

Dissertation

**Zelltyp-spezifische Mikroanalyse von *Arabidopsis thaliana*-
Blättern**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Universität Potsdam

von Stephan Peter Brandt

Potsdam, im November 2001

1. Gutachter:

Prof. Dr. Lothar Willmitzer, Max Planck Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm

2. Gutachter:

Prof. Dr. Martin Steup, Universität Potsdam, Institut für Biochemie und Biologie, Potsdam

3. Gutachter:

Prof. Dr. Uwe Sonnewald, Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben

Meinen lieben Eltern Christa und Hans-Martin

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Warum ist Einzelzellanalytik wichtig?.....	1
1.2	Methoden zur hochauflösenden Probennahme und Analytik.....	2
1.2.1	Destruktive Methoden.....	3
1.2.2	Nicht invasive Methoden.....	4
1.2.3	Minimal invasive Methoden.....	5
1.2.3.1	<i>Metabolitenanalytik.....</i>	7
1.2.3.2	<i>Proteinanalytik.....</i>	9
1.2.3.3	<i>Transkriptanalytik.....</i>	9
1.3	Das Blatt.....	11
1.3.1	Die Epidermis.....	12
1.3.2	Das Mesophyll.....	13
1.4	Zielsetzung der Arbeit.....	15
2	MATERIAL UND METHODEN.....	16
2.1	Material.....	16
2.1.1	Samen.....	16
2.1.2	Geräte und Verbrauchsmaterial.....	16
2.1.3	Chemikalien und Enzyme.....	17
2.1.4	Oligonukleotide.....	18
2.1.5	Oligonukleotide für die Echtzeit-PCR.....	19
2.1.6	Verwendete Internetprogramme.....	19
2.2	Methoden.....	20
2.2.1	Pflanzenaufzucht.....	29
2.2.2	Herstellung lichtmikroskopischer Schnitte.....	20
2.2.3	Probennahme.....	20
2.2.3.1	<i>Probennahme einzelner Zellinhalte mittels Glasmikrokapillaren (nach Malone et al. 1989).....</i>	<i>20</i>
2.2.3.2	<i>Probennahme mittels Mikrodissektion.....</i>	<i>22</i>
2.2.4	Nukleinsäuremethoden.....	22
2.2.4.1	<i>Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen.....</i>	<i>23</i>
2.2.4.2	<i>Northernblot-Hybridisierung.....</i>	<i>23</i>
2.2.4.3	<i>RNA-Amplifizierungsstrategien.....</i>	<i>23</i>
2.2.4.4	<i>Array Technologie.....</i>	<i>28</i>
2.2.5	Gaschromatographie-Massenspektrometrie.....	30
2.2.6	Kapillarelektrophoresemethoden.....	31
2.2.6.1	<i>Kationen (nach Kehr et al. 1999).....</i>	<i>31</i>
2.2.6.2	<i>Anionen (nach Hüssa et al. 1999).....</i>	<i>32</i>
2.2.6.3	<i>Kohlenhydrate.....</i>	<i>32</i>
2.2.6.4	<i>Nachweis von Aminosäuren nach FITC-Derivatisierung (nach Arlt et al. 2001)....</i>	<i>35</i>
2.2.7	Proteinmethoden.....	36
2.2.7.1	<i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....</i>	<i>36</i>
2.2.7.2	<i>Proteinsequenzierung mittels Q-TOF-Massenspektrometrie.....</i>	<i>36</i>
3	ERGEBNISSE.....	37
3.1	Transkriptuntersuchungen.....	37
3.1.1	Versuchskonzeption.....	37
3.1.2	<i>Dotblothybridisierung mit Einzelzellproben.....</i>	<i>37</i>
3.1.3	<i>Amplifizierungsstrategien.....</i>	<i>38</i>

3.1.3.1	<i>Gen-spezifische reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion</i>	38
3.1.3.2	<i>Unspezifische Amplifikation von Nukleinsäuren</i>	39
3.1.4	Arrayhybridisierung als Durchmusterungsmethode für unterschiedlich exprimierte Gene.....	43
3.1.4.1	<i>Vergleich der Expressionsmuster von Rosettenblättern bei Tag und Nacht</i>	44
3.1.4.2	<i>Vorversuche für Arrayhybridisierungen mit Produkten der Arbitrary-PCR</i>	45
3.1.4.3	<i>Genexpressionsvergleich zwischen Epidermis und Mesophyll</i>	46
3.1.4.4	<i>Genexpressionsvergleich zwischen Epidermis und Mesophyll bei Tag und Nacht</i> ..	50
3.1.4.5	<i>Genexpressionsvergleich zwischen Gesamtblatt und Epidermis/ Mesophyll bei Nacht/Tag</i>	54
3.1.5	Methoden zum Überprüfen der Arraydaten.....	55
3.1.5.1	<i>RT-PCR mit Gewebeproben</i>	55
3.1.5.2	<i>Gewebenorthernblot</i>	56
3.1.5.3	<i>Semiquantitative Polymerase Kettenreaktion</i>	56
3.1.5.4	<i>Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion</i>	57
3.1.6	Zusammenfassung.....	59
3.2	Metabolitenuntersuchungen	59
3.2.1	Konzeption.....	59
3.2.2	Gaschromatographie-Massenspektrometrie.....	59
3.2.3	Kationen.....	61
3.2.4	Anionen.....	62
3.2.5	Kohlenhydrate.....	63
3.2.5.1	<i>CuSO₄-Puffersystem</i>	63
3.2.5.2	<i>CuSO₄-Puffersystem nach Instrumentenumbau</i>	64
3.2.5.3	<i>Sorbat-Puffersystem</i>	65
3.2.5.4	<i>APTS</i>	65
3.2.6	Aminosäuren.....	66
3.2.7	Zusammenfassung.....	67
3.3	Proteinuntersuchungen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Massenspektrometrie	68
3.3.1	Konzeption.....	68
3.3.2	Proteinisolierung, -auftrennung und -sequenzierung.....	68
3.3.3	Zusammenfassung.....	71
4	DISKUSSION	72
4.1	Methoden der Probennahme	72
4.2	Genexpressionsstudien	73
4.2.1	Nachweis spezifischer Transkripte.....	73
4.2.2	Gleichzeitiger Nachweis vieler Transkripte.....	75
4.2.2.1	<i>Globale/unspezifische Amplifizierungsstrategien</i>	75
4.2.2.2	<i>Arrayhybridisierungen</i>	80
4.2.3	Überprüfen der Arraydaten.....	85
4.2.3.1	<i>Gewebenorthernblot</i>	86
4.2.3.2	<i>Semiquantitative und Echtzeit-PCR</i>	86
4.3	Metabolite	88
4.3.1	Gaschromatographie-Massenspektrometrie.....	88
4.3.2	Kapillarelektrophorese.....	88
4.3.2.1	<i>Anorganische Ionen</i>	89
4.3.2.2	<i>Kohlenhydrate</i>	91
4.3.2.3	<i>Aminosäuren</i>	93
4.3.3	Proteinuntersuchungen.....	94
4.4	Schlußbetrachtung und Ausblick	95

5	ZUSAMMENFASSUNG.....	97
6	REFERENZEN.....	99
7	ANHANG.....	A1
	Anhang 1.....	A1
	Anhang 2.....	A5
	Anhang 3.....	A9
	Anhang 4.....	A16
	Anhang 5.....	A21
	Anhang 6.....	A24

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abb. 1 Minimal invasive Probenahme.....	6
Abb. 2 Schematischer Querschnitt eines Blatts.....	11
Abb. 3 Mikromeißel und geschnittenes Gewebe.....	22
Abb. 4 Positionen der 42 ESTs in den Quadraten auf den Arrayfiltern.....	28
Abb. 5 Schemata und Photos der umgebauten CE.....	34
Abb. 6 Reduktive Aminierung eines Zuckers durch APTS.....	34
Abb. 7 Derivatisierungsreaktion einer Aminosäure mit FITC.....	35
Abb. 8 Dotblot mit verschiedenen (Zell-) Proben.....	37
Abb. 9 RT-PCR mit verschiedenen Primer-Zellproben-Kombinationen.....	38
Abb. 10 PCR nach Tailing.....	40
Abb. 11 Smart-RT-PCR mit verschiedenen Vorlagen.....	41
Abb. 12 PCR-Reaktionen mit verschiedenen <i>Arbitrary</i> -Primern.....	42
Abb. 13 <i>Arbitrary</i> -RT-PCR mit verschiedenen Zellproben.....	42
Abb. 14 RT-PCR mit Primern gegen Actin 2 und verschieden vielen Zellproben aus Epidermis und Mesophyll.....	46
Abb. 15 Arrayfilterausschnitt mit zwei stark vergrößerten 4 ² -Quadraten.....	46
Abb. 16 Scatterplot der Quotienten Aktivität _{Epidermis/Mesophyll} je zweier unabhängiger Hybridisierungen mit Epidermis- bzw. Mesophyll-spezifischen Proben.....	48
Abb. 17 Beispiele für Mesophyll- und Epidermis-spezifisch exprimierte Gene sowie ein konstitutiv exprimiertes Gen.....	50
Abb. 18 RT-PCR mit mikrodisektiertem Mesophyllgewebe.....	55
Abb. 19 Mesophyll-spezifischer <i>Northern</i> blot.....	56
Abb. 20 Semiquantitative PCR mit verschiedenen Zellproben.....	57
Abb. 21 Echtzeit-RT-PCR mit verschiedenen Zellproben.....	58
Abb. 22 Übereinander gelegte Massenspektren der Negativkontrolle und einer Probe bestehend aus 40 vereinigten Mesophyllzellen.....	60
Abb. 23 Konzentration der freien Aminosäuren in Gesamtextrakten von <i>A. thaliana</i> -Rosettenblättern.....	61
Abb. 24 Kaliumkonzentration in Epidermis und Mesophyll von <i>A. thaliana</i> -Rosettenblättern.....	62
Abb. 25 Kationenkonzentrationen in Gesamtblatt-extrakten aus <i>A. thaliana</i> Rosettenblättern.....	62
Abb. 26 Elektropherogramme verschiedener Anionenmessungen.....	62
Abb. 27 Elektropherogramme verschiedener CE-Zucker-Messungen.....	63
Abb. 28 Elektropherogramme verschiedener CE-Zucker-Messungen an der umgerüsteten CE.....	64
Abb. 29 Elektropherogramme verschiedener CE-Zucker-Messungen mit LIF-Detektion.....	66
Abb. 30 Elektropherogramme verschiedener Aminosäuremessungen mittels CE.....	67
Abb. 31 Eindimensionales-SDS-PAGE-Gel.....	69
Abb. 32 Massenspektrometrische Sequenzierung des Proteins aus Bande 1 nach Auftrennung der Proteine durch eindimensionale SDS-PAGE und Trypsinverdau.....	69
Abb. 33 <i>Alignments</i> der sequenzierten Peptidfragmente.....	70
Tab. 1 Kapillarelektrophoresedetektoren und ihre ungefähren Nachweisgrenzen.....	7
Tab. 2 Primerschema für verschiedene PCR-Reaktionen.....	39
Tab. 3 Anzahl der ESTs, die bei Tag und Nacht unterschiedliche Aktivitäten im Gesamtblatt zeigen.....	44
Tab. 4 Anzahl der ESTs, die in der Epidermis und im Mesophyll unterschiedliche Aktivitäten zeigen.....	49
Tab. 5 Anzahl der ESTs, die bei Tag unterschiedliche Aktivitäten in Epidermis und Mesophyll zeigen.....	51
Tab. 6 Anzahl der ESTs, die bei Nacht unterschiedliche Aktivitäten in Epidermis und Mesophyll zeigen.....	52
Tab. 7 Anzahl der ESTs, die in der Epidermis bei Nacht und Tag unterschiedliche Aktivitäten zeigen.....	53
Tab. 8 Anzahl der ESTs, die im Mesophyll bei Nacht und Tag unterschiedliche Aktivitäten zeigen.....	54
Tab. 9 Ergebnisse der Gewebe-spezifischen Echtzeit-PCR.....	58
Tab. 10 Übersicht über die Proben, die für GC-MS-Messungen verwendet wurden.....	60
Tab. 11 Angegeben sind die niedrigsten, nachweisbaren Konzentrationen für Standardlösungen der vier Kationen K ⁺ , Na ⁺ , Ca ²⁺ und Mg ²⁺	61

ABKÜRZUNGEN

A	Adenin	min	Minute
Abb.	Abbildung	MPI-MP	Max Planck Institut für molekulare Pflanzenphysiologie
Acc. No.	<i>Accession Number</i> , Zugangsnummer		
APTS	8-Aminopyren-1,3,6-trisulfonsäure	MSTFA	2,2,2-Trifluoro-N-methyl-N-(trimethylsilyl)acetamid
Bp	Basenpaare	MSU	Michigan State Universität
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> , Rinderserumalbumin	m/z	Masse/Ladung
C	Cytosin	NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> , Kernmagnetische Resonanz
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
CE	<i>capillary electrophoresis</i> , Kapillarelektrophorese	PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
Ci	Curie	psi	<i>pounds per squareinch</i> , Pfund pro Quadratinch
CIP	Chloroform-Isoamylalkohol-Phenol	RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> , Ribonukleinsäure
cpm	<i>counts per minute</i> , Zählereignisse pro Minute	RNAse	Ribonuklease
d	desoxy-	SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	T	Thymin
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	Tab.	Tabelle
DEPC	Diethylpyrocarbonat	TFA	<i>Trifluorogenic Acid</i> , Trifluoressigsäure
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat	TG	Trockengewicht
DIG	Digoxigenin	Tris	2-Amino-2-hydroxy-methyl-1-3-propandiol
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> , Desoxyribonukleinsäure	U	Enzymeinheit
DTT	Dithiothreitol	Upm	Umdrehungen pro Minute
dTTP	Desoxythymidintriphosphat	v	<i>volume</i> , Volumen
EDX	<i>electron dispersive X-ray analysis</i> , Elektronen-dispersive Röntgenanalyse	V	Volt
EST	Expressed Sequence Tag	vgl.	vergleiche
FG	Frischgewicht	w	<i>weight</i> , Gewicht
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat		
G	Guanin		
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie		
HGE	Hintergrundelektrolyt		
Kap.	Kapitel		
l	Liter		
LCM	<i>Laser Capture Microdissection</i> , Laser vermittelte Mikrodissektion		
LIF	Laser induzierte Fluoreszenz		
LOD	<i>Limit of Detection</i> , Detektionslimit		
LTP	Lipidtransferierendes Protein		

verwendete Präfixe

k	kilo	10 ³
m	milli	10 ⁻³
μ	mikro	10 ⁻⁶
n	nano	10 ⁻⁹
p	pico	10 ⁻¹²
f	femto	10 ⁻¹⁵
a	atto	10 ⁻¹⁸
z	zepto	10 ⁻²¹

1 EINLEITUNG

“*The structural complexity of the plant body results from variation and function of cells...*”
(Kathrine Esau 1953, zitiert nach Edwards und Coruzzi 1990).

Höhere Pflanzen sind vielzellige Organismen und im Unterschied zu einzelligen und niederen Pflanzen findet man eine starke Differenzierung der Zellen. Verschiedene Zelltypen haben unterschiedliche Aufgaben. Gleichartige Zellen werden im Verbund als Gewebe definiert werden, wie z.B. Palisaden- oder Schwammparenchym (Braune *et al.* 1991). Je feiner man einzelne Zellen eines Gewebes analysiert, um so mehr Unterschiede findet man aber auch zwischen „gleichartigen“ Zellen eines Gewebes (Fricke *et al.* 1994a, Kehr 1998). Verschiedene Gewebe werden zu funktionellen Einheiten, den Gewebesystemen zusammengefaßt (z. B. Mesophyll), welche wiederum die oft schon mit bloßem Auge gut erkennbaren Organe bilden: Den vegetativen wie Wurzel, Stamm oder Blatt stehen die generativen Organe wie Blüte oder Frucht gegenüber (z.B. besteht ein Blatt hauptsächlich aus den drei Gewebesystemen Epidermis, Mesophyll und Leitbündel). In der vorliegenden Arbeit wird der Begriff Gewebe für Epidermis und Mesophyll verwendet, obwohl beide eher Gewebesysteme darstellen.

Die Entwicklung von Methoden zur künstlichen Erzeugung genetischer Diversität wie *Knock out*- oder Transposoninsertions-Populationen hat in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht (Aarts *et al.* 1993, Strepp *et al.* 1998, Cho *et al.* 1999, Zhuo und Chua 2000). Einhergehend damit wurden multiparallele Analysemethoden entwickelt, mit deren Hilfe Transkripte (Arrayhybridisierung, Lennon und Lehrach 1991, Duggan *et al.* 1999), Proteine (zweidimensionale Gelelektrophorese, Proteinsequenzierung mittels Massenspektrometrie, Lottspeich und Zorbas 1998) und auch eine Vielzahl von Metaboliten (Gaschromatographie-Massenspektrometrie, Roessner *et al.* 2000) untersucht werden können. Das Aufeinandertreffen beider Entwicklungen hat neue Möglichkeiten zur Analyse der Physiologie und damit zum Verständnis des Systems Pflanze eröffnet (Roessner *et al.* 2001, Fiehn *et al.* 2000). Diese Methoden sind hervorragend geeignet, ganze Pflanzen oder Organe zu untersuchen.

1.1 Warum ist Einzelzellanalytik wichtig?

Um ein ganzheitliches Bild von den physiologischen Prozessen in höheren Pflanzen zu erhalten, ist es notwendig, sowohl makroskopische als auch mikroskopische Betrachtungen anzustellen. Hierzu müssen einerseits ganze Pflanzen oder alle Zellen eines Organs oder Gewebes untersucht werden, andererseits müssen die kleinsten funktionellen Einheiten, die Zellen, und wenn möglich, sogar ihre einzelnen Kompartimente, analysiert werden (Kehr 2001, Tomos und Sharrock 2001). Erst die hieraus gewonnenen Kenntnisse über die lokale Verteilung von Nährstoffen und Metaboliten wie organische Säuren oder Kohlenhydrate als auch über Genexpressionen und Proteinmuster ermöglichen ein ganzheitlicheres Verständnis (Edwards und Coruzzi 1990). Hierbei ergeben einzeln untersuchte Komponenten nur ein Teilbild. Um Zellen umfassend zu verstehen, ist die Integration möglichst vieler Informationen notwendig. So läßt die Kenntnis über die

Expressionsstärke eines Gens nicht zwangsläufig Schlüsse über die vorhandene Menge des entsprechenden Enzyms oder seine Aktivität zu (Voet *et al.* 1999). Zudem kann durch Kenntnis vieler lokaler Metabolitenkonzentrationen bekannten Molekülen unter Umständen eine neue, zusätzliche Funktion zugewiesen werden (Outlaw und Zhang 2001). Durch die gezielte Veränderung von Umwelteinflüssen oder durch genetische Modifikation können so Vorgänge wie Metabolitensynthese, -transport und -speicherung oder auch interzelluläre Kommunikation besser verstanden werden (Fricke *et al.* 1994a-c, Kehr *et al.* 1998).

Es gibt mehrere Veröffentlichungen, in denen versucht wurde, aus kleinen Segmenten (Harrison *et al.* 1997), kleinen Gewebeprobe (Hertzberg *et al.* 2001) oder Mesophyll (Haritatos *et al.* 1996) Kohlenhydrate oder Genexpressionsmuster zu untersuchen. Aber auch diese Versuche lieferten nur Durchschnittswerte an Information. Zwar wurde die Probenmenge verringert, aber Zellen unterschiedlichen Typs konnten nicht voneinander getrennt untersucht werden, da ein effektives Zellseparationsverfahren fehlte.

Mittels Methoden, die das Beprobieren von individuellen Zellen erlauben (vgl. Kap. 1.2), ist es möglich, eine sehr hohe räumliche Auflösung zu erhalten. Mit solchen Techniken können spezifische Zellen in Geweben beprobt und deren Inhalt untersucht werden. Durch die kombinierte Analyse von Metaboliten, anorganischen Ionen sowie der Genexpression und dem Vorkommen von Proteinen mit hoher räumlicher Auflösung könnten Stoffwechselwege nachgezeichnet und spezifischen Zelltypen wie z.B. Schließ- oder Geleitzellen (vgl. Kap. 1.3) zugeordnet werden (Edwards und Coruzzi 1990, Richardson *et al.* 2000). Zusätzlich wäre hierfür die Messung von Stoffflüssen sehr nützlich, um auch dynamische Daten einbeziehen zu können (Meharg 1994). Auf diese Weise wäre es auch möglich, bisher unbekannt Funktionen bestimmter Zelltypen zu entdecken. So konnte bereits gezeigt werden, daß die Blattepidermis von transgenen Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum*) in der Lage ist, als transients Speicherort für Kohlenhydrate zu fungieren (Kehr *et al.* 1998).

1.2 Methoden zur hochauflösenden Probennahme und Analytik

Die aus Organhomogenaten zu gewinnende Information ist von begrenzter Aussagekraft bezüglich des Beitrags eines bestimmten Gewebes oder Zelltyps zum erhaltenen Meßergebnis. Zwar ist die Verkleinerung der Ausgangsmenge an Pflanzenmaterial die logische Konsequenz, aber auch z.B. Blattscheiben bestehen noch aus mehreren Zelltypen. Verkleinert man die Ausgangsmenge bis hin zu einzelnen Zellen, so ergibt sich das Problem, daß die meisten Standardanalysemethoden nicht anwendbar sind. Um dieses Problem zu umgehen, gibt es mehrere Möglichkeiten: Man verwendet Verfahren, die die Bereitstellung einer genügend großen Ausgangsmenge des gewünschten Zelltyps ermöglichen. Eine zweite Lösung stellt die Entwicklung von Analysesystemen dar, die mit kleinsten Volumina arbeiten können. Die dritte Möglichkeit besteht darin, Methoden zu benutzen, die sensitiv genug sind, auch noch geringste Konzentrationen, wie sie nach der Verdünnung kleinster Probenvolumina entstehen, nachweisen zu können (Kehr 2001).

1.2.1 Destruktive Methoden

Für die erste Möglichkeit existieren mehrere, effektive und vielfach angewendete Verfahren zum Vereinzeln von unterschiedlichen Geweben. Grundsätzlich kann jedoch eine Pflanze bzw. ein Organ nur einmal beprobt werden. Mit diesen Methoden ist es deshalb nicht möglich, Zeitverläufe an einem intakten Individuum zu verfolgen.

Vereinzlungstechniken sind z.B. die Herstellung von Zelltyp-spezifischen Protoplasten (Raschke und Hedrich 1988, Murata *et al.* 2001) oder das Abziehen von Zellschichten (*Tissue peels*, Gaedeke *et al.* 2001). Es können sogar bestimmte Zellen eines Gewebesystems, das aus mehreren unterschiedlichen Zelltypen besteht, durch geeignete Verfahrensweisen angereichert werden (z.B. epidermale Fragmente, Kopka *et al.* 1997). Alle diese Vereinzlungsmöglichkeiten greifen jedoch erheblich in den Stoffwechsel der betroffenen Zellen ein und spiegeln daher nur bedingt den *in vivo*-Zustand wider. So verändert beispielsweise Protoplastierung die Genexpression in den Zellen (Grosset *et al.* 1990, Titarenko *et al.* 1997) beziehungsweise deren metabolische Zusammensetzung (Macnicol 1976). Jedoch kann mit diesen Strategien hinreichend viel Ausgangsmaterial bereitgestellt werden, um Standardanalysetechniken wie *Northernblot*hybridisierungen, GC-MS oder Enzymtests durchführen zu können.

Ein alternatives Verfahren stellt das Fixieren, Einbetten und Schneiden von Gewebe dar. Durch *in situ*-Hybridisierung beziehungsweise Immunolokalisation mittels Antikörpern kann das differentielle Vorkommen von Nukleinsäuren und Proteinen in verschiedenen Zellen untersucht werden (Gahan 1984, Gao und Showalter 2000, Engler 2001). Auch andere Moleküle, gegen die Antikörper hergestellt werden können wie z.B. Aminosäuren, konnten in Gewebeschnitten immunolokalisiert werden (Walker *et al.* 2001).

Gewebeschnitte sind außerdem der Mikrodisektion zugänglich. Mechanische Mikrodisektion wurde schon 1977 von Outlaw und Lowry für das Herauslösen von Schließzellpaaren aus *Vicia faba*-Blättern verwendet. Mittels einer sogenannten *Fishbonewaage* war es sogar möglich, einzelne Zellen zu wiegen (Outlaw und Lowry 1977). Insbesondere bei der Analyse tierischen und humanen Gewebes hat sich *Laser Capture Microdissection* (LCM) bewährt (Emmert-Buck *et al.* 1996, Simone *et al.* 1998). Auf diese Weise kann ausreichend viel gleichzeitiges Material gesammelt werden, um die erhaltenen Proben mit der ganzen Palette von Standardmethoden zu analysieren. So konnten in über LCM gewonnen humanen Zellproben Transkripte durch Arrayhybridisierungen nachgewiesen werden (Sgroi *et al.* 1999). In einer genügend großen Menge humaner Zellen wurden Proteine bereits über ein- und zweidimensionale Gelelektrophoresen analysiert und massenspektrometrisch sequenziert (Banks *et al.* 1999, Wittcliff *et al.* 2000). Der spezifische Nachweis bestimmter Proteine in den Proteinmustern war durch *Westernblotting* und Antikörper möglich (Ornstein *et al.* 2000). Es können sich auch Verfahren wie Matrix unterstützte Laserdesorption/ionisations- oder Elektrosprayionisations-massenspektrometrie anschließen (Best *et al.* 2000).

Allerdings ist es wegen der Entwässerung in eingebetteten Proben nicht möglich, lösliche Substanzen zu analysieren. Dies ist aber in kryofixierten Gewebeteilen möglich (Outlaw und Zhang 2001). Hierbei ist jedoch die Probennahme und Handhabung recht schwierig, da ein Auftauen der Proben unbedingt verhindert werden muß und Metabolite durch Einfrieren oder Auftauen hydrolysiert werden können (z.B. ATP, Outlaw und Zhang 2001). In Schock-gefrorenen Gewebeschnitten kann die Verteilung von anorganischen Ionen mittels Elektronen dispersiver Röntgenanalyse (EDX) untersucht werden (Williams *et al.* 1993). Sogar ein Enzymtest in einzelnen, ausgeschnittenen Schließzellen war möglich (für Pyruvat-Orthophosphat-Dikinase, Outlaw *et al.* 1985).

1.2.2 Nicht invasive Methoden

Das genaue Gegenteil von destruktiven Techniken sind nicht invasive Methoden. Jedoch gibt es nur für wenige Analyten geeignete, nicht invasive Verfahren, welche eine hinreichende Sensitivität und räumliche Auflösung bereitstellen. Ein zweiter Nachteil liegt in der Schwierigkeit, daß tiefer liegende Zellschichten unter Umständen nicht mehr erreicht werden können.

Leshem und Pinchasov (2000) konnten photoakustische Spektroskopie, bei der das Auftreten von akustischen Wellen in Folge von Lichtabsorption ausgenutzt wird (Bell 1880, Röntgen 1881), für die Analyse von Stickoxid und Ethylen in reifenden Früchten nutzen. Jedoch ist bisher keine Anwendung für Einzelzelluntersuchungen beschrieben worden.

Nuclear Magnetic Resonance (NMR)-Spektroskopie wurde ebenfalls bereits erfolgreich für die nicht invasive Untersuchung von Pflanzen angewendet werden (Bligny und Douce 2001, Köckenberger 2001). Die Metabolitenverteilung im Hypokotyl (Metzler *et al.* 1995) und im Phloem (Verscht *et al.* 1998) von Rizinus (*Ricinus communis*) konnte auf diese Weise analysiert werden. Die räumliche Auflösung ist aber recht grob und erreicht bislang nicht die Dimension einzelner Zellen. Für genauere Untersuchungen müßten Querschnitte des Gewebes angefertigt werden. Ein weiterer gravierender Nachteil sind die extrem hohen Kosten. Dennoch aber ist NMR-Spektroskopie hervorragend geeignet zum Verfolgen des Flusses von (C^{13} markierten) Metaboliten (Köckenberger *et al.* 2001).

Auch die in der Medizin angewendete Methode der Positron aussendenden Tomographie konnte als Positron aussendendes Spurenabbildungssystem (*positron emitting tracer imaging system*) für das Verfolgen der Aufnahme und des Transports von H_2O^{15} in intakten Pflanzen angewendet werden (Kiyomiya *et al.* 2001). Es war möglich, dieses Aufnahmeexperiment mehrere Male im Abstand von je einer Stunde an derselben Pflanze durchzuführen. Jedoch ist die räumliche Auflösung auf 2,4 mm beschränkt. Dennoch können Informationen über Stoffflüsse an unverletzten Pflanzen erhalten werden.

Durch Fluoreszenzmikroskopie konnte Chlorophyllfluoreszenz in einzelnen Schließ- und Mesophyllzellen gemessen werden (Snell und Dassen 2000, Baker *et al.* 2001). Chlorophyllfluoreszenz ist ein inverses Maß für die Photosynthese und gibt daher Aufschluß über

die assimilatorische Aktivität (Lichtenthaler und Babani 2000). Des weiteren könnte aus der Photosyntheseleistung die Aktivität anderer Stoffwechselwege abgeleitet werden.

Auch weitere physikalische Methoden wie Wachstumsmessungen (Schmundt *et al.* 1998) sind nicht invasiv und geben in Kombination mit weiteren Methoden wertvolle Informationen (Kehr *et al.* 1998). Ionenströme über die Plasmamembran sind ebenfalls nicht invasiv mit selbstreferierenden, Ionen-selektiven Mikroelektroden meßbar (Smith *et al.* 1999). Jedoch ist diese Methode auf Oberflächenzellen beschränkt (Shabala und Newman 1999). Sie wurde erfolgreich auf die Untersuchung von Ca^{2+} , K^+ , H^+ , Cl^- und O_2 -Flüssen in Wurzelzellen (Kochian *et al.* 1992, Mancuso *et al.* 2000) oder Blattepidermiszellen (Shabala und Newman 1999, Mancuso *et al.* 2000) angewendet. Für einige Kationen wie Ca^{2+} und Metabolite wie Glutathion gibt es zudem spezifisch bindende Fluoreszenzfarbstoffe. Werden diese oder andere Farbstoffe, mit denen allgemein interzelluläre Verbindungen untersucht werden können, beispielsweise ins Medium gegeben und von Pflanzen aufgenommen, können über konfokale *Laserscanning*-Mikroskopie Konzentrationen in Zellen bestimmt und Stoffflüsse in den Pflanzen verfolgt werden (Tirlapur und König 1999, Meyer und Fricker 2000, Fricker und Meyer 2001). *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen, die mit dem Gen für das Ca^{2+} -spezifische grün-fluoreszierende Protein Yellow Cameleon 2.1 unter Kontrolle eines Schließzell-spezifischen Promotors transformiert wurden, stellen diesen fluoreszierenden Indikator exklusiv in den Stomatazellen her (Allen *et al.* 1999). In diesen Pflanzen wurde die Ca^{2+} -Homöostase der Schließzellen *in vivo* verfolgt.

Proteine konnten über transgene Pflanzen, die Reportergene wie GFP unter Kontrolle von spezifischen Promotoren exprimierten, im Zusammenspiel mit Techniken wie konfokaler *Laserscanning*-Mikroskopie lokalisiert werden (Fricker und Oparka 1999, Hanson und Köhler 2001). Bei allen Vorteilen stellen transgene Pflanzen aber ein artifizielles System dar. Zudem sind nicht für alle Gene die Promotoren bekannt und das Herstellen transgener Pflanzen nimmt je nach Pflanzenspezies eine recht lange Zeit in Anspruch.

1.2.3 Minimal invasive Methoden

Minimal invasive Probennahme stellt einen Mittelweg dar: Die Beprobung von Zellen erfolgt durch ausgezogene Glaskapillaren, die auf einen Mikromanipulator montiert sind (Abb. 1). Kapillaren mit einem Außendurchmesser $<10 \mu\text{m}$ können unter optischer Kontrolle mittels eines Mikroskops in Zielzellen intakter Pflanzen eingestochen werden (Abb. 1). Hierbei gelangt Zellsaft durch den Turgor der Zelle in die Spitze der Kapillare. Diese kann nun entfernt und ihr Inhalt einer Analyse zugeführt werden (Malone *et al.* 1989, Tomos und Sharrock 2001, Kehr 2001). Die erhaltenen Volumina bewegen sich in Abhängigkeit von Pflanzenart und Zelltyp zwischen 20 und 100 pl (Bazzanella *et al.* 1998, Kehr 1998). Sie sind damit deutlich kleiner als die Volumina, die von typischen Modelleinzellen im tierischen oder humanen Bereich erhalten werden (Olefirowicz und Ewing 1990). Die Zellproben bestehen zum größten Teil aus dem Saft der Vakuolen (Fricke *et al.* 1994a), die je nach Zelltyp und Pflanzenart bis zu 99 % des Zellvolumens ausmachen (Winter *et al.* 1993, Winter *et al.* 1994, Leidreiter *et al.* 1995). Die Frage, ob es sich

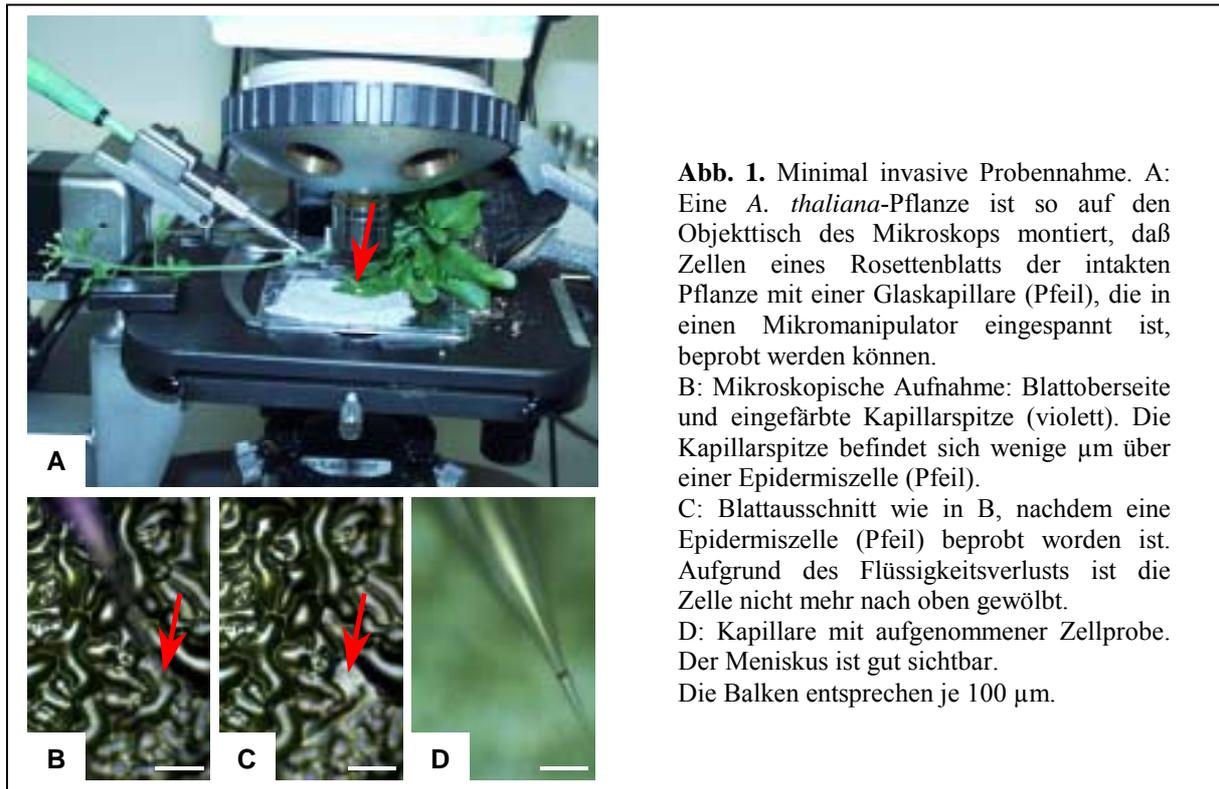


Abb. 1. Minimal invasive Probennahme. A: Eine *A. thaliana*-Pflanze ist so auf den Objektisch des Mikroskops montiert, daß Zellen eines Rosettenblatts der intakten Pflanze mit einer Glaskapillare (Pfeil), die in einen Mikromanipulator eingespannt ist, beprobt werden können.

B: Mikroskopische Aufnahme: Blattoberseite und eingefärbte Kapillarspitze (violett). Die Kapillarspitze befindet sich wenige μm über einer Epidermiszelle (Pfeil).

C: Blattausschnitt wie in B, nachdem eine Epidermiszelle (Pfeil) beprobt worden ist. Aufgrund des Flüssigkeitsverlusts ist die Zelle nicht mehr nach oben gewölbt.

D: Kapillare mit aufgenommener Zellprobe. Der Meniskus ist gut sichtbar.

Die Balken entsprechen je 100 μm .

um eine reine Vakuolenprobe handelt, kann durch Aktivitätsbestimmungen von Markerenzymen beantwortet werden (Fricke *et al.* 1994a); so kommt z.B. Malatdehydrogenase nicht in Vakuolen, aber in anderen Organellen wie Zytoplasma, Glyoxysomen und Mitochondrien vor (Martinoia *et al.* 1981, Cooper und Beevers 1969). In typischen mit Glaskapillaren gewonnenen Epidermiszellproben von Gerste (*Hordeum vulgare*) wurde keine Aktivität dieses Enzyms nachgewiesen (Fricke *et al.* 1994a). Verändert man die Probennahme so, daß man die Zellinhalte quantitativer erntet (vgl. Kap. 2.2.3.1), kann durchaus auch beispielsweise Zytoplasma aus Epidermiszellen erhalten und über RT-PCR nachgewiesen werden (Brandt *et al.* 1999).

Diese Beprobungsmethode wurde mehrfach am selben Blatt durchgeführt, ohne daß es z.B. zu einer Veränderung der Osmolarität der Proben kam (Kehr 1998). Vermutlich greift die Methode kaum in den Stoffwechsel der Nachbarzellen ein. Dies ist wichtig, weil es dadurch möglich wird, Zeitverläufe durch wiederholte Probennahme am selben Organ zu verfolgen.

Es können nicht nur Oberflächenzellen beprobt werden. Inhalte aus tiefer gelegenen Zellschichten wie dem Mesophyll werden extrahiert, indem die Kapillare durch geöffnete Stomata gestochen wird (Fricke *et al.* 1994a) bzw. indem ein Überdruck an die Kapillare beim Hindurchstechen durch unerwünschte Zellschichten angelegt wird. Die Verwendung von Reporter genen wie GFP unter Kontrolle von Zelltyp-spezifischen Promotoren in Kombination mit transgenen Ansätzen ermöglicht es sogar, spezifische Zellen der Leitbündel anzustechen (Geleitzellen, Brandt *et al.* 1999). Auch der Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen wie Carboxyfluoreszeindiacetat, welches spezifisch in Siebelementen angereichert wird, kann zur Identifikation von Zielzellen herangezogen werden (Raps *et al.* 2001).

Für durch die Glaskapillarmethode gewonnene Proben ist die Entwicklung hochempfindlicher Analyseverfahren, die mit kleinsten Volumina bzw. geringsten Konzentrationen arbeiten, notwendig. Es gibt bereits geeignete Verfahren, für die die Probenmenge nicht nur bis auf den Inhalt von Einzelzellen (Tomos und Sharrock 2001), sondern sogar bis hin zu Aliquots dieser verringert werden kann (Lochmann *et al.* 1998, Bazzanella *et al.* 1998).

1.2.3.1 Metabolitenanalytik

Pflanzliche Proben, die minimal invasiv durch Glaskapillaren gewonnen wurden, haben zwar häufig ein sehr kleines Volumen (<1 nl) und die absoluten Stoffmengen sind gering (pmol-fmol), dennoch sind eine Reihe von Methoden entwickelt worden, die eine hinreichende Sensitivität besitzen.

Stoffflüsse können demnach nicht nur nicht invasiv (vgl. Kap. 1.2.2), sondern auch minimal invasiv verfolgt werden, wodurch die räumliche Auflösung erhöht wird. Werden Pflanzen radioaktiv markiertem $C^{14}O_2$ ausgesetzt, so läßt sich das aufgenommene radioaktiv markierte C^{14} in Zellproben mittels *Biological Accelerator*-Massenspektrometrie bis zu fmol-Mengen nachweisen (Koroleva *et al.* 2000). Jedoch ist es bisher nicht möglich, die Substanzen, in die das C^{14} eingebaut wurde, zu identifizieren.

Kuzmin und Kollegen (1973) verwendeten Kapillarflußzellen, um in ihnen die Absorption von Mikrotröpfchen zu messen. Mittels dieser Methode konnten sie in subzellulären Proben der Alge *Acetabularia* Enzymtests durchführen (Mikichur *et al.* 1976). Auch für Zellproben höherer Pflanzen wurden solche Enzymtests sowohl zur Aktivitätsbestimmung (Fricke *et al.* 1994a, Koroleva *et al.* 1997) als auch zur Analyse von Metabolitenkonzentrationen (Fricke *et al.* 1994b, Kehr *et al.* 1999, Korolev *et al.* 2000) verwendet. EDX wurde in solchen Proben für die Bestimmung anorganischer Ionen erfolgreich eingesetzt (Fricke *et al.* 1994a-c, Fricke *et al.* 1995). Mit den bisher beschriebenen Analysetechniken kann jedoch nur eine Substanz pro Ansatz untersucht werden, wobei es auch zu Interferenzen zwischen Molekülen in den Proben kommen kann (Kehr 2001). Im Gegensatz dazu haben trennende Techniken den Vorteil, daß sie zur simultanen Bestimmung mehrerer Komponenten mindestens einer Stoffklasse geeignet sind. Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) oder Kapillarelektrophorese (CE) sind solche Techniken. GC-MS ist die universalere Methode der beiden, da multiparallel nicht nur viele Substanzen einer Stoffklasse, sondern auch unterschiedlicher Stoffklassen getrennt und detektiert werden können (Roessner *et al.* 2000). Hingegen werden in der CE meist nur Substanzen einer Stoffklasse getrennt und

Tab. 1. Kapillarelektrophoresedetektoren und ihre ungefähren Nachweisgrenzen (Detektionslimits). Nach Baker 1995, verändert.

Detektor	Mol	Molarität
UV/Vis-Absorption	10^{-13} - 10^{-16}	10^{-5} - 10^{-7}
Indirekte Absorption	10^{-12} - 10^{-15}	10^{-4} - 10^{-6}
Fluoreszenz	10^{-15} - 10^{-17}	10^{-7} - 10^{-9}
Indirekte Fluoreszenz	10^{-14} - 10^{-16}	10^{-6} - 10^{-8}
Laser induzierte Fluoreszenz (LIF)	10^{-18} - 10^{-20}	10^{-13} - 10^{-16}
Massenspektrometrie	10^{-16} - 10^{-17}	10^{-8} - 10^{-10}
Amperometrie	10^{-18} - 10^{-19}	10^{-7} - 10^{-10}
Leitfähigkeit	10^{-15} - 10^{-16}	10^{-7} - 10^{-9}
Refraktärindex	10^{-14} - 10^{-16}	10^{-6} - 10^{-8}
Radioaktivität	10^{-17} - 10^{-19}	10^{-10} - 10^{-12}

nachgewiesen. Bei sorgfältiger Wahl des Hintergrundelektrolyten (HGE) und der Meßbedingungen ist aber die Analyse unterschiedlichster Substanzklassen möglich (Baker 1995, Heiger *et al.* 1996, Ross und Serwe 1998, Guetens *et al.* 2000). Das benötigte Probenvolumen ist kleiner und die Nachweisgrenze (Detektionslimit, LOD) ist deutlich geringer (Baker 1995) als bei der GC-MS. Die CE im engeren Sinne wurde 1981 von Jorgenson und Lukacs eingeführt und ist inzwischen eine weitverbreitete Analysemethode in Wissenschaft und Industrie. Die Detektionsmöglichkeiten reichen von UV/VIS-Absorption über Amperometrie, Refraktionsindex und Radioaktivität bis hin zur Massenspektrometrie (Tab. 1, Baker 1995). Mittels Laser induzierter Fluoreszenz-Detektion (LIF) konnte schon ein LOD im zmol-Bereich erzielt werden (Baker 1995). Jede Detektionsart hat ihre Vor- und Nachteile, welche sorgfältig für das jeweilige Experiment abgewogen werden sollten.

Eine Reihe von Publikationen sind vorhanden, in denen demonstriert werden konnte, daß Einzelzellanalysen mittels CE durchgeführt werden können. Diese wurden fast ausschließlich an tierischen oder humanen Zellen vorgenommen. Hierbei wurden Proteine, Amine (Wallingford und Ewing 1988), Neurotransmitter (Olefirowicz und Ewing 1990), Aminosäuren, Anionen, Kationen, primäre Metabolite und weitere Substanzen sowie Enzymaktivitäten (Shaner und Brown 2000) untersucht. In pflanzlichen Zellproben wurden mittels CE bisher Kationen (Bazzanella *et al.* 1998, Kehr *et al.* 1999), Anionen (Bazzanella *et al.* 1998), Zucker und Aminosäuren (Lochmann *et al.* 1998, Arlt *et al.* 2001) sowie einige Alkaloide (Lochmann *et al.* 2001) bestimmt. Bislang wurde nur eine Publikation veröffentlicht, in der solche Analysen im Zusammenhang mit einer biologischen Fragestellung bearbeitet wurden (Kehr *et al.* 1999).

Mittels Glaskapillaren kann nicht nur der Inhalt von Zellen gesammelt und einer nachfolgenden Analytik zugeführt werden. Die Kapillaren wurden auch schon durch Befüllen mit Elektrolytlösung als (Ionen-selektive) Mikroelektroden verwendet (Miller *et al.* 2001). Nach Einstechen in einzelne Zellen wie beispielsweise Schließzellen (Roelfsema *et al.* 2001) sind Ionenströme, ähnlich wie beim *whole cell*-Modus des *Patch clampings*, meßbar. Mittels dieser minimal invasiven Methode können aber nicht nur die Ströme von Oberflächenzellen (vgl. Kap. 1.2.2, vibrierende selbstreferierende Elektroden), sondern auch von weiter innen gelegenen Zellen gemessen werden (Nitrat, Ammonium, pH-Wert, Miller *et al.* 2001). Auch die Injektion von Ionen-selektiven Farbstoffen in z.B. Schließzellen zur Verfolgung von Ionenströmen und zur Bestimmung von Ionenkonzentrationen ist möglich (McAinsh *et al.* 1990). Die Mikroinjektion wurde von Knoblauch und Kollegen (1999) so verfeinert, daß es inzwischen sogar möglich ist, einzelne Zellorganellen wie Chloroplasten zu treffen. Diese können nach Injektion einer entsprechenden DNA, gelöst in einem fl- bis al-Volumen, transient transformiert werden (Knoblauch *et al.* 1999). Durch Mikroinjektion dürfte es auch möglich sein, fluoreszierende Substrate für die *in vivo*-Aktivitätsbestimmung endogener Enzyme (Haugland 1995) in einzelne Zellen intakter Pflanzen zu injizieren.

1.2.3.2 Proteinanalytik

Zwar können auch Proteine (Pinto *et al.* 1997, Okerberg und Shear 2001) und Nukleinsäuren (Zabzdyr und Lillard 2001) sehr effizient mittels CE nachgewiesen werden, aber es werden lediglich Informationen über die Retentionszeiten oder- unter denaturierenden Bedingungen- über die Massen, nicht jedoch über die Sequenz der Moleküle und damit ihre Identität erhalten. So konnte das Proteinmuster von einzelnen *Caenorhabditis elegans*-Zellen zwar ermittelt, aber über die Identität der Proteine nur spekuliert werden (Hu *et al.* 2001). Durch Hinzufügen von Proteinstandards (*Spiking*) könnten einige Proteine identifiziert werden, jedoch ist dies bei angenommenen 20.000 Genen, von denen ein nicht unerheblicher Teil exprimiert ist (Hu *et al.* 2001), keine Hochdurchsatzmethode. Um diese beiden eminent wichtigen Stoffklassen dennoch auf Zellebene zu untersuchen, wurden andere Verfahren entwickelt (vgl. Kap. 1.2.1 und 1.2.3.3). Proteine, gegen die Antikörper vorhanden sind, können auch direkt in mittels Glaskapillartechnik gewonnenen Proben einzelner Zellen nachgewiesen werden. Hierzu werden die Zellinhalte auf Membranen aufgetragen und mit Antikörpern gegen das zu untersuchende Protein inkubiert. So konnte das Vorhandensein von Rubiscopein in Mesophyllzellextrakten von Gerste nachgewiesen werden (Koroleva *et al.* 2000).

1.2.3.3 Transkriptanalytik

Proben pflanzlicher Zellen enthalten nur eine sehr geringe Menge mRNA (<700 fg, Dresselhaus *et al.* 1994). Transkripte aus Einzelzellproben können durch reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) mit spezifischen Primern (Richert *et al.* 1996, Brandt *et al.* 1999) amplifiziert und detektiert werden. Koltai und McKenzie Bird (2000) benutzten für RT-PCR vermittelten Nachweis von Transkripten eingebettete Gewebeschnitte aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*) und *A. thaliana*.

Ein Nachteil von RT-PCR mit spezifischen Primern ist der, daß pro Ansatz lediglich ein Transkript amplifiziert wird. Um einen höheren Durchsatz zu erzielen ohne die Probenmenge zu erhöhen, kann eine Multiplex-PCR durchgeführt werden, bei der mehrere Primerpaare pro Ansatz eingesetzt werden. Dadurch können bis zu neun unterschiedliche cDNAs gleichzeitig nachgewiesen werden (Ponce *et al.* 2000). Theoretisch sollte dieser Ansatz auch mit Proben aus wenigen Zellen möglich sein. Eine ungleiche Bindungseffizienz der Primer insbesondere in den ersten Zyklen würde jedoch zu falschen relativen Aussagen führen. Dies wird zu einem umso gravierenderen Problem, je limitierter die Ausgangsmenge ist.

Um ganze Transkriptome oder wenigstens Teile davon zu vergleichen, sind verschiedene Methoden etabliert worden (Lockhart und Winzeler 2000). Das Durchmustern von cDNA-Bibliotheken ist ein häufig angewendetes Verfahren. Hierbei können spezifische Transkripte in zwei unterschiedlichen Bibliotheken auf ihre Anwesenheit hin getestet werden. Jedoch sind quantitative Aussagen schwer zu treffen. Im *Differential Display* (Liang und Pardee 1992, Bauer *et al.* 1993) werden *Arbitrary*-Primer benutzt. Dies sind Primer mit einer festen Sequenz, die unter genau definierten Bedingungen ausgewählt werden (vgl. Kap. 2.2.4.3.7.8) und mehr oder weniger

zufällig an DNA-Sequenzen binden. In einer PCR erzeugen sie in Kombination mit einem Oligo (dT)-Primer Fragmente der ursprünglichen DNA-Population. Über Sequenzgele können die Produkte verschiedener Ausgangsmengen direkt verglichen und interessante Banden ausgeschnitten, reamplifiziert und sequenziert werden. Bei der repräsentativen Differenzanalyse werden an eine cDNA-Population (*Tester*) Adaptoren ligiert. Danach werden sie mit der zu vergleichenden cDNA-Population (*Driver*) gemischt und eine PCR mit Primern gegen die Adaptoren durchgeführt. Nur solche cDNA-Moleküle, die ausschließlich in der *Tester*-Population vorkommen, werden exponentiell amplifiziert. Heteroduplices aus homologen Molekülen beider Populationen werden lediglich linear vermehrt. Den nur in der *Driver*-Population vorkommenden cDNA-Molekülen fehlen die Adaptoren völlig, so daß sie gar nicht amplifiziert werden. Anschließend können die exklusiv vermehrten und nur in der *Tester*-Population vorkommenden cDNA-Moleküle kloniert und sequenziert werden (Lisitsyn *et al.* 1993). Bei der massenhaften Hybridisierung, auch Arrayhybridisierung genannt, werden markierte einzelsträngige cDNA-Moleküle, die die Gesamtheit eines Transkriptoms zu einem bestimmten Zeitpunkt repräsentieren, gleichzeitig gegen ein Set von bis zu mehreren tausend *Expressed Sequence Tags* (ESTs) oder Oligonukleotiden hybridisiert (Lennon und Lehrach 1991, Duggan *et al.* 1999). Typische kommerzielle Arrayfilter repräsentieren bis zu 8.200 Gene (Affymetrix, <http://www.affymetrix.com>). In absehbarer Zeit wird es sicherlich möglich sein, das komplette *A. thaliana*-Genom auf Arrays unterzubringen.

Mit Ausnahme des *Differential Display* benötigen alle diese Techniken Ausgangsmengen an mRNA, wie sie nicht einmal in großen tierischen Zellen wie z.B. in Riesenneuronen von Schnecken (*Planorbis corneus*, Olefirowicz und Ewing 1990) zu finden sind. Daher ist es zunächst notwendig, die in den Wenig- oder Einzelzellproben enthaltene mRNA zu amplifizieren (Freeman *et al.* 1999, Brady 2000). Dazu sind verschiedene Techniken entwickelt worden.

So konnten Belyavski und Kollegen (1989) erstmals zeigen, daß durch *Tailing* auch an die 3'-Enden der Erstrang-cDNA, die nur aus wenigen Myelomzellen gewonnen wurde, bekannte Sequenzen ansynthetisiert werden können. Nach PCR konnten die Produkte zum Anlegen einer cDNA-Bibliothek genutzt werden. Auf die gleiche Weise wurde eine solche Bibliothek aus nur 50 Mausezellen hergestellt. Dabei entsprach die mRNA-Ausgangsmenge etwa 1,75 ng (Welsh *et al.* 1990).

Bertioli und Kollegen (1994) konnten mittels *Tailing* aus pflanzlicher mRNA eine cDNA-Bibliothek anlegen. Sie benutzten jedoch eine nicht weiter definierte Menge Gesamt-RNA, die sie aus nur 10 mg pflanzlichen Gewebes isoliert hatten. Ein ähnliches Protokoll wurde verwendet, um aus 128 Eizellprotoplasten aus Mais (*Zea mays*) eine cDNA-Bibliothek herzustellen (Dresselhaus *et al.* 1994). Die Ausgangsmenge mRNA wurde durch theoretische Überlegungen auf circa 50 pg geschätzt (Dresselhaus *et al.* 1994).

Die Methode des *Tailings* konnte verfeinert werden. Während Belyavski *et al.* (1989) den Schwerpunkt auf die Vermehrung von Vollängenklonen legten, versucht das Protokoll von Brady *et al.* (1990), die Expressionsstärken während der PCR besser beizubehalten. Durch eine

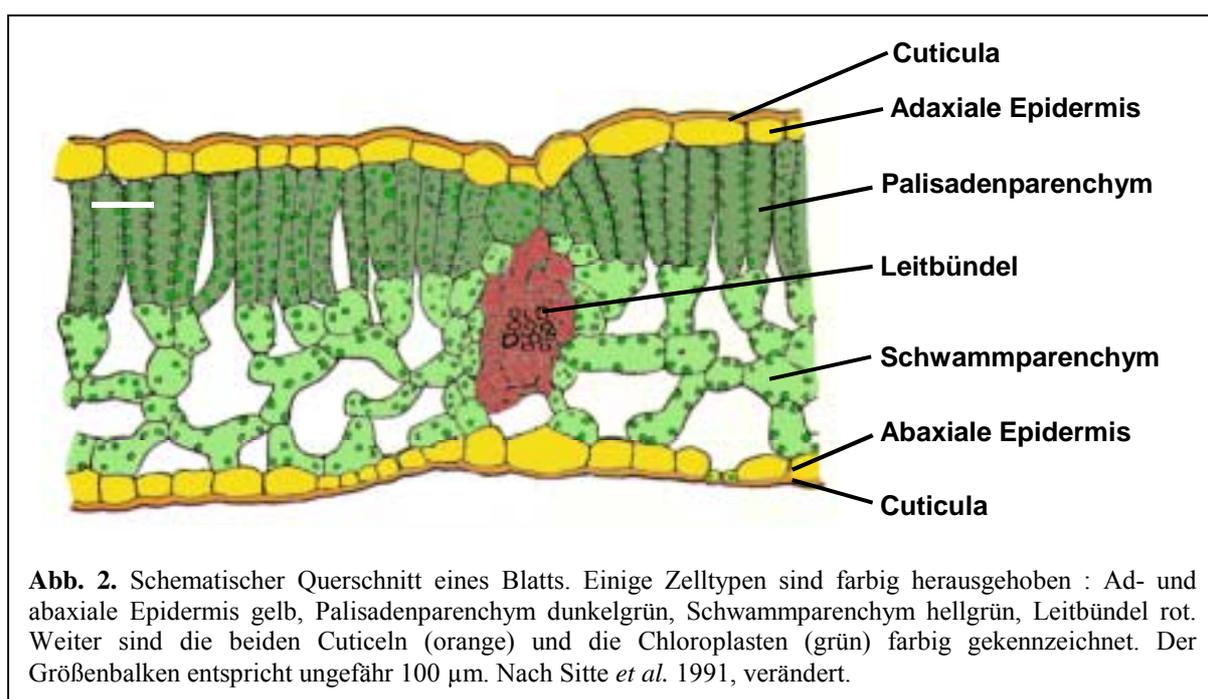
verkürzte Zeit für die reverse Transkription sind alle entstandenen cDNAs zwischen 500 und 700 bp lang und es kommt in der PCR nicht mehr zur Bevorzugung der kleineren Moleküle (Phillips und Eberwine 1996, Luo *et al.* 1999), da alle in etwa die gleiche Größe haben.

In einer weiteren globalen PCR-Strategie wurden Adaptoren an das unbekannte Ende der revers transkribierten, doppelsträngig gemachten cDNA aus einzelnen Tomatenepidermiszellen beziehungsweise vereinigten Gerstenmesophyllzellen ligiert. Deren Sequenz diente in Kombination mit einer abgewandelten Oligo (dT)-Sequenz als Primer für die PCR (Karrer *et al.* 1995, Gallagher *et al.* 2001).

Eine dritte, nicht PCR-basierende Methode stellt die lineare *antisense*RNA Amplifikation dar (Phillips und Eberwine 1996, Luo *et al.* 1999). Hierbei wird für die reverse Transkription ein Oligo (dT)-Primer verwendet, der einen Promotor für eine RNA-Polymerase enthält. Nach der reversen Transkription kann so durch lineare Amplifikation *antisense*RNA hergestellt werden. Der Vermehrungsfaktor liegt hierbei in der ersten Runde bei ca. 10^3 , nach einer zweiten Runde bei ca. 10^6 (Phillips und Eberwine 1996) und ist damit vergleichbar mit dem der PCR. Bei dieser Methode werden überwiegend 3'-Sequenzen und keine Vollängenklone erhalten (Phillips und Eberwine 1996, Freeman *et al.* 1999), weshalb sie weniger für die Herstellung von cDNA-Bibliotheken geeignet ist. Die synthetisierten *antisense*RNA-Moleküle können jedoch für Arrayhybridisierungen verwendet werden (Luo *et al.* 1999).

1.3 Das Blatt

Blätter höherer Pflanzen bestehen im wesentlichen aus drei Gewebesystemen (Abb. 2): Den Epidermen, dem Mesophyll (Palisaden- und Schwammparenchym) und den Leitbündeln, wobei im folgenden als Vereinfachung Epidermis und Mesophyll als Gewebe bezeichnet werden (vgl. Kap. 1). Die Epidermis bildet die Abschlußgewebe des Blattes, während das Mesophyll den Ort



der Photosynthese darstellt. In den Leitbündeln lassen sich die Zelltypen grob den Leitbahnen Xylem und Phloem zuordnen. Im folgenden werden Epidermis und Mesophyll genauer beschrieben, da diese beiden Gewebe in der vorliegenden Arbeit exemplarisch untersucht werden sollten.

1.3.1 Die Epidermis

Die Epidermis (griechisch Oberhaut) ist das äußere Abschlußgewebe eines Blattes (Abb. 2). Bei *A. thaliana*, wie auch den meisten anderen krautigen Pflanzen, handelt es sich um eine einzige Zellschicht. Sie ist nicht nur die Abgrenzung zur Umwelt, sondern auch die Kontaktstelle. Die Zellen schließen lückenlos aneinander und sind stark miteinander verzahnt, was die mechanische Belastbarkeit erhöht. Dadurch können sie häufig als Häutchen abgezogen werden. In den Zellen der Epidermis kommen kaum intakte Chloroplasten vor (Sitte *et al.* 1998). Die meisten Plastiden sind farblose Leukoplasten oder, je nach Pflanze, farbige Chromoplasten (Lüttge *et al.* 1999). Die Hauptaufgabe der Epidermiszellen ist die Verhinderung der unkontrollierten Transpiration von H₂O über die Oberfläche der Blätter. Hierzu wird auf die Oberseite der Zellen eine Schicht aus Cutin und Wachs gelegt (Cuticula, Abb. 2). Sie vermindert die Verdunstung auf bis zu 0,01 % gegenüber der einer gleichflächigen Wasseroberfläche (Sitte *et al.* 1998). Um dennoch einen Gasaustausch, der für die Photosynthese essentiell ist, zu ermöglichen, befinden sich in der Epidermis neben weiteren Zelltypen wie Blatthaaren (Trichome) Schließzellpaare, die als Idioblasten bezeichnet werden können (Braune *et al.* 1991). Sie sind vereinzelt vorkommende, stark spezialisierte Zellen, die sich sowohl anatomisch als auch funktionell stark von den übrigen Epidermiszellen unterscheiden (Sitte *et al.* 1998). Sie können, abhängig vom Wasserstatus der Pflanze, Spaltöffnungen schließen oder öffnen. Durch sie tritt neben O₂ auch H₂O aus dem Interzellularraum aus und CO₂ kann aus der Atmosphäre in diesen eindiffundieren. Mittels Analysen mit hochauflösenden Methoden könnte ihre biochemische Zusammensetzung genauer untersucht und ihre Funktionsweise besser verstanden werden. So konnten bereits in Gerstenblättern Konzentrationsgradienten für Malat in benachbarten Epidermiszellen von Stomata nachgewiesen werden (Fricke *et al.* 1995). In dieser Arbeit wurden ausschließlich reguläre Epidermiszellen untersucht. Vorkommende Idioblasten hingegen wurden nicht analysiert, weshalb von Epidermis als Gewebe gesprochen wird.

In manchen Pflanzen besteht eine weitere Aufgabe der Epidermis darin, Fraßfeinde abzuwehren. Dazu wird eine besonders dicke Cuticula benötigt. Die Cuticula kann auch durch Verkalkung oder Verkieselung gefestigt werden (Sitte *et al.* 1998). Zu diesem Zweck lagern einige Pflanzen zusätzlich sekundäre Metabolite in der Epidermis ein. Tabak (*Nicotiana tabaccum*) beispielsweise speichert Nikotin, Nornikotin und Anabasin in der Epidermis (Lochmann *et al.* 2001). Die Nikotinkonzentration in Epidermiszellen ist 10fach erhöht gegenüber der Konzentration im Gesamtblatt (Lochmann *et al.* 2001). Auch Trichome können wie im Falle der Brennessel (*Urtica dioica*) der Verteidigung dienen (Sitte *et al.* 1998), indem sie Sekrete einlagern, die Fraßfeinde abwehren sollen.

Aus Untersuchungen an Gerste ist bekannt, daß Ca^{2+} und Cl^- präferentiell in den Epidermiszellen akkumuliert werden, während Phosphat, Aminosäuren und Zucker verglichen mit Mesophyllzellen in nur geringen Konzentrationen vorliegen (Dietz *et al.* 1992, Dietz *et al.* 1994, Fricke *et al.* 1994a, Karley *et al.* 2000). Eine mögliche Erklärung für die genau gegenteilig verteilten Ionen Ca^{2+} und Phosphat könnte darin liegen, daß beide zusammen unlösliche Salze bilden und daher streng räumlich getrennt werden müssen (Dietz *et al.* 1992).

Über Epidermis-spezifische Gene ist bislang nicht viel bekannt. In einigen Untersuchungen wurden Gene, die an der Wachsbiosynthese (Post-Beittenmiller 1996) beteiligt sind, mittels *in situ*-Hybridisierung lokalisiert. Dabei konnten in *A. thaliana* Transkripte der Gene CUT1 (ein sehr lange Fettsäuren kondensierendes Enzym, Millar *et al.* 1999) und LTP1 (ein Lipid transportierendes Protein, Thoma *et al.* 1994) in Blättern spezifisch in der Epidermis lokalisiert werden. Ein anderes Gen der LTP-Familie, WAX9, wurde in Brokkoli (*Brassica oleracea*) ebenfalls als Epidermis-spezifisch exprimiert gefunden (Pyee und Kolattukudy 1995). Vermutlich zeigen weitere an der Cutinsynthese beteiligte Gene Epidermis-spezifische Expressionsmuster. An Petersilienpflanzen (*Petroselinum crispum*) wurden Lokalisierungsstudien für Phenylalaninammoniumlyase, 4-Cumarat-CoA-Ligase, Chalconsynthase und anderer am Phenylpropanoidstoffwechsel beteiligter Gene durchgeführt. Sowohl Transkripte als auch, so weit durchgeführt, Proteine und sogar Endprodukte konnten im Blatt exklusiv in der Epidermis gefunden werden (Schmelzer *et al.* 1988, Wu und Hahlbrock 1992, Reinhold und Hahlbrock 1997), wobei eine Lichtinduktion der Transkription beobachtet wurde. Einige weitere Gene sind in verschiedenen Pflanzenspezies als Epidermis-spezifisch beschrieben worden (Kyojuka *et al.* 1998, Simmons *et al.* 1998, Smart *et al.* 2000). Herausragend ist dabei die Lokalisation eines Transkriptionsfaktors der *myb*-Gruppe, der offenbar an der Entwicklung von Trichomen beteiligt ist (Li *et al.* 1996).

1.3.2 Das Mesophyll

Das Mesophyll (griechisch Blattmitte) ist untergliedert in Palisaden- und Schwammparenchym (Abb. 2). Ersteres ist senkrecht zur Blattoberfläche angeordnet und grenzt an die adaxiale Epidermis der Blätter. Es stellt den Hauptort der Photosynthese dar. Bis zu 80 % der im Blatt vorkommenden Chloroplasten befinden sich in dieser meist einschichtigen Zelllage, in der kleinere Interzellularräume vorkommen (Abb. 2, Lüttge *et al.* 1999). Das Schwammparenchym besteht aus großen, unregelmäßig angeordneten Zellen, wodurch große Interzellularräume entstehen (Abb. 2). Die „innere“ Oberfläche ist dadurch stark vergrößert, so daß der Gasaustausch zwischen der Luft und den Zellen rasch verlaufen kann (Sitte *et al.* 1998). An der Grenze zwischen Palisaden- und Schwammparenchym verlaufen die Leitbündel, die für die Nährstoffversorgung und den Abtransport der Assimilate an die Verbrauchsorte verantwortlich sind. Jedoch bilden die Leitbündel ein eigenes Gewebesystem und gehören nicht zum Mesophyll, auch wenn sie mit diesem sehr eng verknüpft sind (Abb. 2). In ihnen finden sich z.B. auch die Geleitzellen, die sich wie Schließzellen ebenfalls anatomisch von den sie umgebenden Zellen stark unterscheiden (Sitte

et al. 1998). Palisaden- und Schwammparenchym sowie die Geleitzellen sind weitere Beispiele für Zelltypen, deren Rolle mittels Einzelzellanalytik besser verstanden werden könnte. In der vorliegenden Arbeit wird vom Mesophyll als Gewebe gesprochen, gleichwohl es aus zwei unterschiedlichen Zelltypen besteht. Diese sollten hier aber nicht im einzelnen, sondern zusammen im Vergleich zur Epidermis untersucht werden.

Zu den Hauptaufgaben des Mesophylls gehört neben der Aufnahme von CO_2 aus und der Abgabe von O_2 in den Interzellularraum die Fixierung des aufgenommenen CO_2 in Kohlenhydraten und die Bereitstellung energiereicher Verbindungen wie ATP und $\text{NADPH}+\text{H}^+$ in der Photosynthese. Die Photosynthese ist in den Chloroplasten lokalisiert. So findet man als Mesophyll-spezifische Transkripte vor allem die von Chloroplastenproteinen: Z.B. den Triosephosphattranslokator, der das zunächst in Triosephosphat festgelegte CO_2 aus den Chloroplasten befördert (Brink *et al.* 1995), Chlorophyll a/b bindende Proteine (Brink *et al.* 1995), Proteine der Photosysteme I und II (Mustardy *et al.* 1990) oder die kleine Untereinheit der Rubisco (Perrot-Rechenmann *et al.* 1989) und eine ganze Reihe weitere Proteine. Es lassen sich aber auch Transkripte von Genen nachweisen, die nur mittelbar an der Photosynthese beteiligt sind bzw. von ihr abhängen wie z.B. eine chloroplastidäre Glutaminsynthetase (Edwards *et al.* 1990), Carboanhydrase, die an der schnellen Umwandlung von CO_2 in HCO_3^+ beteiligt ist (Jacobson *et al.* 1975), ein mitochondrialer Glycinderboxylasekomplex, welcher durch die Oxygenaseaktivität der Rubisco entstandenes Glycolat über Glycin zu Serin umsetzt (Mohr und Schopfer 1992), oder Saccharosephosphatsynthase, die wahrscheinlich an der Kontrolle der Fixierung von Kohlenstoff in Saccharose beteiligt ist (Cheng *et al.* 1996).

Untersuchungen an Gerste ergaben, daß die Konzentration an Aminosäuren und primären Photosyntheseprodukten wie Fruktose, Glukose und Saccharose im Mesophyll gegenüber der Epidermis deutlich erhöht ist (Tomos *et al.* 1992, Dietz *et al.* 1994, Fricke *et al.* 1996, Kehr *et al.* 1998, Koroleva *et al.* 2000). Auch Phosphat und Mg^{2+} sind im Mesophyll stärker konzentriert als in Epidermiszellen (Dietz *et al.* 1992, Fricke *et al.* 1994a). Mg^{2+} -Ionen werden für den Einbau in das Chlorophyll benötigt. Aber auch ohne das so festgelegte Mg^{2+} ist dessen Konzentration immer noch etwa fünffach höher als in der Epidermis (Dietz *et al.* 1992). Phosphat wird insbesondere als Orthophosphat für den Triosephosphat-Orthophosphat-Antiport beim Transport der primären Photosyntheseprodukte aus den Chloroplasten benötigt (Fliege *et al.* 1978).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von Blättern der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* in Hinsicht auf Gewebe-spezifische Besonderheiten bis hin zur Einzelzellanalyse. Die Bestimmungen sollte nicht nur Expressionsstudien von Transkripten und Proteinen beinhalten, sondern ebenfalls einen Überblick über Ionen- und Metabolitenkonzentrationen geben. Bereits an anderen Organismen etablierte Protokolle sollten aufgegriffen und ihr Potential exemplarisch an den beiden Blattgeweben Epidermis und Mesophyll von *A. thaliana* demonstriert bzw. neue methodische Ansätze entwickelt und erprobt werden. Im einzelnen sollten

- spezifische Transkripte nachgewiesen werden, um letztlich die Erstellung von Expressionsprofilen einzelner Zellen zu ermöglichen,
- Gewebe-spezifisch anorganische Ionen, Kohlenhydrate sowie Aminosäuren nachgewiesen werden,
- Proteine in Gewebe-spezifischen Proben identifiziert werden. Hierzu sollte Gewebe durch mechanische Mikrodissektion in eingebetteten Schnitten angereichert werden. Anschließend sollten die Proteine durch Gelelektrophorese und Massenspektrometrie identifiziert werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Samen

Samenlager, MPI-MP, Golm	<i>Arabidopsis thaliana</i> L., cv. C24 (Ackerschmalwand), Wildtyp
Nunhems Zaden BV, AA Haelen, Niederlande	<i>Cucumis sativus</i> L., cv. Bella F1 (Gurke), Wildtyp
Samenlager, MPI-MP, Golm	<i>Cucurbita maxima</i> Duch., cv. Gelber Zentner (Kürbis), Wildtyp
	<i>Solanum tuberosum</i> L., cv. Desirée (Kartoffel), Wildtyp

2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterial

Amersham, Braunschweig	α P ³³ dCTP, α P ³² dCTP
Applied Biosystems, Weiterstadt	SDS 5700 Sequence Detection System, Primer Express-Software
Beckman Coulter, Unterschleißheim	P/ACE 5510 Kapillarelektrophorese, P/ACE MDQ 2000 Kapillarelektrophorese, Argonlaser, Zubehör, Gold-Software, PACE Station Software
BioRad, München	Transilluminator, Kamera, Thermodrucker, Mini Protean 3 Elektrophorese-Apparatur
BioRobotics, Cambridge, UK	BioGrid Spottingroboter
CS Chromatographie Service, Langerwehe	Borosilikatkapillaren
Drummond Scientific Co., Broomall, USA	Digital Microdispenser
Eppendorf, Hamburg	Biopur Reaktionsgefäße (steril), Kapillarenhalter, Mikromanipulator 5171, Pipetten, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, Tischzentrifuge, Biophotometer, Mikromeißelsystem
Heraeus Instruments, Berlin	Labor-Muffelofen Typ M 104
Imaging Research, St.Catherine`s, Kanada	Array Vision Software
Kodak Eastman, Rochester, USA	Entwickler, Fixierer, X-OMAT-AR-Filme
List Electronic, Darmstadt	Pipettenziehgerät
Macherey-Nagel, Düren	Nylonmembran Porablot NY
Micromass, Altrincham, UK	Q-TOF 1 Massenspektrometer, Biolynx Software, Gold- beschichtete Borosilikat-Glaskapillaren
MWG Biotech, Ebersberg	Hybaid Hybridisierungsflaschen HB-OV-BM, Hybaid Minioven, Primus Thermocycler 25, Sequenzierungen
Millipore, Eschborn	Zip Tips
Nikon, Düsseldorf	Fluoreszenz-Auflichtmikroskop Optiphot 2, Filterblock V, Narishige Mikroschmiede, Kamera F 601F
Palisade Coorporation, New York, USA	Wiley-Massenspektralbibliothek
Raytest, Straubenhardt	Fuji BAS Intensifying Screen, Fuji BAS 1800 II Phosphorimager

Sigma, Deisenhofen	Kodak Röntgenfilm
Sarstedt, Nümbrecht	<i>Biosphere</i> Filtertips (steril)
Spindler und Hoyer, Göttingen	schwingungsfreier Tisch
Stratagene, Heidelberg	Stratalinker 1800
ThermoQuest, Manchester, UK	AS 2000 Autosampler, GC 8000 Gaschromatograph, Voyager Quadrupolmassenspektrometer
World Precision Instruments, Berlin	Borsilikatglaskapillaren
Ziege Labortechnik, Luckenwalde	Agarosegel-Elektrophoresezubehör

2.1.3 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien und Reagenzien sind, wenn nicht gesondert ausgewiesen, von Roth (Karlsruhe), Life Technologies (Eggenstein), Merck (Darmstadt) oder Sigma (Deisenhofen). Chemikalien wurden in pro analysi-Qualität verwendet.

Applied Biosystems, Weiterstadt	SYBR Green PCR-Mix
Biometra, Göttingen	Dynazyme II, rekombinant
BioRad, München	Silver Stain Plus-Kit
Biozym, Hess. Oldendorf	Agarose
ClonTech, Heidelberg	Advantage cDNA Polymerase Mix, SMART cDNA Library Construction Kit
Dynal, Hamburg	Dynabeads Oligo (dT) ₂₅
Fluka, Deisenhofen	Silanierlösung V
Invitrogen, Leek, Niederlande	Original TA Cloning-Kit
Life Technologies, Eggenstein	Superscript II RNase H ⁻ RT, Trizol LS Reagenz, Taq-DNA Polymerase
Molecular Probes, Leiden, Niederlande	8-Aminopyren-1, 3, 6-trisulfonsäure
Novex, San Diego, USA	Kolloidales Coomassie-Blau
Pharmacia Biotech, Freiburg	dNTPs, Nick Column
QIAGEN, Hilden	PCR Purification Kit, Sensiscript RT
Roche, Mannheim	PCR DIG Labeling Mix, Anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragment, CDP-Star, Blockierungsreagenz, RNase A, Restriktionsenzym Sfi I, Random Prime Labeling Kit
Rosemann GmbH, Berlin	Lysoformin Desinfektionsmittel
Promega, Heidelberg	RNasin, RNase-Inhibitor, Terminale Desoxynukleotidyltransferase
Sigma, Deisenhofen	Fluoresceinisothiocyanat
Stratagene, Amsterdam, Niederlande	λ ZAP cDNA Kit, Gigapack III Gold Packaging Extract Kit

2.1.4 Oligonukleotide

Das Oligonukleotid (dT)₁₅ wurde von Roche (Mannheim), alle übrigen Oligonukleotide (Primer) wurden von TIB MolBiol (Berlin) oder Invitrogen (Leek, Niederlande) hergestellt.

Produktname, Organismus (Acc. No.)	Primer	Tempera- tur [°C]	Produkt- länge (mit Intron)
Actin 2, <i>A. thaliana</i> (U41998)	5´-AAA AAT GGC TGA GGC TGA TG	62	720 (801)
	5´-TTC TCG ATG GAA GAG CTG GT		
Adapter	5´-GAC CGT CCG GAA TTC CTT AA 3´-CTG GCA GGC CTT AAG GAA	/	/
Arbitrary-Primer 2	5´-GGA ACC AAT C	40	/
Arbitrary-Primer 3	5´-CTT TCT ACC C	40	/
Arbitrary-Primer 9	5´-TCG GTC ATA G	40	/
Arbitrary-Primer 15	5´-GAT CCA GTA C	40	/
Arbitrary-Primer 18	5´-GAT CTC AGA C	40	/
Arbitrary-Primer 24	5´-GAT CAT GGT C	40	/
eco2	5´-AAG GAA TTC CGG ACG GTC	64	/
oce2	5´-GAC CGT CCG GAA TTC CTT	64	/
Ascorbat-Peroxidase, <i>C. sativus</i> (D88649)	5´-CAT CAT CGT CAT CAT CAC C	62	755
	5´-AAG TCT CCC CCA ACA AGT C		
CER 2, <i>A. thaliana</i> (U40849)	5´-CTC TGT ATT GGG TTG AGT TG	59	750
	5´-TTC TTC AGG CAT CAC TAC AC		
Elongationsfaktor 1 α , <i>thaliana</i> (X14449)	5´-TGG ATT TGA GGG TGA CAA CA	57	915
	5´-TCT TGA CTG CAG CCT TGG TA		
Lipid transferierendes Protein, <i>A. thaliana</i> (M80567)	5´-AGT TGG CAT GCT TGC TCT TG	62	350 (386)
	5´-TCG AAA CTT CCG GTA GTA GCA TC		
not	5´-GCG GCC GCT TTT TTT TTT TTT TTT T	64	/
Phosphoenolpyruvat- carboxylase, <i>A. thaliana</i> (AF071788)	5´-AGA AGA ACA CCT CCA ACC CC	58	1704
	5´-TGC TGC TCC GAA ACC TAA C		
Phosphoglyceratmutase, <i>S. tuberosum</i> (AF047842)	5´-GGC TCG TAA TCG CTA GGT	55	1500
	5´-GCA GGG TGC TCC TGA ACA		
Rubisco, <i>A. thaliana</i> (X14564)	5´-TTC ACC GGC TTG AAG TCA TC	62	382 (808)
	5´-CCG GGT ACT CCT TCT TGC AT		
Rubisco, <i>C. sativus</i> (M16056)	5´-GGC ATA AAT GGC TTC ATC	59	750
	5´-GAA AGT CGG GGA AAT AAA C		
Stärkephosphorylase, Knollen L-Typ, <i>S. tuberosum</i> , (X52385)	5´-ACC TTG AGT GAG AAA ATT CAC	58	1400
	5´-GAC TTC TAC TGT TTC AGT ATC		
TOPO	GCC AGT GTG CTG GAA TTC GC GGA TAT CTG CAG AAT TCG CC	63	/
β Tubulin, <i>A. thaliana</i> (M84702)	5´-AAG GTG GTC AAT GCG GTA AC	62	1005 (2385)
	5´-CTC ACC TTC CTC ATC AGC AG		
Ubiquitin, <i>A. thaliana</i> (NC_003075)	5´-GGA GAC GGA GGA CCA AGT GA	62	200 (462)
	5´-TTT GAC CGG AAA GAC CAT CA		
VN	5´-TTT TTT TTT TTT VN V: A, C oder G N: A, C, G oder T	64	/

2.1.5 Oligonukleotide für die Echtzeit-PCR

Produktname, Organismus (Acc. No.)	Primer	Tempera- tur [°C]	Produkt- länge (mit Intron)
EFA ^{RT} Elongationsfaktor 1 α , <i>A. thaliana</i> (X14449)	5´-GTC ATT GAT GCT CCT GGC CAT	60	240
	5´-CGT ACC TGG CCT TGG AGT ACT		
RCA ^{RT} Rubisco, <i>A. thaliana</i> (X14564)	5´-CGC AAG ACC AAC AAG GAC ATC	60	70
	5´-TGG CCA CAC TCA TGC AGC TAA		

2.1.6 Verwendete Internetprogramme

<i>Arabidopsis</i> EST-Funktionen	http://www.arabidopsis.org/ABRC/
Massenpektralbibliothek	http://www.mpimp-golm.mpg.de/mms-library/index-e.html
Nukleotiddatenbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Primersuche	http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi
Proteindatenbanken	http://xylian.igh.cnrs.fr/bin/fasta-guess.cgi
	http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg3.html
	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Sequenzvergleich mit einer Datenbank (<i>Blast</i>)	http://www.arabidopsis.org/blast

2.2 Methoden

2.2.1 Pflanzenaufzucht

A. thaliana Pflanzen wurden in einer Pflanzenwuchskammer unter $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Licht, einem 16 zu 8 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus, 65 % relativer Luftfeuchte und einer Temperatur von 22°C angezogen. Nach 2 Wochen wurden die auf Erde gekeimten Pflänzchen in separate Töpfe (Durchmesser 6 cm) vereinzelt. Die Analysen wurden an 5-7 Wochen alten Pflanzen durchgeführt. Kartoffel-Pflanzen wurden unter $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Licht, Gurken- (*Cucumis sativus*) und Kürbis- (*Cucurbita maxima*) Pflanzen unter $600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Licht für je 14 Stunden pro Tag aufgezogen. Die relative Luftfeuchte betrug 65 % bei einer Temperatur von 22°C . 8 bis 12 Wochen alte Pflanze wurden für die Beprobung herangezogen.

2.2.2 Herstellung lichtmikroskopischer Schnitte

Blattstücke wurden in einer sukzessiven, aufsteigenden Ethanolreihe entwässert und anschließend paraffinisiert:

Schritt	Substanz	Dauer	T [$^\circ\text{C}$]
1	70 % Ethanol	10	40
2	80 % Ethanol	10	40
3	95 % Ethanol	15	40
4	100 % Ethanol	20	40
5	100 % Ethanol	30	40
6	Xylol	30	40

Schritt	Substanz	Dauer	T [$^\circ\text{C}$]
7	Xylol	30	40
8	Xylol	30	40
9	Paraffin	20	60
10	Paraffin	30	60
11	Paraffin	20	60
12	Paraffin	30	60

Mittels eines Mikrotoms (Leica) wurden 10 bis $60 \mu\text{m}$ dünne Schnitte hergestellt und in Glasgefäßen über eine Reihe aus Xylol, 50 % Xylol (v/v)/ 50 % (v/v) Ethanol und Ethanol bei jeweils halbstündiger Inkubation entparaffinisiert. Die noch feuchten Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und bei Raumtemperatur getrocknet.

2.2.3 Probennahme

2.2.3.1 Probennahme einzelner Zellinhalte mittels Glasmikrokapillaren (nach Malone et al. 1989)

Glaskapillaren (Durchmesser: 1,5 mm, WPI) wurden mittels eines Pipettenziehgerätes in zwei Teile gezogen, wobei der resultierende Spitzendurchmesser geringer als $5 \mu\text{m}$ (für Transkriptbestimmungen geringer als $10 \mu\text{m}$) war. Unter Zuhilfenahme einer Mikroschmelde konnten gegebenenfalls Kapillarenden bearbeitet bzw. Verengungsstellen für Konstriktionskapillaren eingeschmolzen werden, die das Entnehmen gleicher Volumina ermöglichen (Tomos et al. 1994). Die Kapillaren wurden direkt nach dem Ziehen verwendet oder in einem verschließbaren Glas Spitze nach oben aufbewahrt. Länger aufbewahrte Spitzen wurden

für 6 Stunden bei 180°C sterilisiert. Teilweise wurden Kapillaren silaniert, um das Anheften geladener Moleküle an die Glaswand und Kreuzkontaminationen bei mehrfacher Probennahme mit derselben Kapillare zu verhindern. Hierzu wurden die Spitzen mit 20 µl Silanierlösung (Fluka) versetzt und für 6 Stunden bei 180°C sterilisiert (Kehr 1998).

Die Probennahme erfolgte auf einem schwingungsfreien Tisch (Spindler und Hoyer). Neben einem Mikroskop (Nikon) wurde eine Pflanze so in eine Stativhalterung montiert, daß ein Blatt der intakten Pflanze auf dem Objektisch fixiert werden konnte. Eine Glaskapillare wurde in einen elektrisch betriebenen Mikromanipulator (Eppendorf) eingespannt. Für die Gewinnung von Epidermisproben wurde die Kapillare an die gewünschte Epidermiszelle herangefahren und rasch eingestochen (Abb. 1). Durch den Turgor wurde der Zellsaft in die Kapillare gedrückt. Um Mesophyllzellproben zu erhalten, wurde durch intakte (für CE-Bestimmungen) oder direkt vorher geerntete Epidermiszellen (Transkriptbestimmungen) in das darunterliegende Gewebe hindurchgestochen. Hierbei wurde ein Überdruck angelegt, um das Eindringen von Epidermiszellsaft zu verhindern (Kehr *et al.* 1998, Brandt *et al.* 1999). Die Kapillare wurde danach rasch aus dem Gewebe gezogen ($\ll 1$ s), um Verdünnungseffekte zu vermeiden (Malone *et al.* 1989). Es wurden maximal je 2 Epidermis- und 2 Mesophyllproben vom selben Blatt genommen und höchstens 2 Blätter derselben Pflanze beprobt. Auch Negativ- und Positivkontrollen wurden mit einer Kapillare in die Reaktionsgefäße transferiert, um dieselbe Handhabung zu gewährleisten. Alle Proben, die nicht näher erläutert werden, wurden nachmittags, die als Tagproben bezeichneten gegen Ende der Lichtperiode (1-3 Stunden vor Beginn der Dunkelheit) und die als Nachtproben bezeichneten kurz vor Beginn der Lichtperiode (0-1 Stunde vor Ende der Dunkelheit) genommen.

Für Transkriptbestimmungen wurden Kapillaren mit Durchmessern geringer als 10 µm verwendet, die Kapillare wurde langsamer aus dem Gewebe entfernt, um mehr Zellsaft in die Kapillare einfließen zu lassen. Durch Anlegen eines leichten Unterdrucks konnte zusätzlich mehr Zellsaft eingesaugt werden, wobei nachströmendes Wasser aus den Nachbarzellen bei diesen Proben keine Rolle spielt. Die erhaltenen Zellproben wurden in sterile Reaktionsgefäße überführt, in welchen 5 U RNase Inhibitor in 1 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem H₂O vorgelegt waren. Zellproben wurden bis zur unmittelbaren Weiterverarbeitung auf Eis aufbewahrt oder vorübergehend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Es wurde für jede Probenentnahme eine frische Kapillare verwendet.

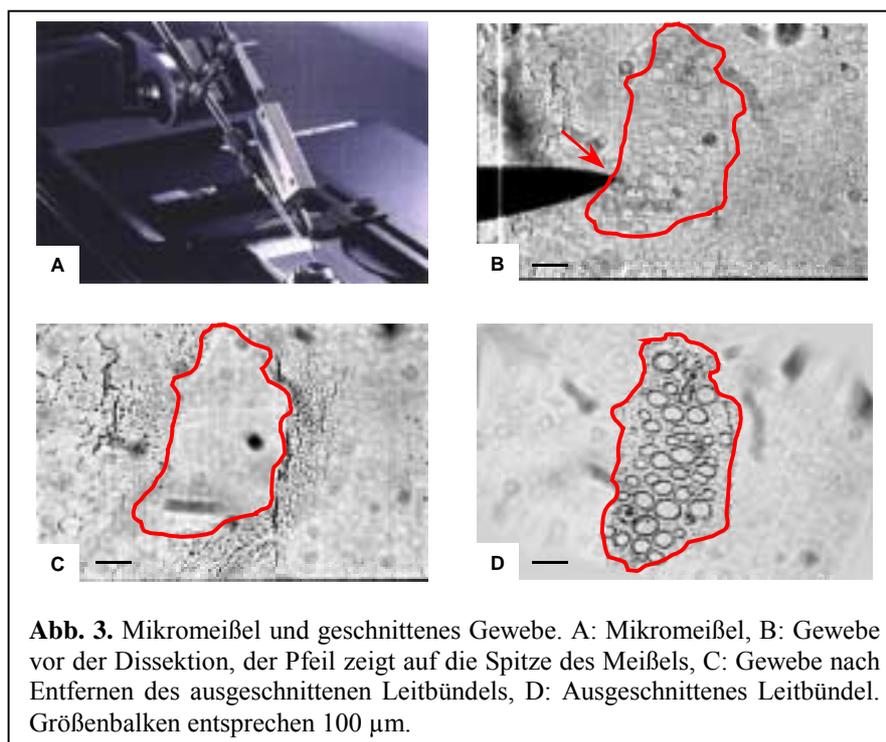
Zellproben für Kationenbestimmungen wurden direkt in CE-Mikrovials, in denen 5 µl H₂O_{bidest} vorgelegt waren, überführt. Für alle Proben wurde jeweils dieselbe Konstriktionskapillare benutzt, welche zwischen den Probenentnahmen jeweils zweimal mit H₂O_{bidest} gespült wurde. Zellproben für Anionenanalysen wurden ebenfalls in 5 µl H₂O_{bidest} aufgenommen. Proben für Aminosäurebestimmungen wurden in Reaktionsgefäße mit 5 µl 0,2 M Carbonatpuffer transferiert (Arlt *et al.* 2001). Proben für Zuckerbestimmungen wurden wie Proben für Kationen in 5 µl H₂O_{bidest} aufgenommen. Für solche Proben, die mit der umgebauten CE (vgl. Kap. 2.2.6.3.3) analysiert werden sollten, wurden unter Öl mittels eines Microdispensers (Drummond Scientific

Co.) 5 nl große H_2O_{bidest} -Tropfen erzeugt. In diese wurden die Proben aus den Kapillaren direkt überführt (Bazzanella *et al.* 1998).

2.2.3.2 Probennahme mittels Mikrodissektion

Um eine große Anzahl gleichartiger Zellen zu erhalten, kann man sich der Mikrodissektion bedienen. Hierzu wird das entsprechende Gewebe fixiert und eingebettet, Mikrotom-geschnitten und unter einem Lichtmikroskop die entsprechenden Gewebebereiche herausgelöst. Dies kann über einen Laser (LCM, Emmert-Buck *et al.* 1996) oder ein Mikromeißelsystem (Mikrodissektor, Eppendorf, Abb. 3) erfolgen.

Die entparaffinisierten oder noch paraffinisierten Präparate wurden unter einem Mikroskop (Nikon) plaziert und die gewünschten Gewebebereiche mittels eines Mikrodissektors (Abb. 3A) ausgeschnitten. Hierbei wurde ein vibrierender Mikromeißel auf die Probe aufgesetzt und um den gewünschten Gewebebereich herumgeführt (Abb. 3B). Dabei wird das Gewebe zertrennt und der gewünschte Bereich kann mittels einer Glas- oder Plastikpipette aufgesaugt werden (Abb. 3C-D). Die Probennahme kann entweder unter Xylol oder nach Entparaffinisierung unter Alkohol, Wasser oder auch trocken erfolgen.



2.2.4 Nukleinsäuremethoden

Klonierungen, Agarosegelelektrophoresen, Chloroform-Isoamylalkohol-Phenol (CIP)-Reinigungen und Ethanol-fällungen wurden nach Ausubel *et al.* 1995 durchgeführt.

2.2.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen

RNA wurde entweder mittels Trizol Reagenz (Life Technologies), mittels RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, jeweils nach Herstellerangaben) oder nach der REB-Methode isoliert. Bei dieser Methode wird das gemörserte Gewebe mit gleichen Volumina REB-Puffer (25 mM Tris-HCl, pH 8, 25 mM EDTA, 75 mM NaCl, 1 % SDS, pro 100 ml Puffer 8,5 ml β -Mercaptoethanol) und CIP versetzt, gemischt und bei 4°C 15 min bei 4.000 Upm in einer Untertischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wird mit konzentriertem LiCl auf 2 M LiCl eingestellt und die RNA über Nacht bei 4°C gefällt. Nach Zentrifugation wie oben wird das Pellet in 500 μ l H₂O_{DEPC} aufgenommen. Es schließt sich ein Waschen mit Ethanol an.

Alle RNA-Konzentrationen wurden nach der Isolierung im Photometer (Eppendorf) bei 260 nm bestimmt (Ausubel *et al.* 1995).

2.2.4.2 Northernblot-Hybridisierung

2.2.4.2.1 Übertragen von Nukleinsäuren auf Membranen (*Blotten*)

2.2.4.2.1.1 Glaskapillarproben

Die Proben, die an die Membran gebunden werden sollten, wurden in 1 μ l H₂O_{DEPC} vorgelegt, mit 1 μ l eines Mixes aus Formamid und Formaldehyd (10 μ l + 3 μ l) gemischt und für 10 min auf 56°C erhitzt. Hierbei sollten Sekundärstrukturen aufgebrochen werden. Anschließend wurden die Proben in sukzessiven 0,5 μ l Pipettierschritten auf die Membran aufgetragen, um die Spots möglichst klein zu halten. Mittels UV-Licht wurden die Proben gebunden (*crosslinking*, Stratalinker, Stratagene).

2.2.4.2.1.2 Mikrodisektionsproben

Die entparaffinisierten Gewebebereiche wurden für 20 min bei 37°C in 3 μ l H₂O_{DEPC} und 2 μ l Proteinase K (1 μ g/ml) bzw. 5 μ l H₂O_{DEPC} inkubiert. Anschließend wurden sie mit 2 μ l MEN Puffer, 1,5 μ l Formaldehyd und 5 μ l Formamid gemischt, für 10 min bei 56°C denaturiert und mit 2 μ l Blaumarker/Ethidiumbromid versetzt. Die Proben wurden auf ein 2 mm dünnes Agarosegel (2 % Agarose, gelöst in MEN-Puffer zuzüglich 1/6 vol Formaldehyd) geladen und für 45 min bei 90 V getrennt. Mittels Kapillarblot (Ausubel *et al.* 1995) wurden die Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran übertragen und durch UV-*crosslinking* (Stratalinker, Stratagene) gebunden.

2.2.4.2.2 Hybridisierung

Sonden für die Hybridisierung wurden mit der Methode von Feinberg und Vogelstein (1983) mit 50 μ Ci α P³² dCTP hergestellt (Random Prime Labeling Kit, Roche). Prähybridisierung (>2 Stunden), Hybridisierung (24 Stunden) und Autoradiographie richteten sich nach Ausubel *et al.* (1995, vgl. Kap. 2.2.4.4.3)

2.2.4.3 RNA-Amplifizierungsstrategien

2.2.4.3.1 Vorkehrungen gegen Kontaminationen

Um Kontaminationen in der RT-PCR zu vermeiden, die zu falschen Signalen führen würden, wurden folgende Sicherheitsvorkehrungen getroffen (nach Kwok und Higuchi 1989, Brandt *et al.* 1999):

- sterile Reaktionsgefäße
- sterile Filtertips
- frisch destilliertes H₂O_{bidest}, autoklaviert für alle Lösungen. Für RNA Schritte wurde dieses H₂O mit DEPC behandelt (Ausubel *et al.* 1995)
- UV-Licht (312 nm) zum Sterilisieren der Arbeitsfläche (Sarkar und Sommer 1990)
- Arbeitsplatz in einer Plexiglasbox als Schutz vor Kontaminationen (Kitchin *et al.* 1990)
- vor dem Öffnen von DNA-/ RNA-haltigen Reaktionsgefäßen wurden diese anzentrifugiert
- Prä- und Post-PCR-Arbeiten wurden räumlich getrennt
- wenn möglich wurden Parallelproben und Negativkontrollen mitverarbeitet
- Einmalhandschuhe und sauberer Laborkittel (Kitchin *et al.* 1990)
- häufiges Auswischen der Arbeitsfläche mit Desinfektionsmittel, insbesondere zwischen dem Ansetzen verschiedener PCR-Reaktionen.

2.2.4.3.2 Reverse Transkription

Zur Synthese von cDNA aus RNA wurde Superscript II reverse Transkriptase (Life Technologies) verwendet. Diese aus dem *Moloney Murine Leukemia Virus* isolierte Transkriptase hat eine deutlich höhere Ausbeute als beispielsweise AMV Reverse Transkriptase (Bertioli *et al.* 1994) und ist thermostabiler (Richert *et al.* 1996). Ein typischer Ansatz bestand aus Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl bei pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂), 0,1 µM dT₁₅ Primer, 10 mM Dithiothreitol (DTT), je 100 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP und 50 U Superscript II in einem Gesamtvolumen von 10 µl (Brandt *et al.* 1999). Als Matritze dienten Einzelzellproben und Gesamt RNA. Die Ansätze wurden für 75 min bei 48 °C gefolgt von 5 min bei 94°C in einem Thermocycler (MWG Biotech) inkubiert.

Das Enzym Sensiscript (Qiagen) sollte laut Herstellerangaben optimiert sein für Ausgangsmengen an Gesamt-RNA von unter 50 ng. In vergleichenden Parallelexperimenten konnte keine Verbesserung der Ausbeute erzielt werden, so daß alle Reaktionen mit Superscript II durchgeführt wurden.

2.2.4.3.3 Gen-spezifische Polymerase Kettenreaktion

Diese Methode wurde analog zu Brandt *et al.* 1999 durchgeführt. Ein Standardansatz war in einem Gesamtvolumen von 50 µl wie folgt zusammengesetzt: Reaktionspuffer für Advantage cDNA Polymerase Mix (40 mM Tricin-KOH bei pH 9,2, 15 mM KOAc, 3,5 mM Mg(OAc)₂, 187,5 ng BSA) bzw. für Dynazyme Polymerase (10 mM Tris-HCl bei pH 8,8, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,1 % Triton X-100), je 0,5 µM 5'- und 3'-Primer, je 200 µM dATP, dCTP, dGTP und

dTTP sowie 0,5 µl Advantage cDNA Polymerase Mix (Clontech) bzw. 2 U Dynazyme Polymerase (Biometra). Folgendes Zeitprogramm wurde durchgeführt: 5 min Erstdenaturierung, gefolgt von bis zu 40 Zyklen 95°C für 150 s, Annealing für 90 s (Temperatur Primer abhängig, vgl. Kap. 2.1.4), Elongation bei 72°C (Advantage cDNA Polymerase Mix, Clontech) bzw. 74°C (Dynazyme, Biometra) für 90 s bzw. 90 s zuzüglich 5 s Zeitinkrement, gefolgt von einer 5 minütigen Endelongation bei 72 bzw. 74°C.

2.2.4.3.4 Semiquantitative Polymerase Kettenreaktion

Hierzu wurden Einzelzellproben wie unter 2.2.4.3.2 und 2.2.4.3.3 revers transkribiert und amplifiziert. Jedoch wurde der reverse Transkriptionsansatz vor der PCR geteilt, so daß zwei Primerpaare für eine Probe benutzt werden konnten. Nach unterschiedlichen Zyklenzahlen wurden je 10 µl Aliquots aus beiden Hälften entnommen und gelelektrophoretisch analysiert.

2.2.4.3.5 Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion

Die reverse Transkription wurde wie unter 2.2.4.3.2 durchgeführt. Bei der anschließenden PCR wird dem Ansatz ein fluoreszierender Farbstoff zugegeben, der ausschließlich an doppelsträngige DNA bindet. Die Zunahme der Fluoreszenz kann nach jedem Zyklus bestimmt werden. Die Anzahl Zyklen, die benötigt wird, um eine bestimmte Fluoreszenzintensität zu erreichen, ist ein Maß für die Ausgangsmenge an DNA im Ansatz (Johnson *et al.* 2000).

Für das Primerdesign wurde das Programm Primer Express (Applied Biosystems) verwendet. Dabei wurde besonderes Augenmerk darauf gelegt, daß, wenn möglich, zwischen 5 und 10 Nukleotide des 3'-Endes eines Primers über der Übergangsstelle von einem Exon zu einem Intron liegen. Damit sollte verhindert werden, daß eventuell enthaltene genomische DNA koamplifiziert wird.

Einzelzellproben wurden revers transkribiert (vgl. Kap. 2.2.4.3.2) und anschließend zu gleichen Teilen auf zwei neue Reaktionsgefäße aufgeteilt. Der zugegebene Mastermix enthielt 12,5 µl SYBR GreenTM PCR Mix (doppelt konzentriert, Applied Biosystems), 500 nM je Primer und Wasser ad 25 µl. Das Zeitprogramm war wie folgt aufgebaut: 2 min 50°C, 10 min 95°C, gefolgt von 40 Zyklen 95°C für 15 s und 60°C für 1 min. Daran schloß sich ein Dissoziationsprotokoll an, indem der ganze PCR-Ansatz 5 min bei 95°C denaturiert wurde, bevor auf 60 °C langsam abgekühlt wurde. Hierbei wurde die Kinetik des erneuten Zusammenlagerns der komplementären Stränge beobachtet. Mit Hilfe dieses Teils des Programms kann überprüft werden, ob unspezifische Nebenprodukte synthetisiert wurden.

2.2.4.3.6 Polymerase Kettenreaktion mit direkter Digoxigeninmarkierung (nach Brandt *et al.* 1999)

Um PCR Produkte zu detektieren, die in nur geringer Konzentration vorlagen, wurden je 200 µM dATP, dCTP, dGTP und 195 µM dTTP sowie 5 µM Digoxigenin-11-dUTP (DIG, Roche) eingesetzt. Die eingebauten DIG markierten Nukleotide machten eine spätere, äußerst sensitive

Detektion der PCR Produkte möglich. Hierzu wurden die PCR Produkte in einem 1 oder 2 % Agarosegel getrennt, auf eine Nylonmembran durch Kapillarblot übertragen und mittels Antikörper-gebundener alkalischer Phosphatase nachgewiesen.

2.2.4.3.7 Unspezifische Amplifikation von Nukleinsäuren

PCR stellt eine Möglichkeit dar, um auch unterschiedliche cDNA-Moleküle in einem Reaktionsansatz zu amplifizieren. Jedoch werden dafür uniforme 3'-Enden der Erststränge benötigt. Die entstehenden PCR-Produkte können anschließend zur Synthese einer cDNA Bibliothek oder für Arrayhybridisierungen verwendet werden.

2.2.4.3.7.1 Tailing (nach Bertioli et al 1994)

Durch terminale Desoxynukleotidyltransferase können an das unbekanntes 3'-Ende eines beliebigen Erststranges mehrere Nukleotide ansynthetisiert werden. Bietet man nur eines der vier Nukleotide an, so entsteht ein einheitliches Ende, dessen Sequenz als Primer für die PCR benutzt werden kann. Zur Erststrangsynthese wurde anstelle des (dT)₁₅-Primers 5 µg Oligo (dT)₂₅-Dynabeads (Dyna) genommen. Dies sind magnetische Partikel, an die Oligo (dT)₂₅-Primer gebunden sind. Der heterologe Doppelstrang wurde mit 1 µl RNase H für 30 min bei 37°C inkubiert, um die RNA zu entfernen. Nach Zugabe von 40 µl Wasser und zweiminütiger Inkubation in einem Magnethalter wurde die flüssige Phase abpipettiert, die Dynabeads-gebundene cDNA in 50 µl Reaktionsgemisch bestehend aus 500 µM dCTP, 100 mM Cacodylatpuffer, 1 mM CoCl₂, 100 µM DTT, 20 U terminale Desoxynukleotidyltransferase resuspendiert und für 60 min bei 37°C inkubiert. Nach einem weiteren Reinigungsschritt mittels eines Magnethalters konnte die cDNA als Matritze für PCR verwendet werden. Hierbei wurden die ersten drei Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 40°C, die übrigen 37 Zyklen bei 56°C ausgeführt.

2.2.4.3.7.2 Ligation von Adaptern (nach Karrer et al. 1995)

Durch Ligation kann an das unbekanntes Ende eines Doppelstranges ein doppelsträngiges, kurzes DNA-Stück (Adapter) angebracht werden. Damit sind beide Enden bekannt und ihre Sequenzen können als Primer für die PCR dienen. Der Adapter enthält an einem 5'-Ende einen Überhang aus 2 Nukleotiden und ist am anderen Ende ohne Überhang. Dadurch kann er gerichtet ligiert werden. Für die Ligation des Adapters wurde ein Reaktionsgemisch bestehend aus 5 U T4 DNA Ligase, 66 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂, 1 mM Dithioerythrit, 1 mM dATP, 1 µg Adapter und 28 µl doppelsträngiger DNA (PCR-Produkt ohne A-Überhänge) in einem Gesamtvolumen von 35 µl hergestellt und über Nacht bei 14°C inkubiert. Als Primer für die PCR dienten die Primer not und eine Sequenz des doppelsträngigen Adapters (Primer eco2). Der Primer not besteht aus (dT)₁₆ und einer am 5'-Ende gelegenen Schnittstelle für das Restriktionsenzym Not I, der Primer eco2 enthält eine Schnittstelle für das Enzym Eco RI. Die beiden Schnittstellen erleichtern ein gerichtetes Klonieren der PCR-Produkte.

2.2.4.3.7.3 DOP-PCR (Roche)

Dieses Kit beruht auf der PCR-vermittelten Amplifizierung des Templates unter Verwendung eines nahe dem 3'-Ende degenerierten Primers. Dieser kann daher bei niedriger Annealingtemperatur relativ unspezifisch binden. Nach 5 Zyklen wird die Annealingtemperatur erhöht und die spezifischen Sequenzen des Primers sind nun für das Binden an das Template verantwortlich. Die Reaktionen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.4.3.7.4 RAP-PCR (nach Menke und Müller-Röber 2001)

Dieses Protokoll ist der DOP-PCR (vgl. Kap. 2.2.4.3.7.3) ähnlich. Anstelle des partiell degenerierten Primers wird ein definierter Primer verwendet, der in den ersten Zyklen bei niedriger Annealingtemperatur recht unspezifisch bindet, nach Erhöhung der Annealingtemperatur in den weiteren Zyklen der PCR aber eine spezifische Amplifikation ermöglicht. Die PCR wurde den Angaben in der Veröffentlichung folgend durchgeführt.

2.2.4.3.7.5 TOPO-Klonierung (Invitrogen)

Dieses Klonierungskit verwendet anstelle des Enzyms Ligase Topoisomerase, die an den linearisierten Vektor pCR 2.1 gebunden ist. Dadurch ist die Ligationswahrscheinlichkeit erhöht. Für die Ligation werden Sequenzen mit A-Überhängen benötigt. Diese können durch 10 min Inkubation mit Taq-Polymerase bei 72°C hergestellt werden. Die Klonierungen in den Vektor pCR 2.1 wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.4.3.7.6 RNA-Ligase-Klonierung eines einzelsträngigen Adapters

Nach reverser Transkription mit Dynabeads-Oligo (dT)₂₅, anschließendem 30 min RNase H-Verdau und Bindung der cDNA an einen Magneten wurde der RT-Ansatz abpipettiert (Kap. 2.2.4.3.7.1). In einem Endvolumen von 10 µl wurde für die Ligation des Erststranges mit dem einzelsträngigen Primer eco2 folgendes Reaktionsgemisch zusammengestellt: 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM dATP, 30 mg/l BSA, 10 U T4 RNA Ligase, 1 µg eco2-Primer. Der gesamte 10 µl Ansatz wurde anschließend als Template für eine PCR verwendet. Als Primer dienten die Oligos not und oce2 (vgl. Kap. 2.2.4.3.7.2).

2.2.4.3.7.7 Smart Kit (Clontech)

Für die reverse Transkription wurden in einem Endvolumen von 10 µl folgende Substanzen gemischt: 1 µM SMART III Oligonukleotid, 1 µM CDS III/3'-PCR Primer, 50 mM Tris-HCl bei pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 2 mM DTT, je 1 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP und 200 U Superscript II. Zunächst wurden in einem Volumen von 5 µl die beiden Primer mit der Vorlage für je 2 min bei 72°C, anschließend auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe der übrigen Substanzen und es wurde bei 42°C für 60 min inkubiert.

Zwischen 20 und 100 % des Reaktionsansatzes wurden als Vorlage für eine PCR verwendet, die in 100 µl Gesamtvolumen wie folgt zusammengesetzt war: 40 mM Tricin-KOH bei pH 9,2, 15

mM KOAc, 3,5 mM Mg(OAc)₂, 375 ng BSA, je 200 μM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 0,2 μM 5'-PCR Primer, 0,2 μM CDS III/3'-PCR Primer und 2 μl Advantage cDNA Polymerase Mix. Das Reaktionsgemisch wurde für 1 min auf 95°C erhitzt, gefolgt von bis zu 40 Zyklen 95°C für 15 s und 68°C für 6 min.

2.2.4.3.7.8 Arbitrary-PCR (nach Bauer et al. 1993, verändert)

In einem 50 μl Standardansatz wurden der Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl bei pH 8,8, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,1 % Triton X-100), 0,5 μM VN-Primer, 0,5 μM eines *Arbitrary*-Primers [10 Nukleotide langer Primer mit einer definierten Sequenz, einem GC-Gehalt von 50 % und keinen ununterbrochenen Selbstkomplementaritäten länger als 2 Nukleotide (Bauer *et al.* 1993)], je 200 μM dATP, dCTP, dGTP, dTTP und 2 U Dynazyme Polymerase (Biometra) gemischt und folgendes Zeitprogramm benutzt: 5 min Erstdenaturierung bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen 95°C für 30 s, Annealing bei 40°C für 120 s, Elongation bei 74°C für 30 s zuzüglich einem Zeitincrement von 5 s je Zyklus, gefolgt von einer 5 minütigen Endelongation 74°C.

2.2.4.4 Array Technologie

2.2.4.4.1 Filterherstellung

16.128 *A. thaliana* cDNA Plasmidklone wurden vom *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC, Ohio, USA) erhalten und bestanden zum Großteil aus Klonen, die in einem Projekt der *Michigan State University* (USA, MSU-Kollektion) generiert wurden (Newman *et al.* 1994).

Die Inserts wurden per PCR in jeweils drei Parallelansätzen amplifiziert. Als Primer dienten hierbei Sequenzen der beiden flankierenden Seiten des Plasmids (vorwärts 5'-AAA GGG GGA TGT GCT GCA AGG CG, rückwärts 5'-GCT TCC GGC TCG TAT GTT GTG TG). Die PCR wurde mit *E. coli* Kolonien unter Standardbedingungen durchgeführt (Thimm *et al.* 2001).

Die PCR Produkte wurden mittels eines BioGrid Spottingroboters (BioRobotics) auf Nylonmembranen (Hybond N⁺, Amersham) der Größe 22,2 cm x 22,2 cm übertragen, die vorher in 0,5 M NaOH getränkt worden waren. Jeder Spot wurde zehnmals aufgetragen. Die in dieser Arbeit verwendeten Arrayfilter tragen, wenn nicht anders angegeben, 36.864 Spots. Diese sind in 4² Quadraten angeordnet. Jedes dieser Quadrate besteht aus 4² Spots (Abb. 4, Abb. 15). Jedes Quadrat beinhaltet einen leeren Spot (Position 7) zur Bestimmung des lokalen Hintergrunds sowie einen, der das humane Gen für Desmin repräsentiert (Position 13, Acc. No. NM_001927, Abb. 4). Da jeder EST doppelt aufgetragen ist, enthält ein Filter 16.128 unterschiedliche ESTs. Allerdings sind einige ESTs in mehr als einem Quadrat aufgetragen, so daß die Gesamtzahl der unterschiedlichen ESTs mit unter 16.000 angegeben werden muß.

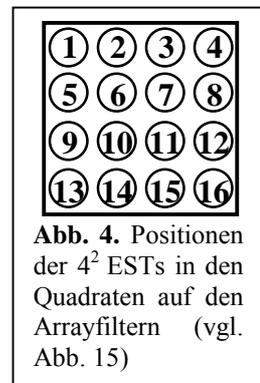


Abb. 4. Positionen der 4² ESTs in den Quadraten auf den Arrayfiltern (vgl. Abb. 15)

Die Membranen wurden mit einer Lösung bestehend aus 1 M Tris/HCl, pH 7,2 und 1,5 M NaCl neutralisiert. Die Spots wurden durch zweistündiges „Backen“ bei 80°C mit anschließendem *Crosslinken* bei 254 nm in einem Stratalinker (Stratagene) fixiert.

Für eine Abschätzung der *Spottingeffizienz* eines jeden Spots wurde eine Referenzhybridisierung durchgeführt. Hierbei diente ein von den ursprünglichen Primern eingerahmtes Plasmidstück als Sonde (Sondenherstellung vgl. Kap. 2.2.4.4.2). Die ausgewerteten Intensitäten nach der Hybridisierung sollten alle gleich stark sein. Da sie dies nicht waren, wurde eine mathematische Korrektur eingeführt, indem die Ergebnisse der Referenzhybridisierung in die der komplexen Hybridisierung eingerechnet wurden (vgl. Kap. 2.2.4.4.4, Thimm *et al.* 2001).

2.2.4.4.2 Sondenherstellung

10 µg Gesamt-RNA aus Blättern wurde in 7,5 µl H₂O_{DEPC} vorgelegt. 0,75 µg (dT)₁₅-Primer wurden dazugegeben und der Ansatz für 10 min auf 70°C erhitzt, danach für weitere 10 min auf Eis abgekühlt. Nun wurde ein vorgekühltes, konzentriertes Reaktionsgemisch zugesetzt. Die Endkonzentrationen in einem 25 µl Gesamtansatz waren 50 mM Tris-HCl bei pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 40 U RNAsin, je 0,5 mM dATP, dGTP und dTTP sowie 60 µCi α P³³ dCTP. Nach 5 min Inkubation bei 42°C wurden 200 U Superscript II zugesetzt und der ganze Ansatz für 60 min auf 42°C gehalten. Nach Zugabe von 12,5 nmol unmarkiertem dCTP wurde für weitere 30 min bei 42°C inkubiert und abschließend die Reaktion bei 70°C für 15 min gestoppt. Die RNA wurde durch alkalische Hydrolyse abgebaut [10 µl 1 M NaOH, 10 min Inkubation bei 20°C und 15 min bei 50°C, anschließend Neutralisation für 10 min bei 20°C durch Zusatz von 10 µl 1 M HCl und 2 µl 1 M Natriumphosphat (pH 7,2)].

cDNA aus vereinigten Einzelzellproben wurde nach der PCR-vermittelten Amplifizierung über Qiaquick PCR Purification Zentrifugensäulchen (Qiagen) von nicht eingebauten Primern, Nukleotiden, Salzen und Proteinen gereinigt und konzentriert. Nach der Methode von Feinberg und Vogelstein (1983) wurde die cDNA mit radioaktivem 60 µCi α P³³ dCTP markiert (Random Prime Labeling Kit, Roche). Um eine bessere Orientierung auf den Filtern zu gewährleisten, wurde diesen Sonden Desmin mit einer Aktivität von je ca. 140.000 cpm beigemischt.

Markierte Nukleinsäuren wurden über *Nicks* Säulchen (Pharmacia Biotech) in Fraktionen getrennt und die Einbaurate gegenüber der eingesetzten Gesamtaktivität bestimmt, welche über 50 % liegen sollte.

2.2.4.4.3 Komplexe Hybridisierung

Arrayfilter wurden für 2 Stunden bei 65°C in 20 ml Hybridisierungspuffer (250 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 10 mM EDTA, 7 % SDS und 1 % BSA) vorhybridisiert. In frischen 20 ml Hybridisierungspuffer wurde die durch 5 min Erhitzen auf 95°C denaturierte cDNA verdünnt und die Filter damit für 30 Stunden bei 65°C inkubiert. Bei Wiederholungsexperimenten wurden die Filter permutiert. Zum Abwaschen der nicht gebundenen cDNA wurden die Filter je 20 min bei 65°C erst in einer Lösung aus 2 x SSC, 0,5 % SDS, 4 mM Natriumphosphat, dann in einer aus 0,2 x SSC, 0,5 % SDS, 4 mM Natriumphosphat gespült. Anschließend wurde über Nacht ein *Intensifying Screen* (Raytest) belichtet. Mit einem Phosphorimager (Raytest) wurden die *Intensifying Screens* bei einer Auflösung von 50 µm (16-Bits-pro-Punkt) gescannt. Mittels der

Software Array Vision (Imaging Research) wurde das Bild analysiert und umgewandelt in ein Tabelle, die die Signalstärken der einzelnen ESTs beinhaltet.

2.2.4.4 Datenauswertung (nach Thimm *et al.* 2001)

Die erhaltenen Rohdaten wurden mittels einer im Hause verfügbaren Datenbank mit ihren EST-Nr. versehen, verrechnet und normalisiert. Im ersten Schritt wird dabei der lokale Hintergrund von den Werten abgezogen und der erhaltene Wert wird durch das durchschnittliche Signal aller Spots auf dem Filter geteilt (ohne Berücksichtigung der Desminspots). Im zweiten Schritt wird die Menge der jeweilig gespotteten DNA mit dem Wert verrechnet. Dies geschieht unter der Annahme, daß unter den gewählten Bedingungen der komplexen Hybridisierung die Signalstärke linear abhängt von der Menge der gebundenen DNA (Thimm *et al.* 2001). Als letztes wird der Durchschnitt der beiden Parallelsots jedes ESTs berechnet (vgl. Kap. 2.2.4.4.1, Abb. 4). Die möglichen Funktionen der ESTs wurden durch Homologiesuchen mittels der TAIR Datenbank (<http://www.arabidopsis.org/ABRC>) ermittelt.

2.2.5 Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Über gaschromatographisch-massenspektrometrische Messungen können viele Substanzen in einer Messung getrennt und detektiert werden. Diese Methode ermöglicht es, Moleküle unterschiedlichster Substanzklassen gleichzeitig zu analysieren.

Je 150 mg frisch geerntetes Blattmaterial wurde nach dem Abwiegen sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. In gefrorenem Zustand wurden die Proben gemörsert und mit 1000 µl Chloroform und 250 µl H₂O_{bidest} versetzt. 250 µl Wasser wurde als Negativkontrolle ebenso behandelt. Nach Zentrifugation wurden die wässrigen Überstände abgenommen und in einer Vakuumzentrifuge eingetrocknet. Es schlossen sich 2 Derivatisierungsschritte an: Die trockenen Proben wurden mit 80 µl Methoxyamin (20 mg/ml Pyridin) versetzt und 90 min bei 37°C inkubiert. Im zweiten Schritt wurden 80 µl 2,2,2-Trifluoro-N-methyl-N-(trimethylsilyl)acetamid (MSTFA) und 40 µl eines Fettsäuremixes als Zeitstandard für die automatische Quantifizierung zugesetzt und die Ansätze für weitere 30 min bei 37°C temperiert. Als zusätzliche Negativkontrolle wurde auch in einem leeren Reaktionsgefäß eine Derivatisierungsreaktion durchgeführt. Standards für die Erstellung von Kalibrierkurven wurden ebenso derivatisiert.

Zellproben wurden in 10 µl Chloroform abgelegt und in einer Vakuumzentrifuge eingetrocknet. Ebenso wurde Wasser als Negativkontrolle mittels einer Glaskapillare in Chloroform überführt. Es schlossen sich, wie oben erwähnt, 2 Derivatisierungsschritte an, wobei jeweils 10 µl Methoxyamin (20 mg/ml Pyridin) und im zweiten Schritt 10 µl MSTFA verwendet wurden.

Die weitere Analyse wurde analog zu Roessner *et al.* (2000) durchgeführt. Kurz zusammengefaßt wurde ein AS 2000 *Autosampler* (Thermoquest), ein Gaschromatograph GC 8000 (ThermoQuest) und ein Voyager-Quadrupolmassenspektrometer (ThermoQuest) benutzt. Zur Analyse wurden Proben mit einem Volumen von 1 µl splitlos mittels der Heißen-Nadel-Methode injiziert. Es wurden Massenspektren im Bereich Masse/Ladung (m/z) 50 bis 600 gemessen. Die Auswertung

der Chromatogramme und Massenspektren erfolgte über das Programm Masslab (Thermoquest). Peaks wurden über ihre Retentionszeiten und Massenspektralbibliotheken (Wiley, Palisade Corporation und <http://www.mpimp-golm.mpg.de/mms-library/index-e.html>, MPI-MP) identifiziert. Die Quantifizierung von Peaks erfolgte durch Vergleich der *Response Ratios* zu Standardkurven (Roessner *et al.* 2000).

2.2.6 Kapillarelektrophoresemethoden

Für die Analyse von Kationen und Anionen wurde eine Kapillarelektrophorese P/ACE 5510 (Beckman Coulter) mit Diodenarray- beziehungsweise UV- Detektor verwendet. Für alle Aminosäuremessungen wurde eine MDQ 2000 Kapillarelektrophorese (Beckman Coulter) mit LIF-Detektion benutzt. Zur Anregung der Fluoreszenz stand ein Argonlaser (Beckman Coulter) zur Verfügung. Kohlenhydrate wurden, wenn nicht extra ausgewiesen, mit einer Kapillarelektrophorese P/ACE 5510 gemessen. Alle angegebenen Spülschritte wurden bei 20 psi ausgeführt, die Probenaufgabe erfolgte hydrodynamisch für 5 oder 10 s bei 0,5 psi. Es wurden immer unbehandelte Borosilikatkapillaren (CS Chromatographie Service, Beckman Coulter) der angegebenen Länge verwendet und, wenn nicht gesondert angegeben, auf 20°C temperiert.

2.2.6.1 Kationen (nach Kehr *et al.* 1999)

Zur Kationenanalyse wurde der bei 214 nm stark absorbierende HGE para-Aminopyridin (5 mM bei pH 3,2) in einer 100 µm (Innendurchmesser) Kapillare benutzt. Da die Kationen bei dieser Wellenlänge nicht absorbieren, können sie als negative Peaks nachgewiesen werden. Die Auftrennung der Analyten erfolgte auf einer Länge von 47 cm (effektiv 40 cm). Die Proben wurden in Mikroprobengefäßen (Beckman Coulter) aufbewahrt, die in halbvoll mit Wasser gefüllten Probenfläschchen plaziert waren, um Verdunstungseffekte zu minimieren. Die Methode war wie folgt aufgebaut:

Spül-, Probenaufgabe- und Separationsbedingungen			
Spülschritt 1	1 M NaOH	0,8 min	20 psi
Spülschritt 2	H ₂ O _{bidest}	0,5 min	20 psi
Spülschritt 3	HGE	1 min	20 psi
Probenaufgabe		10 s	0,5 psi
Separation		5 min	20 kV

Um die Konzentration eines Kations in den Einzelzellproben zu bestimmen, wurde die entsprechende Peakfläche integriert und in Relation gesetzt zu einer Kalibrationskurve und einem Standard, der mit derselben Konstriktionskapillare wie die Proben genommen wurde.

Für Gesamtextrakte wurden Rosettenblätter geerntet, gewogen, bei 60°C für 2 Tage getrocknet und in einem Muffelofen (Heraeus Instruments) verascht. Hierzu wurde folgendes Temperatur-Zeit-Profil verwendet:

- 1 h Rampe 30 °C - 90 °C
- 6 h 90 °C (Entfernung restlicher Feuchtigkeit aus dem Pflanzenmaterial)
- 6 h Rampe 90 °C - 350 °C
- 6 h 350 °C (erster Veraschungsschritt)
- 3 h Rampe 350 °C - 500 °C
- 24 h 500° C (zweiter Veraschungsschritt)
- 12 h Rampe 500 °C - 30 °C (Abkühlung)

Die Asche wurde in H₂O_{bidest} aufgenommen und der pH-Wert mit 1 M HCl auf unter 2 eingestellt. Die Konzentrationen wurden über Kalibrationskurven der entsprechenden Kationen bestimmt.

2.2.6.2 Anionen (nach Hiissa et al. 1999)

Für die Anionenanalyse wurde ein aus 2,25 mM Pyromellinsäure, 6,5 mM NaOH, 0,75 mM Hexamethoniumhydroxid und 1,6 mM Triethanolamin bestehender HGE gewählt (pH 7,7). Dieser HGE kehrt den elektroosmotischen Fluß um, wodurch eine positive Trennungsspannung von 20 kV angelegt werden konnte. Die Detektion erfolgte bei 254 nm. Die Kapillare hatte eine Länge von 77 cm (effektiv 70 cm) und einen Innendurchmesser von 50 µm. Das verwendete Spül- und Separationsprogramm setzte sich wie folgt zusammen:

Spül-, Probenaufgabe- und Separationsbedingungen			
Spülschritt 1	0,1 M NaOH	3 min	20 psi
Spülschritt 2	HGE	5 min	20 psi
Probenaufgabe		10 s	0,5 psi
Separation		30 min	20 kV

2.2.6.3 Kohlenhydrate

2.2.6.3.1 CuSO₄- Puffersystem (nach Bazzanella et al. 1998, Lochmann et al. 1998)

Zucker bilden mit Cu²⁺-Ionen bei alkalischem pH-Wert Komplexe, bei denen die positive Ladung des Kupfers überwiegt. Dadurch wandern diese im elektrischen Feld zur Kathode. Die Detektion der Komplexe erfolgte bei 254 nm. Getrennt wurde in einer 77 cm (effektiv 70 cm) langen, unbehandelten Borosilikatkapillare mit einem Innendurchmesser von 50 µm. Der HGE setzte sich aus 6 mM CuSO₄ und 500 mM NH₃ bei pH 11,6 zusammen. Die Methode war wie folgt aufgebaut:

Spül-, Probenaufgabe- und Separationsbedingungen			
Spülschritt 1	0,1 N NaOH	1 min	20 psi
Spülschritt 2	HGE	2 min	20 psi
Probenaufgabe		10 s	0,5 psi
Separation		10 min	25 kV

2.2.6.3.2 Sorbat-Puffersystem (nach Vorndran *et al.* 1992)

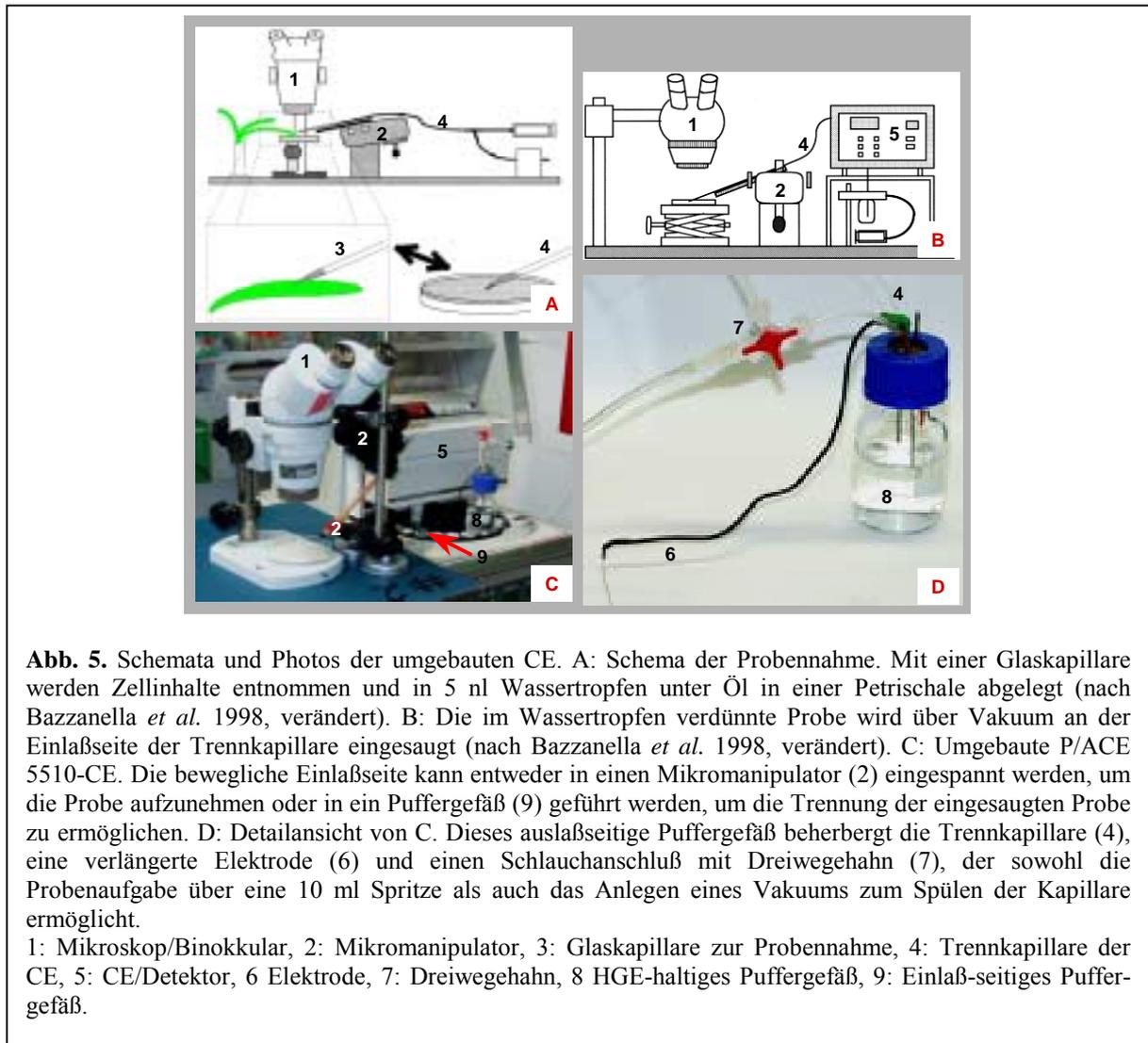
Sorbat als HGE absorbiert bei einer Wellenlänge von 256 nm sehr stark. Die underivatisierten, nicht komplexierten Kohlenhydrate können als negative Peaks detektiert werden, da sie bei dieser Wellenlänge nicht absorbieren. Zur Trennung wurde eine 97 cm lange Kapillare (effektiv 90 cm) mit einem Innendurchmesser von 50 μm und als HGE 6 mM Sorbat (pH 12,1) verwendet. Die Kapillare wurde auf 15°C gekühlt. Das verwendete Spül- und Separationsprogramm setzte sich wie folgt zusammen:

Spül-, Probenaufgabe- und Separationsbedingungen			
Spülschritt 1	1 N NaOH	1 min	20 psi
Spülschritt 2	HGE	2 min	20 psi
Probenaufgabe		10 s	0,5 psi
Separation		8 min	25 kV

2.2.6.3.3 Instrumentenumbau

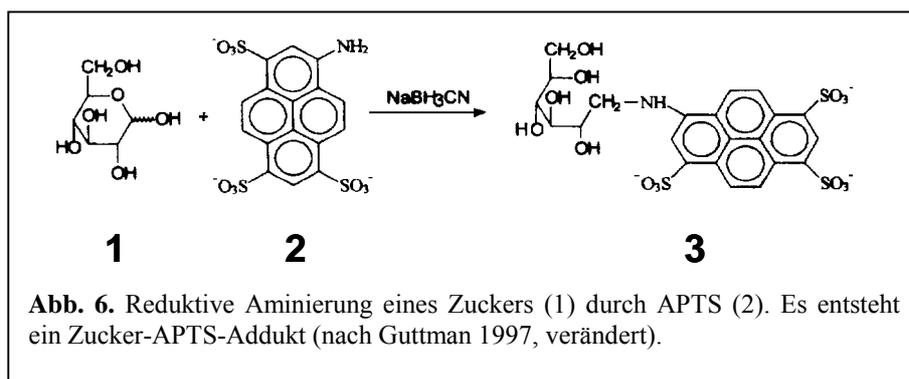
Bazzanella und Kollegen (1998) beschreiben eine Eigenbau-CE, mit der es möglich ist, unter mikroskopischer Kontrolle manuell Proben im nl-Bereich auf die Kapillare aufzugeben (Abb. 5). Hierzu ist die Einlaßseite der Trennkapillare beweglich; dadurch kann sie entweder zur Probenaufnahme unter das Mikroskop oder zum Anlegen von Spannung in ein Gefäß mit HGE und einer Elektrode geführt werden (Abb. 5A-B). In den nl-Tropfen werden die Zellproben (pl-Bereich) verdünnt, wodurch die Verdünnung um den Faktor 1000 verringert wird. Sie werden unter Öl gelagert, um Verdunstungseffekte zu verhindern (Abb. 5A, 5C).

Um dieser Technik folgen zu können, wurde die P/ACE 5510 Kapillarelektrophorese so umgebaut, daß Proben mittels Vakuum auf die Kapillare aufgegeben werden konnten. Hierzu wurden jeweils die letzten 15 cm der Ein- bzw. Auslaßseite der Kapillare freibeweglich gestaltet und auf der Auslaßseite ein selbstgebautes Puffergefäß verwendet, welches über einen Dreiweghahn sowohl mit einer Vakuumpumpe als auch einer 10 ml Spritze verbunden war und in das die Kathode verlängert wurde (Abb. 5C-D). Die Einlaßseite war freibeweglich, um die Kapillare zwischen den Proben unter Öl/Binokular und Puffergefäß bewegen zu können. Die Kapillare konnte hierbei nicht temperiert werden, da sie sich circa zur Hälfte außerhalb der temperierbaren Kartusche befand. Die Gesamtlänge der Kapillare betrug 70 cm, die effektive Länge 55 cm, bei einem Innendurchmesser von 50 μm . Nach jedem Lauf wurde per Vakuumpumpe für 1 min durch die Kapillare Ethanol gesaugt, anschließend für 2 min HGE. Die Probenaufgabe erfolgte per Hand mittels Ansaugen durch die Spritze. Als Separationsspannung wurden 15 kV für 60 min angelegt.



2.2.6.3.4 Nachweis von Zuckern nach APTS-Derivatisierung (nach Guttman 1997)

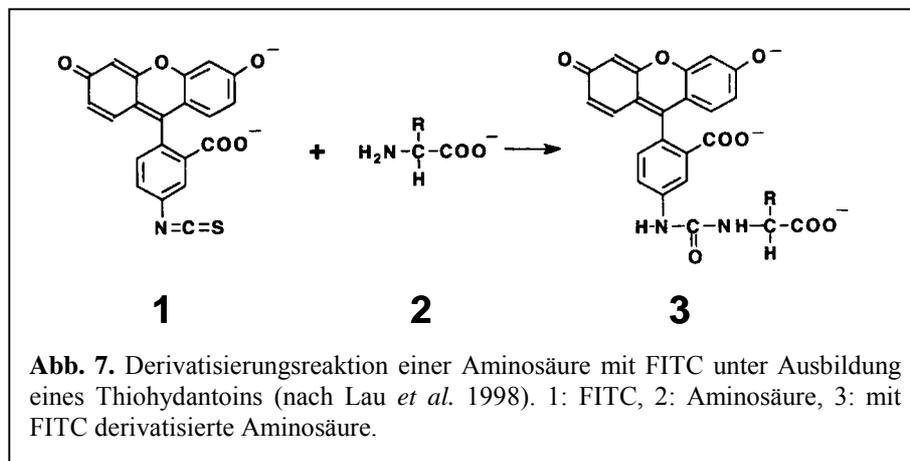
Da Zucker nach Anregung bei 488 nm nicht über native Fluoreszenz verfügen, ist eine Derivatisierung mit einem geeigneten Reagenz notwendig. Es wurde 0,2 M 8-Aminopyren-1,3,6-trisulfonat (APTS, Molecular Probes) in 25 %iger Zitronensäure verwendet: Die Zucker wurden mit 4 μmol APTS in Gegenwart von 2 μmol Natriumcyanaborohydrid (in Tetrahydrofuran, Sigma) in 60 min bei 75°C durch reduktive Aminierung derivatisiert (Abb. 6).



Als HGE diente 200 mM Borat (pH 10,2). Es wurde eine 25 μm (Innendurchmesser) Kapillare mit einer Länge von 40 cm (effektiv 30 cm) benutzt. Die verwendete Methode setzte sich wie folgt zusammen:

Spül-, Probenaufgabe- und Separationsbedingungen			
Spülschritt 1	0,1 N NaOH	1 min	20 psi
Spülschritt 2	H ₂ O _{bidest}	1 min	20 psi
Spülschritt 3	HGE	2 min	20 psi
Probenaufgabe		10 s	0,5 psi
Separation		45 min	30 kV

2.2.6.4 Nachweis von Aminosäuren nach FITC-Derivatisierung (nach Arlt *et al.* 2001)



Nur wenige Aminosäuren zeigen nach Anregung native Fluoreszenz. Daher war eine Derivatisierung notwendig. Diese erfolgte mittels Zugabe des gleichen Volumens 2,1 μM Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) zur Probe und Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln wie in Arlt *et al.* (2001) beschrieben. FITC reagiert mit primären Aminogruppen nicht nur von Aminosäuren (Abb. 7), sondern auch von Peptiden, Proteinen, oder Katecholaminen und bildet dabei Thiohydantoin (Blau und Halket 1997). Als HGE wurde ein Puffer bestehend aus 100 mM Borat und 20 mM SDS bei pH 9,3 verwendet. Die Kapillare hatte eine Länge von 53 cm (effektiv 43 cm) bei einem inneren Durchmesser von 50 μm . Nachstehende Methode wurde für die Trennung verwendet:

Spül-, Probenaufgabe- und Separationsbedingungen			
Spülschritt 1	0,1 N NaOH	3 min	20 psi
Spülschritt 2	H ₂ O _{bidest}	2 min	20 psi
Spülschritt 3	HGE	2 min	20 psi
Probenaufgabe		10 s	0,5 psi
Separation		30 min	20 kV

2.2.7 Proteinmethoden

2.2.7.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteine aus Gewebebereichen, die mit dem Mikromeißel gewonnen wurden, bzw. aus Blattscheiben wurden durch Inkubation in SDS-Probenpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 2,5 % (w/v) SDS, 5 % (w/v) Mercaptoethanol, 15 % (v/v) Glycerol und 0,01 % (w/v) Bromophenolblau) extrahiert und für 5 min bei 70°C denaturiert. Die Trennung der Proteine erfolgte in einem 1 mm dicken Minigel. Trenngel (12 %) und Sammelgel (4 %) wurden aus einer 30 %igen Acrylamid/Bis-Lösung (BioRad) nach Herstellerangaben gegossen. Die Trennung erfolgte in einem Gelelektrophoresesystem Mini Protean 3 (BioRad) bei 100 V. Als Kammerpuffer diente 50 mM Tris-HCl, 380 mM Glycin, 0,1 (w/v) % SDS bei pH 8,6. Es wurden zwei unterschiedliche Färbungen verwendet: Die Gele wurden nach Herstellerangaben mit kolloidalem Coomassie-Blau (Novex) gefärbt und über Nacht in Wasser entfärbt oder nach Herstellerangaben mit einer Silberfärbung (BioRad) gefärbt.

2.2.7.2 Proteinsequenzierung mittels Q-TOF-Massenspektrometrie

Aus den Coomassie-Blau-gefärbten Gelen wurden die zu sequenzierenden Banden ausgeschnitten. Diese wurden in silikonisierte Reaktionsgefäße überführt und für zweimal 1 Stunde in 40 % (v/v) Acetonitril und 60 % (v/v) 50 mM NH_4HCO_3 entfärbt. Die entfärbten Gelstücke wurden für 5 min in 100 % Acetonitril entwässert. Auf Eis wurden 20 μl Trypsin (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in 50 mM NH_4HCO_3) hinzugegeben und nach 10 min weitere 30 μl 50 mM NH_4HCO_3 . Bis zum nächsten Morgen wurde der Ansatz bei 37°C inkubiert. Dann wurde der Puffer abpipettiert und die Peptide wurden aus dem Gel durch 20 minütige Inkubation mit 15 μl 5 % (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) und dreimaliger 20 minütiger Inkubation mit 5 % TFA in 50 % Acetonitril extrahiert. Die Überstände wurden vereinigt, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 10 μl 0,1 % TFA gelöst. Die Proben wurden mit Zip Tips (Millipore) entsalzt und aufkonzentriert und in 5 μl eines Gemisches aus 50 % (v/v) Acetonitril und 0,1 % Essigsäure eluiert.

1 μl jedes tryptischen Verdau wurde mittels eines Quadrupol-Flugzeit-Hybrid-Massenspektrometers (Q-TOF, Micromass), ausgerüstet mit einer Z-Sprühquelle, analysiert. Das Gerät wurde extern mit dem Fragmentspektrum vom doppelt geladenen 1571,68 Da-Ion (785,84 m/z) des Fibrinopeptids B kalibriert. Die Proben wurden unter zu Hilfenahme von Goldbeschichteten Borosilikat-Glaskapillaren (Micromass) über Nano-Elektrosprayionisation aufgegeben. Die Kapillaren- bzw. *Conspannung* lagen bei 800 V bzw. 50 V. Die Kollisionsspannung wurde zwischen 15 und 35 V variiert. Die erhaltenen Daten wurden über den MaxEnt3-Algorithmus und die Biolynx Software (Micromass) ausgewertet. Datenbanksuchen und *Alignments* wurden mit im Internet frei verfügbaren Programmen vorgenommen (<http://xylian.igh.cnrs.fr/bin/fasta-guess.cgi>, <http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg3.html>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3 ERGEBNISSE

3.1 Transkriptuntersuchungen

3.1.1 Versuchskonzeption

Viele pflanzliche Prozesse sind auf bestimmte Regionen, häufig auf bestimmte Zelltypen beschränkt. Dies wird nicht zuletzt an der Spezialisierung von Zellen in z.B. Schließ-/Epidermiszellen, Palisaden-/Schwammparenchymzellen oder Geleitzellen/Siebelemente deutlich. Um die hierbei zugrundeliegenden Genaktivitäten den Zellen und ihren spezifischen Prozessen zuordnen zu können, ist es notwendig, eine Zelltyp-spezifische Auflösung zu erreichen.

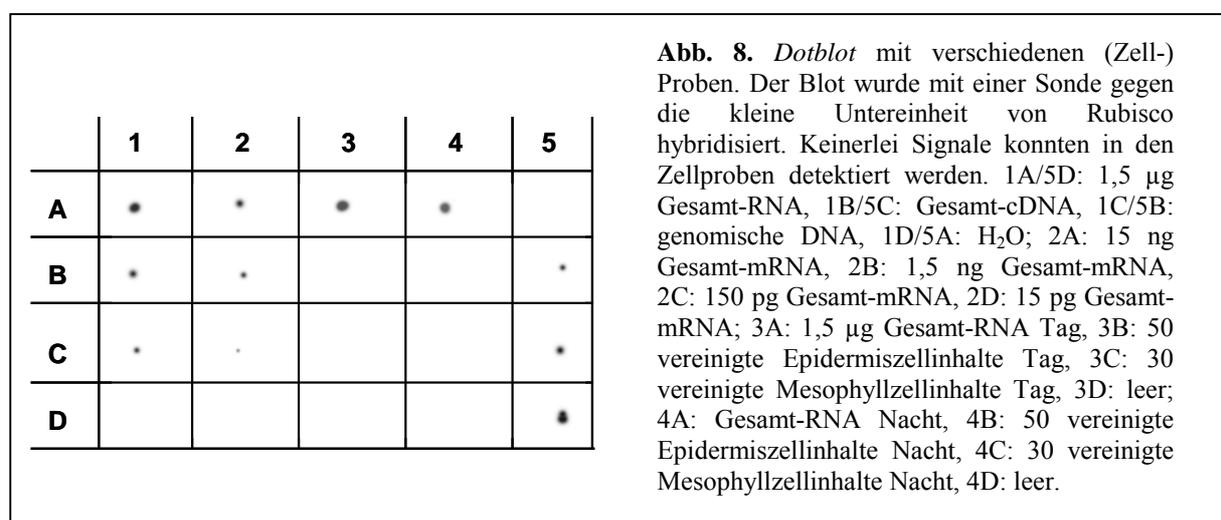
Durch Probenentnahme mittels Glaskapillaren ist es möglich, aus einzelnen Zellen Zellsaft zu entnehmen (Malone *et al.* 1989, Kehr *et al.* 1998, Brandt *et al.* 1999), wobei die mRNA-Menge pro Zelle geringer als 700 fg ist (Dresselhaus *et al.* 1994).

Im folgenden sind Versuche beschrieben, um Transkripte in Einzelzellproben zu untersuchen. Hierzu wurden vorhandene Methoden optimiert beziehungsweise Analysemethoden entwickelt, um sie anschließend auf die Zellproben anwenden zu können.

3.1.2 Dotblothybridisierung mit Einzelzellproben

Es wurden mittels Glaskapillaren bis zu 50 Mesophyll- bzw. bis zu 140 Epidermiszellinhalte in 1 µl Wasser vereinigt und nach Denaturieren direkt auf Membranen aufgetragen. Wasserproben des gleichen Volumens wurden als Negativkontrollen aufgetragen. Als Positivkontrollen wurden genomische DNA sowie cDNA verwendet. Um die Effizienz der Hybridisierung abschätzen zu können, wurde zusätzlich eine Gesamt-mRNA-Verdünnungsreihe auf die Membran aufgebracht.

Die Membranen wurden mit radioaktiven Sonden für ein Chlorophyll bindendes Protein (Acc. No. X64460) bzw. für die kleine Untereinheit von Rubisco (Acc. No. X14564) hybridisiert (Abb. 8). Es konnten keine Signale für die vereinigten Zellinhalte detektiert werden. Die ebenfalls mit aufgetragenen Positivkontrollen ergaben klare Signale bis zu einer Menge von 150 pg Gesamt-



mRNA (Abb. 8). Daraus folgt, daß die Hybridisierung funktioniert hat, aber in den Zellinhalten zu wenig RNA (und genomische DNA) enthalten war, um eine Schwärzung des Films zu bewirken. Die aufgetragene genomische DNA sollte dazu dienen, um nach Hybridisierung mit einer nicht transkribierten, genomischen Sequenz abschätzen zu können, ob in den Zellinhalten genomische DNA enthalten ist. Dies würde zu falschen Aussagen bei der Hybridisierung mit einer Sonde führen, die kodierende Sequenzen enthält.

3.1.3 Amplifizierungsstrategien

Wie unter 3.1.2 gezeigt, reicht die vorhandene RNA-Menge auch in vielen vereinigten Zellproben nicht zum Nachweis durch Hybridisierung aus. Im Folgenden sind Experimente dargestellt, in denen versucht wurde, die RNA-Menge so zu erhöhen, daß sie anschließend nachweisbar war.

3.1.3.1 Gen-spezifische reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion

Verschiedene Transkripte wurden über RT-PCR aus mittels Glaskapillaren erhaltenen Einzelzellproben amplifiziert und über Gelelektrophorese die Produkte getrennt. Sie konnten direkt mit Ethidiumbromidfärbung oder nach *Blotten* und Antikörpernachweis des in die DNA eingebauten DIG nachgewiesen werden. So konnten Ergebnisse aus Vorarbeiten an Blattmesophyllproben aus Kartoffel (Phosphoglyceratmutase, Acc. No. AF047842) und sowohl an Blattepidermis als auch -mesophyll von Gurke (cytosolische Ascorbatperoxidase, Acc. No. D88649 bzw. kleine Untereinheit von Rubisco (Acc. No. M16056) reproduziert werden (Brandt *et al.* 1999).

Um die Anwendbarkeit dieses Protokolls auch für schwach exprimierte Gene zu testen, wurde versucht, Transkripte des Kartoffelgens Knollen L-Typ Stärkephosphorylase (Acc. No. X52385) in Blattmesophyllproben aus Kartoffel nachzuweisen. Dieses Gen ist als wenig exprimiert in Blättern beschrieben (Sonnewald *et al.* 1995). Klare Signale in Mesophyllzellproben konnten in Mesophyllzellproben erhalten werden (Brandt *et al.* 1999).

Als nächstes wurde die Übertragbarkeit der Methode auf *A. thaliana*-Proben getestet. Hierzu wurden ein Epidermis-spezifisches, ein Mesophyll-spezifisches sowie ein konstitutiv exprimiertes Gen ausgewählt: Die Transkripte der für das Lipidtransferierende Protein (LTP, Acc. No. M80567), die kleine Untereinheit von Rubisco und Actin 2 (Acc. No. U41998) kodierenden Gene konnten im erwarteten Expressionsmuster detektiert werden (Abb. 9).

Als Kontrollreaktionen wurden immer Negativkontrollen mit Wasser anstelle von Zellinhalt und Zellinhalte ohne reverse Transkription mitgeführt. Durch letztere Reaktion kann eine genomische

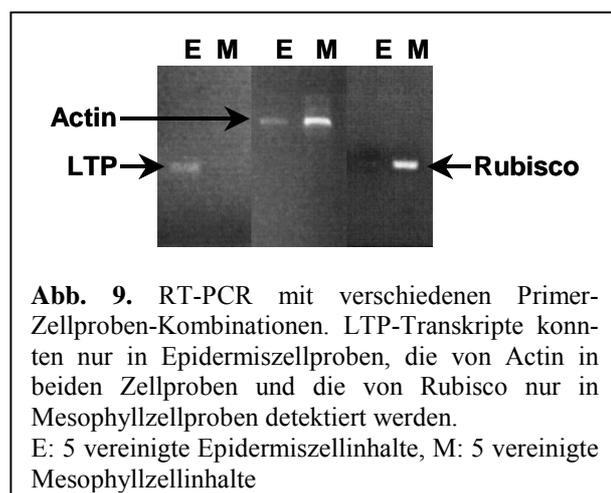


Abb. 9. RT-PCR mit verschiedenen Primer-Zellproben-Kombinationen. LTP-Transkripte konnten nur in Epidermiszellproben, die von Actin in beiden Zellproben und die von Rubisco nur in Mesophyllzellproben detektiert werden. E: 5 vereinigte Epidermiszellinhalte, M: 5 vereinigte Mesophyllzellinhalte

Verunreinigung von Signalen unterschieden werden, die auf mRNA zurückgehen. Es wurden in weniger als 10 % der Zellproben genomische Verunreinigungen gefunden (Brandt *et al.* 1999). Zellkerne waren daher entweder nicht in den Proben enthalten bzw. ihre DNA war der PCR nicht zugänglich (Lambolez *et al.* 1995).

3.1.3.2 Unspezifische Amplifikation von Nukleinsäuren

Bei den meisten eukaryontischen mRNA-Molekülen ist eine Poly(dA) Region am 3'-Ende vorhanden (Voet *et al.* 1999). Diese macht man sich für die reverse Transkription zu nutze, indem man einen Oligo (dT)-Primer verwendet, den man auch für spätere PCR-Zyklen benutzen kann. Die Schwierigkeit der unspezifischen (globalen) Amplifikation besteht in der unbekanntem Sequenz am 5'-Ende der mRNA. Es fehlt die Sequenzinformation für einen zweiten Primer, so daß eine globale PCR zunächst nicht möglich ist.

3.1.3.2.1 **Synthese eines Homopolymers an das 3'-Ende des Erststranges**

Beim *Tailing* werden an das 3'-Ende des Erststranges mehrere (10 bis 25) gleiche Nukleotide ansynthetisiert. So entsteht an diesem Ende ein bekannter, homomerer „Schwanz“ (*Tail*), dessen komplementäre Sequenz als Primer verwendet werden kann. In Vorversuchen wurde dCTP als das geeignetste Nukleotid für das Enzym terminale Desoxynukleotidyltransferase ermittelt. Seine

Tab. 2. Primerschema für verschiedene PCR-Reaktionen.
Es wurden Gen-spezifische Primer gewählt, die gegen die kleine Untereinheit von Rubisco gerichtet waren.

Kombination	<i>Forward</i> Primer	<i>Reverse</i> Primer
1	Genspezifischer 5'-Primer	Degenerierter Oligo (dT)- Primer
2	Degenerierter Oligo (dG)-Primer	Genspezifischer 3'-Primer
3	Degenerierter Oligo (dG)-Primer	Degenerierter Oligo (dT)- Primer

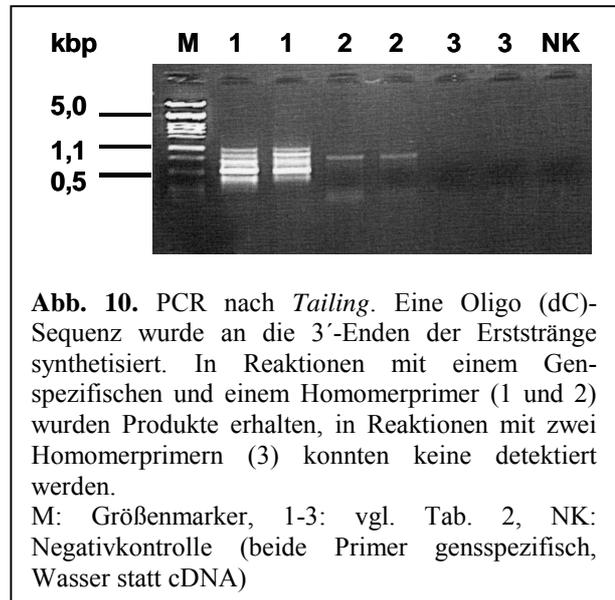
Konzentration wurde zw. 1,5 mM und 5 µM variiert und mit 500 µM als optimal festgestellt. Als Templates für die reverse Transkription vor der *Tailing*reaktion dienten verschiedene Konzentrationen an isolierter Gesamt-RNA. Die eingesetzte Menge wurde zwischen 20 ng und 20 pg variiert.

Zunächst wurde an das 3'-Ende des Erststranges ein Homopolymer synthetisiert. In der sich anschließenden PCR wurden verschiedene Primerkombinationen gewählt, um den Erfolg des *Tailings* zu überprüfen (Tab. 2):

Kombination 1, die dem Überprüfen des reversen Transkriptionsschritts diene, und Kombination 2, bei der der *Tailinger*folg überprüft wurde, erbrachten beide je eine Hauptbande bei 2 ng eingesetzter Gesamt-RNA (Abb. 10). Die Nebenbanden der Reaktion 1 rühren wahrscheinlich von unspezifischeren Bindungsstellen des degenerierten Oligo (dT)-Primers auf dem Poly-(dA)-Ende her. Das PCR-Produkt der Reaktion 2 fiel größer aus, da die von dieser Primerkombination überspannte Sequenz offenbar größer war als die der Hauptbande der Primerkombination in Reaktion 1.

Obwohl sowohl die reverse Transkription als auch das *Tailing* funktioniert haben, konnte kein PCR Produkt für die Kombination der beiden degenerierten Primer gefunden werden (Abb. 10). Eine DIG-Markierung während der PCR und ein anschließender Antikörpernachweis der geblohteten PCR-Produkte ergaben für diese Proben sehr schwache Signale. Wurde die Ausgangsmenge weiter verringert, so konnten für die Primerkombinationen 1 und 2 noch bis zu einer Ausgangsmenge von 20 pg Gesamt-RNA Produkte detektiert werden. Für die Kombination der beiden degenerierten Primer konnten bei Verringerung der Ausgangsmenge keine Produkte mehr nachgewiesen werden.

Offenbar kann terminale Transferase nur mit relativ großen pflanzlichen Nukleinsäuremengen arbeiten; zudem war der Einsatz von 2 degenerierten Homomerprimern in der PCR offensichtlich nicht effizient.



3.1.3.2.2 Ligation von Adaptern an das unbekannte Ende doppelsträngiger DNA

Über die Ligation eines doppelsträngigen Primers an die unbekannte Seite einer ebenfalls doppelsträngigen DNA kann eine spezifische Sequenz eingeführt werden, die neben der Poly (dT/dA)-Sequenz am anderen Ende als Primer in einer globalen PCR dienen kann.

In Vorversuchen wurden je 10 ng eines PCR-Produktes der Phosphoglyceratmutase aus Kartoffel als Vorlagen verwendet. Es wurde ein doppelsträngiger Primer ligiert, der auf einer 5'-Seite einen zwei Nukleotide langen Überhang besitzt. Dies ermöglichte eine gerichtete Ligation. Nach der Ligation wurde ein Teil oder der ganze Ansatz als Vorlage für die PCR genommen. Es konnten keine Produkte nachgewiesen werden. Da schon diese Vorversuche nicht den gewünschten Erfolg brachten, wurde von weiterer Optimierung abgesehen.

3.1.3.2.3 Smart Kit (Clontech)

Diese Methode beruht auf der Synthese mehrerer dCTP-Nukleotide an das 3'-Ende des entstehenden Erststranges. Bei gleichzeitiger Zugabe eines Primers, der mehrere dGTP-Reste am eigenen 3'-Ende besitzt, kann die Transkriptase die Matritze wechseln (mRNA gegen Primer) und synthetisiert an alle Erststränge gleichartige 3'-Enden. Die hierzu komplementäre Sequenz und das Poly-(dT)-Ende dienen als Primer für eine globale PCR. Laut Herstellerangaben (Clontech, Produktinformation) soll dieses Kit für die Amplifikation von Gesamt-RNA-Mengen von bis zu 50 ng besonders geeignet sein. Mit den so amplifizierten Vollängen-cDNA-Molekülen könnten cDNA-Bibliotheken angelegt werden.

Zunächst wurde eine Amplifikation mit abgestufter Templatekonzentration (20 ng- 20 pg Gesamt-RNA) durchgeführt. Es wurden Produkte bis zu einer Ausgangsmenge von 2 ng *A. thaliana*-Gesamt-RNA gefunden. In bis zu 50 % der Negativkontrollen waren ebenfalls Produkte vorhanden. Die Ursache hierfür bleibt unklar, da bei den angewendeten Maßnahmen zum Schutz vor Kontaminationen (vgl. Kap. 2.2.4.3.1) in spezifischen PCR-Reaktionen in höchstens 5 % der Negativkontrollen Signale auftraten. Dies spricht gegen Kreuzkontaminationen.

Um zu überprüfen, ob die Strategie auch mit biologischen Proben arbeitet, wurden Zellinhalte von 10 und 100 Zellen der adaxialen Epidermis von *A. thaliana*-Hochblättern verwendet. Nach Amplifizierung und Gelelektrophorese waren keine Signale detektierbar (Abb. 11). Auch eine DIG-Markierung während der PCR und anschließender Antikörpernachweis der Produkte nach *Blotten* brachte keine neuen Resultate hervor. Wurden Signale in den Zellproben gefunden, waren diese auch in den Negativkontrollen vorhanden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde auf das Anlegen einer cDNA-Bibliothek verzichtet.

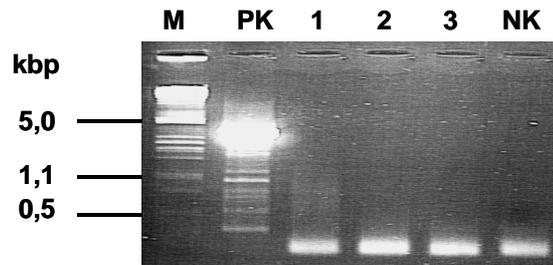


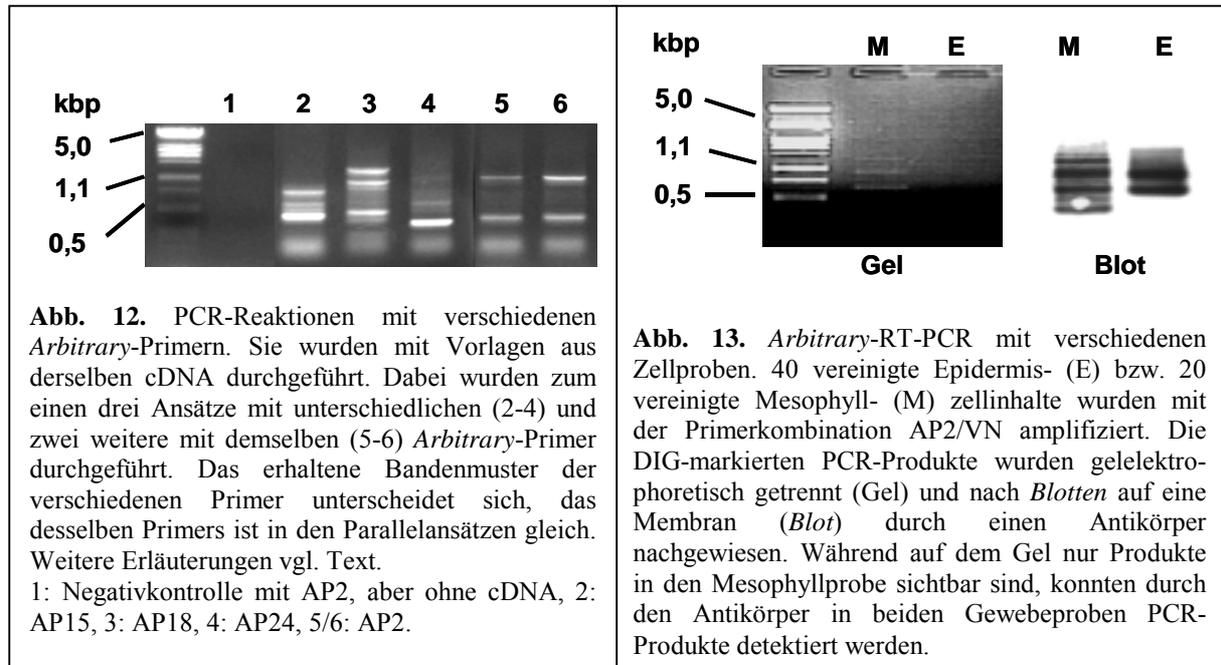
Abb. 11. Smart-RT-PCR mit verschiedenen Vorlagen. In Reaktionen mit Zellproben als Vorlagen wurden keinerlei Produkte erhalten. M: Größenmarker, PK: 1 µg humane PlacentamRNA, 1: 2 ng *A. thaliana*-Gesamt-RNA, 2: 100 vereinigte Epidermiszellinhalte, 3: 10 vereinigte Zellinhalte, NK: Negativkontrolle.

3.1.3.2.4 *Arbitrary*-PCR (nach Bauer *et al.* 1993, verändert)

Bei dieser Art der PCR, die dem *Differential Display* entstammt (Liang und Pardee 1992), wird ein degenerierter Oligo (dT)-Primer mit einem *Arbitrary*-Primer kombiniert, der aus einer spezifischen Sequenz besteht, die bestimmte Kriterien erfüllen muß (vgl. Kap. 2.2.4.3.7.8). Werden genügend viele verschiedene Primer benutzt, so ist die statistische Wahrscheinlichkeit eines Bindungsereignisses hinreichend groß, um theoretisch alle cDNA (mRNA)-Sequenzen wenigstens einmal zu amplifizieren (Bauer *et al.* 1993).

In Vorversuchen mit Verdünnungsreihen des Ausgangsmaterials (von 20 ng- 20 pg Gesamt-RNA) konnte gezeigt werden, daß die *Arbitrary*-Primer mit Ausgangsmengen von weniger als 100 pg Gesamt-RNA noch Produkte hervorbringen. Diese waren jedoch nur nach DIG-Markierung und Antikörpernachweis sichtbar zu machen. In Abb. 12 ist die Reproduzierbarkeit der *Arbitrary*-PCR dargestellt. Dafür wurden zwei parallele PCRs aus demselben reversen Transkriptionsansatz mit der Primerkombination AP2/VN durchgeführt (Abb. 12). Aus demselben Ansatz wurden zusätzlich noch drei weitere PCRs mit weiteren *Arbitrary*-Primern durchgeführt, um zu zeigen, daß andere Primer unterschiedliche Bandenmuster hervorbringen (Abb. 12). Die Negativkontrolle, die Wasser anstatt cDNA enthielt, wurde mit der Kombination AP2/VN behandelt und brachte keinerlei Signale hervor (Abb. 12).

Zum Übertragen des PCR-Protokolls auf biologische Proben wurden 20 und 30 Mesophyllzellen sowie 30 und 40 Epidermiszellen beprobt und deren Zellinhalte der Amplifikation zugeführt. Nach 40 Zyklen konnten in den Mesophyllproben bereits mittels Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung Banden sichtbar gemacht werden, für die Epidermisproben mußte ein DIG-Nachweis nach *Blotten* durchgeführt werden. Hierbei ergaben sich für beide Ansätze so viele



Banden unterschiedlicher Größe, daß diese im Agarosegel nicht mehr sauber aufgetrennt werden konnten und nur noch ein Schmier zu sehen war (Abb. 13). Die erhaltenen Produkte lagen im Bereich zwischen 200 und 2000 bp. Mitgeführte Negativkontrollen mit Wasser anstelle von Zellinhalten zeigten auch nach *Blotten* und Antikörpernachweis keine nennenswerten Produkte (Abb. 13).

3.1.3.2.5 Weitere Amplifizierungsstrategien

Es wurden weitere, teilweise kommerziell angebotene Methoden/Kits zur Amplifikation getestet. Keine dieser in diesem Kapitel zusammengefaßten Methoden führte zum erwünschten Erfolg. Dennoch werden hier kurz die Strategien vorgestellt:

Das DOP-PCR Master-Kit der Firma Roche beruht auf einer PCR vermittelten Amplifikation der Vorlagen. Hierbei wird ein degenerierter Primer verwendet, der nahe des 3'-Endes eine dN₆-Sequenz trägt, innerhalb der alle Kombinationen erlaubt sind. Sie ist benachbart von einer GC-reichen Sequenz. Die ersten 5 Zyklen werden bei 30°C für 90 s gefolgt von einer Temperaturerhöhung von 3,5°C pro 15 s bis auf die Elongationstemperatur durchgeführt. Für alle weiteren Zyklen wird eine Annealingtemperatur von 62°C angelegt. Für die ersten 5 Zyklen ist die dN₆-Region für das Binden des Primers entscheidend, bei den späteren Zyklen die GC-reiche Region, die in allen in den ersten 5 Zyklen synthetisierten cDNA-Molekülen enthalten ist. Dadurch entstehen einheitliche Enden, was eine globale Amplifikation ermöglicht. In

Vorversuchen arbeitete dieses Kit nur mit relativ großen Templatemenen (>100 ng Gesamt-RNA). Es eignet sich offenbar nicht für die Amplifikation kleinster Nukleinsäuremengen und wurde daher nicht weiter verwendet.

Ebenso wurde ein RAP-PCR-Protokoll nach Menke und Müller-Röber (2001) hinsichtlich seiner Anwendbarkeit für sehr geringe Probenmengen getestet. Dieses Protokoll arbeitet ähnlich wie die DOP-PCR. Im Originalprotokoll wird als Mindestausgangsmenge 100 ng Gesamt-RNA angegeben. Wie schon mit der DOP-PCR arbeitete auch dieses Protokoll nur mit solch großen Mengen, nicht aber mit in Einzelzellproben vorhandenen. Auf Optimierungsschritte wurde daher verzichtet.

In einem weiteren Ansatz wurde versucht, mit Hilfe des TOPO-Klonierungskits (Invitrogen) doppelsträngige cDNA-Moleküle vor einer Amplifizierung in einen Vektor zu klonieren. Anschließend sollte mit Primern, die gegen die flankierenden Vektorsequenzen gerichtet waren, eine globale PCR durchgeführt werden. Dieses Kit besitzt eine höhere Ligationswahrscheinlichkeit als normale Ligationen, da es sich nicht des Enzyms Ligase bedient. Vielmehr wird eine Isomerase I, die zusätzlich an den linearisierten Vektor gebunden ist, verwendet. Diese Idee ließ sich nicht verwirklichen, da nach der vermeintlichen Klonierung kleinerer Mengen (<10 ng) Phosphoglyceratmutase, die doppelsträngig aus einer PCR gewonnen wurde, und anschließender PCR mit den TOPO-Primern keine Produkte erhalten werden konnten. Mit Hilfe von T4 RNA-Ligase wurde außerdem versucht einen einzelsträngigen Adapter an den Erststrang der cDNA zu ligieren und dessen komplementäre Sequenz anschließend als zweiten Primer in einer PCR zu verwenden. Vorversuche mit geringen Vorlagenmengen (weniger als 2 ng Gesamt-RNA) schlugen fehl, weshalb auch hier auf eine Optimierung verzichtet wurde.

3.1.4 Arrayhybridisierung als Durchmusterungsmethode für unterschiedlich exprimierte Gene

Sowohl isolierte Gesamt-RNA einer Pflanze oder eines Organs als auch unspezifisch amplifizierte cDNA kann gelelektrophoretisch aufgetrennt werden. Dabei können aber Unterschiede zwischen Nukleinsäurepopulationen nicht identifiziert werden, da beide auf Gelen nur einen Schmier ergeben. Selbst wenn distinkte Banden unterschieden werden könnten, bliebe deren Identität unklar.

Durch Hybridisierung mittels einer spezifischen Sonde kann das Vorkommen eines einzelnen Transkripts in unterschiedlichen Proben untersucht werden. Arrayhybridisierung ist eine Technik, die es erlaubt, multiparallele Hybridisierungen durchzuführen. Hierbei werden viele Gene in Form von *Expressed Sequence Tags* (ESTs) auf einem Trägermaterial angeordnet und fixiert. Markierte Nukleinsäuren können nun gegen diese Arrays hybridisiert werden. Je nachdem, in welchem Zustand die Pflanzen zur Zeit der Ernte waren, können für diesen Zustand spezifische Expressionsmuster gefunden und mit Expressionsmustern anderer Zustände verglichen werden (Schena *et al.* 1995, Reymond *et al.* 2000). Die Nukleinsäuren, die als Sonden verwendet werden, bestehen üblicherweise aus Gesamt-RNA-Präparationen einer Pflanze oder eines Organs. In

dieser Arbeit wurden zusätzlich unspezifisch über *Arbitrary*-PCR angereicherte cDNA-Populationen als Sonden für die Hybridisierung eingesetzt. Im folgenden werden Versuche beschrieben, in denen spezifische Gene in Gesamt-RNA-Präparationen von Blättern und in Gewebe-spezifischen, unspezifisch amplifizierten cDNA-Populationen über Array-hybridisierungen nachgewiesen werden sollten.

3.1.4.1 Vergleich der Expressionsmuster von Rosettenblättern bei Tag und Nacht

Um Expressionsmuster von *A. thaliana*-Rosettenblättern bei Tag und bei Nacht zu erstellen, wurden am Ende der Lichtperiode (1-3 Stunden vor Ende des Lichts) bzw. am Ende der Dunkelperiode (0-1 Stunde vor Beginn des Lichts) Blätter geerntet, die enthaltene Gesamt-RNA isoliert und jeweils 10 µg nach radioaktiver Markierung zum Hybridisieren verwendet. Dieser Versuch wurde dreimal durchgeführt. RNA wurde dabei von 6 verschiedenen Pflanzen isoliert, die zu unterschiedlichen Zeiten in einer Wuchskammer unter gleichen Bedingungen herangezogen wurden.

Tab. 3. Anzahl der ESTs, die bei Tag und Nacht unterschiedliche Aktivitäten im Gesamtblatt zeigen. Sie sind nach funktionellen Kategorien aufgeschlüsselt.

*25 ESTs sind homolog zu Genen, die für Chlorophyll bindende Proteine kodieren

Funktionelle Kategorie	Spezifische Funktion	Unbekannt	Gesamt	Spezifische Funktion	Unbekannt	Gesamt
	Rosettenblatt Nacht			Rosettenblatt Tag		
	7	22	29	54	34	88
Primärer Metabolismus	1			2		
Membranproteine/ Transporter	/			2		
Proteinmetabolismus	/			4		
Regulation/Translation	2			2		
Primäre Biosynthese	/			1		
Photosynthese	1			34*		
DNA-Synthese/ Chromosomenstruktur	/			/		
Redoxstatus	1			1		
Sekundärer Metabolismus	/			2		
Hormone/Signaltransduktion	/			1		
Streß	1			2		
Zellwand	/			/		
Detoxifikation	/			2		
Weitere	1			1		

ESTs, die in mindestens zwei von drei Durchführungen Werte über dem doppelten lokalen Hintergrund zeigten, wurden in die Auswertung einbezogen. Da für einen aussagekräftigen t-Test mehr als drei Replika pro Erntezeitpunkt nötig gewesen wären, wurde dieser nicht durchgeführt. Die erhaltenen Werte geben daher Trends wieder und sind nicht zwangsläufig signifikant.

Tab. 3 zeigt eine Übersicht über die Anzahl und funktionellen Kategorien derjenigen Gene, die bei Nacht bzw. Tag stärker exprimiert waren. Als präferentiell Nacht-exprimiert wurden solche Gene angesehen, die in den Dunkelexperimenten eine zweifach höhere durchschnittliche Aktivität

zeigten als in den Lichtexperimenten. Umgekehrt wurden als Tag-aktiv solche Gene angenommen, deren durchschnittliche Expression im Licht zweifach erhöht war.

Als Nacht-exprimierte ESTs wurden insgesamt 29 gefunden, von denen 22 keiner Funktion zuzuordnen waren (Tab. 3, vgl. Anhang 1). Interessant ist die stärkere Expression des Transkriptionsfaktors L2. Hingegen dürfte der EST, der homolog zu dem Gen für das Photosystem I Reaktionszentrum ist und eine Nachtaktivität nahelegt, ein falsch positives Signal darstellen. Dieses Gen wird von mehreren ESTs abgedeckt und die übrigen ESTs zeigen entweder keine spezifische oder eine Tagexpression.

Umgekehrt zeigten 88 ESTs eine höhere Aktivität am Tage (Tab. 3), die beispielsweise homolog zu an der Photosynthese beteiligten Genen sind (unter anderen verschiedene Chlorophyll bindende Proteine, Photosysteme I und II oder Carboanhydrase, vgl. Anhang 1). Rubisco zeigte Genaktivitäten, die nicht auf eine eindeutig höhere Expression zum Zeitpunkt der Tagprobennahme hindeuteten. Dies ist nicht ungewöhnlich, konnte doch schon gezeigt werden, daß mRNA für Rubisco (kleine Untereinheit) zwar in den frühen Morgenstunden ein Akkumulationsmaximum besitzt, aber auch nachts auf einem relativ hohen Niveau vorhanden ist (Giuliano *et al.* 1988, Pilgrim und McClung 1993). Weitere Tag-aktive Gene kodierten für Katalase 3, Phenylalaninammoniumlyase und Transcinnamat-4-Hydroxylase. Letztere beiden sind im Sekundärstoffwechsel an der Synthese von Flavonoiden beteiligt (vgl. Anhang 1).

Für die Gruppe der vermutlich konstitutiv exprimierten Gene, die zu jedem Zeitpunkt und in jedem Gewebe gleich stark aktiv sein sollten, konnten ESTs mit Homologie zu β -Tubulin, Actin 2, Cyclophilin und einem Elongationsfaktor 1 α gefunden werden (vgl. Anhang 1). Der Quotient der Aktivitäten_{Nacht/Tag} lag für alle diese ESTs nahe 1.

3.1.4.2 Vorversuche für Arrayhybridisierungen mit Produkten der Arbitrary-PCR

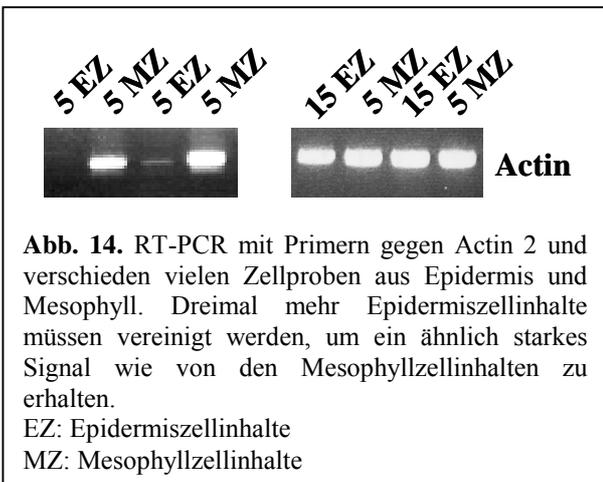
In einem Vorversuch sollte getestet werden, ob die Teilsequenzen einer Vollängenvorlage, die während der *Arbitrary*-PCR entstehen, ausreichen, um Hybridisierungssignale auf Arrayfiltern zu erhalten. Hierzu wurden 10 ng Gesamt-RNA von *A. thaliana* einer RT-PCR unterzogen, radioaktiv markiert und anschließend gegen Filter hybridisiert, die ca. 1.400 ESTs der MSU-Kollektion trugen. Es wurden circa 200 Signale erhalten. Diese wurden nicht ausgewertet, da es sich lediglich um einen Vorversuch handelte.

Des weiteren sollte getestet werden, ob vereinigte Zellproben als Vorlage ausreichen, um nach Amplifikation ebenfalls ausreichende Hybridisierungssignale hervorzubringen. Für diesen Test wurden rund 30 Mesophyllzellproben eines *A. thaliana*-Hochblattes vereinigt. Nach RT-PCR und radioaktiver Markierung wurden sowohl die PCR-Produkte der Mesophyllzellen als auch der Ansatz der Negativkontrolle (Wasser statt Template) gegen 2 Arrayfilter hybridisiert, die rund 16.000 ESTs der MSU-Kollektion enthielten. Auf dem Filter, der mit der Mesophyllprobe hybridisiert wurde, ergaben sich circa 2000 Signale. Der mit der Negativkontrollreaktion hybridisierte Filter hingegen brachte weniger als 50 Signale hervor. Da es sich auch bei diesen

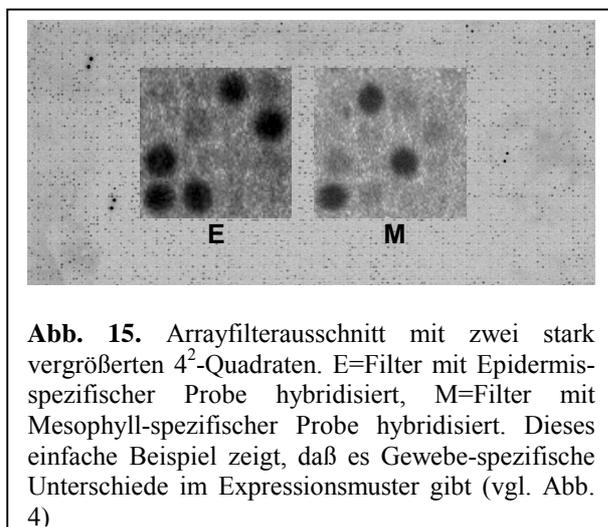
Experimenten um Vorversuche handelte, wurden die Hybridisierungssignale nicht weiter ausgewertet. Bei den wenigen Negativsignalen handelt es sich wahrscheinlich um Artefakte aus der PCR-Reaktion und um unspezifische Hybridisierungen.

Um gleich starke Signale auf Arrayfiltern zu erhalten, sollte die Menge an eingesetzter RNA für die Sonden abgeglichen werden. Dies ist für unamplifizierte Einzelzellproben nicht mittels photometrischer Konzentrationsbestimmungen möglich, da der Nukleinsäuregehalt zu gering ist. Ein Abgleichen der Volumina ist zwar möglich, aber Zellen der beiden Gewebe enthalten unterschiedlich große Zytoplasmaanteile (vgl. Kap. 1.2.3). Um dennoch zu untersuchen, ob

Einzelzellproben aus Epidermis und Mesophyll in etwa vergleichbare Mengen mRNA enthalten, wurde mit Gewebe-spezifischen Proben RT-PCR durchgeführt. Als Primer dienten solche, die ein 720 bp großes Fragment des Actin 2 Transkripts einschließen. Actin 2 wird als konstitutiv exprimiert angenommen und sollte daher in allen Zelltypen ungefähr gleich stark exprimiert sein (An *et al.* 1996, McDowell *et al.* 1996). Zunächst wurden jeweils 5 Epidermis- und 5 Mesophyllzellinhalte vereinigt und einer RT-PCR unterzogen. Abb. 14 zeigt das Ergebnis: Für die Mesophyllproben konnten deutliche Signale, für die Epidermisproben nur sehr schwache Signale detektiert werden. Wird die Anzahl der Epidermiszellinhalte verdreifacht, so erhält man ähnliche Signalstärken für dieses konstitutiv exprimierte Gen in beiden Zelltypen. Dies ist eine erste Näherung, in welchem Verhältnis Epidermis- und Mesophyllzellproben einzusetzen sind, um etwa vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.



3.1.4.3 Genexpressionsvergleich zwischen Epidermis und Mesophyll



Die Vorversuche zeigten, daß es möglich ist, amplifizierte Nukleinsäuren aus vereinigten Gewebe-spezifischen Zellproben gegen Arrayfilter zu hybridisieren. Diese Technik sollte nun angewendet werden, um Unterschiede im Expressionsmuster zwischen adaxialer Epidermis und Mesophyll von *A. thaliana*-Rosettenblättern zu identifizieren. Hierzu wurden jeweils ca. 25-50 Epidermis- bzw. 15-25 Mesophyllzellproben vereinigt. Nach Amplifikation mit der Primerkombination AP2/VN konnten Produkte nach

Gelelektrophorese bzw. *Blot* nachgewiesen werden. Diese repräsentieren etwa 11 % der mRNA-Population der Ausgangszellen (Bauer *et al.* 1993). Die Produkte wurden radioaktiv markiert, wobei Einbauraten von bis zu 90 % der eingesetzten Gesamtaktivität erzielt werden konnten. Die so hergestellten Sonden wurden gegen Filter hybridisiert (Abb. 15).

Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu überprüfen, wurden diese beiden Hybridisierungen insgesamt dreimal mit unabhängigen Proben durchgeführt. Dazu sind von drei verschiedenen Pflanzen an drei verschiedenen Tagen Proben genommen und amplifiziert worden. Für die Hybridisierungen wurden insgesamt vier Filter aus zwei verschiedenen Chargen benutzt, die zwischen den einzelnen Durchführungen permutiert wurden. Dadurch sollten Filter-spezifische Unterschiede ausgeschlossen werden.

Zur Auswertung der aus der Datenbank zurückerhaltenen Daten war es notwendig, einige Schwellenwerte einzuführen. Diese werden im folgenden kurz besprochen:

- 1.) Alle Signalintensitäten, die kleiner als der zweifache lokale Hintergrund waren, wurden näherungsweise durch den Wert 0,1 ersetzt. Alternativen hierzu wären das Löschen dieser Werte, was jedoch zu einem Verlust an Daten führen würde, oder das Ersetzen eines solchen Wertes durch den Durchschnitt der beiden verbleibenden Werte. Von beiden Möglichkeiten wurde kein Gebrauch gemacht
- 2.) Von den normalisierten Signalstärken eines ESTs wurde der Quotient aus $\text{Aktivität}_{\text{Epidermis}}/\text{Aktivität}_{\text{Mesophyll}}$ berechnet. Dies führt zu einem gut überschaubaren Schema, welches zusätzlich große Gesamtsignalunterschiede zwischen verschiedenen Hybridisierungen normalisiert.
- 3.) Alle Quotienten, die genau 1 ergaben, wurden gelöscht, da hier in beiden Zuständen kein Signal über dem doppelten lokalen Hintergrund erzielt werden konnte (beide Werte 0,1).
- 4.) Nur solche ESTs wurden weiter betrachtet, die in mindestens zwei von drei Durchführungen Quotienten ergaben, die sich um nicht mehr als das vierfache ihres Wertes unterschieden.
- 5.) Ein fünffacher Unterschied in der Signalstärke eines ESTs in zwei Zuständen deutet auf unterschiedliche Expression hin. ESTs, die in mindestens zwei von drei Durchführungen unter den genannten Voraussetzungen Quotienten aufwiesen, die unterhalb von 0,2 lagen, wurden als präferentiell Mesophyll-exprimiert angesehen. Dieser Schwellenwert wurde eingeführt (ebenso wie Bedingung 6), um differentielle Genexpression in Zahlen ausdrücken zu können.
- 6.) Umgekehrt wurden ESTs mit Quotienten größer 5 in mindestens zwei von drei Durchführungen als präferentiell Epidermis-exprimiert angesehen (vgl. Bedingung 5).

In den verschiedenen Durchführungen konnten circa 2000 ESTs nach den Bedingungen 1-3 angesprochen werden. Als Schnittmenge aus den drei Durchführungen ergab sich nach Bedingung 4 eine Anzahl von 680 ESTs.

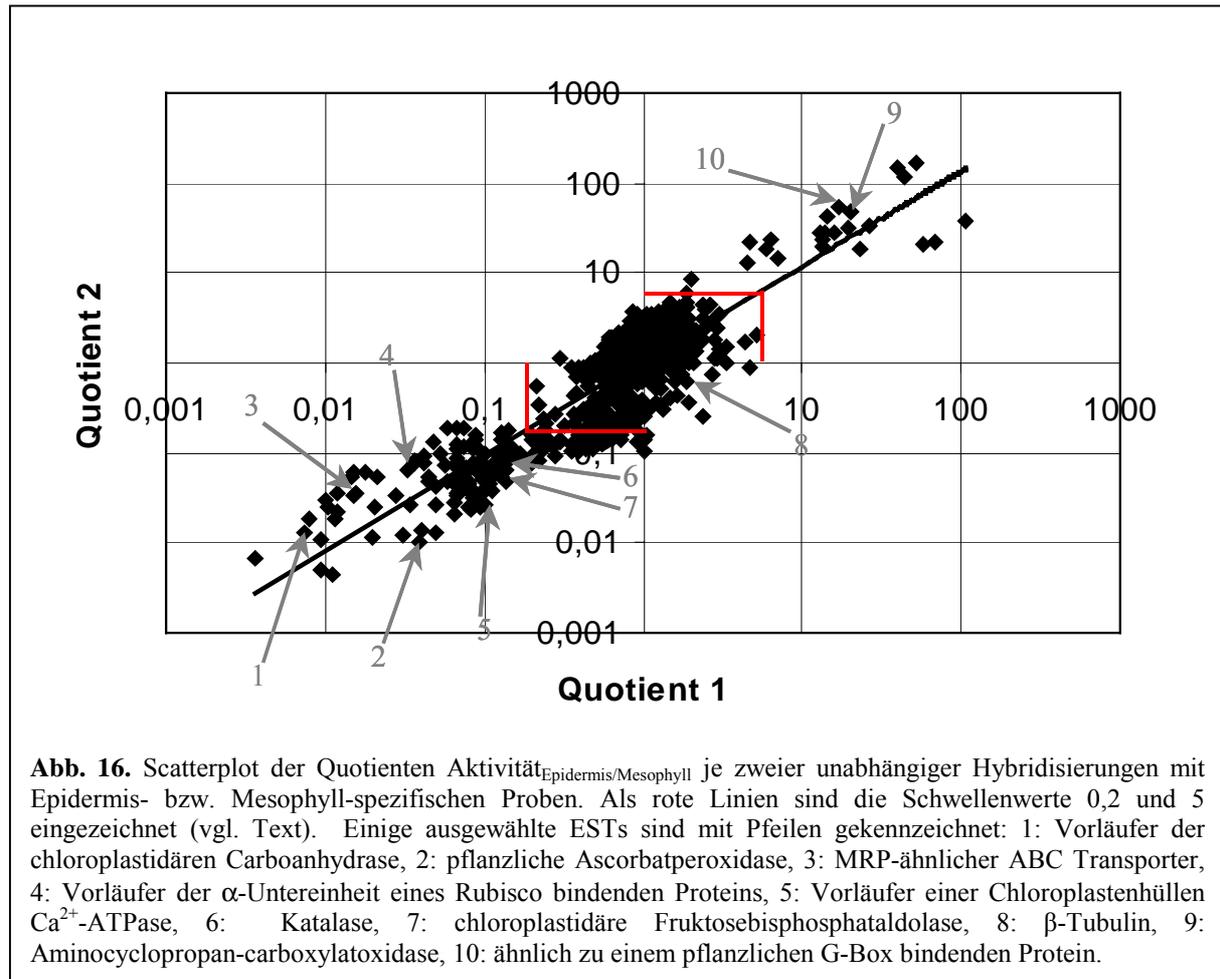


Abb. 16 zeigt einen *Scatterplot*, indem die Quotienten zweier unabhängiger Hybridisierungspaare aufgetragen sind. Die Steigung der Ausgleichsgeraden war nahe 1. Das Bestimmtheitsmaß lag bei 0,7634. Auffallend war besonders die Wertewolke um den Nullpunkt herum. Hier lagen die meisten Werte. Die entsprechenden Gene sind nach Bedingung 5 und 6 annähernd als gleich stark exprimiert in beiden Geweben anzusehen. Jeweils an den Enden der Gerade liegen die Extremwerte. Die hohen spiegeln die präferentiell Epidermis-exprimierten Gene wieder, die niedrigen die präferentiell Mesophyll-exprimierten. Trotz des relativ niedrigen Bestimmtheitsmaßes ist eine lineare Abhängigkeit der Wertepaare voneinander sichtbar, was sich in der Steigung $m \sim 1$ der Ausgleichsgeraden widerspiegelt. Ursache der relativ hohen Varianz ist vermutlich die PCR, die die Vorlagen nicht exakt quantitativ vermehrt. Dadurch können kleinere Unterschiede auch bei gleich exprimierten Genen entstehen, weshalb die Schwellenwerte mit 0,2 beziehungsweise 5 höher angelegt als in Experimenten ohne Amplifikation (vgl. Kap. 3.1.4.1). Von den 680 in Abb. 16 dargestellten Werten waren 560 nicht unterschiedlich exprimiert und lagen in der Wolke um den Nullpunkt herum. 98 ESTs allerdings hatten Quotienten kleiner als 0,2 und 23 ESTs lagen oberhalb von 5 (vgl. Anhang 2). 121 oder 17,6 % der hier betrachteten ESTs können als differentiell exprimiert angesehen werden. Diese 121 ESTs gehören unterschiedlichen funktionellen Gruppen an (Tab. 4). Insgesamt konnten 57 ESTs nach Datenbankvergleichen keine Funktionen zugeordnet werden. Zusammenfassend lassen sich 11 präferentiell Epidermis-

Tab. 4. Anzahl der ESTs, die in der Epidermis und im Mesophyll unterschiedliche Aktivitäten zeigen. Sie sind nach funktionellen Kategorien aufgeschlüsselt.

Funktionelle Kategorie	Spezifische Funktion	Unbekannt	Gesamt	Spezifische Funktion	Unbekannt	Gesamt
	Epidermis			Mesophyll		
	19	4	23	45	53	98
Primärer Metabolismus	1			1		
Membranproteine/ Transporter	1			3		
Proteinmetabolismus	4			/		
Regulation/Translation	5			9		
Primäre Biosynthese	/			6		
Photosynthese	/			6		
DNA-Synthese/ Chromosomenstruktur	/			/		
Redoxstatus	/			/		
Sekundärer Metabolismus	2			2		
Hormone/Signaltrans- duktion	1			/		
Streß	4			8		
Zellwand	/			2		
Detoxifikation	1			3		
Weitere	/			5		

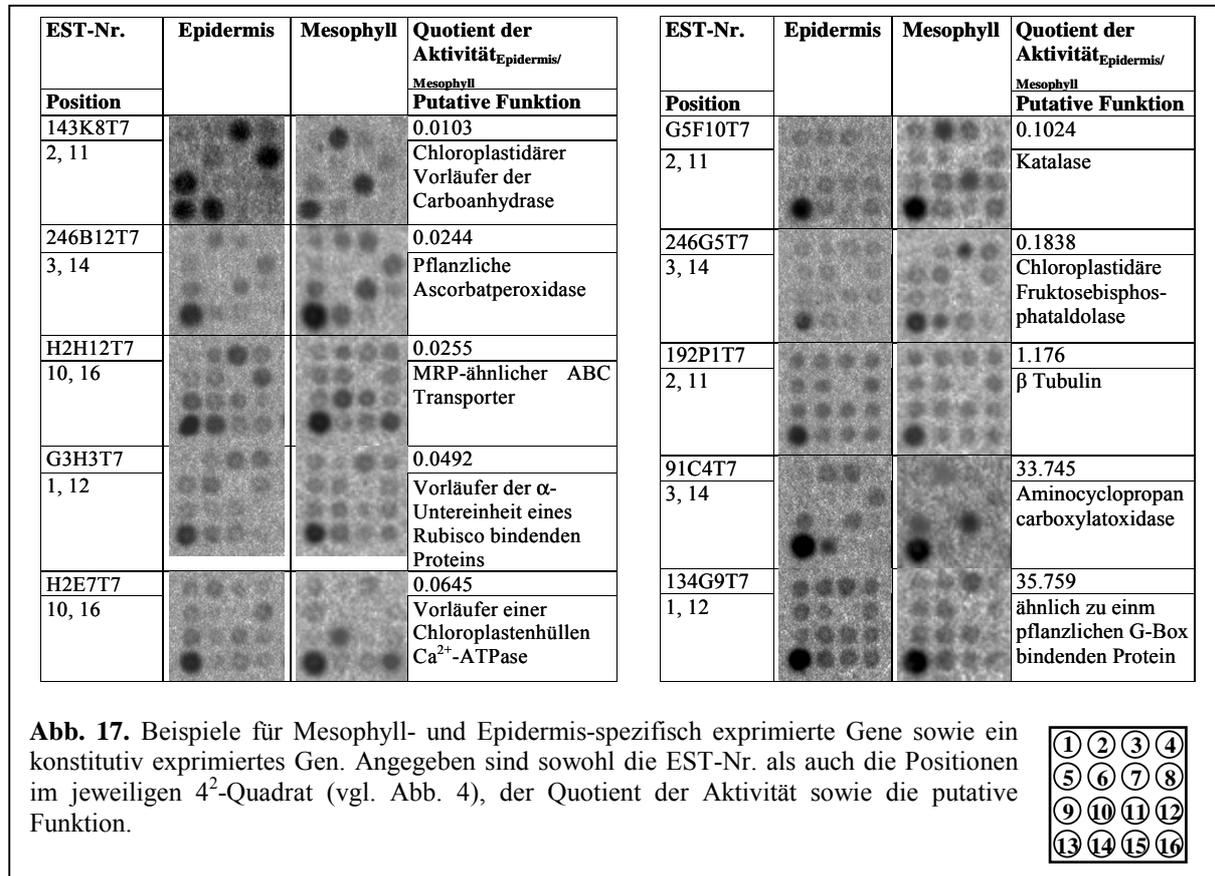
exprimierte ESTs dem Primärstoffwechsel, 8 dem sekundären Stoffwechsel zuordnen. Bei den vermutlich Mesophyll-spezifischen ESTs hingegen sind 25 dem Primär- und 15 dem Sekundärstoffwechsel zuzuordnen. Nicht dem Stoffwechsel können 5 ESTs zugeordnet werden, hierunter befinden sich beispielsweise ESTs mit Funktion wie *translationally controlled tumor protein homolog*, ein Glycin-reiches Protein oder ECA Protein 3.

Unter den scheinbar Epidermis-spezifischen ESTs befinden sich kein Gene, die schon durch Literaturdaten als vorwiegend Epidermis-exprimiert beschrieben sind (vgl. Anhang 2). Interessanterweise finden sich hier zwei ESTs, die zu Regulationsproteinen homolog sind (G-Box bindendes Protein und MAR Operator Repressor).

Anders hingegen verhält es sich mit den präferentiell Mesophyll-exprimierten ESTs (vgl. Anhang 2): Für einige ist Literatur verfügbar, die die Gewebe-spezifische Aktivität des Gens belegt. Hierbei handelt es sich um Gene, die in der Photosynthese eine Rolle spielen, wie z.B. eine Carboanhydrase (Jacobson *et al.* 1975), eine Rubisco-bindende Proteinuntereinheit (Martel *et al.* 1990) und eine chloroplastidäre Fruktosebisphosphataldolase 2 (Tsutsumi *et al.* 1994). Es finden sich aber auch eine Reihe bisher nicht als Mesophyll-spezifisch nachgewiesene Gene wie Monodehydroascorbatreduktase und L-Ascorbatperoxidase.

Für die Gruppe der durch Literaturdaten belegten, konstitutiv exprimierten Gene ist in Abb. 16 β -Tubulin eingezeichnet (vgl. Anhang 2). Weitere bekannte, gleich stark exprimierte Gene wie beispielsweise Actin 2 (An *et al.* 1996, McDowell *et al.* 1996), Elongationsfaktor 1 α (Pokalsky *et al.* 1989) oder Cyclophilin (Karrer *et al.* 1995) sind nicht unter den 680 ESTs, die hier untersucht

werden konnten. Die Ursache dafür ist, daß diese Gene nicht mit dem vorhanden Primerpaar AP2/VN in der PCR amplifiziert wurden. Deshalb ist keine Aussage über ihr Expressionsverhalten möglich. Abb. 17 stellt einige der gefundenen Gene nochmals dar (vgl. Abb. 16). Hierbei werden die auf den Filtern erhaltenen Hybridisierungssignale beider Gewebe gegenübergestellt.



3.1.4.4 Genexpressionsvergleich zwischen Epidermis und Mesophyll bei Tag und Nacht

In einem weiteren Versuch wurden Epidermis und Mesophyll zusätzlich auch am Ende der Dunkelperiode beprobt und weitere *Arbitrary*-Primer getestet, um einen größeren Teil des Transkriptoms abzudecken. Hierzu wurden pro Gewebe/Zeitpunkt für die PCR sechs verschiedene *Arbitrary*-Primer (AP2 bis AP24) in Kombination jeweils mit dem Oligo (dT)-Primer VN verwendet. Mit jedem Primer wurden zwei unabhängige PCR-Reaktionen durchgeführt. Von allen zwölf PCR-Reaktionen pro Gewebe/Zeitpunkt wurden Aliquots gelelektrophoretisch getestet, um den Erfolg der PCR zu kontrollieren. Beim Vereinigen der PCR-Produkte sollten so große Schwankungen in der Ausbeute mit gleichen Primern in unterschiedlichen Ansätzen ausgeglichen werden.

Als Vorlagen für die RT-PCR wurden je ca. 40 Zellen der adaxialen Epidermis bzw. ca. 15 Mesophyllzellen am Tag (1-3 Stunden vor Ende der Lichtperiode) und bei Nacht (0-1 Stunde vor Beginn der Lichtperiode) gesammelt. Aufgrund der schwierigen und zeitaufwendigen

Probennahme konnte dieser Versuch nur einmal durchgeführt werden. Bei der Auswertung wurden nur solche ESTs berücksichtigt, deren Aktivitäten mindestens zweimal höher waren als der lokale Hintergrund. Zum besseren Überblick sind in den Tab. 5-8 die ESTs je nach ihrer Homologie in verschiedene funktionelle Gruppen sortiert.

Vergleich Epidermis-Mesophyll am Tag (Tab. 5):

62 ESTs waren präferentiell in der Epidermis und 200 präferentiell im Mesophyll exprimiert (Tab. 5, vgl. Anhang 3). Gegenüber dem ersten Epidermis-Mesophyll-Vergleich (vgl. Kap. 3.1.4.3) konnten mit den benutzten sechs Primerpaaren mehr ESTs (~12.000 gegenüber ~2000 ESTs) angesprochen werden. Im Mesophyll konnten Homologien zu 145 verschiedenen Genen, in der Epidermis zu 30 Genen gefunden werden (Tab. 5). Die Expressionen der in Tab. 4 dargestellten ESTs konnten in diesem Versuch bis auf wenige Ausnahmen (chloroplastidäre Fruktosebisphosphataldolase 2, Phaseolin G-Box-bindendes Protein) tendenziell wiedergefunden werden.

Bei den beiden ESTs, die zu Photosyntheseegenen homolog sind und bei Tage in der Epidermis aktiv waren, handelt es sich wahrscheinlich um Falschpositive. Während in der Epidermis ~50 % der ESTs keine Funktion zuzuordnen war, lag dieser Anteil im Mesophyll nur bei ~25 %, obgleich hier die Anzahl der vermeintlich spezifisch exprimierten ESTs mehr als dreimal so hoch war. Insbesondere in den Kategorien Photosynthese, Regulation/Translation, Membranproteine/Transporter und primäre Biosynthese sowie Streß und Detoxifikation fanden sich im Mesophyll

Tab. 5. Anzahl der ESTs, die bei Tag unterschiedliche Aktivitäten in Epidermis und Mesophyll zeigen. Sie sind nach funktionellen Kategorien aufgeschlüsselt.

*83 EST sind homolog zu Rubisco-Genen

Funktionelle Kategorie	Spezifische Funktion	Unbekannt	Gesamt	Spezifische Funktion	Unbekannt	Gesamt
	Epidermis Tag			Mesophyll Tag		
	30	32	62	145	55	200
Primärer Metabolismus	2			3		
Membranproteine/ Transporter	5			9		
Proteinmetabolismus	2			3		
Regulation/Translation	4			9		
Primäre Biosynthese	/			3		
Photosynthese	2			91*		
DNA-Synthese/ Chromosomenstruktur	/			4		
Redoxstatus	1			3		
Sekundärer Metabolismus	/			3		
Hormone/Signaltransduktion	1			1		
Streß	1			4		
Zellwand	3			1		
Detoxifikation	2			4		
Weitere	7			7		

mehr ESTs. Die drei letzten Kategorien könnten mit der verstärkten Photosyntheseaktivität im Mesophyll zusammenhängen. Insbesondere ergaben ESTs Mesophyll-spezifische Signale, die zu weiteren Photosyntheseenen wie z.B. dem des Chlorophyll-bindenden Proteins, des Protein des Photosystem II Reaktionszentrums, des Sauerstoff hervorbringenden Komplexes oder Untereinheiten von Rubisco homolog waren.

In der Epidermis fanden sich lediglich in der Zellwandkategorie mehr ESTs. Hier zeigte ein EST Homologie zum Gen Wax9D aus Brokkoli, welches an der Cutinsynthese beteiligt ist (Pyee und Kolattukudy 1995).

Vergleich Epidermis-Mesophyll bei Nacht (Tab. 6):

Tab. 6. Anzahl der ESTs, die bei Nacht unterschiedliche Aktivitäten in Epidermis und Mesophyll zeigen. Sie sind nach funktionellen Kategorien aufgeschlüsselt.
 *19 ESTs sind homolog zu Genen, die für Ubiquitin kodieren.
 ** 6 ESTs haben Homologie zu 2 Rubisco-Genen

Funktionelle Kategorie	Spezifische Funktion	Unbekannt	Gesamt	Spezifische Funktion	Unbekannt	Gesamt
	Epidermis Nacht			Mesophyll Nacht		
	3	3	6	81	80	161
Primärer Metabolismus	/			4		
Membranproteine/ Transporter	/			6		
Proteinmetabolismus	1			25*		
Regulation/Translation	1			5		
Primäre Biosynthese	/			7		
Photosynthese	/			11**		
DNA-Synthese/ Chromosomenstruktur	/			1		
Redoxstatus	/			1		
Sekundärer Metabolismus	1					
Hormone/Signaltransduktion	/			2		
Streß	/			4		
Zellwand	/			2		
Detoxifikation	/			3		
Weitere	/			10		

In Tab. 6 sind die Ergebnisse des Vergleichs Epidermis Mesophyll im Dunkeln dargestellt (vgl. Anhang 4). Deutlich weniger ESTs zeigten Gewebe-spezifische Expression als beim Tagvergleich (Tab. 6, Tab. 5). In nahezu allen Kategorien fanden sich wiederum im Mesophyll mehr ESTs. Dies galt besonders für Gene des Proteinmetabolismus, der Photosynthese und die Gruppe der Weiteren. In der ersten Kategorie fanden sich Homologien zu insgesamt fünf verschiedenen Ubiquitingenen und zu vier Proteasen, in der Photosynthesekategorie sind sechs von elf ESTs homolog zu Rubisco-Genen.

Vergleich Epidermis Nacht-Tag (Tab. 7):

Tab. 7. Anzahl der ESTs, die in der Epidermis bei Nacht und Tag unterschiedliche Aktivitäten zeigen. Sie sind nach funktionellen Kategorien aufgeschlüsselt.

Funktionelle Kategorie	Spezifische Funktion	Unbekannt	Gesamt	Spezifische Funktion	Unbekannt	Gesamt
	Epidermis Nacht			Epidermis Tag		
	9	5	14	24	30	54
Primärer Metabolismus	2			3		
Membranproteine/ Transporter	1			4		
Proteinmetabolismus	/			1		
Regulation/Translation	2			4		
Primäre Biosynthese	/			/		
Photosynthese	1			/		
DNA-Synthese/ Chromosomenstruktur	1			/		
Redoxstatus	/			1		
Sekundärer Metabolismus	/					
Hormone/Signaltransduktion	/			1		
Streß	/			/		
Zellwand	/			3		
Detoxifikation	1			2		
Weitere	1			5		

Die Anzahl der Epidermis-spezifischen ESTs war in den Tagproben fast viermal höher als in den Nachtproben (Tab. 7, vgl. Anhang 5). Dies betraf in besonderer Weise die Gruppe derjenigen ESTs, denen keinerlei Homologien zuzuordnen waren. In den Kategorien Weitere und Zellwand traten zahlenmäßig die größten Unterschiede auf. Die Aktivität des Photosystem I kodierenden Gens in der Nachtprobe stellt wahrscheinlich ein falsch positives Signal dar.

Vergleich Mesophyll Nacht-Tag (Tab. 8):

In Tab. 8 ist der Vergleich der Mesophyllhybridisierungen zu beiden Erntezeitpunkten dargestellt (vgl. Anhang 6). Es kamen mehr ESTs vor, die präferentiell bei Nacht exprimiert wurden. Zudem konnte in den Dunkelproben deutlich mehr ESTs keine Homologie zugeordnet werden. Darüber hinaus traten nachts mehr ESTs in den Kategorien primärer Metabolismus, primäre Biosynthese und Proteinmetabolismus sowie bei den Weiteren auf. In der Gruppe Proteinmetabolismus fanden sich Homologien zu 5 verschiedenen Ubiquitingenen sowie zu vier Proteasen, jedoch zu keinen weiteren Proteinen, die am Ubiquitinsystem beteiligt sind. Auffallend waren zudem die sechs ESTs, die zu Photosynthesegenen homolog sind. Darunter befanden sich zwei, die zu Rubisco-Gene homolog sind. Bei dem Tagexperiment war die Gruppe der Photosynthesegene am stärksten vertreten und überstieg auch die Zahl der Photosynthesegene deutlich, die nachts aktiv waren.

Tab. 8. Anzahl der ESTs, die im Mesophyll bei Nacht und Tag unterschiedliche Aktivitäten zeigen. Sie sind nach funktionellen Kategorien aufgeschlüsselt.

* 20 ESTs sind homolog zu Ubiquitin-Genen, **44 ESTs sind homolog zu Rubisco-Genen

Funktionelle Kategorie	Spezifische Funktion	Unbekannt	Gesamt	Spezifische Funktion	Unbekannt	Gesamt
	Mesophyll Nacht			Mesophyll Tag		
	81	53	134	64	13	77
Primärer Metabolismus	10			2		
Membranproteine/ Transporter	3			1		
Proteinmetabolismus	27*			2		
Regulation/Translation	4			5		
Primäre Biosynthese	7			1		
Photosynthese	6			46**		
DNA-Synthese/ Chromosomenstruktur	2			1		
Redoxstatus	1					
Sekundärer Metabolismus				1		
Hormone/Signaltransduktion	3			1		
Streß	1			/		
Zellwand	1			/		
Detoxifikation	5			3		
Weitere	9			1		

3.1.4.5 Genexpressionsvergleich zwischen Gesamtblatt und Epidermis/ Mesophyll bei Nacht/Tag

Der Vergleich zwischen den Gesamtblatt und Gewebe-spezifischen Hybridisierungen am Tag und bei Nacht zeigte, daß die Photosynthesegene, die in den Gesamtblatt hybridisierungen tagsüber gefunden wurden (vgl. Anhang 1), in den hochauflösenden Gewebe-spezifischen Experimenten auf das Mesophyll beschränkt waren (Rubisco, Chlorophyll a/b bindendes Protein, Sauerstoff hervorbringender Komplex, vgl. Anhang 3). In den Gesamtblattexperimenten bei Nacht waren die meisten Photosynthesegene ausgeschaltet (Ausnahme: Rubisco, vgl. Anhang 1). Dieses Resultat wurde teilweise auch in den Nacht-Mesophyllproben gefunden (vgl. Anhang 6). Photosynthesegene sind scheinbar auf das Mesophyll beschränkt und ihr Expressionsmuster kann auch im Gesamtblattextrakt verfolgt werden.

Phenylalaninammoniumlyase und Transcinnamat-4-Hydroxylase wurden in Gesamtblattexperimenten als Tag-induziert gefunden (vgl. Anhang 1). In den Gewebe-spezifischen Hybridisierungen hingegen traten für beide Gene sowohl nachts als auch tagsüber in beiden Gewebearten keine unterschiedlichen Expressionsmuster auf (vgl. Anhang 3, 4, 5 und 6). Da die Genaktivitäten, die nach den Hybridisierungen auf den Filtern detektiert wurden, sehr niedrige Werte aufwiesen, ist es wahrscheinlich, daß beide Transkripte von den Primern nicht amplifiziert wurden.

Die bei Nacht stärkere Expression des Transkriptionsfaktors L2 in Gesamtblatt hybridisierungen (vgl. Anhang 1) konnte ebenfalls nicht in den hochauflösenden Hybridisierungen der beiden

untersuchten Gewebe bestätigt werden (vgl. Anhang 3, 4, 5 und 6). Die Aktivität des ESTs lag in beiden Geweben zu beiden Zeitpunkten zwischen 8 und 12. Die Stärke der Aktivität läßt auf ein „echtes“ Signal schließen, da bei Nichtamplifizierung des Transkripts die Werte deutlich geringer wären.

3.1.5 Methoden zum Überprüfen der Arraydaten

Um die durch die Hybridisierungen gefundenen Daten zu verifizieren, sollte beispielhaft die Aktivität einiger ausgewählter Gene in den entsprechenden Geweben über eine zweite, unabhängige Methode nachgewiesen werden. Idealerweise wäre die Methode der Wahl eine nicht PCR-basierende. Im folgenden sind nun Experimente beschrieben, eine solche zweite Methode zu etablieren und anzuwenden.

3.1.5.1 RT-PCR mit Gewebeproben

Im Rahmen dieser Arbeit stand für vier Wochen das Mikromeißelsystem der Firma Eppendorf zur Verfügung (Abb. 3A). In Anlehnung an LCM, bei der aus fixierten Gewebeschnitten mittels eines Laserstrahls Bereiche herausgeschnitten werden, bedient sich dieses System zum Schneiden eines vibrierenden Mikromeißels. Somit stellt dieses Verfahren ein alternatives Probennahmesystem zu den Glaskapillaren dar.

Rosettenblätter von *A. thaliana* wurden paraffinisiert und 50 µm dicke Mikrotomschnitte hergestellt. Die gewünschten Gewebebereiche konnten unter Xylol oder nach Entparaffinisierung naß, nicht-wäßrig unter Alkohol oder auch trocken geschnitten und aufgenommen werden (Abb. 3B-D).

Nach Entfernen der Epidermen diente das Mesophyll angereicherte Gewebe als Vorlage für RT-PCR-Reaktionen, mit denen überprüft werden sollte, ob in mikrodisektiertem Gewebe die Nukleinsäuren trotz Einbetten, Schneiden und Dissektieren intakt bleiben. Nach Überführen des Gewebes in ein Reaktionsgefäß wurde das Reaktionsgemisch für den reversen Transkriptionsschritt in zwei Teilen zugegeben: Zuerst 5,5 µl H₂O_{DEPC}. In diesem wurden die Gewebeteile 30 s gevortext und an zentrifugiert. Nach Zugabe der restlichen 4,5 µl des Reaktionsgemisches wurde eine Standard-RT-PCR durchgeführt. Hierzu wurden Primer gegen die kleine Untereinheit von Rubisco verwendet. Wie in Abb. 18 gezeigt, konnten in allen Proben Produkte nachgewiesen werden. Es ist deutlich zu erkennen, daß die Primer ein Intron innerhalb der Rubiscosequenz überspannen: Die obere Bande hat eine Größe von 808 bp und ist

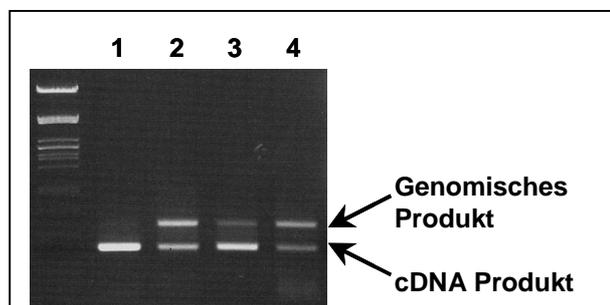


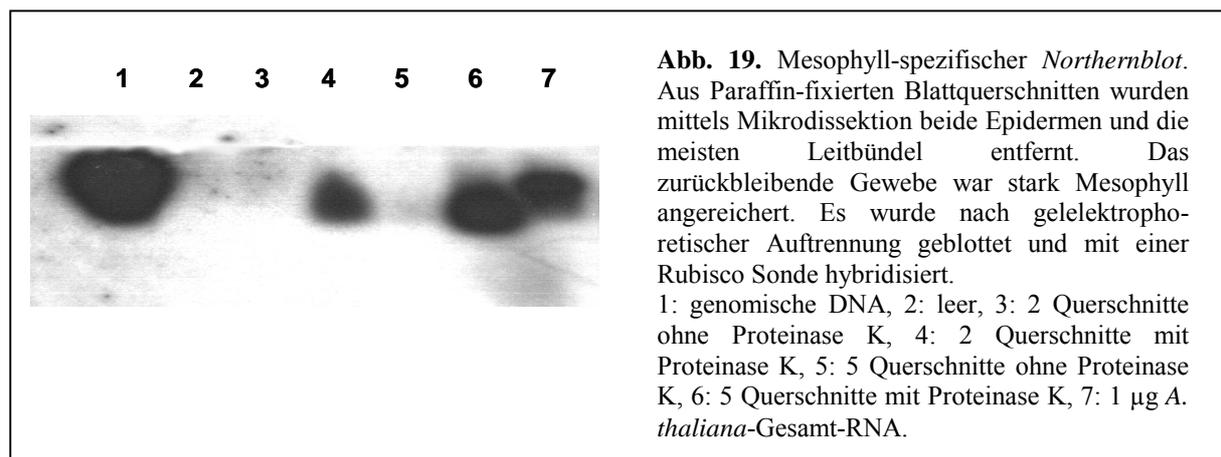
Abb. 18. RT-PCR mit mikrodisektiertem Mesophyllgewebe. Die PCR wurde mit Rubisco-primern durchgeführt. In den Gewebeproben (2-4) sind 2 Produkte verschiedenen Ursprungs detektierbar.

1: Positivkontrolle (2 ng *A. thaliana* Gesamt-RNA, 2 und 3: je 3 Querschnitte, 4: 1/2 Querschnitt.

genomischen Ursprungs, während die untere mit 382 bp nur etwa halb so groß ist und ursprünglich auf mRNA zurückzuführen ist.

3.1.5.2 Gewebenorthernblot

Mesophyllproben aus 35 µm Rosettenblattschnitten von *A. thaliana* wurden wie in Kap. 3.1.5.1 gewonnen, in ein Reaktionsgefäß überführt und entweder mit H₂O_{DEPC} oder Proteinase K inkubiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Überführen auf eine Nylonmembran wurden die Proben mit einer radioaktiv markierten Rubisco (kleine Untereinheit)-Sonde hybridisiert. Nach Autoradiographie konnten Signale in den Proteinase K verdauten Proben gefunden werden, nicht jedoch in den unverdauten Proben (Abb. 19). Es stellte sich bei Wiederholungen heraus, daß eine recht große Menge mikrodisektiertes Gewebe benötigt wird. Die erhaltenen Ergebnisse demonstrieren anschaulich (Abb. 19), daß Mikrodissektion eine elegante Methode zum Verifizieren der Arraydaten ist. In den vier Wochen, in denen der Mikrodisektor zur Verfügung stand, konnten nur wenige Experimente durchgeführt werden, weshalb weitere Methoden getestet wurden (vgl. Kap. 3.1.5.3, 3.1.5.4).



3.1.5.3 Semiquantitative Polymerase Kettenreaktion

Da nur wenige *Northernblot*hybridisierungen möglich waren (vgl. Kap. 3.1.5.1), wurde auf PCR-basierende Methoden zum Nachweis von Transkripten zurückgegriffen. Da Zellproben unterschiedlich viel zytoplasmatische Anteile enthalten und eine Quantifizierung der mRNA nicht möglich ist, wurde ein konstitutiv exprimiertes Gen zur Normalisierung benötigt. Zu diesem Zweck wurden Proben nach der reversen Transkription geteilt. Eine Hälfte wurde mit Primern gegen das konstitutive Gen, die andere Hälfte mit Primern gegen das zu untersuchende Gen behandelt. Um eine Sättigung der PCR zu umgehen, wurde jeweils nach 25, 30 und 35 Zyklen ein Aliquot gelelektrophoretisch auf Produktbildung untersucht.

Es wurden von *A. thaliana*-Rosettenblättern gegen Ende der Lichtperiode je 15 Epidermis- und 5 Mesophyllzellen beprobt. Als konstitutiv exprimiertes Gen wurde der Elongationsfaktor 1 α verwendet (Pokalsky *et al.* 1989), als zu untersuchendes Gen die kleine Untereinheit von Rubisco. Abb. 20 zeigt die PCR-Produkte nach Gelelektrophorese: Während in beiden Zellproben die Amplifizierung der Elongationsfaktor-Transkripte gelang und vergleichbare Produktmengen nach 35 Zyklen vorhanden waren, konnten Rubisco-Produkte nach 35 Zyklen nur in den Mesophyllproben nachgewiesen werden.

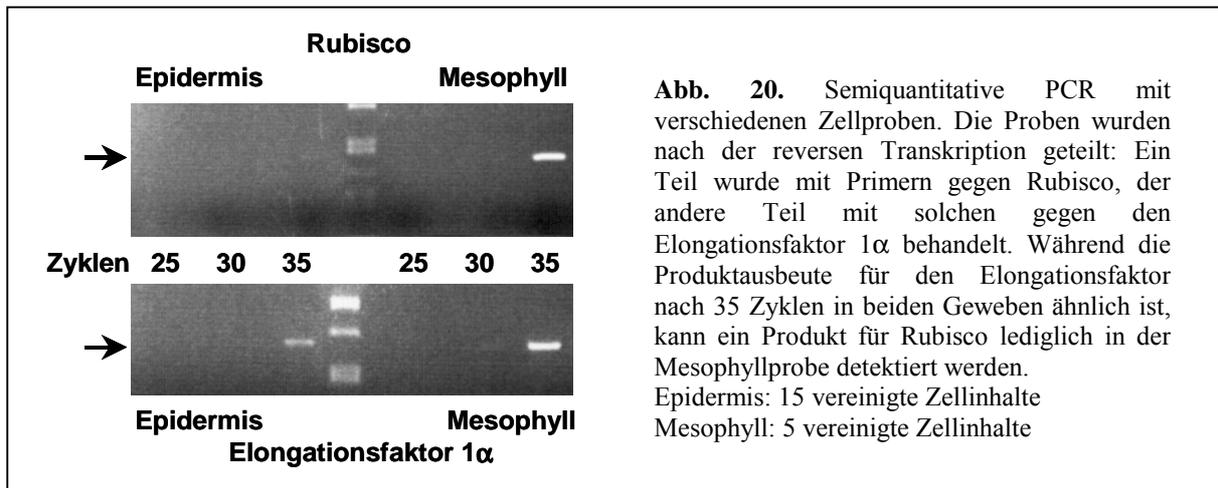


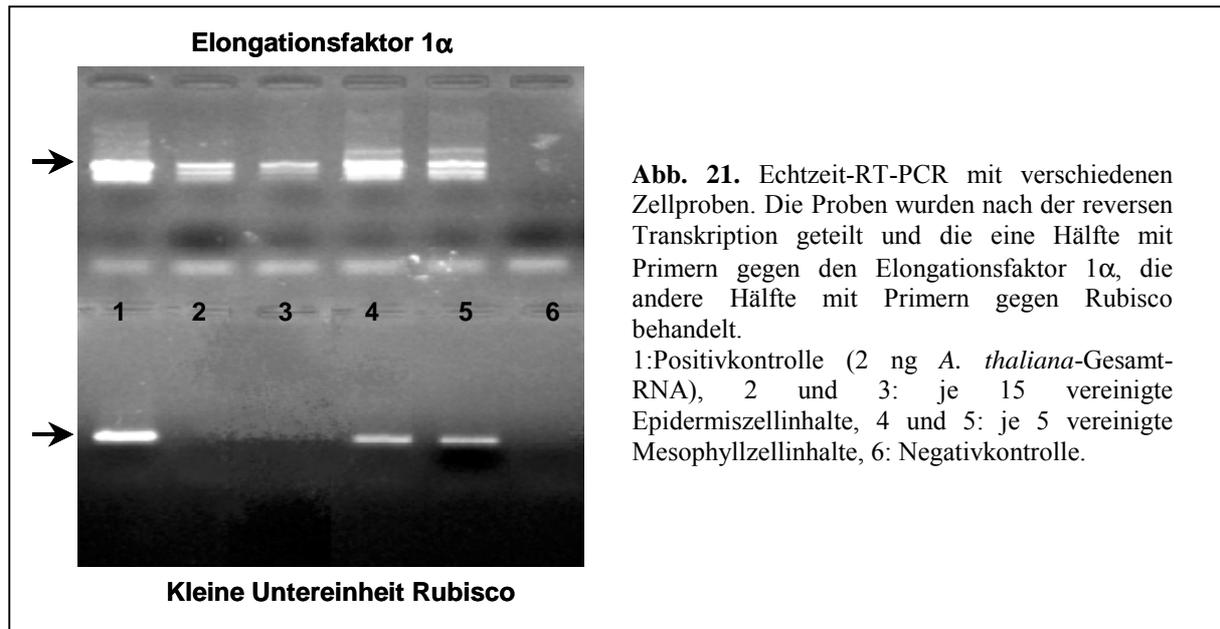
Abb. 20. Semiquantitative PCR mit verschiedenen Zellproben. Die Proben wurden nach der reversen Transkription geteilt: Ein Teil wurde mit Primern gegen Rubisco, der andere Teil mit solchen gegen den Elongationsfaktor 1 α behandelt. Während die Produktausbeute für den Elongationsfaktor nach 35 Zyklen in beiden Geweben ähnlich ist, kann ein Produkt für Rubisco lediglich in der Mesophyllprobe detektiert werden. Epidermis: 15 vereinigte Zellinhalte
Mesophyll: 5 vereinigte Zellinhalte

In einer weiteren semiquantitativen RT-PCR wurden Mesophyllproben, die am Ende der Nacht und am Ende des Tages genommen wurden, analog mit Actin 2- und Rubisco-Primern amplifiziert. Für das konstitutive Actin 2-Gen wurden nach 40 Zyklen in den Nacht- und Tagproben vergleichbare Produktmengen gefunden. In beiden Proben konnten Rubisco-Produkte nachgewiesen werden, wobei in den Tagproben mehr Produkt zu sehen war. Konnten in den Nachtproben nach 35 Zyklen die ersten Produkte detektiert werden, so war dies für die Tagproben teilweise schon nach 30 Zyklen möglich (Daten nicht abgebildet).

3.1.5.4 Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion

Diese durch Fluoreszenznachweis sehr sensitive Methode erlaubt zusätzlich eine relativ exakte Quantifizierung der gebildeten Produktmenge in den jeweiligen Proben. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR GreenTM fluoresziert nur nach Bindung an doppelsträngige DNA. Die Zunahme der Fluoreszenz wird nach jedem Zyklus gemessen. Die Anzahl der Zyklen, die benötigt wird, um eine definierte Signalstärke zu erreichen (C_t -Wert), ist ein Maß für die Menge an gebildetem Produkt (und ließe letztlich sogar eine Aussage über die Menge Ausgangsmaterial in der Probe zu).

Es ist wichtig, Koamplifizierung durch genomische Verunreinigung zu unterbinden. Dies würde zu falschen Ergebnissen und Fehlinterpretationen führen. Daher wurden die Primer so ausgewählt, daß einer der beiden Primer über einer Exon/Intron-Grenze lag. Die Proben wurden nach der reversen Transkription geteilt. Für die PCR der einen Hälfte wurden Rubisco-Primer (RCA^{RT}) verwendet, für die zweite Hälfte wurden Primer gegen den Elongationsfaktor 1 α verwendet



(EFA^{RT}). Dieses Gen gilt als konstitutiv exprimiert (Pokalsky *et al.* 1989). Da Zellproben unterschiedlich viel mRNA enthalten, sollten die erhaltenen Produktmengen auf dieses Gen normalisiert werden.

Als Vorlagen für die RT-PCR dienten je 5 Mesophyllzellen bzw. 15 Epidermiszellen. Alle Proben wurden gegen Ende der Lichtperiode von *A. thaliana*-Rosettenblättern genommen. Wie in Abb. 21 dargestellt, konnten bis auf die Negativkontrolle in allen Proben eine Bande für den Elongationsfaktor nachgewiesen werden. Daraus folgt, daß in allen diesen Proben cDNA enthalten war. In den zweiten, mit Rubisco-Primern behandelten Hälften der Positivkontrolle (Gesamt-RNA) und der beiden Mesophyllproben konnte jeweils eine eindeutige Bande für Rubisco erhalten werden. Jedoch konnte weder eine Bande in den beiden Epidermiszellproben noch in der Negativkontrolle detektiert werden. Tab. 9 gibt die gemessenen c_t -Werte in den einzelnen Gewebeproben wieder.

Tab. 9. Ergebnisse der Gewebe-spezifischen Echtzeit-PCR. Angegeben sind die c_t -Werte für die jeweiligen Gewebeproben aus Abb. 21. Sie geben an, nach wieviel Zyklen das Fluoreszenzsignal der PCR-Produkte einen vorgegebenen Schwellenwert überschreitet. Weitere Erläuterungen vgl. Text.

		EFA ^{RT} -Primer	RCA ^{RT} -Primer
Epidermis	Probe 1	36,3	/
	Probe 2	37,6	/
Mesophyll	Probe 1	33,27	35,95
	Probe 2	33,43	32,78

Aus folgenden zwei Gleichungen kann die relative Transkriptmenge in den Proben bestimmt werden:

$$\Delta C_t(\text{Gewebe 1}) = C_t(\text{Rubisco}) - C_t(\text{Elongationsfaktor})$$

$$\Delta \Delta C_t = \Delta C_t(\text{Gewebe 1}) - \Delta C_t(\text{Gewebe 2})$$

Hier macht eine solche Kalkulation jedoch wenig Sinn, da die beiden Epidermisproben den Schwellenwert der Fluoreszenz auch nach 40 Zyklen nicht erreicht hatten. Wie auch die (unempfindlichere) Gelelektrophorese zeigte (Abb. 21), ist in den Epidermisproben keine Rubisco-RNA vorhanden gewesen.

3.1.6 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, daß einzelne Zellinhalte für RT-PCR mit spezifischen Primern zugänglich sind und sowohl stark als auch schwach exprimierte Gene in verschiedenen Gewebeschichten nachweisbar sind. Diese Analyse konnte ebenfalls quantitativ durchgeführt werden, was einen direkten Vergleich der Expressionsstärke eines Gens in unterschiedlichen Geweben ermöglichte. *Northernblot*hybridisierungen mit mikrodisezierten Proben stellen eine Alternative zum PCR-basierenden Nachweis spezifischer Transkripte dar. Vereinigte Zellproben konnten nach einer *Arbitrary-PCR* als Sonden für die Hybridisierung von Arrayfiltern verwendet werden, die mehr als 16.000 ESTs enthielten. Dadurch war es möglich, in einer einzigen Versuchsdurchführung die Expressionsstärke vieler Gene gleichzeitig zu bestimmen.

3.2 Metabolitenuntersuchungen

3.2.1 Konzeption

Neben der Untersuchung des Transkriptoms sollte versucht werden, auch das Metabolom Gewebe-spezifisch zu erfassen. Literaturdaten für andere Pflanzenspezies zeigten bereits, daß verschiedene Zelltypen unterschiedliche Metabolitenkonzentrationen aufweisen (Kartoffel: Kehr *et al.* 1998, Kehr *et al.* 1999, Gerste: Fricke *et al.* 1994a-c, Karley *et al.* 2000).

Im folgenden werden nun Versuche beschrieben, in denen mehrere Methoden auf ihre Eignung hin getestet wurden, Metabolite im weiteren Sinne (inklusive anorganischer Ionen) aus (vereinigten) Einzelzellproben zu bestimmen. Hierbei sollten vor allem Protokolle etabliert werden, die automatisierbar sind und die Analyse von mehreren Substanzen gleichzeitig erlauben.

3.2.2 Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Über Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie können viele Substanzen gleichzeitig in einer Messung detektiert werden. Diese multiparallele Methode ist dabei nicht auf eine Substanzklasse pro Messung festgelegt. Daher ist es möglich, nach Auftrennung in lipophile und lipophobe Phase bis zu 326 Komponenten aus einer Probe zu identifizieren. Hierzu ist pro Phase nur eine Messung notwendig (Fiehn *et al.* 2000).

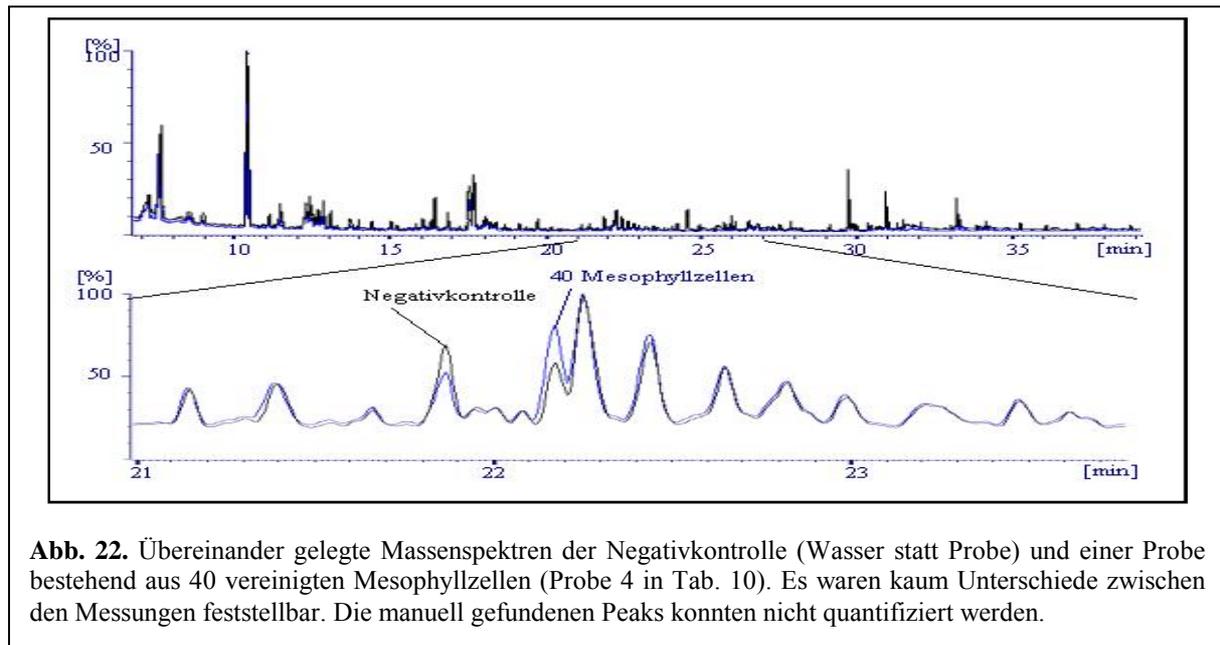


Abb. 22. Übereinander gelegte Massenspektren der Negativkontrolle (Wasser statt Probe) und einer Probe bestehend aus 40 vereinigten Mesophyllzellen (Probe 4 in Tab. 10). Es waren kaum Unterschiede zwischen den Messungen feststellbar. Die manuell gefundenen Peaks konnten nicht quantifiziert werden.

Es wurden von *A. thaliana*-Rosettenblättern verschiedene Proben mit Glaskapillaren genommen (Tab. 10). Auch die Negativkontrolle (Probe 5) und die zugesetzten Aminosäuren (zu Probe 1) wurden mit Glaskapillaren in die Reaktionsgefäße transferiert. Letztere Probe (1) diente als Positivkontrolle. Sowohl das zugesetzte Aspartat als auch das Cystein konnten in den Massenspektren dieser Probe wiedergefunden werden. In allen Proben, einschließlich der beiden Negativkontrollen (5 und 6), konnten Citrat, Fruktose, Glukose und Phosphat gemessen werden. In den beiden Negativkontrollen war darüber hinaus noch Saccharose nachweisbar. Weitere Substanzen konnten nicht detektiert werden. Für alle gefundenen Substanzen waren die Peaks so klein, daß sie nicht über eine automatische Auswertung gefunden wurden. Auch eine manuelle Auswertung war schwierig, da die Peaks kaum vom Hintergrund zu unterscheiden waren (Abb. 22). Daher konnte keine Integration der Peakflächen durchgeführt werden. Eine Quantifizierung

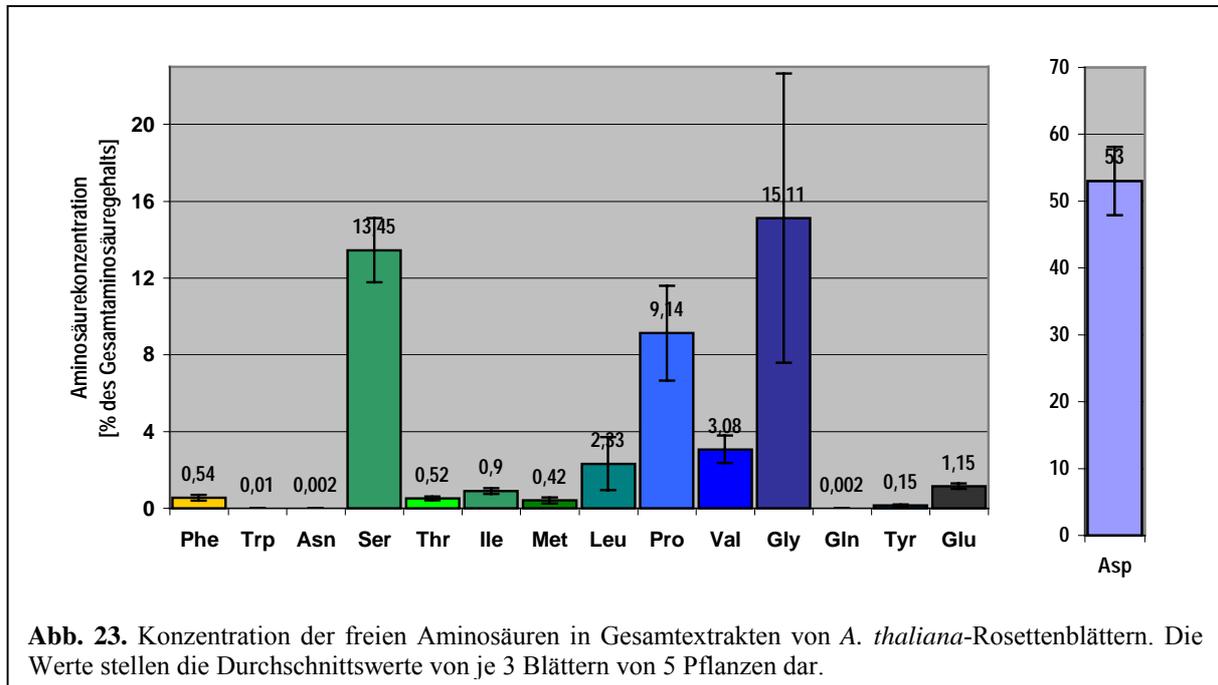
war nicht möglich.

In Gesamtblattextrakten von *A. thaliana*-Rosettenblättern hingegen konnten neben organischen Säuren und Zuckern auch freie Aminosäuren nachgewiesen werden. Die Konzentrationen einiger Aminosäuren wurden quantifiziert und sind in Abb. 23 dargestellt. Sie bilden die Mittelwerte aus Messungen an je 3 Blättern von 5 verschiedenen Pflanzen.

Tab. 10. Übersicht über die Proben, die für GC-MS-Messungen verwendet wurden.

	Anzahl Zellen	Probe
1	20	Zellen Epidermis (adaxial) und Mesophyll gemischt zuzüglich Aspartat und Cystein
2	50	Zellen Epidermis (adaxial) und Mesophyll gemischt
3	50	Epidermiszellen (adaxial)
4	40	Mesophyllzellen
5	/	Wasserkontrolle
6	/	Leeres Reaktionsgefäß

GC-MS ist für größere Probenmengen, wie sie Gesamtblattextrakte darstellen, eine geeignete Methode, um verschiedene Substanzen simultan nachzuweisen. Für Proben, bestehend aus wenigen Zellen, reicht aber die Sensitivität nicht aus.



3.2.3 Kationen

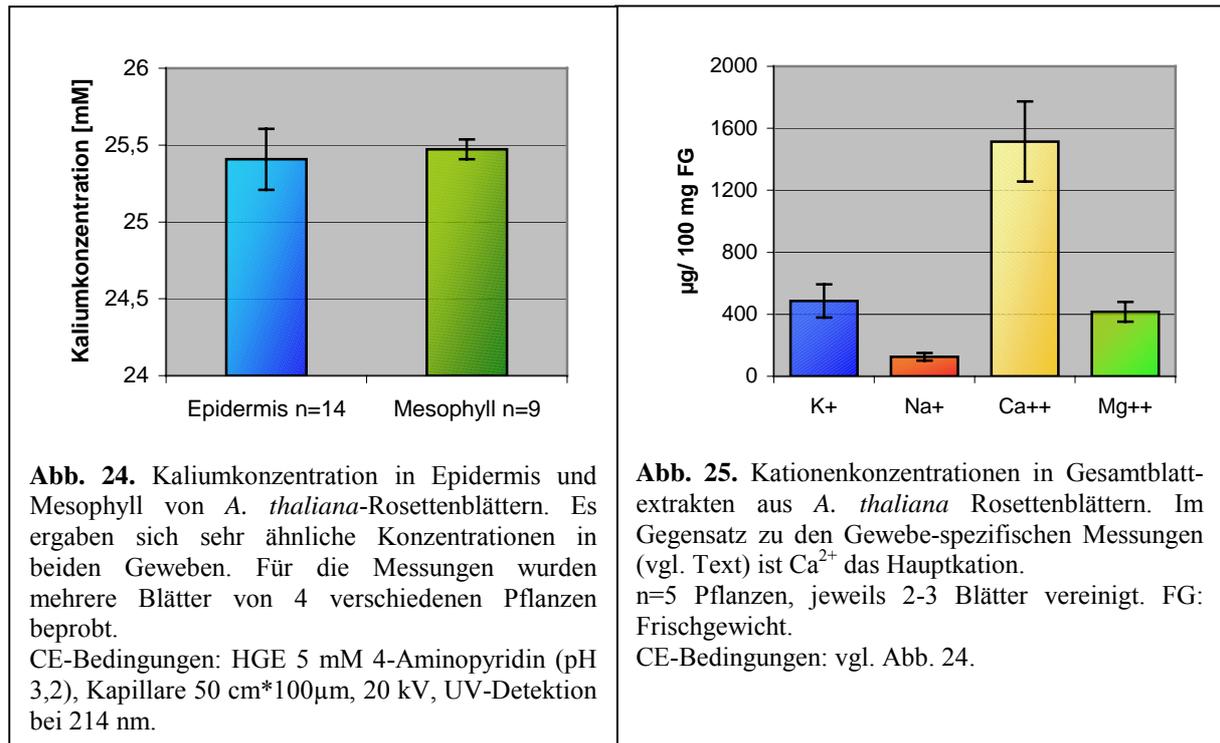
Tab. 11. Angegeben sind die niedrigsten, nachweisbaren Konzentrationen (LODs) für Standardlösungen der vier Kationen K^+ , Na^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} . CE-Bedingungen vgl. Abb. 24.

Kation	LOD [μM]
Na^+	3,26
Mg^{2+}	3,09
K^+	1,92
Ca^{2+}	1,87

Es konnte bereits gezeigt werden, daß Kapillarelektrophorese eine geeignete Methode darstellt, um K^+ zu analysieren (Kehr *et al.* 1999). Um die Kationenkonzentrationen von *A. thaliana*-Rosettenblättern zu bestimmen, wurden mittels Glaskapillaren Epidermis- und Mesophyllproben genommen. Es wurde immer dieselbe Konstriktionskapillare für einen Satz Proben (Epidermis, Mesophyll, Standard und Wasserkontrollen) verwendet (Kehr *et al.* 1999). Dadurch hatten die Proben dieser Kapillare alle das gleiche Volumen. Die Zellproben bestanden hierbei aus mehr als einem Zellinhalt. Nach

Integration der Peakflächen wurden diese in Relation zu Kalibrationskurven gesetzt, um die Konzentrationen zu bestimmen (vgl. Kap. 2.2.6.1). Für beide Gewebe ergab sich kein wesentlicher Unterschied: Im Mesophyll lag die K^+ -Konzentration bei $25,47 \pm 0,06$ mM und in der Epidermis bei $25,41 \pm 0,2$ mM (Abb. 24). Weitere Kationen wie Na^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} konnten in beiden Zelltypen nicht in auswertbaren Mengen detektiert werden. Die LODs für Standardlösungen aller vier Kationen sind in Tab. 11 zusammengefaßt.

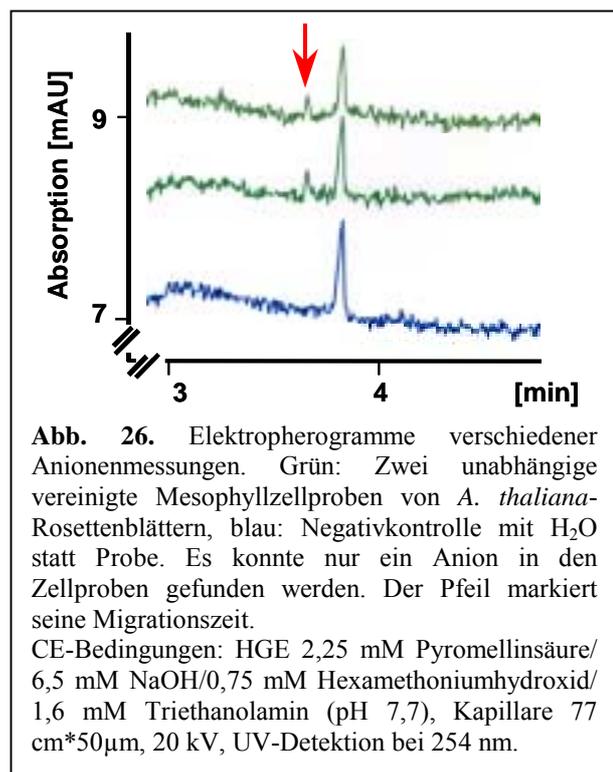
Zusätzlich wurden aus Gesamtextrakten von Rosettenblättern die Konzentrationen dieser vier Kationen bestimmt. Sie sind in Abb. 25 zusammengefaßt. Da diese Messungen nur auf die eingesetzte Blattmasse [Frischgewicht (FG)] bezogen werden konnten, war kein direkter



Vergleich zwischen Gewebeprobe und Gesamtblattextrakt möglich. Betrachtet man jedoch die relativen Verhältnisse, fällt auf, daß das Hauptkation in den veraschten Blättern Ca^{2+} war. K^+ und Mg^{2+} hatten in etwa die gleiche Konzentration, während Na^+ vergleichsweise niedrig konzentriert war. Dies unterschied die Gesamtblattproben deutlich von den beiden Gewebeprobe, in denen K^+ das Hauptkation darstellte.

3.2.4 Anionen

Wie schon von Bazzanella und Kollegen (1998) gezeigt werden konnte, ist CE eine geeignete Methode zum Nachweis von anorganischen Anionen in sehr kleinen Probenmengen. Hier wurde ein nach Hiissa *et al.* (1999) leicht abgewandelter HGE benutzt. Er enthielt u.a. Pyromellinsäure, Hexamethoniumhydroxid und Triethanolamin. Mit diesem HGE können Anionen direkt bei 254 nm nachgewiesen werden. Zum Testen des Systems wurde ein Gemisch aus je 20 mM Acetat, Cl^- , NO_3^- , PO_4^{3-} und SO_4^{2-} auf die Kapillare gegeben und aufgetrennt. Im Elektropherogramm konnten vier Peaks detektiert werden, die in einem Vergleichslauf mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ als Probe nicht vorhanden waren.



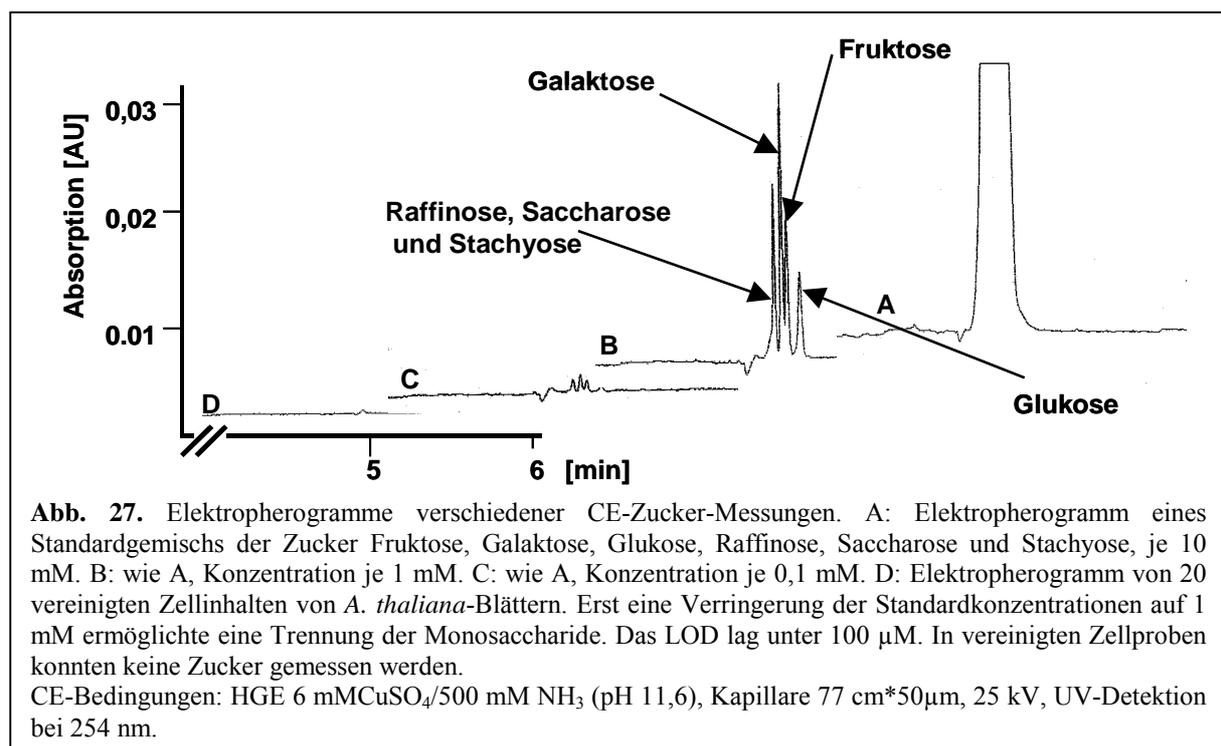
Es wurde zunächst auf eine Identifikation der Peaks durch Einzelläufe bzw. Zugabe jeweils eines Standards zum Gemisch verzichtet, da in einem weiteren Test zunächst die Sensitivität des Puffersystems getestet werden sollte. Hierzu wurden mehrfach 20 Mesophylleinzellproben gemischt, auf die Kapillare gegeben und separiert. Es konnte lediglich ein Peak detektiert werden (Abb. 26). Offenbar reichte die Sensitivität des Systems nicht aus, mehr Anionen zu detektieren. Es wurde deswegen auf eine Optimierung und die Peakidentifikation verzichtet.

3.2.5 Kohlenhydrate

Es gibt verschiedene CE-gestützte Protokolle zur Trennung und zum Nachweis von Kohlenhydraten. Nur ein Puffersystem ist bisher beschrieben worden, um Kohlenhydrate aus pflanzlichen Einzelzellproben zu analysieren (Lochmann *et al.* 1998). Für dieses Protokoll wurde eine Eigenbau-CE mit UV-Detektion verwendet, die nicht mit einem *Autosampler* ausgestattet war. Nachfolgend sind Versuche beschrieben, dieses Protokoll auf eine kommerzielle CE mit *Autosampler* zu übertragen bzw. weitere Protokolle auf die Analyse von Zellproben anzuwenden.

3.2.5.1 CuSO₄-Puffersystem

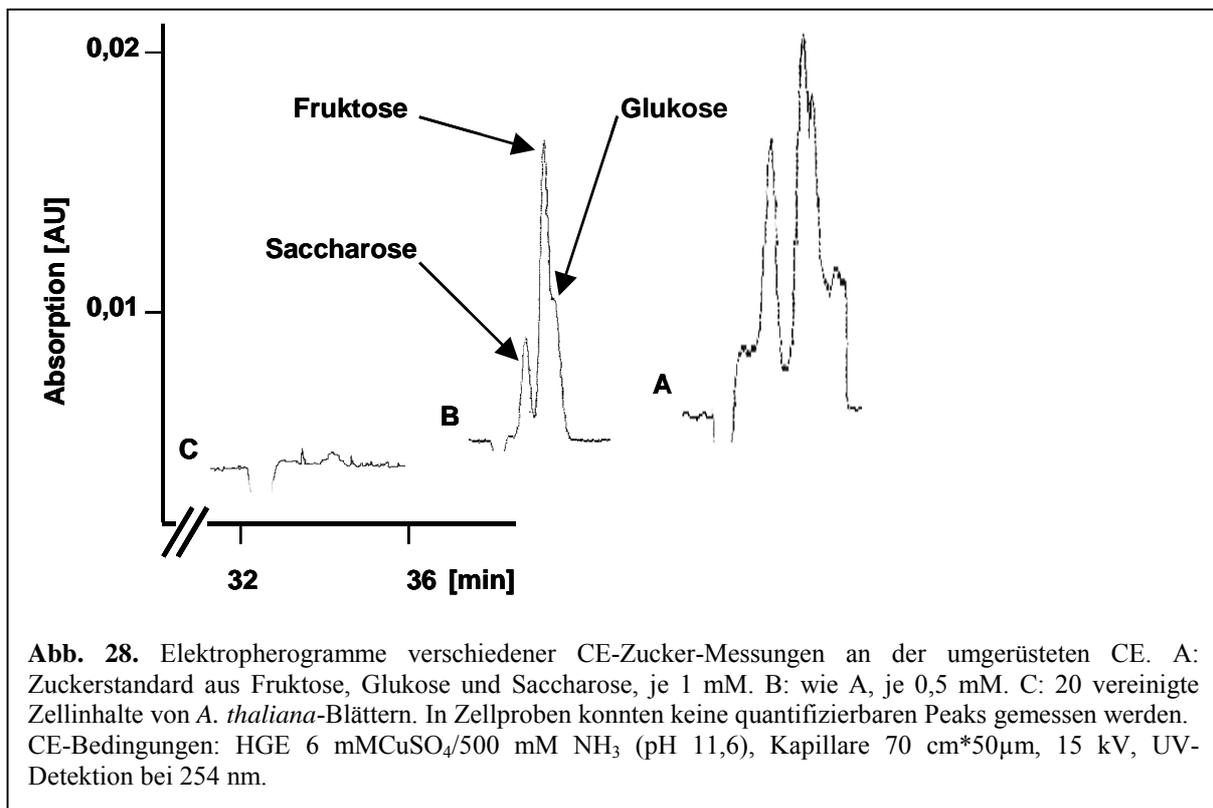
Wird CuSO₄/NH₃ als HGE benutzt, so bilden zunächst zwei Wasser- und vier Ammoniakmoleküle mit je einem Kupferion einen Komplex, der bei 254 nm nur schwach absorbiert. Die Hydroxygruppen der Zuckermoleküle verdrängen die Wasser- bzw. Ammoniakmoleküle aus dem Komplex. Das neu entstandene Chelat absorbiert stark bei 254 nm und ist, ungeachtet der zwei positiven Ladungen des Kupfers, negativ geladen. Dadurch wandert der Komplex als anionische Verbindung hinter dem elektroosmotischen Fluß (Bazzanella und Bächmann 1998).



Mit $\text{CuSO}_4/\text{NH}_3$ als HGE konnten in Einzelläufen Standards von Fruktose, Galaktose, Glukose, Raffinose, Saccharose und Stachyose in verschiedenen Konzentrationen detektiert werden. Wurden jedoch die Standards dieser Zucker in einer Probe vereinigt, so ergaben sich Schwierigkeiten bei der Trennung der Zucker (Abb. 27). Aus Abb. 27A ist ersichtlich, daß 10 mM eine zu hohe Konzentration darstellte, die das Auflösungsvermögen der CE unter diesen Bedingungen überschritt. Es fand keine Peaktrennung statt. Bei einer 10-fachen Verringerung der Konzentration auf 1 mM kam es zu einer Trennung der Monosaccharide, wobei jedoch die drei Mehrfachzucker komigrierten (Abb. 27B). Auch bei einer weiteren 1:10 Verdünnung der Standards auf 100 μM konnten nur die Monosaccharide getrennt werden (Abb. 27C). Trotz Änderungen der Parameter Kapillarlänge, Kapillartemperatur, Kupfer- und NH_3 -Konzentration sowie der Trennungsspannung konnte keine Separation von Saccharose, Stachyose und Raffinose erreicht werden. Als LODs für Fruktose, Galaktose und Glukose wurde je 50 μM festgestellt. In Abb. 27D ist ein typisches Elektropherogramm von 20 vereinigten Einzelzellproben aus *A. thaliana*-Blättern dargestellt. Es konnten keinerlei Zucker detektiert werden. Offensichtlich liegt die Zuckerkonzentration in den Zellproben nach Verdünnung unterhalb des LOD.

3.2.5.2 CuSO_4 -Puffersystem nach Instrumentenumbau

Die einfache Übertragung des Protokolls von Lochmann *et al.* (1998) auf eine kommerzielle CE erbrachte nicht die erwartete Sensitivität (vgl. Kap. 3.2.5.1). Daher wurde die hier verwendete kommerzielle CE (P/ACE 5510 Beckman Coulter) dem Originalprotokoll entsprechend umgebaut (Abb. 5). Lochmann und Kollegen (1998) benutzten eine Eigenbau-CE, die mit einer beweglichen



Einlaßseite ausgestattet war. Dadurch konnten die Zellproben, die lediglich in 5 nl H₂O_{bidest} verdünnt wurden, unter einem Mikroskop quantitativ in die Kapillare eingesaugt werden. Durch die Verringerung des Verdünnungsvolumens von 5 µl auf 5 nl kann die Verdünnung um den Faktor 1000 gesenkt werden. Wie Abb. 28A-B zeigt, war es möglich mit der umgebauten CE verschieden konzentrierte Standardgemische, bestehend aus Fruktose, Glukose und Saccharose, zu trennen und die Zucker zu detektieren. Allerdings war hier die Auftrennung schlechter als bei Messungen mit dem Gerät in seiner ursprünglichen Konfiguration (Abb. 27). Das LOD lag bei 100 µM. In Proben bestehend aus 20 vereinigten Zellinhalten von *A. thaliana*-Blättern konnten ebenfalls keine quantifizierbaren Peaks nachgewiesen werden (Abb. 28C). Um zu prüfen, ob irgendeine Substanz in den Zellproben enthalten war, die die Messungen störte, wurde einigen Zellproben ein Standard beigemischt. Der Standard war immer meßbar, weshalb davon ausgegangen werden kann, daß die Zellproben nicht mit dem Meßsystem interferierten.

Als eine Folge des Umbaus war es unmöglich, die Kapillare zu temperieren. Aufgrund der hohen Spannung innerhalb der Kapillare entstand Wärme, die nicht abgeführt werden konnte. Häufig bildeten sich dadurch Gasblasen, die als Ohmscher Widerstand wirkten. Durch diese Beeinträchtigung des Stromflusses änderten sich die Migrationszeiten der Peaks sehr stark, so daß eine Auswertung nicht mehr möglich war. Bei solchen Fehlern konnte es zusätzlich zu einer Überlastung des System kommen, so daß die Elektropherogramme vom Computer nicht weiter aufgezeichnet wurden.

3.2.5.3 Sorbat-Puffersystem

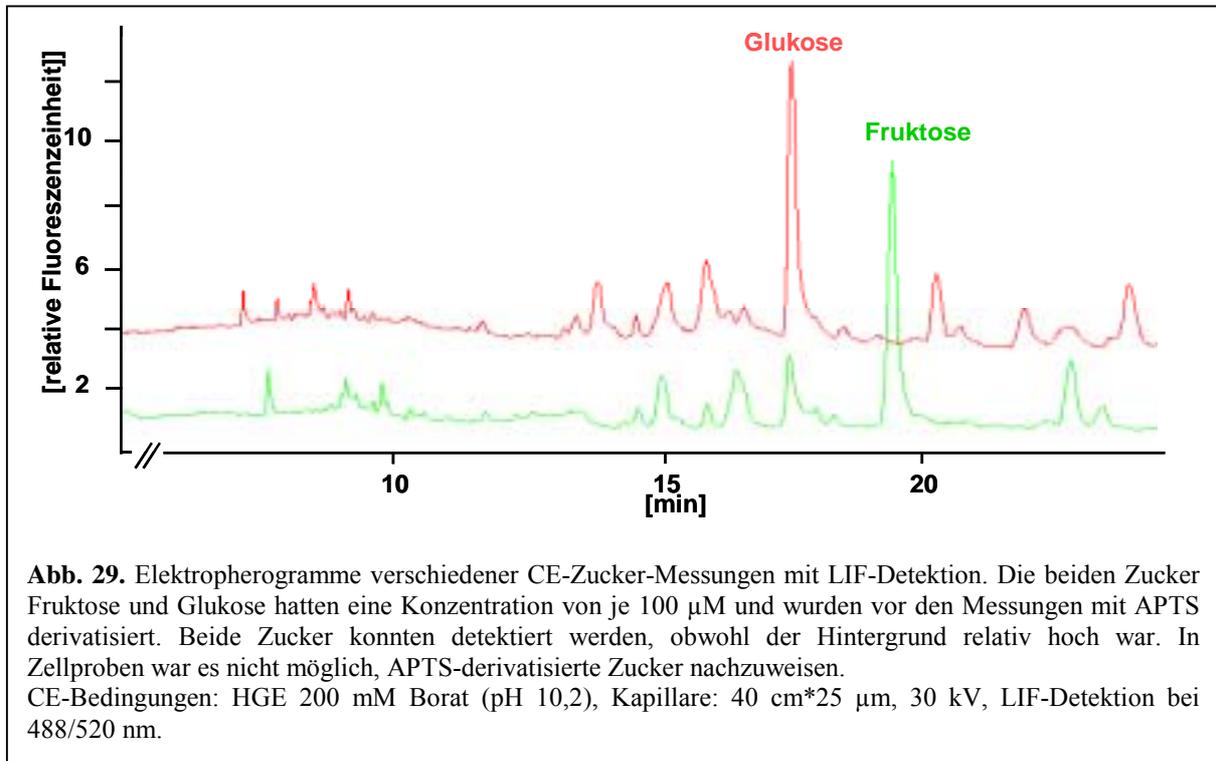
Als zweites Puffersystem zur Zuckeranalytik mittels CE wurde ein Sorbat-haltiger HGE gewählt. Sorbat absorbiert stark bei einer Wellenlänge von 254 nm. Da Zucker bei dieser Wellenlänge kein Licht absorbieren, können sie als negative Peaks detektiert werden.

Auch mit diesem Puffersystem konnten mit der CE in ihrer ursprünglichen Konfiguration die sechs Zucker Fruktose, Galaktose, Glukose, Raffinose, Saccharose und Stachyose nicht in einem Lauf getrennt werden. Zudem lag das LOD nur bei 500 µM und war damit um den Faktor fünf schlechter als mit dem CuSO₄-haltigen HGE. Es wurde daher auf umfangreiche Optimierungsschritte verzichtet.

3.2.5.4 APTS

Da der Nachweis von Zuckern mittels UV-Detektion nicht gelang, sollte versucht werden, diese über LIF-Detektion nachzuweisen. Es konnte bereits gezeigt werden, daß 8-Aminopyren-1,3,6-trisulfonsäure (APTS) ein geeignetes Fluorophor zum Markieren von reduzierenden Zuckern ist, die keine native Fluoreszenz besitzen (Chen und Evangelista 1995, Guttman 1997). Hierbei wird der Zucker durch reduktive Aminierung derivatisiert (Abb. 6).

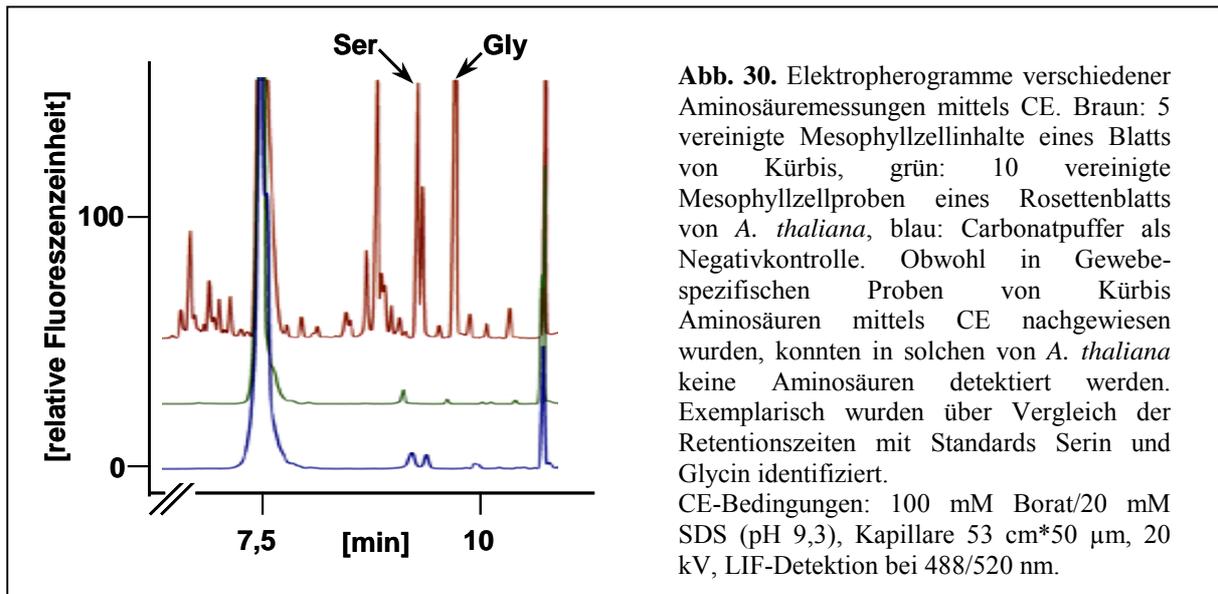
Abb. 29 zeigt typische Elektropherogramme der Standardzucker Fruktose und Glukose, beide mit einer Konzentration von 100 μM . Die Zucker sind klar vom Hintergrund unterscheidbar. Dieser war in allen Messungen ähnlich hoch, was für LIF-Detektion ungewöhnlich ist. Wurden vereinigte Einzelzellproben derivatisiert und gemessen, so konnten keine Zuckerpeaks identifiziert werden.



3.2.6 Aminosäuren

Zwei Protokolle wurden zum Aminosäurenachweis in pflanzlichen Zellproben publiziert (Bazzanella *et al.* 1998, Arlt *et al.* 2001): Auf ein Verfahren, welches auf UV-Detektion zurückgreift (Bazzanella *et al.* 1998), wurde aufgrund der Erfahrungen mit der Analyse von Zuckern verzichtet. Vielmehr sollte versucht werden, Aminosäuren mittels der empfindlicheren LIF-Detektion nachzuweisen (Tab. 1, Arlt *et al.* 2001). Da nur die aromatischen Aminosäuren nach Anregung über native Fluoreszenz verfügen (Pinto *et al.* 1997), war eine Derivatisierung notwendig. Aus den verschiedenen zur Verfügung stehenden Agenzien (Blau und Halket 1997) wurde Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) ausgewählt, da es bei 488 nm anregbar ist und ein sehr niedriges LOD besitzt (Arlt *et al.* 2001). FITC reagiert mit primären Aminogruppen (Abb. 7). Aufgrund dieses Reaktionsverhaltens ist es jedoch nicht spezifisch für Aminosäuren, sondern derivatisiert auch andere Amine wie Peptide, Amino Zucker oder Katecholamine.

In Abb. 30 sind typische Elektropherogramme dargestellt. Der Nachweis von Aminosäuren aus vereinigten Zellproben verschiedener Gewebe aus Rosettenblättern von *A. thaliana* gelang nicht. Es konnten, verglichen mit Negativkontrollen (Wasser statt Zellprobe), keine zusätzlichen Peaks reproduzierbar nachgewiesen werden. Daher ergaben sich auch keine Unterschiede zwischen Epidermis- und Mesophyllproben. Um dennoch die Anwendbarkeit der Methode für Einzelzellmessungen zu verdeutlichen, wurden Mesophyllzellen von Kürbis (*Cucurbita maxima*) beprobt und ebenfalls nach Derivatisierung gemessen. Bis zu zwölf Aminosäuren waren über Retentionszeitvergleich mit Standards identifizierbar (Abb. 30).



Um auszuschließen, daß der Nicht-Nachweis von Aminosäuren in *A. thaliana*-Proben auf störende Effekte von Inhaltsstoffen der Proben zurückzuführen ist, wurden zusätzlich Gesamtblattextrakte von *A. thaliana*-Rosettenblättern hergestellt, derivatisiert und gemessen. Eine Reihe von Peaks wurden detektiert und über Retentionszeitvergleich konnten exemplarisch die Aminosäuren Aspartat, Glycin und Serin identifiziert werden (Daten nicht abgebildet).

3.2.7 Zusammenfassung

Die für Metabolitenuntersuchungen in Proben mit unlimitiertem Ausgangsmaterial oft verwendete Methode der GC-MS besitzt keine ausreichende Sensitivität, um Metabolite in Proben bestehend aus wenigen pflanzlichen Zellen bestimmen zu können. CE jedoch, in Verbindung mit UV-Absorptions- bzw. LIF-Detektion hat hinreichend geringe LODs, um in vereinigten Einzelzellproben enthaltene Kationen (Anionen) und Aminosäuren (in Kürbis) untersuchen zu können. Für die Zuckanalytik mittels CE-LIF wird ein anderes Derivatisierungsreagenz benötigt, welches einen niedrigeren Hintergrund verursacht. Allgemein überraschend war die Nichtanwendbarkeit der veröffentlichten Protokolle zum Zuckernachweis aus pflanzlichen Einzelzellproben mittels UV-Detektion und die Schwierigkeiten beim Übertragen der Aminosäuremethode von einer Pflanzenspezies auf eine andere.

3.3 Proteinuntersuchungen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Massenspektrometrie

3.3.1 Konzeption

Proteine stellen die dritte große Substanzklasse neben Nukleinsäuren und der heterogenen Gruppe der Metabolite im weiteren Sinne dar. Es konnte gezeigt werden, daß die mRNA-Menge eines Gens nicht zwangsläufig mit der Menge des zugehörigen Proteins korreliert (Voet *et al.* 1999). Deshalb ist es sinnvoll, nach Ansätzen zur Proteinanalyse auf Einzelzellebene zu suchen.

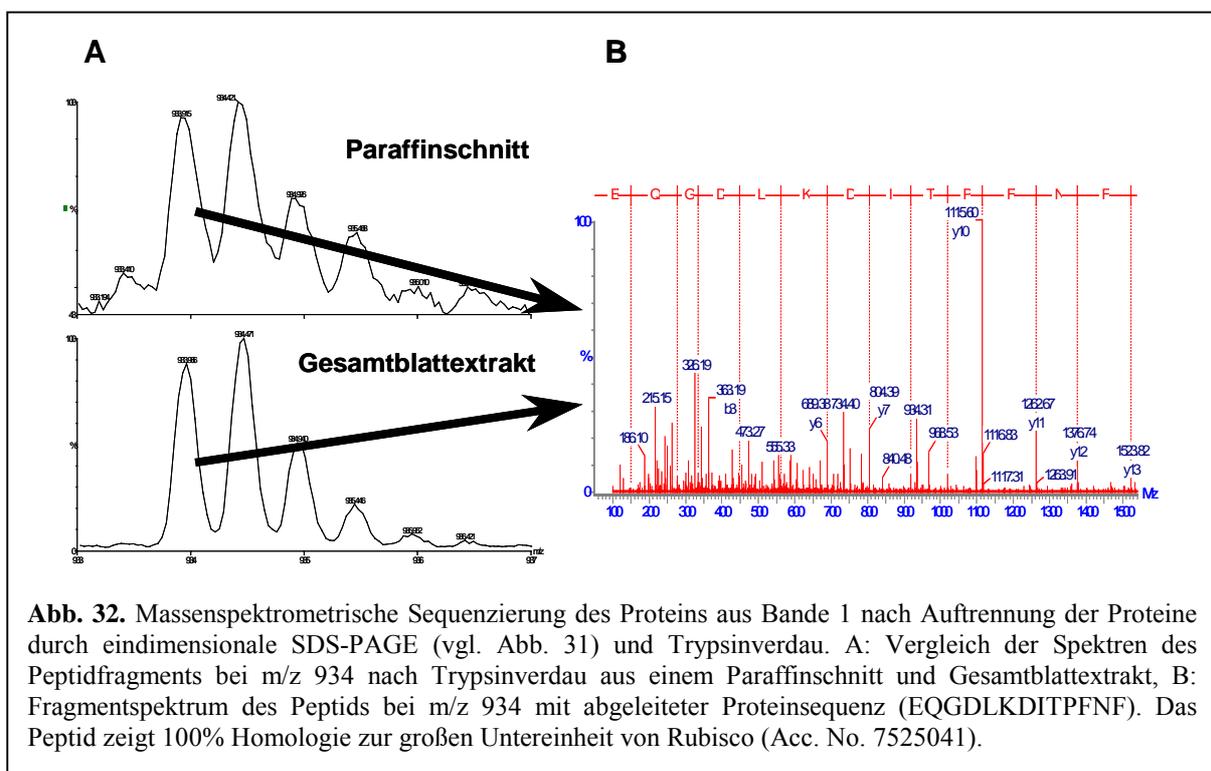
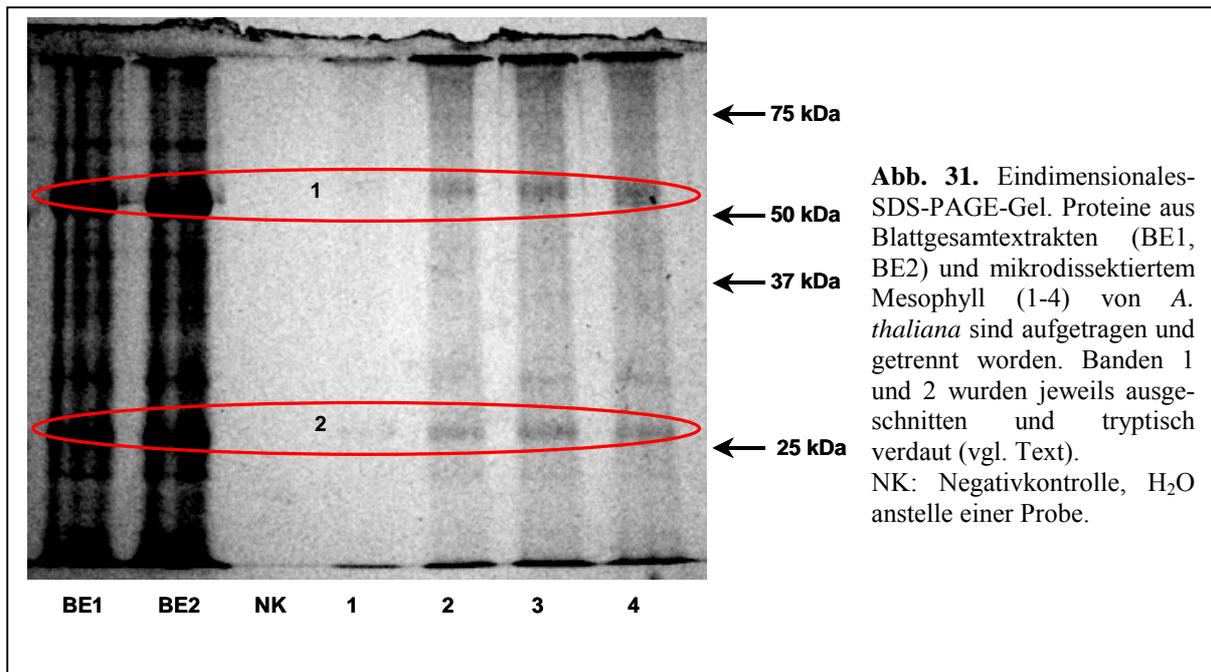
Die Probennahme durch Glaskapillaren ist zwar relativ einfach und schnell, es kann aber nicht so viel Material gesammelt werden, wie dies über das Mikromeißelsystem möglich ist. Aus diesem Grund wurde diese zweite Methode für die Gewinnung von Proben für Proteinuntersuchungen herangezogen (vgl. Kap. 3.1.5.1).

3.3.2 Proteinisolierung, -auftrennung und –sequenzierung

Wie in Kap. 3.1.5.1. gezeigt, können mittels eines Mikromeißels größere Gewebebereiche aus einem Mikrotomschnitt herausgelöst werden. Dabei bleiben enthaltene Makromoleküle wie Nukleinsäuren unbeschädigt (vgl. Kap. 3.1.5.1, 3.1.5.2). Diese Probennahmemethode wurde genutzt, um Proteine in Gewebe-spezifischen Proben zu untersuchen.

Mikrotomquerschnitte von *A. thaliana*-Rosettenblättern der Dicke 50 µm wurden mittels des Mikromeißels bearbeitet. Dabei wurde die ad- wie abaxiale Epidermis sowie ein Großteil der Leitbündel entfernt. Das zurückbleibende Restgewebe, das vornehmlich aus Mesophyll bestand, wurde mit SDS-Probenpuffer versetzt und denaturiert. Nach Gelelektrophorese und Silberfärbung waren in den Gewebeproben bis zu neun Proteinbanden sichtbar. In den als Positivkontrollen mitaufgetragenen Gesamtextrakten von *A. thaliana*-Rosettenblättern konnten korrespondierende Banden beobachtet werden. In Parallelansätzen waren nach Färbung mit kolloidalem Coomassie-Blau weniger (drei bis sechs) Banden zu sehen (Abb. 31).

Um die Identität der Proteine zu bestimmen, wurden exemplarisch die Banden oberhalb des 50 und 25 kDa-Markers sowohl vom Gesamtextrakt als auch von den mikrodisektierten Proben ausgeschnitten (Bande 1 und 2 in Abb. 31). Die Banden wurden einzeln tryptisch verdaut und die Fragmente sequenziert. Hierzu wurden die Coomassie-Blau-gefärbten Gele benutzt. Es wurden für die erste Bande (Abb. 31) sechs Peptide erhalten und sequenziert. In Abb. 32A ist jeweils der gleiche Ausschnitt der Peptidspektren des Gesamtextraktes und einer mikrodisektierten Probe (Paraffinschnitt) dargestellt. Abb. 32B zeigt das Fragmentspektrum dieser Peptide. Für die zweite Bande in Abb. 31 konnten zwei Peptide gefunden und sequenziert werden.



Nach einer Datenbanksuche konnten die sequenzierten Peptide der Bande 1 (Abb. 31) der Sequenz der großen Untereinheit von Rubisco aus *A. thaliana* (Acc. No. 7525041) zugeordnet werden. Abb. 33A stellt dies graphisch in einem *Alignment* zwischen den sechs Teilsequenzen und der Sequenz der großen Untereinheit von Rubisco dar. Die ausgeschnittene Bande hat eine Größe knapp über 50 kDa und die große Untereinheit von Rubisco ist 53 kDa groß. Zudem ist Rubisco eines der häufigsten Proteine in Pflanzen (Voet *et al.* 1999). In den Blattextrakten ist die



sequenzierte Bande die stärkste. Und auch in den Mikromeißelproben stellt diese Bande eine der Hauptbanden dar. In Abb. 33B ist ein *Alignment* für die 2 Peptidfragmente der zweiten ausgeschnittenen Bande aus Abb. 1 zu sehen. Beide erhaltenen Sequenzen sind homolog zu einem Chlorophyll bindenden Protein (Acc. No. NP_180989). Wie schon bei der Rubisco-Sequenz findet man eine Homologie von beinahe 100 %. Auch hier stimmte die Größe von knapp über 25 kDa (28 kDa) gut überein.

Es konnten sowohl die sofort nach der Ernte aus ganzen Blättern extrahierten Proteine als auch Proteine aus zuvor in Paraffin eingebetteten und mikrodisektierten Gewebeschnitten sequenziert werden. Weder die Einbettung noch die Mikrodisektion verursachten hierbei Schwierigkeiten.

3.3.3 Zusammenfassung

Mittels der Mikromeißelprobennahme wurde soviel Material gesammelt, daß die enthaltenen Proteine auf einem Proteingel mit herkömmlichen Färbungen sichtbar gemacht werden konnten. Exemplarisch wurden zwei Banden ausgeschnitten und sequenziert. Durch Datenbankvergleiche konnten ihre Identitäten ermittelt werden.

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit sollten zum einen bestehende Methoden angewendet, zum anderen weitere Methoden entwickelt werden, um Einzelzellproben auf möglichst viele Substanzklassen hin untersuchen zu können. Im zweiten Teil der Arbeit sollten diese Methoden auf die Charakterisierung der beiden Gewebe Epidermis und Mesophyll von *A. thaliana* angewendet werden. Dadurch sollte eine Beschreibung dieser Gewebetypen nicht mehr nur durch ihre Anatomie und Lage innerhalb des Blatts, sondern vor allem durch ihre biochemische Zusammensetzung und spezifische Genexpression erfolgen.

Die mRNA-Menge eines Gens korreliert nicht unbedingt mit der Menge des Proteins oder seiner Enzymaktivität. Dies liegt an unterschiedlichen Regulationsebenen (z.B. transkriptional, translational und posttranslational, Voet *et al.* 1999). Um den Zustand eines Gewebes oder einer Zelle exakter zu beschreiben, ist nicht nur das Wissen um Expressionshöhe, Proteinmengen und Enzymaktivitäten wichtig, sondern die Konzentrationen von möglichst vielen Metaboliten sollten ebenfalls bekannt sein.

Für ein umfassenderes Verständnis biologischer Prozesse ist die Integration all dieser Informationen entscheidend. Aus diesem Grunde wurden in der vorliegenden Arbeit Methoden zur Untersuchung der kleinsten funktionellen Einheit von Pflanzen, der Zelle, sowohl auf der transkriptionalen und metabolischen als auch der Proteinebene etabliert und angewendet.

4.1 Methoden der Probennahme

Die hier verwendete Probennahmemethode mit Glaskapillaren wurde 1989 von Malone und Kollegen eingeführt. Sie ist seither zur Beantwortung vieler Fragestellungen bezüglich der Ionen- und Metabolitenverteilung sowie der Genexpression herangezogen worden (Fricke *et al.* 1994a-c, Karrer *et al.* 1995, Koroleva *et al.* 1998, Kehr *et al.* 1999, Brandt *et al.* 1999). Diese Beprobungsmethode liefert hauptsächlich Zellsaft vakuolären Ursprungs. Der Anteil des Zytoplasmas in der Probe hängt dabei vom Anteil der Vakuole am gesamten Zellvolumen ab (Fricke *et al.* 1994a). Die „Reinheit“ der Vakuolenprobe kann durch die Aktivitätsmessung von Markerenzymen (z.B. Malatdehydrogenase, die nicht in Vakuolen vorkommt, Martinoia *et al.* 1981) bestimmt werden (Fricke *et al.* 1994a). In Gerste (Winter *et al.* 1993), Spinat (*Spinacea oleracea*, Winter *et al.* 1994) und Kartoffel (Leidreiter *et al.* 1995) wurden die relativen Volumina in Epidermis- und Mesophyllzellen verglichen. Dabei lagen die vakuolären Anteile in den Epidermisproben bei allen drei Arten zwischen 89 und 99 %, in den Mesophyllzellen zwischen 73 und 79 %. Letztere enthalten zytoplasmatische Anteile zwischen 3,4 und rund 7 %, erstere enthalten nach Fricke *et al.* (1994a) keinerlei Zytoplasmaanteile. Durch die hier angewendete veränderte Probennahme für die Nukleinsäureanalytik (größere Öffnungsweiten der Kapillaren, langsames Entfernen der Kapillare aus der Zielzelle, gegebenenfalls Anlegen eines leichten Unterdrucks, vgl. Kap. 2.2.3.1) können auch in Epidermiszellen zytoplasmatische Anteile erhalten werden (Abb. 9, Brandt *et al.* 1999), wenngleich auch deutlich weniger als in den Mesophyllproben. Deshalb mußten für vergleichbare Signalstärken nach der RT-PCR auch 2-3

mal mehr Epidermiszellen gesammelt werden (Abb. 14). Zudem ist RT-PCR eine wesentlich sensitivere Nachweismethode als Enzymtests, wodurch auch kleinere Zytoplasmaanteile in Proben nachgewiesen werden können.

Die minimal invasive Probennahme mittels Glaskapillaren hat auch bei wiederholter Beprobung desselben Blatts keinen Einfluß auf z.B. die Osmolalität der Zellen (Kehr 1998). Die Probennahmetechnik beeinflusst die Zellen der Umgebung vermutlich kaum. Die Zusammensetzung der entnommenen Probe spiegelt zudem die *in vivo*-Bedingungen recht genau wider, da die Beprobung sehr schnell vonstatten geht ($\ll 1$ s). Sie ist damit anderen Techniken wie Abziehen von Gewebeschichten (Gaedeke *et al.* 2001) oder Vereinzelungen durch Protoplastieren (Dresselhaus *et al.* 1994) überlegen, die durch die recht starken Eingriffe nicht mehr die genaue physiologische Situation im Zellverband abbilden (Macnicol 1976, Grosset *et al.* 1990, Titarenko *et al.* 1997).

Zwar hat die Lage der beprobten Zellen an Blattspitze oder -basis nur geringe Veränderungen auf die Osmolalität zur Folge (Kehr 1998), aber es gibt Unterschiede zu Zellen direkt über den Leitbündeln und zu Blättern anderen Alters (Kehr 1998). Um derlei Unterschiede zu umgehen, wurden in dieser Arbeit für metabolische Analysen stets mindestens 5 Zellinhalte gemischt, so daß sich positionsabhängige Unterschiede ausgleichen.

Die Beprobung von Zellen ist nicht nur auf Zellschichten wie Epidermis oder Mesophyll, die nahe der Oberfläche liegen, beschränkt, sondern kann auch für innere Zellschichten angewendet werden, sofern diese entweder über Reportergene (z.B. GFP für Geleitzellen, Brandt *et al.* 1999) oder (Fluoreszenz-) Farbstoffe (Siebelemente, Raps *et al.* 2001) markiert sind.

Die zweite hier verwendete Methode, Mikrodissektion, ist im Gegensatz dazu destruktiv und kann ohne Beeinflussung der Pflanze nur einmal pro Organ bzw. Pflanze angewendet werden. Sie hat aber den Vorteil, daß sehr große gleichförmige Gewebebereiche gewonnen werden können. Dadurch ist es möglich, genügend Material zu sammeln, um Proteinisolierungen und -sequenzierungen (Abb. 31-33) sowie *Northernblot*hybridisierungen durchzuführen (Abb. 18). Arrayhybridisierungen konnten bereits mit durch LCM erhaltenen Proben menschlichen Gewebes ohne vorhergehende Amplifikation durchgeführt werden (Sgroi *et al.* 1999). Dies war in dieser Arbeit aufgrund der kurzen Zeit, die der Mikrodissektor zur Verfügung stand, nicht möglich. Je nach Fragestellung haben beide Probennahmestrategien ihre Vor- und Nachteile und ergänzen sich hervorragend.

4.2 Genexpressionsstudien

4.2.1 Nachweis spezifischer Transkripte

Für einen RNA-*Blot* benötigt man gewöhnlicherweise mindestens ~ 5 pg mRNA eines bestimmten Transkripts, um es durch Hybridisierung mit einer radioaktiven Sonde nachweisen zu können (Ausubel *et al.* 1995). Pro Zelle kann ein Gesamtgehalt an mRNA von weniger als 700 fg angenommen werden (Dresselhaus *et al.* 1994). Bei 100 vereinigten Zellinhalten ergibt sich eine theoretische Gesamt-mRNA-Menge von weniger als 70 pg, wenn das Zytoplasma quantitativ in

der Probe enthalten wäre. Im hier durchgeführten *Dotblot* konnte ein spezifisches Signal in Verdünnungsreihen bis zu einer Menge von 150 pg Gesamt-mRNA nachgewiesen werden. Daraus ergibt sich, daß RNA-*Blot*hybridisierung keine geeignete Methode zum Nachweis von Transkripten selbst in vielen vereinigten Zellinhalten ist (Abb. 8).

Um dennoch Transkripte Zelltyp-spezifisch nachweisen zu können, wurde eine RT-PCR mit spezifischen Primern durchgeführt. Es konnten nicht nur Vorarbeiten mit Primern gegen stark exprimierte Gene (Phosphoglyceratmutase, Rubisco) bestätigt und die Methode auf *A. thaliana*-Gewebeproben übertragen werden (Abb. 9), sondern auch die Anwendbarkeit dieses Protokolls auf ein schwach exprimiertes Gen (Knollen L-Typ Stärkephosphorylase im Mesophyll von Kartoffelblättern, Sonnewald *et al.* 1995) konnte gezeigt werden (Brandt *et al.* 1999). Hierbei ist besonders interessant, daß, obwohl die Probennahme nicht quantitativ ist und die Ergebnisse nicht auf ein konstitutives Gen normalisiert sind, das schwach exprimierte Gen nach der PCR ein ähnlich starkes Signal ergibt wie Rubisco. Die PCR hat nach 40 Zyklen den exponentiellen Amplifikationsbereich verlassen und befindet sich in der Sättigung (Gassen *et al.* 1994). Diese Methode ist daher nur für Alles-oder-Nichts-Antworten geeignet. Um auch quantitative Aussagen über Genexpressionsstärken treffen zu können, kann eine semiquantitative oder Echtzeit-PCR durchgeführt werden (vgl. Kap. 4.2.3.2, Passarinho *et al.* 2001).

Das hier zur Anwendung gekommene Protokoll nutzt die sehr sensitive RT-PCR. In Kombination mit der minimal invasiven Probennahmetechnik können so Probleme älterer Protokolle umgangen werden: Die aufwendige Konstruktion einer cDNA-Bank (Karrer *et al.* 1995) oder das vorherige Protoplastieren der Zellen (Dresselhaus *et al.* 1994, Richert *et al.* 1996) entfallen. Ersteres dauert recht lange und birgt durch mehrere Reinigungsschritte die Gefahr, daß ein Teil oder sogar das gesamte, sehr limitierte Ausgangsmaterial verloren geht. Letzteres stellt einen unphysiologischen Prozess dar und verändert die Genexpression in den Protoplasten gegenüber dem intakten Gewebe (Grosset *et al.* 1990, Titarenko *et al.* 1997).

In den durchgeführten Kontrollexperimenten, PCR mit Zellinhalten ohne reverse Transkription, Inkubation der Zellinhalte vor der RT-PCR mit RNase A und Wasser statt Zellinhalten, konnten in über 90 % der Fälle keine Signale detektiert werden. Die beiden ersten Kontrollen zeigen genomische Kontaminationen an, während die letzte Kontrollreaktion Kreuzkontaminationen zwischen den Zellproben anzeigt. Zellkerne gelangen anscheinend aufgrund ihrer Größe zwischen 10 und 20 µm (Braune *et al.* 1991) nicht in die Kapillare bzw. die Bedingungen während der PCR reichen nicht aus, um genomische DNA für die Polymerase zugänglich zu machen, wie schon von Lambalez und Kollegen (1995) vermutet.

Im Gegensatz dazu erhält man mit Proben aus mikrodissiziertem Gewebe nach RT-PCR Produkte (Abb. 18), die sowohl auf genomische DNA als auch auf mRNA zurückzuführen sind. Zellkerne sind vorhanden und werden bei der Präparation des Gewebes zerstört, so daß die genomische DNA der Polymerase zugänglich ist.

4.2.2 Gleichzeitiger Nachweis vieler Transkripte

Es ist inzwischen durch Multiplex-PCR möglich, Primer für verschiedene Gene in einer Reaktion zu mischen und so mehrere Produkte zu erhalten. So können bis zu neun Primerpaare für spezifische Transkripte gleichzeitig in einer Reaktion verwendet werden (Ponce *et al.* 2000). Hierbei sind jedoch Beschränkungen bei der Primerwahl zu beachten, so daß kein Nachweis beliebig vieler Transkripte gleichzeitig möglich ist (Henegariu *et al.* 1997). Auch ist der Einsatz von vielen spezifischen Primern ein nicht außer acht zu lassender ökonomischer Faktor. Dennoch stellt dies eine elegante Möglichkeit dar, in einer Probe z.B. das konstitutiv exprimierte Gen und das zu untersuchende Gen in einer Reaktion zu amplifizieren. In dieser Arbeit jedoch sollten globale Amplifizierungsstrategien angewendet werden.

4.2.2.1 Globale/unspezifische Amplifizierungsstrategien

Zum gleichzeitigen Nachweis vieler Transkripte aus kleinen Probenmengen gibt es verschiedene Möglichkeiten (zusammengefaßt in Freeman *et al.* 1999, Dixon *et al.* 2000, Brady 2000), von denen einige in dieser Arbeit auf ihre Anwendbarkeit hinsichtlich kleinster, pflanzlicher Probenmengen getestet wurden.

Belyavski und Kollegen (1989) konnten erstmals zeigen, daß durch *Tailing* an die unbekanntes 3'-Enden von Erstrang-cDNA, die nur aus wenigen Myelomzellen gewonnen wurden, bekannte Sequenzen ansynthetisiert werden konnten. Diese Sequenz und die Poly (dT)-Sequenz am 5'-Ende konnten als Primer in einer globalen PCR verwendet werden. Die Produkte wurden zum Anlegen einer cDNA-Bibliothek genutzt. Ein ähnliches Protokoll wurde verwendet, um aus 128 Eizellprotoplasten aus Mais eine cDNA-Bibliothek herzustellen (Dresselhaus *et al.* 1994). Die hierbei geschätzte Ausgangsmenge mRNA wurde durch theoretische Überlegungen auf circa 50 pg geschätzt (Dresselhaus *et al.* 1994). Im Gegensatz zu Protoplasten als Ausgangsmaterial wird bei der in dieser Arbeit verwendeten Glaskapillarprobennahme das Zytoplasma (welches die mRNA enthält) nicht zwangsläufig quantitativ entnommen, wodurch die Menge an Ausgangsmaterial erheblich sinken kann. Zudem ergab sich bei den Vorversuchen die Schwierigkeit, daß bei Verwendung zweier homomerer Primer die Ausbeute drastisch sank und lediglich bis zu einer Ausgangskonzentrationen von 2 ng Gesamt-RNA Produkte nach der PCR detektierbar waren. Bei niedrigeren Ausgangsmengen findet zwar noch ein *Tailing* statt, aber es kommt zu Problemen mit der Ausbeute der PCR bei Verwendung zweier homomerer Primer (Freeman *et al.* 1999), verglichen mit den Ansätzen, in denen keine oder nur ein Homomerprimer eingesetzt wurde. Selbst mit vielen vereinigten Zellinhalten wäre man an der Grenze dessen, was noch effizient amplifiziert werden kann. Aus diesem Grunde wurde von Experimenten mit Zellinhalten abgesehen. Ein weiteres Problem, das zusätzlich zu einer Verringerung der Ausgangsmenge beitragen kann, ist die Tatsache, daß auch bei Verwendung magnetischer Oligo (dT)-Primer cDNA während der notwendigen Waschschriffe (vgl. Kap. 2.2.4.3.7.1) verloren gehen kann.

Die Ligation von Adaptoren an das unbekannte Ende eines DNA-Doppelstranges und eine anschließende PCR mit Primern gegen diese Sequenz und die bekannte Poly (dT/dA)-Region lieferte ebenfalls keine zuverlässigen Ergebnisse in Vorversuchen, so daß keine Experimente mit Zellinhalten durchgeführt wurden. Obwohl mit einem solchen Ansatz cDNA-Bibliotheken aus einzelnen Epidermis- und Schließzellen von Tomate generiert werden konnten (Karrer *et al.* 1995), stellte sich dieses Protokoll im Rahmen dieser Arbeit als nicht geeignet heraus. Es werden allgemein 100-200 ng cDNA für Ligationen empfohlen (Sambrook *et al.* 1989), jedoch enthält eine Probe selbst aus 100 vereinigten Zellinhalten deutlich weniger cDNA nach der reversen Transkription, so daß die Ligationswahrscheinlichkeit sehr gering ist. Im Originalprotokoll sind zudem 6 Waschstritte vorgesehen (Karrer *et al.* 1995, Gallagher *et al.* 2001). Trotz des Einsatzes von magnetischen Oligo (dT)-Primern birgt das mehrmalige Waschen von geringen pg-Mengen mRNA bzw. cDNA die große Gefahr des Verlusts von Ausgangsmaterial.

Die Ligationswahrscheinlichkeit hängt vom Zusammentreffen der zwei DNA-Enden, die ligiert werden sollen, und dem Enzym Ligase ab. Sie kann erhöht werden, wenn das Enzym bereits an eines der DNA-Enden gebunden ist. Dies ist im TOPO-Ligationskit der Firma Invitrogen verwirklicht. Hier ist eine Topoisomerase, die die DNA-Enden zusammenfügt, bereits an den Klonierungsvektor gebunden. Nach erfolgreicher Klonierung sollten in einer PCR mit Primern, die gegen die flankierenden Sequenzen des Vektors gerichtet waren, die Inserts unabhängig von ihrer Sequenz amplifiziert werden. Jedoch scheint es so, als ob auch hier eine Mindestmenge an DNA (>10 ng) eingesetzt werden muß (vgl. Kap. 3.1.3.2.5). Zudem müßte cDNA, die aus Zellinhalten gewonnen wurde, erst doppelsträngig gemacht werden. Dies wiederum brächte einen Reinigungsschritt mit sich, der die Gefahr des Verlusts der unamplifizierten cDNA in sich birgt und wegen der anschließenden Klonierung der Einsatz von magnetischen Oligo (dT)-Primern nicht möglich wäre.

Als letzte Klonierungsmethode wurde die Klonierung eines einzelsträngigen Adapters mittels RNA-Ligase getestet. Es traten die gleichen Probleme auf wie bei den beiden ersten Klonierungsstrategien.

Alle bisher beschriebenen und teilweise auch getesteten Methoden zur Amplifizierung von DNA aus limitiertem Ausgangsmaterial benötigen Enzym-vermittelte Schritte vor der eigentlichen Vermehrung. Dies scheint nicht ohne weiteres möglich zu sein, da die Mengen an mRNA bzw. cDNA nicht ausreichen. Ein Lösungsansatz wäre, die Volumina der Reaktionsansätze stark zu verringern. Dies wurde schon erfolgreich z.B. für mikrofluorimetrische Enzymtests, die in nl-Tropfen unter Öl durchgeführt wurden (Kehr *et al.* 1998) oder für PCR-Reaktionen mit anschließender Gelelektrophorese und Detektion der Produkte auf einem integrierten Mikrochip gezeigt (Burns *et al.* 1998). Dadurch würden die Mengen weniger stark verdünnt und enzymatische Reaktionen könnten wieder ablaufen. Da sub µl-Volumina nur mit größerem Aufwand zu pipettieren sind (Kehr *et al.* 1998), ist diese Technik unkomfortabel und zeitaufwendig. Mikrochips hingegen müßten für die jeweilige Reaktion extra hergestellt werden, was insbesondere für kleine Stückzahlen extrem teuer sein kann. Andere

Amplifikationsstrategien, die auf enzymatische Reaktionen vor der Amplifikation verzichten, erscheinen daher als sinnvollere Möglichkeiten. Hier bieten sich sowohl die Smart-Technik der Firma Clontech als auch die *Arbitrary-PCR* (Williams *et al.* 1990) an.

Erstere Technik macht Gebrauch vom sogenannten Templatewechsel: Die meisten reversen Transkriptasen synthetisieren mehrere C-Nukleotide an das 3'-Ende des Erststranges. Ist nun im Ansatz ein zweiter Primer mit mehreren G-Nukleotiden am 5'-Ende vorhanden, so kann dieser an den Erststrang binden. Die Transkriptase wechselt, wenn die mRNA fertig abgelesen ist, das Template und synthetisiert an den Erststrang die komplementäre Sequenz des zweiten Primers (Produktinformation Clontech).

Die PCR-vermittelte Amplifizierung von Gesamt-RNA-Mengen unterhalb von 2 ng gelang mit dieser Methode nicht. In PCR-Ansätzen mit unterschiedlich vielen vereinigten Zellinhalten konnten auch nach DIG-Markierung und Antikörpernachweis keine Produkte detektiert werden. Der Hersteller gibt die Minimalmenge für diese Reaktion mit 50 ng Gesamt-RNA an. Offenbar ist das Kit für noch geringere Mengen, wie sie in vereinigten Zellinhalten vorhanden sind, nicht geeignet.

Die zweite Methode ohne vorhergehende enzymatische Schritte ist die *Arbitrary-PCR*, wie sie zur Untersuchung von polymorpher Genom-DNA eingesetzt wird (Williams *et al.* 1990). Dasselbe Prinzip liegt der PCR zugrunde, die für Transkriptomstudien im *Differential Display* verwendet wird (Liang und Pardee 1992): Ein Primer, mit einer festen Sequenz, die bestimmten Kriterien entsprechen muß (vgl. Kap. 2.2.4.3.7.8), hybridisiert unter wenig stringenten Bedingungen an ein DNA-Molekül. Dabei kann es aufgrund der niedrigen Temperatur zu Fehlpaarungen kommen. Dies ist erwünscht, um mehr Bindungsereignisse zu erhalten. Durch Kombination mit einem (degenerierten) Oligo (dT)-Primer bzw. durch Verwendung desselben oder eines zweiten *Arbitrary-Primers* kann nun die DNA in einer PCR-Reaktion vermehrt werden. Anders als bei den oben beschriebenen globalen Methoden wird hier nur ein Teil der vorhandenen Transkripte in einer Probe amplifiziert. Für eine Abdeckung der vorhandenen Transkripte von 95 % wären zwischen 20 (Liang und Pardee 1992, Sturtevant 2000) und 25 (Bauer *et al.* 1993) verschiedene *Arbitrary-Primer* in Kombination mit Oligo (dT)-Primern notwendig. Zudem werden diese nicht als Vollängenklone, sondern als 3'-Teilsequenzen vermehrt (Liang und Pardee 1992, Dixon *et al.* 1998, Menke und Müller-Röber 2001). Dadurch können unter Umständen Spleißvarianten nicht gefunden werden, weil die Information der 5'-Seite verloren geht (Dixon *et al.* 2000).

Aufgrund der oben beschriebenen Erfahrungen mit anderen Methoden wurde versucht, eine möglichst einfache Verfahrensweise anzuwenden. Das Originalprotokoll des *Differential Display* (Liang und Pardee 1992, Bauer *et al.* 1993) wurde daher ausgewählt. Es wurde zum einen bereits erfolgreich auf pflanzliche Proben angewendet (Benito *et al.* 1996, Kleber-Janke und Krupinska 1997); zum anderen konnte es in abgewandelter Form für Expressionsanalysen in einzelnen humanen Zellen benutzt werden (Renner *et al.* 1998, Dixon *et al.* 1998). Da die Auflösung von Polyacrylamidgelen beschränkt ist (Bauer *et al.* 1993), wurden die PCR-Produkte in dieser Arbeit über Arrayhybridisierungen ausgewertet (vgl. Kap. 3.1.4, Abb. 15, 17). Dadurch konnte zum

einen darauf verzichtet werden, durch Verwendung von 12 unterschiedlichen degenerierten Oligo (dT)-Primern (Liang und Pardee 1992, Bauer *et al.* 1993) die Komplexität der Produkte pro PCR zu verringern (Kleber-Janke und Krupinska 1997). Zum anderen konnten durch Datenbanksuchen Sequenz- und Funktionsinformationen erhalten werden (vgl. 3.1.4, Abb. 17, Anhang 1-6). Eine Reamplifikation und Klonierung (Kleber-Janke und Krupinska 1997, Sturtevant 2000) von Banden war überflüssig.

Interessanterweise zeigen die für den *Differential Display* benötigten Primer ein Paradoxon (Liang und Pardee 1992, Bauer *et al.* 1993): Obwohl Decamere statistisch gesehen wesentlich seltener binden als Hexamere, bringen sie im Gegensatz zu Hexameren, die keine Banden erzeugen, nach einer PCR 50-100 Banden auf einem Polyacrylamidgel hervor (Liang und Pardee 1992). Für ein erfolgreiches Hybridisierungsereignis müssen wenigstens 6 Nukleotide am 3'-Ende perfekt passen, während am 5'-Ende bis zu 4 Fehlpaarungen toleriert werden. Damit haben die Decamere eine höhere statistische Bindungswahrscheinlichkeit und wirken effektiv wie Hexamere (Bauer *et al.* 1993). Durch dieses Verhalten ist jedoch die Effizienz des Annealings verringert und es werden mehr Zyklen benötigt, um ausreichende Mengen an Produkten zu erhalten (Liang und Pardee 1992). Im Gegensatz zur PCR mit spezifischen Primern ist die *Arbitrary-PCR* nach 40 Zyklen (Liang und Pardee 1992, Benito *et al.* 1996, Kleber-Janke und Krupinska 1997, Renner *et al.* 1998) daher noch nicht in der Sättigung. Anderenfalls könnten Expressionsstärken zwischen zwei unterschiedlichen Geweben nicht verglichen werden. Vielmehr scheint es so zu sein, daß die Konzentration an Nukleotiden erschöpft ist, bevor 40 Zyklen komplettiert sind (Bertioli *et al.* 1995). Dadurch werden die Expressionsverhältnisse relativ beibehalten, wenngleich auch kleinere cDNAs bevorzugt amplifiziert werden (Phillips and Eberwine 1996, Luo *et al.* 1999).

Eine große Schwierigkeit beim *Differential Display* kann die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und die teilweise hohe Anzahl falsch positiver Signale sein (Zegzouti *et al.* 1997, Baldwin *et al.* 1999), die vor allem auf Primerartefakte aufgrund der niedrigen *Annealing*temperatur zurückgehen. Im Gegensatz zum Nachweis der PCR-Produkte über Polyacrylamidgele wurde hier eine hohe Spezifität durch die Hybridisierung eingeführt, die einen großen Teil der nicht kodierenden Primerartefakte ausschloß. Um die Anzahl falsch positiver Signale weiter zu reduzieren, wurde die RAP-PCR ausgetestet (Menke und Müller-Röber 2001). Sie soll eine höhere Spezifität gegenüber der „einfachen“ *Arbitrary-PCR* dadurch aufweisen, daß durch längere Primer höhere Annealingtemperaturen nach dem ersten Zyklus der PCR mit niedriger Temperatur benutzt werden können. Jedoch ergab diese, bisher in Pflanzen nur selten eingesetzte Methode, nur mit Gesamt-RNA-Mengen über 100 ng Ergebnisse (vgl. Kap. 3.1.3.2.5). Dies kann an zu wenigen erfolgreichen Annealingereignissen im ersten, niedrig temperierten Zyklus gelegen haben. Nur bei recht großen Mengen cDNA finden genug Primerelongationen statt, um eine repräsentative Vermehrung zu gewährleisten. Abhilfe könnten z.B. mehrere niedrig temperierte Zyklen zu Beginn der Amplifikation leisten, wie es beispielsweise im Protokoll für DOP-PCR vorgesehen ist (vgl. Kap. 3.1.3.2.5). Der Hersteller dieses kommerziellen Kits (Roche) gibt als Ausgangsmenge zwischen 1 pg und 100 ng DNA an. Dieses Kit beruht auf einer abgewandelten

Form der RAP-PCR und verwendet einen Primer, der nahe dem 3'-Ende ein degenerierte N₆-Region aufweist. Jedoch konnten auch hier nur Ausgangsmengen über 100 ng Gesamt-RNA amplifiziert werden. Da das Standardprotokoll für genomische Templates optimiert ist (Roche, Produktinformation), wären wahrscheinlich Änderungen im Protokoll vorzunehmen.

Um die Reproduzierbarkeit der *Arbitrary*-PCR zu erhöhen, sind in der Literatur eine Reihe von Strategien beschrieben worden. Sie umfassen eine empirische Optimierung der Annealingtemperatur für jeden *Arbitrary*-Primer (Malhotra *et al.* 1998), die Verwendung von Duplikat- oder Triplikatreaktionen derselben RNA-Präparation (Luce und Burrows 1998) und die Durchführung von Parallelreaktionen mit unabhängigen RNA-Präparationen (Mohr *et al.* 1997). Neben der Einführung einer erhöhten Spezifität durch Hybridisierung wurden in dieser Arbeit Parallelreaktionen mit unabhängigen Proben durchgeführt und nur solche Ergebnisse ausgewertet, die in mindestens zwei von drei Experimenten erhalten wurden (vgl. Kap. 3.1.4.3)

Eine weitere, hier nicht angewendete Methode ist die Herstellung von *antisense*RNA (van Gelder *et al.* 1990). Diese kann zur Hybridisierung gegen Arrayfilter (Luo *et al.* 1999, Wang *et al.* 2000) bzw. zur Konstruktion einer cDNA-Bibliothek (Ying *et al.* 1999) benutzt werden. Der Oligo (dT)-Primer für die reverse Transkription enthält einen Promotor für T7 RNA Polymerase. Mit Hilfe dieser wird *antisense*RNA von der unamplifizierten cDNA transkribiert (van Gelder *et al.* 1990). Dabei kann eine 10⁶-fache Anreicherung der Transkripte erzielt werden (Phillips und Eberwine 1996, Luo *et al.* 1999). Der große Vorteil der Methode liegt darin, daß durch die lineare Amplifikation die ursprünglichen Expressionsverhältnisse nahezu erhalten bleiben (Phillips und Eberwine 1996), wenngleich vornehmlich die Sequenzen der 3'-Regionen vermehrt werden (Phillips und Eberwine 1996, Freeman *et al.* 1999). Die mRNA aus nur 500 individuell über LCM erhaltenen Rattenneuronen (Luo *et al.* 1999) bzw. aus vereinzelt Zellen des Rattenhirns (O'Dell *et al.* 1998) konnte so amplifiziert werden. Zwei Gründe sprachen gegen eine Verwendung dieser Methode: Zum einen konnte bisher nicht gezeigt werden, daß sie für pflanzliche mRNA geeignet ist. Auch ist unklar, ob *antisense*RNA-Amplifikation mit so geringen Mengen mRNA, wie sie in weniger als 100 Pflanzenzellen enthalten sind, funktioniert, gleichwohl die Methode mit einzelnen tierischen Zelleninhalten arbeitet (O'Dell *et al.* 1998). Zwar konnte aus einer Ausgangsmenge von 50 ng Gesamt-RNA *antisense*RNA hergestellt werden, aber mit vereinigt Inhalten aus Epidermis- bzw. Trichomzellen war dies nicht möglich (Dr. Elke Lieckfeld, MPI-MP Golm, persönliche Kommunikation). Zum anderen sind- je nach Protokoll- drei (Luo *et al.* 1999) oder bis zu sechs (Phillips und Eberwine 1996) Waschschrte notwendig. Durch die Verwendung der speziellen Promotor-enthaltenen Oligo (dT)-Primer können kommerziell erwerbliche magnetische Oligo (dT)-Primer nicht verwendet werden, so daß die Gefahr eines teilweise oder ganzen Verlusts der ursprünglichen mRNA besteht.

Viele der hier diskutierten Methoden wurden schon für Expressionsanalysen von einzelnen tierischen (O'Dell *et al.* 1998, Luo *et al.* 1999) und humanen (Belyavski *et al.* 1989) Zellen verwendet. Für die Analyse von pflanzlichen Einzelzellen gab es bislang erst zwei Strategien (*Tailing*: Dresselhaus *et al.* 1994, Adapterligation: Karrer *et al.* 1995). In dieser Arbeit wurde mit

dem *Differential Display* (Liang und Pardee 1992) eine dritte eingeführt. Sie stellte in dieser Arbeit das einzige Protokoll dar, mit dessen Hilfe kleinste Mengen pflanzlicher mRNA amplifiziert werden konnten. Dabei wurde auch in Kauf genommen, daß das Amplifizierungsprotokoll (wie die meisten anderen auch) stark exprimierte Gene bevorzugt vermehrt (Bertioli *et al.* 1995). Der Einfluß dieses Problems könnte durch eine Optimierung (Reduktion) der Zyklenzahl verringert werden.

4.2.2.2 Arrayhybridisierungen

Als multiparallele Hybridisierungstechnik wurden Arrayhybridisierungen bereits für eine große Anzahl unterschiedlicher Proben z.B. aus Säugetieren (DeRisi *et al.* 1996, Schena *et al.* 1996), Hefen (Posas *et al.* 2000) oder Pflanzen (Schena *et al.* 1995, Ruan *et al.* 1998) eingesetzt (zusammengefaßt in Baldwin *et al.* 1999, Duggan *et al.* 1999). Da für diese Art von Hybridisierungen Gesamt-RNA-Mengen im µg-Bereich benötigt werden (Kehoe *et al.* 1999), mußte die in den Zellproben von *A. thaliana* enthaltene RNA zunächst amplifiziert werden (vgl. Kap. 4.2.2.1), um sie gegen Filter hybridisieren zu können, die mehr als 16.000 ESTs tragen.

4.2.2.2.1 Evaluierung der Daten

Nach Normalisierung der Genaktivitäten auf die Gesamtaktivität aller vorhandenen ESTs auf den Filtern (Thimm *et al.* 2001), wurden zur Auswertung der so erhaltenen Daten zunächst die Quotienten $\text{Aktivität}_{\text{Epidermis/Mesophyll}}$ für jeden EST berechnet und mehrere Schwellenwerte eingeführt (vgl. Kap. 3.1.4.3). In Hybridisierungsexperimenten mit großen Mengen RNA können Expressionsunterschiede größer Faktor zwei zwischen unterschiedlichen RNA-Populationen nachgewiesen werden (Schena *et al.* 1996, DeRisi *et al.* 1997, Ruan *et al.* 1998). Da die mRNA-Menge in den Zellproben nicht bestimmt werden konnte und die Amplifizierungsstrategie nicht streng quantitativ ist (Freeman *et al.* 1999, Dixon *et al.* 2000), wurde dieser Schwellenwert auf größer Faktor fünf heraufgesetzt.

Um die Reproduzierbarkeit der Hybridisierungsexperimente zu untersuchen, wurden je drei unabhängige Epidermis- und Mesophyllproben getrennt gesammelt, amplifiziert und hybridisiert. Es wurden nur solche ESTs weiter betrachtet, deren Aktivitäten sich in mindestens zwei von drei Durchführungen nur um weniger als das vierfache unterschieden. Mit dieser Bedingung konnten extreme Schwankungen in den Werten ausgeglichen werden, die auf Unregelmäßigkeiten bei der Amplifizierung (vgl. Kap. 4.2.2.1.) beziehungsweise Hybridisierung hindeuten. Ursachen hierfür können darin liegen, daß schon kleinere Ungleichgewichte in der Transkriptmenge, verglichen mit Hybridisierungen ohne Amplifikation, zu recht hohen Unterschieden in der Signalintensität führen können (Schenk *et al.* 2000). Des weiteren können große Unterschiede bei den schwach exprimierten Genen durch Hybridisierungsartefakte hervorgerufen werden (Desprez *et al.* 1998), die hier eine größere Gewichtung als bei stark exprimierten haben. Auch der sogenannte *Monte Carlo*-Effekt (Karrer *et al.* 1995), nach dem nicht vorherzusagen ist, ob ein sehr schwach exprimiertes Gen während der PCR vermehrt wird oder nicht, spielt hierbei eine Rolle.

Der in Abb. 16 gezeigte *Scatterplot*, indem die Quotienten $\text{Aktivität}_{\text{Epidermis/Mesophyll}}$ jedes ESTs in zwei unabhängigen Durchführungen gegeneinander aufgetragen sind, zeigt daher eine Streuung der Datenpunkte, die höher ist als man in Experimenten ohne Amplifikation erwarten würde (Desprez *et al.* 1998). Entsprechend hat das Bestimmtheitsmaß einen Wert von 0,7634. Aber dennoch wird eine klare lineare Abhängigkeit mit einer Steigung der Ausgleichsgeraden von $m \sim 1$ deutlich. Dies bedeutet, daß unabhängige Experimente vergleichbar sind. Bei dieser Darstellung der Quotienten $\text{Aktivität}_{\text{Epidermis/Mesophyll}}$ können ESTs von präferentiell unterschiedlich exprimierten Genen an den beiden Enden der Ausgleichsgeraden gefunden werden.

4.2.2.2 Epidermis-Mesophyll-Vergleich

Am unteren Ende der Ausgleichsgeraden in Abb. 16 erscheinen ESTs von präferentiell im Mesophyll exprimierten Genen (vgl. Anhang 2). Hierunter befinden sich Gene, die zur Photosynthese gehören, wie z.B. Carboanhydrase oder eine Rubisco-bindende Proteinuntereinheit, die beide als Mesophyll-spezifisch beschrieben sind (Jacobson *et al.* 1975, Martel *et al.* 1990). Mit der chloroplastidären Fruktosebisphosphat-Aldolase 2 wurde auch ein Vertreter der in den Calvinzyklus involvierten Enzyme als stark im Mesophyll exprimiert gefunden (Tsutsumi *et al.* 1994). Rubisco selbst und andere Photosynthesegene konnten in diesem Versuch nicht gefunden werden. Dies kann zwei Gründe haben. Zum einen werden nur circa 11 % des Transkriptomts durch den verwendeten *Arbitrary*-Primer abgedeckt (Bauer *et al.* 1993). Um weitere Gene zu finden, müßten Parallel-PCR-Ansätze mit unterschiedlichen Primern durchgeführt werden. In Kap. 3.1.4.4 konnten durch solche Parallelansätze mit 6 verschiedenen *Arbitrary*-Primern einige weitere Photosynthesegene (inklusive Rubisco), nachgewiesen werden (vgl. Anhang 3). Zum anderen enthalten die Filter zwar circa 16.000 ESTs, aber viele Gene sind redundant. Die geschätzte Zahl der repräsentierten Gene liegt bei circa 6.000 (Thimm *et al.* 2001). Das Nicht-Auffinden von ESTs eines bestimmten Gens bedeutet nicht zwangsläufig, daß es im entsprechenden Gewebe nicht aktiv ist. Daher erhält man ein eingeschränktes Bild des Genexpressionsprofils im jeweiligen Gewebe. Dennoch können gute Hinweise darauf erhalten werden, Gene welcher Stoffwechselwege möglicherweise unterschiedlich reguliert sind.

Im Mesophyll wurden auch Gene als spezifisch exprimiert gefunden, die eine Rolle bei der Detoxifikation von Sauerstoffradikalen spielen. Sauerstoffradikale entstehen z.B. durch die Mehlerreaktion bei einem hohen Reduktionsgrad von Ferredoxin im Photosystem I in Folge hoher Lichteinstrahlung (Polle 1996, Heldt und Heldt 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß zwei der Hauptgene (Ascorbatperoxidase und Monodehydroascorbatreduktase) des Detoxifikationsweges in *A. thaliana* präferentiell Mesophyll-exprimiert sind (Anhang 2). Weitere involvierte Gene wie Superoxiddismutase konnten nicht gefunden werden, da sie entweder von den Primern nicht erfaßt wurden oder auf den Filtern nicht repräsentiert waren. Dieses Beispiel verdeutlicht, wie durch Gewebe-spezifische Arrayhybridisierungen Kandidatengene (Stoffwechselwege) gefunden werden können, deren Expression offenbar unterschiedlich ist. Mittels einer exakteren Methode (z.B. Echtzeit-PCR, Johnson *et al.* 2000, Al-Taher *et al.* 2000,

oder *in situ*-Hybridisierung, Darby 2000) könnte anschließend das Expressionsmuster genauer untersucht werden.

Die Gruppe der präferentiell Epidermis exprimierten Gene liegt am Ende des oberen Bereichs der Ausgleichsgeraden in Abb. 16. Hierunter befinden sich keine Gene, deren Expressionsmuster bereits in der Literatur beschrieben wurde wie z.B. LTP1 (Thoma *et al.* 1994) oder WAX9D (Pyee und Kolattukudy 1995). Dies kann die schon diskutierten Ursachen (Primerwahl und Auswahl der ESTs auf dem Filter) haben. So konnte ein EST mit Homologie zum Gen WAX9D aus Brokkoli mit zusätzlichen Primern amplifiziert und seine Expression ermittelt werden (vgl. Kap. 3.1.4.4). Sicherlich interessant für weitere Untersuchungen ist das Expressionsverhalten der beiden gefundenen Regulationsproteine G-Box bindendes Protein und Mar Operator Repressor (Kawagoe und Murai 1996, Seoane und Levy 1995), da ihr Expressionsmuster unter Umständen Rückschlüsse über weitere, von ihnen regulierte Gene zuläßt.

Für die Gruppe der vermutlich konstitutiv exprimierten Gene wurde in diesem Experiment lediglich β -Tubulin (Snustad *et al.* 1992) gefunden. Weitere vermutlich konstitutiv exprimierte Gene wie Actin 2 (An *et al.* 1996, McDowell *et al.* 1996), Elongationsfaktor 1 α (Pokalsky *et al.* 1989) oder Cyclophilin (Karrer *et al.* 1995) konnten nicht detektiert werden. Da sie aber auf den Filtern durch ESTs repräsentiert sind (vgl. Kap. 3.1.4.1), wurden sie von dem verwendeten Primerpaar wahrscheinlich nicht amplifiziert.

Allgemein fiel auf, daß offensichtlich deutlich mehr ESTs von präferentiell Mesophyll-exprimierten (98) als Epidermis-exprimierten Genen vorkamen (23, Tab. 4). Diese Befunde deuten daraufhin, daß im Mesophyll mehr spezifische Stoffwechselwege vorhanden sind als in der Epidermis. Diese dürften vor allem im Bereich CO₂-Fixierung und primäre Biosynthesen liegen. So konnten neben zu Photosynthese-assoziierten Genen homologe ESTs auch sechs ESTs gefunden werden, die zu genen homolog sind, die an der Synthese von Aminosäuren bzw. Fettsäuren beteiligt sind (Anhang 2). Worauf allerdings der deutlich unterschiedliche Anteil ESTs unbekannter Funktion im jeweiligen Gewebe zurückzuführen ist, bleibt unklar (54 % der Mesophyll- aber nur 17 % der Epidermis-ESTs, Tab. 4). Durch die fortschreitende Annotation des *A. thaliana*-Genoms können zukünftig auch Homologien zu ESTs mit bislang unbekannter Funktion gefunden und damit das in ihnen enthaltene Potential offengelegt werden.

In diesem die Epidermis und das Mesophyll vergleichenden Experiment wurden zwei Falschpositive gefunden. Zwei der 16 auf diesen Filtern aufgetragenen ESTs des Chlorophyll bindenden Proteins und einer von über 30 ESTs für den Vorläufer der kleinen Rubisco-Untereinheit 3b wurden ausschließlich als aktiv in der Epidermis gefunden. Jedoch zeigte keiner der anderen zu diesen Genen homologen ESTs eine stärkere Aktivität als der doppelte lokale Hintergrund bzw. Unterschiede zwischen den beiden Geweben. Die Transkripte dieser beiden Gene scheinen nicht vom verwendeten AP2-Primer erfaßt worden zu sein. Die drei Falschpositiven sind daher wahrscheinlich Hybridisierungsartefakte. Ein weiterer, genereller Ursprung für falsch positive (und falsch negative) Signale kann die PCR-Reaktion sein. Sie ist anfällig für kleine Mengenunterschiede in der Ausgangskonzentration der cDNA (Liang und

Pardee 1994). Ebenso anfällig ist sie auch für *mispriming* aufgrund der sehr niedrigen Annealingtemperatur von 40°C. Dies kann zu dramatischen Ungleichheiten in den detektierten Expressionsstärken einzelner ESTs führen (Baldwin *et al.* 1999). Dies sind Beispiele dafür, wie wichtig es ist, die gefundenen Ergebnisse mittels einer zweiten, unabhängigen Methode zu überprüfen [beispielsweise spezifische, (semi-) quantitative PCR (vgl. Kap. 3.1.5.3, 3.1.5.4, Al-Taher *et al.* 2000, Johnson *et al.* 2000), Gewebenorthernblots (vgl. Kap. 3.1.5.1), *in situ*-Hybridisierung (Darby 2000)], da bei weitem nicht für alle Gene die Expressionsmuster bekannt sind. Ungewöhnliche Ergebnisse können auch ein Nachsequenzieren des entsprechenden ESTs erforderlich machen, da die Annotation der ESTs durchaus Fehler enthalten kann.

4.2.2.2.3 Vergleich der Genaktivitäten bei Tag/Nacht und in Epidermis/Mesophyll

In der zweiten hochauflösenden Genexpressionsanalyse wurden Epidermis und Mesophyll nicht nur gegen Ende der Licht-, sondern auch am Ende der Dunkelperiode untersucht. Es wurden sechs unterschiedliche *Arbitrary*-Primer in Kombination mit dem Oligo (dT)-Primer VN verwendet. Dabei wurden für jeden *Arbitrary*-Primer zwei Parallelansätze durchgeführt. Dadurch konnten Schwankungen in der Produktausbeute zwischen Proben verschiedener Gewebe/Zeitpunkte ausgeglichen werden (vgl. Kap. 3.1.4.4). Erst nach dem Abgleichen der PCR-Produkte wurden die je 12 unterschiedlichen Proben gemischt und gemeinsam weiterverarbeitet.

Durch den Einsatz der sechs unterschiedlichen *Arbitrary*-Primer konnten mehr Transkripte amplifiziert werden als dies mit nur einem möglich war: Im Vergleich Epidermis- Mesophyll tagsüber ergaben dadurch mehr ESTs Signale (circa 12.000) als bei der ersten Gewebeexpressionsanalyse (circa 2000, vgl. 3.1.4.3). Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit der Theorie nach Bauer und Kollegen (1993), wonach mit mehr Primern auch mehr Transkripte amplifiziert werden. Auch die Zahl der unterschiedlich exprimierten Gene ist im Vergleich zum ersten Versuch erhöht: 200 ESTs sind im Mesophyll stärker exprimiert und 62 in der Epidermis. Dabei verteilen sich die zusätzlichen ESTs ganz unterschiedlich auf die funktionellen Gruppen, ohne daß es zu besonderen Auffälligkeiten kommt (Tab. 5).

Im folgenden werden einige ausgewählte Ergebnisse diskutiert:

Der Vergleich Epidermis/Mesophyll für die Nachtproben zeigte vor allem eine Verringerung der unterschiedlich exprimierten Gene gegenüber den Tagproben (Tab. 6, Tab. 5). Dies betraf vor allem die offensichtlich Epidermis-spezifischen Gene. Im Vergleich zur Epidermis waren nachts im Mesophyll noch elf ESTs aktiv, die zu Genen der Photosynthese homolog sind. Sechs davon zeigten Homologie zu zwei Rubisco-Genen. Auch im Vergleich Mesophyll Nacht/Tag (Tab. 8) konnten nachts noch sechs ESTs mit Homologie zu Photosynthesegenen gefunden werden. Darunter auch zwei Rubisco-Gene, was jedoch nicht überraschend war, da Rubisco-RNA auch nachts vorhanden ist (Giuliano *et al.* 1988, Pilgrim *et al.* 1993). Es kann daher vermutet werden, daß auch weitere für Photosynthesegene kodierende mRNA nachts vorhanden sein könnte. Dies würde das Vorhandensein von mRNA für das Chlorophyll bindende Protein sowie die Photosystem I Reaktionszentrum Untereinheit XI erklären. Auch in den

Gesamtblatthybridisierungen wurde für Rubisco keine lichtabhängige Expression gefunden (vgl. Kap. 3.1.4.1, Tab. 3, Anhang 1).

Der Vergleich Mesophyll Nacht/Tag zeigte nachts deutlich mehr ESTs von Genen (Tab. 8), die am Proteinmetabolismus beteiligt sind. Vor allem ESTs, die homolog sind zu Ubiquitingenen und zu vier Proteasen, hatten eine erhöhte Aktivität. Es scheint, als ob der Proteinabbau nachts verstärkt vor sich ginge (Desprez *et al.* 1998). Es wurden jedoch keine weiteren ESTs gefunden, die zu Genen des Ubiquitinsystem homolog sind. Dieses Ergebnis konnte bei den Hybridisierungen mit Gesamtblatt-RNA jedoch nicht gefunden werden. Scheinbar wurde dieser Effekt durch die Expression dieser Gene in anderen Geweben überdeckt.

Der Vergleich Epidermis/Mesophyll bei Nacht zeigte ein interessantes Bild (Tab. 6, Anhang 4): Der Proteinabbau schien nicht nur zeitlich, sondern auch räumlich reguliert zu sein, denn nur im Mesophyll zeigte sich eine erhöhte Aktivität für ESTs von Genen, die für Ubiquitin und einige Proteasen kodieren. ESTs von Photosynthesegenen wurden ausschließlich im Mesophyll gefunden (vgl. oben), nicht aber in der Epidermis. Ganz allgemein wurden bei Nacht wesentlich mehr Mesophyll- als Epidermis-spezifische ESTs gefunden.

Vergleicht man die Expressionsdaten der Epidermis unter den beiden Lichtbedingungen (Tab. 7), stellt man fest, daß zum einen offenbar die Zellwandbiosynthese tagsüber abläuft. Dies könnte seine Ursache in der Bereitstellung der Zellwandpolysaccharide haben, die letztlich von der lichtabhängigen Photosynthese im Mesophyll abhängig ist. Durch die zusätzlichen fünf *Arbitrary-Primer* (im Vergleich zum ersten Experiment) konnte auch ein EST des Gens WAX9D aus Brokkoli nachgewiesen werden. Dieses Gen ist an der Cutinsynthese beteiligt und Epidermis-spezifisch (Pyee und Kolattukudy 1995), scheint aber nach den vorliegenden Ergebnissen nur bei Licht aktiv zu sein. Zum anderen fällt der zahlenmäßige Unterschied bei ESTs unbekannter Funktion auf: Tagsüber werden sechsmal mehr ESTs gefunden als nachts (bei den ESTs mit bekannter Funktion beträgt der Faktor nur ~2,5). Da es sich um ESTs unbekannter Funktion handelt, ist eine Interpretation dieses Befundes schwierig.

Aus der Gruppe der vermeintlich konstitutiv exprimierten Gene konnte nicht nur β -Tubulin bestätigt werden (vgl. Kap. 3.1.4.4), sondern zusätzlich wurden auch ESTs von Actin 2 und 8 (An *et al.* 1996, McDowell *et al.* 1996) sowie Cyclophilin (Karrer *et al.* 1995) und des Elongationsfaktors 1 α (Pokalsky *et al.* 1989) jeweils in beiden Geweben zu beiden Zeitpunkten als annähernd gleich stark exprimiert gefunden (vgl. Anhang 3-6).

Zum Bestätigen dieser Befunde können die an den entsprechenden Stoffwechselwegen beteiligten Gene einer genaueren Expressionsanalyse mittels einer zweiten, quantitativeren Methode wie z.B. Gewebe-spezifischen *Northernblot* (vgl. Kap. 3.1.5.1, 4.2.3.1), (semi-) quantitative RT-PCR (vgl. Kap. 3.1.5.3, 3.1.5.4, 4.2.3.2, Al-Taher *et al.* 2000, Johnson *et al.* 2000) oder *in situ*-Hybridisierung (Darby 2000) unterzogen werden. Hier zeigt sich noch einmal, wie nützlich ein recht schnelles Vorselektionsverfahren ist, um Anhaltspunkte zu erhalten, welche Stoffwechselwege unter veränderten Bedingungen eventuell betroffen sind.

4.2.2.2.4 Vergleich Gesamtblatt und Epidermis-Mesophyll unter verschiedenen Lichtbedingungen

Im Vergleich Gesamtblatt Nacht/Tag und der Gewebeproben Nacht/Tag fällt auf, daß vergleichsweise wenige Gene unterschiedliche Expressionsmuster im Gesamtblatt zeigten. Nach den Gewebe-spezifischen Hybridisierungen hätte man eine größere Anzahl von Unterschieden erwarten können. Dieses Ergebnis kann so interpretiert werden, daß einige Gewebe-spezifische Effekte im Gesamtblatt durch Effekte in anderen Zelltypen überlagert wurden (vgl. Kap. 3.1.4.5). Andererseits zeigten sich auch im Gesamtblatt Expressionsmuster, die in den Gewebeproben nicht nachgewiesen werden konnten: Phenylalaninammoniumlyase und Transcinnamat-4-Hydroxylase, zwei Gene, die für Enzyme der Flavonoidsynthese kodieren (Schmelzer *et al.* 1988, Wu und Hahlbrock 1992), wurden als tagsüber induziert gefunden. Ihr lichtabhängiges Expressionsmuster entsprach dabei den Literaturdaten (Schmelzer *et al.* 1988, Wu und Hahlbrock 1992). In den Gewebe-spezifischen Hybridisierungen hingegen wurde für die zwei Gene sowohl nachts als auch tagsüber in beiden Gewebearten keine unterschiedliche Expression gefunden. Da die Genaktivitäten, die nach den Hybridisierungen auf den Filtern gefunden wurden, niedrige Werte aufwiesen, ist es möglich, daß beide Transkripte von den Primern nicht amplifiziert wurden. Da Phenylalaninammoniumlyase bereits in epidermalen Zellen von Petersilie nachgewiesen werden konnte (Schmelzer *et al.* 1988, Reinhold und Hahlbrock 1997), hätte man ein ähnliches Expressionsverhalten bei erfolgreicher Amplifikation erwarten können. Die in Gesamtblatthybridisierungen gefundene stärkere Expression des Transkriptionsfaktors L2 bei Nacht konnte ebenfalls nicht in den Gewebe-spezifischen Hybridisierungen nachgewiesen werden. Die recht hohen Aktivitäten des ESTs in allen vier untersuchten Zuständen läßt vermuten, daß das entsprechende Transkript von den Primern erfaßt und amplifiziert wurde. Es ist durchaus denkbar, daß dieser Transkriptionsfaktor in einem hier nicht untersuchten Gewebe eine starke, zeitlich anders regulierte Expression erfährt, so daß sein Expressionsmuster auf Gesamtblattebene anders aussieht.

Bei näherer Betrachtung der (normalisierten) Expressionsstärken fällt auf, daß die Gesamtblatthybridisierungen allgemein niedrigere Genaktivitäten zeigten und die Unterschiede bei den differentiell exprimierten Genen geringer waren als dies für die Gewebehybridisierungen der Fall war (vgl. Anhang 1 und 3-6). In den Gesamtblatthybridisierungen treten keine so starken Unterschiede auf, da viele Zelltyp-spezifische Effekte durch Expressionen in anderen Zelltypen überlagert werden. Zudem hat die PCR die differentielle Genexpression in den Gewebe-spezifischen Hybridisierungen möglicherweise noch verstärkt.

4.2.3 Überprüfen der Arraydaten

Um die Expression der über Gewebe-spezifische Arrayhybridisierungen gefundenen, unterschiedlich exprimierten Gene durch eine zweite, unabhängige Methode zu verifizieren, gibt es gut etablierte Methoden wie beispielsweise *in situ*-Hybridisierung (Darby 2000). Da diese Technik jedoch sehr arbeitsaufwendig und zeitintensiv ist, wurden in dieser Arbeit verschiedene

andere Strategien verfolgt (vgl. Kap. 3.1.5). Als differentiell exprimiertes Gen wurde exemplarisch die kleine Untereinheit von Rubisco gewählt (vgl. Anhang 3 und 4).

4.2.3.1 Gewebenorthernblot

Als erste Methode zum Überprüfen der mittels Arrayhybridisierungen erhaltenen Expressionsmuster sollte ein *Northernblot* mit RNA aus mikrodisektiertem Gewebe (Abb. 19) durchgeführt werden. Um vorab zu zeigen, daß das Einbetten und die Mikrodisektion die Nukleinsäuren nicht zerstören, wurde zunächst eine RT-PCR mit mikrodisektiertem Mesophyll durchgeführt (Abb. 18). Die Doppelbande zeigt, daß nicht nur Produkte, die auf mRNA zurückgehen, sondern auch solche, die genomischen Ursprungs waren, erhalten wurden. Im Unterschied zu den mittels Glaskapillaren gewonnenen Proben waren in den Gewebeproben nicht nur Zellkerne enthalten, sondern deren genomische DNA auch für die PCR zugänglich (Wittcliff *et al.* 2000).

Über die Mikromeißelmethode können vergleichsweise große gleichförmige Gewebebereiche erhalten werden. Haben die Gewebeschnitte eine Dicke, die dem des Zelldurchmessern nahe kommt, kann, ähnlich wie bei Protoplasten, die mRNA nahezu quantitativ (im Gegensatz zur Glaskapillarmethode) erhalten werden. Werden genügend große Gewebebereiche ausgeschnitten und zur Analyse herangezogen, sollte die RNA-Menge für *Northernblot*hybridisierungen ausreichen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf diese Weise Rubisco in Mesophyllproben nachgewiesen (Abb. 19). Offensichtlich waren die bearbeiteten Gewebebereiche nicht immer groß genug gewählt und enthielten teilweise weniger als 150 pg mRNA (vgl. Kap. 4.2.1, Ausubel *et al.* 1995), so daß ein Nachweis durch Hybridisierung nicht in jeder Durchführung möglich war. Aufgrund der kurzen Zeit, die der Mikrodisektor zur Verfügung stand, konnten diese Experimente nicht auf größere Probenmengen und andere Zelltypen wie z.B. die Epidermis ausgeweitet werden. Aber im Gegensatz zur *in situ*-Hybridisierung (Darby 2000) können einmal hergestellte Membranen mehrfach mit unterschiedlichen Sonden hybridisiert werden.

Die Gewebeproben müßten zukünftig vor der Gelelektrophorese noch DNase verdaut werden, um genomische Signale auszuschließen. Durch Komplexierung der divalenten Kationen im Inkubationspuffer mittels EDTA (und Verwendung eines SDS-haltigen Hybridisierungspuffers) interferiert die DNase anschließend nicht mit der DNA-Sonde während der Hybridisierung. Der Einfachheit halber wurde in diesen ersten Versuchen jedoch darauf verzichtet.

4.2.3.2 Semiquantitative und Echtzeit-PCR

Als zweite Methode zum Überprüfen der Arraydaten wurden semiquantitative RT-PCR-Reaktionen (McPherson *et al.* 1996, Passarinho *et al.* 2001) durchgeführt (vgl. Kap. 3.1.5.3, Abb. 20). Das hierfür verwendete Protokoll beruht auf der in Kap. 4.2.1 bereits diskutierten Einzelzell-PCR. Jedoch wurden die Proben nach der reversen Transkription geteilt und ein Teil mit Primern gegen ein (vermeintlich) konstitutiv exprimiertes Gen, der andere mit solchen gegen das zu untersuchende Gen amplifiziert. Da die RNA-Menge in Einzelzellproben nicht bestimmt werden

konnte, wurde auf die Expression des konstitutiven Gens normalisiert (Abb. 20). Als konstitutives Gen wurden der Elongationsfaktor 1α (Pokalsky *et al.* 1989) bzw. Actin 2 (An *et al.* 1996, McDowell *et al.* 1996) gewählt. In weiteren Versuchen wäre es sinnvoll, weitere vermeintlich konstitutive Gene wie z.B. β -Tubulin (Snustad *et al.* 1992) und Cyclophilin (Karrer *et al.* 1995) zur Normalisierung heranzuziehen, um etwaigen Schwankungen in der Expression der konstitutiven Gene entgegenzuwirken. Die Anwendbarkeit eines solchen Protokolls auch auf Einzelzellproben konnte hier anhand des Beispiels der kleinen Untereinheit von Rubisco und Proben aus Epidermis und Mesophyll demonstriert werden (Abb. 20). In den Mesophyllproben konnte nach 35 Zyklen ein Rubisco-Produkt nachgewiesen werden. In den Epidermisproben war dies nicht möglich, obgleich die Signalstärke der konstitutiven Produkte ungefähr gleich war.

Da die Auswertung durch gelelektrophoretisch analysierte Aliquots jedoch nur recht grob ist, wurde hier auch eine Echtzeit-PCR (vgl. Kap. 3.1.5.4, Johnson *et al.* 2000, Al-Taher *et al.* 2000) mit vereinigten Zellproben analog durchgeführt, wobei die Synthese von PCR-Produkten nach jedem PCR-Zyklus bestimmt und auf ein konstitutives Gen normalisiert wurde (Johnson *et al.* 2000). In dem hier beispielhaft durchgeführten Versuch konnte in allen Ansätzen (außer den Negativkontrollen) Produkte für den Elongationsfaktor 1α erhalten werden (Abb. 21). Dies war auch in den Mesophyllproben, die mit Rubisco-Primern amplifiziert wurden, der Fall. In den entsprechenden Epidermisproben konnte keine Fluoreszenzzunahme beobachtet werden. Daraus folgt, daß Rubisco-cDNA mit dem hier verwendeten Schwellenwert nur in Mesophyllproben detektierbar war. Das mit beiden PCR-Methoden erhaltene Expressionsmuster von Rubisco bestätigt die über Arrayhybridisierungen gefundenen Daten.

Nach den hier durchgeführten Arrayhybridisierungen ist Rubisco-mRNA auch nachts im Mesophyll/Blatt vorhanden (vgl. Kap. 3.1.4.1, 3.1.4.4, Anhang 1 und 4). In einer weiteren semiquantitativen RT-PCR wurde dieses Expressionsmuster von Rubisco im Mesophyll bei Tag und Nacht überprüft. Als konstitutives Gen wurde Actin 2 gewählt, welches nach 40 Zyklen zu beiden Zeitpunkten ähnliche Produktmengen hervorbrachte. Rubisco konnte sowohl in den Tag- als auch Nachtproben nach 30 bzw. 35 Zyklen nachgewiesen werden, wobei die Produktmenge in den Tagproben höher war (vgl. Kap. 3.1.5.3). Das Expressionsmuster, welches über Gewebespezifische Arrayhybridisierungen für Rubisco gefunden wurde, konnte bestätigt werden und stimmt auch mit der Literatur überein (Pilgrim und McClung 1993, Giuliano *et al.* 1988).

Beide Protokolle zeigen, daß Einzelzell-RT-PCR nicht nur unter qualitativen Aspekten möglich ist (vgl. Kap. 3.1.3.1), sondern auch quantitativ durchgeführt werden kann. Daher ist sie ein geeignetes Werkzeug, um Daten, die über Gewebespezifische Arrayhybridisierungen gewonnen wurden, zu überprüfen. Durch die gleichzeitige Analyse mehrerer hundert bis zu einigen tausend Genen kann ein schneller Überblick gewonnen werden, welche Gene evt. unterschiedlich exprimiert sind. Diese können nachfolgend über RT-PCR exakter analysiert werden.

4.3 Metabolite

4.3.1 Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Die Analyse von Gewebe-spezifischen Proben mittels GC-MS erbrachte keine zufriedenstellenden Resultate. Zwar konnten verschiedene Metabolite [inklusive Phosphat, welches die Summe allen freien Phosphats und des während der Derivatisierung abgespaltenen Phosphats darstellt (Dr. Ute Rößner, MPI-MP Golm, persönliche Kommunikation), vgl. Kap. 3.2.2] detektiert werden, sie waren aber in allen Proben einschließlich der Negativkontrollen vorhanden. Ihr Vorkommen stellt vermutlich eine Kreuzkontamination aus vorherigen Messungen dar (Dr. Ute Rößner, MPI-MP Golm, persönliche Kommunikation).

Aufgrund der sehr geringen Stoffmengen in den Proben war das Signal/Rausch-Verhältnis relativ klein und etwaige reale Peaks gingen im Hintergrund unter. Daher konnten keine weiteren Metabolite aufgefunden und identifiziert werden.

Abhilfe könnten eventuell umfangreiche Optimierungen wie die Verwendung anderer Säulen und Derivatisierungsreagenzien schaffen. Dadurch könnte der Hintergrund verringert und somit das Signal zu Rausch-Verhältnis erhöht werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die Anwendung des *Single Ion Monitorings*. Hierbei wird nicht der gesamte m/z-Bereich gemessen, sondern nur ein bestimmtes m/z-Verhältnis. Dadurch können pro Zeiteinheit mehr Scans durchgeführt werden, was zu einer bis zu 30-fach höheren Sensitivität führt (Roessner *et al.* 2000). Jedoch geht beim *Single Ion Monitoring* die Multiparallelität und damit der Hauptvorteil der GC-MS verloren. GC-MS scheint somit keine geeignete Methode für die Analyse sehr kleiner Probenmengen zu sein.

Für die Analyse größerer Probenmengen wie Blattgesamtextrakte aus *A. thaliana*-Rosettenblättern hingegen ist GC-MS sehr gut geeignet (vgl. Kap. 3.2.2, Abb. 23). In einer Messung konnten so Aminosäuren, organische Säuren und Zucker analysiert werden. Durch Messung geeigneter Kalibrierkurven konnten exemplarisch einige gefundene Aminosäuren quantifiziert werden (Abb. 23). Hierbei wurde eine ungefähre Übereinstimmung mit Literaturdaten gefunden (Chiang und Dandekar 1995, Sarrobert *et al.* 2000). Auffallend allerdings sind die geringen Mengen der Hauptaminosäuren Glutamin und Threonin. Jedoch gibt es auch in der Literatur beträchtliche Unterschiede, was die Zusammensetzung der freien Aminosäuren anbetrifft (Chiang und Dandekar 1995, Sarrobert *et al.* 2000). Diese könnten durch das Alter der Pflanzen und die Wachstumsbedingungen hervorgerufen werden.

4.3.2 Kapillarelektrophorese

Da GC-MS nicht zur Analyse von (vereinigten) Einzelzellproben geeignet war, wurde für diese Analysen die Kapillarelektrophorese benutzt. Zunächst wurden anorganische Ionen bestimmt.

4.3.2.1 Anorganische Ionen

4.3.2.1.1 Kationenmessungen in Einzelzell- und Gesamtblattproben

Mittels CE wurden zunächst anorganische Kationen in vereinigten Einzelzellproben und in Gesamtblattextrakten bestimmt. Das hierzu benutzte Protokoll konnte schon erfolgreich zur Analyse von K^+ in Proben bestehend aus wenigen Kartoffelepidermiszellen eingesetzt werden (Kehr *et al.* 1999). Erstaunlicherweise ergaben Messungen von Epidermis- und Mesophyllproben von *A. thaliana*-Rosettenblättern eine sehr ähnliche K^+ -Konzentration von circa 25 mM (Abb. 24). Weitere Ionen wie Na^+ , Ca^{2+} oder Mg^{2+} waren in Zellproben nicht reproduzierbar meßbar. Eine Quantifizierung dieser Ionen war auch in Kartoffelzellen nicht möglich (Kehr *et al.* 1999, Dr. Julia Kehr MPI-MP Golm, persönliche Kommunikation). Mittels EDX-Analysen ist es jedoch möglich, Na^+ , Ca^{2+} und weitere Ionen quantitativ zu messen (Malone *et al.* 1991, Fricke *et al.* 1994a). Mit einem Imidazolphosphat-haltigen HGE konnte auch Mg^{2+} in Zellproben durch CE-Messungen bestimmt werden (Bazzanella *et al.* 1998).

Die in beiden Geweben gefundene K^+ -Konzentration war im Vergleich zu Kartoffel und Gerste recht gering. In der Epidermis von Kartoffel wurde eine K^+ -Konzentration von ca. 100 mM mittels CE bestimmt (Kehr *et al.* 1999). Der durch EDX-Analysen ermittelte K^+ -Gehalt in Epidermisproben von Gerste lag zwischen 176 und ca. 220 mM (Malone *et al.* 1991, Fricke *et al.* 1994a-b), in Mesophyllproben bei ca. 200 mM (Fricke *et al.* 1994a) und damit ungefähr achtmal höher als die in dieser Arbeit in *A. thaliana* gemessenen Konzentrationen. K^+ -Messungen mittels CE in Gerstenepidermisproben ergaben sogar- je nach Zelltyp- bis zu 250 mM (Bazzanella *et al.* 1998). Scheinbar gibt es zu den recht hohen artspezifischen Unterschieden bezüglich der K^+ -Konzentration auch Unterschiede, die durch die Meßmethodik verursacht werden. Um dies genauer zu untersuchen, müßten jedoch gezielte Parallelversuche mit beiden Analyseverfahren durchgeführt werden. Für die übrigen drei Kationen lassen sich für *A. thaliana* in beiden Geweben die Konzentrationen nur sehr grob schätzen: Nimmt man ein Probenvolumen von 500 pl (pro Zelle ~100 pl bei 5 vereinigten Zellen) an, so wurden diese für die CE-Messungen $1:10^4$ verdünnt (vgl. Kap. 2.2.3.1). Das LOD für die Standards dieser Ionen lag zwischen 1,87 und 3,26 μM (Tab. 11). Da die drei Ionen nicht gemessen werden konnten, muß ihre Konzentration kleiner als das LOD multipliziert mit der Verdünnung sein: Für Ca^{2+} ergibt sich so eine maximal mögliche Konzentration von unter 18,7 mM, für Mg^{2+} unter 30,9 mM beziehungsweise unter 32,6 mM für Na^+ .

In Gerste wurden Na^+ -Konzentrationen von weniger als 20 mM in beiden Geweben gefunden (Fricke *et al.* 1994a). Ca^{2+} hingegen scheint präferentiell eine höhere Konzentration (37 mM gegenüber 2 mM) in der Epidermis von Gerste aufzuweisen (Fricke *et al.* 1994a, Fricke *et al.* 1996). In der Gerstenepidermis scheint speziell die Ca^{2+} -Konzentration auch stark von der Position der Zelle im Gewebe (Fricke *et al.* 1995) bzw. den Lichtverhältnissen abzuhängen (Fricke *et al.* 1995).

Da die Konzentrationen für die Gesamtextrakte aus Blättern nur auf das Gewicht bezogen werden konnten, nicht jedoch auf das Volumen, ist ein direkter Vergleich mit den Gewebeproben nicht

möglich. Es ist allerdings möglich, die relativen Konzentrationen der Kationen miteinander zu vergleichen. Hierbei fällt auf, daß in den Gesamtblattextrakten im Gegensatz zu den Zellproben Ca^{2+} das Hauption darstellt, gefolgt von K^+ und Mg^{2+} sowie mit größerem Abstand Na^+ . Letzteres scheint quantitativ gesehen keine große Rolle zu spielen. Ähnliche Relationen wurden auch für Gesamtblattextrakte aus Bohne (*Phaseolus vulgare*) und Tomate gefunden (Wignarajah *et al.* 1975, Flores *et al.* 2001). Die Untersuchungen an Gerste ergaben andere Ergebnisse, die aber durch die unterschiedliche Probenaufarbeitung erklärt werden können: Für die Gesamtblattproben verwendeten Fricke und Kollegen abgemessene Blattflächen, die sie ausschnitten, von denen sie die Mittelrippe entfernten, die Zellen durch Zentrifugieren aufbrachen und nur den Überstand analysierten (Fricke *et al.* 1994a). Dadurch wurden nur die freien Ionen (ohne Phloem- und Xylemsaft) gemessen. Die Konzentrationen und die Relationen zueinander spiegeln ungefähr die der Einzelzellmessungen wieder: Für K^+ wurde eine Konzentration zwischen 191 und 206 mM, für Ca^{2+} zwischen 4 und 8 mM gefunden (Fricke *et al.* 1994a). Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen beruhten jedoch auf veraschten Proben und schlossen daher auch die gebundenen Ionen (z.B. Ca^{2+} in der Zellwand, Toru und Masaru 1998, oder Mg^{2+} im Chlorophyll, Walker und Willows 1997) mit ein und haben daher andere Relationen als die Ionen, die in vereinigten Zellproben gefunden wurden.

4.3.2.1.2 Anionenmessungen in Einzelzellproben

Mit der hier verwendeten Methode (Hiissa *et al.* 1999) konnte lediglich ein Anion in vereinigten Zellproben gemessen werden (Abb. 26). Das Puffersystem stellt keine ausreichende Sensitivität bereit, um die Anionenzusammensetzung von verdünnten Zellproben genauer analysieren zu können, weshalb von Optimierungen sowie der Peakidentifikation abgesehen wurde. Vermutlich handelt es sich bei dem einen gefundenen Peak um NO_3^- , welches in Gerstenzellen als Hauptanion identifiziert wurde (Fricke *et al.* 1994, Fricke *et al.* 1994). Bazzanella *et al.* (1998) konnten mit einem ähnlichen Pyromellinsäure enthaltenen HGE Cl^- , SO_4^{2-} und NO_3^- in Aliquots von Einzelzellproben nachweisen. Hierfür verwendeten sie eine Eigenbau-CE, bei der die Verdünnung der Zellprobe deutlich verringert wurde (vgl. Kap. 4.3.2.2, Abb. 5). Da schon die Zuckermessungen nicht die erwarteten Ergebnisse ergaben, wurde auf eine Anwendung der umgebauten CE auf die Analyse von Anionen verzichtet. Zudem ist das Originalprotokoll nicht automatisierbar und deshalb für Routinemessungen ungeeignet.

Das Protokoll nach Shamsi *et al.* (1999), welches indirekte Fluoreszenzdetektion verwendet, könnte die Sensitivität erhöhen, so daß CE-Messungen möglich wären. Andererseits sind Anionen quantitativ über EDX-Analysen bzw. mikrofluorimetrische Enzymtests (NO_3^- durch Nitratreduktaseassay) bestimmbar (Fricke *et al.* 1994a-b), so daß auf eine Detektion mittels CE verzichtet werden kann. Es besteht zumindest bei den Enzymassays ebenfalls der Nachteil, daß sie nicht für Hochdurchsatzmessungen einsetzbar sind.

4.3.2.2 Kohlenhydrate

Verschiedene auf CE basierende Protokolle sind für die Analyse von Zucker-haltigen Proben beschrieben worden (Oefner und Chiesa 1994, Noe *et al.* 1999, El Rassi 1999). Die Schwierigkeit allgemein besteht darin, daß Zucker keine chromophoren Gruppen tragen und daher entweder nach Chelatisierung (Bazzanella und Bächmann 1998, El Rassi 1999), indirekt (Vorndran *et al.* 1992, Klockow *et al.* 1994, Zemmann *et al.* 1997) oder nach Derivatisierung (Chen und Evangelista 1995) detektiert werden müssen. In der vorliegenden Arbeit wurden alle drei Prinzipien auf ihre Anwendbarkeit hinsichtlich der Analyse kleinster Probenmengen getestet.

Mit einem HGE bestehend aus $\text{CuSO}_4/\text{NH}_3$ (Bazzanella und Bächmann 1998), der mit Zuckern stark absorbierende Chelatkomplexe eingeht, konnten die drei Zucker Fruktose, Galaktose und Glukose von Mehrfachzuckern getrennt (Abb. 27B-C) und das LOD mit $50 \mu\text{M}$ bestimmt werden; aber offenbar ist die in den Zellproben vorhandene Konzentration dieser Zucker unterhalb des LOD (Abb. 27D). Der kritische Punkt bei dieser Analyse, im Gegensatz zur Kationenbestimmung, ist die Verdünnung der Proben beziehungsweise die Sensitivität des Detektors. Nimmt man ein durchschnittliches Probenvolumen von 100 pl pro Zelle an und vereinigt 20 Zellen, so ergibt sich ein Verdünnungsfaktor von 2500 bei Aufnahme in $5 \mu\text{l H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$. Daraus folgt, daß die minimale in Zellproben nachweisbare Konzentration 125 mM beträgt. Messungen an Mesophyllzellen von Gerste ergaben, abhängig vom Blattalter, eine Konzentration von $100\text{-}200 \text{ mM}$ Saccharose und weniger als 20 mM Fruktose und Glukose (Koroleva *et al.* 1997, Koroleva *et al.* 1998). In Kartoffelmesophyllzellen wurde unter der Annahme, daß Saccharose der Hauptzucker ist, dessen Konzentration mit 110 mM angegeben (Kehr 1998, Kehr *et al.* 1998, Kehr *et al.* 1999). Für *A. thaliana* liegen bisher keine Literaturdaten vor. Aus den Konzentrationen, die in anderen Pflanzen gefunden wurden, läßt sich ableiten, daß das hier bestimmte LOD im Bereich der biologischen Zuckerkonzentration liegt. Für sichere Bestimmungen wird jedoch ein LOD deutlich unterhalb der zu messenden Konzentrationen benötigt.

Um den Verdünnungsfaktor der Proben senken zu können, wurde die kommerzielle CE dem Protokoll von Lochmann und Kollegen (1998) entsprechend mit einer beweglichen Einlaßseite ausgestattet (Abb. 5). Dadurch war es möglich, die Proben in nur noch $5 \text{ nl H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ abzulegen und einen Verdünnungsfaktor von 2,5 zu erreichen. Das LOD dieser Methode wurde mit $100 \mu\text{M}$ bestimmt und lag damit erstaunlicherweise um den Faktor 2 höher als im Normalmodus. Eine Detektion von Zuckern in vereinigten Zellproben war deshalb trotz der deutlich verringerten Verdünnung nicht möglich (Abb. 28). Im Unterschied zum Originalprotokoll von Lochmann *et al.* (1998) wurde hier ein UV-Detektor mit geringerer Sensitivität verwendet. Jedoch scheint es auch mit einer baugleichen CE Schwierigkeiten zu geben, die publizierte hohe Sensitivität zu erreichen (Dirk Steinhauser, MPI-MP Golm, persönliche Kommunikation). Es bleibt eine offene Frage, wo das LOD in den Messungen des Originalprotokolls lag (Lochmann *et al.* 1998). Da die Autoren lediglich Aliquots von Einzelzellproben verwendet haben, muß es entsprechend niedrig liegen.

Für die verwendete Methode ist lediglich ein generelles LOD für Standards von 50-100 μM publiziert (Bazzanella und Bächmann 1998).

Ein zweiter HGE gekoppelt mit UV-Detektion wurde auf seine Eignung zum Nachweis von Zuckern in sehr kleinen Proben hin getestet. Dieser HGE enthielt als stark absorbierende Substanz Sorbat, so daß über indirekte Absorption Zucker nachgewiesen werden können (Vorndran *et al.* 1992, Klockow *et al.* 1994, Zemann *et al.* 1997). In der Literatur finden sich LODs zwischen 20 μM (Zemann *et al.* 1997) und 290 μM (Klockow *et al.* 1994). Das mit dem hier verwendeten Detektor gefundene LOD lag bei 500 μM und damit deutlich über dem, was erreicht werden könnte. Die gefundenen LODs stehen in guter Übereinstimmung mit der Theorie, daß der direkt Nachweis sensitiver ist als der indirekte (Tab. 1, Baker 1995). Da die gefundene Sensitivität nicht für Zellproben ausreicht, wurde nicht versucht, dieses Protokoll weiter zu optimieren.

Um das LOD zu erhöhen, gibt es die Möglichkeit, andere Detektionsverfahren wie Amperometrie oder Radioaktivität zu nutzen (Baker 1995). Als überaus sensitiv hat sich LIF-Detektion herausgestellt (Tab. 1). Da Kohlenhydrate über keine native Fluoreszenz verfügen, müssen sie derivatisiert werden. Hierzu gibt es eine ganze Reihe von Reagenzien, wie z.B. ANTS, ANDSA, QBQCA (Paulus und Klockow 1996, El Rassi 1997). In dieser Arbeit wurde APTS gewählt, da es durch den zur Verfügung stehenden Argonlaser anregbar ist und das LOD bei 2 pmol Zucker liegt (Evangelista *et al.* 1995). Fruktose und Glukose konnten nur bis zu einer Konzentration von 50 μM sicher identifiziert werden. Der hohe Hintergrund in den Messungen (Abb. 29) machte daher einen Nachweis in Zellproben unmöglich. Er ist allerdings ungewöhnlich hoch für LIF-Detektion (Evangelista *et al.* 1995, Guttman 1997). Da unterschiedliche APTS-Chargen des Herstellers benutzt wurden und alle zum gleichen Ergebnis führten, könnte es sich um eine generelle Verunreinigung des Derivatisierungsmittels handeln. Auch durch die Wahl eines anderen HGE, z.B. MOPS- oder Phosphatpuffer (Chen und Evangelista 1995), könnte der unspezifische Hintergrund eventuell gesenkt werden. Mittels eines He/Cd-Laser könnten andere Derivatisierungsreagenzien wie ANTS oder ANDSA (Paulus und Klockow 1996, El Rassi 1997) getestet werden, die unter Umständen einen geringeren Hintergrund verursachen. Jedoch bringt speziell die Derivatisierung mit ANTS lediglich eine Verbesserung des LOD um den Faktor 10 mit sich (Paulus und Klockow 1996). Besonders 5-Dimethylaminonaphtalen-1-sulfonylhydrazin scheint ein interessantes Reagenz zu sein, da mit ihm bereits Mono- und Disaccharide im amol-Bereich in Tränenflüssigkeit detektiert werden konnten (Perez und Colon 1996). Hier müßten im einzelnen genau Vor- und Nachteile gegeneinander abgewogen werden.

Um die hohen LODs, insbesondere für die auf UV-Detektion beruhenden Methoden, zu umgehen, könnten die Proben in zukünftigen Experimenten aufkonzentriert werden. So kann eine Aufkonzentration von geladenen Analyten direkt in der Trennkapillare vorgenommen werden. Es ist als *Stacking* in mehreren Varianten beschrieben worden (Lee *et al.* 2000, Quirino und Terabe 2000a). In der einfachsten Form wird die Probe in einem schwach leitenden Puffer verdünnt und eine Fokussierung der Analyten erfolgt an der Grenzfläche zwischen diesem Puffer und dem HGE durch den abrupten Unterschied in der elektrophoretischen Beweglichkeit (Lee *et al.* 2000,

Quirino und Terabe 2000a). Mit diesem und anderen Verfahren, wie z.B. *Large Volume Sample Stacking* (Quirino und Terabe 2000a), pH-vermitteltem Phasentransfer (Zhan *et al.* 2000), *Sweeping* (Quirino und Terabe 2000b) oder transienter Isotachophorese (Klunder *et al.* 1998) kann eine Konzentrierung der Proben bis um das 10^6 -fache erreicht werden. Zudem könnte eine Optimierung des CE-Systems, z.B. durch Verwendung einer *Bubble cell*-Kapillare, eine Senkung des LOD ergeben (Hempel 2000). Zusätzliche Methoden sind von Breadmore und Haddad (2000) zusammengefaßt worden. Die so zu erzielenden Konzentrationen könnten eine Messung von Zuckern in Zellproben mit UV- oder LIF-Detektion durchaus erlauben.

4.3.2.3 Aminosäuren

Wie in tierischen Einzelzellproben (Shaner and Brown 2000) kann der Nachweis von Aminosäuren mittels CE auch mit pflanzlichen (Einzel-) Zellproben durchgeführt werden. Dafür sind zwei Protokolle publiziert worden (Lochmann *et al.* 1998, Arlt *et al.* 2001). Ersteres beruht auf UV-Detektion und wurde hier aufgrund der Erfahrungen mit der UV-Detektion von Zuckern nicht angewendet. Vielmehr wurde das zweite Protokoll benutzt, welches von der sehr sensitiven LIF-Detektion Gebrauch macht. Da nur die aromatischen Aminosäuren (Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin) über native Fluoreszenz verfügen (Pinto *et al.* 1997), müssen Aminosäuren derivatisiert werden. Hierzu gibt es eine ganze Reihe von Reagenzien (Blau und Halket 1997). Aufgrund der Anregbarkeit bei 488 nm (passend zum vorhandenen Argonlaser) und des sehr geringen LOD (Cheng und Dovichi 1988, Nouadje *et al.* 1995, Takizawa und Nakamura 1998) wurde FITC zur Derivatisierung verwendet. In Mesophyllproben von Kürbisblättern konnten auf diese Weise zwölf Aminosäuren nachgewiesen werden (Abb. 30, Arlt *et al.* 2001). Obwohl mit Blattextrakten gezeigt werden konnte, daß die Methode prinzipiell auch mit Proben von *A. thaliana*-Blättern arbeitet (Abb. 30), gelang es weder in vereinigten Epidermis- oder Mesophyll-Zellproben Aminosäuren nachzuweisen (Abb. 30). Da offenbar keine Matrixeffekte in den *A. thaliana*-Proben auftraten, liegt die Vermutung nahe, daß sowohl in den Epidermis- als auch in den Mesophyllzellen geringere Konzentrationen an freien Aminosäuren vorliegen als dies z.B. in Kürbis der Fall ist. In der wilden Wassermelone (*Citrullus lanatus*), wie Kürbis zu den *Cucurbitaceae* gehörend, wurde eine freie Aminosäurekonzentration in Blättern von $14,9 \mu\text{mol/g}$ FG gefunden (Kawasaki *et al.* 2000). In *A. thaliana* wurde sie mit $121,6 \mu\text{mol/g}$ Trockengewicht (TG) festgestellt (Chiang und Dandekar 1995). Bei einem angenommenen FG/TG-Verhältnis von 10:1 in Blättern liegen die Konzentrationen an freien Aminosäuren im selben Bereich. Dies würde bedeuten, daß es in *A. thaliana* Zelltypen geben muß, die eine höhere freie Aminosäurekonzentration, verglichen mit Epidermis- und Mesophyllzellen, aufweisen. Die Siebelemente wären ein möglicher Zelltyp, allerdings gibt es bislang keine Untersuchungen über den Aminosäuregehalt im Phloemsaft von *A. thaliana*.

Wie schon bei den Kohlenhydraten, könnte ein Aufkonzentrieren in der Trennkapillare vor der Separation das Problem lösen. Bei einer 10- bis 100-fachen Anreicherung der Aminosäuren sollte eine Detektion auch in *A. thaliana*-Proben möglich sein (Lee *et al.* 2000, Quirino und Terabe

2000a). So konnten Cheng und Dovichi (1988) durch ein optimiertes Verfahren Aminosäuren mit hydrodynamischer Injektion im zmol-Bereich detektieren.

4.3.3 Proteinuntersuchungen

Bekannte Proteine können Gewebe-spezifisch über einen Antikörpernachweis detektiert werden. Dieser kann nach Mikrodissektion, PAGE und *Westernblot* erfolgen (Lottspeich und Zorbas 1998, Ornstein *et al.* 2000). Um die arbeitsaufwendige Mikrodissektion zu umgehen, kann der Antikörpernachweis aber auch direkt in fixierten Gewebeschnitten durch Immunlokalisation erfolgen (Gao und Showalter 2000, Walker *et al.* 2001). Die dritte und schnellste Methode ist der Antikörper-vermittelte Nachweis in direkt auf Membranen transferierten Zellinhalten, die mit Glaskapillaren genommen wurden (Koroleva *et al.* 2000). Hierbei entfällt sowohl das Einbetten und Schneiden als auch die Mikrodissektion. Jedoch bietet die erste Methode die Möglichkeit, auch Isoformen, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit nicht mit Antikörpern unterschieden werden können, in einem zweidimensionalen Gel zu trennen und mit demselben Antikörper nachzuweisen.

Eine zweite Strategie zur Identifizierung von bekannten Proteinen ist die Detektion ihrer tryptischen Fragmente via CE, wobei die Detektion durch die Fluoreszenz der aromatischen Aminosäuren erfolgt. LODs im unteren amol-Bereich konnten erzielt werden (Okerberg und Shear 2001). Um die schwierige Anregung durch Zwei-Photonenexcitation (Okerberg und Shear 2001) zu umgehen, können auch spezifisch die Lysinreste in den Peptidfragmenten mit 5-Furoylquinolin-3-Carboxaldehyd markiert werden. Die LIF-Detektion erfolgt mittels eines herkömmlichen Argonlasers und ähnliche LODs im amol-Bereich konnten erzielt werden (Pinto *et al.* 1997). Jedoch ist diese Methode lediglich für Proteine mit bekanntem Peptidfragmentmuster geeignet.

In dieser Arbeit war es möglich, unbekannte Proteine nachzuweisen. Durch die Mikrodissektion fixierten Gewebes war es möglich, genügend Material zu erhalten, um eine eindimensionale PAGE zur Auftrennung von Proteinen durchzuführen. Je nach Färbemethode konnten bis zu 9 verschiedene Banden in den Proben des mikrodisssektierten Gewebes sichtbar gemacht werden (vgl. Kap. 3.3.2). Auf dem Gel waren keine (kleinen) Abbauprodukte sichtbar. Es könnten wahrscheinlich mehr Proteine nachgewiesen werden, wenn mehr mikrodisssektiertes Gewebe eingesetzt und die darin enthaltenen Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt würden.

Zur Sequenzierung der Proteine wurden die ausgeschnittenen Banden tryptisch verdaut und die erhaltenen Peptide mittels eines Q-TOF-Massenspektrometers sequenziert. Hierbei konnten Sequenzen sowohl von Proteinen der Gesamtextrakte als auch der fixierten, mikrodisssektierten Proben erhalten werden. Es konnten keinerlei Beeinträchtigungen durch das Entwässern, Einbetten, Schneiden oder Mikrodisssektieren gefunden werden.

Die Sequenzen konnten über Datenbanksuche zwei an der Photosynthese beteiligten Proteinen zugeordnet werden: Bande 1 in Abb. 31 konnte als große Untereinheit von Rubisco und Bande 2 als Chlorophyll a/b bindendes Protein identifiziert werden (Abb. 33). Rubisco ist eines der

Hauptproteine in Pflanzen (Voet *et al.* 1999). Dies korreliert auch mit der Menge, in welcher dieses Protein auf den Gelen zu beobachten war. Sowohl in den Gesamtextrakten als auch in den mikrodissektierten Proben war die Rubisco-Bande nach Färbung eine der intensivsten. Auch das Chlorophyll a/b bindende Protein scheint mengenmäßig eines der Hauptproteine darzustellen, da es ebenfalls eine der am intensivsten gefärbten Banden hervorbrachte.

Die in dieser Arbeit angewandte Vorgehensweise ist besonders geeignet für die Identifizierung unbekannter Proteine, da Sequenzinformationen erhalten werden.

4.4 Schlußbetrachtung und Ausblick

Die in dieser Arbeit etablierten Methoden zusammengekommen mit weiteren schon vorhandenen Protokollen z.B. zur Analyse von weiteren Metaboliten (Kehr *et al.* 1999, Korolev *et al.* 2000) und Enzymaktivitäten (Koroleva *et al.* 1997) ermöglichen eine bessere Beschreibung des physiologischen Zustandes von einzelnen Zellen bzw. Geweben. Es ist möglich, das Vorkommen von Transkripten, vielen (vor allem primären) Metaboliten und für bestimmte Synthesen verantwortlichen Enzymen zu untersuchen. Hinzu kommen noch physikalische Methoden, mit denen Parameter wie Turgordruck, Membran- und Wasserpotential (Kehr *et al.* 1999, Tomos und Leigh 1999) oder auch Wachstumsraten (Kehr *et al.* 1998, Schmundt *et al.* 1998) und Chlorophyllfluoreszenz (Snel und Dassen 2000) gemessen werden können. Mit Hilfe aller dieser Werkzeuge kann versucht werden, das Vorkommen von Genexpression(-smustern), Metabolitenkonzentrationen, Proteinen und Enzymaktivitäten sowie Zellwachstum oder Photosyntheseaktivität zu korrelieren (deRisi *et al.* 1997, Nelson *et al.* 2000, Richardson *et al.* 2000). Zusätzlich sollten möglichst auch Stoffflüsse nicht oder minimal invasiv gemessen werden (Meharg 1994, Köckenberger 2001). Durch Integration dieser Befunde können bekannte Stoffwechselwege besser verstanden und bestimmten Zelltypen zugerechnet beziehungsweise bekannten Molekülen neue physiologische Funktionen zugeordnet werden (deRisi *et al.* 1997, Outlaw und Zhang 2001).

Mittels der hier beschriebenen Techniken ist es in Zukunft möglich, nicht nur den Ist-Zustand in Zellen besser als bisher zu beschreiben, sondern auch dynamische Vorgänge *in vivo* zu verfolgen. Da die Analytik von Einzelzellen eine sehr hohe räumliche und zeitliche Auflösung (Korolev *et al.* 2000) ermöglicht, können Vorgänge wie beispielsweise Pathogenbefall von Pflanzen besser verstanden werden. Auch Prozesse in anderen Zelltypen wie Schließ- oder Geleitzellen können durch Anwendung dieser Methoden besser aufgelöst werden. Dies könnte zu neuen physiologischen Erkenntnissen bei Schließzellbewegungen bzw. Phloembe- und entladung führen.

Die rasante Entwicklung von Mikrochips (*Lab on a chip*) zur Analyse kleinster Probenmengen (Gawron *et al.* 2001, Lacher *et al.* 2001) birgt ein großes Potential für die Untersuchung einzelner Zellen, da hier die Verdünnung der Proben keine Rolle mehr spielt. So konnten Aminosäuren, Kohlenhydrate, Nukleinsäuren und andere Substanzen bereits mittels Mikrochips nachgewiesen werden. In Zukunft werden zudem Methoden eine größere Rolle spielen, die

weniger in den Stoffwechsel eingreifen und ein Extrahieren von Zellsaft umgehen. Dabei werden vor allem Sensoren im nm-Bereich entscheidend sein. So wurden bereits optochemische Fasersensoren (Lu und Rosenzweig 2000) und Sensoren, die auf (Antikörper-) beschichteten Nanopartikeln beruhen (Cullum *et al.* 2000, Clark *et al.* 1999), entwickelt. Aufgrund ihrer extrem kleinen Abmessungen dürfte es nicht nur möglich sein einzelne Zellen, sondern sogar subzelluläre Kompartimente zu analysieren. So konnten bereits Toxine, pH-Wert und Ca^{2+} in einzelnen Zellen gemessen werden. Ebenso ist es denkbar, Enzymtests *in vivo* direkt im Gewebe durchzuführen. Hierfür wird ein fluoreszierendes Substrat benötigt (Haugland 1995), welches über eine Sonde mit einem Durchmesser von wenigen Nanometern in die Zielzelle injiziert werden kann (Vo-Dinh *et al.* 2000). Analog könnten so sogar *in vivo*-Lokalisationen von Proteinen vorgenommen werden, wenn mit entsprechenden Antikörpern Antikörpermarker koinjiziert würden, die an der Stelle des Antikörper-Antigen-Komplexes einen unlöslichen Niederschlag bilden (Liddell und Weeks 1996).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Methoden für die Analyse der Genexpression, verschiedener Metabolitenkonzentrationen und dem Vorkommen von Proteinen in einzelnen pflanzlichen Zellen getestet. Dabei wurden zum einen bestehende Methoden für die Einzelzellanalyse auf die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* übertragen. Zum anderen wurden Methoden verfeinert bzw. weiter entwickelt, damit sie auf kleinste Probenmengen, die aus einzelnen Zellen von *A. thaliana* gewonnen wurden, angewendet werden können. Als Zelltyp-spezifische Probennahmemethoden wurden die minimal invasive Glaskapillarmethode sowie eine Methode zur Mikrodissektion eingesetzt, welche die Anreicherung von Material aus eingebettetem Gewebe erlaubt.

Im ersten Teil der Arbeit wurden Strategien zur Analyse von Transkripten erarbeitet. Die ersten Versuche zielten darauf ab, in mit Glaskapillaren genommenen Einzelzellproben verschiedener Gewebeschichten RT-PCR durchzuführen, um spezifische Transkripte nachweisen zu können. Dies gelang für eine Reihe von Genen aus verschiedenen Pflanzenspezies. Dabei konnten sowohl Transkripte stark wie auch schwach exprimierter Gene nachgewiesen werden.

Für die Erstellung von Gewebe-spezifischen Expressionsprofilen war es notwendig, die in vereinigten Zellproben enthaltene mRNA zunächst zu amplifizieren, um eine ausreichende Menge für Arrayhybridisierungen zu erhalten. Vor der Vermehrung wurde die mRNA revers transkribiert. Es wurden daran anschließend verschiedene Amplifikationsstrategien getestet: Die neben *Tailing*, Adapterligation und anderen PCR-basierenden Protokollen getestete *Arbitrary-PCR* hat sich in dieser Arbeit als einfache und einzige Methode herausgestellt, die mit so geringen cDNA-Mengen reproduzierbar arbeitet. Durch Gewebe-spezifische Array-hybridisierungen mit der so amplifizierten RNA konnten schon bekannte Expressionsmuster verschiedener Gene, vornehmlich solcher, die an der Photosynthese beteiligt sind, beobachtet werden. Es wurden aber auch eine ganze Reihe neuer offensichtlich Gewebe-spezifisch exprimierter Gene gefunden. Exemplarisch für die differentiell exprimierten Gene konnte das durch Arrayhybridisierungen gefundene Expressionsmuster der kleinen Untereinheit von Rubisco verifiziert werden. Hierzu wurden Methoden zum Gewebe-spezifischen *Northernblot* sowie semiquantitativer und Echtzeit-Einzelzell-RT-PCR entwickelt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Methoden zur Analyse von Metaboliten einschließlich anorganischer Ionen verwendet. Es stellte sich heraus, daß die multiparallele Methode der Gaschromatographie-Massenspektrometrie keine geeignete Methode für die Analyse selbst vieler vereinigter Zellinhalte ist. Daher wurde auf Kapillarelektrophorese zurückgegriffen. Eine Methode, die mit sehr kleinen Probenvolumina auskommt, eine hohe Trennung erzielt und zudem extrem geringe Detektionslimits besitzt. Die Analyse von Kohlenhydraten und Anionen erfordert eine weitere Optimierung. Über UV-Detektion konnte die K^+ -Konzentration in verschiedenen Geweben von *A. thaliana* bestimmt werden. Sie lag in Epidermis und Mesophyll mit ca. 25 mM unterhalb der für andere Pflanzenspezies (*Solanum tuberosum* und *Hordeum vulgare*) publizierten

Konzentration. Weiter konnte gezeigt werden, daß zwölf freie Aminosäuren mittels einer auf Kapillarelektrophorese basierenden Methode in vereinigten Zellproben von *Cucurbita maxima* identifiziert werden konnten. Die Übertragung der Methode auf *A. thaliana*-Proben muß jedoch weiter optimiert werden, da die Sensitivität selbst bei Laser induzierter Fluoreszenz-Detektion nicht ausreichte.

Im dritten und letzten Teil der Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die die Analyse bekannter wie unbekannter Proteine in Gewebe-spezifischen Proben ermöglicht. Hierzu wurde zur Probennahme mittels mechanischer Mikrodissektion eine alternative Methode zur *Laser Capture Microdissection* verwendet, um aus eingebetteten Gewebeschnitten distinkte Bereiche herauszuschneiden und somit homogenes Gewebe anzureichern. Aus diesem konnten die Proteine extrahiert und über Polyacrylamidgelelektrophorese separiert werden. Banden konnten ausgeschnitten, tryptisch verdaut und massenspektrometrisch die Primärsequenz der Peptidfragmente bestimmt werden. So konnten als Hauptproteine im Mesophyll die große Untereinheit von Rubisco sowie ein Chlorophyll bindendes Protein gefunden werden.

Die in dieser Arbeit entwickelten und auf die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* angewandten Einzelzellanalysetechniken erlauben es in Zukunft, physiologische Prozesse besser sowohl räumlich als auch zeitlich aufzulösen. Dies wird zu einem detaillierteren Verständnis mannigfaltiger Vorgänge in Pflanzen führen.

6 REFERENZEN

- Aarts, M., Dirkse, W., Stiekema, W. und Pereira, A.** (1993) Transposon tagging of a male sterility gene in *Arabidopsis*. *Nature* 36: 715-717.
- Al-Taher, A., Bashein, A., Nolan, T., Hollingsworth, M. und Brady, G.** (2000) Global cDNA amplification combined with real-time RT-PCR: accurate quantification of multiple human potassium channel genes at the single cell level. *Yeast* 17: 201-210.
- Allen, G., Kwak, J., Chu, S., Llopis, J., Tsien, R., Harper, J. und Schroeder, J.** (1999) Cameleon calcium indicator reports cytoplasmic calcium dynamics in *Arabidopsis* guard cells. *Plant J.* 19: 735-747.
- An, Y., McDowell, J., Huang, S., McKinney, E., Chambliss, S. und Meagher, R.** (1996) Strong, constitutive expression of the *Arabidopsis* ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *Plant J.* 10: 107-121.
- Arlt, K., Brandt, S. und Kehr, J.** (2001) Amino acid analysis in five pooled single plant cell samples using capillary electrophoresis coupled to laser-induced fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 926: 319-325.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. und Struhl, K.** (1995): Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley & Sons* New York.
- Baker D.** (1995) Capillary electrophoresis. *John Wiley & Sons* New York.
- Baker, N., Oxborough, K., Lawson, T. und Morison, J.** (2001) High resolution imaging of photosynthetic activities of tissues, cells and chloroplasts in leaves. *J. Exp. Bot.* 52: 615-621.
- Baldwin, D., Crane, V. und Rice, D.** (1999) A comparison of gel-based, nylon filter and microarray techniques to detect differential RNA expression in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 96-103.
- Banks, R., Dunn, M., Forbes, M., Stanley, A., Pappin, D., Naven, T., Gough, M., Harnden, P. und Selby, P.** (1999) The potential use of laser capture microdissection to selectively obtain distinct populations of cells for proteomic analysis - Preliminary findings. *Electrophoresis* 20: 689-700.
- Bauer, D., Müller, H., Reich, J., Riedel, H., Ahrenkiel, V., Warthoe, P. und Strauss, M.** (1993): Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acids Res.* 18: 4272-4280.
- Bazzanella, A. und Bächmann, K.** (1998) Separation and direct UV detection of sugars by capillary electrophoresis using chelation of copper (II). *J. Chromatogr. A* 799: 231-239.
- Bazzanella, A., Lochmann, H., Tomos, D. und Bächmann, K.** (1998) Determination of inorganic cations and anions in single plant cells by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 809: 231-239.
- Bell, A.** (1880) Upon the production of sound by radiant energy. *American Journal of Science* 20: 305-324.
- Belyavski, A., Vinogradova, T. und Rajewsky, K.** (1989) PCR-based cDNA library construction: general cDNA libraries at the level of a few cells. *Nucleic Acids Res.* 17: 2919-2932.
- Benito, E., prins, T. und van Kan, J.** (1996) Application of differential display RT-PCR to the analysis of gene expression in a plant-fungus interaction. *Plant Mol. Biol.* 32: 947-957.
- Bertioli, D., Smoker, M., Brown, A., Jones, M., und Burrows, P.** (1994): A method based on PCR for the construction of cDNA libraries and probes from small amount of tissue. *BioTechniques* 16: 1054-1058.
- Bertioli, D., Schlichter, U., Adams, M., Burrows, P., Steinbiß, H. und Antoniw, J.** (1995): An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 23: 4520-4523.
- Best, C., Gillespie, J., Englert, C., Swalwell, J., Pfeifer, J., Krizman, D. Petricoin, E., Liotta, L., und Emmert-Buck, M.** (2000) New approaches to molecular profiling of tissue samples. *Anal. Cell Pathol.* 20: 1-6.
- Blau, K. und Halket, J.** (1997) Handbook of derivatives for chromatography. *John Wiley & Sons* New York, 2. Auflage.
- Bligny, R. und Douce, R.** (2001) NMR and plant metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 191-196.
- Brady, G., Barbara, M. und Iscove, N.** (1990) Representative in vitro cDNA amplification from individual hemopoietic cells and colonies. *Methods Mol. Cell. Biol.* 2: 17-25..
- Brady, G.** (2000) Expression profiling of single mammalian cells-small is beautiful. *Yeast* 17: 211-217.
- Brandt, S., Kehr, J., Walz, C., Imlau, A., Willmitzer, L. und Fisahn, J.** (1999) A rapid method for detection of plant gene transcripts from single epidermal, mesophyll and companion cells of intact leaves. *Plant J.* 20: 245-250.
- Braune, W., Leman, A. und Taubert, H.** (1991) Pflanzenanatomisches Praktikum I. *Gustav Fischer Verlag* Jena.
- Breadmore, M. und Haddad, P.** (2001) Approaches to enhancing the sensitivity of capillary electrophoresis methods for the determination of inorganic and small organic anions. *Electrophoresis* 22: 2464-2489.
- Brink, S., Fischer, K., Klösgen, R. und Flügge, U.** (1995) Sorting of nuclear-encoded chloroplast membrane proteins to the envelope and the thylakoid membrane. *J. Biol. Chem.* 270: 20808-20815.
- Burns, M., Johnson, B., Brahmasandra, S., Handique, K., Webster, J., Krishnan, M., Sammarco, T., Man, P., Jones, D., Heldsinger, D., Mastrangelo, C. und Burke, D.** (1998) An Integrated Nanoliter DNA Analysis Device. *Science* 282: 484-487

- Chen, F. und Evangelista, R.** (1995) Analysis of mono- and oligosaccharide isomers derivatized with 9-aminopyrene-1,4,6-trisulfonate by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence. *Anal. Biochem.* 230: 273-280.
- Cheng, Y. und Dovichi, N.** (1988) Subattomole amino acid analysis by capillary zone electrophoresis and laser-induced fluorescence. *Science* 242: 562-564.
- Cheng, W., Im Kyung, H. und Chourey, P.** (1996) Sucrose phosphate synthase expression at the cell and tissue level is coordinated with sucrose sink-to-source transitions in maize leaf. *Plant Physiology* 111: 1021-1029.
- Chiang, H. und Dandekar, A.** (1995) Regulation of proline accumulation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh during development and in response to desiccation. *Plant Cell Environ.* 18: 1280-1290.
- Cho, R., Mindrinos, M., Richards, D., Sapolsky, R., Anderson, M., Drenkard, E., Dewdney, J., Reuber, L., Stammers, M., Federspiel, N., Theologis, A., Yang, W., Hubbell, E., Au, M., Chung, E., Lashkari, D., Lemieux, B., Dean, C., Lipshutz, R., Ausubel, F., Davis, R. und Oefner, P.** (1999) Genome-wide mapping with biallelic markers in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genet.* 23: 203-207.
- Clark, H., Kopelman, R., Tjalkens, R. und Philbert, M.** (1999) Optical nanosensors for chemical analysis inside single living cells. 2. Sensors for pH and Calcium and the intracellular application of PEBBLE sensors. *Anal. Chem.* 71: 4837-4843.
- Cooper, T. und Beevers, H.** (1969) Mitochondria and glyoxysomes from castor bean endosperm. *J. Biol. Chem.* 244: 3507-3513.
- Cullum, B., Griffin, G., Miller, G. und Vo-Dinh, T.** (2000) Intracellular measurements in mammary carcinoma cells using fiber-optic nanosensors. *Anal. Biochem.* 277: 25-32.
- Darby, I.** (2000) Methods in Molecular Biology-*In situ* hybridization protocols. Human Press Totowa 2. Aufl.
- DeRisi, J., Penland, L., Brown, P., Bittner, M., Meltzer, P., Ray, M., Chen, Y., Su, Y. und Trent, J.** (1996) Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat. Genet.* 14: 457-460.
- DeRisi, J., Iyer, V. und Brown, P.** (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278: 680-686.
- Desprez, T., Amselem, J., Caboche, M. und Höfte, H.** (1998) Differential gene expression in *Arabidopsis* monitored using cDNA arrays. *Plant J.* 14: 643-652.
- Dietz, K., Schramm, M., Lang, B., Lanzl-Schramm, A., Dürr, C. und Martinoia, E.** (1992) Characterization of the epidermis from barley primary leaves. *Planta* 187: 431-437.
- Dietz, K., Hollenbach, B. und Hellwege, E.** (1994) The epidermis of barley leaves is a dynamic intermediary storage compartment of carbohydrates, amino acids and nitrate. *Physiol. Plant.* 92: 31-36.
- Dixon, A., Richardson, P., Lee, K., Carter, N. und Freeman, T.** (1998) Expression profiling of single cells using 3 prime end amplification (TPEA) PCR. *Nucleic Acids Res.* 26: 4426-4431.
- Dixon, A., Richardson, P., Pinnock, R. und Lee, K.** (2000) Gene-expression analysis at the single-cell level. *Trends Pharmacol. Sci.* 21: 65-70.
- Dresselhaus, T., Lörz, H. und Kranz, E.** (1994) Representative cDNA libraries from few plant cells. *Plant J.* 5: 605-610.
- Duggon, D., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P. und Trent, J.** (1999) Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat. Genet.* 21: 10-14.
- Edwards, J. und Coruzzi, G.** (1990) Cell-specific gene expression in plants. *Annu Rev. Genet.* 24:275-303.
- Edwards, J., Walker, E. und Coruzzi, G.** (1990) Cell-specific gene expression in transgenic plants reveals nonoverlapping roles for chloroplast and cytosolic glutamine synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3459-3463.
- El Rassi, Z.** (1997) Recent developments in capillary electrophoresis of carbohydrate species. *Electrophoresis* 18: 2400-2407.
- El Rassi, Z.** (1999) Recent developments in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography of carbohydrate species. *Electrophoresis* 20: 3134-3144.
- Emmert-Buck, M., Bonner, R., Smith, P., Chuaqui, R., Zhuang, Z., Goldstein, S., Weiss, R. und Liotta, L.** (1996) Laser capture microdissection. *Science* 274: 998-1001.
- Engler, J., deGroot, R., van Montagu, M. und Engler, G.** (2001) In situ hybridization to mRNA of *Arabidopsis* tissue sections. *Methods* 23: 325-334.
- Evangelista, R., Liu, M. und Chen, F.** (1995) Characterization of 9-aminopyrene-1,4,6-trisulfonate-derivatized sugars by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Anal. Chem.* 67: 2239-2245.
- Feinberg, A. und Vogelstein, B.** (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13.
- Fiehn, O., Kopka, J., Dörmann, P., Altmann, T., Trethewey, R. und Willmitzer, L.** (2000). Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat. Biotechnol.* 18: 1157-1161.
- Flores, P., Carvajal, M., Cerda, A. und Martinez, V.** (2001) Salinity and ammonium/nitrate interactions on tomato plant development, nutrition, and metabolites. *J. Plant Nutr.* 24: 1561-1573.

- Fliege, R., Flügge, U., Werdan, K. und Heldt, H.** (1978) Specific transport of inorganic phosphate, 3-phosphoglycerate and triosephosphate across the inner membrane of the envelope in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 502: 232-247.
- Freeman, T., Lee, K. und Richardson, P.** (1999) Analysis of gene expression in single cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 579-582.
- Fricke, W., Leigh, R. und Tomos, D.** (1994a) Concentrations of inorganic and organic solutes in extracts from individual epidermal, mesophyll and bundle-sheath cells of barley leaves. *Planta* 192: 310-316.
- Fricke, W., Pritchard, J., Leigh, R. und Tomos, D.** (1994b) Cells of the upper and lower epidermis of barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves exhibit distinct patterns of vacuolar solutes. *Plant Physiol.* 104: 1201-1208.
- Fricke, W., Leigh, R. und Tomos, D.** (1994c) Epidermal solute concentrations and osmolality in barley leaves studied at the single-cell level. *Planta* 192: 317-323.
- Fricke, W., Hinde, P., Leigh, R. und Tomos, D.** (1995) Vacuolar solutes in the upper epidermis of barley leaves. Intercellular differences follow patterns. *Planta* 196: 40-49.
- Fricke, W., Leigh, R. und Tomos, D.** (1996) The intercellular distribution of vacuolar solutes in the epidermis and mesophyll of barley leaves changes in response to NaCl. *J. Exp. Bot.* 47: 1413-1426.
- Fricker, M. und Oparka, K.** (1999) Imaging techniques in plant transport: meeting review. *J. Exp. Bot.* 50: 1089-1100.
- Fricker, M. und Meyer, A.** (2001) Confocal imaging of metabolism in vivo: pitfalls and possibilities. *J. Exp. Bot.* 52: 631-640.
- Gaedeke, N., Klein, M., Koluksiaoglu, U., Forestier, C., Muller, A., Ansorge, M., Becker, D., Mammun, Y., Kuchler, K., Schulz, B., Müller-Räber, B. und Martinoia, E.** (2001) The *Arabidopsis thaliana* ABC transporter AtMRP5 controls root development and stomata movement. *EMBO J.* 20: 1875-1887.
- Gahan, P.** (1984) Plant histochemistry and cytochemistry: an introduction. *Academic Press* London.
- Gallagher, J., Koroleva, O., Tomos, D., Farrar, J. und Pollock, C.** (2001) Single cell analysis technique for comparison of specific mRNA abundance in plant cells. *J. Plant Physiol.* 158: 1089-1092.
- Gao, M. und Showalter, A.** (2000) Immunolocalization of LeAGP-1, a modular arabinogalactan-protein, reveals its developmentally regulated expression in tomato. *Planta* 210: 865-874.
- Gassen, H., Sachse, G. und Schulte, A.** (1994) PCR: Grundlagen und Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion. *Gustav Fischer Verlag* Stuttgart.
- Gawron, A., Martin, S. und Lunte, S.** (2001) Microchip electrophoretic separation systems for biomedical and pharmaceutical analysis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 14: 1-12.
- Giuliano, G., Hoffman, N., Ko, Kenton, Scolnik, P. und Cashmore, A.** (1988) A light-entrained circadian clock controls transcription of several plant genes. *EMBO J.* 7: 3635-3642.
- Grosset, J., Marty, I., Chartier, Y. und Meyer, Y.** (1990) Messenger RNAs newly synthesized by tobacco mesophyll protoplasts are wound inducible. *Plant. Mol. Biol.* 15: 485-496.
- Guetens, G., Van Cauwenberghe, K., De Boeck, G., Maes, R., Tjaden, U., van der Greef, J., Highley, M., van Oosterom, A. und de Bruijn, E.** (2000) Nanotechnology in bio/clinical analysis. *J. Chromatogr. B* 739: 139-150.
- Guttman, A.** (1997) Analysis of composition by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 763: 271-277.
- Hanson, M. und Köhler, R.** (2001) GFP imaging: Methodology and application to investigate cellular compartmentation in plants. *J. Exp. Bot.* 52: 529-539.
- Haritatos, E., Keller, F. und Turgeon, R.** (1996) Raffinose oligosaccharide concentrations measured in individual cell and tissue types in *Cucumis melo* L. leaves: implications for phloem loading. *Planta* 198: 614-622.
- Harrison, J., Gallagher, J. und Pollock, C.** (1997) A simple and rapid method for the analysis of water-soluble carbohydrates from small segments of cereal leaf tissue. *J. Plant Physiol.* 151: 654-659.
- Haugland, R.** (1995) Detecting enzymatic activity in cells using fluorogenic substrates. *Biotech. Histochem.* 70: 243-251.
- Heiger, D., Herold, M. und Grimm, R.** (1996) Applications of the HP ^{3D}Capillary Electrophoresis system. *Hewlett Packard* Waldbronn.
- Heldt, H. und Heldt, F.** (1999) Pflanzenbiochemie. Spektrum Akad. Verlag Heidelberg, 2. Auflage.
- Hempel, G.** (2000) Strategies to improve the sensitivity in capillary electrophoresis for the analysis of drugs in biological fluids. *Electrophoresis* 21: 691-698.
- Hertzberg, M., Sievertzon, M., Aspeborg, H., Nilsson, P., Sandberg, G. und Lundeberg, J.** (2001) cDNA microarray analysis of small plant tissue samples using a cDNA tag target amplification protocol. *Plant J.* 25: 585-591.
- Henegariu, O., Heerema, N., Dlouhy, S., Vance, G. und Vogt P.** (1997) Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques* 23: 504-511.
- Hiissa, T., Siren, H., Kotiaho, T., Snellman, M. und Häutojarvi, A.** (1999) Quantification of anions and cations in environmental water samples. Measurements with capillary electrophoresis and indirect-UV detection. *J. Chromatogr. A* 853: 403-411.

- Hu, S., Lee, R., Zhang, Z., Krylov, S. und Dovichi, N.** (2001) Protein analysis of an individual *Caenorhabditis elegans* single-cell embryo by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B* 752: 307-310.
- Jacobson, B., Fong, F. und Heath, R.** (1975) Carbonic anhydrase of spinach. *Plant Physiol.* 55: 468-474.
- Johnson, M., Wang, K., Smith, J., Heslin, M. und Diasio, R.** (2000) Quantitation of Dihydropyrimidine Dehydrogenase Expression by Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction. *Anal. Biochem.* 278: 175-184.
- Jorgenson, J. und Lukacs, K.** (1981) Free-zone electrophoresis in glass capillaries. *Clin. Chem.* 27:1551-1553.
- Karley, A., Leigh, R. und Sanders, D.** (2000) Differential ion accumulation and ion fluxes in the mesophyll and epidermis of barley. *Plant Physiol.* 122: 835-844.
- Karrer, E., Lincoln, J., Hogenhout, S., Bennett, A., Bostock, R., Martineau, B., Lucas, W., Gilchrist, D. und Alexander, D.** (1995): In situ isolation of mRNA from individual plant cells: Creation of cell-specific cDNA libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3814-3818.
- Kawagoe, Y. und Murai, N.** (1996) A novel basic region/helix-loop-helix protein binds to a G-box motif CACGTG of the bean seed storage protein b-phaseolin gene. *Plant Sci.* 116: 47-57.
- Kawasaki, S., Miyake, C., Kohchi, T., Fujii, S., Uchida, M und Yokoty, A.** (2000) Responses of wild watermelon to drought stress : Accumulation of an ArgE homologue and citrulline in leaves during water deficits. *Plant Cell Physiol.* 41: 864-873.
- Kehoe, D., Villand, P. und Somerville, S.** (1999) DNA microarrays for studies of higher plants and other photosynthetic organisms. *Trends Plant Sci.* 4: 38-41.
- Kehr, J.** (1998) Mikroanalyse einzelner Zellen und Kompartimente transgener Pflanzen mittels biophysikalischer Methoden. Dissertation, Universität Potsdam.
- Kehr, J., Hustiak, F., Walz, C., Willmitzer, L. und Fisahn, J.** (1998) Transgenic plants changed in carbon allocation pattern display a shift in diurnal growth pattern. *Plant J.* 16: 497-503.
- Kehr, J., Wagner, C., Willmitzer, L. und Fisahn, J.** (1999) Effect of modified carbon allocation on turgor, osmolality, sugar and potassium content, and membrane potential in the epidermis of transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) plants. *J. Exp. Bot.* 50: 565-571.
- Kehr, J.** (2001) High resolution spatial analysis of plant systems. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:197-201.
- Kitchin, P., Szotoryi, Z., Fromholz, C. und Almond, N.** (1990): Avoidance of false positives. *Nature* 344: 201.
- Kiyomiya, S., Nakanishi, H., Uchida, H., Nishiyama, S., Tsukada, H., Ishioka, N., Watanabe, S., Osa, A., Mizuniwa, C., Ito, T., Matsushashi, S., Hashimoto, S., Sekine, T., Tsuji, A. und Mori, S.** (2001) Light activates H₂O₁₅ flow in rice: Detailed monitoring using a positron-emitting tracer imaging system (PETIS). *Physiol. Plant.* 113: 359-367.
- Kleber-Janke, T. und Krupinska, K.** (1997) Isolation of cDNA clones for genes showing enhanced expression in barley leaves during dark-induced senescence as well as during senescence under field conditions. *Planta* 203: 332-340.
- Klockow, A., Paulus, A., Figueiredo, V., Amado, R. und Widmer, H.** (1994) Determination of carbohydrates in fruit juices by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 680: 187-200.
- Klunder, G., Andrews, J., Church M., Spear, J., Russo, R., Grant, P. und Andresen, B.** (1998) Nuclear fission product analysis using capillary separation techniques. *J. Radioanal. Nucl. Chem* 236: 149-153.
- Knoblauch, M., Hibberd, J., Gray, J. und Bel, A.** (1999) Galinstan expression femtosyringe for microinjection of eukaryotic organelles and prokaryotes. *Nature Biotech.* 17: 906-909.
- Kochian, L., Shaff, J., Kuehtreiber, W., Jaffe, L. und Lucas W.** (1992) Use of an extracellular, ion-selective, vibrating microelectrode system for the quantification of potassium, proton, and calcium positive fluxes in maize roots and maize suspension cells. *Planta* 188: 601-610.
- Köckenberger, W.** (2001) Nuclear magnetic resonance micro-imaging in the investigation of plant cell metabolism. *J. Exp. Bot.* 52: 641-652.
- Koltai, H. und McKenzie Bird, D.** (2000) High throughput cellular localization of specific plant mRNAs by liquid-phase in situ reverse transcription-polymerase chain reaction of tissue sections. *Plant Physiol.* 123: 1203-1212.
- Kopka, J., Provart, N. und Müller-Röber, B.** (1997) Potato guard cells respond to drying soil by a complex change in the expression of genes related to carbon metabolism and turgor regulation. *Plant J* 11: 871-882.
- Korolev, A., Tomos, D., Bowtell, R. und Farrer, J.** (2000) Spatial and temporal distribution of solutes in the developing carrot taproot measured at single cell resolution. *J. Exp. Bot.* 51: 567-577.
- Koroleva, O., Farrar, J., Tomos, D. und Pollock, C.** (1997) Patterns of solute in individual mesophyll, bundle sheath and epidermal cells of barley leaves induced to accumulate carbohydrate. *New Phytol.* 136: 97-104.
- Koroleva, O., Farrar, J., Tomos, D. und Pollock, C.** (1998) Carbohydrates in individual cells of epidermis, mesophyll and bundle sheath in barley leaves with changed export or photosynthetic rate. *Plant Physiol.* 118: 1525-1532.

- Koroleva, O., Tomos, D., Farrar, J., Roberts, P. und Pollock, C.** (2000) Tissue distribution of primary metabolism between epidermal, mesophyll and parenchymatous bundle sheath cells in barley leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* 27: 747-755.
- Kuzmin, S., Mikichur, N., Naumova, L. und Sandakhchiev, L.** (1973) Optical density measurements of ultramicrovolumes of liquid. *Anal. Biochem.* 54: 234-238.
- Kyozuka, J., Konishi, S., Nemoto, K., Izawa, T. und Shimamoto, K.** (1998) Down-regulation of *RFL*, the *FLO/LFY* homolog of rice, accompanied with panicle branch initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 : 1979-1982.
- Kwok, S. und Higuchi, R.** (1989): Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339: 237-238.
- Lacher, N., Garrison, K., Martin, S. und Lunte, S.** (2001) Microchip capillary electrophoresis/electrochemistry. *Electrophoresis* 22: 2526-2536.
- Lambolez, B., Audinat, E., Bochet, P. und Rossier, J.** (1995): Patch-clamp recording and RT-PCR on single cells. *Neuromethods* 26: 193-231.
- Lau, S., Zaccardo, F., Little, M. und Banks, P.** (1998) Nanomolar derivatizations with 5-carboxyfluorescein succinimidyl ester for fluorescence detection in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 809: 203-210.
- Lee, J., Coi, O., Jung, H., Kim, K. und Chung, D.** (2000) Capillary electrophoresis of nonprotein and protein amino acids without derivatization. *Electrophoresis* 21: 930-934.
- Leidreiter, K., Kruse, A., Heineke, D., Robinson, D. und Heldt, H.** (1995) Subcellular volumes and metabolite concentrations in potato (*Solanum tuberosum* cv. Désirée) leaves. *Bot. Acta* 108: 439-444.
- Lennon, G. und Lehrach, H.** (1991) Hybridization analyses of arrayed cDNA libraries. *Trends in Genetics* 7: 314-317.
- Leshem, Y. und Pinchasov, Y.** (2000) Non-invasive photoacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content stoichiometry during the ripening of strawberries *Fragaria ananassa* (Duch.) and avocados *Persea americana* (Mill.). *J. Exp. Bot* 51: 1471-1473.
- Li, S., Santini, J., Nicolaou, O. und Parish, R.** (1996) A novel myb-related gene from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 379: 117-121.
- Liang, P. und Pardee, A.** (1992): Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971.
- Liang, P. und Pardee, A.** (1994) Differential Display of mRNA by PCR. In Ausubel *et al.* 1995: 15.8.1-15.8.8.
- Lichtenthaler, H. und Babani, F.** (2000) Detection of photosynthetic activity and water stress by imaging the red chlorophyll fluorescence. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 889-895.
- Liddell, E. und Weeks, I** (1996) Antikörper-Techniken. *Spektrum Akademischer Verlag* Heidelberg.
- Lisitsyn, N., Lisitsyn, N. und Wigler, M.** (1993) Cloning the differences between two complex genomes. *Science* 259: 946-951.
- Lochmann, H., Bazzanella, A. und Bächmann, K** (1998) Analysis of solutes and metabolites in single plant cell vacuoles by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 817: 337-343.
- Lochmann, H., Bazzanella, A., Kropsch, S. und Bächmann, K.** (2001) Determination of tobacco alkaloids in single plant cells by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 917: 311-317.
- Lockhart, D. und Winzeler, E.** (2000) Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 405: 827-836.
- Lottspeich, F. und Zorbas, H.** (1998) Bioanalytik. *Spektrum Akademischer Verlag* Heidelberg.
- Lu, J. und Rosenzweig, Z.** (2000) Nanoscale fluorescent sensors for intracellular analysis. *Fresenius J. Anal. Chem.* 366: 569-575.
- Luce, M. und Burrows, P.** (1998) Minimizing false positives in Differential Display. *Biotechniques* 24: 766-770.
- Luo, L., Salunga, R., Guo, H., Bittner, A., Joy, K., Galindo, J., Xiao, H., Rogers, K., Wan, J., Jackson, M. und Erlander, M.** (1999) Gene expression profiles of laser-captured adjacent neuronal subtypes. *Nature Med.* 5: 117-122.
- Lüttge, U., Kluge, M. und Bauer, G.** (1999) Botanik. *Wiley-VCH Verlag* Weinheim, 3. Auflage.
- Macnicol, P.** (1976) Rapid metabolic changes in the wounding response of leaf discs following excision. *Plant Physiol.* 57: 80-84.
- Malhotra, K., Foltz, L., Mahoney, W. und Schueler, P.** (1998) Interaction and effect of annealing temperature on primers used in the differential display RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 26: 854-856.
- Malone, M., Leigh, R. und Tomos, D.** (1989) Extraction and analysis of sap from individual wheat leaf cells: The effect of sampling speed on the osmotic pressure of extracted sap. *Plant Cell Environ.* 12: 919-926.
- Malone, M., Leigh, R. und Tomos, D.** (1991) Concentrations of vacuolar inorganic ions in individual cells of intact wheat leaf epidermis. *J. Exp. Bot.* 42: 305-309.
- Mancuso, S., Papesch, G. und Marra, A.** (2000) Apolarographic, oxygen-selective, vibrating-microelectrode system for the spatial and temporal characterisation of transmembrane oxygen fluxes in plants. *Planta* 211: 384-389.
- Martel, R., Cloney, L., Pelcher, L. und Hemmingsen, S.** (1990) Unique composition of plastid chaperonin-60: α and β polypeptide-encoding genes are highly divergent. *Gene* 94: 181-187.

- Martinoia, E., Heck, U. und Wiemken, A.** (1981) Vacuoles as storage compartments for nitrate in barley leaves. *Nature* 289: 292-294.
- McAinsh, M., Brownlee, C. und Hetherington, A.** (1990) Abscisic acid-induced elevation of guard cell cytosolic Ca²⁺ precedes stomatal closure. *Nature* 343: 186-188.
- McDowell, J., Huang, S., McKinney, E., An, Y. und Meagher, R.** (1996) Structure and evolution of the actin gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 142: 587-602.
- McPherson, M., Quirke, P. und Taylor, G.** (1996) PCR 1: A practical approach. *Oxford University Press* Oxford.
- Meharg, A.** (1994) A critical review of labelling techniques used to quantify rhizosphere carbon-flow. *Plant Soil* 166: 55-62.
- Menke, U. und Müller-Röber, B.** (2001) RNA fingerprinting of specific plant cell types: Adaptation to plants and optimization of RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR). *Plant Mol. Biol. Rep.* 19: 33-48.
- Metzler, A., Izquierdo, M., Ziegler, A., Köckenberger, W., Komor, E., Vonkienlin, M., Haase, A. und Decorps, M.** (1995) Plant histochemistry by correlation peak imaging. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 9: 11912-11915.
- Meyer, A. und Fricker, M.** (2000) Direct measurement of glutathione in epidermal cells of intact *Arabidopsis* roots by two-photon scanning microscopy. *J. Microsc.* 198: 174-181.
- Mikichur, N., Sandakhchiev, L. und Shchelkunov, S.** (1976) Analysis of the enzymatic activity of individual subcellular particles of *Acetabularia mediterranea*. *Anal. Biochem.* 71: 1-5.
- Millar, A., Clemens, S., Zachgo, S., Giblin, M., Taylor, D. und Kunst, L.** (1999) CUT1, an *Arabidopsis* gene required for cuticular wax biosynthesis and pollen fertility, encodes a very-long-chain fatty acid condensing enzyme. *Plant Cell* 11: 825-838.
- Miller, A., Cookson, S., Smith, S. und Wells, D.** (2001) The use of microelectrodes to investigate compartmentation and the transport of metabolized inorganic ions in plants. *J. Exp. Bot.* 52: 541-549.
- Mohr, H. und Schopfer, P.** (1992) Pflanzenphysiologie. *Springer Verlag* Heidelberg, 4. Auflage.
- Mohr, S., Cullen, P., Schmidt, R., Cignarella, A. und Assmann, G.** (1997) Avoidance of false positives in PCR-based mRNA differential display during investigation of nonstandardized tissues or cells. *Clinical Chem.* 43: 182-186.
- Murata, Y., Pei, Z., Mori, I. und Schroeder, J.** (2001) Abscisic acid activation of plasma membrane Ca²⁺ channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants. *Plant Cell* 13: 2513-2523.
- Mustardy, L., Cunningham, F. und Gantt, E.** (1990) Localization and quantification of chloroplast enzymes and light-harvesting components using immunocytochemical methods. *Plant Physiol.* 94: 334-340.
- Nelson, P., Han, D., Rochon, Y., Corthals, G., Lin B., Monson, A., Nguyen, V., Franza, B., Plymate, S., Aebersold, R. und Hood, L.** (2000) Comprehensive analyses of prostate gene expression: Convergence of expressed sequence tag databases, transcript profiling and proteomics. *Electrophoresis* 21: 1823-1831.
- Newman, T., Debruijn, F., Green, P., Keegstra, K., Kende, H., McIntosh, L., Ohlrogge, J., Raikhel, N., Somerville, S., Thomashow, M., Retzel, E. und Somerville, C.** (1994) Genes galore: a summary of the methods for accessing the results of large scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis thaliana* cDNA clones. *Plant Physiol.* 106: 1241-1255.
- Noe, C., Lachmann, B., Möllenbeck, S. und Richter, P.** (1999) Determination of reducing sugars in selected beverages by capillary electrophoresis. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 208: 148-152.
- Nouadje, G., Nertz, M., Verdegue, P. und Couderc, F.** (1995) Ball-lens laser-induced fluorescence detector as an easy-to-use highly sensitive detector for capillary electrophoresis. Application to the identification of biogenic amines in dairy products. *J. Chromatogr. A* 717: 335-343.
- O'Dell, D., Raghupathi, R., Crino, P., Morrison, B., Eberwine, J. und McIntosh, T.** (1998) Amplification of mRNAs from single, fixed, TUNEL-positive cells. *BioTechniques* 25: 566-569.
- Oefner, P. und Chiesa, C.** (1994) Capillary electrophoresis of carbohydrates. *Glycobiology* 4: 397-412.
- Okerberg, E. und Shear, J.** (2001) Attomole-level protein fingerprinting based on intrinsic peptide fluorescence. *Anal. Chem.* 73: 1610-1613.
- Olefirowicz, T. und Ewing, A.** (1990) Capillary electrophoresis in 2 and 5 µm diameter capillaries: Application to cytoplasmic analysis. *Anal. Chem.* 62: 1872-1876.
- Ornstein, D., Gillespie, J., Paweletz, C., Duray, P., Herring, J., Vocke, C., Topalian, S., Bostwick, D., Linehan, M., Petricoin III, E. und Emmert-Buck, M.** (2000) Proteomic analysis of laser capture microdissected human prostate cancer and *in vitro* prostate cell lines. *Electrophoresis* 21: 2235-2242.
- Outlaw, W. und Lowry, O.** (1977) Organic acid and potassium accumulation in guard cells during stomatal opening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 4434-4438.
- Outlaw, W., Springer, S. und Tarczynski, M.** (1985) Histochemical technique a general method for quantitative enzyme assays of single cell extracts with a time resolution of seconds and a reading precision of femtomoles. *Plant Physiol.* 77: 659-666.
- Outlaw, W. und Zhang, S.** (2001) Single-cell dissection and microdroplet chemistry. *J. Exp. Bot.* 52: 605-614.

- Passarinho, P., Van Hengel, A., Fransz, P. und de Vries, S.** (2001) Expression pattern of the *Arabidopsis thaliana* AtEP3/AtchitIV endochitinase gene. *Planta* 212: 556-567.
- Paulus, A. und Klockow, A.** (1996) Detection of carbohydrates in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 720: 353-376.
- Perez, S. und Colon, L.** (1996) Determination of carbohydrates as their dansylhydrazine derivatives by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis* 17: 352-358.
- Perrot-Rechenmann, C., Joannes, M., Squalli, D. und Lebacq, P.** (1989) Detection of Phosphoenolpyruvate and ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase transcripts in maize leaves by in situ hybridization with sulfonated cDNA probes. *J. Histochem. Cytochem.* 37: 423-428.
- Phillips, J. und Eberwine, J.** (1996) Antisense RNA amplification: A linear amplification method for analyzing the mRNA population from single living cells. *Methods Enzymol.* 10: 283-288.
- Pilgrim, M. und McClung, R.** (1993) Differential involvement of the circadian clock in the expression of genes required for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase synthesis, assembly, and activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 103: 553-564.
- Pinto, D., Arriaga, E., Craig, D., Angelova, J., Sharma, N., Ahmadzadeh, H. und Dovichi, N.** (1997) Picomolar assay of native proteins by capillary electrophoresis precolumn labeling, submicellar separation, and laser-induced fluorescence detection. *Anal. Chem.* 69: 3015-3021.
- Pokalsky, A., Hiatt, W., Ridge, N., Rasmussen, R., Houck, C. und Shewmaker, C.** (1989) Structure and expression of elongation factor 1 α in tomato. *Nucleic Acids Res.* 17: 4661-4674.
- Polle, A.** (1996) Mehler reaction: Friend or foe in photosynthesis. *Bot. Acta* 109: 84-89.
- Ponce, M., Pérez-Pérez, J., Piqueras, P. und Micol, J.** (2000) A multiplex reverse transcriptase- polymerase chain reaction method for fluorescence- based semiautomated detection of gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 211: 606-608.
- Posas, F., Chambers, J., Heyman, J., Hoeffler, J., Nadal, E. und Arino, J.** (2000) The transcriptional response of yeast to saline stress. *J. Biol. Chem.* 23: 17249-17255.
- Post-Beittenmiller, D.** (1996) Biochemistry and molecular biology of wax production. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 405-430.
- Pyee, J. und Kolattukudy, P.** (1995) The gene for the major cuticular wax-associated protein and three homologous genes from broccoli (*Brassica oleracea*) and their expression patterns. *Plant J.* 7: 49-59.
- Quirino, J. und Terabe, S.** (2000a) Sample stacking of cationic and anionic analytes in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 902: 119-135.
- Quirino, J. und Terabe, S.** (2000b) Approaching a million fold sensitivity increase in capillary electrophoresis with direct ultraviolet detection: cation selective injection and sweeping. *Anal. Chem.* 72: 1023-1030.
- Raps, A., Kehr, J., Gugerli, P., Moar, W., Bigler F. und Hilbeck, A.** (2001) Immunological analysis of phloem sap of *Bacillus thuringiensis* corn and of the nontarget herbivore *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphidae) for the presence of Cry1Ab. *Mol. Ecol.* 10: 525-533.
- Raschke, K. und Hedrich, R.** (1988) Patch clamp measurements on isolated guard cell protoplasts and vacuoles. *Methods Enzymol.* 174: 312-329.
- Reinhold, S. und Hahlbrock, K.** (1997) *In situ* localization of phenylpropanoid biosynthetic mRNAs and proteins in parsley (*Petroselinum crispum*). *Bot. Acta* 110: 431-443.
- Renner, C., Trümper, L., Pfitzenmeier, J., Loftin, U., Gerlach, K., Stehle, I., Wadle, A. und Pfreundschuh, M.** (1998) Differential mRNA display at the single cell level. *BioTechniques* 24: 720-723.
- Reymond, P., Weber, H., Damond, M. und Farmer, E.** (2000) Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 707-719.
- Richardson, P., Dixon, A., Lee, K., Bell, M., Cox, P., Williams, R., Pinnock, R. und Freeman, T.** (2000) Correlating physiology with gene expression in striatal cholinergic neurons. *J. Neurochem.* 74: 839-846.
- Richert, J., Kranz, E., Lörz, H. und Dresselhaus, T.** (1996) A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for gene expression studies at the single cell level. *Plant Sci.* 114: 93-99.
- Roelfsema, R., Steinmeyer, R., Staal, M. und Hedrich, R.** (2001) Single guard cell recordings in intact plants: light-induced hyperpolarization of the plasma membrane. *Plant J.* 26: 1-13.
- Roessner U., Wagner C., Kopka J., Trethewey R. und Willmitzer L.** (2000). Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *Plant J.* 23:131-142.
- Roessner, U., Luedemann, A., Brust, D., Fiehn, O., Linke, T., Willmitzer, L. und Fernie, A.** (2001) Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. *Plant Cell.* 13: 11-29.
- Röntgen, C.** (1881) Über Töne, welche durch intermittierende Bestrahlung eines Gases entstehen. *Annalen der Physik und Chemie* 12: 155-159.
- Ross, G. und Serwe, M.** (1998) HP ^{3D}Capillary Electrophoresis system. *Hewlett Packard* Waldbronn.
- Ruan, Y., Gilmore, J. und Conner, T.** (1998) Towards Arabidopsis genome analysis: monitoring expression of 1400 genes using cDNA microarrays. *Plant J.* 15: 821-833.
- Sambrook, J., Fritsch, E. und Maniatis, T.** (1989): Molecular Biology-A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* New York.

- Sarrobert, C., Thibaud, M., Contard-David, P., Gineste, S., Bechtold, N., Robaglia, C. und Nussaume, L.** (2000) Identification of an *Arabidopsis thaliana* mutant accumulating threonine resulting from mutation in a new dihydrodipicolinate synthase gene. *Plant J.* 24: 357-367.
- Sarkar, G. und Sommer, S.** (1990): Shedding light on PCR contamination. *Nature* 343: 27.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. und Brown, P.** (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-470.
- Schena, M., Shalon, D., Heller, R., Chai, A., Brown, P. und Davis, R.** (1996) Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 10614-10619.
- Schenk, P., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J., Richmond, T., Somerville, S. und Maners, J.** (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 11655-11660.
- Schmelzer, E., Jahn, W. und Hahlbrock, K.** (1988) *In situ* localization of light-induced chalcone synthase mRNA, chalcone synthase, and flavonoid end products in epidermal cells of parsley leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2989-2993.
- Schmundt, D., Stitt, M., Jaehne, B. und Schurr U.** (1998) Quantitative analysis of the local rates of growth of dicot leaves at a high temporal and spatial resolution, using image sequence analysis. *Plant Journal.* 16: 505-514.
- Seoane, A. und Levy, S.** (1995) Characterization of MarR, the repressor of the multiple antibiotic resistance (mar) operon in *Escherichia coli*. *J. Bact.* 177: 3414-3419.
- Sgroi, D., Teng, S., Robinson, G., LeVangie, R., Hudson, J. und Elkahoul, A.** (1999) *In vivo* gene expression profile analysis of human breast cancer progression. *Cancer Res.* 59: 5656-5661.
- Shabala, S. und Newman, I.** (1999) Light-induced changes in hydrogen, Calcium, Potassium, and Chloride ion fluxes and concentrations from the mesophyll and epidermal tissues of bean leaves. Understanding the ionic basis of light-induced bioelectrogenesis. *Plant Physiol.* 119: 1115-1124.
- Shamsi, S., Danielson, N. und Warner, I.** (1999) Flavin mononucleotide for indirect laser-induced fluorescence detection of anions separated by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 835: 159-168.
- Shaner, L. und Brown, P.** (2000) Single cell analysis using capillary electrophoresis. *J. Liq Chrom. & Rel Technol* 23: 975-997.
- Simmons, C., Hantke, S., Grant, S., Johal, G. und Briggs, S.** (1998) The maize lethal leaf spot 1 mutant has elevated resistance to fungal infection at the leaf epidermis. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11: 1110-1118.
- Simone, N., Bonner, R., Gillespie, J., Emmert-Buck, M. und Liotta, L.** (1998) Laser-capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis. *Trend Genet.* 14: 272-276.
- Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F. und Bresinsky, A.** (1991) Strasburger-Lehrbuch der Botanik. *Gustav Fischer Verlag* Jena, 33. Auflage.
- Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F. und Bresinsky, A.** (1998) Strasburger-Lehrbuch der Botanik. *Gustav Fischer Verlag* Jena, 34. Auflage.
- Smart, L., Cameron, K. und Bennett, A.** (2000) Isolation of genes predominantly expressed in guard cells and epidermal cells of *Nicotiana glauca*. *Plant Mol. Biol.* 42: 857-869.
- Smith, P., Hammar, K., Porterfield, M., Sanger, R. und Trimarchi, J.** (1999) Self-referencing, non-invasive, ion selective electrode for cell detection of trans-plasma membrane calcium flux. *Microsc. Res. Tech.* 46: 398-417.
- Snel, J. und Dassen, H.** (2000) Measurements of light and pH dependence of single-cell photosynthesis by fluorescence microscopy. *J. Fluorescence* 10: 269-273.
- Snustad, D., Haas, N., Kopczak, S. und Silflow, C.** (1992) The small genome of *Arabidopsis* contains at least nine expressed beta-tubulin genes. *Plant Cell* 4: 549-556.
- Sonnwald, U., Basner, A., Greve, B. und Steup, M.** (1995) A second L- type isozyme of potato glucan phosphorylase: cloning, antisense inhibition and expression analysis. *Plant Mol. Biol.* 27, 567-576.
- Strepp, R., Scholz, S., Kruse, S., Speth, V. und Reski, R.** (1998) Plant nuclear gene knockout reveals a role in plastid division for the homolog of the bacterial cell division protein FtsZ, an ancestral tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 4368-4376.
- Sturtevant, J.** (2000) Applications of differential-display reverse transcription-PCR to molecular pathogenesis and medical mycology. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 408-427.
- Takizawa, K. und Nakamura, H.** (1998) Separation and determination of fluorescein isothiocyanate-labeled amino acids by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Anal. Sci.* 14: 925-928.
- Tirlapur, U. und König, K.** (1999) Near-infrared femtosecond laser pulses as a novel non-invasive means for dye-permeation and 3D imaging of localised dye-coupling in the *Arabidopsis* root meristem. *Plant J.* 20: 363-370.
- Titarenko, E., Rojo, E., Leon, J. und Sanchez-Serrano, J.** (1997) Jasmonic acid-dependent and -independent signaling pathways control wound-induced gene activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 115: 817-826.

- Thimm, O., Essigmann, B., Kloska, S., Altmann, T. und Buckhout, T.** (2001) Response of *Arabidopsis* to iron deficiency stress as revealed by microarray analysis. *Plant Physiol.* 127: 1030-1043.
- Thoma, S., Hecht, U., Kippers, A., Botella, J., De Vries, S. und Sommerville, C.** (1994) Tissue-specific expression of a gene encoding a cell wall-localized lipid transfer protein from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 105: 35-45.
- Tomos, A., Leigh, R., Palta, J. und Williams J.** (1992) Sucrose and cell water relations. In Pollock, C., Farrar, J. und Gordon, J. (Hrsg.) Carbon partitioning within and between organisms. *BIOS Scientific Publishers Oxford*: 71-89.
- Tomos, D., Hinde, P., Richardson, P., Pritchard, J. und Fricke, W.** (1994) Microsampling and measurements of solutes in single cells. In Harris, N. und Oparka, K. (Hrsg.) *Plant Cell Biology-A practical approach. Oxford University Press Oxford*: 297-314.
- Tomos, D. und Leigh, R.** (1999) The pressure probe: a versatile tool in plant cell physiology. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 447-472.
- Tomos, D. und Sharrock, R.** (2001) Cell sampling and analysis (SiCSA): metabolites measured at single cell resolution. *J. Exp. Bot.* 52: 623-630.
- Toru, M. und Masaru, K.** (1998) Boron and Ca²⁺, essential inorganic constituents of pectin polysaccharides in higher plant cell walls. *J. Plant Res.* 111: 179-190.
- Tsutsumi, K., Kagaya, Y., Hidaka, S., Suzuki, J., Tokairin, Y., Hirai, T., Hu, D., Ishikawa, K. und Ejiri, S.** (1994) Structural analysis of the chloroplastic and cytoplasmic aldolase-encoding genes implicated the occurrence of multiple loci in rice. *Gene* 141: 215-220.
- VanGelder, R., Zastrow, M., Yool, A., Dement, W., Barchas, J. und Eberwine, J.** (1990) Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 87: 1663-1667.
- Verscht J, Kalusche B, Köhler J, Köckenberger W, Metzler A, Haase A und Komor E.** (1998) The kinetics of sucrose concentration in the phloem of individual vascular bundles of the *Ricinus communis* seedling measured by nuclear magnetic resonance micro-imaging. *Planta* 205: 132-139.
- Vo-Dinh, T., Alarie, J., Cullum, B. und Griffin G.** (2000) Antibody-based nanoprobe for measurement of a fluorescent analyte in a single cell. *Nature* 18: 764-767.
- Voet, D., Voet, J. und Pratt, C.** (1999) Fundamentals in Biochemistry. *John Wiley & Sons New York*, 3. Auflage.
- Vorndran, A., Oefner, P., Scherz, H. und Bonn, G.** (1992) Indirect UV detection of carbohydrates in capillary zone electrophoresis. *Chromatographia* 33: 163-168.
- Walker, C. und Willows, R.** (1997) Mechanism and regulation of Mg-chelatase. *Biochem. J.* 327: 321-333.
- Walker, R., Chen, Z., Johnson, K., Famiani, F., Tecs, L. und Leegood, R.** (2001) Using immunohistochemistry to study plant metabolism: the examples in plant tissues, and of phosphoenolpyruvate carboxykinase and its possible role in pH regulation. *J. Exp. Bot.* 52: 565-576.
- Wallingford, R. und Ewing, A.** (1988) Capillary electrophoresis with electrochemical detection in 12.7 µm columns. *Anal. Chem.* 60: 1972-1975.
- Wang, E., Miller, L., Ohnmacht, G., Liu, E. und Marincola, F.** (2000) High-fidelity mRNA amplification for gene profiling. *Nat. Biotech.* 18: 457-459.
- Welsh, J., Liu, J. und Efstratiadis, A.** (1990) Cloning of PCR-amplified total complementary DNA construction of a mouse oocyte complementary DNA library. *Genet. Anal.* 7: 5-17.
- Wignarajah, K., Jennings, D. und Handley, J.** (1975) The effect of salinity on growth of *Phaseolus vulgaris* L. II. Effect on internal solute concentration. *Ann. Bot.* 39: 1039-1055.
- Williams, J., Kubelik, A., Livak, K., Rafalski, A. und Tingey, S.** (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Williams, M., Thomas, B., Farrar, J. und Pollock, C.** (1993) Visualizing the distribution of elements within barley leaves by energy dispersive X-ray image maps (EDX maps). *New Phytol.* 125: 367-372.
- Winter, H., Robinson, D. und Heldt, H.** (1993) Subcellular volumes and metabolite concentrations in barley leaves. *Planta* 191: 180-190.
- Winter, H., Robinson, D. und Heldt, H.** (1994) Subcellular volumes and metabolic concentrations in spinach leaves. *Planta* 193: 530-535.
- Wittcliff, J., Kunitake, S., Chu, S. und Travis, J.** (2000) Applications of laser capture microdissection in genomics and proteomics. *Journal of Clinical Ligand Assay* 23: 66-73.
- Wu, S. und Hahlbrock, K.** (1992) In situ localization of phenylpropanoid-related gene expression in different tissues of light- and dark- grown parsley seedlings. *Z. Naturforschung* 47c: 591-600.
- Ying, S. Lui, H., Lin, S. und Chuong, C.** (1999) Generation of full-length cDNA library from single human prostate cancer cells. *BioTechniques* 27: 410-414.
- Zabzdyr, J. und Lillard, S.** (2001) UV- and visible-excited fluorescence of nucleic acids separated by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 911: 269-276.
- Zegzouti, H., Jones, B., Marty, C., Lelivre, J., Latche, A., Pech, J. und Bouzayen, M.** (1997) ER5, a tomato cDNA encoding an ethylene-responsive LEA-like protein: Characterization and expression in response to drought, ABA and wounding. *Plant Mol. Biol.* 35: 847-854.

- Zemann, A., Nguyen, D. und Bonn, G.** (1997) Fast separation of underivatized carbohydrates by coelectroosmotic capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 18: 1142-1147.
- Zhan, W., Wang, T. und Li, S.** (2000) Derivatization, extraction and concentration of amino acids and peptides by using organic/aqueous phases in capillary electrophoresis with fluorescence detection. *Electrophoresis* 21:3593-3599.
- Zhuo, J. und Chua N.** (2000) Chemical- inducible systems for regulated expression of plant genes. *Curr. Opin. Biotech.* 11: 146-151.

Anhang 1

Normalisierte Aktivitäten aller unterschiedlich und einiger gleich exprimierter Transkripte im Gesamtblatt von *A. thaliana*-Rosettenblättern bei Nacht und Tag. Repräsentiert sind sie durch die gefundenen, homologen ESTs. Sortiert sind sie in drei Gruppen nach ihrer Expressionsstärke und innerhalb der Gruppen alphabetisch nach ihrer putativen Funktion. Fragezeichen markieren ESTs ohne Homologie. Es wurden pro Zeitpunkt drei unabhängige Hybridisierungen durchgeführt. Die Durchschnitte der Quotienten (Aktivität_{Nacht/Tag}) sind grau unterlegt. Weitere Erläuterungen vgl. Kap. 3.1.4.1.

EST-Nr.	Nacht 1	Nacht 2	Nacht 3	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Quotient der Durchschnitte	Putative Funktion
118O24T7	0,291322	0,706489	0,595778	3,51323	0,148175	0,17639	0,415235355	?
120O3T7	0,354833	0,295574	0,334086	0,369562	1,11002	0,84765	0,423032284	?
122A12T7	0,489244	0,265047	0,345129	0,445867	0,851932	0,93612	0,492149212	?
122P6T7	0,245011	0,256038	0,359519	0,189959	1,02168	1,09344	0,373335578	?
134I23T7	1,15203	0,647299	0,420491	0,427877	2,1821	3,43106	0,367456779	?
137F22T7	1,49867	1,22674	0,998582	1,13371	2,78359	3,72532	0,487266409	?
160A15T7	0,226196	0,271477	0,1	0,391262	0,369853	0,62058	0,432565387	?
160K24T7	0,1	0,224361	0,495827	0,189542	1,94774	0,45757	0,316083132	?
161P6T7	0,116012	0,279785	0,271647	0,0933483	1,30072	0,79922	0,304311607	?
169N6T7	0,1	0,478953	0,305873	0,195483	1,35556	0,72207	0,38925806	?
177K9T7	0,152161	0,118247	0,123964	0,09686	0,37989	0,38069	0,459942293	?
177M6T7	1,5869	0,878248	0,993452	0,734593	4,45325	6,23442	0,302794639	?
178P2T7	1,02473	1,80287	0,891698	3,33087	1,69609	2,45101	0,497367334	?
180B2T7	0,431954	0,258268	0,371444	0,371389	1,15695	1,59885	0,33949531	?
186J7T7	0,552756	0,31868	0,1	0,29817	1,00915	1,10506	0,402687802	?
222J13T7	0,318185	0,239783	0,196952	0,287801	0,578385	0,74773	0,467755817	?
229P11T7	0,362572	0,392078	0,1	0,498979	0,554573	0,8084	0,45900729	?
240I3T7	0,0661302	0,0748762	0,27043	0,767635	0,0505373	0,1	0,448103695	?
241D5T7	0,478541	0,339928	0,753415	0,588369	1,4465	1,25151	0,478302716	?
62H11T7	0,860229	0,288291	0,558545	0,450424	2,15825	1,32918	0,433501344	?
E11A3T7	0,331617	0,358234	0,546576	0,571972	0,897677	1,13343	0,474986353	?
E11B3T7	0,310425	0,42378	2,54939	0,471911	3,73602	2,38038	0,498397085	?
E5A5T7	0,128673	0,0885659	0,1	0,141907	0,353016	0,21903	0,444342057	?
E6A12T7	1,06805	0,721918	0,80082	0,793801	2,56069	3,6988	0,367316193	?
E7E6T7	0,810574	0,392876	0,538645	0,521047	2,10096	1,53639	0,418934267	?
F2H6T7	0,185413	0,274613	0,1	0,520143	0,331063	0,35633	0,463775821	?
F7E2T7	0,257757	0,350141	0,419102	1,46264	0,487999	0,55686	0,409571939	?
F7E9T7	0,138359	0,20154	0,1	0,764537	0,1	0,14437	0,436014979	?

Anhang 1. Arrayhybridisierungen, Vergleich Gesamtblatt bei Nacht und Tag

EST-Nr.	Nacht 1	Nacht 2	Nacht 3	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Quotient der Durchschnitte	Putative Funktion
G10F4T7	0,171929	0,1	0,1	0,1	0,34789	0,31684	0,486353989	?
G11A9T7	0,1	0,257077	0,279867	0,228963	0,672417	0,39178	0,49255039	?
G3D10T7	0,1	0,0546254	0,173729	0,369272	0,175733	0,17883	0,453630933	?
E2D1T7	0,0311199	0,0685184	0,0824488	0,110298	0,056698	0,65569	0,221331902	ATPase epsilon Untereinheit
242I18T7	0,1	0,218248	1,12636	0,279957	1,84454	1,10081	0,447897828	Auxin-reprimiertes Protein
G8G11T7	0,0935443	0,0807665	0,1	0,101663	0,205541	0,27367	0,472237228	Calcium-abhängige Proteinkinase 19
E2H1T7	0,275055	0,511041	0,353206	0,71393	0,754795	0,85555	0,490175216	Carboanhydrase 2
122N6T7	1,63221	0,930108	1,53533	1,74485	4,55287	5,83279	0,337796844	Chlorophyll a/b bindendes Protein
183O15T7	0,974942	0,405646	0,620952	0,376482	3,50132	4,65224	0,234645972	Chlorophyll a/b bindendes Protein
241G19T7	0,516159	0,341181	0,899373	0,687505	1,49071	1,3981	0,49120757	Chlorophyll a/b bindendes Protein
E12E4T7	3,06504	0,836255	1,59484	1,165	5,19681	5,84813	0,450136119	Chlorophyll a/b bindendes Protein
E2E1T7	1,17984	0,859235	1,68612	1,28091	6,25226	4,63785	0,306070896	Chlorophyll a/b bindendes Protein
E6C11T7	4,54972	1,12768	2,01773	1,63152	8,12296	6,82102	0,464247232	Chlorophyll a/b bindendes Protein
E8C9T7	2,80703	0,836962	1,55155	1,23273	5,81728	5,57797	0,411430965	Chlorophyll a/b bindendes Protein
G5H5T7	0,464891	0,1	0,986931	0,945936	1,78263	1,38709	0,377053379	Chlorophyll a/b bindendes Protein
130E5T7	2,20348	1,09429	1,0463	0,740718	3,79882	4,60157	0,475223572	Chlorophyll a/b bindendes Protein
E1E8T7	3,11309	1,05905	1,05363	1,59091	6,6311	6,33169	0,359068141	Chlorophyll a/b bindendes Protein (LHCP AB 140)
E5D11T7	5,02354	1,60623	3,12473	2,79568	13,2432	12,3473	0,34363553	Chlorophyll a/b bindendes Protein (LHCP AB 140)
E5G8T7	0,117997	0,148905	0,267303	0,192968	0,497439	0,39712	0,491209438	Chlorophyll a/b bindendes Protein CP29
89B10T7	1,93019	1,06039	0,818594	0,656361	6,42178	8,29877	0,247720365	Chlorophyll a/b bindendes Protein des LHC II Typ 1 Vorläufer
E8F3T7	0,835901	0,306536	0,1	0,41573	1,43524	2,0628	0,317452737	Chlorophyll a/b bindendes Protein LHC II Type III
E5F1T7	0,743331	0,244384	0,245259	0,317926	1,25339	2,19787	0,327119436	Chlorophyll a/b bindendes Protein LHCI Type III
196M22T7	0,226164	0,680531	0,503714	2,48522	0,190984	0,3964	0,459027262	Dehydrin
178M4T7	1,98983	1,01803	1,28286	1,24211	3,90247	4,46243	0,446623872	gene M4 protein
121P8T7	0,391628	0,430173	0,1	1,06463	0,632926	0,54429	0,411180365	Glutathionperoxidase
185B10T7	0,23207	0,200906	0,181214	0,179979	0,411503	0,66696	0,488056254	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
172M6T7	0,319897	0,606125	0,949736	0,203229	2,39865	1,53377	0,453558317	Glycin-reiches Protein
181E13T7	0,22126	0,149413	0,187929	0,244858	0,376938	0,56042	0,47250298	hypothetical protein
225A18T7	1,79403	1,78772	6,43123	13,935	2,8662	3,53119	0,492464486	Jasmonat induzierbares Protein
E7G1T7	0,480756	0,253695	0,429717	0,360033	1,18391	0,90647	0,475089944	K Polypeptid (4 kDa) des Photosystem II
178M11T7	1,03914	0,950677	0,765861	1,07591	4,68607	4,67592	0,264006936	Katalase 3
122O2T7	0,285028	0,0973461	0,148736	0,136598	0,733904	0,95455	0,291011101	Lichtsammelkomplex Typ III, LHC II
231J2T7	0,494755	0,394174	0,1	0,596762	0,654244	1,56476	0,351211358	LichtsammelkomplexChlorophyll a/b bindendes Protein
106F16T7	0,508535	0,270718	0,379308	0,244569	1,62168	1,46147	0,348154697	LichtsammelkomplexChlorophyll a/b bindendes Protein
171D5T7	0,538332	0,242481	0,416482	0,405988	1,20243	1,10286	0,441598021	LichtsammelkomplexChlorophyll a/b bindendes Protein
183K19T7	0,48433	0,432251	0,466554	0,526682	1,43655	1,44127	0,406266467	LichtsammelkomplexChlorophyll a/b bindendes Protein
249J10T7	0,738939	0,232497	0,572056	0,49677	1,30598	1,36313	0,487539641	LichtsammelkomplexChlorophyll a/b bindendes Protein
138A20T7	0,497417	0,635678	0,604722	3,30597	0,275135	0,28287	0,449748161	Metallothionein
128N22T7	1,13395	0,444935	0,460888	0,274687	1,83689	3,7695	0,346836642	Phenylalaninammoniumlyase
G4B11T7	0,1	0,181678	0,354862	0,278969	1,34041	0,1	0,37021506	Phosphoglucomutase

A2

7 Anhang

Anhang 1. Arrayhybridisierungen, Vergleich Gesamtblatt bei Nacht und Tag

EST-Nr.	Nacht 1	Nacht 2	Nacht 3	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Quotient der Durchschnitte	Putative Funktion
228L18T7	0,543388	0,234075	0,5616	0,7352	0,507659	1,44539	0,498117176	Photosystem I 9 KDa Protein
E1F6T7	0,389217	0,321455	0,976439	0,484493	2,2497	1,34222	0,41387146	Photosystem I 9 KDa Protein
E12F3T7	0,670601	0,4545	0,926489	0,843938	1,73403	1,90974	0,45715764	Photosystem I Untereinheit PSI-E
135K20T7	0,251823	0,140149	0,194262	0,144022	0,453791	0,83382	0,409485658	Photosystem II
92C3T7	1,20426	1,90281	2,01799	2,67249	4,91999	3,39867	0,466289697	Photosystem II 10 kDa Polypeptide
E5G6T7	0,795658	2,23503	2,41624	3,32543	3,88269	3,73225	0,497874204	Photosystem II 10 kDa Polypeptide
180A24T7	1,74587	0,335389	1,06084	0,744949	4,17348	4,74739	0,32507323	Photosystem II Typ I Chlorophyll a /b bindendes Protein
135G20T7	1,56522	1,11927	0,605818	1,14938	2,93532	3,74836	0,420053976	Photosystem II Typ I Chlorophyll a /b bindendes Protein
156J21T7	2,31604	1,00887	1,1959	1,45427	5,13604	4,95248	0,39165661	Photosystem II Typ I Chlorophyll a /b bindendes Protein
187D7T7	1,91514	0,641206	1,11642	0,392018	4,68497	6,83414	0,308347455	Photosystem II Typ I Chlorophyll a /b bindendes Protein
E11C11T7	1,46905	0,841047	0,819885	0,866851	2,75452	3,174	0,460605021	Protein der inneren Mitochondrienmembran
E12C2T7	0,3193	0,193042	0,1	0,325282	0,92874	0,44276	0,360883458	Proteinkinasehomolog
110I2T7	0,278334	0,375129	0,0898059	0,669925	0,492897	0,33311	0,496861745	Putative Proteinkinase
E2F11T7	0,307924	0,346736	0,35959	0,448602	1,50988	1,62608	0,282949493	Ähnlich einem ribosomalen Protein L18
E1H12T7	0,0986961	0,116954	0,1	0,272577	0,218669	0,15846	0,485836781	RNA Polymerase II Untereinheit 9
178M17T7	0,531886	0,474903	0,360093	0,730179	0,941248	1,29351	0,461015529	S-Adenosylmethionindecaboxylase
240A11T7	0,131199	0,0887907	0,1	0,218488	0,559542	0,1	0,364440509	Trans-cinnamat-4-hydroxylase
201F2T7	0,260988	0,171771	0,440005	0,56906	0,540197	0,68424	0,486627507	Typ 2 Lichtsammelkomplex Chlorophyll a/b bindendes Polypeptid
91D12T7	0,383834	1,29659	0,504401	3,06572	0,598362	0,76029	0,49381618	Ubiquitin-ähnliches Protein
186H11T7	0,243661	0,266674	0,267147	0,394714	0,653506	0,81879	0,416431844	unknown protein
168H2T7	0,496388	1,26701	0,785121	1,39531	0,77589	0,81442	0,853597627	Actin ACT2
192P1T7	0,146905	0,204518	0,204796	0,225595	0,135765	0,18809	1,118181173	β Tubulin
170B22T7	0,191842	0,292448	0,21415	0,300799	0,198492	0,27009	0,907797068	Cyclophilin
232A19T7	1,08574	1,05225	6,63986	7,04892	0,820223	1,06016	0,983038654	Translationsfaktor 1 α
109C13T7	0,77015	0,598626	5,92305	2,29804	0,72694	0,53461	2,048502229	?
111B23T7	1,23538	0,633285	0,621888	0,426461	0,434992	0,26692	2,207201323	?
111M24T7	0,468866	2,29181	0,354447	0,506248	0,534164	0,43526	2,110993198	?
115E7T7	2,08068	0,916082	3,42114	1,74863	0,89627	0,54114	2,014380852	?
120M10T7	0,0721814	1,29153	0,813348	0,235901	0,132355	0,1	4,649293122	?
121B16T7	1,70015	0,533407	0,327836	0,379672	0,250292	0,48899	2,289102025	?
123D12T7	3,34355	4,02985	2,78685	2,8329	1,0598	0,64775	2,237719714	?
150I21T7	1,07957	0,1	0,362768	0,281844	0,385021	0,1	2,011224922	?
194E3T7	2,84898	3,24146	4,23194	3,25054	0,850937	0,73668	2,133536441	?
195K6T7	3,34202	3,61033	4,29481	3,97789	0,905571	0,70367	2,013048564	?
198G3T7	0,143957	0,307035	4,82585	0,533313	0,561592	0,69064	2,955314994	?
206M1T7	1,89927	2,49641	1,03189	1,232	0,897915	0,5546	2,02180504	?
231O19T7	0,225361	0,107615	1,68584	0,241938	0,526419	0,17972	2,129382033	?
245B2T7	7,99447	1,53088	1,71673	1,60214	1,83979	1,89831	2,105163813	?

A3

7 Anhang

Anhang 1. Arrayhybridisierungen, Vergleich Gesamtblatt bei Nacht und Tag

EST-Nr.	Nacht 1	Nacht 2	Nacht 3	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Quotient der Durchschnitte	Putative Funktion
64D8T7	0,630679	11,5209	7,36628	6,16704	1,32873	1,5565	2,156128684	?
65G12T7	2,18915	3,4471	13,7628	0,149223	3,04699	0,97122	4,654919219	?
81D1T7	0,421597	1,76825	1,46229	0,20156	0,580786	0,37085	3,166978121	?
89I24T7	1,22126	1,4662	6,74177	0,0763636	1,58205	0,60263	4,170299945	?
92M11T7	3,06658	1,61407	1,19481	1,01613	0,809002	0,66024	2,364012528	?
98D15T7	8,41705	3,90575	2,76094	4,24756	1,76838	1,1873	2,094021579	?
E7D1T7	0,199862	1,61177	0,356591	0,55491	0,304464	0,1	2,260039359	?
88G19T7	4,85875	0,924868	3,19746	2,57833	0,951888	0,36625	2,304929725	Hitze und Säure-stabiles Phosphoprotein, 28KDa
106L20T7	0,073777	0,359711	0,431802	0,12086	0,0993482	0,1	2,702273084	Hitzeschockprotein 70
196F17T7	4,58956	5,48298	8,03308	6,20609	1,22364	1,59784	2,005591759	hypothetisches Protein
111L20T7	0,475893	6,00818	4,21774	3,10593	0,708147	0,42825	2,52262684	Photosystem I Reaktionszentrum, Untereinheit PSAN
104C2T7	0,381486	0,475877	1,39023	0,124457	0,474461	0,19196	2,841899562	ribosomal protein L19 like
111L8T7	0,124857	0,442012	0,379146	0,126036	0,122752	0,10459	2,677062522	Sulfitreduktasestruktur bei 1,6 Angstrom Auflösung Oxidoreduktase, Sirohäm
91J2T7	0,0791969	0,282601	0,335727	0,0759949	0,0848088	0,08357	2,854369731	Thioredoxin
87E4T7	1,95277	8,16751	7,09213	5,37388	1,36521	0,58796	2,349160262	Transkriptionsfaktor L2

Anhang 2

Normalisierte Aktivitäten aller unterschiedlich und einiger gleich exprimierter Transkripte in vereinigten Zellproben der Epidermis und des Mesophylls von *A. thaliana*-Rosettenblättern. Repräsentiert sind sie durch die gefundenen, homologen ESTs. Sortiert sind sie in drei Gruppen nach ihrer Expressionsstärke und innerhalb der Gruppen alphabetisch nach ihrer putativen Funktion. Fragezeichen markieren ESTs ohne Homologie. Es wurden pro Gewebe drei unabhängige Hybridisierungen durchgeführt. Die Durchschnitte von zwei der drei Quotienten (Aktivität_{Epidermis/Mesophyll}) sind grau unterlegt. Weitere Erläuterungen vgl. Kap. 3.1.4.3.

EST-Nr.	Epidermis 1	Mesophyll 1	Epidermis 2	Mesophyll 2	Epidermis 3	Mesophyll 3	Quotient 1	Quotient 2	Durchschnitt der Quotienten	Putative Funktion
135H3T7	0,1	10,6536	33,7124	234,818	0,1	9,11158	0,009386498	0,010975045	0,010180772	?
220I21T7	0,1	9,00589	23,7701	302,632	0,1	22,4058	0,011103844	0,00446313	0,007783487	?
134I23T7	1,20524	1,71375	0,1	8,63118	0,1	5,43495	0,011585901	0,018399433	0,014992667	?
132P9T7	0,71441	0,597053	0,1	8,52071	0,1	4,50786	0,011736111	0,022183475	0,016959793	?
137C1T7	0,1	0,627113	0,1	8,49352	0,1	2,79281	0,011773682	0,035806231	0,023789956	?
133N11T7	0,1	5,0894	8,8521	151,886	0,1	8,51963	0,019648682	0,011737599	0,01569314	?
H3H12T7	0,1	0,849947	0,1	0,1	0,1	1,88608	0,117654395	0,05302002	0,085337208	?
G7D10T7	0,1	3,56948	13,58	0,1	0,1	2,94475	0,028015285	0,03395874	0,030987013	?
95C9T7	0,1	3,21085	0,1	24,6115	0,1	8,25887	0,031144401	0,012108194	0,021626297	?
248A14T7	0,1	3,534	32,6339	0,1	0,1	10,4282	0,028296548	0,009589383	0,018942965	?
134H20T7	1,03935	24,7799	55,2562	717,076	0,1	17,9067	0,041943269	0,005584502	0,023763885	?
245L12T7	0,1	1,32203	0,1	0,1	0,1	2,13025	0,075641249	0,046942847	0,061292048	?
251P15T7	0,1	1,99587	0,1	0,1	0,1	4,43014	0,050103464	0,02257265	0,036338057	?
F3B6T7	0,1	1,49882	0,1	0,882697			0,066719152	0,113289158	0,090004155	?
247L8T7	0,1	2,23495	11,689	0,1	0,1	4,24682	0,04474373	0,02354703	0,03414538	?
240I7T7	0,1	1,17667	0,1	1,49247			0,084985595	0,067003022	0,075994308	?
249M15T7	0,1	1,46993	0,1	0,1	0,1	0,801445	0,06803045	0,124774626	0,096402538	?
190D1T7	0,1	1,46689	8,83114	0,1	0,1	3,05186	0,068171438	0,032766903	0,05046917	?
187D4T7	0,1	1,45495	11,2717	0,1	0,1	1,85979	0,068730884	0,053769512	0,061250198	?
184K11T7	0,1	1,40048	0,1	0,1	0,1	1,34782	0,07140409	0,074193883	0,072798987	?
242I9T7	0,1	1,36127	0,1	0,543582			0,073460812	0,183964885	0,128712849	?
179O9T7	0,1	1,35709	0,1	0,834381	2,14432	1,39039	0,07368708	0,119849325	0,096768203	?
245N23T7	0,1	2,50479	13,6365	0,1	0,1	5,08971	0,039923507	0,019647485	0,029785496	?
246N12T7	0,1	1,24548	11,0431	0,1	0,1	3,89912	0,08029033	0,025646813	0,052968571	?
H1F11T7	0,1	15,6599	0,1	2,11035			0,006385737	0,047385505	0,026885621	?
245K22T7	0,1	2,30548	21,9625	11,8861	0,1	6,35542	0,043374915	0,015734601	0,029554758	?
246N13T7	0,1	1,1819	10,651	5,40968	0,1	6,32782	0,084609527	0,015803231	0,050206379	?
H1E3T7	0,1	1,17223	0,1	0,1	0,1	1,27259	0,085307491	0,078579904	0,081943697	?

A5

Anhang 2. Arrayhybridisierungen, Vergleich Epidermis-Mesophyll

EST-Nr.	Epidermis 1	Mesophyll 1	Epidermis 2	Mesophyll 2	Epidermis 3	Mesophyll 3	Quotient 1	Quotient 2	Durchschnitt der Quotienten	Putative Funktion
138E13T7	0,1	1,13054	0,1	0,1	0,1	0,721421	0,088453306	0,138615316	0,113534311	?
H1A5T7	0,1	13,1606	0,1	0,918304			0,007598438	0,1088964	0,058247419	?
H8B2T7	0,1	1,06125	7,85947	0,1	0,1	3,99309	0,094228504	0,025043262	0,059635883	?
246G18T7	0,1	2,0169	0,1	0,1	0,1	3,03779	0,04958104	0,032918668	0,041249854	?
244P6T7	0,1	1,47569	15,5206	7,4709	0,1	8,80534	0,06776491	0,011356745	0,039560827	?
251F24T7	0,1	0,985858	2,06082	0,1	0,1	2,10051	0,101434487	0,047607486	0,074520986	?
249E7T7	0,1	1,95544	0,1	2,08897			0,051139386	0,047870482	0,049504934	?
246G20T7	0,1	1,49101	0,1	0,1	0,1	3,44277	0,067068631	0,029046378	0,048057505	?
246G17T7	0,1	2,24534	16,0376	9,12853	0,1	8,05491	0,044536685	0,012414788	0,028475736	?
G9E9T7	0,1	4,99344	0,1	0,594144			0,020026274	0,168309366	0,09416782	?
229E21T7	1,26016	3,78348	10,2165	90,0719	1,78165	33,125	0,113426052	0,05378566	0,083605856	?
E5F3T7	0,1	0,84428	0,1	0,1	0,1	1,03575	0,118444118	0,096548395	0,107496256	?
H4G2T7	0,1	5,89012	0,1	0,701288			0,016977583	0,142594768	0,079786176	?
217O6T7	0,1	0,767076	0,1	0,1	0,1	1,21213	0,130365179	0,082499402	0,10643229	?
246I17T7	0,1	0,983196	0,1	2,12595			0,10170912	0,047037795	0,074373457	?
125L24T7	0,1	0,680525	0,1	0,1	0,1	1,12292	0,146945373	0,089053539	0,117999456	?
120C20T7	0,1	0,67091	1,90215	0,1	0,1	0,835747	0,149051289	0,119653436	0,134352362	?
246M8T7	0,1	0,629935	0,1	0,1	0,1	1,05677	0,158746537	0,09462797	0,126687254	?
197F21T7	0,1	0,567466	0,1	0,1	0,1	1,1802	0,176222012	0,084731401	0,130476706	?
G6H6T7	0,1	3,457	0,1	0,635287			0,028926815	0,157409171	0,093167993	?
122B23T7	0,1	0,495955	0,1	0,1	0,1	0,725486	0,201631196	0,137838635	0,169734916	?
134I18T7	2,60587	12,6156	40,1152	306,978	0,1	57,7905	0,130677768	0,001730388	0,066204078	?
247K8T7	0,1	2,89051	15,5963	6,12286	0,1	8,14627	0,034595971	0,012275557	0,023435764	?
E7H6T7	0,1	1,04848	0,1	0,1	0,1	1,24367	0,095376164	0,080407182	0,087891673	40S ribosomales Protein S12
247A3T7	0,1	1,53329	13,8228	5,49614	0,1	9,50568	0,065219234	0,010520026	0,03786963	AA404382 kommt von diesem Gen
240P4T7	0,1	0,990762	0,1	0,1	0,1	0,99721	0,100932414	0,100279781	0,100606097	Alkoholdehydrogenase Homolog
134I7T7	3,40081	14,6656	44,8974	305,67	0,1	87,1923	0,146881931	0,00114689	0,074014411	Ankyrin Homolog
269D12T7	0,1	1,25937	0,1	0,1	0,1	1,57346	0,079404782	0,063554205	0,071479494	Caltractin
G9G5T7	0,1	3,3788	0,1	0,1	0,1	0,885124	0,029596306	0,112978521	0,071287413	Carboanhydrase
188G1T7	1,45086	1,12182	0,1	12,7705	0,1	5,34455	0,007830547	0,018710649	0,013270598	Carboanhydrase, chloroplastidärer
H2E7T7	0,1	0,97498	7,88048	3,70798	0,1	3,74862	0,102566206	0,026676484	0,064621345	Chloroplasthüllen Ca2+-ATPase Vorläufer
246G5T7	0,1	1,23917	8,82393	0,1	0,1	4,47737	0,080699178	0,02233454	0,051516859	chloroplastidäre Fruktosebisphosphataldolase
178J2T7	3,20068	3,72762	0,1	1,90187	0,1	1,01238	0,05258	0,098777139	0,07567857	ECA Protein 39
134M20T7	1,4637	1,27587	0,1	9,72061	0,1	4,04743	0,01028742	0,024707036	0,017497228	F21B7.31
242P4T7	0,1	1,48273	10,0582	0,1	0,1	3,11814	0,067443162	0,032070401	0,049756782	Glutaminsynthetase
249E23T7	0,1	2,13322	0	3,82779	0,1	2,23547	0,04687	0,0261247	0,03649735	Glycin reiches Protein
204I22T7	0,72415	1,03637	0,1	2,71707	0,1	1,28141	0,036804352	0,078039035	0,057421693	Hauptlatexprotein Typ 1
245B9T7	0,1	0,714617	0,1	0,1	0,1	1,38569	0,139935098	0,072166213	0,106050656	Hetzeschock verwandtes Protein 80
247I5T7	0,1	1,03478	0,1	0,1	0,1	1,60463	0,096638899	0,062319662	0,079479281	HSC70-G7 Protein (Hitzeschockprotein)
170J16T7	0,1	3,4168	0,1	27,8025	0,1	16,0702	0,029267151	0,006222698	0,017744924	Jasmonat induziertes Protein

A6

Z Anhang

Anhang 2. Arrayhybridisierungen, Vergleich Epidermis-Mesophyll

EST-Nr.	Epidermis 1	Mesophyll 1	Epidermis 2	Mesophyll 2	Epidermis 3	Mesophyll 3	Quotient 1	Quotient 2	Durchschnitt der Quotienten	Putative Funktion
220F8T7	0,59105	10,0787	31,5288	384,583	1,33339	27,4519	0,058643377	0,048571866	0,053607621	Kälte und ABA reguliertes Gen
G5F10T7	0,1	2,63317	0,1	0,1	0,1	26,913	0,037977039	0,003715676	0,020846358	Katalase 3
186G10T7	0,1	1,31671	0,1	0,1	0,1	1,48037	0,075946868	0,06755068	0,071748774	kleines GTP-bindendes Protein
246B12T7	0,1	2,51784	16,3071	0,1	0,1	10,0206	0,039716582	0,009979442	0,024848012	L-Ascorbatperoxidase (cytosolisch)
G7B8T7	0,1	2,93789	0,1	0,1	0,1	3,715	0,034038034	0,0269179	0,030477967	Monodehydroascorbatreduktase
H2H12T7	10,3542	12,6446	0,1	6,47447	0,1	2,76937	0,01544528	0,036109296	0,025777288	MRP-ähnlicher ABC Transporter
186G17T7	0,1	1,04599	0,1	0,1	0,1	1,76461	0,095603208	0,056669746	0,076136477	NADH-Glutaminsynthase
249K8T7	1,79462	2,01108	0,1	0,786447	0,1	0,602368	0,12715415	0,166011475	0,146582812	O-acetylserin(thiol)lyase
242N13T7	0,1	1,12986	0,1	0,1	0,1	0,624816	0,088506541	0,160047118	0,124276829	Phospholipidtransferprotein
188I21T7	0,1	0,872738	0,1	0,1	0,1	1,64801	0,114581925	0,060679243	0,087630584	plastidäre Pyruvatkinase
G10A6T7	0,1	5,75798	2,8642	1,14801	0,1	1,27786	0,01736	0,078255834	0,047807917	Proteinkinase ADK1
156F19T7	0,1	1,5086	0,1	0,1	0,1	0,540489	0,066286623	0,185017641	0,125652132	putative beta-Ketoacyl-CoA-Synthase
132O13T7	0,29569	1,05271	2,57862	27,7051	0,1	6,74264	0,093073838	0,014830986	0,053952412	putative Pektinesterase
132O7T7	0,54321	1,01952	0,1	17,8992	0,1	5,37692	0,005586842	0,018598008	0,012092425	Rho-ähnliches GTP bindendes Protein
249E8T7	0,1	1,14087	6,53063	0,1	0,1	3,78619	0,087652406	0,026411775	0,057032091	ribosomales Protein L12
150L7T7	1,18841	1,52272	0,1	1,50239	0,1	1,37533	0,066560613	0,072709822	0,069635218	ribosomales Protein YL16
135H24T7	0,1	0,926531	0,1	0,1	0,1	1,88067	0,10792947	0,05317254	0,080551005	Salzstress induziertes intrinsisches Tonoplastenprotein
157F23T7	0,1	1,99568	0,1	0,1	0,1	3,74294	0,050108234	0,026716966	0,0384126	Ser/Thr Proteinkinase
186F24T7	0,1	1,19609	0,1	0,1	0,1	0,810845	0,083605749	0,123328133	0,103466941	seven in absentia isolog
142E13T7	0,1	4,91156	0,1	0,1	0,1	3,92234	0,02036013	0,025494985	0,022927558	SIEP1L Protein
220E7T7	1,21657	0,1	0,1	9,8441	0,1	3,36733	0,010158369	0,029697119	0,019927744	Thioglukosidglukohydrolase
229E20T7	0,1	2,44073	9,65335	68,9716	1,43461	8,27751	0,040971349	0,173314197	0,107142773	transkriptional kontrolliertes Tumorprotein Homolog
245C12T7	0,1	1,26686	0,1	0,1	0,1	2,17817	0,07893532	0,045910099	0,06242271	Trockenheit induzierte Cysteinproteinase RD19A Vorläufer
251J11T7	0,1	2,37005	5,74617	0,1	0,1	3,4158	0,042193203	0,029275719	0,035734461	Valosin-enhaltendes Protein
G1A11T7	0,1	2,20568	0,1	0,1	0,1	1,79781	0,045337492	0,05562323	0,050480361	Vorläufer der (R)-(+)-Mandelonitrillyase Isoform MDL3
G3H3T7	0,1	2,99531	0,1	0,1	0,1	1,53158	0,033385526	0,065292051	0,049338789	Vorläufer der α Untereinheit eines Rubisco Untereinheit bindenden Proteins
G9F2T7	0,1	7,01276	0,1	0,538369			0,014259721	0,185746208	0,100002964	Vorläufer eines chloroplastidären Hitzeschock involvierten 70 KDa Stromaproteins
G12A7T7	0,1	1,73896	0,1	7,51647			0,057505636	0,013304117	0,035404877	Zellulase
246P8T7	0,1	2,8562	16,8188	5,53088	0,1	12,904	0,035011554	0,007749535	0,021380544	zytologische Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase
179L2T7	0,1	1,55682	5,71797	0,1	0,1	1,35582	0,064233502	0,073756103	0,068994802	zytologische Glutaminsynthetase
168H2T7	0,1	2,39711	0,1	0,1	0,1	0,1				Actin 2
170B22T7	1,93723	1,54947	0,1	0,1	0,1	0,1				Cyclophilin
192P1T7	0,96508	0,631271	0,1	0,1	0,0167	0,0208	1,528788745	0,802884615	1,505633589	β Tubulin
232A19T7	1,67115	1,10266	8,95472	0,1	0,1	0,1				Elongationsfaktor 1 α
135A2T7	0,46009	0,1	0,1	0,1	1,31628	0,1	4,60092	13,1628	8,88186	?
196O5T7	0,60224	0,1	3,821	0,1	1,85729	0,1	6,0224	18,5729	12,29765	?

A7

Anhang 2. Arrayhybridisierungen, Vergleich Epidermis-Mesophyll

EST-Nr.	Epidermis 1	Mesophyll 1	Epidermis 2	Mesophyll 2	Epidermis 3	Mesophyll 3	Quotient 1	Quotient 2	Durchschnitt der Quotienten	Putative Funktion
133B5T7	0,63822	0,1	2,36494	0,1	0,1	0,1	6,38224	23,6494	15,01582	?
222P9T7	0,1	0,584366	6,83527	0,1	2,22041	0,1	68,3527	22,2041	45,2784	?
122L17T7	1,00861	0,1	2,8511	0,1	0,1	0,1	10,0861	28,511	19,29855	26S Proteasom ATPase Untereinheit
136H4T7	1,34479	0,1	1,91988	0,1	0,1	0,1	13,4479	19,1988	16,32335	ähnlich zum 60S ribosomalen Protein L17
134G9T7	1,69224	0,1	5,45967	0,1	0,1	0,722374	16,9224	54,5967	35,75955	ähnlich zum Phaseolin G-box bindenden Protein PG2, Transkriptionsfaktor ähnliches Protein
91C4T7	2,03775	0,1	4,71229	0,1	0,1	0,1	20,3775	47,1229	33,7502	Aminocyclopropan-1-carboxylatoxidase (ACC Oxidase)
122J4T7	5,33051	0,1	5,82007	0,1	0,1	0,1	53,3051	58,2007	55,7529	ATP-abhängige Clp Protease, ATP-bindende Untereinheit
248O13T7	2,32581	0,1	0,1	0,1	1,87346	0,1	23,2581	18,7346	20,99635	CF0 ATP Synthase Untereinheit 9
160C9T7	4,86385	0,1	32,5357	0,1	0,1	0,1	48,6385	325,357	186,99775	Cytochrom P450 ähnliches Protein
98D6T7	5,28845	0,1	16,3403	0,1	0,1	0,1	52,8845	163,403	108,14375	Cytochrom P450 ähnliches Protein
122K4T7	2,80212	0,1	2,22921	0,1	0,1	0,1	28,0212	22,2921	25,15665	Cytochrom P450-involviert in einen frühen Schritt der Gibberellinbiosynthese
132L24T7	1,99712	0,1	4,67888	0,1	0,1	0,1	19,9712	46,7888	33,38	durch Wundstress induziert
115K16T7	4,43813	0,1	11,9657	0,1	0,1	0,1	44,3813	119,657	82,01915	Glutathionsynthetase
99A16T7	2,60907	0,1	3,36545	0,1	0,1	0,1	26,0907	33,6545	29,8726	HSP70-ähnliches Protein
227M16T7	1,58687	0,1	2,77404	0,1	0,1	0,1	15,8687	27,7404	21,80455	Metallothionein-ähnliches Protein
196B7T7	1,95059	0,1	3,18321	0,1	0,1	0,1	19,5059	31,8321	25,669	möglicher mar Operatorrepressor MarR
206G21T7	0,70507	0,1	3,35926	1,33547	1,4434	0,1	7,05065	14,434	10,742325	Phosphopyruvathydratase
232D16T7	0,57757	0,1	0,744538	0,1	0,1	0,1	5,77574	7,44538	6,61056	Polyubiquitin
162K16T7	1,44676	0,1	4,20527	0,1	0,1	1,39627	14,4676	42,0527	28,26015	ribosomale Protein 30S Untereinheit
83H5T7	1,40734	0,1	2,74503	0,1	0,1	0,1	14,0734	27,4503	20,76185	somatische Embryogenese Rezeptor-ähnliche Kinase
92A21T7	4,02811	0,1	14,9069	0,1	0,1	0,1	40,2811	149,069	94,67505	Ubiquitin konjugierendes Enzym Homolog

A8

Z Anhang

Anhang 3

Normalisierte Aktivitäten aller unterschiedlich und einiger gleich exprimierter Transkripte in vereinigten Zellproben der Epidermis und des Mesophylls von *A. thaliana*-Rosettenblättern am Ende der Lichtperiode. Repräsentiert sind sie durch die gefundenen, homologen ESTs. Sortiert sind sie in drei Gruppen nach ihrer Expressionsstärke und innerhalb der Gruppen alphabetisch nach ihrer putativen Funktion. Fragezeichen markieren ESTs ohne Homologie. Die Quotienten (Aktivität_{Epidermis Tag/Mesophyll Tag}) sind grau unterlegt. Weitere Erläuterungen vgl. Kap. 3.1.4.4.

EST-Nr.	Epidermis Tag	Mesophyll Tag	Quotient	Putative Funktion
E6A10T7	0,0355202	0,227072	0,156427036	?
G8C4T7	0,0477475	0,298411	0,160005831	?
76E12T7	0,0579453	0,315717	0,183535571	?
E3F2T7	0,0531911	0,324205	0,164066254	?
E11A6T7	0,0632033	0,332481	0,190095975	?
E7B4T7	0,0379491	0,402922	0,094184731	?
128J1T7	0,0798856	0,417458	0,191362005	?
G4A8T7	0,0449944	0,444901	0,101133511	?
G7H11T7	0,0727996	0,454128	0,160306345	?
109G5T7	0,0865366	0,485037	0,178412369	?
85C6T7	0,0844193	0,503965	0,167510244	?
79A3T7	0,0969579	0,513507	0,188815148	?
G5A6T7	0,0323141	0,571956	0,056497528	?
67G4T7	0,111901	0,653485	0,171237289	?
225I21T7	0,076462	0,681449	0,112205022	?
132F7T7	0,138459	0,79765	0,173583652	?
173O24T7	0,09518	0,800436	0,118910194	?
E8F4T7	0,0577545	0,856862	0,067402335	?
226P8T7	0,120057	0,896104	0,133976637	?
F3A9T7	0,112459	0,912838	0,123197106	?
223E15T7	0,081653	0,913249	0,089409351	?
F2E12T7	0,132455	0,934006	0,141813864	?
174G4T7	0,124517	1,05723	0,117776643	?
111O21T7	0,148707	1,09153	0,136237208	?
187F1T7	0,12533	1,09504	0,11445244	?
145P1T7	0,176619	1,11347	0,158620349	?
70G8T7	0,190754	1,13445	0,168146679	?
E12C12T7	0,103818	1,21486	0,08545676	?
181H11T7	0,159866	1,27821	0,125070215	?
168H19T7	0,251632	1,28948	0,195142228	?
172I16T7	0,129305	1,34883	0,095864564	?

A9

Anhang 3. Arrayhybridisierungen, Vergleich Epidermis-Mesophyll am Tag

EST-Nr.	Epidermis Tag	Mesophyll Tag	Quotient	Putative Funktion
223E13T7	0,0874151	1,42393	0,061390026	?
242G7T7	0,302508	1,58072	0,191373551	?
139N14T7	0,171224	1,70362	0,100505981	?
115G6T7	0,217117	1,74366	0,124517968	?
161I3T7	0,239959	1,74406	0,137586436	?
173G14T7	0,116079	1,75214	0,066249843	?
242H21T7	0,0578579	1,81589	0,031862007	?
E10D1T7	0,321026	2,17802	0,147393504	?
159H21T7	0,259165	2,88892	0,089709995	?
226A17T7	0,190165	3,36529	0,05650776	?
146O7T7	0,0884952	3,43974	0,025727293	?
170B13T7	0,47544	3,44028	0,138198054	?
106K8T7	0,563928	4,07441	0,138407279	?
104J22T7	0,317701	4,16577	0,076264652	?
226A20T7	0,186614	4,55214	0,040994785	?
124A7T7	0,386093	8,12968	0,047491783	?
121G4T7	0,204444	1,0831	0,188758194	?
74E3T7	0,0908815	0,573775	0,158392227	?
120M11T7	0,137735	0,729844	0,188718411	?
123H22T7	0,343701	2,0481	0,16781456	?
E5D9T7	0,0464848	0,250885	0,185283297	40S ribosomales Protein S12
170A21T7	0,134472	0,803519	0,167353852	40S ribosomales Protein S13
246C2T7	0,702177	5,01627	0,139979905	40S ribosomales Protein S13
G2D3T7	0,0556777	0,750545	0,074183027	4-Coumarat-Coenzym A-Ligase
172E20T7	0,0969385	0,57037	0,169957221	Actin
122B2T7	0,458346	8,35038	0,054889239	Actin (ACT3) Gen
247G15T7	0,380874	3,14587	0,121071119	Ähnlich zum beta integralen Membranprotein
81A7T7	0,110015	1,45021	0,075861427	ähnlich zum Phaseolin G-box bindenden Protein PG2
170G23T7	0,203727	2,04601	0,099572827	Ähnlich zum ribosomalen Protein L21
173F11T7	0,138616	2,66714	0,051971775	AIG2
181I17T7	0,099786	1,49121	0,066916129	Aquaporin
226N11T7	0,0949199	1,54346	0,061498128	Aquaporin
224J15T7	0,213478	4,43316	0,048154815	β-Glukosidase
174G3T7	0,111803	1,05843	0,105630982	Calcium-abhängige Proteinkinase
143K8T7	0,0784414	6,22442	0,012602202	Carboanhydrase
188G1T7	0,408735	8,51478	0,048003002	Carboanhydrase, chloroplastidärer Vorläufer
145P10T7	0,32501	2,11698	0,153525305	Chlorophyll a/b bindendes Protein
182N4T7	0,0638419	0,578582	0,110342009	chloroplastidär ribosomales Protein L1
242G15T7	0,254276	2,24889	0,113067335	DNA-Schaden-Reparatur/Toleranzprotein DRT100 Vorläufer
184O13T7	0,185311	2,02378	0,091566771	Eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 4A-1
249C3T7	0,301907	3,39554	0,088912809	Germin-ähnliches Protein

A10

Z Anhang

Anhang 3. Arrayhybridisierungen, Vergleich Epidermis-Mesophyll am Tag

EST-Nr.	Epidermis Tag	Mesophyll Tag	Quotient	Putative Funktion
110B6T7	0,108381	1,33523	0,081170285	Glutathione-S-Transferase
160M19T7	0,253662	2,08651	0,121572386	Glutathione-S-Transferase
114J4T7	0,119517	1,68894	0,070764503	Glutathionperoxidase
173N24T7	0,397722	2,00559	0,198306733	Hauptlatexprotein
115B13T7	0,0750139	0,993479	0,075506276	Histone H3
187P7T7	0,0455482	0,628691	0,072449264	Homolog zu Skp1p, ein evolutionär konserviertes Kinetochorprotein aus Hefe
G10C5T7	0,039094	0,262631	0,148855238	Hydroxymethylglutaryl CoA Reduktase
121F11T7	0,168709	1,64196	0,102748544	hypothetisches Protein Lpg22p
147P23T7	0,129231	0,864026	0,149568416	Jasmonat induziertes Protein
220E24T7	0,172907	1,87119	0,092404833	Jasmonat induziertes Protein
249B11T7	0,366324	2,54918	0,143702681	Jasmonat induziertes Protein
220F8T7	0,181298	1,40139	0,129370125	Kälte und ABA reguliertes Gen
91I15T7	0,0870742	1,61856	0,053797326	Krankheitsresistenz-Antwortprotein
129P9T7	0,226701	8,74819	0,025914046	L-Ascorbatperoxidase
120B15T7	0,354405	10,1329	0,034975673	L-Ascorbatperoxidase
187G5T7	0,114694	2,68402	0,04273217	L-Ascorbatperoxidase
93B10T7	0,134139	1,4037	0,095561017	L-Ascorbatperoxidase Vorläufer
248G21T7	0,207505	1,31783	0,157459612	mitochondriale fMet, 18S, 5S repeat unit DNA
E6H9T7	0,616033	3,72108	0,165552205	Nitrittransporter
87H6T7	0,1091	0,858187	0,12712847	Nukleosom Assemblyprotein I-ähnliches Protein
G3G5T7	0,0602388	0,48748	0,123571839	Phosphoglukomutase
224H11T7	0,140567	0,991641	0,141751904	Photosystem I 9KDa Protein
118D23T7	0,124761	1,06332	0,117331565	Photosystem II Reaktionscenter 6.1KDa Protein
H4A5T7	0,305095	2,18367	0,139716624	Plasmamembran H ⁺ ATPase
F4H5T7	0,0618508	0,614998	0,100570734	putative chloroplastidäre Prephenatdehydratase
147A15T7	0,123479	0,917965	0,134513843	putative Rezeptorproteinkinase TMK1 Vorläufer
172E19T7	0,168464	1,66002	0,101483115	putative Serin-glyoxylate Aminotransferase
F5D1T7	0,177367	2,14729	0,082600394	R29515_1
208E22T7	0,236528	1,64705	0,143607055	Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase
E7A7T7	0,352207	3,14406	0,112022989	Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase
119K3T7	0,278149	1,65487	0,168079064	Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase kleine Untereinheit
113P10T7	0,148121	1,89176	0,078297987	Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase kleine Untereinheit
122A13T7	0,190146	1,40484	0,135350645	Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase kleine Untereinheit
123L18T7	0,216352	2,02182	0,107008537	Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase kleine Untereinheit
200F8T7	0,147568	0,828453	0,17812477	Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase kleine Untereinheit Vorläufer
197H16T7	0,116347	1,01558	0,114562122	Ribulosebiphosphatcarboxylase kleine Kette Vorläufer
203M5T7	0,136148	1,13842	0,119593823	Ribulosebiphosphatcarboxylase kleine Kette Vorläufer
205H18T7	0,111194	1,2425	0,089492153	Ribulosebiphosphatcarboxylase kleine Kette Vorläufer
205I21T7	0,160598	1,37342	0,116932912	Ribulosebiphosphatcarboxylase kleine Kette Vorläufer
E6D12T7	0,101382	0,914386	0,110874401	Ribulosebiphosphatcarboxylase kleine Kette 1A Vorläufer
107F7T7	0,145879	1,00508	0,14514168	Ribulosebiphosphatcarboxylase kleine Kette 1B Vorläufer

A11

Anhang 3. Arrayhybridisierungen, Vergleich Epidermis-Mesophyll am Tag

EST-Nr.	Epidermis Tag	Mesophyll Tag	Quotient	Putative Funktion
90E2T7	0,130978	1,08422	0,120803896	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 1B Vorläufer
146N6T7	0,0938666	1,39351	0,067359832	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 1B Vorläufer
187F16T7	0,164309	1,44054	0,114060699	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 1B Vorläufer
143C23T7	0,184902	1,78001	0,103876945	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 1B Vorläufer
73D11T7	0,131356	1,87345	0,070114495	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 1B Vorläufer
231E24T7	0,15315	1,96975	0,077750984	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 1B Vorläufer
160E15T7	0,260393	2,07659	0,125394517	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 1B Vorläufer
172D4T7	0,112823	2,18278	0,051687756	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 1B Vorläufer
117I2T7	0,272916	2,89212	0,094365379	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 1B Vorläufer
242D20T7	0,368988	3,11122	0,118599135	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 1B Vorläufer
242E18T7	0,296425	3,25385	0,091099774	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 1B Vorläufer
185F20T7	0,102738	1,60404	0,064049525	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 1B Vorläufer
163E18T7	0,12606	1,78572	0,070593374	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 1B Vorläufer
157J6T7	0,100151	3,63651	0,027540416	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 1B Vorläufer
108C7T7	0,0763802	1,35021	0,056569126	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 2B Vorläufer
192K21T7	0,302103	2,07875	0,145329164	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 2B Vorläufer
106E17T7	0,081871	0,773876	0,105793435	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 2B Vorläufer
242I8T7	0,122193	1,11422	0,109666852	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 2B Vorläufer
91D11T7	0,116888	1,18434	0,098694632	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 2B Vorläufer
103G18T7	0,152333	1,1999	0,126954746	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 2B Vorläufer
E12E7T7	0,0991687	1,32243	0,074989754	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 2B Vorläufer
224G9T7	0,134528	1,49504	0,089982877	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 2B Vorläufer
227J9T7	0,164999	1,92413	0,085752522	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 2B Vorläufer
269G2T7	0,132363	1,97768	0,066928421	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 2B Vorläufer
135J9T7	0,301144	2,23454	0,134767782	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 2B Vorläufer
161I4T7	0,171487	2,51312	0,068236694	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 2B Vorläufer
93F10T7	0,0900383	1,94756	0,046231336	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 2B Vorläufer
144G20T7	0,236778	2,09095	0,113239437	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 2B Vorläufer
174M11T7	0,0875506	2,63963	0,033167755	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 2B Vorläufer
179F15T7	0,350159	2,02406	0,17299833	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
141O17T7	0,21529	1,944	0,110745885	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
143K4T7	0,147101	0,858922	0,17126235	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
118D13T7	0,134107	0,895686	0,149725462	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
166D23T7	0,163212	0,955425	0,170826595	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
214A3T7	0,145028	0,964845	0,150312226	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
127O21T7	0,132553	1,22713	0,10801871	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
63B7T7	0,094466	1,23468	0,076510513	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
110C10T7	0,0965617	1,29424	0,074608805	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
119L6T7	0,168877	1,48152	0,113989011	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
146K20T7	0,164647	1,54162	0,106801287	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
163H24T7	0,142555	1,55829	0,091481688	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer

A12

Z Anhang

Anhang 3. Arrayhybridisierungen, Vergleich Epidermis-Mesophyll am Tag

EST-Nr.	Epidermis Tag	Mesophyll Tag	Quotient	Putative Funktion
146J24T7	0,0942941	1,61258	0,05847406	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
134H23T7	0,24418	1,64355	0,148568647	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
172G21T7	0,20678	1,64681	0,125563969	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
159O13T7	0,175117	1,71308	0,102223481	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
146D3T7	0,228169	1,76224	0,129476689	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
171L21T7	0,101459	1,78993	0,056683222	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
168O23T7	0,215256	1,79281	0,120066265	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
159K23T7	0,185874	2,01465	0,092261187	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
225N22T7	0,338005	2,24	0,150895089	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
174G14T7	0,123734	1,11526	0,110946326	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
184G15T7	0,210513	1,19647	0,175945072	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
116B24T7	0,102221	1,30111	0,078564457	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
184G14T7	0,22349	1,54156	0,144976517	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
166G11T7	0,303008	1,82039	0,166452244	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
163L21T7	0,178367	1,83257	0,097331616	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
172C7T7	0,159857	1,94293	0,082276253	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
177A4T7	0,284563	2,00659	0,141814222	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
168F20T7	0,371346	2,044	0,181676125	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
155J9T7	0,31592	2,22759	0,14182143	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
E5F9T7	0,34871	2,41802	0,144213034	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
106D17T7	0,101319	1,00413	0,100902274	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette F1 Vorläufer
143D10T7	0,25454	1,88853	0,134782079	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette F1 Vorläufer
221B17T7	0,203809	1,40294	0,145272784	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 1B Vorläufer
107G4T7	0,117315	0,675078	0,173779919	Rubisco
110M3T7	0,191248	1,00795	0,18973957	Rubisco
198J20T7	0,178175	1,14779	0,1552331	Rubisco
E4H4T7	0,459665	2,85308	0,161111851	Rubisco
121P16T7	0,128163	1,16083	0,110406347	Rubisco kleine Untereinheit
205A7T7	0,204786	1,3491	0,15179453	Rubisco kleine Untereinheit
223G22T7	0,408235	4,43198	0,092111201	Sauerstoff-hervorbringender Komplex des Photosystem II
168G18T7	0,134187	4,84981	0,027668507	Sauerstoff-hervorbringender Komplex des Photosystem II
E4F8T7	0,0592754	8,67043	0,006836501	Sauerstoff-hervorbringender Komplex psbP
144C15T7	0,181965	1,92315	0,094618205	sekretierte purple saure Phosphatase Vorläufer
127F15T7	0,558248	3,92055	0,142390226	Serin/Threoninkinase
126G4T7	0,0479145	0,490726	0,097640027	Translationsinitiationsfaktor EIF-2B AL
172H20T7	0,137422	1,35234	0,101617936	Trehalose-6-phosphatsynthase Homolog
111K14T7	0,0915368	0,981728	0,09324049	Ubiquitin-konjugierendes Enzym 18
E2G10T7	0,141778	0,976856	0,145137052	unbekannt
124L6T7	0,230917	1,66709	0,138515017	unbekannt
248I16T7	0,713977	10,056	0,071000099	unbekannt
E6A12T7	0,0773258	14,4336	0,005357347	Vakuoläre ATPase Untereinheit A

A13

Anhang 3. Arrayhybridisierungen, Vergleich Epidermis-Mesophyll am Tag

EST-Nr.	Epidermis Tag	Mesophyll Tag	Quotient	Putative Funktion
E6A12T7	0,135189	20,215	0,006687559	Vakuoläre ATPase Untereinheit A
G5B3T7	0,249849	5,70374	0,043804416	Vakuoläre ATPase Untereinheit A
162O6T7	0,26019	11,9797	0,021719242	Vakuoläre ATPase Untereinheit A
244H23T7	0,0740049	0,89456	0,08272771	Vakuoläres prozessierendes Enzym
223N6T7	0,169283	4,75154	0,035626976	Wachstumsregulator Homolog
168H2T7	0,559826	0,330871	1,691976631	Actin 2
170B22T7	0,104828	0,208984	0,501607779	Cyclophilin
192P1T7	0,15906	0,181723	0,875288213	β Tubulin
232A19T7	21,7565	11,8159	1,841290126	Elongationsfaktor 1 α
128N22T7	0,228995	0,257907	0,887897575	Phenylalaninammoniumlyase
240A11T7	0,323422	0,207962	1,555197584	Transcinnamat-4-Hydroxylase
87E4T7	11,7331	12,4454	0,942766002	Transkriptionsfaktor L2
179J1T7	1,06206	0,142434	7,456506171	?
179J3T7	2,33469	0,184903	12,62656636	?
179J7T7	2,20637	0,296592	7,439074554	?
180F21T7	1,93738	0,331666	5,841358475	?
180F7T7	1,19837	0,143078	8,375641259	?
180G14T7	3,99261	0,310921	12,8412362	?
180G23T7	4,55504	0,654667	6,957796865	?
180I18T7	0,684253	0,111201	6,153298981	?
180I20T7	3,27346	0,216013	15,15399536	?
180L11T7	3,88863	0,610964	6,364744895	?
181F8T7	0,919779	0,166773	5,515155331	?
181N13T7	1,59429	0,179048	8,90426031	?
240E9T7	1,92984	0,28575	6,753595801	?
242K7T7	4,02925	0,509482	7,908522774	?
244C18T7	1,15507	0,197078	5,860978902	?
89P9T7	4,948	0,78522	6,301418711	?
E10B9T7	1,2644	0,118837	10,63978391	?
E11C10T7	1,16336	0,191822	6,064789232	?
E1F2T7	1,04625	0,0760717	13,75347205	?
E4E10T7	0,593539	0,115887	5,121704764	?
E6C4T7	0,222556	0,0364652	6,103243641	?
E6F6T7	0,496164	0,0725896	6,835194022	?
E7B6T7	12,6299	0,0533207	236,8667328	?
G10D4T7	1,46965	0,0845165	17,38891222	?
G4G1T7	0,565698	0,0739047	7,654425226	?
G6H9T7	1,12071	0,221377	5,062450029	?
G8E3T7	2,33401	0,149371	15,62558997	?

Anhang 3. Arrayhybridisierungen, Vergleich Epidermis-Mesophyll am Tag

EST-Nr.	Epidermis Tag	Mesophyll Tag	Quotient	Putative Funktion
G9G11T7	5,06825	0,520168	9,74348672	?
G9H3T7	5,87515	0,163789	35,87023549	19S Proteosom Vorläufer 9 mRNA
203P20T7	14,2367	0,164263	86,670157	30S ribosomales Protein S16
G8H4T7	2,26874	0,252183	8,996403405	β Fruktosidase
E1D10T7	1,37711	0,13968	9,859034937	Dwarf1
179H24T7	4,8989	0,844664	5,799820994	EDGP Vorläufer
E2G7T7	0,357212	0,0565541	6,316288297	Eisen-Superoxiddismutase
205P2T7	3,91335	0,202741	19,30221317	Elongationsfaktor TU, chloroplastidärer Vorläufer (EF-TU)
170I8T7	1,46841	0,284389	5,163385363	F21J9.18
89K12T7	5,35352	0,951366	5,627192899	grr1
G4H3T7	5,5436	1,03625	5,349674306	H ⁺ ATPase der Plasmamembran
G11D7T7	2,05833	0,0998436	20,61554271	intrinsisches Protein 2a der Plasmamembran
G10B4T7	2,57285	0,388292	6,626070071	Isocitratlyase
G9E10T7	16,705	0,476344	35,06919369	Katalase 3
197L1T7	3,61227	0,337681	10,69728531	Mitochondriales Chaperonin HSP60-1 Vorläufer
180H14T7	3,91299	0,453105	8,635945311	Mögliches Membranprotein
G1C8T7	2,62638	0,0795929	32,99766688	NADPH Thioedoxinreduktase
179E11T7	2,34886	0,339802	6,912437243	Patent
G10A9T7	0,487586	0,0916551	5,319791261	Pektinesterase
115J6T7	0,46419	0,0650225	7,138913453	Peroxisomales ATP/ADP Carrierprotein
231F3T7	6,52435	0,737139	8,850908716	Photosystem II Typ I Chlorophyll a /b bindendes Protein
E4C7T7	14,8227	0,195298	75,89785866	Produkt ähnlich zum ccr Protein
180E9T7	3,77912	0,599247	6,306447925	Profilin 2
180K17T7	2,86827	0,184574	15,53994604	PTPKIS1
179H12T7	1,77741	0,222	8,006351351	ribosomales Protein L34
241L23T7	9,38163	0,623906	15,03692864	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 1A Vorläufer
180H18T7	2,85191	0,167769	16,99902843	T7N9.5
179H16T7	0,71472	0,090305	7,914511932	Transkriptionsfaktor SaMADS A
F7B5T7	1,95474	0,244658	7,989683558	Trockenheit induzierbare Cystein Proteinase-Vorläufer
114P24T7	0,557464	0,0964848	5,777739084	unbekannt
179E12T7	4,07886	0,663626	6,146323381	unbekannt
222P10T7	4,3482	0,209069	20,79791839	unbekannt
E6E6T7	1,27395	0,156266	8,15244519	V-Typ H ⁺ ATPase
179F12T7	3,02128	0,384648	7,854661925	WAX9D
G1A2T7	1,91725	0,344907	5,558744821	Xylosidase

Anhang 4

Normalisierte Aktivitäten aller unterschiedlich und einiger gleich exprimierter Transkripte in vereinigten Zellproben der Epidermis und des Mesophylls von *A. thaliana*-Rosettenblättern am Ende der Dunkelperiode. Repräsentiert sind sie durch die gefundenen, homologen ESTs. Sortiert sind sie in drei Gruppen nach ihrer Expressionsstärke und innerhalb der Gruppen alphabetisch nach ihrer putativen Funktion. Fragezeichen markieren ESTs ohne Homologie. Die Quotienten ($\text{Aktivität}_{\text{Epidermis Nacht/Mesophyll Nacht}}$) sind grau unterlegt. Weitere Erläuterungen vgl. Kap. 3.1.4.4.

EST-Nr.	Epidermis Nacht	Mesophyll Nacht	Quotient	Putative Funktion
E2H5T7	0,0492157	0,257446	0,191169022	?
E8H12T7	0,0576429	0,29001	0,198761767	?
E10F7T7	0,0490004	0,327532	0,149604924	?
E2A6T7	0,0487602	0,33236	0,14670899	?
F3C3T7	0,0832135	0,442944	0,187864606	?
176J8T7	0,115008	0,587103	0,19589067	?
156I8T7	0,118539	0,615124	0,192707487	?
242D24T7	0,114949	0,708876	0,16215671	?
228K20T7	0,139447	0,753947	0,184955972	?
178H13T7	0,1022	0,76102	0,134293448	?
178P4T7	0,140307	0,762467	0,184017144	?
F4H10T7	0,0844743	0,815134	0,103632409	?
E7B4T7	0,080037	0,848469	0,094331083	?
168H19T7	0,109787	0,856465	0,128186207	?
132G21T7	0,134882	0,896395	0,150471611	?
120P23T7	0,145701	0,975915	0,149296814	?
206O16T7	0,181785	0,978711	0,185739202	?
170B13T7	0,180058	0,988002	0,18224457	?
126J17T7	0,153788	1,04078	0,147762255	?
G1F6T7	0,163274	1,05729	0,154426884	?
134I13T7	0,191371	1,06086	0,180392323	?
186A10T7	0,14521	1,07977	0,134482343	?
226N4T7	0,213322	1,13086	0,188636967	?
120M11T7	0,223378	1,13657	0,196536949	?
123J7T7	0,223359	1,17813	0,189587736	?
240G24T7	0,164111	1,29145	0,127074993	?
191J2T7	0,146094	1,30956	0,111559608	?
G7D9T7	0,219707	1,43017	0,153622996	?
192C12T7	0,198208	1,45756	0,135986169	?
F10G9T7	0,110647	1,4802	0,074751385	?
96P17T7	0,286644	1,53244	0,187050717	?

Anhang 4, Arrayhybridisierungen, Vergleich Epidermis-Mesophyll bei Nacht

EST-Nr.	Epidermis Nacht	Mesophyll Nacht	Quotient	Putative Funktion
G4F12T7	0,222058	1,56659	0,141746085	?
105O20T7	0,128286	1,68627	0,076076785	?
206L10T7	0,215339	1,70849	0,126040539	?
92K3T7	0,295637	1,77977	0,166109666	?
141C4T7	0,12727	2,06679	0,061578583	?
105D4T7	0,179334	2,07096	0,086594623	?
140O2T7	0,323028	2,08097	0,155229532	?
G7C1T7	0,172891	2,08738	0,082826797	?
222I5T7	0,150438	2,15019	0,06996498	?
143B11T7	0,418377	2,17414	0,19243333	?
F1B10T7	0,0889256	2,26288	0,039297532	?
180M9T7	0,343092	2,36934	0,144804882	?
209E19T7	0,193335	2,4561	0,078716257	?
244K1T7	0,178309	2,52541	0,070605961	?
230B16T7	0,11069	2,55138	0,043384365	?
214B11T7	0,238729	2,64186	0,090363986	?
121L6T7	0,192876	2,77885	0,069408568	?
E5G4T7	0,0373151	3,14686	0,011857884	?
117J11T7	0,140115	3,16551	0,04426301	?
F3E2T7	0,482341	3,18064	0,151649039	?
G3H4T7	0,173498	3,20387	0,054152634	?
190I6T7	0,129536	3,26733	0,039645827	?
115G6T7	0,293297	3,35154	0,087511114	?
121G2T7	0,212568	3,43617	0,061861899	?
103F6T7	0,298393	3,48058	0,085730826	?
185D14T7	0,442438	3,48628	0,126908338	?
244B23T7	0,302692	3,91473	0,077321297	?
226A17T7	0,120346	4,16368	0,028903758	?
141O5T7	0,147173	4,55525	0,032308435	?
212H9T7	0,648276	4,57585	0,14167335	?
129C6T7	0,341715	5,02167	0,06804808	?
226A20T7	0,16598	5,58837	0,029700968	?
155P20T7	0,145773	6,02907	0,024178356	?
116D18T7	0,187812	6,50064	0,028891309	?
122O12T7	0,18319	6,91846	0,026478436	?
G10D6T7	1,4047	8,032	0,174887948	?
E6A12T7	0,43503	8,13179	0,053497446	?
106K8T7	0,260479	9,64907	0,026995244	?
210A23T7	1,743	10,3717	0,168053453	?
111A5T7	0,072977	39,4787	0,001848516	?
211O13T7	0,970293	52,7388	0,018398086	?

A17

Anhang 4, Arrayhybridisierungen, Vergleich Epidermis-Mesophyll bei Nacht

EST-Nr.	Epidermis Nacht	Mesophyll Nacht	Quotient	Putative Funktion
212D11T7	1,9898	78,7955	0,025252711	?
106H21T7	0,150373	1,73075	0,086883143	12-Oxophytodienoatreduktase
204D7T7	1,71991	12,3462	0,139306831	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reduktase
122B2T7	0,415351	2,51783	0,164963878	Actin (ACT3)
192O7T7	1,17317	9,43338	0,124363696	Ähnlich zur ATP-Citratlyase
246B20T7	0,745514	15,4589	0,048225553	Ähnlich zur ATP-Citratlyase
157G10T7	0,211998	2,60558	0,081363075	α -Tubulin
242G4T7	0,213202	5,78227	0,036871678	α -Tubulin
241I14T7	0,322562	5,11817	0,063022916	anorganische Pyrophosphatase
203C7T7	0,229151	7,35181	0,031169331	Athb-6 Homeoboxprotein
F4F11T7	0,0476071	2,5711	0,018516238	ATP Citratlyase
177L7T7	0,114827	0,935362	0,122762096	Beta integrales Membranprotein
G7A8T7	0,203212	1,85515	0,10953939	Chaperonin 60 β
191I21T7	0,23943	1,54672	0,154798541	Cucumisin, Protease D
182E24T7	0,178173	11,6747	0,015261463	Cyclopropanfettsäuresynthase
103I15T7	0,16675	7,64058	0,021824259	Cystein Proteinase RD21A Vorläufer
228K16T7	0,130459	2,43171	0,053649078	Cysteinprotease
143A7T7	0,160316	12,4748	0,012851188	Cysteinproteinase Homolog
241I16T7	0,113175	0,917112	0,123403685	Dehydrin RAB18
190K17T7	0,117572	3,77347	0,031157529	DNA bindendes Protein
191F16T7	0,200584	1,87441	0,107011806	EGF Rezeptor ähnliches Protein
E5F5T7	0,0496493	0,584272	0,084976347	Fusionsprotein: Ubiquitin; ribosomal protein S27a
168B8T7	0,111526	0,954245	0,116873549	Galactosyltransferase assoziierte Proteinkinase P58/GTA
216C14T7	0,157033	0,843504	0,186167463	Germin-ähnliches Protein
206N21T7	0,266392	1,53693	0,173327347	Gluthation S-Transferase
226N14T7	0,126369	4,35394	0,029024056	Glyoxysomale Citratsynthase
119H2T7	0,170004	1,24335	0,136730607	GMP Synthase
141K12T7	0,88684	7,94404	0,111635893	Homeobox-Leucin Zipper Protein
115F3T7	0,0827659	0,740599	0,111755349	Hypothetisches Protein
214C17T7	0,931784	34,1886	0,027254231	Hypothetisches Protein
191J19T7	0,199581	2,11908	0,094182853	Hypothetisches Protein
G1H1T7	0,0753118	0,852915	0,088299303	Jasmonat induzierbares Protein
E7G1T7	0,0306817	0,163983	0,187102931	K Polypeptid (4 kDa) des Photosystem II
G10C5T7	0,0405598	0,974851	0,041606153	LHC II Typ III Chlorophyll a/b bindendes Protein
203A7T7	0,130262	3,71088	0,035102725	Lösliche anorganische Pyrophosphatase
151G18T7	0,475885	3,99618	0,119084976	Lösliche anorganische Pyrophosphatase
138A20T7	0,0932624	0,492716	0,189282264	Metallothionein
163F22T7	0,28225	5,51649	0,051164781	Nicht-cyanogene beta Glukosidase Vorläufer
147K15T7	0,132857	1,5891	0,083605185	Nicotiana eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 4A
126N11T7	0,390019	2,44976	0,159207024	Nitratreduktase
E6H9T7	0,106545	1,63307	0,065242151	Nitrittransporter

Anhang 4, Arrayhybridisierungen, Vergleich Epidermis-Mesophyll bei Nacht

EST-Nr.	Epidermis Nacht	Mesophyll Nacht	Quotient	Putative Funktion
151N1T7	0,138584	1,16311	0,119149522	Peptidylprolyl cis-trans Isomerase
213L3T7	0,201008	8,63712	0,023272572	Phosphoglucomutase
H10E5T7	0,0496036	0,874619	0,056714524	Photosystem I P700 Apoprotein A1
F3A3T7	0,10096	1,05672	0,095540919	Polyubiquitin
F4C3T7	0,0983606	2,19538	0,044803451	Polyubiquitin
211P21T7	1,02541	46,752	0,021932965	PSI Reaktionscenter Untereinheit XI
190I5T7	0,189026	2,3774	0,079509548	Reversibel glykosyliertes Polypeptide 2
182A5T7	0,124454	1,46761	0,084800458	Ribosomales Protein
E5F9T7	0,0733948	0,750705	0,097767832	Ribulosebisphosphatcarboxylase
241A17T7	0,161289	1,04392	0,154503219	Ribulosebisphosphatcarboxylase
91G9T7	0,147459	1,10725	0,133175886	Ribulosebisphosphatcarboxylase
232A2T7	0,221178	1,53683	0,143918325	Ribulosebisphosphatcarboxylase
241L23T7	0,248614	1,87093	0,132882577	Ribulosebisphosphatcarboxylase
242D20T7	0,343793	2,79764	0,12288679	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 1B Vorläufer
91O11T7	0,216447	16,8634	0,012835312	Rubisco Untereinheit bindendes Protein beta Untereinheit Vorläufer (60 KDa Chaperonin beta Untereinheit)
211P20T7	1,39604	72,0452	0,01937728	SCARECROW ähnliches Protein
89K20T7	0,164888	1,29258	0,127565025	Serinacetyltransferase
F1A5T7	0,188984	3,52252	0,053650228	SRG1 Genprodukt
E2G7T7	0,043417	0,74937	0,057938001	Superoxiddismutase
E8D6T7	0,0759949	1,15686	0,065690663	Superoxiddismutase
F4B2T7	0,127936	1,79507	0,071270758	Thioglukosidglukohydrolase
E6C8T7	0,0393197	0,240777	0,163303389	Transkriptional kontrolliertes Tumor Proteinhomolog
206L7T7	0,310638	1,84413	0,16844691	Translokation-assoziiertes Protein, α Untereinheitsvorläufer TRAP- α
177O9T7	0,175594	0,934987	0,187803681	Typ II Chlorophyll a/b-bindendes Protein
109E3T7	0,135438	2,23832	0,060508774	Ubiquitin
210K12T7	0,115579	3,62108	0,031918378	Ubiquitin
222O20T7	0,40312	4,0604	0,099280859	Ubiquitin
249N2T7	0,173394	4,29353	0,040384951	Ubiquitin
113B2T7	0,371026	2,11173	0,175697651	Ubiquitin 11
231D6T7	0,164533	1,17364	0,140190348	Ubiquitin/Ribosomales Protein
192D14T7	0,0816202	1,60623	0,050814765	Ubiquitin-ähnliches Protein
91D12T7	0,0814571	1,79693	0,045331259	Ubiquitin-ähnliches Protein
146N22T7	0,12949	2,6635	0,048616482	Ubiquitin-ähnliches Protein
241E1T7	0,170749	1,31683	0,1296667	Ubiquitin-ähnliches Protein 12
230E4T7	0,290391	2,31927	0,125207932	Ubiquitin-ähnliches Protein 12
241P3T7	0,195349	2,40357	0,081274521	Ubiquitin-ähnliches Protein 12
E6B7T7	0,0395479	4,2159	0,009380654	Ubiquitin-ähnliches Protein 12
247P24T7	0,379651	4,88115	0,077779007	Ubiquitin-ähnliches Protein 12
E5A10T7	0,047819	0,419558	0,113974707	Ubiquitinextensionsprotein
E4H3T7	0,03832	0,827252	0,04632204	Ubiquitinvorläufer
180B9T7	0,141828	0,855873	0,165711502	Ubiquitinvorläufer

A19

7 Anhang

Anhang 4, Arrayhybridisierungen, Vergleich Epidermis-Mesophyll bei Nacht

EST-Nr.	Epidermis Nacht	Mesophyll Nacht	Quotient	Putative Funktion
211P19T7	0,195118	1,10469	0,176626927	unbekannt
E2G10T7	0,041857	0,342529	0,122199872	unbekanntes Protein
F3E7T7	0,0874369	0,625926	0,139692072	unbekanntes Protein
151L13T7	0,0853827	0,741133	0,115205638	unbekanntes Protein
162O6T7	0,323329	6,03153	0,053606465	Vakuoläre ATPase Untereinheit A
G5B3T7	0,274719	2,06692	0,132912256	Vakuoläre ATPase Untereinheit A
206L9T7	0,186772	2,51062	0,074392779	Xyloglukanendostransglykosylase ähnliches Protein
168H2T7	0,301974	0,1	3,01974	Actin 2
170B22T7	0,199091	0,1	1,99091	Cyclophilin
192P1T7	0,197859	0,1	1,97859	β Tubulin
232A19T7	8,82991	8,64996	1,020803564	Elongationsfaktor 1 α
128N22T7	0,402845	0,355819	1,132162701	Phenylalaninammoniumlyase
240A11T7	0,377877	0,297986	1,268103199	Transcinnatmat-4-Hydroxylase
87E4T7	8,02432	8,06505	0,994949814	Transkriptionsfaktor L2
240E11T7	1,69611	0,0896756	18,91384055	?
199D3T7	1,89023	0,129571	14,5883724	?
205K13T7	1,77039	0,190137	9,311128292	?
240D7T7	0,866796	0,110381	7,852764516	Calmodulin
231C4T7	3,47026	0,268075	12,94510864	Hydroxynitrilase
126O20T7	5,7025	1,05937	5,382916262	Putative Proteinkinase

A20

Z Anhang

Anhang 5

Normalisierte Aktivitäten aller unterschiedlich und einiger gleich exprimierter Transkripte in vereinigten Zellproben der Epidermis von *A. thaliana*-Rosettenblättern am Ende der Dunkel- und Lichtperiode. Repräsentiert sind sie durch die gefundenen, homologen ESTs. Sortiert sind sie in drei Gruppen nach ihrer Expressionsstärke und innerhalb der Gruppen alphabetisch nach ihrer putativen Funktion. Fragezeichen markieren ESTs ohne Homologie. Die Quotienten (Aktivität Epidermis_{Nacht/Tag}) sind grau unterlegt. Weitere Erläuterungen vgl. Kap. 3.1.4.4.

EST-Nr.	Epidermis Nacht	Epidermis Tag	Quotient	Putative Funktion
179J1T7	0,157962	1,06206	0,14873171	?
179J3T7	0,195664	2,33469	0,083807272	?
179J7T7	0,321915	2,20637	0,145902546	?
180E15T7	0,330409	3,67863	0,089818492	?
180F21T7	0,374803	1,93738	0,193458692	?
180F7T7	0,162205	1,19837	0,13535469	?
180G14T7	0,334123	3,99261	0,083685359	?
180G20T7	0,200064	4,53088	0,044155661	?
180G23T7	0,831767	4,55504	0,182603665	?
180I18T7	0,137324	0,694453	0,197744124	?
180I20T7	0,265051	3,27326	0,080974625	?
180K17T7	0,147469	2,86827	0,051413918	?
181N13T7	0,190328	1,59429	0,119381041	?
242K7T7	0,282493	3,51092	0,080461247	?
244C18T7	0,230923	1,15507	0,199921217	?
E10B9T7	0,0761297	1,2644	0,060210139	?
E1F2T7	0,04564	1,04625	0,043622461	?
E2H6T7	0,0461892	0,373235	0,123753667	?
E4E10T7	0,0728383	0,593539	0,122718642	?
E6C4T7	0,0396728	0,222556	0,178259854	?
E7B4T7	0,080037	1,75205	0,045681915	?
E7B6T7	0,0386305	12,6299	0,003058654	?
G10D4T7	0,0785148	1,46965	0,053424149	?
G4G1T7	0,0747418	0,565698	0,132123147	?
G8E3T7	0,0933326	2,33401	0,039988089	?
G9G11T7	0,44498	5,06825	0,087797563	?
G9H10T7	0,14118	0,823508	0,171437315	?
G9H3T7	0,0536345	5,87515	0,009129044	?
203P20T7	0,101015	12,7172	0,007943179	30S ribosomales Protein S16
G8H4T7	0,36623	2,26874	0,161424403	β-Fruktosidase

Anhang 4, Arrayhybridisierungen, Vergleich Epidermis-Mesophyll bei Nacht

EST-Nr.	Epidermis Nacht	Epidermis Tag	Quotient	Putative Funktion
F7B5T7	0,163893	1,95474	0,083843887	Cysteinproteinase RD19A Vorläufer
E1D10T7	0,0429168	1,37711	0,031164395	Dwarf1
205P2T7	0,192559	3,91335	0,049205668	Elongationsfaktor TU, chloroplastidärer Vorläufer (EF-TU)
114L15T7	0,154213	1,00134	0,154006631	Ethylen-bildendes Enzym
170I8T7	0,192901	1,46841	0,131367261	F21J9.18
E2G6T7	0,0528593	1,26962	0,041633953	intrinsisches Tonoplasten protein γ (γ -TIP)
G10B4T7	0,300541	2,57285	0,116812484	Isocitratlyase
G9E10T7	0,160307	16,705	0,009596348	Katalase 3
G1C8T7	0,062705	2,62638	0,023875068	NADPH Thioedoxinreductase
E6H9T7	0,106545	0,616033	0,172953397	Nitrittransporter
179E11T7	0,238459	2,34886	0,101521163	Patent
G10A9T7	0,0430284	0,487586	0,088247817	Pektinesterase
G4H3T7	0,8391	5,5436	0,151363735	Plasmamembran-ständige H+ ATPase
180E9T7	0,542328	3,77912	0,143506425	Profilin 2
134A15T7	0,222205	1,17058	0,189824702	Protein MFP-b
179H12T7	0,245297	1,77741	0,138008113	Ribosomales Protein L34
E2G7T7	0,043417	0,357212	0,121544069	Superoxiddismutase
180H18T7	0,150911	2,85191	0,052915765	T7N9.5
179H16T7	0,115656	0,71472	0,161820013	Transkriptionsfaktor SaMADS A
179E12T7	0,683708	4,07886	0,167622326	unbekannt
222P10T7	0,221569	4,3482	0,050956488	unbekannt
180H14T7	0,753114	3,91299	0,192465097	wahrscheinliches Membranprotein
179F12T7	0,517259	3,02128	0,171205251	WAX9D
G1A2T7	0,255158	1,91725	0,133085409	Xylosidase
168H2T7	0,301974	0,559826	0,539406887	Actin 2
170B22T7	0,199091	0,104828	1,899215858	Cyclophilin
192P1T7	0,197859	0,15906	1,24392682	β Tubulin
232A19T7	8,82991	8,47455	1,04193261	Elongationsfaktor 1 α
128N22T7	0,402845	0,228995	1,759186882	Phenylalaninammoniumlyase
240A11T7	0,377877	0,323422	1,168371354	Transcinnamat-4-hydroxylase
87E4T7	8,02432	11,7331	0,683904509	Transkriptionsfaktor L2
181H11T7	1,36389	0,159866	8,531457596	?
242H21T7	1,67204	0,0578579	28,8990786	?
E3F2T7	0,376801	0,0531911	7,083910654	?
H4A5T7	2,07009	0,305095	6,785066946	?
182N4T7	0,637448	0,0638419	9,984790553	Chloroplastidäres ribosomales Protein L1
217D21T7	0,476529	0,0860013	5,540951125	gamma Untereinheit der mitochondrialen F1-ATPase
F7C9T7	0,756922	0,122498	6,179055985	Glutaminyl-IRNA Synthetase

A22

Z Anhang

Anhang 5, Arrayhybridisierungen, Vergleich Epidermis bei Nacht und Tag

EST-Nr.	Epidermis Nacht	Epidermis Tag	Quotient	Putative Funktion
187P7T7	0,677048	0,0455482	14,86442933	homolog zu Skp1p, ein evolutionär konserviertes Kinetochorprotein aus Hefe
248G21T7	1,06901	0,207505	5,151731284	mitochondriales fMet, 18S, 5S repeat Einheit DNA
245N11T7	10,9422	1,83695	5,95672174	Peroxidase
E12F3T7	0,283412	0,053398	5,307539608	Photosystem I Untereinheit PSI-E
127F15T7	3,35665	0,558248	6,012829423	Serin/Threonin-Kinase mRNA
248I16T7	7,67358	0,713977	10,74765714	unbekannt
244H23T7	0,84694	0,0740049	11,44437733	Vakuoläres prozessierendes Enzym

Anhang 6

Normalisierte Aktivitäten aller unterschiedlich und einiger gleich exprimierter Transkripte in vereinigten Zellproben des Mesophylls von *A. thaliana*-Rosettenblättern am Ende der Dunkel- und Lichtperiode. Repräsentiert sind sie durch die gefundenen, homologen ESTs. Sortiert sind sie in drei Gruppen nach ihrer Expressionsstärke und innerhalb der Gruppen alphabetisch nach ihrer putativen Funktion. Fragezeichen markieren ESTs ohne Homologie. Die Quotienten (Aktivität Mesophyll_{Nacht/Tag}) sind grau unterlegt. Weitere Erläuterungen vgl. Kap. 3.1.4.4.

A24

EST-Nr.	Mesophyll Nacht	Mesophyll Tag	Quotient	Funktion
123H22T7	0,596695	3,24765	0,183731313	?
124A7T7	0,543883	8,12968	0,066900911	?
155C1T7	2,75232	14,0963	0,195251236	?
172I16T7	0,197169	1,34883	0,146177799	?
173G14T7	0,185846	1,75214	0,106068008	?
199D3T7	0,129571	1,44152	0,089884983	?
205K13T7	0,190137	3,17541	0,059877937	?
223E13T7	0,169495	1,42393	0,119033239	?
223E15T7	0,15644	0,913249	0,171300489	?
240E11T7	0,0896756	1,09428	0,08194941	?
94E17T7	1,04516	5,29259	0,197476094	?
246C2T7	0,957946	5,01627	0,190967791	40S ribosomales Protein S13
170G23T7	0,213422	2,10586	0,101346718	Ähnlich zum ribosomalen Protein L21
170G23T7	0,317921	2,04601	0,155385849	ähnlich zum ribosomalen Protein L21
171E15T7	0,262237	1,58378	0,165576658	ähnlich zum ribosomalen Protein L21
224J15T7	0,869117	4,43316	0,196049094	β-Glukosidase
240D7T7	0,110381	1,39568	0,079087613	Calmodulin
204G22T7	0,171474	0,895842	0,191410985	enthält Ähnlichkeit zur Peptidasefamilie A1
249C3T7	0,539919	3,39554	0,159008287	Germin-ähnliches Protein
232D4T7	2,19282	12,2094	0,179600963	Glutaminsynthetase
114J4T7	0,200139	1,68894	0,118499769	Glutathionperoxidase
173N24T7	0,352924	2,00559	0,175970163	Hauptlatexprotein
115B13T7	0,171813	0,993479	0,172940747	Histon H3
231C4T7	0,268075	7,24822	0,036984943	Hydroxynitrilylase
121F11T7	0,26317	1,64196	0,16027796	Hypothetisches Protein aus Hefe, Lpg22p
223N21T7	0,973841	5,19278	0,187537504	intrinsisches Protein 2a der Plasmamembran
220F8T7	0,233555	1,40139	0,166659531	Kälte und ABA reguliertes Gen
120B15T7	1,77257	10,1329	0,174932152	L-Ascorbateperoxidase
129P9T7	1,26966	8,74819	0,145134022	L-Ascorbateperoxidase
118D23T7	0,156997	1,06332	0,147647933	Photosystem II Reaktionscenter 6,1KDa Protein
113P10T7	0,216339	1,89176	0,114358587	Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase kleine Untereinheit

Anhang 6, Arrayhybridisierungen, Vergleich Mesophyll bei Nacht und Tag

A25

EST-Nr.	Mesophyll Nacht	Mesophyll Tag	Quotient	Funktion
119K3T7	0,181109	1,65487	0,109440016	Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase kleine Untereinheit
127F20T7	0,226555	2,05614	0,110184618	Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase kleine Untereinheit
122A13T7	0,258962	1,40484	0,184335583	Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase kleine Untereinheit
107F7T7	0,116266	1,00508	0,115678354	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 1B Vorläufer
146N6T7	0,271406	1,39351	0,1947643	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 1B Vorläufer
160E15T7	0,356279	2,07659	0,171569255	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 1B Vorläufer
187F16T7	0,230471	1,44054	0,15998931	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 1B Vorläufer
90E2T7	0,208896	1,08422	0,192669384	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 1B Vorläufer
163E18T7	0,200052	1,78572	0,112028762	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 1B Vorläufer
185F20T7	0,13901	1,60404	0,086662427	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 1B Vorläufer
231E24T7	0,279598	1,46549	0,190788064	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 1B Vorläufer
242E18T7	0,454248	2,46196	0,184506653	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 1B Vorläufer
192K21T7	0,275993	2,07875	0,132768731	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 2B Vorläufer
135J9T7	0,367839	2,23454	0,164615089	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 2B Vorläufer
181P19T7	0,389591	1,96231	0,198536928	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 2B Vorläufer
223G6T7	0,24225	1,47654	0,164065992	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 2B Vorläufer
242I8T7	0,164614	1,11422	0,147739226	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 2B Vorläufer
144G20T7	0,228942	2,09095	0,109491858	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 2B Vorläufer
174M11T7	0,289456	2,63963	0,109657793	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 2B Vorläufer
141O17T7	0,258318	1,944	0,13287963	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
118D13T7	0,137152	0,895686	0,153125091	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
119L6T7	0,175905	1,48152	0,118732788	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
134H23T7	0,245291	1,64355	0,149244623	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
159O13T7	0,27381	1,71308	0,159834917	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
166D23T7	0,191005	0,955425	0,199916268	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
168O23T7	0,322652	1,79281	0,179969991	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
214A3T7	0,168601	0,964845	0,17474413	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
107F2T7	0,217212	1,27738	0,170044936	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
116B24T7	0,228779	1,30111	0,175833711	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
161M12T7	0,753446	6,51084	0,115721781	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
163L21T7	0,219594	1,83257	0,119828438	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
166G11T7	0,324111	1,82039	0,178044815	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
168F20T7	0,270266	2,044	0,13222407	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
171M16T7	0,448671	2,33812	0,191893915	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
172C7T7	0,196766	1,94293	0,10127282	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
174G14T7	0,198149	1,11526	0,177670678	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
177A4T7	0,270464	2,00659	0,134787874	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
184G15T7	0,232012	1,19647	0,193913763	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B Vorläufer
179F15T7	0,34297	2,02406	0,169446558	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 3B VorläuferPRECURSOR
143D10T7	0,216979	1,88853	0,114893065	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette F1 Vorläufer
205H18T7	0,194147	1,2425	0,156255131	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette Vorläufer

Anhang 6, Arrayhybridisierungen, Vergleich Mesophyll bei Nacht und Tag

EST-Nr.	Mesophyll Nacht	Mesophyll Tag	Quotient	Funktion
205I21T7	0,218071	1,37342	0,158779543	Ribulosebiphosphatcarboxylase kleine Kette Vorläufer
205A7T7	0,266768	1,3491	0,197737751	Ribulosebiphosphatcarboxylase kleine Untereinheit
168G18T7	0,160259	4,84981	0,033044387	Sauerstoff-hervorbringender Komplex des Photosystem II
144C15T7	0,207416	1,92315	0,107852222	sekretierte saure Phosphatase
172H20T7	0,182828	1,35234	0,135193812	Trehalose-6-phosphatsynthase Homolog
111K14T7	0,178711	0,981728	0,182037183	Ubiquitin-konjugierendes Enzym 18
168H2T7	0,1	0,330871	0,302232592	Actin 2
170B22T7	0,1	0,208984	0,478505532	Cyclophilin
192P1T7	0,1	0,181723	0,550288076	β Tubulin
232A19T7	13,7249	11,8159	1,161561963	Elongationsfaktor 1 α
128N22T7	0,355819	0,257907	1,379640723	Phenylalaninammoniumlyase
240A11T7	0,297986	0,207962	1,432886777	Transcinnamat-4-hydroxylase
87E4T7	8,06505	12,4454	0,648034615	Transkriptionsfaktor L2
103F6T7	3,48058	0,269025	12,93775671	?
105D4T7	2,07096	0,186345	11,11357965	?
105O20T7	1,68627	0,150671	11,19173564	?
111A5T7	39,4787	0,10925	361,3610984	?
113H1T7	0,721691	0,136738	5,277911042	?
115B4T7	0,307718	0,0558441	5,51030458	?
116D18T7	6,50064	0,27682	23,48327433	?
117J11T7	3,16551	0,11696	27,06489398	?
120P23T7	0,951149	0,170016	5,59446758	?
121G2T7	3,43617	0,471972	7,280453078	?
121L6T7	1,3398	0,0875736	15,29913125	?
122O12T7	6,91846	0,699157	9,895431212	?
130P5T7	0,795457	0,155766	5,106743449	?
132G21T7	0,896395	0,165932	5,402182822	?
134I13T7	1,06086	0,19353	5,481630755	?
141C4T7	2,06679	0,130698	15,8134784	?
141O5T7	4,55525	0,137853	33,04425729	?
155P20T7	6,02907	0,169512	35,56721648	?
177K16T7	0,670897	0,0968644	6,926146242	?
178P4T7	0,762467	0,143412	5,316619251	?
180M9T7	2,36934	0,150346	15,75924867	?
185D14T7	3,48628	0,564479	6,176102211	?
190I6T7	3,26733	0,457566	7,140674788	?
206L10T7	1,70849	0,191263	8,932673857	?
206O16T7	0,978711	0,179096	5,464728414	?
209E19T7	2,4561	0,479709	5,119978987	?

A26

Z Anhang

Anhang 6, Arrayhybridisierungen, Vergleich Mesophyll bei Nacht und Tag

A27

EST-Nr.	Mesophyll Nacht	Mesophyll Tag	Quotient	Funktion
210A23T7	10,3717	1,48538	6,982522991	?
211O13T7	52,7388	0,547091	96,39858817	?
212D11T7	78,7955	1,52719	51,5950864	?
212H9T7	4,57585	0,667221	6,858072513	?
214B11T7	2,64186	0,209957	12,58286221	?
222I5T7	2,15019	0,121089	17,75710428	?
224P3T7	17,1392	3,26001	5,257407186	?
230B16T7	2,55138	0,182769	13,95958833	?
240E9T7	1,83796	0,28575	6,432055993	?
244B23T7	3,91473	0,728554	5,373287361	?
244K1T7	2,52541	0,272466	9,268716097	?
88M6T7	1,08496	0,19659	5,518897197	?
92K3T7	1,77977	0,189636	9,385190576	?
E5G4T7	3,14686	0,0470086	66,94221908	?
F1B10T7	2,26288	0,143156	15,80709156	?
F3E2T7	3,18064	0,529866	6,002725217	?
F4H10T7	0,815134	0,149371	5,457110149	?
G3H4T7	3,20387	0,272677	11,74968919	?
G7C1T7	2,08738	0,260627	8,009070434	?
G8G9T7	2,61997	0,236572	11,07472566	?
106H21T7	1,73075	0,146101	11,84625704	12-Oxophytodienoatreductase
204D7T7	12,3462	1,49584	8,253690234	3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA Reductase
220P22T7	1,40528	0,276256	5,086875941	Acetolactatsynthese Vorläufer
231B19T7	0,398821	0,06665	5,983810953	Actin-12
192O7T7	9,43338	1,82437	5,170760317	ähnlich zur ATP-Citratlyase
246B20T7	15,4589	2,17261	7,115358946	ähnlich zur ATP-Citratlyase
198I10T7	4,0991	0,68494	5,984611791	ähnlich zur Phosphoglyceratmutase
157G10T7	2,60558	0,226284	11,51464531	α Tubulin
242G4T7	5,78227	0,271333	21,31060358	α Tubulin
241I14T7	5,11817	0,588431	8,697995177	Anorganische Pyrophosphatase
207M11T7	1,57648	0,23937	6,585954798	AP2 Domäne enthaltendes Protein RAP2.8
90D4T7	1,10195	0,184287	5,979531926	AR411
203C7T7	7,35181	0,238005	30,88930905	6 Homeobox Protein
F4F11T7	2,5711	0,417515	6,158102104	ATP-Citratlyase
G7A8T7	2,02497	0,204396	9,907092115	Chaperonin 60 beta
H10E5T7	0,874619	0,0537949	16,25839996	Chlorophyll a Apoprotein A1 (Photosystem I P700)
231F3T7	4,44573	0,737139	6,031060628	Chlorophyll a /b bindendes Protein (Photosystem II Typ I)
182E24T7	11,6747	0,160458	72,7586035	Cyclopropanfettsäuresynthase
228K16T7	2,43171	0,1903	12,77829743	Cystein Protease
143A7T7	12,4748	0,112358	111,0272522	Cystein Proteinase Homolog
103I15T7	7,64058	0,189756	40,26528805	Cystein Proteinase RD 21A Vorläufer

7 Anhang

Anhang 6, Arrayhybridisierungen, Vergleich Mesophyll bei Nacht und Tag

EST-Nr.	Mesophyll Nacht	Mesophyll Tag	Quotient	Funktion
190K17T7	3,77347	0,513056	7,354889135	DNA bindendes Protein
168B8T7	0,954245	0,111708	8,54231568	Galaktosyltransferase assoziierte Proteinkinase P58/GTA
124L18T7	3,47939	0,215022	16,18155352	Glutathion-reguliertes Kaliumefflux System Protein kefB
206N21T7	1,53693	0,223701	6,870465487	Glutathion-S-transferase
226N14T7	4,35394	0,129398	33,64766071	Glyoxysomale Citratsynthase
119H2T7	1,24335	0,187736	6,622864022	GMP-Synthase
89K12T7	6,46671	0,951366	6,797289371	grr1
225G20T7	16,3049	2,89617	5,629814548	HMG Protein
141K12T7	7,94404	1,58841	5,001252825	Homeobox-Leucin Zipper Protein
185D15T7	5,57536	1,09617	5,086218379	Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase
115F3T7	0,740599	0,11468	6,457961284	hypothetisches Protein
214C17T7	34,1886	0,836271	40,88220206	hypothetisches Protein
191J19T7	2,11908	0,128761	16,45746771	hypothetisches Protein
G1H1T7	0,852915	0,0992479	8,593783848	Jasmonat induzierbares Protein
151G18T7	3,99618	0,583979	6,84302004	lösliche anorganische Pyrophosphatase
203A7T7	3,71088	0,230735	16,08286563	lösliche anorganische Pyrophosphatase
116E16T7	0,468256	0,0929416	5,03817451	Metallothionein
138A20T7	0,492716	0,0873431	5,641155398	Metallothionein
170L1T7	0,598075	0,116749	5,122741951	Metallothionein
197L1T7	3,17195	0,337681	9,393332761	mitochondriales Chaperonin HSP60-1 Vorläufer
222M22T7	8,08353	0,869072	9,301335217	NADH Dehydrogenase (Ubiquinon)
163F22T7	5,51649	0,404075	13,65214379	Nicht cyanogene beta Glukosidase Vorläufer
147K15T7	1,5891	0,152132	10,44553414	Nicotiana eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 4A
126N11T7	2,87413	0,303221	9,478664077	Nitratreduktase
115J6T7	0,555371	0,0650225	8,541212657	Peroxisomales ATP/ADP Carrierprotein
213L3T7	8,63712	0,183899	46,96665017	Phosphoglukomutase
F3A3T7	1,05672	0,170443	6,199843936	Polyubiquitin
F4C3T7	2,19538	0,162854	13,48066366	Polyubiquitin
210F24T7	0,578177	0,113169	5,108969771	Protein Disulfidisomerase
211P21T7	46,752	1,03919	44,98888557	PSI Reaktionscenter Untereinheit XI
G7A8T7	1,85515	0,260214	7,129324325	Pyrrrolin-5-carboxylatsynthetase B
190I5T7	2,3774	0,441121	5,389450967	reversibel glykosyliertes Polypeptid-2
182A5T7	1,46761	0,137116	10,703419	ribosomales Protein
241L23T7	8,1445	0,623906	13,05404981	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 1A Vorläufer
242D20T7	2,79764	0,51527	5,429464164	Ribulosebisphosphatcarboxylase kleine Kette 1B Vorläufer
91O11T7	16,8634	0,19122	88,18847401	Rubisco Untereinheit bindendes Protein, Vorläufer der beta Untereinheit (60 KDa CHAPERONIN BETA SUBUNIT)
211P20T7	72,0452	0,614759	117,1925909	SCARECROW ähnliches Protein
89K20T7	1,29258	0,235516	5,488289543	Serinacetyltransferase
F1A5T7	3,52252	0,30261	11,64046132	SRG1 Protein
E2G7T7	0,74937	0,0565541	13,2504982	Superoxiddismutase
E8D6T7	1,15686	0,0655071	17,66007044	Superoxiddismutase, chloroplastidärer Vorläufer

A28

Z Anhang

Anhang 6, Arrayhybridisierungen, Vergleich Mesophyll bei Nacht und Tag

EST-Nr.	Mesophyll Nacht	Mesophyll Tag	Quotient	Funktion
F4B2T7	1,79507	0,194594	9,224693464	Thioglukosidglukohydrolase
103I15T7	7,70613	0,185183	41,61359304	Thiolprotease
206L7T7	1,84413	0,22759	8,102860407	Translokon-assoziiertes Protein, Vorläufer der alpha Untereinheit
109E3T7	2,23832	0,127135	17,60585205	Ubiquitin
210K12T7	2,24319	0,227416	9,863817849	Ubiquitin
222O20T7	4,0604	0,485462	8,363991414	Ubiquitin
249N2T7	4,29353	0,49684	8,641675388	Ubiquitin
F1D9T7	0,544444	0,0889592	6,120153958	Ubiquitin
113B2T7	2,11173	0,33857	6,237203533	Ubiquitin 11
E4H3T7	0,827252	0,0922816	8,964430612	ubiquitin precursor
180B9T7	0,855873	0,163736	5,227152245	Ubiquitin Vorläufer
E5F5T7	0,584272	0,0923339	6,327816761	Ubiquitin/ribosomales Protein S27a
146N22T7	2,6635	0,249222	10,68725875	Ubiquitin-ähnliches Protein
192D14T7	1,60623	0,114626	14,01278942	Ubiquitin-ähnliches Protein
91D12T7	1,79693	0,127022	14,14660453	Ubiquitin-ähnliches Protein
230E4T7	2,31927	0,390051	5,946068591	Ubiquitin-ähnliches Protein 12
241E1T7	1,31683	0,20806	6,329087763	Ubiquitin-ähnliches Protein 12
241P3T7	3,66276	0,180069	20,34086933	Ubiquitin-ähnliches Protein 12
247P24T7	4,88115	0,546139	8,937559852	Ubiquitin-ähnliches Protein 12
E6B7T7	4,2159	0,124989	33,73016825	Ubiquitin-ähnliches Protein 12
230E4T7	2,40701	0,351512	6,84758984	Ubiquitin-ähnliches Protein 12
114P24T7	0,62728	0,0964848	6,501334925	unbekannt
211P19T7	1,10469	0,170856	6,465620171	unbekannt
213D12T7	1,58524	0,216994	7,30545545	unbekannt
151L13T7	0,741133	0,0623491	11,88682756	unbekanntes Protein
206L9T7	2,51062	0,26502	9,473322768	Xyloglukanendotransglykosylase ähnliches Protein

A29

DANKSAGUNG

Danken möchte ich Prof. Dr. Lothar Willmitzer und Dr. Julia Kehr für die Bereitstellung des Themas und ihre ständige Diskussionsbereitschaft. Prof. Dr. Martin Steup (Universität Potsdam) möchte ich für die Vertretung meiner Arbeit an der Universität Potsdam und die interessanten fachlichen Gespräche danken. Ich bedanke mich bei Prof. Thomas Altmann (MPI-MP) für die Bereitstellung der Arrayfilter.

Mein besonderer Dank gilt natürlich Julia, für ihre schier unermessliche Geduld und ihre vielen Ideen, die diese Arbeit geprägt haben. Ihr und den Mitgliedern ihrer Arbeitsgruppe, meinen Mädels Christina, Kathy, Martina und Melanie, gilt mein Dank nicht nur für die vielen lustigen Stunden im Labor, sondern auch für das Erdulden meiner schlechten Laune beim Zusammenschreiben als auch das Korrekturlesen meiner Arbeit. Schön war es, daß die Arbeit so manchesmal in den Hintergrund rückte. Für das Korrekturlesen möchte ich mich auch bei Dr. Elke Lieckfeld bedanken. Des weiteren möchte ich Dr. Sebastian Kloska für die Unterstützung beim Auswerten der Arraydaten, Sabine Fischer und Peggy Lange für manche Hilfestellung im Isolab, Helga Kulka für die Pflege meiner Aras („ab heute pikiere ich deine Aras, bei dir überlebt das nur die Hälfte der Pflänzchen“) und Dr. Ute Rößner für die Hilfe an der GC-MS meinen Dank aussprechen. Dietmar und Toralf möchte ich danken für den vorzüglichen Umbau unserer CE.

Ally sei meine Anerkennung ausgesprochen, daß er mich geduldig Woche für Woche beim Tischtennis gewinnen ließ.

Den meisten Mitgliedern des MPIs gilt mein Dank dafür, daß die letzten sechseinhalb (!) Jahre zu einer angenehmen (und lehrreichen) Zeit wurden. Regina, Romy und Michael möchte ich besonders hervorheben: Was ein einfaches Lächeln, ein paar lebenswürdige Worte doch ausmachen können. Katja sei, auch wenn es nun müßig ist, für vielerlei, besonders aber ihre Geduld in den abgelaufenen drei Jahren gedankt.

Meinen Eltern Christa und Hans-Martin möchte ich als letztes, aber auch am tiefsten danken, daß sie alle meine Fehler und Macken nicht nur ertragen, sondern mich auch immer ermuntern und bei allen Entscheidungen unterstützen.

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name Stephan Peter Brandt
Geboren 25.11.1972
Geburtsort Göttingen
Familienstand ledig

Ausbildung

1979-1983 Albani-Grundschule, Göttingen
1983-1985 Orientierungstufe Lutherschule, Göttingen, Latein als erste Fremdsprache
1985-1992 Theodor-Heuss-Gymnasium, Göttingen, Englisch als zweite Fremdsprache
1992-1994 Studium der Biologie (Diplom), Georg-August-Universität Göttingen
Okt. 1994 Diplomvorprüfungen
1994-1998 Studium der Biologie (Diplom), Universität Potsdam
1997 Ablage der Diplomprüfungen
Juli 1997-
 April 1998 Diplomarbeit am Max Planck Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie,
 Golm (Abteilung Prof. Dr. Lothar Willmitzer) in der Arbeitsgruppe von Dr.
 Joachim Fisahn, Thema: „Untersuchungen zum Nukleinsäuregehalt im
 Phloemsaft“
Okt. 1998-
 Nov. 2001 Doktorarbeit am Max Planck Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie,
 Golm (Abteilung Prof. Dr. Lothar Willmitzer) in der Arbeitsgruppe von Dr.
 Julia Kehr, Thema: „Zelltyp-spezifische Mikroanalyse von *Arabidopsis*
 thaliana-Blättern“
Aug. 2001 Teilnehmer am 102. BASF Studentenferienkurs in Ludwigshafen

PUBLIKATIONSLISTE

Brandt, S. und Fisahn, J. (1998) Expression of a Potassium channel from potato leaves in *Xenopus* oocytes. *Plant Cell Physiol.* 39: 600-606.

Knight, H., Brandt, S. und Knight, M. (1998) A history of stress alters drought calcium signalling pathways in Arabidopsis. *Plant J.* 16: 681-687.

Brandt, S., Kehr, J., Walz, C., Imlau, A., Willmitzer, L. und Fisahn, J. (1999) A rapid method for detection of plant gene transcripts from single epidermal, mesophyll and companion cells of intact leaves. *Plant J.* 20: 245-250.

Arlt, K., Brandt, S. und Kehr, J. (2001) Amino acid analysis at the single plant cell level using capillary electrophoresis coupled to laser- induced- fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 926: 319-325.

Brandt, S., Kloska, S., Altmann, T. und Kehr, J. (2001) Using array hybridization to monitor gene expression at the single cell level. *J. Exp. Bot.* eingereicht.

Reinhold-von-Sengbusch-Preis 2001 für eine herausragende Präsentation des Posters:

Brandt, S., Willmitzer, L. und Kehr, J. Microarray hybridization for monitoring gene expression at the single cell level.

Verliehen während der 14. Tagung „Molekularbiologie der Pflanze“, Dabringhausen Wermelskirchen 2001.