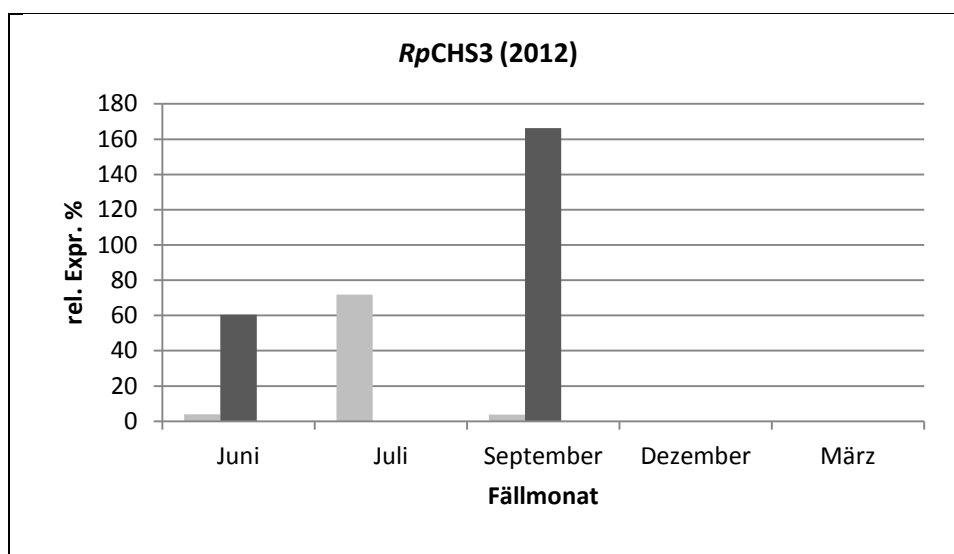


Abbildung 3-29: Relative Expression des *RpCHS3* Gens in den Radialparenchymenten der Splint-Kern-Übergangszone der Proben von 2012 im Jahresverlauf. Die relativen Expressionen sind als prozentuale Anteile in Bezug zur Expression des 18S Referenzgens dargestellt. Die relativen Expressionen der Individuen sind dargestellt. Für den Monat Juli lag nur ein Individuum vor.

Als Markergen der Kernholzbildung zeigt *RpCHS3* ein seasonspezifisches Expressionsmuster. Zum Zeitpunkt der Kernholzbildung im Sommer und Herbst ist eine deutliche Hochregulierung erkennbar, während im Dezember und März kein Transkript detektiert werden konnte. Dieses Muster ist in Übereinstimmung mit den Genexpressionsstudien an RNA aus Gesamtgewebe (vgl. Kapitel 3.5.3). Auch im Radialparenchym findet sich die stärkste Expression im September (bei Individuum zwei). Diese ist mit 166 %, gegenüber 110,2 % für RNA aus Gesamtgewebe deutlich erhöht. Im Juli (71,9 %) und Juni (60,5 % für 2012_Jun2) wurde im Radialparenchym weniger Transkript als während der Versuche an RNA aus Gesamtgewebe detektiert (99 bzw. 80,1 %). Auch im radialen Parenchymgewebe finden sich die individuellen Expressionsunterschiede eines Probenzeitpunktes wieder. So ist sowohl im Juni, als auch im September jeweils ein Individuum sehr stark hochreguliert, während das zweite einen Expressionswert unter 5 % aufweist.

3.7.6 Relative Expression von *RpPAL1*

Mithilfe der Primerkombination *RpPAL1for/RpPAL1rev* erfolgte die Amplifikation des Markergens. Die Expressionswerte sind in Abbildung 3-30 wiedergegeben. Das Genexpressionsmuster entspricht dabei dem der Untersuchungen an RNA aus Gesamtgewebe. Dabei ist auch hier ein seasonspezifisches Muster mit

Expressionspeaks in den Sommermonaten sowie im Frühherbst erkennbar. Das Expressionsniveau liegt dabei im Radialparenchym etwas niedriger. So wurden in den Studien an RNA aus Gesamtgewebe maximale Expressionen von 37 % im Juni, 18,8 % im Juli und 27,9 % im September errechnet. Im Radialparenchym dagegen betragen die Werte für diese Monate 16,7 %, 14,8 % und 27,9 %. Trotzdem ergibt sich auch hier die seasonspezifische Hochregulierung des *RpPAL1* Gens im Sommer und Frühherbst. In den Monaten Dezember und März dagegen konnte kein Transkript des Markergens nachgewiesen werden. Die Unterschiede zwischen den zwei Individuen eines Probenzeitpunkts treten hier vor allem im September auf. Während 2012_Sep2 mit 16,8 % die höchste Expression aller untersuchten Proben aufweist, ist die relative Transkriptmenge in 2012_Sep1 mit 0,18 % gerade noch detektierbar.

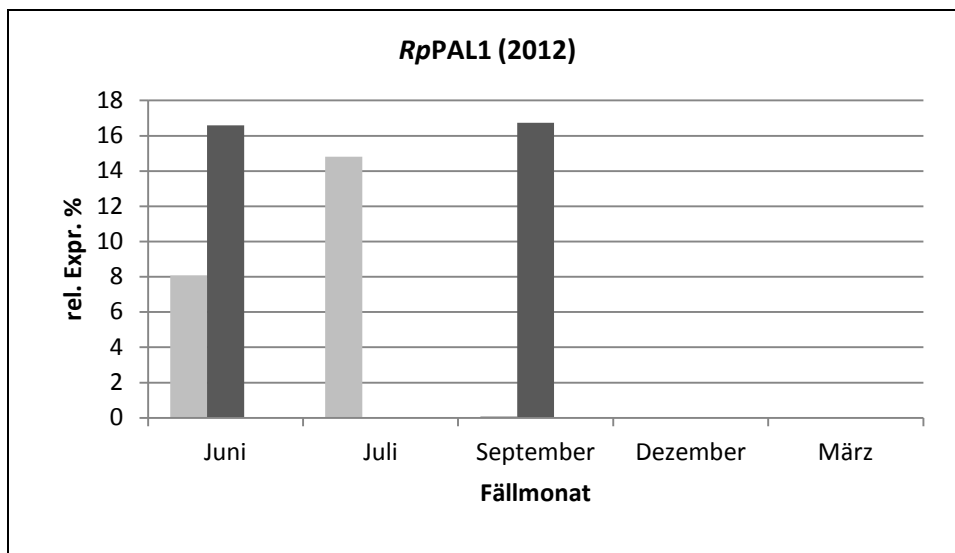
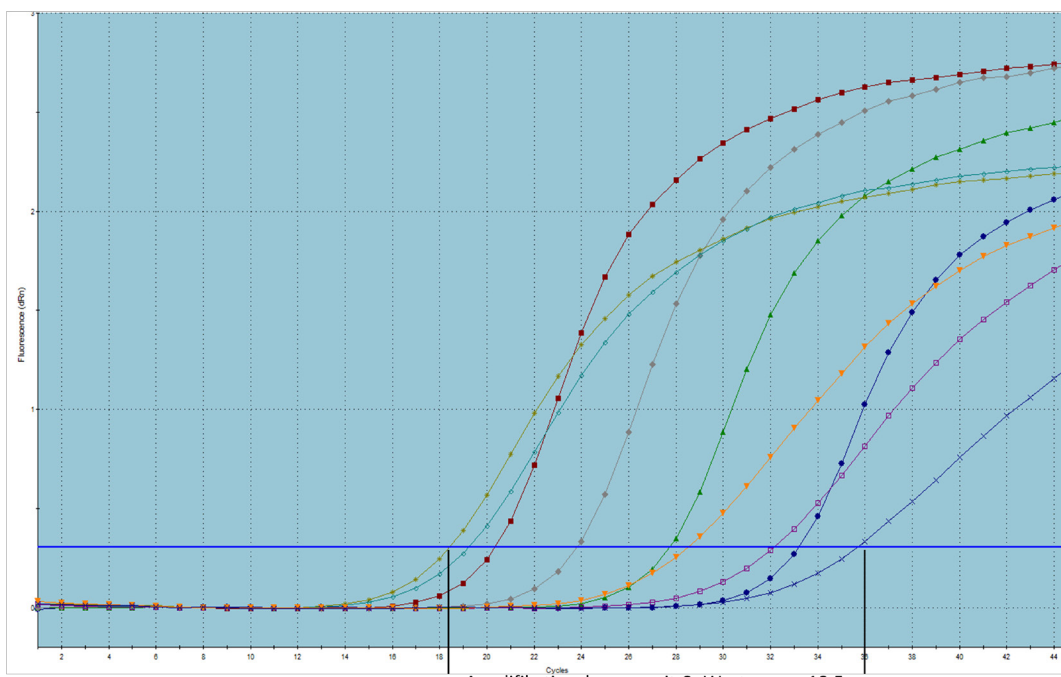
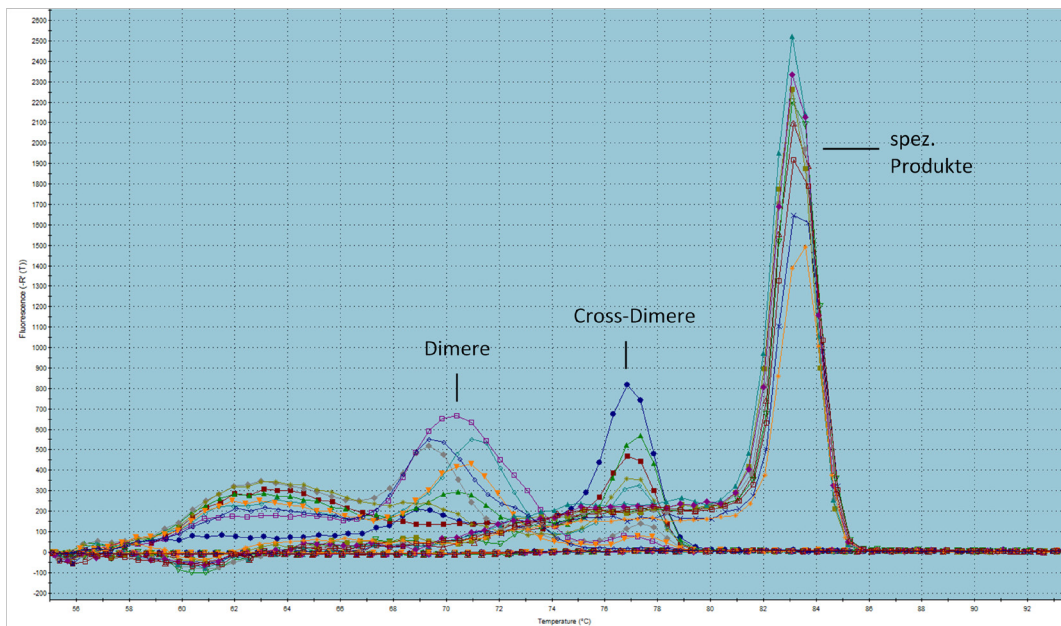


Abbildung 3-30: Relative Expression des *RpPAL1* Gens in den Radialparenchymenten der Splint-Kern-Übergangszonen der Proben von 2012 im Jahresverlauf. Die relativen Expressionen sind als prozentuale Anteile in Bezug zur Expression des 18S Referenzgens dargestellt. Die relativen Expressionen der Individuen sind dargestellt. Für den Monat Juli lag nur ein Individuum vor.

3.8 Ergebnisse der Genexpressionsstudien an RNA, erhalten aus Axialparenchym

Keines der untersuchten Gene (*Rp14-3-3*, *RpHS70*, *RpCHS3*, *RpPAL1*) weist eine messbare Expression im Axialparenchym auf. Wie in Kapitel 3.6.1 dargelegt, steht dies nicht in Zusammenhang mit zu geringem Ausgangsmaterial, qualitativ unzureichender RNA oder fehlerhafter Transkription zu cDNA. Wie Abbildung 3-24 in

dem genannten Kapitel zeigt, ist eine Amplifikation der 18S Untereinheit mittels PCR möglich. Dies beweist, dass funktionierende cDNA aus dem Ausgangsmaterial erarbeitet werden konnte. Die Amplifikationskurven in einer darauffolgenden Real-Time PCR bestätigen dieses Ergebnis. Abbildung 3-31 zeigt beispielhaft die Amplifikationskurven sowie die aufgenommenen Schmelzkurven aller neun Proben des Jahres 2012 der Untersuchung von *RpCHS3*. Die Dissoziationskurvenkurven zeigen für 18S spezifische Peaks bei etwa 83 °C, dem Schmelzpunkt des Fragments, während die Kurven für *RpCHS3* Peaks bei ca. 70 und 77 °C aufweisen, was auf Primer-Dimere bzw. Cross-Dimere hinweist. Diese Versuche belegen, dass *Rp14-3-3*, *RpHS70*, *RpCHS3* und *RpPAL1* in den axialen Parenchymen der in dieser Arbeit untersuchten Robinienquerschnitte nicht exprimiert sind, bzw. die Expression sehr niedrig und unterhalb der Bestimmungsgrenze des verwendeten Real-Time PCR-Assays liegt. Mögliche Gründe für die fehlende Expression der untersuchten Gene im Axialparenchym sollen in Kapitel 4 diskutiert werden.



Amplifikationskurven mit C_T Werten von 18,5 bis 36

Abbildung 3-31 Dissoziations- und Amplifikationskurven der Genexpressionsstudie an *RpCHS3* aus Axialparenchym der Proben des Jahres 2012. Die Dissoziationskurven (oben) zeigen die spezifische Produktbildung des 18S Amplifikats mit der Schmelztemperatur von ca. 83 °C, während die Amplifikation von *RpCHS3* zu Dimer- bzw. Cross-Dimerbildung führte (ca. 70 bzw. 77 °C). Die Amplifikationskurven (unten) weisen C_T -Werte von 18,5 bis 36 für das 18S Genfragment auf.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Beitrag axialer und radialer Parenchyme zur obligaten Kernholzbildung in *Robinia pseudoacacia* L. zu untersuchen. Dabei wurden zunächst die Kandidatengene heat shock (HS70) und 14-3-3 molekulargenetisch identifiziert und im Weiteren, mittels Genexpressionsstudien, der Zusammenhang mit der Kernholzbildung beleuchtet. Zum Vergleich wurden Genexpressionsstudien an *Rp*CHS3 (Chalkonsynthase) und *Rp*PAL1 (Phenylalanin-Ammonium-Lyase), den Markergenen der Kernholzbildung, durchgeführt.

Da der unterschiedliche Einfluss von axialem und radialem Parenchym auf die Kernholzbildung bisher weitgehend unbekannt ist, wurde mithilfe der Lasermikrodissektion eine Methode entwickelt, die es erlaubt, RNA aus den verschiedenen Parenchymgeweben getrennt voneinander aufzuarbeiten und mittels Genexpressionsstudien zu untersuchen. Dies ermöglicht einen vertieften Einblick in die molekularen und zellularen Grundlagen der Kernholzbildung der Robinie. Im Folgenden werden die erbrachten Ergebnisse der Untersuchungen anhand aktueller Studien und Veröffentlichungen diskutiert.

4.1 Extraktion, Aufarbeitung und Qualität der Gesamt-RNA aus Gesamtgewebe

Die Extraktion von Gesamt-RNA aus Gesamtgewebe erfolgte mit dem Qiagen RNeasy® Plant Mini Kit. Es war für alle Proben und alle Gewebe möglich, qualitativ gute RNA zu isolieren (vgl. Kapitel 3.1). Die Abnahme der RNA-Menge (dokumentiert als abnehmende Bandenintensität im Gelbild, Abbildung 3-1) in radialer Richtung zur Splint-Kern-Übergangszone ist mit der sinkenden Vitalität der Zellen zu erklären. Die Phloem- und Splintgewebe bilden den physiologisch aktiven Teil des Stammes. Im alternden Splintholz beginnt das Absterben der Parenchymzellen durch programmierten Zelltod. In der Splint-Kern-Übergangszone finden sich daher nur noch wenige vitale Zellen. Das Kernholz weist schließlich keine physiologische Aktivität mehr auf (Hillis 1987; Taylor et al. 2002). Ein weiterer Beweis für die fortschreitende Desintegration der Zellen in Richtung der Übergangszone ist die Quantität von Phospholipiden, welche einen Parameter für die Integrität von Parenchymzellen darstellt. Mithilfe chromatographischer Methoden konnten Hillinger und Mitarbeiter

(1996) eine quantitative Abnahme der Phospholipide in Richtung der Splint-Kern-Übergangszone nachweisen, im Kernholz finden sich nur noch Spuren dieser. In letzteren Geweben akkumulieren Flavonoide, was Schwierigkeiten bei der reversen Transkription von RNA in cDNA bzw. bei der Amplifikation mit sich bringen kann. Die erschwerte Anwendung molekularbiologischer Methoden und Extraktion von Nucleinsäuren im alternden Splint ist in zahlreichen Veröffentlichungen beschrieben (Fukazawa und Higuchi 1966; De Filippis und Magel 1998; Magel 2002; Rachmayanti et al. 2009; Abe et al. 2011). Trotz dieser methodischen Schwierigkeiten gelang es in der vorliegenden Arbeit, mit den gewählten Methoden auch aus den ältesten Splintbereichen und der Splint-Kern-Übergangszone intakte RNA zu isolieren, wie die distinkten Bandenmuster (18S und 26S Bande sind deutlich erkennbar) in Abbildung 3-1 zeigen. Auch die reverse Transkription sowie die anschließende Amplifikation eines Fragments der 18S Untereinheit als Kontrolle (Abbildung 3-2) gelang für alle Proben.

4.2 Identifizierung der Kandidatengene

Um Genexpressionsstudien an HS70 und 14-3-3 durchführen zu können, müssen die Gensequenzen oder Teile davon bekannt sein. Daher galt es zunächst, die Kandidatengene mittels molekularbiologischer Methoden, wie PCR und Sequenzierung, zu identifizieren.

Da zu Beginn dieser Untersuchungen weder für 14-3-3 noch für das HS70 Gen Sequenzen für *Robinia pseudoacacia* bekannt waren, wurden zunächst Gensequenzen aus nah verwandten Arten aus der Familie der Fabaceae in ein multiples Sequenzalignment überführt. Anhand dieser Sequenzen wurden degenerierte Primer erstellt, mit deren Hilfe entsprechende (noch unbekannt) Genabschnitte der beiden Kandidatengene amplifiziert und anschließend sequenziert wurden (vgl. Kapitel 3.2.1 und 3.2.2). Degenerierte Primer stellen ein Gemisch verschiedener Primer dar. Der Grad der Degenerierung, also die Anzahl verschiedener Primer im Gemisch, kann durch Multiplikation der Anzahl der möglichen Basen an jeder Position berechnet werden (Kwon et al. 2001). Mit zunehmender Degenerierung nimmt die Konzentration einzelner Primer-Individuen im Gemisch ab, was dazu führen kann, dass schwach exprimierte Transkripte im Template nicht amplifiziert werden, da alle Primer an stärker exprimierte Transkripte binden. Dies kann dazu führen, dass einzelne Mitglieder von Genfamilien nicht identifiziert werden,

da sie durch stärker exprimierte Mitglieder „verdeckt“ werden. Sambrook und Russel (2001) geben den maximalen Grad der Degenerierung, bei dem auch seltene Transkripte amplifizierbar sind, mit 60 an. Die in dieser Arbeit verwendeten degenerierten Primer weisen eine Degenerierung von maximal 48 auf. Es ist also davon auszugehen, dass auch seltene Transkripte amplifiziert wurden.

Auf diese Weise konnte ein 1767 bp langes HS70 Genfragment, bzw. ein 500 bp langes 14-3-3 Genfragment, erarbeitet werden.

Die PCR mit degenerierten Primern diene zudem ausschließlich der näherungsweise Bestimmung einer Gensequenz der Kandidatengene. Die Klonierung zur Identifikation der einzelnen Mitglieder der Genfamilien wurde nicht mit Amplifikaten, welche mithilfe degenerierter Primer erhalten wurden, durchgeführt. Stattdessen wurden genspezifische Primer entwickelt (Kapitel 3.2.3), die keine Degenerierung aufweisen. So konnte das Problem der maximalen Degenerierung und dem damit einhergehenden Verlust schwach exprimierter Mitglieder einer Genfamilie umgangen werden. Für die genspezifischen Primer wurden Sequenzabschnitte gewählt, an denen die Sequenz, erhalten aus der Amplifikation mit degenerierten Primer, keine Doppelpeaks im Chromatogramm aufweist. Ein doppeltes Signal weist auf zwei verschiedene Basen an einer Position während der Sequenzierung hin. Dies bedeutet entweder, dass zwei Gene einer Genfamilie im Gemisch vorliegen oder eine unspezifische Anlagerung der Primer vorlag. Da die genspezifischen Primer keine Degenerierung aufweisen sollten und alle Mitglieder einer Genfamilie amplifiziert werden sollten, kamen diese Sequenzabschnitte für Primer nicht in Betracht.

Mithilfe der genspezifischen Primer konnte ein 1767 bp langes HS70 Genfragment erarbeitet werden (vgl. Kapitel 3.2.4). Die Homologie von 92 % zu einem HS70 Gen von *Glycine max*, einer weiteren Art aus der Familie der Fabaceae, belegt die berichtete hohe Konservierung des Gens (Lindquist und Craig 1988; Ellis und van der Vies 1991; Gething und Sambrook 1992; Wu et al. 1994; Wisniewski et al. 1996).

Für das 14-3-3 Gen wurde ein 478 bp langer Genabschnitt erarbeitet. Auch die 14-3-3 Genfamilie wird als hochkonserviert beschrieben (Muslin et al. 1996), was die berechnete Homologie des erarbeiteten Genfragments von 89 % zu *Glycine max* bestätigt.

4.3 Klonierung und Einteilung der Gene innerhalb der Genfamilien

Um festzustellen, ob es sich bei den amplifizierten HS70 und 14-3-3 Genfragmenten jeweils um ein einzelnes Gen oder mehrere Mitglieder einer Genfamilie handelt, wurde eine Klonierung durchgeführt. Nach erfolgreicher M13 PCR wurden zwölf Klone des *Rp14-3-3* bzw. 15 Klone des *RpHS70* Genfragments sequenziert (vgl. Kapitel 3.3).

4.3.1 Klonierung des 14-3-3 Genfragments

Anhand der Klonsequenzen können für die *Rp14-3-3* Genfamilie drei verschiedene Mitglieder unterschieden werden (vgl. Kapitel 3.3). In anderen Pflanzenarten ist die Genfamilie zum Teil deutlich größer. So wurden für *Arabidopsis* (DeLille et al. 2001; Rosenquist et al. 2001) 15 Gene identifiziert. In der Fabaceae *Glycine max* können sogar 18 verschiedene Mitglieder unterschieden werden (Li und Dhaubhadel 2011). Andererseits wurden auch kleinere Genfamilien nachgewiesen. So beschreiben Piotrowski und Oecking (1998) sechs Isoformen für *Nicotiana tabacum* (Fabaceae). Studien an Bäumen ergaben vier 14-3-3 Gene in *Eukalyptus* (Furtado et al. 2007) und sechs im Genom der Pappel (Lapointe et al. 2001).

Die in dieser Arbeit unterschiedenen Isoformen *Rp14-3-3Gen1* und *Rp14-3-3Gen2* weisen Homologien von 84,7 bis 85,4 % in ihrer Nukleotidsequenz auf, was den Homologien der genannten sechs 14-3-3 Pappel Isoformen ungefähr entspricht (62 bis 90 %). Das *Rp14-3-3Gen3* unterscheidet sich nur aufgrund der zusätzlichen Aminosäure Serin von *Rp14-3-3Gen2*. Durch Berechnungen mithilfe des p-Distanzen Modells, bei dem nur Substitutionen, aber keine Indel berücksichtigt werden (Knoop und Müller 2009), ergeben sich Homologien von 99,8 bis 100 % zwischen den beiden Isoformen. Bei ausschließlicher Betrachtung der Sequenzhomologie läge es daher nahe, keine Separierung vorzunehmen. Da es sich hier nicht um einen konservativen Austausch, sondern um eine zusätzliche Codierung für eine Aminosäure handelt und ein Fehler in der Sequenzierung unwahrscheinlich ist, wird *Rp14-3-3Gen3* dennoch als eigene Isoform betrachtet. Die Genexpressionsstudien in dieser Arbeit untermauern diese Einteilung. Die beiden Gene zeigen zwar ähnliche Expressionsmuster, unterscheiden sich aber quantitativ deutlich (vgl. Kapitel 3.5.1). Die hohen Homologien zwischen den identifizierten 14-3-3 Isoformen sind auch auf die Tatsache zurückzuführen, dass Genfragmente und nicht das gesamte Gen

betrachtet wurden. *Rp14-3-3Gen1-3* weisen Längen von 143 bzw. 144 Aminosäuren auf. Das vollständige Gen in *Glycine max* beinhaltet 250 bis 260 Aminosäuren (Li und Dhaubhadel 2011), das *Nicotiana tabacum* Gen 251 (Chen et al. 1994). Bezogen auf diese Werte, wurden daher nur maximal 57 % des Gens identifiziert.

Die Aminosäuresequenzen der *Rp14-3-3* Isoformen weisen zudem weder Methionin auf, noch findet sich bei ihnen ein Stopp-Codon. Die Proteinbiosynthese startet am C-Terminus immer mit Methionin als erster Aminosäure und endet am Stopp-Codon des N-Terminus. Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei den analysierten 14-3-3 Genfragmenten größtenteils um die Codierung des „core“ Teils handelt. Ferl und Mitarbeiter (1999) beschreiben diesen für *Arabidopsis* als den Abschnitt mit der stärksten Konservierung, wobei sich die verschiedenen Isoformen in 51 % der Aminosäuren gleichen. Die N- und C-Termini sind dagegen deutlich variabler und weisen mit 14 % bzw. 0 % sehr geringe Homologien auf. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Termini teilweise spezielle, bisher unerforschte Proteinfunktionen ausführen. Der konservierte „core“ Teil ist für die Proteinbindungsaktivität verantwortlich, daher besitzen alle 14-3-3 Proteine die Fähigkeit, an Targetproteine zu binden (Aducci et al. 2002). Obwohl in dieser Arbeit nur ein Fragment des 14-3-3 Gens in der Robinie analysiert wurde, konnten die drei verschiedenen Isoformen problemlos differenziert werden. Die Unterschiede von bis zu 15,3 % in der Nukleotidsequenz, bzw. eines kompletten Codons, lassen darauf schließen, dass der „core“ Bereich variabel genug ist, um die verschiedenen Mitglieder der Genfamilie zu identifizieren. Es ist daher anzunehmen, dass auch seltene Transkripte erkannt wurden. Der Datenbankabgleich der Isoformen *Rp14-3-3Gen2* und *Gen3* mittels des BLASTn Algorithmus ergab die höchste Übereinstimmung mit der *Glycine max* 14-3-3 Isoform *SGF14h* (Li und Dhaubhadel 2011). Die Autoren wiesen in weiteren Studien (Li et al. 2012) eine Interaktion dieses Proteins mit dem Transkriptionsfaktor GmMYB176 nach, der die Genexpression einer CHS Isoform und damit die Isoflavonoidbiosynthese reguliert (Yi et al. 2010).

4.3.2 Klonierung des HS70 Genfragments

Die Familie der heat shock 70 Gene wird in der Literatur als evolutionär stark konservativ beschrieben (Lindquist und Craig 1988; Ellis und van der Vies 1991; Gething und Sambrook 1992; Wisniewski et al. 1996). Die Homologie der Nukleotidsequenz zwischen verschiedenen Pflanzen geben Wu et al. mit 80-92 % an. Die Sequenzen der *RpHS70* Klone weisen eine Übereinstimmung von 92 % zu *Cicer*

arietinum (Familie: Fabaceae) auf. Auch zu Mitgliedern anderer Pflanzenfamilien ergeben sich hohe Übereinstimmungen, beispielsweise 82 % gegenüber der Pappel (Familie: Salicaceae). Die hohe Konservierung des Gens kann in der vorliegenden Arbeit daher bestätigt werden. Heat shock 70 Proteine werden in Pflanzen zumeist durch Multigenfamilien codiert. So finden sich in *Vigna radiata* fünf Isoformen (Chen et al. 2004) und 14 in *Arabidopsis* (Sung et al. 2001b). Die 15 Klone in dieser Arbeit weisen dagegen eine Homologie von 96,6 bis 100 % in ihrer Aminosäuresequenz auf, wobei sämtliche Unterschiede konservativer Art sind. Die Homologien der Isoformen in *Arabidopsis* werden mit 81 bis 88 % beschrieben. Es ist daher davon auszugehen, dass es sich bei den erarbeiteten Klonen um ein einzelnes Gen und nicht um mehrere Mitglieder einer Genfamilie handelt, auch wenn nur ein Genfragment analysiert wurde (die Aminosäuresequenz beinhaltet keine Start- und Stopp-Codons). Es besteht einerseits die Möglichkeit, dass HS70 in der Robinie nicht als Multigenfamilie organisiert ist. Für *Citrullus vulgaris* wurde beispielsweise von einem einzelnen codierenden Gen für heat shock Proteine berichtet (Wimmer et al. 1997). Eine zweite Möglichkeit besteht darin, dass bereits die PCR mit degenerierten Primern (vgl. Kapitel 3.2.2) nur ein Mitglied der Genfamilie amplifizierte. Dies erscheint aufgrund des Einsatzes mehrerer degenerierter Primerpaare mit einem Degenerierungsfaktor von bis zu 48 sowie der Amplifikation mit niedriger Annealing-Temperatur (50 °C) sehr unwahrscheinlich. Um etwaige weitere HS70 Isoformen in der Robinie zu identifizieren, müssten die untranslatierten 3' Regionen des Gens amplifiziert und sequenziert werden. Auf diese Untersuchungen wurde verzichtet, da in dieser Arbeit allein der Bezug des HS70 Gens zur Kernholzbildung von Interesse war.

4.4 Real-Time PCR-basierte Genexpressionsstudien

Die Genexpressionsstudien dieser Arbeit wurden mittels Real-Time PCR durchgeführt. Diese Methode zur Quantifizierung von mRNA in verschiedensten Geweben hat sich in den letzten Jahren zur am weitesten verbreiteten Methode entwickelt. Die wichtigsten Vorteile sind die dynamische Reichweite, die Sensitivität und die Sequenzspezifität der Methode (Jozefczuk und Adjaye 2011). So ist es aufgrund der Sensitivität möglich, auch sehr schwach exprimierte Gene zu detektieren. Die hohe Sequenzspezifität erlaubt es, einzelne Genfamilienmitglieder mit hoher Sequenzhomologie differenziert zu analysieren. Beide genannten Punkte sind in dieser Arbeit von großer Bedeutung. Wie sich herausstellte, sind die untersuchten

Kandidatengene *Rp14-3-3* und *RpHS70* zu vielen Probenzeitpunkten gerade in der Splint-Kern-Übergangszone nur sehr schwach exprimiert (vgl. Kapitel 3.5.1 und 3.5.2). Trotzdem konnten aufgrund der hohen Sensitivität des Real-Time PCR-Assays auch Spuren von Transkript detektiert werden. Die Werte der relativen Expression lagen dabei teilweise deutlich unter 0,1 %. Aufgrund der hohen Sequenzkonservierung der 14-3-3 Genfamilie spielt auch die Sequenzspezifität eine wichtige Rolle. So unterscheiden sich *Rp14-3-3Gen2* und *Rp14-3-3Gen3* in ihrer Nukleotidsequenz nur um ein Basentriplett (vgl. Kapitel 3.3). Während der Genexpressionsstudien konnten beide Mitglieder trotzdem differenziert analysiert werden.

Grundlage für ein spezifisches Real-Time PCR- (qPCR) Assay sind spezifische Primer. Hier sind hohe Anforderungen beim Erstellen der Primer zu beachten, da bei der Fluoreszenzmessung nicht zwischen spezifischem Produkt und Fehlanlagerung oder Primer-Dimer unterschieden werden kann. Eine hohe Spezifität soll durch folgende Vorgaben gewährleistet werden (SABiosciences 2008):

- kurzes Amplikon (50-210 bp)
- Länge der Primer zwischen 19 und 23 bp
- hohe Schmelztemperatur der Primer (60-68 °C)
- möglichst geringer Hang zur Bildung von Sekundärstrukturen.

Mithilfe des Programmes Primer Premier 5 (Lalitha 2000) wurde versucht, Primer zu erstellen, die diesen Anforderungen genügen (vgl. Kapitel 3.4). Alle erarbeiteten Primer weisen Längen zwischen 19 und 23 bp auf. Die Schmelztemperaturen betragen 59,8 bis 64,4 °C. In diesen Punkten entsprechen die Oligonukleotide den Vorgaben von SABiosciences. Die hohen Schmelztemperaturen ermöglichen dabei die verwendete Annealing-Temperatur von 60 °C während der Amplifikation, was zu einer spezifischen Anlagerung führt. In Bezug auf Amplikonlänge und Bildung von Sekundärstrukturen erfüllen die verwendeten Primer nicht die Anforderungen. Für die Kandidatengene wurde eine Vielzahl von forward und reverse Primern erstellt und in verschiedenen Kombinationen getestet: für das *RpHS70* Gen acht forward und acht reverse Primer, für *Rp14-3-3Gen1* sechs forward und sechs reverse Primer, für *Rp14-3-3Gen2* ein forward und ein reverse Primer, für *Rp14-3-3Gen3* vier forward und sechs reverse Primer (Daten nicht gezeigt). Die Sequenzspezifität wurde mittels PCR und anschließender Sequenzierung überprüft. Mithilfe der während der Real-Time PCR aufgenommenen Schmelzkurven wurde die Produktspezifität der Amplifikation mit den verschiedenen Primerkombinationen analysiert, dies stellt eine Validierung der Primer in Anlehnung an Jozefczuk und Adjaye (2011) dar. Hierbei stellte sich heraus, dass die mittels Primer Premier 5 errechneten Werte zum Hang zur Bildung von

Sekundärstrukturen nur eine sehr bedingte Voraussage auf die Produktspezifität erlauben. So wurden Primerkombinationen eingesetzt, die keinerlei Hang zur Bildung von Sekundärstrukturen aufweisen (Hang zur Bildung von Dimeren, Hairpins, Cross-Dimeren jeweils $\Delta G = 0$ kcal/mol). Trotzdem zeigte die Schmelzkurvenanalyse, dass die Produktbildung unspezifisch verlief. Umgekehrt weist beispielsweise der Primer *Rp14-3-3G2rev5* einen Hang zur Dimer- ($\Delta G = -6,1$ kcal/mol) und Hairpinbildung ($\Delta G = -2$ kcal/mol) auf. Eine spezifische Amplifikation war hier jedoch, wie bei allen letztendlich verwendeten Primern und Primerkombinationen, möglich. Ein weiteres Problem beim Erarbeiten von Oligonukleotiden stellte die hohe Sequenzhomologie der *Rp14-3-3* Genfamilienmitgliedern dar. Die Mitglieder *Rp14-3-3Gen2* und *Rp14-3-3Gen3* unterscheiden sich nur um ein Basentriplett am Ende des Genfragments, welches *Rp14-3-3Gen3* zusätzlich hat. Daher musste der reverse Primer zwangsläufig an diesem Sequenzabschnitt angreifen, um eine getrennte Analyse zu ermöglichen. Die empfohlene Amplikonlänge für qPCR-Assays von bis zu 210 bp konnte daher nicht eingehalten werden. Nach Sequenzierung und Schmelzkurvenanalyse der Produkte konnte festgestellt werden, dass die Amplikonlänge von 267 bp trotzdem eine spezifische Amplifikation erlaubt.

Wie bereits beschreiben, stellt die Real-Time PCR ein sehr sensitives System dar. Diese Sensitivität birgt auch eine Anfälligkeit für Kontaminationen. Daher wurden die Versuche in einem eigens für Real-Time PCR und Lasermikrodissektion eingerichteten Labor durchgeführt. In diesem fanden keine weiteren PCR-basierten Versuche statt, sodass die Gefahr einer Kontamination mit Fremd-DNA bzw. Amplifikat minimiert werden konnte. Beim erarbeiteten Assay zur Anwendung der Lasermikrodissektion wurde ebenfalls darauf geachtet, Kontaminationen in Hinblick auf die Genexpressionsstudien auszuschließen. Durch Einsatz von Negativkontrollen und anschließender Überprüfung der Produkte anhand der Schmelzkurven konnte gewährleistet werden, dass die Quantifizierung der mRNA in sämtlichen Real-Time PCR-Läufen, die für Genexpressionsstudien herangezogen wurden, kontaminationsfrei ablief.

Durch die hohe Sensitivität ergibt sich eine hohe Empfindlichkeit der Expressionsergebnisse gegenüber Schwankungen der Amplifikationseffizienz. Die in dieser Arbeit verwendete Gleichung (2) zur Berechnung der relativen Expression (vgl. 2.11.4) setzt voraus, dass sich die Amplifikation in der exponentiellen Phase befindet. Am Anfang des PCR-Laufs ist die cDNA-Menge zu gering, zum Schluss (Plateauphase) ist die cDNA-Menge der Zielsequenz so stark angestiegen, dass immer häufiger Produktfragmente miteinander hybridisieren und eine Hemmung bewirken (Holzapfel und Wickert 2007). Diese Voraussetzung wird bei der Real-Time

PCR erfüllt, da die gesamte Amplifikationskurve und der C_T -Wert, der den Eintritt in die exponentielle Phase kennzeichnet, aufgenommen werden (Arya et al. 2005). Aufgrund des exponentiellen Anstiegs führen selbst geringe Schwankungen in der Amplifikationseffizienz zu steigenden Ungenauigkeiten der errechneten Transkriptmenge (Sambrook und Russel 2001). Unterschiedliche chemische Zusammensetzungen des cDNA-Templates (beispielsweise einzel- und doppelsträngig) können dabei zu veränderten Amplifikationseffizienzen führen. Da während der Aufbereitung der Gesamt-RNA alle Proben dieselben Prozessschritte erfuhren und auch gleiche Volumina verwendet wurden, ist davon auszugehen, dass sich die eingesetzte cDNA der Proben chemisch sehr stark gleicht. Dies gilt analog für die Aufbereitung von RNA, erhalten aus axialem und radialem Parenchym. Daher ist ein systematischer Fehler an dieser Stelle auszuschließen. Auch Reste von Polysacchariden und Phenolen, die während der RNA-Extraktion nicht entfernt werden, stellen einen Störfaktor dar (Staub et al. 1995). Dieses Problem ist im vorliegenden Fall vernachlässigbar, da im Laufe der weiteren Verarbeitung durch DNase-Verdau, reverse Transkription und der geringen Template-Konzentration im Real-Time PCR-Ansatz eine erhebliche Verdünnung etwaiger Störkomponenten erfolgte.

Die Berechnung der relativen Expression eines Zielgens setzt ein geeignetes Referenzgen voraus, mithilfe dessen die Expressionsdaten normalisiert werden. Die Signale des Referenzgens dienen dazu, Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten cDNA-Proben auszugleichen (Holzapfel und Wickert 2007). Dabei sollte dieses zu jedem Zeitpunkt des Zellzyklus stabil exprimiert und leicht zu detektieren sein. Zumeist codieren diese Gene für Enzyme, Strukturproteine oder RNA-Moleküle, die für elementare Funktionen der Zelle verantwortlich sind. Daher wird auch der Begriff „housekeeping genes“ (Haushaltsgene) verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Genfragment der 18S Untereinheit der ribosomalen RNA (rRNA) als Referenzgen verwendet. Die Struktur-RNA codiert für die kleine Untereinheit aller cytoplasmatischen Ribosomen in Eukaryoten. 18S ist eines der am häufigst verwendeten Referenzgene in Eukaryoten (Finnegan et al. 1993). Es wird für mRNA-Quantifizierungsversuche als interner Standard empfohlen, da die mRNA-Schwankungen in verschiedenen Geweben im Vergleich zu anderen Haushaltsgenen sehr gering sind (Thellin et al. 1999 und Referenzen darin). Auch für Angiospermen wurde 18S erfolgreich als Haushaltsgen eingesetzt (Olbrich et al. 2008). Es ist in Pflanzen auch unter Stressbedingungen stabil exprimiert (Olbrich et al. 2008; Huang et al. 2014), was für die Untersuchungen in der Splint-Kern-Übergangszone in dieser Arbeit von Vorteil ist, da der Prozess der Kernholzbildung auch mit Wassermangel in

Verbindung gebracht wird (Sachsee 1967; Hillis 1968; De Filippis und Magel 2012). Da ein 18S Genfragment zur Normalisierung auch für Fabaceae zufriedenstellende Ergebnisse lieferte (Martins et al. 2008; Lange 2009), fiel die Entscheidung für die Genexpressionsstudien in dieser Arbeit auf dieses Haushaltsgen.

Die Amplifikationseffizienz der Primerkombination *Rp18S.RTfor/Rp18S.RT.rev* wurde nach Auswertung der Standardkurven mit 1,85 berechnet und ist damit niedriger als von Lange (2009) angegeben (2,02). Da die Effizienzen für die Amplifikation von *RpPAL1* und *RpCHS3* denen Langes entsprechen, ergibt sich daraus für beide Markergene ein quantitativ niedrigerer Wert bei der Berechnung der relativen Expression.

4.5 Genexpressionsstudien an RNA aus Gesamtgewebe

In diesem Kapitel sollen die Ergebnisse der Genexpressionsstudien an den Kandidatengenen *Rp14-3-3Gen1-3* und *RpHS70* diskutiert werden. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf möglichen Verbindungen zur Kernholzbildung sowie Überlegungen über sonstige Rollen der resultierenden Proteine. Im Weiteren werden auch die Expressionsdaten der Markergene *RpPAL1* und *RpCHS3* diskutiert und mit vorherigen Studien verglichen. Auffällig bei sämtlichen untersuchten Genen sind die teilweise starken Expressionsunterschiede zwischen den Individuen eines Probenzeitpunkts, was darauf hindeutet, dass die Transkriptmenge auch vom Alter des Individuums und dessen Entwicklungsstand abhängig ist. Umweltfaktoren als Grund für die Expressionsunterschiede können für die Proben des Jahres 2012 vernachlässigt werden, da mit Ausnahme des zweiten Juni-Individuums alle Bäume wenige 100 Meter voneinander entfernt gefällt wurden. Ähnlich hohe Standardabweichungen für den Mittelwert der relativen Expressionen aus mehreren Individuen wies auch Lange (2009) für *RpCHS3* und *RpPAL1* nach. Da die Kernholzbildung ein genetisch determinierter Prozess ist, sind zeitliche Unterschiede des Beginns der Kernholzbildung (und damit des Genexpressionsmusters) zwischen Individuen verschiedenen Alters und Entwicklungsstands zu erwarten.

4.5.1 Die *Rp14-3-3* Genfamilie

Transkripte der drei Mitglieder der Genfamilie konnten in allen Geweben zu allen Probenzeitpunkten nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 3.5.1). Diese Ergebnisse

decken sich mit der Aussage, dass 14-3-3 Proteine in Pflanzen ubiquitär vorkommen und an verschiedensten Prozessen, wie Signaltransduktion und Metabolismus, beteiligt sind (Wu et al. 1997; Ferl et al. 1999). Da 14-3-3 in Pflanzen an über 300 Targetproteine bindet (Denison et al. 2011), war zu erwarten, dass es auch an physiologischen Prozessen sowohl im Phloem, dem Splint sowie der Übergangszone der Robinie beteiligt ist. Alle drei Gene sind dabei schwach exprimiert. Einzelne Expressionspeaks finden sich nur im Phloem bzw. im äußeren Splint vor allem im Frühjahr/Frühsummer sowie im Winter. Diese Peaks sind nicht darauf zurückzuführen, dass diese Gewebe den physiologisch aktivsten Teil aller untersuchten Gewebe darstellen. Der Anteil physiologisch aktiver Zellen spielt, aufgrund des Abgleichs mit dem 18S Referenzgens, bei der Betrachtung der Genexpressionsmuster keine Rolle. Ein Expressionspeak in der Splint-Kern-Übergangszone findet sich nur im Juli-Individuum des Jahres 2012 für *Rp14-3-3Gen2*. Zu diesem Zeitpunkt ist die relative Expression mit 96 % deutlich höher als in anderen Geweben. In allen anderen Individuen zu allen Zeitpunkten sind die *Rp14-3-3* Gene in der Splint-Kern-Übergangszone schwächer exprimiert als in Phloem und Splint. Damit und aufgrund der generell geringen Transkriptmenge ist die Genfamilie als Markergen der Kernholzbildung ungeeignet. Die ähnlichen Expressionsmuster aller identifizierten 14-3-3 Isoformen sowie die hohe Sequenzkonservierung unterstützen die Vermutung von Finnie und Mitarbeitern (2000), dass die einzelnen Mitglieder der Genfamilie keine funktionellen Unterschiede aufweisen, sondern dieselben Targetproteine binden, allerdings mit unterschiedlicher Bindungsspezifität.

Ein Zusammenhang des Kandidatengens mit dem Prozess der Kerninhaltsstoffsynthese ist dennoch wahrscheinlich. So konnten Li und Mitarbeiter (2012) eine Interaktion von 14-3-3 Proteinen mit dem Transkriptionsfaktor GmMYB176 in *Glycine max* nachweisen, welcher die Genexpression von CHS reguliert (Dhaubhadel und Li 2010; Yi et al. 2010). Die Autoren vermuten, dass 14-3-3 in den Transport des Transkriptionsfaktors vom Nukleus in das Cytosol beteiligt ist. Während der vorliegenden Genexpressionsstudien wurden die größten *RpCHS3* Transkriptmengen im Sommer und Frühherbst in der Splint-Kern-Übergangszone detektiert. Diese Genexpressionsmuster lassen sich mit denen der *Rp14-3-3* Genfamilie im selben Gewebe nur teilweise in Übereinstimmung bringen. *Rp14-3-3Gen1* zeigt im Jahresverlauf 2008 keine deutlichen Peaks. Vielmehr zeigt sich eine konstant schwache Expression 0,2 bis ca. 1 % zu allen Probenzeitpunkten. Im Jahr 2012 sind die Expressionsmuster von *Rp14-3-3Gen1* und *RpCHS3* dagegen vergleichbar. Beide Gene weisen die höchsten relativen Expressionen im Juli und September auf. Wobei *Rp14-3-3Gen1* (Juli 5,9 %; September bis zu 1,8 %) deutlich

schwächer exprimiert ist, als *RpCHS3* (Juli 99 %; September bis zu 110 %). Ein ähnliches Bild ergibt sich beim Vergleich des CHS Markergens mit *Rp14-3-3Gen2*. Auch hier kann für das Jahr 2008 kein gemeinsames Expressionsmuster entdeckt werden, da *Rp14-3-3Gen2* eine konstant niedrige Expression aufweist. Im Jahr 2012 zeigt das Kandidatengen einen deutlichen Peak im Juli (96,3 %). Auch im September ist es mit bis zu 10 % im Vergleich zum Frühjahr, Spätherbst und Winter stärker exprimiert. Die Genexpressionsmuster von *Rp14-3-3Gen2* und *RpCHS3* stimmen im Jahresverlauf 2012 also qualitativ überein. Gleiches gilt auch für *Rp14-3-3Gen3*. Im Jahresverlauf 2008 ist eine Hochregulierung (bis zu 6,9 %) im April gegenüber anderen Zeitpunkten zu beobachten. Im Jahr 2012 ist das Gen in den Monaten Juni (bis 3,1 %), Juli (1,6 %) und September (bis 3 %) deutlich stärker exprimiert, als im Dezember und März. Bei allen drei Mitgliedern der *Rp14-3-3* Genfamilie ist also ein qualitativ ähnliches Genexpressionsmuster wie für das *RpCHS3* Markergen zu beobachten. Die Hochregulierung aller drei *Rp14-3-3* Isoformen im Sommer des Jahres 2012 gegenüber dem Spätherbst ist in Übereinstimmung mit den Genexpressionsstudien von Yang und Mitarbeitern (2004), die von einer 2,3fachen Erhöhung der Transkriptmenge im November gegenüber dem Juli berichten.

Eine mögliche Erklärung für die relativ niedrige *Rp14-3-3* Expression, im Vergleich mit den Markergenen, liefern Dhaubhadel und Li (2010): Einerseits bewirkte ein „silencing“ des CHS regulierenden Transkriptionsfaktors GmMYB176 in *Glycine max* eine reduzierte CHS Genexpression und damit eine niedrigere Isoflavonoidakkumulation. Eine Überexpression des Transkriptionsfaktors führte andererseits nicht zu einer erhöhten Expression des CHS Gens. Erhöhte 14-3-3 Transkriptmengen dagegen bewirkten eine Translokation von GmMYB176 in das Cytosol, was zu einer reduzierten Flavonoidsynthese führte (Li et al. 2012). Erhöhte 14-3-3 Mengen hemmen in diesem Fall also Chalkonsynthase. Ein anderes Phänomen wurde in Kartoffel beobachtet (Zuk et al. 2005). Hier agiert 14-3-3 u.a. mit Saccharose-Phosphat Synthase und Nitrat Reduktase, wobei die Aktivität der Targetproteine sinkt. Eine Reduzierung der 14-3-3 Proteinmenge sorgte für eine erhöhte Aktivität von SPS und NR. Eine Überexpression des Proteins hatte hingegen keinen Effekt auf die Targetproteine, was die Autoren vermuten lässt, dass 14-3-3 Proteine im Überschuss in der Zelle vorliegen und eine Überexpression keinen Einfluss auf den Metabolismus hat.

Einen weiteren Zusammenhang zwischen 14-3-3 Proteinen und dem Sekundärmetabolismus zeigen Lapointe (2001) und Mitarbeiter auf. Im Anschluss an Wundinduktionen mittels Chitosan und Methyl-Jasmonat wurde eine erhöhte Akkumulation von 14-3-3 mRNA detektiert. Gleichzeitig stieg auch die Menge der PAL

Transkripte an, was die Autoren vermuten lässt, dass ein Zusammenhang zwischen 14-3-3 und der erhöhten PAL Expression besteht. Möglicherweise kommt 14-3-3 eine Rolle bei der Signaltransduktion nach Verwundung zu. Die Genexpressionsstudien an *RpPAL1* in dieser Arbeit zeigen für das Jahr 2012 die höchsten relativen Expressionen im Juni (bis zu 37 %), Juli (18,8 %) und September (bis zu 27,9 %). Das Genexpressionsmuster, mit einer konstanten Hochregulierung von Sommer bis Frühherbst ähnelt somit allen drei Mitgliedern der *Rp14-3-3* Genfamilie. Im Jahr 2008 allerdings ist PAL lediglich im Juni mit 27,7 % stark exprimiert. Zu allen anderen Zeitpunkten beträgt die relative Expression weniger als 1,5 %. Dieses Muster wird für *Rp14-3-3* nicht beobachtet.

Aufgrund der nachweisbaren Expression aller *Rp14-3-3* Gene in der Splint-Kern-Übergangszone zu allen Zeitpunkten und der Hochregulierung des Kandidatengens im Sommer und Frühherbst scheint ein Zusammenhang mit der Kernholzbildung wahrscheinlich. Ob die 14-3-3 Isoformen tatsächlich mit PAL, CHS oder deren Transkriptionsfaktoren interagieren, können nur biochemische Versuche auf Proteinebene zeigen. Zudem ist zu beachten, dass 14-3-3 nicht allein auf transkriptioneller Ebene reguliert wird (Roberts und Bowles 1999; Lapointe et al. 2001). So konnte eine metabolische Kontrolle *in vitro* nachgewiesen werden. Dabei interagiert Adenosinmonophosphat (AMP) mit 14-3-3 und reduziert so die Bindungsaffinität zu anderen Liganden. In Spinat wurden AMP Bindungsstellen an 14-3-3 Proteinen entdeckt, was die Autoren zur Vermutung führt, dass eine metabolische Kontrolle auch *in vivo* stattfindet (Athwal et al. 1998; Comparot et al. 2003). Eine posttranslationale Modifikation der 14-3-3 Isoformen konnte in Gerste aufgezeigt werden (van Zeijl et al. 2000).

Die gegenüber der Splint-Kern-Übergangszone erhöhten Expressionswerte, im Phloem und Splint lassen Spekulationen über weitere Aufgaben der 14-3-3 Genfamilie in der Robinie zu. Zahlreiche Veröffentlichungen weisen auf verschiedene Rollen des Proteins im Primärmetabolismus hin. In Kartoffel und Tomate dient SPS als Targetprotein für die 14-3-3 Genfamilie. Eine verringerte Menge an 14-3-3 Protein führt dabei, wie bereits erwähnt, zu erhöhten Aktivitäten der interagierenden Enzyme. Erhöhte SPS-Aktivitäten im Winter, detektiert in allen Geweben der Robinie, werden mit der Adaption auf Kälte in Verbindung gebracht (Hauch und Magel 1998). Die Genexpressionsmuster der vorliegenden Arbeit zeigen dagegen keine verringerte saisonsspezifische Expression im Winter auf. Vielmehr verläuft die Expression im Dezember und März des Jahres 2012 gewebespezifisch mit einer erhöhten Expression des Gens in den äußeren Bereichen des Querschnitts (Phloem und äußerer Splint), sodass anhand dieser Studien kein Zusammenhang zwischen der

14-3-3 Transkriptmenge und einer etwaigen Interaktion mit SPS schlussfolgert werden kann. Die im Vergleich zum inneren Teil des Xylems hohen Transkriptmengen der *Rp14-3-3* Gene im Phloem und äußeren Splint könnten ein Hinweis auf die für zahlreichen Pflanzen beschriebene Interaktion mit H⁺-ATPase sein. Dieses Enzym dient als Protonenpumpe der Energiebereitstellung für Transportprozesse von Reservestoffen und Wasser (Palmgren 1998). Die C-terminale Region der H⁺-ATPase wird dabei durch 14-3-3 aktiviert (Oecking und Hagemann 1999; Sze et al. 1999; Comparot et al. 2003).

4.5.2 Das *RpHS70* Gen

Mithilfe des aufgestellten Real-Time PCR-Assays konnte Transkript des *RpHS70* Gens in allen Geweben und zu jeder Jahreszeit detektiert werden (vgl. Kapitel 3.5.2). Auch wenn das Gen teilweise nur sehr schwach exprimiert ist, beispielsweise im Phloem einer der Septemberproben des Jahres 2012 mit nur 0,2 % im Vergleich zum 18S Referenzgen, lässt sich das untersuchte Gen damit den heat shock cognates (HSC) zuordnen. HSC werden im gesamten Jahr unter normalen Wachstumsbedingungen synthetisiert, während die zweite Gruppe der heat shock Proteine (HSP) durch Stressbedingungen, wie Hitzestress, aktiviert werden (Lindquist und Craig 1988). In der Splint-Kern-Übergangszone findet sich nur im Juli des Jahres 2012 eine Hochregulierung des Kandidatengens gegenüber anderen Geweben. Daher kommt *RpHS70* als Markergen für die Kernholzbildung in der Robinie nicht in Betracht. Trotzdem deutet das Expressionsmuster in der Splint-Kern-Übergangszone auf einen Zusammenhang mit dem Prozess der Kernholzbildung hin. Sowohl 2008 als auch 2012 ist ein Anstieg der Transkriptmenge von Frühjahr bis Frühherbst gegenüber den Spätherbst und Wintermonaten zu verzeichnen. Genexpressionsstudien mittels ESTs in der Übergangszone der Robinie (Yang et al. 2004) ergaben dagegen eine Hochregulierung eines heat shock Gens (HSP70) im November um den Faktor 4,4 gegenüber Juli.

Die deutliche Hochregulierung von *RpHS70* im Juli 2012 gegenüber allen anderen Zeitpunkten ist auch für *Rp14-3-3Gen1* und *Rp14-3-3Gen2* erkennbar, was Spekulationen über eine Interaktion der Proteine in der Robinie zulässt. May und Soll (2000) beschreiben einen 14-3-3/heat shock Komplex, der an Proteinvorstufen bindet und deren Translokationsrate um den Faktor vier erhöht.

Der Beginn des programmierten Zelltods wird in der Robinie auf Spätsommer/Herbst datiert und endet im März des darauffolgenden Jahres (Nobuchi et al. 1984). *RpHS70*

weist im Winter die schwächste Expression aller Jahreszeiten auf. Ein Zusammenhang des Gens mit dem Zelltod, wie für *Arabidopsis* berichtet (Fang et al. 2013), kann aus den erarbeiteten Ergebnissen daher nicht geschlossen werden. Eine Expression als Reaktion auf den verringerten Wassergehalt während der Kernholzbildung, wie von de Filippis und Magel (2012) spekuliert, erscheint ebenfalls unwahrscheinlich, da *RpHS70* im Phloem, einem Gewebe mit hohem Wassergehalt, zumindest im Jahresverlauf 2012 ebenfalls konstant zwischen 11 und 37,2 % exprimiert ist (mit Ausnahme der Septemberindividuen).

Diese Abweichungen von anderen Studien können damit erklärt werden, dass es sich bei dem in der vorliegenden Arbeit identifizierten Gen nicht um ein HSP, sondern ein HSC handelt. Ob *RpHS70* eine Rolle bei Stressreaktionen wie beispielsweise Hitze und Wassermangel spielt, ist fraglich, aber nicht auszuschließen, da auch heat shock cognates an der Reaktion auf Stress beteiligt sein können. So wiesen Xiu et al. (2014) einen Anstieg der Genexpression zweier HS70 cognates in *Macrobrachium nipponense* als Reaktion auf Hitzestress nach. Vielmehr ist jedoch zu vermuten, dass *RpHS70* in das normale Wachstum und die Entwicklung der Robinie involviert ist. Ähnliche Ergebnisse lieferten Studien auf Transkript- und Proteinebene an *Vigna radiata* (Chen et al. 2004). Die Autoren stellten eine ähnliche Expression von drei heat shock cognate Genen in allen Geweben, mit Ausnahme von gereiften Samen und Keimlingen zu Beginn der Keimung, fest. Aufgrund der Bindungsaktivitäten kommen sie zu der Schlussfolgerung, dass HS70 in *Vigna radiata* an Signal- und Transitpeptide bindet und als Motor der Translokation dient. Es bleibt daher zu spekulieren, dass *RpHS70* als Chaperon an Transportprozessen sowie an der Aufrechterhaltung der Protein-Homöostase beteiligt ist, wie bereits für zahlreiche Pflanzen beschrieben (Wu et al. 1994; Neupert 1997; Hartl und Hayer-Hartl 2002; Nollen und Morimoto 2002).

4.5.3 Die Markergene *RpPAL1* und *RpCHS3*

Phenyl-Ammonium-Lyase (PAL) und Chalkonsynthase (CHS) stellen Markergene der obligaten Kernholzbildung dar. Beide Enzyme spielen eine Schlüsselrolle bei der Flavonoidbiosynthese in der Splint-Kern-Übergangszone. PAL ist das Eingangsenzym des Phenylpropanstoffwechsels, welcher die Ausgangssubstrate der Flavonoidbiosynthese bereitstellt, während CHS die Bildung von Naringenin-Chalkon, dem Grundgerüst aller Flavonoide, katalysiert. Die Rolle beider Markergene konnte sowohl auf Enzymebene (Magel et al. 1991; Magel und Hübner 1997), als auch auf Genexpressionsebene (Beritognolo et al. 2002; Yang et al. 2004; Lange 2009) in der

Splint-Kern-Übergangszone nachgewiesen werden. Für die vorliegende Arbeit wurden die Gene *RpPAL1* und *RpCHS3* exemplarisch für beide Genfamilien herangezogen. Die Mitglieder beider Genfamilien weisen in der Robinie gleiche gewebespezifische Verteilungsmuster in der Genexpression auf. Lediglich der quantitative Anteil an der Gesamtexpression unterscheidet sich (Lange 2009). Daher wurde jeweils das quantitativ am stärksten vertretene Genfamilienmitglied gewählt. Die Expressionsdaten sollten einerseits im Vergleich mit den Kandidatengenen *Rp14-3-3* und *RpHS70* Aufschluss darüber geben, ob es sich bei diesen ebenfalls um Markergene der Kernholzbildung handelt. Zudem sollte ein Abgleich der Expressionsdaten, erhalten aus RNA aus Gesamtgewebe, mit denen der RNA aus Axial- bzw. Radialparenchyman Licht auf den Beitrag der verschiedenen Parenchyme auf den Prozess der Kernholzbildung werfen.

Das erarbeitete Genexpressionsmuster von *RpPAL1* (vgl. Kapitel 3.5.4) weist sowohl im Jahr 2008, als auch im Jahr 2012 die höchsten Transkriptmengen im Sommer und im Herbst (nur 2012) auf, während das Gen im Frühjahr und Winter wenig bis gar nicht exprimiert wird. Diese Ergebnisse decken sich mit vorherigen Untersuchungen an *RpPAL1* (Lange 2009). In besagter Studie konnte eine Hochregulierung im Juli und August (ca. 50 % relative Expression) nachgewiesen werden. Im Oktober sank die Transkriptmenge (ca. 10 % relative Expression), im Mai und November war sie nahezu nicht mehr nachweisbar. Da PAL in der Robinie nicht ausschließlich in der Splint-Kern-Übergangszone, sondern auch im umliegenden Xylemgewebe nachgewiesen werden konnte (Magel et al. 1991; Magel und Hübner 1997), entschied sich der Autor, die Expressionsdaten der Splint-Kern-Übergangszone auf die des inneren Splints zu beziehen. Dies bewirkte eine Verschiebung des Expressionspeaks in den Spätherbst, was dem Muster der PAL-Enzymaktivität in der Robinie entspricht (Magel et al. 1991). Trotz des Einsatzes gleicher Primer sowohl für *RpPAL1*, als auch für das 18S Referenzgen erweisen sich die relativen Expressionen in der vorliegenden Arbeit konstant niedriger als in der vorangegangenen Studie Langes. Dies ist auf die erneute Berechnung der Amplifikationseffizienz der 18S Primer zurückzuführen (vgl. Kapitel 3.4.1.1 und 4.4). Diese Unterschiede beschränken sich folgerichtig auf den Zahlenwert der relativen Expression, aber nicht auf das saisonale Genexpressionsmuster. Genexpressionsstudien mithilfe von Microarrays (Yang et al. 2004) untermauern dieses Muster, so zeigte die Studie eine Hochregulierung eines PAL Genabschnitts im Juli gegenüber dem November um den Faktor 3,3. Während der vorliegenden Untersuchungen erwies sich die Hochregulierung im Sommer

gegenüber dem Spätherbst noch als deutlich höher (Faktor 103 im Jahr 2008 und 6280 im Jahr 2012).

Die Expression der Chalkonsynthase ist nahezu ausschließlich auf die Splint-Kern-Übergangszone beschränkt (vgl. Kapitel 3.5.3). Geringere Transkriptmengen finden sich bei zwei Proben im inneren Splint. In allen anderen Geweben ist das Gen sehr schwach bzw. gar nicht exprimiert. Dies ist in Übereinstimmung mit Untersuchungen zur radialen Verteilung des CHS Proteins und dessen Enzymaktivität in der Robinie (Magel et al. 1991; Magel und Hübner 1997). Dieser Zusammenhang lässt darauf schließen, dass die Steigerung der CHS Transkriptmenge nötig ist, um auch den Enzymgehalt zu steigern, was bedeutet, dass die Regulierung von CHS hauptsächlich auf transkriptionellem Wege erfolgt (Beritognolo et al. 2002). Die geringen Mengen CHS Transkript im Splintholz sind nicht auf eine Akkumulation von Flavonoiden oder deren Vorstufen zurückzuführen, wie es für den *Juglans Typ* oder Typ 2 der obligaten Kernholzbildung charakteristisch ist. Vielmehr wird von einer initialen Dihydrorobinetinsynthese während der Xylemdifferenzierung ausgegangen. So konnten Magel und Mitarbeiter (1994) dieses Flavonoid in sehr geringen Mengen im Splint der Robinie nachweisen, allerdings ohne eine Konzentrationszunahme bis zur Splint-Kern-Übergangszone. Die Autoren vermuten daher, dass die geringe Flavonoidmenge dem präventiven Schutz vor Insekten und holzerstörenden Pilzen dient. Bereits diese geringen Mengen sind ausreichend, um einen aktiven Schutz zu gewährleisten.

In der Splint-Kern-Übergangszone weist *RpCHS3* sowohl im Jahresverlauf 2008, als auch 2012 ein seasonspezifisches Muster mit einer Hochregulierung in den Sommer und Frühherbstmonaten auf. Im Spätherbst und Winter ist die Expression sehr gering bzw. nicht messbar, bevor sie im Frühjahr wieder ansteigt. Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit den Studien Langes (2009), der die höchsten Transkriptmengen im Juli und August detektierte (ca. 250 bzw. 180 % relative Expression). Darauf folgte ein Absinken auf ca. 75 % im Oktober und unter 5 % im November. Im Mai stieg die relative Expression wieder auf ca. 10 % an. Dieses Muster deckt sich qualitativ mit dem seasonspezifischen Verlauf der vorliegenden Genexpressionsstudien der Proben des Jahres 2012. Die Werte der relativen Expression steigen hier vom Juni (bis zu 80 %) zum Juli (99 %) bis September (bis zu 110 %) an, während im Dezember und März nur noch Spuren bzw. keine Transkripte detektierbar sind. Die quantitativ niedrigeren Expressionswerte der vorliegenden Studien sind, wie für PAL, auf die geänderte Amplifikationseffizienz der 18S Primer zurückzuführen. Die Hochregulierung von CHS im Sommer wurde in der Robinie auch

von Yang und Mitarbeitern (2004) nachgewiesen. Microarray-basierte Genexpressionsstudien deckten dabei eine Hochregulierung des Gens im Juli um den Faktor 2,8 gegenüber dem November auf.

4.5.4 Fazit der Genexpressionsstudien an RNA aus Gesamtgewebe

Mit der vorliegenden Arbeit konnte ein weiterer Beweis für die typischen Genexpressionsmuster von PAL und CHS erbracht werden. Die Kandidatengene *Rp14-3-3Gen1-3* und *RpHS70* weisen in der Splint-Kern-Übergangszone, bis auf wenige Ausnahmen, keine Hochregulierung gegenüber anderen Geweben während der Sommermonate und Herbstmonate (dem Zeitpunkt der Kernholzbildung) auf. Daher und aufgrund der generell schwachen Expression kommen beide Kandidatengene als Markergene der Kernholzbildung nicht in Betracht. Wie bereits diskutiert, ist ein Zusammenhang mit diesem Prozess dennoch wahrscheinlich.

Im Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich das im Jahr 2012 gesammelte Probenset von Robinienquerschnitten gut eignet, um den unterschiedlichen Einfluss von axialen und radialen Parenchymen auf die Flavonoidsynthese und damit auf die obligate Farbkernbildung aufzuzeigen. Der Einfluss der Parenchyme soll dabei anhand der relativen Expression im Vergleich zu Expressionsversuchen an RNA aus Gesamtgewebe diskutiert werden (vgl. Kapitel 4.7).

4.6 Erstellen eines Assays zur Lasermikrodissektion und Aufbereitung des dissektierten Parenchymmaterials

Ziel dieser Arbeit ist es, axiale und radiale Parenchyme getrennt voneinander aufzuarbeiten, um anhand der isolierten RNA Genexpressionsstudien durchzuführen. Daher wurde ein Assay für die Lasermikrodissektion entwickelt, welches diese differenzierte Aufarbeitung erlaubt (vgl. Kapitel 3.6). Das größte Problem stellt dabei die Fixierung des Dünnschnitts auf dem Objektträger dar. Hier gilt es histologische Details zu bewahren, um die verschiedenen Gewebe (axiale und radiale Parenchyme, Fasern, Gefäße) unterscheiden zu können. Gleichzeitig darf es nicht zur Desintegration der RNA kommen, da dies spätere Genexpressionsstudien unmöglich machen würde. In Studien an anderem Pflanzenmaterial angewendete Methoden wie Acetonfixierung mit anschließender Kryoeinbettung (Asano et al. 2002) sind nur

schwer auf den Werkstoff Holz anwendbar, da sie Protokollen zur Untersuchung tierischer Zellen entstammen, was aufgrund der Vakuolen in pflanzlichen Zellen zu einer Destabilisierung und damit verminderten histologischen Auflösung führt (Kerk et al. 2003). Auch das in der Zellwand der verholzten Achse eingelagerte Lignin ist in diesem Zusammenhang problematisch. Trotzdem gelang es Larisch (2012; 2013), mithilfe einer modifizierten Farmer-Lösung (Ethanol-Essigsäure) und anschließender Paraffineinbettung der Mikrotomschnitte ein Fixierungsprotokoll für Pappel zu erarbeiten. Allerdings erscheint dieses System sehr aufwendig, da die Dünnschnitte vor der LMPC („Lasermicrodissection and pressure catapulting“) entparaffiniert werden müssen. Zudem berichten Deeken und Mitarbeiter (2008), dass die Paraffineinbettung mit einer Desintegration der RNA einhergehen kann. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein reproduzierbares und einfach zu handhabendes Assay erarbeitet. Verschiedenste Vorversuche waren nötig, um letztendlich eine zufriedenstellende Methode zu erhalten. Zunächst wurde ein Ethanol basiertes Fixierungsprotokoll zur Lasermikrodissektion aus menschlichem Knochengewebe (Benoyahu et al. 2005) in Erwägung gezogen. Eine Fixierung der Robiniendünnschnitte auf dem Objektträger ist mit dieser Methode nicht möglich. Weitere Versuche wurden unter Einsatz von PEN-Slide-Objektträgern (MembraneSlide NF 1.0 PEN; Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München) durchgeführt. Dies sind Objektträger, die mit einer dünnen Polyethylen-Naphthalat-Membran überzogen sind. Diese wird zusammen mit dem Gewebe geschnitten und katapultiert und soll als „Stütze“ dienen, sodass weniger Laserenergie nötig ist. Eine Fixierung auf diesen speziellen Objektträgern bewirkte allerdings einen nahezu totalen Verlust der histologischen Details. Auch die Fixierung mit PALM[®] Liquid CoverGlass N (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München), einem Sprühreagenz, das auf Dünnschnitt und Objektträger aufgetragen wird, um diesen mithilfe eines Glasstabs zu fixieren, brachte keinen Erfolg. Allein die entwickelte Methode der Zuckerfixierung in Kombination mit dem Fixieren durch Klebestreifen erbrachte den gewünschten Erfolg. Wie in Kapitel 3.6 gezeigt, können auf diese Weise histologische Details bewahrt werden, sodass Markieren und Dissektieren verschiedener Parenchymgewebe problemlos möglich sind. Da sich herausstellte, dass sich die Klebestreifen während der Gefriertrocknung lösten, wurden die Dünnschnitte zunächst mit der Zuckerlösung fixiert und gefriergetrocknet. Erst im Anschluss erfolgte die weitere Fixierung mit Klebestreifen. Die Proben wurden danach umgehend der Lasermikrodissektion zugeführt. Durch den Vorgang der Gefriertrocknung werden sämtliche biologische Vorgänge der Zellen gestoppt, sodass die Integrität der RNA bewahrt bleibt. Der Vorteil der entwickelten Methode liegt in der sehr einfachen Handhabung und der Zeitersparnis. So sind keine aufwändigen

Schritte zur Fixierung mit ätzenden oder giftigen Substanzen, wie dies beispielsweise bei der Farmer-Lösung der Fall ist, nötig. Auch das zeitaufwändige Einbetten bzw. Entparaffinieren entfällt. Das erarbeitete System bietet zudem nur eine niedrige Kontaminationsanfälligkeit. Da eine Kontamination mit Fremd-RNA aufgrund deren geringer Stabilität unwahrscheinlich ist, bleibt nur die Kontaminationsgefahr mit Fremd-DNA. Aus diesem Grund findet während der RNA-Extraktion ein Verdauungsschritt mit DNase I statt (vgl. Kapitel 2.4.2), sodass mögliche Verunreinigungen an dieser Stelle beseitigt werden.

Ein Problem bei mittels Lasermikrodissektion gewonnenem Material stellt die sehr geringe RNA-Menge dar. Die reverse Transkription mit dem SuperScript[®] III First-Strand Synthesis System und eine anschließende Amplifikation des 18S Genfragments mittels PCR war nicht erfolgreich. Dieses Problem wurde in zahlreichen Studien beschrieben und durch eine Amplifikation des gesamten Transkriptoms gelöst. Dabei kamen T7-RNA-Polymerase basierte Systeme (Asano et al. 2002; Kehr 2003; Kerk et al. 2003 und Referenzen darin) sowie verschiedene kommerzielle Kits zum Einsatz (Deeken et al. 2008; Goué et al. 2012; Larisch 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde das Qiagen QuantiTect Whole Transcriptome Kit (vgl. Kapitel 2.5.3) verwendet. Dieses Kit erlaubt eine lineare, uniforme Amplifikation aller Transkripte einer RNA-Probe. Dabei erfolgt zunächst eine reverse Transkription, anschließend eine Ligation von zwei Enzymen an die cDNA und schließlich die Amplifikation dieser mithilfe einer REPLI-g Midi DNA-Polymerase in einer isothermen Reaktion (Qiagen 2011). Spezifische Angaben zum Reaktionsablauf und den Enzymen gibt der Hersteller nicht preis. Wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben, konnte mithilfe dieses Kits für alle Proben cDNA hergestellt und für die Genexpressionsstudien eingesetzt werden. Eine Limitierung des Kits tritt für „low-copy“-Transkripte auf. Hierbei kann es einer Unterrepräsentation der Transkripte während der Amplifikation kommen, was zu stochastischen Fehlern führen kann und im schlimmsten Fall eine Amplifikation der „low-copy“-Transkripte verhindert. In darauffolgenden Genexpressionsstudien wären daher schwach exprimierte Gene nicht mehr detektierbar. Qiagen empfiehlt eine Ausgangsmenge von 100 Zellen, um dieses Problem zu umgehen. In den Genexpressionsstudien an RNA aus Gesamtgewebe stellte sich heraus, dass *Rp14-3-3* und *RpHS70* in der Splint-Kern-Übergangszone schwach exprimiert sind. Die Markergene *RpPAL1* und *RpCHS3* zeigen zwar im Sommer und Herbst sehr hohe relative Expressionen, im Winter jedoch findet sich nur sehr wenig Transkript (vgl. Kapitel 3.5). Aus diesem Grund müssen auch „low-copy“-Transkripte linear amplifiziert werden, um aussagekräftige Genexpressionsstudien durchführen zu können. Daher

wurde die Menge der dissektierten Parenchymzellen näherungsweise berechnet. Anhand von Tangentialschnitten der Robinie, die unter dem Systemmikroskop Bx41 mit E-330 Digitalkamera (Olympus, Tokio, Japan) beobachtet wurden, wurde der tangentielle Durchmesser von Radialparenchym mithilfe der „Cell[^]B-Imaging Software for Life Science Microscopy“ (Olympus) bestimmt (Abbildung 4-1). Der Durchmesser beträgt dabei 7 bis 13 μm , was der Schnittdicke der in der LMPC eingesetzten Radialschnitte (10 μm) ungefähr entspricht. Es ist also davon auszugehen, dass bei dieser Schnittdicke durchschnittlich eine Zelle dissektiert wird. Die Fläche einer einzelnen Parenchymzelle in radialer Richtung wurde während der LMPC mit dem PALM[®] MicroBeam Systems und der PALM[®] Robo Software bestimmt. Eine radiale Parenchymzelle weist im Durchschnitt eine Fläche von 400 μm^2 auf. Bei einer dissektierten Gesamtfläche von mindestens 500.000 μm^2 entspricht dies ca. 1250 Zellen Ausgangsmaterial. Damit ist auch die Amplifikation von Genen mit geringer Transkriptmenge möglich und die nachfolgenden Genexpressionsstudien an RNA, erhalten aus LMPC-Material, aussagekräftig.

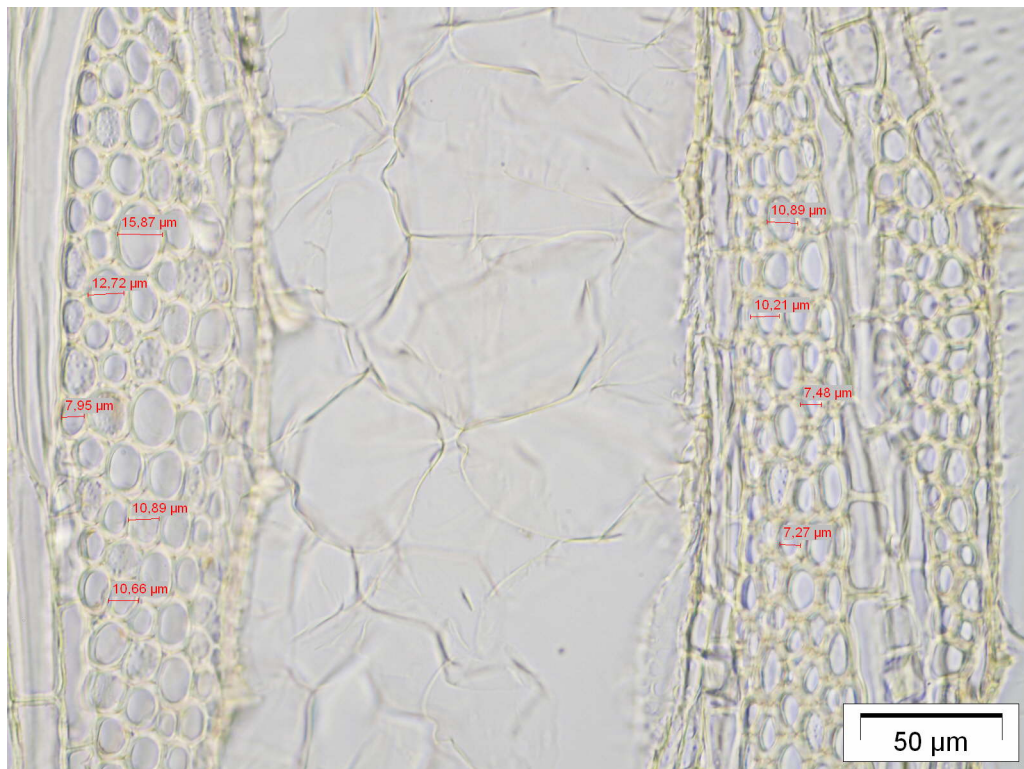


Abbildung 4-1: Tangentialschnitt der Robinie zur Bestimmung der durchschnittlichen Größe von radialen Parenchymzellen. Die einzelnen Zellen weisen Durchmesser zwischen 7 und 13 μm^2 auf.

4.7 Genexpressionsstudien an axialen und radialen Parenchymen und deren Beitrag zur Kernholzbildung

Anhand der aus axialen und radialen Parenchymen erhaltenen RNA (bzw. cDNA) wurden Genexpressionsstudien mittels Real-Time PCR durchgeführt. Ein Vergleich dieser Genexpressionsmuster, besonders der Markergene *RpCHS3* und *RpPAL1*, mit denen aus Versuchen an RNA aus Gesamtgewebe, erlaubt Rückschlüsse auf den Beitrag der verschiedenen Parenchyme zur Kernholzbildung.

Die Genexpressionsmuster aller untersuchten Gene an RNA aus Radialparenchym entsprechen dabei weitgehend denen aus RNA des Gesamtgewebes (vgl. Kapitel 3.5. und 3.7). So sind auch hier die Kandidatengene *Rp14-3-3Gen1-3* und *RpHS70* bis auf wenige Ausnahmen schwach exprimiert. Die starke Hochregulierung von *Rp14-3-3Gen2* (96,3 %) und *RpHS70* (57,7 %) im Juli findet sich im Radialparenchym wieder (*Rp14-3-3Gen2*: 90,6 %; *RpHS70*: 41,5 %). Die Markergene *RpCHS3* und *RpPAL1* zeigen im Radialparenchym das typische Genexpressionsmuster, mit einer Hochregulierung in den Sommermonaten. Auch hier sind die Unterschiede zu Studien an RNA aus Gesamtgewebe allein quantitativer Natur. Ein Trend zu einer generell höheren bzw. niedrigeren berechneten relativen Expression für *RpCHS3* ist nicht erkennbar. Für *RpPAL1* ergeben sich dagegen durchgehend niedrigere Werte.

Die quantitativen Unterschiede können auf die Probenahme zurückgeführt werden. Diese erfolgte in der Splint-Kern-Übergangszone an unterschiedlichen Stellen des Stammquerschnitts. Zwar lagen diese nur wenige Zentimeter auseinander, trotzdem ist ein gewebespezifischer Unterschied denkbar. Ein Einfluss der unterschiedlichen Aufbereitung der RNA (vgl. Kapitel 3.6.1 und 4.6) erscheint unwahrscheinlich, da das Qiagen QuantiTect Whole Transcriptome Kit eine lineare Amplifikation erlaubt (Qiagen 2011). Damit ist eine Verschiebung des Transkriptverhältnisses zwischen Ziel- und Referenzgenen ausgeschlossen. Aufgrund der Normalisierung mithilfe der 18S Untereinheit als Referenzgen sind die Unterschiede in der RNA-Aufbereitung nicht von Bedeutung für das Quantifizierungsergebnis.

Im Gegensatz zum Radialparenchym konnte im Axialparenchym keine Expression der Zielgene (*RpCHS3*, *RpPAL1*, *RpHS70*, *Rp14-3-3Gen1-3*) detektiert werden. Die stabile Expression der 18S Untereinheit konnte sowohl mittels PCR (vgl. Kapitel 3.6.1) als auch mittels Real-Time PCR (vgl. Kapitel 3.8) nachgewiesen werden. Dies dient als Nachweis, dass cDNA in ausreichender Konzentration und Qualität vorliegt. Die Ergebnisse lassen nur den Schluss zu, dass sowohl die Kandidatengene *RpHS70* und

Rp14-3-3 als auch die Markergene *RpCHS3* und *RpPAL1* im Axialparenchym der Robinie nicht exprimiert sind, bzw. diese nur Spuren von Transkript enthalten. Beide Markergene stehen im Sekundärmetabolismus in Zusammenhang mit der Flavonoidbiosynthese. PAL ist als erstes Enzym des Phenylpropanstoffwechsels an der Bereitstellung von Cumaroyl-CoA, dem Ausgangssubstrat der Flavonoidsynthese, beteiligt (Hanson und Havir 1981; Magel et al. 1991). CHS katalysiert die Kondensation dieses Substrats zu Naringenin-Chalkon, dem Grundgerüst aller Flavonoide (Heller und Forkmann 1988; Hahlbrock und Scheel 1989). Eine Synthese der Kerninhaltsstoffe Robinetin und Dihydrorobinetin ist daher nur in Anwesenheit beider Enzyme möglich. In den durchgeführten Genexpressionsstudien weisen nur die radialen Parenchyme Transkripte der beiden Markergene auf, im Axialparenchym dagegen konnten diese nicht nachgewiesen werden. Das Fehlen von PAL und CHS Transkript (und damit auch Enzym) im axialen Parenchym weist darauf hin, dass diese Gewebe nicht an der Kerninhaltsstoffsynthese dieser wichtigen phenolischen Komponenten in der Robinie beteiligt sind. Das Radialparenchym scheint für die Flavonoidbiosynthese allein verantwortlich zu sein. Dieses Ergebnis lässt sich gut in vorhandene Studien einordnen, die im Strahlparenchym den Hauptort der Kerninhaltsstoffsynthese sehen. So konnten Nakaba und Mitarbeiter (2012) mittels licht- und fluoreszenzmikroskopischer Methoden nachweisen, dass der programmierte Zelltod von axialen Parenchyemen in der Robinie zeitlich vor dem der radialen erfolgt. Die Einlagerung von Kerninhaltsstoffen dagegen wurde mittels Autofluoreszenz zuerst im Strahlparenchym nachgewiesen. Die Autoren schlussfolgerten, dass axiale Parenchyme nicht an der Kerninhaltsstoffsynthese, sondern anderweitig an der Kernholzbildung beteiligt sind. Dies deckt sich mit früheren mikroskopischen Untersuchungen an *Cryptomeria japonica* (Higuchi et al. 1969; Nobuchi und Harada 1983), die zwar ein ähnliches Verhalten von Axial- und Radialparenchym während des Zelltods beobachteten, den Zeitpunkt des axialen Zelltods allerdings vorangestellt beschrieben. Zudem konnten Kerninhaltsstoffe in der Splint-Kern-Übergangszone mittels Farbreaagenzien im Radialparenchym, nicht aber im Axialparenchym nachgewiesen werden, was zu der Vermutung führte, dass Kerninhaltsstoffe nur im Strahlparenchym synthetisiert werden, um anschließend in benachbarte tracheale Elemente abgesondert zu werden (Sachs et al. 1966; Nobuchi und Harada 1985). Diese Aussage unterstützen Sekundärionen-massenspektrometrische Versuche an Sugi, die in Kombination mit Elektronenmikroskopie durchgeführt wurden (Kuroda et al. 2014). Der Kerninhaltsstoff Ferruginol akkumulierte dabei allein im Radialparenchym der Übergangszone. Mithilfe derselben Methode konnte der Kerninhaltsstoff 4,8-dihydroxy-5-methoxy-2-naphtaldehyd im Strahlparenchym der

Splint-Kern-Übergangszone von *Diospyros kaki* nachgewiesen werden. Nur daran angrenzende Axialparenchyme enthielten ebenfalls diesen Inhaltsstoff, was die Autoren zu der Vermutung führt, dass die Synthese im Radialparenchym erfolgt, gefolgt von einer Penetration der umliegenden Zellen (Matsushita et al. 2012). Der Prozess der Kernholzbildung stellt ein Zusammenspiel von Primär- und Sekundärmetabolismus dar. Die Reservestoffe in der Übergangszone dienen zunächst der Energiegewinnung. Erst ein Umschalten zum sekundären Stoffwechsel führt zu einem Verbrauch der Kohlenstoffgerüste für die Kerninhaltsstoffsynthese (Höll und Lenzian 1973; Magel und Höll 1993). Die benötigten Reservestoffe sind in der Robinie hauptsächlich in den Holzstrahlen lokalisiert (Ziegler 1964; Magel et al. 1997; Sauter und Witt 1997). Andere Arten wie die asiatische *Bridelia retusa* weisen dagegen in beiden Parenchymgeweben Stärkekörner auf (Nair et al. 1981). Auch Saccharose, welche in der Robinie, nach Spaltung durch SuSy, Kohlenstoffgerüste für die Flavonoidsynthese bereitstellt, wird durch die Strahlen von äußeren Geweben in Übergangszone importiert (Magel et al. 1994; Magel 2001). Der Mineralstofftransport vom Splint- in das Kernholz verläuft ebenfalls über das Radialparenchym, wie Okada (2011, 2012) mittels der Injektion von Rubidium und anschließenden biochemischen Untersuchungen an *Cryptomeria japonica* (Sugi) nachweisen konnte. Aus den genannten Gründen wird seit längerem vermutet, dass die radialen Parenchyme hauptsächlich für die Kerninhaltsstoffsynthese verantwortlich sind (Bamber und Fukazawa 1985; Hillis 1987; Climent et al. 1998). In der Robinie beträgt der Anteil des Radialparenchyms 21 %, der des Axialparenchyms nur 6 % (Wagenführ 2007), was ein weiterer Hinweis auf die Dominanz des Strahlparenchyms ist. Mit der vorliegenden Arbeit konnte die vorherrschende Ansicht bestätigt werden, dass die radialen Parenchyme für die Synthese der Flavonole Robinetin und Dihydrorobinetin verantwortlich sind. Dies bedeutet nicht, dass axiale Parenchyme an der Kernholzbildung der Robinie unbeteiligt sind. Über einen Beitrag dieser Parenchyme in anderer Weise kann spekuliert werden. Für andere Arten ist bekannt, dass axiale und radiale Parenchyme unterschiedliche Beiträge zur Kernholzbildung leisten. Nagasaki und Mitarbeiter (2002) wiesen den Kerninhaltsstoff Agatharesinol, ein Norlignan, in *Cryptomeria japonica* mit immunohistochemischen Versuchen und anschließender Mikroskopie allein im Radialparenchym nach. Allerdings fanden sich im Axialparenchym braungefärbte Stoffe, die die Autoren aufgrund von Farbe und exklusivem Vorkommen im Kernholz als möglichen Kerninhaltsstoff beschreiben. Axiale und radiale Parenchyme synthetisieren in Sugi also unterschiedliche Kerninhaltsstoffe. Die Farbe des Kernholzes dieser Art ist dagegen durch Komponenten, die im Axialparenchym akkumulieren determiniert, wie

mikrophotometrische Studien belegen (Kuroda und Shimaji 1983). Ein Beitrag der axialen Parenchyme, abseits der Flavonoidbiosynthese, scheint daher auch in der Robinie wahrscheinlich.

4.8 Schlussfolgerung und Ausblick

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden HS70 und 14-3-3 Genfragmente, die Kandidatengene der Kernholzbildung in der Robinie darstellen, als *RpHS70* und *Rp14-3-3Gen1-3* identifiziert und anhand von Genexpressionsstudien auf ihre mögliche Rolle als Markergene untersucht. Beide Kandidaten erweisen sich aufgrund ihrer schwachen relativen Expression sowie dem ubiquitären Vorkommen von Transkript in allen untersuchten Geweben zu allen Zeitpunkten als nicht geeignet. Zukünftige biochemische Versuche könnten belegen, ob die Kandidatengene tatsächlich mit Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) und Chalkonsynthase (CHS) interagieren und damit am Prozess der Flavonoidsynthese beteiligt sind. Die Hochregulierung der Gene im Sommer und Herbst innerhalb der Splint-Kern-Übergangszone sowie bereits veröffentlichte Studien an anderen Baumarten lassen dies vermuten.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein Assay zur getrennten Aufarbeitung von Axial- und Radialparenchym mittels Lasermikrodissektion erarbeitet. Dieses ist einfacher zu handhaben und zeitlich weniger aufwändig als bisher veröffentlichte Methoden. Die meiste Zeit fällt hier auf das Dissektieren von ca. 1000 Zellen. Diese Menge ist nötig, um im Weiteren eine genügend hohe RNA-Ausbeute zu erreichen. Trotzdem ist diese noch so gering, dass ein Amplifikationsschritt nötig ist, um genügend cDNA für Genexpressionsstudien zu erhalten. Verschiedene Hersteller entwickeln momentan „single cell“ PCR-Systeme, die es ermöglichen sollen, RNA linear aus einer einzigen Zelle zu amplifizieren. Ein solches System würde den zeitlichen Aufwand der hier erarbeiteten Methode noch einmal deutlich verringern.

Die durchgeführten Genexpressionsstudien an RNA, erhalten aus axialen und radialen Parenchymen, zeigen, dass sowohl PAL als auch CHS allein im Radialparenchym der Robinie exprimiert sind. Da beide Markergene für Schlüsselenzyme der Flavonoidbiosynthese codieren, muss geschlossen werden, dass axiale Parenchyme an dieser Synthese nicht beteiligt sind und dass das Strahlparenchym, wie bereits in vorherigen biochemischen und mikroskopischen Veröffentlichungen

beschrieben, die dominierende Stellung während der Kernholzbildung einnimmt. Die Gene *RpHS70* und *Rp14-3-3* sind ebenfalls allein im Radialparenchym exprimiert. Da ein Zusammenhang beider Gene mit der Kernholzbildung vermutet wird, sind diese Ergebnisse ein weiterer Hinweis auf die Dominanz des radialen Parenchyms.

Die vorliegende Arbeit liefert einen weiteren Beitrag zum molekularbiologischen Verständnis der Kernholzbildung, wobei erstmals die zelluläre Ebene einbezogen wurde. Ein volles Verständnis der Mechanismen der Kernholzbildung ist die Voraussetzung für eine zukünftig mögliche Kontrolle der chemischen Eigenschaften von Holz sowie für das „metabolic engineering“.

5 Zusammenfassung

Die obligate Kernholzbildung in den innersten, lebenden Xylemgeweben vieler Bäume ist einer der ökologisch und ökonomisch wichtigsten sekundären Differenzierungsprozesse verholzter Achsen. Der Prozess ist genetisch determiniert und wird von endogenen wie exogenen Faktoren beeinflusst. Das herausragende Charakteristikum des Kernholzes sind die Kerninhaltsstoffe, die dem Holz seine dunklere Farbe und eine „natürliche Dauerhaftigkeit“ verleihen. Zu den wichtigsten Kerninhaltsstoffen der Robinie gehören die Flavonoide Robinetin und Dihydrorobinetin. Diese verleihen dem Holz eine Resistenz gegenüber holzerstörenden Pilzen und Mikroorganismen. Die Flavonoide akkumulieren *in situ* im Parenchymgewebe der Splint-Kern-Übergangszone. Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) als Eingangsenzym des Phenylpropanstoffwechsels und Chalkonsynthase (CHS) als wichtigstes Enzym der Flavonoidbiosynthese nehmen dabei Schlüsselpositionen ein. Die codierenden Gene gelten daher als Markergene der obligaten Farbkernbildung und weisen in den Sommer- und Herbstmonaten einen saisonalen Expressionshöhepunkt in der Splint-Kern-Übergangszone auf. Der Prozess der obligaten Kernholzbildung endet mit dem programmierten Zelltod der beteiligten Parenchyme. An *Robinia pseudoacacia* L., einem Modellbaum der obligaten Kernholzbildung, wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit die Verwendbarkeit von zwei Genen 14-3-3 und heat shock 70 als Markergene untersucht. Beide Genfamilien werden in Zusammenhang mit Signaltransduktionswegen, Transportprozessen und der Stressantwort genannt. Ein Zusammenhang mit der Farbkernbildung wird von Autoren verschiedener Veröffentlichungen vermutet. Sie gelten somit als Kandidatengene der Kernholzbildung. Mithilfe von Amplifikation mittels PCR, Klonierung und Sequenzierung konnten drei 14-3-3 Genfragmente (*Rp14-3-3Gen1-3*) und ein heat shock Genfragment (*RpHS70*) identifiziert werden. Anhand weiterführender Genexpressionsstudien mittels Real-Time PCR konnten Transkripte beider Genfamilien in sämtlichen Xylemgeweben sowie im Phloem der Robinie zu allen Jahreszeiten nachgewiesen werden. Die Transkriptmengen erwiesen sich dabei als sehr niedrig in Vergleich zum eingesetzten 18S Referenzgen. Ein für Markergene typischer, saisonaler Expressionspeak in der Splint-Kern-Übergangszone konnte in den Sommer- und Herbstmonaten nachgewiesen werden, wobei die Transkriptmengen vorwiegend niedriger als in den äußeren Geweben waren. Weder *Rp14-3-3* noch *RpHS70* können daher als Markergene der obligaten Kernholzbildung eingesetzt werden. Ein Zusammenhang mit diesem Prozess ist dennoch

wahrscheinlich.

Bisherige molekularbiologische Untersuchungen zur Kernholzbildung betrachteten allein das Gesamt(parenchym)gewebe der Splint-Kern-Übergangszone. Mikroskopische und biochemische Studien gehen jedoch von unterschiedlichen Beiträgen von axialen und radialen Parenchymen aus. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zur Lasermikrodissektion entwickelt, die eine getrennte Aufarbeitung von Axial- und Radialparenchym erlaubt. Dabei wurden zunächst Mikrotomschnitte angefertigt und mittels einer Zuckerlösung auf einen Objektträger fixiert. Die Dünnschnitte wurden gefriergetrocknet, die endgültige Fixierung erfolgte im Anschluss mit Klebestreifen. Nach separater Dissektion von Axial- bzw. Radialparenchym aus der Splint-Kern-Übergangszone erfolgte die Extraktion der RNA, reverse Transkription zu cDNA sowie die Amplifikation des Transkriptoms. Vergleichende Genexpressionsstudien an den Markergenen PAL und CHS sowie den Genen HS70 und 14-3-3 anhand von cDNA, erhalten aus (1) Axialparenchym, (2) Radialparenchym sowie (3) dem Gesamtgewebe der Splint-Kern-Übergangszone bestätigen die bereits vermutete Dominanz des Strahlparenchyms während der obligaten Farbkernbildung. Die Expressionsmuster von (2) und (3) gleichen sich in qualitativer Hinsicht sehr stark. Im Axialparenchym konnten keinerlei Transkripte der Kandidatengene HS70 und 14-3-3 sowie der Markergene PAL und CHS nachgewiesen werden, was zu der Schlussfolgerung führt, dass allein radiale Parenchyme der Splint-Kern-Übergangszone an der Flavonoidbiosynthese beteiligt sind.

6 Abkürzungsverzeichnis

2D SDS-PAGE	Twodimensional sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gelelectrophoresis
A	Adenin
AMP	Adenosinmonophosphat
BLAST	Basic local alignment search tool
bp	Basenpaar
C	Cytosin
C _T	Threshold-Wert
CHS	Chalkonsynthase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
ddH ₂ O	Reinstwasser
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESTs	Expressed sequence tags
G	Guanin
GSP	Genspezifischer Primer
HS70	Heat shock 70 Genfamilie
HSP70	Heat shock protein 70
HSC	Heat shock cognates
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
IS	Innerer Splint
Kb	Kilobase (1000 Basenpaare)
<i>lacZ</i> -Gen	Lactose-Operon
LB	Loading buffer
LB-Medium	Lysogeny broth medium
LMD	Lasermikrodissektion
LMPC	Lasermicrodissection and pressure catapulting
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure

MS	mittlerer Splint
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NR	Nitratreduktase
oPPZ	oxidativer Pentosephosphat-Zyklus
OS	Outer sapwood (äußerer Splint)
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
PCR	Polymerase chain reaction
Ph	Phloem
PPS	Phenylpropanstoffwechsel
rDNA	Ribosomale DNA
rpm	Umdrehungen pro Minute
ROX	6-Carboxy-X-rhodamin
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SOC-Medium	Super optimal growth medium
SPS	Saccharose-Phosphat Synthase
SuSy	Saccharose Synthase
SYBR Green	2-2-[(3-Dimethylamino-propyl)-propylamino]-1-phenyl-1 <i>H</i> -chinolin-4-ylidenmethyl-3-methyl-benzothiazol-3-ium-Kation
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	DNA-Polymerase (aus <i>Thermus aquaticus</i>)
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TZ	Transition zone (Splint-Kern Übergangszone)
U	Uracil
UV	Ultraviolett
TI	Thünen-Institut
qPCR	Quantitative Real-Time PCR
X-Gal	5-bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galactopyranoside

7 Literaturverzeichnis

- Abe H, Watanabe U, Yoshida K, Kuroda K, Zhang CH (2011) Changes in organelle and DNA quality, quantity and distribution in the wood of *Cryptomeria japonica* over long-term storage. *IAWA Journal* 32 (2):263-272
- Aducci P, Camoni L, Marra M, Visconti S (2002) From cytosol to organelles: 14-3-3 proteins as multifunctional regulators of plant cell. *Plant Life* 53 (1):49-55. doi:10.1080/15216540210813
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25 (17):3389-3402. doi:10.1093/nar/25.17.3389
- Anderson JV, Li QB, Haskell DW, Guy CL (1994) Structural organization of the spinach endoplasmic reticulum-luminal 70 kilodalton heat shock cognate gene and expression of 70 kilodalton heat shock genes during cold acclimation. *Plant Physiology* 104 (4):1359-1370. doi:10.1104/pp.104.4.1359
- Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HRH (2005) Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 5 (2):209-219. doi:10.1586/14737159.5.2.209
- Asano T, Masumura T, Kusano H, Kikuchi S, Kurita A, Shimada H, Kadowaki K (2002) Construction of a specialized cDNA library from plant cells isolated by laser capture microdissection: toward comprehensive analysis of the genes expressed in the rice phloem. *The Plant Journal* 32 (3):401-408. doi:10.1046/j.1365-313X.2002.01423.x
- Athwal GS, Huber JL, Huber SC (1998) Phosphorylated nitrate reductase and 14-3-3 proteins - site of interaction, effects of ions and evidence for an AMP-binding site on 14-3-3 proteins. *Plant Physiology* 118 (3):1041-1048. doi:10.1104/pp.118.3.1041
- Bamber RK (1976) Heartwood, its function and formation. *Wood Science and Technology* 10 (1):1-8. doi:10.1007/bf00376379

- Bamber RK, Fukazawa K (1985) Sapwood and heartwood: a review. *Forestry Abstracts* 46 (9):567-580
- Baqi SA, Shah JJ (1985) Histoenzymatic studies in wood of *Acacia auriculiformis* Cunn. during heartwood formation. *Holzforschung* 39 (6):311-320. doi:10.1515/hfsg.1985.39.6.311
- Benoyahu D, Akavia UD, Socher R, Shur I (2005) Gene expression in skeletal tissues: application of laser capture microdissection. *Journal of Microscopy* 220 (1):1-8. doi:10.1111/j.1365-2818.2005.01511.x
- Beritognolo I, Magel E, Abdel-Latif A, Charpentier JP, Jay-Allemand C, Breton C (2002) Expression of genes encoding chalcone synthase, flavanone 3-hydroxylase and dihydroflavonol 4-reductase correlates with flavanol accumulation during heartwood formation in *Juglans nigra*. *Tree Physiology* 22 (5):291-300. doi:10.1093/treephys/22.5.291
- Bhat K, Patel J (1982) Nuclear behaviour during heartwood formation in *Acacia auriculiformis* A. Cann. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences- Plant Sciences* 91 (2):107-114. doi:10.1007/bf03167114
- Bhat KV, Patel JD (1980) Nuclear studies in relation to heartwood formation in *Ougeinia oojeinensis* Roxb and *Garuga pinnata* Roxb. *Caryologia* 33 (4):519-526
- Bukau B, Horwich AL (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92 (3):351-366. doi:10.1016/s0092-8674(00)80928-9
- Burtin P, Jay-Allemand C, Charpentier JP, Janin G (1998) Natural wood colouring in *Juglans* sp. (*J. nigra*, *J. regia* and hybrid *J. nigra* 23 x *J. regia*) depends on native phenolic compounds accumulated in the transition zone between sapwood and heartwood. *Trees-Structure and Function* 12:258-264
- Butland SL, Chow ML, Ellis BE (1998) A diverse family of phenylalanine ammonia-lyase genes expressed in pine trees and cell cultures. *Plant Molecular Biology* 37 (1):15-24. doi:10.1023/a:1005941228246
- Campbell MM, Ellis BE (1992) Fungal elicitor-mediated responses in pine cell-cultures. 3. Purification and characterization of phenylalanine ammonia-lyase. *Plant Physiology* 98 (1):62-70. doi:10.1104/pp.98.1.62

- Chen Y-J, Wu M-F, Yu Y-H, Tam MF, Lin T-Y (2004) Developmental expression of three mungbean Hsc70s and substrate-binding specificity of the encoded proteins. *Plant and Cell Physiology* 45 (11):1603-1614. doi:10.1093/pcp/pch182
- Chen ZT, Fu HI, Liu D, Chang PFL, Narasimhan M, Ferl R, Hasegawa PM, Bressan RA (1994) A NaCl-regulated plant gene encoding a brain protein homolog that activates ADP ribosyltransferase and inhibits protein-kinase C. *The Plant Journal* 6 (5):729-740. doi:10.1046/j.1365-313X.1994.6050729.x
- Clark D, Pazdernik N (2009) *Molekulare Biotechnologie. Grundlagen und Anwendungen.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Climent J, Gil L, Pardos JA (1998) Xylem anatomical traits related to resinous heartwood formation in *Pinus canariensis* Sm. *Trees-Structure and Function* 12 (3):139-145. doi:10.1007/pl00009703
- Comparot S, Lingiah G, Martin T (2003) Function and specificity of 14-3-3 proteins in the regulation of carbohydrate and nitrogen metabolism. *Journal of Experimental Botany* 54 (382):595-604. doi:10.1093/jxb/erg057
- Day RC, Grossniklaus U, Macknight RC (2005) Be more specific! Laser-assisted microdissection of plant cells. *Trends in Plant Science* 10 (8):397-406. doi:10.1016/j.tplants.2005.06.006
- De Filippis L, Magel E (1998) Differences in genomic DNA extracted from bark and from wood of different zones in Robinia trees using RAPD-PCR. *Trees-Structure and Function* 12 (6):377-384
- De Filippis L, Magel E (2012) Identification of biochemical differences between the sapwood and transition zone in *Robinia pseudoacacia* L. by differential display of proteins. *Holzforschung* 66 (4):543-549. doi:10.1515/hf.2011.178
- Deeken R, Ache P, Kajahn I, Klinkenberg J, Bringmann G, Hedrich R (2008) Identification of *Arabidopsis thaliana* phloem RNAs provides a search criterion for phloem-based transcripts hidden in complex datasets of microarray experiments. *The Plant Journal* 55 (5):746-759. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03555.x

- Dehon L, Macheix JJ, Durand M (2002) Involvement of peroxidases in the formation of the brown coloration of heartwood in *Juglans nigra*. *Journal of Experimental Botany* 53 (367):303-311. doi:10.1093/jexbot/53.367.303
- Déjardin A, Laurans F, Arnaud D, Breton C, Pilate G, Leplé JC (2010) Wood formation in angiosperms. *Comptes Rendus Biologies* 333 (4):325-334. doi:10.1016/j.crv.2010.01.010
- DeLille JM, Sehnke PC, Ferl RJ (2001) The *Arabidopsis* 14-3-3 family of signaling regulators. *Plant Physiology* 126 (1):35-38. doi:10.1104/pp.126.1.35
- Dellus V, Scalbert A, Janin G (1997a) Polyphenols and colour of Douglas fir heartwood. *Holzforschung* 51 (4):291-295. doi:10.1515/hfsg.1997.51.4.291
- Dellus V, Mila I, Scalbert A, Menard C, Michon V, Herve du Penhoat CLM (1997b) Douglas-fir polyphenols and heartwood formation. *Phytochemistry* 45 (8):1573-1578. doi:10.1016/s0031-9422(97)00245-8
- Denison FC, Paul AL, Zupanska AK, Ferl RJ (2011) 14-3-3 proteins in plant physiology. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 22 (7):720-727. doi:10.1016/j.semcd.2011.08.006
- Dhaubhadel S, Li XY (2010) A new client for 14-3-3 proteins: GmMYB176, an R1 MYB transcription factor. *Plant Signaling and Behavior* 5 (7):921-923. doi:10.4161/psb.5.7.12133
- Dujesiefken D, Liese W (2008) Das CODIT-Prinzip. Von den Bäumen lernen für eine fachgerechte Baumpflege. Haymarket Media Verlag, Braunschweig
- Ellis RJ, van der Vies SM (1991) Molecular chaperones. *Annual Review of Biochemistry* 60 (1):321-347. doi:10.1146/annurev.bi.60.070191.001541
- Emi T, Kinoshita T, Shimazaki K-i (2001) Specific binding of vf14-3-3a isoform to the plasma membrane H⁺-ATPase in response to blue light and fusicoccin in guard cells of broad bean. *Plant Physiology* 125 (2):1115-1125. doi:10.1104/pp.125.2.1115
- Faktor O, Kooter JM, Dixon RA, Lamb CJ (1996) Functional dissection of a bean chalcone synthase gene promoter in transgenic tobacco plants reveals

- sequence motifs essential for floral expression. *Plant Molecular Biology* 32 (5):849-859. doi:10.1007/bf00020482
- Fang SS, Li LH, Cui BY, Men SZ, Shen YQ, Yang X (2013) Structural insight into plant programmed cell death mediated by BAG proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 69:934-945. doi:10.1107/s0907444913003624
- Ferl RJ, Chung HJ, Sehnke PC (1999) The 14-3-3 proteins: cellular regulators of plant metabolism. *Trends in Plant Science* 4 (11):463-463
- Finnegan MCM, Goepel JR, Hancock BW, Goyns MH (1993) Investigation of the expression of housekeeping genes in non-hodgkins-lymphoma. *Leukemia & Lymphoma* 10 (4-5):387-393. doi:10.3109/10428199309148565
- Finnie C, Borch J, Collinge DB (2000) 14-3-3 proteins: eukaryotic regulatory proteins with many functions. *Plant Molecular Biology* 40 (4):545-554
- Freudenberg K, Hartmann L (1954) Inhaltsstoffe der *Robinia pseudoacacia*. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* 587 (3):207-212
- Fu H, Subramanian RR, Masters SC (2000) 14-3-3 Proteins: structure, function and regulation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 40 (1):617-647. doi:10.1146/annurev.pharmtox.40.1.617
- Fukazawa K, Higuchi T (1966) Studies on the mechanism of heartwood formation. IV. RNA content in the ray parenchyma cells. *Journal of the Japan Wood Research Society* 12 (5):221-226
- Furtado EL, Rosa DB, Zamprogno KC, Marino CL, Wilcken CF, Velini ED, Mori ES, Guerrini IA (2007) 14-3-3: defense and regulatory proteins coding by *Eucalyptus* genome. *Scientia Forestalis* 35 (73):9-18
- Gething M-J, Sambrook J (1992) Protein folding in the cell. *Nature* 355 (6355):33-45. doi:10.1038/355033a0
- Goldsworthy SM, Stockton PS, Trempus CS, Foley JF, Maronpot RR (1999) Effects of fixation on RNA extraction and amplification from laser capture microdissected tissue. *Molecular Carcinogenesis* 25 (2):86-91. doi:10.1002/(sici)1098-2744(199906)25:2<86::aid-mc2>3.0.co;2-4

- Goué N, Noël-Boizot N, Vallance M, Magel E, Label P (2012) Microdissection to isolate vascular cambium cells in poplar. *Silva Fennica* 46 (1):5-16
- Goué N, Lesage-Descauses M-C, Mellerowicz EJ, Magel E, Label P, Sundberg B (2008) Microgenomic analysis reveals cell type-specific gene expression patterns between ray and fusiform initials within the cambial meristem of *Populus*. *New Phytologist* 180 (1):45-56. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02556.x
- Goujon T, Sibout R, Eudes A, MacKay J, Joulanin L (2003) Genes involved in the biosynthesis of lignin precursors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* 41 (8):677-687. doi:10.1016/s0981-9428(03)00095-0
- Hahlbrock K (1981) Flavonoids. In: Stumpf PK, Conn EE (eds) *The biochemistry of plants: a comprehensive treatise. Secondary plant products. Vol 7.* Academic Press, New York, pp 425-456
- Hahlbrock K, Scheel D (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40:347-369. doi:10.1146/annurev.pp.40.060189.002023
- Hanson KR, Havir EA (1981) Phenylalanine ammonia-lyase. In: Conn EE (ed) *The biochemistry of plants: a comprehensive treatise. Secondary plant products. Vol 7.* Academic Press, New York, pp 577-625
- Hart JH, Johnson KC (1970) Production of decay-resistant sapwood in response to injury. *Wood Science and Technology* 4 (4):267-272
- Hartl FU, Hayer-Hartl M (2002) Protein folding - molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295 (5561):1852-1858. doi:10.1126/science.1068408
- Hauch S, Magel E (1998) Extractable activities and protein content of sucrose-phosphate synthase, sucrose synthase and neutral invertase in trunk tissues of *Robinia pseudoacacia* L. are related to cambial wood production and heartwood formation. *Planta* 207 (2):266-274. doi:10.1007/s004250050482
- Heller W, Forkmann G (1988) Biosynthesis. In: Harborne JB (ed) *The flavonoids: advances in research since 1980.* Chapman and Hall, New York, pp 400-426

- Hergert HL (1977) Secondary lignification in conifer trees. In: Jett C, Arthur J (eds) Cellulose chemistry and technology. ACS Symposium Series. Vol 48. American Chemical Society, New York, pp 227-243. doi:10.1021/bk-1977-0048.ch016
- Higuchi T, Onda Y, Fujimoto Y (1969) Studies on the mechanism of heartwood formation. VIII. Biochemical aspects of heartwood formation, with special reference to the site of biogenesis of heartwood compounds. Wood Research (48):15-30
- Hillinger C, Holl W, Ziegler H (1996) Lipids and lipolytic enzymes in the trunkwood of *Robinia pseudoacacia* L during heartwood formation. 1. Radial distribution of lipid classes. Trees-Structure and Function 10 (6):366-375. doi:10.1007/bf02185640
- Hillis WE (1968) Chemical aspects of heartwood formation. Wood Science and Technology 2 (4):241-259. doi:10.1007/bf00350271
- Hillis WE (1977) Secondary changes in wood. In: Loewus F, Runeckles VC (eds) The structure, biosynthesis and degradation of wood. Vol 11. Springer US, New York, pp 247-309. doi:10.1007/978-1-4615-8873-3_7
- Hillis WE (1987) Heartwood and tree exudates. Springer Verlag, Berlin
- Höll W, Lenzian K (1973) Respiration in sapwood and heartwood of *Robinia pseudoacacia*. Phytochemistry 12 (5):975-977. doi:10.1016/0031-9422(73)85002-2
- Holzapfel B, Wickert L (2007) Die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. Biologie in unserer Zeit 37 (2):120-126. doi:10.1002/biuz.200610332
- Hrazdina G, Jensen RA (1992) Spatial organization of enzymes in plant metabolic pathways. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 43:241-267
- Huang LK, Yan HD, Jiang XM, Zhang XQ, Zhang YW, Huang X, Zhang Y, Miao JM, Xu B, Frazier T, Zhao BY (2014) Evaluation of candidate reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in switchgrass under various abiotic

- stress conditions. *Bioenergy Research* 7 (4):1201-1211. doi:10.1007/s12155-014-9457-1
- Huang Z, Tsai CJ, Harding S, Meilan R, Woeste K (2010) A cross-species transcriptional profile analysis of heartwood formation in black walnut. *Plant Molecular Biology Reporter* 28 (2):222-230. doi:10.1007/s11105-009-0144-x
- Huang Z, Surana P, Kihara D, Meilan R, Woeste K (2011) *JnCML-like*, an EF-hand motif-containing gene seasonally upregulated in the transition zone of black walnut (*Juglans nigra* L.). *American Journal of Molecular Biology* 1:140-155
- Huber SC, Israel DW (1982) Biochemical basis for partitioning of photosynthetically fixed carbon between starch and sucrose in soybean (*Glycine max* Merr.) leaves. *Plant Physiology* 69 (3):691-696. doi:10.1104/pp.69.3.691
- IAWA (1964) Multilingual glossary of terms used in wood anatomy, Vol 40. Verlagsanstalt Buchdruckerei Konkordia, Winterthur
- Johnson C, Crowther S, Stafford MJ, Campbell DG, Toth R, MacKintosh C (2010) Bioinformatic and experimental survey of 14-3-3-binding sites. *The Biochemical journal* 427 (1):69-78
- Jones DH, Ley S, Aitken A (1995) Isoforms of 14-3-3-protein can form homodimers and heterodimers *in-vivo* and *in-vitro* - implications for function as adapter proteins. *FEBS Letters* 368 (1):55-58. doi:10.1016/0014-5793(95)00598-4
- Joos HJ, Hahlbrock K (1992) Phenylalanine ammonia-lyase in potato (*Solanum tuberosum* L) - genomic complexity, structural comparison of 2 selected genes and modes of expression. *European Journal of Biochemistry* 204 (2):621-629. doi:10.1111/j.1432-1033.1992.tb16675.x
- Jozefczuk J, Adjaye J (2011) Quantitative real-time PCR-based analysis of gene expression. In: Daniel Jameson MV, Hans VW (eds) *Methods in Systems Biology. Methods in Enzymology*. Vol 500. Academic Press, San Diego, pp 99-109. doi:10.1016/B978-0-12-385118-5.00006-2
- Ke D, Saltveit jr. E (1988) Plant hormone interaction and phenolic metabolism in the regulation of russet spotting in iceberg lettuce. *Plant Physiology* 88:1136-1140

- Kehr J (2003) Single cell technology. *Current Opinion in Plant Biology* 6 (6):617-621. doi:10.1016/j.pbi.2003.09.002
- Kerk NM, Ceserani T, Tausta SL, Sussex IM, Nelson TM (2003) Laser capture microdissection of cells from plant tissues. *Plant Physiology* 132 (1):27-35. doi:10.1104/pp.102.018127
- Kim B-R, Nam H-Y, Kim S-U, Kim S-I, Chang Y-J (2003) Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. *Biotechnology Letters* 25 (21):1869-1872. doi:10.1023/a:1026298032009
- Knoop V, Müller K (2009) *Gene und Stammbäume*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Kreuzaler F, Ragg H, Heller W, Tesch R, Witt I, Hammer D, Hahlbrock K (1979) Flavanone synthase from *Petroselinum hortense* - molecular weight, subunit composition, size of messenger RNA and absence of pantetheinyl residue. *European Journal of Biochemistry* 99 (1):89-96. doi:10.1111/j.1432-1033.1979.tb13235.x
- Kuchipudi SV, Tellabati M, Nelli RK, White GA, Perez BB, Sebastian S, Slomka MJ, Brookes SM, Brown IH, Dunham SP, Chang KC (2012) 18S rRNA is a reliable normalisation gene for real-time PCR based on influenza virus infected cells. *Virology Journal* 9. doi:10.1186/1743-422x-9-230
- Kuroda H, Shimaji K (1983) Distribution of coloring substances in Sugi heartwood. *Holzforschung* 37 (5):225-230. doi:10.1515/hfsg.1983.37.5.225
- Kuroda K, Fujiwara T, Hashida K, Imai T, Kushi M, Saito K, Fukushima K (2014) The accumulation pattern of ferruginol in the heartwood-forming *Cryptomeria japonica* xylem as determined by time-of-flight secondary ion mass spectrometry and quantity analysis. *Annals of Botany* 113 (6):1029-1036. doi:10.1093/aob/mcu028
- Kwok S, Chang SY, Sninsky JJ, Wang A (1994) A guide to the design and use of mismatched and degenerate primers. *Genome Research* 3 (4):S39-S47
- Kwon M, Davin LB, Lewis NG (2001) *In situ* hybridization and immunolocalization of lignan reductases in woody tissues: implications for heartwood formation and

- other forms of vascular tissue preservation. *Phytochemistry* 57 (6):899-914.
doi:10.1016/s0031-9422(01)00108-x
- Lalitha S (2000) Primer Premier 5. *Biotech Software & Internet Report* 1 (6):270-272.
doi:10.1089/152791600459894
- Lamlom SH, Savidge RA (2006) Carbon content variation in boles of mature sugar maple and giant sequoia. *Tree Physiology* 26 (4):459-468
- Lange H (2009) Molekulare Grundlagen von Verfärbungsprozessen im Holz der Robinie (*Robinia pseudoacacia* L.): Genexpressionsstudien an Schlüsselgenen der Flavonoidsynthese. Dissertation, Universität Hamburg, Hamburg
- Lapointe G, Luckevich MD, Cloutier M, Seguin A (2001) 14-3-3 gene family in hybrid poplar and its involvement in tree defense against pathogens. *Journal of Experimental Botany* 52 (359):1331-1338. doi:10.1093/jexbot/52.359.1331
- Larisch C (2013) Laser Mikrodisektion als Tool für gewebespezifische Expressionsanalysen in Pflanzen: Methodik und Anwendung. Universitätsbibliothek der Universität Würzburg, Würzburg
- Larisch C, Dittrich M, Wildhagen H, Lautner S, Fromm J, Polle A, Hedrich R, Rennenberg H, Müller T, Ache P (2012) Poplar wood rays are involved in seasonal remodeling of tree physiology. *Plant Physiology* 160 (3):1515-1529. doi:10.1104/pp.112.202291
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23 (21):2947-2948. doi:10.1093/bioinformatics/btm404
- Lawton MA, Lamb CJ (1987) Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitor, wounding and infection. *Molecular and Cellular Biology* 7 (1):335-341
- Li QB, Haskell DW, Guy CL (1999) Coordinate and non-coordinate expression of the stress 70 family and other molecular chaperones at high and low temperature in spinach and tomato. *Plant Molecular Biology* 39 (1):21-34. doi:10.1023/a:1006100532501

- Li XY, Dhaubhadel S (2011) Soybean 14-3-3 gene family: identification and molecular characterization. *Planta* 233 (3):569-582. doi:10.1007/s00425-010-1315-6
- Li XY, Chen L, Dhaubhadel S (2012) 14-3-3 proteins regulate the intracellular localization of the transcriptional activator GmMYB176 and affect isoflavonoid synthesis in soybean. *The Plant Journal* 71 (2):239-250. doi:10.1111/j.1365-313X.2012.04986.x
- Liese W, Dujesiefken D (1989) Wundreaktionen bei Laubbäumen. Paper presented at the Tagungsbericht, 2. Symposium, Ausgewählte Probleme der Gehölzphysiologie - Gehölze, Mikroorganismen und Umwelt, Tharandt, 13. – 16. Juni
- Lindquist S, Craig EA (1988) The heat shock proteins. *Annual Review of Genetics* 22 (1):631-677. doi:10.1146/annurev.ge.22.120188.003215
- Logemann E, Parniske M, Hahlbrock K (1995) Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (13):5905-5909. doi:10.1073/pnas.92.13.5905
- Lorenz WW, Sun F, Liang C, Kolychev D, Wang HM, Zhao X, Cordonnier-Pratt MM, Pratt LH, Dean JFD (2006) Water stress-responsive genes in loblolly pine (*Pinus taeda*) roots identified by analyses of expressed sequence tag libraries. *Tree Physiology* 26 (1):1-16
- Lu GH, Sehnke PC, Ferl RJ (1994) Phosphorylation and calcium-binding properties of an *Arabidopsis* GF14 brain protein homolog. *Plant Cell* 6 (4):501-510
- Magel E (2000) Biochemistry and physiology of heartwood formation. In: Savidge R, Barnett J, Napier R (eds) *Cell and molecular biology of wood formation* BIOS Scientific Publishers, Oxford, pp 363-376
- Magel E (2001) Physiology of cambial growth, storage of reserves and heartwood formation. In: Huttunen S, Heikkilä H, Bucher J, Sundberg B, Jarvis P, Matyssek R (eds) *Trends in european forest tree physiology research*. Vol 2. Kluwer Academic Press, Netherlands, pp 19-32

- Magel E (2002) Biochemistry and quantitative histochemistry of wood. In: Chaffey N (ed) Wood formation in trees: cell and molecular biology techniques. Taylor & Francis Ltd, London, pp 229-243. doi:10.1201/9780203166444.ch14
- Magel E, Höll W (1993) Storage carbohydrates and adenine nucleotides in trunks of *Fagus sylvatica* L. in relation to discolored wood. *Holzforschung* 47 (1):19-24. doi:10.1515/hfsg.1993.47.1.19
- Magel E, Hübner B (1997) Distribution of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase within trunks of *Robinia pseudoacacia* L. *Botanica Acta* 110 (4):314-322
- Magel E, Jay-Allemand C, Ziegler H (1994) Formation of heartwood substances in the stemwood of *Robinia pseudoacacia* L. II. Distribution of nonstructural carbohydrates and wood extractives across the trunk. *Trees-Structure and Function* 8 (4):165-171. doi:10.1007/bf00196843
- Magel E, Abdel-Latif A, Hampp R (2001a) Non-structural carbohydrates and catalytic activities of sucrose metabolizing enzymes in trunks of two *Juglans* species and their role in heartwood formation. *Holzforschung* 55 (2):135-145. doi:10.1515/hf.2001.022
- Magel E, Hauch S, De Filippis L (2002) Random amplification of polymorphic DNA and reverse transcription polymerase chain reaction of RNA in studies of sapwood and heartwood. In: Chaffey N (ed) Wood formation in trees: cell and molecular biology techniques. Taylor & Francis Ltd, London, pp 319-337
- Magel E, Drouet A, Claudot A, Ziegler H (1991) Formation of heartwood substances in the stem of *Robinia pseudoacacia* L. *Trees-Structure and Function* 5 (4):203-207. doi:10.1007/bf00227526
- Magel E, Hillinger C, Höll W, Ziegler H (1997) Biochemistry and physiology of heartwood formation: role of reserve substances. In: Rennenberg H, Eschrich W, Ziegler H (eds) *Trees: contributions to modern tree physiology*. Backhuys Publishers, Leiden, pp 477-506
- Magel E, Hillinger C, Wagner T, Höll W (2001b) Oxidative pentose phosphate pathway and pyridine nucleotides in relation to heartwood formation in *Robinia pseudoacacia* L. *Phytochemistry* 57 (7):1061-1068. doi:10.1016/s0031-9422(01)00091-7

- Martins PK, Jordao BQ, Yamanaka N, Farias JRB, Beneventi MA, Binneck E, Fuganti R, Stolf R, Nepomuceno AL (2008) Differential gene expression and mitotic cell analysis of the drought tolerant soybean (*Glycine max* L. Merrill Fabales, Fabaceae) cultivar MG/BR46 (Conquista) under two water deficit induction systems. *Genetics and Molecular Biology* 31 (2):512-521
- Matsushita Y, Jang IC, Imai T, Takama R, Saito K, Masumi T, Lee SC, Fukushima K (2012) Distribution of extracts including 4,8-dihydroxy-5-methoxy-2-naphthaldehyde in *Diospyros kaki* analyzed by gas chromatography-mass spectrometry and time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Holzforschung* 66 (6):705-709. doi:10.1515/hf-2011-0214
- Matyssek R, Fromm J, Rennenberg H, Roloff A (2010) *Biologie der Bäume*. Eugen Ulmer, Stuttgart
- May T, Soll J (2000) 14-3-3 proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants. *The Plant Cell Online* 12 (1):53-64
- Mayer I, Koch G, Puls J (2006) Topochemical investigations of wood extractives and their influence on colour changes in american black cherry (*Prunus serotina* Borkh.). *Holzforschung* 60 (6):589-594. doi:10.1515/hf.2006.100
- Messing J (1983) New M13 vectors for cloning. In: Wu R, Grossman L, Moldave K (eds) *Recombinant DNA Part C. Methods in Enzymology*. Vol 101. Academic Press, San Diego, pp 20-78
- Miernyk JA, Duck NB, Shatters RG, Folk WR (1992) The 70 kilodalton heat shock cognate can act as a molecular chaperone during the membrane translocation of a plant secretory protein precursor. *Plant Cell* 4 (7):821-829
- Moore BW, Perez VJ (1968) Specific acidic proteins of the nervous system. In: Carlson F (ed) *Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration*. Prentice Hall, New Jersey, pp 343-359
- Moorhead G, Douglas P, Cotelle V, Harthill J, Morrice N, Meek S, Deiting U, Stitt M, Scarabel M, Aitken A, MacKintosh C (1999) Phosphorylation-dependent interactions between enzymes of plant metabolism and 14-3-3 proteins. *The Plant Journal* 18 (1):1-12. doi:10.1046/j.1365-313X.1999.00417.x

- Morimoto RI (1998) Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones and negative regulators. *Genes & Development* 12 (24):3788-3796. doi:10.1101/gad.12.24.3788
- Müller H-J (2001) PCR Polymerase-Kettenreaktion. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Muslin AJ, Tanner JW, Allen PM, Shaw AS (1996) Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* 84 (6):889-897. doi:10.1016/s0092-8674(00)81067-3
- Nagasaki T, Yasuda S, Imai T (2002) Immunohistochemical localization of agatharesinol, a heartwood norlignan, in *Cryptomeria japonica*. *Phytochemistry* 60 (5):461-466. doi:10.1016/s0031-9422(02)00141-3
- Nair MNB, Shah JJ, Pandalai RC (1981) Wood anatomy and histochemical-changes of sapwood during heartwood formation in *Bridelia retusa* Spreng. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences- Plant Sciences* 90 (5):425-433
- Nakaba S, Kubo T, Funada R (2008) Differences in patterns of cell death between ray parenchyma cells and ray tracheids in the conifers *Pinus densiflora* and *Pinus rigida*. *Trees-Structure and Function* 22 (5):623-630. doi:10.1007/s00468-008-0220-0
- Nakaba S, Yamagishi Y, Sano Y, Funada R (2012) Temporally and spatially controlled death of parenchyma cells is involved in heartwood formation in pith regions of branches of *Robinia pseudoacacia* var. *inermis*. *Journal of Wood Science* 58 (1):69-76. doi:10.1007/s10086-011-1221-y
- Nakazono M, Qiu F, Borsuk LA, Schnable PS (2003) Laser capture microdissection, a tool for the global analysis of gene expression in specific plant cell types: identification of genes expressed differentially in epidermal cells or vascular tissues of maize. *Plant Cell* 15 (3):583-596. doi:10.1105/tpc.008102
- Neupert W (1997) Protein import into mitochondria. *Annual Review of Biochemistry* 66:863-917. doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.863

- Nobuchi T, Harada H (1983) Physiological features of the "white zone" of Sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don)- cytological structure and moisture content. *Mokuzai Gakkaishi* 29 (12):824-832
- Nobuchi T, Harada H (1985) Ultrastructural changes in parenchyma cells of Sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) associated with heartwood formation. *Mokuzai Gakkaishi* 31 (12):965-973
- Nobuchi T, Sato R, Iwata R, Harada H (1984) Season of heartwood formation and the related cytological structure of ray parenchyma cells in *Robinia pseudoacacia* L. *Mokuzai Gakkaishi* 30:628-636
- Nollen EAA, Morimoto RI (2002) Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *Journal of Cell Science* 115 (14):2809-2816
- Oda K, Matsumura J, Tsutsumi J, Abe Z (1994) Black-heartwood formation and ash contents in the stem of Sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don.). *Science Bulletin of the Faculty of Agriculture Kyushu University* 48 (3-4):171-176
- Oecking C, Hagemann K (1999) Association of 14-3-3 proteins with the C-terminal autoinhibitory domain of the plant plasma-membrane H⁺-ATPase generates a fusicoccin-binding complex. *Planta* 207 (3):480-482. doi:10.1007/s004250050507
- Oecking C, Piotrowski M, Hagemeyer J, Hagemann K (1997) Topology and target interaction of the fusicoccin-binding 14-3-3 homologs of *Commelina communis*. *The Plant Journal* 12 (2):441-453. doi:10.1046/j.1365-3113.1997.12020441.x
- Okada N, Hirakawa Y, Katayama Y (2011) Application of activable tracers to investigate radial movement of minerals in the stem of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*). *Journal of Wood Science* 57 (5):421-428. doi:10.1007/s10086-011-1188-8
- Okada N, Hirakawa Y, Katayama Y (2012) Radial movement of sapwood-injected rubidium into heartwood of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) in the growing period. *Journal of Wood Science* 58 (1):1-8. doi:10.1007/s10086-011-1218-6

- Olbrich M, Gerstner E, Welzl G, Fleischmann F, Osswald W, Bahnweg G, Ernst D (2008) Quantification of mRNAs and housekeeping gene selection for quantitative real-time RT-PCR normalization in European beech (*Fagus sylvatica* L.) during abiotic and biotic stress. *Zeitschrift Fuer Naturforschung Section C-A Journal of Biosciences* 63 (7-8):574-582
- Palmgren MG (1998) Proton gradients and plant growth: role of the plasma membrane H⁺-ATPase. In: Callow JA (ed) *Advances in Botanical Research*. Vol 28. Academic Press, San Diego, pp 1-70
- Palmgren MG, Fuglsang AT, Jahn T (1998) Deciphering the role of 14-3-3 proteins. *Experimental Biology Online* 3 (4)
- Parsell DA, Lindquist S (1993) The function of heat shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annual Review of Genetics* 27:437-496
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29 (9):2002-2007
- Piotrowski M, Oecking C (1998) Five new 14-3-3 isoforms from *Nicotiana tabacum* L.: implications for the phylogeny of plant 14-3-3 proteins. *Planta* 204 (1):127-130
- Plambeck T (2012) Erarbeitung genspezifischer Primer für das 14-3-3 Protein von *Robinia pseudoacacia*. Bachelor Thesis, Universität Hamburg, Hamburg
- PREMIER-Biosoft (1994) PCR primer design guidelines. http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html. Abgerufen am 28.02.2014 2014
- Qiagen (2001) QIAGEN® PCR cloning handbook. <http://www.qiagen.com/products/cloning/pcrcloningsystem/qiagenpcrcloningkit.aspx#Tabs=t2>. Abgerufen am 01.03 2012
- Qiagen (2011) QuantiTect® Whole Transcriptome handbook. <http://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=6910f167-e4ae-43a2-b87d-26a74c55a75c&lang=en>. Abgerufen am 09.02.2015

- Rachmayanti Y, Leinemann L, Gailing O, Finkeldey R (2009) DNA from processed and unprocessed wood: factors influencing the isolation success. *Forensic Science International: Genetics* 3 (3):185-192. doi:10.1016/j.fsigen.2009.01.002
- Richter HG, Dallwitz MJ (2000) Commercial timbers: descriptions, illustrations, identification and information retrieval. <http://delta-intkey.com/wood/de/www/papropse.htm>. Abgerufen am 21.01.2014
- Richter HG, Waitkus C (2001) Die Robinie und ihr Holz. BFH Infoblatt. Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft, Hamburg
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 245 (2):154-160. doi:10.1006/abio.1996.9916
- Roberts MR (2000) Regulatory 14-3-3 protein-protein interactions in plant cells. *Current Opinion in Plant Biology* 3 (5):400-405. doi:10.1016/s1369-5266(00)00103-5
- Roberts MR (2003) 14-3-3 proteins find new partners in plant cell signalling. *Trends in Plant Science* 8 (5):218-223. doi:10.1016/s1360-1385(03)00056-6
- Roberts MR, Bowles DJ (1999) Fusicoccin, 14-3-3 proteins and defense responses in tomato plants. *Plant Physiology* 119 (4):1243-1250. doi:10.1104/pp.119.4.1243
- Rosenquist M, Alsterfjord M, Larsson C, Sommarin M (2001) Data mining the *Arabidopsis* genome reveals fifteen 14-3-3 genes. Expression is demonstrated for two out of five novel genes. *Plant Physiology* 127 (1):142-149. doi:10.1104/pp.127.1.142
- Roux DG, Paulus E (1962) Condensed tannins. 13. Interrelationships of flavonoid components from heartwood of *Robinia pseudacacia*. *Biochemical Journal* 82 (2):324-&
- Rubin MA (2001) Use of laser capture microdissection, cDNA microarrays and tissue microarrays in advancing our understanding of prostate cancer. *Journal of Pathology* 195 (1):80-86. doi:10.1002/path.892

- SABiosciences (2008) Designing & validating real-time PCR primers. <http://www.sabiosciences.com/pathwaymagazine/pathways7/designing-validating-real-time-pcr-primers.php>. Abgerufen am 01.02. 2012
- Sachs IB, Ward JC, Bulgrin EH (1966) Heartwood stain in red oak. Holz als Roh- und Werkstoff 24 (10):489-497. doi:10.1007/bf02612881
- Sachsee H (1967) Über das Wasser/Gas-Verhältnis im Holzporenraum lebender Bäume im Hinblick auf die Kernbildung. Holz als Roh- und Werkstoff 25 (8):291-303. doi:10.1007/bf02615679
- Sambrook J, Russel DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. 3 edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sauter JJ, Witt W (1997) Structure and function of rays: storage, mobilization, transport. In: Rennenberg H, Eschrich W, Ziegler H (eds) Trees: contributions to modern tree physiology. Backhuys Publishers, Leiden, pp 177-195
- Schrimpf G (2002) Gentechnische Methoden. 3 edn. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
- Schuller A, Kehr J, Ludwig-Muller J (2014) Laser microdissection coupled to transcriptional profiling of *Arabidopsis* roots inoculated by *Plasmodiophora brassicae* indicates a role for brassinosteroids in clubroot formation. Plant and Cell Physiology 55 (2):392-411. doi:10.1093/pcp/pct174
- Schütt P (2006) *Robinia pseudoacacia* L. In: Schütt P, Weisgerber H, Schuck H, Lang U, Stimm B, Roloff A (eds) Enzyklopädie der Laubbäume. Nikol Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, Hamburg, pp 513-529
- Seehaus K, Tenhaken R (1998) Cloning of genes by mRNA differential display induced during the hypersensitive reaction of soybean after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. Plant Molecular Biology 38 (6):1225-1234
- Sehnke PC, Chung HJ, Wu K, Ferl RJ (2001) Regulation of starch accumulation by granule-associated plant 14-3-3 proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98 (2):765-770. doi:10.1073/pnas.021304198

- Shah JJ, Baqui S, Pandalai RC, Patel KR (1981) Histochemical changes in *Acacia nilotica* L. during transition from sapwood to heartwood. IAWA Bulletin 2 (1):31-36
- Shain L, Hillis WE (1973) Ethylene production in xylem of *Pinus radiata* in relation to heartwood formation. Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique 51 (7):1331-1335
- Shigo AL (1979) Tree decay. An expanded concept. USDA Agriculture Information Bulletin (419):73 pp.
- Shigo AL (1984) Compartmentalization - a conceptual framework for understanding how trees grow and defend themselves. Annual Review of Phytopathology 22:189-214. doi:10.1146/annurev.py.22.090184.001201
- Shigo AL, Hillis WE (1973) Heartwood, discolored wood and microorganisms in living trees. Annual Review of Phytopathology 11:197-222. doi:10.1146/annurev.py.11.090173.001213
- Shigo AL, Marx HG (1977) Compartmentalization of decay in trees. USDA Agriculture Information Bulletin 405:1-73
- Soares-Cavalcanti NM, Belarmino LC, Kido EA, Pandolfi V, Marcelino-Guimaraes FC, Rodrigues FA, Pereira GAG, Benko-Iseppon AM (2012) Overall picture of expressed heat shock factors in *Glycine max*, *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. Genetics and Molecular Biology 35 (1):247-259
- Song K, Liu B, Jiang X, Yin Y (2011) Cellular changes of tracheids and ray parenchyma cells from cambium to heartwood in *Cunninghamia lanceolata*. Journal of Tropical Forest Science 23 (4):478-487
- Spicer R (2005) Senescence in secondary xylem: heartwood formation as an active developmental program. In: Holbrook NM, Zwieniecki MA (eds) Vascular transport in plants. Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp 457-475. doi:10.1016/B978-012088457-5/50024-1
- Staub U, Polivka H, Gross HJ (1995) 2 rapid microscale procedures for isolation of total RNA from leaves rich in polyphenols and polysaccharides - application for sensitive detection of grapevine viroids. Journal of Virological Methods 52 (1-2):209-218. doi:10.1016/0166-0934(94)00165-d

- Stitt M, Wilke I, Feil R, Heldt HW (1988) Coarse control of sucrose-phosphate synthase in leaves - alterations of the kinetic-properties in response to the rate of photosynthesis and the accumulation of sucrose. *Planta* 174 (2):217-230. doi:10.1007/bf00394774
- Sumioka A, Nagaishi S, Yoshida T, Lin A, Miura M, Suzuki T (2005) Role of 14-3-3 γ in FE65-dependent gene transactivation mediated by the amyloid β -protein precursor cytoplasmic fragment. *Journal of Biological Chemistry* 280 (51):42364-42374. doi:10.1074/jbc.M504278200
- Sung DY, Kaplan F, Guy CL (2001a) Plant Hsp70 molecular chaperones: protein structure, gene family, expression and function. *Physiologia Plantarum* 113 (4):443-451. doi:10.1034/j.1399-3054.2001.1130402.x
- Sung DY, Vierling E, Guy CL (2001b) Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis* Hsp70 gene family. *Plant Physiology* 126 (2):789-800. doi:10.1104/pp.126.2.789
- Sze H, Li XH, Palmgren MG (1999) Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: regulation and biosynthesis. *Plant Cell* 11 (4):677-689. doi:10.1105/tpc.11.4.677
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28 (10):2731-2739. doi:10.1093/molbev/msr121
- Taylor A, Gartner B, Morrell J (2002) Heartwood formation and natural durability - a review. *Wood and Fiber Science* 34 (4):587-611
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology* 75 (2-3):291-295. doi:10.1016/S0168-1656(99)00163-7
- Toroser D, Athwal GS, Huber SC (1998) Site-specific regulatory interaction between spinach leaf sucrose-phosphate synthase and 14-3-3 proteins. *FEBS Letters* 435 (1):110-114. doi:10.1016/S0014-5793(98)01048-5

- Ucar MB, Ucar G (2011) Characterization of methanol extracts from *Quercus hartwissiana* wood and bark. *Chemistry of Natural Compounds* 47 (5):697-703
- Uggla C, Sundberg B (2002) Sampling of cambial region tissues for high resolution analysis. In: Chaffey N (ed) *Wood formation in trees: cell and molecular biology techniques*. Taylor & Francis Ltd, London, pp 215-228. doi:10.1201/9780203166444.ch13
- van Zeijl MJ, Testerink C, Kijne JW, Wang M (2000) Subcellular differences in post-translational modification of barley 14-3-3 proteins. *FEBS Letters* 473 (3):292-296. doi:10.1016/s0014-5793(00)01545-3
- Wagenführ R (2007) *Holzatlas*. 6 edn. Carl Hanser Verlag, Leipzig
- Wang L, Cui N, Zhao XC, Fan HY, Li TL (2014) Accumulation of carbohydrate and regulation of 14-3-3 protein on sucrose phosphate synthase (SPS) activity in two tomato species. *Journal of Integrative Agriculture* 13 (2):358-364. doi:10.1016/s2095-3119(13)60373-1
- 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 (5):244-252. doi:10.1016/j.tplants.2004.03.006
- Wimmer B, Lottspeich F, van der Klei I, Veenhuis M, Gietl C (1997) The glyoxysomal and plastid molecular chaperones (70 kDa heat shock protein) of watermelon cotyledons are encoded by a single gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (25):13624-13629. doi:10.1073/pnas.94.25.13624
- Wisniewski M, Close TJ, Artlip T, Arora R (1996) Seasonal patterns of dehydrins and 70 kDa heat shock proteins in bark tissues of eight species of woody plants. *Physiologia Plantarum* 96 (3):496-505. doi:10.1111/j.1399-3054.1996.tb00464.x
- Wu K, Rooney MF, Ferl RJ (1997) The *Arabidopsis* 14-3-3 multigene family. *Plant Physiology* 114:1421-1431
- Wu SH, Wang C, Chen JC, Lin BL (1994) Isolation of a cDNA-encoding a 70 kDa heat shock cognate protein expressed in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 25 (3):577-583. doi:10.1007/bf00043887

- Xiu YJ, Feng J, Lu WQ, Liu DD, Wu T, Zhu HX, Liu P, Li WJ, Ren Q, Gu W, Meng QG, Wang W (2014) Identification of a novel cognate cytosolic Hsp70 gene (MnHsc70-2) from oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* and comparison of its expressions with the first cognate Hsc70 (MnHsc70-1) under different stresses. *Cell Stress & Chaperones* 19 (6):949-961. doi:10.1007/s12192-014-0519-2
- Xu DP, Sung SJS, Loboda T, Kormanik PP, Black CC (1989) Characterization of sucrolysis *via* the uridine diphosphate and pyrophosphate dependent sucrose synthase pathway. *Plant Physiology* 90 (2):635-642. doi:10.1104/pp.90.2.635
- Xu WF, Shi WM (2006) Expression profiling of the 14-3-3 gene family in response to salt stress and potassium and iron deficiencies in young tomato (*Solanum lycopersicum*) roots: analysis by real-time RT-PCR. *Annals of Botany* 98 (5):965-974. doi:10.1093/aob/mcl189
- Yang J, Kamdem DP, Keathley DE, Han KH (2004) Seasonal changes in gene expression at the sapwood-heartwood transition zone of black locust (*Robinia pseudoacacia*) revealed by cDNA microarray analysis. *Tree Physiology* 24 (4):461-474. doi:10.1093/treephys/24.4.461
- Yang J, Park S, Kamdem DP, Keathley DE, Retzel E, Paule C, Kapur V, Han KH (2003) Novel gene expression profiles define the metabolic and physiological processes characteristic of wood and its extractive formation in a hardwood tree species, *Robinia pseudoacacia*. *Plant Molecular Biology* 52 (5):935-956. doi:10.1023/a:1025445427284
- Yi JX, Derynck MR, Li XY, Telmer P, Marsolais F, Dhaubhadel S (2010) A single-repeat MYB transcription factor, GmMYB176, regulates CHS8 gene expression and affects isoflavonoid biosynthesis in soybean. *The Plant Journal* 62 (6):1019-1034. doi:10.1111/j.1365-3113X.2010.04214.x
- Yoshida K, Futamura N, Nishiguchi M (2012) Collection of expressed genes from the transition zone of *Cryptomeria japonica* in the dormant season. *Journal of Wood Science*:1-15. doi:10.1007/s10086-011-1234-6
- Yoshida K, Nishiguchi M, Futamura N, Nanjo T (2007) Expressed sequence tags from *Cryptomeria japonica* sapwood during the drying process. *Tree Physiology* 27 (1):1-9

- Zhang H, Wang J, Nickel U, Allen RD, Goodman HM (1997) Cloning and expression of an *Arabidopsis* gene encoding a putative peroxisomal ascorbate peroxidase. *Plant Molecular Biology* 34 (6):967-971. doi:10.1023/a:1005814109732
- Zheng PM, Aoki D, Matsushita Y, Yagami S, Fukushima K (2014) Lignification of ray parenchyma cells in the xylem of *Pinus densiflora*. Part II: microchemical analysis by laser microdissection and thioacidolysis. *Holzforschung* 68 (8):907-913. doi:10.1515/hf-2013-0232
- Ziegler H (1964) Storage, mobilization and distribution of reserve material in trees. In: Zimmermann MH (ed) *The formation of wood in forest trees. A symposium.* Academic Press, New York, pp 303-320
- Ziegler H (1965) Use of isotopes in the study of translocation in rays. In: *Proceedings of the symposium on the use of isotopes and radiation in oil-plant nutrition studies, 28 June-2 July, 1965, Ankara, Turkey.* International Atomic Energy Agency, Wien, pp 361-370
- Ziegler H (1968) Biologische Aspekte der Kernholzbildung. *European Journal of Wood and Wood Products* 26 (2):61-68. doi:10.1007/bf02615811
- Zuk M, Weber R, Szopa J (2005) 14-3-3 protein down-regulates key enzyme activities of nitrate and carbohydrate metabolism in potato plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (9):3454-3460. doi:10.1021/jf0485584

8 Anhang

```

***** ** ***** ** * ***** ***** ***** ***** *****
Deg -----CATGGAGAAAGTNTCCGCCRCGGYGGASAACGAGGAACACACGGTGGAGGAGAGAACTYCTCTCNTGTNCGCYTACAAGAACGT
GSP GAGATGGTGGAGTTCATGGAGAAAGGTCTCCGCCACCGCCGCAACGAGGAACACACGGTGGAGGAGAGAACTCCTCTCA-GTG-GCCTACAAGAACGT
ruler 1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100

***** * ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
Deg SATCGGWGCMCGMCGTGCYTCGTGGCGYATCATCTCYTCCATCGARCAGAAGGAGGAGAGTGMKGGMAACGAGGAYCACGYTCRRTYATCCGTGACTAC
GSP CATCGGAACCGACCTGCTGGCGTATCATCTTCCATCGAGCAGAAGGAGGAGAGTCTGGCGAACGAGGACACGCTCCGTCTCATCCGTGACTAC
ruler .....110.....120.....130.....140.....150.....160.....170.....180.....190.....200

***** ***** ** * ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
Deg CGATCYAAGATCGAGKCTGARCTYCCAAMATCTGCGACGGAATCCTCRMRCCTTGAYWCWCGYCTCATTCYKCGCTWYTCGGYAYTCYAAGG
GSP CGATCCAAGATCGAGCTGAACCTCCAAACATCTGCGACGGAATCCTCAAACCTCTGATACCTCCCTCATTCGCGAGCTTCCGGCATTCCAAAGG
ruler .....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270.....280.....290.....300

***** ***** ** * ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
Deg TTTTCTACCTCAARATGAARGGWGATTAYCACAGGTACCTCGCTGAGTCAAGACCGGYGCGYARMGWAAAGAMGCGCCGAGAGCACYCTCKCCGWT
GSP TTTTCTACCTCAAGATGAAGGTTATACACAGGTACCTCGCTGAGTCAAGACCGGTGCCGAACGTAAGAAGCTGCCGAGAGCACCTCTCCGCATA
ruler .....310.....320.....330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.....400

***** ***** ***** ** * ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
Deg CAAATCYGCTCAGGACATTCRAAYRCKGARCTGCCTC--CAACTCAYCCRATYAGGCTTGGWCTTGCTCTGAACTTCTCKGTGTTTACTATGARATYC
GSP CAAATCTGCTCAGGACATTCCAAACCGGAACTGCCTCGTCAACTCATCCAATTAGGCTTGGACTTGGCTCTCTGAACTTCTC-----
ruler .....410.....420.....430.....440.....450.....460.....470.....480.....490.....500

Deg TTAACTCTCCTGATCGKGC
GSP -----
ruler .....510.....

```

Abbildung A 1: Sequenzalignment des 14-3-3 Genfragments. Dargestellt sind die Nukleotidsequenzen erhalten durch die Amplifikation mit degenerierten (Deg) und genspezifischen Primern (GSP).



Abbildung A 2: Sequenzalignement des HS70 Genfragments. Dargestellt sind die Nukleotidsequenzen erhalten durch die Amplifikation mit degenerierten (Deg) und genspezifischen Primern (GSP).

Tabelle A 1: Übersicht aller C_T- und Expressionswerte für Rp14-3-3Gen1 im Jahr 2008 bei Genexpressionsstudien an RNA aus Gesamtgewebe.

	2008_Apr1			2008_Apr2		
Zone	C _T Rp14-3-3Gen1	C _T 18S	NRQ in %	C _T Rp14-3-3Gen1	C _T 18S	NRQ in %
Ph	35,93	26,82	0,99	32,5	21,93	0,37
OS	32,2	22,54	0,63	31,93	20,97	0,28
MS	33,18	20,92	0,13	34,41	23,76	0,37
IS	35,64	25,48	0,51	32,93	22,74	0,47
TZ	35,25	24,6	0,38	33,48	22,59	0,31
	2008_Jun1			2008_Jun2		
	C _T Rp14-3-3Gen1	C _T 18S	NRQ in %	C _T Rp14-3-3Gen1	C _T 18S	NRQ in %
Ph	35,87	24,8	0,29	31,81	24,86	3,32
OS	35,16	23,56	0,21	-	-	-
MS	-	-	-	31,72	23,52	1,54
IS	33,43	21,61	0,17	32,45	25,82	4,12
TZ	35	23,28	0,19	-	-	-
	2008_Okt1			2008_Okt2		
	C _T Rp14-3-3Gen1	C _T 18S	NRQ in %	C _T Rp14-3-3Gen1	C _T 18S	NRQ in %
Ph	28,9	17,34	0,18	30,36	17,05	0,06
OS	26,65	15,52	0,22	25,81	13,03	0,08
MS	30,39	20,83	0,64	29,12	14,58	0,03
IS	29,85	18,87	0,26	31,17	17,26	0,05
TZ	30,31	19,93	0,39	30,85	18,72	0,13
	2008_Nov1			2008_Nov2		
	C _T Rp14-3-3Gen1	C _T 18S	NRQ in %	C _T Rp14-3-3Gen1	C _T 18S	NRQ in %
Ph	27,89	21,33	3,80	30,81	22,91	1,80
OS	32,22	19,88	0,12	29,71	20,51	0,79
MS	45	23,78	0,00	28,79	20,63	1,45
IS	31,93	23,75	1,56	32,17	23,17	0,95
TZ	31,49	19,55	0,15	33,79	24,87	1,04

Tabelle A 2: Übersicht aller C_T- und Expressionswerte für Rp14-3-3Gen1 im Jahr 2012 bei Genexpressionsstudien an RNA aus Gesamtgewebe.

	2012_Jun1			2012_Jun2		
Zone	C _T Rp14-3-3Gen1	C _T 18S	NRQ in %	C _T Rp14-3-3Gen1	C _T 18S	NRQ in %
Ph	30,96	22,14	1,03	24,29	19,66	11,27
OS	29,28	21,85	2,31	26,75	20,3	3,94
MS	35,91	22,04	0,05	30,96	22,82	1,56
IS	36,59	23,97	0,12	35,81	26,36	0,80
TZ	35,63	25,09	0,41	35,66	23,5	0,15
	2012_Jul					
	C _T Rp14-3-3Gen1	C _T 18S	NRQ in %			
Ph	-	32,73	0,00			
OS	24,43	16,79	1,78			
MS	26,59	20,92	6,33			
IS	30,97	24,39	4,08			
TZ	34,42	28,29	5,91			
	2012_Sep1			2012_Sep2		
	C _T Rp14-3-3Gen1	C _T 18S	NRQ in %	C _T Rp14-3-3Gen1	C _T 18S	NRQ in %
Ph	32,02	22,48	0,68	-	25,68	0,00
OS	22,93	18,74	14,24	27,47	19,83	1,93
MS	29,89	20,2	0,58	31,51	20,69	0,30
IS	34,81	22,92	0,17	32,94	23,1	0,58
TZ	33,17	19,72	0,06	32,76	24,77	1,80
	2012_Dez1			2012_Dez2		
	C _T Rp14-3-3Gen1	C _T 18S	NRQ in %	C _T Rp14-3-3Gen1	C _T 18S	NRQ in %
Ph	29,16	18,76	0,37	27,92	24,49	26,05
OS	20,66	15,18	6,05	29,26	20,88	1,29
MS	25,87	16,55	0,66	27,83	18,45	0,67
IS	33	18,6	0,04	31,78	17,45	0,04
TZ	32,77	17,83	0,03	33,59	20,94	0,10
	2012_Mär1			2012_Mär2		
	C _T Rp14-3-3Gen1	C _T 18S	NRQ in %	C _T Rp14-3-3Gen1	C _T 18S	NRQ in %
Ph	22,53	16,73	5,23	37,77	15,91	0,00
OS	24,96	16,81	1,32	34,81	15,47	0,00
MS	29,14	19,39	0,55	36,52	17,01	0,00
IS	29,98	18,21	0,16	36,24	17,17	0,00
TZ	31,09	19,15	0,15	34,31	18,49	0,02

Tabelle A 3: Übersicht aller C_T- und Expressionswerte für Rp14-3-3Gen2 im Jahr 2008 bei Genexpressionsstudien an RNA aus Gesamtgewebe.

	2008_Apr1			2008_Apr2		
Zone	C _T Rp14-3-3Gen2	C _T 18S	NRQ in %	C _T Rp14-3-3Gen2	C _T 18S	NRQ in %
Ph	35,73	24,17	0,15	28,47	21,93	2,85
OS	29,72	19,87	0,38	27,56	20,98	2,74
MS	29,44	18,5	0,19	28,25	23,73	9,84
IS	31,84	22,72	0,62	27,69	22,76	7,58
TZ	31,2	21,8	0,51	27,83	22,55	6,12
	2008_Jun1			2008_Jun2		
	C _T Rp14-3-3Gen2	C _T 18S	NRQ in %	C _T Rp14-3-3Gen2	C _T 18S	NRQ in %
Ph	33,78	24,8	0,69	27,35	24,86	33,80
OS	32,69	23,56	0,62	-	-	-
MS	-	-	-	28,04	23,52	9,81
IS	30,64	21,61	0,64	29,39	25,82	17,98
TZ	31,69	23,28	0,95	-	-	-
	2008_Okt1			2008_Okt2		
	C _T Rp14-3-3Gen2	C _T 18S	NRQ in %	C _T Rp14-3-3Gen2	C _T 18S	NRQ in %
Ph	27,73	17,86	0,36	29,78	18,55	0,16
OS	24,24	15,94	0,90	24,67	13,9	0,20
MS	26,59	21,53	6,87	27,23	15,6	0,12
IS	26,72	19,78	2,17	28,89	18,62	0,29
TZ	27,44	20,7	2,48	29,59	19,88	0,41
	2008_Nov1			2008_Nov2		
	C _T Rp14-3-3Gen2	C _T 18S	NRQ in %	C _T Rp14-3-3Gen2	C _T 18S	NRQ in %
Ph	25,15	19,24	3,98	31,74	22,79	0,68
OS	23,83	20,27	16,52	28,66	20,43	1,01
MS	26,23	20,16	3,67	28,44	19,98	0,87
IS	26,91	21,52	5,64	30,17	22,86	1,82
TZ	27,01	20,66	3,13	33,77	24,76	0,68

Tabelle A 4: Übersicht aller C_T- und Expressionswerte für Rp14-3-3Gen2 im Jahr 2012 bei Genexpressionsstudien an RNA aus Gesamtgewebe.

	2012_Jun1			2012_Jun2		
Zone	C _T Rp14-3-3Gen2	C _T 18S	NRQ in %	C _T Rp14-3-3Gen2	C _T 18S	NRQ in %
Ph	31,42	22,91	0,89	21,83	20,85	78,19
OS	29,84	22,89	2,26	24,81	21,24	16,69
MS	37,65	22,68	0,02	29,03	23,62	5,76
IS	37,48	24,83	0,08	32,34	27,43	8,28
TZ	36,91	25,44	0,16	32,88	24,65	1,08
	2012_Jul					
	C _T Rp14-3-3Gen2	C _T 18S	NRQ in %			
Ph	-	32,92	0,00			
OS	18,79	16,12	26,31			
MS	23,58	20,34	20,04			
IS	26,63	23,49	22,40			
TZ	28,55	27,73	96,30			
	2012_Sep1			2012_Sep2		
	C _T Rp14-3-3Gen2	C _T 18S	NRQ in %	C _T Rp14-3-3Gen2	C _T 18S	NRQ in %
Ph	30,96	23,19	1,39	-	26,69	0,00
OS	22,15	18,82	18,52	24,93	20,9	12,60
MS	29,71	20,11	0,44	29,47	21,73	1,38
IS	33,36	22,95	0,29	30,56	23,94	2,81
TZ	32,76	20,61	0,10	29,66	25,14	10,07
	2012_Dez1			2012_Dez2		
	C _T Rp14-3-3Gen2	C _T 18S	NRQ in %	C _T Rp14-3-3Gen2	C _T 18S	NRQ in %
Ph	26,18	20,55	4,81	23,82	24,79	268,09
OS	18,52	16,83	47,86	24,06	21,14	24,59
MS	24,01	18,18	4,10	22,83	18,75	11,80
IS	28,73	21,46	1,83	26,07	17,62	0,85
TZ	31,43	19,19	0,09	27,92	20,91	2,12
	2012_Mär1			2012_Mär2		
	C _T Rp14-3-3Gen2	C _T 18S	NRQ in %	C _T Rp14-3-3Gen2	C _T 18S	NRQ in %
Ph	21,2	17,54	14,88	24,86	18,07	2,30
OS	23,71	17,57	3,37	22,86	16,83	3,56
MS	27,91	20,26	1,43	32,85	26,74	3,99
IS	28,9	18,92	0,35	32,6	23,96	0,84
TZ	29,23	19,67	0,45	33,65	26,31	1,90

Tabelle A 5: Übersicht aller C_T- und Expressionswerte für Rp14-3-3Gen3 im Jahr 2008 bei Genexpressionsstudien an RNA aus Gesamtgewebe.

	2008_Apr1			2008_Apr2		
Zone	C _T Rp14-3-3Gen3	C _T 18S	NRQ in %	C _T Rp14-3-3Gen3	C _T 18S	NRQ in %
Ph	32,27	25,41	1,75	27,72	22,06	3,57
OS	26,58	21,23	4,30	27,46	21,4	2,79
MS	26,89	20,92	2,94	28,51	23,82	6,52
IS	28,7	23,65	5,23	27,56	22,93	6,73
TZ	28,57	22,94	3,66	27,36	22,77	6,89
	2008_Jun1			2008_Jun2		
	C _T Rp14-3-3Gen3	C _T 18S	NRQ in %	C _T Rp14-3-3Gen3	C _T 18S	NRQ in %
Ph	38,16	24	0,02	34,25	26,86	1,28
OS	30,57	22,29	0,72	-	-	-
MS	-	-	-	34,86	28,9	3,09
IS	30,91	23,25	1,06	36,99	28,77	0,78
TZ	36,54	27,87	0,59	-	-	-
	2008_Okt1			2008_Okt2		
	C _T Rp14-3-3Gen3	C _T 18S	NRQ in %	C _T Rp14-3-3Gen3	C _T 18S	NRQ in %
Ph	33,89	19,98	0,02	36,83	22,51	0,02
OS	31,43	18,98	0,06	28,62	17,41	0,12
MS	33,62	23,75	0,28	32,96	21,06	0,08
IS	34,61	22,32	0,06	33,96	23,01	0,14
TZ	33,89	19,98	0,02	36,83	22,51	0,02
	2008_Nov1			2008_Nov2		
	C _T Rp14-3-3Gen3	C _T 18S	NRQ in %	C _T Rp14-3-3Gen3	C _T 18S	NRQ in %
Ph	35,15	22,6	0,05	33,38	21,56	0,08
OS	27,94	18,65	0,38	28,56	18,98	0,32
MS	32,3	21,8	0,19	31,1	20,59	0,18
IS	30,94	22,25	0,56	32,14	22,09	0,25
TZ	27	18,18	0,51	32,05	22,71	0,38

Tabelle A 6: Übersicht aller C_T- und Expressionswerte für Rp14-3-3Gen3 im Jahr 2012 bei Genexpressionsstudien an RNA aus Gesamtgewebe.

	2012_Jun1			2012_Jun2		
Zone	C _T Rp14-3-3Gen3	C _T 18S	NRQ in %	C _T Rp14-3-3Gen3	C _T 18S	NRQ in %
Ph	29,44	20,58	0,50	21,88	20,85	59,75
OS	29,07	20,79	0,72	22,78	21,24	43,87
MS	45	21,1	0,00	26,67	23,62	17,70
IS	35,63	22,39	0,04	29,86	27,43	26,37
TZ	35,78	23,49	0,06	30,56	24,65	3,11
	2012_Jul					
	C _T Rp14-3-3Gen3	C _T 18S	NRQ in %			
Ph	-	32,48	0,00			
OS	22,95	16,03	1,60			
MS	27,79	20,01	0,97			
IS	31,63	23,61	0,85			
TZ	34,66	27,66	1,63			
	2012_Sep1			2012_Sep2		
	C _T Rp14-3-3Gen3	C _T 18S	NRQ in %	C _T Rp14-3-3Gen3	C _T 18S	NRQ in %
Ph	28,28	20,86	1,21	35,93	24,88	0,14
OS	19,58	16,61	17,89	24,2	18,82	4,16
MS	26,91	17,86	0,44	28,82	19,78	0,45
IS	31,45	21,43	0,25	29,95	21,94	0,85
TZ	30,17	17,67	0,05	29,11	23,15	2,99
	2012_Dez1			2012_Dez2		
	C _T Rp14-3-3Gen3	C _T 18S	NRQ in %	C _T Rp14-3-3Gen3	C _T 18S	NRQ in %
Ph	28,65	18,27	0,20	24,24	22,59	41,33
OS	20,85	14,78	2,68	24,76	18,72	2,78
MS	26,3	16,19	0,23	23,64	16,88	1,78
IS	31,59	19,24	0,06	27,6	15,74	0,08
TZ	34,79	17,44	0,00	29,92	19,3	0,17
	2012_Mär1			2012_Mär2		
	C _T Rp14-3-3Gen3	C _T 18S	NRQ in %	C _T Rp14-3-3Gen3	C _T 18S	NRQ in %
Ph	22,2	15,47	1,80	26,71	18,07	0,57
OS	24,78	15,46	0,37	24,88	16,83	0,81
MS	28,92	17,98	0,14	34,4	26,74	1,08
IS	29,94	16,89	0,04	35,63	23,96	0,09
TZ	30,51	17,47	0,04	36,27	26,31	0,27

Tabelle A 7: Übersicht aller C_T- und Expressionswerte für RpHS70 im Jahr 2008 bei Genexpressionsstudien an RNA aus Gesamtgewebe.

	2008_Apr1			2008_Apr2		
Zone	C _T RpHS70	C _T 18S	NRQ in %	C _T RpHS70	C _T 18S	NRQ in %
Ph	33,76	26,56	3,01	29,65	22,59	2,93
OS	27,83	21,86	5,45	27,75	22,23	7,17
MS	27,55	20,4	2,62	28,83	25,5	28,40
IS	29,52	24,53	10,43	28,37	24,06	15,35
TZ	28,93	23,51	7,87	27,94	23,62	15,08
	2008_Jun1			2008_Jun2		
	C _T RpHS70	C _T 18S	NRQ in %	C _T RpHS70	C _T 18S	NRQ in %
Ph	31,91	25,64	5,06	35,67	24,86	0,34
OS	29,87	24,3	7,37	-	-	-
MS	-	-	-	28,67	23,52	9,23
IS	27,2	22,48	11,55	29,89	25,82	18,55
TZ	28,71	24,1	12,88	-	-	-
	2008_Okt1			2008_Okt2		
	C _T RpHS70	C _T 18S	NRQ in %	C _T RpHS70	C _T 18S	NRQ in %
Ph	25,3	16,88	1,13	27,73	17,93	0,51
OS	22,7	14,82	1,46	22,86	13,94	0,77
MS	24,48	16	1,06	24,68	15,65	0,76
IS	25,2	17,3	1,55	25,71	18,05	1,82
TZ	25,19	19,47	5,91	26,26	19,43	3,07
	2008_Nov1			2008_Nov2		
	C _T RpHS70	C _T 18S	NRQ in %	C _T RpHS70	C _T 18S	NRQ in %
Ph	30	22,95	2,97	29,38	21,68	1,96
OS	24,45	18,82	6,12	24,95	18,91	4,82
MS	27,86	22,14	6,36	27,09	20,74	4,22
IS	27,84	22,3	7,10	27,92	21,94	5,43
TZ	26,52	18,54	1,53	28,54	22,51	5,35

Tabelle A 8: Übersicht aller C_T- und Expressionswerte für RpHS70 im Jahr 2012 bei Genexpressionsstudien an RNA aus Gesamtgewebe.

	2012_Jun1			2012_Jun2		
Zone	C _T RpHS70	C _T 18S	NRQ in %	C _T RpHS70	C _T 18S	NRQ in %
Ph	25,63	21,79	19,01	21,78	19,66	49,29
OS	24,87	21,66	27,44	23,88	20,3	21,27
MS	29,99	21,89	1,56	30,99	22,82	1,53
IS	34,09	23,57	0,39	31,52	26,36	9,92
TZ	32,39	25	2,58	29,54	23,5	5,47
	2012_Jul					
	C _T RpHS70	C _T 18S	NRQ in %			
Ph	36,88	33,63	37,20			
OS	20,82	16,57	12,95			
MS	25,61	20,76	10,21			
IS	27,66	22,91	11,48			
TZ	30,2	27,96	57,66			
	2012_Sep1			2012_Sep2		
	C _T RpHS70	C _T 18S	NRQ in %	C _T RpHS70	C _T 18S	NRQ in %
Ph	31,76	20,8	0,28	38,73	25,99	0,11
OS	20,92	16,64	12,75	23,85	20,29	21,51
MS	28,16	17,85	0,38	28,68	20,98	1,92
IS	32,87	20,92	0,16	29,91	23,64	4,79
TZ	30,59	17,63	0,08	29,82	24,78	10,19
	2012_Dez1			2012_Dez2		
	C _T RpHS70	C _T 18S	NRQ in %	C _T RpHS70	C _T 18S	NRQ in %
Ph	29,92	17,63	0,12	26,68	24,49	54,00
OS	19,45	14,18	6,66	29,94	20,88	0,86
MS	24,6	15,62	0,78	22,1	18,45	19,40
IS	31,7	18,8	0,09	25,74	17,45	1,23
TZ	28,67	17,39	0,21	27,45	20,94	3,87
	2012_Mär1			2012_Mär2		
	C _T RpHS70	C _T 18S	NRQ in %	C _T RpHS70	C _T 18S	NRQ in %
Ph	18,93	15,42	19,39	27,91	20,74	2,61
OS	21,18	15,68	6,06	26,55	17,96	1,05
MS	24,53	18,1	3,75	26,95	19,71	2,43
IS	25,59	16,95	0,99	29,64	19,83	0,54
TZ	25,86	17,57	1,24	30,51	20,69	0,55

Tabelle A 9: Übersicht aller C_T- und Expressionswerte für RpCHS3 im Jahr 2008 bei Genexpressionsstudien an RNA aus Gesamtgewebe.

	2008_Apr1			2008_Apr2		
Zone	C _T RpCHS3	C _T 18S	NRQ in %	C _T RpCHS3	C _T 18S	NRQ in %
Ph	-	26,82	0,00	-	21,93	0,00
OS	-	22,54	0,00	34,4	20,97	0,02
MS	-	20,92	0,00	-	23,76	0,00
IS	-	25,48	0,00	-	22,59	0,00
TZ	25,69	24,6	38,80	23,75	22,74	41,61
	2008_Jun1			2008_Jun2		
	C _T RpCHS3	C _T 18S	NRQ in %	C _T RpCHS3	C _T 18S	NRQ in %
Ph	33,81	24,8	0,27	-	24,86	0,00
OS	-	23,56	0,00	-	-	-
MS	-	-	-	-	23,52	0,00
IS	29,68	21,61	0,51	27,98	25,82	19,60
TZ	22,75	23,28	108,48	-	-	-
	2008_Okt1			2008_Okt2		
	C _T RpCHS3	C _T 18S	NRQ in %	C _T RpCHS3	C _T 18S	NRQ in %
Ph	-	17,34	0,00	34,11	17,05	0,00
OS	-	15,52	0,00	33,24	13,03	0,00
MS	-	20,83	0,00	-	14,58	0,00
IS	-	18,87	0,00	-	17,26	0,00
TZ	32,39	19,93	0,03	23,18	18,72	5,01
	2008_Nov1			2008_Nov2		
	C _T RpCHS3	C _T 18S	NRQ in %	C _T RpCHS3	C _T 18S	NRQ in %
Ph	37,31	21,33	0,00	-	22,91	0,00
OS	-	19,88	0,00	-	20,51	0,00
MS	-	23,78	0,00	-	20,63	0,00
IS	-	23,75	0,00	-	23,17	0,00
TZ	27,09	19,55	0,72	31,44	24,87	1,25

Tabelle A 10: Übersicht aller C_T- und Expressionswerte für RpCHS3 im Jahr 2012 bei Genexpressionsstudien an RNA aus Gesamtgewebe.

	2012_Jun1			2012_Jun2		
Zone	C _T RpCHS3	C _T 18S	NRQ in %	C _T RpCHS3	C _T 18S	NRQ in %
Ph	37,64	22,14	0,00	29,01	19,66	0,23
OS	34,38	21,85	0,03	29,65	20,3	0,23
MS	-	22,04	0,00	31,67	22,82	0,31
IS	31,51	23,97	0,69	26,36	20,44	1,97
TZ	29,47	25,09	4,92	23,45	23,5	80,14
	2012_Jul					
	C _T RpCHS3	C _T 18S	NRQ in %			
Ph	-	32,73	0,03			
OS	32,03	16,79	0,01			
MS	29,88	20,92	0,29			
IS	-	24,39	0,00			
TZ	27,82	28,29	99,00			
	2012_Sep1			2012_Sep2		
	C _T RpCHS3	C _T 18S	NRQ in %	C _T RpCHS3	C _T 18S	NRQ in %
Ph	28,7	21,16	0,71	31,83	25,68	1,62
OS	45	16,85	0,00	32,65	19,83	0,03
MS	29,02	18,07	0,09	33,19	20,69	0,03
IS	28,33	20,75	0,70	26,32	23,1	10,39
TZ	22,74	17,33	2,81	24,19	24,77	110,15
	2012_Dez1			2012_Dez2		
	C _T RpCHS3	C _T 18S	NRQ in %	C _T RpCHS3	C _T 18S	NRQ in %
Ph	-	19,3	0,00	32,56	24,49	0,49
OS	29,73	16,02	0,02	-	20,88	0,00
MS	31,57	17,35	0,01	35,38	18,45	0,00
IS	-	19,99	0,00	-	17,45	0,00
TZ	-	18,9	0,00	29,96	20,94	0,28
	2012_Mär1			2012_Mär2		
	C _T RpCHS3	C _T 18S	NRQ in %	C _T RpCHS3	C _T 18S	NRQ in %
Ph	24,72	16,73	0,56	-	15,91	0,00
OS	24,5	16,81	0,68	-	15,47	0,00
MS	33,95	19,39	0,01	-	17,01	0,00
IS	26,35	18,21	0,50	-	17,17	0,00
TZ	30,48	19,15	0,07	42,48	18,49	0,00

Tabelle A 11: Übersicht aller C_T- und Expressionswerte für RpPAL1 im Jahr 2008 (links) und 2012 (rechts) bei Genexpressionsstudien an RNA aus Gesamtgewebe der Splint-Kern-Übergangszone.

	C _T RpPAL1	C _T 18S	NRQ in %		C _T RpPAL1	C _T 18S	NRQ in %
2008_Apr1	26,95	22,95	1,37	2012_Jun1	25,17	24,1	9,37
2008_Apr2	-	21,75	0	2012_Jun2	22,8	23,7	36,98
2008_Jun1	24,17	24,75	27,68	2012_Jul	26,39	26,59	18,84
2008_Jun2	-	-	-	2012_Sep1	26,65	24,03	3,27
2008_Okt1	31,57	19,1	0,01	2012_Sep2	23,07	23,54	27,87
2008_Okt2	24,55	18,78	0,54	2012_Dez1	35,26	17,76	0,00
2008_Nov1	25,92	21,19	0,94	2012_Dez2	32,29	20,23	0,01
2008_Nov2	29,42	24,65	0,72	2013_Mär1	41,38	18,92	0,00
				2013_Mär2	26,23	18,61	0,16

Tabelle A 12: Übersicht aller C_T- und Expressionswerte für Rp14-3-3Gen1 (links) und Rp14-3-3Gen2 (rechts) bei Genexpressionsstudien an RNA erhalten aus Radialparenchym der Splint-Kern-Übergangszone.

	C _T Rp14-3-3Gen1	C _T 18S	NRQ in %	C _T Rp14-3-3Gen2	C _T 18S	NRQ in %
2012_Jun1	38,2	26,11	0,17	38,12	26,31	0,13
2012_Jun2	39,89	27,65	0,16	34,52	26,39	1,18
2012_Jul	37,58	29,78	2,31	29,71	28,76	90,60
2012_Sep1	-	23,67	0,00	36,96	22,38	0,02
2012_Sep2	34,63	25,83	1,15	31,67	26,28	6,09
2012_Dez1	32,77	17,83	0,03	33,64	21,06	0,08
2012_Dez2	38,16	24,67	0,07	29,85	21,37	0,88
2013_Mär1	32,69	22,1	0,36	28,36	21	1,72
2013_Mär2	38,26	25,38	0,10	34,38	24,23	0,34

Tabelle A 13: Übersicht aller C_T- und Expressionswerte für Rp14-3-3Gen3 (links) und RpHS70 (rechts) bei Genexpressionsstudien an RNA erhalten aus Radialparenchym der Splint-Kern-Übergangszone.

	C _T Rp14-3-3Gen3	C _T 18S	NRQ in %	C _T RpHS70	C _T 18S	NRQ in %
2012_Jun1	37,36	24,69	0,05	31,59	24,28	2,65
2012_Jun2	32,59	24,77	0,97	30,41	23,17	2,68
2012_Jul	33,15	26,01	1,48	31,01	28,2	41,52
2012_Sep1	34,12	21,05	0,04	30,23	21,7	1,20
2012_Sep2	29,06	23	2,81	29,95	24,09	6,18
2012_Dez1	38,69	21,05	0,00	32,28	21,7	0,36
2012_Dez2	31,97	22,16	0,28	30,35	20,74	0,62
2013_Mär1	32,02	19,14	0,04	37,36	21,67	0,02
2013_Mär2	35,68	25,37	0,21	35,42	21,87	0,06

Tabelle A 14: Übersicht aller C_T- und Expressionswerte für RpCHS3 (links) und RpPAL1 (rechts) bei Genexpressionsstudien an RNA erhalten aus Radialparenchym der Splint-Kern-Übergangszone.

	C _T RpCHS3	C _T 18S	NRQ in %	C _T RpPAL1	C _T 18S	NRQ in %
2012_Jun1	29,8	25,09	4,00	27,36	26,29	8,08
2012_Jun2	23,9	23,5	60,47	25,9	25,84	16,60
2012_Jul	23,81	23,69	71,90	25,68	25,41	14,81
2012_Sep1	26,16	21,26	3,70	27,36	19,36	0,11
2012_Sep2	17,9	19,04	166,34	28,76	29,03	16,75
2012_Dez1	-	18,9	0,00	-	23,75	0,00
2012_Dez2	-	22,3	0,00	-	26,38	0,00
2013_Mär1	-	19,86	0,00	-	25,22	0,00
2013_Mär2	-	22,46	0,00	-	26,93	0,00