

Einfluss von Trockenstress auf Polyamine und Sperminsynthesen in Gerste (*Hordeum vulgare*)

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften,
Institut für Pharmazie

Diese Dissertation gehört zum Teilprojekt TP07 des
Interdisziplinären Zentrums für Nutzpflanzenforschung (IZN)

der

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



von

Herrn Dipl.-Pharm. Sebastian Pietack
geboren am 21.07.1983 in Frankfurt (Oder)

Gutachter:

1. Prof. Dr. B. Dräger
2. Prof. Dr. E. Peiter
3. Prof. Dr. D. Ober

Verteidigungsdatum: 22.02.2019

Die Gerste spricht: „Ich bin so fein,
mein Haar ist lang und dünn.
Könnt es ein Stückchen länger sein,
ging`s bis zum Himmel hin!“ ...

aus „Der Streit“, Gedicht von Erna Brückner (23.03.1927-10.04.2014)

Gewidmet sei diese Arbeit meiner Ehefrau Julia Pietack und meiner Familie.

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	C
II.	Abbildungsverzeichnis.....	H
III.	Tabellenverzeichnis	J
IV.	Diagrammverzeichnis	L
V.	Abkürzungsverzeichnis.....	M
1.	Einleitung.....	1
1.1.	Gerste – <i>Hordeum vulgare</i>	1
1.2.	Gerste und Trockenstress	2
1.3.	Polyamine in Pflanzen.....	3
1.3.1.	PA-Biosynthese	4
1.3.2.	Putrescin und Spermidin.....	7
1.3.3.	Spermin und Sperminsynthasen	7
1.3.4.	Thermospermin und Thermosperminsynthasen	9
1.4.	Fragestellung und Ziele.....	10
2.	Material und Methoden.....	13
2.1.	Materialien	13
2.1.1.	<i>Hordeum vulgare</i> -Pflanzen.....	13
2.1.2.	Bakterienstämme	13
2.1.3.	Leerplasmide.....	14
2.1.4.	Primer	14
2.1.5.	Instrumente und Apparaturen	17
2.1.6.	Chemikalien.....	19
2.1.7.	Kits und Marker.....	21
2.1.8.	Enzyme	22
2.1.9.	Kulturmedien für <i>E. coli</i>	23
2.1.10.	Puffer und Reagenzien.....	23
2.1.11.	Sonstige Materialien	27
2.2.	Biologische Methoden	27
2.2.1.	Anzucht von Gerstenpflanzen für (<i>T</i>) <i>SPMS</i> -Untersuchungen.....	27
2.2.2.	Anzucht von Gerstenpflanzen für Trockenstressexperimente	28
2.2.2.1.	Trockenstressexperiment 2012	30
2.2.2.2.	Trockenstressexperiment 2013	30
2.2.2.3.	Trockenstressexperiment 2014.....	30
2.2.3.	Anzucht von Gerstenpflanzen für transiente Transformation von Protoplasten	32
2.3.	Molekularbiologische Methoden	32
2.3.1.	Isolation von gesamt-RNA aus <i>Hordeum vulgare</i> -Pflanzen	32

2.3.1.1.	Methode nach Reinbothe (Phenol-Chloroform-, 3-Tages-Methode)	32
2.3.1.2.	Methode nach QIAGEN [®] RNeasy [®] Plant Mini Kit, modifiziert	33
2.3.2.	Fällung und Aufkonzentrierung von Ribonukleinsäuren	33
2.3.3.	Reverse Transkription.....	33
2.3.3.1.	Reverse Transkription mit SuperScript [™] II, Invitrogen	34
2.3.3.2.	RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit Thermo Scientific.....	34
2.3.3.3.	Omniscript [®] RT Kit von QIAGEN.....	35
2.3.4.	Agarose-Gel-Elektrophorese	35
2.3.5.	Polymerase-Kettenreaktionen (PCRs).....	35
2.3.5.1.	MangoMix [™] -PCR.....	36
2.3.5.2.	MyFi [™] -Taq-PCR	37
2.3.5.3.	<i>Pfu</i> -PCR.....	37
2.3.5.4.	qRT-PCR	38
2.3.5.5.	RACE-PCR.....	39
2.3.5.6.	Ranger-PCR.....	41
2.3.5.7.	<i>Taq</i> -PCR.....	42
2.3.5.8.	Phusion Polymerase-PCR.....	43
2.3.6.	Extraktion von cDNA-Fragmenten aus Agarosegelen	43
2.3.7.	Ligation von DNA-Fragmenten.....	44
2.3.7.1.	Promega pGEM [®] -T Easy-Ligation.....	44
2.3.7.2.	Promega T4-Ligation.....	44
2.3.7.3.	Invitrogen TA-Klonierung.....	45
2.3.8.	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Bakterienkulturen	45
2.3.9.	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> Bakterienkulturen	46
2.3.9.1.	Hitze-Schock	46
2.3.9.2.	Elektroschock	46
2.3.10.	Kolonie-PCR	46
2.3.11.	Flüssigkulturen und Plasmidpräparation	47
2.3.12.	Glycerolkultur.....	47
2.3.13.	Restriktionsverdau	47
2.3.14.	<i>HvSPMS</i> -Gen-Promotorenaktivitätsuntersuchungen.....	48
2.3.14.1.	Isolation von <i>Hordeum vulgare</i> gDNA	48
2.3.14.2.	Genome Walking	48
2.3.14.3.	Vektorkonstruktion.....	49
2.3.14.4.	Protoplastenisolation	51
2.3.14.5.	transiente Protoplastentransformation	52
2.3.14.6.	Fluoreszenzmikroskopie.....	52

2.3.15. Sequenzierung.....	52
2.4. Biochemische Methoden.....	53
2.4.1. Bakterielle Proteinsynthese	53
2.4.2. Lyse der Bakterien.....	53
2.4.3. Umpufferung von Proteinfractionen.....	53
2.4.4. Kinetische Charakterisierung der HvSPMS-Proteine.....	54
2.4.4.1. Reinheits- und Gehaltsbestimmung dcSAM	54
2.4.4.2. Bestimmung der Funktion der vermeintlichen HvSPMS-Proteine	55
2.4.4.3. Bestimmung der Linearität der Proteinaktivität der HvSPMS-Proteine	55
2.4.4.4. Bestimmung des pH-Optimums der HvSPMS	56
2.4.4.5. Kinetische Charakterisierung der HvSPMS-Proteine.....	56
2.5. Instrumentell-analytische und Chemische Methoden	57
2.5.1. Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren.....	57
2.5.1.1. Bestimmung mittels UV-VIS-Spektrofotometer Gene Quant II	58
2.5.1.2. Bestimmung mittels Plattenleser NanoQuant Infinite M 200	58
2.5.2. Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC).....	58
2.5.3. Bradford-Assay.....	59
2.5.4. Denaturierende Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	59
2.5.5. HPLC-Analyse von Polyaminen.....	60
2.5.5.1. Extraktion von Polyaminen aus Gerstenpflanzenmaterial.....	60
2.5.5.2. Derivatisierung von Polyaminen mit Dansylchlorid	61
2.5.5.3. Derivatisierung von Polyaminen mit FMOC.....	62
2.5.5.4. HPLC-Analyse von Polyaminen nach Dansylierung	62
2.5.5.5. HPLC-Analyse von Polyaminen nach FMOC-Derivatisierung	63
2.5.6. GC-MS-Analyse von Polyaminen	64
2.5.6.1. Derivatisierung von Polyaminen mit HFBA	64
2.5.6.2. GC-MS-Analyse von Polyaminen nach HFBA-Derivatisierung.....	65
2.6. <i>In silico</i> Methoden.....	66
2.6.1. Charakterisierung der Nukleinsäuresequenzen.....	66
2.6.1.1. Wobble-Primer-Gestaltung.....	66
2.6.1.2. cDNA-Sequenzierung.....	68
2.6.1.3. gDNA-Sequenzierung und Genome Walking	68
2.6.2. Phylogenetische Analyse	69
2.6.2.1. Phylogenetische Analyse der HvSPMS-Gen-Sequenzen.....	69
2.6.2.2. Phylogenetische Suche nach HvTSPMS-Gen-Sequenzen	70
2.6.3. Datenbanken und Computerprogramme.....	73
3. Ergebnisse.....	74

3.1. Charakterisierung der HvSPMS-Proteine	74
3.1.1. Charakterisierung der Nukleinsäuresequenzen.....	74
3.1.1.1. Isolierte RNA aus <i>Hordeum vulgare</i> Pflanzen	74
3.1.1.2. Amplifizierung von <i>Hv(T)SPMS</i> -cDNA-Fragmenten	74
3.1.1.3. Amplifizierung und Sequenzierung der Vollängen- <i>HvSPMS1</i> -cDNA	74
3.1.1.4. Amplifizierung und Sequenzierung der Vollängen- <i>HvSPMS2</i> -cDNA	75
3.1.1.5. gDNA-Amplifizierung und Sequenzierung.....	75
3.1.1.6. Intron-Exon-Muster	76
3.1.2. Phylogenetische Untersuchungen.....	76
3.1.2.1. <i>SPMS</i> in <i>Hordeum vulgare</i>	76
3.1.2.2. Phylogenetische Einordnung von HvSPMS	77
3.1.2.3. <i>TSPMS</i> in <i>Hordeum vulgare</i>	78
3.1.3. Charakterisierung der Proteinfunktion	79
3.1.3.1. Umklonierung der <i>HvSPMS</i> -cDNA-Sequenzen in den pQE30-Vektor	80
3.1.3.2. HvSPMS-Proteinsynthese und -Reinigung	80
3.1.3.3. Funktionsuntersuchungen.....	80
3.1.4. Kinetische Charakterisierung.....	82
3.1.4.1. Bestimmung der pH-Optima	82
3.1.4.2. Bestimmung der kinetischen Charakteristika	83
3.2. Aktivitätsuntersuchungen der <i>HvSPMS</i> -Gen-Promotoren.....	84
3.2.1. Isolierte gDNA aus <i>Hordeum vulgare</i> Pflanzen.....	85
3.2.2. Genome Walking und Analyse der upstream-Regionen	85
3.2.3. Vektorkonstruktion.....	87
3.2.4. Protoplastenisolation und –Transformation.....	87
3.2.5. Fluoreszenzmikroskopie	88
3.3. Trockenstressexperimente.....	89
3.3.1. Trockenstressexperiment 2012	89
3.3.2. Trockenstressexperiment 2013	93
3.3.2.1. Regulation der Transkriptabundanzen der <i>HvSPMS</i> -Gene	93
3.3.2.2. Polyamingehalt	97
3.3.3. Trockenstressexperiment 2014	99
3.3.3.1. Regulation der Transkriptabundanzen der <i>HvSPMS</i> -Gene	99
3.3.3.2. Polyamingehalt	105
3.4. Suche nach <i>TSPMS</i> in <i>Hordeum vulgare</i>	110
3.4.1. Erste cDNA-Amplifizierung zur Suche vermeintlicher <i>HvTSPMS</i>	110
3.4.2. Zweite cDNA-Amplifizierung und Sequenzierung vermuteter <i>HvTSPMS</i> -cDNA-Fragmente	110

3.4.3.	Dritte cDNA-Amplifizierung und Sequenzierung vermeintlicher <i>HvTSPMS</i> -cDNA-Fragmente	111
3.4.4.	HPLC-gestützte TSPM-Suche in <i>Hordeum vulgare</i>	113
4.	Diskussion.....	117
4.1.	Charakterisierung der <i>HvSPMS</i> -Proteine	117
4.1.1.	Aufschlüsselung der <i>HvSPMS</i> -Nukleinsäuresequenzen.....	117
4.1.1.1.	Amplifizierung und Sequenzierung der <i>HvSPMS1/2-c/gDNA</i>	117
4.1.1.2.	Intron/Exon-Muster der <i>HvSPMS</i> -Gene	118
4.1.2.	Phylogenetische Untersuchungen	121
4.1.3.	Funktions- und kinetische Charakterisierung der <i>HvSPMS</i> -Proteine	122
4.1.3.1.	Synthese und Reinigung der vermuteten <i>HvSPMS</i> -Proteine	122
4.1.3.2.	Bestimmung der Proteinfunktion.....	123
4.1.3.3.	Kinetische Charakterisierung der <i>HvSPMS</i> -Proteine.....	124
4.2.	Aktivitätsuntersuchungen der <i>HvSPMS</i> -Promotoren.....	127
4.2.1.	Amplifizierung, Sequenzierung und Analyse der <i>HvSPMS</i> -upstream-Regionen	128
4.2.2.	Vektorkonstruktion und Aktivitätsuntersuchungen.....	129
4.3.	Trockenstressexperimente.....	131
4.3.1.	Untersuchung der Regulation der Transkriptabundanzen der <i>HvSPMS</i> -Gene	132
4.3.2.	Untersuchungen des PA-Gehaltes	135
4.3.2.1.	Putrescingehalt.....	136
4.3.2.2.	Spermidingehalt.....	137
4.3.2.3.	Spermingehalt.....	138
4.4.	Zusammenfassende Betrachtungen der Charakterisierung, der Aktivitätsuntersuchungen der <i>HvSPMS</i> -Proteine und der Trockenstressexperimente.....	140
4.5.	Suche nach Thermosperminsynthesen in Gerste.....	142
4.5.1.	Suche nach cDNA-Sequenzen für <i>HvTSPMS</i>	142
4.5.2.	Phylogenetische Abgrenzung von <i>SPMS</i> - und <i>TSPMS</i> -Genen	143
4.5.3.	HPLC-gestützte TSPM-Suche in <i>Hordeum vulgare</i>	144
5.	Zusammenfassung und Ausblick	147
6.	Anhang.....	149
6.1.	Elektropherogramme.....	150
6.2.	Vektorkarten.....	153
6.2.1.	pGreen-red-Vektor.....	153
6.2.2.	pGreen-red-yellow-Vektor	154
6.2.3.	pGreen-red-Insert-Yellow-Vektoren	155
6.2.4.	pUBI-AB-Vektor	157

6.2.5.	pUBI-AB- <i>mUBI::eYFP-Tnos</i> -Vektor	158
6.3.	<i>HvSPMS</i> -Sequenzen.....	159
6.3.1.	<i>HvSPMS1</i> -cDNA-Sequenz	159
6.3.2.	<i>HvSPMS2</i> -cDNA-Sequenz	159
6.3.3.	<i>HvSPMS1</i> -gDNA-Sequenz (ohne upstream-Region).....	160
6.3.4.	<i>HvSPMS2</i> -gDNA-Sequenz (ohne upstream-Region).....	161
6.3.5.	<i>HvSPMS1</i> -Protein-Sequenz	163
6.3.6.	<i>HvSPMS2</i> -Protein-Sequenz	163
6.3.7.	<i>HvSPMS1</i> -upstream-Region-Sequenz	164
6.3.8.	<i>HvSPMS2</i> -upstream-Region-Sequenz	165
6.3.9.	Alignment der <i>HvSPMS</i> -Sequenzen und Wobble-Primer	166
6.4.	Phylogenetische Bäume aus wissenschaftlichen Publikationen	167
6.4.1.	Phylogenetischer Baum aus Rodríguez-Kessler, et al., 2010	167
6.4.2.	Phylogenetischer Baum aus Takahashi, et al., 2009.....	168
6.4.3.	Phylogenetischer Baum aus Takano, et al., 2012	168
6.5.	Motive für mögliche CIS-Elemente der <i>HvSPMS</i> -upstream-Regionen.....	169
6.5.1.	mögliche Motive für CIS-Elemente der <i>HvSPMS1</i> -upstream-Region	169
6.5.2.	mögliche Motive für CIS-Elemente der <i>HvSPMS2</i> -upstream-Region	177
6.6.	Sonstige Abbildungen	184
6.6.1.	GenomeWalker™ Adapter und Adapter-Primer	184
6.6.2.	MCS Promega pGEM®-T Easy Vector System	184
6.6.3.	Isolierte Gerstenprotoplasten	185
7.	Literaturverzeichnis	186
8.	Danksagung	197
9.	Selbstständigkeitserklärung	199
10.	Lebenslauf Dipl.-Pharm. Sebastian Pietack.....	200

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Biosynthese von SPM und TSPM ausgehend von PUT und SPD	6
Abbildung 2:	Ein hypothetisches Modell der defensiven Rolle von Spermin in stark NaCl-gestresster Arabidopsis – Kopie (Kusano, et al., 2007 b).....	8
Abbildung 3:	Anordnung und schematische Darstellung von Töpfen in der Klimakammer	28
Abbildung 4:	Schematische Darstellung Trockenstressexperiment 2012	30
Abbildung 5:	Schematische Darstellung Trockenstressexperiment 2013	31
Abbildung 6:	Schematische Darstellung Trockenstressexperiment 2014	31
Abbildung 7:	vereinfachte Reaktionsgleichung der Derivatisierung von SPM mit Dansylchlorid.....	61

Abbildung 8: vereinfachte Reaktionsgleichung der Derivatisierung von SPM mit FMOC	62
Abbildung 9: vereinfachte Reaktionsgleichung der Derivatisierung von SPM mit HFBA.....	65
Abbildung 10: Bereiche Alignment zur Gestaltung von Wobble-Primern Pr1_for und Pr3_rev.....	67
Abbildung 11: Intron-Exon-Muster gDNA <i>HvSPMS</i>	76
Abbildung 12: Phylogenetischer Baum 1, bekannte SPMS-Proteinsequenzen.....	77
Abbildung 13: Phylogenetischer Baum 2, phylogenetische Einordnung der HvSPMS-Proteine.....	78
Abbildung 14: Phylogenetischer Baum 3, Proteinsequenzen für phylogenetische Suche nach möglichen TSPMS in <i>Hordeum vulgare</i>	79
Abbildung 15: SDS-PAGE-Elektropherogramme HvSPMS-Proteine.....	80
Abbildung 16: GC-MS-Chromatogramm HvSPMS-Funktionsbestimmungsassays.....	81
Abbildung 17: Genkarte upstream-Regionen der <i>HvSPMS</i> -Gene.....	86
Abbildung 18: Zusammenfassung der Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie.....	88
Abbildung 19: Alignment resultierender Sequenzen dritter cDNA-Amplifizierung und Sequenzierung vermuteter <i>HvTSPMS</i> -cDNA-Fragmente.....	111
Abbildung 20: Alignment contig-Motive und Ausgangssequenzen in Baumansicht.....	112
Abbildung 21: HPLC-Chromatogramme PA-Standard-Mischung und TSPM-Standard.....	113
Abbildung 22: GC-MS-Chromatogramm BSTFA-derivatisiertes SPM.....	115
Abbildung 23: Chromatogramme Optimierung FMOC-PA-Derivatisierungsmethode.....	115
Abbildung 24: Chromatogramm Methode 8, FMOC-derivatisierte Gerstenpflanzenproben.....	116
Abbildung 25: pGreen-red-Vektor.....	153
Abbildung 26: pGreen-red-yellow-Vektor.....	154
Abbildung 27: pUBI-AB-Vektor.....	157
Abbildung 28: pUBI-AB- <i>mUBI::eYFP</i> -Tnos-Vektor.....	158
Abbildung 29: Alignment <i>HvSPMS</i> -Sequenzen mit den Wobble-Primern Pr1_for bis Pr4_rev.....	166
Abbildung 30: Phylogenetischer Baum aus Rodríguez-Kessler, et al., 2010.....	167
Abbildung 31: Phylogenetischer Baum aus Takahashi, et al., 2009.....	168
Abbildung 32: Phylogenetischer Baum aus Takano, et al., 2012.....	168
Abbildung 33: GenomeWalker™ Adapter und Adapter-Primer, Kopie.....	184
Abbildung 34: MCS Promega pGEM®-T Easy Vector System.....	184
Abbildung 35: isolierte Gerstenprotoplasten.....	185

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	taxonom. Kennzeichen Gerste.....	2
Tabelle 2:	Übersicht Anbauzyklen verwendeter Gerstensorten	13
Tabelle 3:	verwendete Bakterienstämme.....	13
Tabelle 4:	verwendete Leerplasmide	14
Tabelle 5:	verwendete Primer.....	16
Tabelle 6:	verwendete Instrumente und Apparaturen.....	19
Tabelle 7:	verwendete Chemikalien	21
Tabelle 8:	verwendete Kits und Marker	22
Tabelle 9:	verwendete Enzyme.....	23
Tabelle 10:	Zusammensetzung verwendeter Kulturmedien	23
Tabelle 11:	verwendete Puffer- und Reagenzien.....	27
Tabelle 12:	Sonstige Materialien	27
Tabelle 13:	Eigenschaften ED-73	27
Tabelle 14:	Bedingungen Klimakammer.....	29
Tabelle 15:	cDNA-Synthese-Protokoll SuperScript™ II Reverse Transkriptase, Invitrogen.....	34
Tabelle 16:	cDNA-Synthese-Protokoll RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific.....	35
Tabelle 17:	cDNA-Synthese-Protokoll Omniscript® RT Kit, QIAGEN	35
Tabelle 18:	MangoMix™ -PCR – gewöhnliche PCR und Kolonie-PCR.....	36
Tabelle 19:	MangoMix™ -PCR – touch-down-PCR und Gradienten-PCR.....	36
Tabelle 20:	MyFi™ -PCR – gewöhnliche- und touch-down-PCR.....	37
Tabelle 21:	<i>Pfu</i> -PCR.....	38
Tabelle 22:	qRT-PCR	38
Tabelle 23:	3'RACE-PCR 1 und 2	39
Tabelle 24:	Protokoll TdT Tailing.....	40
Tabelle 25:	5'RACE-PCR 1 und 2	40
Tabelle 26:	Genome Walking Ranger-PCR 1 und 2	41
Tabelle 27:	Ranger-PCR für genomische <i>HvSPMS1</i> -Sequenz.....	42
Tabelle 28:	<i>Taq</i> -PCR allgemein	42
Tabelle 29:	<i>Taq</i> -PCR, Vektorkonstrukt Aktivitätsuntersuchungen <i>HvSPMS</i> - Promotoren	43
Tabelle 30:	Phuison-PCR, Vektorkonstrukt Aktivitätsuntersuchungen upstream- Sequenzen <i>HvSPMS</i> -Gen	43
Tabelle 31:	Ligation in pGEM-T Easy-Vektor.....	44
Tabelle 32:	Ligation in eigenes Vektorkonstrukt	45
Tabelle 33:	Ligation in pCR2.1-Vektor.....	45

Tabelle 34:	Ligationen für Genome Walking, Verhältnis Vektor zu Insert, Temperaturprogramme	49
Tabelle 35:	Proteinfunktionsbestimmungsassays, Komponenten und Bedingungen	55
Tabelle 36:	HvSPMS-Proteinaktivitätslinearitätsassay, Komponenten und Bedingungen	56
Tabelle 37:	HvSPMS-Protein-pH-Abhängigkeitsassay, Komponenten und Bedingungen	56
Tabelle 38:	Assays zur kinetischen Charakterisierung der HvSPMS-Proteine, Komponenten und Bedingungen	57
Tabelle 39:	Eigenschaften der HisTrap™ HP-Säulen, GE Healthcare	58
Tabelle 40:	Eigenschaften Proteinchromatographiesystem	58
Tabelle 41:	Zusammensetzung SDS-PAGE-Polyacrylamidgel	59
Tabelle 42:	Coomassie-Färbung, Komponenten und Ablauf	60
Tabelle 43:	Parameter HPLC-Methode Bestimmung von PA nach Dansylierung	63
Tabelle 44:	Parameter HPLC-Methode Bestimmung von PA nach FMOC-Derivatisierung	64
Tabelle 45:	Parameter HPLC-Methode Bestimmung von PA nach HFBA-Derivatisierung	65
Tabelle 46:	Sequenzen zur Wobble-Primer-Gestaltung für <i>Hv(T)SPMS</i> -Gen-Charakterisierung	67
Tabelle 47:	Sequenzen BLAST-Analyse nach <i>Hv(T)SPMS</i> -cDNA-Sequenzierungs-PCR 1	68
Tabelle 48:	verwendete Sequenzen zur Analyse der gDNA-Sequenz der <i>HvSPMS</i> -Gene	69
Tabelle 49:	verwendete Datenbankeinträge zur Erstellung phylogenetischer Bäume	70
Tabelle 50:	verwendete UniProt-Datenbankeinträge zur Erstellung von phylogenetischen Bäumen zur Suche nach <i>TSPMS</i> in <i>Hordeum vulgare</i>	72
Tabelle 51:	verwendete Datenbanken und Computerprogramme	73
Tabelle 52:	kinetische Parameter HvSPMS-Proteine bei variablen Substrat- und konstanten Co-Substrat- Konzentrationen im Assay	83
Tabelle 53:	kinetische Parameter HvSPMS-Proteine bei konstanter Substrat- und variabler Co-Substrat- Konzentration im Assay	84
Tabelle 54:	Charakteristika der <i>HvSPMS</i> -Gen upstream-Regionen	85
Tabelle 55:	BLAST-Datenbank-Analyse <i>HvSPMS</i> -Gen-upstream-Regionen	86
Tabelle 56:	Bestimmung der Protoplastenzelldichte mit Fuchs-Rosenthal-Kammer	87
Tabelle 57:	Vergleich der rTER-Werte <i>HvSPMS1</i> zwischen Wachstumsstadien A-D, Trockenstressexperiment 2012	91
Tabelle 58:	Vergleich der rTER-Werte <i>HvSPMS2</i> zwischen Wachstumsstadien A-D, Trockenstressexperiment 2012	92
Tabelle 59:	Regulation der <i>HvSPMS</i> -Gene in (A) bis (D), Trockenstressexperiment 2013	93

Tabelle 60:	Vergleich der rTER-Werte <i>HvSPMS1</i> zwischen Wachstumsstadien A-D, Trockenstressexperiment 2013	95
Tabelle 61:	Vergleich der rTER-Werte des <i>HvSPMS2</i> -Gens zwischen Wachstumsstadien A-D, Trockenstressexperiment 2013	96
Tabelle 62:	Vergleich der rTER-Werte des <i>HvSPMS1</i> -Gens zwischen Wachstumsstadien A & C, Trockenstressexperiment 2014	103
Tabelle 63:	Vergleich der rTER-Werte des <i>HvSPMS2</i> -Gens zwischen Wachstumsstadien A & C, Trockenstressexperiment 2014	104
Tabelle 64:	Zusammenfassung wesentlicher Informationen über Intron/Exon-Muster monokotyledoner <i>SPMS</i> -gDNA-Sequenzen	120
Tabelle 65:	Vergleich dcSAM-Bindemotiv in mono- und dikotyledonen <i>SPMS</i>	121
Tabelle 66:	Charakteristische Sequenzmotive von pflanzlichen Aminopropyl-Transferasen	123
Tabelle 67:	Publizierte Daten zu pH-Optima von <i>SPMS</i>	124
Tabelle 68:	Publizierte Daten zu K_m -Werten von <i>SPMS</i> mit SPD als Substrat	124
Tabelle 69:	Publizierte Daten zu K_i -Werten von <i>SPMS</i> , verschiedene Inhibitoren	126
Tabelle 70:	Elektropherogramme	152
Tabelle 71:	Vektorkonstrukt mit <i>mUBI</i> -Promotor bzw. <i>HvSPMS</i> -Gen upstream-Regionen	156
Tabelle 72:	mögliche Motive für CIS-Elemente der <i>HvSPMS1</i> -upstream-Region	176
Tabelle 73:	mögliche Motive für CIS-Elemente der <i>HvSPMS2</i> -upstream-Region	183

IV. Diagrammverzeichnis

Diagramm 1:	Lösungsmittelgradientenverlauf der HPLC-Methode zur Bestimmung von PA nach Dansylierung	63
Diagramm 2:	Lösungsmittelgradientenverlauf der HPLC-Methode zur Bestimmung von PA nach FMOC-Derivatisierung	64
Diagramm 3:	Temperaturverlauf Säulenofen der GC-MS-Methode zur Bestimmung von PA nach HFBA-Derivatisierung	66
Diagramme 4 (links) und 5 (rechts):	Produktbildung in Linearitätsassays V (links) und VII bis IX (rechts), <i>HvSPMS</i> -Proteine	81
Diagramm 6:	Bestimmung der pH-Optima der <i>HvSPMS</i>	82
Diagramme 7 (links) und 8 (rechts):	Substrat-Sättigung <i>HvSPMS</i> -Proteine	83
Diagramme 9 (links) und 10 (rechts):	Co-Substrat-Sättigung <i>HvSPMS</i> -Proteine	84
Diagramme 11, 12 (oben links und rechts), 13 und 14 (unten links und rechts):	Relative <i>HvSPMS</i> -Transkriptexpression im Trockenstressexperiment 2012, Stadien A-D	90
Diagramme 15, 16 (oben links und rechts), 17 und 18 (unten links und rechts):	Relative <i>HvSPMS</i> -Transkriptexpression Trockenstressexperiment 2013, Stadien A-D	94

Diagramme 19 (oben) und 20 (unten): Polyamingehalte	Trockenstressexperiment	
2013, Stadien A und C	98	
Diagramme 21, 22 (oben links und rechts), 23, 24 (mittig links und rechts), 25 und 26 (unten links und rechts): Relative <i>HvSPMS</i> -Transkriptexpressionsrate	Trockenstressexperiment 2014, Kultivare Golden Promise, Tatum und Xanadu, Stadien A und C	101
Diagramme 27, 28 (oben links und rechts), 29 und 30 (unten links und rechts): Relative <i>HvSPMS</i> -Transkriptexpression	Trockenstressexperiment 2014, Kultivare Golden Promise, Tatum und Xanadu, Stadien A und C	102
Diagramme 31 (oben) und 32 (unten): Polyamingehalte	Trockenstressexperiment	
2014, Kultivar Golden Promise Stadien A und C		107
Diagramme 33 (oben) und 34 (unten): Polyamingehalte	Trockenstressexperiment	
2014, Kultivar Tatum Stadien A und C		108
Diagramme 35 (oben) und 36 (unten): Polyamingehalte	Trockenstressexperiment	
2014, Kultivar Xanadu Stadien A und C		109

V. Abkürzungsverzeichnis

(A)	Stadium <u>A</u>
(B)	Stadium <u>B</u>
(C)	Stadium <u>C</u>
(D)	Stadium <u>D</u>
A	<u>A</u> denin
ABA	<u>ab</u> scisic <u>a</u> cid – Abscisinsäure
AP	<u>A</u> dapter <u>P</u> rimer
AOEPU	N-[(2- <u>A</u> mino <u>o</u> xy <u>e</u> thyl)-1,4-diaminobutan], Trivialname von Diaminobutan ist <u>P</u> utrescin
APAPA	1- <u>A</u> mino <u>o</u> xy-3-N-(3- <u>a</u> minopropyl)- <u>a</u> minopropan
APT	<u>A</u> minopropyl <u>t</u> ransferase
<i>Ath</i>	<i><u>A</u>rabidopsis <u>t</u>haliana</i>
AUAP	<u>A</u> bridged <u>U</u> niversal <u>A</u> mplification <u>P</u> rimer
A _{xxx}	<u>A</u> bsorption bei der Wellenlänge $\lambda = \text{xxx nm}$, z.B. A ₂₆₀ $\rightarrow \lambda = 260 \text{ nm}$
bp	<u>B</u> asen <u>p</u> aare
<i>Bp</i>	<i><u>B</u>rassica <u>r</u>apa subsp. <u>p</u>ekinensis</i>
BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin – Rinderserumalbumin
BSTFA	<i>N,O</i> - <u>B</u> is(trimethyl <u>s</u> ilyl)trifluoro <u>a</u> cetamid
C	<u>C</u> ytosin
<i>das</i>	<u>d</u> ays <u>a</u> fter <u>s</u> owing – Tage nach Aussaat
dcSAM	<u>d</u> ecarboxyliertes <u>S</u> - <u>A</u> denosyl-L- <u>m</u> ethionin
DIC	Differentialinterferenzkontrast-(DIC)-Methode nach Nomarski
EcSPDS	<u>S</u> PDS isoliert aus <i><u>E</u>scherichia <u>c</u>oli</i>
ED-73	Einheitserde ED-73, (Einheitserdenwerke Patzer Gebr. Patzer GmbH & Co. KG, 2011)
ED-73+V	ED-73 gemischt mit Vermiculit (Feuchthaltemittel), 85 T + 15 T (v/v)
FLcDNA(s)	<u>f</u> ull <u>l</u> ength- <u>c</u> DNA, Vollängen-cDNA, <u>s</u> \triangleq Plural
FM	<u>F</u> risch <u>m</u> asse
FMOC	9- <u>F</u> luorenyl <u>m</u> ethoxy <u>c</u> arbonylchloride

Fraktion P	zur Trockne eingengtes (SpeedVac), in Perchlorsäure suspendiertes Hydrolysat des Gerstenpflanzenmaterialpellets nach perchlorsaurer Extraktion, enthielt ursprünglich konjugierte und wasserunlösliche PA [2.5.5.1./60]
Fraktion Ü1	Überstand des Gerstenpflanzenmaterials nach perchlorsaurer Extraktion, enthielt ursprünglich konjugierte und wasserlösliche PA [2.5.5.1./60]
Fraktion Ü2	zur Trockne eingengtes (SpeedVac), in Perchlorsäure suspendiertes Hydrolysat des Überstandes des Gerstenpflanzenmaterials nach perchlorsaurer Extraktion, enthielt konjugierte und wasserlösliche PA [2.5.5.1./60]
G	<u>G</u> uanin
Gm	<u>G</u> lycine <u>m</u> ax
GP	Gerste (<i>Hordeum vulgare</i>), Kultivar <u>G</u> olden <u>P</u> romise
Gt	<u>G</u> entiana <u>t</u> riflora
HFBA	<u>H</u> eptafluorobuttersäureanhydrid
HsSPMS	<u>H</u> omo <u>s</u> apiens- <u>S</u> PMS
Hv	<u>H</u> ordeum <u>v</u> ulgare
HvSPMS	<u>H</u> ordeum <u>v</u> ulgare <u>S</u> per <u>m</u> ins <u>y</u> nthase
Kbp	<u>K</u> ilo- <u>b</u> p (n × 1'000 bp)
K _i	<u>i</u> nhibitorische <u>K</u> onstante
K _m	<u>M</u> ichaelis- <u>M</u> enten- <u>K</u> onstante
LE	<u>L</u> ängeneinheiten
Lj	<u>L</u> otus <u>j</u> aponicus
MCS	<u>M</u> ultiple <u>C</u> loning <u>S</u> ite (multiple Klonierungsregion) eines Vektors, hier finden sich Schnittstellen verschiedener, häufig verwendeter Restriktasen
Md	<u>M</u> alus <u>s</u> ylvestris var. <u>d</u> omestica
MTA	5'- <u>M</u> ethylthio <u>a</u> denosin
N _{2 liq}	flüssiger Stickstoff (N ₂)
NCP	<u>n</u> icht <u>c</u> harakterisiertes <u>P</u> rotein
OD ₆₀₀	<u>o</u> ptische <u>D</u> ichte, gemessen bei einer Wellenlänge von λ = 600 nm
ORF	<u>O</u> pen <u>R</u> eadin <u>F</u> rame, offener Leserahmen, Bereich der Ribonukleinsäure, dessen Leserahmen zwischen einem Start- bzw. Stopp-Codon im gleichen Leseraster liegt; kodiert potentielle Peptide bzw. Proteine
Os	<u>O</u> ryza <u>s</u> ativa
PA	<u>P</u> oly <u>a</u> min(e)
PMT	<u>P</u> utrescin- <u>M</u> ethyl <u>t</u> ransferase
PUT	<u>P</u> utrescin
qRT	<u>q</u> uantitative <u>R</u> eal <u>T</u> ime – quantitative Echtzeit
Rn	<u>R</u> attus <u>n</u> orvegicus forma domestica
RnSPDS	<u>S</u> PDS isoliert aus <u>R</u> attus <u>n</u> orvegicus forma domestica-Prostata
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur (20-25 °C)
rTER	<u>r</u> elative <u>T</u> ranskri <u>e</u> xpressionsrate, TER untersuchtes Gen (<i>HvSPMS</i>) bezogen auf TER Housekeeping-Gen (<i>HvActin</i>)
SAM	<u>S</u> - <u>A</u> denosyl- <u>L</u> - <u>m</u> ethionin
SAMDC	<u>S</u> - <u>A</u> denosyl- <u>L</u> - <u>m</u> ethionin- <u>D</u> ecarboxylase
SNP	<u>s</u> ingle nucleotide polymorphism – Einzelnukleotidpolymorphismus, beschreibt die Variation eines einzelnen Basenpaares in einem DNA-Strang
SPD	<u>S</u> permidin
SPDS	<u>S</u> permidin <u>s</u> ynthase
SPM	<u>S</u> permin
SPMS	<u>S</u> permin <u>s</u> ynthase
SQI _N	<u>S</u> equenzidentität auf <u>N</u> ukleotidebene (in Prozent)
SQI _A	<u>S</u> equenzidentität auf <u>A</u> minosäureebene (in Prozent)

<i>Sv</i>	<i><u>Senecio vulgaris</u></i>
T	<u>Thymin</u>
TA	Gerste (<i>Hordeum vulgare</i>), Kultivar <u>Tatum</u>
TER	<u>Transkriptexpressionsrate</u>
<i>T_m</i>	<u>Schmelztemperatur</u>
t _{RET}	<u>Retentionszeit</u>
TrStr	<u>Trockenstress</u>
TSPM	<u>Thermospermin</u> , Strukturisomer des SPM
TSPMS	<u>Thermosperminsynthase</u>
UTR	<u>untranslated region</u> , nicht translatierter Bereich
UV-Licht	<u>ultraviolettes Licht</u> , Wellenlängenbereich $\lambda < 380$ nm
<i>v_{max}</i>	<u>Maximale Reaktionsgeschwindigkeit v</u>
Vol	<u>Volumen</u>
VT	<u>Volumenanteile</u>
WN	<u>Wassergehalt im Nährbodensubstrat</u>
WT	<u>Wildtyp</u>
XA	Gerste (<i>Hordeum vulgare</i>), Kultivar <u>Xanadu</u>
<i>Zm</i>	<i><u>Zea mays</u></i>

1. Einleitung

Diese Dissertationsschrift ist Teil des Forschungsprojektes TP07 des Interdisziplinären Zentrums für Nutzpflanzenforschung (IZN) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Verschiedene in Sachsen-Anhalt ansässige wissenschaftliche Institute arbeiten im IZN zusammen, um den Einfluss von biotischem und abiotischem Stress auf die Modellpflanze Gerste zu untersuchen.

In Teil eins des Forschungsprojektes TP07 wurde in der naturwissenschaftlichen Fakultät I, Institut für Pharmazie, Abteilung Biogene Arzneistoffe der Martin-Luther-Universität die Wirkung von Trockenstress (TrStr) auf Sperminsynthase-Gene, -Proteine und deren Metabolite in Gerste untersucht und beschrieben. Die vorliegende Dissertationsschrift beschreibt diese Untersuchungen.

In einem zweiten Teil des Projektes wurde die Wirkung von osmotischem Stress auf die Stresstoleranz von Gerste in der Naturwissenschaftlichen Fakultät III im Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Geowissenschaften und Informatik, Abteilung Pflanzenernährung der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg untersucht und soll ebenfalls in einer Dissertation beschrieben werden.

Folgende Wachstumsstadien der Gerstenpflanzen wurden untersucht: Stadium A (A) Keimlingspflanzen im Alter von 3-40 *das* (Tage nach Aussaat), Einblatt-bis Dreiblattstadium; Stadium B (B) junge Pflanzen im Alter von 15-45 *das*, Mehrblattstadium; Stadium C (C) fertile Pflanzen im Alter von 57-70 *das*, Infloreszenz-, oder Ähren- Stadium; Stadium D (D) Pflanzen im Alter von 77-90 *das*, Karyopsen-, oder Schließfrucht- Stadium.

TrStr wurde wie folgt abgestuft: Kontrollpflanzen – mindestens 60 % Wassergehalt im Nährbodensubstrat (WN), leichter TrStr – 40 % WN, moderater TrStr – 20 % WN, hoher TrStr – 10 % WN.

Die in dieser Dissertationsschrift verwendeten Abschnitts-, Abbildungs-, Diagramm-, Tabellen- und Seitenverweise stehen in eckigen Klammern „[]“. Der Verweis führt den Abschnitt, die Abbildung, das Diagramm, bzw. die Tabelle an und wird durch einen Schrägstrich „/“ von seiner Seitenangabe abgetrennt: z.B. Tabelle 1 auf Seite 2: [Tabelle 1/2].

1.1. Gerste – *Hordeum vulgare*

Gerste stellt eine der wichtigsten agrarwirtschaftlich genutzten Getreidesorten der Erde dar, sie steht im Erntejahr 2017/18 mit einem Ertrag von 3 t/ha an Position vier (hinter Mais, Reis und Weizen) der weltweit am meisten produzierten Getreidesorten (United States Department of Agriculture, 2017). Im Jahr 2016 erreicht Deutschland mit 10'730,5 t EU-weit die höchste Gerste-Erntemenge (Eurostat, 2017). Die Art *Hordeum vulgare* (*Hv*) [Tabelle 1/2] gehört taxonomisch zur Familie der Süßgräser (*Poaceae*), im Stamm Triticaceae zur Gattung Gerste (*Hordeum*) und wurde ausgehend von Wildgerste (*Hordeum spontaneum*) gezüchtet (Badr, et al., 2000). Gerste war eine der ersten kultivierten Nutzpflanzen im Nahen Osten (Zohary, et

al., 2000). Gerstensorten werden in Sommer- und Wintergerste unterschieden, dabei treten zwei-, vier- und sechszeilige Formen auf. Zweizeilige Gerste (meist Sommergerste) hat pro Ansatzstelle an der Ähre nur ein, während mehrzeilige Gerste (meist Wintergerste) pro Ansatzstelle zwei oder drei Körner hat. Zweizeilige Gerstensorten werden für die Nahrungsmittelherstellung aufgrund des höheren Stärke- und Proteingehaltes (12-15 %) angebaut (Lyons, et al., 2008). Wintergerstensorten benötigen eine Vernalisation (natürliche Induktion des Blühens durch eine längere Kälteperiode) zum Schossen (Pflanzentriebstreckung unter Ausbildung von Blütenständen). Durch die längere Vegetationsphase erzielen sie höhere Erträge und die Nährstoffzusammensetzung der Körner ist besser für die Tierfuttermittelherstellung geeignet. Wintergerstensorten mit hohen Protein- und Ballaststoffgehalten (β -Glucan-Gehalt ≥ 4 g/100 g Korn) werden für die menschliche Ernährung (Brot) verwendet. Eine tägliche Aufnahme von 3 g β -Glucanen aus Gerste kann den Blutholesterinspiegel nach den Mahlzeiten senken (European Food Safety Authority, 2011). Braugerste (v.a. zweizeilige Sommergerste und sechszeilige Wintergerste) wird zur Herstellung von Bier und anderen alkoholischen Getränken wie Whisky verwendet. In diesem Dissertationsprojekt wurden die Gerste-Samen stratifiziert. Stratifikation bezeichnet das Brechen der Samenruhe von gequollenen Samen durch eine Kältebehandlung mit Temperaturen um den Gefrierpunkt (Brechner, 2002).

taxonomische Kennzeichen Gerste (<i>Hordeum vulgare</i>)
– einjährig
– Wuchshöhe: 0,7-1,2 m, aufrecht
– wechselständige zweizeilig angeordnete Laubblätter, einfach parallelnervig
– zwei lange, unbewimperte Blattröhrchen der Blattscheide umschließen Halm vollständig
– Tausendkorngewicht: 35-50 g
– ähriger Blütenstand mit flexibler Rhachis
– in Reihen stehende, ungestielte Ährchen gleich und fertil, eine Blüte, Hüllspelze lineal-lanzettlich,
– Grannen: 8-15 cm
– Fruchtstand: Karyopse, Körner mit Spelze verwachsen

Tabelle 1: taxonom. Kennzeichen Gerste

1.2. Gerste und Trockenstress

Abiotischer Stress – u.a. TrStr – führt zu deutlichen Verlusten der Kornfüllrate, des Korngewichtes und reduziert die Gerstenmalzqualität (Wu, et al., 2017). Eine hohe Malzqualität zeichnet sich durch hohe Stärke- und β -Glucan-Gehalte (erreicht durch niedrige β -Amylase-Aktivität) und einen niedrigen Eiweiß-Gehalt aus (Wu, et al., 2017). Ernteeinbußen durch TrStr verschärfen somit Schwierigkeiten bei der Nahrungsmittelversorgung für eine wachsende Weltbevölkerung. Der Stressor Trockenheit wird als multifaktorieller Faktor charakterisiert, bei dem die Umwelttemperatur, die externe Wassermenge, die Bewässerungsmethode, die Dauer des Wasserverlustes und die Eigenschaften des Nährbodens zusammenspielen (Wu, et al., 2017) und in ihrer Gesamtheit Pflanzen stressen.

Die Pflanzenzucht ist deshalb permanent bemüht Trocken- und Salzstress-tolerante Getreidesorten zu züchten. Gerste ist beispielsweise toleranter gegenüber Salzstress als

Weizen (Harlan, 1995), trotzdem vermindern Salzstress und andere abiotische Stressoren die Ernteerträge immens. Kusano, et al. beschreiben Salzgehalt und Wasserverfügbarkeit von Nährböden als limitierende Faktoren für Pflanzenwachstum und -Produktivität und zeigen, dass Pflanzen als Gegenmaßnahme die Polyamin (PA)-Biosynthese transkriptional und translational modulieren (Kusano, et al., 2007 b). Wasserstress wird schnell wahrgenommen und direkt in ein molekulares Signal umgesetzt. Die TrStr-induzierte Expression vieler Gene, wie auch die von pflanzlichen Sperminsynthase (*SPMS*)-Genen, wird über Abscisinsäure (ABA) gesteuert (Hanzawa, et al., 2002; Alcázar, et al., 2006; Talamè, et al., 2007). Das PA Spermin (SPM) wurde in anderen Pflanzen bereits untersucht. In *Arabidopsis thaliana* (*Ath*) beispielsweise wurde gezeigt, dass SPM Salz- und TrStr-protective Eigenschaften hat (Yamaguchi, et al., 2006; Kusano, et al., 2007 b). Talamè, et al. berichten, dass für das Verständnis der TrStr-Regulation vor allem die Qualität des TrStr entscheidend sei. Kurzzeitiger TrStr widerspiegelt nicht unbedingt die tatsächlich auftretenden Bedingungen in den gestressten Pflanzen. Es treten nur kurzzeitige Prozesse der Adaption auf, sodass gravierende Auswirkungen auf den Pflanzenstoffwechsel nicht oder nur verfälscht gemessen werden, was bei Experimenten mit Langzeit-TrStr nicht passieren kann (Talamè, et al., 2007). In den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten wurde Gerste langzeit-gestresst. Die Pflanzen wurden nicht für Stunden, sondern über mehrere Tage lang gestresst.

Daher ergibt sich eine Fragestellung für dieses Projekt: Wie kann es zum Verständnis der Mechanismen beitragen, in denen SPM eine Rolle bei der Reaktion auf TrStr in Gerste spielt? Welche Schlüsse sind auf die allgemeine TrStr-Regulation in Pflanzen möglich?

1.3. Polyamine in Pflanzen

PA sind endständige primäre Amine mit niedrigem Molekulargewicht und unterschiedlicher Kettenlänge, bei denen die Kohlenstoff-Kette durch sekundäre Amine unterbrochen ist. Dabei bildet ausgehend vom Putrescin (PUT) eine Aminobutyl-Einheit das Grundgerüst. Bei länger-kettigen PA wird es durch Aminopropyl-Einheiten linear oder wechselseitig fortgesetzt. Die PA-Amingruppen haben basische pK_a -Werte. SPM hat beispielsweise folgende pK_a -Werte: $pK_aN^1 = 10,1$, $pK_aN^4 = 7,9$, $pK_aN^8 = 8,4$, $pK_aN^{12} = 10,9$ (Bergeron, et al., 1995).

PA sind ubiquitär in allen lebenden Organismen außer Archaea verteilt (Imamura, et al., 2015). Die am häufigsten in Pflanzen vorkommenden PA sind PUT, Spermidin (SPD) und SPM (Alcázar, et al., 2010). PA sind bei physiologischem, zellulärem pH-Wert protoniert und liegen als Polykationen vor, was ihnen ermöglicht an Makromoleküle wie DNA, RNA, Chromatin oder Proteine zu binden (Kusano, et al., 2008). Sie können diese Moleküle so stabilisieren (Korolev, et al., 2002; Alcázar, et al., 2010). Durch die kovalente Bindung können sie auch destabilisierend wirken, da durch Proteinquervernetzung zytotoxische Proteinderivate entstehen können (Kusano, et al., 2008). In hohen Konzentrationen können PA zytotoxisch wirken: Sie sind mit der Hypersensitiven Antwort assoziiert (Takahashi, et al., 2009) und führen, gezielt eingesetzt, zum schnellen Zelltod (Kusano, et al., 2008). Die

exogene PA-Applikation führt zur Erhöhung ihrer zellulären Konzentration, was das Pflanzenwachstum hemmt (Kakehi, et al., 2008; Kusano, et al., 2008; Takano, et al., 2012). Lokalisiert sind PA im Zytoplasma und in Zellorganellen wie Chloroplasten, Mitochondrien und Vakuolen (Kusano, et al., 2008). Sie existieren in freier Form (lösliche PA), konjugiert an niedermolekulare Verbindungen (säurelösliche PA) und in gebundener Form (Makromoleküle, siehe oben) (Urano, et al., 2003; Takano, et al., 2012). Besonders hohe Konzentrationen von PUT, SPD und SPM stellen Urano und Hanzawa et al. in den Sexualorganen von *Ath* fest (Hanzawa, et al., 2002). Sie akkumulieren in den Blüten, Knospen und reifen Schoten, in den Blättern und den Wurzeln wiederum werden niedrige Konzentrationen gemessen (Urano, et al., 2003). Efroze, et al. zeigen jedoch, dass PA in Wurzelknollen von *Lotus japonicus* (*Lj*) während des Durchlaufens verschiedener Entwicklungsstadien akkumulieren und verglichen mit anderen Organen ein bis zu zehnfach höheres Level erreichen (Efroze, et al., 2008). PA-Regulationsmechanismen sind demnach vielfältig und können von Pflanze zu Pflanze verschieden beeinflusst sein. Für den PA-Gehalt ist entscheidend, in welcher Stoffwechselsituation die jeweilige Pflanze beobachtet wird. Er kann bis in den mM-Bereich ansteigen (Minguet, et al., 2008).

PA-Transporter wurden bisher noch nicht beschrieben. Es wird vermutet, dass PA transmembranär durch einen potentialgesteuerten Gradienten transportiert werden (Kusano, et al., 2008). PA werden nicht aus dem Nährboden in die Pflanze aufgenommen (Imai, et al., 2004 b), was unterstreicht, dass zumindest in den äußersten Zellschichten von *Ath*- Wurzeln keine PA-Transporter vorkommen.

PA sind an der Regulation fundamental wichtiger zellulärer Regulationsmechanismen in pflanzlichen und tierischen Zellen beteiligt. Sie haben Einfluss auf das Wachstum und die Entwicklung von Pflanzen, die Expression von Genen, die Teilung und Differenzierung von Zellen, die DNA- und Protein-Synthese, sowie die Morpho- und Embryogenese (Alcázar, et al., 2010; Kusano, et al., 2008). PA beeinflussen die Regulation der Antwort auf abiotischen und biotischen Stress (Kusano, et al., 2008). Dabei sind PUT und SPD essentiell für das Überleben der Pflanze, während SPM nicht essentiell, aber bedeutsam für das Wachstum und die Entwicklung der Pflanze bei Stress ist (Imai, et al., 2004 a; Imai, et al., 2004 b; Yamaguchi, et al., 2006). In *Ath* akkumulieren PA als Antwort auf (a)biotischen Stress durch Induktion der PA-Biosynthese (Urano, et al., 2003).

Daraus leite ich eine Fragestellung der Dissertation ab: Hat abiotischer Stress in Form von TrStr einen Einfluss auf die Regulation von *SPMS*-Genen in Gerste? Wie verändert TrStr den Gerste-SPM-Gehalt?

1.3.1. PA-Biosynthese

Die PA-Biosynthese ist hinreichend in der Literatur beschrieben, die involvierten Gene und Enzyme werden genannt, auf Besonderheiten wird eingegangen (Kusano, et al., 2007 a; Kusano, et al., 2008; Ohnuma, et al., 2011; Takahashi, et al., 2009). Daher erläutere ich die PA-Biosynthese nicht erneut. Die für die Dissertation wichtigen Syntheseschritte, die

beteiligten Enzyme und die umgesetzten Substrate, bzw. die entstehenden Produkte werden in Abbildung 1/6 zusammengefasst.

Pflanzen haben die PA-Biosynthese aus Cyanobakterien akquiriert (Alcázar, et al., 2010). Zwei verschiedene Synthesewege werden beschrieben (Takano, et al., 2012). In Säugern wird PUT ausgehend von Ornithin über Ornithin-Decarboxylase (*ODC*)-Aktivität gebildet. In Pflanzen wird es ausgehend von Arginin via Agmatin durch Arginin-Decarboxylase (*ADC*) und zwei weiteren Hydrolasen gebildet (Kusano, et al., 2008). Einige Pflanzen (z.B. *Ath*) besitzen keine *ODC*-Gene und können es nur über den *ADC*-Weg produzieren (Kusano, et al., 2007 a). PUT wird dann zu SPD umgesetzt, das wiederum zu SPM bzw. Thermospermin (TSPM) umgewandelt wird. Bei beiden Reaktionsschritten findet jeweils ein Transfer einer Aminopropyl-Gruppe vom Co-Substrat decarboxyliertes *S*-Adenosyl-L-methionin (dcSAM) auf das entsprechende, in Lösung vorliegende, protonierte PA statt (Wu, et al., 2007). Diese Reaktionen werden durch Spermidinsynthasen (*SPDS*)- und *SPMS*- bzw. Thermosperminsynthasen (*TSPMS*) katalysiert. Dabei geht die positive Ladung des dcSAM verloren und es entsteht das Seitenprodukt 5'-Methylthioadenosin (MTA) [Abbildung 1/6]. Die positive Ladung am Aminopropyl-Ende des SPD, die während des *SPMS*-Katalysemechanismus entsteht, ist für die korrekte Bindung von SPD am aktiven Zentrum des *SPMS*-Proteins notwendig (Eloranta, et al., 1990). Zusätzlich ist die Deprotonierung des SPD-Aminobutyl-Teils die Triebkraft der Katalyse-Reaktion.

DcSAM wird aus der Vorstufe des biologisch aktiven *S*-Adenosyl-L-methionins (*SAM*) durch Aktivität der *SAM*-Decarboxylase (*SAMDC*) gebildet. Im *SAM* hat das Schwefelatom *S*-Konfiguration, weshalb biologisch aktives dcSAM ebenfalls *S*-konfiguriert ist. *R*-dcSAM kann von Aminopropyl-Transferasen zur PA-Biosynthese nicht umgesetzt werden (Dejima, et al., 2003). Bereits Coward, et al. vermuteten, dass nur ein Enantiomer von dcSAM aktiv sei (Coward, et al., 1977). Hibasami, et al. präzisierten, dass es das *S*-Enantiomer ist (Hibasami, et al., 1980), was Wu, et al. 2007 bestätigten. Durch seine positive Ladung wird dcSAM an der Oberfläche der negativ geladenen Bindetasche gebunden. Die Bindung wird durch die Wechselwirkungen der Aminopropyl- und Ribose-Hydroxyl-Gruppen des dcSAM mit den korrespondierenden Protein-Aminogruppen gestärkt (Wu, et al., 2007).

Die an der Biosynthese beteiligten Enzyme und deren kinetische Eigenschaften sind bereits z.B. für *Ath* (*SPDS*, *SPMS*, *TSPMS*) (Hanzawa, et al., 2000; Hanzawa, et al., 2002) und *Malus sylvestris var. domestica* (*Md*) (*SPDS*, *SPMS*) (Panicot, et al., 2002; Kitashiba, et al., 2005) beschrieben. Beschreibungen für PA-synthetisierende Enzyme in monokotyledonen Pflanzen lassen sich in der Literatur seltener finden – PA-synthetisierende Enzyme in Gerste sind noch nicht beschrieben. Daher ist ein Ziel dieser Dissertation die funktionelle, kinetische und sequenzielle Charakterisierung einer *SPMS* in einem monokotyledonen Modellorganismus (Gerste).

Für krautige, mehrjährige Pflanzen wurde bisher nur wenig Wissen über die PA-Biosynthese-Gene publiziert (Imamura, et al., 2015). Gerste entspricht zwar nicht diesen Kriterien,

dennoch ist ein weiteres Ziel dieses Projektes neue Erkenntnisse über die PA-Biosynthese durch die Untersuchung der Regulation der *HvSPMS*-Gene bei TrStr zu gewinnen.

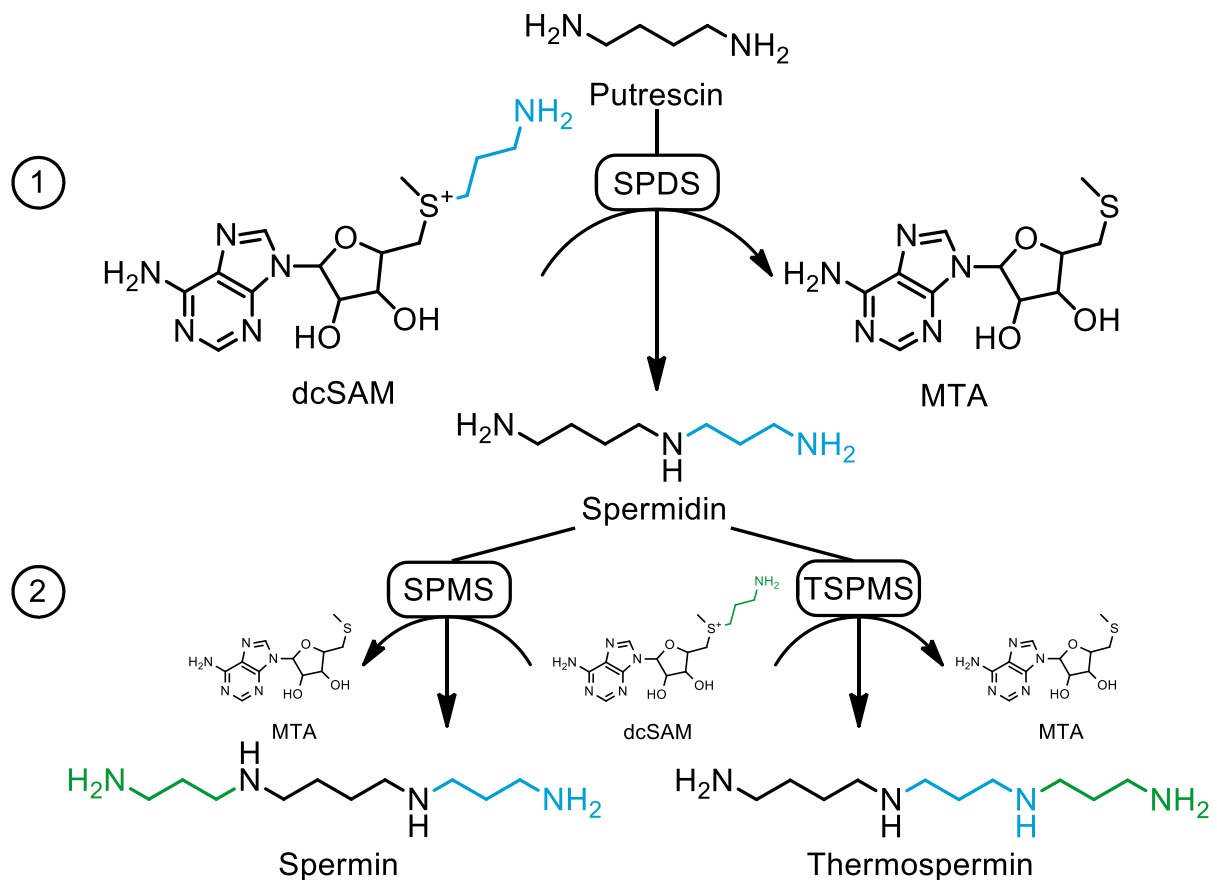


Abbildung 1: Biosynthese von SPM und TSPM ausgehend von PUT und SPD übertragene Aminopropyleinheit blau (Reaktionsschritt 1) und grün (Reaktionsschritt 2) gefärbt; dcSAM – decarboxyliertes *S*-Adenosyl-L-Methionin, MTA – 5'-Methylthioadenosin; biosynthetisch aktive Proteine: SPDS – Spermidinsynthase, SPMS – Spermisynthase, TSPMS – Thermospermisynthase

Neben der Regulation der *SPDS*- und *SPMS/TSPMS*-Gene wird die PA-Biosynthese vor allem durch Regulation der *ODC*- und *SAMDC*-Gene beeinflusst. Diese Mechanismen spielen für diese Dissertation eine untergeordnete Rolle, weshalb genauere Beschreibungen in der entsprechenden Review-Literatur (Kusano, et al., 2007 a; Kusano, et al., 2008; Takano, et al., 2012) nachzulesen sind.

An die Biosynthese der PA kann sich deren Abbau (Katabolismus) anschließen. PA-Oxydasen (z.B. Sperminoxydase oder Diamooxydasen) bauen PA zu 4-Aminobutanal, (3-Aminopropyl)-4-Aminobutanal, bzw. zu 1,3-Diaminopropan, Ammoniak (NH_3) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) ab (Cona, et al., 2006; Kusano, et al., 2008).

Ein wichtiger Aspekt bei der Biosynthese von SPD und SPM ist die kompetitive Hemmung von *SPDS*- und *SPMS*-Enzymen durch MTA (Pajula, et al., 1979 b; Hibasami, et al., 1980; Eloranta, et al., 1990). Neben MTA wurden MTA-Analoga als potente Inhibitoren dieser

Enzyme beschrieben (Eloranta, et al., 1990). Shirahata, et al. untersuchten die hemmende Wirkung von PA-Derivaten an SPDS- und SPMS-Enzymen und erstellten aufbauend auf kinetische Untersuchungsdaten Modelle ihrer Bindetaschenstruktur (Shirahata, et al., 1991). Diese Modelle, die ausschließlich auf kinetischen Daten beruhen, wurden Jahrzehnte später durch computergestützte Berechnungen und Modelle bestätigt (Korolev, et al., 2002; Wu, et al., 2007; Wu, et al., 2008). Das verdeutlicht, wie wichtig kinetische Daten zur exakten Untersuchung von Biosynthesemechanismen und zur Erstellung von Modellen immer noch sind.

Als Fragestellung für diese Dissertation führe ich aus: Ist ein Einfluss des während der SPM-Biosynthese gebildeten MTA auf die Katalyse-Reaktion und ihrer kinetischen Parameter feststellbar?

1.3.2. Putrescin und Spermidin

In der Literatur werden vor allem für PUT stressprotektive Eigenschaften beschrieben. Das *AtADC2*-Gen wird durch abiotischen Stress induziert. Infolgedessen wird vermehrt PUT gebildet, das für die Stresstoleranz in *Ath* benötigt wird (Takahashi, et al., 2009). Diese Feststellung wird dadurch belegt, dass in *Ath-adc2-1*-Insertionsmutanten erst nach externer PUT-Applikation die Stresstoleranz ansteigt (Urano, et al., 2004). Es wird außerdem diskutiert, dass PUT eine bedeutende Rolle bei der Samenentwicklung und der Embryogenese spielt (Urano, et al., 2005). In anderen Studien werden hohe PUT-Konzentrationen mit (a)biotischem Stress assoziiert (Kusano, et al., 2007 a). Es wird vermutet, dass die hohen PUT-Konzentrationen zur Repression des Gibberellin-Säure-Metabolismus führen. Dadurch werden das Pflanzenlängenwachstum und die Keimfähigkeit vermindert, was den Zwergwuchs und das verzögerte Blühen *ADC2*-überexprimierender *Ath*-Pflanzen erklärt (Kusano, et al., 2007 a). Nach Funktionsverlust der *AtSPDS*-Gene tritt ein deutlich verminderter SPD-Gehalt (freies und löslich konjugiertes SPD) in *spds1-1 spds2-1*-Doppelmutanten auf (minus 20-17 % gegenüber Wildtyp (WT)). Der SPM-Gehalt wird ebenfalls vermindert und der PUT-Gehalt gesteigert (4,8 bis 17-fach gegenüber WT) (Imai, et al., 2004 b). Es wird geschlussfolgert, dass PUT und SPD essentiell für das Überleben und das normale Wachstum von Pflanzen sind (Imai, et al., 2004 b; Urano, et al., 2005).

Als Fragestellung soll in dieser Dissertation untersucht werden: Welche Veränderungen der PUT- und SPD-Gehalte lassen sich in trockengestressten Gerstepflanzen feststellen?

1.3.3. Spermin und Sperminsynthasen

SPM ist nicht essentiell für das Überleben von Pflanzen, spielt aber eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Toleranzmechanismen bei (a)biotischem Stress (Imai, et al., 2004 b; Urano, et al., 2005; Kusano, et al., 2007 a; Kusano, et al., 2007 b). *Datura stramonium*-ADC überexprimierende *Oryza sativa* (*Os*)-Pflanzen tolerieren Trockenheit besser gegenüber WT und halten hohe SPD- bzw. SPM-Konzentrationen aufrecht (Kusano, et al., 2007 a). SPM-defiziente *Ath*-Mutanten sind hypersensitiv gegenüber TrStr, was durch externe SPM-

Applikation aufgehoben werden kann (Yamaguchi, et al., 2006; Yamaguchi, et al., 2007). Der Schutzmechanismus von SPM bei abiotischem Salz- und Trockenstress wird folgendermaßen erklärt: Die Stomata der *atspms-1*-Pflanzen werden bei TrStr nicht geschlossen. Demnach kontrolliert SPM die beim Stomataschluss beteiligten Kationenkanäle der Vakuole (schnell (FV)- und langsam-aktivierte (SV)) und ist folglich direkt oder indirekt an der TrStr-Regulation von *Ath* beteiligt. Da die PA-Biosynthese in trockengestressten Pflanzen nachweislich gegenüber WT gesteigert wird (Bouchereau, et al., 1999), kommt es in Stomata-Schließzellen durch die angestiegene SPM-Konzentration zur Modulation bestimmter Ca^{2+} -permeabler Kanäle. Dadurch steigt die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration an, was zur Inaktivierung eines plasmamembranständigen einwärts gerichteten Na^+ -Kanals führt (Yamaguchi, et al., 2006). In den Experimenten von Kusano, et al., 2007 b hat SPM neben anderen PA dabei die höchste Effizienz. Die Na^+ -Kanalkblockade, die ursprünglich durch die erhöhte SPM-Konzentration ausgelöst wurde und über die SOS (übermäßig salzsensitive)-Signalkaskade sowie Ca^{2+} -vermittelt wird, triggert letztendlich den Stomata-Schluss [Abbildung 2/8].

Um den Einfluss von TrStr auf den PA-Gehalt zu verstehen, muss auf die biosynthetisch aktiven Enzyme und deren codierende Gene geachtet werden. SPMS-Enzyme sind in vielen Organismen an verschiedenen Stoffwechselwegen beteiligt. So führt beispielsweise der Defekt der humanen (*Homo sapiens*) SPMS (*HsSPMS*)-Enzyme u.a. zur Ausbildung des Snyder Robinson Syndroms, einer Form der kognitiven, physischen und motorischen Behinderung (Pegg, et al., 2010). Jedoch ist das humane SPMS-Enzym evolutionär bedeutend älter als pflanzliche SPMS-Enzyme (Pegg, et al., 2010).

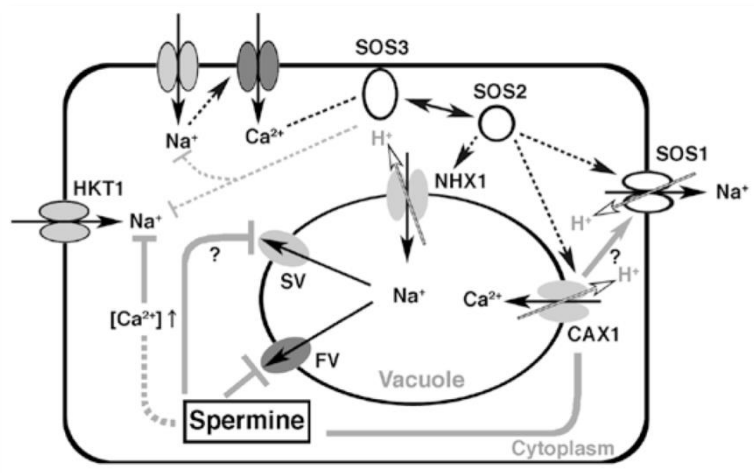


Abbildung 2: Ein hypothetisches Modell der defensiven Rolle von Spermin in stark NaCl -gestresster Arabidopsis – Kopie (Kusano, et al., 2007 b)
Abbildung unverändert aus Kusano, et al., 2007b entnommen

Es unterscheidet sich deutlich von z.B. den HvSPMS-Enzymen (19-20 % Sequenzidentität auf Aminosäureebene (SQI_A) (eigene Daten)). Pflanzliche SPMS-Proteine haben eine sehr nahe phylogenetische Verwandtschaft zu pflanzlichen SPDS-Proteinen (Minguet, et al., 2008 und eigene Daten), denn sie haben a) einen sehr hohen Grad an Sequenzidentität (Hashimoto, et al., 1998; Panicot, et al., 2002; Teuber, et al., 2007) und besitzen b) ähnliche Katalysereaktionen mit gleichem Co-Substrat. Sie haben c) einen gemeinsamen Vorfahren und verhalten sich paraphyletisch zueinander: Unter als SPDS annotierten Proteinsequenzen

finden sich Sequenzen, die als SPMS-Proteine annotiert wurden und umgekehrt; z.B. bei *AtSPMS1*, Sequenzen von Apfel und Tomate (Minguet, et al., 2008). SPMS-Proteine (EC 2.5.1.22) gehören zu den Aminopropyl-Transferasen, die dcSAM und nicht SAM als Co-Substrat verwenden [1.3.1./4]. Die Konzentration des dcSAM bildet den sogenannten „Flaschenhals“ der Katalyse (Hiatt, et al., 1986; Imai, et al., 2004 b; Ikeguchi, et al., 2006). SPMS-Gene sind ubiquitär in der gesamten Pflanze exprimiert (Takano, et al., 2012). Die vielen verschiedenen Formen der SPMS- und SPDS-Proteine entstanden durch alternatives Spleißen (Ikeguchi, et al., 2006). Es wurden bisher nur wenige zugehörige Gene charakterisiert (Rodríguez-Kessler, et al., 2010): *AtACL5* als *SPMS*-Gen (Hanzawa, et al., 2000), *AtSPDS1-3* (Hanzawa, et al., 2002), *AtSPMS* (Panicot, et al., 2002), *AtACL5*-Homologe in *Md* als *SPMS*-Gene (Kitashiba, et al., 2005), *LjSPMS*-Gen und -Protein (Efrose, et al., 2008) und *AtSPDS*- und *AtSPMS*-Homologe in *Gentiana triflora* (*Gt*) (Imamura, et al., 2015).

Diese Untersuchungen zu SPM zeigen hauptsächlich die Wirkung des PA im Zytosol von Pflanzenzellen. Die Regulation der SPMS-Gene wurde indes nur wenig untersucht (siehe Beispiele oben).

Es ergibt sich als Fragestellung: Wie werden der Gersten-SPM-Gehalt und die *HvSPMS*-Gene bei TrStr reguliert?

1.3.4. Thermospermin und Thermosperminsynthasen

Neben *SPMS*- sind auch *TSPMS*-Gene im Pflanzenreich weit verbreitet: *TSPMS* (*AtACL5*)-homologe Gene konnten u.a. in Gymnospermae, Chlorophyceae und Oomyceta gefunden werden (Takano, et al., 2012). *SPMS*-Homologe wurden bisher nur in Angiospermae identifiziert, während dessen *TSPMS*- Analoga in allen Pflanzen und Chlorophyceae vorkommen (Pegg, et al., 2010). Phylogenetische Untersuchungen zeigen, dass sich die *TSPMS*-Gene evolutiv noch vor der Abtrennung der *SPMS*- von den *SPDS*-Genen von einem gemeinsamen Vorläufergen abspalteten und phylogenetisch betrachtet deutlich älter sind als *SPMS*-Gene (Rodríguez-Kessler, et al., 2010). Demnach ist zu erwarten, dass sich große Abstände zwischen *SPMS*- und *TSPMS*-Gensequenzen in phylogenetischen Bäumen zeigen. Ein Ziel dieser Dissertation soll sein, *HvSPMS* phylogenetisch einzuordnen.

Um die Regulation von SPM bei TrStr zu untersuchen war es notwendig, SPM und TSPM getrennt voneinander nachzuweisen. Beide PA sind unter Standard-HPLC-Bedingungen, mit denen PA bisher untersucht wurden, nicht zu trennen (Kakehi, et al., 2008). Ziel dieses Projektes ist es eine Trennmethode zu entwickeln.

Das PA TSPM ist essentiell für die Spross- und beteiligt an der Gefäß-Entwicklung in *Ath* (Kakehi, et al., 2008; Takahashi, et al., 2009). In Studien mit *atacl5-1*-Funktionsverlust-Mutanten wurde die phänotypisch verminderte Stammelongation durch externe Applikation von TSPM aufgehoben. Mit SPM gelang dies nicht. Im Überschuss führte TSPM zur Inhibition der Blattausweitung (Kakehi, et al., 2008).

Bisher wurden nur sehr wenige *TSPMS*-Gene und -Proteine kinetisch bzw. strukturell charakterisiert. Das *AtACL5*-Protein wurde als SPMS (Hanzawa, et al., 2000) und *AtACL5*-Homologe in *Md* wurden beschrieben, jedoch nicht als *TSPMS*-Gene annotiert (Kitashiba, et al., 2005). In späteren Untersuchungen wurde mittels Dünnschichtchromatographie und anschließender MALDI-TOF-Fragmentierungsanalyse nachgewiesen, dass das *AtACL5*-Protein eine TSPMS ist und keine SPM synthetisiert (Knott, et al., 2007). Diese Ergebnisse führten zum Umdenken bei der Charakterisierung von vermutlichen SPMS, denn es ist nun stets zu prüfen, ob sie ausschließlich SPM, TSPM oder beide PA synthetisieren. Hanzawa, et al. untersuchten 2002 die Sequenzidentität auf Nukleotidebene (SQI_N) der *AtSPDS*- und *AtACL5*-Gene. Eine SQI_N von lediglich 33 % wurde festgestellt. Zu diesem Zeitpunkt wäre zu hinterfragen gewesen, ob *AtSPDS* bzw. *AtACL5* tatsächlich *SPDS*- bzw. *SPMS*-Gene sind, da die Literatur bisher deutlich höhere SQI_N beschrieb. Demnach muss geprüft werden, ob alle bis dato als SPMS annotierten Proteine tatsächlich nur SPM oder auch, bzw. ausschließlich TSPM bilden. Eine Frage dieser Dissertation lautet daher: Lassen sich in Gerste Spermysynthasen nachweisen und haben sie ausschließlich SPMS-Aktivität?

Weitere TSPMS v.a. von thermophilen Organismen werden beschrieben. Die Substratspezifität einer *Pyrobaculum aerophilum* PA (*PaSPeE*)- und einer *Hyperthermus butylicus* PA (HbSPeE I)-Synthase werden charakterisiert. Neben SPM können sie mit niedrigen Aktivitäten auch TSPM bilden (Knott, 2009). Triamin-Agmatin-Aminopropyl-Transferasen (TAAPT) können aus den Substraten SPD und dcSAM die Produkte SPM oder TSPM bilden, je nachdem ob die Aminopropylgruppe oder die Aminobutyl-Gruppe des SPD im aktiven Zentrum gebunden wird (Ohnuma, et al., 2011). TAAPT zeigen außerdem eine hohe Aktivität mit SAM als Substrat und haben Gate-Keeping-Loops, die auch bei TmSPDS (Korolev, et al., 2002) und HsSPDS (Wu, et al., 2007) beschrieben werden. TAAPT-Gene haben höhere strukturelle Ähnlichkeiten mit *AtACL5*- als mit *SPMS*-Gensequenzen. Die TAAPT aus *Thermus thermophilus* synthetisiert ausschließlich SPM (Ohnuma, et al., 2011). Diese Ergebnisse zeigen, dass trotz Struktur- und Sequenzuntersuchungen wichtig zu klären ist, ob die vermutlichen SPMS- bzw. TSPMS-Proteine nur SPM, TSPM oder beide PA bilden. Als Fragestellung führe ich aus: Können TSPMS in Gerste identifiziert werden und welche strukturellen bzw. sequenziellen Unterschiede können zu HvSPMS festgestellt werden?

1.4. Fragestellung und Ziele

Mit der Dissertation sollen folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- 1.) Können in Gerste SPMS nachgewiesen werden?
- 2.) Welche funktionellen und sequenziellen Charakteristika weisen sie auf? Welche kinetischen Parameter können für sie charakterisiert werden? Welche Erkenntnisse über Aktivität und Promotoren von Gerste-SPMS können gewonnen werden?
- 3.) Bilden SPMS in Gerste nur SPM? Lässt sich TSPMS-Aktivität bzw. TSPM in Gerste nachweisen?

- 4.) Können TSPMS in Gerste identifiziert und welche strukturellen bzw. sequenziellen Unterschiede können zu SPMS festgestellt werden?
- 5.) Welchen Einfluss hat TrStr auf die Regulation der SPMS-Gene in Gerste? Lassen sich Unterschiede in verschiedenen Wachstumsstadien feststellen? Sind Schlüsse auf die allgemeine TrStr-Regulation in Pflanzen möglich?
- 6.) Wie verändert TrStr den Gerste-SPM-Gehalt? Lassen sich Veränderungen der PUT- und SPD-Gehalte in trockengestressten Gerstepflanzen feststellen?
- 7.) Welchen Einfluss hat der in der SPM-Biosynthese gebildete SPMS-Inhibitor MTA auf die Katalyse-Reaktion und die kinetischen Parameter?
- 8.) Wie können diese Untersuchungen zum Verständnis der Mechanismen beitragen, in denen SPM eine Rolle bei der Reaktion auf TrStr in Gerste spielt?

Um diese Fragen zu beantworten, hat diese Dissertation folgende Ziele:

- I. die funktionelle, kinetische und sequenzielle Charakterisierung im monokotyledonen Modellorganismus Gerste.
- II. die phylogenetische Einordnung von Gerste-SPMS.
- III. die Untersuchung der Aktivität der SPMS-Promotoren soll.
- IV. den Gewinn neuer Erkenntnisse über die PA-Biosynthese v.a. der SPM-Biosynthese durch die Untersuchung der Regulation der Gerste-SPMS bei TrStr.
- V. die Etablierung einer Trennmethode für SPM und TSPM.

Um diese Fragen und Ziele zu untersuchen, wurden folgende Experimente durchgeführt:

Datenbank-Recherchen und phylogenetische Analysen bereits publizierter Nukleotid- und Protein-Sequenzen pflanzlicher SPMS identifizierten hochkonservierte Sequenzbereiche der verwendeten Sequenzen. In Klonierungsexperimenten wurden Primer abgeleitet, mit denen aus *Hordeum vulgare*-RNA vermutliche SPMS-cDNA-Fragmente kloniert und die cDNA- und Proteinsequenzen aufgeschlüsselt werden sollten. In phylogenetischen Untersuchungen sollten die SPMS-Sequenzen eingeordnet werden.

Weitere Experimente zur Sequenzcharakterisierung der mutmaßlichen *HvSPMS*-Gene wurden durchgeführt: Die gDNA-Sequenzen und die Intron-Exon-Strukturen der *HvSPMS*-Gene wurden charakterisiert. Weiterhin wurden deren upstream-Regionen zur Identifizierung von *HvSPMS*-Gen-Promotorregionen mittels Genome Walking sequenziert. So sollten anhand bereits bekannter Sequenzabschnitte neue bisher unbekannte Abschnitte kloniert werden. Die *HvSPMS*-Promotoren sollten auf Aktivität in nicht-gestressten *Hordeum vulgare*-Protoplasten getestet werden. Dazu wurden diese mit einem selbst klonierten Vektorkonstrukt transformiert und in Fluoreszenzmikroskopie-Untersuchungen beobachtet.

Eine zweite Methode zur Trennung und Analyse von PA (v.a. von SPMS und TSPM) als Reinsubstanz in Lösung und nach Extraktion aus pflanzlichem Material mittels GC-MS-Analytik sollte neben der in der Arbeitsgruppe bereits bestehenden HPLC-UV-VIS-Analytik

gefunden werden. Mit der etablierten Methode war eine Trennung von SPM und TSPM nicht möglich.

Die mutmaßlichen HvSPMS-Proteine wurden heterolog in *Escherichia coli* (*E. coli*, *Ec*) exprimiert, isoliert, gereinigt und funktionell, sowie kinetisch *in vitro* charakterisiert.

Parallel dazu sollten in Gerstenpflanzen-Anzucht-Experimenten optimale Bedingungen für die späteren TrStr-Experimente gefunden werden. Die TrStr-Experimente umfassten das Anziehen der Gerstenpflanzen bis in ein Alter von ca. 95 *das*, die Inkubation der Gerstenpflanzen unter TrStr-Bedingungen, die sich anschließende Extraktion von RNA. Daran schlossen sich die quantitative Echtzeit (qRT)-PCR-Analyse, die Extraktion von PA, sowie die HPLC-gestützte Analyse der PA-Gehalte der gestressten und nicht-gestressten Gerstenpflanzen an. Es wurden verschiedene, gegenüber TrStr verschieden tolerante Gerstensorten untersucht.

Parallel zu diesen Experimenten wurden *TSPMS*-Gene, -Proteine und TSPM in *Hordeum vulgare* gesucht. Gleichzeitig sollte eine dritte Methode zur Analyse von PA mittels HPLC-UV-VIS-Analytik in der Arbeitsgruppe etabliert werden.

2. Material und Methoden

- Temperaturen werden wie folgt bezeichnet: Temperaturen oberhalb Raumtemperatur (RT) (20-25 °C) als „warm“, Temperaturen unterhalb RT als „kalt“ bezeichnet

2.1. Materialien

2.1.1. Hordeum vulgare-Pflanzen

- Sommer- und Wintergerstenkultivar-Saatgut verschiedener Saatguthersteller verwendet [Tabelle 2/13]; für TrStr-Experimente Kultivare Golden Promise (GP) mit mittlerer bis geringer, sowie Tatum (TA) und Xanadu (XA) mit erhöhter Trockentoleranz genutzt (TA, XA – Nordsaat AG)

Gerstensorte	Anbauzyklus	Gerstensorte	Anbauzyklus
Britney	Sommergerste	Naomie	Wintergerste
Fridericus	Wintergerste	Quench	Sommergerste
Golden Promise	Sommergerste	Salome	Sommergerste
Laverda	Wintergerste	Souleyka	Wintergerste
Lomerit	Wintergerste	Tatum	Sommergerste
Marthe	Sommergerste	Xanadu	Sommergerste

Tabelle 2: Übersicht Anbauzyklen verwendeter Gerstensorten

Angaben gemäß Anbauhinweisen, Sorteninformationen und Warendecklarationen der Saatguthersteller (BayWa AG München Züchtervertrieb, 2013; KWS LOCHOW GmbH, 2016; KWS Suisse SA, 2016; SAATBAU LINZ eGen, 2016; SAATEN-UNION GmbH, 2015; Syngenta Agro GmbH, 2015)

2.1.2. Bakterienstämme

Bezeichnung und Hersteller	Genotyp
M15[pREP4], QIAGEN	$\text{NaI}^{\text{S}}, \text{Str}^{\text{S}}, \text{Rif}^{\text{S}}, \text{Thi}^{-}, \text{Lac}^{-}, \text{Ara}^{+}, \text{Gal}^{+}, \text{Mtl}^{-}, \text{F}^{-}, \text{RecA}^{+}, \text{Uvr}^{+}, \text{Lon}^{+}$
NEB [®] 10-beta Electrocompetent <i>E. coli</i> , New England Biolabs	$\Delta(\text{ara-leu})7697 \text{ araD139 } \text{fhuA } \Delta\text{lacX74 } \text{galK16 } \text{galE15 } \text{e14-}\Phi80\text{dlacZ}\Delta\text{M15 } \text{recA1 } \text{relA1 } \text{endA1 } \text{nupG } \text{rpsL}(\text{Str}^{\text{R}}) \text{ rph } \text{spoT1 } \Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC})$
One Shot [®] Top10, Invitrogen	$\text{F}^{-} \text{ mcrA } \Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC}) \Phi80\text{lacZ}\Delta\text{M15 } \Delta\text{lacX74 } \text{recA1 } \text{araD139}\Delta(\text{ara-leu})7697 \text{ galU } \text{galK } \text{rpsL}(\text{Str}^{\text{R}}) \text{ endA1 } \text{nupG}$
XL1-Blue, Stratagene	$\text{recA1 } \text{endA1 } \text{gyrA96 } \text{thi-1 } \text{hsdR17 } \text{supE44 } \text{relA1 } \text{lac}[\text{F}' \text{ proAB } \text{lac}^{\text{q}}\text{ZM15 } \text{Tn10}(\text{Tet}^{\text{r}})]$
XL2-Blue MRF ⁺ Ultracompetent Cells, Stratagene	$\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 } \text{supE44 } \text{thi-1 } \text{recA1 } \text{gyrA96 } \text{relA1 } \text{lac}[\text{F}' \text{ proAB } \text{lacI}^{\text{q}}\text{ZM15 } \text{Tn10}(\text{Tet}^{\text{r}}) \text{ Amy Cam}^{\text{r}}]$

Tabelle 3: verwendete Bakterienstämme

Angaben nach Manuals der Hersteller (QIAGEN, 2001; New Engand Biolabs, 2015; Thermo Fisher Scientific, 2013; Stratagene, 2004; Stratagene, 2015)

2.1.3. Leerplasmide

Bezeichnung, Hersteller	Eigenschaften	Bezeichnung, Hersteller	Eigenschaften
pART7-35S::mCherry-Tocs	5'621 bp, p35S, pART7-MCS-mCherry-Tocs-Fragment	pUBI-AB	4'745 bp, UBI-Int, Amp ^r
pCR [®] 2.1, Invitrogen	3'929 bp, <i>LacZ</i> , Amp ^r , Kan ^r	pUBI-AB-mUBI::EYFP-Tnos	5'471 bp, UBI-Int, eYFP-Tnos, Amp ^r
pGEM [®] -T Easy, Promega	3'015 bp, <i>LacZ</i> , Amp ^r	pQE-30, QIAGEN	3'461 bp, Amp ^r , His-Tag (N)
pGreenII 0179	5'138 bp, <i>LacZ</i> , HygB ^r		

Tabelle 4: verwendete Leerplasmide

Eigenschaften nach Herstellern (Thermo Fisher Scientific, 2013; Promega, 2012; QIAGEN, 2003); bp – Basenpaare; Resistenzen: Amp^r – Ampicillin, HygB^r – Hygromycin B, Kan^r – Kanamycin; eYFP-Tnos – gelb fluoreszierendes Protein, NOS-Terminator; His-Tag – 6-fach Histidin-Tag N-terminal, *LacZ* – β -Galactosidase; mCherry-Tocs – rot fluoreszierendes Protein, OCS-Terminator; MCS – multiple Klonierungsregion; p35S – Cauliflower Mosaic Virus 35S-Kassette; UBI-Int – Ubiquitin-Intron

2.1.4. Primer

Nr.	Bezeichnung	Schnittstelle	Sequenz (5'→3')	T _m in °C
HvSPMSwobble				
1	Pr1_for		CCA CYG TTG TKT CTG GRT GGT TC	63,9
	Pr2_for		CAA YAA CCC DAT GTG GCC AGG AG	63,9
	Pr3_rev		CCA CTN GGA TAT GTA GGR ACA C	60,3
	Pr4_rev		GAG AKC ATR TCT TGR ATA AGA TGC GTA TG	63,1
	Pr5_for		GAC ACM AAG CVT TTT GGM AAG G	60,0
	Pr6_rev		CDG TRT CAG CAA ADG ATG GHA CAT G	62,2
HvFLbaf17k92				
2	HvINSdirfor_restr	BamHI	GGA TCC GAG GGT GGA GGC GCA AGA AAT	69,5
	HvINSdirrev_restr	SaI	GTC GAC CTA GGA AGC GGT GAT AGC GCT	69,5
HvSPMS-RACE-PCR				
3	3'RP_GSP1		CGA CTT CAT GTT GGT GAC GC	59,4
	3'RP_GSP2		CTC CTG AAG GCA CAT ATG ATG C	60,3
	5'RP_GSP1		CTG AGG TGA CTT GGT ACA GAC	59,8
	5'RP_GSP2		CAC CAT CTC CAC CTC CAA TAA CC	62,4
	5'RP_GSP3		TCC TGG TAG GCA CAT TCA TCC	59,8
4	HvSPMS2_dir_Seq			

Nr.	Bezeichnung	Schnittstelle	Sequenz (5'→3')	T _m in °C
4	HvSPMS2_for_restr	BamHI	GGA TCC GAG GGT GGA GAC GTA	65,7
	HvSPMS2_rev_restr	SalI	GTC GAC CTA AGC GGT AAG AAT TTC A	63,8
qRT-PCR				
5	HvSPMS1_for_qRT		GAA GGA GCT ACT AAA GAT GGA CGA	60,3
	HvSPMS1_rev_qRT		CGC TGT CCC GCA TTA CC	61,2
	HvSPMS2_for_qRT		CGC TAT GAC AGC AGG GAG G	61,9
	HvSPMS2_rev_qRT		CGG TAA GAA TTT CAC TGT GTG GC	62,9
	HvActin_for_qRT		GGA AAT GGC TGA CGG TGA GGA C	67,3
	HvActin_rev_qRT		GGC GAC CAA CTA TGC TAG GGA AAA C	66,8
	PP2A-4_for_qRT		GAT GAC TGC AAC GCT CAC AC	60,5
	PP2A-4_rev_qRT		CTC AAA GGA AAT AAT CAG GCG TTC	62,3
	HvSPMS-restr			
6	HvSPMS1_for		GAG GGT GGA GGC GCA AGA AAT	66,9
	HvSPMS1_rev		CTA GGA AGC GGT GAT AGC GCT	66,0
	HvSPMS2_for		GAG GGT GGA GAC GTA	50,8
	HvSPMS2_rev		CTA AGC GGT AAG AAT TTC A	50,8
HvTSPMS_fimgggeg				
7	HvTSPMS_fw1_deg		TTY ATH ATG GGN GGN GGN GAA GG	63,0
	HvTSPMS_fw2_deg		TTY ATH ATG GGN GGN GGN GAG GG	64,8
	HvTSPMS_fw3_deg		GGN CCN TGY TAY CAR YTY TAY AC	60,6
	HvTSPMS_fw4_deg		GGN CCN TGY TAY CAR YTR TAY AC	60,6
	HvTSPMS_rev		CGG GGT ACG ATG AGA CAC CAG	63,7
	HvTSPMS_rev_oligoT ₁₅		CGG GGT ACG ATG AGA CAC CAG TTT TTT TTT TTT TTT	66,0
HvSPSM1_genom				
8	HvSPMS1_for_gen		ATG GAG GGT GGA GGC GCA AGA AAT GTT TC	72,0
	HvSPMS1_rev_gen		CTA GGA AGC GGT GAT AGC GCT GTC CCG CAT TAC	75,0
HvSPMS_genWalk				
9	HvSPMS1_318C_GSP1		GCG CTT TGC TTG GTT TAC CTG AAC ATA C	68,0
	HvSPMS1_88C_nested		AGG CAA TGG CTT GCG GGA GCC ATC ATC	74,0
	HvSPMS2_184C_GSP1		ATC GGG AGT GGG TTT CTG TGA ACC ATC	70,0
	HvSPMS2_52C_nested		CCT TTG TCT GTG ATG TCC CAG TCA AAC C	69,0
	GenWalk_Adaptor		GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAC GCG TGG TCG ACG GCC CGG GCT GGT	84,0
	AP1		GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	59,0
AP2		ACT ATA GGG CAC GCG TGG T	65,0	

Nr.	Bezeichnung	Schnittstelle	Sequenz (5'→3')	T _m in °C
	HvSPMS_genUp_Seq			
	HvSPMS1_Seq2_M1		CTG CAC CAC CAA ATG TTA GG	61,0
	HvSPMS1_Seq2_M2		GGG TCG CAT TAT CCA AGT AG	59,0
	HvSPMS1_Seq3_M5		TGA AAG AGC TGC AGG TAT GG	61,0
	HvSPMS1_Seq3_M6		GGT GAT GGT GGT GTA CTA AG	59,0
	HvSPMS1_Seq4_P1		TCG AAA CAC GGC CAG CAG AG	67,0
	HvSPMS1_Seq4_P2		GTT TGG CAC AGG ACG GTT TG	64,0
10	HvSPMS1_Seq5_P1		GAT AAG GCA TGA CTG GAA AC	58,0
	HvSPMS1_Seq5_P2		TCA ACA GGA GCG TCG TAT TC	61,0
	HvSPMS1_Seq6_P1		GTT TGG CAC AGG ACG GTT TG	64,0
	HvSPMS1_Seq6_P2		GCG CCT TTA TAT GAA TCA TC	54,0
	HvSPMS1_Seq6_P3		TCA ACA GGA GCG TCG TAT TC	61,0
	HvSPMS1_Seq6_P4		GGG CAG ATG TTT CCT GTT TC	61,0
	HvSPMS2_Seq2_for		TTC TCC CGC GCT CCA ACT TC	66,0
	HvSPMS2_Seq2_rev		CTG TGC AGC TAG TGC TAC AG	62,0
	213-T7		TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	53,2
	214-T3		AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG	53,2
11	333		TTG ATC TTG ATA TAC TTG GAT GAT GG	58,5
	334-pUBI-AB_R		CCC ATC TCA TAA ATA ACG TCA TGC	59,3
	820-seq-mCherry3'For		CCA CAA CGA GGA CTA CAC CA	59,4
	1081-TDNA-BASTA-T35Sf		CGA GAC AAG CAC GGT CAA CT	59,4
	Phusion_SPMS1_for		CCT CCT TTT TTT AAA AAA GAA CAA TTA TCG	58,6
	Phusion_SPMS1_rev		GAA CCC TGT TCC CCT TTA AAG T	58,4
	Phusion_SPMS2_for		AAA TAA ATT TTT ATG TAT TTT TCA TCA ATG ATC	55,8
12	Phusion_SPMS2_for_2		CAT CAA TGA TCG CCA TAT GTC	55,9
	Phusion_SPMS2_rev		GGA TCC TGT TCT TTG AAG TTC	55,9
	Kolo_upSPMS1		GAG CAC AAG GCG ATA GTT C	56,7
	Kolo_upSPMS2		GCG TGT CAG TGA TCT TGT G	56,7

Tabelle 5: verwendete Primer

Primer wurden bei Eurofins MWG Operon mit HPSF-Reinigungsgrad synthetisiert, als 100 µM Lösung in DEPC- bzw. Nuklease-freiem Wasser bei – 20 C gelagert, Primerschmelztemperatur mit Clonemanager-Software berechnet bzw. laut den Angaben des Schmelzpunktrechners der MWG-Internet-Seite übernommen, Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen fett gedrückt, wobble-Stellen kursiv gedrückt

2.1.5. Instrumente und Apparaturen

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Agarose- Gelelektrophorese	Standard Power Pack P25	Biometra
	Electrophoresis Power Supply PS 3002	GibcoBRL Life
	Consort E835 Power Unit	Technologies
	Microcomputer Electrophoresis Power Supply PHERO-STAB 550	Consort BIOTECH FISCHER
Autoklav	Varioklav Typ 500	H + P Labortechnik
Brutschrank	B6060	Heraeus Instruments
Eismaschine	Scotsman AF 100	Scotsman
Elektroporator	Multiporator	eppendorf
Fluoreszenzmikroskop		
Mikroskop	Axio-Observer Z.1	Carl Zeiss AG
Kamera	AxioCam MRm Kamera	
Fluoreszenzdetektion	Filtersatz 38 HE: 450 nm ≤ λ _{ex} ≤ 490 nm, 500 nm ≤ λ _{em} ≤ 550 nm	
	Filtersatz 31: 550 nm ≤ λ _{ex} ≤ 580 nm, 590 nm ≤ λ _{em} ≤ 650 nm	
	Software	AxioVision Software (Version 4.8.2.), Differentialinterferenzkontrast-(DIC)- Methode nach Nomarski
GC-MS		
Gaschromatograph	Shimadzu GC-2100	Shimadzu
Massenspektrometer	Shimadzu GC/MS-QP2010S	
Gel Fotografie		
Transluminator (312 nm)	TC-312A	Spectroline Ltf-Labortechnik Mitsubishi
Videokamera	Modul CCD Ser.-Nr.: 993249	
Videokopie	Prozessor P91E	
HPLC		
Merck Hitachi Elite LaChrom D 7000	Interface D-7000 Pumpe L-7100 Autosampler L-7200 Fluoreszenzdetektor L-7485 Dioden-Array-Detektor L-7455 Säulenofen Jetstream 2 Plus	Merck Hitachi W.O. Electronics
Inkubatorschüttler	Certomat IS GFL 3032 Heraeus Inkubator B 6060 innOva 4230	Sartorius Stedim Biotech GmbH GFL Heraeus Instruments New Brunswick Scientific
Kühlkammer	TE1200/1950/100ESL	Viessmann
Kühlschränke	CBC 371 (4 °C) Privileg Öko (- 20 °C) Queue (4 °C/- 20 °C) ALASKA GGT-501 (- 20 °C) Laboratory Chest Freezer ProfiLine Taurus PLTA 3360 (- 70) Herafreeze HFU586STD-V14 (- 80 °C) Herafreeze HFC586PLUS-V14 (- 80 °C)	Nunc Privileg Boch ALASKA National Lab Heraeus Instruments

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Kolbenhubpipetten		
2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1'000 µl, 5'000 µl, 10'000 µl	Research/ peqPETTE Research	eppendorf/ peqlab Biotechnologie GmbH eppendorf
LAF-Sterilbank	LaminAir HB 2472	Heraeus Instruments
Lyophilisator/ Gefriertrocknung	Alpha 1-2 LD plus Drehscheibenvakuumpumpe RZ 2	Christ Vacubrand GmbH
Magnetheizrührer	IKAMAG RET RCT basic	IKA Labortechnik
Mikrowelle	Typ 700 Privileg 8526	Severin Privileg
pH-Meter	inoLab pH Level 1 pMX 3000 MV 870	WTW Präcitronic
Plattenleser	NanoQuant Infinite M200	TECAN
Polyacrylamid- Gelelektrophorese, SDS-PAGE-Apparatur	Unipack 250 Power Supply PerfectBlue™ Vertikale Doppel-Systeme TWIN S, Model: 45-1010-i ST305 Electrophoresis Power Supply	Uniequip peqlab Biotechnologie GmbH LIFE Technologies
Proteinchromatografie	ÄKTAexplorer 100 Pumpe P-900 pH/Leitfähigkeitsmesser pH/C-900 UV-Detektor UV-900 Fraktionssammler Frac-900	Pharmacia Biotech
qRT-PCR-System	C1000 Thermal Cycler CFX98 Real-Time-System	BioRAD
Schlauchpumpe	Pump P-1	Pharmacia Biotech
Schüttler	KS 500 KS 501 digital	IKA Labortechnik
SpeedVac	RCV 2-18 RCV 2-25 Kühlfalle ALPHA 1-4 Kühlfalle CT 02-50 Membran-Vakuumpumpe MZ2C	Christ Vacubrand GmbH
Thermoblock	Blockthermostat BT 200	Kleinfeld Labortechnik
Thermocycler für PCR	T3 Thermocycler T Gradient Thermoblock Mastercycler gradient S1000 Thermal Cycler	Biometra biomedizinische Analytik GmbH eppendorf BioRAD
Thermoschüttler	Mixing Block MB-102 Thermomixer 5436/5437 Thermomixer comfort	BIOER Technologies eppendorf
Trockenschrank	UM 500 HAST 5020	Memmert MLW
Ultraschallbad	Sonorex RK 100 Sonorex TK 52	Bandelin Electronic
Ultraschallstab- Apparatur	Sonifier 250 Sonoplus HD70 Ultraturax Typ UW 70	Branson Bandelin
UV/VIS- Spektralphotometer	BioSpectrometer basic DNA/RNA-Spektrometer Gene Quant II RNA/DNA Calculator	eppendorf Pharmacia Biotech

Bezeichnung	Typ	Hersteller
UV/VIS-Spektralphotometer	Einstrahlphotometer Ultrospec III Zweistrahlphotometer UV-160A	Pharmazia LKB Biochrom Shimadzu
Vortex-Mischer	Minishaker MS2 VF2 Vortex-Genie 2	IKA Labortechnik Scientific Industries
Waagen		
Analysenwaagen	BP 210S MC1 Analytic AC 210 LS R 200 D XA 105 Dual Range	Sartorius AG Göttingen Mettler Toledo
Feinwaage Laborwaagen	MC1 Backweigher LC 220S-00DC Kern Typ 440 47N MC1 Laboratory LC 2200 MP-3000 OI-1500-P	Sartorius AG Göttingen Kern und Sohn GmbH Sartorius AG Göttingen Ohyo Omnilab
Wasseraufbereitung	TKA GenPure	TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH
Zentrifugen		
Kühlzentrifugen	Biofuge fresco Centrifuge 5403 Centrifuge 5430 R GS-15R Centrifuge Perfect Spin 24R	Heraeus Instruments eppendorf Beckman peqlab Biotechnologie GmbH
Tischzentrifugen	Sigma 3K12 Sigma 3K18 Sorvall RC-5B Tj-25 Centrifuge Centrifuge 5415 D Centrifuge 5424 Perfect Spin P	B.Braun Biotech Intenational Du Pont Instruments Beckman Coulter eppendorf peqlab Biotechnologie GmbH

Tabelle 6: verwendete Instrumente und Apparaturen

2.1.6. Chemikalien

Bezeichnung	Reinheit	Hersteller
2-Mercaptoethanol (C ₂ H ₆ OS)	reinst	Roth
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure, MES (C ₆ H ₁₃ NO ₄ S)	≥ 99,5 %	Sigma-Aldrich
4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure, HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	≥ 99,5 %	AppliChem
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid, X-Gal (C ₁₄ H ₁₅ BrClNO ₆)	≥ 99,0 %	Thermo Scientific
9-Fluorenylmethoxycarbonylchloride, Fmoc	≥ 97,0 %	Sigma-Aldrich
Abscisinsäure, ABA (C ₁₅ H ₂₀ O ₄)	≥ 98,5 %	Sigma-Aldrich
Aceton (C ₃ H ₆ O)	≥ 99,5 %	Roth
Acetonitril (CH ₃ CN)	≥ 99,9 %	Roth, VWR
Acrylamid (C ₃ H ₅ NO)	≥ 99,0 %	AppliChem
Agar	Bakt.Bio.-Grad	AppliChem
Agarose ([C ₁₂ H ₁₈ O ₉] _n)	peqGold Univ.	VWR
Albumin Fraktion V aus Rinderserum, BSA	≥ 98,0 %	Serva
Ammoniak-Lösung 25 % (NH ₃)	25 %	Roth
Ammoniumthiocyanat (NH ₄ SCN)	reinst, kristallin	AppliChem
Ammoniumperoxidsulfat, APS ([NH ₄] ₂ S ₂ O ₈)	≥ 98,0 %	Merck

Bezeichnung	Reinheit	Hersteller
Ampicillin (C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S Na-Salz)	≥ 99,0 %	AppliChem
Ascorbinsäure, ACA (C ₆ H ₈ O ₆)	reinst	AppliChem
Boräure (H ₃ BO ₃)	≥ 99,8 %	Roth
Bromphenolblau (C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S)	research grade	Serva
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂ · 2 H ₂ O)	Mol.Bio.-Grad	Calbiochem
Calciumnitrat-Tetrahydrat (Ca(NO ₃) ₂) · 4 H ₂ O	≥ 98,0 %	Roth
Coomassie Brilliant Blau R-250 (C ₄₅ H ₄₄ N ₃ NaO ₇ S ₂ Na-Salz)	reinst	AppliChem
Dansylchlorid (C ₁₂ H ₁₂ ClNO ₂ S)	≥ 98,0 %	AppliChem
D-Glucose-Monohydrat (C ₆ H ₁₂ O ₆ · H ₂ O)	≥ 99,0 %	Fluka
Diethylether ([C ₂ H ₅] ₂ O)	≥ 99,0 %	Roth
Diethylpyrocarbonat, DEPC (C ₆ H ₁₀ O ₅)	≥ 97,0 %	AppliChem
Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat (K ₂ HPO ₄ · 3 H ₂ O)	reinst, kristallin	Merck
Dikaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	reinst, kristallin	Merck
Dimethylsulfoxid, DMSO (C ₂ H ₆ OS)	≥ 99,9 %	AppliChem
Dinatriummethylenediamintetraessigsäure-Dihydrat (Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O)	≥ 99,0 %	AppliChem
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O)	≥ 99,5 %	Roth
Dithiothreitol, DTT (C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)	≥ 99,5 %	AppliChem
Essigsäure (CH ₃ COOH)	≥ 99,0 %	Roth
Ethanol (C ₂ H ₅ OH), unvergält	96 % (V/V), reinst	Roth
Ethanol (C ₂ H ₅ OH), vergält mit ca. 1 % Methylethylketon	96 % (V/V)	Roth
Ethidiumbromid-Lösung (C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃), wässrig	10 mg/ml	Sigma-Aldrich, QIAGEN
Ethylacetat (C ₄ H ₈ O ₂)	≥ 99,5 %	VWR
Glycerol (C ₃ H ₈ O ₃), wasserfrei	≥ 98,0 %	Roth
Glycin	≥ 99,5 %	AppliChem
Glycogen	Mol.Bio.-Grad	Thermo Scientific
Hefeextrakt	keine Angabe	AppliChem
Heptafluorobuttersäureanhydrid, HFBA (C ₈ F ₁₄ O ₃)	≥ 99,0 %	Sigma-Aldrich
Hexan (C ₆ H ₁₄)	≥ 99,0 %	VWR
Imidazol (C ₃ H ₄ N ₂)	≥ 99,0 %	AppliChem
Isopropanol, Isopropylalkohol (C ₃ H ₈ O)	reinst	Roth
Isopropyl-β-D-1-thogalactosid, IPTG (C ₉ H ₁₈ O ₅ S)	≥ 99,0 %	Thermo Scientific
Kaliumchlorid (KCl)	≥ 99,0 %	AppliChem
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	reinst, kristallin	Merck
Kaliumhydroxid (KOH)	≥ 85,0 %, Plättchen	Roth
Kanamycinsulfat (C ₁₈ H ₃₆ N ₄ O ₁₁ · H ₂ SO ₄)	keine Angabe	AppliChem
L-Prolin (C ₅ H ₉ NO ₂)	≥ 99,0 %	AppliChem
Lithiumchlorid (LiCl)	≥ 99,0 %	AppliChem
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ · 6 H ₂ O)	≥ 99,9 %	Sigma-Aldrich
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ · 7 H ₂ O)	≥ 99,0 %	Roth
Mangan-II-chlorid-Tetrahydrat (MnCl ₂ · 4 H ₂ O)	Analytikgrad	Serva
Mannitol (C ₆ H ₁₄ O ₆)	≥ 98,0 %	Sigma-Aldrich
Methanol (CH ₃ OH)	reinst	Roth
Natriumacetat-Trihydrat (C ₂ H ₃ NaO ₂ · 3 H ₂ O)	≥ 99,0 %	AppliChem
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃), wasserfrei	≥ 99,5 %	Roth
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat (NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O)	≥ 98,0 %	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	≥ 99,9 %	AppliChem
Natriumdodecylsulfat, SDS (C ₁₂ H ₂₅ NaSO ₄)	≥ 99,5 %	AppliChem

Bezeichnung	Reinheit	Hersteller
Natriumhydroxid (NaOH)	reinst, Plättchen	Merck, Roth
Natriumhypochlorit-Lösung (NaClO)	12-13 % akt. Chlor	AppliChem, Roth
Nickel-II-sulfat-Hexahydrat (NiSO ₄ · 6 H ₂ O)	≥ 99,0 %	Roth
<i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid, MBA (C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂)	research grade	Serva
<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid, BSTFA (CF ₃ C[=NSi(CH ₃) ₃]OSi(CH ₃) ₃)	≥ 99,0 %	Sigma-Aldrich
Perchlorsäure (HClO ₄)	60,0 %	Merck
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	85 %	Merck
Piperazin-1,4-diethansulfonsäure, PIPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₆ S ₂)	99 %	Merck
Polyethylenglycol, PEG 1'000, 3'350, 10'000 (H[C ₂ H ₄ O] _n OH)	keine Angabe	keine Angabe
Polyvinylpolypyrrolidon, PVPP ([C ₆ H ₉ NO] _n)	keine Angabe	Sigma-Aldrich
Putrescin-Dihydrochlorid (C ₄ H ₁₂ N ₂ · 2 HCl)		Sigma-Aldrich
Putrescin-Base (C ₄ H ₁₂ N ₂)	≥ 98,0 %	Sigma-Aldrich
Quarz/Seesand	rein	Laborchemie Apolda
<i>S</i> -Adenosyl-L-homocystein, SAH (C ₁₄ H ₂₀ N ₆ O ₅ S)	≥ 99,0 %	Sigma-Aldrich
<i>S</i> -Adenosyl-L-methioninchlorid, SAM (C ₁₅ H ₂₂ N ₆ O ₅ S ⁺)	ca. 70,0 %	Sigma-Aldrich
<i>S</i> -Adenosyl-L-methionin decarboxyliert, <i>S</i> -Adenosyl-L-methioninamin, dcSAM (C ₁₄ H ₂₃ N ₆ O ₃ S ⁺)	≥ 98,0 %, H-NMR, C-NMR	IPB-Halle, D; Tokyo Biochem. Res. Inst., JPN
Salzsäure (HCl)	37,0 %, reinst	AppliChem
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	96 %	Roth
Spermidin-Trihydrochlorid (C ₇ H ₁₉ N ₃ · 3 HCl)	≥ 99,0 %	Merck
Spermin-Tetrahydrochlorid (C ₁₀ H ₂₆ N ₄ · 4 HCl)	≥ 97,0 %	Merck
Stickstoff (N ₂), flüssig	≥ 99,8 % (V/V)	Air Liquide
Tetramethylethylendiamin, TEMED (C ₆ H ₁₆ N ₂)	≥ 99,0 %	Sigma-Aldrich
Thermospermin-Tetrahydrochlorid (C ₁₀ H ₂₆ N ₄ · 4 HCl)	≥ 99,0 %, H-NMR, C-NMR	IPB-Halle
Toluol (C ₇ H ₈)	≥ 99,5 %	Roth
Trichlormethan, Chloroform (CHCl ₃)	≥ 99,8 %	Roth
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, TRIS PUFFERAN, TRIS-Base (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	≥ 99,3 %	Roth
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid, TRIS-HCl (C ₄ H ₁₁ NO ₃ HCl)	≥ 99,0 %	Merck
Triton X-100, Octylphenol-polyethylenglycol-ether (<i>t</i> -Oct-C ₆ H ₄ -[OCH ₂ CH ₂] _n OH, n = 9-10)	keine Angabe	Sigma-Aldrich, Serva
Trypton, Caseinhydrolysat	keine Angabe	AppliChem

Tabelle 7: verwendete Chemikalien

Gehaltsangaben nach Angaben der Hersteller auf den Chemikalienumverpackungen

2.1.7. Kits und Marker

Bezeichnung	Hersteller
3' RACE System	Invitrogen
5' RACE System	Invitrogen
DNeasy Plant Maxi Kit	QIAGEN
dNTP Set (jeweils 100 mM, dATP, dCTP, dGTP, dTTP*)	Thermo Scientific
GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Scientific
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Thermo Scientific
GenomeWalker™ Universal Kit	Clontech

Bezeichnung	Hersteller
gGEM-T Easy Vector System	Promega
MangoMix™	BIOLINE
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix	Thermo Scientific
Maxima SYBR Green qPCR MasterMix (2x); ROX provided	Thermo Scientific
MinElute® PCR Purification Kit	QIAGEN
NucleoBond® Xtra Midi Kit	Macherey & Nagel
Omniscript® RT Kit	QIAGEN
Plant RNA Purification Mini Kit	Thermo Scientific
PureYield™ Plasmid Miniprep System	Promega
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
QIAzol Lysis Reagent Kit	QIAGEN
Quantitas DNA Marker	Biozym Scientific GmbH
Ranger DNA Polymerase	BIOLINE
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Scientific
RNase-Free DNase Set	QIAGEN
RNeasy® MinElute® Cleanup Kit	QIAGEN
RNeasy® Plant Mini Kit	QIAGEN
SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit	Clontech
T4 DNA Ligase	Promega
TA Cloning Kit	Invitrogen
TOPO Cloning Kit	Invitrogen
Unstained Protein Molecular Weight Marker	Fermentas/Thermo Scientific
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega

Tabelle 8: verwendete Kits und Marker

*dATP, dCTP, dGTP, dTTP – Desoxyribonukleosidtriphosphate

2.1.8. Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
<i>Afl</i> III (20 U/μl)	New England Biolabs
Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP)	New England Biolabs
<i>Ava</i> I (10 U/μl)	New England Biolabs
<i>Bam</i> HI, <i>Bam</i> HI-HF (je 20 U/μl)	ThermoScientific, <u>New England Biolabs</u>
<i>Bst</i> XI (10 U/μl)	New England Biolabs
<i>Bst</i> BI (10 U/μl)	New England Biolabs
Cellulase RS (16 U/μg)	Duchefa Biochemie
DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment	New England Biolabs
DNase I (5000 U/mg, 1 U/μl)	Sigma-Aldrich, <i>Thermo Scientific</i>
<i>Eco</i> RI, <i>Eco</i> RI-HF (10 U/μl, 20 U/μl)	ThermoScientific, <u>New England Biolabs</u>
<i>Eco</i> RV, <i>Eco</i> RV-HF (10 U/μl, 20 U/μl)	ThermoScientific, <u>New England Biolabs</u>
Lysocym (20'000 U/mg)	AppliChem
Macerolzyme R-10	Duchefa Biochemie
MangoTaq™ -DNA-Polymerase	Bioline GmbH
Maxima Hot-Start-Taq-DNA-Polymerase	Thermo Scientific
MyFi™ -Taq-Polymerase	Bioline GmbH
<i>Nae</i> I (10 U/μl)	New England Biolabs
<i>Nco</i> I (10 U/μl, 20 U/μl)	Thermo Scientific, <u>New England Biolabs</u>
<i>Not</i> I, <i>Not</i> I-HF (20 U/μl)	Thermo Scientific, <u>New England Biolabs</u>
<i>Pfu</i> DNA Polymerase, rekombinant (2,5 U/μl)	Thermo Scientific

Bezeichnung	Hersteller
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/μl)	Thermo Scientific
<i>Psi</i> I (5 U/μl)	New England Biolabs
<i>Pst</i> I (15 U/μl, <u>20 U/μl</u>)	Thermo Scientific, <u>New England Biolabs</u>
Ranger-DNA-Polymerase	Bioline GmbH
<i>Sac</i> I-HF (20 U/μl)	New England Biolabs
<i>Sal</i> I, <i>Sal</i> I-HF (10 U/μl, <u>20 U/μl</u>)	Thermo Scientific, <u>New England Biolabs</u>
<i>Sca</i> I, <i>Sca</i> I-HF (10 U/μl, <u>20 U/μl</u>)	Thermo Scientific, <u>New England Biolabs</u>
<i>Spe</i> I-HF (20 U/μl)	New England Biolabs
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	Invitrogen
T4 DNA Polymerase	New England Biolabs
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/μl)	New England Biolabs
<i>Taq</i> DNA Polymerase, rekombinant (10 U/μl)	Thermo Scientific
TdT terminale Desoxyribonukleosyltransferase (20 U/μl)	Invitrogen
<i>Xba</i> I (20 U/μl)	New England Biolabs
<i>Xma</i> I (10 U/μl)	New England Biolabs

Tabelle 9: verwendetete Enzyme

Puffer nach Herstellervorgaben verwendet; gleiche Enzyme verschiedener Hersteller verwendet: ‚recte‘ und ‚unterstrichen‘ gedruckte Angaben zusammengehörend

2.1.9. Kulturmedien für *E. coli*

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Luria-Medium	1,0 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1,0 % Natriumchlorid, pH 7,5
LB-Agarplatten	LB-Medium mit 0,7 %, 1,0 %, 1,5 % oder 2,0 % Agar, geeignetes Antibiotikum (z.B. Ampicillin)
SOB-Medium	2 % Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM Natriumchlorid, 2,5 mM Kaliumchlorid, 10 mM Magnesiumchlorid, 10 mM Magnesiumsulfat, pH 6,8 – 7,0 Magnesiumsalze nach Autoklavieren zugesetzt
SOC-Medium	2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM Natriumchlorid, 2,5 mM Kaliumchlorid, 10 mM Magnesiumchlorid, 10 mM Magnesiumsulfat, 20 mM D-Glucose
TB-Medium	1,2 % Trypton, 2,4 % Hefeextrakt, 0,4 % Glycerol

Tabelle 10: Zusammensetzung verwendeter Kulturmedien

SOC-Medium nach Manual Thermo Fisher, Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, 2013)

2.1.10. Puffer und Reagenzien

Bezeichnung	Zusammensetzung
10-fach Laufpuffer für SDS-PAGE	30,2 g TRIS PUFFERAN, 144,0 g Glycin, 10,0 g SDS, pH 8,3 zu 1'000,0 ml, Lagerung: RT, Lichtschutz
1-fach Laufpuffer für SDS-PAGE	10-Fach Laufpuffer für SDS-PAGE 1:10 mit Wasser verdünnt
10-fach TAE-Puffer	400 mM TRIS PUFFERAN, 200 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH 7,6 (Essigsäure)
1-fach TAE-Puffer	10-Fach TAE-Puffer 1:10 mit Wasser verdünnt

Bezeichnung	Zusammensetzung	
2-fach Probenpuffer für SDS-PAGE	0,09 M TRIS-HCl pH 6,8, 2,00 % (m/V) SDS, 0,02 % (m/V) Bromphenolblau Lagerung: – 20 °C	20,00 % (m/V) Glycerol, 0,10 M DTT,
4-fach Bradford-Stammlösung	400 mg Coomassie Brilliant Blau R-250, 400 ml entionisiertes Wasser,	400 ml Phosphorsäure, 200 ml Ethanol (unvergällt)
5-fach Probenpuffer für SDS-PAGE	0,225 M TRIS-HCl pH 6,8, 5,000 % (m/V) SDS, 0,05 % (m/V) Bromphenolblau Lagerung: – 20,0 °C	50,000 % (m/V) Glycerol, 0,250 M DTT,
20-fach Natriumborat-Puffer	2 M Natriumhydroxid pH 8,8	2 M Borsäure Lösung steril filtriert
1-fach Natriumborat-Puffer Ampicillin-Stammlösung	10-Fach 20-fach Natriumborat-Puffer 1:10 mit Wasser verdünnt 100 mg/ml Ampicillin, Lösung wird steril filtriert,	Lagerung: – 20 °C
Bindepuffer IMAC	50 mM Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat, pH 8,0, eingestellt mit konz. Natronlauge, Puffer anschließend partikelfrei filtriert (0,45 µm), Lagerung bei 4 °C	300 mM Natriumchlorid, 10 mM Imidazol,
Calciumnitrat-Lösung (1M)	1 M Calciumnitrat-Tetrahydrat	
Cellulase-Macerase-Gemisch	1,50% Cellulase, 0,75 % Macerozym, 10 mM MES (pH 5,6) 10 min 55 °C, abkühlen lassen, Zugabe von: 0,1 % BSA, 5 mM Mercaptoethanol steril filtrieren, Zugabe von: 50 µg/ml Kanamycin	0,20 % Hemicellulase, 0,6 M Mannitol, 1 mM Calciumchlorid,
Dansylchlorid-Lösung	7,5 mg/ml Dansylchlorid, Lagerung: – 20 °C, Lichtschutz	in Aceton,
dcSAM-Stammlösung (für Aktivitätsassays)	10 mM dcSAM in HEPES-Puffer 2 (20 mM, pH 8,0) Lagerung: – 20,0 °C	
dcSAM-Lösungen (für Aktivitätsassays)	1 mM: dcSAM-Stammlösung 1:10 mit HEPES-Puffer 2 (20 mM, pH 8,0) verdünnt, Lagerung: – 20,0 °C	0,1 mM dcSAM-Stammlösung 1:100 mit HEPES-Puffer 2 verdünnt,
DEPC-Wasser	0,1 % (V/V) DEPC, 1 ml DEPC zu 1'000 ml verdünnen, 2 h rühren, autoklavieren	
dNTP-Mix	2,5 mM: 0,5 mM dATP, 0,5 mM dCTP, 0,5 mM dGTP, 0,5 mM dTTP, 20 mM: 5,0 mM dATP, 5,0 mM dCTP, 5,0 mM dGTP, 5,0 mM dTTP, Lösungsmittel: DEPC-Wasser, Lagerung: – 20 °C	10 mM: 2,5 mM dATP, 2,5 mM dCTP, 2,5 mM dGTP, 2,5 mM dTTP, 40 mM: 10,0 mM dATP, 10,0 mM dCTP, 10,0 mM dGTP, 10,0 mM dTTP,

Bezeichnung	Zusammensetzung	
DTT-Lösung (125 mM)	125 mM DTT, Lagerung: - 20 °C	in DEPC-Wasser,
Enzym-Stammlösungen	teilweise vereinigte Fraktionen, die nach Proteinchromatographie erhalten wurden (600 ng/µl ≤ c ≤ 1400 ng/µl)	
Elutionspuffer IMAC	50 mM Natriumdihydrogenphosphat, 500 mM Imidazol, Lösung steril filtriert,	300 mM Natriumchlorid, pH 8,0 (HCl _{konz.}), Lagerung: 4 °C
Enzym-Lösungen (für Aktivitätsassays)	1:10 Enzym-Stammlösung 1:10 verdünnt mit HEPES-Puffer 1/2 (20 mM, pH 8,1/8,0)	1:20 Enzym-Stammlösung 1:20 verdünnt mit HEPES- Puffer 1/2 (20 mM, pH 8,1/8,0)
Ethanol für RNA, (70 % V/V)	70 % Ethanol, unvergält, Lagerung 4 °C	in DEPC-Wasser,
Ethanol (70 % V/V)	70 % Ethanol, vergält mit ca. 1 % Ethylmethylketon in DEPC-Wasser	
Ethidiumbromid-Lösung	1 mg/ml Ethidiumbromid, Lichtschutz	Lagerung: 4 °C,
Glycogen-Lösung	20 µg/µl Glycogen	Lagerung: - 20 °C
HEPES-Puffer-Stammlösung	200 mM HEPES, Lagerung 4 °C	pH 8,0 (NaOH _{konz.}),
HEPES-Puffer 1 (20 mM, pH 8,1)	HEPES-Puffer-Stammlösung 1:10 verdünnt, 2 mM DTT, 1 mM ACA, pH 8,1 (NaOH _{konz.})	
HEPES-Puffer 2 (20 mM, pH 8,0)	HEPES-Puffer-Stammlösung 1:10 verdünnt, 2 mM DTT, 1 mM ACA	
IPTG-Stammlösung	100 mM IPTG bzw. Lösung steril filtriert,	250 mM IPTG, Lagerung: - 20 °C
Kaliumphosphat-Puffer (0,5M)	0,5 M Dikaliumhydrogenphosphat, 0,5 M Kaliumdihydrogenphosphat,	pH 7,0, Lagerung 4-8 °C
Kanamycin-Stammlösung	100 mg/ml Kanamycinsulfat, Lagerung: - 20 °C	Lösung steril filtriert,
Lithiumchlorid-Lösung	4 M Lithiumchlorid, 20 mM Natriumacetat pH 5,2,	in DEPC-Wasser, autoklavieren
Lysepuffer IMAC	50 mM Natriumdihydrogenphosphat, 10 mM Imidazol, Lösung steril filtriert,	300 mM Natriumchlorid, pH 8,0 (NaOH _{konz.}), Lagerung: 4 °C
Lösungen für SDS-PAGE	Fixierlösung: 12 % Essigsäure, 50 % Methanol Entfärbelösung: 10 % Essigsäure, 25 % Ethanol (unvergält) Trocknerlösung: 6 % Glycerol, 10 % Essigsäure, 40 % Methanol	Färbelösung: 2 g Coomassie Brilliant Blau R-250, 50 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, 425 ml entionisiertes Wasser, 425 ml Ethanol (unvergält)
Mannitol-Lösung (1 m)	1 M Mannitol	
Mannitol-Magnesium- Lösung	steril herstellen: 0,6 mM Mannitol, 4 mM MES-KOH (pH 5,6)	15 mM Magnesiumchlorid,
MES-KOH (pH 5,6)	100 mM MES, pH 5,6	1 M Kaliumhydroxid,
Natriumacetat-Lösung (3 M)	3 M Natriumacetat-Trihydrat	pH 5,2

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Natriumcarbonat-Lösung, gesättigt	Natriumcarbonat, wasserfrei, in Wasser gelöst bis unlöslicher Bodensatz bildet	
Natriumchlorid-Lösung (1 M)	1 M Natriumchlorid,	Lösung filtriert
Natriumhydroxid-Lösung (0,1 M)	0,1 M Natriumhydroxid,	Lösung filtriert
Natriumhydroxid-Lösung (1 M)	1 M Natriumhydroxid	
Nickelsulfat-Lösung	100 mM Nickel-II-sulfat	
NTES-Puffer	100 mM NaCl 1 % SDS (m/V)	1 mM EDTA 10 mM TRIS-HCl, pH 7,5
PEG-CMS-Lösung	0,25 ml Calciumnitrat-Lösung (1 M) 1 g Polyethylenglycol 3350,	1 ml Mannitol-Lösung (1 M)
Perchlorsäure-Lösung (5 %)	5 % Perchlorsäure (V/V)	
PIC (Protease-Inhibitor-Cocktail, DMSO-Lösung)	Thermo Scientific	
PIC-Lysepuffer-Mischung	300 µl PIC vorsichtig mischen (DMSO-haltig)	40 ml Lysepuffer IMAC
Plasmolysepuffer	1 mM Calciumchlorid, 750 mM Mannitol	15 mM MES (pH 5,6),
Polyamin (PA)-Lösungen	wässrige Lösungen unterschiedlicher Konzentration von: Putrescin-Dihydrochlorid und -Base, Spermin-Tetrahydrochlorid,	Spermidin-Trihydrochlorid, Thermospermin-Tetrahydrochlorid
Prolin-Lösung	100 mg/ml L-Prolin,	Lagerung: – 20 °C
Protoplasteninkubationsmedium	4 mM Kaliumchlorid, 4 mM MES (pH 5,7)	0,6 M Mannitol, steril filtrieren
RLT-Puffer	1% 2-Mercaptoethanol (V/V) in RLT-Puffer (QIAGEN)	
Salzsäure (5 %)	5 % Salzsäure (V/V)	
Spermidin-Stammlösung (für Aktivitätsassays)	100 mM Spermidin in HEPES-Puffer 2 (20 mM, pH 8,0), Lagerung: – 20,0 °C	
Spermidin-Lösungen (für Aktivitätsassays)	10 mM: Spermidin-Stammlösung 1:10 mit HEPES-Puffer 2 (20 mM, pH 8,0) verdünnt, 1 mM: Spermidin-Lösung (10 mM) 1:10 mit HEPES-Puffer 2 (20 mM, pH 8,0) verdünnt, Lagerung: – 20,0 °C	10 mM: Spermidin-Stammlösung 1:100 mit HEPES-Puffer 2 (20 mM, pH 8,0) verdünnt,
Stopp-Puffer	200,0 mM EDTA (pH 8,0), 0,2 % Bromphenolblau,	50,0 % (V/V) Glycerol, Lagerung: 4 °C
Stripping-Puffer	200 mM Natriumdihydrogenphosphat, 50 mM EDTA,	500 mM Natriumchlorid, Lösung steril filtriert
Taq-Polymerase-PCR-Puffer	100 mM TRIS-HCl, 15 mM Magnesiumchlorid,	500 mM Kaliumchlorid, pH 8,0
TFB-Puffer	10 mM PIPES pH 6,7, 250 mM Kaliumchlorid, Mangan-II-chlorid nach pH-Einstellung hinzugegeben, Lösung wurde steril filtriert	15 mM Calciumchlorid, 55 mM Mangan-II-chlorid-Tetrahydrat,
W5-Lösung	steril herstellen: 125 mM Calciumchlorid, 2 mM MES-KOH (pH 5,6),	5 mM Kaliumchlorid, 154 mM Natriumchlorid

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Wasser für ÄKTA	Wasser filtriert und autoklaviert	
X-Gal-Lösung	40 mg/ml X-Gal, in N,N-Dimethylformamid	Lagerung: – 20,0 °C, Lichtschutz

Tabelle 11: verwendete Puffer- und Reagenzien

Lösungsmittel (wenn nicht anders angegeben) entionisiertes, wenn nötig autoklaviertes Wasser ($\sigma = 0,55 \mu\text{S/cm}$); Sterilfiltration wässriger Lösungen hitzeinstabiler Stoffe (z.B. Ampicillin) mit Celluloseacetatfiltern (0,22 μm Porenweite); Filtration von Puffern und Lösungen für Proteinchromatographie mit Celluloseacetatfiltern (0,45 μm Porenweite) unter laminarem Luftstrom; besondere Herstellungs- und Lagerungsbedingungen in jeweiliger Rezeptur angegeben

2.1.11. Sonstige Materialien

Bezeichnung	Hersteller
HisTrap™ HP-Säule	GE Healthcare
PD-10-Säule	GE Healthcare
LiChrospher® 100 RP-18 (5 μm)	Merck
LiChroCART® 250-4 HPLC-Catridge	Merck
FS-Supreme-5ms-CS-Säule	Chromatographie Service GmbH

Tabelle 12: Sonstige Materialien

Auflistung der für Kapitel 2 wichtigen, sonstigen, Materialien, Angaben gemäß Herstellerangaben

2.2. Biologische Methoden

2.2.1. Anzucht von Gerstenpflanzen für *(T)SPMS*-Untersuchungen

- Samen von *H. vulgare* cv. Naomie (Wintergerste, Hohertragserste) (BayWa AG München Züchtervertrieb, 2013) getrocknet, nicht sterilisiert, nicht gebeizt, entspelzt
- Samen vor Aussaat stratifiziert, auf feuchtes Filterpapier gelegt, mit Aluminiumfolie lichtgeschützt abgedeckt und 48 h bei 4 °C inkubiert (gleichzeitiges Keimen aller entwicklungsfähigen Pflanzen (Brinkell, 1994))
- jeweils fünf gekeimte Samen ca. 1,5 cm unterhalb der Oberfläche in mit Einheitserde ED 73 (ED-73) [Tabelle 13/27] bis Höhe von 7 cm gefüllte Pflanzschalen (5 × 5 × 8 cm (B × T × H)) inkubiert

Eigenschaft	Parameter	Eigenschaft	Parameter
Kultursubstrat bestehend aus	Naturton, Weißtorf	enthält Langzeitdünger	ja
pH (CaCl ₂)	5,8	Kalium (K ₂ O) (CAL)	400 mg/l
Salzgehalt (KCl)	2,5 g/l	Schwefel (S) (FM)	200 mg/l
Stickstoff (N) (CaCl ₂)	250 mg/l	Magnesium (Mg) (FM)	700 mg/l
Phosphat (P ₂ O ₅) (CAL)	300 mg/l		

Tabelle 13: Eigenschaften ED-73

Angaben gemäß Warendeclaration (Einheitserdenwerke Patzer Gebr. Patzer GmbH & Co. KG, 2011); FM – Frischmasse

- Pflanzschalen elf bis zwölf Tage bei RT in Zimmergewächshäusern in direktes Sonnenlicht gestellt, Nährbodensubstrat wurde sehr feucht gehalten (WN $\geq 75 \%$)

- nach 3-5 *das* Keimlinge, Isolation derer gesamt-RNA nach 11-12 *das* [2.3.1.1./32]
- für weitere *SPMS*-Untersuchungsexperimente Gerstenpflanzen verschiedener Kultivare, verschiedener Saatgutbetriebe verwendet [Tabelle 2/13]; Pflanzen unter oben beschriebenen bzw. erläuterten Bedingungen [2.2.2./28, 2.2.3./32] kultiviert
- zur Identifizierung vermeintlicher *HvTSPMS* im ersten Experiment ein Teil der oben genannten *H. vulgare* cv. Naomie- Pflanzen verwendet; im zweiten Experiment Pflanzen des GP- Kultivars unter den oben beschriebenen Bedingungen kultiviert

2.2.2. Anzucht von Gerstenpflanzen für Trockenstressexperimente

- TrStr-Experimente in Gewächshausklimakammern in Zusammenarbeit mit Stefan Ehnert (MLU Halle, Naturwissenschaftliche Fakultät I, Institut für Biologie, Institutsbereich Pflanzenphysiologie, Deutschland) durchgeführt
- nicht gestresste Pflanzen (Kontrollpflanzen) mit gestressten Pflanzen verglichen
- Kontrollen: 60 % WN, drei TrStr-Phasen: Phase 1 – geringer TrStr, 40 % WN; Phase 2 – moderater TrStr, 20 % WN; Phase 3 – hoher TrStr, 10 % WN, TrStr durch konsequentes Nicht-Wässern des Nährbodensubstrates induziert
- Gerstepflanzen in 7-L-Pflanztöpfen (im Folgenden als Töpfe bezeichnet) mit Reservoir für nicht im Nährboden gebundenes Wasser kultiviert
- Nährbodensubstrat: ED-73 zu ca. 15 % (V/V) mit Vermiculit (ED-73+V) gemischt, Samen vor Aussaat stratifiziert, auf feuchtes Filterpapier gelegt, mit Aluminiumfolie lichtgeschützt abgedeckt und 48 h bei 4 °C inkubiert

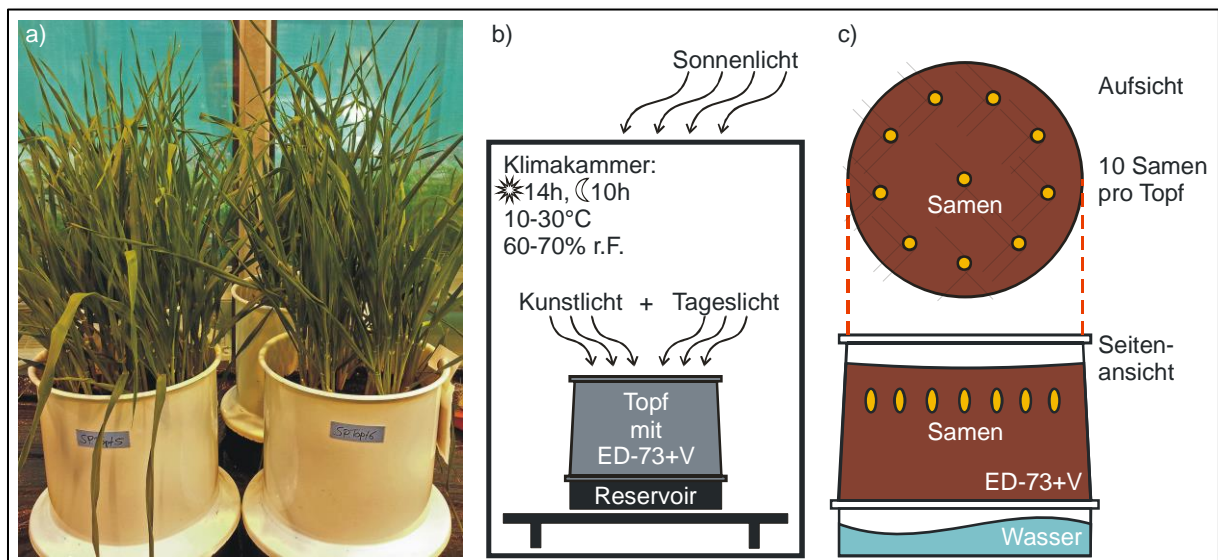


Abbildung 3: Anordnung und schematische Darstellung von Töpfen in der Klimakammer
 a) Anordnung Gruppe von vier Töpfen, Pflanzen im Alter von 30 *das*; b) schematische Darstellung Klimakammer, Topf (mit ED-73+V gefüllt) auf Tisch, Klimakammer mit abschattbarem Glasdach, Lichtquelle gedämpftes Sonnenlicht (Tageslicht) plus Kunstlicht von Lampen in Klimakammer; c) schematische Darstellung Topf mit Wasserreservoir (Aufsicht und Seitenansicht), Anordnung von zehn gekeimte Samen pro Topf

- WN wurde durch Gewicht bestimmt:
 - vor Topfbefüllung mit Nährbodensubstrat Topf-Leergewicht bestimmt (z.B. Topf 1, $m_{\text{leer}} = 1,344 \text{ kg}$)
 - 1,3 kg ED-73+V in Töpfe gefüllt, zehn gekeimte Samen auf Nährbodensubstrat gelegt
 - Samen mit 200 g Ed-73+V bedeckt [Abbildung 3c/28], Nährbodensubstrat leicht angedrückt und mit 600 ml Leitungswasser übergossen (Vorversuche: 1,5 kg frisch geöffnetes ED-73+V im Topf mit 600 ml Leitungswasser übergossen → 60 % WN)
 - Topf-Gesamtgewicht bestimmt (z.B. Topf 1, $m_{60\%} = 3,444 \text{ kg}$)
- Töpfe in Klimakammer gestellt [Abbildung 3a) und b)/28, 2.2.2.1./30 bis 2.2.2.3./30]
- Klimakammerbedingungen [Tabelle 14/29]

Bedingung	Einstellwert	Bedingung	Einstellwert
Tag-Nacht-Rhythmus	☼ 14 h; ☾ 10 h	Luftfeuchte	60-70 %
Temperatur	☼ 25-30 °C; ☾ 10-16 °C		

Tabelle 14: Bedingungen Klimakammer

☼ – Dauer bzw. Temperatur in der Tagphase, ☾ – Dauer bzw. Temperatur in der Nachtphase

- Topfgewicht zweimal täglich (7:30-8:30, 16:30- 18:30) bestimmt
- bei Unterschreitung Soll-WN der Kontrollen wurde WN durch Übergießen mit Leitungswasser mind. auf Sollwert eingestellt
- Start TrStr-Phase: Pflanzen nicht mehr gewässert, Topfgewicht zweimal täglich ermittelt, WN von Kontrollpflanzen bis Materialernte durch Wässern über mind. 60 % gehalten
- unterschritten Töpfe gestresster Pflanzen 40 %, 20 % und 10 % WN wurde oberirdischer Teil der gestressten und ihrer Kontroll-Pflanzen mit Skalpell abgeschnitten, in 50 ml-Falcon-Gefäße überführt, in $N_2 \text{ liq}$ schockgefroren und bei -80 °C gelagert
- Anschließend Bestimmung der Transkriptabundanzen der *HvSPMS*-Gene mittels qRT-PCR [2.3.5.4./38]
- Vergleich rTER-Werte [2.3.5./35] *HvSPMS*-Gene zwischen Kontrollen und gestressten Pflanzen mittels ein- und zweiseitiger, gepaarter Anova-Analysen (Holm-Sidak-Methode, Signifikanz bei $p \leq 0,05$), war Anova-Analyse nicht durchführbar (Test Normalverteilung oder Test gleich verteilter Varianzen Werte fehlgeschlagen) → Vergleich rTER-Werte mittels ungepaartem t-Test (Signifikanz bei $p \leq 0,05$)
- Verhältnisse rTER-Werte *HvSPMS*-Gene Kontrollen und gestresste Pflanzen innerhalb Stadium berechnet: verschiedene Stadien → Quotienten gleicher Stressgruppen berechnet (z.B. rTER-Wert Kontrollen (A) bezogen auf (B)), Quotienten verschiedener Stressgruppen (z.B. rTER-Wert 10 % WN (A) bezogen auf 20 % WN (C)) nicht berechnet
- Pflanzen-PA-Gehalte TrStr-Experimente 2013 und 2014 mittels HPLC [2.5.5./60] bestimmt, Vergleich Kontrollen und gestresste Pflanzen mittels ungepaartem t-Test (Signifikanz bei $p \leq 0,05$)

2.2.2.1. Trockenstressexperiment 2012

- Kultivationszeitraum: 25.06.-07.10.2012; verwendete Pflanzenstadien: A-D
- pro Stadium jeweils vier Töpfe mit je zehn gekeimten Samen angesetzt
- für Probennahme von Kontroll- und gestressten Pflanzen (drei TrStr-Phasen) jeweils ein Topf verwendet [Abbildung 4/30], alle biologischen Replikate (zehn Pflanzen) geerntet
- Kontrollen am Experimentende genommen

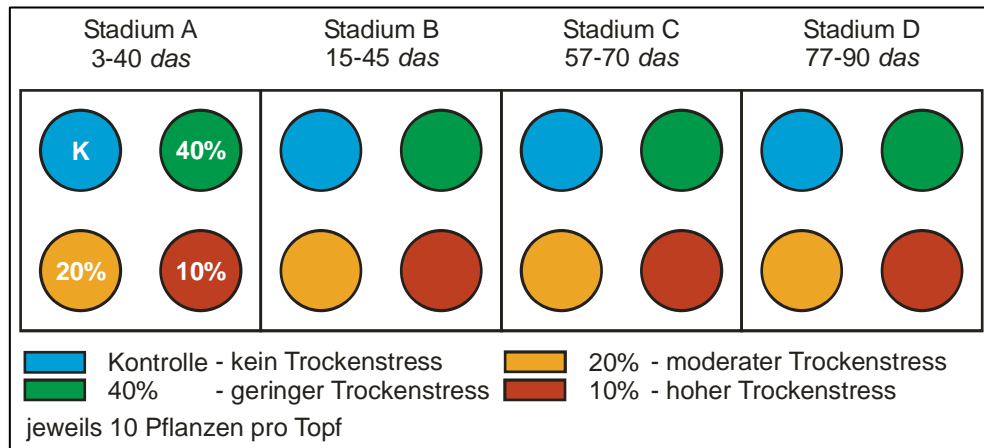


Abbildung 4: Schematische Darstellung Trockenstressexperiment 2012

alle Pflanzen der Stadien A bis D gleichzeitig, unter denselben Klimakammerbedingungen in selber Klimakammer kultiviert; pro Stadium jeweils vier Töpfe zu je zehn Pflanzen verwendet; K – Topf Kontrolle (blau), 40 % bis 10 % – Töpfe gestresste Pflanzen; grün, gelb bzw. rot – 40 %, 20 % bzw. 10 % WN

2.2.2.2. Trockenstressexperiment 2013

- Kultivationszeitraum: 18.04.-19.07.2013; verwendete Pflanzenstadien: A-D; zwei parallel angesetzte Gruppen (I und II)
- Gruppe I - Bestimmung Pflanzen-PA-Gehalt [2.5.5./60], Gruppe II - Bestimmung Regulation der Transkriptabundanzen der *HvSPMS*-Gene der Pflanzen [2.3.5.4./38]
- beide Gruppen zur selben Zeit, in selber Klimakammer kultiviert und gestresst
- pro Stadium Kontrollpflanzen und gestresste Pflanzen (drei TrStr-Phasen) angesetzt
- gestressten Pflanzen der drei TrStr-Phasen jeweils gleiche Anzahl Kontrollpflanzen zugeordnet [Abbildung 5/31]
- gleicher Erntezeitpunkt von Kontrollen und gestressten Pflanzen, pro Stressphase mindestens vier biologische Replikate von Kontroll- bzw. gestressten Pflanzen geerntet

2.2.2.3. Trockenstressexperiment 2014

- Kultivationszeitraum: 26.03.-01.06.2014; verwendete Pflanzenstadien: A und C; Kultivare: GP, TA, XA; zwei parallel angesetzte Gruppen [vgl. 2.2.2.2./30], TA, XA hatten höhere TrStr-Toleranz als GP
- beide Gruppen zur selben Zeit, in selber Klimakammer kultiviert und gestresst
- pro Stadium Kontrollpflanzen und gestresste Pflanzen (drei TrStr-Phasen) angesetzt

- gestressten Pflanzen der drei TrStr-Phasen jeweils gleiche Anzahl Kontrollpflanzen zugeordnet [Abbildung 6/31]
- gleicher Erntezeitpunkt von Kontrollen und gestressten Pflanzen, pro Stressphase mindestens vier biologische Replikate von Kontroll- bzw. gestressten Pflanzen geerntet

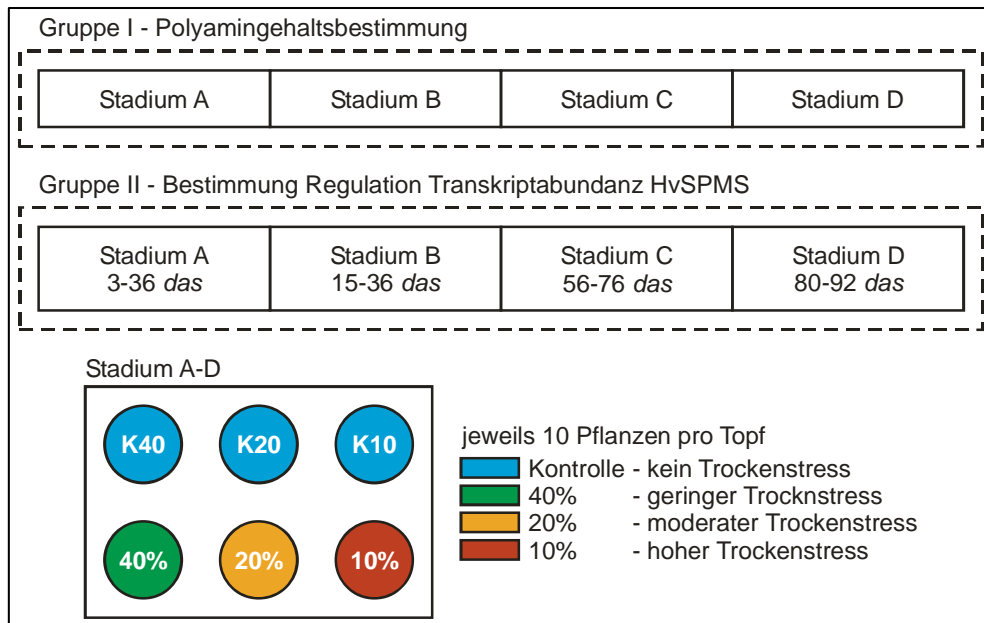


Abbildung 5: Schematische Darstellung Trockenstressexperiment 2013

alle Pflanzen der Stadien A bis D in zwei Gruppen gleichzeitig, parallel, unter denselben Klimakammerbedingungen, in selber Klimakammer kultiviert; pro Stadium jeweils sechs Töpfe zu je zehn Pflanzen verwendet; K – Topf Kontrolle (blau), 40 % bis 10 % – Töpfe gestresste Pflanzen; grün, gelb bzw. rot – 40 %, 20 % bzw. 10 % WN

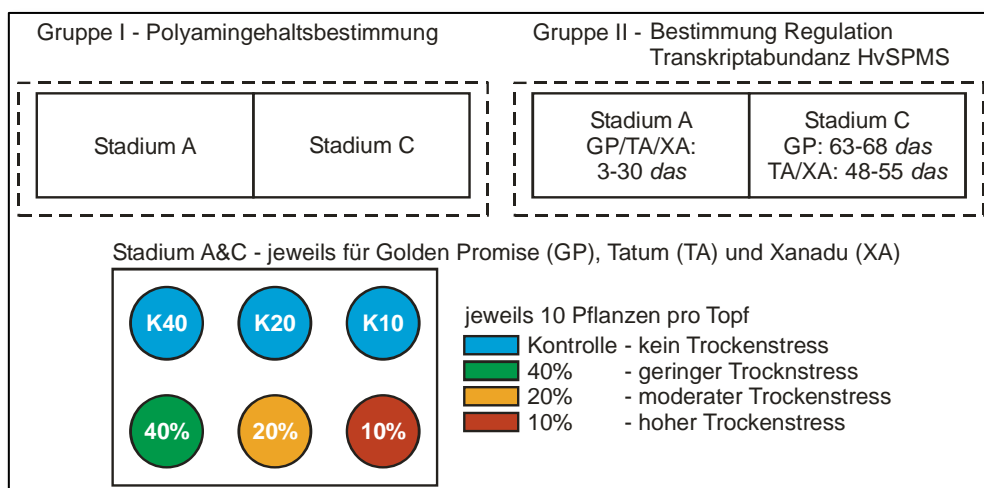


Abbildung 6: Schematische Darstellung Trockenstressexperiment 2014

Pflanzen der Gerstenkultivare GP, TA und XA kultiviert; alle Pflanzen der Stadien A und C in zwei Gruppen gleichzeitig, parallel, unter denselben Klimakammerbedingungen, in selber Klimakammer kultiviert; pro Stadium jeweils sechs Töpfe zu je zehn Pflanzen verwendet; K – Topf Kontrolle (blau), 40 % bis 10 % – Töpfe gestresste Pflanzen; grün, gelb bzw. rot – 40 %, 20 % bzw. 10 % WN

2.2.3. Anzucht von Gerstenpflanzen für transiente Transformation von Protoplasten

- getrocknete, nicht sterilisierte, nicht gebeizte, entspelzte, für 48 h bei 4 °C stratifizierte Samen von *H. vulgare* cv. Golden Promise verwendet
- jeweils drei gekeimte Samen in mit ED-73 gefüllte Pflanzschalen (8 × 8 × 15 cm (B × T × H)) inkubiert, Pflanzschalen 14 cm mit ED-73 gefüllt, Samen 1,5 cm unterhalb Oberfläche.
- Pflanzschalen in Zimmergewächshausbodenschalen für sieben Tage in die Klimakammer (Arbeitsgruppe Peiter) bei RT gestellt, dabei Nährbodensubstrat in regelmäßiger Kontrolle feucht gehalten (WN ≥ 50 %)
- Keimlinge nach 3 *das* beobachtet, nach 7 *das* Protoplastenisolation aus Blättern von 14 Keimpflanzen isoliert [2.3.14.4./51]

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. Isolation von gesamt-RNA aus *Hordeum vulgare*-Pflanzen

- gesamt-RNA-Isolation aus Gerstepflanzen für SPMS-Suche und deren Charakterisierung mittels modifizierter Phenol-Chloroform-(3-Tages)-Methode (Reinbothe, et al., 1992)
- für Untersuchung der Regulation der Transkriptmengen der *HvSPMS*-Gene in den TrStr-Experimenten, für zweites Experiment zur Suche nach vermeintlichen *HvTSPMS* und für Untersuchung der *HvSPMS*-Gen-Promotoren gesamt-RNA-Isolation aus Gerstenpflanzen und deren Sprossachsen mittels modifizierter QIAGEN[®] RNeasy[®] Plant Mini Kit-Methode
- gesamt-RNA-Konzentrationsbestimmung nach Isolation [2.5.1./57], anschließende Lagerung bei -80 °C in RNase-freien Reaktionsgefäßen

2.3.1.1. Methode nach Reinbothe (Phenol-Chloroform-, 3-Tages-Methode)

- in mit Salzsäure (5 %) und Ethanol (unvergällt) gereinigten, sterilisierten Mörser 3 g FM 11-12 *das*-alte Gerstenkeimlingslaubblätter [2.2.1.27] mit N_{2 liq} feinpulverig gemörsert
- Zugabe von 6 ml NTES-Puffer, 3 ml Chloroform und 3 ml Phenol-Unterphase; Mischung 5 min mit Vortex-Mischer homogenisiert
- Mörser mit Mischung aus 4 ml NTES-Puffer, 2 ml Chloroform und 2 ml Phenol-Unterphase gespült; Spülsuspension mit Homogenisat vereinigt, erneut 5 min mit Vortex-Mischer gemischt und danach 10 min bei 5'000 min⁻¹ zentrifugiert
- wässrige Oberphase abgenommen, erneut mit gleichem Vol-Teil Phenol-Unterphase/Chloroform 5 min mit Vortex-Mischer gemischt und zentrifugiert; Wiederholung bis in Grenzschicht zwischen wässriger und organischer Phase keine Proteine mehr ausfielen
- Nukleinsäuren (u.a. DNA, mRNA, rRNA) in wässriger Oberphase (ca. 10 ml) mit 1 ml Natriumacetat-Lösung (3 M) und 25 ml Ethanol (unvergällt) über Nacht bei -20 °C gefällt
- Mischung am Folgetag 30 min bei 4 °C bei 5'000 min⁻¹ zentrifugiert

- gefällte Nukleinsäuren mit 3 ml Ethanol (für RNA, 70 %) gewaschen, an Luft getrocknet und in 5 ml DEPC-Wasser bei 4 °C gelöst; über Nacht m- und rRNA durch Zusatz von 5 ml Lithiumchlorid-Lösung (4 M) bei 4 °C gefällt
- Mischung am Folgetag 30 min bei 4 °C bei 5'000 min⁻¹ zentrifugiert; gefällte Ribonukleinsäuren mit 3 ml Ethanol (für RNA, 70 %) gewaschen, an Luft getrocknet und in 50 – 150 µl DEPC-Wasser bei 4 °C gelöst

2.3.1.2. Methode nach QIAGEN[®] RNeasy[®] Plant Mini Kit, modifiziert

- in mit Salzsäure (5 %) und Ethanol (unvergällt) gereinigten, sterilisierten Mörser 100 mg gefrorenes Blattmaterial in N₂ liq und Spatelspitze Quarz/Seesand zu feinkristallinem, mehligen Pulver gemörsert; Zugabe 450 µl 56 °C-warmer RLT-Puffer
- Mischung mit Vortex-Mischer 30 s gemischt und auf QIAshredder spin-Säulen gegeben und bei 13'000 min⁻¹ zentrifugiert
- Fortsetzung des QIAGEN[®] RNeasy[®] Plant Mini Kit-Protokolls bis Schritt 6 (nach Angaben des Herstellers (QIAGEN, 2010)); anstelle von Schritt 7 Auf-Säule-DNA-Verdau mit QIAGEN RNase-Free DNase Kit durchgeführt; Fortsetzung Schritte 8 – 10
- in Schritten 11 und 12 Elution mit 30 µl RNase-freiem Wasser → 60 µl RNA-Präparation erhalten
- keine zweite Verwendung des Eluates aus Schritt 11, in Vorversuchen waren RNA-Ausbeute und -Gesamtkonzentration für sich anschließende Experimente zu gering

2.3.2. Fällung und Aufkonzentrierung von Ribonukleinsäuren

- RNA-Konzentration nach Isolation [2.3.1.2./33] 20-100 ng/µl → Fällung und Konzentrierung bei 4 °C in sterilisierten oder RNase-freien Reaktionsgefäßen
- zu 60 µl RNA-Präparation 0,6 µl Glycogen-Lösung und 6 µl Natriumacetat-Lösung (3 M) gegeben; kräftiges Mischen (Ziehen der Reaktionsgefäße über Kavitäten des Reaktionsgefäßständers); 3 min Zentrifugation bei 4 °C bei 13'500 min⁻¹
- Zugabe von 150 µl Ethanol (für RNA, 70 % V/V); kräftiges Mischen; 3 min Zentrifugation bei 4 °C bei 13'500 min⁻¹
- Inkubation der Reaktionsgefäße über Nacht bei – 80 °C oder für 90 min bei RT
- 30 min Zentrifugation bei 4 °C bei 13'500 min⁻¹; Überstand verworfen
- Zugabe von 500 µl -20 °C-kaltem Ethanol (für RNA, 70 % V/V) auf Pellet; kräftiges Mischen; 10 min Zentrifugation bei 4 °C bei 13'500 min⁻¹; Überstand verworfen;
- Pellet an Raumluft bei 4 °C getrocknet, dann in 10 – 20 µl RNase-freiem oder DEPC-Wasser gelöst; Konzentrationsbestimmung [2.5.1./57].

2.3.3. Reverse Transkription

- Matrize zur cDNA-Synthese: isolierte gesamt-RNA [2.3.1./32f]; Verwendung:
- SuperScript II reverse Transkriptase (Invitrogen, life Technologies, 2010) → Suche nach vermutlichen *HvSPMS*-Genen und deren Charakterisierung

- TrStr-Experimente (qRT-PCR) → RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, 2012), Omniscript® RT Kit (QIAGEN, 2010)
- nach cDNA-Synthese Konzentrationsbestimmung der Präparationen [2.5.1./57]
- qRT-PCR-cDNA-Synthese-Ansätze mittels *Taq*-PCR [2.3.5.7/42] und *HvActin*-Primern (Primersatz Nr. 5 [Tabelle 5/16], Annealing bei 62 °C) überprüft → Bande auf Agarosegelen bei ca. 200 Basenpaaren (bp) → für qRT-PCR verwendet

2.3.3.1. Reverse Transkription mit SuperScript™ II, Invitrogen

- SuperScript™ II Reverse Transkriptase Kit (Invitrogen), Thermocycler T3 (Biometra)

Komponente	Vol / Menge, Endkonzentration	Bemerkung
Gesamt-RNA	5,0 µg	
Oligo-dT ₍₁₂₋₁₈₎ -Primer	1,0 µl, 0,5 µM	
dNTP-Mix (2,5 mM)	5,0 µl, 2,5 mM	0,5 mM je Nukleotid
DEPC-Wasser o. RNase-freies Wasser	ad 19,0 µl	
Mischung 5 min bei 70 °C (Primeranlagerung), dann 2 min bei 4 °C inkubiert, dann vorsichtig mit Pipette gemischt, dann kurz zentrifugiert		
5-fach Erststrang-Puffer	5,0 µl, 1-fach	
DTT-Lösung (125 mM)	2,0 µl, 10,0 mM	
Mischung 2 min bei 42 °C inkubiert		
SuperScript™ Reverse Transkriptase	1,0 µl, 200 U	
Gesamt-Vol: 25,0 µl		
Mischung mit Pipette vorsichtig gemischt, dann zentrifugiert		
cDNA-Synthese (reverse Transkription)	50 min bei 42 °C	
Inaktivierung	15 min bei 70 °C	Lagerung: – 20 C

Tabelle 15: cDNA-Synthese-Protokoll SuperScript™ II Reverse Transkriptase, Invitrogen
Protokoll nach Anleitung des Herstellers (Invitrogen, life Technologies, 2010)

2.3.3.2. RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit Thermo Scientific

- RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific), Thermocycler T3 (Biometra) oder Inkubatorschüttler Certomat IS bzw. GFL 3032

Komponente	Vol / Menge, Endkonzentration	Bemerkung
Gesamt-RNA	750 ng	
Oligo-dT ₍₁₂₋₁₈₎ -Primer	0,5 µl, 0,1 µM	
Nuklease-freies Wasser	ad 12,5 µl	
Mischung 5 min bei 65 °C (Primeranlagerung), dann 2 min bei 4 °C inkubiert, dann vorsichtig mit Pipette gemischt, dann kurz zentrifugiert		
5-fach Erststrang-Puffer	4,0 µl, 1-fach	
RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific)	0,5 µl, 20 U	
dNTP-Mix (10 mM)	2,0 µl, 10,0 mM	2,5 mM je Nukleotid
RevertAid H Minus Reverse Transkriptase	1,0 µl, 200 U	
Gesamt-Vol: 20,0 µl		
Mischung wurde mit der Pipette vorsichtig gemischt, dann zentrifugiert		

-Fortsetzung auf folgender Seite-

Komponente	Vol / Menge, Endkonzentration	Bemerkung
cDNA-Synthese (reverse Transkription)	60 min bei 42 °C	
Inaktivierung	5 min bei 70 °C	Lagerung: – 20 C

Tabelle 16: cDNA-Synthese-Protokoll RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific
Protokoll nach Angaben des Herstellers (Thermo Scientific, 2012)

2.3.3.3. Omniscript® RT Kit von QIAGEN

- Omniscript® RT Kit (QIAGEN), Inkubatorschüttler GFL 3032

Komponente	Vol / Menge, Endkonzentration	Bemerkung
10-fach Erststrang-Puffer	2,0 µl, 1-fach	
Oligo-dT ₍₁₂₋₁₈₎ -Primer	2,0 µl, 1,0 µM	
dNTP-Mix (10 mM)	2,0 µl, 20,0 mM	5,0 mM je Nukleotid
Nuklease-freies Wasser	ad 8,0 µl	
Mischung wurde mit der Pipette gemischt, dann kurz zentrifugiert		
RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific)	1,0 µl, 10 U	
Omniscript® Reverse Transkriptase	1,0 µl, 4 U	
Mischung wurde mit der Pipette vorsichtig gemischt, dann zentrifugiert		
gesamt-RNA	750 ng	
Gesamt-Vol: 20,0 µl		
Mischung mit Pipette vorsichtig gemischt, dann zentrifugiert		
cDNA-Synthese (reverse Transkription)	60 min bei 42 °C	
Inaktivierung	5 min bei 70 °C	Lagerung: – 20 C

Tabelle 17: cDNA-Synthese-Protokoll Omniscript® RT Kit, QIAGEN
Protokoll nach Angaben des Herstellers (QIAGEN, 2010)

- cDNA-Synthese zweite Amplifizierung von vermutlichen *HvTSPMS*-cDNA-Fragmenten: anstelle Oligo-dT-Primer wurde *HvTSPMS_rev_OligoT₁₅*-Primer verwendet

2.3.4. Agarose-Gel-Elektrophorese

- Isolierte RNA- und DNA-Fragmente elektrophoretisch getrennt, 0,7 – 2,0 %-ige (m/m) Agarose- 1-fach TAE- bzw. 1-fach Natriumborat-Puffer-Gele, 100 ml Puffer enthielten 10 µl Ethidiumbromid-Lösung; Gele ohne Ethidiumbromid nach Entwicklung im Ethidiumbromid-Bad (5 mg/ml in 1-fach TAE- bzw. 1-fach Natriumborat-Puffer) gefärbt
- Beladung Gel: 300-1'000 ng Nukleinsäure plus jeweils 1-2 µl Stopp-Puffer; Gel in Elektrophoresekammer (1-fach TAE- bzw. 1-fach Natriumborat-Puffer)
- horizontale Entwicklung bei 70 – 130 V, anschließend Foto unter UV-Licht ($\lambda = 312 \text{ nm}$)
- Abschätzung Molekulargewicht anhand DNA-Leiter (Quantitas DNA Marker (Biozym Scientific GmbH, 2012), 2log DNA Ladder (New Engand Biolabs, 2016) bzw. GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas, 2006; Thermo Scientific, 2012))

2.3.5. Polymerase-Kettenreaktionen (PCRs)

- Oligonukleotid-Primer: Tabelle 5/16, Thermocycler: T3 Thermocycler, T Gradient

Thermoblock, Mastercycler gradient, S1000 Thermal Cycler, C1000 Thermal Cycler mit CFX98 Real-Time-System

- anschließend entweder Agarose-Gel-Elektrophorese-Trennung [2.3.4./35] oder Lagerung bei $-20,0\text{ }^{\circ}\text{C}$; nach elektrophoretischer Trennung der PCR-Proben: Extraktion [2.3.6./43]

2.3.5.1. MangoMixTM-PCR

- gewöhnliche PCR-Anwendungen, Kolonie-PCR, touch-down (td)- und Gradienten (Grad)-PCR nach Herstellerprotokoll (Bioline GmbH, 2012)
- Kolonie-PCR: 5-60 Bakterienkolonien von Agarplatte(n) gewählt (teilweise unterstützt durch Blau-Weiß-Selektion), Suspension jeweils in 10-20 μl sterilem Wasser

Komponente	Vol / Endkonzentration		
	gewöhnliche PCR		Kolonie-PCR
Template	0,8-2,0 μl		1,0-4,0 μl
MangoMix TM	10,0 μl		10,0 μl
Vorwärtsprimer [100 μM]	0,8 μM		0,8 μl
Rückwärtsprimer [100 μM]	0,8 μM		0,8 μl
DEPC-Wasser	ad 20,0 μl		ad 20,0 μl
PCR-Programm	T in $^{\circ}\text{C}$	t in s	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	120	
zyklische Denaturierung	95	15-30	
Primeranlagerung	$T_m-5\text{ }^{\circ}\text{C}$	30-60	35 x
zyklische Elongation	72	45-60 ^a , bis 300 ^b	

Tabelle 18: MangoMixTM-PCR – gewöhnliche PCR und Kolonie-PCR

zyklische Denaturierung, Primeranlagerung und zyklische Elongation 35-mal wiederholt, Primeranlagerung $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ unterhalb Primer- T_m [Tabelle 5/16], a – zyklische Elongation 15-30 s pro erwarteten tausend (Kilo) Basenpaaren (Kbp)-Transkriptlänge, b – bis 300 s v.a. bei Genome Walking; Protokoll nach Angaben des Herstellers (Bioline GmbH, 2012)

Komponente	Vol / Endkonzentration				
	touch-down-PCR		Gradienten-PCR		
Template	2 μl		0,8 μl		
MangoMix TM	25 μl		10,0 μl		
Vorwärtsprimer [100 μM]	0,4 μM		0,8 μl		
Rückwärtsprimer [100 μM]	2,0 μM		2,4 μl		
DEPC-Wasser	ad 50 μl		ad 20,0 μl		
PCR-Programm	T in $^{\circ}\text{C}$		t in s	Zyklen	
	td	Grad	td und Grad	td	Grad
Initiale Denaturierung	95		120		
zyklische Denaturierung	95		30		
Primeranlagerung	75 \rightarrow 65, 69 \rightarrow 59, 65 \rightarrow 55 8 Reihen	70 \rightarrow 50 8 Reihen	30	20 x – 0,5 C, 15 x	35 x
zyklische Elongation	72		30 ^a		

Tabelle 19: MangoMixTM-PCR – touch-down-PCR und Gradienten-PCR

td - touch-down-PCR; Grad - Gradienten-PCR; je ein Ansatz pro Primerpaar, a – zyklische Elongation 15-30 s pro erwarteten Kbp-Transkriptlänge

- touch-down-PCR: erste 20 Zyklen Primeranlagerung von 69 °C auf 59 °C fallend, pro Zyklus – 0,5 °C, letzten 15 Zyklen bei 59 °C
- Gradienten-PCR: Temperaturgradient über acht Cycler-Reihen: A – 70,0 °C, B – 68,8 °C, C – 66,6 °C, D – 62,6 °C, E – 57,8 °C, F – 53,9 °C, G – 51,3 °C, H – 50,0 °C

2.3.5.2. MyFi™ -Taq-PCR

- nach Genome Walking [2.3.14.2./48] auf Genome-Walking-Plasmide angewendet → für Sequenzierung möglichst fehlerfrei und vollständig klonieren (MyFi™-Taq-DNA-Polymerase hat bis 3,5-fach höhere Genauigkeit gegenüber nativer Taq-Polymerase (Bioline GmbH, 2012))
- gewöhnliche und touch-down (td)-PCRs

Komponente	Vol / Endkonzentration gewöhnliche- und touch-down-PCR					
	Template	1,0 µl				
MyFi™ -5 x-Puffer	5,0 µl					
Vorwärtsprimer [20 µM]	0,4 µM					
Rückwärtsprimer [20 µM]	0,4 µM					
MyFi™ -DNA-Polymerase	1,0 µl / 0,5 U					
DEPC-Wasser	ad 25,0 µl					
PCR-Programm	T in °C		t in s		Zyklen	
	PCR	td-PCR	PCR	td-PCR	PCR	td-PCR
Initiale Denaturierung	95		60			
zyklische Denaturierung	95		15		nach je4 x	
Primeranlagerung	T_m-5 °C	60→55	30		35 x	– 1,0 C,
zyklische Elongation	72		135 ^a	30 ^b		gesamt: 35 x

Tabelle 20: MyFi™-PCR – gewöhnliche- und touch-down-PCR

gewöhnliche PCR: zyklische Denaturierung, Primeranlagerung und zyklische Elongation in 35-mal wiederholt, Primeranlagerung 5 °C unterhalb Primer- T_m [Tabelle 5/16], a – zyklische Elongation 45 s pro erwarteten Kbp-Transkriptlänge; touch-down-PCR: Primeranlagerung von 60 °C auf 55 °C fallend nach jeweils vier Zyklen – 1,0 °C, b – zyklische Elongation 30 s abweichend von Protokoll; Protokoll nach Angaben des Herstellers (Bioline GmbH, 2012)

2.3.5.3. Pfu-PCR

- Vollängen-cDNA-Sequenz- Amplifikation verschiedener *Hordeum vulgare*-Kultivare
- cDNA-Fragmente-Isolation und Amplifikation (Fermentas, 2009) aus Gerste-RNA [2.3.1./32]

Komponente	Vol, bzw. Endkonzentration
cDNA	2,0 µl
dNTP-Mix [10 mM]	0,25 µM pro Nukleotid
Vorwärtsprimer [100 µM]	1,0 µM
Rückwärtsprimer [100 µM]	1,0 µM
10-fach Pfu-Polymerase-Puffer	5,0 µl
Pfu-Polymerase mit Magnesiumsulfat	1,0 µl / 2,0 U
DEPC-Wasser	ad 50,0 µl

-Fortsetzung auf folgender Seite-

PCR-Programm	T in °C	t in s	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	120	
zyklische Denaturierung	95	30	
Primeranlagerung	$T_m - 5$ °C	30	35 x
zyklische Elongation	72	180 ^a	
finale Elongation	72	300	

Tabelle 21: *Pfu*-PCR

zyklische Denaturierung, Primeranlagerung und zyklische Elongation 35-mal wiederholt, Primeranlagerung 5 °C unterhalb Primer- T_m [Tabelle 5/16], a – zyklische Elongation 120 s pro erwarteten Kbp-Transkriptlänge; Protokoll nach Angaben des Herstellers (Fermentas, 2009)

- PCR-Ansätze anschließend mit 1 U *Taq*-DNA-Polymerase 15 min bei 72 °C inkubiert (3' Adenosin-Überhang-Synthese an die PCR-Amplifikate, für TA-Klonierung)
- verwendete Primersätze: 2, 4 und 6 [Tabelle 5/16]

2.3.5.4. qRT-PCR

- Maxima SYBR Green qPCR MasterMix-Kit (Thermo Scientific, 2011)
- fertiger MasterMix ohne ROX-Lösung verwendet; Maxima-heiß-Start-*Taq*-DNA Polymerase chemisch modifiziert → bei RT inaktiv, keine unspezifische Primeranlagerungen; fluoreszierender SYBR-Green-Farbstoff interkaliert in 200-300 bp-lange Doppel-Strang-DNA-PCR-Fragmente → Menge in UV-Licht quantifiziert
- Primer-Satz Nr. 5 [Tabelle 5/16] verwendet; in Vorversuchen spezifische Primer-Gen-Bindung sichergestellt: qRT-PCR-Signale in Ansätzen mit *HvSPMS*-cDNA-Sequenzen im pGEM-T-Easy-Vektor-Plasmid und entsprechenden Primern beobachtet (*HvSPMS1*-Plasmid mit *HvSPMS1*-Primer, *HvSPMS2* analog); in entgegengesetzten Ansätzen (*HvSPMS1*-Plasmid mit *HvSPMS2*-Primer und umgekehrt) keine Signale beobachtet

Komponente	Vol, bzw. Endkonzentration		
cDNA-Verdünnung	5,0 µl		
SYBR-Green-MasterMix	10,0 µl		
Vorwärtsprimer [100 µM]	0,5 µM		
Rückwärtsprimer [100 µM]	0,5 µM		
DEPC-Wasser	ad 20,0 µl		
PCR-Programm	T in °C	t in s	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	600	
zyklische Denaturierung	95	15	
Primeranlagerung	60	15	40 x
zyklische Elongation und UV-Messung	72	30	
Denaturierung	95	10	
Bestimmung Schmelzkurve und UV-Messung	65→95	5	+0,5 °C/5 S
finale Denaturierung	95	5	

Tabelle 22: qRT-PCR

zyklische Denaturierung, Primeranlagerung und zyklische Elongation mit UV-Messung 40-mal wiederholt, danach Schmelzkurven der PCR-Ansätze bestimmt; Protokoll nach Angaben des Herstellers (Thermo Scientific, 2011)

- qRT-PCR-Ansätze in 96-Well-Platten pipettiert; pro Platte PCR-Ansätze der Pflanzen-cDNA-Präparationen, drei Blindansätze, eine Verdünnungsreihe des Pflanzen-cDNA-Pools (Standardkurve) aufgetragen und vermessen
- für Standardkurven-cDNA-Pool Anteile jeder Pflanzen-cDNA-Präparation verwendet: dreifach aufkonzentrierte, unverdünnte und zu 1/3, 1/9 und 1/27 verdünnte Aliquote des Pflanzen-cDNA-Pools
- Herstellung dreifach aufkonzentriertes Aliquot: alle Pflanzen-cDNA-Präparationen und alle Standardkurven-Aliquote vor Mischen mit PCR-MasterMix 1:5 verdünnt; Ausnahme dreifach aufkonzentrierten Aliquot: dieses 3:5 verdünnt

2.3.5.5. RACE-PCR

- *HvSPMS2*-cDNA-Sequenzierung: nacheinander 3' und 5'RACE-PCR-Kit (Invitrogen, 2004) verwendet
- 3'RACE-PCR (RP): gesamt-RNA-Isolation mit Reinbothe-Methode [2.3.1.1./32]
- Reverse Transkription mit SuperScript™ II [2.3.3.1./34] und AP (Adapter Primer) (anstelle Oligo-dT-Primer) → poly-T-markierte Erststrang-cDNA; danach Abbau für 20 min bei 37 °C des RNA-Template-Stranges durch Zugabe von 1 µl RNase H
- erste genspezifische PCR mit Aliquot initialer Reverser Transkription, *Taq*-DNA-Polymerase, 3'RP_GSP1 (genspezifischer Primer 1) [Tabelle 5/16], AUAP (Abridged Universal Amplification Primer); zweite genspezifische PCR mit Aliquot erster PCR, *Taq*-DNA-Polymerase, 3'RP_GSP2 [Tabelle 5/16], AUAP

Komponente	Vol / Endkonzentration		
cDNA	2,5 µl von initialer Reverser Transkription / 2,5 µl von erster genspezifischer PCR		
10-fach <i>Taq</i> -Polymerase-Puffer + MgCl ₂	5,0 µl		
dNTP-Mix [2,5 mM]	4,0 µl		
3'RP_GSP1 [100 µM] / 3'RP_GSP2 [100 µM]	0,4 µM		
AUAP [100 µM]	0,4 µM		
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	2,0 U		
DEPC-Wasser	ad 50,0 µl		
PCR-Programm	<i>T</i> in °C	<i>t</i> in s	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	180	
zyklische Denaturierung	95	60	
Primeranlagerung	57	60	35 x
zyklische Elongation	72	90	
finale Elongation	72	300	

Tabelle 23: 3'RACE-PCR 1 und 2

zyklische Denaturierung, Primeranlagerung und zyklische Elongation 35-mal wiederholt; erste genspezifische PCR mit 2,5 µl initialer Reverse-Transkriptase-Reaktion und 3'RP_GSP1, zweite genspezifische PCR mit 2,5 µl erster genspezifischer PCR und 3'RP_GSP2 durchgeführt; Protokoll nach Angaben des Herstellers (Invitrogen, 2004)

- Agarose-Gelelektrophorese mit 20 µl beider PCRs
- 5'RACE-PCR: selbes gesamt-RNA-Ausgangsmaterial wie bei 3'RACE-PCR
- Reverse Transkription mit SuperScript™ II [2.3.3.1./34], 5'RP_GSP1 (anstelle Oligo-dT-Primer) → Erststrang-cDNA
- Abbau für 30 min bei 37 °C des RNA-Template-Stranges durch Zugabe von 1 µl RNase H; S.N.A.P.™-Säulen-Aufreinigung (Invitrogen, 2004) mit QIAquick® PCR-Purification Kit (nach Angaben des Herstellers (QIAGEN, 2015)) und TdT (terminale Desoxyribonukleosyltransferase) Tailing (Cytidin-Elongation der cDNA)

Komponente	Vol / Endkonzentration	
DEPC-Wasser	5,0 µl	
5-fach Tailing Puffer	4,0 µl	
dCTP-in DEPC-Wasser [2,5 mM]	1,0 µl	
S.N.A.P.™-Säulen Mix	8,5 µM	
Mischung für 2,5 min bei 94 °C und anschließend für 1 min bei 4 °C inkubiert		
TdT (terminale Desoxyribonukleosyltransferase)	30,0 U	
Gesamt-Vol: 20 µl		
Reaktionsschritt	T in °C	t in s
TdT Tailing	37	900
Inaktivierung	70	600

Tabelle 24: Protokoll TdT Tailing

TdT Tailing nach Protokoll der Firma Invitrogen (Invitrogen, 2004) durchgeführt

- erste genspezifische PCR mit *Taq*-DNA-Polymerase, 5'RP_GSP2- [Tabelle 5/16], Abridged Anchor-Primer (Invitrogen); zweite genspezifische PCR mit *Taq*-DNA-Polymerase, 5'RP_GSP3 [Tabelle 5/16], AUAP

Komponente	Vol, bzw. Endkonzentration		
cDNA-Template	2,0 µl von dC-verlängerter cDNA / 2,0 µl von erster genspezifischer PCR		
10-fach <i>Taq</i> -Polymerase-Puffer + MgCl ₂	5,0 µl		
dNTP-Mix [2,5 mM]	4,0 µl		
5'RP_GSP2 [100 µM] / 5'RP_GSP3 [100 µM]	0,4 µM		
Abridged Anchor [100 µM] Primer/ AUAP [100 µM]	0,4 µM		
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	2,0 U		
DEPC-Wasser	ad 50,0 µl		
PCR-Programm	T in °C	t in s	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	240	
zyklische Denaturierung	95	60	
Primeranlagerung	57	60	35 x
zyklische Elongation	72	90	
finale Elongation	72	300	

Tabelle 25: 5'RACE-PCR 1 und 2

zyklische Denaturierung, Primeranlagerung und zyklische Elongation 35-mal wiederholt; erste genspezifische PCR mit 2,0 µl TdT Tailing Reaktion und 5'RP_GSP2 und Abridged Anchor-Primer, zweite genspezifische PCR mit 2,0 µl erster genspezifischer PCR und 5'RP_GSP3 und AUAP durchgeführt; Protokoll nach Angaben des Herstellers (Invitrogen, 2004)

- Agarose-Gel-Elektrophorese mit 20 µl beider PCRs
- Wiederholungsexperimente: Clontech SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, 2009), Ausgangsmaterial: oben genannte RNA

2.3.5.6. Ranger-PCR

- Amplifikation langer genomischer DNA-Matrizen von 10 kb oder mehr (Genome Walking) mit sehr hoher Sensitivität möglich (Bioline GmbH, 2014); Amplifikation *HvSPMS*-upstream-gDNA-Bereiche mit Clontech GenomeWalker Universal Kit und Bioline Ranger-PCR Kit
- genspezifische touch-down PCRs für PCR 1 mit AP1 und GSP1, für PCR 2 mit AP2 und GSP2 jeweils beider *HvSPMS*-Gene nach Herstellerangaben (Clontech, 2007)
- zyklische Primeranlagerung und Elongation erfolgen im selben Reaktionsschritt für mehrere Minuten bei gleicher Temperatur

Komponente	Vol / Endkonzentration		
DNA-Templates	1,0 µl entsprechender gDNA-Bibliothek / 1,0 µl der 1:50-Verdünnung der ersten genspezifischen PCR		
5-fach Advantage 2 PCR-Puffer (Clontech)	10,0 µl		
HvSPMS1_318C_GSP1 [10 µM]	0,4 µM		
HvSPMS2_184C_GSP1 [10 µM]			
HvSPMS1_88C_nested [10 µM]			
HvSPMS2_52C_nested [10 µM]			
AP1 [10 µM] / AP2 [10 µM]	0,4 µM		
Ranger-DNA-Polymerase	4,0 U		
DEPC-Wasser	ad 50,0 µl		
PCR-Programm	<i>T</i> in °C	<i>t</i> in s	Zyklen PCR1 / PCR2
Initiale Denaturierung	98	240	
zyklische Denaturierung	98	60	
Primeranlagerung	98	10	7 x / 4 x
Primeranlagerung und Elongation	72	480	
zyklische Denaturierung	98	10	32 x / 19 x
Primeranlagerung und Elongation	68 / 65	480	
finale Primeranlagerung und Elongation	68 / 65	420	

Tabelle 26: Genome Walking Ranger-PCR 1 und 2

zyklische Denaturierung, zyklische Primeranlagerung und Elongation für PCR 1 bzw. PCR 2 bei 72 °C 7- bzw. 4-mal und dann für bei 68 °C 32-mal bzw. bei 65 °C 19-mal wiederholt; erste genspezifische PCR jeweils mit 1,0 µl entsprechender gDNA-Bibliothek, AP1, GSP1 der *HvSPMS*-Gene, zweite genspezifische PCR jeweils mit 1,0 µl 1:50-Verdünnung erster genspezifischer PCR, AP2, GSP2 der *HvSPMS*-Gene durchgeführt; neben einer Negativ- auch eine Positivkontrolle mitgeführt

- Amplifizierung *HvSPMS1*-Gen-gDNA-Sequenz mit gDNA aus 2.3.14.1./48 und Primersatz Nr. 8 [2.1.3./14]

Komponente	Vol / Endkonzentration		
gDNA-Template	1,56 µl (≅ 200 ng)		
5-fach Ranger Reaktionspuffer	10,00 µl		
HvSPMS1_for_gen	0,4 µM		
HvSPMS1_rev_gen	0,4 µM		
Ranger-DNA-Polymerase	4,0 U		
DEPC-Wasser	ad 50,0 µl		
PCR-Programm	T in °C	t in s	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	180	
zyklische Denaturierung	98	15	30 x
Primeranlagerung und Elongation	70	480	

Tabelle 27: Ranger-PCR für genomische *HvSPMS1*-Sequenz
zyklische Denaturierung, Primeranlagerung und zyklische Elongation 30-mal wiederholt,
Primeranlagerung 5 °C unterhalb Primer-*T_m* [Tabelle 5/16]

2.3.5.7. Taq-PCR

- Kolonie-PCR zur Selektion positiver Bakterienklone nach Transformation, Kontroll-PCR nach Ligation und Restriktionsverdau, Kontroll-PCR (z.B. cDNA-Synthese)
- Kolonie-PCR: 5-60 Bakterienkolonien (teilweise mit Blau-Weiß-Selektion), Suspension in 10-20 µl sterilem Wasser
- vollständiger Bakterienaufschluss für 10 min bei 95 °C, anschließend bei 4 °C abgekühlt

Komponente	Vol / Endkonzentration		
	Kolonie-PCR	gewöhnliche PCR	
Template	20,0 µl Bakteriensuspension	1,0-3,0 µl	
dNTP-Mix [10 mM]	0,25 µM pro Nukleotid		
Vorwärtsprimer [100 µM]	1,0 µM		
Rückwärtsprimer [100 µM]	1,0 µM		
10-fach <i>Taq</i> -Polymerase-Puffer	3,0 µl	1,0-5,0 µl	
<i>Taq</i> -Polymerase	1,0 U	0,5 U – 2,0 U	
DEPC-Wasser	ad 30,0 µl	ad 10,0-50,0 µl	
PCR-Programm	T in °C	t in s	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	300	
zyklische Denaturierung	95	60	35 x
Primeranlagerung	<i>T_m</i> -5 °C	60	
zyklische Elongation	72	90	
finale Elongation	72	600	

Tabelle 28: *Taq*-PCR allgemein
zyklische Denaturierung, Primeranlagerung und zyklische Elongation 35-mal wiederholt,
Primeranlagerung 5 °C unterhalb Primer-*T_m* [Tabelle 5/16]

- bei Vektorkonstrukt-Klonierung Aktivitätsuntersuchungen *HvSPMS*-Promotoren [2.3.14./48ff]: die in Kolonie-PCR untersuchten Bakterienkolonie direkt in PCR-Ansätze suspendiert (kleinere Ansätze möglich)

Komponente	Vol / Endkonzentration		
Template	gepickte Bakterienkolonie		
dNTP-Mix [10 mM]	0,25 μ M pro Nukleotid		
Vorwärtsprimer [100 μ M]	0,50 μ l		
Rückwärtsprimer [100 μ M]	0,50 μ l		
10-fach <i>Taq</i> -Polymerase-Puffer	1,25 μ l		
<i>Taq</i> -Polymerase	0,50 U		
DEPC-Wasser	ad 12,50 μ l		
PCR-Programm	<i>T</i> in °C	<i>t</i> in s	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	300	
zyklische Denaturierung	95	30	
Primeranlagerung	<i>T_m</i> -5 °C	30	40 x
zyklische Elongation	72	75	
finale Elongation	72	300	

Tabelle 29: *Taq*-PCR, Vektorkonstrukt Aktivitätsuntersuchungen *HvSPMS*-Promotoren
zyklische Denaturierung, Primeranlagerung und zyklische Elongation 40-mal wiederholt,
Primeranlagerung 5 °C unterhalb Primer-*T_m* [Tabelle 5/16]; Primer aus Primer-Satz 11 und
Kolo-Primer aus Primersatz 12 [2.1.3./14] verwendet

2.3.5.8. Phusion Polymerase-PCR

- Phusion High-Fidelity DNA Polymerase generiert besonders lange PCR-Fragmente (bis 7,5 kb) mit hoher Akkuratität (Polymerasefehler: $1/4,4 \times 10^7$ Kopien) und Geschwindigkeit, bei verschiedensten Templates einsetzbar; Amplifizierung upstream-*HvSPMS*-Gen-Vektorkonstrukte nach Angaben des Herstellers (Thermo Scientific, 2013) mit Primer-Satz 12

Komponente	Vol / Endkonzentration		
Template	5 ng		
dNTP-Mix [10 mM]	0,25 μ M pro Nukleotid		
Vorwärtsprimer [100 μ M]	0,5 μ M		
Rückwärtsprimer [100 μ M]	0,5 μ M		
5-fach Phusion HF Puffer	10,0 μ l		
Phusion DNA Polymerase	1,0 U		
DEPC-Wasser	ad 50,0 μ l		
PCR-Programm	<i>T</i> in °C	<i>t</i> in s	Zyklen
Initiale Denaturierung	98	30	
zyklische Denaturierung	98	10	
Primeranlagerung	<i>T_m</i> -5 °C	30	40 x
zyklische Elongation	72	90	
finale Elongation	72	600	

Tabelle 30: Phusion-PCR, Vektorkonstrukt Aktivitätsuntersuchungen upstream-Sequenzen *HvSPMS*-Gen
zyklische Denaturierung, Primeranlagerung und zyklische Elongation 40-mal wiederholt,
Primeranlagerung 5 °C unterhalb Primer-*T_m* [Tabelle 5/16]; Phusion-Primer, Primer-Satz 12
[2.1.3./14] verwendet; Protokoll nach Angaben des Herstellers (Thermo Scientific, 2013)

2.3.6. Extraktion von cDNA-Fragmenten aus Agarosegelen

- QIAquick[®] Gel Extraction Kit, MinElute PCR Purification Kit, GeneJET Gel Extraction Kit, Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (QIAGEN, 2015; QIAGEN, 2008)

(Thermo Scientific, 2015; Promega, 2010)

- cDNA-Fragmente in 30-60 µl DEPC-, oder RNase-freiem oder entionisiertem, autoklavierten Wasser aufgenommen, bei -20 °C gelagert; sofern notwendig (z.B. Klonierung sticky-end-cDNA), sich anschließende Arbeitsschritte umgehend ausgeführt

2.3.7. Ligation von DNA-Fragmenten

- Promega pGEM[®]-T (Easy) Vektor System, andere Plasmidvektoren in Kombination mit Promega T4 DNA Ligase (Promega, 2013), sowie Invitrogen TA cloning Kit
- zur Transformation isolierter cDNA-Fragmente (Inserte) in Bakteriensuspensionskulturen vorher Ligation in Leerplasmidvektor (Vektor); durch Restriktionsverdau [2.3.13./47] geöffnete, linearisierte Vektoren und Inserte(an entsprechender Stelle genannt) über Ligation neu mittels Promega T4 DNA Ligase miteinander kombiniert
- Ligation über Nacht bei 4-8 °C oder 16 °C, 90 min bei RT oder im Thermocycler für PCR mit speziellen Temperaturprogrammen; Ligationsansätze anschließend zur Transformation der Bakterienstämme [2.1.2./13] genutzt oder bei -20 °C gelagert

2.3.7.1. Promega pGEM[®]-T Easy-Ligation

- Wenn unter 3./74ff nicht anders beschrieben alle PCR-Produkte (Ausnahme *Pfu*-PCR) in den pGEM[®]-T Easy-Vektor ligiert; molares 1:1-Verhältnis zwischen Insert und Vektor
- Ligationsreaktion nicht erfolgreich → Wiederholung, dabei Verhältnis von Insert zu Vektor nach Promega-Handbuch optimiert (Promega, 2009)

Komponente	Vol / Endkonzentration	
	groß	klein
Insert	1 µl	0,5
Vektor pGEM [®] -T Easy	50 ng	25,0 ng
2-fach Ligationspuffer	5 µl	2,5 µl
T4 DNA-Ligase	1 U	
steriles Wasser	ad 10 µl	ad 5,0
Mischung vorsichtig gemischt, kurz zentrifugiert und über Nacht bei 4-8 °C, 16 °C oder für 90 min bei 25 °C inkubiert danach 10 min bei 65 °C inaktiviert		

Tabelle 31: Ligation in pGEM-T Easy-Vektor

je nach Bedarf große bzw. kleine Ligationen angesetzt; Protokoll nach Angaben des Herstellers (Promega, 2013)

- Ligationsprodukte später in *E. coli* XL1-Blue, XL2-Blue bzw. NEB[®] 10-beta Electrocompetent *E. coli* transformiert

2.3.7.2. Promega T4-Ligation

- Konstruktion eines Vektors aus pGreen-Vektor und bestimmten Inserts der pART7-35S::mCherry-Tocs- und pUBI-AB-mUBI::EYFP-Tnos-Vektoren
- für bakterielle Proteinsynthese [2.4.1./53] isolierte *HvSPMS*-Gen-cDNA-Fragmente in pQE30-Vektor integriert

- Ligationsreaktionen mit Promega T4 DNA-Ligase; molares 3:1-Verhältnis zwischen Insert und Vektor; bei Berechnung reale Größen von Insert und Vektor nach Promega Handbuch (Promega, 2009) berücksichtigt

Komponente	Vol / Endkonzentration
Insert	3 Teile
Vektor	100 ng \cong 1 VT
10-fach Ligationspuffer	1 μ l
T4 DNA-Ligase	0,5-1 U
steriles Wasser	ad 10 μ l
Mischung vorsichtig gemischt, kurz zentrifugiert, über Nacht bei 14 °C inkubiert danach 10 min bei 65 °C inaktiviert	

Tabelle 32: Ligation in eigenes Vektorkonstrukt

Vektorkonstrukt bestand aus pGreen-Vektor und Inserts der pART7-35S:: mCherry-Tocs- und pUBI-AB-mUBI::EYFP-Tnos-Vektoren, vereinzelt größere Ansätze mit doppelten Volumina ad 20 μ l angesetzt; VT – Volumenanteile

- Ligationsprodukte für *HvSPMS*-Promotoren-Aktivitätsuntersuchungen in *E. coli* One Shot[®] Top10, Ligationsprodukte für bakterielle Proteinsynthese in *E. coli* M15[pREP4] transformiert

2.3.7.3. Invitrogen TA-Klonierung

- *Pfu*-PCR-Ansätze nach finaler Elongation 15 min bei 72 °C mit 1 U *Taq*-Polymerase inkubiert \rightarrow 3'Adenin-Überhänge am PCR-Produkt für komplementäre Bindung an 3'Thymidin-Überhänge des offenen pCR2.1-Vektors

Komponente	Vol / Endkonzentration
Insert	1 μ l
Vektor pCR2.1	50 ng
10-fach Ligationspuffer	1 μ l
T4 DNA-Ligase	1 U
steriles Wasser	ad 10 μ l
Mischung vorsichtig gemischt, kurz zentrifugiert, über Nacht bei 16 °C inkubiert danach für 10 min bei 65 °C inaktiviert	

Tabelle 33: Ligation in pCR2.1-Vektor

- Ligationsprodukte in *E. coli* XL1-Blue transformiert

2.3.8. Herstellung kompetenter *E. coli* Bakterienkulturen

- über Nacht aus mehreren gepickten, frisch ausplattierten, angewachsenen Bakterienkolonien [2.1.2./13] eine 100 ml-SOB-Medium-Vorkultur (\cong 100 VT) angesetzt
- 50,0 ml, 37 °C warmes LB-Medium mit 0,5 ml Vorkultur geimpft, bei 37 °C, 250 min⁻¹ bis optische Dichte bei $\lambda = 600$ nm (OD_{600}) = 0,6 inkubiert, anschließend bei 4 °C, 3'000 min⁻¹ für 10 min zentrifugiert
- Pellet in 20 VT 4 °C-kaltem TFB-Puffer suspendiert, dann 5 min bei 4 °C inkubiert, danach 5 min bei 4 °C und 3'000 min⁻¹ zentrifugiert
- Pellet in 4 VT 4 °C-kaltem, mit 0,3 VT Dimethylsulfoxid gemischten TFB-Puffer

suspendiert und 30 min bei 4 °C inkubiert, anschließend zu je 50 µl in 4 °C-kalte Reaktionsgefäße aliquotiert und in N₂ liq schockgefroren; Lagerung bei -80 °C

2.3.9. Transformation von kompetenten *E. coli* Bakterienkulturen

- Transformation ausschließlich über Hitzeschock in chemisch kompetente *E. coli*
- Transformationen zur Herstellung des Vektorkonstruktes für *HvSPMS*-Gen-Promotor-Aktivitätsbestimmung [2.3.14.3./49] über Elektroschock in elektrisch kompetente *E. coli* One Shot[®] Top 10 (Labor Pflanzenernährung, Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Geowissenschaften und Informatik)

2.3.9.1. Hitze-Schock

- Ligationsansätze und Aliquote der -80 °C-kalten kompetenten *E. coli* Bakterienkulturen 5 min bei 4 °C inkubiert
- unter laminarer Luftströmung 1-3 µl Ligationsansatz in Bakterienkulturen gegeben, mit Pipettenspitze vorsichtig gemischt, für 30 min bei 4 °C inkubiert
- Kulturen 30 s bei 42 °C erwärmt, sofort 2 min bei 4 °C inkubiert, dann mit 250 µl SOC-Medium versetzt und 60-120 min mit 1'000-1'400 min⁻¹ bei 37 °C geschüttelt
- 50-250 µl Gemisch auf 37 °C-warme, antibiotikahaltige LB-Agarplatten (50 µg/ml Ampicillin und/oder 25 µg/ml Kanamycin) ausgestrichen, über Nacht bei 37 °C inkubiert
- bei Verwendung von One Shot[®]- und XL1-Blue-Bakterienstämmen Blau-Weiß-Selektion (Agarplatten vor Ausstreichen der Bakterienkulturen jeweils mit 40 µl 100 mM IPTG- und X-Gal-Lösung bestrichen, unter laminarer Luftströmung bei RT getrocknet)
- Kolonien am Folgetag mittels Kolonie-PCR [2.3.10./46] auf Vorkommen des rekombinanten Vektors getestet

2.3.9.2. Elektroschock

- Ligationsansätze und Aliquote der -80 °C-kalten elektrokompetenten *E. coli* Bakterienkulturen 5 min bei 4 °C inkubiert
- 2 µl Ligationsansatz in 60 µl Bakterienkulturen gegeben, Gemisch in vorher mit Ethanol (vergällt, 70%) gespülte Elektroschockküvette gefüllt
- Elektroschockbehandlung (U = 2'500 V), sofort danach Zugabe von 500 µl SOC-Medium
- Mischen durch Pipettieren, 60 min bei 37 °C inkubiert
- 50-250 µl Gemisch auf 37 °C-warme, antibiotikahaltige TB-Agarplatten (50 µg/ml Ampicillin oder 25 µg/ml Kanamycin) ausgestrichen, über Nacht bei 37 °C inkubiert
- Kolonien am Folgetag mittels Kolonie-PCR [2.3.10./46] auf das Vorkommen des rekombinanten Vektors getestet

2.3.10. Kolonie-PCR

- transformierte Bakterienkolonien mittels Kolonie-PCR auf Vorkommen rekombinanter Vektoren untersucht [2.3.5.1./36, 2.3.5.7./42]

- zu untersuchende Kolonien mit Zahnstocher gepickt, in 10-20 µl sterilem Wasser suspendiert und im jeweiligen Sektor einer antibiotikahaltigen LB-Agar-Sektorplatte (50 mg/ml Ampicillin und/oder 25 mg/ml Kanamycin) ausgestrichen
- Agarplatte für mehrere Stunden bei 37 °C inkubiert
- anschließend an PCR wurden PCR-Ansätze und Blindprobe mittels Agarosegel-Elektrophorese [2.3.4./35] ausgewertet, danach wurden ggf. Flüssigkulturen positiver Transformanden angelegt [2.3.11./47]

2.3.11. Flüssigkulturen und Plasmidpräparation

- 50 ml antibiotikahaltiges LB-Medium (50 mg/ml Ampicillin, bei *E. coli* M15[pREP₄] zusätzlich 25 mg/ml Kanamycin) mit Bakterienkolonie bzw. Glycerolkultur [2.3.12./47] versetzt und über Nacht bei 37 °C im Inkubationsschüttler bei 150-220 min⁻¹ inkubiert
- Abnahme von 1'275 µl für eine Glycerolkultur, 10 min Zentrifugation (4 °C, 5'000 min⁻¹)
- aus Pellet mit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, 2014), PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega, 2009), oder QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, 2012) Plasmide in 30-60ml steriles Wasser eluiert
- Konzentrationsbestimmung doppelsträngiger DNA [2.5.1./57], ggf. Sequenzierung [2.3.14./48]

2.3.12. Glycerolkultur

- 1'275 µl Über-Nacht-Flüssigkultur der positiven Transformande [2.3.11./47] unter laminarer Luftströmung mit 225 µl sterilem Glycerol vorsichtig gemischt
- Lagerung: -80 °C

2.3.13. Restriktionsverdau

- Anwendung: a) Überführung von Inserts vom einen Vektorsystem in anderes (z.B. Umklonieren der *HvSPMS*-Inserte vom pCR2.1- bzw. pGEM-T Easy- in pQE-30-Vektor); b) Herstellung des Vektorkonstruktes zur Analyse der *HvSPMS*-Promotorregionen
- bereits bestehende Vektoren und -Konstrukte wurden geöffnet, bestimmte benötigte bzw. nicht benötigte Inserts ausgeschnitten, anschließende Neukombination [2.3.14.3./49] via Ligation [2.3.7./44]
- verwendete Restriktionsendonukleasen: Tabelle 9/23, einzeln oder miteinander kombiniert
- optimale Bedingungen für jeweiligen Restriktionsverdau (u.a. Puffer, Enzymmenge und Inkubationszeit) nach Herstellerangaben (z.B.: Restriktionsendonukleasen von New England Biolabs: Double Digest Finder in Kombination mit CutSmart®-Puffersystem (New England Biolabs, 2015))
- 1,0 µg, 1,5-2,5 µg, 4,0-5,0 µg Plasmid-DNA in 15 µl, 20 µl, 50-100 µl Restriktionsverdauansätzen 60-180 min bei 37 °C inkubiert (inkl. Kontrollen, Negativansätze)

- anschließende cDNA-Fragment-Auftrennung via Agarose-Gel-Elektrophorese [2.3.4./35], Überprüfung auf korrektes Schnittmuster, benötigte Inserte bzw. Vektoren für sich anschließende Ligationsreaktionen [2.3.7./44] verwendet

2.3.14. HvSPMS-Gen-Promotorenaktivitätsuntersuchungen

- in isolierten, transformierten Gerstenprotoplasten untersucht [2.3.14.4.f/51f]
- upstream- und gDNA-Sequenzen sequenziert
- diese in Zusammenarbeit mit Herrn Ricardo Happek (MLU-Halle Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät III, Deutschland) jeweils in selbst konstruierten Vektor, der u.a. fluoreszierende Proteine kodiert, kloniert
- Plasmide in isolierte *Hordeum vulgare*- Protoplasten transformiert und unter Fluoreszenzlicht betrachtet → Rückschlüsse HvSPMS-Gen-Promotoren-Aktivität gezogen

2.3.14.1. Isolation von *Hordeum vulgare* gDNA

- Isolation genomischer DNA mit Qiagen[®] DNeasy[®] Plant Maxi Kit aus 7 *das*-alten *Hordeum vulgare* Pflanzen (QIAGEN, 2015)]
- in mit Salzsäure (5 %) und Ethanol (unvergällt) gereinigten, sterilisierten Mörser 1 g gefrorenes Pflanzenmaterial in N₂ liq und Spatelspitze Quarz/Seesand gemörsert → feinkristallines, mehliges Pulver
- Qiagen-Protokoll ab Schritt 8 nach Herstellerangaben abgearbeitet (QIAGEN, 2015)
- gDNA in 2,5 ml AE-Puffer eluiert, Konzentrationsbestimmung mit Plattenleser NanoQuant Infinite M 200 [2.5.1.2./58], Konzentration lag bei 20,8 ng/μl → Fällung [2.3.2./33], Aufnahme in 800 μl AE-Puffer erneute Bestimmung und Lagerung bei 4 °C
- gDNA-Güte mit 1 μl gDNA auf 0,7 %-igem Agarosegel [2.3.4./35] bestimmt [2.3.4./35], anschließend Genome Walking [2.3.14.2./48]

2.3.14.2. Genome Walking

- verwendete Primer unter 2.1.3./14 aufgeführt; Primerdesign nach GenomeWalker[™] Universal Kit User Manual (Clontech, 2007)
- erster gDNA-Verdau [2.3.14.1./48] über Nacht bei 37 °C nach Herstellerangaben mit *EcoRV*-Restriktase, Gütebestimmung anhand 0,7 %-igem Agarosegel [Tabelle 70-X/151]
- zweiter gDNA-Verdau nach Herstellerangaben
- erstellte Restriktionsbibliotheken (digestion library, DL):

DL1 – <i>DraI</i>	DL2 – <i>PvuII</i>
DL3 – <i>StuI</i>	DL4 – <i>EcoRV</i>
DL5 – <i>PsiI</i>	DL6 – <i>SspI</i>
- 120 min, bei 37 °C inkubiert, Trennung mit 0,7 %-igem Agarosegel [Tabelle 70-XI f/151], Reinigung nach Herstellerangaben
- Ligation an GenomeWalker[™] Adapter [Abbildung 33/184] bei 16 °C über Nacht

- Genome Walking-Ranger-PCRs [2.3.5.6./41] über Nacht, Lagerung bei 4 °C
- Analyse anhand 1,5 %-igem Agarosegel [Tabelle 70-XIII bis XVI/151]
- Extraktion positiver PCR-Amplifikate [2.3.6./43], keine zusätzlichen PCR-Zyklen
- Ligation der PCR-Fragmente in pGEM[®]-T Easy Vektor [2.3.7.1./44]; verschiedene, vom Promega-Protokoll (Promega, 2009) abweichende Ligationsansätze und Temperaturprogramme nötig [Tabelle 34/49]; *HvSPMS*-Ligationsprogramme verschieden

Verhältnis		Programm <i>HvSPMS2</i>			Programm <i>HvSPMS1</i>		
Vektor	Insert	<i>T</i> in °C	Zeit	Zyklen	<i>T</i> in °C	Zeit	Zyklen
a) 0,5	3,50	37	2 min	50 x	6°-16	1 °C/s	100 x
b) 1,0	1,00	16	5 min		16	1 min	
c) 1,0	1,50	16	∞	16-37	1 °C/s		
d) 1,0	2,00			37	1 min		
e) 1,0	3,00			37-16	1 °C/s		
f) 1,0	0,37			16	1 min		
g) 1,0	0,70			16-8	1 °C/s		
h) 1,0	1,86			8	∞		
i) 1,5	2,50						

Tabelle 34: Ligationen für Genome Walking, Verhältnis Vektor zu Insert, Temperaturprogramme

anstelle in 2.3.7.1./44 beschriebenen Verhältnisse von Vektor zu Insert wurden unter a-g aufgeführten Verhältnisse in verschiedenen Ligationsansätzen in Abhängigkeit von erfolgreicher Bakterientransformation pipettiert; Temperaturprogramme für optimale Ligationsbedingungen im Mastercycler gradient laufen lassen, Programm *HvSPMS2* wich von Programm *HvSPMS1* ab (Genome Walking von *HvSPMS2* zeitlich vor *HvSPMS1*)

- Transformation der Ligationsansätze in *E. coli* XL2-Bakterienkulturen, Ausplattierung auf LB-Agarplatten [2.3.9./46], Inkubation bei 37 °C über Nacht
- Mango-Mix-Kolonie-PCR [2.3.10./46] mit M13-Primern (M13uni [– 21], M13rev [– 29]), über-Nacht-Flüssigkulturen von positiven Transformanden
- Plasmidpräparation [2.3.11./47], Erfolgskontrolle über Restriktionsverdau [2.3.13./47] mit MCS (multiple Klonierungsregion)-Restriktasen des pGEM[®]-T Easy Vektors (Promega, 2009) [6.6.2./184]
- Sequenzierung der *HvSPMS*-Fragmente in mehreren Schritten [2.3.15./52] mit M13-Primern und Primer-Satz Nr. 10 [2.1.3./14] (über online-Portal Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg anhand bereits bekannter, im Laufe der Sequenzierung bekannt gewordener Sequenzinformationen editiert; nur von Eurofins Genomics GmbH verwendet)
- *HvSPMS*-Gen-upstream-Regionen in selbst-konstruierten Vektor kloniert [2.3.14.3./49]

2.3.14.3. Vektorkonstruktion

- Reinigungen mit Promega Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, 2010); Ligationen mit T4-Ligase, New England Biolabs in Verhältnis von Vektor : Insert = 3 : 1 [2.3.7.2./44]; Transformationsreaktionen mit Elektroschock in elektrisch kompetente *E. coli* One Shot[®] Top10 [2.3.9.2./46]; Kolonie-PCRs nach Tabelle 29/43 mit Primersatz Nr.

- 11 [2.1.3./14]; Flüssigkulturen mit TB-Medium (25 µg/ml Kanamycin); Plasmidpräparationen mit Promega PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega, 2009); Restriktionsverdau nach 2.3.13./47; Agarose-Gel-Elektrophorese nach 2.3.4./35; zusätzliche PCRs nach Tabelle 29/43 mit Primersatz Nr. 11 [2.1.3./14]; Dephosphorylierung (New England Biolabs, 2016) mit CIP-Phosphatase (Macherey & Nagel, 2013); blunt end-Reaktionen (Blunten) mit DNA-Polymerase I, Large (Klenow) Fragment (New England Biolabs, 2016)
- Grundgerüst für selbst konstruierten Vektor: pGreen II (0179)- Vektor (als pGreen-Vektor bezeichnet), Quelle: John Innes Centre, Norwich UK, (Hellens, et al., 2000) und pART7-Vektor (Gleave, 1992)
 - Subklonierung *mCherry*-Kassette des pART7-35S::*mCherry_Tocs*-Vektors (Quelle: Ricardo Happeck, MLU-Halle Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät III, Deutschland) pGreen-Vektor:
 - Restriktionsverdau mit Restriktase *NotI* pGreen-Vektor geöffnet, aus pART7-35S::*mCherry-Tocs*-Vektor wurde 35S::*mCherry-Tocs*-Kassette ausgeschnitten
 - Reinigung beider Restriktionsverdaureaktionen, Dephosphorylierung offener pGreen-Vektor und erneute Reinigung; Ligation 35S::*mCherry-Tocs*-Kassette und offener pGreen-Vektor über Nacht bei 16 °C → pGreen-red-Vektor [6.2.1./153]
 - Transformation in *E. coli*; Erfolgskontrolle über Kolonie-PCR mit Primern 213, 820
 - Bestimmung positiver Transformanden via Agarose-Gel-Elektrophorese, Über-Nacht-Flüssigkulturen
 - Isolierung amplifizierter pGreen-red-Plasmide am Folgetag; Restriktionsverdau und anschließende Agarose-Gel-Elektrophorese; Erfolgskontrolle anhand Restriktionsverdau-Bandenmuster und zusätzlichen PCRs mit Primern 213 und 214 (spezifisch für pGreen-Vektor), 213 und 820 (spezifisch für *mCherry*-Kassette) und 334 und 1081 (spezifisch für *BASTA*-Resistenz-Kassette) [Tabelle 70-XVII/152]
 - Subklonierung *eYFP*-Protein-Kassette des pUBI-AB-*mUBI::eYFP-Tnos*-Vektors (Quelle: Ricardo Happeck, MLU-Halle Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät III, Deutschland) in pGreen-red-Vektor:
 - Restriktionsverdau pGreen-red-Vektor mit Restriktase *SalI*, aus pUBI-AB-*mUBI::eYFP-Tnos*-Vektor mit Restriktasen *HindIII* und *NotI* *eYFP-Tnos*-Kassette ausgeschnitten; Erfolgskontrolle über mittels Agarose-Gel-Elektrophorese
 - Reinigung Restriktionsverdauansatz, Blunten, erneute Reinigung; Dephosphorylierung pGreen-red-Vektor, Reinigung; Ligation offener pGreen-red-Vektor und ausgeschnittene *eYFP-Tnos*-Kassette über Nacht bei 16 °C → pGreen-red-yellow-Vektor [6.2.2./154]
 - Transformation in *E. coli*; Erfolgskontrolle mit Kolonie-PCR mit Primern 213 und 214
 - Bestimmung positiver Transformanden via Agarose-Gel-Elektrophorese; Über-Nacht-Flüssigkulturen

Isolation amplifizierter pGreen-red-yellow-Plasmide am Folgetag; Restriktionsverdau und anschließende Agarose-Gel-Elektrophorese; Erfolgskontrolle anhand Restriktionsverdau-Bandenmuster [Tabelle 70-XVIII/152]

- Subklonierung Ubiquitin-Promotor aus Mais (*mUBI*) bzw. *HvSPMS*-Gen-upstream-Regionen in pGreen-red-yellow-Vektor vor *eYFP*-Gen:
 - Restriktionsverdau: aus pUBI-AB-Vektor [6.2.4./157] mit Restriktasen *SacI*, *SpeI* *mUBI*-Promotor herausgeschnitten; pGreen-red-yellow-Vektor mit Restriktase *SpeI* vor *eYFP*-Kassette geöffnet; *HvSPMS1*-Gen- upstream-Region mit Restriktasen *EcoRI*, *ScaI* aus pGEM-T-Easy-*HvSPMS1*-Plasmid ausgeschnitten
 - Reinigung und Blunten Restriktionsverdaureaktionen; Dephosphorylierung offener pGreen-red-yellow-Vektor, Reinigung
 - Klonierung *HvSPMS2*-Gen-upstream-Region aus pGEM-T-Easy-*HvSPMS2*-Plasmid mittels Phusion Polymerase-PCR [2.3.5.8./43] und Phusion-SPMS2-Primern Primersatz 12 [2.1.3./14]
 - Ligation *Ubi*-Promotor, *HvSPMS1*-Gen-upstream-Region, PCR-Ansatz *HvSPMS2*-Gen-upstream-Region für 72 h bei 16 °C in offenen pGreen-red-yellow-Vektor → Vektoren pGreen-red-*mUBI*-yellow, pGreen-red-*upHvSPMS1*-yellow, und pGreen-red-*upHvSPMS2*-yellow [6.2.3./155]
- Transformation in *E. coli*; Erfolgskontrolle via Kolonie-PCR mit Primern 213, 333 (Ubiquitin-Promotor) bzw. 213, Kolo-Primern Primer-Satz 12 (upstream-Regionen *HvSPMS2*-Gen)
- Bestimmung positiver Transformanden über Agarose-Gel-Elektrophorese; Über-Nacht-Flüssigkulturen, Plasmidisolierung am Folgetag; Restriktionsverdau und anschließende Agarose-Gel-Elektrophorese; Erfolgskontrolle anhand [Tabelle 70-XIX bis XXI/152]
- mit Konstrukten (Ubiquitin- und *HvSPMS*-Konstrukte) transiente Gerstenprotoplasten-Transformation [2.3.14.5./52]

2.3.14.4. Protoplastenisolation

- aus Blättern 14 *das*- alter Pflanzen
- Blattmaterial in Plasmolyse-Puffer gelegt und in 0,1-0,5 cm breite Streifen geschnitten, geschnittenes Material umgehend in Cellulase-Macerozym-Gemisch überführt
- Inkubation Blattmaterial-Enzymgemisch 30 min bei RT unter vermindertem Luftdruck (Exsikkator); anschließend langsame Belüftung Vakuumbehälter; an Gefäßwänden klebendes Pflanzenmaterial wieder in das Gemisch verbracht; Inkubation 210 min bei RT und 40 min⁻¹
- Blattmaterial-Enzymgemisch vorsichtig und langsam durch mit W5-Lösung getränktes feinmaschiges Netz gegossen; 5 ml W5-Lösung vorsichtig auf Filtrat pipettiert und gemischt
- Zentrifugation 5 min bei RT und 100 g; Überstand mit abgenommen und verworfen

- Protoplasten in 3 ml W5-Lösung suspendiert; bei 4 °C in Fuchs-Rosenthal-Kammergezählt; Verdünnung Protoplasten-W5-Lösung-Gemisch auf Konzentration von 2×10^6 Protoplasten pro Milliliter in Mannitol-Magnesium-Lösung
- anschließend transiente Protoplastentransformation [2.3.14.5./52]

2.3.14.5. transiente Protoplastentransformation

- Elektroschock-Transformation [2.3.9.2./46] *E. coli* One Shot® Top10-Bakterienkulturen mit Vektorkonstrukt-Plasmiden [2.3.14.3./49]; Inkubation auf Kanamycin-haltigen Agarplatten (25 µg/ml) 8-10 h bei 37 °C; 250 ml-Über-Nacht-Kultur angesetzt
- Plasmidisolierung mit NucleoBond®Xtra Midi Kit (Macherey & Nagel, 2013) nach Midi-Präparation-Präparation am Folgetag
- 10 µg Plasmid mit 100 µl Protoplasten-W5-Lösung-Gemisch versetzt, vorsichtig gemischt; Zugabe 110 µl PEG-CMS-Lösung, vorsichtig gemischt
- Inkubation 20 min bei 23 °C, Zugabe von 1'000 µl W5-Lösung, vorsichtig gemischt
- Zentrifugation 2 min bei RT, 100 g; Überstand abgenommen; Pellet in 750 µl Protoplasteninkubationsmedium suspendiert, in Petrischale pipettiert, mit Parafilm verschlossen
- Auswertung via Fluoreszenzmikroskopie [2.3.14.6./52]

2.3.14.6. Fluoreszenzmikroskopie

- Erfolgskontrolle Gerstenprotoplastentransformation [2.3.14.5./52], Aktivitätsprüfung *HvSPMS*-Gen-upstream-Regionen
- Detektion *mCherry*-Protein: Anregung Protoplasten bei $550 \leq \lambda_{ex} \leq 580$ nm (gelbes Lichtspektrum); Emissionsmessung bei $590 \leq \lambda_{em} \leq 650$ nm (orangerotes Lichtspektrum)
- Detektion *eYFP*-Protein: Anregung Protoplasten bei $450 \leq \lambda_{ex} \leq 490$ nm (blaues Lichtspektrum); Emissionsmessung bei $500 \leq \lambda_{em} \leq 550$ nm (grünes Lichtspektrum)
- Fluoreszenzmikroskopie und Nomarski Differentialinterferenzkontrastmethode mit Axio-Observer Z.1 Mikroskop (Filtersätze 38 HE und 31) [2.1.5./17], AxioVision Software durchgeführt, 100-fache Vergrößerung
- interne Kontrolle der Transformationsexperimente = Ubiquitinpromotorkonstrukt: rote Fluoreszenz der mit diesem Plasmidkonstrukt transformierten Protoplasten nachweisbar → Transformation erfolgreich

2.3.15. Sequenzierung

- 50-100 ng zu sequenzierender Plasmide von Firma Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg sequenziert (Cycle Sequencing-Technologie (Dideoxy-Ketten-Termination/cycle sequencing mit thermostabiler Polymerase), ABI 3730XL-Sequenzern), Sequenzierung immer in vorwärts- und rückwärts-Richtung
- Auswertung Ergebnisse mit Clonemanager (Version 9, Professional Edition)- und OMIGA (Version 2.0)- Software

- Sequenzierfehler durch Vergleich mehrerer Sequenzierungen eines PCR-Produktes unter Berücksichtigung der ABI-Trace-Sequenzierqualitätsreport-Daten ausgeschlossen, bei Unklarheiten erneut mit eigenen Primern bzw. Sequenzierprimern sequenziert

2.4. Biochemische Methoden

- HvSPMS-Proteine rekombinant exprimiert und anschließend von anderen Proteinen der Synthesebakterienstammkultur mittels Metallionenaffinitätschromatografie abgetrennt
- Umpufferung, Aliquotierung, Lagerung bei -80 °C; kinetische Charakterisierung

2.4.1. Bakterielle Proteinsynthese

- TB-Medium-Flüssigvorkulturen (50 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Kanamycin) [2.3.11./47] der HvSPMS-Glycerolkulturen über Nacht
- mit 10 ml Vorkultur 250 ml antibiotikahaltiges TB-Medium beimpft; Inkubation bei 37 °C und 250 min⁻¹ bis 0,8 < OD₆₀₀ < 1,0; nach Bedarf 1-2 L Bakterienkultur angesetzt
- Induktion Proteinbildung Zugabe von 1 ml 250 mM IPTG-Lösung zu 250 ml Bakteriensuspension; Inkubation 4,5 h bei 37 °C und 250 min⁻¹ (Induktionsdauer in Vorversuchen zur zeitlichen Zunahme des rekombinant exprimierten Zielproteins mittels denaturierender Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese [2.5.3./59] ermittelt)
- Zentrifugation 10 min bei 4 °C und 5'000 min⁻¹; Bakterienzellpellets mit autoklaviertem, entionisiertem Wasser suspendiert, in 50 ml-Reaktionsgefäße umgefüllt
- Zentrifugation 15 min bei 4 °C und 5'000 min⁻¹; Überstände verworfen
- Lagerung Pellets bei -80 °C

2.4.2. Lyse der Bakterien

- Pellets der bakteriellen Proteinsynthese [2.4.1./53] 15 min bei 4 °C inkubiert
- vorsichtiges Mischen mit 10 ml PIC-Lysepuffermischung und 1 ml Lysozym (10 mg/ml \cong 20'000 U); Inkubation 30 min bei 4 °C; dann Ultraschallbehandlung für 90 s bei 4 °C (Ultraschallstab-Apparatur, output-control: 1, duty: 50 %)
- Inkubation 8 min bei RT mit 500 U DNase I Sigma-Aldrich → Senkung der Viskosität der Suspension; jeweils zwei Lysate desselben Proteins vereinigt
- Überstand mit löslichen Proteinen (Rohlysat) durch Zentrifugation 45 min bei 4 °C und 13'000 min⁻¹ von zellulären Bestandteilen abgetrennt; Probennahme Rohlysat und Pellet für denaturierende Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese [2.5.3./59]
- Rohlysat partikelfrei filtriert (0,45 µm Porendurchmesser); Metallionenaffinitätschromatographie [2.5.2./58] und Umpufferung [2.4.3./53]

2.4.3. Umpufferung von Proteinfraktionen

- um negativen Einfluss auf Enzymaktivität auszuschließen

- nach Proteinchromatographie [2.5.2./58] 4 °C-kalte HvSPMS-Proteinfraktionen in imidazolfreiem, 4 °C-kalten HEPES-Puffer 2 (20 mM, pH 8,0; „Puffer“) nach Prinzip der Größenausschlusschromatographie umgepuffert
- PD-10-Säulen (GE Healthcare, gefüllt mit Sephadex G-25) [Tabelle 12/27] verwendet
- Equilibrierung mit 2,5 ml Puffer; Beladung mit 2,0 ml Proteinfraktion, 0,5 ml Puffer; Elution mit 3,5 ml Puffer, ggf. mehrere Proteinfraktionen vereinigt
- Proteinlösung unter laminarer Luftströmung vorsichtig mit 1,0 ml Glycerol gemischt
- Aliquotierung zu 250,0 µl; Konzentrationsbestimmung via Bradford-Assay [2.5.3./59]; Lagerung bei -80 °C
- anschließend denaturierende Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese [2.5.3./59]

2.4.4. Kinetische Charakterisierung der HvSPMS-Proteine

- u.a. decarboxyliertes S-Adenosylmethonin (dcSAM) benötigt; auf freiem Markt nicht käuflich zu erwerben; Freundlicherweise dcSAM von Herrn Prof. Dr. K. Samejima (Musashino Universität, Japan) zur Verfügung gestellt, leider reichte gestellte Menge nicht aus; weiteres dcSAM durch Herrn Sebastian Stark (IPB Halle, Natur- und Wirkstoffchemie, Synthese, Deutschland) synthetisiert; Reinheit und Gehalt dcSAM vor kinetischer Charakterisierung bestimmt [2.4.4.1./54]
- nach Umpufferung und denaturierender Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese [2.4.3./53, 2.5.3./59] Proteine auf PUT-Methyltransferase (PMT)-, SPDS- oder SPMS-Aktivität untersucht
- danach Linearität der Proteinaktivität getestet und pH-Optima bestimmt; anschließend SPMS-Aktivität kinetisch charakterisiert
- pro Assay drei technische Replikate; Assay-Abstoppen durch Zugabe gesättigter Natriumcarbonatlösung und kräftigem Schütteln (Vortex-Mischer); dann Inkubation bei 4-8 °C inkubiert bzw. Lagerung bei -20 °C
- gebildete PA mittels HPLC-Analyse [2.5.5./60] quali- und quantitativ bestimmt

2.4.4.1. Reinheits- und Gehaltsbestimmung dcSAM

- Reinheit japanisches und synthetisiertes dcSAM durch Herrn Sebastian Stark (IPH Halle, Deutschland) mittels ¹³C- und ¹H-NMR-Spektroskopie mit über 98 % ermittelt
- photometrische Gehaltsbestimmung (Zweistrahlphotometer UV-160A, Shimadzu): 49,8 mg dcSAM in 1 ml Wasser gelöst, Referenzsubstanz S-Adenosylhomocystein (SAH) (Sigma, Gehalt 99,0 %) (gleiches Chromophor wie dcSAM)
- Konzentration Ausgangslösung: 83,79 mM, Einstellung dcSAM-Stammlösung auf 10 mM in HEPES-Puffer 2
- Neuanschaffung UV-VIS-Spektralphotometers BioSpectrometer basis, eppendorf → vereinfachte und kürzere Gehaltsbestimmung möglich (UV-VIS-Spektrum und Verdünnungsreihen zur Kalibrierung mit Absorption bei $\lambda = 260$ nm der dcSAM-

Stammlösung (10m mM) mess- und speicherbar); Gehalt und Konzentration neu hergestellter dcSAM-Lösungen (ab 08/2014) anhand gespeicherter Daten bestimmt und vermessen

2.4.4.2. Bestimmung der Funktion der vermeintlichen HvSPMS-Proteine

- Proteinfunktionsbestimmungsassays nach Tabelle 35 a-c/55
- danach Linearität der Proteinaktivität untersucht [2.4.4.3./55]
- mittels GC-MS-Analyse überprüft, ob in Proteinassays neben bzw. anstelle von SPM Strukturisomer TSPM gebildet wurde [2.5.6./64]

Funktion	Assay I	Assay II	Assay III
a) PMT	1 µg Protein	10 µg Protein	10 µg denaturiertes Protein*
		jeweils 500 µM Put	
		jeweils 400 µM SAM**	
		jeweils HEPES-Puffer 2 (20 mM, pH 8,0) ad 350 µl	
b) SPDS	1 µg Protein	10 µg Protein	10 µg denaturiertes Protein*
		jeweils 500 µM Put	
		jeweils 400 µM dcSAM**	
		jeweils HEPES-Puffer 2 (20 mM, pH 8,0) ad 350 µl	
c) SPMS	1 µg Protein	10 µg Protein	10 µg denaturiertes Protein*
		jeweils 500 µM SPD	
		jeweils 400 µM dcSAM**	
		jeweils HEPES-Puffer 2 (20 mM, pH 8,0) ad 350 µl	
Assays (aI-cIII) für 30 min bei 37 °C inkubiert, danach Zugabe von 350 µl gesättigter Natriumcarbonat-Lösung			

Tabelle 35: Proteinfunktionsbestimmungsassays, Komponenten und Bedingungen

a) PMT-Funktion, b) SPDS-Funktion, c) SPMS-Funktion; *Protein für 10 min bei 95 °C denaturiert; **Assays bei 4 °C pipettiert, nach Zugabe aller weiteren Komponenten vermeintliche Co-Substrate (SAM, dcSAM) hinzugegeben und vorsichtig mit Pipette gemischt

2.4.4.3. Bestimmung der Linearität der Proteinaktivität der HvSPMS-Proteine

- Linearität Produktbildung der HvSPMS-Proteine über Zeit untersucht [Tabelle 36/56]
- Assays mit variabler Gesamtdauer [Tabelle 36 a-g/56] und unterschiedlicher Proteinmenge (Assays IV-VI); Assays mit konstanter Gesamtdauer (30 min) und unterschiedlicher Proteinmenge (Assays VII-X)

Assay IV	Assay V	Assay VI
1 µg Protein	10 µg Protein	10 µg denaturiertes Protein*
	jeweils 3'000 µM SPD	
	jeweils 200 µM dcSAM**	
	jeweils HEPES-Puffer 2 (20 mM, pH 8,0) ad 350 µl	
Assays (IV-VI) jeweils für a) 2,5 min, b) 5,0 min, c) 7,5 min, d) 10,0 min, e) 15,0 min, f) 20,0 min und g) 30,0 min bei 37 °C inkubiert, Zugabe von 350 µl gesättigter Natriumcarbonat-Lösung		
-Fortsetzung auf folgender Seite-		

Assay VII	Assay VIII	Assay IX	Assay X
1 µg Protein	5 µg Protein	10 µg Protein	10 µg denaturiertes Protein*
jeweils 3'000 µM SPD			
jeweils 200 µM dcSAM**			
jeweils HEPES-Puffer 2 (20 mM, pH 8,0) ad 350 µl			
Assays (VII-X) jeweils für 30,0 min bei 37 °C inkubiert, danach Zugabe von 350 µl gesättigter Natriumcarbonat-Lösung			

Tabelle 36: HvSPMS-Proteinaktivitätslinearitätsassay, Komponenten und Bedingungen
Assays IV-VI: variable Zeit (a-g) bei unterschiedlicher Proteinmenge, Assays VII-X: variable Proteinmenge, konstante Zeit; *Protein für 10 min bei 95 °C denaturiert; Assays bei 4 °C pipettiert; **nach Zugabe aller weiteren Komponenten Co-Substrat dcSAM hinzugegeben und vorsichtig mit Pipette gemischt

- anschließend pH-Optima HvSPMS Proteine bestimmt [2.4.4.4./56]

2.4.4.4. Bestimmung des pH-Optimums der HvSPMS

- nach Linearitätsnachweis HvSPMS-Proteinaktivität [2.4.4.3./55] Bestimmung pH-Optima
- Einstellung pH-Stufen → verschiedene Puffer eingesetzt (Kaliumphosphat-, HEPES- und TRIS-HCl-Puffer, sowie gesättigte Natriumcarbonat-Lösung) [Tabelle 37 a-k/56]
- 10 µg Protein pro Assay verwendet

Puffer/Lösung	pH-Wert	Assay XI	Assay XII
		10 µg Protein	10 µg denaturiertes Protein*
K _m H _n PO ₄ , 50 mM, 2 mM DTT, 1 mM ACA	a) 6,5	jeweils 3'000 µM SPD, jeweils 200 µM dcSAM**, jeweils Puffer/Lösung ad 350 µl	
	b) 7,0		
	c) 7,5		
HEPES, 50 mM, 2 mM DTT, 1 mM ACA	d) 7,5		
	e) 8,0		
	f) 8,5		
TRIS-HCl, 50 mM, 2 mM DTT, 1 mM ACA	g) 8,5		
	h) 9,0		
	i) 9,5		
	j) 10,0		
Na ₂ CO ₃ , gesättigt, 2 mM DTT, 1 mM ACA	k) 12,1		
Assays (XI u. XII) jeweils 30 min bei 37 °C inkubiert, danach Zugabe von 350 µl gesättigter Natriumcarbonat-Lösung			

Tabelle 37: HvSPMS-Protein-pH-Abhängigkeitsassay, Komponenten und Bedingungen
a-k – pH-Stufen durch unterschiedliche Puffer; *Protein für 10 min bei 95 °C denaturiert; Assays bei 4 °C pipettiert; **nach Zugabe aller weiteren Komponenten Co-Substrat dcSAM hinzugegeben und vorsichtig mit Pipette gemischt

- anschließend kinetische Charakterisierung [2.4.4.5./56]

2.4.4.5. Kinetische Charakterisierung der HvSPMS-Proteine

- kinetische Charakterisierung nach Bestimmung der pH-Optima [2.4.4.4./56]

- kinetische Charakterisierungsassays in Tabelle 38/57 zusammengefasst; zur Ermittlung kinetischer Parameter v_{\max} , K_m , K_{cat} angestrebt Enzyme durch Variation Co-Substratkonzentration bei konstanter Substratkonzentration bzw. durch Variation eines Parameters (Substrat- oder Co-Substratkonzentration) zu sättigen
- → alle relevanten Assaybedingungen variiert, variierten Bedingungen in Klammern und kursiver Schrift angegeben

Komponente	Assay XIII u. XIV*	Assay XV u. XVI*
Proteinmenge	1 μg (0,1-10,0 μg)	1 μg (0,1-10,0 μg)
Substrat SPD	variabel: 0-5'000 μM (0-10'000 μM)	konstant: 3'000 μM (750-5'000 μM)
Co-Substrat dcSAM**	konstant: a) 200 μM b) 400 μM c) 600 μM (100-750 μM)	variabel: 0-750 μM
HEPES-Puffer 1 / 2 *** (20 mM, pH 8,1 / 8,0)	ad 350 μl	ad 350 μl

Assays (XIII-XVI) jeweils für 10 min (5-30 min) bei 37 °C inkubiert,
danach Zugabe von 350 μl gesättigter Natriumcarbonat-Lösung

Tabelle 38: Assays zur kinetischen Charakterisierung der HvSPMS-Proteine, Komponenten und Bedingungen

a-c – Assays bei verschiedenen konstanten Co-Substratkonzentrationen; *Assays XIV und XVI mit denaturiertem Protein (10 min bei 95 °C) angesetzt; Assays bei 4 °C pipettiert; **nach Zugabe aller weiteren Komponenten Co-Substrat dcSAM hinzugegeben und vorsichtig mit Pipette gemischt, ***HvSPMS1-Assays mit HEPES-Puffer 1, HvSPMS2-Assays mit HEPES-Puffer 2

- Assays die HvSPMS1- bzw. HvSPMS2- Protein enthielten HEPES-Puffer 1 (pH 8,1) bzw. -Puffer 2 (pH 8,0) verwendet
- anschließend gebildete PA mittels HPLC-Analyse [2.5.5./60] bestimmt

2.5. Instrumentell-analytische und Chemische Methoden

2.5.1. Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

- UV-VIS-Spektrofotometer Gene Quant II, Plattenleser NanoQant Infinite M 200
- Absorption Nukleinsäurelösungen in beiden Methoden bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ und $\lambda = 280 \text{ nm}$, sowie definierter Schichtdicke (d) quantifiziert; Reinheitsbestimmung über Quotienten $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ (Soll: 1,5 – 2,0) und Agarose-Gel-Elektrophorese [2.3.4./35]
- Für die Nukleinsäuren gelten folgende spezifische Absorptionskoeffizienten (ϵ):
 - Doppelstrang-DNA – $\epsilon_{260} = 0,020 (\mu\text{g/ml})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
 - Einzelstrang-RNA – $\epsilon_{260} = 0,025 (\mu\text{g/ml})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

2.5.1.1. Bestimmung mittels UV-VIS-Spektrofotometer Gene Quant II

- Nukleinsäurelösung mit DEPC- bzw. nukleasefreiem Wasser 1:60 verdünnt
- dreifach-Bestimmung Absorption gegen DEPC- bzw. nukleasefreiem Wasser in Quarzküvette (Schichtdicke $d = 1$ cm); Berechnung arithmetisches Mittel

2.5.1.2. Bestimmung mittels Plattenleser NanoQuant Infinite M 200

- v.a. für Konzentrationsbestimmung der aus trockengestressten Pflanzen isolierten RNA
- 2 μ l Nukleinsäurelösungen auf Messeinsatz-Quarz-Kavitäten aufgetragen; dreifach-Bestimmung Absorption gegen Nuklease-freies Wasser; Schichtdicke Nukleinsäurelösung zwischen Messeinsatzplatte betrug $d = 1$ mm

2.5.2. Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC)

- *HvSPMS*-cDNAs in pQE-30-Vektor ligiert, in *E. coli* M15[pREP4] transformiert, rekombinant als Fusionsprotein mit N-terminalem sechsfachem Histidinanhang (HIS-Tag) exprimiert
- HisTrap™ HP-Säulen [Tabelle 12/27 und Tabelle 39/58] eingesetzt; an Säulenmaterial zweiwertige Nickelionen (Ni^{2+} -Ionen) durch Chelatbildner Iminodiessigsäure (IDA) immobilisiert

Eigenschaften HisTrap™ HP-Säulen, GE-Healthcare	
Säulen-Vol	1,0 ml
Maße	0,7 cm x 2,5 cm
stationäre Phase	Nickel-Sepharose (quervernetzte Agarose mit IDA-Gruppen), 6 %
Metallion	Ni^{2+}
Partikelgröße	34 μ m
Bindekapazität	mind. 40 mg His-Tag Protein/ml Medium

Tabelle 39: Eigenschaften der HisTrap™ HP-Säulen, GE Healthcare
Säulen-Gesamt-Vol 1 ml

- Trennprinzip: Verdrängung Wassermoleküle \rightarrow stabiler Komplex des Protein-HIS-Tags mit Ligandenbindestellen der Säulenmatrix- Ni^{2+} -Ionen \rightarrow Proteine fest an Säulenmaterial der stationären Phase gebunden \rightarrow von löslichen Bakterienproteinen getrennt

Eigenschaften Proteinchromatographiesystem ÄKTA explorer 100, Pharmacia Biotech	
Säule	HisTrap™ HP, GE Healthcare
Equilibrierung	Bindepuffer IMAC pH 8,0 bis Konstanz von Druck und Leitfähigkeit
Flussrate	1ml / min
Temperatur	20 °C
Detektion	UV-Absorption, $\lambda = 280$ nm, Druck, Leitfähigkeit
Probenaufgabe	45-50 ml Probereservoir
Elution	linearer Gradient 10-500 mM Imidazol über 20 Säulen-Vol durch Mischen von Binde- und Elutionspuffer IMAC
Fraktionierung	2 ml zu 25 Fraktionen mit beginnender Gradientenelution

Tabelle 40: Eigenschaften Proteinchromatographiesystem

Chromatographie *HvSPMS*-Proteine über HisTrap™ HP- Säulen (E Healthcare) mittels ÄKTA explorer 100 (Pharmacia Biotech), vor und nach Proteinchromatographie System auf Ethanol (vergällt, 70 % V/V) umgespült

- Imidazol im Elutionspuffer IMAC verdrängte bei ansteigender Konzentration im Methode-Elutionsschritt (Gradient: 10-500 mM) Proteine aus Chelatkomplexen
- histidinreiche Proteine können ohne HIS-Tag an Säulenmaterial binden; Elution mit geringeren Imidazol-Konzentrationen; durch HIS-Tag hatten HvSPMS-Proteine höchste Bindungsaffinität der löslichen *E. coli*-Proteine zur stationären Phase → Elution nach natürlich vorkommenden histidinreichen Bakterienproteinen
- Proteinchromatographiesystem ÄKTA explorer 100 [2.1.5./17]; aus Rohlysat [2.4.2./53] HvSPMS-Proteine abgetrennt
- Elution der HvSPMS-Proteine in 2 ml-Fraktionen bei 4 °C; Probennahme für denaturierende Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese [2.5.3./59]: Durchfluss, HvSPMS-Protein-Fraktionen
- nach Elution Umpufferung [2.4.3./53] und Konzentrationsbestimmung mittels Bradford-Assay [2.5.3./59]

2.5.3. Bradford-Assay

- Konzentrationsbestimmung umgepufferter HvSPMS-Proteine nach Bradford (Bradford, 1976), Ultrospec III, UV-160A, BioSpectrometer basic [Tabelle 6/19]
- Messlösung: 3 ml 4-fach Bradford-Stammlösung plus 9 ml entionisiertem Wasser
- 1 ml Messlösung mit 50 µl 1:10- bzw. 1:20-verdünnter Proteinlösung [2.4.3./53] (\triangleq Probelösung) bzw. HEPES-Puffer 2 (\triangleq Referenz) in Küvette (Schichtdicke $d = 1$ cm) gemischt; Inkubation 5 min bei RT
- Messung Absorption Probelösung gegen Referenz bei Wellenlänge $\lambda = 590$ nm; Konzentrationsbestimmung HvSPMS-Proteinlösung nach Lambert-Beer (Mittelwert drei unabhängiger Messungen)
- in Vorversuchen Bestimmung Kalibriergeraden mit BSA (25-200 µg unter Berücksichtigung 1:10- bzw. 1:20-Verdünnung)

2.5.4. Denaturierende Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

- Überprüfung rekombinante Expression und Güte Abtrennung HvSPMS-Proteinen von löslichen Bakterienproteine nach Laemli (Laemmli, 1970)

Bezeichnung Bestandteil	Sammelgel	Trenngel
Acrylamid	5,000 %	15,0%
<i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid	0,132 %	0,4 %
TRIS-HCl pH 6,8	125 mM	–
TRIS-HCl pH 8,8	–	376 mM
SDS	0,100 %	0,1 %
TEMED	0,100 %	0,3 %
APS	0,050 %	0,1 %
entionisiertes Wasser	ad 2,0 ml	ad 6,0 ml

Tabelle 41: Zusammensetzung SDS-PAGE-Polyacrylamidgel

beide Gele in selbe SDS-PAGE-Apparatur [2.1.5./17] gegossen, Sammelgel auf ausgehärtetes Trenngel gegossen, Probenkamm in noch nicht ausgehärtetes Sammelgel gesteckt

- SDS-PAGE: Sammelgel (5 % Acrylamid, pH 6,8), Trenngel (15 % Acrylamid, pH 8,8)
- Probenahme [2.4.2./53, 2.5.2./58]: Rohlysate, Pellet, Durchfluss, HvSPMS-Proteinfraktionen mit hohem Proteingehalt (Bakterien- und HvSPMS-Proteine)
- mit entionisiertem Wasser verdünnt:
 - Durchfluss 1:15
 - Spatelspitze Pellet plus 2 ml
 - Rohlysate 1:15
 - HvSPMS-Proteinfraktion 1:3
- 50 µl Verdünnung 1:2 mit 2-fach Probenpuffer SDS-PAGE; 5 min bei 95 °C denaturiert, anschließend bei 4-8 °C inkubiert; 10-15 µl auf Polyacrylamidgel aufgetragen
- Proteinmolekulargewichtsmarker: Fermentas Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas, 2006), Referenzbandenbereich: 10-200 kDa [2.1.7./21]; Laufpuffer: 1-fach Laufpuffer für SDS-PAGE [2.1.10./23]
- Proteintrennung: 10 min, 100 V / 25 mA; ca. 30 min 150 V / 40 mA
- Proteine nach Fixierung durch Coomassiefärbung detektiert [Tabelle 42/60]

Ablauf	Komponenten	Zeit
1. Fixierung	Fixierlösung	20 min
2. Färbung	Färbelösung	30 min
3. Entfärbung	Entfärbelösung	nach Bedarf
4. Trocknung	Trocknerlösung	15 min

Tabelle 42: Coomassie-Färbung, Komponenten und Ablauf
anschließend an Entfärbepad Gel in Cellophanfolie fixiert und bei RT 2d trocknen gelassen

- wurden neben gesuchten HvSPMS-Proteinen auf Bahnen aufgetragener Proteinfraktionen der immobilisierten Metallionenaffinitätschromatographie [2.5.2./58] keine weiteren Proteine detektiert → Reinheit Proteinfraktionen ausreichend
- kinetische Charakterisierung der HvSPMS-Proteine [2.4.4./54]

2.5.5. HPLC-Analyse von Polyaminen

- wässrige PA-Lösungen [Tabelle 11/27] → Kalibrierung von HPLC, GC-MS [2.5.6./64] und Vorversuche, PA-Gehalte von Gerstenpflanzen, in Proteinassays gebildete PA
- drei voneinander unabhängige Ansatzreihen; pro HPLC-Messreihe externe PA-Standards (derivatisiertes Gemisch (je 100 ng Put + Spd + Spm) in 40 µl ACN) mitgeführt
- vor Bestimmung Gerstenpflanzen-PA-Gehalte PA aus Pflanzen extrahiert
- dann PA der Extrakte, PA der wässrigen Lösungen, in Proteinassays gebildeten PA ausgeschüttelt, derivatisiert; mit HPLC-System [2.1.5./17] quanti- und qualifiziert

2.5.5.1. Extraktion von Polyaminen aus Gerstenpflanzenmaterial

- Pflanzenmaterial in N₂ liq schockgefroren, sofort verarbeitet oder bei -80 °C gelagert
- 50-100 mg gefrorenes Pflanzenmaterials unter stetiger Zugabe von N₂ liq zu sehr feinem Pulver gemörsert, mit 1,5 ml Perchlorsäure-Lösung (5 %) 2 h bei 4 °C und 800 min⁻¹ inkubiert, anschließend 20 min bei RT und 13'000 min⁻¹ zentrifugiert

- Pellet (konjugierte und wasserunlösliche PA, Fraktion P) mit 1 ml Natriumhydroxid-Lösung (1 M) versetzt und suspendiert (Vortex-Mischer); 250 µl Suspension und 250 µl Überstand (konjugierte und freie wasserlösliche PA, Fraktion Ü1) je in Braunglasampulle überführt, 1:1 mit konz. Salzsäure gemischt; Glasampullen in Gasbrennerflamme luftdicht verschlossen; Proben 18 h bei 110 °C hydrolysiert → konjugiert gebundene PA in Lösung gebracht; durch Hydrolyse entstand aus Fraktion Ü1 die Fraktion Ü2
- Hydrolysate 5 min bei 13'000 min⁻¹ zentrifugiert; 100 µl Überstände in 2 ml-Reaktionsgefäßen ca. 1,5 h bei 60 °C bis zur Trockne eingengt (SpeedVac); Rückstände in 100 µl Perchlorsäure-Lösung (5 %) suspendiert
- je 100 µl Ü1, Ü2, P in 2 ml-Reaktionsgefäßen mit Dansylchlorid derivatisiert [2.5.5.2./61]
- Bestimmung Gerstenpflanzen-PA-Gehalte nach G-Derivatisierung: Pflanzenmaterial mit N₂ liq zu sehr feinem Pulver gemörsert; direkt bzw. nach Lagerung bei -20 °C mit FMOC derivatisiert [2.5.5.3./62]
- Präzisionsbestimmung in Vorversuchen: Ü1, Ü2, P von 10 biologischen Replikaten gleichzeitig angezogener Gerstenpflanzen [2.2.1./27] parallel aufgearbeitet, anschließend mit Dansylchlorid bzw. FMOC derivatisiert und in HPLC analysiert [2.5.5.2.ff/61ff] → der Messwertstreuung zwischen ± 7-12 % (Präzision: 88-93 %)

2.5.5.2. Derivatisierung von Polyaminen mit Dansylchlorid

- PA-Derivatisierung mit Dansylchlorid nach Smith-Davies-Methode (Smith, et al., 1985)
- vereinfachte Derivatisierungsreaktion am Beispiel von Spermin [Abbildung 7/61]

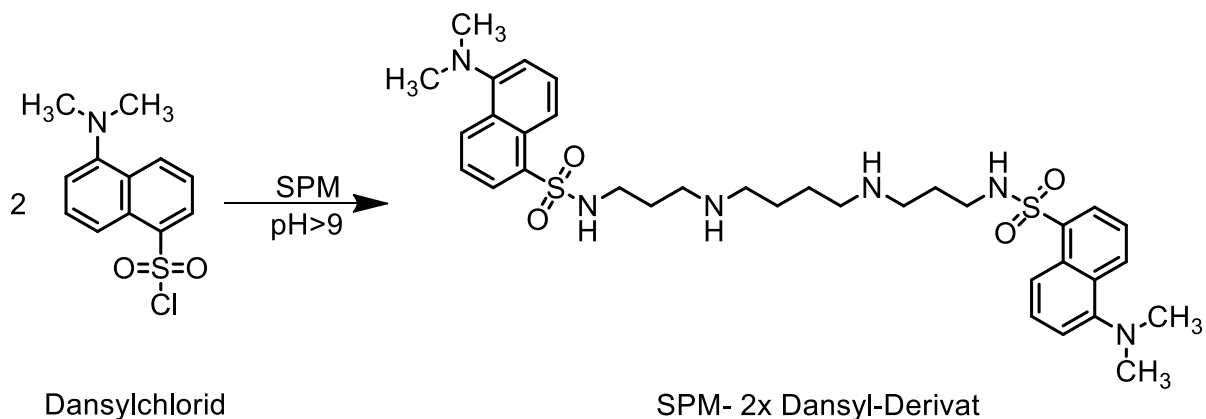


Abbildung 7: vereinfachte Reaktionsgleichung der Derivatisierung von SPM mit Dansylchlorid
vereinfachte Reaktionsdarstellung ohne genaue Reaktionsbedingungen; zweifache, unvollständige Derivatisierung von SPM dargestellt, theoretisch kann an allen freien (primären und sekundären) Stickstoffatomen je ein weiteres Dansylchlorid-Molekül binden; Abbildung erstellt mit ChemBioDraw Ultra, Version 12.0

- je 100 µl wässrige PA-Lösungen [Tabelle 11/27], Fraktionen Ü1, Ü2, P [2.5.5.1./60] mit 100 µl gesättigter Natriumcarbonat-Lösung gemischt
- Gemische bzw. 200 µl abgestoppter PA-Assay [2.4.4./54f] mit 400 µl Dansylchlorid-Lösung gemischt (Vortex-Mischer)

- unter Lichtausschluss 60 min bei 60 °C und 1'500 min⁻¹ inkubiert, dann mit 100 µl Prolin-Lösung versetzt, 30 min bei RT ohne Schütteln inkubiert
- Gemische dreimal mit 500 µl Toluol ausgeschüttelt; Toluolphasen abgenommen, vereint und entweder mehrere Stunden bei 40 °C bzw. ca. 60 min bei 60 °C bis zur Trockne eingengt (SpeedVac); entweder Lagerung bei -20 °C oder HPLC-Analyse [2.5.5.3./62]

2.5.5.3. Derivatisierung von Polyaminen mit FMOC

- FMOC-PA-Derivatisierung nach Fellenberg (Fellenberg, et al., 2012) für wässrige PA-Lösungen und in N₂ liq sehr fein gemörstertes Gerstenpflanzenmaterial
- Inkubation 100 mg Pflanzenmaterial mit 200 µl Extraktionspuffer (20 % Methanol, 200 mM Natriumchlorid, 10 mM Kaliumphosphat, pH 6,0) 10 min Ultraschallbad bei RT
- Zentrifugation bei 13'500 min⁻¹, Überstand abgenommen, Pellet erneut mit 200 µl Extraktionspuffer extrahiert und zentrifugiert, Überstände vereint
- 10-40 µl Extrakt, 10-40 µl PA-Standardgemisches (PUT + SPD + SPM + TSPM, jeweils 1 µM), bzw. 10-40 µl 1:1-Gemisch aus Pflanzenextrakt und PA-Standardgemisch mit 40-100 µl Derivatisierungspuffer (0,5 M Borsäure, pH 7,9) und 80-200 µl FMOC-Lösung (3 mM in Aceton) gemischt; 20-60 min bei 30 °C inkubiert
- nach Zugabe FMOC-Lösung sichergestellt dass pH-Wert Mischung pH_M ≥ 4; dann HPLC-Analyse [2.5.5.5./63]
- vereinfachte Derivatisierungsreaktion am Beispiel von Spermin [Abbildung 8/62]

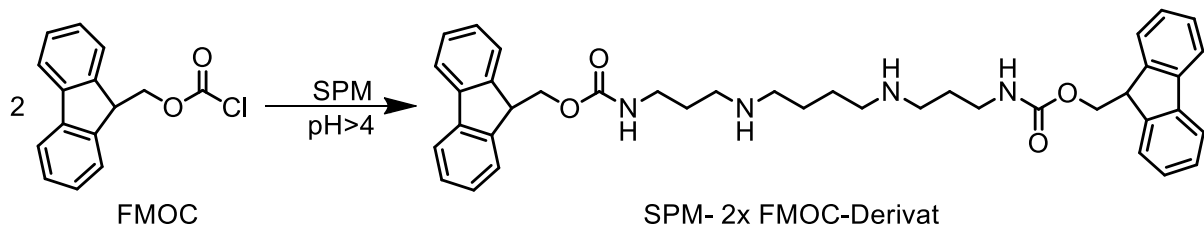


Abbildung 8: vereinfachte Reaktionsgleichung der Derivatisierung von SPM mit FMOC
vereinfachte Reaktionsdarstellung ohne detaillierte Reaktionsbedingungen; zweifache, unvollständige SPM-Derivatisierung dargestellt, theoretisch kann an allen freien (primären und sekundären) Stickstoffatomen je ein weiteres FMOC-Molekül binden; Abbildung erstellt mit ChemBioDraw Ultra, Version 12.0

2.5.5.4. HPLC-Analyse von Polyaminen nach Dansylierung

- bereits publizierte PA-HPLC-Trennmethode nach Dansylierung (Marcé, et al., 1995; Stenzel, et al., 2006) verwendet
- nach Derivatisierung [2.5.5.2./61] eingengte Proben mit 200-400 µl Acetonitril aufgenommen, kräftig gemischt (Vortex-Mischer), 1 min bei RT und 13'000 min⁻¹ zentrifugiert, anschließend über RP-18-Säule getrennt
- Vorversuche: Proben-Mehrfachinjektion nicht nötig da Messfehler HPLC-System derselben Probe nach Drei-, Fünf- bzw. Zehnfachinjektion zwischen 1-5% (Präzision: 95-99 %)

- vor und nach Messung zusammenhängender HPLC-Probenreihe, maximal jedoch nach 50 Messungen Säule drei- bis fünfmal mit je 40 µl Acetonitril gespült
- Parameter, Lösungsmittelgradientenverlauf siehe Tabelle 43/63 und Diagramm 1/63

Parameter Dansylchlorid-HPLC-Methode	
Säule	RP-18 (5 µm), LiChrospher® 100, LiChrocart® 250-4 HPLC Catridge, Merck
Säulenparameter	250 x 4 mm, 5 µm Partikelgröße
Laufmittelgradient	Laufmittel A: Acetonitril : Wasser = 1:9 Laufmittel B: Wasser : Acetonitril = 9:1
Flussrate	1 ml/min
Proben-Vol	200-800µl
Injektions-Vol	10-40 µl
Laufdauer	37 min, 35 min Lauf, 2 min Spülen und Injektion
Temperatur Säulenofen	40 °C
Detektion	Absorption bei $\lambda = 200-400$ nm, Extinktion $\lambda = 365$ nm, Emission $\lambda = 510$ nm, FID-Detektor

Tabelle 43: Parameter HPLC-Methode Bestimmung von PA nach Dansylierung
Aufbau HPLC-Anlage [Tabelle 6/19]

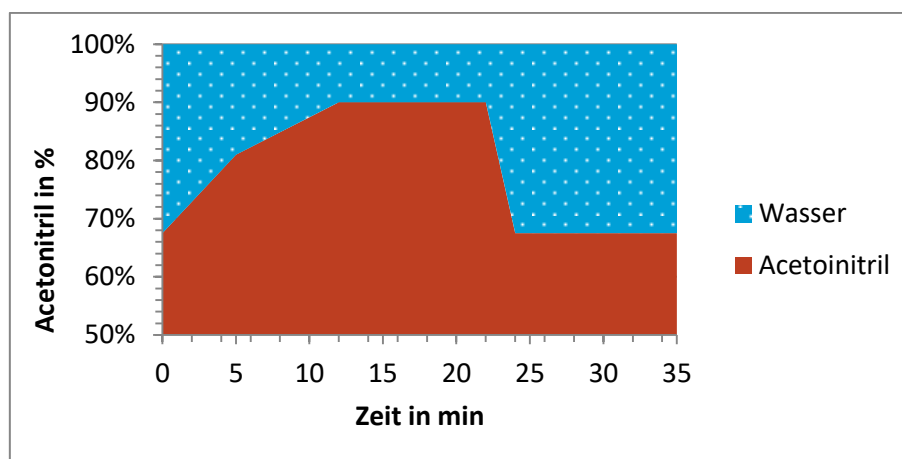


Diagramm 1: Lösungsmittelgradientenverlauf der HPLC-Methode zur Bestimmung von PA nach Dansylierung

- Chromatogramm-Auswertung: Retentionszeiten; Peakflächen gemessene, dansylierte PA

2.5.5.5. HPLC-Analyse von Polyaminen nach FMOC-Derivatisierung

- bereits publizierte PA-HPLC-Trennmethode nach FMOC-Derivatisierung (Fellenberg, et al., 2012) verwendet
- Proben-Derivatisierung [2.5.5.3./62] 10 µl Derivatisierungsgemisch in HPLC-System eingespritzt; Trennung über RP-18-Säule
- Vorversuche: Proben-Mehrfachinjektion nicht notwendig da Messfehler HPLC-System derselben Probe nach Drei-, Fünf- bzw. Zehnfachinjektion zwischen 1-4% (Präzision: 96-99 %)
- vor und nach Messung zusammenhängender HPLC-Probenreihe, maximal jedoch nach 20 Messungen Säule drei- bis fünfmal mit je 40 µl Acetonitril gespült
- Parameter, Lösungsmittelgradientenverlauf siehe Tabelle 44/64, Diagramm 2/64

Parameter Fmoc-HPLC-Methode	
Säule	RP-18 (5 µm), LiChrospher® 100, LiChrocart® 250-4 HPLC Catridge, Merck
Säulenparameter	250 x 4 mm, 5 µm Partikelgröße
Laufmittelgradient	Laufmittel A: Acetonitril : Wasser = 2:98 Laufmittel B: Wasser : Acetonitril = 98:2
Flussrate	0,5-1,0 ml/min
Proben-Vol	130-340µl
Injektions-Vol	10 µl
Laufdauer	60 min, 58 min Lauf, 2 min Spülen und Injektion
Temperatur Säulenofen	30 °C
Detektion	Absorption bei $\lambda = 200-400$ nm, Extinktion $\lambda = 265$ nm, Emission $\lambda = 320$ nm, FID-Detektor

Tabelle 44: Parameter HPLC-Methode Bestimmung von PA nach Fmoc-Derivatisierung
Aufbau HPLC-Anlage [Tabelle 6/19]

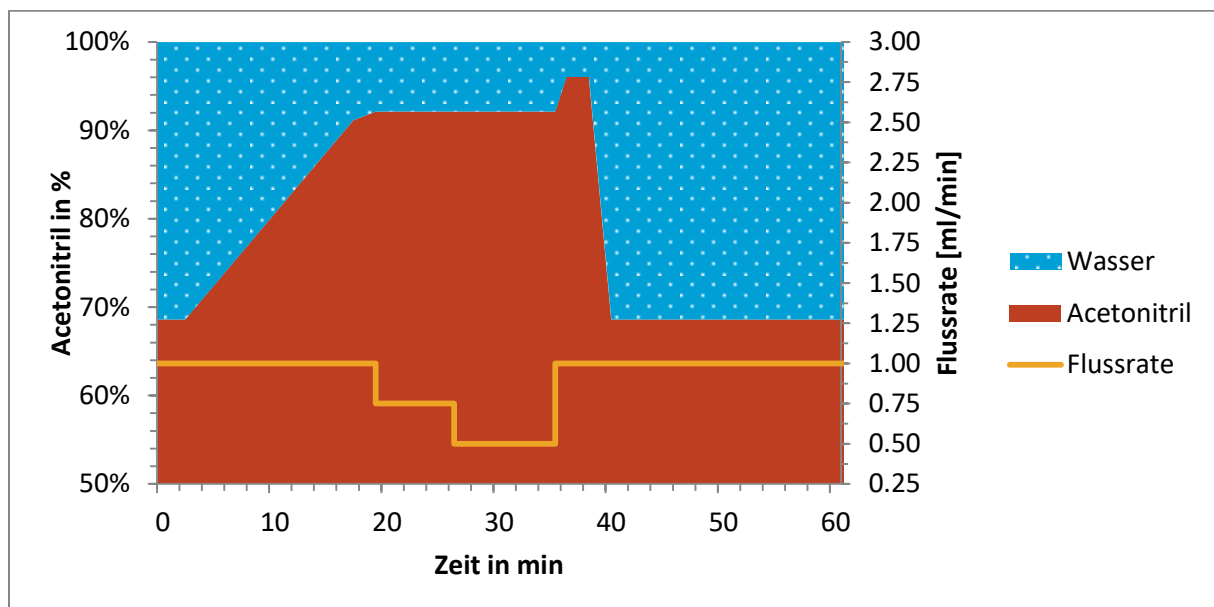


Diagramm 2: Lösungsmittelgradientenverlauf der HPLC-Methode zur Bestimmung von PA nach Fmoc-Derivatisierung

- Chromatogramm-Auswertung: Retentionszeiten; Peakflächen gemessener Fmoc-derivatisierter PA

2.5.6. GC-MS-Analyse von Polyaminen

- Bestimmung wässriger PA-Lösungen [Tabelle 11/27], in HvSPMS-Proteinassays gebildete PA [2.4.4./54]; Quanti- und Qualifizierung mittels GC-MS-System [2.1.5./17]
- bereits veröffentlichte PA-Trennmethode nach Heptafluorobuttersäureanhydrid (HFBA)-Derivatisierung (Fernandes, et al., 2000)

2.5.6.1. Derivatisierung von Polyaminen mit HFBA

- Grundlage: Methode nach Fernandes (Fernandes, et al., 2000)
- 100 µl wässrige PA-Lösung (0,05-1,50 mM) bzw. 100 µl abgestoppter HvSPMS-Proteinassay 120 min bei -80 °C eingefroren; über Nacht lyophilisiert

- Zugabe je 300 µl HFBA und Acetonitril; 60 min bei 80 °C und 1'000 min⁻¹ inkubiert; Abkühlen bei 4 °C; vorsichtig mit 750 µl Methanol versetzt; 180-300 min bei 30 °C bis zur Trockne eingengt (SpeedVac)
- Rückstand in 900 µl Kaliumphosphat-Puffer (0,5 M) aufgenommen; dreimal mit je 600 µl Dichlormethan ausgeschüttelt; Dichlormethanphasen vereint; 60 min bei 30 °C bis zur Trockne eingengt; GC-MS-Analyse [2.5.6.2./65] bzw. Lagerung bei -20 °C oder -80 °C
- vereinfachte Derivatisierungsreaktion am Beispiel von Spermin [Abbildung 9/65]

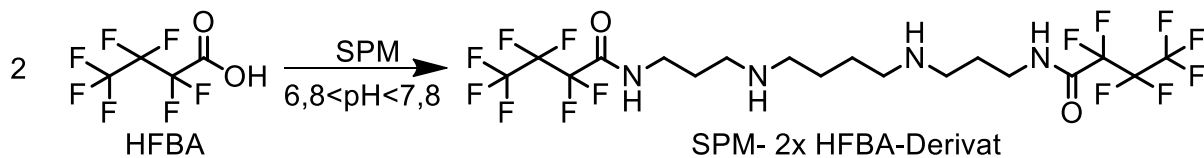


Abbildung 9: vereinfachte Reaktionsgleichung der Derivatisierung von SPM mit HFBA
vereinfachte Reaktionsdarstellung ohne detaillierte Reaktionsbedingungen; zweifache, unvollständige SPM-Derivatisierung dargestellt, theoretisch kann an allen freien (primären und sekundären) Stickstoffatomen jeweils ein weiteres HFBA-Molekül binden; Abbildung erstellt mit ChemBioDraw Ultra, Version 12.0

- Präzisionsbestimmung (Vorversuche): 10 Replikate der PA-Lösungen bzw. Proteinassays parallel nach oben beschriebener Methode aufgearbeitet; HFBA-Derivatisierung; GC-MS-Analyse [2.5.6.2./65]; Messwertstreuung: $\pm 2-9 \%$ (Präzision: 91-98 %)

2.5.6.2. GC-MS-Analyse von Polyaminen nach HFBA-Derivatisierung

- eingengte Proben [2.5.6.1./64] in Mischung aus 10 µl Azobenzol (interner Standard) und 90 µl Ethylacetat gelöst; 1 µl Lösung in GC-MS-System splitlos injiziert; Trennung mittels Silikonfestphasenkapillarsäule; Trägergas: Helium, Flussrate 1,2 ml/min
- Vorversuche: Proben-Mehrfachinjektion nicht notwendig da Messfehler GC-MS-System derselben Probe nach Drei- bis Fünffach-Injektion zwischen 1-5% (Präzision: 95-99 %)

Parameter HFBA-GC-MS-Methode	
Säule	FS-Supreme-5ms, Chromatographie Service GmbH
Säulenparameter	30 m x 0,25 mm, 0,25 µm Schichtdicke, Silikonfestphasenkapillarsäule, Säulenmaterial: Phenylpolysilphenylen
Flussrate	1,2 ml/min
Proben-Vol	100 µl, incl. 10µl Azobenzol (interner Standard)
Injektions-Vol	1 µl, splitlos über 1 min, bei 220 °C
Laufdauer	18 min
Temperatur Säulenofen	80-290 °C
Temperatur Ionenquelle	220 °C
Temperatur Interface	250 °C
Detektion	MS, 50-900 amu, 220 °C, Detektorspannung 1,5 kV

Tabelle 45: Parameter HPLC-Methode Bestimmung von PA nach HFBA-Derivatisierung
Aufbau HPLC-Anlage [Tabelle 6/19]

- Vor und nach Messung zusammenhängende GC-MS-Probenreihe, maximal jedoch nach 10 Messungen Säule ein- bis fünfmal mit 5 µl Hexan gespült

- Parameter, Temperaturgradientenverlauf siehe Tabelle 45/65, Diagramm 3/66

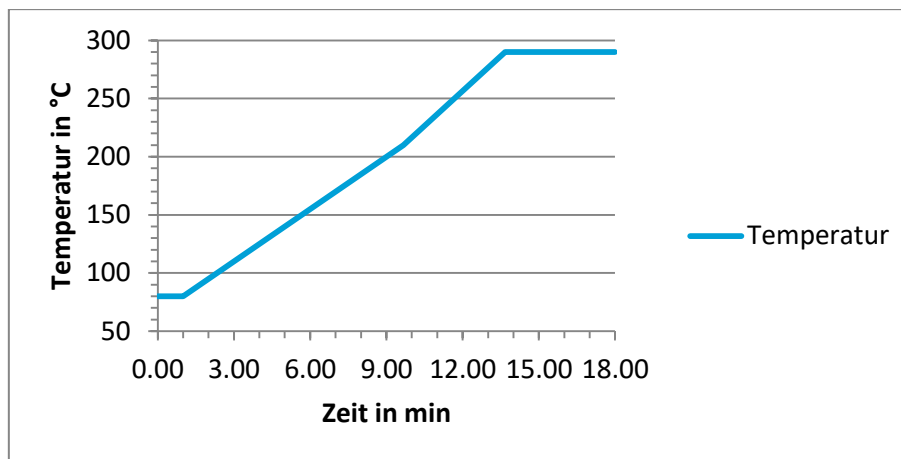


Diagramm 3: Temperaturverlauf Säulenofen der GC-MS-Methode zur Bestimmung von PA nach HFBA-Derivatisierung

- detektierte Massenspektren den HFBA-derivatisierten PA mit NIST-Bibliothek (Version 2008) zugeordnet; Auswertung: Retentionszeiten, Peakflächen

2.6. In silico Methoden

- Einstellungen Clonemanager-Software für Alignments Sequenzierung vermutliche *HvSPMS*-cDNA- und gDNA- Sequenzen, phylogenetische Analyse: Alignment Multiple Sequences; Global-Ref; DNA bases alignment, standard linear; scoring matrix: mismatch penalty 2, open gap penalty 4, extend gap penalty

2.6.1. Charakterisierung der Nukleinsäuresequenzen

- Sequenzidentitäten auf Nukleotid-/Aminosäureebene ($SQI_{N/A}$) mit OMIGA- bzw. Clonemanager-Software berechnet
- kinetische Berechnungen mit SigmaPlot-Software und Enzyme Kinetics-Modul

2.6.1.1. Wobble-Primer-Gestaltung

- Sequenzen für Wobble-Primer-Design (Primer-Satz 1, [Tabelle 5/16]), cDNA-Amplifizierung, Suche nach vermutlichen (*T*)*SPMS* in *H. vulgare* [Tabelle 46/67]

Nummer	Bezeichnung	Quelle	Referenz
1	AED96308.1, Locus: At5g53120, Q94BN2 (SPSY_ARATH) <i>Arabidopsis thaliana</i> SPDS3/SPMS	EMBL, UniProtKB	(Sato, et al., 2000)
2	CAM35498.1, A2VC29 (A2VC29_LOTJA) <i>Lotus japonicus</i> SPMS	EMBL, UniProtKB	(Efrose, et al., 2008)
3	BAE19758.1, Q4ADY5 (Q4ADY5_9ROSA) <i>Malus sylvestris</i> var. <i>domestica</i> SPMS	EMBL, UniProtKB	(Kitashiba, et al., 2005)
4	ACD87085.1, Locus: Os02g15550.2, B3GPG7 (B3GPG7_ORYSJ) <i>Oryza sativa</i> SPDS3	EMBL, UniProtKB	Datenbankeintrag

-Fortsetzung auf folgender Seite-

Nummer	Bezeichnung	Quelle	Referenz
5	BAC81142.1, Locus: Os06g33710.1, Q7XAP2 (Q7XAP2_ORYSJ) <i>Oryza sativa</i> SPDS2	EMBL, UniProtKB	(Kikuchi, et al., 2003)
6	AAP97136.1, Q7XBB3 (Q7XBB3_SOLLC) <i>Solanum lycopersicum</i> putative SPMS	EMBL, UniProtKB	(Budiman, et al., 2000)
7	AAF01311.1, At5g19530, Q9S7X6 (ACL5_ARATH) <i>Arabidopsis thaliana</i> TSPMS ACAULIS5	EMBL, UniProtKB	(Hanzawa, et al., 2000)
8	BAD27601.3, Os02g14190.1, Q6EQJ6 (Q6EQJ6_ORYSJ) <i>Oryza sativa</i> putative SPMS	EMBL, UniProtKB	Datenbankeintrag, 2005, (International Rice Genome Sequencing Project, 2005)
9	EEF45388.1, B9RSQ5 (B9RSQ5_RICCO) <i>Ricinus communis</i> unknown protein	EMBL, UniProtKB	(Chan, et al., 2010)
10	CAE54353.1, Q70AG5 (Q70AG5_SOLLC) <i>Solanum lycopersicum</i> putative SPMS	EMBL, UniProtKB	(Budiman, et al., 2000)

Tabelle 46: Sequenzen zur Wobble-Primer-Gestaltung für *Hv(T)SPMS*-Gen-Charakterisierung

in Spalte „Bezeichnung“ Accession-Einträge und Bezeichnung jeweiliger Datenbank-Einträge aufgeführt; Referenzangaben laut Datenbankeintrag; Datenbanken in Tabelle 51/73 aufgeführt

<i>At5g53120</i>	141	TC ACTCCACT	GTTGT TT CTG	GGTGGTT TT C	GGAACCTCAC	180
<i>LjSPMS</i>	141	CCAT TT CCACC	GTTGT TT CTG	GGTGGTT TT C	AGCACC TTCAA	180
<i>MsSPMS</i>	141	TC AT TT CCACT	GTTGT TT CTG	GGTGGTT TT C	AGAA TTCCAG	180
<i>Os2g15550</i>	171	CCAC CG CCACC	GTGGT GT CCG	GATGGTT TT CAC	CGAGCC CCGC	210
<i>Os6g33710</i>	138	CCAT GT CCACA	GTGGT GT CAG	GGTGGTT TT CAC	GGAACCC CCGC	177
<i>SISPMS2</i>	105	TC ACT TT ACT	GTTGT TT CTG	GATGGTT TT C	TTCA ACCT TTCT	144
<i>At5g53120</i>	861	CAG CGT CCCC	ACATATCC AA	G CGG CGTGAT	TGG TTT CG TC	900
<i>LjSPMS</i>	861	AA GTGT TT CCT	ACATATCC GA	GTGGT TT CGAT	AGG GT TTT CT TT	900
<i>MsSPMS</i>	861	G AGTGT TT CCT	AC GT TATCC AA	GTGGTGTGAT	AGG TTT TTCT G	900
<i>Os2g15550</i>	891	G AGTGT CCC G	ACATATCC CA	GTGGTGTGAT	TGG GT TTTCT G	930
<i>Os6g33710</i>	858	AA G CGT TTCT	AC CT TATCC TA	GTGGTGT CA T	TGG TTTT TT G	897
<i>SISPMS2</i>	822	CAGTGT TT CCT	ACATATCC TA	GTGG CGT TAT	TGG GT TTTCT TT	861

Abbildung 10: Bereiche Alignment zur Gestaltung von Wobble-Primern Pr1_for und Pr3_rev rot – Primerbindebereiche, blau – Wobble-Stelle, **fett** und *kursiv gedruckt* – abweichende cDNA-Sequenzinformationen; oben – Bindebereich Primer Pr1_for (Primer-Satz Nr. 1 [2.1.3./14]); unten – Bindebereich Primer Pr3_rev (Primer-Satz Nr. 1), Primersequenz entsprechend revers komplementär gestaltet; Zahlen – Basenpaarposition in entsprechender cDNA-Sequenz

- Vergleich Sequenzen mit OMIGA-Software (Version 2.0) miteinander in je einem Alignment (CLUSTAL W(1.60) Multiple Sequence Alignments, Pairwise alignment)

- Sequenzen 1-6 bzw. 7-11 [Tabelle 46/67] für Klonierung vermeintlicher *SPMS*- bzw. *TSPMS*-cDNA-Sequenzen in Gerste
- für Wobble-Primer-Design Alignment-Bereiche mit sehr hoher $SQL_{N/A}$ gewählt
- Sequenzen und Charakteristika Wobble-Primer siehe Primer-Satz Nr.1 [2.1.3./14]
- Primerkombination PCR Amplifizierung vermutlicher *SPMS*- bzw. *TSPMS*-cDNA-Fragmente: Ansatz 1 (A1) – Primer 1 (Pr1) + Pr3, A2 – Pr1 + Pr4, A3 – Pr2 + Pr3, A4 – Pr2 + Pr4, A5 – Pr5 + Pr6
- Bindebereiche der Primer 1 (Pr1_for) und 3 (Pr3_rev) beispielhaft in Abbildung 10/67

2.6.1.2. cDNA-Sequenzierung

- in BLAST-Analysen identifizierte Sequenzen [Tabelle 47/68]

Nummer	Bezeichnung	Quelle	Referenz
1	AK250272.1, FLbaf71m17, <i>Hordeum vulgare</i> unknown function	EMBL	(Sato, et al., 2000)
2	AK250627.1, FLbaf92k17, <i>Hordeum vulgare</i> cDNA clone	EMBL	Datenbankeintrag, (Sato, 2007; Sato, et al., 2009)
3	AK250652.1, FLbaf84n09, <i>Hordeum vulgare</i> unknown function	EMBL	(Sato, et al., 2000)
4	AK252089.1, FLbaf143115, <i>Hordeum vulgare</i> unknown function	EMBL	(Sato, et al., 2000)
5	AK332552.1 <i>Triticum aestivum</i> cDNA clone WT004_E07	EMBL	(Kawaura, et al., 2009)

Tabelle 47: Sequenzen BLAST-Analyse nach *Hv(T)SPMS*-cDNA-Sequenzierungs-PCR 1 in Spalte „Bezeichnung“ Accession-Einträge und Bezeichnung jeweiliger Datenbank-Einträge aufgeführt; Referenzangaben laut Datenbankeintrag; Datenbanken in Tabelle 51/73 aufgeführt

- Volllängen-cDNA-Sequenz-Eintrag AK250627.1, FLbaf92k17 für Design Primer-Satz Nr. 2 [2.1.3./14] verwendet

2.6.1.3. gDNA-Sequenzierung und Genome Walking

- mit gDNA und Ranger DNA Polymerase genomische Sequenz *HvSPMS1*-Gen amplifiziert [2.3.5.6./41]; Amplifikat 72 h bei 4-8 C in pGEM-T Easy-Vektor ligiert; heterolog in *E. coli* exprimiert [2.3.7.1.ff/44ff]; Plasmidisolation [2.3.11./47]
- Sequenzierung in mehreren Schritten [2.3.15./52]; Datenbank-Analysen mit beiden *HvSPMS*-Gen-upstream-Regionen [2.6.2./70]
- zur Analyse verwendete Einträge [Tabelle 48/69]

Bezeichnung	Quelle	Referenz
AJ864784.1: <i>Hordeum vulgare subsp. spontaneum</i> transposon Talisker, clone SQ003T7D03	EMBL-Datenbank	(Lyons, et al., 2008)
AK250132.1: <i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i> cDNA clone: FLbaf61n02, mRNA sequence	EMBL-Datenbank	(Sato, et al., 2009)

-Fortsetzung auf folgender Seite-

Bezeichnung	Quelle	Referenz
AK354115.1: <i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i> mRNA for predicted protein, complete cds, clone: NIASHv1005C01	EMBL-Datenbank	(Matsumoto, et al., 2011)
AK362530.1: <i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i> mRNA for predicted protein, complete cds, clone: NIASHv2007A02	EMBL-Datenbank	(Matsumoto, et al., 2011)
AK370244.1: <i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i> mRNA for predicted protein, complete cds, clone: NIASHv2107I09	EMBL-Datenbank	(Matsumoto, et al., 2011)
AK374734.1: <i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i> mRNA for predicted protein, complete cds, clone: NIASHv3075B03	EMBL-Datenbank	(Matsumoto, et al., 2011)
HQ390403.1: Triticum aestivum clone UCDA00854 genomic sequence	EMBL-Datenbank	(Akhunov, et al., 2010)

Tabelle 48: verwendete Sequenzen zur Analyse der gDNA-Sequenz der *HvSPMS*-Gene in Spalte „Bezeichnung“ Accession-Einträge und Bezeichnung jeweiliger Datenbankeinträge aufgeführt; Referenzangaben laut Datenbankeintrag; Datenbanken in Tabelle 51/73 aufgeführt

2.6.2. Phylogenetische Analyse

2.6.2.1. Phylogenetische Analyse der *HvSPMS*-Gen-Sequenzen

- alle relevanten Datenbankeinträge mit MEGA-Software untersucht; in phylogenetischen Bäumen dargestellt; Alignments auf Aminosäuresequenz-Ebene berechnet
- Analyseparameter für ClustalW-Alignments: Pairwise Alignment: Gap Opening Penalty: 10, Gap Extension Penalty: 0,1; Multiple Alignment: Gap Opening Penalty: 10, Gap Extension Penalty: 0,2; Protein Weight Matrix Gonnet; Residue-specific Penalties: ON; Hydrophilic Penalties: ON; Gap Separation Distance: 4; End Gap Separation: OFF; Use Negative Matrix: OFF; Delay Divergent Cutoff (%): 30
- Analyseparameter zur Berechnung phylogenetischer Bäume: Analysis: Phylogeny Reconstruction, Scope: All Selected Taxa, Statistical Method: Neighbor-joining (Saitou, et al., 1987); Phylogeny Test: Test of Phylogeny: Bootstrap method, No of Bootstrap Replications: 500 bzw. 1'000 (Felsenstein, 1985); Substitution Model: Substitutions Type: Amino acid, Model/Method: p-distance (Nei, et al., 2000); Rates and Patterns: Rates among Sites: Uniform Rates, Pattern among Lineages: Same (Homogeneous); Data Subset to Use: Gaps/Missing Data Treatment: Pairwise deletion
- in Abbildungen 11/76, 12/77, 13/78 dargestellte Bäume als ungewurzelte Bäume berechnet; Maßstab so gewählt, dass Astlängen der Größe des evolutionären Abstandes der Sequenzen im Baum entsprachen; evolutionäre Abstand so gewählt, dass dessen Einheit der Anzahl von Aminosäureaustauschen pro Stelle entsprach; alle doppeldeutigen Positionen für jedes Sequenzpaar entfernt

- zusätzlich zu unter 2.6.1.1./66 und 2.6.1.2./68 genannten Einträgen verwendete Datenbankeinträge [Tabelle 49/70]

Bezeichnung	Quelle	Referenz
AAV85715.1, At1g70310, O48661 (SPD2_ARATH) <i>Arabidopsis thaliana</i> SPDS2	EMBL, UniProt	Datenbankeintrag, 2004, Cheuk R., Chen H., Kim C.J., Shinn P., Ecker J.R.
ABB51556.2 <i>Zea mays</i> SPDS2, in Rodríguez-Kessler, et al., 2010 als SPMS1	EMBL	(Rodríguez-Kessler, et al., 2006; Rodríguez-Kessler, et al., 2010)
ACD87085.1 <i>Oryza sativa</i> SPDS3	EMBL	Datenbankeintrag, 2008, Li D., Xia Z., Tao Y., Zhu L.
ACG33952.1 <i>Zea mays</i> SPDS1	EMBL	(Alexandrov, et al., 2009)
ACG34862.1 <i>Zea mays</i> SPDS1	EMBL	(Alexandrov, et al., 2009)
ACG34974.1 <i>Zea mays</i> SPDS1	EMBL	(Alexandrov, et al., 2009)
AEE30435.1, At1g23820 Q9ZUB3 (SPD1_ARATH) <i>Arabidopsis thaliana</i> SPDS1	EMBL, UniProt	(Theologis, et al., 2000)
AJ251298.1, Os07g22600.1, Q9SMb1 <i>Oryza sativa</i> put SPMS	EMBL, UniProt	Datenbankeintrag, 1999, Franceschetti M., Michael A.J.
AK060916 <i>Oryza sativa</i> Japonica Group cDNA clone: 001-035- G07, full insert sequence	EMBL,	(Kikuchi, et al., 2003)
BAD10438.3, Os08g40890 <i>Oryza sativa</i> putative SPMS	EMBL	Datenbankeintrag, 2004

Tabelle 49: verwendete Datenbankeinträge zur Erstellung phylogenetischer Bäume in Spalte „Bezeichnung“ Accession-Einträge und Bezeichnung jeweiliger Datenbankeinträge aufgeführt; Referenzangaben laut Datenbankeintrag; Datenbanken in Tabelle 51/73 aufgeführt

2.6.2.2. Phylogenetische Suche nach *HvtSPMS*-Gen-Sequenzen

- alle relevanten Datenbankeinträge mit MEGA-Software untersucht; in phylogenetischen Bäumen dargestellt; dieselben Analyseparameter für ClustalW-Alignments und Berechnung phylogenetischer Bäume wie unter 2.6.2.1./69 beschrieben
- für Berechnung phylogenetischer Bäume für Anzahl Bootstrap-Replikationen (No of Bootstrap Replications) Wert 1'000 verwendet
- Datenbankeinträge aus UniProt-Datenbank verwendet [Tabelle 48/69]

Bezeichnung	Bezeichnung
1 A2VC29; <i>Lotus japonicus</i> SPMS	34 D9CJ07; <i>Volvox carteri f. nagariensis</i> SPDS
2 A2X2T3; <i>Oryza sativa subsp. indica</i> NCP	35 D9CJ61; <i>Volvox carteri f. nagariensis</i> SPDS
3 A4RYD8; <i>Ostreococcus lucimarinus</i> SPDS	36 F4KJ05; <i>Arabidopsis thaliana</i> SPDS3
4 A5BNU0; <i>Vitis vinifera</i> vermeintliches NCP	37 F8WLB6; <i>Citrus unshiu (Satsuma mandarin) (Citrus nobilis var. unshiu)</i> SPDS

-Fortsetzung auf folgender Seite-

Bezeichnung	Bezeichnung
5 A5BQH5; <i>Vitis vinifera</i> vermeintliches NCP	38 G7I904; <i>Medicago truncatula</i> (Barrel medic) (<i>Medicago tribuloides</i>) TSPMS ACAULIS Protein
6 A8HYM8; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (<i>Chlamydomonas smithii</i>) SPMS	39 G7J8E3; <i>Medicago truncatula</i> (Barrel medic) (<i>Medicago tribuloides</i>) TSPMS ACAULIS Protein
7 A8R0T2; <i>Nicotiana benthamiana</i> SPMS	40 G7K2D1; <i>Medicago truncatula</i> (Barrel medic) (<i>Medicago tribuloides</i>) TSPMS ACAULIS Protein
8 A9PCB6; <i>Populus trichocarpa</i> (<i>Populus balsamifera</i> <i>subsp. trichocarpa</i>) vermeintliches NCP	41 G8C849; <i>Pinus sylvestris</i> putative SPMS
9 A9S1K9; <i>Physcomitrella patens subsp. patens</i> vorausgerechnetes Protein	42 I0ZAI4; <i>Coccomyxa subellipsoidea</i> SAM-abhängige Methyltransferase
10 A9S7S6; <i>Physcomitrella patens subsp. patens</i> vorausgerechnetes Protein	43 I1HZ49; <i>Brachypodium distachyon</i> NCP
11 A9TPB8; <i>Physcomitrella patens subsp. patens</i> vorausgerechnetes Protein	44 I1HZ50; <i>Brachypodium distachyon</i> NCP
12 B7FII8; <i>Medicago truncatula</i> (<i>Medicago</i> <i>tribuloides</i>) NCP	45 I1HZ51; <i>Brachypodium distachyon</i> NCP
13 B9F4H6; <i>Oryza sativa subsp. japonica</i> Peroxidase	46 I1M958; <i>Oryza glaberrima</i> NCP
14 B9HD20; <i>Populus trichocarpa</i> (<i>Populus balsamifera</i> <i>subsp. trichocarpa</i>) NCP	47 I1MX76; <i>Glycine max</i> (<i>Glycine hispida</i>) NCP
15 B9HJW9; <i>Populus trichocarpa</i> (<i>Populus balsamifera</i> <i>subsp. trichocarpa</i>) NCP	48 I1NYV2; <i>Glycine max</i> (<i>Glycine hispida</i>) NCP
16 B9HV65; <i>Populus trichocarpa</i> (<i>Populus balsamifera</i> <i>subsp. trichocarpa</i>) NCP	49 I1LE54; <i>Glycine max</i> (<i>Glycine hispida</i>) NCP
17 B9RQV3; <i>Ricinus communis</i> SPDS	50 Q017T2; <i>Ostreococcus tauri</i> SPMS
18 B9RSQ5; <i>Ricinus communis</i> vermeintliche SPDS	51 Q2YHN8; <i>Plantago major</i> SPMS1
19 C1E0T7; <i>Micromonas commoda</i> NCP	52 Q2YHN9; <i>Plantago major</i> TSPMS
20 C1MTU7; <i>Micromonas pusilla</i> vorausgerechnetes Protein	53 Q2YHP0; <i>Plantago major</i> TSPMS
21 C5XDS1; <i>Sorghum bicolor</i> (<i>Sorghum vulgare</i>) NCP	54 Q4ADY3; <i>Malus sylvestris</i> var. <i>domestica</i> ACAULIS5 Protein
22 C6TIR0; <i>Glycine max</i> (<i>Glycine hispida</i>) NCP	55 Q4ADY4; <i>Malus sylvestris</i> var. <i>domestica</i> ACAULIS5 Protein

-Fortsetzung auf folgender Seite-

	Bezeichnung		Bezeichnung
23	C6TNY9; <i>Glycine max</i> (<i>Glycine hispida</i>) NCP	56	Q4YHN8; <i>Plasmodium berghei</i> vermeintliches NCP
24	D5LAU0; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (<i>Chlamydomonas smithii</i>) vermeintliche SPDS1	57	Q6EQJ6; <i>Oryza sativa subsp. japonica</i> vermeintliche SPMS
25	D5LAY0; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (<i>Chlamydomonas smithii</i>) vermeintliche SPDS1	58	Q70AG5; <i>Solanum lycopersicum</i> (<i>Lycopersicon esculentum</i>) vermeintliche SPMS
26	D7LZ91; <i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i> SPMS	59	Q76IR3; <i>Taxodium distichum</i> vermeintliche SPMS
27	D7STV8; <i>Vitis vinifera</i> vermeintliches NCP	60	Q76JP8; <i>Cryptomeria japonica</i> vermeintliche SPMS
28	D7T6W1; <i>Vitis vinifera</i> vermeintliches NCP	61	Q8W3K6; <i>Arabidopsis halleri subsp. gemmifera</i> SPMS
29	D8QNY0; <i>Selaginella moellendorffii</i> vermeintliches NCP	62	Q9S7X6; <i>Arabidopsis thaliana</i> TSPMS ACAULIS5
30	D8SJ39; <i>Selaginella moellendorffii</i> vermeintliches NCP	63	Q9S7X6-2; <i>Arabidopsis thaliana</i> TSPMS ACAULIS5 Isoform 2
31	D8SSJ3; <i>Selaginella moellendorffii</i> vermeintliches NCP	64	Q9S7X6-3; <i>Arabidopsis thaliana</i> TSPMS ACAULIS5 Isoform 3
32	D8SZF9; <i>Selaginella moellendorffii</i> vermeintliches NCP	65	Q9ZUB3; <i>Arabidopsis thaliana</i> SPDS1
33	D8U725; <i>Volvox carteri f. nagariensis</i> SPDS		

Tabelle 50: verwendete UniProt-Datenbankeinträge zur Erstellung von phylogenetischen Bäumen zur Suche nach *TSPMS* in *Hordeum vulgare*
NCP – nicht charakterisierte Proteine; Bezeichnung jeweiliger Datenbankeinträge aufgeführt; Datenbanken siehe Tabelle 51/73; Einträge in Zusammenarbeit mit Dr. Juliane Fischer (IPB-Halle, Natur- und Wirkstoffchemie, Chemoenzymatik, Deutschland) gesucht

- Einträge in Zusammenarbeit mit Dr. Juliane Fischer (IPB Halle, Natur- und Wirkstoffchemie, Deutschland) gesucht
- in Tabelle 50/72 aufgeführte Sequenzen mit Clonemanager-Software in Alignments miteinander verglichen; Wobble-Primer-Design nur Proteinsequenzen pflanzlichen Ursprungs verwendet, die nicht als SPMS bzw. SPDS kinetisch charakterisiert wurden und die zwei konservierte Sequenzbereiche aufwiesen
- Aminosäuresequenzen: Bereich Nr. 1 – fimgggeg, Bereich Nr. 2 – gpcyqlyt
- nach Ausschluss aller diese Bedingungen nicht erfüllenden Sequenzen für Wobble-Primer (Primersatz Nr. 7, Tabelle 5/16) -Design verwendete Sequenzen aus Tabelle 50/72: 2, 5 12, 13, 14, 17, 21, 26,27, 37, 39, 43, 46, 47, 53, 54, 55, 58, 61, 62

2.6.3. Datenbanken und Computerprogramme

Bezeichnung	Betreiber/Version u. Firma	Referenz
bex-db	National Agriculture and Food Research Organization, NARO, Japan https://www.gene.affrc.go.jp/databases_en.php , http://barleyflc.dna.affrc.go.jp/bexdb/	(Tanaka, et al., 2013)
BLAST	National Centre for Biotechnology Information, NCBI, USA, www.ncbi.nlm.nih.gov	(Altschul, et al., 1990)
BRENDA	Institut für Biochemie und Bioinformatik, TU Braunschweig www.brenda-enzymes.org	(Placzek, et al., 2017)
EMBL	European Molecular Biology Laboratory, www.embl.org , www.ebi.ac.uk	
IPK Barley BLAST Server	International Barley Sequencing Consortium, BARLEX, IPK Gatersleben https://apex.ipk-gatersleben.de/apex/f?p=284:10::::	(Colmsee, et al., 2015)
PLACE	National Institute of Agrobiological Sciences 1-2 Kannondai 2-chome, Tsukuba, Ibaraki 305-8602 Japan http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/	(Higo, et al., 1999) (Prestridge, 1991)
PlantCARE	PlantCARE, a plant cis-acting regulatory element database Stephane Rombauts, Patrice Déhais, Marc Van Montagu and Pierre Rouz	(Lescot, et al., 2002)
UniProtKB	The UniProt Consortium, www.uniprot.org	(The UniProt Consortium, 2012)
Bio-Rad CFX-Manager™ Software	Version 2.1, © Bio-Rad Laboratories, 2011	
Clonemanager	Version 9, Professional Edition, Scientific & educational Software © 1994-2007	
MEGA-Software	Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Version 4.0 bis 5.2.1, ©1993-2012, K. Tamaura, D Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar	
MS Excel Software	Version 2010 (14), © Microsoft Corporation, 2010	
OMIGA-Software,	Version 2.0, Oxford Molecular Ltd. ©1996-99, Rainbow SentinelLM, Rainbow Technologies Inc. ©1989-1996	
SigmaPlot-Software, Enzyme Kinetics- Modul	SigmaPlot: Version 10, © 2006; Version 11, © 2008; Enzyme Kinetics- Modul: Version 1.3, © 2004, Sysat Software Inc., LEADTOOL © 1991-98, DUNDAS SOFTWARE LTD. © 1994-1999, © wpcubed GmbH, Germany, © TE Sub Systems Inc., © Sax Software	

Tabelle 51: verwendete Datenbanken und Computerprogramme

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der HvSPMS-Proteine

3.1.1. Charakterisierung der Nukleinsäuresequenzen

Bekannte SPMS-cDNA-Sequenzen der EMBL-Datenbank ermöglichten das Design von Wobble-Primern [2.6.1.1./66] für die reverse Transkription in isolierter Gerste-Ganzpflanzen-RNA [3.1.1.1./74] zur Suche nach SPMS-bzw. TSPMS-cDNA-Sequenzen [3.1.1.2.ff/74ff].

Sequenziert wurde nach Methode 2.3.15./52.

3.1.1.1. Isolierte RNA aus *Hordeum vulgare* Pflanzen

Aus 3,0 g frischen 11-12 *das* alten Pflanzen [2.3.1.1./32] wurden 2,645 µg/µl RNA (Verhältnis $A_{260}/A_{280} = 2,0$) isoliert [2.5.1.1./58]. Die Präparationen waren in Konzentration und Qualität für die Synthese von cDNA durch reverse Transkription [2.3.3.1./34] geeignet.

3.1.1.2. Amplifizierung von *Hv(T)SPMS*-cDNA-Fragmenten

Mit *Taq*-PCR [2.3.5.7./42] und Primersatz Nr. 1 zeigten alle PCR-Ansätze für mögliche SPMS-cDNA-Fragmente (Ansätze 1-4) Amplifikate im Bereich zwischen 500-800 bp [Tabelle 70-I/150]. In den Ansätzen für TSPMS-cDNA-Fragmente (Ansätze 5-6) war das nicht der Fall. Weitere Experimente zur Klonierung von TSPMS-cDNA-Fragmenten mit den TSPMS-Primern des Primersatzes Nr. 1 blieben erfolglos [3.4./110]. Die extrahierten Amplifikate a-d [Tabelle 70-I/150] wurden mit T4-Ligase in den pCR[®]2.1-Vektor ligiert, heterolog in *E. coli* XL1-Blue exprimiert [2.3.7.2.ff/44ff] und sequenziert.

Die Sequenzen der PCR-Ansätze 1-4 wurden in der EMBL-Datenbank in BLAST-Analysen untersucht. Unter anderem wurde der Vollängen-cDNA-Datenbankeintrag AK250627.1 (FLbaf92k17) [Tabelle 47/68] mit einer SQI_N von 99,9 % zu PCR-Ansatz 1 identifiziert. Die Sequenzen von PCR-Ansatz 1, AK250627.1 und die Sequenzen der PCR-Ansätze 2-4 hatten eine SQI_N von 76 %. Nach Kombination der Sequenziererergebnisse der PCR-Ansätze 2-4 wurde die cDNA-Sequenz eines 600 bp langen cDNA-Fragments mit einer SQI_N von 99 % erhalten. In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob zwei verschiedene cDNA-Fragmente kloniert wurden, die verschiedene Proteine kodierten.

3.1.1.3. Amplifizierung und Sequenzierung der Vollängen-*HvSPMS1*-cDNA

Mit der AK250627.1-Sequenz [3.1.1.2./74] wurde Primer-Satz Nr. 2 [2.1.3./14] abgeleitet. Unter Verwendung der Primer und der cDNA (3.1.1.2/74) wurde in der *Pfu*-PCR [2.3.5.3./37] ein ca. 1'200 bp-großes Amplifikat erhalten [Tabelle 70-II/150], das nach Isolation in den pCR2.1-Vektor ligierte und heterolog in *E. coli* XL1-Blue exprimiert wurde [2.3.7.1.ff/44ff]. Die isolierten, sequenzierten Plasmide der AK250627.1- und der 1'155 bp langen Konsensus-Sequenz hatten eine SQI_N von 100 %. Die Amplifizierung und Sequenzierung der Vollängen-*HvSPMS1*-cDNA-Sequenz [6.3.1./159] war demnach erfolgreich. In anschließenden Experimenten wurde die Funktion der kodierten Proteine untersucht [3.1.3.3./80, 3.1.4.1./82].

3.1.1.4. Amplifizierung und Sequenzierung der Volllängen-*HvSPMS2*-cDNA

Die BLAST-Analyse der Konsensussequenz der *Taq*-PCR-Ansätze 2-4 ergab keine Datenbankeinträge mit einer $SQI_N \leq 90\%$ [3.1.1.2./74]. Die vermutete Volllängen-*HvSPMS2*-cDNA-Sequenz wurde mittels RACE-PCR [2.3.5.5./39] mit Primer-Satz Nr. 3 [2.1.3./14] amplifiziert:

Mit isolierter RNA [3.1.1.1./74] wurden nacheinander Einzelstrangsynthese, RNA-Verdau und die 3'RACE-PCRs 1 und 2 durchgeführt (vgl. [Tabelle 70-III/150]). Die Amplifikate a, b wurden extrahiert, in den pGEM-T Easy-Vektor ligiert und rekombinant in *E. coli* XL1-Blue exprimiert [2.3.7.1.ff/44ff]. Nach Isolation und Sequenzierung der Plasmide wurde eine 681 bp-lange 3'RACE-PCR-cDNA-Sequenz mit Stopp-Codons in den möglichen 3 Leserahmen wurde identifiziert. Sie wurde mit der Konsensussequenz der *Taq*-PCR-Ansätze 2-4 kombiniert, die 3'RACE-PCR-Amplifizierung und Sequenzierung waren erfolgreich.

Mit isolierter RNA [3.1.1.1./74] wurden nacheinander Einzelstrangsynthese, RNA-Verdau, S.N.A.P.[™]-Säulen-Aufreinigung, TdT Tailing und die 5'RACE-PCRs 1 [Tabelle 70-IV-a/150] und 2 [Tabelle 70-V-a,b/150] durchgeführt. Amplifikate wurden extrahiert, in den pGEM-T Easy-Vektor ligiert und rekombinant in *E. coli* XL1-Blue exprimiert [2.3.7.1.ff/44ff]. Isolierte Plasmide wurden sequenziert, jedoch wurden unter verschiedenen Bedingungen keine zur Ausgangs-cDNA passenden Sequenzen gefunden. Die Konsensussequenz der Plasmide der 5'RACE-PCR-2 b [Tabelle 70-V-b/150]) zeigte eine SQI_N von 75 % zur vermuteten *HvSPMS1*-cDNA-Sequenz und außerdem eine SQI_N von 83 % zur Konsensussequenz der Plasmide der PCR-Ansätze 2-4. Da die SQI_N unterhalb von 90 % lag, wurde davon ausgegangen, dass die 5'RACE-PCR-Amplifizierung und Sequenzierung nicht erfolgreich waren. Eine Anfrage bei Dr. Nils Stein (IPK Gatersleben, Genebank, Research Group Genomics of Genetic Resources, Deutschland) erbrachte eine 8568 bp-lange gDNA-Contig-Sequenz des 2010 noch nicht publizierten GABI-BARLEX-Projektes, die zur Konsensussequenz der Plasmide der PCR-Ansätze 2-4 passte. Nach Entfernen der Introns und nicht benötigter gDNA-Bereiche *in silico* wurde eine weitere *SPMS*-Volllängen-cDNA-Sequenz erhalten, die *HvSPMS2*.

Mit *Pfu*-PCR, den Primern des Primer-Satz Nr. 4 [2.1.3/14] und cDNA [3.1.1.1./74] wurde ein 1'100-1'200 bp-langes PCR-Produkt [Tabelle 70-VI/150] amplifiziert. Es wurde extrahiert, heterolog in *E. coli* XL1-Blue exprimiert und sequenziert. Die 1'155 bp lange Konsensussequenz [6.3.2./159] wies zur *HvSPMS2*-Volllängen-cDNA-Sequenz eine SQI_N von 100 % auf. Zur *HvSPMS1*-cDNA-Sequenz hatte sie eine SQI_N von 78 %. Danach wurde die Funktion der kodierten Proteine charakterisiert [3.1.3.3./80, 3.1.4.1./82].

3.1.1.5. gDNA-Amplifizierung und Sequenzierung

Neben der gDNA-Sequenz des GABI-BARLEX-Gerstengenom-Sequenzierprojekts wurde mit Ranger-PCR [2.3.5.6/41] zur Amplifizierung der *HvSPMS1*-gDNA-Sequenz ein 4-6 Kbp-langes Amplifikat erhalten, das in mehreren Schritten sequenziert wurde. Nach Kombination

der Sequenzierergebnisse wurde die 3'818 bp-lange gDNA-Sequenz des *HvSPMS1*-Gens erhalten. Die gDNA-Sequenz des *HvSPMS2*-Gens war 5'639 bp lang [6.3.3.f/160f].

3.1.1.6. Intron-Exon-Muster

Die *HvSPMS*-cDNA- und gDNA- Sequenzen wurden in Alignments miteinander verglichen [Abbildung 11/76]. Beide *HvSPMS*-gDNA-Sequenzen bestanden aus 11 Exons und 10 Introns. Die Exons mit derselben Nummer hatten gleiche Länge, die Introns hatten ungleiche Längen.

Anschließend wurde zur Untersuchung der *HvSPMS*-Gen-Promotoren die upstream-Region beider *HvSPMS*-Gene durch Genome Walking amplifiziert und sequenziert [3.2.2./85].

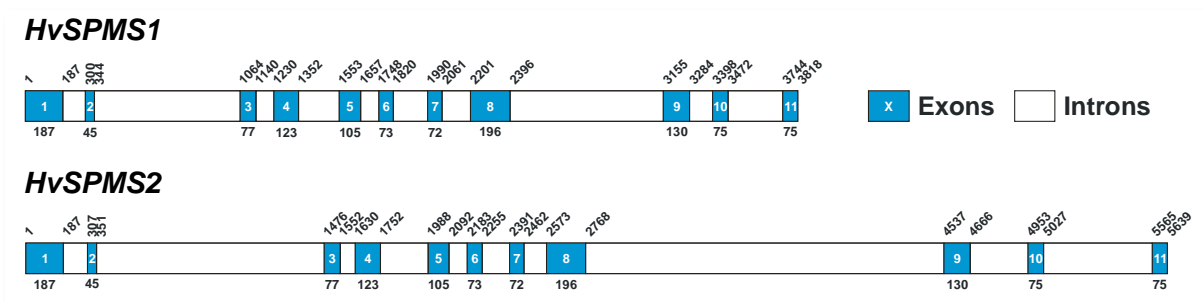


Abbildung 11: Intron-Exon-Muster gDNA *HvSPMS*

Ziffern über gDNA – Basen Exon- Beginn bzw. Ende; Ziffern unter gDNA – Exonlänge; weiße Ziffern – Exonnummer, Längen maßstabsgetreu

3.1.2. Phylogenetische Untersuchungen

In phylogenetischen Untersuchungen wurden die Sequenzen untersucht, mit denen die Primer zur Suche nach SPMS und TSPMS in *Hordeum vulgare* abgeleitet wurden. Die *HvSPMS*-Gensequenzen wurden analysiert und zusammen mit anderen *SPMS*-Sequenzen in phylogenetische Bäume dargestellt.

3.1.2.1. *SPMS* in *Hordeum vulgare*

Bei der Suche nach *SPMS* in Gerste wurde in Datenbankrecherchen nach cDNA-Sequenzen bekannter *SPMS*-Proteine in Pflanzen gesucht [3.1.1./74], mit denen Wobble-Primer [2.6.1.1./66] abgeleitet wurden. Die zum Primerdesign verwendeten *SPMS*-Gen-Sequenzen [Tabelle 46/67] wurden miteinander in Alignments verglichen und ihre Proteinsequenzen wurden in einem phylogenetischen Baum dargestellt [Abbildung 12/77]. Entsprechend der Datenbank-Annotationen und den publizierten Daten zur kinetischen Charakterisierung wurden sie unterschieden in Sperminsynthasen (*SPMS*), Spermidinsynthasen (*SPDS*) und Thermosperminsynthasen (*TSPMS*). Die Korrektheit der Zuordnungen der Sequenzen wurde lediglich angenommen, da nur sehr wenige Proteine tatsächlich kinetisch charakterisiert wurden [Abbildung 12/77]. Proteinsequenzen die um ein charakterisiertes Protein clusterten, wurde die Funktion des charakterisierten Proteins zugeordnet.

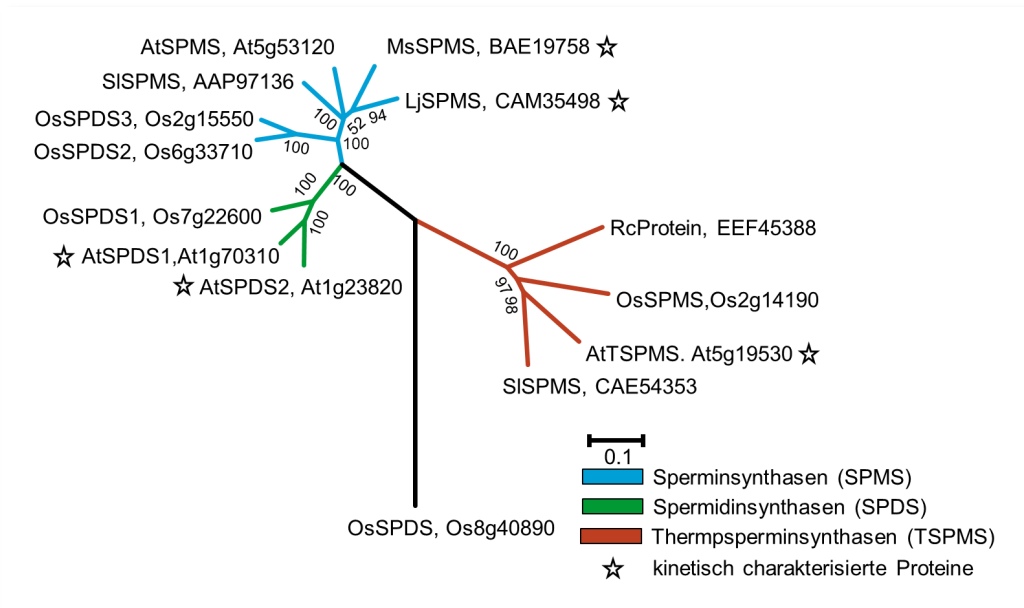


Abbildung 12: Phylogenetischer Baum 1, bekannte SPMS-Proteinsequenzen

blaue Balken – SPMS, grüne Balken – SPDS, rote Balken – TSPMS, Sterne – kinetisch charakterisierte Proteine; Sequenzen aus EMBL-Datenbank; Berechnung nach 2.6.2.1./69: Summe der Astlänge = 2,62744802, Bootstraptest mit 500 Replikaten; 14 Aminosäuresequenzen analysiert, gesamt 479 Positionen im Finaldatensatz, evolutionäre Analyse mit MEGA5 (Tamura, et al., 2011)

3.1.2.2. Phylogenetische Einordnung von HvSPMS

Nach vollständiger Sequenzierung der *HvSPMS*-cDNA-Sequenzen wurden weitere BLAST-Analysen (EMBL-Datenbank) durchgeführt, um sie gegen weitere bereits bekannte SPMS-Sequenzen phylogenetisch abzugrenzen, sie mit ihnen zu vergleichen und um die Zuordnung der Gruppen im Baum zu präzisieren. Die Sequenzen [Tabellen 47/68 und 49/70] Sequenzen wurden in einem phylogenetischen Baum dargestellt [Abbildung 13/78]. Die cDNA-Sequenzen beider *HvSPMS*-Gene gruppierten sich in den Sperminsynthasen-Teil des phylogenetischen Baumes. Auch hier beruht die Zuordnung der Sequenzen auf ihren Annotationen und der Nähe zu Sequenzen kinetisch charakterisierter Proteine (vgl. 3.1.2.1./76).

Die Einordnung im phylogenetischen Baum unterstützte die Hypothese, dass die *HvSPMS*-cDNA-Sequenzen für SPMS-Proteine in Gerste kodierten. Die kinetische Charakterisierung der *HvSPMS*-Proteine als tatsächliche SPMS [3.1.4./82] bestätigte die richtige Funktionszuordnung der *HvSPMS*-Proteinsequenzen in den phylogenetischen Bäumen [Abbildungen 11/77 und 12/78].

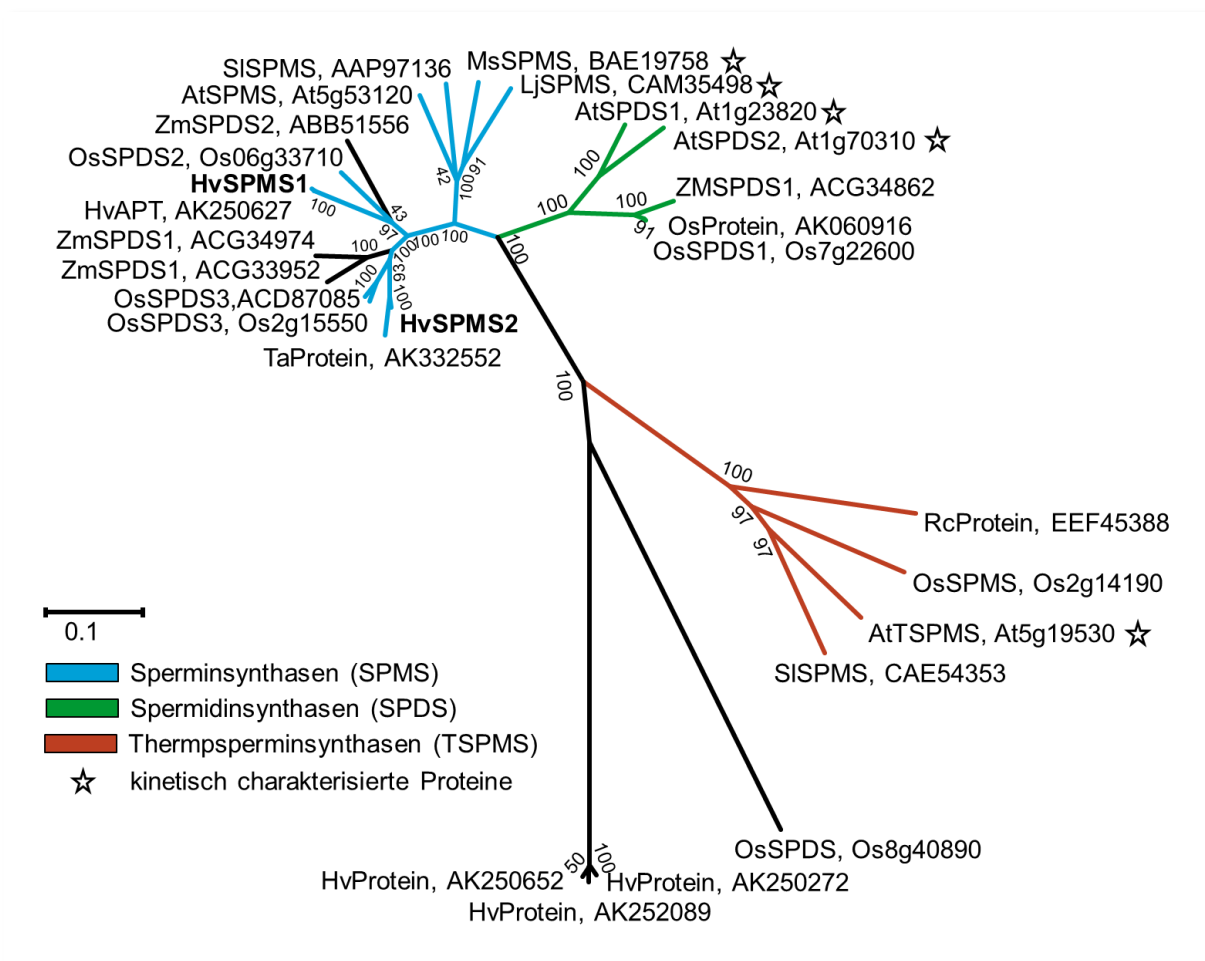


Abbildung 13: Phylogenetischer Baum 2, phylogenetische Einordnung der HvSPMS-Proteine blaue Balken – SPMS, grüne Balken – SPDS, rote Balken – TSPMS, Sterne – kinetisch charakterisierte Proteine; Sequenzen aus EMBL-Datenbank; Berechnung nach 2.6.2.1./69: Summe der Astlänge = 3,55304381, Bootstraptest mit 1000 Replikaten; 27 Aminosäuresequenzen analysiert, gesamt 500 Positionen im Finaldatensatz, evolutionäre Analyse mit MEGA5 (Tamura, et al., 2011) durchgeführt

3.1.2.3. TSPMS in *Hordeum vulgare*

Nach der erfolglosen ersten Suche nach *HvTSPMS* [3.1.1.2./74] wurden in Kooperation mit Dr. Juliane Fischer (IPB Halle, Natur- und Wirkstoffchemie, Chemoenzymatik, Deutschland) neue degenerierten Wobble-Primer für eine erneute Suche nach *HvTSPMS*-Genen abgeleitet. Dabei wurden Proteinsequenzen verschiedener Taxa verwendet, die das Aminosäuremotiv fimgggeg besaßen. Dieses Motiv bildet die für den Katalyseprozess benötigten Aminosäuren im aktiven Zentrum von TSPMS-Proteinen und erschien für sie charakteristisch zu sein.

Die Proteinsequenzen [Tabelle 50/72] wurden mit der Mega-Software in Alignments untersucht. Der phylogenetische Baum enthielt 65 Proteinsequenzen [Abbildung 14/79]. Die pflanzlichen Proteinsequenzen (schwarze und grüne Schrift in Abbildung 14/79) wurden mit der Clonemanager-Software in Alignments untersucht. 32 Sequenzen wurden aussortiert (schwarze Schrift). Sie hatten entweder eine geringere $SQI_{N/A}$ als 50 % zur AtTSPMS oder clusterten in den SPDS- und SPMS-Gruppen des phylogenetischen Baums aus Abbildung

12/77. Mit den verbliebenen 22 Sequenzen wurden Wobble-Primer (Primersatz Nr. 7, Tabelle 5/16) abgeleitet [2.6.2.2./70]. Die Ergebnisse der c-DNA-Amplifizierung zur Suche nach HvTSPMS werden in 3.4./110 beschrieben.

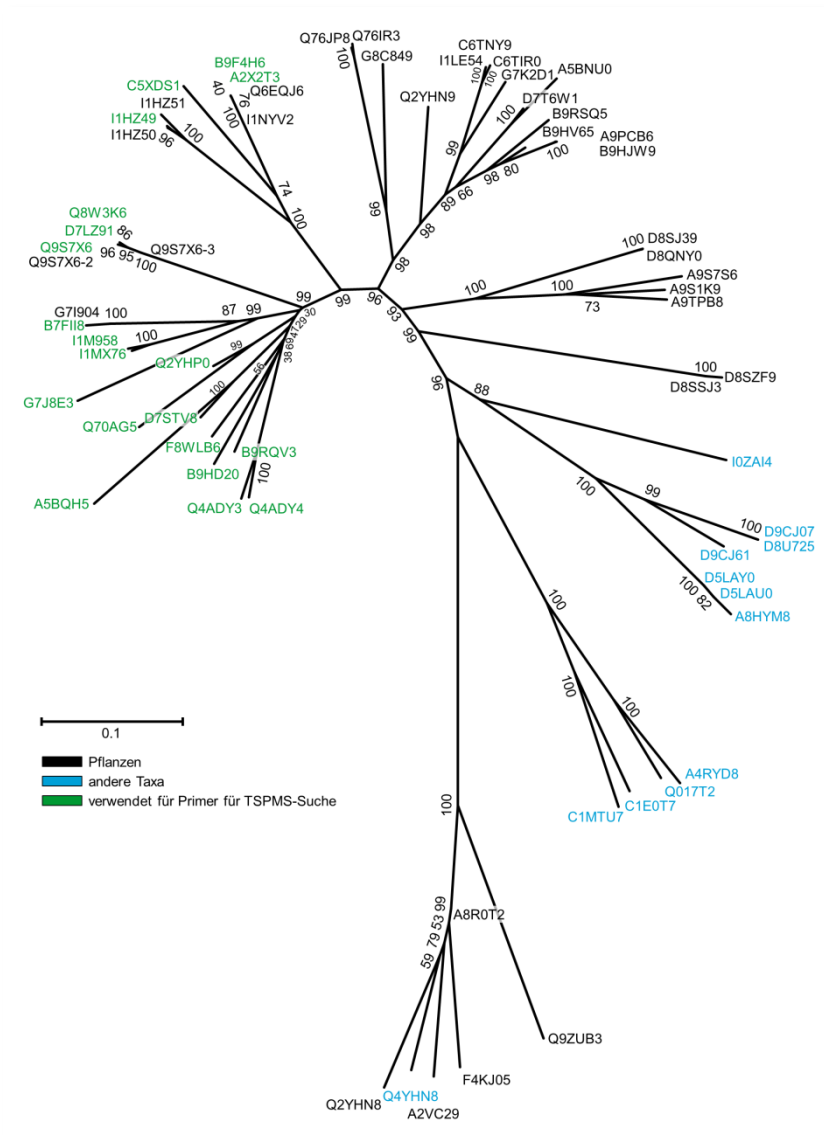


Abbildung 14: Phylogenetischer Baum 3, Proteinsequenzen für phylogenetische Suche nach möglichen TSPMS in *Hordeum vulgare*

Proteinsequenzbezeichnungen: schwarz – pflanzliche Proteinsequenzen, blau – Sequenzen anderer Taxa, grün – für Gestaltung von Wobble-Primern für TSPMS-Suche in *Hordeum vulgare* verwendete Sequenzen; Sequenzen aus BRENDA-, EMBL- und UNI-Prot-Datenbank; Berechnung nach 2.6.2.1./69: Summe der Astlänge = 5,60640175 dargestellt, Bootstraptest mit 1000 Replikaten; 65 Aminosäuresequenzen analysiert, gesamt 774 Positionen im Finaldatensatz, evolutionäre Analyse mit MEGA5 (Tamura, et al., 2011) durchgeführt

3.1.3. Charakterisierung der Proteinfunktion

Die HvSPMS-cDNA-Fragmente wurden in den pQE30-Vektor umkloniert. Nach Protein-Synthese und Reinigung wurden die HvSPMS-Proteine charakterisiert.

3.1.3.1. Umklonierung der *HvSPMS*-cDNA-Sequenzen in den pQE30-Vektor

Nach Ausschneiden (Restriktasen *SalI* und *BamHI*) der *HvSPMS*-cDNA-Fragmente aus den pGEM-T Easy- bzw. pCR2.1-Plasmiden (Restriktionsverdaubanden c [Tabelle 70-VIII/150] und e [Tabelle 70-IX/151]), wurden sie in den geöffneten pQE30-Vektor ligiert [Tabelle 70-VIII-a, b/150 und IX-d/151]. Sequenzierungen der heterolog in *E. coli* exprimierten Plasmide zeigten, dass die *HvSPMS*-cDNA-Fragmente jeweils in 5'→3'-Translationsrichtung in den pQE30-Expressions-Vektor kloniert wurden. Mit der *HvSPMS*-Proteinsynthese wurde fortgefahren [3.1.3.2./80].

3.1.3.2. *HvSPMS*-Proteinsynthese und -Reinigung

Die synthetisierten Proteine [2.4.1./53] der *HvSPMS*-pQE30-Plasmide [3.1.3.1/80] wurden lysiert [2.4.2./53], von den Bakterienproteinen getrennt [2.5.2./58] und in HEPES-Glycerol-Puffer umgepuffert [2.4.3./53].

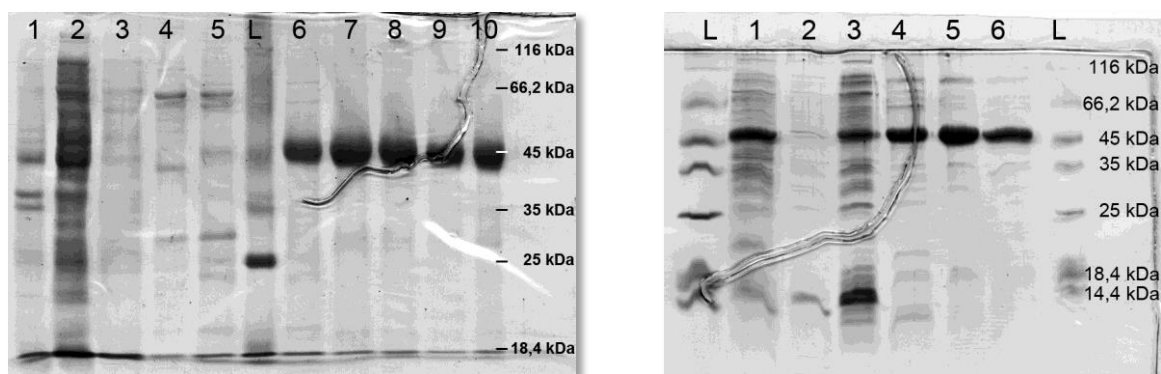


Abbildung 15: SDS-PAGE-Elektropherogramme *HvSPMS*-Proteine

links: SDS-PAGE-Elektropherogramm *HvSPMS1*, Reinigung 05.07.2011; 1 – Pellet, 2 – Lysat, 3 – Durchfluss, 4-5 – Fraktionen 3-4, 6-10 – Fraktionen 5-9 (enthielten *HvSPMS1*-Protein); rechts: SDS-PAGE-Elektropherogramm *HvSPMS2*, Reinigung 29.09.2014; 1 – Pellet, 2 – Durchfluss, 3 – Lysat, 4-6 – Fraktionen 6-8 (enthielten *HvSPMS2*-Protein); L – Fermentas Unstained Protein Molecular Weight Marker SM0431 (Fermentas, 2006)

Die SDS-PAGE [2.5.4./59] zeigte für beide *HvSPMS*-Proteine ein Molekulargewicht von ca. 45 kDa [Abbildung 15/80]. Die Proteinfractionen hatten eine ausreichende Reinheit für die Proteinfunktionsuntersuchungen. Mit der Clonemanager-Software wurden folgende Molekulargewichte der *HvSPMS*-Proteine berechnet: *HvSPMS1* – 42,0895 kDa, *HvSPMS2* – 42,0093 kDa. Demnach war die Synthese und Reinigung der *HvSPMS*-Proteine erfolgreich.

3.1.3.3. Funktionsuntersuchungen

Nach *HvSPMS*-Proteinsynthese und Reinigung [3.1.3.2./80] wurde die enzymatische Katalysefunktion der Proteine *in vitro* [2.4.4.2./55] bestimmt. Das dazu benötigte dcSAM [2.4.4.1./54] enthielt 59,8 % wirksames Diastereomer (*S*-dcSAM (Dejima, et al., 2003)), bei einer Einwaage von 49,8 mg entsprach dies 29,73 mg. Beide Enzyme bildeten mit PUT als Substrat und SAM bzw. dcSAM als Co-Substrat kein *N*-Methylputrescin bzw. SPD. Sie besaßen demnach keine PMT- bzw. SPDS-Aktivität. Beide Enzyme bildeten mit SPD als

Substrat und dem Co-Substrat dcSAM das Produkt SPM. Mit GC-MS-Analytik wurde nachgewiesen, dass beide HvSPMS-Proteine unter den untersuchten Bedingungen ausschließlich SPM und kein TSPM bildeten [Abbildung 16/81].

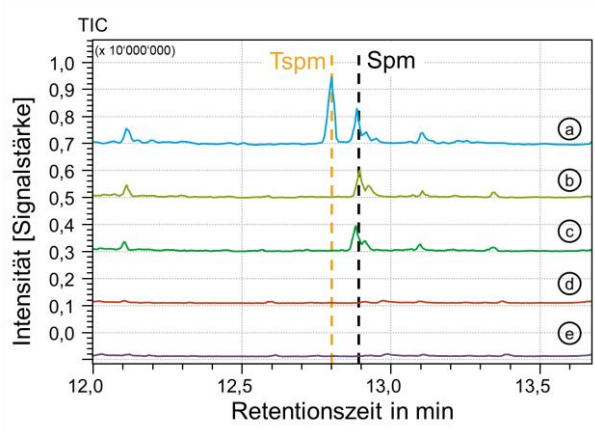


Abbildung 16: GC-MS-Chromatogramm HvSPMS-Funktionsbestimmungsassays

blaue Kurve (a) – wässrige TSPM-SPM-Standardmischung (0,15 mM), hellgrüne Kurve (b) – HvSPMS1- Funktionsbestimmungsassay, grüne Kurve (c) – HvSPMS2- Funktionsbestimmungsassay, rote Kurve (d) – HvSPMS1-Funktionsbestimmungsassay mit denaturiertem Protein (10 min, 95 °C), lila Kurve (e) – HvSPMS2-Funktionsbestimmungsassay mit denaturiertem Protein (10 min, 95 °C); Retentionszeit TSPM – 12,8 min, Retentionszeit SPM – 12,9 min; TIC – Total Ion Count

Die Negativkontrollen mit denaturiertem Protein, gleichen Konzentrationen an Substrat und Co-Substrat und gleichen Inkubationsbedingungen zeigten weder TSPM noch SPM in den Assays. Beide HvSPMS-Proteine besaßen eindeutig und ausschließlich SPMS-Aktivität.

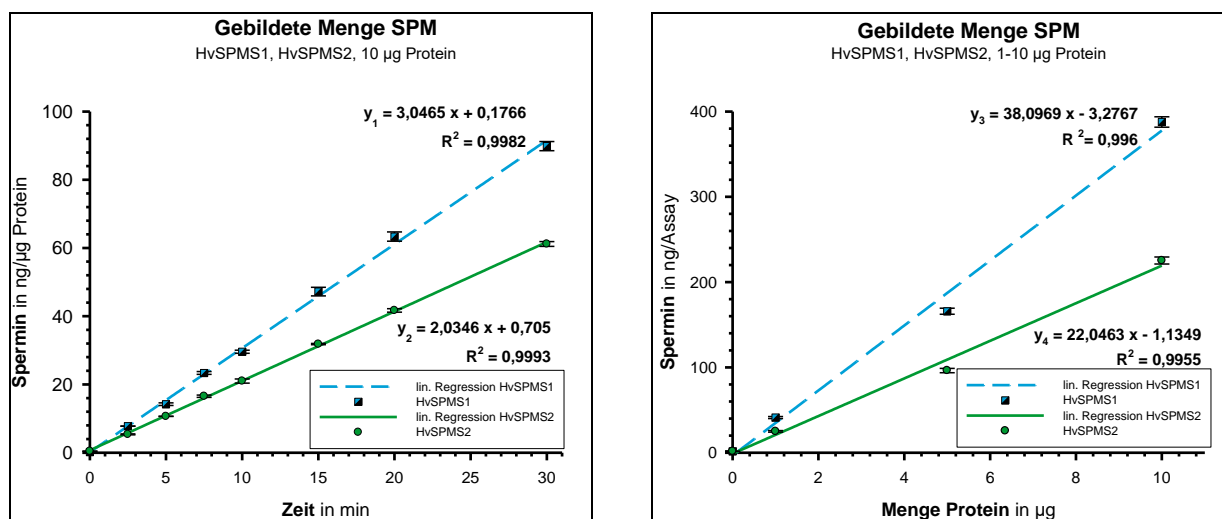


Diagramme 4 (links) und 5 (rechts): Produktbildung in Linearitätsassays V (links) und VII bis IX (rechts), HvSPMS-Proteine

blaue Kurven – von HvSPMS1-Protein gebildete Menge SPM; grüne Kurven – von HvSPMS2-Protein gebildete Menge SPM (links: ng/µg Protein, rechts: ng/Assay); Assay V jeweils 10 µg Protein 0-30 min bei 37 °C inkubiert, Assays VII bis IX (1 µg, 5 µg, 10 µg Protein) jeweils 30 min bei 37 °C inkubiert

In den Linearitätsassays [2.4.4.3./55] wurde der lineare Anstieg des Produktes SPM über die Zeit und abhängig von der Proteinmenge nachgewiesen [Diagramme 4 und 5/81]. Das HvSPMS1-Protein bildete im Vergleich mehr Produkt pro Zeit als das HvSPMS2-Protein. Folgende Regressionsgeradengleichungen wurden für Assay V berechnet:

$$y_{1, \text{HvSPMS1}} = 3,0465 x + 0,1766; R^2_{1, \text{HvSPMS1}} = 0,9982,$$

$$y_{2, \text{HvSPMS2}} = 2,0346 x + 0,705; R^2_{2, \text{HvSPMS2}} = 0,9993.$$

Auch bildete 1 μg HvSPMS2-Protein weniger Produkt als 1 μg HvSPMS1-Protein. Folgende Regressionsgeradengleichungen wurden berechnet:

$$y_{3, \text{HvSPMS1}} = 38,0969 x - 3,2767; R^2_{3, \text{HvSPMS1}} = 0,996,$$

$$y_{4, \text{HvSPMS2}} = 22,0463 x - 1,1349; R^2_{4, \text{HvSPMS2}} = 0,9955.$$

In den Assays VI und X mit denaturiertem Protein wurde erwartungsgemäß keine Produktbildung beobachtet. Mit der kinetischen Charakterisierung der HvSPMS-Proteine wurde fortgefahren.

3.1.4. Kinetische Charakterisierung

3.1.4.1. Bestimmung der pH-Optima

Die Katalysegeschwindigkeiten (v) der HvSPMS-Proteine wurde bei ansteigendem pH-Wert im Proteinassay bestimmt [Diagramm 6/82] [2.4.4.4./56]. Die Kurve des HvSPMS1-Proteins wurde nach der Gauß-Regression (5 Parameter) und die Kurve des HvSPMS2-Proteins wurde nach Weibull-Regression (5 Parameter) berechnet. Für das HvSPMS1- und das HvSPMS2-Protein wurden Maxima bei pH 8,0 bis pH 8,2 und pH 7,8 bis pH 8,2 bestimmt.

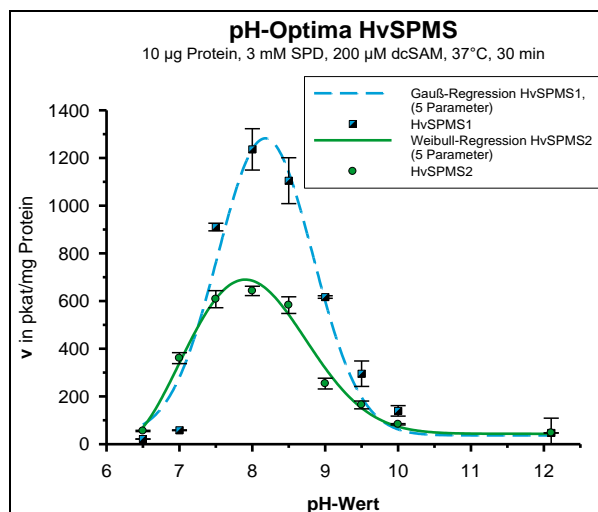


Diagramm 6: Bestimmung der pH-Optima der HvSPMS

blaue Kurve – v HvSPMS1 [pkat/mg Protein], Gauß-Regression (5 Parameter); grüne Kurve – v HvSPMS2 [pkat/mg Protein], Weibull-Regression (5 Parameter); jeweils 10 μg Protein, 3 mM SPD, 200 μM dcSAM pro Assay, Assays jeweils für 30 min bei 37 °C inkubiert

Alle folgenden Assays mit dem HvSPMS1- bzw. HvSPMS2-Protein wurden bei pH 8,1 bzw. 8,0 durchgeführt. Wie zuvor zeigte das HvSPMS1-Protein höhere Aktivität als das HvSPMS2-Protein.

3.1.4.2. Bestimmung der kinetischen Charakteristika

Bei ansteigender Substrat-Konzentration [Diagramme 7 und 8/83] waren für die Sättigung beider Proteine unter den gewählten Assaybedingungen [2.4.4.5./56] sehr hohe Konzentrationen nötig. Die Kurvenverläufe wurden nach Michaelis-Menten-Bedingungen berechnet. Das HvSPMS1-Protein zeigte bei niedrigen und mittleren Co-Substrat-Konzentrationen (a) und (b) ähnliche v_{\max} - und K_m - Werte, bei 600 μM dcSAM (c) waren die Werte für v_{\max} höher und für K_m niedriger.

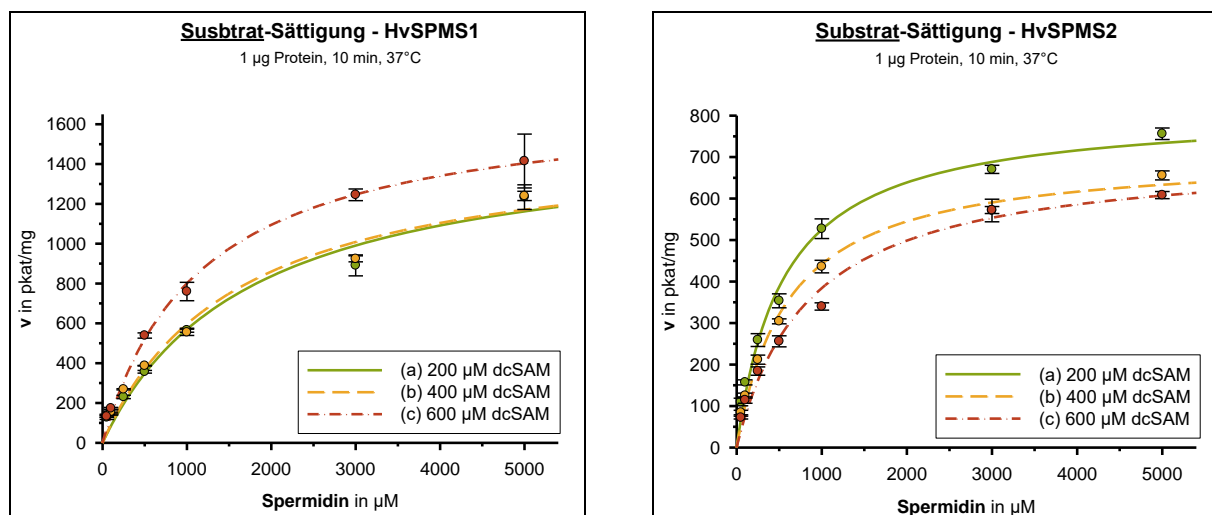


Diagramme 7 (links) und 8 (rechts): Substrat-Sättigung HvSPMS-Proteine

links – Substrat-Sättigung HvSPMS1-Protein; rechts – Substrat-Sättigung HvSPMS2-Protein; pro Assay jeweils 1 μg Protein 10 min mit 3 mM SPD und bei variierender Substrat Konzentration im Assay bei 37 °C inkubiert; hellgrüne (a), gelbe (b), rote (c) Kurven – Konzentration dcSAM c = (a) 200 μM , (b) 400 μM , (c) 600 μM

Das HvSPMS2-Protein zeigte 1,9- bis 2,4-fach geringere v_{\max} - und um 3,2- bis 1,3-fach geringere K_m - Werte als das HvSPMS1-Protein.

Mit ansteigender Co-Substrat-Konzentration nahm v_{\max} des HvSPMS2-Proteins ab und K_m wurde größer [Diagramm 8 (a)-(c)/83; Tabelle 52/83], das zeigt eine Hemmung des HvSPMS2-Enzyms durch das Co-Substrat dcSAM.

dcSAM [μM]	HvSPMS1		HvSPMS2	
	v_{\max} [pkat/mg Protein]	K_m [μM]	v_{\max} [pkat/mg Protein]	K_m [μM]
(a) 200	1'569,9	1'753,2	814,7	551,0
(b) 400	1'541,5	1'585,3	710,0	606,4
(c) 600	1'728,7	1'158,6	710,2	848,0

Tabelle 52: kinetische Parameter HvSPMS-Proteine bei variablen Substrat- und konstanten Co-Substrat- Konzentrationen im Assay
alle Angaben mit SigmaPlot-Software und Enzyme Kinetics-Modul nach Michaelis-Menten-Bedingungen berechnet

Bei ansteigender Co-Substrat-Konzentration wurden beide Proteine mit dem Co-Substrat dcSAM unter den gewählten Assaybedingungen gesättigt [Diagramme 9 und 10/84]. Für das HvSPMS1-Protein wurde der Kurvenverlauf nach Michaelis-Menten-Bedingungen berechnet.

Für das HvSPMS2-Protein wurden der Kurvenverlauf, v_{\max} , K_m und K_i für eine inkompetitive Co-Substrat-Hemmung des Proteins nach Michaelis-Menten-Bedingungen berechnet [Tabelle 53/84]. Bei gleicher K_m war v_{\max} des HvSPMS1-Proteins größer als die des HvSPMS2-Proteins.

Bei unterschiedlichen, innerhalb eines Assays konstanten Substrat-Konzentrationen und variablen Co-Substrat-Konzentrationen wurden keine Veränderungen der v_{\max} - und K_m -Werte beobachtet. Eine Substrathemmung der HvSPMS-Proteine wurde ausgeschlossen (vgl. Beobachtungen Diagramme 9 und 10/84).

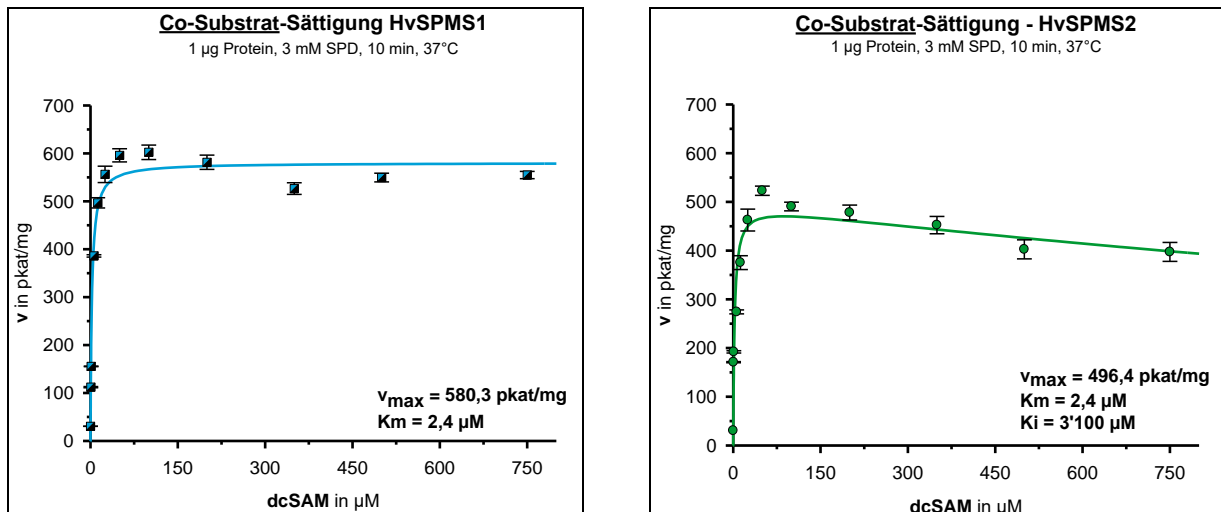


Diagramme 9 (links) und 10 (rechts): Co-Substrat-Sättigung HvSPMS-Proteine

links – Co-Substrat-Sättigung HvSPMS1-Protein, Michaelis-Menten- Kinetik; rechts – Co-Substrat-Sättigung HvSPMS2-Protein, inkompetitive Co-Substrat- Hemmung nach Michaelis-Menten; pro Assay jeweils 1 μg Protein 10 min mit 3 mM SPD und bei variierender Co-Substrat Konzentration im Assay bei 37 °C inkubiert

HvSPMS1		HvSPMS2		
v_{\max} [pkat/mg Protein]	K_m [μM]	v_{\max} [pkat/mg Protein]	K_m [μM]	K_i [μM]
580,3	2,4	496,4	2,4	3'100

Tabelle 53: kinetische Parameter HvSPMS-Proteine bei konstanter Substrat- und variabler Co-Substrat- Konzentration im Assay
alle Angaben mit SigmaPlot-Software und Enzyme Kinetics-Modul nach Michaelis-Menten-Bedingungen für inkompetitiven Hemm-Mechanismus berechnet

3.2. Aktivitätsuntersuchungen der HvSPMS-Gen-Promotoren

Die *HvSPMS*-Gen-upstream-Bereiche wurden durch Genome Walking kloniert, dann sequenziert und in einen für diese Untersuchungen konstruierten binären Ti-Vektor subkloniert. Die Vektorkonstrukte wurden danach transient in Gerstenprotoplasten transformiert. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden Rückschlüsse auf die Aktivität der upstream-Regionen in den untersuchten Protoplasten gezogen, um Informationen über die Regulation der *HvSPMS*-Gene zu bekommen.

3.2.1. Isolierte gDNA aus *Hordeum vulgare* Pflanzen

Aus 1 g frischem Pflanzenblattmaterial 7 das alter Pflanzen wurde 35,7 ng/ μ l ($A_{260}/A_{280} = 1,81$) gDNA isoliert [2.3.14.1./48]. Nach Fällung und Aufkonzentrierung war sie in Konzentration mit 123,0 ng/ μ l ($A_{260}/A_{280} = 1,79$) und Qualität für das anschließende Genome Walking [2.3.14.2./48] geeignet.

3.2.2. Genome Walking und Analyse der upstream-Regionen

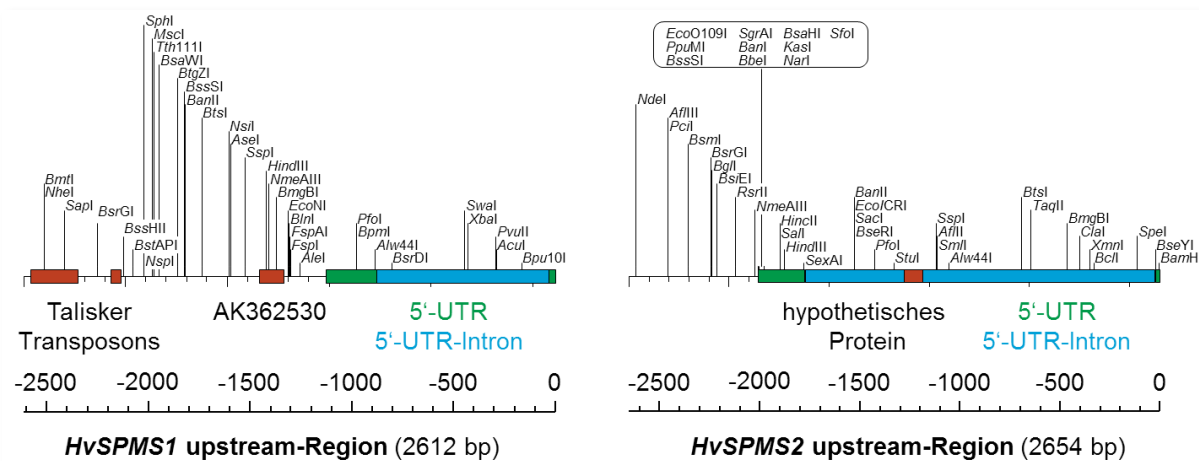
Nach dem ersten Restriktionsverdau der gDNA [3.2.1./85] mit *EcoRV*-Restriktase wurde erwartungsgemäß keine klare Trennung erhalten [Tabelle 70-X/151]. Der zweite Restriktionsverdau mit Ansatz 1 (Restriktasen *DraI*, *PvuII*, *StuI*, *EcoRV*, *SspI* und *PsiI*) zeigte wie erwartet unscharfe Amplifikatbanden und keine klare Trennung [Tabelle 70-XI, XII/151]. Nach der Ligation mit dem GenomeWalker™ Adapter und den Genome Walking-Ranger PCR's wurde für jede PCR-Bibliothek mindestens eine scharfe Amplifikatbande erhalten [Tabelle 70-XIII, XIV a-i, XV, XVI a-n/151]. Die Amplifikate (a-i, a-n) wurden ausgeschnitten und in den pGEM®-T Easy Vektor ligiert [2.3.14.2./48]. Nach Transformation, Kolonie-PCR und Kontroll-Restriktionsverdau aller Bibliotheken wurden ihre Plasmide in mehreren Schritten sequenziert.

Charakteristikum	Länge	Position
<i>HvSPMS1</i> -upstream-Region /	2'612 bp /	
<i>HvSPMS2</i> -upstream-Region	2'654 bp	
in beiden upstream-Regionen gefunden:		
5' UTR	1'127 bp /	0 bp bis – 1'127 bp /
	2'009 bp	0 bp bis – 2'009 bp
5' UTR-Intron	1'096 bp /	– 31 bp bis – 2'009 bp /
	1'748 bp	– 26 bp bis – 1'184 bp
in <i>HvSPMS1</i> -upstream-Region:		
Talisker Transposon 1, 100 % SQI _N	230 bp	– 2'347 bp bis – 2'576 bp
Talisker Transposon 2, 100 % SQI _N	51 bp	– 2'135 bp bis – 2'185 bp
hypothetisches Protein, AK362530, 100 % SQI _N	121 bp	– 1'332 bp bis – 1'453 bp
hypothetisches Protein, AK374734, 100 % SQI _N	253 bp	– 1'127 bp bis – 875 bp
in <i>HvSPMS2</i> -upstream-Region:		
hypothetisches Protein, zu finden bei:		
<i>Hordeum vulgare</i> AK250132, 86 % SQI _N	96 bp	– 1'184 bp bis – 1'279 bp
<i>Hordeum vulgare</i> AK354115.1, 96 % SQI _N	88 bp	– 1'181 bp bis – 1'268 bp
<i>Triticum aestivum</i> HQ390403, 86 % SQI _N	105 bp	– 1'184 bp bis – 1'288 bp

Tabelle 54: Charakteristika der *HvSPMS*-Gen upstream-Regionen

Angaben vor bzw. nach Querstrich für *HvSPMS1*-bzw. *HvSPMS2*-upstream-Regionen; Längen- und Positionsangaben in bp; SQI_N in Prozent nach aligning der Sequenzen in Datenbanken BLAST, EMBL, NIAS; Position = Bindebereich in upstream-Region; UTR – nicht translaterter Bereich; Bezeichnung Datenbankeinträge siehe Tabellen 48/69 und 49/70

Die Analyse der Sequenzen [6.3.7./164 und 6.3.8./165] in den Datenbanken BLAST (Altschul, et al., 1990), EMBL und NIAS (Tanaka, et al., 2013) ergab die in Tabelle 54/85 dargestellten Charakteristika. Abbildung 17/86 zeigt die Genkarten der *HvSPMS*-Gen upstream-Regionen. Die BLAST-Analyse ergab die in Tabelle 55/86 aufgeführten Einträge.

Abbildung 17: Genkarte upstream-Regionen der *HvSPMS*-Gene

5'-UTR in grün, 5'-URT-Intron in blau, charakteristische Regionen [Tabelle 54/85] in rot

Es wird dargestellt, an welche *HvSPMS*-Nukleinsäuren, an welcher Stelle die gefundenen Sequenzen in Alignments banden und wie lang die Basenpaarungen waren.

Bezeichnung	Nukleinsäure, an die gebunden wurde	Länge	Position/SQI _N
AJ864784.1	<i>gHvSPMS1</i> -upstream-Region	281 bp	bp 1-bp 281/92 %
AK250132.1, FLbaf61n02	<i>gHvSPMS2</i> -upstream-Region	107 bp	bp 1'378-bp 1'485/86 %
AK250272.1, FLbaf71m17	<i>HvSPMS1</i> -cDNA	1'008 bp	bp 1-bp 1'008/41 %
AK250627.1, FLbaf92k17	<i>HvSPMS1</i> -cDNA	1'157 bp	bp 87-bp 1'243/100 %
AK250652.1, FLbaf84n09	<i>HvSPMS1</i> -cDNA	1'073 bp	bp 2-bp 1'074/42 %
AK252089.1, FLbaf143115	<i>HvSPMS1</i> -cDNA	1'133 bp	bp 1-bp 1'133/41 %
AK332552.1	<i>HvSPMS1</i> -cDNA	1'157 bp	bp 265-bp 1'475/79 %
	<i>gHvSPMS2</i> -upstream-Region	264 bp	bp 2- bp 264/91 %
	<i>HvSPMS2</i> -cDNA	1'157 bp	bp 265-bp 1'421/96 %
AK354115.1	<i>gHvSPMS2</i> -upstream-Region	100 bp	bp 1'843-bp 1'942/96 %
AK362530.1	<i>gHvSPMS1</i> -upstream-Region	123 bp	bp 2-bp 123/100 %
	<i>HvSPMS1</i> -cDNA	1'157 bp	bp 155-bp 1'311/100 %
AK370244.1	<i>gHvSPMS2</i> -upstream-Region	228 bp	bp 2-bp 229/100 %
	<i>HvSPMS2</i> -cDNA	1'157 bp	bp 258-bp 1'414/99,9 %
AK374734.1	<i>gHvSPMS1</i> -upstream-Region	253 bp	bp 2-bp 254/100 %
	<i>HvSPMS1</i> -cDNA	1'157 bp	bp 286-bp 1'442/ 100 %
HQ390403.1	<i>gHvSPMS2</i> -upstream-Region	105 bp	bp 360-bp 464/86 %

Tabelle 55: BLAST-Datenbank-Analyse *HvSPMS*-Gen-upstream-Regionen

Datenbankeinträge mit EMBL-accessions bezeichnet; Länge – Länge der Basenpaarung des gefundenem Eintrags und entsprechend gebundener Nukleinsäure; Position – Binderegion des gefundenen Eintrags; Alignments in Clonemanager-Software durchgeführt [2.6./66]; Bezeichnung Datenbankeinträge siehe Tabellen 48/69 und 49/70

In den Tabellen 48/69 und 49/70 sind die Bezeichnungen und die annotierten Funktionen dieser Sequenzen nachzulesen. Regulatorische Sequenzmotive der *HvSPMS*-Gen-upstream-Regionen (CIS-Elemente) wurden mit den PLACE- und PlantCARE-Datenbanken

identifiziert. Für Promotor typische und für bestimmte CIS-Elemente spezifische Motive wurden identifiziert. Für die *HvSPMS1*- bzw. *HvSPMS2*-Gen-upstream-Region wurden 217 bzw. 183 mögliche Motive ermittelt [6.5./169].

3.2.3. Vektorkonstruktion

Die Subklonierung der *mCherry*-Kassette in den pGreen-Vektor war erfolgreich. Nach Restriktionsverdau (Restriktasen *BstXI* und *SpeI*) des pGreen-red-Vektors aus Klon 3 wurden erwartungsgemäß Fragmente der Länge 5,1 Kbp (Intensität 65%) und 3,0 Kbp (Intensität 35%) beobachtet [Tabelle 70-XVII/152]. Die 6-8 Kbp-lange Restriktionsverdaubande von Klon 13 könnte von zwei oder mehr Insertionen der *mCherry*-Kassette in den pGreen-Vektor stammen. Für die weitere Klonierung wurde das isolierte Plasmid von Klon 3 verwendet.

Die sich anschließende Subklonierung der *eYFP*-Kassette in den pGreen-red-Vektor war erfolgreich, der Restriktionsverdau (Restriktasen *AflIII* und *BstBI*) des pGreen-red-yellow-Vektors zeigte das erwartete Muster [Tabelle 70-XVIII/152]: Banden bei 5,7 Kbp (Intensität 65 %), 2,2 Kbp (Intensität 25 %) und 904 bp (Intensität 10 %). Der Restriktionsverdau von Klon 1 zeigte eine ungenaue Trennung zweier 5-6 Kbp-langen Fragmente. Die gepickte Kolonie war evtl. verunreinigt, für die weitere Arbeit wurde Klon 8 verwendet.

Anschließend wurden der *Ubi*-Promotor und die upstream-Regionen der *HvSPMS*-Gene in den pGreen-red-yellow-Vektor subkloniert. Die Restriktionsverdaus des pGreen-red-*mUBI*-yellow-Vektors (Restriktase *AflIII*) (A), des pGreen-red-*upHvSPMS1*-yellow-Vektors (Restriktase *XmaI*) (B) und des pGreen-red-*upHvSPMS2*-yellow-Vektors (Restriktase *SalI*) (C) zeigten die zu erwartenden Muster [Tabelle 70-XIX bis XXI /152]:

(A) 8,0 Kbp (Intensität 77 %) und 2,3 Kbp (Intensität 23 %),

(B) 7,2 Kbp (Intensität 64%), 1,7 Kbp (Intensität 20 %) und 1,2 Kbp (Intensität 16 %),

(C) 8,9 Kbp (Intensität 77 %), 2,0 Kbp (Intensität 17 %) und 904 bp (Intensität 6 %)

Für die transiente Protoplastentransformation [3.2.4./87] wurden die Plasmide der Klone 8 (A), 2 (B) und 26 (C) verwendet.

3.2.4. Protoplastenisolation und -Transformation

Intakte Protoplasten unterschiedlicher Größe wurden beobachtet [6.6.3./185], die Protoplastenisolation [2.3.14.4./51] war erfolgreich. In 0,2 µl Suspension befanden sich ca. 119 Protoplasten [Tabelle 56/87].

Zählung	Anzahl Protoplasten				Mittelwert
	Feld 1	Feld 2	Feld 3	Feld 4	
a	112	123	116	132	120,75
b	121	114	117	114	116,50
c	120	114	117	124	118,75
Anzahl Protoplasten jeweils gezählt in 0,2 µl (0,2 mm ³) Suspension					Ø = 118,66 ≈ 119
berechnete Anzahl Protoplasten in 5,0 ml Suspension:					2,975 · 10 ⁶
berechnetes Vol Suspension für 2,0 · 10 ⁶ Protoplasten:					3,37 ml

Tabelle 56: Bestimmung der Protoplastenzelldichte mit Fuchs-Rosenthal-Kammer 0,2 mm³ Protoplasten-W5-Lösung-Suspension pro Zählfeld, Dreifachbestimmung

Für die transiente Protoplastentransformation wurden $2,0 \cdot 10^6$ Protoplasten verwendet, sie wurde mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet [3.2.5./88].

3.2.5. Fluoreszenzmikroskopie

Mit der rot fluoreszierenden *mCherry*-Proteinkassette wurde getestet, ob die Gerstenprotoplasten nach der Transformation die Plasmidkonstrukte trugen. Mit der gelb fluoreszierenden *eYFP*-Proteinkassette wurde die Aktivität der Ubiquitin-Promotor (*pUBI*)- bzw. die vermuteten Gerste-SPMS-Promotor (*pHvSPMS1/2*)-Regionen den transient transformierten Protoplasten getestet. Der Plasmidkonstrukt-Transfer und die Protoplasten-Transformation waren erfolgreich, die Promotoren waren aktiv [Abbildung 18/88]. Die Methode eignete sich demnach zur Untersuchung der Aktivität von Promotoren in Gerste.

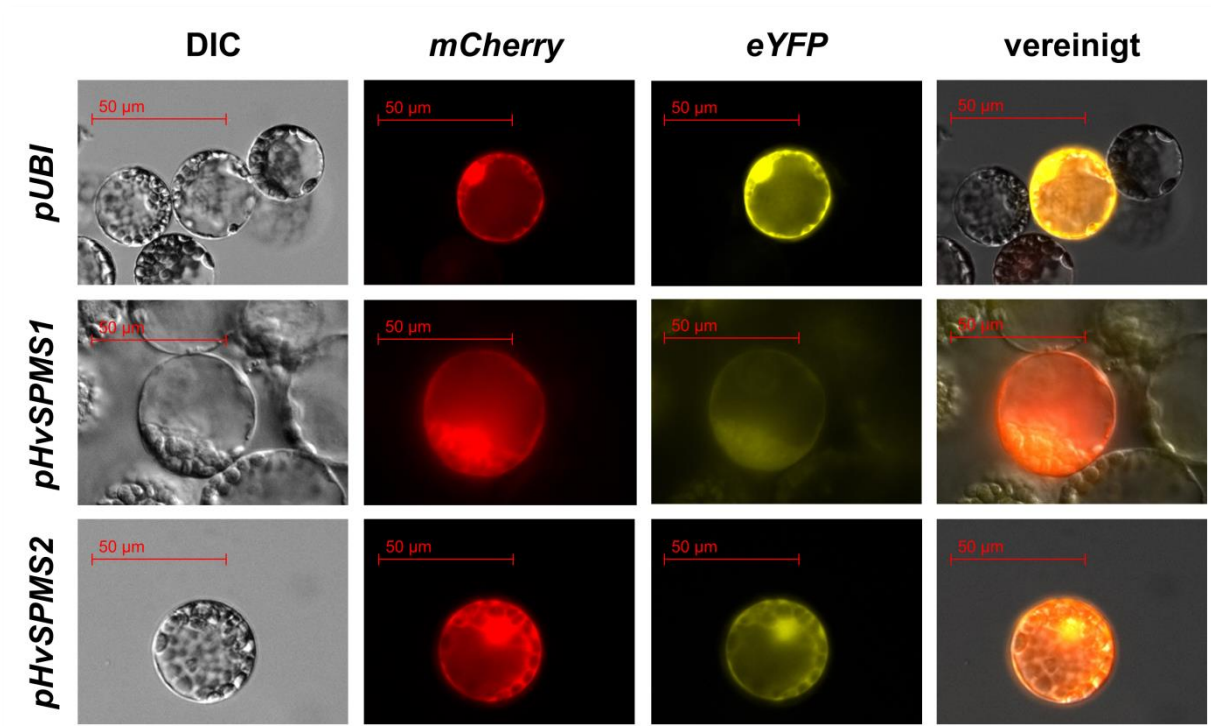


Abbildung 18: Zusammenfassung der Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie

DIC - Nomarski Differentialinterferenzkontrastmethode, *mCherry* – rot fluoreszierendes Protein (λ_{em} : 550-580 nm, λ_{ex} : 590-650 nm), *eYFP* – gelb fluoreszierendes Protein (λ_{em} : 150-490 nm, λ_{ex} : 500-550 nm), *pUBI* – Ubiquitinpromotor, *pHvSPMS1/2* – vermeintliche *HvSPMS1* o. 2-Promotoren; Fotografien aufgenommen mit Axio-Observer Z.1 Mikroskop (Filtersätze 38 HE und 31) [2.1.5./17] und AxioVision Software; Belichtungsintensität von Fotografien der mit *pHvSPMS*-Konstrukten transformierten Protoplasten auf Niveau der mit *pUBI*-Konstrukten transformierten Protoplasten erhöht

In den mit den *pHvSPMS1/2*-Konstrukten transformierten Suspensionen zeigten weniger Protoplasten gelbe Fluoreszenz als in den mit dem *pUBI*-Konstrukt transformierten Suspensionen. Außerdem war ihre Fluoreszenzintensität geringer (nur qualitativ bestimmt). Es wurden wahrscheinlich weniger Protoplasten transformiert und die Aktivität der *pSPMS* war unter den getesteten Bedingungen geringer Aktivität des *pUbi*. Dennoch war sie

vorhanden. Die gelbe Fluoreszenzintensität der mit den *pHvSPMS1*-Konstrukten transformierten Protoplasten war geringer als die der mit den *pHvSPMS2*-Konstrukten transformierten Protoplasten (nur qualitativ bestimmt).

3.3. Trockenstressexperimente

Die relativen Transkriptexpressionsraten (rTER) der *HvSPMS*-Gene und der PA-Gehalte der Gerstenpflanzen wurden in drei TrStr-Experimenten untersucht, um Rückschlüsse auf die Induktion der *HvSPMS*-Gene und -Enzyme bei TrStr ziehen zu können.

Die rTER-Werte der *HvSPMS*-Gene von Kontroll- und gestressten Pflanzen wurden innerhalb eines Stadiums und zwischen verschiedenen Stadien ins Verhältnis gesetzt. Quotienten verschiedener Stressgruppen (z.B. rTER-Wert 10 % WN (A) bezogen auf 20 % WN (C)) wurden nicht berechnet. Sie zeigen nur an, welche Pflanzengruppen gegenüber den anderen erhöhte bzw. verminderte rTER-Werte besitzen. Sie ergeben keinen Informationszugewinn gegenüber Quotienten eines Wachstumsstadiums oder Quotienten gleich gestresster Pflanzen verschiedener Wachstumsstadien.

Die experimentellen Voraussetzungen waren für den Vergleich der rTER der *HvSPMS*-Gene untereinander ungeeignet [4.3./131].

3.3.1. Trockenstressexperiment 2012

Aufgrund des hohen Pflanzenmaterialverbrauchs der RNA-Isolation wurden die Gerstenpflanzen des TrStr-Experiments nur mittels qRT-PCR-Analyse [2.3.5.4./38] untersucht [Diagramme 11/90 bis 14/90, Tabellen 57/91 und 58/92]. Die PA-Gehalte der Pflanzen wurden nicht ermittelt.

In allen untersuchten Stadien wurden innerhalb des Stadiums bei steigendem TrStr ansteigende rTER-Werte beider *HvSPMS*-Gene beobachtet: Das *HvSPMS1*-Gen zeigte gegenüber Kontrollniveau signifikant erhöhte rTER-Werte in (A), (C) und (D) ab 20 % WN, in (B) nur bei 40 % WN. In (B) waren sie bei 10 % WN nicht signifikant erhöht. Das *HvSPMS2*-Gen zeigte gegenüber den Kontrollen signifikant erhöhte rTER-Werte in (A) ab 40 % WN, in (B), (C) und (D) ab 20 % WN.

Die *HvSPMS*-Gene reagierten auch unterschiedlich in den verschiedenen Stadien auf TrStr.

In (A) und (B) waren die rTER-Werte beider *HvSPMS*-Gene innerhalb einer Stressgruppe (z.B. 40 % WN) jeweils kleiner als die in (C) und (D). In (C) und (D) wiederum stiegen die rTER-Werte der *HvSPMS*-Gene der gestressten Pflanzen gegenüber Kontrollniveau ab 20 % WN jeweils stärker an als in (A) und (B). Auffallend war, dass die rTER-Werte beider *HvSPMS*-Gene der Kontrollen (v.a. beim *HvSPMS2*-Gen) in (C) und (D) höher waren als in (A) und (B). Verglichen mit den anderen Stadien waren die rTER-Werte der *HvSPMS*-Gene der gestressten Pflanzen in (B) gegenüber den Kontrollen nur wenig erhöht.

Diese ersten Beobachtungen sollten im TrStr-Experiment von 2013 weiter untersucht werden [3.3.2./93].

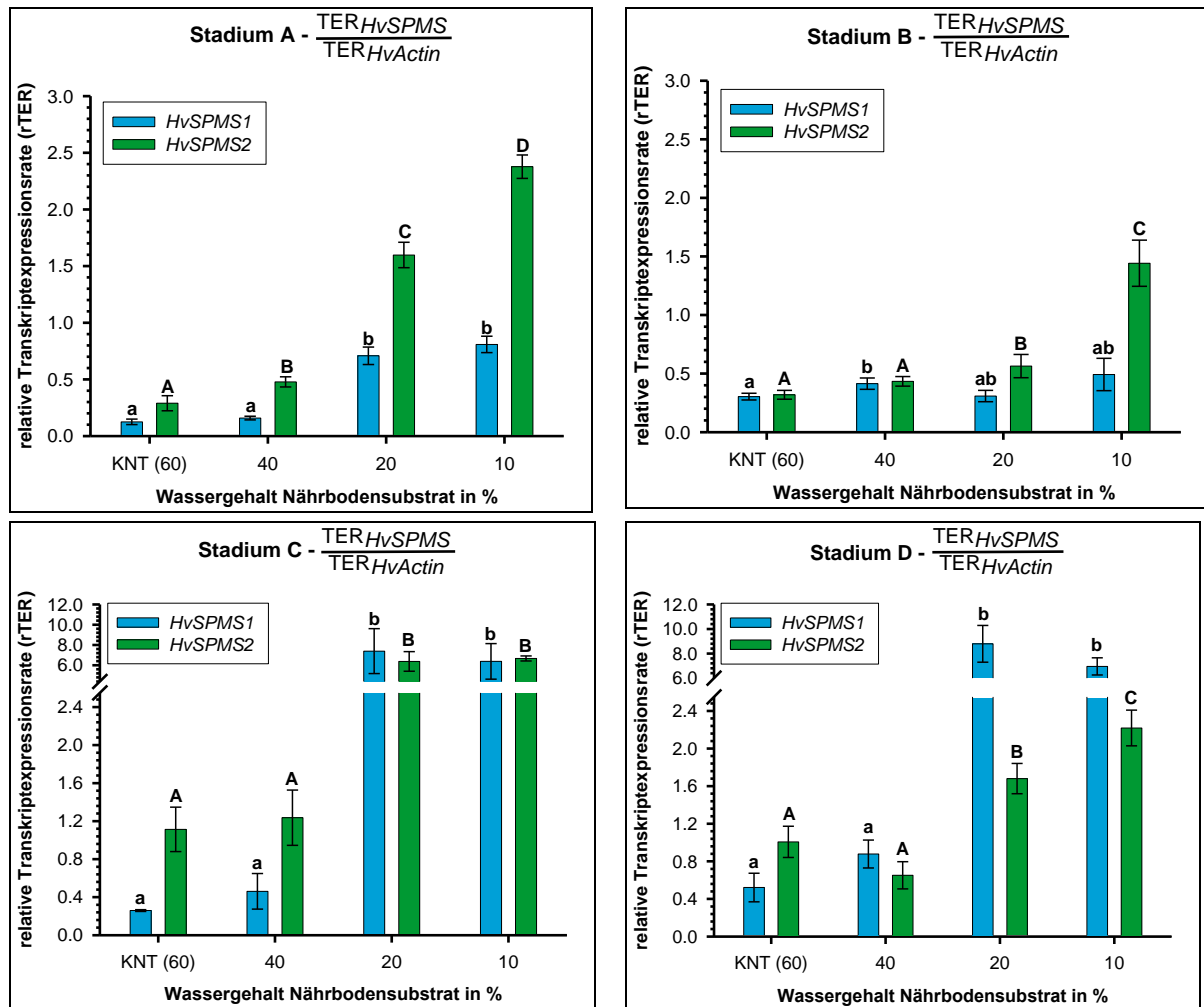


Diagramme 11, 12 (oben links und rechts), 13 und 14 (unten links und rechts): Relative *HvSPMS*-Transkriptexpression im Trockenstressexperiment 2012, Stadien A-D relative Transkriptexpressionsrate (rTER) dargestellt (TER_{HvSPMS} -Gene bezogen auf $TER_{HvActin}$); blaue Balken – rTER-Werte *HvSPMS1*, dunkelgrüne Balken – rTER-Werte *HvSPMS2*, KNT – Kontrolle (60 % WN), 40-10 % – TrStr-Stadien (% WN); Säulenbeschriftungsindizes a-b, bzw. A-C – Signifikanzen der rTER-Werte *HvSPMS1* und *HvSPMS2*: ein- und zweiseitige Anova-Analyse (Holm-Sidak-Methode) und t-Test: signifikante Unterschiede bei $p \leq 0,05$, ungleiche oder gleiche Buchstaben $\hat{=}$ signifikant oder nicht signifikant unterschiedlich

<i>HvSPMS1</i>	Stadium A				Stadium B				Stadium C				Stadium D				
	KNT	40 %	20 %	10 %	KNT	40 %	20 %	10 %	KNT	40 %	20 %	10 %	KNT	40 %	20 %	10 %	
A	KNT	1,0	1,3 (-)	5,7 (-)	6,5 (-)	2,4 (-)				2,1 (-)				4,2 (-)			
	40 %	1,3 (+)	1,0	4,5 (-)	5,1 (-)		2,6 (-)			2,9 (-)				5,5 (-)			
	20 %	5,7 (+)	4,5 (+)	1,0	1,1 (-)		2,3 (+)			10,4 (-)				12,4 (-)			
	10 %	6,5 (+)	5,1 (+)	1,1 (+)	1,0			1,6 (+)			7,9 (-)				8,6 (-)		
B	KNT	2,4 (+)				1,0	1,4 (-)	1,0	1,6 (-)	1,2 (+)				1,7 (-)			
	40 %		2,6 (+)			1,4 (+)	1,0	1,3 (+)	1,2 (-)		1,1 (-)			2,1 (-)			
	20 %			2,3 (-)		1,0	1,3 (-)	1,0	1,6 (-)			24,0 (-)			28,5 (-)		
	10 %				1,6 (-)	1,6 (+)	1,2 (+)	1,6 (+)	1,0			13,0 (-)				14,1 (-)	
C	KNT	2,1 (+)				1,2 (-)				1,0	1,8 (-)	28,5 (-)	24,6 (-)	2,0 (-)			
	40 %		2,9 (+)				1,1 (+)			1,8 (+)	1,0	16,0 (-)	13,8 (-)		1,9 (-)		
	20 %			10,4 (+)				24,0 (+)		28,5 (+)	16,0 (+)	1,0	1,2 (+)		1,2 (-)		
	10 %				7,9 (+)				13,0 (+)	24,6 (+)	13,8 (+)	1,2 (-)	1,0			1,1 (-)	
D	KNT	4,2 (+)				1,7 (+)				2,0 (+)				1,0	1,7 (-)	16,8 (-)	13,3 (-)
	40 %		5,5 (+)				2,1 (+)				1,9 (+)			1,7 (+)	1,0	10,0 (-)	7,9 (-)
	20 %			12,4 (+)				28,5 (+)				1,2 (+)		16,8 (+)	10,0 (+)	1,0	1,3 (+)
	10 %				8,6 (+)				14,1 (+)			1,1 (+)		13,3 (+)	7,9 (+)	1,3 (-)	1,0
Verhältnis rTER:		#,# (+) – #,#-fach erhöht				#,# = 1,0				#,# (-) – #,#-fach vermindert							
Signifikanzniveau:		#,# ≥ 6,0	6,0 > #,# ≥ 2,5	2,5 > #,# > 1,0						-1,0 > #,# > -2,5	-2,5 ≥ #,# > -6,0	-6,0 ≥ #,#					
Signifikanzniveau:		∴ – p ≤ 0,001	∴ – p ≤ 0,01	. – p ≤ 0,05	Wert ohne Punkt – nicht signifikant												

Tabelle 57: Vergleich der rTER-Werte *HvSPMS1* zwischen Wachstumsstadien A-D, Trockenstressexperiment 2012

Verhältnis Mittelwerte der rTER-Werte der einzelnen Stressphasen der unterschiedlichen Wachstumsstadien berechnet; KNT – Kontrolle; 40 %, 20 %, 10 % – WN, K bei 60 % WN; Signifikanzniveau nach Punktezahl: ∴ – p ≤ 0,001, ∴ – p ≤ 0,01, . – p ≤ 0,05, keine Punkte – keine signifikanten Unterschiede; #,# (+) – rTER-Werte #,#-fach erhöht: rote, gelbe, hellgrüne Markierung – Stärke der Erhöhung; #,# (-) – rTER-Werte auf #,#-fach vermindert: dunkelgrüne, hellblaue, dunkelblaue Markierung – Stärke der Verminderung; leere Felder – Verhältnisse der rTER-Werte nicht dargestellt

<i>HvSPMS2</i>	Stadium A				Stadium B				Stadium C				Stadium D				
	KNT	40 %	20 %	10 %	KNT	40 %	20 %	10 %	KNT	40 %	20 %	10 %	KNT	40 %	20 %	10 %	
A	KNT	1,0	.1,7 (-)	∶5,5 (-)	∶8,2 (-)	1,1 (-)				.3,8 (-)				3,5 (-)			
	40 %	.1,7 (+)	1,0	∶3,3 (-)	∶5,0 (-)		1,1 (+)				.2,6 (-)				1,4 (-)		
	20 %	∶5,5 (+)	∶3,3 (+)	1,0	∶1,5 (-)			∶2,8 (+)				∶4,0 (-)			1,1 (-)		
	10 %	∶8,2 (+)	∶5,0 (+)	∶1,5 (+)	1,0				∶1,6 (+)			∶2,8 (-)				1,1 (+)	
B	KNT	1,1 (+)				1,0	1,4 (-)	.1,8 (-)	∶4,5 (-)	.3,5 (-)				∶3,2 (-)			
	40 %		1,1 (-)			1,4 (+)	1,0	1,3 (-)	∶3,3 (-)		∶2,8 (-)				1,5 (-)		
	20 %			∶2,8 (-)		.1,8 (+)	1,3 (+)	1,0	∶2,6 (-)			∶11,3 (-)			∶3,0 (-)		
	10 %				∶1,6 (-)	∶4,5 (+)	∶3,3 (+)	∶2,6 (+)	1,0				∶4,6 (-)			∶1,5 (-)	
C	KNT	.3,8 (+)				.3,5 (+)				1,0	1,1 (-)	∶5,7 (-)	∶6,0 (-)	1,1 (+)			
	40 %		.2,6 (+)				∶2,8 (+)			1,1 (+)	1,0	∶5,2 (-)	∶5,4 (-)		1,9 (+)		
	20 %			∶4,0 (+)				∶11,3 (+)		∶5,7 (+)	∶5,2 (+)	1,0	1,0			∶3,8 (+)	
	10 %				∶2,8 (+)			∶4,6 (+)		∶6,0 (+)	∶5,4 (+)	1,0	1,0			∶3,0 (+)	
D	KNT	∶3,5 (+)				∶3,2 (+)				1,1 (-)				1,0	1,5 (+)	.1,7 (-)	∶2,2 (-)
	40 %		1,4 (+)				1,5 (+)				1,9 (-)			1,5 (-)	1,0	∶2,6 (-)	∶3,4 (-)
	20 %			1,1 (+)				∶3,0 (+)				∶3,8 (-)		.1,7 (+)	∶2,6 (+)	1,0	∶1,3 (-)
	10 %				1,1 (-)			∶1,5 (+)				∶3,0 (-)		∶2,2 (+)	∶3,4 (+)	∶1,3 (+)	1,0
Verhältnis rTER:		#,# (+) – #,#-fach erhöht				#,# = 1,0				#,# (-) – #,#-fach vermindert							
		#,# ≥ 6,0		6,0 > #,# ≥ 2,5		2,5 > #,# > 1,0				-1,0 > #,# > -2,5		-2,5 > #,# > -6,0		-6,0 ≥ #,#			
Signifikanzniveau:		∶ – p ≤ 0,001		∶ – p ≤ 0,01		. – p ≤ 0,05		Wert ohne Punkt – nicht signifikant									

Tabelle 58: Vergleich der rTER-Werte *HvSPMS2* zwischen Wachstumsstadien A-D, Trockenstressexperiment 2012

Verhältnis Mittelwerte rTER-Werte einzelner Stressphasen der unterschiedlichen Wachstumsstadien berechnet; KNT – Kontrolle 60 % WN; 40 %, 20 %, 10 % – WN; Signifikanzniveau nach Punktezahl: ∶ – p ≤ 0,001, ∶ – p ≤ 0,01, . – p ≤ 0,05, keine Punkte – keine signifikanten Unterschiede; #,# (+) – rTER-Werte #,#-fach erhöht: rote, gelbe, hellgrüne Markierung – Stärke der Erhöhung; #,# (-) – rTER-Werte auf #,#-fach vermindert: dunkelgrüne, hellblaue, dunkelblaue Markierung – Stärke der Verminderung; leere Felder – Verhältnisse der rTER-Werte nicht dargestellt

3.3.2. Trockenstressexperiment 2013

Der Versuchsaufbau von 2012 wurde 2013 geändert. Die Pflanzen wurden in zwei Gruppen für die Bestimmung des PA-Gehaltes und die Untersuchung der Regulation der Transkriptabundanz der *HvSPMS*-Gene unterteilt [2.2.2.2./30]. Jedem TrStr-Stadium wurde seine Kontrollgruppe zugeordnet, um in beiden Gruppen gleich alte Pflanzen, die unter identischen Bedingungen kultiviert wurden, untersuchen zu können.

3.3.2.1. Regulation der Transkriptabundanz der *HvSPMS*-Gene

In allen Wachstumsstadien wurden mit zunehmendem TrStr gegenüber den Kontrollen ansteigende rTER-Werte beider *HvSPMS*-Gene der gestressten Pflanzen beobachtet [Diagramme 15/94 bis 18/94, Tabellen 60/95 und 61/96]. Innerhalb der Stadien zeigten die *HvSPMS*-Gene der gestressten Pflanzen gegenüber den Kontrollen unterschiedliche Reaktionen auf TrStr [Tabelle 59/93].

Gen	signifikant erhöhte rTER-Werte der Stadien bei x % WN							
	(A)		(B)		(C)		(D)	
<i>HvSPMS1</i>	10 %	40 %	20 %	10 %	20 %	10 %	20 %	10 %
<i>HvSPMS2</i>	20 %	10 %	10 %		10 %		kein Unterschied	

Tabelle 59: Regulation der *HvSPMS*-Gene in (A) bis (D), Trockenstressexperiment 2013 gegenüber Kontrollen signifikant erhöhte rTER-Werte der *HvSPMS*-Gene in den Wachstumsstadien (A) bis (D), Farbzuordnung nach Stressintensität: grün – 40 % WN, gelb – 20 % WN, rot – 10 % WN

Mit Ausnahme von (A) waren die rTER-Werte des *HvSPMS1*-Gens der gestressten Pflanzen bereits bei leichtem und moderatem TrStr in (B), (C) und (D) signifikant erhöht. Beim *HvSPMS2*-Gen waren sie mit Ausnahme von (D) erst bei starkem TrStr gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht. In (A) verhielt es sich bei beiden Genen umgekehrt. In (D) zeigte das *HvSPMS2*-Gen der gestressten Pflanzen gegenüber den Kontrollen keine signifikant erhöhten rTER-Werte.

Mit Ausnahme von *HvSPMS2* in (D) zeigten sich bei beiden *HvSPMS*-Genen in (C) und (D) gegenüber den Kontrollen stärker signifikant erhöhte rTER-Werte der gestressten Pflanzen als in (A) und (B). Dies wurde in ähnlicher Form bereits im TrStr-Experiment von 2012 beobachtet. Ebenfalls wurde 2013 beobachtet, dass die Kontrollen der rTER-Werte beider Gene innerhalb der und zwischen den Stadien schwankten und dass die *HvSPMS*-Gene in den verschiedenen Stadien unterschiedliche Reaktionen auf den TrStr zeigten:

Im TrStr-Experiment von 2012 waren die rTER-Werte der gestressten Pflanzen der *HvSPMS*-Gene waren mit Ausnahme von (B) in allen Stadien ab 20% WN signifikant gegenüber Kontrollniveau erhöht. Im Experiment von 2013 wurde dies mit Ausnahme von (A) für das *HvSPMS1*-Gen bestätigt. Die rTER-Werte des *HvSPMS2*-Gens wiederum bestätigten diese Beobachtung mit Ausnahme von (A) nicht. Die rTER-Werte waren erst bei 10 % WN bzw. in (D) gar nicht signifikant erhöht. Durch die zusätzliche Bestimmung der rTER-Werte der

HvSPMS-Gene von Kontrollpflanzen in jeder TrStr-Abstufung wurde der tatsächliche Unterschied der rTER-Werte zwischen Kontrollen und gestressten Pflanzen präziser als im Experiment von 2012 bestimmt.

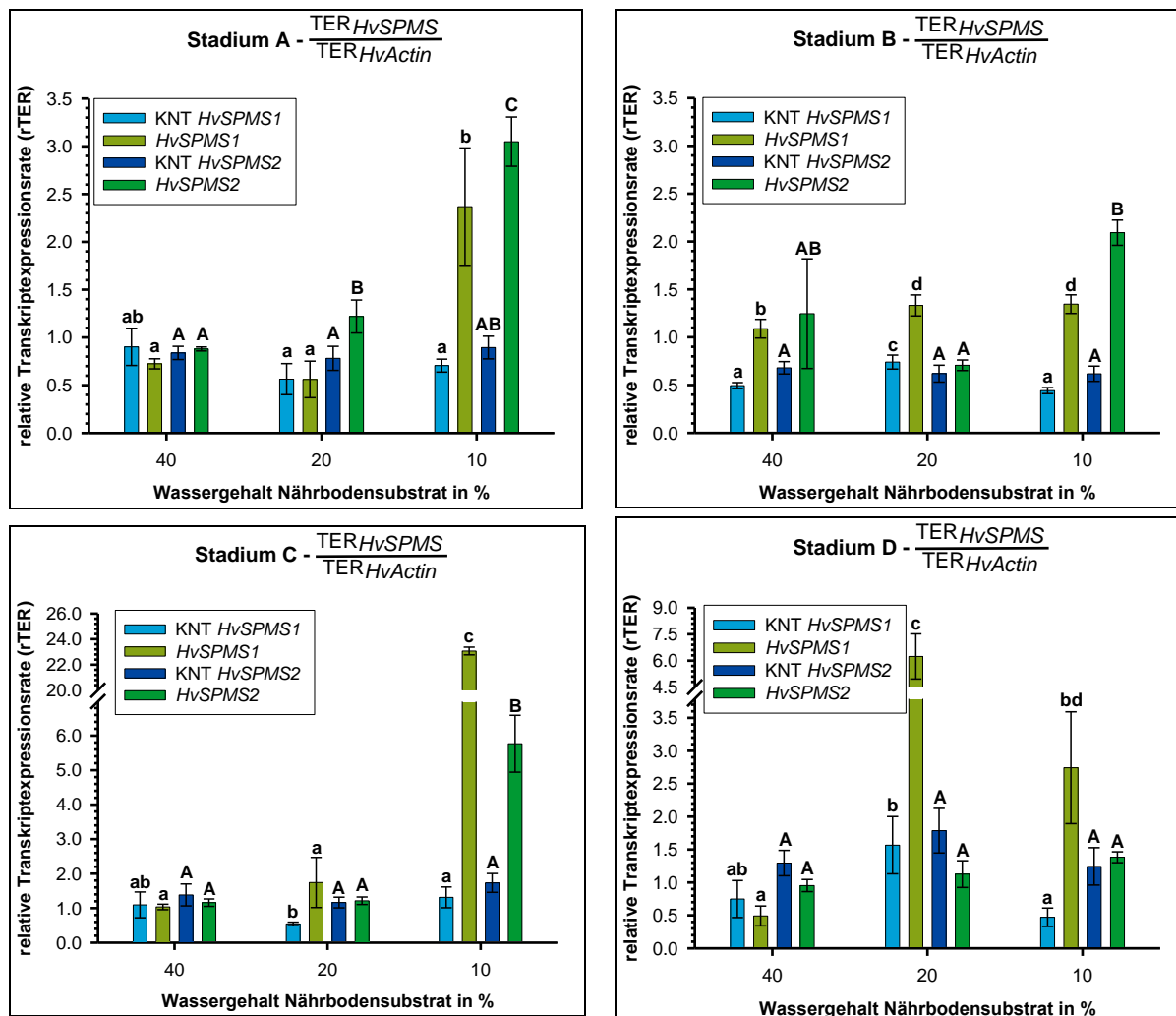


Diagramme 15, 16 (oben links und rechts), 17 und 18 (unten links und rechts): Relative *HvSPMS*-Transkriptexpression Trockenstressexperiment 2013, Stadien A-D relative Transkriptexpressionsrate (rTER) dargestellt; hellblaue Balken – rTER *HvSPMS1* Kontrolle (KNT, 60 % WN), hellgrüne Balken – *HvSPMS1* TrStr-Stadien 40-10 % WN; dunkelblaue Balken – rTER *HvSPMS2* KNT (60 % WN), dunkelgrüne Balken – *HvSPMS2* TrStr-Stadien 40-10 % WN; Säulenbeschriftungsindizes a-d und A-C – Signifikanzen der rTER Werte von *HvSPMS1* und *HvSPMS2*: ein- und zweiseitige Anova-Analyse (Holm-Sidak Methode) und t-Test durchgeführt: signifikante Unterschiede bei $p \leq 0,05$, ungleiche oder gleiche Buchstaben $\hat{=}$ signifikant oder nicht signifikant verschieden

<i>HvSPMS1</i>	Stadium A						Stadium B						Stadium C						Stadium D							
	K 40	40	K 20	20	K 10	10	K 40	40	K 20	20	K 10	10	K 40	40	K 20	20	K 10	10	K 40	40	K 20	20	K 10	10		
A	K 40	1,0	1,2 (+)	1,6 (+)	1,6 (+)	1,3 (+)	2,6 (-)	1,8 (+)		1,2 (+)		2,0 (+)		1,2 (-)		1,7 (+)		1,5 (-)		1,2 (+)		1,7 (-)		1,9 (+)		
	40	1,2 (-)	1,0	1,3 (+)	1,3 (+)	1,0	-3,3 (-)		1,5 (-)					1,4 (-)						1,5 (+)						
	K 20	1,6 (-)	1,3 (-)	1,0	1,0	1,3 (-)	-4,2 (-)	1,1 (+)		1,3 (-)		1,3 (+)		1,9 (-)		1,0		2,3 (-)		1,3 (-)		2,8 (-)		-1,2 (+)		
	20	1,6 (-)	1,3 (-)	1,0	1,0	1,3 (-)	-4,2 (-)			2,4 (-)						-3,1 (-)							-11,1 (-)			
	K 10	1,3 (-)	1,0	1,3 (+)	1,3 (+)	1,0	-3,4 (-)	-1,4 (+)		1,0		-1,6 (+)		1,6 (-)		1,3 (+)		1,9 (-)		1,1 (-)		2,2 (-)		1,5 (+)		
	10	2,6 (+)	-3,3 (+)	-4,2 (+)	-4,2 (+)	-3,4 (+)	1,0						1,8 (+)										-9,7 (-)			
B	K 40	1,8 (-)		1,1 (-)		1,4 (-)		1,0	-2,2 (-)	-1,5 (-)	-2,7 (-)	1,1 (+)	-2,7 (-)	2,2 (-)		1,1 (-)		-2,7 (-)		1,5 (-)		-3,2 (-)		1,0		
	40		1,5 (+)					2,2 (+)	1,0	1,5 (+)	-1,2 (-)	2,5 (+)	1,2 (-)		1,1 (+)					2,2 (+)						
	K 20	1,2 (-)		1,3 (+)		1,0		1,5 (+)	-1,5 (-)	1,0	-1,8 (-)	-1,7 (+)	-1,8 (-)	1,5 (-)		1,4 (+)		1,8 (-)		1,0		2,1 (-)		1,6 (+)		
	20				2,4 (+)			2,7 (+)	-1,2 (+)	-1,8 (+)	1,0	3,0 (+)	1,0				1,3 (-)						-4,7 (-)			
	K 10	2,0 (-)		1,3 (-)		1,6 (-)		1,1 (-)	2,5 (-)	-1,7 (-)	3,0 (-)	1,0	3,0 (-)	2,5 (-)		1,2 (-)		-3,0 (-)		1,7 (-)		-3,5 (-)		1,1 (-)		
	10					1,8 (-)		2,7 (+)	1,2 (+)	-1,8 (+)	1,0	3,0 (+)	1,0										-17,1 (-)			
C	K 40	1,2 (+)		1,9 (+)		1,6 (+)		2,2 (+)		1,5 (+)		2,5 (+)		1,0	1,1 (+)	2,0 (+)	1,6 (-)	1,2 (-)	21,1 (-)	1,5 (+)		1,4 (-)		2,3 (+)		
	40		1,4 (+)						1,1 (-)					1,1 (-)	1,0	-1,9 (+)	1,7 (-)	1,3 (-)	22,3 (-)		2,1 (+)					
	K 20	1,7 (-)		1,0		1,3 (-)		1,1 (+)		1,4 (-)		1,2 (+)		2,0 (-)	-1,9 (-)	1,0	-3,2 (-)	-2,4 (-)	42,4 (-)	1,4 (-)		-2,9 (-)		1,2 (+)		
	20				3,1 (+)						1,3 (+)			1,6 (+)	1,7 (+)	3,2 (+)	1,0	1,3 (+)	13,2 (-)				3,6 (-)			
	K 10	1,5 (+)		2,3 (+)		1,9 (+)		2,7 (+)		1,8 (+)		3,0 (+)		1,2 (+)	1,3 (+)	-2,4 (+)	1,3 (-)	1,0	17,6 (-)	1,8 (+)		1,2 (-)		-2,8 (+)		
	10					9,7 (+)						17,1 (+)		21,1 (+)	22,3 (+)	42,4 (+)	13,2 (+)	17,6 (+)	1,0					8,4 (+)		
D	K 40	1,2 (-)		1,3 (+)		1,1 (+)		1,5 (+)		1,0		1,7 (+)		1,5 (-)		1,4 (+)		1,8 (-)		1,0	1,5 (+)	2,1 (-)	-8,3 (-)	1,6 (+)	3,7 (-)	
	40		1,5 (-)						2,2 (-)						2,1 (-)					1,5 (-)	1,0	-3,2 (-)	-12,7 (-)	1,0	-5,6 (-)	
	K 20	1,7 (+)		2,8 (+)		2,2 (+)		3,2 (+)		2,1 (+)		3,5 (+)		1,4 (+)		-2,9 (+)		1,2 (+)		2,1 (+)	3,2 (+)	1,0	4,0 (-)	-3,3 (+)	1,8 (-)	
	20				11,1 (+)						4,7 (+)						-3,6 (+)			8,3 (+)	12,7 (+)	4,0 (+)	1,0	13,2 (+)	2,3 (+)	
	K 10	1,9 (-)		1,2 (-)		1,5 (-)		1,0		1,6 (-)		1,1 (+)		2,3 (-)		1,2 (-)		-2,8 (-)		1,6 (-)	1,0	-3,3 (-)	-13,2 (-)	1,0	-5,8 (-)	
	10					1,2 (+)							2,0 (+)								8,4 (-)	3,7 (+)	-5,6 (+)	1,8 (+)	2,3 (-)	-5,8 (+)

Tabelle 60: Vergleich der rTER-Werte *HvSPMS1* zwischen Wachstumsstadien A-D, Trockenstressexperiment 2013
 Verhältnis Mittelwerte rTER-Werte einzelner Stressphasen der unterschiedlichen Wachstumsstadien berechnet; KNT – Kontrolle 60 % WN; 40 %, 20 %, 10 % – WN; Signifikanzniveau nach Punktezahl: $\ddot{}$ – $p \leq 0,001$, $\dot{}$ – $p \leq 0,01$, \cdot – $p \leq 0,05$, keine Punkte – keine signifikanten Unterschiede; $\#,\# (+)$ – rTER-Werte $\#,\#$ -fach erhöht: rote, gelbe, hellgrüne Markierung – Stärke der Erhöhung; $\#,\# (-)$ – rTER-Werte auf $\#,\#$ -fach vermindert: dunkelgrüne, hellblaue, dunkelblaue Markierung – Stärke der Verminderung; leere Felder – Verhältnisse der rTER-Werte nicht dargestellt

<i>HvSPMS2</i>	Stadium A						Stadium B						Stadium C						Stadium D						
	K 40	40	K 20	20	K 10	10	K 40	40	K 20	20	K 10	10	K 40	40	K 20	20	K 10	10	K 40	40	K 20	20	K 10	10	
A	K 40	1,0	1,1 (-)	1,1 (+)	1,5 (-)	1,1 (-)	3,6 (-)	1,2 (+)		1,4 (+)		1,4 (+)		1,7 (+)		1,4 (-)		2,1 (-)		1,5 (-)		2,1 (-)		1,5 (-)	
	40	1,1 (+)	1,0	1,1 (+)	1,4 (-)	1,0	3,5 (-)		1,4 (-)						-1,3 (-)					1,1 (-)					
	K 20	1,1 (-)	1,1 (-)	1,0	1,6 (-)	1,1 (-)	3,9 (-)	1,1 (+)		1,3 (+)		1,3 (+)		1,8 (-)		1,5 (-)		2,2 (-)		1,7 (-)		2,3 (-)		1,6 (-)	
	20	1,5 (+)	1,4 (+)	1,6 (+)	1,0	1,4 (+)	2,5 (-)					1,7 (+)				1,0						1,1 (+)			
	K 10	1,1 (+)	1,0	1,1 (+)	1,4 (-)	1,0	3,4 (-)	1,3 (+)		1,4 (+)		1,4 (+)		1,5 (-)		1,3 (-)		1,9 (-)		1,4 (-)		2,0 (-)		1,4 (-)	
	10	3,6 (+)	3,5 (+)	3,9 (+)	2,5 (+)	3,4 (+)	1,0																	2,2 (+)	
B	K 40	1,2 (-)		1,1 (-)		1,3 (-)		1,0	1,8 (-)	1,1 (+)	1,0	1,1 (+)	3,1 (-)	2,0 (-)		1,7 (-)		2,5 (-)		1,9 (-)		2,6 (-)		1,8 (-)	
	40		1,4 (+)					1,8 (+)	1,0	2,0 (+)	1,8 (+)	2,0 (+)	1,7 (-)		1,1 (+)					1,3 (+)					
	K 20	1,4 (-)		1,3 (-)		1,4 (-)		1,1 (-)	2,0 (-)	1,0	1,1 (-)	1,0	3,4 (-)	2,2 (-)		1,9 (-)		2,8 (-)		2,1 (-)		2,9 (-)		2,0 (-)	
	20				1,7 (-)			1,0	1,8 (-)	1,1 (+)	1,0	1,1 (+)	3,0 (-)				1,7 (-)						1,6 (-)		
	K 10	1,4 (-)		1,3 (-)		1,4 (-)		1,1 (-)	2,0 (-)	1,0	1,1 (-)	1,0	3,4 (-)	2,2 (-)		1,9 (-)		2,8 (-)		2,1 (-)		2,9 (-)		2,0 (-)	
	10					1,5 (-)		3,1 (+)	1,7 (+)	3,4 (+)	3,0 (+)	3,4 (+)	1,0											1,5 (+)	
C	K 40	1,7 (+)		1,8 (+)		1,5 (+)		2,0 (+)		2,2 (+)		2,2 (+)		1,0	1,2 (+)	1,2 (+)	1,1 (+)	1,3 (-)	4,2 (-)	1,1 (+)		1,3 (-)		1,1 (+)	
	40		1,3 (+)						1,1 (-)					1,2 (-)	1,0	1,0	1,0	1,5 (-)	5,0 (-)		1,2 (+)				
	K 20	1,4 (+)		1,5 (+)		1,3 (+)		1,7 (+)		1,9 (+)		1,9 (+)		1,2 (-)	1,0	1,0	1,0	1,5 (-)	5,0 (-)	1,1 (-)		1,5 (-)		1,1 (-)	
	20				1,0						1,7 (+)			1,1 (-)	1,0	1,0	1,0	1,4 (-)	4,8 (-)			1,1 (+)			
	K 10	2,1 (+)		2,2 (+)		1,9 (+)		2,5 (+)		2,8 (+)		2,8 (+)		1,3 (+)	1,5 (+)	1,5 (+)	1,4 (+)	1,0	3,3 (-)	1,3 (+)		1,0		1,4 (+)	
	10					1,9 (+)								4,2 (+)	5,0 (+)	5,0 (+)	4,8 (+)	3,3 (+)	1,0					4,2 (+)	
D	K 40	1,5 (+)		1,7 (+)		1,4 (+)		1,9 (+)		2,1 (+)		2,1 (+)		1,1 (-)		1,1 (+)		1,3 (-)		1,0	1,4 (+)	1,4 (-)	1,1 (+)	1,0	1,1 (-)
	40		1,1 (+)						1,3 (-)						1,2 (-)					1,4 (-)	1,0	1,9 (-)	1,2 (-)	1,3 (-)	1,5 (-)
	K 20	2,1 (+)		2,3 (+)		2,0 (+)		2,6 (+)		2,9 (+)		2,9 (+)		1,3 (+)		1,5 (+)		1,0		1,4 (+)	1,9 (+)	1,0	1,6 (+)	1,4 (+)	1,3 (+)
	20				1,1 (-)						1,6 (+)						1,1 (-)			1,1 (-)	1,2 (+)	1,6 (-)	1,0	1,1 (-)	1,2 (-)
	K 10	1,5 (+)		1,6 (+)		1,4 (+)		1,8 (+)		2,0 (+)		2,0 (+)		1,1 (-)		1,1 (+)		1,4 (-)		1,0	1,3 (+)	1,4 (-)	1,1 (+)	1,0	1,1 (-)
	10					2,2 (-)														4,2 (-)	1,1 (+)	1,5 (+)	1,3 (-)	1,2 (+)	1,1 (+)

Verhältnis rTER: ## (+) – ##-fach erhöht
 ## ≥ 6,0 (rot) 6,0 > ## ≥ 2,5 (gelb) 2,5 > ## > 1,0 (hellgrün) ## = 1,0 (weiß) ## (-) – ##-fach vermindert
 -1,0 > ## > -2,5 (dunkelgrün) -2,5 > ## > -6,0 (hellblau) -6,0 ≥ ## (dunkelblau)

Signifikanzniveau: :- p ≤ 0,001 :- p ≤ 0,01 .- p ≤ 0,05 Wert ohne Punkt – nicht signifikant

Tabelle 61: Vergleich der rTER-Werte des *HvSPMS2*-Gens zwischen Wachstumsstadien A-D, Trockenstressexperiment 2013
 Verhältnis Mittelwerte rTER-Werte einzelner Stressphasen der unterschiedlichen Wachstumsstadien berechnet; KNT – Kontrolle 60 % WN; 40 %, 20 %, 10 % – WN; Signifikanzniveau nach Punktezahl: :- p ≤ 0,001, :- p ≤ 0,01, .- p ≤ 0,05, keine Punkte – keine signifikanten Unterschiede; ## (+) – rTER-Werte ##-fach erhöht: rote, gelbe, hellgrüne Markierung – Stärke der Erhöhung; ## (-) – rTER-Werte auf ##-fach vermindert: dunkelgrüne, hellblaue, dunkelblaue Markierung – Stärke der Verminderung; leere Felder – Verhältnisse der rTER-Werte nicht dargestellt

Die Beobachtung im TrStr-Experiment von 2012, dass die TER-Werte der *HvSPMS*-Gene der gestressten Pflanzen in (B) gegenüber den Kontrollen weniger stark erhöht waren als in den anderen Stadien, wurde 2013 nicht bestätigt.

In den TrStr-Experimenten von 2012 und 2013 wurde gezeigt, dass das *HvSPMS1*-Gen bereits bei moderatem und das *HvSPMS2*-Gen erst bei starkem TrStr gegenüber den Kontrollen signifikant erhöhte rTER-Werte aufwies. Die Quotienten der rTER-Werte des *HvSPMS1*-Gens von gestressten und Kontroll-Pflanzen waren in den Stadien (C) und (D) größer als beim *HvSPMS2*-Gen.

Im TrStr-Experiment von 2014 wurden diese Beobachtungen und der Vergleich zu trockentoleranten Gerstensorten weiter untersucht [3.3.3./99].

3.3.2.2. Polyamingehalt

Die Diagramme 19/98 und 20/98 stellen die Polyamingehalte der gestressten und der Kontrollpflanzen innerhalb der Wachstumsstadien (A) und (C) dar.

Der PUT-Gehalt der gestressten Pflanzen bei 40-20 % WN war in (A) trotz signifikanter Unterschiede einzelner Fraktionen insgesamt nur geringfügig gegenüber den Kontrollen erhöht und vermindert. Bei 10 % WN wurden allerdings stark signifikant erhöhte Werte des Gesamt-PUT-Gehaltes (Summe aus Ü1, Ü2 und P) gemessen.

Die gestressten Pflanzen reagierten in (C) früher auf TrStr. Bei 40 % WN waren nur die PUT-Gehalte von Ü1 und Ü2, bei 20 % WN und besonders bei 10 % WN waren alle drei Fraktionen signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht. Verglichen mit (A) waren in (C) die PUT-Gehalte aller Fraktionen (Kontrollen und gestresste Pflanzen) höher. Die PUT-Gehalte der gestressten Pflanzen waren in (C) stärker gegenüber den Kontrollen erhöht als in (A). Innerhalb und zwischen (A) und (C) schwankten die PUT-Gehalte der Kontrollen.

Die Beobachtungen der Experimente zur Untersuchung der *HvSPMS*-Gen-Transkriptabundanzen zeigten, dass die rTER-Werte der *HvSPMS*-Gene besonders bei 10 % WN anstiegen [3.3.2.1./93]. Dies stützt die oben beschriebenen Ergebnisse, dass in (A) und (C) die PUT-Gehalte der gestressten Pflanzen besonders bei 10 % WN gegenüber den Kontrollen erhöht waren. Die rTER-Werte der PUT synthetisierenden Gene wurden nicht bestimmt. Es konnte daher kein direkter Zusammenhang zum PUT-Gehalt abgeleitet werden.

Im Vergleich zu den PUT-Gehalten zeigten sich bei den SPD-Gehalten nur geringfügige Unterschiede zwischen gestressten Pflanzen und Kontrollen in (A) und (C): Die SPD-Gehalte der gestressten Pflanzen von Ü1 und Ü2 waren in (A) bei 40-10 % WN signifikant gegenüber den Kontrollen vermindert. Dabei bildete der nicht signifikant verminderte SPD-Gehalt von Ü2 bei 10 % WN eine Ausnahme. Die SPD-Gehalte der P-Fractionen der gestressten Pflanzen waren unverändert bzw. bei 20 % WN signifikant gegenüber den Kontrollen vermindert.

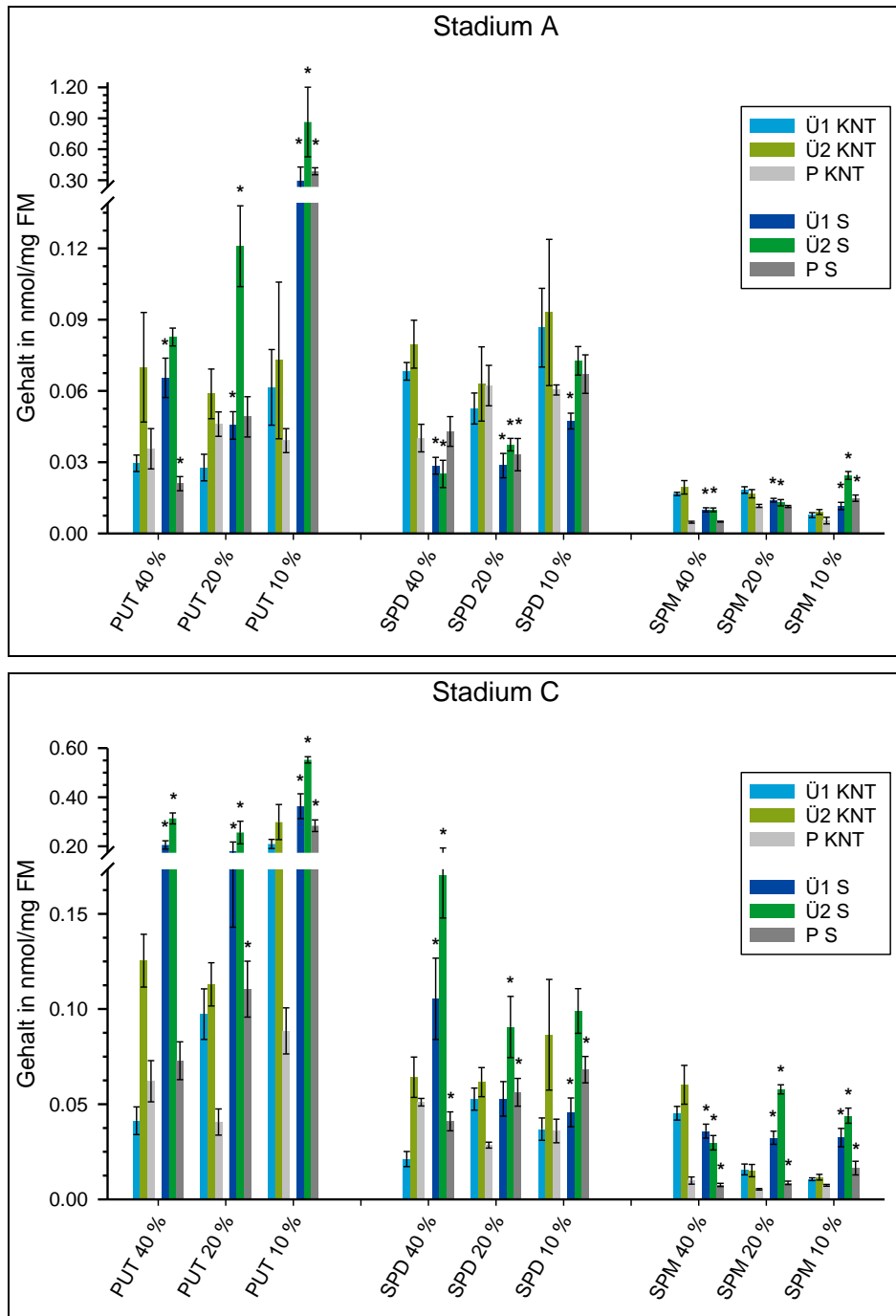


Diagramme 19 (oben) und 20 (unten): Polyamingehalte Trockenstressexperiment 2013, Stadien A und C

PA-Gehalte in nmol/mg FM dargestellt (Frischmasse bezieht sich auf Einwaage des in flüssigem N₂ gefrorenen Pflanzenmaterials vor PA-Extraktion); PA-Gehalte bei ansteigendem TrStr bestimmt: Kontrolle (KNT) – 60 % Wassergehalt Nährbodensubstrat (WN), Stress (S): 40-10 % WN; Kontrolle: hellblaue Balken – Fraktion Ü1, hellgrüne Balken – Fraktion Ü2, hellgraue Balken – Fraktion P, Stress: dunkelblaue Balken – Fraktion Ü1, dunkelgrüne Balken – Fraktion Ü2, dunkelgraue Balken – Fraktion P; *-Säulenbeschriftungsindizes – signifikanter Unterschied zwischen KNT und S: t-Test durchgeführt: signifikante Unterschiede ab $p \leq 0,05$

In (C) waren die SPD-Gehalte von Ü1 und Ü2 der gestressten Pflanzen bei 40 % WN gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht. Ü1 war bei 20 % und 10 % WN unverändert, Ü2 war bei 20 % WN signifikant erhöht und bei 10 % WN unverändert. Die SPD-Gehalte der P-Fractionen der gestressten Pflanzen waren gegenüber den Kontrollen bei 40 % WN signifikant vermindert und bei 20 % WN und 10 % WN signifikant erhöht. Der Gesamt-SPD-Gehalt war in (C) nicht höher als in (A). Die Gesamt-SPD-Gehalte der gestressten Pflanzen waren in (A) und (C) bei zunehmendem TrStr gegenüber den Kontrollen nicht so stark erhöht wie beim PUT-Gehalt. Die Regulation der *HvSPDS*-Gene wurde nicht untersucht, ein Zusammenhang mit den rTER-Werten der *HvSPDS*-Gene ließ sich daher nicht ableiten.

Die Regulation der SPM-Gehalte war wiederum ähnlich der Regulation der PUT-Gehalte: Die SPM-Gehalte der gestressten Pflanzen von Ü1 und Ü2 waren in (A) gegenüber dem Kontrollniveau bei 40 % und 20 % WN signifikant vermindert, die P-Gehalte blieben nahezu unverändert. Bei 10 % WN war der Gesamt-SPM-Gehalt der gestressten Pflanzen gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht. Er war jedoch nicht so stark erhöht wie der Gesamt-PUT-Gehalt der gestressten Pflanzen. In (C) wurden ähnliche Beobachtungen gemacht: Bei 40 % WN waren die Gesamt-SPM-Gehalte der gestressten Pflanzen gegenüber den Kontrollen signifikant vermindert, bei 20-10 % WN waren sie signifikant erhöht. Sie waren stärker gegenüber den Kontrollen erhöht als in (A). Wie bei den PUT-Gehalten waren die SPM-Gehalte aller Fraktionen in (C) höher als in (A) und in beiden Stadien wurden mit zunehmendem TrStr gegenüber den Kontrollen ebenfalls ansteigende SPM-Gehalte der gestressten Pflanzen beobachtet. Die SPM-Gehalte aller Fraktionen waren geringer als ihre PUT- und SPD-Gehalte. Die SPD-Gehalte der Kontrollen schwankten in beiden Stadien weniger stark als beim PUT-Gehalt.

Die rTER-Werte der *HvSPMS*-Gene der gestressten Pflanzen stiegen gegenüber den Kontrollen bei 10 % WN in (A) und (C) stark signifikant an [3.3.2.1./93]. Es ließ sich ein direkter Zusammenhang zwischen erhöhten rTER-Werten der *HvSPMS*-Gene und erhöhtem Gesamt-SPM-Gehalt der gestressten Pflanzen gegenüber Kontrollniveau ableiten.

Im TrStr-Experiment von 2014 wurden diese Beobachtungen im GP-Kultivar und in trockenoleranten Gerstensorten weiter untersucht [3.3.3./99].

3.3.3. Trockenstressexperiment 2014

Im TrStr-Experiment von 2014 wurden zusätzlich zur bisher untersuchten Gerstensorte Golden Promise zwei trockenoleranten Kultivare Tatum (TA) und Xanadu (XA) untersucht. Der prinzipielle Aufbau des Experimentes von 2013 wurde beibehalten [3.3.2./93]. Im Unterschied zu den Vorjahren wurden die Regulationen der *HvSPMS*-Gen-Transkriptabundanzen nur in (A) und (C) untersucht.

3.3.3.1. Regulation der Transkriptabundanzen der *HvSPMS*-Gene

In allen drei Kultivaren wurden mit zunehmendem TrStr gegenüber den Kontrollen

ansteigende rTER-Werte der gestressten Pflanzen beider *HvSPMS*-Gene in (A) und (C) beobachtet [Diagramme 21-30/101f, Tabellen 62, 63/103f]:

In (A) waren die rTER-Werte des *HvSPMS1*-Gens der gestressten Pflanzen der Kultivare GP und TA gegenüber den Kontrollen ab 40 % WN signifikant erhöht (TA 20 % WN nicht signifikant). Beim XA-Kultivar waren sie bei 40 % signifikant vermindert und bei 20-10 % signifikant erhöht. In den gestressten Pflanzen der Kultivare TA und XA waren sie bei 20-10 % WN höherer als im GP-Kultivar [Diagramm 27/102]. Die rTER-Werte des *HvSPMS2*-Gens des GP-Kultivars stiegen in (A) in den gestressten und den Kontroll-Pflanzen bei 40-10% WN ohne signifikante Unterschiede an. Beim TA-Kultivar waren bei 40 % und 10 % WN und im XA-Kultivar nur bei 10 % WN signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht. In den gestressten Pflanzen der Kultivare TA und XA waren sie bei 10 % WN höher beim GP-Kultivar [Diagramm 29/102].

In (C) waren die rTER-Werte der *HvSPMS*-Gene im GP-Kultivar ab 20 % und in TA und XA erst bei 10 % WN stark signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht. Demnach wurden die rTER-Werte beider *HvSPMS*-Gene im GP-Kultivar bereits bei moderatem TrStr induziert. Die rTER-Werte des *HvSPMS2*-Gens der gestressten Pflanzen der Kultivare TA und XA waren generell niedriger als die des GP-Kultivars.

Die rTER-Werte der Kontrollen schwankten mit zunehmendem TrStr in allen Kultivaren in beiden Stadien. Beim *HvSPMS2*-Gen in (A) stiegen sie mit ansteigendem TrStr in (A) in allen drei Kultivaren sogar an (Ausnahme XA bei 10 % WN). Die Quotienten in den Tabellen 62, 63/103f zeigen dadurch weniger deutliche Unterschiede an, da die rTER-Werte der Kontrollen mit zunehmendem TrStr im Nenner anstiegen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die rTER-Werte der *HvSPMS*-Gene der gestressten Pflanzen in den drei Kultivaren in beiden Stadien mit zunehmendem TrStr gegenüber den Kontrollen signifikant anstiegen. Demnach wurden die *HvSPMS*-Gene durch TrStr induziert, wobei *HvSPMS1* stark und *HvSPMS2* moderat induziert waren. Die *HvSPMS*-Gene wurden besonders bei 10 % WN durch TrStr induziert und in den gestressten Pflanzen waren die rTER-Werte beider *HvSPMS*-Gene in (C) stärker erhöht als in (A), was die Ergebnisse der Vorjahre bestätigte. Besonders hervorzustellen ist, dass die *HvSPMS*-Gene der Kultivare TA und XA in (A) bei 10 % WN stärker induziert waren als im GP-Kultivar. Weiterhin waren in (C) beide *HvSPMS*-Gene im GP-Kultivar bereits ab 20 % WN stark induziert, während sie in den trockentoleranteren Kultivaren erst ab 10 % WN stark induziert waren. Die rTER-Werte des *HvSPMS2*-Gens der gestressten GP-Pflanzen waren in (C) ab 20 % WN stärker gegenüber den Kontrollen erhöht als in den trockentoleranten Kultivaren.

In allen TrStr-Experimenten und besonders in 2014 wurden schwankende rTER-Werte der Kontrollen beider *HvSPMS*-Gene festgestellt, sie waren in (C) höher als in (A).

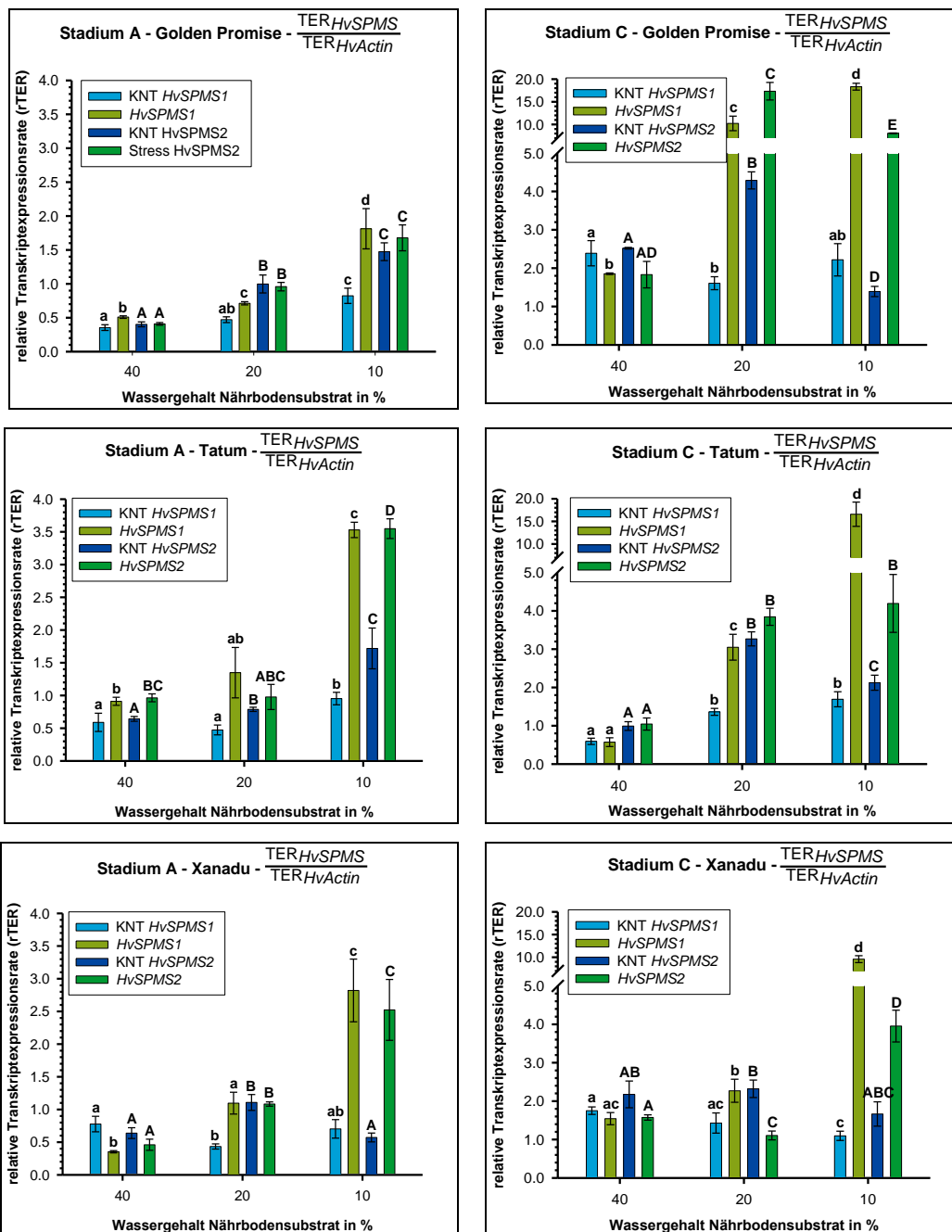


Diagramme 21, 22 (oben links und rechts), 23, 24 (mittig links und rechts), 25 und 26 (unten links und rechts): Relative *HvSPMS*-Transkriptexpressionsrate Trockenstressexperiment 2014, Kultivare Golden Promise, Tatum und Xanadu, Stadien A und C relative Transkriptexpressionsrate (rTER) dargestellt; hellblaue Balken – rTER *HvSPMS1* Kontrolle (KNT, 60 % WN), hellgrüne Balken – *HvSPMS1* TrStr-Stadien 40-10 % WN; dunkelblaue Balken – rTER *HvSPMS2* KNT (60 % WN), dunkelgrüne Balken – *HvSPMS2* TrStr-Stadien 40-10 % WN; Säulenbeschriftungsindizes a-d und A-E – Signifikanzen der rTER-Werte von *HvSPMS1* und *HvSPMS2*: ein- und zweiseitige Anova-Analyse (Holm-Sidak Methode) und t-Test durchgeführt: signifikante Unterschiede bei $p \leq 0,05$, ungleiche oder gleiche Buchstaben $\hat{=}$ signifikant oder nicht signifikant verschieden

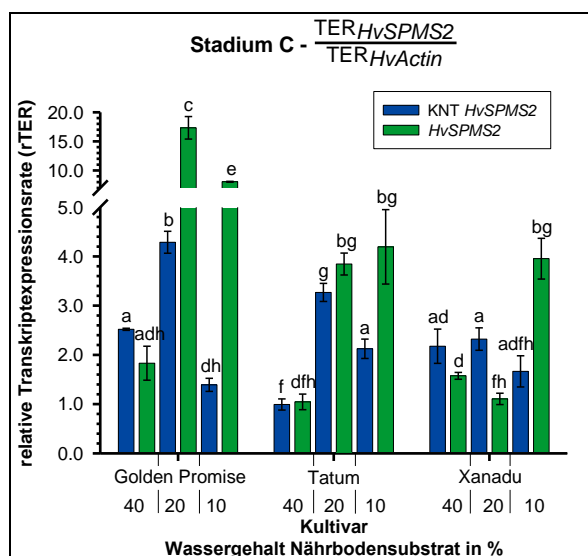
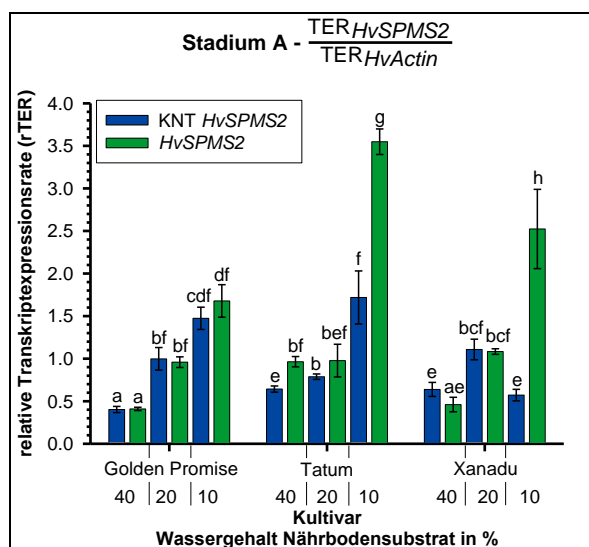
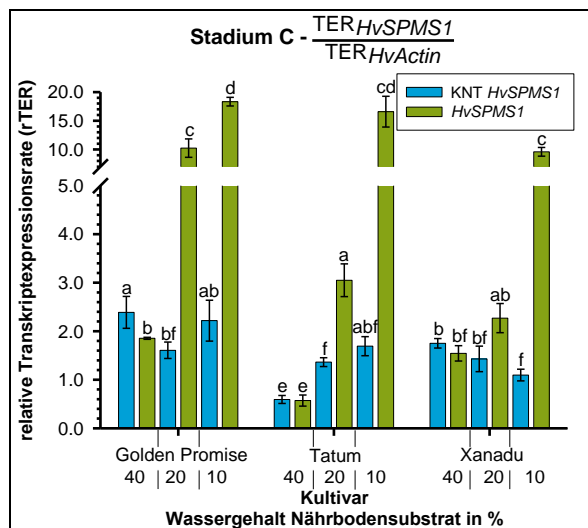
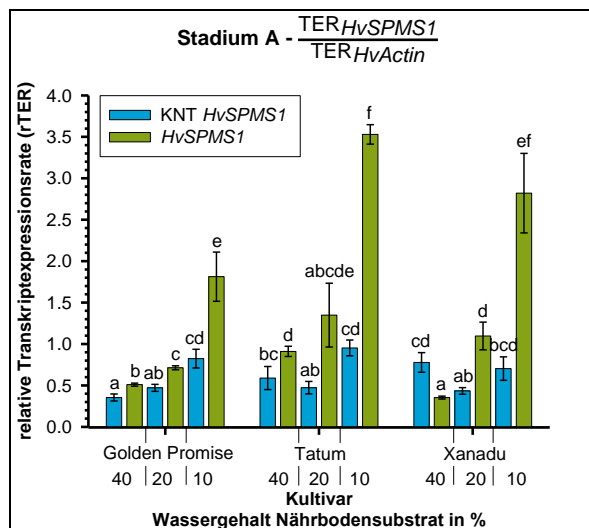


Diagramme 27, 28 (oben links und rechts), 29 und 30 (unten links und rechts): Relative *HvSPMS*-Transkriptexpression Trockenstressexperiment 2014, Kultivare Golden Promise, Tatum und Xanadu, Stadien A und C relative Transkriptexpressionsrate (rTER) dargestellt; hellblaue Balken – rTER *HvSPMS1* Kontrolle (KNT, 60 % WN), hellgrüne Balken – *HvSPMS1* TrStr-Stadien 40-10 % WN; dunkelblaue Balken – rTER *HvSPMS2* KNT (60 % WN), dunkelgrüne Balken – *HvSPMS2* TrStr-Stadien 40-10 % WN; Säulenbeschriftungsindizes a-h – Signifikanzen der rTER-Werte der *HvSPMS*-Gene: ein- und zweiseitige Anova-Analyse (Holm-Sidak Methode) und t-Test durchgeführt: signifikante Unterschiede bei $p \leq 0,05$, ungleiche oder gleiche Buchstaben $\hat{=}$ signifikant oder nicht signifikant verschieden

HvSPMS1	Golden Promise – Stadium A							Tatum – Stadium A							Xanadu – Stadium A							Golden Promise – Stadium C							Tatum – Stadium C							Xanadu – Stadium C																																
	KNT	40	20	10	10	10	40	KNT	40	20	10	10	10	40	KNT	40	20	10	10	40	KNT	40	20	10	10	10	40	KNT	40	20	10	10	40	KNT	40	20	10	10	40	KNT	40	20	10	10	40																							
GP (A)	KNT 40	1,0	1,4 (+)	1,3 (+)	2,0 (+)	2,3 (+)	-5,1 (-)	1,7 (-)	1,3 (+)		3,7 (+)		2,2 (-)	1,2 (+)		2,0 (+)		2,2 (-)	1,2 (+)		2,0 (+)		2,0 (+)		-6,7 (-)	3,6 (+)		-4,5 (-)		-6,3 (-)						-6,7 (-)	3,6 (+)		-4,5 (-)		-6,3 (-)						1,7 (-)	1,1 (+)		3,8 (+)		4,8 (+)						-4,9 (-)	-3,0 (-)		-4,0 (-)		-3,1 (-)					
	40	-1,4 (+)	1,0	1,1 (+)	1,4 (+)	1,6 (+)	-3,6 (-)		1,8 (+)					1,4 (+)																																																						
	KNT 20	1,3 (+)	1,1 (+)	1,0	1,5 (+)	1,7 (+)	-3,8 (-)	1,3 (+)		1,0		2,0 (+)		1,7 (-)	1,1 (+)		1,5 (+)		1,7 (-)	1,1 (+)		1,5 (+)		1,5 (+)		-5,1 (-)	3,4 (+)		-3,4 (+)		-4,7 (-)						1,3 (-)	2,9 (+)		3,6 (+)		3,7 (-)		3,0 (-)		2,3 (-)																						
	20	2,0 (+)	1,4 (+)	1,5 (+)	1,0	1,2 (-)	-2,5 (-)					1,9 (-)					1,5 (+)												14,4 (-)											4,3 (+)						3,2 (+)																						
TA (A)	KNT 40	-1,7 (+)		1,3 (+)		1,4 (+)		1,0	1,5 (+)	1,2 (+)	2,3 (+)	1,6 (+)	-6,0 (-)	1,3 (+)	1,4 (+)		1,2 (+)		1,3 (+)	1,4 (+)		1,2 (+)		1,2 (+)		-4,1 (-)	2,7 (+)		-3,8 (-)		-3,8 (-)						1,0	2,3 (+)		2,9 (+)		3,0 (+)		2,4 (+)		1,9 (+)																						
	40		1,8 (+)					1,5 (+)	1,0	1,9 (+)	1,5 (+)	1,0	-3,9 (-)		2,6 (+)					2,2 (+)							2,0 (+)													1,6 (+)						1,7 (-)																						
	KNT 20	1,3 (+)		1,0		1,7 (+)		1,2 (+)	1,9 (+)	1,0	2,9 (+)	2,0 (+)	-7,5 (-)	1,6 (+)	1,1 (+)		1,5 (+)		1,6 (+)	1,1 (+)		1,5 (+)		1,5 (+)		-5,1 (-)	-3,4 (+)		-4,7 (-)		-4,7 (-)						1,3 (-)	2,9 (+)		3,6 (+)		3,7 (+)		3,0 (+)		2,3 (+)																						
	20	2,3 (+)	1,5 (+)	2,9 (+)	1,0	1,4 (+)	-2,6 (-)	2,3 (+)	1,5 (+)	2,9 (+)	1,0	1,4 (+)	-2,6 (-)	2,3 (+)	1,5 (+)	2,9 (+)	1,0	1,4 (+)	-2,6 (-)	2,3 (+)	1,5 (+)	2,9 (+)	1,0	1,4 (+)	-2,6 (-)				7,6 (+)											2,3 (+)						1,7 (-)																						
XA (A)	KNT 40	2,2 (+)		1,7 (+)		1,1 (+)		1,3 (+)	1,6 (+)		1,2 (+)		1,0	-2,2 (+)	-1,8 (+)	1,4 (+)	1,1 (+)	3,6 (+)		1,0	-2,2 (+)	-1,8 (+)	1,4 (+)	1,1 (+)	3,6 (+)		3,1 (+)	2,1 (+)		-2,9 (-)		-2,9 (-)						1,3 (+)	1,8 (+)		2,2 (+)		2,3 (+)		1,8 (+)		1,4 (+)																					
	40		1,4 (+)					2,6 (+)					2,2 (+)	1,0	1,2 (+)	3,1 (+)	2,0 (+)	8,0 (+)										5,2 (+)													1,6 (+)						3,4 (+)																					
	KNT 20	1,2 (+)		1,1 (+)		1,9 (+)		1,4 (+)		1,1 (+)		2,2 (+)		1,8 (+)	1,2 (+)	1,0	2,5 (+)	1,6 (+)	6,5 (+)		1,8 (+)	1,2 (+)		1,0	2,5 (+)	1,6 (+)	6,5 (+)		3,5 (+)	3,7 (+)		-5,1 (-)		-5,1 (-)						1,4 (+)		3,1 (+)		3,9 (+)		3,0 (+)		3,3 (+)		2,5 (+)																		
	20			1,5 (+)							1,2 (+)			1,4 (+)	3,1 (+)	2,5 (+)	1,0	1,6 (+)	2,6 (+)												9,3 (+)											2,8 (+)						2,1 (+)																				

Tabelle 62: Vergleich der rTER-Werte des *HvSPMS1*-Gens zwischen Wachstumsstadien A & C, Trockenstressexperiment 2014

Verhältnis der Mittelwerte der rTER-Werte der einzelnen Stressphasen der unterschiedlichen Wachstumsstadien berechnet; GP – Kultivar Golden Promise, TA – Kultivar Tatum; XA – Kultivar Xanadu; K – Kontrolle; 40 %, 20 %, 10 % – Wassergehalt Nährbodensubstrat (WN), K bei 60 % WN; ## (+) – rTER-Werte ##-fach erhöht: rote, gelbe, hellgrüne Markierung – Signifikanzniveau Erhöhung $p \leq 0,001$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,05$; ## (-) – rTER-Werte auf ##-fach vermindert: dunkelgrüne, hellblaue, dunkelblaue Markierung – Signifikanzniveau Verminderung $p \leq 0,001$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,05$; keine Farbe – nicht signifikant unterschiedlich; leere Felder – Verhältnisse der rTER-Werte nicht dargestellt

3.3.3.2. Polyamingehalt

In allen drei Kultivaren wurden in (A) und (C) mit zunehmendem TrStr ansteigende Gesamt-PUT-Gehalte (Summe Fraktionen Ü1, Ü2, P) beobachtet:

In (A) waren sie bei 40 % WN in allen Kultivaren nahezu unverändert, bei 20 % WN waren sie beim TA-Kultivar bereits leicht und bei 10 % WN in allen Kultivaren stark signifikant erhöht, was die Ergebnisse der Experimente aus 2013 für das GP-Kultivar bestätigte [vgl. 3.3.2.2./97]. Auffällig war, dass die Gesamt-PUT-Gehalte der gestressten Pflanzen der trockentoleranteren Kultivare in (A) bei 10 % WN wesentlich höher waren als im GP-Kultivar [Diagramme 31, 33, 35/107ff]. Dies bestätigt, dass der Gesamt-PUT-Gehalt durch starken TrStr induziert wurde.

In der unlöslichen PA-Fraktion der Kontrollpflanzen des GP-Kultivars wurden bei 40 % WN besonders hohe Werte gemessen, die bei diesen Bedingungen in anderen Experimenten nicht beobachtet wurden. Eine erneute Bestimmung des PA-Gehaltes dieser Kontrollpflanzen war nicht möglich, weil kein Pflanzenmaterial mehr vorhanden war.

Im Gegensatz zu (A) waren in (C) die Gesamt-PUT-Gehalte mit Ausnahme vom GP Kultivar bei 20 % WN (nur leicht erhöht) in allen Kultivaren bereits bei 40-20 % WN signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht. Bei 10 % WN waren sie besonders stark induziert und auch in (C) zeigten die trockentoleranteren Kultivare deutlich höhere Gesamt-PUT-Gehalte [Diagramme 31/107 bis 36/109]. Generell waren die Gesamt-PUT-Gehalte in (C) höher als in (A). Im Vergleich zum GP-Kultivar waren die PUT-Gehalte der Kontrollen der trockentoleranteren Kultivare niedriger, was den Unterschied zwischen gestressten Pflanzen und Kontrollen wiederum vergrößerte. Die Beobachtungen der drei Kultivare bestätigten die Ergebnisse von 2013 [vgl. 3.3.2.2./97], obwohl die im Experiment von 2013 gemessenen PUT-Gehalte der gestressten Pflanzen 2014 im GP-Kultivar höher waren [Vergleich Diagramme 20/98 und 32/107].

Im Gegensatz zu den PUT-Gehalten wurden in (A) und (C) keine ansteigenden SPD-Gehalte in den gestressten Pflanzen beobachtet: Die Gesamt-SPD-Gehalte der Kultivare GP und TA wurden in (A) durch ansteigenden TrStr in den gestressten Pflanzen in allen Ü1-Fraktionen signifikant vermindert. Die Ü2-Fraktionen wurden teilweise signifikant vermindert oder blieben unverändert, die P-Fraktionen blieben unverändert oder wurden teilweise signifikant erhöht [Diagramme 31, 33/107f]. Im XA-Kultivar wurden die Gesamt-SPD-Gehalte bei 40-10 % WN vermindert [Diagramm 35/109]. Diese Beobachtungen stützen die Ergebnisse von 2013 [vgl. 3.3.2.2./97].

In (C) blieben die SPD-Gehalte der gestressten Pflanzen des GP-Kultivars gegenüber den Kontrollen bei 40-10 % WN nahezu unverändert [Diagramm 32/107]. Im Gegensatz dazu konnten im TA-Kultivar gegenüber den Kontrollen bei 20-10 % WN und im XA-Kultivar bei 40 % WN leicht erhöhte Gesamt-SPD-Gehalte beobachtet werden [Diagramm 34, 36/108f]. Dies wurde in diesem und im Experiment von 2013 bisher nicht beobachtet. Bei 20-10 % WN

wurden im XA-Kultivar keine veränderten SDP-Gehalte in den gestressten Pflanzen festgestellt (Ausnahme Ü1-Fraktion bei 10 % WN).

In allen Kultivaren war der SPM-Gesamt-Gehalt der gestressten Pflanzen bei 40 % WN in (A) signifikant gegenüber den Kontrollen vermindert. Bei 20 % WN blieb er im GP-Kultivar nahezu unverändert, in den trockenoleranteren Kultivaren war er, trotz erhöhter SPM-Gehalte der P-Fractionen, hingegen signifikant vermindert. Bei 10 % WN war er wiederum in allen Kultivaren signifikant erhöht, wobei er in den Kultivaren TA und XA stärker gegenüber den Kontrollen erhöht war als im GP-Kultivar [Diagramme 31, 33, 35/107ff]. Demnach wurden bei leichtem TrStr eine Repression und eine Induktion des SPM-Gehaltes bei starkem TrStr festgestellt. Die SPM-Gehalte waren in jedem Kultivar geringer als ihre jeweiligen PUT- bzw. SPD-Gehalte. All dies bestätigte die Ergebnisse der SPM-Gehaltsbestimmung von 2013, jedoch war der Unterschied der SPM-Gehalte zwischen gestressten und Kontroll-Pflanzen 2013 größer.

Die Untersuchungen der Regulation der *HvSPMS*-Gen-Transkriptabundanz [3.3.3.1./99] zeigten in allen Kultivaren die Induktion beider Gene bei 10 % WN in (A). Erhöhte Gesamt-SPM-Gehalte korrelieren mit induzierten *HvSPMS*-Genen in (A).

In (C) zeigte sich in allen drei Kultivaren deutlicher eine Induktion der Gesamt-SPM-Gehalte der gestressten Pflanzen gegenüber Kontrollniveau bei zunehmendem TrStr: Während sie bei den GP- und XA-Kultivaren bei 40 % WN zunächst noch signifikant vermindert bzw. beim TA-Kultivar unverändert waren, waren sie bei 20-10 % WN in allen Kultivaren signifikant erhöht. Dabei zeigten die Kultivare GP und XA ähnliche Werte und bei 20 % WN stärkere Anstiege der Gesamt-SPM-Gehalte als bei 10 % WN [Diagramme 32/107 und 36/109]. Beim TA-Kultivar war der Gesamt-SPM-Gehalt bei 10 % WN hingegen stärker erhöht als bei 20 % WN und sogar höher als der SPD-Gehalt [Diagramm 34/108].

Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse von 2013, jedoch waren die Gesamt-SPM-Gehalte bei 10 % WN 2013 stärker erhöht als 2014 [Vergleich Diagramme 20/98 und 32, 34, 36/107ff]. In (C) waren die Verhältnisse der Gesamt-SPM-Gehalte zwischen gestressten und Kontroll-Pflanzen ähnlich denen der Gesamt-PUT-Gehalte. In (C) korrelierten die induzierten *HvSPMS*-Gene mit den gesteigerten Gesamt-SPM-Gehalten in den trocken-gestressten Pflanzen.

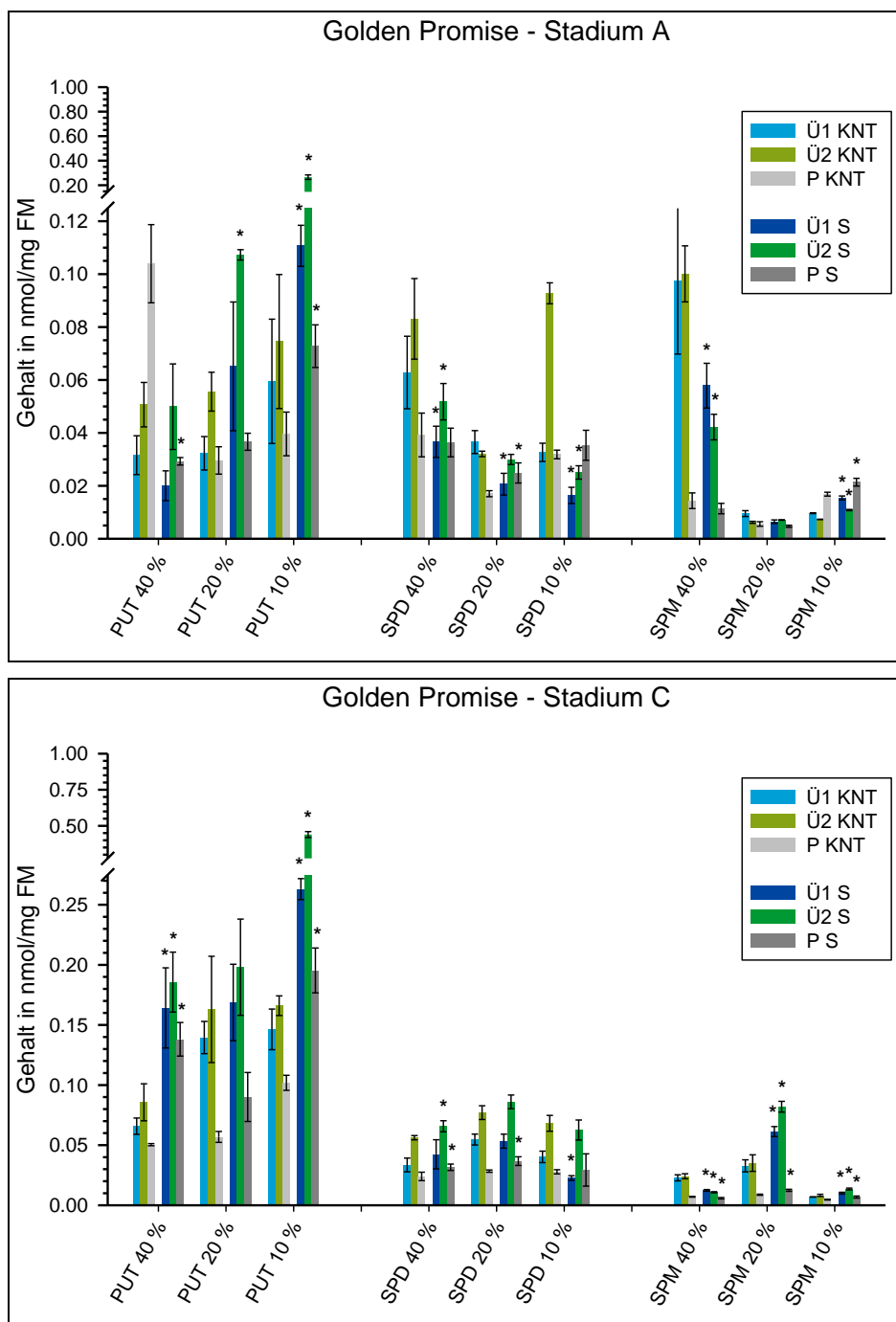


Diagramme 31 (oben) und 32 (unten): Polyamingehalte Trockenstressexperiment 2014, Kultivar Golden Promise Stadien A und C

PA-Gehalte in nmol/mg FM dargestellt (Frischmasse bezieht sich auf Einwaage des in flüssigem N₂ gefrorenen Pflanzenmaterials vor der PA-Extraktion); PA-Gehalte bei ansteigendem TrStr bestimmt: Kontrolle (KNT) – 60 % Wassergehalt Nährbodensubstrat (WN), Stress (S): 40-10 % WN; Kontrolle: hellblaue Balken – Fraktion Ü1, hellgrüne Balken – Fraktion Ü2, hellgraue Balken – Fraktion P, Stress: dunkelblaue Balken – Fraktion Ü1, dunkelgrüne Balken – Fraktion Ü2, dunkelgraue Balken – Fraktion P; *-Säulenbeschriftungsindizes – signifikanter Unterschied zwischen KNT und S: t-Test durchgeführt: signifikante Unterschiede ab $p \leq 0,05$

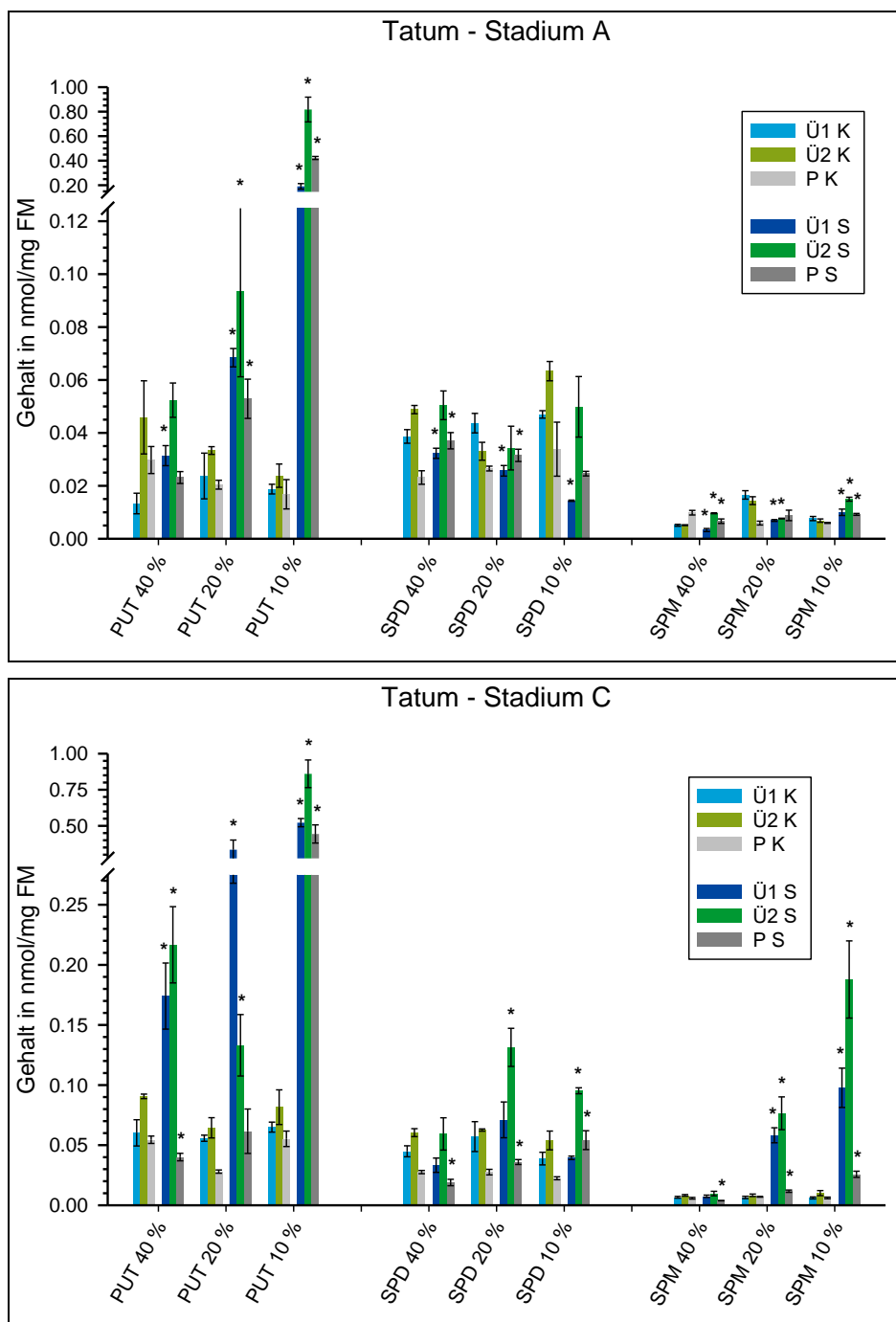


Diagramme 33 (oben) und 34 (unten): Polyamingehalte Trockenstressexperiment 2014, Kultivar Tatum Stadien A und C

PA-Gehalte in nmol/mg FM dargestellt (Frischmasse bezieht sich auf Einwaage des in flüssigem N₂ gefrorenen Pflanzenmaterials vor der PA-Extraktion); PA-Gehalte bei ansteigendem TrStr bestimmt: Kontrolle (KNT) – 60 % Wassergehalt Nährbodensubstrat (WN), Stress (S): 40-10 % WN; Kontrolle: hellblaue Balken – Fraktion Ü1, hellgrüne Balken – Fraktion Ü2, hellgraue Balken – Fraktion P, Stress: dunkelblaue Balken – Fraktion Ü1, dunkelgrüne Balken – Fraktion Ü2, dunkelgraue Balken – Fraktion P; *-Säulenbeschriftungsindizes – signifikanter Unterschied zwischen KNT und S: t-Test durchgeführt: signifikante Unterschiede ab $p \leq 0,05$

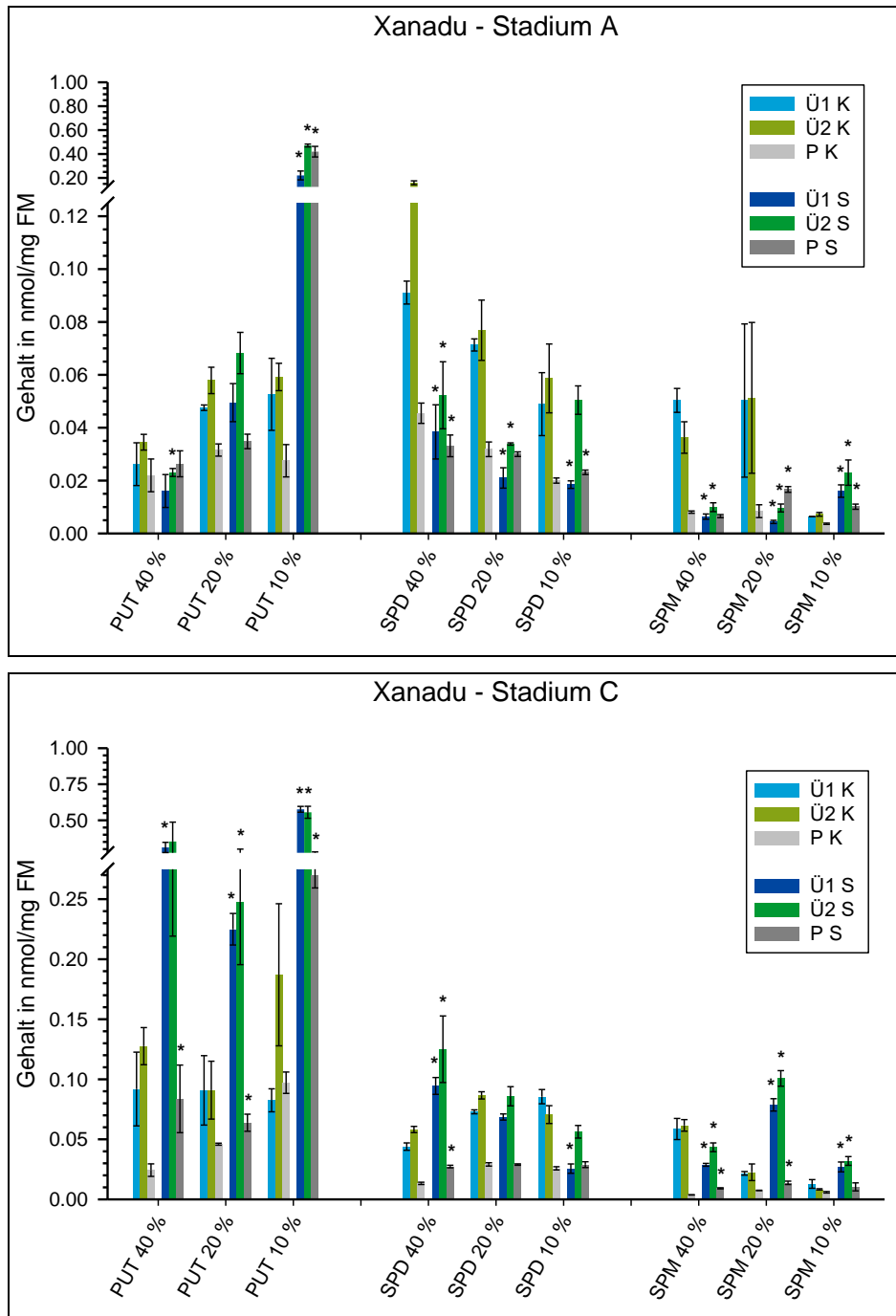


Diagramme 35 (oben) und 36 (unten): Polyamingehalte Trockenstressexperiment 2014, Kultivar Xanadu Stadien A und C

PA-Gehalte in nmol/mg FM dargestellt (Frishmasse bezieht sich auf Einwaage des in flüssigem N₂ gefrorenen Pflanzenmaterials vor der PA-Extraktion); PA-Gehalte bei ansteigendem TrStr bestimmt: Kontrolle (KNT) – 60 % Wassergehalt Nährbodensubstrat (WN), Stress (S): 40-10 % WN; Kontrolle: hellblaue Balken – Fraktion Ü1, hellgrüne Balken – Fraktion Ü2, hellgraue Balken – Fraktion P, Stress: dunkelblaue Balken – Fraktion Ü1, dunkelgrüne Balken – Fraktion Ü2, dunkelgraue Balken – Fraktion P; *-Säulenbeschriftungsindizes – signifikanter Unterschied zwischen KNT und S: t-Test durchgeführt: signifikante Unterschiede ab $p \leq 0,05$

3.4. Suche nach TSPMS in *Hordeum vulgare*

3.4.1. Erste cDNA-Amplifizierung zur Suche vermeintlicher *HvTSPMS*

Für die Suche nach HvTSPMS wurde in einem ersten Experiment Gesamt-RNA aus Gerstenpflanzen des Kultivars Naomie isoliert [3.1.1.1./74]. Nach mehrfacher Veränderung der experimentellen Bedingungen wurden mit Primersatz Nr. 1 [3.1.1.2./74] mehrere cDNA-Amplifikate mit maximaler Länge von ca. 150 bp erhalten. Diese wurden mit der T4-Ligase in den pCR[®]2.1-Vektor ligiert und heterolog in *E. coli* XL1-Blue exprimiert [2.3.7.2.ff/44ff]. In den Sequenzen der isolierten Plasmide wurden die Primersequenzen nicht wiedergefunden. Die Sequenzen zeigten zueinander unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Leserichtungen keine Ähnlichkeit. Die cDNA-Amplifizierung mit Primersatz Nr. 1 war demnach erfolglos.

3.4.2. Zweite cDNA-Amplifizierung und Sequenzierung vermuteter *HvTSPMS*-cDNA-Fragmente

In Kooperation mit Frau Dr. Juliane Fischer (IPB Halle, Natur- und Wirkstoffchemie, Chemoenzymatik, Deutschland) erlaubten phylogenetische Untersuchungen für Pflanzen-TSPMS [3.1.2.3./78] erneut Wobble-Primer abzuleiten [Primersatz Nr. 7, Tabelle 5/16]. Nach Isolation von Gesamt-RNA aus Gerstenpflanzen des Kultivars GP [2.3.1.2./33] und cDNA-Synthese mit Omniscript[®] RT [2.3.3.3./35] wurden in mehreren Gradienten- und touch down-PCRs mit MangoMix[™] [2.3.5.1./36] 200-800 bp lange Amplifikate erhalten (z.B. Tabelle 70-XXII, XXIII, XXIV/152). Nach Ligation in pGEM[®]T-Easy-Vektor und heterologer Expression in *E. coli* XL1-Blue [2.3.7.2.ff/44ff] wurden aus 80 gepickten Kolonien 30 Plasmide isoliert. Nach Überprüfung mit *Eco*R1-Restriktase [2.3.13/47] wurden diese sequenziert. Die Sequenzen wurden mit den Wobble-Primer-Sequenzen verglichen: Der vorwärts-Primer stimmte mit Ausnahme der Wobble-Stellen vollständig, der rückwärts-Primer nur auf einer Länge von 5-8 bp mit den Sequenzen überein. In der Binderegion des vorwärts-Primers zeigten die Sequenzen vollständige Übereinstimmung über eine Länge von ca. 40 bp, in der Binderegion des rückwärts-Primers über eine Länge von ca. 300 bp. Der Bereich dazwischen (ca. 750 bp lang) zeigte keine bis sehr wenig Übereinstimmung. In weiteren Alignments stimmten die Ausgangs-Proteinsequenzen [Tabelle 50/72] mit den erhaltenen Sequenzen außerhalb der Wobble-Primerbindestellen nicht überein. In BLAST- und EMBL-Analysen [Tabelle 51/73] der erhaltenen Sequenzen wurden offene Leserahmen (ORF) monokotyledoner Pflanzen u.a. von *Hordeum vulgare* gefunden. Deren Nukleotidsequenzen wurden mit den Ausgangs-Proteinsequenzen verglichen und zeigten außerhalb der Primerbinderegionen ebenfalls keine Übereinstimmung. Es erfolgte eine erneute RNA-Isolation aus Gerstenpflanzen-Sprossachsen mit anschließender cDNA-Amplifikation [3.4.3./111].

3.4.3. Dritte cDNA-Amplifizierung und Sequenzierung vermeintlicher *HvTSPMS*-cDNA-Fragmente

Nach Isolation von Gesamt-RNA aus Sprossachsen des GP-Kultivars [2.3.1.2./33] und cDNA-Synthese mit Omniscript® RT [2.3.3.3./35] wurden touch down- und Gradienten-PCRs mit MangoMix™ [2.3.5.1./36] durchgeführt.

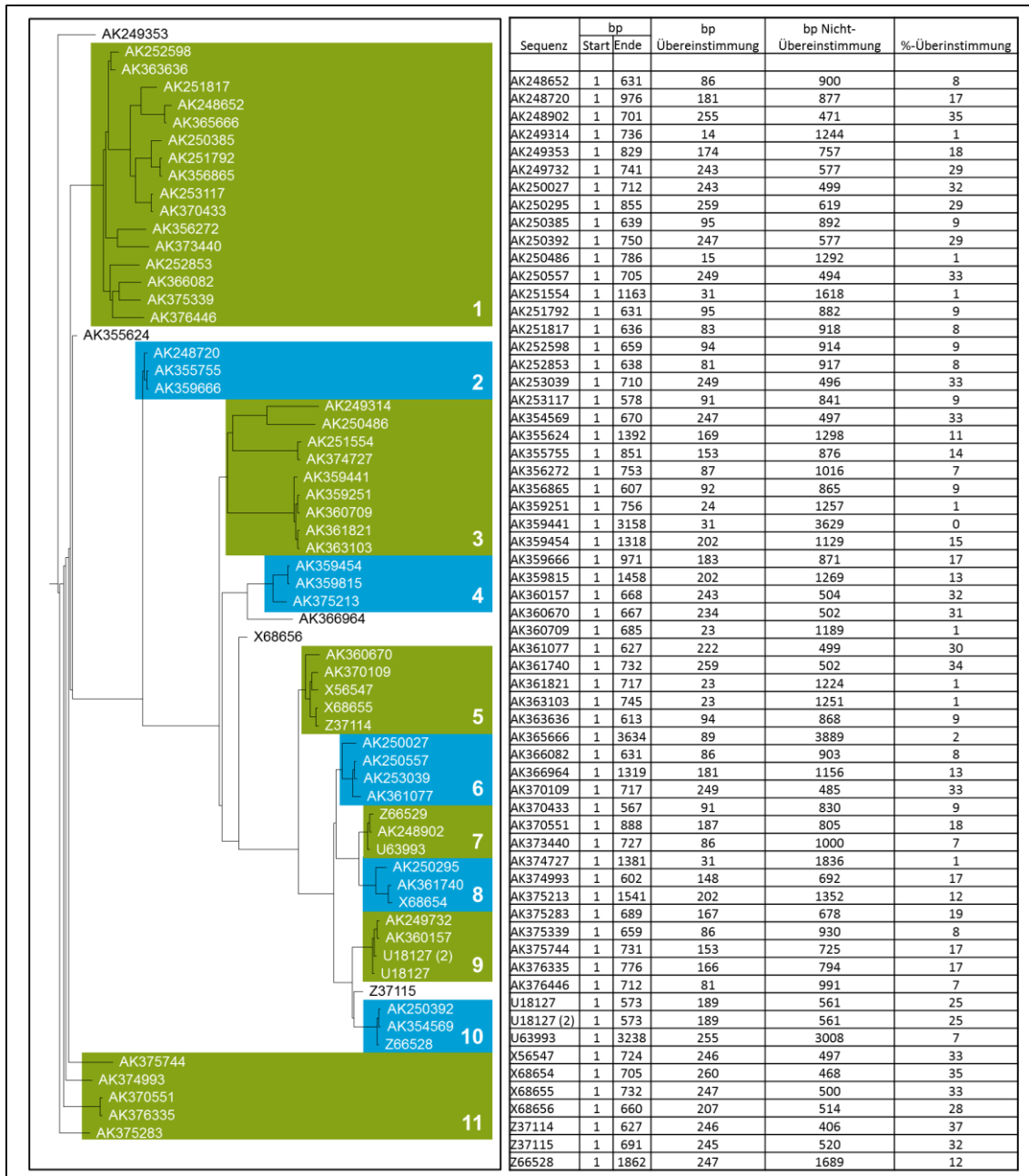


Abbildung 19: Alignment resultierender Sequenzen dritter cDNA-Amplifizierung und Sequenzierung vermuteter *HvTSPMS*-cDNA-Fragmente
 11 Gruppen farbig markiert, Farbigkeit folgt keinem Muster, Gruppierung selbst gewählt; Ergebnisse Alignment tabellarisch dargestellt, bp – Basenpaar; Bezeichnung der Sequenzen nach Accession-Einträgen EMBL-Datenbank; Abbildung des Alignments mit Clonemanager-Software mit Multi-Way-Methode erstellt, keine phylogenetische Berechnung in Mega-Software durchgeführt

Vor der Zugabe zum PCR-Ansatz wurden die Wobble-Primer (Primersatz Nr. 7 [Tabelle 5/16]) mit Dithiothreitol (DTT) auf eine Endkonzentration von 10 mM verdünnt, um Primer-Schleifenbildungen während der PCR zu unterbinden. Vorwärts- und rückwärts-Primer wurden in einem Verhältnis von 1:2 eingesetzt. 200-800 bp lange PCR-Amplifikate wurden in den pGEM[®]T-Easy-Vektor ligiert, heterolog in *E. coli* XL1-Blue exprimiert [2.3.7.2.ff/44ff] und via Blau-Weiß-Selektion differenziert. 40 Plasmide wurden isoliert, anschließend zur Überprüfung mit der *Eco*R1-Restriktase verdaut [2.3.13/47] und dann sequenziert. Mit der Clonemanager-Software wurde in den Sequenzen nach möglichen ORFs gesucht, die dann *in silico* zu Proteinsequenzen translatiert wurden. Ließen sich auch die Wobble-Primer wiederfinden, wurden mit den ORF-Nukleotid- und Proteinsequenzen BLAST-Analysen (EMBL-Datenbank) durchgeführt. Alle Datenbankeinträge mit einer Ähnlichkeit $\geq 80\%$ wurden zur weiteren Analyse verwendet. Aus 565 Einträgen wurden 90 Nukleotid- und 31 Proteinsequenzen identifiziert und in Alignments analysiert. Nach dem Aussortieren gleicher Sequenzen wurden die verbliebenen 63 Nukleotidsequenzen in elf Gruppen eingeteilt [Abbildung 19/111] und resultierende Sequenzen (contiguous- (contig-) Sequenzen) abgeleitet. Zusätzlich wurde eine BLAST-Analyse mit der *AtTSPMS*-Gen-Sequenz in der zu jener Zeit nicht veröffentlichten IPK Barley BLAST-Datenbank durchgeführt. Es wurden die zwei Gersten-EST-Sequenzen HO17A06S und HO27O22S gefunden. Sie wurden zusammen mit den Ausgangssequenzen und den contig-Sequenzen verglichen [z.B. Abbildung 20/112].

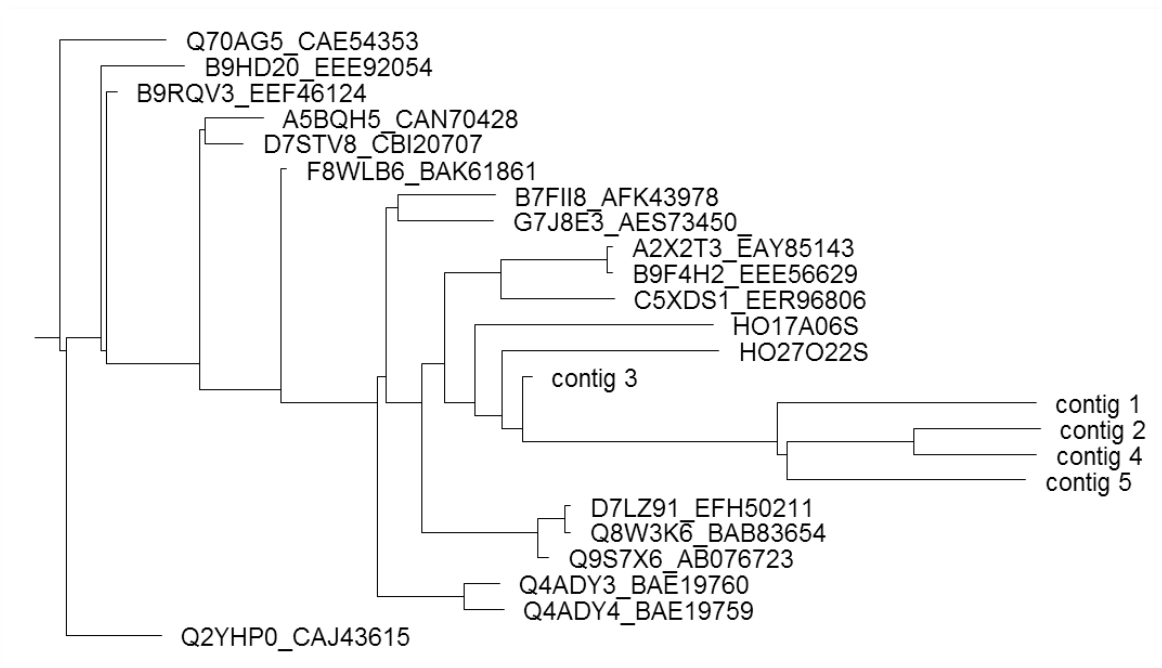


Abbildung 20: Alignment contig-Motive und Ausgangssequenzen in Baumansicht

Bezeichnung Sequenzen nach Accession-Einträgen EMBL-Datenbank; contig-Sequenzen gingen aus resultierenden Sequenzen hervor; Abbildung des Alignments mit Clonemanager-Software mit Multi-Way-Methode erstellt, keine phylogenetische Berechnung in Mega-Software durchgeführt

Die contig-Sequenzen schienen große Ähnlichkeiten zu den Gerstensequenzen HO17A06S und HO27O22S zu haben [Abbildung 20/112], doch hatte Contig-Sequenz 3 nur eine SQI_N von ca. 59 % und die contig-Sequenzen 1, 2, 4 und 5 lediglich eine SQI_N von ca. 30 % zu beiden Gerstensequenzen. In weiteren BLAST-Analysen (EMBL-Datenbank) der contig-Sequenzen wurden bei einer Ähnlichkeit von $\geq 80\%$ nur nicht-charakterisierte bzw. vermeintlich annotierte Nukleotidsequenzen gefunden, mit denen BLAST-Analysen im Gerste-Genom hätten durchgeführt werden müssen, das zu diesem Zeitpunkt nicht möglich war. Die dritte Amplifikation und Sequenzierung von vermeintlichen *HvTSPMS*-cDNA-Sequenzen war demnach erfolglos.

3.4.4. HPLC-gestützte TSPM-Suche in *Hordeum vulgare*

Für die TSPM-Suche musste eine Analysenmethode zur Extraktion, Derivatisierung, Trennung, sowie zum Nachweis von SPM und TSPM etabliert werden. Ihre Trennung nach Derivatisierung mit Dansylchlorid [2.5.5.2./61] war mittels HPLC [2.5.5.4./62] nicht möglich (vgl. (Kakehi, et al., 2008)). Sie zeigten in FLD- und DAD- Chromatogrammen gleiche Spektren und Retentionszeiten [Abbildung 21/113].

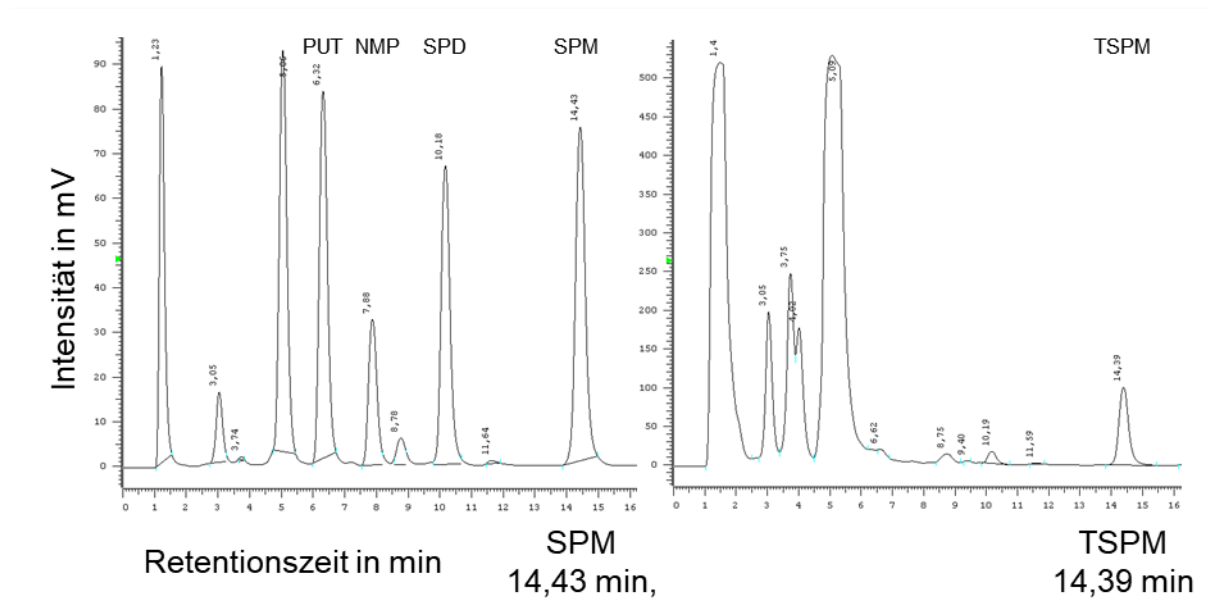


Abbildung 21: HPLC-Chromatogramme PA-Standard-Mischung und TSPM-Standard
Chromatogramme dansylierter PA-Lösungen: links – Chromatogramm PA-Standard-Mischung (5 ng/μl), rechts – Chromatogramm TSPM-Standard (5 ng/μl); Standardmischung besteht aus PUT, NMP, SPD, SPM (je 5 ng/μl); Retentionszeiten: SPM-Dansyl-Derivat – 14,43 min, TSPM-Dansyl-Derivat – 14,39 min

Mit der angepassten Methode nach Fernandes, et al., 2000 [3.1.3.3./80] konnten TSPM und SPM in Mischungen wässriger Standards, sowie in mit TSPM versetzten *HvSPMS*-Proteinassays nach HFBA-Derivatisierung [2.5.6.1./64] und anschließender GC-MS-Analyse [2.5.6.2./65] erfolgreich von einander getrennt nachgewiesen werden. Wurde in N₂liq-gemörsertes Gerstenpflanzen als Ausgangsmaterial verwendet, ließen sich auch nach Optimierung der Bedingungen keine PA in den Extrakten nachweisen.

Es wurde versucht die Methode der perchlorsauren Extraktion von PA [2.5.5.1./60] mit der HFBA-Derivatisierung zu kombinieren. Ideal verläuft die Derivatisierungsreaktion bei pH 7,4 (Fernandes, et al., 2000); die PA-HFB-Derivate sind nur bei pH 7,0-9,0 stabil. Die Methode der perchlorsauren PA-Extraktion liefert HCl-hydrolysierte Trockenextrakte (Ü2, P) und einen perchlorsäuren Überstand (Ü1). Diese Fraktionen oxidierten bei Zugabe des HFBA-ACN-Derivatisierungsgemisch sehr heftig, was deren Aufarbeitung unmöglich machte. Versuche die Derivatisierungsreaktion mit einem geeigneten Puffer zu stabilisieren, um die PA-HFB-Derivate dann mit einem geeigneten Lösungsmittel auszuschütteln, blieben erfolglos: Entweder war die Pufferkapazität der gewählten Puffersysteme zu gering oder sie waren zu hoch konzentriert, sodass sie im anschließenden Trocknungsschritt aussalzen und die PA-HFB-Derivate zerstörten. Ohne Trocknung wurde keine erschöpfende Extraktion mit den gewählten Lösungsmitteln erreicht. Einige Lösungsmittel reagierten selbst mit HFBA und den PA-HFB-Derivaten. Weiterhin ließen sich theoretisch gut geeignete Lösungsmittel in Praxis nicht verwenden, da sich keine Phasengrenzen zwischen der gering anteilig wässrigen PA-HFB-Mischung und den jeweiligen Lösungsmitteln einstellte. Die pH-Stabilisierung über sogenannte Hilfsbasen (z.B. Pyridin) brachte keinen Erfolg. Literaturrechen ergaben, dass PA aus Pflanzenmaterial nur durch perchlor- bzw. -salz- sauren Aufschluss erschöpfend extrahiert werden können.

Die Silylierung ist eine weitere gängige GC-MS-geeignete Derivatisierungsmethode von primären und sekundären Aminen, die mit der perchlorsauren Extraktion kombiniert werden sollte. Zunächst wurden wässrige SPM-Standards für 30 min bei 60 °C mit BSTFA inkubiert und mittels GC-MS analysiert. Es wurde kein vollständiger Umsatz beobachtet, die Chromatogramme zeigten bei 10,2-12,6 min nicht derivatisiertes SPM und bei 13,0-15,1 min sehr stark gefrontete Mehrfach-Peaks von nicht vollständig derivatisiertem SPM [Abbildung 22/115]. Dies konnte durch Optimierung der Derivatisierungsbedingungen nicht abgestellt werden. Der Ansatz PA zu silylieren wurde verworfen. Zu einem späteren Zeitpunkt der Dissertationsphase wurde festgestellt, dass anstelle der HFBA-Derivatisierungs-GC-Säule eine andere hätte verwendet werden müssen, da bereits kleinste Spuren an Fluorid-Ionen die auf der Säule laufenden PA-Silyl-Derivate zerstörten. Dies erklärte die vermeintlich nicht optimierbaren Derivatisierungsbedingungen und die Mehrfachpeaks der Chromatogramme.

Die Methoden wurden aus Zeitmangel nicht erneut optimiert, es wurde stattdessen versucht SPM und TSPM nach FMOC-Derivatisierung via HPLC (Fellenberg, et al., 2012) nachzuweisen und zu trennen [2.5.6./64]. Unter Verwendung der RP-18 LiChrospher® 100, LiChrocart® 250-4 HPLC- Säule, ließen sie sich zunächst nicht trennen und hatten gleiche Retentionszeiten. Die Extraktions- Derivatisierungs- und die HPLC-Analyse-Bedingungen wurden angepasst und optimiert [Abbildung 23/115, Methoden 8-12; vgl. 2.5.5.1./60, 2.5.5.3./62, 2.5.5.5./63]. Eine Basislinientrennung der Strukturisomere wurde nicht erreicht [vgl. 4.5.3./144].

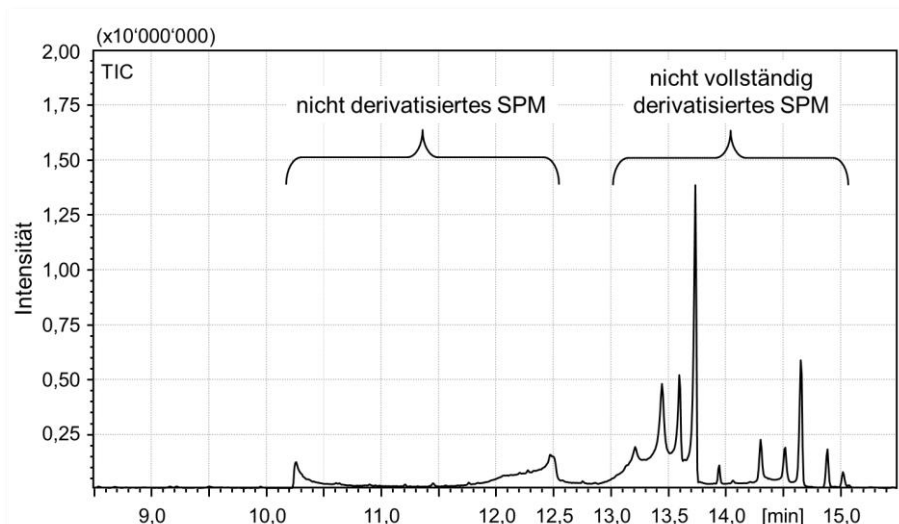


Abbildung 22: GC-MS-Chromatogramm BSTFA-derivatisiertes SPM

SPM-Standard nach Derivatisierung mit BSTFA; nicht derivatisiertes SPM – 10,2 min bis 12,6 min, unvollständig derivatisiertes SPM – 13,0 min bis 15,1 min; TIC – Total Ion Count

Mit Methode 12 wurde das SPM/TSPM-Gemisch soweit getrennt, dass im Chromatogramm ein Doppelpeak mit einem Abstand der Peakmaxima von ca. 1,5 min erhalten wurde: TSPM-Retentionszeit ($t_{RET\ TSPM}$) = 29,0 min, $t_{RET\ SPM}$ = 30,5 min [Abbildung 23/115, Methode 12].

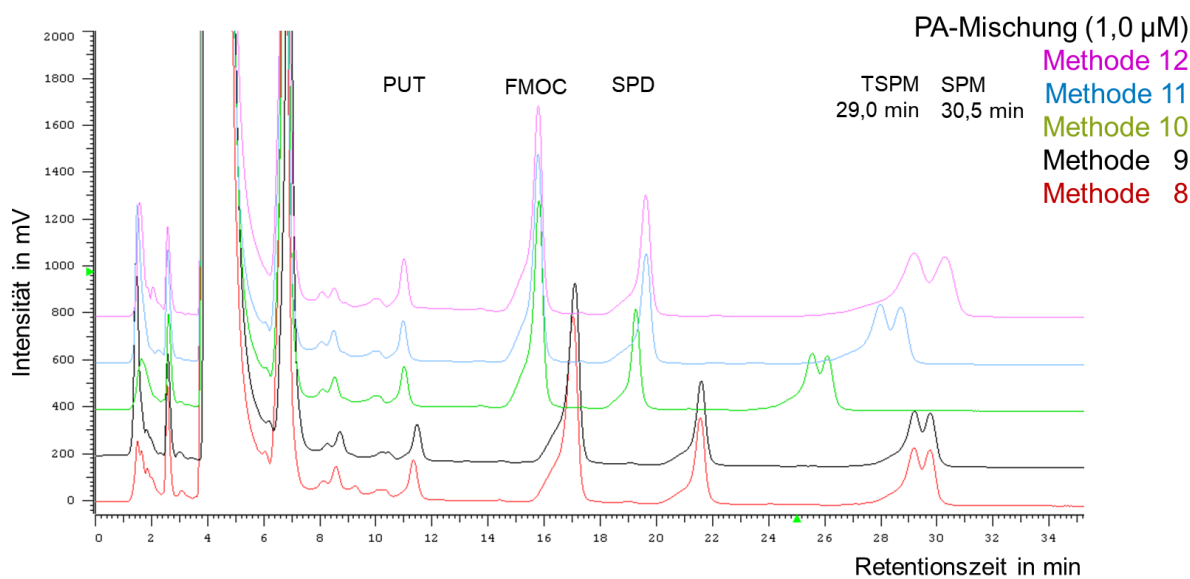


Abbildung 23: Chromatogramme Optimierung Fmoc-PA-Derivatisierungsmethode

PA-Standards nach Derivatisierung mit Fmoc, Methoden 8 bis 12; PA-Mischung – PUT, SPD, TSPM und SPM (jeweils 1,0 μ M); Methode 12 – endgültige HPLC-Bedingungen [2.5.5.5./63]; Elutionszeiten: TSPM – 29,0 min, SPM – 30,5 min

Bereits mit Methode 8 wurden Gerstenpflanzenextrakte untersucht. Bei einzelnen Pflanzenproben, denen kein TSPM/SPM-Gemisch zugemischt wurde, wurden Doppelpeaks zu den entsprechenden Elutionszeiten beobachtet. Methode 8 ermöglichte jedoch keine

hinreichende TSPM/SPM-Trennung, sodass die zugemischten Pflanzenproben keinen Doppel- sondern stark frontende Peaks zeigten [vgl. Abbildung 24/116].

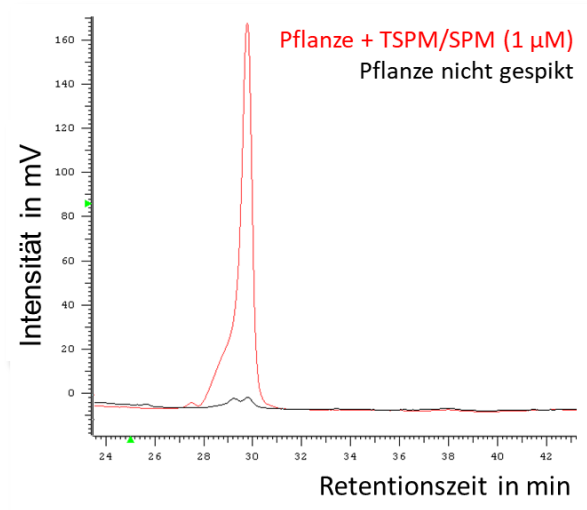


Abbildung 24: Chromatogramm Methode 8, FMOc-derivatisierte Gerstenpflanzenproben
Chromatogramme zeigen Gerstenpflanzenproben nach Derivatisierung mit FMOc, rote Kurve – Pflanzenprobe mit TSPM-SPM-Mischung (1 µM) gespickt, schwarze Kurve – Pflanzenprobe nicht gespickt

Leider konnten die Doppelpeaks bei erneuter Messung dieser und weiterer, neu extrahierter Pflanzenproben mit Methode 12 nicht repliziert werden. Es wurde daher entschieden die Methodenoptimierung an dieser Stelle zu beenden.

Die Etablierung eines HPLC-gestützten Trennverfahrens der Strukturisomere TSPM und SPM, das auch auf komplexe Pflanzenmatrices angewendet werden konnte, wurde erreicht, jedoch war der Nachweis von TSPM in *Hordeum vulgare* unter den genannten Bedingungen nicht möglich.

4. Diskussion

4.1. Charakterisierung der HvSPMS-Proteine

4.1.1. Aufschlüsselung der HvSPMS-Nukleinsäuresequenzen

4.1.1.1. Amplifizierung und Sequenzierung der HvSPMS1/2-c/gDNA

Bei der Amplifizierung und Sequenzierung der *Hv(T)SPMS*-cDNA kamen Wobble-Primer des Primersatzes Nr. 1 [2.1.3./14] in verschiedenen Paarungen zum Einsatz [2.6.1.1./66]. Sie wurden mit Hilfe eines Alignments verschiedener bekannter *SPMS*-Sequenzen an hoch konservierten Regionen designt [Abbildung 10/67]. Werden die vollständig sequenzierten cDNA-Sequenzen der beiden *HvSPMS*-Gene verglichen, zeigen sich im Primer-Bindebereich nur wenige Austausche einzelner Basen [6.3.9./166]. Trotzdem wurden zwei verschiedene cDNA-Fragmente kloniert [3.1.1.2./74].

In der BLAST-Analyse der Sequenz des cDNA-Fragments aus PCR-Ansatz 1 habe ich den Vollängen-cDNA-(FLcDNA)-Datenbankeintrag AK250627.1 (FLbaf92k17) [3.1.1.2./74] identifiziert. Dieser wurde in einem Sequenzierungs- und Chromosomen-Kartierungsprojekt des Gerstenkultivars Haruna Nijo generiert (Sato, et al., 2009). Die Annotationen des Projektes beruhen lediglich auf *in silico*-Berechnungen, Funktionsuntersuchungen der kodierten Proteine wurden nicht durchgeführt. Basierend auf solchen Berechnungen wurde beispielsweise *SPMS1* in *Zea mays* (*Zm*) zunächst als *ZmSPDS1* annotiert. Es stellte sich jedoch in späteren Charakterisierungsexperimenten heraus, dass dieses Protein tatsächlich eine *SPMS*-Aktivität hatte (Rodríguez-Kessler, et al., 2010). AK250627.1 (FLbaf92k17) wurde als „nicht-gespleißte, genomische Spermidinsynthase 1, putativ“ (Sato, et al., 2009) annotiert und ist in den Daten zur Chromosomen-Kartierung nicht zu finden. Er gehört demnach zu der FLcDNA-Gruppe, die jenem Projekt nicht kartiert werden konnte. In weiterer Sequenzierarbeit (*Pfu*-PCR) wies ich AK250627.1 (FLbaf92k17) in meiner verwendeten cDNA-Bank ohne Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) nach. Die cDNA-Sequenz für die mutmaßliche *HvSPMS1* war gefunden.

Für das cDNA-Fragment der PCR-Ansätze 2-4 fand ich in BLAST-Analysen keine passenden Datenbankeinträge. Die Sequenz wurde downstream mittels 3'RACE-PCR vervollständigt. Trotz wiederholter Anpassung der Bedingungen konnte die Sequenz upstream mit 5'RACE-PCR nicht vervollständigt werden [3.1.1.4./75], da keine passenden cDNA-Fragmente amplifiziert wurden. Die Hauptursache hierfür war, dass die 5'RACE-PCR_GSP-Primer 1-3 in einer Region der *HvSPMS*-cDNA-Sequenzen designt wurden, in der sich beide Sequenzen zu ähnlich waren. Ich klonierte wiederholt Fragmente der *HvSPMS1*- anstatt der *HvSPMS2*-cDNA. Neben der ungünstigen Wahl der GSP-Primer-Bindebereiche waren zusätzlich die Primer und die PCR-Bedingungen trotz Optimierung zu wenig spezifisch.

Die resultierende Konsensussequenz der cDNA-Amplifikate der 3'RACE-PCR und der PCR-Ansätze 2-4 wurde in Kooperation mit Dr. Nils Stein (IPK Gatersleben, Genebank, Research

Group Genomics of Genetic Resources, Deutschland) mit bis dato (2010) nicht publizierten Daten des GABI-BARLEX-Projektes (Gerstengenom-Sequenzierung) vervollständigt [3.1.1.4./75]. Das cDNA-Amplifikat der Überprüfungs-*Pfu*-PCR hatte eine SQI_N von 99,9 % mit der in Kooperation mit Dr. Stein vervollständigten Sequenz, die dadurch als mutmaßliche *HvSPMS2*-cDNA-Sequenz bestätigt wurde.

BLAST-Analysen für die Suche nach der *HvSPMS2*-upstream-Region ergaben den FLcDNA-Datenbankeintrag AK370244.1, in dem sich das vermutete *HvSPMS2*-cDNA-Amplifikat wiederfand [Tabelle 55/86]. Der Datenbankeintrag stammt aus dem NIAS (National Institute of Agrobiological Sciences, Japan)-Gerstensequenzierprojekt, in dem ebenfalls das Gerstenkultivar Haruna Nijo verwendet wurde. In jenem Projekt wurde eine cDNA-Bank aus verschiedenen Organen gestresster und nicht gestresster Gerstenpflanzen sequenziert (Matsumoto, et al., 2011). Die erhaltenen FLcDNAs und ihre ORF wurden mit bis 2011 publizierten Gerstesequenzen verglichen und erweiterten den Sequenzinformations-Pool um über 17'700 neue Einträge, von denen ca. 1'700 gerstenspezifisch waren. AK370244.1 wurde annotiert als „normalisierte und geeinzelte Gerste-FLcDNA“, die ein „berechnetes Protein“ kodiert und aus einer „cDNA-Bibliothek aus Sprösslingen und Wurzeln nach Jasmonsäure (JA)- Behandlung des Klons NIASHv2107I09“ stammt (Matsumoto, et al., 2011). Da dieser Annotation nur computergestützte Vergleiche zugrunde liegen, ist sie als putativ einzustufen. Funktionsuntersuchungen und kinetische Charakterisierungen des kodierten Proteins wurden in jenem Projekt ebenfalls nicht durchgeführt. Anhand der Ergebnisse der Charakterisierung [3.1.4./82] können beide *HvSPMS*-cDNAs eindeutig annotiert werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass meine Amplifizierungsexperimente zwei Gerstensequenzen ergaben, die zwar in Datenbanken erfasst waren, deren Aktivitäten jedoch nicht oder nur durch in silico Berechnungen bestimmt wurden. Um ihre Aktivität klar zu definieren, wurden diese Sequenzen und ihre kodierten Proteine anschließend durch mich charakterisiert [3.1.3./79ff, 3.1.4./82ff, siehe auch 4.1.3.2.ff/123ff]. Nach der Bestätigung der funktionalen SPMS [3.1.3.3./80] wurde die gDNA-Sequenz des *HvSPMS1*-Gens amplifiziert und sequenziert [3.1.1.5./75]. Das war für das *HvSPMS2*-Gen nicht notwendig, da diese Sequenzinformationen durch die Kooperation mit Dr. Stein bereits vorlagen.

4.1.1.2. Intron/Exon-Muster der *HvSPMS*-Gene

Anhand der gDNA- und cDNA-Sequenzen der *HvSPMS*-Gene wurden die Intron-Exon-Muster der gDNA bestimmt [3.1.1.6./76]. Die Theorie der spleißosomalen Intron-Exon-Grenzen wurde angewandt, da autokatalytisches Spleißen, das z.B. bei der Prozessierung von Vorläufer-26S-rRNA von *Tetrahymena thermophila* beobachtet wurde (Cech, et al., 1981), bei der Prozessierung der Zellkern-mRNA in Gerstenzellen nicht stattfindet. Hiernach treten sogenannte GT-AG- und seltener AT-AC-Introns auf (ca. 0,1 % (Lorkovic, et al., 2000)). In 3'Richtung beschreibt die Basenabfolge G und T bzw. A und T den Donor und die Basenabfolge A und G bzw. A und C den Akzeptor dieser Introns (Berg, et al., 2002; Wahl, et al., 2009). Trotz dieser eindeutigen Grenzen ist es schwer, Spleißstellen basierend auf

Sequenzdaten vorauszuberechnen. Die Sequenzinformation allein bedeutet nicht, dass ein Spleißvorgang tatsächlich an jener vorausbestimmten Stelle eintritt (Wahl, et al., 2009). Zusätzlich ist alternatives Spleißen durch z.B. Salzstress möglich (Rodríguez-Kessler, et al., 2006).

Die Sequenzinformationen für die Bestimmung der Intron-Exon-Grenzen stammten nicht allein aus Datenbanken, sondern auch aus eigenen cDNA- und gDNA-Sequenzierungen. Nach Ausschluss von Sequenzierfehlern stimmten die Basenabfolgen der cDNAs zu 100 % mit denen der gDNAs überein. Allgemein in Pflanzen-gDNA-Sequenzen auftretende GT-AG-Grenzen (Lorkovic, et al., 2000; Simpson, et al., 1996) wurden angenommen [Abbildung 11/76]. Die Sequenzen der *SPMS1/2* aus *Os* und *Zm* besitzen jeweils 10 Introns und 11 Exons (Rodríguez-Kessler, et al., 2010). Dieses Muster ist für Monokotyledonae hoch konserviert (Minguet, et al., 2008). In den *HvSPMS*-gDNAs wurden ebenfalls 10 Introns unterschiedlicher Längen und 11 Exons jeweils gleicher Längen gefunden. In Tabelle 64/120 werden sie mit den gDNAs von *OsSPMS1/2* und *ZmSPMS1/2* verglichen.

Die Längen der Exons E2 bis E9 der *HvSPMS1/2*-gDNA-Sequenzen werden durch die Daten von Rodríguez-Kessler, et al., 2010 bestätigt. Die Längen der Exons E3 bis E8 sind hoch konserviert (Rodríguez-Kessler, et al., 2010). Das Exon E1 kodiert den variablen, für das jeweils kodierte Protein charakteristischen Amino-Terminus, sodass seine Länge variieren muss. Exon E2, das den phylogenetisch sehr nahen *SPDS*-gDNAs fehlt (Rodríguez-Kessler, et al., 2010), ist in den *HvSPMS*-gDNAs auch 45 bp lang. Die E10-Exons der *HvSPMS*-gDNAs sind genauso lang wie die von *ZmSPMS2* und *OsSPMS1/2*. Monokotyledone *SPMS* besitzen am Ende des ORF ein regulatorisches Exon E11, das den dikotyledonen fehlt (Rodríguez-Kessler, et al., 2010). Demnach und anhand der Daten kann für Exon E11 die variable Länge von 78 ± 3 bp für monokotyledone *SPMS*-DNAs definiert werden. Die cDNA-Sequenzen der *SPMS1/2*-Gene von *Hv*, *Zm* und *Os* haben SQI_N -Werte zwischen 76-84 % [Tabelle 64/120]. Dies zeigt in Zusammenhang mit den gleichen Längen der Exons E2-E9 und den geringfügig unterschiedlichen Längen der Exons E1, E10 und E11 die hohe phylogenetische Nähe der codierenden Bereiche der monokotyledonen *SPMS*-Gene an.

Die Intron-Größe wird u.a. beeinflusst durch Insertion von transponiblen Elementen, durch die Anwesenheit von regulatorischen Elementen und durch die Frequenz und die Größe von Deletionen (Marais, et al., 2005). Die Längen der *HvSPMS1/2*-Introns variierten stark, was typisch für pflanzliche *SPMS*-gDNAs ist (Rodríguez-Kessler, et al., 2010). Die Längen der Introns I1, I3, I4, I6 und I9 sind ähnlich derer der *SPMS*-gDNAs von *Zm* und *Os*. In mono- und dikotyledonen *SPMS*-gDNAs hat das Intron I5 eine hoch konservierte Länge von 70-90 bp (Rodríguez-Kessler, et al., 2010). Die I5-Introns der *HvSPMS*-gDNAs variieren nicht, sind mit 90 bp gleich lang und sind somit hoch konserviert [Tabelle 64/120]. Die Intron-Positionen innerhalb der Codons der *ZmSPMS*- und *OsSPMS*-gDNAs sind konserviert, wobei drei Phasen (P) unterschieden (Rodríguez-Kessler, et al., 2010) werden: P1 – Intron-Start nach Codonbase eins, P2 bzw. P0 – Intron-Start nach Codonbasen zwei bzw. drei (zwischen

zwei Codons). Demnach sind die Introns I1, I2, I6, I7 in den *SPMS*-Genen von *Zm* und *Os* jeweils P1-Introns, I8 ist ein P2-Intron und die restlichen sind P0-Introns.

Diese Zuordnung trifft bei den *HvSPMS*-gDNAs nur für die Introns I1 und I8 zu. Die Codon-Positionen der *HvSPMS*-Introns I2-I7 und I9-I10 weichen von den Daten von Rodríguez-Kessler, et al., 2010 ab [Tabelle 64/120]. Die Intron-Phase ist ein wichtiges evolutionäres Merkmal, da sich die Position und die Anzahl homologer Introns während der Evolution verändern könnte (Rodríguez-Kessler, et al., 2010).

<i>HvSPMS1/2</i>		<i>ZmSPMS1</i>	<i>ZmSPMS2</i>	<i>OsSPMS1</i>	<i>OsSPMS2</i>	Phase	
	Phase						
E1	187	187	190	187	220		
E2	45		45				
E3	77		77				
E4	123		123				
E5	105		105				
E6	73		73				
E7	72		72				
E8	196		196				
E9	130		130				
E10	75	84	75	75	75		
E11	75	78	78	81	78		
∑	1'158	1'170	1'164	1'164	1'194		
I1	112/119	1	148	89	121	105	1
I2	719/1'124	2/0	284	106	622	257	1
I3	89/77	0/1	86	86	109	105	0
I4	200/235	2/0	161	179	254	157	0
I5	90	1	88	82	83	80	0
I6	169/135	2	145	144	298	121	1
I7	139/110	0/2	347	4'068	289	292	1
I8	758/1'768	2	654	6'949	851	440	2
I9	113/286	2/1	295	3'251	152	301	0
I10	271/537	1/2	172	125	117	357	0
∑	2'260/4'481		2'380	15'079	2'896	2'215	
SQI_N zu <i>HvSPMS1</i>		82 %	82 %	84 %	76 %		
SQI_N zu <i>HvSPMS2</i>		78 %	78 %	79 %	82 %		

Tabelle 64: Zusammenfassung wesentlicher Informationen über Intron/Exon-Muster monokotyledoner *SPMS*-gDNA-Sequenzen

Vergleich der Daten der *HvSPMS*-gDNA mit Daten der *ZmSPMS*- bzw. *OsSPMS*-gDNA; Daten zu *Zm* und *Os* nach Rodríguez, et al., 2010; E – Exon, I – Intron; Intron/Exon-Längenangaben in bp; Phase – Phase des Codons (nach 1., 2. und 3. Codonbase \triangleq 1, 2 und 0)

Die *HvSPMS*-Gene haben sich möglicherweise evolutiv anders entwickelt als die *SPMS*-Gene von *Os* und *Zm*. Die Untersuchung der *HvSPMS*-Gen-Evolution ist nicht Inhalt dieser Arbeit, um einen tieferen Einblick in diese Thematik zu bekommen, müssen weitere, v.a. monokotyledone *SPMS*-gDNA-Sequenzen charakterisiert und zusammen mit den *HvSPMS*-gDNAs mit den Daten von Rodríguez-Kessler, et al., 2010 verglichen werden.

4.1.2. Phylogenetische Untersuchungen

Das Review-Paper von Rodríguez-Kessler, et al., 2010 gibt eine gute Übersicht über die Phylogenie pflanzlicher Aminopropyltransferasen (APT). Ihre Ähnlichkeit wird in einem phylogenetischen Baum dargestellt [Abbildung 30/167]. Die Sequenzen der SPMS-Gruppe (darunter *OsSPMS1/2* und *ZmSPMS1/2*) dieses Baumes hatten eine SQI_A von mehr als 50 %. Die HvSPMS1/2-Proteine haben zueinander eine SQI_A von 79 % und zu den SPMS-Proteinsequenzen von *Os* und *Zm* von 68-84 % [Tabelle 64/120], sodass sie höchstwahrscheinlich ebenfalls in der SPMS-Gruppe des Baumes von Rodríguez-Kessler, et al., 2010 clustern würden.

Alternatives Spleißen ermöglicht eine hohe Proteindiversität und kontrolliert das Wachstum und die Entwicklung von Organismen (Urano, et al., 2003; Ikeguchi, et al., 2006). Die HvSPMS-Proteine zeigen eine SQI_A von 79 %, im phylogenetischen Baum liegen sie nahe beieinander [Abbildung 13/78] und die Ergebnisse der kinetischen Charakterisierung [3.1.4./82ff] zeigten die Co-Substrat-Hemmung von HvSPMS2, während HvSPMS1 nicht gehemmt wurde. Die Exon- und Intron-Sequenzen der beiden *HvSPMS*-Gene wurden mit der jeweils anderen *HvSPMS*-g-DNA-Sequenz in Alignments verglichen. Für beide Gene wurden die Positionen der Exons des einen Gens exakt nur denselben Positionen der Exons des anderen Gens, jedoch nicht den Introns, zugeordnet. Dabei zeigten sich SQI_N von 50-85 %. Die Introns beider Gene konnten nicht der jeweils anderen gDNA-Sequenz zugeordnet werden, weil sie a) dabei in kurze (6-10 bp) Bereiche zerteilt wurden, die sich b) diffus über die gesamte g-DNA-Sequenz des anderen Gens verteilten. Es wurde daher ausgeschlossen, dass es sich bei den *HvSPMS*-Genen um alternative Spleißvarianten handelte.

Bezeichnung	Länge [aa]	Position [aa]			
		I	II	III	IV
<u>Dikotyledonae:</u>					
<i>MdSPMS</i>	369				
<i>AtSPMS</i>	359	Val	Ser	Ala	Val
<u>Monokotyledonae:</u>					
<i>HvSPMS1</i>	385	Val			
<i>HvSPMS2</i>	385	Ile	Ala	Ala	Val
<i>ZmSPMS1*</i> (<i>ZmSPDS2</i>), ABB51556	389	Val	Ala		
<i>OsSPMS1*</i> (<i>OsSPDS2</i>), Os6g33710	387				
<i>ZmSPDS1</i> , ACG34974	387				
<i>ZmSPDS1</i> , AGG33952	387		Ser	Ala	Val
<i>OsSPDS3</i> , ACD87085	397	Ile			
<i>OsSPMS2*</i> (<i>OsSPDS3</i>), Os2g15550	325		Cys		

Tabelle 65: Vergleich dcSAM-Bindemotiv in mono- und dikotyledonen SPMS

in Spalte Bezeichnung werden Accession-Einträge der jeweiligen Datenbank aufgeführt [Vergleich 2.6.2./69]; * - neue Bezeichnung nach Rodríguez-Kessler, et al., 2010; Datenbanken in Tabelle 51/73 aufgeführt; Positionen nach (Kitashiba, et al., 2005), Positionen aus eigenen phylogenetischen Untersuchungen; aa – Aminosäure; I/II/III/IV – *Md*: 149/161/205/235, *Ath*: 150/162/206/236, Monokotyledonae: 148/160/204/234

Phylogenetische Untersuchungen der SPMS-Proteinsequenzen von *Md* und *Ath* ($SQI_A = 79,8\%$) beschreiben das in Dikotyledonen konservierte dcSAM-Bindemotiv (Kitashiba, et al., 2005), das durch die Aminosäuren Val-149/150 (MdSPMS/AtSPMS), Ser-161/162, Ala-205/206 und Val-235/236 gebildet wird. In eigenen phylogenetischen Untersuchungen wurden die Sequenzen der MdSPMS-, AtSPMS-, HvSPMS- und der monokotyledonen SPMS-Proteine aus Abbildung 13/78 verglichen. Das dcSAM-Bindemotiv von monokotyledonen SPMS weicht demnach in Positionen I und II von dem der Dikotyledonen ab [Tabelle 65/121]. In monokotyledonen SPMS stimmen die Positionen III und IV mit dikotyledonen SPMS überein und sind hoch konserviert. Position I variiert in monokotyledonen SPMS zwischen Valin (dikotyledone SPMS) und Isoleucin (dikotyledone SPDS (Kitashiba, et al., 2005)) und scheint „nur“ konserviert zu sein, während Position II sehr stark variiert. Durch die Charakterisierung weiterer monokotyledoner SPMS-Proteinsequenzen könnte belegt werden, ob in Monokotyledonen Serin wie in den Dikotyledonen oder Alanin an dieser Position konserviert ist. Für monokotyledone SPMS-Proteine kann das dcSAM-Bindemotiv wie folgt beschreiben werden: Val/Ile-148, Ser/Ala-161, Ala-204, Val-234.

In der Analyse zur phylogenetischen Einordnung der *HvSPMS*-Gen-Sequenzen wurden der Großteil der verwendeten Sequenzen jeweils einer charakteristischen Gruppierung zugeordnet: A) SPMS, B) SPDS, C) TSPMS [Abbildungen 12/77 und 13/78]. Die phylogenetische Bäume in Takano, et al. (Takano, et al., 2012), Ohnuma, et al. (Ohnuma, et al., 2011), Rodríguez-Kessler, et al. (Rodríguez-Kessler, et al., 2010), Takahashi, et al. (Takahashi, et al., 2009), Efrose, et al. (Efrose, et al., 2008), Kitashiba, et al. (Kitashiba, et al., 2005) und Panicot, et al. (Panicot, et al., 2002) bestätigen diese Zuordnungen und die Struktur der oben genannten phylogenetischen Bäume. Die evolutiv nahe Verwandtschaft zwischen SPMS und SPDS wird erkennbar. Pflanzliche SPMS evolvierten aus pflanzlichen SPDS (Minguet, et al., 2008).

4.1.3. Funktions- und kinetische Charakterisierung der HvSPMS-Proteine

4.1.3.1. Synthese und Reinigung der vermuteten HvSPMS-Proteine

Die heterolog exprimierte Proteine wurden nahezu vollständig von den löslichen Fraktionen der Bakterienproteine abgetrennt, in der Durchfluss-Fraktion waren keine Proteine mit der Masse von 45 kDa enthalten, in den Pellets jedoch schon [Abbildung 15/80]. Die Extraktion der HvSPMS-Proteine war entweder unvollständig, Fehlfaltungen oder Denaturierung der Proteine bei der Translation in den Expressions- *E. coli*-Kolonien traten auf oder die HvSPMS-Proteine assoziierten (z.B. kovalente Bindung) an denaturierte Bakterienproteine. Die Proteinbanden in den Pellet-Fraktionen machten nur geringe Anteile der Gesamt-Proteinfraktionen aus [Abbildung 15/80], sodass die Methode nicht optimiert wurde. Die HvSPMS-Proteine (HvSPMS1 – 42,09 kDa, HvSPMS2 – 42,01 kDa) eluierten durch die Überladung der Gele bereits bei ca. 45 kDa. Ihr Molekulargewicht ist ähnlich dem anderer

pflanzlicher SPMS: z.B. *GtSPMS* – 39 kDa (Imamura, et al., 2015), bzw. *LjSPMS* – 39,7 kDa (Efrose, et al., 2008). Die humane (*Homo sapiens*) SPMS (*HsSPMS*) hat im Gegensatz dazu ein Molekulargewicht von 45 kDa bzw. 78 kDa als natives Dimer (Kajander, et al., 1989).

4.1.3.2. Bestimmung der Proteinfunktion

Die vermuteten HvSPMS-Proteine hatten ausschließlich SPMS-Aktivität [Assays I-III, 2.4.4.2./55]: Beide nutzten SPD als Substrat und dcSAM als Co-Substrat, um neben MTA SPM als Produkt zu bilden. Die Assays wurden bei konstanter Gesamtdauer und mit unterschiedlichen Proteinmengen durchgeführt. Eine Basislinien-Trennung der möglichen Produkte SPM und TSPM mittels HPLC-Dansylchlorid-Analysenmethode war nicht möglich, da die Strukturisomere dieselben Elutionszeiten aufwiesen. Die GC-MS-HFBA-Analyse zur zweifelsfreien Proteinfunktionsbestimmung ermöglichte die Trennung von SPM ($t_{RET} = 12,9$ min) und TSPM ($t_{RET} = 12,8$ min) [Abbildung 16/81]. TSPM wurde nicht als Produkt gefunden. Die Proteinaktivität als reine SPMS bestätigten die phylogenetischen Untersuchungen. In den Linearitätsassays IV bis X, 2.4.4.3./55 wurden linear ansteigende Produktmengen (SPM) für beide HvSPMS-Proteine nachgewiesen [Diagramme 4 und 5/81]. Anhand der unterschiedlichen Anstiege der Regressionsgeraden fiel auf, dass in den HvSPMS2-Protein-Assays weniger Produkt pro Zeit gebildet wurde als in den HvSPMS1-Protein-Assays [3.1.3.3./80]. Dies wird unter 4.1.3.3./124 weiter ausgeführt.

Um die Protein-Charakteristika von AtSPMS (Ikeguchi, et al., 2006) bzw. HsSPMS (Wu, et al., 2008) zur Struktur und Polymerisierung mit denen von *Hordeum vulgare* zu vergleichen, sind weiterführende Protein-Docking- und Kristallisationsstudien notwendig. So kann geprüft werden, ob der konservierte Aminopropyl-Transferasen-Mechanismus (Korolev, et al., 2002), der außerdem für HsSPMS belegt wurde (Wu, et al., 2008), auch für monokotyledone SPMS zutrifft. Efrose et al. charakterisierten *LjSPDS*, *LjSPMS* und diskutierten charakteristische Motive von Aminopropyl-Transferasen in *Lj* (Efrose, et al., 2008). Die HvSPMS-Protein-Sequenzen weichen nur geringfügig von diesen Motiv-Sequenzen ab [Tabelle 66/123].

Motiv	Sequenz / Position		
	<i>LjSPMS</i>	HvSPMS1	HvSPMS2
1	GGGDGGVLRE <u>VS</u> RHSS 122-137 bp	GGGDGGVLREI <u>AK</u> HDS 149-164 bp	GGGDGGVLREI <u>AR</u> HGS 146-164 bp
2	EID 145-147 bp		EID 172-174 bp
3	<u>DG</u> 186-187 bp		<u>DA</u> 203-204 bp
5	GPAQEL <u>F</u> (E) 200-207 bp		GPAQEL <u>VE</u> 228-235 bp

Tabelle 66: Charakteristische Sequenzmotive von pflanzlichen Aminopropyl-Transferasen *LjSPMS*-Sequenzdaten und Motivbezeichnungen nach Efrose et al. (Efrose, et al., 2008); HvSPMS-Sequenzdaten nach 3.1.1.2./74; Unterschiede sind unterstrichen

Es könnten innerhalb dieser Motive ähnliche Proteinstrukturen vorliegen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass der für Aminopropyl-Transferasen konservierte Bi-Bi-

Proteinfunktionsmechanismus (sequentiell oder Ping-Pong) (Zappia, et al., 1980; Pajula, 1983) auch auf die HvSPMS-Proteine zutrifft. Für SPDS-Proteine wurde ein einfacher Verdrängungsmechanismus mit Inversion der Konfiguration des Methyl-C-Atoms des dcSAM, das nukleophil von PUT angegriffen wird, postuliert (Korolev, et al., 2002). In Protein-Docking- und Kristallisationsstudien kann untersucht werden nach welchem Mechanismus die Katalyse in HvSPMS-Proteinen abläuft. Nur anhand von Sequenzdaten lässt sich nicht ableiten, welche Orientierung die abweichenden Aminosäurereste innerhalb der HvSPMS-Protein-Sekundär- und Tertiärstruktur der einnehmen.

4.1.3.3. Kinetische Charakterisierung der HvSPMS-Proteine

Kinetische Proteinparameter werden bei optimalem pH-Wert charakterisiert, da der pH-Wert die funktionsbezogene, strukturelle Proteinkonformation beeinflusst (Talley, et al., 2010). Das pH-Optimum von SPMS zwischen 7,0-8,1 [Tabelle 67/124] wurde ausschließlich von Säugetierproteinen bestimmt; ein Vergleich mit Daten pflanzlichen Ursprungs ist nur bedingt aussagekräftig. PH-Optima pflanzlicher SPMS wurden jedoch bisher nicht bestimmt.

Organismus	Bereich pH-Optimum	Literatur
<i>Bos taurus</i>	7,0-8,0	(Pajula, et al., 1979 b)
<i>Homo sapiens</i>	7,5	(MacLean, et al., 2008)
<i>Rattus norvegicus</i>	7,5-8,1	(Hannonen, et al., 1972)

Tabelle 67: Publierte Daten zu pH-Optima von SPMS

Informationen nach BRENDA-Datenbank, Stand: 22.05.2017, 21:15 Uhr

Die HvSPMS- v_{\max} -Werte von $8,0 \leq \text{pH}_{\text{HvSPMS1}} \leq 8,2$ bzw. $7,8 \leq \text{pH}_{\text{HvSPMS2}} \leq 8,2$ waren höher als die der Säugetierspezies, jedoch im Bereich von phylogenetisch verwandten pflanzlichen SPDS: z.B. *Senecio vulgaris* (*Sv*) – pH 7,7; *Glycine max* (*Gm*) – pH 8,0; *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* (*Bp*) – pH 8,8 (Daten nach BRENDA-Datenbank, Stand: 22.05.2017). Es fiel auf, dass der v_{\max} -Wert des HvSPMS2-Proteins ca. halb so groß war wie der des HvSPMS1-Proteins.

Gegenüber den in Säugetierspezies bestimmten Werten [vgl. Tabellen 52/83 und 53/84 mit Tabelle 68/124] hatten die HvSPMS-Proteine kleinere v_{\max} - und größere K_m -Werte.

Organismus	K_m in μM	v_{\max} in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg Protein} / \text{pkat}/\text{mg Protein}$	Literatur
<i>Bos taurus</i>	6	0,3960 / 6'600,0	(Pajula, et al., 1979 a/b, 1983; Raina, et al., 1983)
	84-88	0,4030 / 6'716,6	(Baillon, et al., 1988)
<i>Homo sapiens</i>	200	0,5790 / 9'650,0	(Pajula, et al., 1978)
	20	0,4550 / 7'583,3	(Kajander, et al., 1989)
<i>Rattus norvegicus</i>	70	0,3060 / 5'100,0	(Pegg, et al., 1981)
	84-88	0,3060 / 5'100,0	(Hannonen, et al., 1972)
		0,0062 / 103,3	(Baillon, et al., 1988)
		0,0062 / 103,3	(Hibasami, et al., 1980)

Tabelle 68: Publierte Daten zu K_m -Werten von SPMS mit SPD als Substrat

Informationen nach BRENDA-Datenbank, Stand: 31.05.2017, 15:13 Uhr

Die Daten von Hibasami, et al., 1980 wurden für Vergleich nicht verwendet, da sie stark von den anderen Werten abwichen. Es ist auch hier zu beachten, dass Vergleiche zwischen Enzymaktivitäten pflanzlichen und tierischen Ursprungs nur wenig aussagekräftig sind. Kinetische Daten für SPMS pflanzlicher Spezies konnten nicht ermittelt werden, obwohl SPMS-Funktions- und Charakterisierungsuntersuchungen pflanzlicher Spezies publiziert wurden: z.B. *Ath* (Hanzawa, et al., 2002), *Gt* (Imamura, et al., 2015), *Lj* (Efrose, et al., 2008), *Md* (Kitashiba, et al., 2005). Im Vergleich mit Daten pflanzlicher SPDS hatten die HvSPMS-Proteine geringere v_{\max} - und höhere K_m -Werte: z.B. *Gm* – $v_{\max} = 1'266,6$ pkat/mg, $K_m = 0,4$ μM ; *Bp* – $v_{\max} = 17'833,3-21'333,3$ pkat/mg; *Sv* – $K_m = 4,0$ μM (BRENDA-Datenbank, Stand: 31.05.2017). Zum Erreichen der Sättigung der HvSPMS-Proteine waren sehr hohe Konzentrationen an Substrat (SPD) notwendig [Diagramme 7-10/83f]. Der PA-Gehalt wurde in *Ath*-Blättern im nieder- μM -Bereich (50-100 μM PUT, 10-30 μM SPD/SPM) bestimmt (Alcázar, et al., 2010). 50-100 μM an Co-Substrat (dcSAM) reichten aus, um die HvSPMS-Proteine zu sättigen (50-100 μM). Ähnliche dcSAM-Sättigungskonzentrationen (40 μM) werden für die Sättigung der Rindergehirn-SPMS festgestellt (Pajula, et al., 1979 b). Die HvSPMS-Proteine haben folglich geringe Substrat- und hohe Co-Substrat-Affinitäten. DcSAM bildet aufgrund seiner geringen physiologischen Konzentrationen den „Flaschenhals“ des Katalyseprozesses (Imai, et al., 2004 b; Ikeguchi, et al., 2006), was die HvSPMS-Protein-Sättigung bei geringen Co-Substratkonzentrationen erklärt. Bei der Charakterisierung von Triamin/Agmatin-Aminopropyl-Transferasen in thermophilen Bakterien werden auch geringe Substrat-Affinitäten der untersuchten Proteine festgestellt (Ohnuma, et al., 2011), was jedoch mit deren Bi-Funktionalität begründet wird.

Durch ihre hohen Co-Substrat- und niedrigen Substrat-Affinitäten erreichen die HvSPMS-Proteine *in vivo* bei niedrigen dcSAM- und hohen SPD-Konzentrationen ihre v_{\max} . Sie haben eine „Notfall“-Funktion: Bei kleinen Substratkonzentrationen verläuft der Katalyseprozess relativ langsam und bei hohen schnell, um entweder sehr hohe SPD-Konzentrationen schnell abzubauen oder aus diesen schnell SPM zu bilden. Ikeguchi, et al. 2006 diskutierten Mechanismen zur Kompensation der SPD- bzw. SPM-Gehalte: U.a. führen hohe PUT-Konzentrationen durch Steigerung der SAMDC-Aktivität zur gesteigerten dcSAM-Synthese, sodass der SPD-Gehalt verringert und der SPM-Gehalt erhöht werden, was wiederum den PUT-Gehalt steuert. Hu, et al. berichten über die PA-beeinflusste Regulation der *AtSAMDC*-Gene (Hu, et al., 2005). Diese Arbeiten stützen die „Notfall“-Funktions-These: *In vivo* müssten erst sehr hohe SPD-Konzentrationen erreicht werden, bevor mehr oder überhaupt dcSAM für den SPMS-Katalyseprozess gebildet wird. Weiterhin erreichen die HvSPMS bereits bei geringen Co-Substratkonzentrationen maximale Umsätze und bauen SPD solange ab bzw. SPM auf, wie vermehrt oder überhaupt dcSAM zur Verfügung steht. Mit hohen Substrataffinitäten würden die HvSPMS bei geringen SPD-Konzentrationen ebenfalls „so schnell wie möglich“ SPM bilden, was *in vivo* für die „Normal“-Situation möglicherweise nicht notwendig ist.

Die v_{\max} -Werte des HvSPMS2-Proteins verringerten sich in den Substrat-Sättigungsassays bei Erhöhung der konstanten Co-Substratkonzentration [Diagramm 8 a-c/83] und in den Co-Substrat-Sättigungsassays nach Erreichen eines Maximums [Diagramm 10/84]. Das HvSPMS2-Protein bildete in den Linearitätsassays geringere Produktmengen bzw. hatte es in den pH-Optima-Bestimmungsassays ebenfalls geringere v_{\max} -Werte als das HvSPMS1-Protein. Demnach wurde es durch das Co-Substrat dcSAM gehemmt ($K_i = 3'100 \mu\text{M}$). Eine mögliche Substrathemmung wurde bereits bei *Rattus norvegicus* SPDS (RnSPDS) durch SPD mit sehr ähnlichen Kurvenverläufe beobachtet (Baillon, et al., 1988), was diese Schlussfolgerung stützt. Potente SPMS-Hemmstoffe mit publizierten K_i -Werten sind u.a. das beim SPMS-Katalyseprozess entstehende und SPMS-Proteine kompetitiv hemmende MTA (Pajula, et al., 1979 b), 1-Aminoxy-3-N-(3-aminopropyl)-aminopropan (APAPA) und N-[(2-Aminoxyethyl)-1,4-diaminobutan] (AOEPU) (Eloranta, et al., 1990). Sie haben sehr viel kleinere K_i -Werte als dcSAM [Tabelle 69/126] und führen in geringeren Dosen zum Protein-Funktionsverlust (Eloranta, et al., 1990). Es ist jedoch zu betonen, dass diese Inhibitoren wiederum nur an tierischen SPMS untersucht wurden.

Inhibitor	Organismus	K_i in μM	Literatur
APAPA	<i>Mus musculus</i>	1,5	(Ikeguchi, et al., 2006)
	<i>Bos taurus</i>		(Eloranta, et al., 1990)
MTA	<i>Bos taurus</i>	0,3	(Pajula, et al., 1979 b)
	<i>Homo sapiens</i>		(MacLean, et al., 2008)
AOEPU	<i>Mus musculus</i>	186,0	(Ikeguchi, et al., 2006)
	<i>Bos taurus</i>		(Eloranta, et al., 1990)
PUT	<i>Bos taurus</i>	1,7	(Pajula, et al., 1979 b)

Tabelle 69: Publierte Daten zu K_i -Werten von SPMS, verschiedene Inhibitoren
Informationen nach BRENDA-Datenbank, Stand: 22.05.2017, 21:19 Uhr

Bei der Charakterisierung von Hemmstoffen der RnSPDS bzw. EcSPDS wurde bereits beschrieben, dass dcSAM in hohen Konzentrationen eine inhibitorische Wirkung hat (Coward, et al., 1977; Hibasami, et al., 1980; Zappia, et al., 1980). Der berechnete K_i -Wert war mit $220 \mu\text{M}$ etwa um den Faktor 10 kleiner als in meiner Studie, es ist aber zu berücksichtigen, dass er für eine tierische SPDS bestimmt wurde. In tierischen Geweben akkumuliert dcSAM nicht: Pajula, et al., 1979 a – Gehalte $\leq 1 \mu\text{M}$; Hibasami, et al., 1980 – 1-2 nmol/g FM. Es ist nicht auszuschließen, dass in Pflanzen höhere physiologische dcSAM-Konzentrationen auftreten. Dennoch leite ich eine sehr schwache Hemmung des HvSPMS2-Proteins durch dcSAM ab. In weiteren Studien sollte der Hemm-Mechanismus des dcSAM untersucht werden.

Eine vollständige Hemmung des HvSPMS2-Proteins durch MTA *in vitro* ist auszuschließen, da sie potenter als die dcSAM-Hemmung sein müsste (vgl. Pajula, et al, 1979 b). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass MTA an der Hemmung des Enzyms zumindest beteiligt war. Für Untersuchungen darüber müsste die Aktivitätsmessung so verändert werden, dass MTA die HvSPMS-Proteine nicht beeinflusst. Das gebildete MTA könnte z.B. mit Hilfe der Enzyme 5'-Methylthioadenosin/S-Adenosylhomocystein Nukleosidase und S-

Ribosylhomocystein Lyase (Blastoff, 2009) abgebaut oder durch Phosphorylierung mit MTA-Phosphorylase inaktiviert werden (Pajula, et al., 1979 a; Kajander, et al., 1989). Dabei darf keiner der beteiligten oder gebildeten Stoffe den HvSPMS-Katalyseprozess beeinflussen. Die Verminderung der MTA-Konzentration würde die Gleichgewichtslage nicht beeinflussen (K_m und v_{max} würden sich nicht verändern), allerdings würde die Ausbeute erhöht und mehr SPM gebildet werden. Eine Inhibition durch MTA ist nur sehr schwer aufzuheben– auch z.B. bei Wechsel des Assay-Puffers nicht (Coward, et al., 1977). In weiteren *in vivo* und *in vitro*-Untersuchungen ist zu klären, ob eine MTA-Hemmung HvSPMS-Proteine auftritt und wenn, ob und wie sie unterbunden bzw. ob und wie die MTA-Konzentration unterhalb der inhibitorisch wirksamen Konzentration gehalten werden kann.

Aus dem HvSPMS1-Co-Substratsättigungsassay [Diagramm 9/84] ließe sich ebenfalls eine Co-Substrat-Hemmung ableiten. Die Kurve des Assays wies jedoch keinen negativen Trend bei ansteigender Co-Substratkonzentration auf und abnehmende v_{max} -Werte wurden bei ansteigender Co-Substrat-Menge im Assay in den Substrat-Sättigungsassays nicht festgestellt [vgl. Diagramm 7/83]. Die $K_{iHvSPMS1}$ wurde trotzdem mit $4'638,4 \mu\text{M}$ berechnet. Er war wiederum deutlich größer als der mit $3'100 \mu\text{M}$ bereits hohe $K_{iHvSPMS2}$. Ich schließe eine Co-Substrat-Hemmung des HvSPMS1-Proteins aus.

Abschließend ist festzuhalten: Die HvSPMS-Proteine haben ähnliche pH-Optima wie pflanzliche SPDS und sie sind in pflanzlichen SPMS höher als in tierischen. Es fällt auf, dass HvSPMS-Proteine niedrige Substrat- und hohe Co-Substrataffinitäten haben. Möglicherweise sollen HvSPMS *in vivo* erst bei hohen SPD-Konzentrationen maximale Aktivität haben, um dann SPD schnell ab- und SPM aufzubauen. Hohe SPD-Gehalte können z.B. durch TrStr induziert aus hohen PUT-Gehalten entstehen (Ikeguchi, et al., 2006; Kusano, et al., 2007 b; Takahashi, et al., 2009; Alcázar, et al., 2010). Die „Notfall“-Funktion der HvSPMS wurde oben diskutiert. Die kinetischen Charakteristika zeigen, dass HvSPMS2 im Gegensatz zu HvSPMS1 schwach durch das Co-Substrat dcSAM gehemmt wird. Der K_i -Wert ist verglichen mit potenten APT-Hemmstoffen (z.B. MTA) groß. Da dcSAM *in vivo* in geringen Konzentrationen vorkommt (Imai, et al., 2004 b; Ikeguchi, et al., 2006), ist davon auszugehen, dass seine Hemmung eine untergeordnete Rolle spielt oder nicht auftritt. Bei $50\text{-}100 \mu\text{M}$ dcSAM erreichen die HvSPMS-Proteine v_{max} und setzen es „so schnell wie möglich“ um. Auch daher sind höhere dcSAM-Konzentrationen *in vivo* auszuschließen, bei denen die HvSPMS gehemmt werden. Dennoch sollte der dcSAM-Hemmmechanismus charakterisiert und untersucht werden, ob MTA die HvSPMS hemmt.

4.2. Aktivitätsuntersuchungen der HvSPMS-Promotoren

Der Promotor kann u.a. regulatorische Proteine oder andere regulatorische Faktoren codieren, welche die Gen-Transkription, das translatierte Protein oder aber das Gen selbst prä- oder post-translational beeinflussen. Um die Aktivität der HvSPMS-Promotoren zu untersuchen, sollten möglichst große Teile der upstream-Regionen der HvSPMS-RNA-codierenden

Bereiche amplifiziert und in BLAST-Analysen untersucht werden. Mittels transienter Expression der *HvSPMS*-upstream-Regionen in Gerstenprotoplasten wurde die Aktivität der Promotoren getestet. Sagor, et al. 2011 zeigten, dass der *AtSPMS*-Promoter ohne Stressinduktion starke Aktivitäten während der Keimung in Keimlingen, keimenden Samen, in der lateralen Wurzel und in späteren Entwicklungsstadien hatte.

4.2.1. Amplifizierung, Sequenzierung und Analyse der *HvSPMS*-upstream-Regionen

Im Ranger DNA Polymerase Kit ist *Taq*-Polymerase enthalten, sodass die für die Ligation in den pGEM-Vektor nötigen Thymidin-Überhänge (Promega, 2009) während der PCR gebildet wurden, was die PCR-Qualität und Ausbeute erhöhte. Da die Größe der PCR-Amplifikate den Erfolg der Ligation beeinflusst, wurde das pGEM[®] T-Standard-Ligationsprotokoll verändert. Die erhaltenen upstream-Regionen mit den 5'UTRs (nicht translatierte Bereiche) beider Gene wurden in BLAST-Analysen charakterisiert [Tabelle 54/85]. Die 5'UTR bildet einen Teil des regulatorischen Bereiches eines Gens. An ihr binden mRNA- und deren Translation stabilisierende Proteine und sie kodiert regulatorische Elemente sowie die Translation einleitenden Sequenzen. Mit der PlantCARE-Datenbank wurden regulatorische CIS-Elemente der *HvSPMS*-Gen-upstream-Regionen inner- und außerhalb halb der 5'UTRs identifiziert [Tabellen 72/176 und 73/183].

Gen-Promotoren eukaryotischer Lebewesen sind komplex und variieren stark zwischen verschiedenen Spezies. Daher ist es schwierig allgemeine eukaryotische promotor-spezifische Nukleotid-Sequenzen nur durch bioinformatische Methoden zu charakterisieren. Dennoch wurden sowohl Kernpromotor-Elemente wie BRE-Elemente und TATA-Boxen, als auch weit verbreitete andere Promotor-Elemente wie CAAT-Boxen und GC-Motive identifiziert. Demnach wurden zumindest Teile der *HvSPMS*-Promotoren in den upstream-Regionen amplifiziert. Neben cis-Elementen (CGTCA-Motive) für die Regulation des Pflanzenhormonhaushalts wurden in beiden *HvSPMS*-upstream-Regionen cis-Elemente identifiziert, die direkt auf die Regulation von abiotischem und von Trockenstress (TC-reiche Motive) wirken können. Den ABA-Stoffwechsel (ABRE-Elemente, MBS-Bindestelle) und die Pflanzenlichtempfindlichkeit beeinflussende cis-Elemente (AE- und G-Boxen, sowie GT1-Motive u.a.) wurden ebenfalls gefunden. Der ABA-Stoffwechsel kann durch TrStr induziert werden (Talamè, et al., 2007). Zum einen induziert ABA die Stressantwort der *AtSPMS* (Hanzawa, et al., 2000), zum anderen reguliert sie viele verschiedene Stoffwechselwege in Pflanzen- z.B. den PA-Stoffwechsel bei Wasserstress (Alcázar, et al., 2006) und die Öffnung der Stomata (Alcázar, et al., 2010). Die Empfindlichkeit der Pflanze gegenüber Licht ist ebenfalls entscheidend für die Stomataregulation. Demnach wurden in den *HvSPMS*-Promotorregionen cis-Elemente identifiziert, die mit der Regulation von TrStr und des Wasserhaushaltes in Verbindung gebracht werden. Die *HvSPMS* nehmen vermutlich an TrStr-Reaktionen in Gerste teil, denn auch in den Promotoren von anderen PA-Biosynthesegenen wurden bereits u.a. TrStr-responsive Elemente gefunden (Alcázar, et al., 2010). Weitere zellspezifische (Schließzellen) und pflanzenorganspezifische (Blätter)

Untersuchungen der *HvSPMS*-Genpromotoren könnten diese These untermauern. Außerdem sollten die *HvSPMS*-Genpromotoren mit Hochdurchsatzmethoden im Gerste-Genom kartiert werden.

In den 5'UTR von Aminopropyl-Transferase-Genen verschiedener pflanzlicher Spezies (z.B. *AtSPMS*, *OsSPMS*, *ZmSPMS*) treten Introns auf, deren Positionen im Gegensatz zu den Introns der codierenden Bereiche nicht konserviert sind (variable Amino- und Carboxy-Termini, konservierte Zentralregion) (Rodríguez-Kessler, et al., 2010). Die 5'UTR der *HvSPMS*-Gene haben ebenfalls Introns [Tabelle 54/85], in denen cis-Elemente gefunden wurden [Tabellen 72/176 und 73/183]. Eine *HvSPMS*-Gen-regulierende Funktion der Introns ist demnach möglich. Introns in der 5'UTR der SAMDC erscheinen notwendig, um diese bei niedrigen SPD-Konzentrationen induzieren zu können (Hu, et al., 2005). Eine Vielzahl von cis-Elementen, die selbst jedoch nur einen geringen Informationsgehalt besitzen, sind für die Erkennung von Intron-Exon-Grenzen notwendig (Lorkovic, et al., 2000). Welche Relevanz die 5'UTR-Introns der *HvSPMS*-Gene haben, sollte weiter untersucht werden.

Transponible Elemente sind mobile genetische Einheiten, die in vielen Eukaryoten auftreten (Feschotte, et al., 2007). Sie können Gene und Genome durch Insertionsmutationen und retro-Transpositionierungen, Gen-Duplikationen, Chromosomen-Neuanordnung verändern und befinden sich typischerweise in Gen-Promotoregionen (Witte, et al., 2001; Feschotte, et al., 2007; Fontanillas, et al., 2007). Sie werden in verschiedene Gruppen u.a. die MITEs (Miniature Inverted-repeat Transposable Elements) eingeteilt. MITEs sind vorzugsweise in Gen- oder selten kopierende Gen-Regionen inseriert (Lyons, et al., 2008), werden häufig zusammen mit Pflanzengenomen transkribiert und spielen ebenso eine bedeutende Rolle bei der Genregulation und Genomevolution (Lu, et al., 2012). Zu den MITEs zählen die Talisker Transposons, die in der *HvSPMSI*-Gen-upstream-Regionen gefunden und in den Gerstenkultivaren Steptoe, Optic, Morex und Carlsberg bereits beschrieben wurden (Lyons, et al., 2008). Mit dem GP-Kultivar wurde nun ein weiteres Talisker Transposon- tragendes Gerstenkultivar identifiziert. Talisker Transposons sind Marker-MITEs für die breite genetische Diversität von Gerste und nützlich zur Charakterisierung der genetischen Relation innerhalb und zwischen verschiedenen Gerstenkeimgeweben (Lyons, et al., 2008). MITEs haben einen hohen Einfluss auf die Regulation von Genen (Lu, et al., 2012), weshalb der Einfluss der Talisker Transposons auf das *HvSPMSI*-Gen charakterisiert werden sollte.

In den oben genannten BLAST-Analysen wurden Sequenzen (teilweise $SQI_N = 100\%$) in den *HvSPMS*-Gen-upstream-Regionen und der *HvSPMS*-cDNAs gefunden [Tabelle 55/86], denen keine Funktion zugeordnet wurde. Sie sollten wie die *HvSPMS* charakterisiert werden. Es ist nicht auszuschließen, dass sie ebenfalls SPMS-Proteine codieren.

4.2.2. Vektorkonstruktion und Aktivitätsuntersuchungen

Der pGreen II 0179-Vektor, das Grundgerüst der *pHvSPMS*-pGreen-Vektor-Konstrukte, ermöglichte die PEG-medierte Gerstenprotoplastentransformation. Durch Phusion-PCR der *HvSMS2*-Gen-upstream-Region entstanden blunt-Enden-PCR-Fragmente, die nach

Aufreinigung direkt in den offenen pGreen-red-yellow-Vektor ligiert wurden. Für das *pHvSPMS1*-Konstrukt blieb die Phusion-PCR erfolglos, sodass die *HvSPMS1*-Gen-upstream-Region auf konventionellem Weg in den pGreen-red-yellow-Vektor ligiert wurde.

Die Gerstenprotoplasten fluoreszierten durch die 35S-Promotor-vermittelte Transkription des RFP rot, demnach war ihr Stoffwechsel intakt. Neben der roten wurde auch gelbe Fluoreszenz beobachtet, die *HvSPMS*-Promotoren vermittelten demnach die Transkription des YFP und waren aktiv.

Der ubiquitär in Pflanzen exprimierte Ubiquitin-Promotor (*pUBI*) diente als Positivkontrolle. Mithilfe des Testkonstruktes pGreen-red-mUBI-yellow [6.2.3.a)/155] wurde rote und gelbe Fluoreszenz in den Gerstenprotoplasten nachgewiesen. Die gewählte Methode war geeignet, um die Aktivität der *HvSPMS*-Promotoren zu untersuchen. Viele transformierte rot fluoreszierende Protoplasten zeigten gelbe Fluoreszenz. Demnach eignet sich das verwendete pGreen-red-yellow-Vektorkonstrukt auch, um Aktivitäten anderer Gen-Promotoren ähnlicher Größe in Gerste zu untersuchen. Es wäre wichtig, dieses neue System mit weiteren ubiquitären und gerstenspezifischen Promotoren zu testen. Außerdem hat das Konstrukt Potential für Variation (grün-fluoreszierendes oder andere fluoreszierende Proteine anstelle von RFP oder YFP) und zur Erweiterung, um mehrere Promotoren gleichzeitig zu untersuchen. Im pGreen-Vektor-Grundgerüst können auch andere Antibiotikaresistenz-Kassetten verwendet werden, um z.B. die *Agrobacterium*-medierte Transformation oder andere *E. coli*-Anzuchtverfahren (auf Ampicillin-Agar) zu ermöglichen.

Im Vergleich zu den mit dem *pUBI*-Konstrukt transformierten Protoplasten zeigten deutlich weniger mit dem *pHvSPMS*-Konstrukt [6.2.3.b) und c)/155] transformierte Protoplasten rote Fluoreszenz. Von diesen Protoplasten zeigten noch weniger gelbe Fluoreszenz und diese war wiederum geringer als die der mit dem *pUBI*-Konstrukt transformierten Protoplasten. Daraus lässt sich ableiten: a) Die Transformationen mit den *pHvSPMS*-Konstrukten war erfolgreich. b) Innerhalb der klonierten *HvSPMS*-Gen-upstream-Regionen befanden sich *pHvSPMS*, die unter den getesteten Bedingungen aktiv waren. In weiteren Studien sollten die Fluoreszenzintensitäten der unterschiedlich transformierten Protoplasten quantitativ miteinander verglichen werden (*pHvSPMS* gegen *pUBI*). Es sollte untersucht werden, ob salz- bzw. ABA-gestresste Protoplasten gegenüber nicht gestressten Protoplasten oder gegenüber einem internen Standard (mit *pUBI* transformierte, gestresste Protoplasten) verstärkte oder abgeschwächte Fluoreszenz zeigen. Dafür ist vorher zu untersuchen, wie lange Gerstenprotoplasten isoliert in Lösung zu inkubieren sind, bis sie ein nicht-schwankendes Grundfluoreszenzniveau erreichen. Denn Protoplastenisolation und -Transformation könnten zu so hohem Stress führen, dass zwischen gestressten und nicht-gestressten Protoplasten möglicherweise keine Fluoreszenzunterschiede zu beobachten sind. Die *AtSPMS*-Induzierbarkeit durch Salzstress (Sagor, et al., 2011) und Auxin- und Cytokinin-Behandlung (Hanzawa, et al., 2002) wurde bereits nachgewiesen. Nach ABA-, NaCl- Behandlung bzw. Dehydratation stieg die *AtSPMS*-mRNA-Menge an (Urano, et al., 2003). Ich versuchte, die

HvSPMS-Transkription der transformierten Gerstenprotoplasten ebenfalls mit ABA zu induzieren. Es zeigte sich kein Effekt auf die unterschiedlich behandelten Protoplasten, möglicherweise waren die ABA-Inkubationsbedingungen nicht optimal gewählt oder die Protoplasten waren bereits maximal gestresst.

Weiterhin sollte experimentell untersucht werden, in welchen Organen gestresster und nicht-gestresster Gerstenpflanzen sich *HvSPMS*-Promotoraktivität nachweisen lässt. Die *pAtSPMS*- und *pAtACL5*-Aktivitäten wurden in verschiedenen *Ath*-Organen und -Entwicklungsstadien miteinander verglichen (Sagor, et al., 2011). Die *pHvSPMS*-Aktivitäten ließen sich in gleicher Weise mit denen anderer Promotoren in gestressten und nicht-gestressten Pflanzen vergleichen.

Die Fluoreszenzintensität der mit den *pHvSPMS1*-Konstrukten transformierten Protoplasten war geringer als die der mit den *pHvSPMS2*-Konstrukten transformierten Protoplasten. Unter den getesteten Bedingungen war die *pHvSPMS1*-Aktivität demnach geringer als die des *pHvSPMS2*. Das deutet darauf hin, dass die *HvSPMS*-Gene z.B. unter TrStr unterschiedlich reguliert werden und ggf. verschiedene Transkriptabundanzen aufweisen. Dies sollte in weiteren Experimenten zu ihrer Promotoraktivität untersucht werden. Der experimentelle Ansatz der TrStr-Experimente ließ keinen direkten Vergleich der *HvSPMS*-Transkriptabundanzen zu (siehe 4.3./131). Auch wurden die Experimente zur Untersuchung der *pHvSPMS* unabhängig von den TrStr-Experimenten durchgeführt, sodass Rückschlüsse von Promotoraktivität auf die rTER-Werte der *HvSPMS*-Gene nicht möglich sind.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die *HvSPMS*-Gen-Promotorregionen stress-responsible Elemente enthalten und nach transienter Transformation in Gerstenprotoplasten aktiv sind.

4.3. Trockenstressexperimente

Ziel der TrStr-Experimente ist der Vergleich der Regulation der Sperminbildung in verschiedenen Gerstenkultivaren. Die Transkriptabundanzen der *HvSPMS*-Gene können nicht direkt miteinander verglichen werden. Dazu wäre die Messmethode wie folgt anzupassen:

Es sollte experimentell überprüft werden, ob der Sybr-Green-Farbstoff mit der gleichen Affinität in die *HvSPMS*-PCR-Amplifikate interkaliert. Bei unterschiedlichen Affinitäten würden bei gleichen Transkriptmengen unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten gemessen werden. Die in der qRT-PCR amplifizierten Transkripte waren nicht gleich lang, sodass ungleiche Mengen des Fluoreszenzfarbstoffes in die Transkripte interkalierten. Dadurch unterschieden sich die Fluoreszenz-Ausbeuten der *HvSPMS*-Transkript-Farbstoffkomplexe. Die Fluoreszenzintensität sollte daher auf die *HvSPMS*-Transkriptmenge kalibriert werden.

Eine andere Möglichkeit wäre die Normierung auf eine zweite in der Messung konstante Messgröße (Interner Standard), da die Anstiege der Kalibriergeraden der verwendeten Transkripte bei ansteigender Transkriptmenge unterschiedlich sind. Bei der Berechnung der Messwerte müsste dies berücksichtigt werden, da bereits auf eine interne Standardkurve,

(Pool der verwendeten cDNAs) und das *HvActin*-Gen normiert wurde; relative TER wurden bestimmt. Die Messung einer weiteren Messgröße würde den Pipettier- und Messumfang sowie den zeitlichen Aufwand erhöhen.

Folgender Systemfehler der TrStr-Experimente ist zu beachten: Der WN der Töpfe wurde aus deren Gewicht bestimmt. Ab einem gewissen Entwicklungsstand der Pflanzen verfälschte das Eigengewicht der Pflanzen die Messung, da das gemessene nicht dem tatsächlichen Gewicht des Nährbodensubstrates entsprach – der Wassergehalt war geringer! Die Messergebnisse wurden jedoch nicht entscheidend verfälscht, denn: 1.) Der Fehler war bei allen Pflanzen gleich: Kontrollpflanzen und gestresste Pflanzen waren gleich alt und durch die Stratifizierung der Samen entwickelten sie sich ebenfalls gleichmäßig. 2.) Die Stressintensität wurde durch den eigentlich geringeren Wassergehalt intensiviert, wodurch die Quantität des Stresssignals angehoben und die Ergebnisse präzisiert wurden. Dennoch sollte für weitere Untersuchungen der WN durch eine genauere Methodik z.B. mittels Tensiometer bestimmt werden.

Die „normale“ Pflanzenentwicklung wurde durch Stress wesentlich beeinflusst, gestresste und Kontroll-Pflanzen entwickelten sich unterschiedlich weiter. Allerdings erreichten die gestressten Pflanzen binnen weniger Tage die anvisierten WN, sodass der Entwicklungsstand der gestressten Pflanzen nicht wesentlich vom Entwicklungsstand der Kontrollpflanzen abwich. Die Stressphasen aller gestressten Pflanzen wurden nach gleichzeitiger Entwicklung mit gleichen Entwicklungsbedingungen zum gleichen Zeitpunkt begonnen, sodass die Pflanzen bei Stressbeginn nahezu gleich weit entwickelt waren.

4.3.1. Untersuchung der Regulation der Transkriptabundanzen der *HvSPMS*-Gene

Zur Auswertung der Unterschiede der rTER-Werte zwischen Kontroll- und gestressten Pflanzen eignen sich ihre Quotienten [Tabellen 57/91 bis 63/104]. Positive bzw. negative Quotienten zeigen hoch- bzw. herunter regulierte Dividenden (z.B. rTER gestresste Pflanzen) bezogen auf den Divisor (z.B. rTER Kontrollen) innerhalb und zwischen den Stadien an. Zusätzlich wird ein Farbcode verwendet. Die statistische Signifikanz wird durch einen Punktcode verdeutlicht.

In allen Trockenstressexperimenten (2012-2014) waren die rTER-Werte der *HvSPMS*-Gene der gestressten Pflanzen in allen untersuchten Stadien bei zunehmendem TrStr gegenüber den Kontrollen erhöht. Folgende Kernaussagen sind daher festzuhalten:

1.) Die *HvSPMS*-Gene waren trockenstressinduziert.

Dies wurde bereits in *Ath* (Hanzawa, et al., 2002) und in *Os* (Do, et al., 2014) nachgewiesen.

2.) In nahezu allen Stadien waren spätestens bei 10 % WN die rTER-Werte der *HvSPMS*-Gene der gestressten Pflanzen signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht.

Oft waren sie bereits bei moderatem TrStr (20 % WN) gesteigert. Erste Reaktionen zeigten sich bereits bei leichtem TrStr (40 % WN). Auf Ausnahmen (z.B. TrStr-Experiment 2014, (A) [3.3.3.1./99]) wird im Ergebnisteil hingewiesen. In den TrStr-Experimenten von 2012 und 2013 wurden in (A) und (C) besonders stark angestiegene rTER-Werte der gestressten

Pflanzen beobachtet: die Quotienten der rTER-Werte der gestressten Pflanzen waren in Bezug auf die Kontrollen hoch ($\geq 4,0$ und höher). Dies spiegelt eine starke Induktion des jeweiligen *HvSPMS*-Gens in den gestressten Pflanzen wieder. Für die PA-Gehalte der TrStr-Experimente von 2013 und 2014 und für die Bestimmung der rTER-Werte der *HvSPMS*-Gene im TrStr-Experiment von 2014 wurden daher nur die Pflanzen aus (A) und (C) verwendet. Moderne Gerste im Korn-Füllstadium (C) ist besonders anfällig für Wasserdefizienz (Wu, et al., 2017), was die Bedeutung der Ergebnisse aus (C) unterstreicht.

3.) Besonders in (A) und (C), aber auch in (D) waren beide *HvSPMS*-Gene deutlich durch TrStr induziert.

Für (B) traf dies nur teilweise zu. Die gestressten Pflanzen aus (A) und (C) zeigten die TrStr-Induktion der *HvSPMS*-Gene besonders gut an, was jedoch nicht bedeutet, dass Pflanzen dieser Stadien stärker für TrStr anfällig waren als gestresste Pflanzen anderer Stadien. Die Daten aller TrStr-Experimente belegen, dass die gestressten Pflanzen aller untersuchten Stadien die TrStr-Induktion der *HvSPMS*-Gene anzeigen. Für eine Aussage, in welchen Stadien Gerste besonders anfällig für TrStr ist, sind weitere Kennzahlen wie Frischmasse, Chlorophyllindex, Photosyntheserate o.a. erforderlich.

Im TrStr-Experiment von 2014 wurden zusätzlich zwei trockenolerante Gerstenkultivare untersucht.

4.) Die rTER der *HvSPMS*-Gene der gestressten Pflanzen in den drei Kultivaren waren in (A) und (C) bei 10 % WN gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht.

Innerhalb des Stadiums waren die Quotienten aus gestressten und Kontroll-Pflanzen sehr ähnlich. Beim GP-Kultivar stiegen in (A) die rTER-Werte der Kontrollen des *HvSPMS2*-Gens bei ansteigendem TrStr ebenfalls an, sodass sich die Quotienten aus gestressten und Kontroll-Pflanzen nicht änderten. Es wurde nur ein Trend ansteigender rTER-Werte beobachtet. Dennoch induzierte TrStr die *HvSPMS*-Gene in allen drei untersuchten Gerstenkultivaren.

5.) Unterschiede zeigten sich in der Stärke der Induktion bei 20 % WN:

- a) In (A) waren die rTER-Werte des *HvSPMS1*-Gens der gestressten Pflanzen der trockenoleranten Gerstensorten gegenüber ihren Kontrollen stärker erhöht als die des GP-Kultivars.
- b) Die Quotienten der rTER-Werte des *HvSPMS2*-Gens unterschieden sich in (A) nicht.
- c) In (C) waren die rTER-Werte beider *HvSPMS*-Gene der gestressten Pflanzen der trockenoleranten Gerstensorten gegenüber deren Kontrollen weniger stark erhöht als die des GP-Kultivars.

Transgene *Gt*-SPMS-überexprimierende *Ath*-Pflanzen zeigten eine gesteigerte Toleranz gegenüber biotischen und abiotischen Stress und die Induktion von verteidigungsverbundenen Genen (Imamura, et al., 2015). Die Beobachtungen 5.a) und c) sind gegensätzlich. In weiteren Experimente sollte daher geklärt werden, ob die erhöhte Trockenoleranz der trockenoleranten Gerstenkultivare auf eine stärkere oder schwächere Induktion der *HvSPMS*-

Gene u.a. bei 20 % WN als beim GP-Kultivar zurückzuführen war und ob es sich um einen direkten, indirekten oder inversen Induktionsmechanismus handelt. Die Folge einer hohen *HvSPMS*-Geninduktion bei TrStr wäre die Bildung höherer Mengen an *HvSPMS*-Protein in der Pflanze, wodurch mehr SPM im Zytosol verfügbar wäre. Notwendig könnte dies sein, um:

- A) SPM zu bilden, das während TrStr-Situationen in der Pflanze verbraucht worden war (direkter Mechanismus) bzw. werden würde, um ggf. SPM-Abbauprodukte (reaktive Sauerstoffspezies wie H_2O_2 (Efroze, et al., 2008)) zu bilden. Diese könnten wiederum andere (Abwehr-) Regelkreise einleiten (indirekter Mechanismus) (z.B. Induktion von Pathogenabwehr-Mechanismen oder PA-induzierter Stomata-Schluss durch H_2O_2 und NO (Takahashi, et al., 2003; Alcázar, et al., 2010)).
 - B) einen SPM-Vorrat anzulegen, der z.B. zur Abwehr des TrStr verbraucht werden könnte oder um ggf. direkt einen Abwehrmechanismus einzuleiten, der hohe SPM-Mengen benötigt (z.B. Ca^{2+} - und K^+ -vermitteltes, SPM-gesteuertes Stomata-Schließen (Yamaguchi, et al., 2007; Alcázar, et al., 2010)).
 - C) SPM zu bilden, das in andere Kompartimente verteilt werden soll.
 - D) SPM zu bilden, um es z.B. zum Schutz an DNA zu binden (Korolev, et al., 2002; Kusano, et al., 2008) oder aber den Zelltod einzuleiten (Alcázar, et al., 2010) (inverser Mechanismus).
- 6.) Unterschiede der TrStr-Induktion der *HvSPMS*-Gene waren zwischen den beiden trockentoleranten Gerstenkultivaren nicht zu beobachten.
- 7.) Die gestressten Pflanzen wiesen in (C) bei 20 % und 10 % WN in allen TrStr-Experimenten in allen Kultivaren wesentlich höhere rTER-Werte auf als die gestressten Pflanzen in (A).

Demnach wurden die *HvSPMS*-Gene besonders in (C) durch TrStr induziert.

- 8.) Das *HvSPMS1*-Gen ist ab 20 % WN und das *HvSPMS2*-Gen ist ab 10 % WN als Markergene für TrStr in Gerste anzusehen.

Demnach kann der Anstieg der Transkriptionsraten der *SPMS*-Gene als Charakteristikum für TrStr angesehen werden. Um dies als alleinigen Marker für TrStr heranzuziehen, sollte der Zusammenhang von sich verändernden rTER-Werten der *HvSPMS*-Gene und z.B. der Photosyntheserate von Gerstenpflanzen untersucht werden.

Die biologische Relevanz, dass die rTER-Werte von *HvSPMS2* erst bei 10 % WN erhöht waren, liegt möglicherweise in einem Reserve-Stoffwechselweg. Er könnte als zusätzliche Schutzmaßnahme für die Pflanze dienen, um bei starkem TrStr vermehrt SPM zu bilden. So könnten Ressourcen wie dcSAM bei leichtem und moderatem Stress gespart werden oder wäre eine durch starken TrStr induzierte zusätzliche Stressantwort möglich. Wie bei *AtSPDS1/2* (Imai, et al., 2004 b) könnte zwischen den beiden *HvSPMS*-Genen eine funktionelle Redundanz bestehen, sodass bei Ausfall eines Gens durch Mehrfachbelegung des anderen die Funktion erhalten bleibt. Der Phänotyp würde trotz individueller Regulation unverändert ausgebildet werden (Urano, et al., 2003). Das *HvSPMS2*-Gen könnte auch

indirekt durch andere durch TrStr ausgelöste Stoffwechselreaktionen induziert werden, was mit dem Calcium-gesteuerten SPM-Signaltransduktionsmechanismus nach Kusano et al. (Kusano, et al., 2007 a; Kusano, et al., 2007 b) vergleichbar ist. TrStr ist als multifaktorieller Stressor zu verstehen, der in Pflanzen viele Gene induzieren kann (Basu, et al., 2016). Eine „Nachschaltung“ des *HvSPMS2*-Gens kann als „Alles-oder-Nichts“-Antwort verstanden werden: Bei Überschreitung eines Grenzwertes wird eine Maximalantwort ausgelöst, um unabhängig von der TrStr-Intensität einen Verteidigungsmechanismus zu durchlaufen, der alle verfügbaren Ressourcen zur Abwehr nutzt.

In allen TrStr-Experimenten war auffällig, dass die rTER-Werte der Kontroll- Pflanzen schwankten. Dies zeigt die hohe Empfindlichkeit des Systems gegenüber TrStr, führte aber teilweise zu hohen statistischen Standardfehlern und nicht signifikanten Unterschieden zwischen gestressten und Kontroll-Pflanzen. In zukünftigen Untersuchungen sollte der WN mittels Tensiometer häufiger bestimmt werden, um die Schwankungen des Wassergehaltes zu minimieren. Die Klimakammersteuerung sollte optimiert werden (effektivere Abschattung), um den systemischen Fehler zu starker Temperaturschwankungen zu mindern. Die erhöhte Temperatur bedeutete für alle Pflanzen einen zusätzlichen Stressor, der zu den Schwankungen der Kontrollpflanzen geführt haben könnte. Dadurch wurden die Quotienten der rTER-Werte verallgemeinert. Zu weit nach oben oder nach unten schwankende rTER-Werte der Kontrollen verminderten oder erhöhten die Quotienten. Ihre statistische Signifikanz nahm ab und die Aussagen in Bezug auf die rTER-Werte der gestressten Pflanzen wurden weniger präzise abgegrenzt. Die qRT-PCR-Schmelzkurven aller untersuchten Proben hatten schmale Peaks, steile Anstiege und streuten wenig. Bei der Messung der Standardkurven wurden nur vereinzelt ausreißende Messwerte erhalten. Die Qualität der Probenpräparationen war demnach hoch und die Schwankungen der rTER-Werte waren nicht auf die Messmethode zurückzuführen. Sie waren eher durch die biologische Varianz des Systems bedingt: Einige Pflanzen reagierten abweichend vom Großteil der Pflanzen einer Gruppe auf die Inkubationsbedingungen. In anschließenden Untersuchungen ist die Anzahl der Pflanzen aller Gruppen zu erhöhen, um diese biologischen Schwankungen in allen, vornehmlich jedoch in den Kontroll-Gruppen zu minimieren. Dies erhöht auch die statistische Validität der erhobenen Daten. Ausreißer sind so einfacher und statistisch sicherer eliminierbar. Die Erhöhung der Kontrollpflanzengruppen der TrStr-Experimente von 2013 und 2014 führte beispielsweise zur Präzisierung der Ergebnisse: Der Unterschied der rTER-Werte von Kontrollen und gestressten Pflanzen wurde genauer bestimmt. Die Kontrollen waren denselben Inkubationsbedingungen ausgesetzt wie die gestressten Pflanzen. Allerdings führt dies zur Steigerung von Zeit und Kosten, was bei der Experimente-Planung und Gestaltung an Grenzen führt.

4.3.2. Untersuchungen des PA-Gehaltes

Um die Lagerungsdauer möglichst kurz zu halten, und aufgrund des hohen zeitlichen Aufwandes wurde die RNA erst nach Probennahme aller Pflanzen präpariert. Die Präparation

war trotz Voruntersuchungen teilweise erfolglos, sodass durch erhöhten Materialaufwand im TrStr-Experiment von 2012 von vielen Proben nicht ausreichend Material zur PA-Gehaltsbestimmung vorhanden war. Der PA-Gehalt der Pflanzen der TrStr-Experimente von 2013 und 2014 wurde nach dem Abschluss des Experimentes von 2014 bestimmt. Davor wurde festgelegt, sich bei der Untersuchung auf (A) und (C) zu beschränken.

4.3.2.1. Putrescingehalt

Der PUT-Gehalt der gestressten Pflanzen mit zunehmendem TrStr an, was besonders auffällig war. Weitere Kernaussagen der TrStr-Experimente werden festgehalten:

9.) In allen untersuchten Kultivaren und Stadien war der PUT-Gehalt der gestressten Pflanzen bei 10 % WN sehr stark und signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht.

In Wasserstressexperimenten in *Ath* wurde ein ABA-vermittelter PUT-Anstieg in den Ü1- und Ü2-Fractionen festgestellt (Alcázar, et al., 2006). Weitere Experimente zeigten, dass vor allem der PUT-Gehalt durch verschiedene abiotische Stressoren beeinflusst wird, während die SPD- und SPM-Gehalte sich gleichzeitig nicht wesentlich ändern (Alcázar, et al., 2010). Wie auch in meinen Experimenten wurden PUT-Gehalts-Änderungen im niederen mM-Bereich bestimmt. Dies untermauert meine Schlussfolgerung, dass vor allem die PUT-Bildung durch TrStr in Gerste induziert wird. Möglicherweise wurden bzw. sollten auch Stoffwechselwege ausgehend vom PUT induziert werden. So wurden beispielsweise verschiedene Mechanismen zur Kompensation des SPD- und SPM-Gehaltes bereits postuliert (Ikeguchi, et al., 2006):

- a) Bei *SPMS*-Genexpressionssteigerung steigt die SPM-Konzentration, dadurch wird der SPM-Abbau induziert und der SAM-Verbrauch gesteigert. So steigt wiederum die dcSAM-Konzentration um die SPD- und SPM-Bildung aufrecht zu erhalten.
- b) Bei Abfall der *SPMS*-Expression steigt durch Nichtverbrauch die dcSAM-Konzentration und durch *ADC*-Expressionssteigerung die PUT-Konzentration. Dies führt wiederum zu einer Steigerung der SPD- und SPM-Synthese. Somit steigt die SPM-Konzentration, obwohl *SPMS*-Expression sinkt.

Demnach wird deutlich, dass PUT einen bedeutenden Einfluss auf die Kompensations- und Regulationsmechanismen des SPD- und SPM-Gehaltes hat. Auch die Notwendigkeit von PUT für die Stresstoleranz in Pflanzen wurde bereits beschrieben (Takahashi, et al., 2009).

10.) Mit Ausnahme des GP-Kultivars im TrStr-Experiment von 2014 erreichten die gestressten Pflanzen ähnliche PUT-Gehalte bei 10 % WN. Dabei waren die Gesamt-PUT-Gehalte der gestressten Pflanzen stark und signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht.

Zudem waren in allen gestressten Pflanzen aller Kultivare in (A) die Gesamt-PUT-Gehalte erst bei 10 % WN gegenüber Kontrollniveau erhöht.

11.) In (C) waren die Gesamt-PUT-Gehalte der gestressten Pflanzen gegenüber den Kontrollen bereits ab 40 % WN stark und signifikant erhöht, was die TrStr-Induktion besonders gut anzeigte.

Bereits in den Experimenten zur Untersuchung der Regulation der Transkriptabundanzen der *HvSPMS*-Gene wurde diese Schlussfolgerung gezogen [4.3.1./132]. In den gestressten

Pflanzen aller Kultivare wurden mit Ausnahme des GP-Kultivars im TrStr-Experiment von 2014 in (C) keine Unterschiede des PUT-Gehaltes festgestellt. Demnach war die Trockentoleranz der Kultivare TA und XA vom Pflanzen-PUT-Gehalt unabhängig.

In weiteren Untersuchungen zur Regulation von Gersten-APT-Genen bei TrStr, sollten die rTER-Werte der beteiligten Gene des Ornithin-Decarboxylase (ODC)- und des Arginin-Decarboxylase (ADC)-Weges und sich anschließende Stoffwechselwege verglichen und die Veränderungen des PUT-Gesamtgehalts und beteiligter Metabolite sollten untersucht werden. Die *ODC*- und *ADC*-Gene werden beispielsweise verstärkt exprimiert, wenn der SPM-Gehalt (und der PA-Gehalt im Allgemeinen) sinkt oder wenn SPM vermehrt abgebaut wird (Ikeguchi, et al., 2006). *ADC2*-defekte *Ath*- Pflanzen zeigen ebenfalls bei exogener PUT-Applikation eine gesteigerte abiotische Stresstoleranz (Urano, et al., 2003; Urano, et al., 2004). Sowohl diese Studien, als auch die Ergebnisse meiner Arbeit weisen auf die Notwendigkeit zur Untersuchungen der *ODC*- und *ADC*-Stoffwechselwege hin.

4.3.2.2. Spermidingehalt

Die SPD- und SPM-Gehalte der gestressten Pflanzen stiegen bei starkem TrStr weniger stark gegenüber Kontrollniveau an als die PUT-Gehalte. Vermutlich wurden sie in den gestressten Pflanzen aus der durch TrStr erhöhten PUT-Menge gebildet. Eine gesteigerte SPM-Bildung wird auf eine Akkumulation von PUT zurückgeführt (Ikeguchi, et al., 2006), was diese These stützt. In Flux-Analysen mit markiertem PUT (^2H - oder ^{13}C -PUT) könnte dies überprüft werden, markiertes SPD u./o. SPM (^2H - oder ^{13}C -SPD/SPM) müsste bei TrStr in den Pflanzen entstehen. Als weitere Kernaussage nehme ich auf:

12.) Die SPD-Gehalte in den TrStr-Experimenten von 2013 und 2014 waren in allen untersuchten Kultivaren in den gestressten Pflanzen bei ansteigendem TrStr gegenüber den Kontrollen teilweise leicht und signifikant erhöht, vermindert oder unverändert. Dies folgte keiner eindeutigen Regelmäßigkeit. Eine starke Induktion wurde nicht beobachtet.

Bei signifikanter Erhöhung der Ü1- und Ü2- Fraktionen war die P-Fraktion signifikant vermindert und umgekehrt. Möglicherweise fand ein Flux zwischen den SPD-Konjugationsformen in den gestressten Pflanzen statt. Auch dies ließe sich in Flux-Analysen mit markiertem SPD herausfinden. Entweder ist der SPD-Gehalt tatsächlich durch TrStr unbeeinflusst oder SPD dient ausgehend von PUT als Intermediat zur SPM-Synthese, was wahrscheinlicher ist: In einigen Stadien konnte eine leichte, signifikante Erhöhung des SPD-Gehaltes bei ansteigendem TrStr beobachtet werden [Diagramm 34/108]. Das durch TrStr vermehrt gebildete PUT wird demnach u.a. zu SPD und dieses wiederum direkt zu SPM umgesetzt. Dieser Umsatz verläuft vermutlich so schnell, dass nur geringe SPD-Gehaltsveränderungen festgestellt wurden. Es erklärt auch die Induktion und die Verminderung des SPD-Gehaltes der TrStr-Experimente: Wenn SPD gerade noch vermehrt gebildet wurde, wurde ein gegenüber den Kontrollen erhöhter SPD-Gehalt, wenn SPD schon vermehrt zu SPM umgesetzt wurde, wurde ein verminderter SPD-Gehalt gemessen.

In *Thermatoga maritima* wurde eine gekoppelte SPD- und SPM- Bildung beschrieben (Korolev, et al., 2002); in *Ath* wurde ein SPDS-SPMS-Multi-Enzymkomplex nachgewiesen (Panicot, et al., 2002). Die geringen SPD-Gehaltsänderungen ließen sich durch dessen Nachweis in *Hordeum vulgare* auch erklären. In Experimenten mit markiertem SPD und in Untersuchungen der Regulation der *HvSPDS*-Gene bei TrStr in Gerste, wäre zu klären, ob SPD und SPM in den gestressten Pflanzen ausschließlich aus vermehrt gebildetem PUT entstehen. Ein direkter Zusammenhang zwischen TrStr und der von PUT ausgehenden SPM-Synthese ließe sich herstellen. Es könnte auch abgegrenzt werden, ob SPD und SPM jeweils aus ihrer (ggf. in anderen Kompartimenten) gespeicherten Vorstufe oder einer anderen Konjugationsform (erfasst in den Ü1-, Ü2- und P-Fractionen) gebildet wurden.

4.3.2.3. Spermingehalt

Der Gesamt-SPM-Gehalt der gestressten Pflanzen war in allen untersuchten Kultivaren in (A) bei 40 % und 20 % WN und in (C) bei 40 % WN gegenüber den Kontrollen vermindert oder unverändert. Die Verminderungen korrelierten nicht mit den Ergebnissen der Experimente zur Untersuchung der Transkriptabundanzen der *HvSPMS*-Gene [4.3.1./132]. In den gestressten Pflanzen wurden gegenüber Kontrollniveau signifikant erhöhte Transkriptabundanzen der *HvSPMS*-Gene gemessen, was nur die unveränderten Gesamt-SPM-Gehalte erklärt. Ähnliche Beobachtungen werden bei der Knollenentwicklung von *Lj* (Efrose, et al., 2008) und der *Md*-Fruchtentwicklung (Kitashiba, et al., 2005) beschrieben. Diese Beobachtungen wurden entweder auf posttranslationale Regulation der *LjSPDS* und *LjSPMS*, wie es schon für andere Enzyme wie ADC, ODC und SAMDC beschrieben wurde, oder eine gesteigerte Katabolismusrate zurückgeführt (Efrose, et al., 2008).

Für die SPM-Synthese muss allerdings neben dem Substrat SPD auch das Co-Substrat dcSAM in ausreichenden Mengen vorhanden sein. DcSAM bildet für die SPD- und SPM-Synthese den sogenannten „Flaschenhals“ (Hu, et al., 2005; Ikeguchi, et al., 2006), sodass die verminderten SPM-Gehalte auch auf einen dcSAM-Mangel zurückführbar wären. Die TrStr-Experimente belegten die Induktion der PA-Synthese durch TrStr, sodass der dcSAM-Gehalt möglicherweise z.B. für eine vermehrte SPD-Synthese aufgebraucht wurde. Wie bereits erläutert, wurde diese auch durch eine sich unmittelbar anschließende SPM-Synthese oder durch andere SPD-abbauende Stoffwechselwege „maskiert“, sodass sich der SPD-Gehalt scheinbar nicht ändert [vgl. 4.3.2.2./137]. Bei TrStr sollten Experimente mit markiertem PUT durchgeführt und die Regulation der Gerste-*SAMDC*-Gene untersucht werden. So kann geprüft werden, ob SPD und SPM aus PUT hervorgehen und ob die dcSAM-Synthese gesteigert wird. Eventuell sind diese Gene nur bei starkem TrStr induziert, denn die Untersuchungen von Hu, et al., 2005 zeigen, dass *Ath* einen PA-gesteuerten feedback-Mechanismus zur Regulation seiner *SAMDC*-Gene entwickelte. Weiterhin sollten die TrStr-Experimente methodisch so verändert werden, dass RNA-Isolation und PA-Gehaltsbestimmung kombiniert aus derselben Pflanzenprobe bestimmt werden können. Für beide Bestimmungen wurden zwei Proben des gleichen Pflanzenmaterials in N₂ liq gemörsert.

RNA-Isolationsverfahren mit höherer RNA-Ausbeute könnten verwendet und die Sensitivität des HPLC-Systems sollte erhöht werden, um für beide Bestimmungen weniger gemörstertes Pflanzenmaterial zu benötigen.

Weitere Kernaussagen werden festgehalten:

13.) Die Gesamt-SPM-Gehalte der gestressten Pflanzen aller Kultivare waren bei 20 % WN in (C) und bei 10 % WN in (A) und (C) teilweise stark und signifikant erhöht.

Dies wird durch die Experimente zur Untersuchung der *HvSPMS*-Gen-Regulation vollständig bestätigt.

14.) Von induzierten Transkriptabundanzen der *HvSPMS*-Gene konnte demnach auf die Induktion des Gesamt-SPM-Gehaltes in Gerste bei starkem TrStr geschlossen werden.

Naka, et al. 2010 beschreiben bei hohem Salzstress (200 mM NaCl) deutliche Anstiege des PUT- und SPM-Gehaltes. Auch bei Reis wurde die Induktion der SPM-Gehalte bei Salz- und starkem TrStr beschrieben. Der Blatt-SPM-Gehalt war sowohl bei stresssensitiven, als auch bei stresstoleranten Kultivaren induziert (Do, et al., 2014). Allerdings wurde bei TrStr eine Verminderung der PUT- und SPD-Gehalte festgestellt, was der oben zitierten Literatur und den unter 3.3.3.2./105 beschriebenen Ergebnissen widerspricht. Do, et al., 2014 begründen dies mit einer gesteigerten SPM-Synthese bzw. gesteigerter PA- und Diamin-Oxydasen-Aktivität (PA-Abbau).

Urano, et al., 2003 beobachten eine leichte *Ath*-SPM-Gehaltsabnahme bei TrStr und begründen sie ebenfalls mit einer gesteigerten Oxidation. Hier war die TrStr-Phase vergleichsweise sehr kurz (max. 10 h), möglicherweise zu kurz, um vergleichbare SPM-Gehaltsanstiege auszulösen, die in gestressten Gerstenpflanzen erst bei starkem TrStr (unterhalb von 20 % WN) beobachtet wurden. Kurzzeit-(Trocken)-Stress-Experimente widerspiegeln nicht die tatsächliche Stressregulation gestresster Pflanzen (Talamè, et al., 2007). *AtSPMS* wurde dennoch als stressinduzierbare APT klassifiziert (Urano, et al., 2003), was den Nachweis der TrStr-Induktion der *HvSPMS* stützt. *HvSPMS* geben ein weiteres Beispiel für die Induzierbarkeit von monokotyledonen SPMS durch abiotischen Stress.

Eine Korrelation von hohen PA-Gehalten und gesteigerter Salzstresstoleranz wird für Pflanzen beschrieben (Ikeguchi, et al., 2006). Auch stresstolerante *Lj*-Pflanzen waren fähig die PA-Synthese zu steigern (Efrose, et al., 2008). In den Gerste-TrStr-Experimenten zeigten die gestressten Pflanzen aller Kultivare eine gesteigerte PA-Synthese. Somit korreliert ansteigender TrStr nur mit ansteigendem PA-Gehalt der gestressten Pflanzen. Für anschließende Untersuchungen ist ein Vergleich weiterer trockenintoleranter mit trockentoleranten Kultivare bezüglich der PA- und *HvSPMS*-Gen-Regulation sinnvoll, um diese Aussagen zu bestätigen. Es sollte überprüft werden, ob *HvSPMS*-Knockout-Mutanten ähnlich wie *Ath-spms1*-Knockout- und *acl5/spms*-Doppelknockout-Mutanten verminderte Trockentoleranzen zeigen (Yamaguchi, et al., 2007). Alcázar et al., 2010 beschreiben das SPM-induzierte Ca^{2+} -vermittelte Stomata-Schließen und werten es als SPM-vermittelte Trockentoleranz. Für Gerste ist zu prüfen, ob die ansteigenden SPM-Gehalte ebenfalls ein

Ca²⁺-Signal zum Stomata-Schluss auslösen, was ein Nachweis für SPM-vermittelte Trockentoleranz wäre.

In den PA-Gehaltsbestimmungsexperimenten fielen vor allem in den gestressten Pflanzen unterschiedlich hohe PUT-, SPD-, und SPM-Gehalte auf. Es zeigte sich ein PA-Gehaltgefälle bei zunehmender Kettenlänge von PUT (C₄) zu SPM (C₁₀). Dies wurde bereits für Pflanzen nachgewiesen, nur in tierischen Organismen erreichten PA die Gehalte ihrer jeweiligen Biosynthese-Vorläufer (Pegg, et al., 2010). Es sollte untersucht werden, ob SPD und SPM verstärkt in anderen Kompartimenten gespeichert oder z.B: zum Schutz an Makromoleküle wie DNA (Korolev, et al., 2002; Kusano, et al., 2008) und Hydroxyzimtsäuren (Imamura, et al., 2015) zur Pathogenabwehr (Takahashi, et al., 2009; Takano, et al., 2012) konjugiert oder die SPDS- und SPMS-Enzyme selbst kompartimentiert (Ikeguchi, et al., 2006) werden. Hohe PA-Konzentrationen können allerdings toxisch sein (Kusano, et al., 2008): In *Ath* wurde z.B. Embryoabort durch SPD und SPM im Nährboden nachgewiesen (Imai, et al., 2004 b). TrStr-induzierte PA-Oxydasen bilden aus SPD und SPM reaktive Sauerstoffspezies wie H₂O₂ (Urano, et al., 2003). Dies könnte korrespondierenden Biosynthesewegen schaden (Efrose, et al., 2008), sodass in der Pflanze eine Akkumulation von langkettigen PA möglicherweise vermieden wird. Daher sollte untersucht werden, inwiefern Abbauprodukte langkettiger PA bestimmte TrStr-Abwehrmechanismen induzieren und ihre geringen Gehalte ihren verstärkten Abbau anzeigen. SPM und SPD können direkt zu ihrer jeweiligen Vorstufe umgewandelt werden. Dies ist mit ihren Abbauprodukten nicht möglich, was erhöhte Gehalte ihrer Vorstufen erklären kann. Auch hierfür wären die bereits angesprochenen Untersuchungen mit markierten PA bzw. Flux-Analysen hilfreich.

4.4. Zusammenfassende Betrachtungen der Charakterisierung, der Aktivitätsuntersuchungen der HvSPMS-Proteine und der Trockenstressexperimente

HvSPMS-Gene wurden sequenziert, ihre cDNA wurde amplifiziert, *HvSPMS*-Proteine wurden heterolog synthetisiert und als „echte“ SPMS charakterisiert.

Die Linearitätsuntersuchungen der *HvSPMS*-Enzymaktivität zeigten bei variabler Assaydauer oder Proteinmenge im Assay durch geringere Geradenanstiege eine geringere SPM-Bildung des *HvSPMS2*-Proteins gegenüber dem *HvSPMS1*-Protein an. Bei der Bestimmung der pH-Optima erreichte *HvSPMS2* unter gleichen Bedingungen eine (um Faktor 2) geringere v_{\max} als *HvSPMS1*. Die optimalen pH-Bereiche der *HvSPMS*-Proteine überschneiden sich und waren annähernd gleich. Die Charakterisierung der kinetischen Daten der *HvSPMS*-Proteine belegte für *HvSPMS2* einen kleineren K_m -Wert. Diese Beobachtungen sind durch eine leichte Co-Substrat-Hemmung des *HvSPMS2* in den kinetischen Charakterisierungsassays erklärbar. Bei Steigerung der Co-Substratkonzentration im Assay nahmen für *HvSPMS2* die v_{\max} -Werte ab. Pro Zeiteinheit wurde weniger SPM gebildet. Die K_m -Werte stiegen an. Höhere Substratkonzentrationen waren zur Proteinsättigung notwendig. Für beide *HvSPMS*-Proteine

wird eine „Notfall“-Funktion angenommen: Die HvSPMS-Proteine erreichten maximale Umsätze, wenn geringe dcSAM- und hohe SPD-Konzentration vorherrschten. In den TrStr-Experimente wurden das *HvSPMS1*-Gen bei mittelstarkem und starkem und zusätzlich das *HvSPMS2*-Gen bei starkem Stress besonders in (A) und (C) durch TrStr induziert. Die PA-Gehaltsbestimmungsexperimente belegten die Induktion des PUT- und des SPM-Gehaltes in den gestressten Pflanzen. Bei starkem TrStr wurden hohe PA-Gehalte gemessen. In dieser Stoffwechsellage hatten die HvSPMS-Proteine demzufolge optimale Katalysebedingungen und wurden ihrer „Notfall“-Funktion wie folgt gerecht:

Durch moderaten Stress erhöhte sich der PUT- Gehalt, dies führte zur leichten Steigerung der SPD- und SPM-Gehalte. Das *HvSPMS1*-Gen war leicht, das *HvSPMS2*-Gen nicht induziert. Bei ausreichend hoher dcSAM-Konzentration wurde das HvSPMS1-Protein gesättigt. Auch mittlerer Stress führte zum Anstieg des PUT-Gehaltes, was laut Ikeguchi, et al., 2006 zur *SAMDC*-Induktion und damit zur Steigerung der dcSAM-Konzentration führte. Dadurch wurde vermehrt SPD gebildet, optimale Katalysebedingungen für das HvSPMS1-Protein lagen nun vor. Der SPD-Gehalt stieg nicht nachweisbar an, weil SPD unmittelbar in SPM umgesetzt wurde, sodass der SPM-Gehalt schließlich weiter anstieg. Das *HvSPMS1*-Gen war hier bereits induziert, sodass zusätzlich dessen kodiertes Protein gebildet wurde. Durch die hohe dcSAM-Konzentration war das HvSPMS2-Protein zunächst noch leicht gehemmt, sodass es langsamer und weniger SPM als das HvSPMS1-Protein bildete. Das *HvSPMS2*-Gen war weiterhin nicht induziert. Durch den anhaltenden TrStr wurde immer mehr SPD und sofort SPM gebildet und dcSAM allmählich abgebaut, sodass bei starkem Stress auch für das HvSPMS2-Protein optimale Katalysebedingungen vorlagen. Bei weiter ansteigendem Stress konnte es fortlaufend schneller SPM bilden, da die dcSAM-Konzentration kontinuierlich weiter abnahm und sich dadurch dessen Hemmeffekt abschwächte. Beide *HvSPMS*-Gene waren zudem jetzt stark induziert. Die maximale Menge an HvSPMS-Proteinen wurde in den gestressten Gerstenpflanzen exprimiert und die ihnen höchstmögliche SPM-Menge als Reaktion auf den stetig angestiegenen TrStr gebildet (Maximalantwort). Ob *HvSPMS2* durch dcSAM *in vivo* tatsächlich gehemmt wird, sollte daran überprüft werden, ob hemmend wirkende dcSAM-Konzentrationen u.a. bei TrStr erreicht werden.

Den HvSPMS-Genen wurde die Rolle als Markergene für TrStr zugeordnet: Das *HvSPMS1*-Gen war Markergen für mittleren (ab 20 % WN) und starken (ab 10 % WN), das *HvSPMS2*-Gen für starken TrStr. Weil das *HvSPMS2*-Gen erst bei starkem TrStr induziert war und dessen kodiertes Protein in dieser Stoffwechselsituation nicht mehr gehemmt wurde, wird der „Reserve“-Gen- bzw. -Enzym-Charakter erkennbar. Es kompensierte das *HvSPMS1*-Gen bzw. -Protein bei starkem TrStr. Eine mögliche „nachgeschaltete“, „Alles-oder-Nichts“-Rolle des *HvSPMS2*-Gens wurde ebenfalls diskutiert: Nach Überschreitung eines Stress-Grenzwertes (zwischen 20-10 % WN) wurde die Maximalantwort in der Pflanze ausgelöst um *HvSPMS*-Transkriptmengen- bzw. SPM-Gehalts-Maxima zu erreichen.

Trotz unterschiedlicher Regulation der *HvSPMS*-Gene in den trockentoleranten und dem GP-Kultivar zeigten sich im PA-Gehalt keine Unterschiede zwischen den drei untersuchten Kultivaren. Ansteigender TrStr führte in den gestressten Pflanzen aller untersuchten Kultivare zu ansteigenden Gesamt-PUT- und SPM-Gehalten, während sich der SPD-Gehalt (scheinbar) nur unwesentlich änderte. Die Trockentoleranz des TA- bzw. XA-Kultivars ließ sich nicht direkt auf unterschiedliche Regulation der *HvSPMS*-Gene oder unterschiedliche SPM-Gehalte zurückführen.

Die Experimente zur Analyse der *HvSPMS*-Gen-Promotoren-Aktivität vervollständigten die Charakterisierungsexperimente. In den upstream-Regionen der *HvSPMS*-Gene wurden verschiedene cis-Elemente identifiziert, deren Funktion bereits mit abiotischem Stress assoziiert wurde [4.2.1./128]. Die Promotorenaktivität wurde in Fluoreszenzmikroskopie-Untersuchungen nachgewiesen. Die *HvSPMS*-Gen-Promotoren waren in den Amplifikaten der upstream-Regionen enthalten. Allerdings wurden die Promotoraktivitäten nicht unter TrStr-Bedingungen getestet. Rückschlüsse von unterschiedlichen Fluoreszenzausbeuten auf die Regulation der *HvSPMS*-Gene und deren kodierte Proteine schlossen sich aus, denn auch die Fluoreszenzausbeuten wurden nicht quantitativ bestimmt.

4.5. Suche nach Thermosperminsynthesen in Gerste

4.5.1. Suche nach cDNA-Sequenzen für *HvTSPMS*

Bis zum Abschluss der Suche wurden keine TSPMS in Monokotyledonen charakterisiert, jedoch werden zu AtACL5-ähnliche Gene, beispielsweise OsACL5, beschrieben (Rodríguez-Kessler, et al., 2010). In mehreren Ansätzen wurden mit verschiedenen Primer-Sätzen Amplifikate aus *Hordeum vulgare*-cDNA in *E. coli* exprimiert, extrahiert und sequenziert. Die Klonierungsbedingungen wurden dazu mehrfach angepasst. Die erste cDNA-Amplifizierung und Sequenzierung war erfolglos. In einem zweiten Ansatz wurden in Kooperation mit Dr. Juliane Fischer (IPB Halle, Natur- und Wirkstoffchemie, Chemoenzymatik, Deutschland) Wobble-Primer verwendet, die das für *TSPMS*-Gene charakteristische Aminosäure-Motiv GGEG zur Substratbindung kodierten (Korolev, et al., 2002; Knott, et al., 2007; Naka, et al., 2010). Für SPMS-Proteine wird als charakteristisches Substratbindemotiv die Aminosäuresequenz GGGDG beschrieben (Knott, et al., 2007). Die Länge des C-Terminus in SPDS/SPMS- bzw. TSPMS-Proteinen ist entscheidend, ob kurz- oder langkettige PA gebunden werden und die Konsensus-Aminosäuresequenz GGGD/EG ist maßgebend für eine starke dcSAM- und eine schwache PA-Bindung (Ohnuma, et al., 2011). Ausgehend von 229 pflanzlichen Proteinsequenzen ließ sich das GGGD/EG-Motiv in Alignments hochkonserviert wiederfinden. Die Wobble-Primer wurden in hoch konservierten Regionen vor, hinter und genau auf dem Sequenzabschnitt des Motivs designt. In *E. coli* wurden verschiedene cDNAs exprimiert und sequenziert. Es wurden auch nach Optimierung der Klonierungsbedingungen keine Sequenzen gefunden, die zu den Ausgangsequenzen und zu nicht zu allen Primern passten. Der zweite Amplifizierungsansatz blieb ebenfalls erfolglos.

In einem letzten Ansatz wurde Gersten-Sprossachsen-cDNA verwendet, weil TSPM das Wachstums und die Sprossachsenentwicklung in *Ath* beeinflusst: TSPM-defekte Mutanten (*atacl5-1*) zeigen Zwergen-Wachstum, das durch externe Applikation von TSPM aufgehoben werden kann (Kakehi, et al., 2008; Kakehi, et al., 2010). Vermutlich werden *HvTSPMS*-Gene entgegen den Feststellungen von Takano, et al. 2010 nicht ubiquitär in der Gesamtpflanze, sondern vermehrt, möglicherweise sogar ausschließlich, in der Sprossachse oder anderen Gerstenpflanzenorganen exprimiert. Beispielsweise zeigten sich in *Ath* in Blütenorganen und der Sprossachse höhere TSPM-Gehalte als in den Blättern (Kakehi, et al., 2008; Naka, et al., 2010). Schließlich wurden 63 verschiedene Nukleotidsequenzen isoliert [3.4.3./111], die in 11 Gruppen geordnet und deren zusammenhängende Sequenzen bestimmt wurden. In Alignments zeigte sich ihre geringe Ähnlichkeit mit den verwendeten Ausgangssequenzen. Auch dieser Amplifizierungsansatz war erfolglos.

Kakehi et al., 2008 beschreiben, dass TSPM erst nach dreitägiger externer Applikation von SPD mittels Dünnschicht-Chromatographie aus Rohextrakten nachweisbar ist. Die Suche nach *HvTSPMS* wurde mittels veränderter Strategie fortgesetzt, indem nach TSPM dem Produkt der TSPMS-Proteine in Gerste gesucht wurde [4.5.3./144].

4.5.2. Phylogenetische Abgrenzung von *SPMS*- und *TSPMS*-Genen

Die den Amplifizierungsexperimenten [4.5.1./142] vorangegangene Literatur- und Datenbank-Recherche war Grundlage der phylogenetischen Analyse der für die Suche nach *HvTSPMS*-Genen verwendeten Sequenzen.

Die phylogenetischen Bäume der wissenschaftlichen Publikationen von Takano, et al., 2012, Ohnuma, et al., 2011, Rodríguez-Kessler, et al., 2010, Takahashi, et al., 2009, Efroze, et al., 2008, Minguet, et al., 2008, Kitashiba, et al., 2005 und Panicot, et al., 2002 [4.1.2./121] zeigten die evolutiv nahe Verwandtschaft zwischen *SPMS*- und *SPDS*-Genen. Sie zeigen den vergleichsweise großen evolutiven Abstand der *SPMS*- und *TSPMS*-Gene, der auch in den Abbildungen 12/77 und 13/78 dargestellt ist. Er begründet sich durch den horizontalen Gentransfer der *TSPMS*-Gene aus prokaryotischen Triamin/Agmatin-Aminopropyl-Transferasen (TAAPT) (Ohnuma, et al., 2011; Minguet, et al., 2008), und verdeutlicht den grundlegenden Unterschied zu z.B. *SPMS*-Gensequenzen. Der große evolutive Abstand zwischen den beiden Gen-Gruppen (*MdACL5* (\cong *MdTSPMS*)-Homologe und *MdSPMS*-Gene) wird durch die hohen Bootstrap-Werte (nach maximum Likelihood-Analyse) im phylogenetischen Baum angezeigt (Minguet, et al., 2008). Die *MdACL5*-homologen Proteinsequenzen haben eine SQI_A von 26-32 % zu *SPDS*- bzw. 24-28 % zu *SPMS*-Proteinsequenzen (Minguet, et al., 2008). Dies wird als „hohe Ähnlichkeit“ beschrieben. In Anbetracht der aktuellen Datenlage und den als gering einzustufenden Prozentangaben ist es fraglich, ob die *MdACL5*-homologen Proteinen tatsächlich eine *SPMS*-Aktivität haben. Höchstwahrscheinlich handelt es sich um *TSPMS*.

Das Auftreten von *TSPMS*-Genen ging in einigen Pflanzenorganen mit dem Verlust der *SPDS*-Gene einher (Alcázar, et al., 2010), was die unterschiedliche Entwicklung von

SPDS/SPMS- und *TSPMS*-Genen verdeutlicht. Vor allem die Anordnung und die Abstände der *SPDS*-, *SPMS*- und *TSPMS*-Gruppen in den phylogenetischen Bäumen von Takahashi, et al., 2009 und Takano, et al., 2012 [Abbildung 31f/168f] belegen die in den Abbildungen 12 und 13/77f dargestellten Baumstrukturen. Die *AtSPMS*- und *AtACL5*-Gene reagieren unterschiedlich auf gleiche abiotische und biotische Stressoren (Sagor, et al., 2011). Dies wird durch die unterschiedliche Evolution von *SPMS*- und *TSPMS*-Genen belegt. Sie codieren nicht funktionsgleiche Proteine, wie es zuerst diskutiert wurde (Hanzawa, et al., 2000).

Der in Abbildung 14/79 dargestellte phylogenetische Baum zeigt den evolutiven Zusammenhang der für die *TSPMS*-Gen-Suche in Gerste verwendeten putativen *TSPMS*-Aminosäuresequenzen verschiedener Spezies aus verschiedenen Taxa [vgl. 3.1.2.3./78 und 3.4./110]. Die Review-Publikation von Takano, et al. 2012 fasst gezielt den aktuellen Wissensstand zu TSPM zusammen und stellt ebenfalls z.T. andere vermeintliche *TSPMS*-(*AtACL5*)-ähnliche Aminosäure-Sequenzen in einem phylogenetischen Baum [Abbildung 32/168] dar. Der phylogenetische Baum in Abbildung 14/79, die damit verbundene phylogenetische Analyse und die anschließend durchgeführte *HvTSPMS*-Gen-Suche, zeigen evolutive Zusammenhänge von ausgesuchten *TSPMS*-Genen in mono- und dikotyledonen Pflanzen und anderen Taxa.

4.5.3. HPLC-gestützte TSPM-Suche in *Hordeum vulgare*

Für den Nachweis von TSPM in Gerste wurde zunächst eine Methode zur Trennung von SPM und TSPM gesucht. Die HPLC-Methode zum Nachweis von PA aus Pflanzenmaterial nach perchlorsaurer Extraktion [2.5.5./60] konnte nicht angewendet werden, da eine SPM-TSPM-Separation mit dieser Methode nicht möglich war. Dies wird auch in anderen Studien gezeigt (Kakehi, et al., 2008; Naka, et al., 2010). Experimente zur Anpassung der GC-MS-Methode zum Nachweis von PA-Standards und von PA nach Extraktion aus Proteinassays an die perchlorsaure Extraktionsmethode [2.5.6./64] waren erfolglos [vgl. 3.4.4./113ff]. Die Etablierung bzw. Optimierung einer weiteren Standardmethode zum Nachweis von PA nach Silylierung war ebenfalls nicht erfolgreich [vgl. 3.4.4./113ff]. Aufgrund ihrer Validität und der weiten Verbreitung als Standardmethode sind sie in künftigen Studien anzupassen bzw. sollten bestehende Methoden optimiert werden, sodass SPM und TSPM nach Extraktion aus Pflanzenmatrix getrennt voneinander nachweisbar sind.

Schließlich wurde die Methode zum Nachweis von PA nach Extraktion aus *Ath*-Pollenkörnern (Fellenberg, et al., 2012) angepasst und für die Trennung von PA optimiert. Eine vollständige Basislinientrennung von SPM und TSPM wurde nicht erreicht. Durch weitere Absenkung der Flussrate des HPLC-Systems wären die Analyte länger auf der Säule verblieben und hätten sich durch längere Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial besser voneinander getrennt. Dieser Effekt ist jedoch limitiert: Ab einem gewissen Punkt verbreitern sich die Peaks überproportional stark, was der Verbesserung der Trennleistung entgegen gerichtet ist. Daher konnte die Flussrate nicht weiter abgesenkt werden. In solchen Fällen kann die Trennleistung dennoch durch Vergrößerung der Trennstrecke unter Verwendung längerer oder mehrerer

gleich langer Trennsäulen erhöht werden. Dies führt wiederum zur Erhöhung des Druckes innerhalb des HPLC-Systems. Die online gemessenen Drücke im HPLC-System und in der verwendeten Säule waren bereits dicht unterhalb der maximalen Belastungsgrenzen. Eine weitere Druckerhöhung war technisch durch das HPLC-System limitiert und sie hätte unweigerlich zu Schäden an Ventilen, Anschlüssen und Pumpen geführt. Außerdem sollte(n) die Säule(n) durch Druckerhöhung nicht gestaucht werden. Im Nachhinein betrachtet kann die Trennung durch die Verwendung einer leicht stärker polaren stationären Phase (5-10 % Anteil an Cyanopropyl-Resten) ggf. optimiert werden. Im Allgemeinen haben stationäre Phasen von RP-18-Säulen mit (Poly)-Aminen recht unspezifische Wechselwirkungen. Durch eine stärker polare stationäre Phase sind möglicherweise auch die derivatisierten Strukturisomere SPM und TSPM durch spezifische Wechselwirkungen trennbar. Dies sollte in sich anschließenden Untersuchungen getestet werden.

Durch Änderung des Lösungsmittelgradienten und die Erhöhung des ACN-Anteils wurde versucht SPM und TSPM besser zu trennen. Eine Erhöhung des ACN-Anteils von 92,5 % auf 95 % führte jedoch zu keiner nennenswerten Verbesserung ihrer Trennung. Durch weitere Erhöhung des ACN-Anteils wären v.a. nach Extraktion aus Pflanzenmaterial Substanzen eluiert worden, die erst beim Abschließenden „Waschen“ der Säule bei 96 % ACN zu eluieren waren. In Folge dessen wären die Peaks verunreinigt worden.

Während der Methodenoptimierung wurden in einigen Pflanzenproben vereinzelt Doppelpeaks bei den Elutionszeiten von SPM und TSPM gemessen. Diese Peaks ließen sich in Folge- und Kontrollmessungen nicht replizieren. Zur Überprüfung, ob die TSPM-Gehalte in den untersuchten Pflanzenproben unterhalb der minimalen Nachweisgrenze lagen, wurden Proben mit definierten TSPM-Mengen versetzt. Veränderungen der Peak-Höhen und Flächen wurden weder in mit TSPM versetzten noch in nicht-versetzten Pflanzenproben beobachtet. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die TSPM-Gehalte in den Pflanzenproben so gering waren, dass sie durch die Standardabweichungen der Peak-Höhen und Flächen nicht messbar waren. Die Suche nach *HvTSPMS* war erfolglos und wurde beendet. Die Peaks der mit TSPM versetzten Proben waren sehr hoch. In anschließenden Untersuchungen sollten die Proben mit kleineren TSPM-Mengen versetzt werden, um den Anteil der Pflanzen-TSPM-Menge an der Peakhöhe zu erhöhen. Der Unterschied zwischen mit TSPM-versetzter Pflanzenprobe und TSPM-Standardprobe wäre so besser erkennbar.

In weiteren Untersuchungen sollten größere Ausgangsmengen an Pflanzenmaterial verwendet werden, um höhere TSPM-Mengen zu extrahieren. Außerdem sollte die TSPM-Bildung, wie oben beschrieben, zusätzlich induziert werden. Eine weitere Methode zur Trennung von PA nach perchlorsaurer Extraktion und anschließender Benzoylierung wurde beschrieben (Naka, et al., 2010). Mit dieser Methode ließen sich SPM und TSPM sehr gut voneinander separieren. Es empfiehlt sich, diese PA-Extraktionsmethode für Gerste anzupassen.

Unter den beschriebenen Umständen und unter den untersuchten Bedingungen war eine Identifikation von *HvTSPMS* nicht möglich. Ich zeige jedoch Methoden auf, um die Strukturisomere SPM und TSPM in verschiedenen Matrices voneinander zu trennen.

Es ist denkbar, dass die Induktion von *HvTSPMS*-Genen erst nach Induktion durch bestimmte Signale oder Faktoren ausgelöst werden kann. Beispielsweise wurde TSPM erst nach dreitägiger SPD-Behandlung in *Ath* nachgewiesen (Kakehi, et al., 2008). In künftigen Studien könnten die Gerstenpflanzen vor der *HvTSPMS*-Gen-Suche gestresst bzw. z.B. mit SPD behandelt werden. Weiterhin sollte versucht werden, TSPM aus verschiedenen Geweben zu extrahieren. Es wurde bereits vermutet, dass TSPM ubiquitär in Pflanzen zu finden sei (Naka, et al., 2010). Es werden allerdings nur Beispiele für dikotyledone Pflanzen angeführt. Bisher wurde TSPM in Monokotyledonen nicht nachgewiesen. Der Schluss liegt nahe, dass monokotyledone Pflanzen keine TSPMS haben.

5. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Dissertation wurden zwei *HvSPMS*-Gene, deren cDNA-, gDNA- und kodierte Aminosäuresequenzen, die Intron-Exon-Struktur und ihre upstream-Sequenzen charakterisiert. *HvSPMS*-Proteine wurden als reine SPMS charakterisiert. Sie bildeten unter den untersuchten Bedingungen nur SPM, jedoch kein TSPM. *HvSPMS*-Gen-Promotorsequenzen wurden in ihrer Aktivität in einem selbst entwickelten Vektorkonstrukt untersucht. Diese Methode kann auch in anderen Promotorenanalysen mit transformierten Protoplasten verwendet werden. Zwei Polyamin-Trenn- und Detektionsmethoden mit GC-MS- und HPLC-UV-VIS-Analytik wurden entwickelt. Eines der beiden *HvSPMS*-Enzyme wurde durch sein Co-Substrat dcSAM leicht gehemmt. Die inhibitorische Konstante K_i wurde mit $3'100 \mu\text{M}$ nach Michaelis-Menten-Bedingungen ($K_m = 2,4 \mu\text{M}$; $v_{\text{max}} = 496,4 \text{ pkat/mg Protein}$) für einen inkompetitiven Hemm-Mechanismus bestimmt.

Die in der Einleitung gestellten Fragen eins bis werden hiermit beantwortet: SPMS wurden in Gerste nachgewiesen. Sie wurden funktionell und sequenziell charakterisiert und die Aktivität der *HvSPMS*-Promotoren wurde beschrieben. Demnach wurden Ziel I, III und V dieser Dissertation erreicht. Auch Ziel II, die phylogenetische Abgrenzung der beiden *HvSPMS* von anderen mono- und dikotyledonen Aminopropyltransferasen, wurde erreicht.

Frage fünf und sechs können wie folgt beantwortet werden: Die *HvSPMS*-Gene wurden durch ansteigenden Trockenstress induziert. In den Stadien A und C zeigten sich stark erhöhte relative Transkriptexpressionsraten der *HvSPMS*-Gene der intensiv gestressten Pflanzen. Demnach sind die *HvSPMS*-Gene Markergene für Trockenstress. Die Polyamingehalte standen in den Stadien A und C in direktem Zusammenhang zu den relativen Transkriptexpressionsraten der *HvSPMS*-Gene. Bei ansteigendem TrStr stiegen die SPM-Gehalte der gestressten Pflanzen gegenüber Kontrollniveau an. Die PUT-Gehalte stiegen bei Trockenstress stark an, während sich die SPD-Gehalte nur wenig bis gar nicht veränderten. Im dritten Trockenstressexperiment wurden zwei weitere, trockenolerantere Gerstensorten (TA, XA) untersucht. Die Expression der *HvSPMS*-Gene und die PA-Gehalte ähnelten dem GP-Kultivar. Ob die erhöhte Trockentoleranz der Sorten TA und XA auf die Regulation der *HvSPMS*-Gene bzw. der PA-Gehalte zurückzuführen war, blieb unklar. Diese Daten wurden ohne Wiederholung in nur einem Experiment erhoben. Daher ist zu klären, welche Rolle die *HvSPMS*-Gene bzw. die PA-Gehalte bei der Trockentoleranz von Gerste spielen und wie diese sie beeinflussen.

Frage vier der Dissertation kann nur verneint werden, strukturelle und sequenzielle Unterschiede zu *HvSPMS* konnten nicht untersucht werden. *HvTSPMS*-Gene wurden nicht identifiziert. Unterschiedliche Suchstrategien wurden verfolgt, es wurde versucht z.B. TSPM aus Gerstenpflanzen zu isolieren. Es war jedoch nicht möglich, *TSPMS*-Gene bzw. TSPM in Gerste zu nachzuweisen. Es wird empfohlen, die Suche nach dem Produkt TSPM in anschließenden Experimenten zu intensivieren.

Die Untersuchungen dieses Dissertationsprojektes geben Einsicht in die Rolle von SPM bei der Reaktion auf Trockenstress in Gerste. Um Frage acht der Einleitung jedoch umfassend beantworten zu können und um weitere neue Erkenntnisse über die SPM-Biosynthese bei Trockenstress (Ziel IV) zu erlangen, bieten sich weiterführende Experimente an:

SPMS-Gen- und Protein-Sequenzen anderer monokotyledoner Pflanzen können im Vergleich Aufschluss geben, welche Aminosäuren am Katalysemechanismus und an der Substrat- und Produktbindung beteiligt sind. Diese Untersuchungen sollten *in silico*-Modell-, sowie Substrat- und Produkt-Docking-Studien umfassen. Erkenntnisse über den Katalyse- und den Hemm-Mechanismus könnten abgeleitet werden, und ein Strukturvergleich mit SPMS-Proteinen aus dikotyledonen Pflanzen wäre ergänzend möglich. Es ist dazu unabdingbar, die Protein-Kristallstruktur aufzuklären um die korrekte räumliche Struktur der HvSPMS-Proteine zu beschreiben. Die HvSPMS2-Enzymhemmung sollte in Charakterisierungs-Assays untersucht werden, in denen MTA abgebaut wird, um den Hemm-Mechanismus des dcSAM exakt aufzuklären. Der Einfluss von MTA auf die Katalyse und die kinetischen Parameter konnte so ebenfalls genau untersucht werden, um Frage sieben der Einleitung vollständig und abschließend klären zu können.

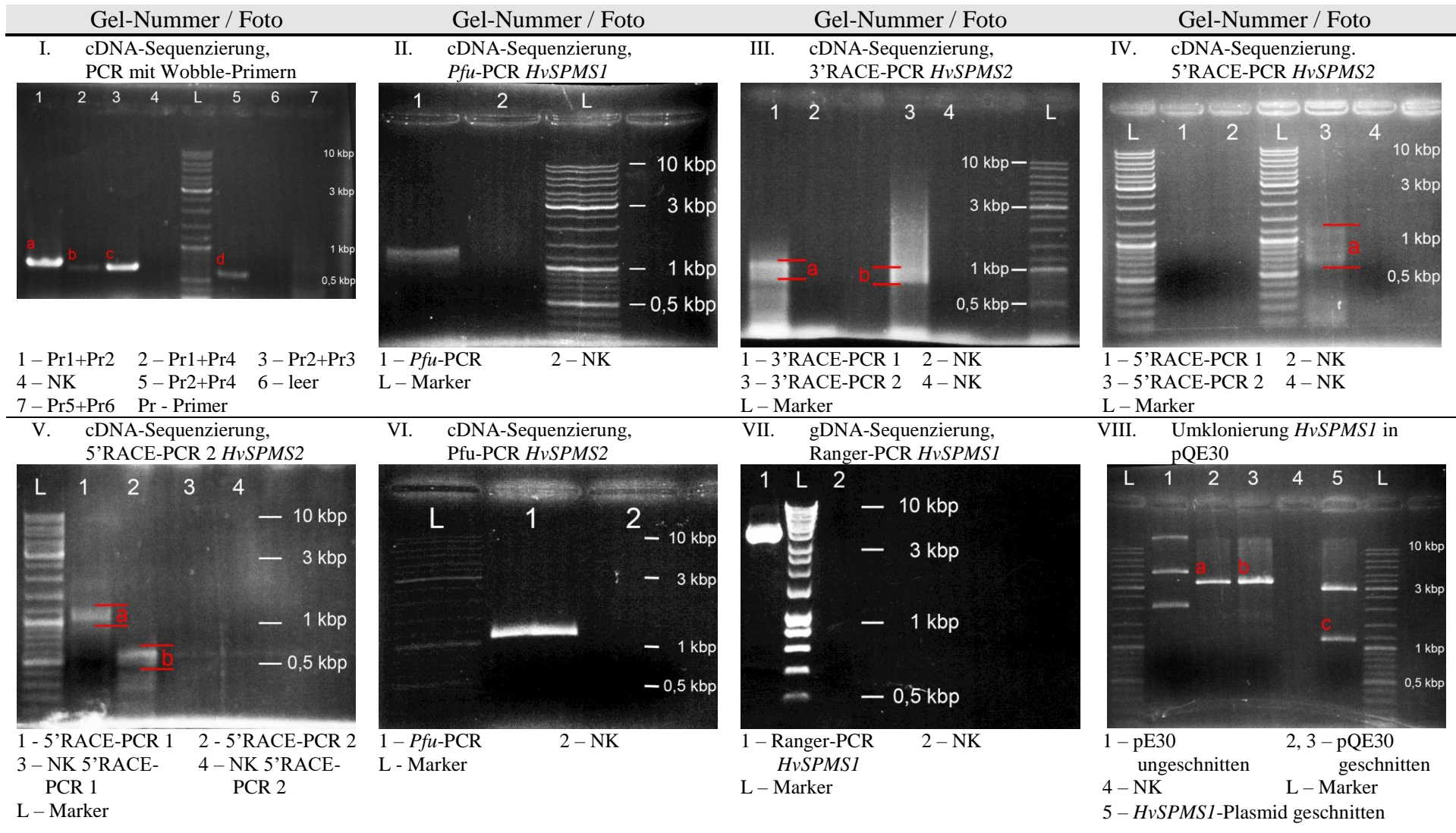
Aus Flux-Analysen mit radioaktiv markierten Polyaminen könnte abgeleitet werden, wie die ansteigenden Polyamingehalte bei Trockenstress entstehen, ob ein direkter Übergang von PUT über SPD zu SPM stattfindet, welche Rolle dabei das dcSAM spielt und welchen Ursprung die Polyamine haben. Die Polyamingehaltsveränderungen wären leichter nachvollziehbar und die Kompartimentierung der beteiligten Metabolite könnte erforscht werden. Außerdem sollte der Flux von PUT und SPD bei Trockenstress untersucht werden, da Trockenstress die PUT-Gehalte der gestressten Pflanzen beeinflusst, während sich die SPD-Gehalte nicht verändern. Zur Klärung der Frage, welche biologische Relevanz die erhöhten Polyamingehalte bei Trockenstress haben, sollte ihr Flux durch den Polyaminpool untersucht werden. Dabei ist der Einfluss der Trockenstress-Qualität (Dauer, Intensität, Umfang) auf die Regulation der *HvSPMS*-Gene und der Polyamingehalte zu untersuchen. Adaptionseffekte und Kompensationsmechanismen in der Pflanze können z.B. vor der Änderung der relativen Transkriptionsraten der *HvSPMS*-Gene und der Polyamingehalte aufgeklärt werden.

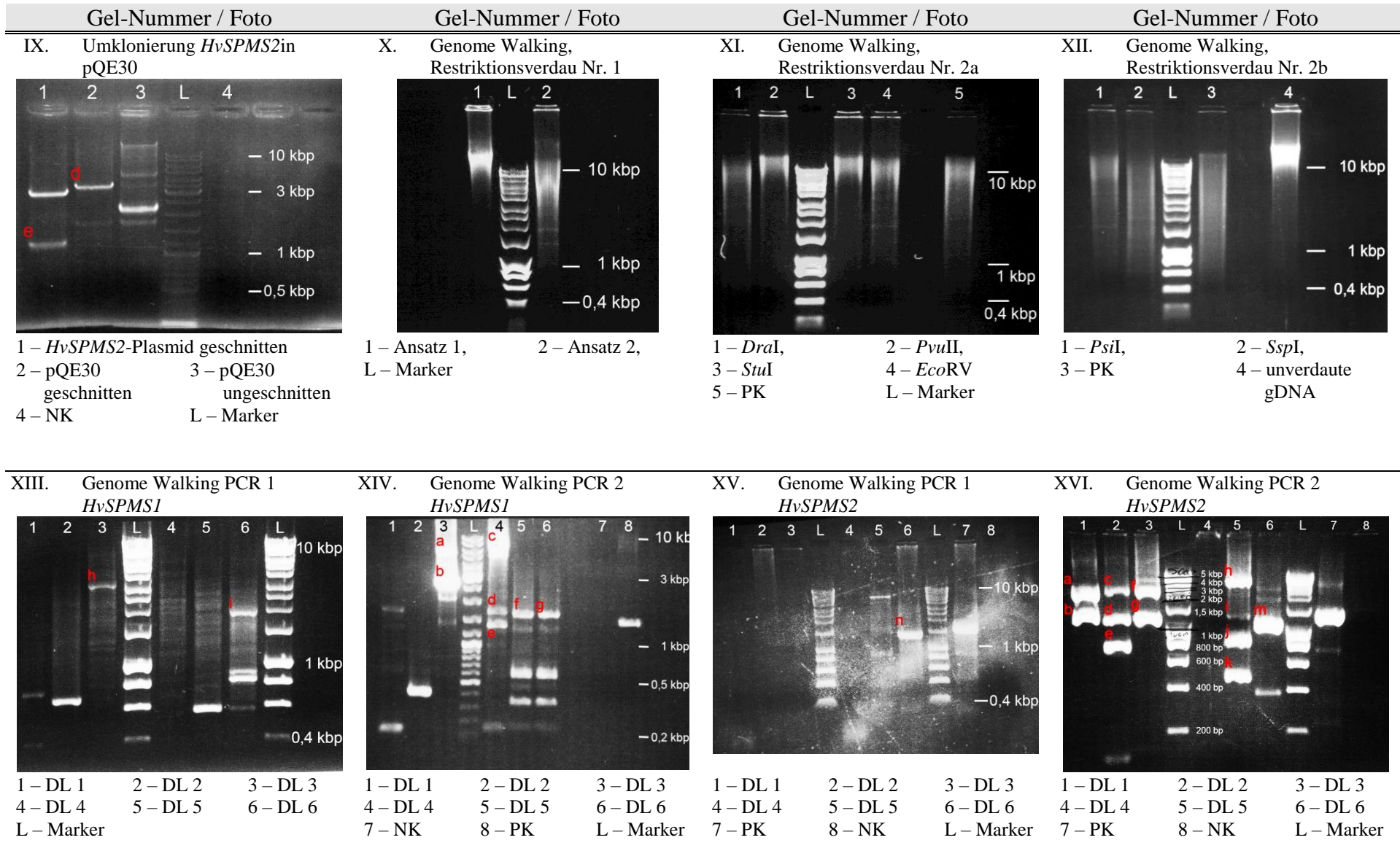
Die *HvSPMS*-Gen-Promotorenaktivität sollten in z.B. Abscisinsäure-gestressten Protoplasten und in Protoplasten gestresster Pflanzen gegenüber Kontrollniveau quantifiziert werden. Außerdem sollte die Promotorenexpression in verschiedenen Pflanzenorganen und der Einfluss von Trockenstress auf die Promotorenaktivität beschrieben werden.

Zur Verminderung der Schwankungen und Präzisierung der Ergebnisse sollten die Messmethoden für Trockenstress geprüft werden. Der Wassergehalt des Nähbodensubstrates sollte vergleichend mittels Tensiometer erfasst werden. Zudem sollte die Probenanzahl erhöht und die Detektionsgrenzen der Analyseverfahren gesenkt werden.

6. **Anhang**

6.1. Elektropherogramme





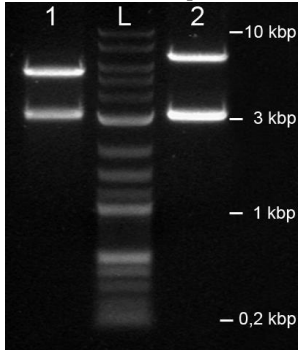
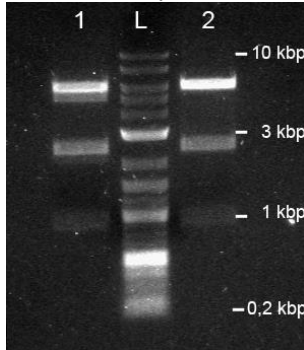
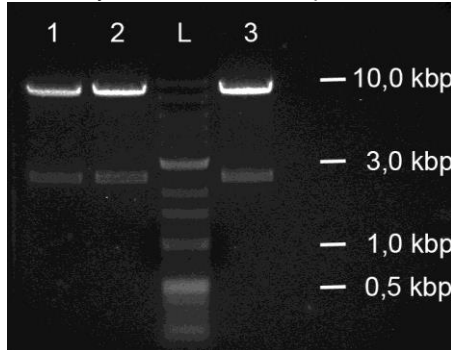
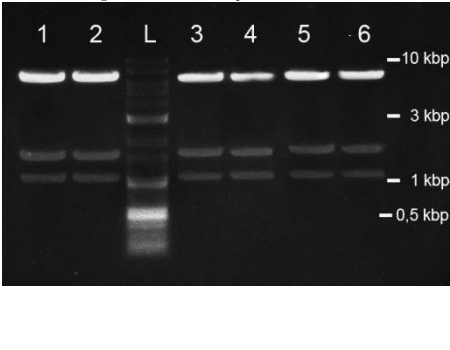
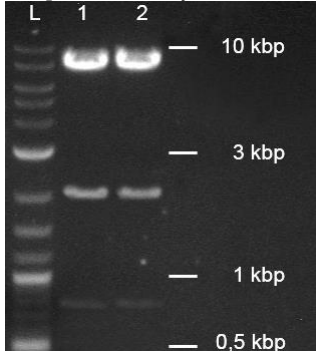
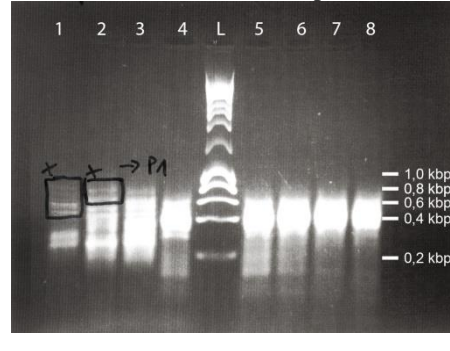
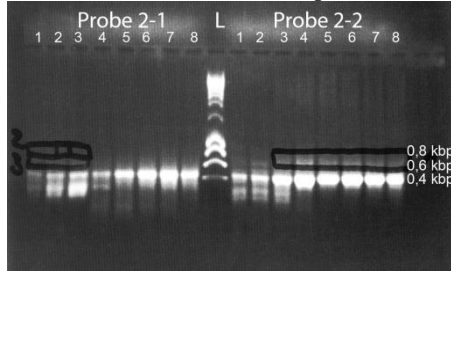
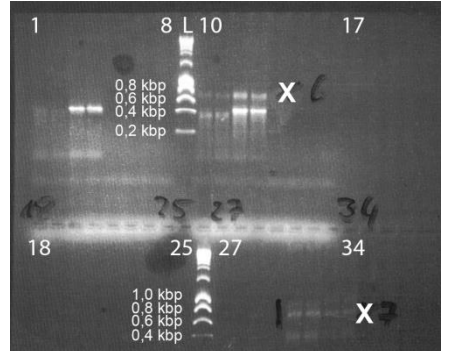
Gel-Nummer / Foto	Gel-Nummer / Foto	Gel-Nummer / Foto	Gel-Nummer / Foto
<p>XVII. Verdau pGreen-red-Vektor mit <i>Bst</i>XI und <i>Spe</i>I</p>  <p>1 – Klon 3 2 – Klon 13 L - Marker</p>	<p>XVIII. Verdau pGreen-red-yellow-Vektor mit <i>Afl</i>III und <i>Bst</i>BI</p>  <p>1 – Klon 1 2 – Klon 8 L - Marker</p>	<p>XIX. Verdau pGreen-red-<i>mUBI</i>-yellow-Vektor mit <i>Afl</i>III</p>  <p>1 – Klon 6 2 – Klon 8 3 – Klon 12 L - Marker</p>	<p>XX. <i>Xma</i>I-Verdau pGreen-red-<i>upHvSPMS1</i>-yellow-Vektor</p>  <p>1 – Klon 2 2 – Klon 3 3 – Klon 6 4 – Klon 7 5 – Klon 11 6 – Klon 18 L - Marker</p>
<p>XXI. <i>Sal</i>I-Verdau pGreen-red-<i>upHvSPMS2</i>-yellow-Vektor</p>  <p>1 – Klon 26 2 – Klon 32 L - Marker</p>	<p>XXII. <i>HvTSPMS</i>-Suche Gradienten-PCR Bsp.1</p>  <p>1 – 70,0 °C 2 – 68,8 °C 3 – 66,6 °C 7 – 51,3 °C 8 – 50,0 °C L - Marker</p>	<p>XXIII. <i>HvTSPMS</i>-Suche Gradienten-PCR Bsp.2</p>  <p>4 – 62,6 °C 5 – 57,8 °C 6 – 53,9 °C schwarzer Kasten – ausgeschnitten</p>	<p>XXIV. <i>HvTSPMS</i>-Suche touch down-PCR</p>  <p>1-8 – 70-60 °C 10-17 – 75-65 °C 18-25 – 70-60 °C 27-34 – 65-55 °C</p>

Tabelle 70: Elektropherogramme

NK – Negativkontrolle; PK – Positivkontrolle; L – Marker: Biozym Quantitas DNA Marker wurde verwendet bei X bis XIII, XV bis XVI; Thermo Scientific GeneRuler™ Ladder Mix wurde verwendet bei I bis IX und XIV; New England Biolabs 2-Log DNA Ladder verwendet bei XVII bis XXI

6.2. Vektorkarten

6.2.1. pGreen-red-Vektor

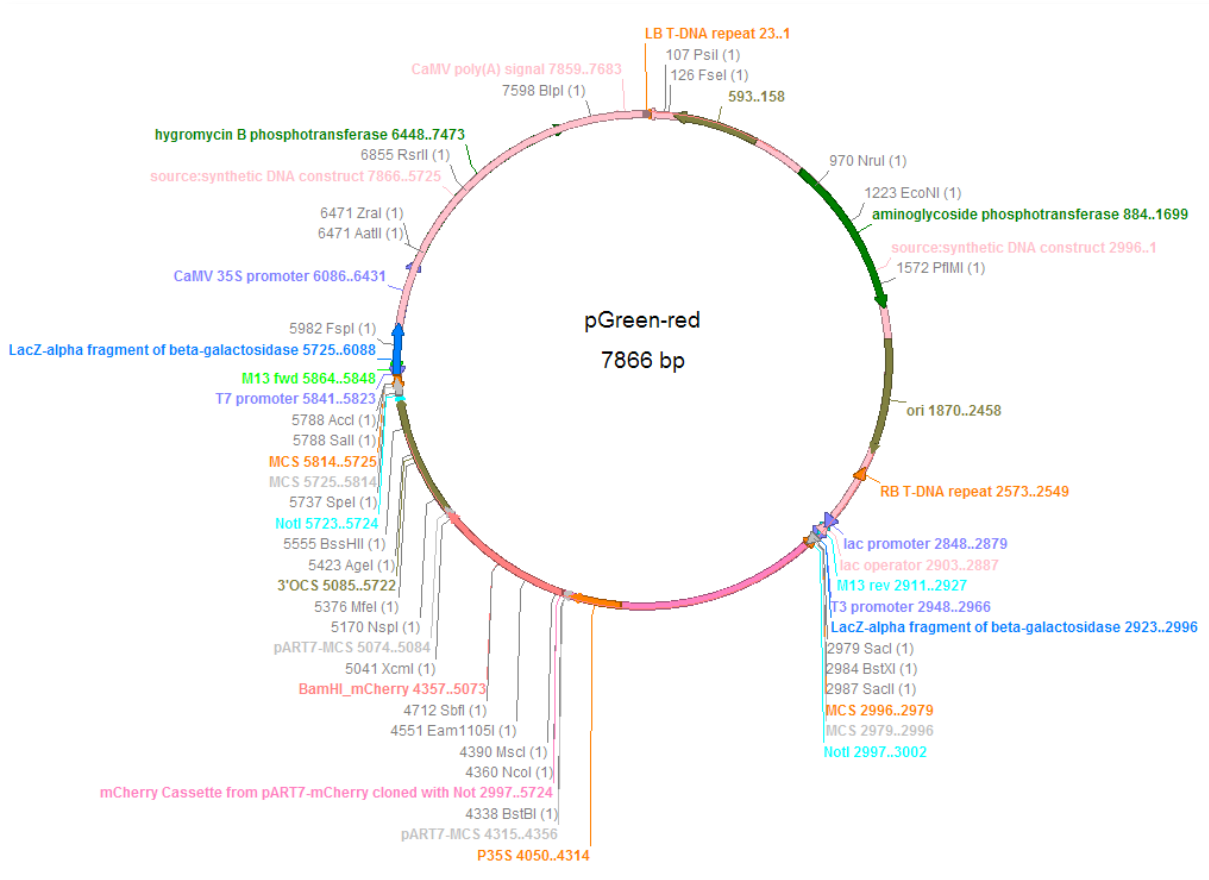


Abbildung 25: pGreen-red-Vektor

pGreen-red-Vektor: in pGreen-Grundgerüst (Hellens, et al., 2000) wurde 35S::mCherry-Tocs-Kassette eingefügt (in pART7-Vektor (Gleave, 1992) wurde mCherry Kassette im Labor Pflanzenernährung (MLU-Halle Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät III, Deutschland) eingefügt); Abbildung wurde mit ApE-A plasmid Editor, Version 2.0.37 erstellt

6.2.2. pGreen-red-yellow-Vektor

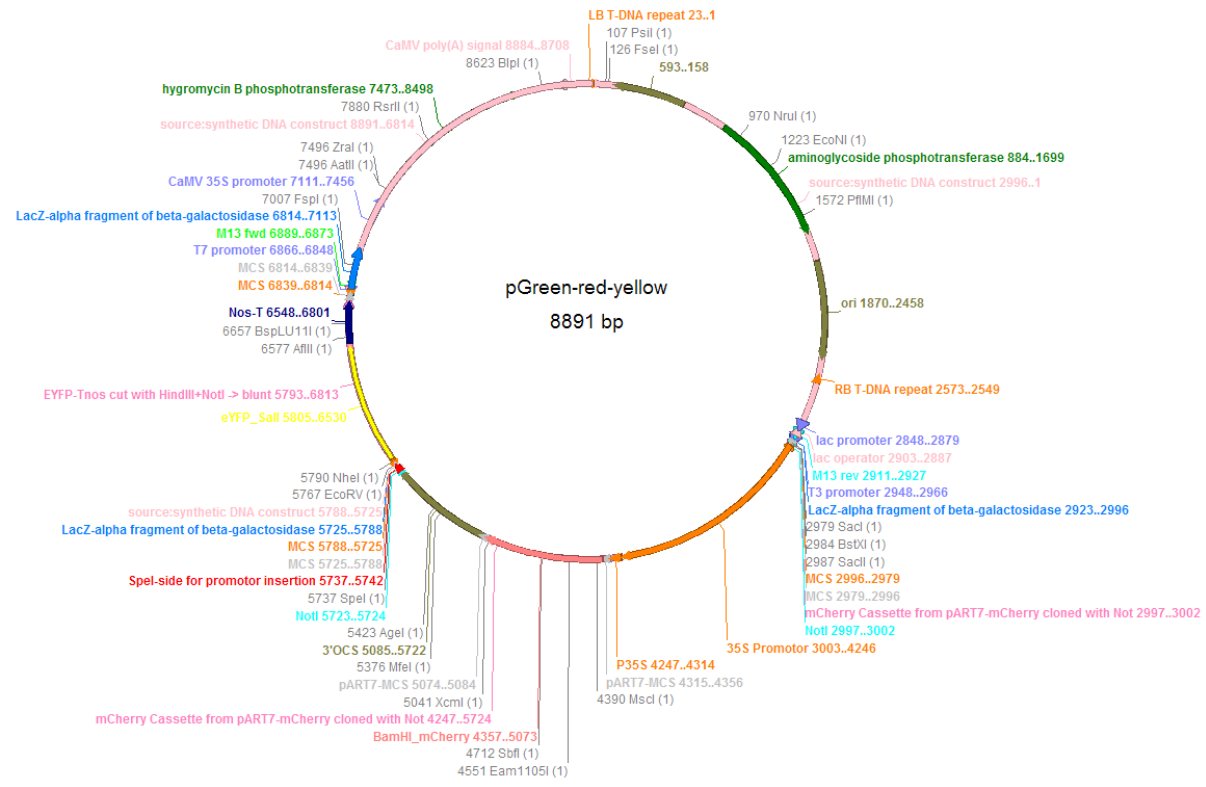
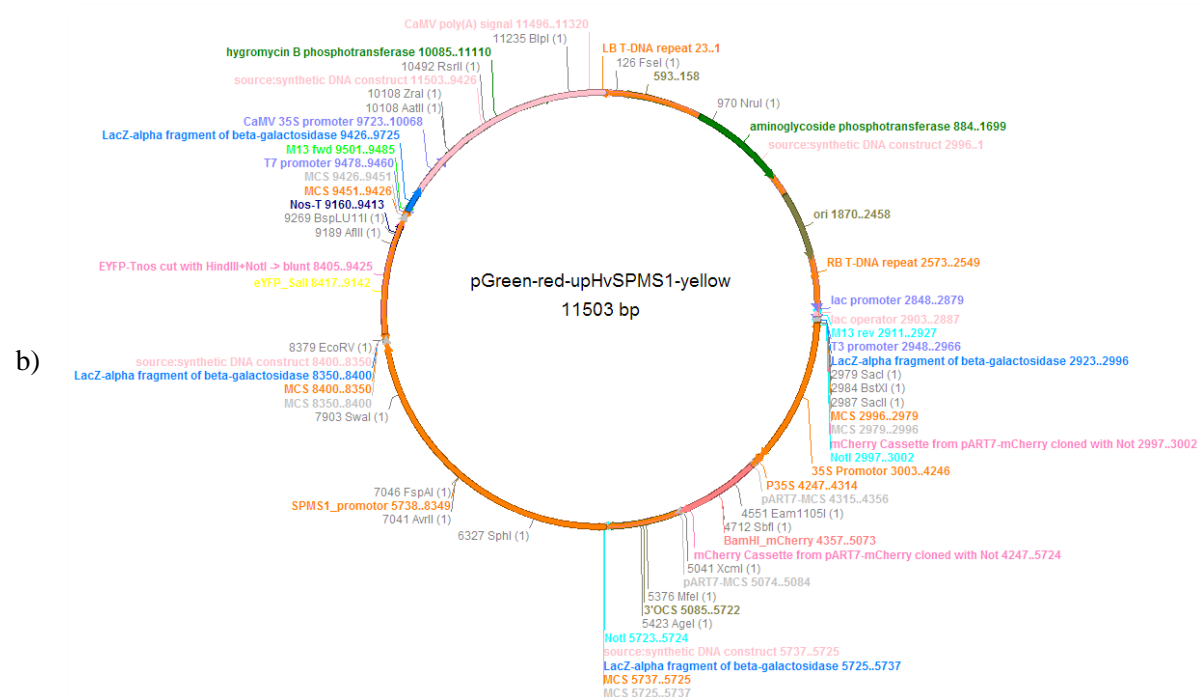
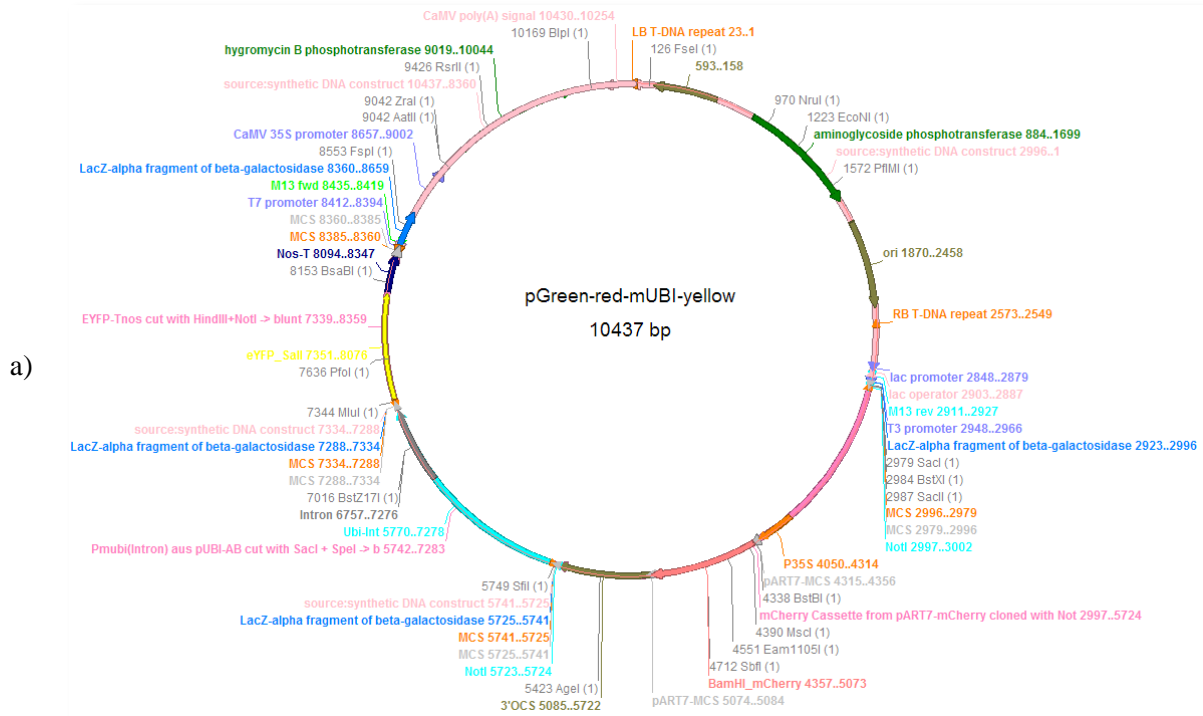


Abbildung 26: pGreen-red-yellow-Vektor

pGreen-red-yellow-Vektor: in pGreen-red-Vektor wurde *eYFP-Tnos*-Kassette eingefügt;
Abbildung wurde mit ApE-A plasmid Editor, Version 2.0.37 erstellt

6.2.3. pGreen-red-Insert-Yellow-Vektoren

Vektorkonstrukt



Vektorkonstrukt

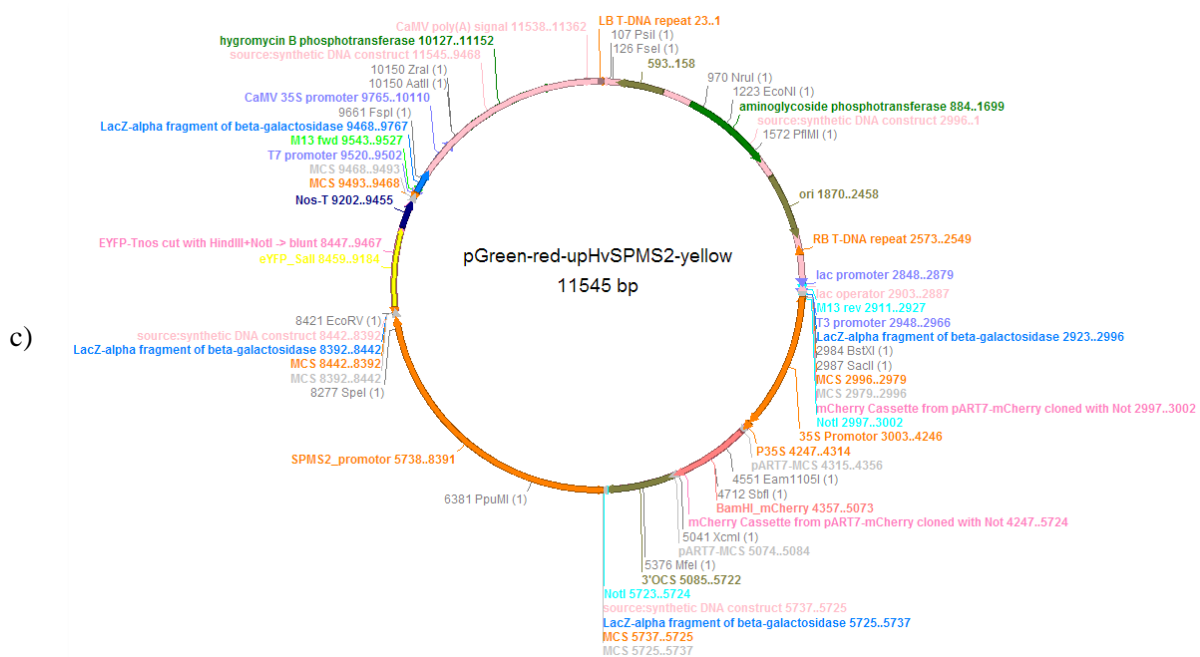


Tabelle 71: Vektorkonstrukt mit *mUBI*-Promotor bzw. *HvSPMS*-Gen upstream-Regionen
 a – pGreen-red-*mUBI*-yellow-Vektor: *mUBI*-Promotor in pGreen-red-yellow-Vektor eingefügt, b – pGreen-red-*upHvSPMS1*-Vektor: *HvSPMS1*-Gen upstream-Region in pGreen-red-yellow-Vektor eingefügt, c) – pGreen-red-*upHvSPMS2*-Vektor: *HvSPMS2*-Gen upstream-Region in pGreen-red-yellow-Vektor eingefügt; Abbildung wurde mit ApE-A plasmid Editor, Version 2.0.37 erstellt

6.2.4. pUBI-AB-Vektor

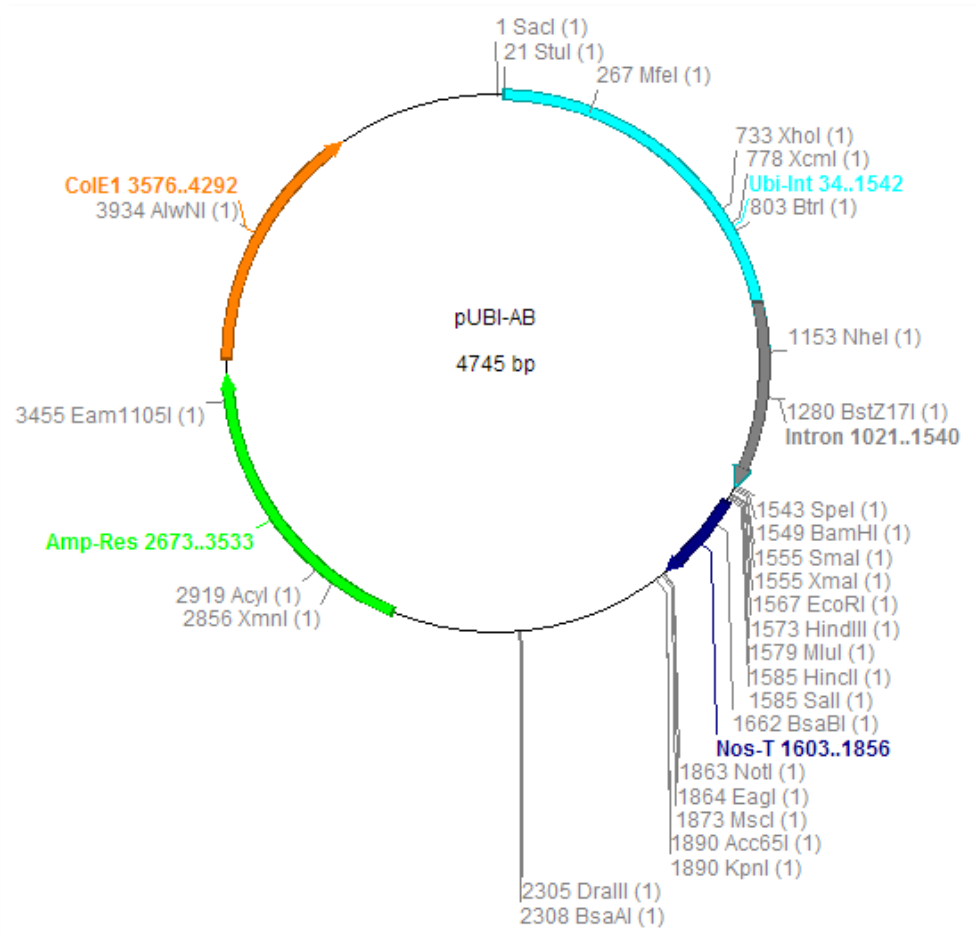
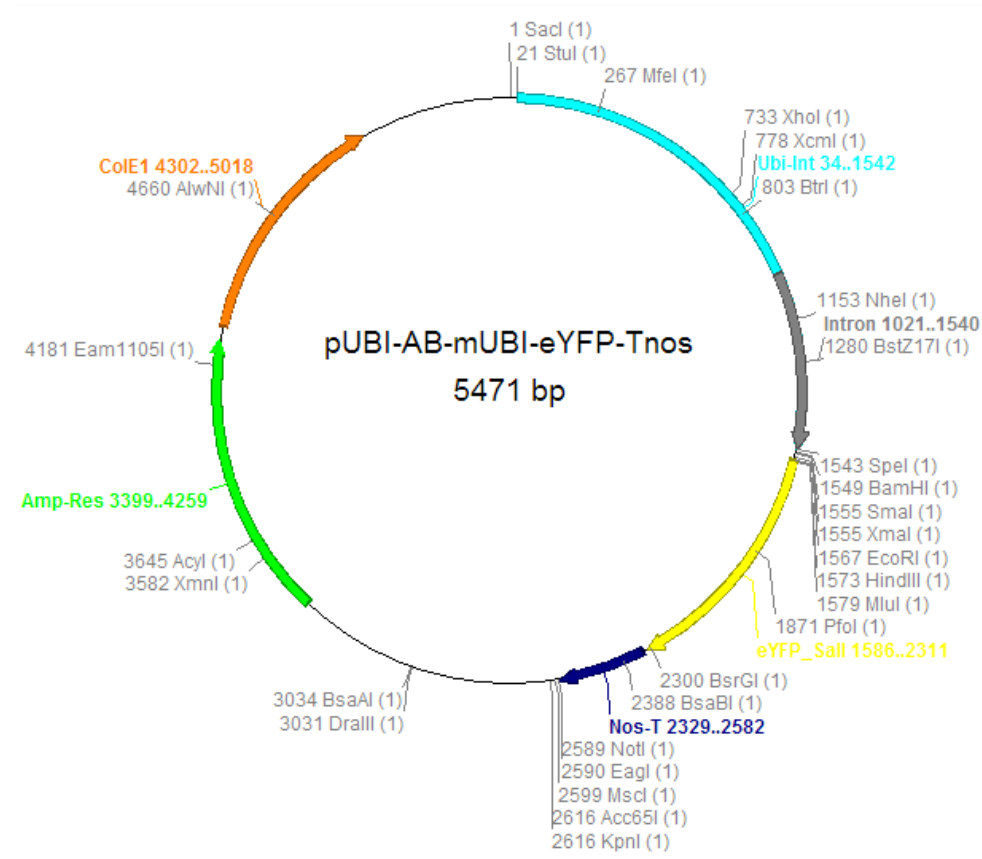


Abbildung 27: pUBI-AB-Vektor

der pUBI-AB-Vektor wurde von der Firma DNA Cloning Service gekauft; die Angaben entsprechen denen des Herstellers (DCS, DNA Cloning Service, 2016); Abbildung wurde mit ApE-A plasmid Editor, Version 2.0.37 erstellt

6.2.5. pUBI-AB-*mUBI::eYFP-Tnos*-VektorAbbildung 28: pUBI-AB-*mUBI::eYFP-Tnos*-Vektor

der pUBI-AB-*mUBI::eYFP-Tnos*-Vektor wurde von Herrn Ricardo Happeck (MLU-Halle Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät III, Deutschland) hergestellt; Abbildung wurde mit ApE-A plasmid Editor, Version 2.0.37 erstellt

6.3. HvSPMS-Sequenzen

6.3.1. HvSPMS1-cDNA-Sequenz

```

1   ATGGAGGGTG GAGGCGCAAG AAATGTTTCT GCAGCGGCAG TACAGACAAA GGGGACTGGG GATGATGGCT CCCGCAAGCC ATTGCCTCCT TGCTGTGTCA 100
101 AGGCGCAAGC TGCTGTGGCA GAATCTGAGG CCAAGTGCCA CGCTACTGTG GTGTCCGGGT GGTTCACAGG AACCCGCTCG CGCTCTGGTA AACCAAGCAA 200
201 AGCGCAGTAC TTCAACAATC CAATGTGGCC TGGGGAGGCT CATTCTGTGA AAGTAGAGAA GATTTTGTAC CAGGGAAAAT CGCCATACCA AGAAGTTTTA 300
301 GTATTCGAGT CTTCAACCTA TGGGAATGTC CTTGTGCTTG ATGGAATTGT TCAGCTGACT GACAAGGATG AATGTGCATA CCAGGAAAATG GTTACTCACC 400
401 TTGCACTGTG CTCAATTCCA TCTCCTAAAA ATGTTTTGGT TGTCGGAGGT GGTGATGGTG GTGTACTAAG AGAAAATAGCC AAGCATGATT CAGTGGAGAG 500
501 TATAGACATA TGTGAGATTG ATCAGCTAGT TATTGATGTT TGTAAGATT TTTTCCCACG TCTATATGTT GGATATAAAG ACCCTCGTGT CAGACTTCAT 600
601 GTTGGCGATG CTGTAGAGTT CTTGAGAAAT TCTCCAGAA GAAAATACGA TGCCATTATT GTTGATTCAT CAGATCCAAT TGGGCCAGCC CAGGAACTTG 700
701 TGGAGAAGCC CTTTTTTCAG GCAATTGCTA GGGCTTTAAA GCCTGGCGGC GTTCTGTCTA ATCTAGCTGA AAGTATGTGG CTGCACACAC ATCTAATCCA 800
801 GGATATGCTT TCTATCTGTC GGGAGGTATT CAAGGGCGGC GTGCACTATG CCTGGGCAAG TGTTCACACA TATCCTAGTG GTGTCATCGG ATTTTTGCTA 900
901 TGCGCGAAGG AAGGTCCACC GGTGGACTTC TTGACTCCTG TGAATCCAAT CGAGAAGATT GAAGGAGCTA CTAAGATGG ACGAGAGATG AGATTTTACA 1000
1001 ATTCAGAGAT TCATAGGGCT GCTTTTATTC TGCCAACATT TGTAAGAGG GAGCTGGAGG CATATAACAC TTCCACTGAA AAGGAGAAAC TGGAGAAGCC 1100
1101 AACGGCGAAA CCAGTGAAGA TGAAGTAAT GCGGGACAGC GCTATCACCG CTTCTAG 1158

```

6.3.2. HvSPMS2-cDNA-Sequenz

```

1   ATGGAGGGTG GAGACGTAAG AAATGGTTTG ACTGGGACAT CACAGACAAA GGGAAAGTGGG GTTGACAGCC CAGCAAAGCC GCTGCCTCCT TGCTGTGTCA 100
101 AGGCGAGGGC TGCAGCACCT GAATCTGAGG CCAAGTGCCA TGCCACTGTG GTGTCAGGAT GGTTCACAGA AACCCACTCC CGATGTGGTA AAGCGAGCAA 200
201 ACTGCAGTAT TACAATAACC CAATGTGGCC AGGAGAGACC CATTCTTGA AAGTGAAAA GATCCTGTAC CAGGGGAAGT CACCGTACCA AGAAGTCTTG 300
301 ATTTTTGAGT CGTTAACCTA TGGAAAAGTC CTTGTGCTTG ATGGTATTGT GCAATTGACT GATAAGGATG AATGTGCCTA CCAGGAAAATG ATTACTCATC 400
401 TTCCACTATG TTCAATTCCCT TCTCCTAAGA AGGTTTTGGT TATTGGAGGT GGAGATGGTG GTGTACTTCG AGAGATAGCC AGACATGGTT CAGTGGAGTC 500
501 TATTGATATA TGTGAAATTG ATCAGCTAGT TATTGATGTT TGTAAGATT TCTTCCCAGA CTTATCTGTT GGATTTAAAG ATCCTCGTGT TCGACTTCAT 600
601 GTTGGTGACG CTGTGGAGTT CTTGAGAAAT ACTCCTGAAG GCACATATGA TGCTATTATT GTTGATTCGT CAGATCCTAT AGGGCCTGCT CAGGAACTTG 700
701 TAGAGAAGCC ATTTTTTCGAG ACAATTGCTA GAGCTTTGAG ACCTGGTGGT GTTCTTTGTA ATCAAGCTGA GAGTATGTGG TTGCATACAC ATCTGATTCA 800
801 GGACATGCTT TCGATCTGCT GTGAGACTTT CAAGGGTTCT GTCCACTATG CCTGGACAAG TGTCCACACA TATCCTAGTG GTGCAATTGG ATTTTTGCTA 900
901 TGTGCCAAG AGGGTCCACC AGTCAACTTC CTGGCACCCA TAAATCCAAT CGAAAACTA GAAGGCCTA TGACAGCAGG GAGGGACATC AGATTTTATA 1000
1001 ACACAGAGAT GCATAAGGCA GCGTTTGTTC TTCCAACCTT TGCAAAGAGA GAGCTAGAAA CATA CGGTGG CTCCACTAGA AGGGCACAGC AAGAGGAAAC 1100
1101 ATCAGCAGAA CCAGCGAAGG TTGCCATCGT GCCACACAGT GAAATTCTTA CCGCTTAG 1158

```

6.3.3. *HvSPMS1*-gDNA-Sequenz (ohne upstream-Region)

1	ATGGAGGGTG	GAGGCGCAAG	AAATGTTTCT	GCAGCGGCAG	TACAGACAAA	GGGGACTGGG	GATGATGGCT	CCCGCAAGCC	ATTGCCTCCT	TGCTGTGTCA	100
101	AGGCGCAAGC	TGCTGTGGCA	GAATCTGAGG	CCAAGTGCCA	CGCTACTGTG	GTGTCCGGGT	GGTTCACAGG	AACCCGCTCG	CGCTCTGGTA	TGCATGCTCT	200
201	GATTGGTGCT	TTGTTATTGC	ATTTCTAGGA	ACGATAAATG	TAGAGGCATG	CACATTTTCT	GCTGTTCTGA	TATCGAAAAC	CAATTTGCTG	TATGTTTCAGG	300
301	TAAACCAAGC	AAAGCGCAGT	ACTTCAACAA	TCCAATGTGG	CCTGGTATTT	CCTTGATTCA	TATTCCATCC	ATGTTTTTTC	TCAAACATTC	CTTGTGCAAA	400
401	TGCTGTCCCT	TTTACTGTGA	AAGTTACAAT	TTTTTCACAG	ATATAAGCTT	TTCTAAAATG	CTCCTAAACA	TTCAGATCTG	TTGTAACCTT	TTTCCTGGCA	500
501	GAAACTGTAA	GAGTGTTTTT	TTCAAGGAAC	TGGATGGTAA	CTATACCATC	GATCCTAGCT	TTAATGTAA	CCTACTTGTT	CGGTTTACAG	AATGGAATCT	600
601	GTTGGTACAG	CCTCACTGTT	AGAAAATAAC	AATCGCTTCC	CACCAAAAATA	ATGCAGTGAT	TCCGTGATGT	ACTAATCATA	AATACATCCC	AGGTTGATAT	700
701	GTTATGAACT	GAACGCCGAG	TATTCATTTT	ACTTTTCTTG	GCAATTCCTG	TTTGTACTTC	GGTTCGCATT	ATCCAAGTAG	ATATGGGGCC	TGAAAGATCA	800
801	ACATTTGTGT	CCCTAGAAGA	TTTGTAGTAC	ACTCCATCCC	GCCCAGGAAA	AAAAAGTAGA	TTACATATCT	GAAGTTATGA	AATGGCATT	TAGGTTTTTAC	900
901	TGCTTGAAGT	TCTTTGCACC	ATCTTGCTTC	TCTGGTTATG	CCGGCTATTT	CTAGTGC GCG	CATTGTCTTT	GAAAATTCCT	TGATCTCTAC	CCAGTATAAT	1000
1001	ACTGAAGTAA	CTTACTTGCT	TGAGCTGGTC	AGTGTGTAA	CCAGAGTTAC	TTCTTCTATA	CAGGGGAGGC	TCATTGTTG	AAAGTAGAGA	AGATTTTGTA	1100
1101	CCAGGGAAAA	TCGCCATACC	AAGAAGTTTT	AGTATTCGAG	GTTATTCTTG	ATCTTCTAAT	TGTGTGCACG	TACGTTGTTT	TGAGTCTGCC	AGACATAGTA	1200
1201	ATGTATAACG	TGTTACGTTG	TGTATGCAGT	CTTCAACCTA	TGGGAATGTC	CTTGTGCTTG	ATGGAATTGT	TCAGCTGACT	GACAAGGATG	AATGTGCATA	1300
1301	CCAGGAAATG	GTTACTCACC	TTGCACTGTG	CTCAATTCCA	TCTCCTAAAA	ATGTATGTAT	TTTATTTTAA	GCCATAAAAT	ATGCTGTCAA	CTTATTGGAT	1400
1401	TTACCATTTA	AATTGAACTG	GAGCATATAC	TCCAACAGAC	AGAATCTTCT	TTTTATGTGC	AGTTACTGAA	TTATTTAGAG	TGGTCACATT	GATTCTTCTA	1500
1501	TAAAGTCGCT	GAAATCTTCA	TACCAAAAAA	ATTTCACTTT	ACTCTCATGC	AGGTTTTGGT	TGTCGGAGGT	GGTGATGGTG	GTGTACTAAG	AGAAATAGCC	1600
1601	AAGCATGATT	CAGTGGAGAG	TATAGACATA	TGTGAGATTG	ATCAGCTAGT	TATTGATGTA	AGAACCATCT	CTTGATTTTG	CTTTGAAGTG	TAATCATCTA	1700
1701	ACATCTAAAA	TAATAGTATT	CTGATGTATG	CCTTCAAATC	GATGCAGGTT	TGTAAGATT	TTTTCCACG	TCTATATGTT	GGATATAAAG	ACCCTCGTGT	1800
1801	CAGACTTCAT	GTTGGCGATG	GTATGTTAAG	AGTTAAGAAG	TTGTTAAGCT	TGTGGTATTA	TTCTGTATAA	TGTTACACAGA	TCATAGACAT	AATCCCTTCT	1900
1901	TTTATAGCAT	CTCAAACCTG	TCATCATGTC	TGCTGACTGC	TGGTCTTGAT	TCTTGTAAT	TTCATAGCAA	ACTTGCATTT	CTTTTGCAGC	TGTAGAGTTC	2000
2001	TTGAGAAATT	CTCCAGAAGG	AAAATACGAT	GCCATTATTG	TTGATTCATC	AGATCCAATT	GGTGAGTTCT	TGCTATTACT	ACACCATACC	TGCAGCTCTT	2100
2101	TCATTTTGAT	TAAGGAGATC	AAAATTTTCA	TCCTGTAGGG	TTGACTTACA	TGGTCTTTT	ATTTAGATAC	TTGAAATTTT	CTTTCACGTC	ACATTTACAG	2200
2201	GGCCAGCCCA	GGAACCTGTG	GAGAAGCCCT	TTTTTCAGGC	AATTGCTAGG	GCTTTAAAGC	CTGGCGGCGT	TCTGTCTAAT	CTAGCTGAAA	GTATGTGGCT	2300
2301	GCACACACAT	CTAATCCAGG	ATATGCTTTC	TATCTGTCCG	GAGGTATTCA	AGGGCGGCGT	GCACTATGCC	TGGGCAAGTG	TTCCAACATA	TCCTAGGTGC	2400
2401	TCTACTTCTC	TGCATCATCT	GTTCTAGACT	TTTCTCCTTT	CACTTCTATG	TATCCATTTG	TTATATTTGT	GCATGCGTAT	TTCAGGTTTT	ATTTTATTGT	2500
2501	TCAATTTCTG	CTGAAATCTC	AAATACTTAG	AAAGTAGTGT	ATTTGGGAAT	ACAAAGTCAT	GCCCAATTAT	ATCGTAGCAC	TACCTGTGAA	GCATTCCTGA	2600
2601	AAATAAAAAAT	ATATGAAGAA	CACAGTCCGC	AGTTGAGATG	ATATCATGCT	CATATTATCG	TCAGTACAGA	ATGCAAGTTA	TTTCATCTAT	ATATCTGTTG	2700

2701	CTGCCAAGTT	GAAGTGGTTA	TTGTTGGCAC	TTAAAGTAGT	GCAGGCAAAA	TGTCCTCCTA	ATTTTCGTGA	GGTTGAGCAG	AAGCTGGAAA	AAAAATCAAT	2800
2801	CGTTTGAAAT	ACTTATTATA	CTCTACTAGT	CTTCATTGCC	AACTGAATGG	AGAAATGGGG	TGTAGGTTAG	CCAATTAGCA	TACTGACCCT	TCTAGGATAC	2900
2901	TCCTTACCAC	TATCTCCATT	TTAGCAGGTG	GACTCTGCTC	ACTGCATGTT	TTGGCACTCC	GATGTCGGAG	GTGCATACGT	ATATTAGTGT	ATGCTTACAA	3000
3001	TCAGACTATG	TTTGATGCTC	AATTTTTCCC	CTTTCCTAAC	ATTTGGTGGT	GCAGAGTATA	AGTAATTTAT	CAGTTAGCTG	TAGCTGCTTA	TTGTTTATAT	3100
3101	GGGTACCCAT	TTCATATGTA	TATAAGCTAA	CCATCTAAAT	ACTTGAATTT	TTAGTGGTGT	CATCGGATTT	TTGCTATGCG	CGAAGGAAGG	TCCACCGGTG	3200
3201	GACTTCTTGA	CTCCTGTGAA	TCCAATCGAG	AAGATTGAAG	GAGCTACTAA	AGATGGACGA	GAGATGAGAT	TTTACAATTC	AGAGGTTTCG	CCTTTTGCCT	3300
3301	TAAAAGATGC	TCTTTATTGC	CACAGGGATG	CAAGATTTGC	AATAGCGAAT	TTTCAATTCA	GTAGTTAGAC	ATCAACTCCT	TTTCTCTTGT	TTGACAGATT	3400
3401	CATAGGGCTG	CTTTTATTCT	GCCAACATTT	GTAAGAGGGG	AGCTGGAGGC	ATATAACACT	TCCACTGAAA	AGGTAAGCCA	TATATAGTTA	CTCGTCCCTT	3500
3501	GTCTGCGTTT	TGTTCCTTTA	CAGTGTTTTG	TATCTTTCAT	CCCTCGCAAA	CAGGGAGGGT	CTAGGCTCCA	ACTGATTGCG	GCAATTATTT	ATAACTTACA	3600
3601	AACTAAATTT	CAATTGACAT	GAAAATGAGC	TTTTTCGATC	TACAGACTAG	TGATTTGCAG	AAAGAAAAAC	CTGCAGACTA	GTAATTCAG	ATTGTTGCAA	3700
3701	TTGAAGAACT	CATTGGTCTT	TTTGCTATAT	CAACCCATGA	CAGGAGAAAC	TGGAGAAGCC	AACGGCGAAA	CCAGTGAAGA	TGAAGGTAAT	GCGGGACAGC	3800
3801	GCTATCACCG	CTTCCTAG									3818

6.3.4. *HvSPMS2*-gDNA-Sequenz (ohne upstream-Region)

1	ATGGAGGGTG	GAGACGTAAG	AAATGGTTTG	ACTGGGACAT	CACAGACAAA	GGGAAGTGGG	GTTGACAGCC	CAGCAAAGCC	GCTGCCTCCT	TGCTGTGTCA	100
101	AGGCGAGGGC	TGCAGCACCT	GAATCTGAGG	CCAAGTGCCA	TGCCACTGTG	GTGTCAGGAT	GGTTCACAGA	AACCCACTCC	CGATGTGGTA	TGTCCTGCCT	200
201	GGTGCTCAAT	TGCATCATCC	TTGCTAATTG	TACTTGACAA	CAGAAATACT	ATAACCTCCT	ATCGTTCTCC	AGTTATTTTG	TCTAAATTTG	ATTGCTTCAT	300
301	ATGCAGGTAA	AGCGAGCAAA	CTGCAGTATT	ACAATAACCC	AATGTGGCCA	GGTATTTCCC	TCGCTGGTGC	CTTTTTTTTT	CTATTGATTG	ATGGATATAC	400
401	CTGTAAGTAG	AATAATAATC	CACAATAGGA	ATGTAATGTT	AAGTTCCTCTA	CATCCGTTTA	TGCGACAAAA	TGCTATTCTG	GTAGACGCTT	GATTACTGGT	500
501	TGAACAGATT	CATGCCTGCA	TTGATGTTAG	GGCATGGTAT	TAGTGCTTAA	TCGATAAAAT	GGATTTCTAA	TGAATGCTTT	AGCCTTTTTG	TTTTGGGAAA	600
601	ATAATTTAGT	CCGACTCAGT	ATTGACAAGA	GAAATTCCAA	CTATTGATAA	ATATTAGTCT	TCAACCTCCT	CAGTTTTGTT	TAAACAAATG	GTTTTGGTTT	700
701	ATTTTTAATT	ATGTTATTAA	TATACTTACT	CAACACACCC	CTTTTGACAT	GGTTATTGTG	AAGTATGGTG	GGCAAAATTT	ATCTAACATA	GTAACATGTT	800
801	CACCACAAGC	AGGGATTGTG	TTCTCTTCAT	TAGTTTGTTA	CTCCCTCCGT	AAAGAAATAT	AAGAGCGTTT	AGACCGATCT	AAATGCTCCT	ATAATTCCTT	900
901	ATGGAGGGAG	TACACTGTTG	ACTTTCCATC	CTGAAGTGGT	GATCTGGGTT	TGTGTAATTT	TCCTCTTCAG	TTCATCATCT	GATTAGAGAG	CATATGCAAC	1000
1001	CCAGTGCTAC	TTGTTGCCTT	TTCTTTGTCA	ATGGTTTTAG	TGTCTAATTT	CAGTCCGTTT	AAAAGAAAAC	TCATGGGTTT	TTGTTCTGTT	TCATATATCC	1100
1101	TAACCTCTGG	AATTTTTTAT	TTTTTATTTG	AACATTAAT	CATGTGTGTT	AGCCTAAATC	GTGTATTTAA	CAAATACACT	AGTTCTCTTG	CGGATGTCTC	1200
1201	TGGCATTAGT	TTCATTCTCG	ACCTCCTTAA	TGTGTTTATG	TTTCACTGAA	TCATGTGTGT	GTTGATTATA	CTCGGGAATC	TTGACTTGTC	CTTAAATATG	1300
1301	TTCAATTGTT	TCTGCAAGA	TACAATTTTC	TTTACATGTA	CTATGCGCTT	CAAGCACATT	GAAATTTCCA	ATTGCTCTTT	ACCGTCTCAG	TTCTCATTTT	1400

1401	TCTTGGTCAT	GTACTTGTGC	AATGAAACAA	GCCCACTTCT	TCCTCAGTCA	TCGTGATTCC	ATTTTCCCTA	CTCAGGAGAG	ACCCATTCCCT	TGAAAGTGGA	1500
1501	AAAGATCCTG	TACCAGGGGA	AGTCACCGTA	CCAAGAAGTC	TTGATTTTTG	AGGTTAGCTT	CATCTATTAA	CACCCAGAGG	GAAAATTGTG	TTTGCCTTCT	1600
1601	GTTGGTAACC	TGGTTGTTTT	TGTATGCAGT	CGTTAACCTA	TGGAAAAGTC	CTTGTGCTTG	ATGGTATTGT	GCAATTGACT	GATAAGGATG	AATGTGCCTA	1700
1701	CCAGGAAATG	ATTACTCATC	TTCCACTATG	TTCAATTCCCT	TCTCCTAAGA	AGGTAATCTT	GTGATCTATG	TTCCTTCTTA	TACTGTGAAT	TATATGACTC	1800
1801	TTTTAATCTA	ATCTTGTGAT	CTATGTTCCCT	TCTTATACTG	TGAATTATAT	GACTCTTTTA	ATCTAATGAT	TGAAATTGTA	TTGACGATAT	TCTGCTGCTA	1900
1901	TATAGCAGCA	GATTAACCTT	TCTTATCTGC	ATTTCCATTG	GAAATGTAGC	ACTCTATTCA	CATATGTTCT	TAGAACTAC	ATTGCAGGTT	TTGGTTATTG	2000
2001	GAGGTGGAGA	TGGTGGTGTA	CTTCGAGAGA	TAGCCAGACA	TGGTTCAGTG	GAGTCTATTG	ATATATGTGA	AATTGATCAG	CTAGTTATTG	ATGTACGAAA	2100
2101	TTCTCCTATG	ACCTATATGA	AGAAATATAG	CCATGTTATT	AAAATTTCTG	ACATGTATCA	TGTTGGTCAT	ATAACTGTGT	AGGTTTGTAA	AGATTTCTTC	2200
2201	CCAGACTTAT	CTGTTGGATT	TAAAGATCCT	CGTGTTTCGAC	TTCATGTTGG	TGACGGTATG	TTGATAATCC	CATGAGGCCA	TAATTACAAC	AGTACTTGTT	2300
2301	GATGTTGTAA	ATTTTCATATA	TATTTGCAAC	CACTAGGTGT	AGCCTGAAGT	TGATGTTGTA	AATTTCATAC	TGGAGTTGTT	TTCCTTCCAG	CTGTGGAGTT	2400
2401	CCTGAGAAAT	ACTCCTGAAG	GCACATATGA	TGCTATTATT	GTTGATTCGT	CAGATCCTAT	AGGTCAGCTT	ATGCAACTGT	GGCATATCCT	CTCTTTTGAC	2500
2501	AAGTTCAAAC	CATGAGTTTT	TATCTTTGTT	CTTGTCGTTT	TTACACTATC	CATTCGGCAT	TGTCAATTGC	AGGGCCTGCT	CAGGAACCTG	TAGAGAAGCC	2600
2601	ATTTTTTCGAG	ACAATTGCTA	GAGCTTTGAG	ACCTGGTGGT	GTTCTTTGTA	ATCAAGCTGA	GAGTATGTGG	TTGCATACAC	ATCTGATTCA	GGACATGCTT	2700
2701	TCGATCTGCT	GTGAGACTTT	CAAGGGTTCT	GTCCACTATG	CCTGGACAAG	TGTCCCAACA	TATCCTAGGT	TTTCACCCTT	TTTCATATAC	CTCATCAGTT	2800
2801	TCTTATGCAC	GCCTGTTTTG	TGGTCTTTAC	TTAGGTTAAT	GTTTTATTTT	GCAACTGAAC	ATTCTGTTTC	GACTTCTCAT	TTTTTTCCCT	CTCGGACAAC	2900
2901	TTCTGAGTTA	AAAATAAAAA	ACACACTAAC	TATCCACCCA	TATGTTTGCA	TCATCTGCTC	AAAAGTTTTT	GTACCACTGT	TGTTAAAGTA	ATTTAATTGT	3000
3001	AAATAGAGAA	ATAAAACTAT	GTATTGTTAT	AATTGTACCT	GTAATTTTTT	TTTGTTTTTT	TTTCATTGAA	GTGCTGTTAG	GCCAGTTTCA	TTGTTTTGGA	3100
3101	TCATAATAAA	AGCATTTGTC	ATCTCTGTAT	ATATTTTAAA	CACAAGTTTT	CTTATTTATG	TTTTGGTAGA	TTTGACAGTT	TGCTATTATA	TCTCATAGCA	3200
3201	ACAGCCAAGC	CGCATGATGT	GTTAAATTTA	CCATGCACCT	ATTAGTATAG	ACTTAGCCTT	TTTATTTGGT	TGTAACACAG	TTCATGTATT	TATATGCCAT	3300
3301	GTAGATTAGA	TATATTGGAT	GACATGAAAC	AGTAAAGCTT	TTCATTACTG	AAACTGTTAC	CAGATAAGAC	ATAACATATA	TGGGTATGGT	TTGTTGAGCT	3400
3401	TCCTTGCAAT	TTTTTTTGTTA	ATGCATGCAA	GCCGTGCAAA	TCCCTTATTG	TGCTATTCCC	AGCTGAGTAG	ATGCACATAC	AAGGGACTTG	GAGTAAGCTT	3500
3501	GCTGCATACA	CATTCTTCTT	TCTTTTTTGA	TATCTCAGCA	AGAGGAGTTT	AGTAGTGTGG	TGGCACATAG	GACTTGGTTA	GTTCTAATGG	TGCACTACCT	3600
3601	TTCTGGCTTC	ATCCTCATGG	GTGTCACTAT	TGTTGGCAGC	TAAATTGGTT	GCAGCGCTGG	GCAATCAATG	ATAGGATGTT	TCAGATTTAT	AGCTCAACTC	3700
3701	ATGCAAGGAG	CATCTTACTC	TGACAAAATA	TTAGTGAGAA	AATATTCCCA	ACATTATATA	TATATATACA	TTTTACCTGG	TTTATGTCGT	GCTAGCTGGT	3800
3801	TGATGCGAGA	TGTTGTAATT	TTACAGTAGT	GACCACTTGT	AACCTAGATG	GACCTGTTTG	GCACTATGGT	GGATCAAACC	CTAAACCTCT	TTATGCAAAA	3900
3901	TTGAACACAG	CTGGGATCTG	AACCATACAT	GTAATTTATT	TATTGAAGCT	ACTGATTTTT	TTATTTATTT	TTTGTTGCAC	CAGTTATTTA	CTTTGAGCAG	4000
4001	TCTTTTATTA	TTATTGGATA	GGTATTGTTG	CCATGAATAC	ATTCTGATT	TAATTAGGCA	AATGAGAAAC	CATCCTGATA	TGCTGTGTTT	AGAAACACAG	4100
4101	CAAGAGACAG	GAGATGGAAA	TATTCGACAC	ATGTTGCATA	TTCCACATCA	GCATCAAATT	AAGAGATTTT	GCATCGCTGT	TTTGTGGAAG	ACAAATGCTG	4200

4201	TTAGGGATGC	TATTTTATCT	TGGGAGTTCA	GGACATATTC	CTCCTAGAAA	GAGAAGCTAG	GCCAATTTAT	GTAACCTTTT	AGTTAAACAA	CTGTTATCAA	4300
4301	GTGTTGGTGT	CAGCTGCCCT	TGTAAATTTG	GTACAAAAAA	TTAGAACATA	ATATATCTGA	GTTTCATTGA	TTAGGCAACC	CACTGCTGGC	TGCCATTCCCT	4400
4401	GTTAGTATAC	ACATTAAGAG	CTGCTGGTTG	TGATAAACAA	ATGTGGCTGA	CTTGACGCTT	TATATGAAGT	CTTTGACGTG	CTAAATGTTG	CTCCTTTTGA	4500
4501	AATTTACTTG	TAACACAACA	TTCAC TTGAT	TTGCAGTGGT	GCAATTGGAT	TTTTGCTATG	TGCCAAAGAG	GGTCCACCAG	TCAACTTCCT	GGCACCCATA	4600
4601	AATCCAATCG	AAAAACTAGA	AGGCGCTATG	ACAGCAGGGA	GGGACATCAG	ATTTTATAAC	ACAGAGGTTT	TTTCTGTTTA	GAAAGTTACC	TATTCTGCTA	4700
4701	ATTTTACAAT	ATACTGTATT	GCTTTTGTCT	TGGTATGCTG	TAGTATATAC	TCCTAATAAA	ATGATGCAGA	ATTCTATTTT	TCCTCGAATT	TTCTGCTACG	4800
4801	ATGATTTTCAT	GCTCTGCAAG	TCCGAAGTTA	CTGTATATAC	CTCATGTTTA	TTCTTTAAAA	ATACTCCACT	CCAACTCAGA	TGTGAGAAAT	ATGGCATTAC	4900
4901	GATTCATTGC	CATCCATAAG	CACACTGATT	TGTTATTTTG	GCTGCTGACC	AGATGCATAA	GGCAGCGTTT	GTTCTTCCAA	CCTTTGCAAA	GAGAGAGCTA	5000
5001	GAAACATACG	GTGGCTCCAC	TAGAAGGGTA	TGTTTTTTTCA	ATTTGTTAAA	GATAAGTCTG	CCTGTGTATT	CTCTTTACTT	GGTGTGTTTC	ATAATTAGGA	5100
5101	CAAATCTTTG	AAAGCACAAT	TTACATTTTC	CACCTGCTTT	CTGAGACTAC	CCAGAAAGCC	ATGAAAAGTT	ACAGCTCTAA	TCTTTGTGGC	GCTTACCTCT	5200
5201	CTTGTA CTTG	GCGTGGTTTC	TTAATTTGGA	GAGTTTCCTT	GACTGCAACA	TTTAATTTCT	CACATTTAAG	TTCAGGCTTG	TTGGCTGGTT	GTACATTTAC	5300
5301	GTGCTAAAAC	AATCAAAGCA	AACAGTCTAA	AAAATTAATT	AGTCGCCACA	TATCCTAGCT	TTATTGCTTT	CAGGTCTTTG	AGATGCATAC	ACAAAGTCGT	5400
5401	TGTTTATATG	TTCAAATATT	ATAGTAAGAT	GACTACTCTC	CCCGTGCTGC	TCAAATTTTC	TAGTAATCTT	GAATTAGTTC	TCTACCCTAT	GTAGCTTGGT	5500
5501	TCTTCCTATG	CCAAACAAGT	GAAGTGTCAA	AAAGCTTAAC	TGGAGATTAT	TTGCGCCATC	ACAGGCACAG	CAAGAGGAAA	CATCAGCAGA	ACCAGCGAAG	5601
5601	GTTGCCATCG	TGCCACACAG	TGAAATTCTT	ACCGCTTAG							5639

6.3.5. HvSPMS1-Protein-Sequenz

1	MEGGGARNVS	AAAVQTKGTG	DDGSRKPLPP	CCVKAQAAVA	ESEAKCHATV	VSGWFTGTRS	RSGKPSKAQY	FNNPMWPGEA	HSLKVEKILY	QGKSPYQEV L	100
101	VFESSTYGNV	LVLGDGIVQLT	DKDECAYQEM	VTHLALCSIP	SPKNVLVVG G	GDGGVLREIA	KHDSVESIDI	CEIDQLVIDV	CKDFFPRLYV	GYKDPRVRLH	200
201	VGDAVEFLRN	SPEGKYDAII	VDSSDPIGPA	QELVEKPF FQ	AIARALKPGG	VLSNLAESMW	LHTHLIQDML	SICREVF KGG	VHYAWASVPT	YPSGVIGFLL	300
301	CAKEGPPVDF	LTPVNPIEKI	EGATKDGREM	RFYNSEIHRA	AFILPTFVKR	ELEAYNTSTE	KEKLEKPTAK	PVKMKVMRDS	AITAS		385

6.3.6. HvSPMS2-Protein-Sequenz

1	MEGGDVRNGL	TGTSQTKGSG	VDSPAKPLPP	CCVKARAAAP	ESEAKCHATV	VSGWFTETHS	RCGKASKLOY	YNNPMWPGET	HSLKVEKILY	QGKSPYQEV L	100
101	IFESLTYGKV	LVLGDGIVQLT	DKDECAYQEM	ITHLPLCSIP	SPKKVLVIG G	GDGGVLREIA	RHGSVESIDI	CEIDQLVIDV	CKDFFPDL SV	GFKDPRVRLH	200
201	VGDAVEFLRN	TPEGTYDAII	VDSSDPIGPA	QELVEKPF FE	TIARALRPGG	VLCNQAESMW	LHTHLIQDML	SICCETF KGS	VHYAWTSVPT	YPSGAIGFLL	300
301	CAKEGPPVNF	LAPINPIEKL	EGAMTAGRDI	RFYNTEMHKA	AFVLPTFAKR	ELETYGGSTR	RAQQEETS AE	PAKVAIVPHS	EILTA		385

6.3.8. HvSPMS2-upstream-Region-Sequenz

1	AAATAAATTT	TTATGTATTT	TTCATCAATG	ATCGCCATAT	GTCATAATTT	TGTACCAATT	TAAGTGAATA	ATTACAAATA	GTTTGAATAA	TTTTGTATGT	100
101	GTTAATTTGT	TTCATTATTG	ATTTTCGATAT	GTAATAATTA	TGTGCCAATT	TGAGTTTATA	TTGTTTTTAT	TACTTTCTAT	ATAGTTCACG	TATACACATG	200
201	TTACCATCAT	CTAATTTACG	TATGATCTCA	TTTGTATAAA	GAAGCAACAA	AATAACGTAT	ATTGATATTA	TCCGTGCTTG	ATCGTGGATG	CATGCATTCA	300
301	TTGTGCAGTA	ATAGACAGTC	GAATAGACGG	CTCATTGTAT	AAGCTGTCTG	TTTAGCCATC	TGTAAGTGAA	ATGTCAAGTA	GTTAGAGATA	GCTGCAGTCT	400
401	AAACCATTGT	ACATGCCCTC	ATGGCCTTGC	CGAACTGCCG	ACCGTTTTGG	CCAAGACTGG	TTTTAGGGGC	CGGCGGAGAT	GCCTTAACGG	AGCGGTTTTG	500
501	TCGCGTTGTA	CGGTGGATTG	AATTGGTGTG	GACCGGTCCG	GTCTGGTTTT	CACCAGGCCA	TGCGGGTCCA	ACCCACTGTC	TGAACCCTGA	ACCCACGGGT	600
601	GGCGGGTTGA	ATCCGATAAG	ACTAAGGCGA	CTCGGCCAGA	CTGAGGACCT	CGTGCCGCTT	TCCTACGGCC	CTCCACCGGC	GCCGCCATCC	CATCCCCTGC	700
701	CCTCCCCCG	ACTCCGGCTC	ACCCCGCCGC	TCAGCCGACC	TCCGCCACCG	CAGGTCGACC	CCGACTGTGC	CCGGCATCAA	GCTTCGCCGC	TAGGGTTGTG	800
801	CCGCCGCCCT	TCTCCCGCGC	TCCAAC TTCG	TCGTCCGGCTT	CCCCCGCCCC	CCACCCCGCA	GCGCCTGTTC	CGCGACCAGG	TAAAGCTCGC	CGTCGCTTTG	900
901	GTTCTACTCA	TGCGTTTTCG	GTTTCGCGTT	TCGCGCTTTG	CAGATTTGTT	GATTTTTCCC	GCCGGCCATG	TTGTTTCTAC	GTATCGGCAT	GTAGCTGGAG	1000
1001	TACTTGTGGA	TTAGGGCATG	CCGATACAGT	GACAACTCT	GCAAACATTG	CATGCTTTCA	TCCGATAGAT	TGGCTAGTTT	TTCTATCGGA	ATACTCTCCA	1100
1101	TGGCCACGCT	CCCAGAAGGT	GAAGGAGCTC	CTCTCCCTTC	CATTTCCCCC	CGTGTCAATT	TGCC TTCTAC	TTTGTGGCTT	TGTCCCATTA	TTAGCCCATC	1200
1201	TCATTACTCC	CCACAGCAGC	TATGCTCCCG	GAAGAAAAAT	AAGTACTCCA	ACCTGTTGAT	GAGATTTGAA	TTGCAATACA	AACGGGACAA	GTTCTGTTAT	1300
1301	ACAGTCAAAT	CGTATGCTAG	GGAGGCCTAT	GTGGGGTTGG	AATGACCTGG	CTGCTACAAC	ACGGTGTAGC	AGATCACTTA	TTTCATACTC	CCTTCGTCCC	1400
1401	AAAATAACTG	TCTCAATTTG	TACTAGAGCT	AGTACAAAGT	TGAGACACTT	ATTTTGGGAC	GGAGGGAGTA	GTAGTTGGGA	CACTTAAATG	ATTTTCGTATT	1500
1501	TATGTGTCAG	AGCACTTACC	TTGTGACACC	ATGCAATATT	CTTAAGATGA	GAAACTGGTT	GGAATGGCGA	AGCAGGTAGA	CCTGGATATG	GCTTTCAGTG	1600
1601	CACTTTTTTT	GTTATGTACC	TGAATGGTTG	GCTTTTATTT	TTTTTATTTT	TGCCCCGGTT	GTGTTATTCT	TTGTAGCATT	AAGCATAAAT	CTGTCAATGC	1700
1701	ACTCAACTTT	AGAAGCTACT	GTATTTTTGG	GACATAATCA	AATGCTGACT	GCAACATTTT	CACACGGTTC	AGCAATGGAG	GGATGTAAAT	GACTAGGAAG	1800
1801	GCGAGAGTAA	ATGAAATGGG	GCTTAATAAG	TTTGATAGAA	GTTAATGCTA	GCGCACAAAT	GTGCATTTAA	TTTTTACATT	GTGCTGTAGC	ACTAGCTGCA	1900
1901	CAGCTACTCA	CCTCATCTCA	ACCCAATATG	ACAATCATCT	CAAAGTGCAT	TGAATACATT	GAGCAGTGCA	GATCCCGAAA	GTTGTAGATC	CACCGAGATT	2000
2001	CTAGCTCCAC	CCACAGCTAG	CTGCAGAAAT	TCGTGTCTGG	AGTAGTAGCA	AAGAAGCCAC	CACTGTTGTG	CTCGCTGTCC	TGCCCTTCTT	CTTACCTTGT	2100
2101	GCAGCCACCT	CCTTGCCCTA	CCTCGATTTG	CCATTCACAG	GTCAGTACCG	TAATTGCAAG	GAGCTTCTGG	AATCCTATCC	TACCCCGCAC	GTCAAAGCCT	2200
2201	CTTGTATTTA	TCGTTCCCTT	TTCTTTTCCA	CTTTTGGTAT	CAGCTCAAAA	TCGATTCTTT	CGTTAGGCGG	GCAACACCCG	CTTGCTCCAA	AACCTCATGT	2300
2301	TATGAAAGGG	TTCTCAGTTC	GTGATCAATA	CATGCTGCTC	TTAAAAATCCA	TGTTCTTGTA	ATCAATACTA	GGTTAGTGTG	TCGCTGAGCC	TTGCAGAGCA	2400
2401	TGTGTACTGA	GTTACTCATC	CACTTATATG	TCTGCCATGG	TGCATGCTTG	TTATGCGTGT	CAGTGATCTT	GTGTCATTCA	TTATGACCTG	CATTTTCTTT	2500
2501	CGTATATGTG	TGTTTGGGTA	TCATAATTTT	ATTTGATTTA	CTAGTGCCAA	GTTTCCCGCA	GAAATTGATG	TGTATACTCC	TGTGTTGAGT	ACTTATTGTT	2600
2601	GCTAAAAGTC	TTTGTGGTTT	ATGCAGAGGC	TGGGAACTTC	AAAGAACAGG	ATCC					2654

6.3.9. Alignment der *HvSPMS*-Sequenzen und Wobble-Primer

HvSPMS1	101	AGGCG CAAG CTGC TGTGGC AGAATCTGAGGCCAAGTGCCAC CGCTACTGTGGTGTCCGGGTGGTT TCACAGGAACCCGCTCGCGCTCTGGTAAA CC AAGCAA	200
HvSPMS2	101	AGGCG AGG GCTGC AGCAC CTGAATCTGAGGCCAAGTGCCAT TGCCAC TGTGGTGT CCAGGATGGTT TCACAGAAACCCACTCCCGATGTGGTAAA GC GAGCAA	200
Pr1_for	1	----- CCAC YGT TGT KTC TGG R TGGTTC-----	23
Pr2_fw		-----	
i-Pr3_rev		-----	
i-Pr4_rev		-----	
HvSPMS1	201	AGCGCAGTACT TCAA CAATCC AATGTGGCC TGG GGAG GC TCATTC GT TGAAAGT TAG AGAAGAT TTT GTACCAGGG AAAA TCGCCATACCAAGAAGT TTTA	300
HvSPMS2	201	ACTGCAGTAT TTACAA TAACCC AATGTGGCC AGG AGAG ACC CATTC CT TGAAAGT GG AAAGAT CCT GTACCAGGG GAAG TC ACC GTACCAAGAAGT CTTG	300
Pr1_for		-----	
Pr2_fw	1	----- CAA YAACCC D ATGTGGCC AGG AG-----	23
i-Pr3_rev		-----	
i-Pr4_rev		-----	
HvSPMS1	701	TGGAGAAGCCCTTTTT TC AGGCAATTGCTAG GG CCTTT AAAG CCTGGCGG CG TTCT GT CTAATC TAG CTGA AA GTATGTGG CTGC ACACACATCT AAT CCA	800
HvSPMS2	701	TAGAGAAGCCATTTTT CG AGACAATTGCTAG AG CCTTT G AGACCTGG TGG TGTTCT TT GTAAATC AA GCTGAGAGTATGTGG TTGC ATACACATCT GAT TCA	800
Pr1_for		-----	
Pr2_fw		-----	
i-Pr3_rev		-----	
i-Pr4_rev	1	----- CATAC GCATCT TAT YCA-----	17
HvSPMS1	801	GGATATGCTTTC TATCTG TC GGAG GT ATTCAAGGG CGG CGTGCACTATGCCTGG GCAAGTGT TCCA ACATATCC TAGTGGTGC ATCGGATTTTTGCTA	900
HvSPMS2	801	GGACATGCTTTC GATCTG CTG TGAG ACT TTCAAGGG TTCT GTCCACTATGCCTGG ACAAGTGT CCA ACATATCC TAGTGGTGC AA TGG ATTTTTGCTA	900
Pr1_for		-----	
Pr2_fw		-----	
i-Pr3_rev	1	----- GTGT YCC TACATATCC NAGTGG -----	22
i-Pr4_rev	18	AGAYATGMTCTC -----	29

Abbildung 29: Alignment *HvSPMS*-Sequenzen mit den Wobble-Primern Pr1_for bis Pr4_rev

rot – Primerbindebereiche, blau – Wobble-Stelle, **fett** und *kursiv gedruckt* – abweichende Sequenzinformationen; Primer sind Teil des Primer-Satzes Nr. 1 [2.1.3./14]; Primersequenz der rückwärts-Primer (durch „i-...“ gekennzeichnet) entsprechend revers komplementär dargestellt; Zahlen – Basenpaarposition in entsprechender cDNA- bzw. Primer-Sequenz

6.4. Phylogenetische Bäume aus wissenschaftlichen Publikationen

6.4.1. Phylogenetischer Baum aus Rodríguez-Kessler, et al., 2010

580

M. Rodríguez-Kessler et al. / Plant Physiology and Biochemistry 48 (2010) 574–590

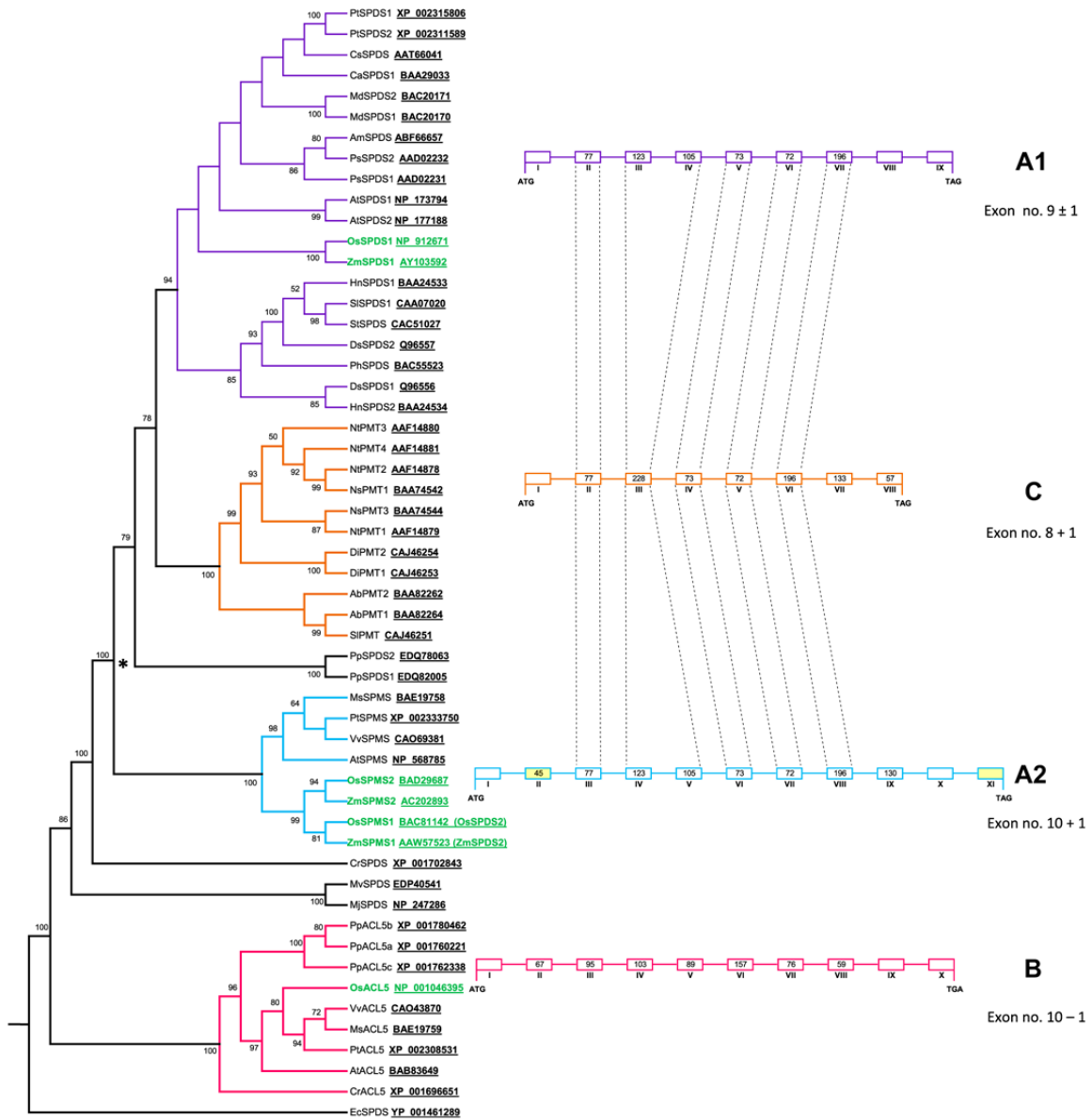


Fig. 3. Unrooted phylogenetic tree of 43 aminopropyl transferase and 11 putrescine N-methyltransferase proteins. The phylogenetic tree (left panel) was created by Neighbor-Joining method, PHYLIP 3.67 package [12]. Bootstrap support values out of 1000 pseudoreplicates of the data set are provided as percentages at the corresponding nodes when >50%. Proteins were grouped into 4 categories representing SPDS (A1), SPMS (A2), ACL5 (B) and PMT (C). The *Escherichia coli* SPDS protein was used as an outgroup. Schematic representation of the intron–exon organization of the plant aminopropyl transferase and PMT genes (right panel). Conserved exons are connected by dotted lines.

Abbildung 30: Phylogenetischer Baum aus Rodríguez-Kessler, et al., 2010

Abbildung ohne Veränderungen aus Publikation entnommen (Rodríguez-Kessler, et al., 2010)

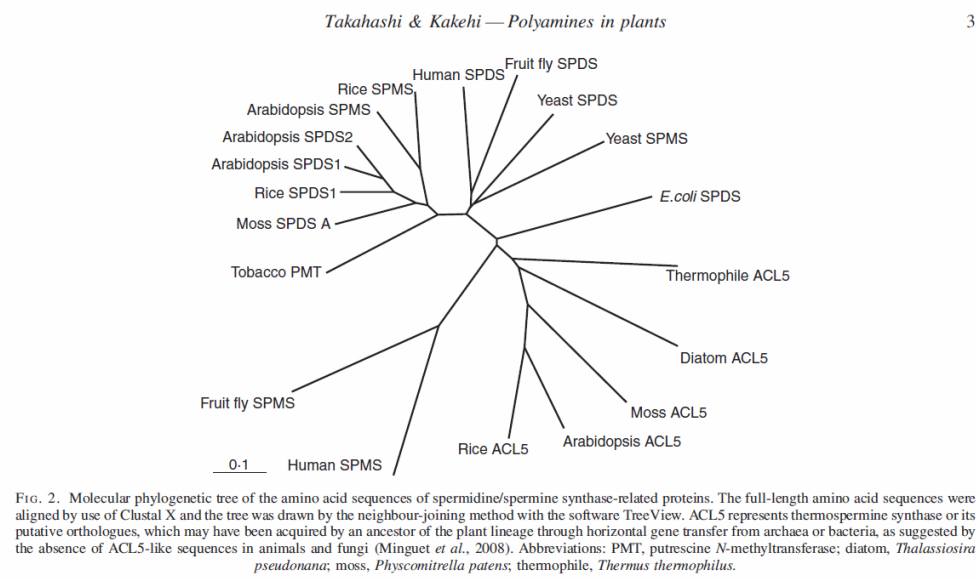
6.4.2. Phylogenetischer Baum aus Takahashi, et al., 2009

Abbildung 31: Phylogenetischer Baum aus Takahashi, et al., 2009

Abbildung ohne Veränderungen aus Publikation entnommen (Takahashi, et al., 2009)

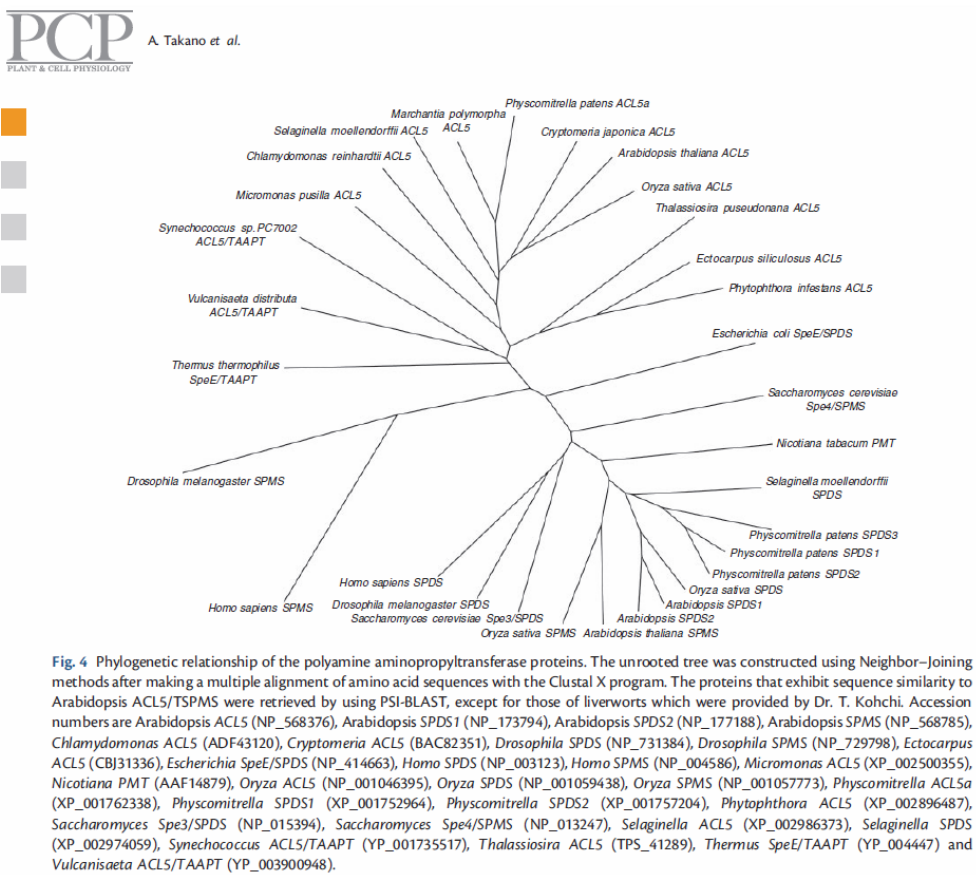
6.4.3. Phylogenetischer Baum aus Takano, et al., 2012

Abbildung 32: Phylogenetischer Baum aus Takano, et al., 2012

Abbildung ohne Veränderungen aus Publikation entnommen (Takano, et al., 2012)

6.5. Motive für mögliche CIS-Elemente der *HvSPMS*-upstream-Regionen

6.5.1. mögliche Motive für CIS-Elemente der *HvSPMS1*-upstream-Region

Motivbezeichnung	Organismus	Position	Strang	Matrix-score	Sequenz	Funktion
5UTR Pyr-reicher Abschnitt	<i>Lycopersicon esculentum</i>	219	+	9	TTT CTT CTC T	CIS-Element, das für hohe Transkriptionsrate steht, ohne dass weitere CIS-Elemente bis auf eine TATA-Box benötigt werden
A-Box	<i>Petroselinum crispum</i>	643	+	6	CCG TCC	CIS-Element, das für hohe Transkriptionsrate steht, ohne dass weitere CIS-Elemente bis auf eine TATA-Box benötigt werden
		843	-	6		
		762	+	6		
		720	-	6		
		817	+	6		
		1258	+	6		
		2105	+	6		
AAGAA-Motiv	<i>Avena sativa</i>	1704	+	6	GGT AAA GAA A	
		1651	-	9		
		2510	+	7		
ABRE	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1717	-	7	GAA AGA A	Potentielles CIS-Elemente, das an Abscisinsäure (ABA) und der TrStr-Antwort von Cor15a beteiligt ist
		183	+	6	CAC GTG	
AE-Box	<i>Arabidopsis thaliana</i>	988	-	6	CAC GTG	Teil eines Systems bestehend aus 3 bis 4 Gap- und 2 AE-Boxen; Lichtreaktivität vermittelnd
AT-reiche Sequenz	<i>Pisum sativum</i>	1093	+	8	AGA AAC AA	notwendig für maximale Elicitor-vermittelte Aktivierung von PsChs1 (Sequenz 2x erforderlich)
Box 1	<i>Pisum sativum</i>	425	-	9	TAA AAT ACT	CIS-Element, beteiligt an Lichtempfindlichkeit
Box 4	<i>Petroselinum crispum</i>	408	-	7	TTT CAA A	Teil des pal-konservierten DNA-Modul-Arrays (pal-CMA1), an Lichtreaktion beteiligt
BRE-Element		1016	-	6	ATT AAT	allgemeines Kernpromotor-Element
		1592	+	7	CCA CGC C	
CAAT-Box	<i>Glycine max</i>	1729	+	7	GCA CGC C	
CAAT-Box	<i>Arabidopsis thaliana</i>	21	+	5	CAA TT	allgemeines CIS-Element in Promotor- und Enhancer-Region
CAAT-Box	<i>Arabidopsis thaliana</i>	703	+	5	CCA AT	

Motivbezeichnung	Organismus	Position	Strang	Matrix-score	Sequenz	Funktion
	<i>Glycine max</i>	386	+	5	CAA TT	
	<i>Brassica rapa</i>	904	-	5	CAA AT	
	<i>Hordeum vulgare</i>	109	+	4	CAA T	
	<i>Hordeum vulgare</i>	704	+	4		
	<i>Brassica rapa</i>	478	+	5	CAA AT	
	<i>Hordeum vulgare</i>	1143	-	4	CAA T	
	<i>Brassica rapa</i>	2373	-	5	CAAAT	
	<i>Brassica rapa</i>	1969	-	5		
	<i>Hordeum vulgare</i>	2564	-	4		
	<i>Hordeum vulgare</i>	1477	-	4	CAA T	
	<i>Hordeum vulgare</i>	2531	-	4		
	<i>Hordeum vulgare</i>	2297	+	4		
	<i>Brassica rapa</i>	2454	-	5	CAA AT	
	<i>Glycine max</i>	1476	-	5	CAA TT	
	<i>Hordeum vulgare</i>	2547	-	4	CAA T	
	<i>Brassica rapa</i>	2128	-	5	CAA AT	
	<i>Hordeum vulgare</i>	1809	-	4	CAA T	
	<i>Glycine max</i>	2371	+	5	CAA TT	
CAT-Box	<i>Arabidopsis thaliana</i>	585	-	6	GCC ACT	allgemeines CIS-Element in Promotor- und Enhancer-Region
CATT-Motiv	<i>Zea mays</i>	757	+	6	GCA TTC	Teil des ppdk-konservierten DNA-Modul-Arrays (ppdk-CMA1), an Lichtreaktion beteiligt
	<i>Zea mays</i>	983	-	6		
	<i>Zea mays</i>	1215	+	6		
	<i>Zea mays</i>	2430	-	6		
CCGTCC-Box	<i>Arabidopsis thaliana</i>	643	+	6	CCG TCC	CIS-Element, mit spezifischer Meristemaktivierung assoziiert
		843	-	6		
		762	+	6		
		720	-	6		
		817	+	6		
		1258	+	6		

Motivbezeichnung	Organismus	Position	Strang	Matrix-score	Sequenz	Funktion
CCGTCC-box	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2105	+	6	CCG TCC	CIS-Element, mit spezifischer Meristemaktivierung assoziiert
		1704	+	6		
CGTCA-Motiv	<i>Hordeum vulgare</i>	529	-	5	CGT CA	Cis-Element, das an Methyljasmonat-Regelkreis beteiligt ist; assoziiert mit seiner komplementären Sequenz TGACG 15bp stromabwärts (Palindrom)
G-Box	<i>Pisum sativum</i>	183	+	6	CAC GTG	CIS-Element, beteiligt an Lichtempfindlichkeit
		988	-	6		
		2155	+	6		
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	183	+	6	CAC GTG	
		988	-	6		
		<i>Zea mays</i>	1241	+		
		2155	+	6	CAC GTT	
GA-Motiv	<i>Helianthus annuus</i>	1149	+	8	AAA GAT GA	Teil der LRE rbcS-(I-G)-Einheit des rbcS Gens
GARE-Motiv	<i>Brassica oleracea</i>	2535	-	7	AAA CAG A	Gibberellin-geregeltes Element
		2569	+	7	TCT GTT G	
GC-Motiv	<i>Zea mays</i>	1536	+	7	GCC CCG G	Enhancer-ähnliches Element, an spezifischer, sauerstofffreier Induzierbarkeit beteiligt
		1604	+	6	CCC CCG	
GCN4-Motiv	<i>Oryza sativa</i>	1751	+	7	TGT GTC A	CIS-Element, an Endospermexpression beteiligt
		2424	-	7	CAA GCC A	
GT1-Motiv	<i>Avena sativa</i>	44	+	7	GGT TAA T	Element, beteiligt an Lichtempfindlichkeit
I-box	<i>Triticum aestivum</i>	2045	-	8	AGA TAA GG	Teil des rbcS-konservierten DNA-Modul-Arrays (rbcS-CMA6), an Lichtreaktion beteiligt
LAMP-Element	<i>Pisum sativum</i>	1145	-	8	CTT TAT CA	Teil des Pc-konservierten DNA-Modul-Arrays (Pc-CMA1), an Lichtreaktion beteiligt
LTR	<i>Hordeum vulgare</i>	894	-	6	CCG AAA	CIS-Element, an Kälteantwort beteiligt
MBS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	59	+	6	CAA CTG	MYB-Bindungsstelle, an TrStr-induzierbarer Myb-Bindungsstelle des rd29B-Gens beteiligt
MBS	<i>Zea mays</i>	2438	+	6	CGG TCA	MYB-Bindungsstelle, CIS-Element mit schwacher Homologie zur TAACTG / CAGTTA-Konsensussequenz; verknüpft mit Bz2-Genaktivierung durch R- und C1-Faktoren
MRE	<i>Petroselinum crispum</i>	938	-	7	AAC CTAA	MYB-Bindungsstelle, an Lichtreaktion und MYB-

Motivbezeichnung	Organismus	Position	Strang	Matrix-score	Sequenz	Funktion
MRE	<i>Petroselinum crispum</i>	2191	+	7	AAC CTA A	Erkennungselement beteiligt, das in vitro und in vivo durch verschiedene Typen von MYB-ähnlichen Proteinen (PcMYB1 und MYB305) erkannt wird
O2-Stelle	<i>Zea mays</i>	1981	+	9	GAT GAT AT GG	CIS-Element, an Zein-Metabolismus-Regulation beteiligt
P-Box	<i>Oryza sativa</i>	1098	-	7	CCT TTT G	Gibberellin-geregeltes Element
Skn-1-Motiv	<i>Oryza sativa</i>	147	-	5	GTC AT	CIS-Element, für hohe Endosperm-Expressionsraten erforderlich; in kooperativer Interaktion mit anderen Motiven (AACA, GCN4, ACGT)
		2039	+	5		
Sp1	<i>Oryza sativa</i>	2087	+	6	GGG CGG	CIS-Element, beteiligt an Lichtempfindlichkeit
	<i>Zea mays</i>	597	-	5	CC (G/A) CCC	
TATA-Box	<i>Zea mays</i>	7	-	8	TTT AAA AA	Kernpromotor-Element, ca. 30 bp vor Transkriptionsstart
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	8	+	5	TTT TA	
	<i>Zea mays</i>	9	+	8	TTT AAA AA	
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	11	-	5	TTT TA	
	<i>Glycine max</i>	47	+	5	TAA TA	
		53	+	4	TAT A	
		70	+	4		
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	81	-	5	TAT AA	
		82	+	4	TAT A	
		94	+	4		
		120	+	6	TAT AAA	
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	122	-	5	TTT TA	
		136	+	5		
	<i>Brassica napus</i>	143	+	6	ATA TAT	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	144	+	4	TAT A	
		261	+	4		
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	277	-	5	TTT TA	
	291	+	5			
<i>Arabidopsis thaliana</i>	340	+	4	TAT A		
<i>Lycopersicon esculentum</i>	347	-	5	TTT TA		

Motivbezeichnung	Organismus	Position	Strang	Matrix-score	Sequenz	Funktion
TATA-Box	<i>Arabidopsis thaliana</i>	377	-	6	TAT AAA	Kernpromotor-Element, ca. 30 bp vor Transkriptionsstart
		378	-	5	TAT AA	
		379	+	4	TAT A	
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	393	-	5	TTT TA	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	402	-	5	TAT AA	
		403	+	4	TAT A	
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	429	+	5	TTT TA	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	438	-	5	TAT AA	
		439	+	4	TAT A	
	<i>Glycine max</i>	460	-	5	TAA TA	
	<i>Brassica napus</i>	461	+	6	ATT ATA	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	462	-	5	TAT AA	
		463	+	4	TAT A	
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	498	+	5	TTT TA	
		768	+	5		
		936	+	5		
	<i>Glycine max</i>	1001	-	5	TAA TA	
		1015	-	5		
	<i>Brassica napus</i>	1018	+	5	ATA TAT	
		1020	-	6		
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1021	-	4	TAT A	
	<i>Glycine max</i>	1038	-	5	TAA TA	
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1057	-	5	TTT TA	
		1086	-	9	TCT ATA TAT T	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1115	-	12	TAT AAA TAT AAA	
		1116	-	5	TAT AA	
1117		+	4	TAT A		
<i>Daucus carota</i>	1119	-	8	TAT AAA TA		
	1120	-	7	TAT AAA T		
<i>Arabidopsis thaliana</i>	1121	-	6	TAT AAA		
	1122	-	5	TAT AA		

Motivbezeichnung	Organismus	Position	Strang	Matrix-score	Sequenz	Funktion
TATA-Box	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1123	+	4	TAT A	Kernpromotor-Element, ca. 30 bp vor Transkriptionsstart
		1873	-	9	TAT ATA AAT C	
		1877	+	9	TAT ATA AAG G	
	<i>Brassica oleracea</i>	1878	+	6	ATA TAA	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1879	+	6	TAT AAA	
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1907	+	5	TTT TA	
	<i>Glycine max</i>	1910	-	5	TAA TA	
	<i>Brassica napus</i>	1982	+	6	ATT ATA	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1983	-	5	TAT AA	
		1984	-	4	TAT A	
	<i>Helianthus annuus</i>	2021	-	6	TAT ACA	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2023	-	4	TAT A	
	<i>Helianthus annuus</i>	2074	-	6	TAT ACA	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2076	-	4	TAT A	
		2124	-	5	TAT AA	
		2125	-	4	TAT A	
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2159	+	5	TTT TA	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2165	+	8	TAT TTA AA	
		2167	-	8		
	<i>Brassica napus</i>	2172	-	6	ATA TAT	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2173	-	4	TAT A	
	<i>Nicotiana tabacum</i>	2179	-	9	TCT ATA AAT A	
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2256	+	5	TTT TA	
	<i>Glycine max</i>	2403	-	5	TAA TA	
	<i>Brassica napus</i>	2404	+	6	ATT ATA	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2405	-	5	TAT AA	
		2406	-	4	TAT A	
	<i>Glycine max</i>	2408	+	5	TAA TA	
TC-reiches Motiv	<i>Nicotiana tabacum</i>	1383	+	9	GTT TTC TTA C	CIS-Element, an Stress-Antwort und -Abwehr beteiligt
		1947	-	9		
TCA-Element	<i>Brassica oleracea</i>	1568	-	9	CAG AAA AGG A	CIS-Element, an Salizylsäure-Antwort beteiligt

Motivbezeichnung	Organismus	Position	Strang	Matrix-score	Sequenz	Funktion
TGA-Element	<i>Brassica oleracea</i>	1079	+	6	AAC GAC	Auxin-geregeltes Element
TGACG-Motiv	<i>Hordeum vulgare</i>	529	+	5	TGA CG	CIS-Element, an Methyljasmonat-Regelkreis beteiligt (Bindestelle des Arabidopsis-bZIP-Proteins TGA1a); mit Komplementärsequenz verbunden
nicht benannt_1	<i>Zea mays</i>	629	+	5	CGT GG	
		840	+	5		
		1357	-	5		
		2468	+	5		
		1592	-	5		
		1471	+	5		
nicht benannt_2	<i>Zea mays</i>	2435	-	5		
nicht benannt_2	<i>Zea mays</i>	1537	+	6	CCC CGG	
nicht benannt_3	<i>Zea mays</i>	629	+	5	CGT GG	
		840	+	5		
		1357	-	5		
		2468	+	5		
		1592	-	5		
		1471	+	5		
nicht benannt_4	<i>Petroselinum hortense</i>	2435	-	5	CTC C	
		1	+	4		
		654	+	4		
		269	+	4		
		747	-	4		
		229	+	4		
		674	-	4		
		598	-	4		
		961	+	4		
		179	-	4		
		657	+	4		
420	-	4				
814	+	4				

Motivbezeichnung	Organismus	Position	Strang	Matrix-score	Sequenz	Funktion
nicht benannt_4	<i>Petroselinum hortense</i>	265	+	4	CTCC	
		677	-	4		
		608	-	4		
		1103	-	4		
		1168	-	4		
		1821	-	4		
		1368	+	4		
		2215	-	4		
		1228	+	4		
		1890	+	4		
		1632	+	4		
		2219	-	4		
		1197	+	4		
		1838	+	4		
		1423	+	4		
2103	+	4				
1297	+	4				
1637	-	4				
nicht benannt_10	<i>Zea mays</i>	1424	+	9	TCC ACG TAG A	
as-2-Box	<i>Nicotiana tabacum</i>	1146	+	9	GAT AAT GAT G	beteiligt an Schössling-spezifischer Expression und Lichtreaktion
Box S	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1917	-	7	AGC CAC C	beteiligt an Elicitor-, Verwundungs- und Pathogenabwehr
chs-CMA2b	<i>Petroselinum crispum</i>	2146	+	11	GTA TCT ACT CAC	Teil des chs-konservierten DNA-Modul-Arrays (chs-CMA2), beteiligt an Lichtreaktion
zirkadianes Element	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1964	-	6	CAA NNN NAT C	CIS-Element, beteiligt an circadianer mRNA-Akkumulationskontrolle
rbcS-CMA7a	<i>Lemna gibba</i>	2045	-	9	GTC GAT AAG G	Teil des konservierten DNA-Modul-Assays rbcS-CMA7, beteiligt an Lichtreaktion

Tabelle 72: mögliche Motive für CIS-Elemente der *HvSPMS1*-upstream-Region

PLACE- und PlantCARE-Datenbank-Recherchen; CORE-Datenbank akzeptierte maximale Basenabfolgelänge von 1'500 bp, Sequenz bei 1'500 bp geteilt, zweifach mit 20 bp Überschneidungsbereich analysiert; Bezeichnung Sequenzeinträge laut Datenbanken; Zeilen gleicher Einträge zusammengefasst

6.5.2. mögliche Motive für CIS-Elemente der *HvSPMS2*-upstream-Region

Motivbezeichnung	Organismus	Position	Strang	Matrix-score	Sequenz	Funktion
A-box	<i>Petroselinum crispum</i>	1456	-	6	CCG TCC	CIS-Element, das für hohe Transkriptionsrate steht, ohne dass weitere CIS-Elemente bis auf eine TATA-Box benötigt werden
ABRE	<i>Arabidopsis thaliana</i>	186	-	6	TAC GTG	CIS-Elemente, das an Abscisinsäure (ABA)-Antwort des rd29B-Gens beteiligt ist
AE-box	<i>Arabidopsis thaliana</i>	970	-	8	AGA AAC AA	Teil eines Systems bestehend aus 3 bis 4 Gap- und 2 AE-Boxen; Lichtreaktion vermittelnd
		2089	-	8	GGT AAG AA	
AAGAA-Motiv	<i>Avena sativa</i>	2255	-	7	GAA AGA A	
		2220	-	9	GGT AAA GAA A	
		2495	-	7	GAA AGA A	
		400	-	6		
ARE	<i>Zea mays</i>	543	+	6	TGG TTT	CIS-Element, für anaerobe Induktion essentiell
		457	+	6		
		2615	+	6		
AT-reiches Element	<i>Glycine max</i>	117	-	10	ATA GAAATCAA	CIS-Elementbindestelle des AT-reichen DNA-Bindeproteins (ATBP-1)
ATGCAAAT-Motiv	<i>Oryza sativa</i>	229	-	8	ATA CAA AT	CIS-Element, eine Base darf nicht passen; Bindestelle assoziiert mit TGAGTCA-Motiv (GCN4), von 2 Basen abgetrennt und ungeordnet
Box 3	<i>Pisum sativum</i>	1804	-	9	CAT TTA CAC T	beteiligt an Lichtreaktion
BRE-Element		677	+	7	CGG CGC C	allgemeines Kernpromotor-Element
CAAT-Box	<i>Hordeum vulgare</i>	25	+	4	CAA T	allgemeines CIS-Element in Promotor- und Enhancer-Region
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	54	+	5	CAA TT	
	<i>Glycine max</i>	55	+	5		
	<i>Brassica rapa</i>	74	+	5	CAA AT	
CAAT-Box	<i>Brassica rapa</i>	104	-	5	CAA AT	allgemeines CIS-Element in Promotor- und Enhancer-Region
	<i>Hordeum vulgare</i>	116	-	4	CAA T	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	144	+	5	CCA AT	
	<i>Glycine max</i>	145	+	5	CAA TT	

Motivbezeichnung	Organismus	Position	Strang	Matrix-score	Sequenz	Funktion
	<i>Brassica rapa</i>	147	-	5	CAA AT	
	<i>Hordeum vulgare</i>	159	-	4	CAA T	
	<i>Brassica rapa</i>	229	-	5	CAA AT	
		260	-	4		
		299	-	4		
	<i>Hordeum vulgare</i>	333	-	4	CAA T	
		405	-	4		
		516	-	4		
	<i>Glycine max</i>	520	-	5	CAA TT	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	521	-	5	CAA AT	
	<i>Brassica rapa</i>	943	-	5		
	<i>Hordeum vulgare</i>	1046	-	4	CAA T	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1068	-	5	CCA AT	
	<i>Glycine max</i>	1155	+	5		
		1157	-	5	CAA AT	
	<i>Brassica rapa</i>	1263	-	5		
	<i>Glycine max</i>	1268	-	5	CAA TT	
		1269	-	4		
	<i>Hordeum vulgare</i>	1273	+	4	CAA T	
	<i>Brassica rapa</i>	1305	+	5	CAA AT	
	<i>Glycine max</i>	1413	+	5	CAA TT	
	<i>Brassica rapa</i>	1415	-	5	CAA AT	
		1534	+	4		
	<i>Hordeum vulgare</i>	1695	+	4	CAA T	
	<i>Brassica rapa</i>	1739	+	5	CAA AT	
	<i>Hordeum vulgare</i>	1773	+	4	CAA T	
	<i>Brassica rapa</i>	1856	+	5	CAA AT	
	<i>Hordeum vulgare</i>	1878	-	4	CAA T	
CAAT-Box	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1923	+	5	CCA AT	allgemeines CIS-Element in Promotor- und Enhancer-Region
		1924	+	4		
	<i>Hordeum vulgare</i>	1932	+	4	CAA T	

Motivbezeichnung	Organismus	Position	Strang	Matrix-score	Sequenz	Funktion
		1949	-	4		
		1958	-	4		
	<i>Brassica rapa</i>	2126	-	5	CAA AT	
	<i>Glycine max</i>	2152	-	5	CAA TT	
		2153	-	4		
	<i>Hordeum vulgare</i>	2326	+	4	CAA T	
		2363	+	4		
	<i>Brassica rapa</i>	2531	-	5	CAA AT	
	<i>Glycine max</i>	2563	-	5	CAA TT	
		2564	-	4	CAA T	
	<i>Hordeum vulgare</i>	2595	-	4		
CATT-Motiv	<i>Zea mays</i>	293	+	6	GCA TTC	Teil des für Lichtreaktion verantwortlichen Elements
CCGTCC-box	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1456	-	6	CCG TCC	CIS-Element, mit spezifischer Meristemaktivierung assoziiert
CGTCA-Motiv	<i>Hordeum vulgare</i>	2190	+	5	CGT CA	CIS-Element, beteiligt an Methyljasmonat-Regelkreis
E2Fa	<i>Nicotiana tabacum</i>	954	+	8	TTT CCC GC	E2F-Bindestelle; G1-M-Übergang des Zellzyklus
		2552	+	8		
	<i>Antirrhinum majus</i>	186	+	6	CAC GTA	
G-Box	<i>Daucus carota</i>	186	-	6	TAC GTG	CIS-Element, beteiligt an Lichtempfindlichkeit
	<i>Zea mays</i>	2188	+	6	CAC GTC	
GAG-Motiv	<i>Hordeum vulgare</i>	474	+	7	GGA GAT G	Teil des rbcA-konservierten DNA-Modul-Arrays (rbcA-CMA1), beteiligt an Lichtreaktion
GARE-Motiv	<i>Brassica oleracea</i>	346	-	7	AAA CAG A	Gibberellin-geregeltes Element
GC-Motiv	<i>Zea mays</i>	704	+	6	CCC CCG	Enhancer-ähnliches Element, beteiligt an sauerstofffreier spezifischer Induktion
GATA-Motiv	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2173	-	7	GAT AGG A	Teil des für Lichtreaktion verantwortlichen Elements
		1146	+	6	CCC CCG	
GC-Motiv	<i>Zea mays</i>	840	+	6	CCC CCG	Enhancer-ähnliches Element, an spezifischer, sauerstofffreier Induzierbarkeit beteiligt
		1652	+	7	GCC CCG G	

Motivbezeichnung	Organismus	Position	Strang	Matrix-score	Sequenz	Funktion																																																																																																																														
GCN4_Motiv	<i>Oryza sativa</i>	1503	+	7	TGT GTC A	CIS-Element, an Endospermexpression beteiligt																																																																																																																														
		2470	+	7			GT1-Motiv	<i>Solanum tuberosum</i>	1004	-	8	AAT CCA CA	CIS-Element der Lichtreaktion	HD-Zip 3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2358	-	9.5	GTA AT (G/C) ATT AC	Proteinbindestelle	I-box	<i>Flaveria trinervia</i>	1585	+	7	GAT ATG G	Teil des für Lichtreaktion verantwortlichen Elements	LTR	<i>Hordeum vulgare</i>	1975	+	6	CCG AAA	CIS-Element, an Kälteantwort beteiligt	MBS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1404	+	6	TAA CTG	Myb-Bindungsstelle, an TrStr-induzierbarer Myb-Bindungsstelle des rd29B-Gens beteiligt	O2-site	<i>Zea mays</i>	1908	-	8	GAT GA (C/T) (A/G) TG (A/G)	CIS-Element, an Zein-Metabolismus-Regulation beteiligt	OBP-1 Stelle	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2227	+	10	TAC ACT TTT GG	CIS-Element	Skn-1-Motiv	<i>Oryza sativa</i>	40	+	5	GTC AT	CIS-Element, an Endospermexpression beteiligt	1341	-	5	1789	-	5	2473	+	5	1928	-	5	2483	-	5	Sp1	<i>Zea mays</i>	596	-	5.5	CC (G/A) CCC	CIS-Element der Lichtreaktion	850	+	5.5	<i>Oryza sativa</i>	843	-	6	GGG CGG	1319	-	5	703	+	5	<i>Zea mays</i>	1145	+	5	846	+	5	700	+	5	Sp1	<i>Oryza sativa</i>	803	-	6	GGG CGG	CIS-Element der Lichtreaktion	<i>Zea mays</i>	2007	+	5.5	CC (G/A) CCC	TATA-Box	<i>Lycopersicon esculentum</i>	8	+	5	TTT TA	Kernpromotorelement, ca. 30 bp vor Transkriptionsstart	<i>Oryza sativa</i>	9	-	8	TAC ATA AA
GT1-Motiv	<i>Solanum tuberosum</i>	1004	-	8	AAT CCA CA	CIS-Element der Lichtreaktion																																																																																																																														
HD-Zip 3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2358	-	9.5	GTA AT (G/C) ATT AC	Proteinbindestelle																																																																																																																														
I-box	<i>Flaveria trinervia</i>	1585	+	7	GAT ATG G	Teil des für Lichtreaktion verantwortlichen Elements																																																																																																																														
LTR	<i>Hordeum vulgare</i>	1975	+	6	CCG AAA	CIS-Element, an Kälteantwort beteiligt																																																																																																																														
MBS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1404	+	6	TAA CTG	Myb-Bindungsstelle, an TrStr-induzierbarer Myb-Bindungsstelle des rd29B-Gens beteiligt																																																																																																																														
O2-site	<i>Zea mays</i>	1908	-	8	GAT GA (C/T) (A/G) TG (A/G)	CIS-Element, an Zein-Metabolismus-Regulation beteiligt																																																																																																																														
OBP-1 Stelle	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2227	+	10	TAC ACT TTT GG	CIS-Element																																																																																																																														
Skn-1-Motiv	<i>Oryza sativa</i>	40	+	5	GTC AT	CIS-Element, an Endospermexpression beteiligt																																																																																																																														
		1341	-	5																																																																																																																																
		1789	-	5																																																																																																																																
		2473	+	5																																																																																																																																
		1928	-	5																																																																																																																																
		2483	-	5																																																																																																																																
Sp1	<i>Zea mays</i>	596	-	5.5	CC (G/A) CCC	CIS-Element der Lichtreaktion																																																																																																																														
		850	+	5.5																																																																																																																																
	<i>Oryza sativa</i>	843	-	6			GGG CGG																																																																																																																													
	1319	-	5																																																																																																																																	
	703	+	5																																																																																																																																	
	<i>Zea mays</i>	1145	+	5																																																																																																																																
	846	+	5																																																																																																																																	
700	+	5																																																																																																																																		
Sp1	<i>Oryza sativa</i>	803	-	6	GGG CGG	CIS-Element der Lichtreaktion																																																																																																																														
	<i>Zea mays</i>	2007	+	5.5	CC (G/A) CCC																																																																																																																															
TATA-Box	<i>Lycopersicon esculentum</i>	8	+	5	TTT TA	Kernpromotorelement, ca. 30 bp vor Transkriptionsstart																																																																																																																														
	<i>Oryza sativa</i>	9	-	8	TAC ATA AA																																																																																																																															
		47	-	7	TAC AAA A																																																																																																																															

Motivbezeichnung	Organismus	Position	Strang	Matrix-score	Sequenz	Funktion
		90	-	7	TAC AAA A	
	<i>Glycine max</i>	131	+	5	TAA TA	
		154	-	6	TAT AAA	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	155	-	5	TAT AA	
		156	+	4	TAT A	
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	164	+	5	TTT TA	
	<i>Glycine max</i>	167	-	5	TAA TA	
		175	+	9	TCT ATA TAT T	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	177	+	4		
		179	+	4	TAT A	
		190	+	4		
	<i>Helianthus annuus</i>	232	-	6	TAT ACA	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	234	+	6	TAT AAA	
		257	+	4	TAT A	
	<i>Glycine max</i>	265	-	5		
		308	+	5	TAA TA	
	<i>Helianthus annuus</i>	335	-	6	TAT ACA	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	337	+	4	TAT A	
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	460	+	5		
	<i>Glycine max</i>	1188	-	5	TAA TA	
		1295	-	6	TAT AAA	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1296	-	5	TAT AA	
		1297	-	4	TAT A	
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1633	+	5	TTT TA	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2425	-	4	TAT A	
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2342	-	5	TTT TA	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2573	-	4	TAT A	
	<i>Glycine max</i>	1824	+	5	TAA TA	
TATA-Box	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2527	+	5	TTT TA	Kernpromotor-Element, ca. 30 bp vor Transkriptionsstart
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2424	-	5	TAT AA	
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2603	-	5	TTT TA	

Motivbezeichnung	Organismus	Position	Strang	Matrix-score	Sequenz	Funktion
		1642	+	5		
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2503	-	4	TAT A	
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1872	+	5	TTT TA	
	<i>Helianthus annuus</i>	2571	-	6	TAT ACA	
TCCC-Motiv	<i>Spinacia oleracea</i>	1131	+	7	TCT CCC T	Teil des für Lichtreaktion verantwortlichen Elements
TCT-Motiv	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2090	+	6	TCT TAC	Teil des für Lichtreaktion verantwortlichen Elements
TGACG-Motiv	<i>Hordeum vulgare</i>	2190	-	5	TGA CG	CIS-Element, beteiligt an Methyljasmonat-Regelkreis
nicht benannt_1	<i>Zea mays</i>	282	+	5		
		1103	-	5	CGT GG	
		592	-	5		
nicht benannt_2	<i>Zea mays</i>	1653	+	6	CCC CGG	
nicht benannt_3	<i>Zea mays</i>	282	+	5		
		1103	-	5	CGT GG	
	<i>Zea mays</i>	592	-	5		
nicht benannt_4	<i>Petroselinum hortense</i>	474	-	4		
		488	-	4		
		670	+	4		
		701	+	4		
		711	+	4	CTC C	
		739	+	4		
		811	+	4		
		819	+	4		
		996	-	4		
nicht benannt_4	<i>Petroselinum hortense</i>	1095	+	4		
		1108	+	4		
		1123	-	4	CTC C	
		1127	+	4		
		1132	+	4		

Motivbezeichnung	Organismus	Position	Strang	Matrix-score	Sequenz	Funktion
		1206	+	4		
		1224	+	4		
		1245	+	4		
		1320	-	4		
		1387	+	4		
		1460	-	4		
		1464	-	4		
		1777	-	4		
		2160	-	4		
		2039	-	4		
		2577	+	4		
		2005	+	4		
		2285	+	4		
		2109	+	4		
nicht benannt_11	<i>Zea mays</i>	1129	+	10	CCT CTC CCG TC	
Box S	<i>Arabidopsis thaliana</i>	564	+	7	AGC CAC C	
		2055	+	7		
chs-CMA2b	<i>Daucus carota</i>	2103	-	11	ATT GCA ACT CAA	Teil des für Lichtreaktion verantwortlichen Elements
zirkadianes Element	<i>Lycopersicon esculentum</i>	515	-	6	CAA NNN NAT C	CIS-Element, beteiligt an circadianer mRNA-Akkumulationskontrolle
Motiv 2b	<i>Oryza sativa</i>	800	+	9	CCG CCG CGC T	CIS-Element, beteiligt an Abscisinsäure (ABA)-Regelkreis
AP-2-ähnliche, pflanzlich	<i>Oryza sativa</i>	872	+	8	CGA CCA GG	

Tabelle 73: mögliche Motive für CIS-Elemente der *HvSPMS2*-upstream-Region

PLACE- und PlantCARE-Datenbank-Recherchen; CORE-Datenbank akzeptierte maximale Basenabfolgelänge von 1'500 bp, Sequenz bei 1'500 bp geteilt, zweifach mit 20 bp Überschneidungsbereich analysiert; Bezeichnung Sequenzeinträge laut Datenbanken; Zeilen gleicher Einträge zusammengefasst

6.6. Sonstige Abbildungen

6.6.1. GenomeWalker™ Adapter und Adapter-Primer

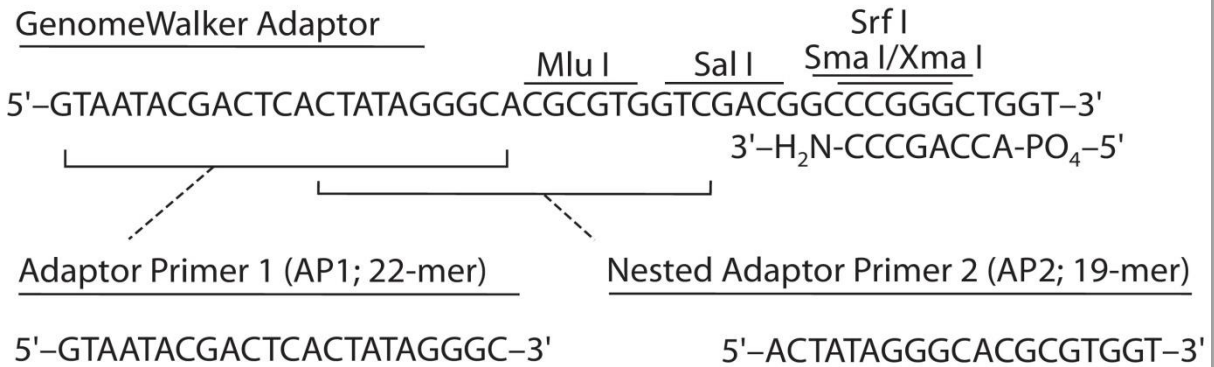


Abbildung 33: GenomeWalker™ Adapter und Adapter-Primer, Kopie

Adapter beidseitig an gDNA-Fragmente ligiert um GenomeWalker Bibliotheken zu erstellen; Aminogruppe des unteren Adapterstranges verhindert Verlängerung des 3'-Endes der Adapterligierten gDNA-Fragmente, das wiederum Bildung einer AP1-Bindestelle an alle weitere Fragmente unterbindet; Schmelztemperaturen AP1 und AP2: 59 °C und 71 °C; Abbildung und alle Angaben entsprechen denen des Herstellers (Clontech, 2007)

6.6.2. MCS Promega pGEM®-T Easy Vector System

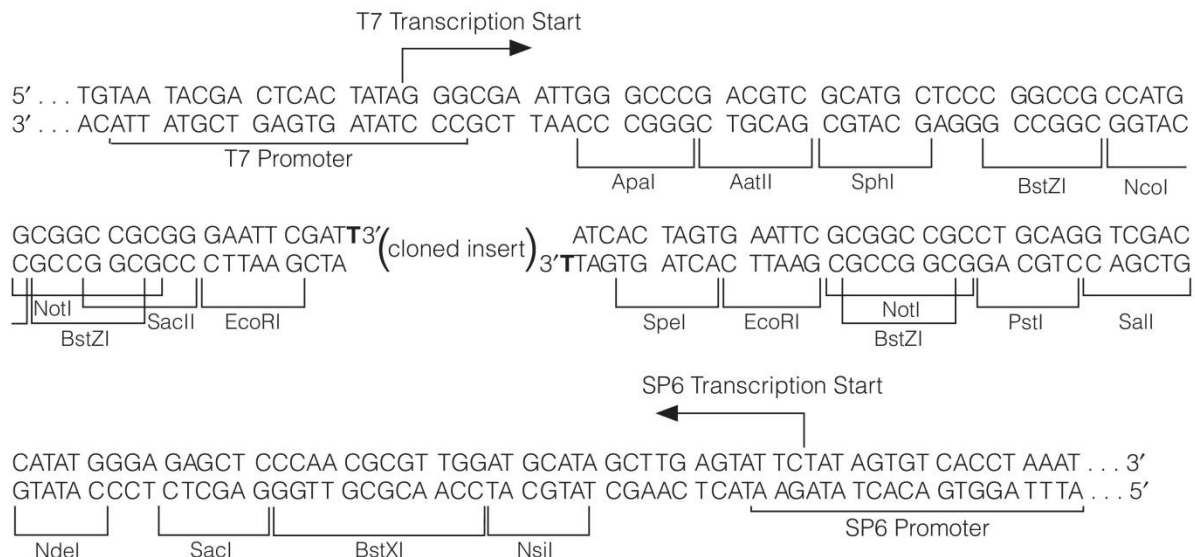


Abbildung 34: MCS Promega pGEM®-T Easy Vector System

Angaben entsprechen denen des Herstellers (Promega, 2009)

6.6.3. Isolierte Gerstenprotoplasten

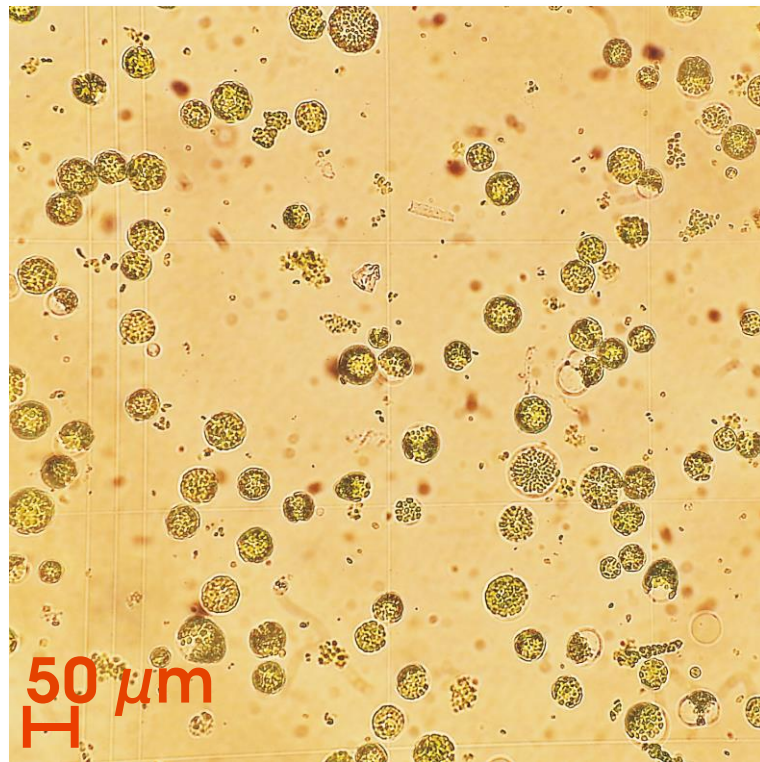


Abbildung 35: isolierte Gerstenprotoplasten

intakte und zerstörte Protoplasten aus 14 das alten *Hordeum vulgare*-Pflanzen isoliert; lichtmikroskopische Aufnahme; Protoplasten in W5-Lösung, 100-fach vergrößert, Frischpräparat

7. Literaturverzeichnis

- Akhunov, Eduard D., et al. 2010.** Nucleotide diversity maps reveal variation in diversity among wheat genomes and chromosomes. *BioMed Central (BMC) Genomics*. 2010, 11:702, S. 1471-2164.
- Alcázar, Rubén, et al. 2006.** Abscisic Acid modulates polyamine metabolism under water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*. 2006, 128, S. 448-455.
- Alcázar, Rubén, et al. 2010.** Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta*. 2010, 231, S. 1237-1249.
- Alexandrov, Nickolai N., et al. 2009.** Insights into corn genes derived from large-scale cDNA sequencing. *Plant Mol Biol*. 2009, 69, S. 179-194.
- Altschul, S. F., et al. 1990.** Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*. 1990, 215, S. 403-410.
- Badr, A., et al. 2000.** On the Origin and Domestication History of Barley (*Hordeum vulgare*). *Molecular Biology and Evolution*. 2000, 17, Nr. 4, S. 499-510.
- Baillon, Jean G., et al. 1988.** Fluorinated analogues of spermidine as substrates of spermine synthase. *European Journal of Biochemistry*. 1988, 176, S. 237-242.
- Basu, Supratim, et al. 2016.** Plant adaptation to drought stress [version 1; referees: 3 approved]. *F1000Research* 2016. 5(F1000 Faculty Rev):1554, 30. Juni 2016, S. 10.
- BayWa AG München Züchtervertrieb. 2013.** Anbauhinweis Naomie. *Wintergerste Naomie* m.z. München, Bayern, Deutschland : BayWa AG München Züchtervertrieb, April 2013.
- Berg, Jeremy M., Tymoczko, John L. und Stryer, Lubert. 2002.** The Transcription Products of All Three Eukaryotic Polymerases Are Processed. *Biochemistry*. New York : Freeman W. H., 2002, Bd. 5th Edition, Section 28.3.
- Bergeron, Raymond J., et al. 1995.** The Role of Charge in Polyamine Analogue Recognition. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1995, Vol. 38, No 13, S. 2278-2285.
- Biastoff, Stefan. 2009.** Untersuchung zur strukturellen Verwandtschaft von Putrescin N-methyltransferase und Spermidinsynthase 1 aus *Datura stramonium*. *Dissertation*. 2009.
- Bioline GmbH. 2012.** MangoMix™-DNA-Polymerase. [Buchverf.] Bioline GmbH. 2012.
- . 2012. MyFi™-DNA-Polymerase. [Buchverf.] Bioline GmbH. 2012.
- . 2014. Ranger-DNA-Polymerase. [Buchverf.] Bioline GmbH. 2014.
- Biozym Scientific GmbH. 2012.** Quantitas DNA Marker 200 bp-10 kb. [Buchverf.] Biozym Scientific GmbH. *Datenblatt Quantitas 200bp-10kb*. s.l. : Biozym Scientific GmbH, 2012.
- Bouchereau, A., et al. 1999.** Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science*. 1999, 140, S. 103-125.
- Bradford, Marion M. 1976.** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. [Hrsg.] Academic Press. Inc. *Analytical Biochemistry*. 1976, 72, S. 248-254.

- Brechner, Elke. 2002.** *Kompaktlexikon der Biologie in drei Bänden.* Heidelberg, Berlin : Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin, 2002. S. 169. Bd. Band III. 3-8274-10-42-8.
- Brinkell, Christopher. 1994.** *Du Monts große Garten-Enzyklopädie. The Royal Horticultural Society.* [Übers.] Stefanie Hutter. Köln : DuMont, 1994. S. 589. ISBN: 3-7701-3268-8.
- Budiman, Muhammad A., et al. 2000.** A Deep-Coverage Tomato BAC Library and Prospects Toward Development of an STC Framework for Genome Sequencing. *Genome Research.* 2000, 10, S. 129-136.
- Cech, Thomas R., Zaug, Arthur J. und Grabowski, Paula J. 1981.** InVitro Splicing of the Ribosomal RNA Precursor of Tetrahymena: Involvement of a Guanosine Nucleotid in the Excision of the Interweninf Sequence. *Cell.* 1981, Vol. 27, S. 487-496.
- Chan, Agnes P., et al. 2010.** Draft genome sequence of the oilseed species *Ricinus communis*. *Nature Biotechnology.* 2010, 28 No. 9, S. 951-959.
- Clontech. 2007.** *GenomeWalker(TM) Universal Kit User Manual.* s.l. : Clontech, 2007.
- . **2009.** *SMARTer(TM) RACE cDNA Amplification Kit User Manual.* s.l. : Clontech, 2009.
- Colmsee, Christian, et al. 2015.** BARLEX - the Barley Draft Genome Explorer. *Molecular Plant.* 2015, 8, S. 964-966.
- Cona, Alessandra, et al. 2006.** Functions of amine oxidases in plant development and defence. *TRENDS in Plant Science.* 2006, Vol. 11 No. 2, S. 80-88.
- Coward, James K., Motola, Nancy C. und Moyer, James D. 1977.** Polyamine Biosynthesis in Rat Prostate. Substrate and Ihibitor Properties of 7-Deaza Analogues of Decarboxylated S-Adenosylmethionine and 5'-Methylthioadenosine. *Journal of Medicinal Chemistry.* 1977, Vol. 20 No. 4, S. 500-505.
- DCS, DNA Cloning Service . 2016.** pUC based vectors with Sfil restriction sites. [Online] 18. August 2016. [Zitat vom: 18. August 2016.] <http://dna-cloning.com/skripte/puc/puc.html>.
- Dejima, Hikedi, et al. 2003.** Synthetic Decarboxylated S-Adenosyl-L-methionine as a Substrate for Aminopropyl Transferases. *Biological Pharmaceutical Bulletin.* 2003, 26(7), S. 1005-1008.
- Do, Phuc T., et al. 2014.** Changes in free polyamine levels, expression of polyamine biosynthesis gene, and performance of rice cultivars under salt stress: a comparison with responses to drought. *frontiers in PLANT SCIENCE.* 2014, Vol. 5, Article 182, S. 1-16.
- Efrose, R. C., et al. 2008.** Characterization of spermidine and spermine synthases in *Lotus japonicus*: induction and spatial organization of polyamine biosynthesis in nitrogen fixing nodules. *Planta.* 2008, 228, S. 37-49.
- Einheitserdenwerke Patzer Gebr. Patzer GmbH & Co. KG. 2011.** Warendeklaration Deutschland Einheitserde ED-73. Am Elmacker 9, 36391 Sinntal-Altengronau, Hessen, Deutschland : s.n., Oktober 2011.

- Eloranta, Terho O., et al. 1990.** Aminooxy Analogues of Spermidine as Inhibitors of Spermine Synthase and Substrates of Hepatic Polyamine Acetylating Activity. *Journal*. 1990, 108, S. 593-598.
- European Food Safety Authority. 2011.** Scientific Opinion on the substantiation of health claim related to barley beta-glucan and lowering of blood cholesterol and reduced risk of (coronary) heart disease pursuant to Article 14 of Regulation (EC) N 1924/2006. *EFSA Journal*. 2011, 9 (12):2470, S. 1-14.
- Eurostat. 2017.** Erntemenge von Gerste in der Europäischen Union nach Ländern in dem Jahr 2016 (in 1.000 Tonnen. *Statista - Das Statistik-Portal, statista.com*. [Online] 2017. [Zitat vom: 04. 12 2017.] <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/457430/umfrage/erntemenge-von-gerste-in-der-eu-nach-laendern/>.
- Fellenberg, Christin, et al. 2012.** Polyamine homeostasis in wild type and phenolamide deficient *Arabidopsis thaliana* stamens. *frontiers in PLANT SCIENCE*. 2012, 3.
- Felsenstein, J. 1985.** Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985, 39, S. 783-791.
- Fermentas. 2009.** Pfu DNA Polymerase. 2009.
- . 2006. *Unstained Protein Molecular Weight Marker*. s.l. : Fermentas, 2006.
- Fernandes, J. O. und Ferreira, M. A. 2000.** Combined ion-pair extraction and gas chromatography–mass spectrometry for the simultaneous determination of diamines, polyamines and aromatic amines in Port wine and grape juice. *Journal of Chromatography A*. 2000, 886, S. 183-195.
- Feschotte, Cédric und Pritham, Ellen J. 2007.** DNA Transposons and the Evolution of Eukaryotic Genomes. *Annual Review of Genetics*. 2007, 41, S. 331-368.
- Fontanillas, Pierre, Hartl, Daniel L. und Reuter, Max. 2007.** Genome Organization and Gene Expression Shape the Transposable Element Distribution in the *Drosophila melanogaster* Euchromatin. *PLOS Genetics*. 2007, Volume 3, Issue 11, S. 2256-2267.
- Gleave, Andrew P. 1992.** a versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. [Hrsg.] Kluwer Academic Publishers. *Plant Molecular Biology*. 1992, 20, S. 1203-1207.
- Hannonen, P., Jänne, J. und Raina, A. 1972.** Partial Purification and Characterization of Spermine Synthase from Rat Brain. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1972, 289, S. 225-231.
- Hanzawa, Yoshie, et al. 2000.** ACAULIS5, an *Arabidopsis* gene required for stem elongation, encodes a spermine synthase. *The EMBO Journal*. 2000, 19 No. 16, S. 4248-4256.
- Hanzawa, Yoshie, et al. 2002.** Characterization of the spermidine synthase-related gene family in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*. 2002, 527, S. 179-180.
- Harlan, J. R. 1995.** Barley *Hordeum vulgare*, (Gramineae-Triticinae). [Buchverf.] J. Smartt und N.W. Simmonds. *Evolution of Crop Plants*. Harlow, UK. : Longman Scientific and Technical, 1995, S. 140-147.

- Hashimoto, Takashi, et al. 1998.** Molecular Cloning of Plant Spermidine Synthases. *Plant Cell Physiology*. 1998, 39(1), S. 73-79.
- Hellens, Roger P., et al. 2000.** pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology*. 2000, 42, S. 819-832.
- Hiatt, Andrew C., McIndoo, Jean und Malmberg, Russell L. 1986.** Regulation of Polyamine Biosynthesis in Tobacco. *The Journal of Biological Chemistry*. 1986, Vol. 261, No. 3, S. 1393-1296.
- Hibasami, Hiroshige, et al. 1980.** Studies of Inhibition of Rat Spermidine Synthase and Spermine Synthase. *Biochemical Journal*. 1980, 187, S. 419-428.
- Higo, Kenichi, et al. 1999.** Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Research*. 1999, Vol. 27, No. 1, S. 297-300.
- Hu, Wen-Wei, Gong, Haibiao und Pua, Eng Chong. 2005.** The Pivotal Roles of the Plant S-Adenosylmethionine Decarboxylase 5' Untranslated Leader Sequence in Regulation of Gene Expression at the Transcriptional and Posttranscriptional Levels. *Plant Physiology*. 2005, Vol. 138, S. 276-286.
- Ikeguchi, Yoshihiko, Bewley, Maria C. und Pegg, Anthony E. 2006.** Aminopropyltransferases: Function, Structure and Genetics. *Journal of Biochemistry*. 2006, 139, S. 1-9.
- Imai, Akihiro, et al. 2004 b.** Spermidine Synthase Genes Are Essential for Survival of Arabidopsis. *Plant Physiology*. 2004 b, Vol. 135, S. 1565-1573.
- Imai, Akihiro, et al. 2004 a.** Spermine is not essential for survival of Arabidopsis. *FEBS Letters*. 2004 a, 556, S. 148-152.
- Imamura, Tomohiro, et al. 2015.** Characterization of spermidine synthase and spermine synthase - The polyamine-synthetic enzymes that induce early flowering in *Gentiana triflora*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015, 463, S. 781-786.
- International Rice Genome Sequencing Project. 2005.** The map-based sequence of the rice genome. *Nature*. 2005, 436, S. 793-800.
- Invitrogen. 2004.** Methods 5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends. *5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends*. 2004.
- Invitrogen, life Technologies. 2010.** *SuperScript™ Reverse Transkriptase*. Carlsbad, California : life Technologies, 2010.
- Kajander, E. Olavi, et al. 1989.** Purification and partial characterization of human polyamine synthases. *Biochemical Journal*. 1989, 259, S. 879-886.
- Takehi, Jun-Ichi, et al. 2010.** Norspermine substitutes for thermospermine in the control of stem elongation in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*. 2010, 584, S. 3042-3046.
- Takehi, Jun-ichi, et al. 2008.** Thermosperimine is Required for Stem Elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*. 2008, 49(9), S. 1342-1349.

- Kawaura, Kanako, et al. 2009.** Assessment of adaptive evolution between wheat and rice as deduced from full-length common wheat cDNA sequence data and expression patterns. *BMC Genomics*. 2009, 10:271.
- Kikuchi, Shoshi , et al. 2003.** Collection, Mapping, and Annotation of Over 28,000 cDNA Clones from japonica Rice. *Science*. 5631, 2003, 301, S. 376-379.
- Kitashiba, Hiroyasu, et al. 2005.** Two types of spermine synthase gene: MdACL5 and MdSPMS are differentially involved in apple fruit development and cell growth. *Gene*. 2005, 361, S. 101-111.
- Knott, Jürgen M., Römer, Piero und Sumper, Manfred. 2007.** Putative spermine synthases from *Thalassiosira pseudonana* and *Arabidopsis thaliana* synthesize thermospermine rather than spermine. *FEBS Letters*. 2007, 581, S. 3081-3086.
- Knott, Jürgen Manfred. 2009.** Biosynthesis of long-chain polyamines by crenarchaeal polyamine synthases from *Hyperthermus butylicus* and *Pyrobaculum aerophilum*. *FEBS Letters*. 2009, 583, S. 3519-3524.
- Korolev, Sergey, et al. 2002.** The crystal structure of spermidine synthase with a multisubstrate adduct inhibitor. *nature structural biology*. 2002, volume 9 number 1, S. 27-31.
- Kusano, T., et al. 2008.** Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*. 2008, 228, S. 367-381.
- Kusano, Tomonobu, et al. 2007 a.** Advances in polyamine research in 2007. *Journal of Plant Research*. 2007 a, 120, S. 345-350.
- . **2007 b.** The Polyamine Spermine Rescues *Arabidopsis* from Salinity and Drought Stresses. *Plant Signaling & Behaviour*. 2007 b, 2:4, S. 251-252.
- KWS LOCHOW GmbH. 2016.** Anbauhinweise Lomerit. [Online] März 2016. [Zitat vom: 12. April 2016.] <http://www.kws.de/aw/KWS/germany/Produkte/Getreide/Anbauhinweise/~hcaf/LOMERIT/>.
- . **2016.** Sortenblatt LOMERIT. *LOMERIT Wintergerste*. [Online] Februar 2016. [Zitat vom: 11. April 2016.] <http://www.kws.de/go/id/cej/>.
- KWS Suisse SA. 2016.** Stark durch Gerste. [Online] KWS LOCHOW GmbH, April 2016. [Zitat vom: 12. April 2016.] <http://www.kws-swiss.ch/aw/KWS/schweiz/Produkte/Getreide/Wintergerste/~fsxo/Stark-durch-Gerste/>.
- Laemmli, U. K. 1970.** Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature*. 227, 1970, S. 680-685.
- Lescot, Magali, et al. 2002.** PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research*. 2002, 30(1), S. 325-327.
- Lorkovic, Zdravko J., et al. 2000.** Pre-mRNA splicing in higher plants. *trends in plant science*. 2000, Vol. 5. No. 4, S. 160-167.
- Lu, Chen, et al. 2012.** Miniature Inverted-Repeat Transposable Elements (MITEs) Have Been Accumulated through Amplification Bursts and Play Important Roles in Gene

Expression and Species Diversity in *Oryza sativa*. *Molecular Biology Evolution*. 2012, 29(3), S. 1005-1017.

Lyons, Maura, et al. 2008. Isolation, analysis and marker utility of novel miniature inverted repeat transposable elements from the barley genome. *Mol Genet Genomics*. 2008, 280, S. 275-285.

Macherey & Nagel. 2013. NucleoBond(R) Xtra - Isolierung von Plasmid DNA, Isolierung von high-copy Plasmiden (Midi, Maxi). [Buchverf.] Macherey & Nagel. *Plasmid DNA purification*. s.l. : Macherey & Nagel, 2013.

MacLean, Helen E., et al. 2008. Impaired skeletal muscle development and function in male, but not female, genomic androgen receptor knockout mice. *The FASEB Journal*. 2008, 22, S. 2676-2689.

Marais, Gabriel, et al. 2005. Intron Size and Exon Evolution in *Drosophila*. *Genetics*. 2005, 170, S. 481-485.

Marcé, M., et al. 1995. Rapid high-performance liquid chromatographic method for the quantitation of polyamines as their dansyl derivatives: application to plant and animal tissues. *Journal of Chromatography B Biomedical Applications*. 1995, 666, S. 329-335.

Matsumoto, Takashi, et al. 2011. Comprehensive Sequence Analysis of 24,783 Barley Full-Length cDNAs Derived from 12 Clone Libraries. *Plant Physiology*. 2011, 156, S. 20-28.

Minguet, Eugenio G., et al. 2008. Evolutionary Diversification in Polyamine Biosynthesis. *Molecular Biology and Evolution*. 2008, 25(10), S. 2119-2128.

Naka, Yukie, et al. 2010. Quantitative analysis of plant polyamines including thermospermine during growth and salinity stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2010, 48, S. 527-533.

Nei, M. und Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York : Oxford University Press, 2000.

New England Biolabs. 2016. 2-Log DNA Ladder (0,1-10,0 kb). [Online] 1. September 2016. [Zitat vom: 1. September 2016.] <https://www.neb.com/products/n3200-2-log-dna-ladder-01-100-kb#pd-protocols>.

—. 2015. NEB 10-beta Electrocompetent *E. coli*. [Buchverf.] New England Biolabs. 2015.

New England Biolabs. 2015. New England Biolabs - CutSmart(R). [Online] New England Biolabs, 07 2015. [Zitat vom: 20. Juni 2016.] <https://www.neb.com/products/restriction-endonucleases/hf-nicking-master-mix-time-saver-other/restriction-endonucleases/cutsmart#FAQ>.

—. 2016. Protocol for blunting ends by 3' overhang removal and fill-in of 3' recessed (5' overhang) ends using DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment (M0210). [Online] 18. August 2016. [Zitat vom: August. 08 2016.] <https://www.neb.com/protocols/2014/01/13/protocol-for-blunting-ends-by-3-overhang-removal-and-fill-in-of-3-recessed-5-overhang-ends-using>.

- . 2016. Protocol for Dephosphorylation of 5'-ends of DNA using CIP (M0290) . [Online] 19. August 2016. [Zitat vom: 19. August 2016.] <https://www.neb.com/protocols/1/01/01/protocol-for-dephosphorylating-with-cip>.
- Ohnuma, Mio, et al. 2011.** Crysal Structures and Enzymatic Properties of a Triamine/Agmatine Aminopropyltransferase from *Thermus thermophilus*. *Journal of Molecular Biology*. 2011, 408, S. 971-986.
- Pajula, Raija-Leena. 1983.** Kinetic properties of spermine synthase from bovine brain. *Biochemical Journal*. 1983, 215, S. 669-676.
- Pajula, Raija-Leena und Raina, Aarne. 1979 a.** Methylthioadenosine, a Potent Inhibitor of Spermine Synthase from Bovine Brain. *FEBS Letters*. 1979 a, Vol. 99 Nr. 2, S. 343-345.
- Pajula, Raija-Leena, Raina, Aarne und Eloranta, Terho. 1979 b.** Polyamine Synthesis in Mamalian Tissues Isolation and Charactization of Spermine Synthase from Bovine Brain. *European Journal of Biochemistry*. 1979 b, 101, S. 619-626.
- Pajula, Raija-Leena, Raina, Aarne und Kekoni, J. 1978.** Purification of Spermine Synthase from Bovine Brain by Spermine-Sepharose Affinity Chromatography. *Febs Letters*. 1978, Vol. 90, Nr. 1, S. 153-156.
- Panicot, Mireia, et al. 2002.** A polyamine Metabolon Involving Aminopropyl Transferase Complexes in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 2002, Vol. 14, S. 2539-2551.
- Pegg, Anthony E. und Michael, Anthony J. 2010.** Spermine synthase. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2010, 67, S. 113-121.
- Pegg, Anthony, Shuttleworth, Kay und Hibasami, Hiroshige. 1981.** Specificity of mammalian spermidine synthase and spermine synthase. *Biochemical Journal*. 1981, 197, S. 315-320.
- Placzek, Sandra, et al. 2017.** BRENDA in 2017: new perspectives and new tools in BRENDA. *Nuclei Acids Research*. 2017, Vol. 45, S. D380-D388.
- Prestridge, D. S. 1991.** SIGNAL SCAN: A computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements. *Compu Appl Biosci*. 7. 1991, 7(2), S. 203-206.
- Promega. 2012.** Cloning Protocols and Applications Guide. [Online] Januar 2012. [Zitat vom: 26. April 2016.] <http://www.promega.de/~media/files/resources/paguide/a4/chap13a4.pdf?la=de-de>.
- . 2009. pGEM-T Easy Vector Systems. 2009.
- . 2009. PureYield Plasmid Miniprep System Technical Bulletin. 2009.
- . 2013. T4 Dna Ligase Blue White Cloning Qualified Protocol. 2013.
- . 2010. WIZARD SV Gel and PCR Clean-Up System. 2010.
- QIAGEN. 2008.** MinElute PCR Purification Kit Protocol. *MinElute(R) Handbook*. s.l. : QIAGEN, 2008.
- . 2010. *Omniscript® Reverse Transcription Handbook*. s.l. : QIAGEN, 2010.
- . 2015. Protocol: Purification of Total DNA from Plant Tissue (Maxi Protocol). *DNeasy(R) Plant Handbook*. s.l. : QIAGEN, 2015.

- . **2010.** Protocol: Purification of Total RNA from Plant Cells and Tissues and Filamentous Fungi. [Buchverf.] Qiagen. *RNeasy® Mini Handbook*. 4. s.l. : QIAGEN, 2010.
- . **2001.** QIAexpress® Data Sheet. *Genotype analysis of E. coli strains SG13009 and M15*. [Online] September 2001. [Zitat vom: 25. April 2016.] <https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=abc8b958-d415-4b91-88a1-e5f90d0a1884&lang=en>.
- . **2012.** QIAprep Miniprep Kit. *Qiaprep Miniprep Handbook*. 2012.
- . **2015.** QIAquick Gel Extraction Kit. *QIAquick Spin Handbook*. 2015.
- . **2015.** QIAquick PCR Purification Kit. *QIAquick Spin Handbook*. 2015.
- . **2003.** The QIAexpressionist - (EN). [Online] Juni 2003. [Zitat vom: 26. April 2016.] <https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=79ca2f7d-42fe-4d62-8676-4cfa948c9435&lang=en>.
- Raina, Aarne, Pajula, Raija-Leena und Eloranta, Terho. 1983.** Purification of Spermidine Aminopropyltransferase (Spermine Synthase) from Bovine Brain. *Methods in Enzymology*. 1983, Vol. 94, S. 276-279.
- Reinbothe, Christiane, et al. 1992.** Differential gene expression during somatic embryogenesis in *Digitalis lanata* analyzed by in vivo and in vitro protein synthesis. *The Plant Journal*. 1992, 2(6), S. 917-926.
- Rodríguez-Kessler, Margarita, et al. 2006.** Effect of Salt Stress on the Regulation of Maize (*Zea mays* L.) Genes Involved in Polyamine Biosynthesis. *Plant Growth Regulation*. 2006, 48, Issue 2, S. 175-185.
- Rodríguez-Kessler, Margarita, et al. 2010.** Genomic organization of plant aminopropyl transferases. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2010, 48, S. 574-590.
- SAATBAU LINZ eGen. 2016.** Sortenberatung Wintergerste Laverda. [Online] April 2016. [Zitat vom: 11. April 2016.] <http://www.saatbau.com/at/saatgut/wintergetreide/wintergerste/wintergerste-mehrzeilig/laverda>.
- SAATEN-UNION GmbH. 2015.** Sorteninformation Sommerbraugerste Britney. [Online] 19. November 2015. [Zitat vom: 11. April 2016.] <http://www.saaten-union.de/index.cfm/nav/445.html>.
- . **2015.** Sorteninformation Sommerbraugerste Marthe. [Online] 19. November 2015. [Zitat vom: 11. April 2016.] <http://www.saaten-union.de/index.cfm/action/varieties/cul/3/v/147.html>.
- . **2015.** Sorteninformation Sommerbraugerste Salome. [Online] 19. November 2015. [Zitat vom: 11. April 2016.] <http://www.saaten-union.de/index.cfm/action/varieties/cul/3/v/143.html>.
- . **2015.** Sorteninformation Winterfuttergerste Souleyka. [Online] 19. November 2015. [Zitat vom: 11. April 2016.] <http://www.saaten-union.de/index.cfm/action/varieties/cul/4/v/98.html>.

- Sagor, G. H. M., et al. 2011.** Spatio-temporal expression analysis of Arabidopsis thaliana spermine synthase gene promoter. *Plant Biotechnology*. 2011, 28, S. 407-411.
- Saitou, N. und Nei, M. 1987.** The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 1987, 4, S. 406-425.
- Sato, Kazuhiro. 2007.** *Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone: FLbaf92k17, mRNA sequence*. [Fasta-Dokument] 2007.
- Sato, Kazuhiro, et al. 2009.** Development of 5006 Full-Length CDNAs in Barley: A Tool for Accessing Cereal Genomics Resources. *DNA Research*. 2009, 16, S. 81-89.
- Sato, Shusei, et al. 2000.** Structural Analysis of Arabidopsis thaliana Chromosome 5. X. Sequence Features of the Regions of 3,076,755 bp Covered by Sixty PI and TAC Clones. *DNA Research*. 2000, 7, S. 31-63.
- Shirahata, Akira, et al. 1991.** Putrescine or Spermidine Binding Site of Aminopropyltransferases and Competitive Inhibitors. *Biochemical Pharmacology*. 1991, Vol. 41, No. 2, S. 205-212.
- Simpson, G. G. und Filipowicz, W. 1996.** Splicing of precursors to mRNA in higher plants: mechanism, regulation and sub-nuclear organisation of the splicosomal machinery. *Plant Molecular Biology*. 1996, 32, S. 1-41.
- Smith, Mary A. und Davies, Peter J. 1985.** Separation and Quantitation of Polyamines in Plant Tissue by High Performance Liquid Chromatography of Their Dansyl Derivatives. *Plant Physiology*. 1985, 78, S. 89-91.
- Stenzel, Olaf, Teuber, Michael und Dräger, Birgit. 2006.** Putrescine N-methyltransferase in Solanum tuberosum L., a calystegine-forming plant. *Planta* 223. 2006, S. 200-212.
- Stratagene. 2004.** XL1-Blue Competent Cells. [Online] 2004. [Zitat vom: 25. April 2016.] <http://www.chem-agilent.com/pdf/strata/200249.pdf>.
- . **2015.** XL2-Blue' MRF Ultracompetent Cells. *Competent Cells for Genomic DNA or Methylated cDNA - Details & Specifications*. [Online] 27. Oktober 2015. [Zitat vom: 26. April 2016.] <http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?crumbAction=push&pageId=636>.
- Syngenta Agro GmbH. 2015.** Quench Sortenprofil. [Online] April 2015. [Zitat vom: 11. April 2016.] <http://www3.syngenta.com/country/de/de/Produkte/Seiten/Quench.aspx>.
- Takahashi, Taku und Kakehi, Jun-Ichi. 2009.** Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth an stress responses. *Annals of Botany*. 2009, 105, 2010, S. 1-6.
- Takahashi, Yoshihiro, et al. 2003.** Spermine signalling in tobacco: activation of mitogen-activated protein kinases by spermine is mediated through mitochondrial dysfunction. *Plant Journal*. 2003, 36 (6), S. 820-829.
- Takano, Ayaka, Kakehi, Jun-Ichi und Takahashi, Taku. 2012.** Thermospermine is Not a Minor Polyamine in the Plant Kingdom. *Plant & Cell Physiology*. 2012, 53(4), S. 606-616.
- Talamè, Valentina, et al. 2007.** Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatment: a comparative analysis. *Journal od Experimental Botany*. 2007, Vol. 58, No.2, S. 229-240.

- Talley, Kemper und Alexov, Emil. 2010.** On the pH-optimum of activity and stability of proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* . 2010, 78(12), S. 2699-2706.
- Tamura, K., et al. 2011.** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 2011, 28(10), S. 2731-2739.
- Tanaka, Tsuyoshi, et al. 2013.** bex-db: Bioinformatics workbench for comprehensive analysis of barley-expressed genes. *Breeding Sciences*. 2013, 63, S. 430-434.
- Teuber, Michael, et al. 2007.** Putrescine N-methyltransferases - a structure-function analysis. *Plant Molecular Biology*. 2007, 63, S. 787-801.
- The UniProt Consortium. 2012.** Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Research*. 2012, 40, D71-D75.
- Theologis, Athasios, et al. 2000.** letters to nature Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 2000, 408, S. 816-820.
- Thermo Fisher Scientific. 2013.** Thermo Fisher TA Cloning Kit. [Online] 5. Juni 2013. [Zitat vom: 26. April 2016.] <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K200001>.
- Thermo Fisher Scientific. 2013.** One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli. [Online] 6. Dezember 2013. [Zitat vom: 25. April 2016.] <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C404010>.
- Thermo Scientific. 2012.** GeneRuler(TM) DNA Ladder Mix. [Buchverf.] Thermo Scientific. *Product Information*. s.l. : Thermo Scientific, 2012.
- . **2014.** Thermo Scientific Gene JET Plasmid Miniprep Kit. [Buchverf.] Thermo Scientific. 2014.
- . **2015.** Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit. [Buchverf.] Thermo Scientific. 2015.
- . **2013.** Thermo Scientific Phusion High-Fidelity DNA Polymerase. [Buchverf.] Thermo Scientific. *Product Information*. s.l. : Thermo Scientific, 2013.
- . **2012.** *Thermo Scientific RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit*. s.l. : Thermo Fisher Scientific Inc., 2012.
- Thermo Scientific. 2011.** Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X). [Buchverf.] Thermo Scientific. *Product Information*. s.l. : Thermo Scientific, 2011.
- United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service. 2017.** *Grain: World Market und Trade*. 2017.
- Urano, K., et al. 2003.** Characterization of *Arabidopsis* genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress response and developmental stages. *Plant, Cell and Environment*. 2003, 26, S. 1917-1926.
- Urano, Kaoru, et al. 2004.** *Arabidopsis* stress-inducible gene for arginine decarboxylase AtADC2 is required for accumulation of putrescine in salt tolerance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004, 313, S. 369-375.

- Urano, Kaoru, Hobo, Tokunori und Shinozaki, Kazuo. 2005.** Arabidopsis ADC genes involved in polyamine biosynthesis are essential for seed development. *Febs Letters*. 2005, 579, Issue 6, S. 1557-1564.
- Wahl, Markus C., Will, Cindy L. und Lührmann, Reinhard. 2009.** The Splicosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. *Cell*. 2009, 136, S. 701-718.
- Witte, Claus-Peter, et al. 2001.** Terminal-repeat retrotransposons in miniature are involved in restructuring plant genomes. *PNAS*. 2001, Vol.98, No. 24, S. 13778-13783.
- Wu, Hong, et al. 2008.** Crystal Structure of Human Spermine Synthase. *Journal of Biological Chemistry*. 2008, Vol. 283, No. 23, S. 16135-16146.
- Wu, Hong, et al. 2007.** Structure and Mechanism of Spermidine Synthase. *Biochemistry*. 2007, 46, S. 8331-8339.
- Wu, Xiaojing, Zeng, Fanrong und Zhang, Guoping. 2017.** PEG-simulated drought stress and spike in vitro culture are used to study the impact of water stress on barley malt quality. *Plant Growth Regulation*. 2017, Vol. 81, Issue 2, S. 243-252.
- Yamaguchi, Koji, et al. 2007.** A protective role for the polyamine spermine against drought stress in Arabidopsis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007, 352, S. 486-490.
- Yamaguchi, Koji, et al. 2006.** The polyamine spermine protects against high salt stress in Arabidopsis thaliana. *FEBS Letters*. 2006, 580, S. 6783-6788.
- Zappia, Vincenzo, et al. 1980.** Mechanism of Polyamine-transfer Reactions Kinetic and Inhibition Studies on Spermidine Synthase from Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry*. 1980, Vol. 225, No. 15, Issue of August 10, S. 7276-7280.
- Zohary, D. und Hopf, M. 2000.** The origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe and the Nile Valley. *Domestication of plants in the Old World*. New York : Oxford University Press Inc., 2000, S. 59-68.

8. Danksagung

Besonders möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Birgit Dräger für die Betreuung dieses Projektes und die Überlassung des Themas bedanken. Ich bedanke mich für ihre Anteilnahme am Fortschritt der Arbeit und ihre geduldige Diskussionsbereitschaft, gerade in der Zeit, in der mehr Rückschläge als Fortschritte auftraten. Ich danke Frau Prof. Dr. Dräger für das Hinterfragen meiner experimentellen Ideen und ihre Hilfe bei der Orientierung auf neuen Wegen. Die fachliche und persönliche Unterstützung während der gesamten Zeit in ihrer Arbeitsgruppe empfand ich immer als sehr hilfreich.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Edgar Peiter. Als Betreuer des zweiten Teils dieses Promotionsprojektes war er immer fachlicher Ansprechpartner und ermöglichte mir die kontinuierliche Zusammenarbeit mit seiner Arbeitsgruppe im Rahmen des IZN. Ich bedanke mich für seine vielen zielführenden Anregungen, die Diskussionsbereitschaft und die Betreuung.

Ich möchte mich besonders bei Frau Dr. Juliane Mittasch und Herrn Dr. Carsten Milkowski bedanken, die mir besonders bei der genetischen Charakterisierung der Sperminsynthesen mit vielen guten Ratschlägen betreuend zur Seite standen. Ich bedanke mich für ihre Geduld, die fachliche und persönliche Unterstützung und die intensiven Diskussionen, die mich insbesondere bei Detailproblemen dazu anregten, nichts als gegeben hinzunehmen, sondern alles zu hinterfragen.

Ich möchte mich bei Frau Dr. Yvonne Sichhart und Frau Dr. Elke Blum bedanken, die mich besonders in der ersten Zeit meiner Promotion betreuten und für mich immer vertrauensvolle Ansprechpartner waren. Ich bedanke mich für ihre fachliche und persönliche Unterstützung.

Frau Nancy Nowak aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Edgar Peiter gilt ein besonderer Dank für die konstruktive Zusammenarbeit im Rahmen des IZN-Forschungsprojektes TP07 und die Kooperation im Rahmen des IZN.

Ich möchte besonders Herrn Ricardo Happek für die Kooperation im Rahmen des IZN danken. Er ermöglichte mir die Klonierungsarbeiten zur Untersuchung der Promotoraktivität der Sperminsynthese-Gene in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Edgar Peiter.

Bei Herrn Stefan Ehnert, Frau Sandra Morgenroth und der Arbeitsgruppe von Herr Prof. Dr. Klaus Humbeck möchte ich mich besonders bedanken. Sie ermöglichten mir die kontinuierliche Nutzung ihrer Klimakammern im Rahmen des IZN und waren für mich stets Ansprechpartner bei der Durchführung der Trockenstress-Experimente.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. Claudia Schaff für die kontinuierliche Zusammenarbeit, ihre Diskussionsbereitschaft und ihre Ratschläge für die qRT-PCR-Messungen.

Mein Dank geht an alle Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des pharmazeutischen Instituts der Arbeitsgruppen von Frau Prof. Dr. Birgit Dräger, Herrn Prof. Dr. Jörg Degenhardt und Herrn Dr. Carsten Milkowski am Hohen Weg für die kollegiale, freundliche und aufgeschlossene Zusammenarbeit. Ich bedanke mich hierbei besonders bei Herrn Dipl.-Pharm. Ralph Coppi,

Herrn Dr. Nebojša Jocković, Frau Dr. Nadine Küster, Frau M.Sc. Julia Manolow, Frau Dr. Bettina Rahfeld, Frau Dr. Nicole Reinhardt, Herrn Dr. Mathias Reisberg und Frau Dr. Sabrina Schläger (genannt in alphabetischer Reihenfolge).

Einen besonderen Dank möchte ich Frau Anja Wodak für die stetige und professionelle Unterstützung bei der experimentellen Laborarbeit aussprechen.

Ich bedanke mich besonders bei Herrn Dr. Christian Albrecht, Herrn Dr. Marcus Buchheim, Frau Dr. Jana Rödiger und Herrn Dr. Marc Rüger für die vielen fachlichen Ratschläge und die stetige Diskussionsbereitschaft.

Ich bedanke mich beim Interdisziplinären Zentrum für Nutzpflanzenforschung für die Finanzierung und bei dessen Mitgliedern für die interessanten Diskussionen in den IZN-Meetings, die mir stets neue Ideen für weitere Experimente aufzeigten.

Abschließend bedanke ich mich bei meiner Frau Julia Pietack, meinen Kindern, meinen Eltern und Schwiegereltern, meiner Familie und meinen Freunden für die ständige Unterstützung und Motivation, ihre unendliche Geduld und ihr immenses Verständnis, besonders in der Schlussphase der Promotion.

9. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Es wurden keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Dabei wurden inhaltlich oder wörtlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht. Die Dissertation wurde bis zum heutigen Datum keiner anderen Universität oder Hochschule vorgelegt.

Lutherstadt Wittenberg,

Sebastian Pietack

10. Lebenslauf Dipl.-Pharm. Sebastian Pietack

21. Juli 1983 Geboren in Frankfurt (Oder)
- 1990 – 1996 4. Grundschule „Geschwister Scholl“, Frankfurt (Oder)
- 1996 – 2003 Carl- Friedrich- Gauß- Gymnasium, Frankfurt (Oder), Abschluss mit Abitur
- 2003 – 2004 Wehrdienst, Freiwillig-Länger-Dienstleistender, Nienburg/Weser, Neubrandenburg
- 2004 – 2008 Studium der Pharmazie, Institut für Pharmazie, Naturwissenschaftliche Fakultät I, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)
- 2006 – 2008 Mitglied Fachschaftsrat Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)
- 2008 – 2009 Praktisches Jahr:
Diplomand, Abteilung Molekulare Zellbiologie, Institut für Pharmazie, Naturwissenschaftliche Fakultät I, Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg, Halle (Saale);
Pharmaziepraktikum Reil-Apotheke, Halle (Saale)
- 27.11.2009 Approbation als Apotheker, Halle (Saale)
- 2009 – 2015 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Abteilung Biogene Arzneistoffe, Institut für Pharmazie, Naturwissenschaftliche Fakultät I, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)
- 29.03.2012 Diplom-Pharmazeut, „Die Expression der Alkaloid-Biosynthese in Keimwurzeln von *Eschscholzia californica*“, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)
- 2012 – 2013 Mitglied Ausschuss für Öffentlichkeitsarbeit, Apothekerkammer Sachsen-Anhalt
- 2014 – 2015 Leitungsvertretender Apotheker, Riebeck-Apotheke Halle (Saale)
- 2015 – 2017 angestellter Apotheker, Leiter der Qualitätskontrolle, Stufenplan- und Informationsbeauftragter, stellv. Leitung myCARE Homeservice GmbH Abteilung Verblisterung, Robert-Koch-Apotheke, Lutherstadt Wittenberg
- Seit 06.2017 angestellter Apotheker, Leitung Abteilung Krankenhausversorgung Robert-Koch-Apotheke, Lutherstadt Wittenberg; Leiter der Qualitätskontrolle, Stufenplan- und Informationsbeauftragter, stellv. Leitung myCARE Homeservice GmbH Abteilung Verblisterung