

Hydroxyzimtsäureamide in Zellkulturen von Kartoffel:
Isolierung und Charakterisierung eines THT cDNA-Klons
aus *Solanum tuberosum*



Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Axel Schmidt

geb. am 27.02.1969 in Dresden

Gutachter:

1. Prof. Dr. D. Strack
2. Prof. Dr. C. Wasternack
3. Prof. Dr. U. Matern

Halle (Saale), den 24.11.1999

Teilergebnisse dieser Arbeiten wurden aus Gründen der Priorität vorab veröffentlicht:

Publikationen

Schmidt, A., Grimm, R., Schmidt, J., Scheel, D., Strack, D. and S. Rosahl (1999) Cloning and Expression of a Potato cDNA Encoding Hydroxycinnamoyl-CoA:Tyramine *N*-(Hydroxycinnamoyl)transferase, *J. Biol. Chem.* **274**, 4273-4280

Schmidt, A., Scheel, D. and Strack, D. (1998) Elicitor-stimulated biosynthesis of hydroxycinnamoyltyramines in cell suspension cultures of *Solanum tuberosum*, *Planta* **205**, 51-55

Beiträge zu wissenschaftlichen Tagungen: Vorträge

Schmidt, A., Scheel, D., Rosahl D. and Strack, S.: Cloning and Characterization of Hydroxycinnamoyl-CoA:Tyramin *N*-Hydroxycinnamoyltransferase,
2. Kurt-Mothes-Doktoranden-Workshop Sekundärstoffwechsel, IPB, Halle /S, 05.-07.10.1998

Beiträge zu wissenschaftlichen Tagungen: Poster

Schmidt, A., Hohlfeld, H., Keller, H., Scheel, D. and Strack, D.: Accumulation of soluble and cell wall-bound phenolics and changes in the activities of enzymes involved in phenylpropanoid pathways in elicitor-treated potato cells.
Symposium of Phytochemical Society of Europa, Halle, 26.-28.09.1996

Schmidt, A., Schmidt, J., Scheel, D., Rosahl, S. and Strack, D.: *Phytophthora infestans*-stimulated biosynthesis of hydroxycinnamic acid amides in *Solanum tuberosum* and cloning of a cDNA encoding hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine hydroxycinnamoyl-transferase (THT), Ferulate '98, Norwich, GB, 08.-11.07.1998

Schmidt, A., Schmidt, J., Scheel, D., Rosahl, S. and Strack, D.: *Phytophthora infestans*-stimulated biosynthesis of hydroxycinnamic acid amides in *Solanum tuberosum* and cloning of a cDNA encoding hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine hydroxycinnamoyl-transferase (THT), 12. Tagung „Molekularbiologie der Pflanzen“, Dabringhausen, 04.-06.03.1999

Schmidt, A., Schmidt, J., Göbel, C., Scheel, D., Rosahl, S. und Strack, D.: Elicitor-stimulated biosynthesis of hydroxycinnamic acid amides in potato and induced expression of THT, 34th annual conference of Phytochemical Society of North America, Montreal, Can, 10.-13.07.1999

Abkürzungsverzeichnis

2,4-D	2,4-Dichlor-phenoxyessigsäure
ABS	(+)-cis,trans Abscisinsäure
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Arachidonsäure
ATP	Adenosintri-phosphat
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine serum albumine)
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure
cDNA	copy DNA
CoA	Coenzym A
Da	Dalton
dCTP	Desoxycytidintri-phosphat
dGTP	Desoxyguanosintri-phosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtri-phosphat
DTT	Dithiotreitol
dTTP	Desoxythymidintri-phosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)-N,N',N'-tetraessigsäure
FG	Frischgewicht
HEPES	N-3-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
His	Histidin
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (High performance liquid chromatography)
HSA	Humanserumalbumin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K	Kontrollen
kat	Katal (Enzymaktivität mol/s)
K _{av}	Verteilungskoeffizient
kb	Kilobasen
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
KPi	Kaliumphosphat-Puffer
L	Linné
LB	Luria Bertani Medium
MES	2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure
MJ	± Methyljasmonat
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
NADP	Nikotinsäureamidadenosindinukleotidphosphat
NZY	Phagenpuffer
OD	optische Dichte
<i>P.i.</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
<i>P.infestans</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
PAL	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PDA	Photodiodenarray
PEG	Polyethylenglycol
pI	Isoelektrischer Punkt
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
<i>Psm</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon

RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions Polymerase-Kettenreaktion
<i>S.tuberosum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
Sacc	Saccharose-Lösung
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SM	Phagenpuffer
SS	Salicylsäure
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
SSPE	Natriumchlorid-Natriumdihydrogenphosphat-EDTA-Puffer
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA-Elektrophoresepuffer
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Elektrophoresepuffer
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
THT	Hydroxycinnamoyl-CoA:Tyramin <i>N</i> -Hydroxycinnamoyltransferase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TWEEN	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
TyrDC	Tyrosin-Decarboxylase
ün	über Nacht
UV	ultraviolett
v.u.Z.	vor unserer Zeit
V_0	Ausschlussvolumen
V_e	Elutionsvolumen
V_t	Gesamtvolumen
v/v	Volumen/Volumen
w/w	Gewicht/Volumen
X-GAL	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Grundlagen pflanzlicher Pathogenerkennung und –abwehr.....	5
1.2 Modifikationen der pflanzlichen Zellwand nach Pathogenbefall.....	8
1.3 Biosynthese der Hydroxyzimtsäureamide.....	10
1.4 Ziel der Arbeit.....	12
2. Material und Methoden.....	13
2.1 Versuchsmaterial.....	13
2.1.1 Zellkultur.....	13
2.1.2 Pflanzenmaterial.....	13
2.1.3 Bakterienanzucht.....	15
2.2 Extraktion phenolischer Verbindungen.....	15
2.2.1 Extraktion löslicher phenolischer Inhaltsstoffe.....	15
2.2.2 Extraktion zellwandgebundener phenolischer Inhaltsstoffe.....	16
2.3 Identifizierung niedermolekularer Verbindungen.....	16
2.3.1 Analyse phenolischer Verbindungen mit Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC).....	16
2.3.2 Analyse phenolischer Verbindungen mit Elektrospray Massenspektrometrie (ES).....	17
2.3.3 Detektion von <i>E</i> -Zimtsäure mit UV-Spektroskopie.....	18
2.4 Mikrobiotest zur Bestimmung des fungalen Wachstumseinflusses von elicitiertem Zellwandmaterial und Hydroxyzimtsäureamid.....	18
2.5 Bestimmung der Enzymaktivitäten.....	18
2.5.1 Herstellung des Proteinrohextraktes.....	18
2.5.2 Aktivitätsbestimmung der THT (E.C. 2.3.1.110).....	18
2.5.3 Aktivitätsbestimmung der TyrDC (E. C. 4.1.1.25).....	19
2.5.4 Aktivitätsbestimmung der PAL (E.C. 4.3.1.5.).....	20
2.6 Isolierung von Nukleinsäuren.....	20
2.6.1 RNA-Isolierung aus Zellkulturen.....	20
2.6.2 RNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial.....	21
2.6.3 Poly (A) ⁺ RNA-Isolierung.....	21
2.6.4 Isolierung genomischer DNA.....	22
2.6.5 Plasmid-DNA Isolierung.....	22
2.6.6 Isolierung <i>Eco</i> RI geschnittener Bakteriophagen-DNA.....	23
2.7 Agarose-Gelelektrophoresen.....	23
2.7.1 RNA-Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese.....	23
2.7.2 DNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	24
2.8 Amplifikation von DNA mittels PCR.....	24
2.8.1 Amplifikation von DNA mittels RT-PCR.....	24
2.8.2 Amplifikation von Bakteriophagen-DNA-Insertionen.....	25
2.9 Elution von DNA-Fragmenten.....	26
2.10 Markierung von DNA-Fragmenten.....	26
2.11 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen.....	26
2.12 Übertragung von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen.....	26
2.12.1 RNA-Transfer.....	26
2.12.2 DNA-Transfer.....	26
2.12.3 Bakteriophagen-DNA-Transfer.....	27
2.13 Radioaktiver Nachweis.....	27
2.14 cDNA-Synthese/Klonierung.....	27
2.14.1 Auffinden und Anreicherung spezifischer Klone.....	29
2.14.2 Ligation und Transformation von cDNA-Fragmenten.....	29
2.15 Screening einer genomischen Bank.....	29
2.16 Klonierung.....	30
2.16.1 Klonierung von PCR-Fragmenten.....	30
2.16.2 Expressionsklonierung.....	30

2.17 Sequenzierung.....	30
2.17.1 Sequenzierreaktion.....	30
2.17.2 Sequenziergel.....	30
2.17.3 Automatisierte Sequenzierung.....	31
2.18 Proteinnachweismethoden.....	31
2.18.1 Gelfiltration.....	31
2.18.2 Diskontinuierliche Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE).....	31
2.18.3 Coomassie-Färbung.....	32
2.18.4 Proteinbestimmung nach Bradford (1976).....	32
2.18.5 Reinigung rekombinanter Proteine.....	32
2.18.6 Nachweis von Proteinen mit Antikörpern (Western Blot).....	33
2.19 Transformation transgener THT-sense Pflanzen.....	33
2.20 Datenbanksuche und Verarbeitung von Sequenzdaten.....	34
2.21 Anmerkungen	34
3 Ergebnisse.....	35
3.1 Akkumulation phenolischer Verbindungen.....	35
3.2 Identifikation der Verbindungen.....	38
3.3 Mikrobiotest-Analyse.....	40
3.4 Aktivierung von Enzymen des Phenylpropanstoffwechsels.....	41
3.5 Erhalt einer THT-homologen Sonde.....	43
3.6 Herstellung und Screening einer cDNA-Bank.....	44
3.7 Expression in <i>Escherichia coli</i>	47
3.8 Charakterisierung der rekombinanten THT.....	49
3.9 Akkumulation der THT-Transkripte nach Elicitierung.....	51
3.10 Akkumulationskinetik der PAL-Transkripte nach Elicitierung.....	52
3.11 Expression in Pflanzen.....	53
3.12 Genomischer Southern-Blot.....	58
3.13 Screening einer genomischen Bank.....	58
3.14 Analyse transgener THT-sense Pflanzen.....	59
3.15 THT-Transkriptakkumulation in Tomate.....	61
3.16 Patentanmeldung.....	62
4 Diskussion.....	63
4.1 Akkumulation phenolischer Verbindungen.....	63
4.1.1 Lösliche Phenole.....	63
4.1.2 Zellwandgebundene Phenole.....	64
4.1.3 Phenolakkumulation im Anzuchtmedium.....	67
4.2 Induktion von Enzymaktivitäten.....	67
4.3 Untersuchungen zum rekombinanten Protein.....	68
4.4 Molekulare Untersuchungen zur THT	71
4.5 Zukünftige Arbeiten.....	75
5 Zusammenfassung.....	77
6 Literatur.....	78

1 Einleitung

Landwirtschaftliche Produktion dient dem Menschen seit Jahrhunderten zur Sicherung seiner Nahrungsgrundlage. Die Kartoffel, *Solanum tuberosum* L., nimmt aufgrund des hohen Kohlenhydratanteils sowie des ausgewogenen Vitamin-, Mineralien-, Aminosäure- und Spurenelementverhältnisses der Knolle neben dem Getreide eine herausragende Position ein. Außerdem stellt sich der landwirtschaftliche Anbau durch die verhältnismäßig anspruchslosen Wachstumsbedingungen relativ einfach dar. Die guten Lagermöglichkeiten, die Geschmacksneutralität sowie die vielseitigen Verwendungsmöglichkeiten tragen zu dem im Vergleich zu anderen Nutzpflanzen außerordentlich hohen Nutzen der Kartoffelpflanze bei (Körber-Grohne, 1988).

Diese Eigenschaften waren ausschlaggebend dafür, dass die im peruanischen Hochland erstmalig ab 750 v.u.Z. nachgewiesene und in den südamerikanischen Anden beheimatete Pflanze zwischen 1540 und 1565 nach Spanien sowie England eingeführt wurde. Die verschiedenen Sorten wurden darauf in mehreren europäischen Gebieten angebaut; der Durchbruch zum Hauptnahrungsmittel für weite Teile der Bevölkerung gelang aber erst ab dem Jahre 1770 in Preußen auf Erlass Friedrich II. In den folgenden Jahrzehnten setzte sich die Kartoffel in ganz Europa durch. Allein in Preußen stieg zum Beispiel der Kartoffelanbau von 5.200 t im Jahre 1765 auf 103.000 t im Jahre 1801 (Meyer, 1890).

Der extensiv betriebene Anbau produktiver Nutzpflanzen hatte allerdings auch zur Folge, dass Pflanzenkrankheiten wie Rost, Brand und Mehltau auftraten. Deren Symptome wurden z.B. durch Theophrast (371 bis 287 v.u.Z.) in seiner Schrift über die "Krankheitsmerkmale an zur Ernährung dienenden Pflanzen" beschrieben. Auch später im römischen Reich leistete man dem "Rostgott" Robigo Abgaben, um sich seiner Gnade zum Erhalt der Ernten zu versichern (Jackson & Taylor, 1996).

In diesem Zusammenhang müssen vor allem die ersten schweren Kartoffelseuchen erwähnt werden. So verursachte die Kraut- und Knollenfäule in den Jahren 1844/46 in Europa eine flächendeckende Missernte mit einer fast völligen Vernichtung der gesamten Kartoffelbestände. Eine daraus sich entwickelnde Hungersnot forderte zahlreiche Opfer und führte zu mehreren großen Auswanderungswellen, vor allem nach Amerika. Im einseitig Kartoffelanbau betreibenden Irland fiel in dieser Zeit allein etwa $\frac{1}{4}$ der gesamten Bevölkerung von 8 Millionen der Hungersnot zum Opfer oder wurde zum Verlassen des Landes gezwungen (Erwin & Ribeyro, 1996). In Deutschland bedingte die selbe Krankheit, die auch als "Braunfäule" bezeichnet wird, im Jahre 1917/18 den so genannten "Steckrübenwinter".

Die 1843 auch auf dem amerikanischen Kontinent erstmalig auftretende Kraut- und Knollenfäule (Peterson et al.1992) wird durch den Befall der Kartoffelpflanze mit dem Pilz *Phytophthora infestans* (*P. infestans*) verursacht und wurde zuerst 1842 von Martius be-

schrieben. Die Namensgebung des Pilzes stammte aus der griechischen Sprache (*phyto* – Pflanze, *phthora* – Zerstörer) und wurde von Anton de Bary geprägt. Diesem gelang 1876, die Biologie des Erregers zu klären und mit seiner Schrift: “Die gegenwärtig herrschende Kartoffelkrankheit, ihre Ursache und Verhütung” den Grundstein für heutige Kenntnisse und Forschungsarbeiten über diesen Pilz zu legen (Erwin & Ribeyro, 1996; Abad & Abad, 1997).

Die Kraut- und Knollenfäule ist auch heute noch in allen Kartoffel anbauenden Ländern zu finden (Spielmann et al., 1991). So wurden z.B. Teile Nordamerikas von 1992 bis 1995 durch Fungizid-resistente *P. infestans*-Genotypen epidemisch befallen, was erhebliche Ernteeinbußen nach sich zog (Fry & Goodwin, 1997). Allein in den Jahren 1994 und 1995 ergaben sich dadurch Verluste von mehr als 230 Millionen US-Dollar (Goodwin et al., 1998). Aber auch in Europa, wie z.B. 1980 und 1994-1996 in den Niederlanden, mussten durch das Auftreten der Krankheit Ernteverluste registriert werden (Zwankhuizen et al., 1998).

Die ursprüngliche Herkunft des Erregers kann mit großer Wahrscheinlichkeit auf das Hochland Mexikos beschränkt werden (Robertson, 1991). Andererseits existiert die Meinung, dass der Ursprungsort sich in den Anden Südamerikas befand (Abad & Abad, 1997). Ausgehend von diesen möglichen Regionen könnte die Übertragung des Pilzes nach Europa und Nordamerika um 1840, also unmittelbar vor den erwähnten großflächigen Epidemien, stattgefunden haben.

Hohe Vermehrungsraten sind Eigenschaften, die *P. infestans* zu epidemischen Auftreten in höchstem Grade befähigen. Bei günstigen äußeren Umweltbedingungen ist innerhalb einer Woche die Entstehung von zwei Generationen des Pilzes möglich, was zum Auslösen einer Epidemie führen kann (Schöber, 1981). Bei einer Infektion gelangt das in den infizierten Kartoffelknollen überwinternde vegetative Myzel während des Auskeimens des Saatgutes in die sich entwickelnden Blätter, es entstehen Pilzhyphen, an deren Enden außerhalb des Blattes Sporenträger (Sporangien) gebildet werden. Diese dienen als Verbreitungsorgane. Die Sporangien können über Regentropfen bzw. Wind bis zu 11 km verbreitet werden (van der Zaag, 1956) und keimen in Abhängigkeit von Luftfeuchtigkeit und Temperatur direkt oder mittels Zoosporen bei 24 bzw. 12 °C. Im Anschluss daran dringen Zoosporen mittels Keimhyphen durch Epidermis oder Stomata ins Wirtsgewebe der Kartoffelpflanze ein, und es kommt zur Bildung von Haustorien. Die Infektion kann schnell die gesamten Blätter erfassen. Die infizierten Bereiche nekrotisieren nachfolgend, was oft zum Absterben der gesamten Pflanze führt. Äußerlich erkennbare Symptome wie gelblich-grüne ölige Flecken auf den untersten Blättern, deren Zentrum sich bei feuchtwarmer Witterung rasch braun verfärbt, sind drei bis fünf Tage nach Erstbefall zu erkennen. Nachfolgend vergrößern sich diese Flecken und fließen zusammen. Auf der Blattunterseite kann zusätzlich in der hellgrünen Übergangszone zum gesunden Gewebe ein grau-weißer Myzelflaum sichtbar werden (Rohde, 1998).

Zur Verdeutlichung dieses Phänomens ist in Abbildung 1.1 ein infiziertes Kartoffelblatt dargestellt.



Abbildung 1.1: *Phytophthora infestans* infiziertes Kartoffelblatt (Quelle: Universität Idaho)

Aber auch die Knollen der Kartoffelpflanze können durch in den Boden gelangte Sporangien des Pilzes infiziert werden (Abbildung 1.2). Der Befall ist durch unregelmäßige Flecken von braungrauer Farbe erkennbar. Das darunter liegende Gewebe ist oft bis in das Knollenninnere braun und trockenfaulig. Diese Knollen stellen während der Lagerung Infektionsherde für gesunde Knollen dar und bilden somit die Ursache für die Vermehrung des Pilzes in Lagerbeständen (Schöber, 1981).

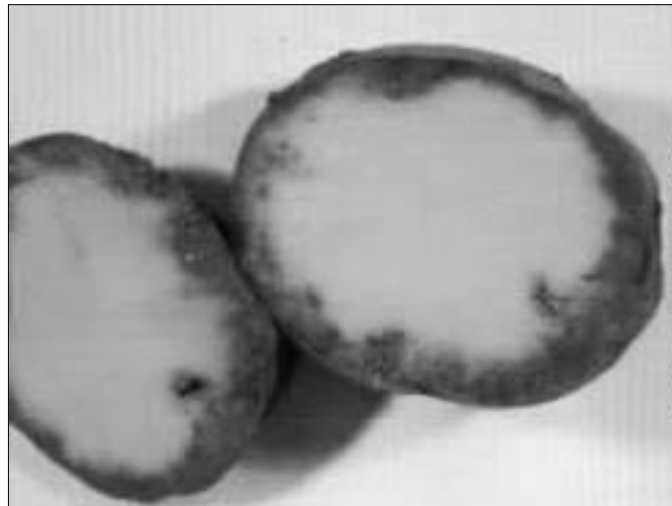


Abbildung 1.2: *Phytophthora infestans* infizierte Kartoffelknolle (Quelle: Universität Idaho)

Da *P. infestans* zu den heterothallischen Pilzen gehört, muss neben der erwähnten und zumeist vorkommenden ungeschlechtlichen Vermehrung auch die geschlechtliche erwähnt werden. Die Kreuzungstypen werden in diesem Fall als A1- und A2-Typ beschrieben. Jeder Kompatibilitätstyp ist dabei selbst inkompatibel und bisexuell, so dass in einer Kreuzung so-

wohl männliche als auch weibliche Gametangien (Antheridien oder Oogonien) gebildet werden können. Während der A1-Typus bisher auf der gesamten Welt beobachtet wurde, war der A2-Typ bis etwa 1980 fast ausschließlich in Zentral-Mexiko existent (Fry & Goodwin, 1997). Erst später wurde dieser Typus auch in Europa nachgewiesen (Hohl & Inselin, 1984; Cooke, 1995). Aufgrund dieser Ungleichverteilung ist die Bedeutung dieser Vermehrungsform für die weltweite Ausbreitung der Kraut- und Knollenfäule noch nicht endgültig geklärt (Fry et al., 1993; Erwin & Ribeyro, 1996).

Die Epidemien Mitte des 19. Jahrhunderts bedingten etwa ab 1890 allerdings auch Bestrebungen, durch klassische Züchtung resistenter Pflanzensorten die Krankheit wirksam einzuschränken. Züchtungserfolge, die zu wirkungsvollen Resistenzen führen könnten, sind allerdings nicht über mehrere Jahre stabil, um eine spätere erneute Ausbreitung der Krankheit auszuschließen (Erwin & Ribeyro, 1996).

Auch aus diesem Grund stehen seit Beginn dieses Jahrhunderts die Wechselwirkungen zwischen dem Erreger *P. infestans* und der Kartoffelpflanze in zunehmendem Maße im Mittelpunkt der phytopathologischen Forschung. Ein Beispiel hierfür sind die Untersuchungen über rassenspezifische Interaktionen zwischen verschiedenen Kartoffelkultivaren und Pilzrassen, die zum Aufstellen der Phytoalexinhypothese führten (Müller & Börger, 1940). Das Forschungsgebiet besitzt aber auch jetzt noch hohe Relevanz. Ursachen sind neben dem zu erwartenden weiteren Erkenntnisgewinn über die molekularen Grundlagen der Pathogenese auch die zunehmende Resistenz des Pilzes gegenüber Pflanzenschutzmitteln. Durch den Einsatz von Fungiziden können Pflanzenkrankheiten zwar zurückgedrängt werden, Pathogene bilden aber aufgrund ihrer genetischen Variabilität Resistenzen gegenüber diesen chemischen Substanzen aus. Die Pilzrassen US-7 und US-8 in Nordamerika sind z.B. nicht mehr suszeptibel gegenüber dem weltweit am häufigsten verwendeten Fungizid Metalaxyl und wurden so Auslöser der letztjährigen Epidemien (Fry et al. 1993; Fry & Goodwin, 1997). In weiteren Studien wird versucht eine weltweit einheitliche Quantifizierung der *P. infestans*-ausgelösten pflanzlichen Abwehrreaktionen durch Markergene bzw. Markerenzyme zu ermöglichen sowie eine Datenbank der erhaltenen Ergebnisse aufzustellen (Kamoun et al., 1998; Forbes et al., 1998).

Nach heutigem Erkenntnisstand kann nur durch den Anbau resistenter Kartoffelsorten eine wesentliche und dauerhafte Eindämmung der Kraut- und Knollenfäule gewährleistet werden.

1.1 Grundlagen pflanzlicher Pathogenerkennung und -abwehr

Um die Einordnung des in der vorliegenden Arbeit bearbeiteten Themas in den Komplex der Interaktion von Pflanzen und phytopathogenen Pilzen zu ermöglichen, erscheint es not-

wendig, die wichtigsten Grundstrukturen der Pflanze-Pathogen-Interaktionen kurz zu charakterisieren. Zu diesem Forschungsgebiet erschienen mehrere Bücher bzw. Übersichtsartikel (Kombrink & Somssich, 1995; Dixon et al., 1996a; 1996b; Prell, 1996; Ebel & Mithöfer, 1998; Hutcheson, 1998; Somssich & Hahlbrock, 1998; Scheel, 1999).

Unter natürlichen Bedingungen kann die Pflanze von der Mehrzahl der bekannten physiologischen Rassen eines phytopathogenen Mikroorganismus nicht befallen werden, da sie für diesen keinen Wirt darstellt. Diese Resistenz ist genetisch determiniert und wird als Nichtwirtsresistenz oder Basisresistenz bezeichnet. Nur wenige Pathogene sind in der Lage, diese Basisresistenz zu durchbrechen und die Pflanze zu infizieren. Hierbei unterscheidet man zwei Fälle. Wird eine suszeptible Pflanze von einem virulenten Pathogen infiziert, bezeichnet man diese Interaktion als kompatibel. Die Pflanze ist ein potentieller Wirt für das Pathogen. In den Fällen, in denen Kultivare der Pflanzenspezies jedoch gegenüber einigen bestimmten Rassen eines Phytopathogens resistent sind, spricht man von Wirtsresistenz. Diese Interaktion zwischen einem avirulenten Pathogen mit einer resistenten Pflanzensorte wird als inkompatibel beschrieben. Zusätzlich kann in letztem Fall eine Einteilung in rassenspezifische und nichtrassenspezifische Resistenz vorgenommen werden (Prell, 1996).

Die Wirtsresistenz einer Pflanze gegenüber bestimmten Rassen eines Pathogens kann durch die "Gen-für-Gen-Hypothese" erklärt werden. Nach diesem Modell findet man im Fall einer inkompatiblen Interaktion für jedes pflanzliche Resistenzgen ein komplementäres Avirulenzgen auf Pathogenseite (Flor, 1956; de Wit, 1992). Das in dieser Arbeit untersuchte Pathosystem *S. tuberosum*/*P. infestans* ist der rassenspezifischen Resistenz zuzuordnen (Bailey, 1983; Freytag et al., 1994).

Die Pflanze besitzt mehrere Möglichkeiten auf Pathogenbefall zu reagieren. Die Abwehrmechanismen können in konstitutive, d.h. unabhängig vom Befall vorhandene, und induzierbare unterteilt werden. Konstitutiv vorhandene strukturelle Barrieren, wie die pflanzliche Zellwand und die Cutikula, sollen im Gegensatz zur Charakterisierung der induzierten Abwehr zu einem späteren Zeitpunkt Gegenstand der Darstellung sein.

Voraussetzung für die induzierte Abwehr ist die Erkennung von Phytopathogenen durch pathogenspezifische, exogene oder zellwandspezifische, endogene Signalmoleküle. Diese werden als Elicitoren bezeichnet, wobei die Erkennung des Signals an der Zelloberfläche erfolgt (Hahlbrock & Scheel, 1987; Hammond-Kosack & Jones, 1997). Während als endogene Elicitoren die aus der Zellwand durch pilzliche lytische Enzyme herausgelösten Poly- und Oligosaccharide bekannt sind (Ryan & Farmer, 1991), kommen exogene Elicitoren in größerer struktureller Vielfalt vor. So wurden neben Oligosacchariden (Sharp et al., 1984) auch Glykoproteine (Parker et al., 1991), Proteine (Sholtens-Toma & de Wit, 1988) und Fettsäuren (Bostock et al., 1982) als Auslöser pflanzlicher Abwehrreaktionen identifiziert.

Die aufgeführte "Gen-für-Gen-Hypothese" wird durch ein biochemisches Modell, das Signal-Rezeptor-Modell, interpretiert. Dieses beinhaltet die Bindung und Erkennung eines phytopathogenen Signals, meist eines Elicitors, durch einen Rezeptor. Die Signale sind jeweils durch ein Avirulenzgen, die Rezeptoren durch das Resistenzgen kodiert (de Wit, 1995; Jones et al., 1994; Parker et al., 1997).

Die Erkennung der Elicitoren durch spezifische Rezeptoren bildet den ersten Schritt einer Signaltransduktionskette. Bisher konnten Bindungsstellen für Elicitoren nachgewiesen werden (z.B. Nürnberger et al., 1994), der generelle Wirkmechanismus der Pathogenerkennung bleibt trotzdem noch ungeklärt (Hammond-Kosack & Jones, 1996; Bonas & Van den Ackerveken, 1997). Die ersten detektierbaren Reaktionen der Signaltransduktion sind die Öffnung von spezifischen K^+ -, Cl^- -, Ca^{2+} - und H^+ -Kanälen innerhalb der Plasmamembran, die zu einem Einstrom von Ca^{2+} -Ionen und Protonen in das Cytoplasma sowie zu einem Ausstrom von K^+ -, Cl^- -Ionen aus diesem Kompartiment führen. Zusätzlich wird die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies beobachtet. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Superoxid-Anionen ($\bullet O_2^-$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Hydroxylradikale ($\bullet OH$) (Dangl et al., 1996; Low & Merida, 1996), die durch Aktivitätsänderungen einer ebenfalls membrangebundenen NAD(P)H-Oxidase bzw. einer apoplastisch lokalisierten Peroxidase (Kombrink & Sommsich, 1995; Wojtaszek, 1997; Bestwick et al., 1997) synthetisiert werden. Im Cytoplasma sind eine Vielzahl weiterer Reaktionen lokalisiert. Hauptsächlich wurden in Weiterführung der Signaltransduktionskette die Änderungen der Enzymaktivitäten der bereits erwähnten NAD(P)H-Oxidase sowie von verschiedenen Phospholipasen, Phosphatasen sowie Proteinkinasen beobachtet (Yang et al., 1997). Die Wirkungsweise der Phospholipase ist dabei eng mit einer Freisetzung von Linolensäure zu sehen, die eine Substanz der Jasmonat-Biosynthese darstellt. Ebenso wurde die Beteiligung von Ethylen oder Salicylsäure an der erwähnten Signalkette beschrieben (Kombrink & Somssich, 1997; Mueller, 1997; Yu et al., 1997). Der abschließende Schritt der Pathogenabwehrreaktion ist die Aktivierung der Abwehrgenexpression, die zu einer Aktivierung der Transkriptionsaktivatoren sowie zur Synthese zahlreicher Proteine mit antimikrobieller Funktion führt. Dazu gehören die Familie der *pathogenesis related*-Proteine, also unter anderem lytische Enzyme, wie Chitinasen und 1,3- β -Glucanasen, die mikrobielle und pilzliche Zellwände angreifen. Zusätzlich wurden Proteinase, Proteinase Inhibitoren, Peroxidasen, Thionine und Proteine mit noch unbekanntem Funktionen identifiziert (Kombrink & Somssich, 1997). In diesem Zusammenhang werden ebenso auch Phytoalexine als wachstumshemmende Substanzen gegenüber dem Pathogen gebildet. Diese 1940 von Müller und Böger am System *S. tuberosum/P. infestans* entdeckte und benannte Stoffgruppe sind Verbindungen, die unspezifisch das Wachstum von pathogenen und nicht-pathogenen Mikroorganismen inhibieren. Bisher konnten aus infizierten

Pflanzen mehr als 200 verschiedene Substanzen isoliert werden, die verschiedenen Stoffklassen, wie Phenolen, Tanninen, Flavonoiden, Terpenoiden oder cyanogenen Glycosiden, zugehören. Der zuerst beschriebene Vertreter war dabei das Sesquiterpen Rishitin, weitere bekannte Abkömmlinge sind das Pisatin, Glyceollin, Xanthotoxin oder Medicarpin (Kuc, 1995; Smith, 1996; Barz, 1997).

Neben den bisher genannten Abwehrmechanismen wird nach einer Infektion im Zusammenhang mit den oben genannten Mechanismen häufig eine lokale Reaktion, der so genannte hypersensitive Zelltod beobachtet. Das räumlich begrenzte Absterben von Pflanzenzellen um die Penetrationsstelle des infizierenden Pathogens bewirkt den Entzug der Lebensgrundlage des Pilzes und eine Inhibierung der Pathogenentwicklung. Ein kausaler Zusammenhang zwischen dem hypersensitiven Zelltod und der Induktion anderer Abwehrreaktionen konnte allerdings bisher nicht nachgewiesen werden (Dangl et al., 1996).

Diese Abwehrreaktionen bleiben nur dann für die Pflanze effizient, wenn sie früh genug aktiviert werden. In diesem Zusammenhang können allerdings auch Zellen der Pflanze sowohl durch wirtsunabhängige als auch durch streng wirtsspezifische Verbindungen des Pilzes geschädigt oder abgetötet werden. Diese Stoffe, zu denen neben Toxinen auch Enzyme und Supressoren gehören, haben zwei unterschiedliche Funktionen. Einerseits soll die Widerstandskraft der Pflanze beispielsweise zum Aufbau von Abwehrbarrieren geschwächt werden, andererseits wird ein Efflux von Ionen und anderen Zellinhaltsstoffen aus der Plasmamembran zur Nährstoffaufnahme durch das Pathogen erwirkt. Vertreter sind z.B. das Diterpenglucosid Fusicoccin sowie das cyclische Pentapeptid Victorin C (Kohmoto & Otani, 1991) aber auch pilzliche Cutinasen, Cellulasen, Pectinasen und Proteasen (Kombrink & Somssich, 1995).

Ein weiterer Teil der pflanzlichen Abwehrreaktion, der im Folgenden gesondert betrachtet werden soll, beinhaltet den Aufbau von strukturellen Wachstumsbarrieren gegenüber dem Pathogen. Diese meist lokal, also nur im infizierten Blatt wirkenden Prozesse basieren auf einer Aktivierung spezifischer Enzyme, deren Reaktionsprodukte zusätzlich in die Zellwand eingebaut werden und eine fungistatische Funktion bewirken (Matern et al., 1995). In diesem Zusammenhang kann die Synthese von phenolischen Verbindungen, von Lignin, Suberin, Cutin, Wachsen und Fetten beobachtet werden. Ebenso dienen Zellwandverstärkungen durch Auflagerung der gegenüber pilzlichen Hydrolasen resistenten Callose um den Infektionsherd (Kauss et al., 1989; Fric & Tamas, 1993), wie auch die Bildung von hydroxyprolinhaltigen Glycoproteinen und deren Einlagerung durch oxidatives Cross-linking (Bradley et al., 1992) der Wachstumsbehinderung des Pathogens innerhalb des befallenen Organs. Es wird angenommen, dass die Pflanze durch Zellwandverstärkungen an den Infektionsherden

der weiteren Penetration des Pilzes wirkungsvoll entgegenwirken kann (Vance et al., 1980; Piquemal et al., 1998).

1.2 Modifikationen der pflanzlichen Zellwand

Modifikationen der Zellwand können zu einer Resistenzerhöhung von Pflanzen führen (Young 1926). Einlagerungen von z.B. Lignin oder Suberin kommen dabei in einer ersten Ebene der Pathogenabwehr konstitutiv in der Pflanze vor und bewirken wahrscheinlich aufgrund ihrer fungistatischen Funktion einen ersten Schutz vor der Penetration des Pathogens (Schlösser, 1997). Gegenüber den pilzeigenen Exoenzymen Cutinase, Cellulase, Xylanase, Protease und Pektinase sowie der möglichen enzymatischen Depolymerisation des Suberins erweisen sie sich allerdings als unzureichend (Hahn et al., 1997). Für die Pflanze ist es demzufolge als Reaktion auf Pathogenbefall notwendig, in einer zweiten Ebene der pflanzlichen Abwehr auch auf induzierbare Mechanismen zurückzugreifen. Daher kann eine zusätzliche Verstärkung der Zellwand, z.B. durch weitere Lignifizierung beobachtet werden. Verschiedene Arbeitsgruppen schlussfolgerten daher, dass eine Durchdringung der Zellwand mit antifungalen Verbindungen zwar nur einen Teilaspekt der komplexen Abwehrreaktion darstellt, aber trotzdem einen wesentlichen Beitrag zu einer verstärkten Wirtsresistenz leisten kann (Ampomah & Friend, 1988; Heitefuss, 1997; Jung & Ni, 1998).

Die Bedeutung der Lignifizierung bildet auch den Gegenstand aktueller molekularbiologischer Forschung, wobei durch den Einsatz von *anti-sense* Konstrukten die Beteiligung verschiedener Enzyme, wie der Cinnamoyl-CoA Reduktase oder der Cinnamoyl Alkohol Dehydrogenase am Lignin-Biosyntheseweg und der Rolle bei Abwehrreaktionen aufgeklärt werden soll (Halpin et al., 1994; Piquemal et al., 1998; Ralph et al., 1997). Ebenso muss die Möglichkeit diskutiert werden, eventuelle Vorstufen des polymeren Lignins, wie Mono- bzw. Dimere könnten vorübergehend bis zur vollständigen Synthese die Funktion des Polymers erfüllen (Ralph et al., 1998). Außerdem existiert die Meinung, die Biosynthese wäre aufgrund der Komplexität des Lignins zu langsam um gegenüber dem Pathogenangriff mit rascher Haustorienbildung einen effizienten Schutz darzustellen (Ye & Varmer, 1993; Eberhard et al., 1993). Dies ließ letztendlich die Schlussfolgerung aufkommen, dass wahrscheinlich besonders in der frühen Infektionsphase der Veresterung von einfachen Phenolen und Phenylpropanen eine entscheidende Bedeutung zukommt. Diese Verbindungen könnten sich dann in späteren Stadien sukzessive zu polymerisierten Phenolen mit zunehmend ligninartiger Struktur weiterentwickeln (Matern et al., 1995).

Verschiedene weiterführende Übersichtsartikel beschäftigen sich mit der Lignin-Biosynthese und sollen darum kurz erwähnt werden (Douglas, 1996; Baucher et al., 1998; Bernards & Lewis, 1998).

Bereits 1979 wurde publiziert, dass wenige Stunden nach Infektionsbeginn die Enzymaktivitäten der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase sowie der 4-Cumarat:CoA Ligase ansteigen (Hahlbrock & Grisebach, 1979; Fritzemeyer et al., 1987). Diese sind Schlüsselenzyme des Phenylpropanstoffwechsels und katalysieren die Synthese von Hydroxyzimtsäuren als Lignin- und Suberinvorstufen. Bernards et al. stellte in diesem Zusammenhang 1995 erstmalig fest, dass diese Säuren für die Polymerisation des Suberins notwendig sind. Hydroxyzimtsäuren kommen sowohl als Mono- als auch als Dimere in der pflanzlichen Zellwand vor und können über die zugehörigen CoA-Ester zu Monolignolen reduziert, aber auch mit verschiedenen Zuckern und Proteinen verestert werden (Lewis & Yamamoto, 1990; Kroon & Williamson, 1999; Hatfield et al., 1999). Als solche übernehmen sie einzeln oder im Komplex wahrscheinlich eine Teilfunktion während der Pathogenabwehr (Clarke, 1982; Fauld & Williamson, 1999). Sie akkumulieren dabei gemeinsam mit anderen aus alkalischen Zellwandhydrolysaten isolierten Phenylpropanen, wie 4-Hydroxybenzaldehyd, Benzoesäure und Vanillin (Beimen et al., 1992; Campbell & Ellis, 1992). Die Fixierung der Hydroxyzimtsäuren in der pflanzlichen Zellwand erfolgt über Ester- und Ether-Bindungen zu Polysacchariden und Lignin (Iiyama et al., 1994; Lam et al., 1994; Ikegawa et al., 1996; Negrel et al., 1996; Baucher et al. 1998; Franke et al., 1998; Hatfield et al., 1999). Derivate der Hydroxyzimtsäuren kommen in einer Vielzahl in Pflanzen vor. So wurden neben den am häufigsten vorkommenden mono- und disubstituierten Zimtsäuren (Cumar- und Ferula- bzw. Kaffeesäure) vor allem deren Ester beschrieben. Als Konjugationspartner fungieren dabei aliphatische, alizyklische und aromatische Hydroxycarbonsäuren (z.B. *S,S*-Weinsäure und Äpfelsäure; Chlorogensäure und Chinasäure; 3,4-Dihydroxyphenylmilchsäure) sowie Zucker (Glucose). Zusätzlich wurden ebenso Glykosylierungsprodukte, wie das Linocaffein [4-*O*-(β -D-Glucopyranosyl)-Kaffeesäuremethylester] aus *Linum usitatissimum* beschrieben (Veit & Gumbinger, 1993; Murata et al., 1995; Hohlfeld et al., 1996b; Hatfield et al., 1999).

Neben diesen Derivaten wurden vor allem in *Solanaceen* auch Hydroxyzimtsäureamide gefunden (Martin-Tanguy et al., 1978). Als Aminteil konnten Tyramin, Octopamin, Putrescin und Spermidin detektiert werden. In diesem Zusammenhang ist die Synthese von 4-Cumaroyl- und Feruloyltyramin bzw. 4-Cumaroyl- und Feruloyloctopamin sowie Kaffeoyl- und p-Cumaroylputrescin und Kaffeoylspermidin beschrieben (Negrel & Jeandet, 1987; Leubner-Metzger & Amrhein, 1993; Negrel & Javelle, 1995; Keller et al., 1996; Mühlenbeck et al., 1996; Negrel et al., 1996; Facchini, 1998; Miyagawa et al., 1998; Pearce et al., 1998). Ebenso wurden diese Verbindungen in monokotylen Pflanzen wie z.B. Weizen (*Triticum*), Gerste (*Hordeum vulgare*) (Louis & Negrel, 1991) sowie Lauch (*Allium*) (Choi & Go, 1996; Nishioka et al., 1997) nachgewiesen. Neben diesen offenkettigen Aminen konnten auch makrozyklische Lactame (z.B. Mayfolin), Amide mit Heterozyklen (z.B. Feruloylpiperidin) sowie Hydroxyzimtsäureamide mit Aminosäuren und Proteinen gezeigt werden (Herrmann, 1978;

Veit & Gumbinger, 1993). Das der möglichen fungiziden Wirkungsweise zugrundeliegende Prinzip wurde bisher allerdings in keinem Fall eindeutig geklärt, einzig für Feruloyltyramin konnten bisher toxische Auswirkungen auf den Mykorrhizapilz *Glomus intraradices* nachgewiesen werden (Grandmaison et al., 1993).

1.3 Biosynthese der Hydroxyzimtsäureamide

Hydroxyzimtsäureamide kommen nahezu im gesamten Pflanzenreich vor und besitzen hauptsächlich eine Aufgabe bei der Pathogenabwehr (Clarke, 1982; Negrel et al., 1996). Daneben ist gezeigt worden, dass diese Substanzen in einer Vielzahl von Pflanzenfamilien während der Blüteninduktion, der Entwicklung der Fortpflanzungsorgane, sowie der Knollenbildung eine mögliche Funktion besitzen (Martin-Tanguy, 1985; Flores et al., 1989). So wurde das Vorkommen dieser Phenole in den reproduktiven Organen sowohl in den Blüten höherer Pflanzen (Martin-Tanguy et al., 1978; Ponchet et al., 1982, Leubner-Metzger & Amrhein, 1993) als auch im Pollen der Buche (*Fagus*) beschrieben (Meurer et al., 1988). Darüber hinaus akkumulieren Hydroxyzimtsäureamide als Reaktion auf verschiedene Stressoren, wie z. B. nach Verwundung (Negrel et al., 1993; Pearce et al., 1998), nach Behandlung mit lytischen Enzymen wie Pectinase, Pronase (Negrel & Javelle, 1995) oder Ozonbehandlung (Schraudner et al., 1993; Booker & Miller, 1998) vor allem in Zellwandfraktionen der untersuchten Pflanzen oder Zellkulturen (Keller et al., 1996; Beimen et al., 1992; Negrel et al., 1996; Pearce et al., 1998).

Hydroxyzimtsäureamide sind Kondensationsprodukte einer Hydroxyzimtsäure und eines Amins. Die Biosynthese erfolgt innerhalb des Phenylpropanstoffwechsels und geht von der Aminosäure Phenylalanin aus. Mit Hilfe der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) wird Phenylalanin zu Zimtsäure umgesetzt, die durch die Zimtsäure-4-Hydroxylase weiter zu 4-Cumarsäure reagieren kann. Die 4-Cumarat-3-Hydroxylase, Catechol-O-Methyltransferase und Ferulat-5-Hydroxylase katalysieren die Reaktionen zur Kaffeesäure, Ferulasäure oder Sinapinsäure. Die Hydroxyzimtsäure wird im Anschluss daran als Acylderivat in einer durch die 4-Cumarat-CoA-Ligase katalysierten Reaktion mit der Sulfhydrylgruppe des Cosubstrates Coenzym A in den Thioester umgewandelt und aktiviert. Im Falle der Hydroxyzimtsäureamide erfolgt die Übertragung des Acylrestes hauptsächlich auf Tyramin, welches aus Tyrosin durch die Aktivität der Tyrosin-Decarboxylase (TyrDC) gebildet wird. Tyrosin und Phenylalanin stammen aus dem Primärstoffwechsel der Pflanze und werden aus Produkten der Glycolyse und des Pentosephosphatweges synthetisiert. Die Synthese der Hydroxyzimtsäureamide erfolgt durch Katalyse der Hydroxycinnamoyl-CoA:Tyramin *N*-Hydroxycinnamoyltransferase (THT). Die in Abbildung 1.3 dargestellte Biosynthese von 4-Cumaroyltyramin steht stellvertretend für die vergleichbare Bildung von Feruloyltyramin, 4-Cumaroyl- und Fe-

ruloyloctopamin sowie den anderen möglichen Hydroxyzimtsäureamiden durch dieses Enzym.

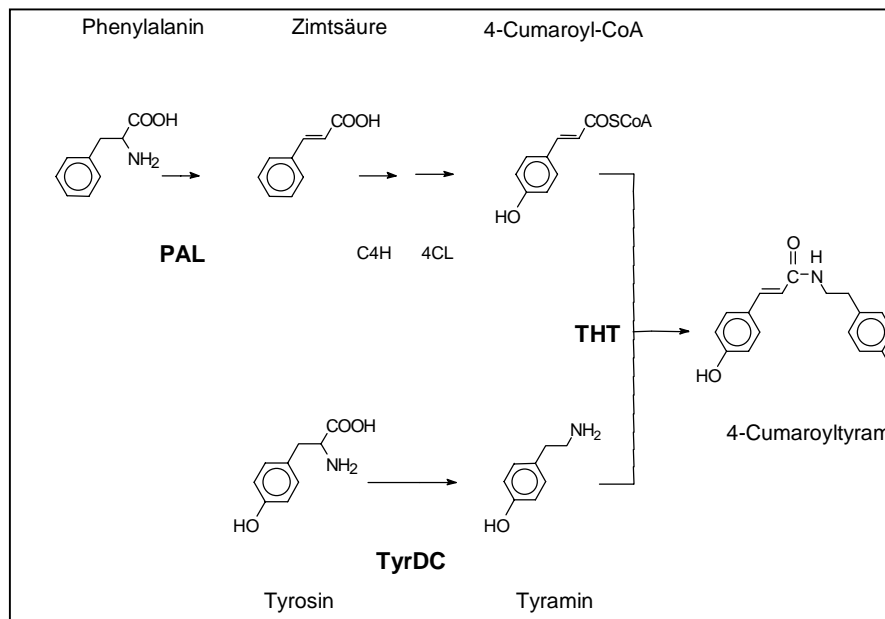


Abbildung 1.3: Reaktionschema zur Biosynthese von 4-Cumaroyltyramin:

An der Biosynthese vom Cumaroyl-CoA Ester sind die Enzyme PAL (Phenylalanin-Ammoniak-Lyase, C4H (Zimtsäure-4-Hydroxylase) und 4CL (4-Cumaroyl-CoA-Ligase), an der Biosynthese von Tyramin ist die TyrDC (Tyrosin-Decarboxylase) beteiligt. Beide Substrate werden in einer Kondensationsreaktion durch die THT (4-Hydroxycinnamoyl-CoA:Tyramin *N*-Hydroxycinnamoyltransferase; EC 2.3.1.110) zu 4-Cumaroyltyramin umgesetzt.

Die Biosynthese von Feruloyltyramin wurde erstmalig 1984 in TMV-inokulierten Blattextrakten aus Tabak (*Nicotiana tabacum*) (Negrel et al., 1984) beschrieben, die Charakterisierung und partielle Reinigung der THT gelangen Fleurence & Negrel 1989. Die Induktion der THT wurde ferner in verwundeten Knollen der Kartoffelpflanze ebenso wie nach Behandlung mit zellwandabbauenden Enzymen und Hormonen (Negrel et al., 1995, Negrel & Javelle, 1995) beschrieben. Zusätzlich wurde in Tabak ein Anstieg der Enzymaktivität nach Ozon-Exposition sowie nach Elicitierung gezeigt (Schraudner et al., 1993; Villegas & Brodelius, 1990). Die vollständige Reinigung und Charakterisierung der THT gelang erstmalig Hohlfeld et al. (1995, 1996a) aus Kartoffel-Zellkulturen sowie 1997 Negrel & Javelle aus Tabak-Zellkulturen. In diesem Zusammenhang wurden erstmalig Peptidsequenzen der THT publiziert. Die Detektion der THT-Enzymaktivität wurde weiterhin in Zellkulturen von Kappenmohn (*Eschscholtzia californica*) (Villegas & Brodelius, 1990), in Weizen- und Gerstenkeimlingen (Negrel et al., 1991) sowie in Zellkulturen aus Opium-Mohn beschrieben (Facchini, 1998).

Weitere, der THT vom Reaktionsmechanismus ähnliche Transferasen konnten mit der Putrescin-Hydroxycinnamoyltransferase aus Tabak-Zellkulturen (Negrel et al., 1992), der Hydroxycinnamoyl-CoA:Hydroxypalmitinsäure *O*-Hydroxycinnamoyltransferase aus Kartoffel (Lofty et al., 1994; 1995), der Spermin-Hydroxycinnamoyltransferase aus *Aphelandra* (Hedberg et al., 1996) sowie der Hydroxycinnamoyl-CoA:Hydroxyanthranilat *N*-Hydroxy-

cinnamoyltransferase aus Hafer (Ishihara et al., 1997; 1998) beschrieben werden. Ebenfalls wurden die Aktivitäten die Hydroxycinnamoyl-CoA:meso-Tartat-Hydroxycinnamoyltransferase, die Hydroxycinnamoyl-CoA:Kaffeoyl-meso-Tartrat-Hydroxycinnamoyltransferase sowie die Hydroxycinnamoyl-CoA: Shikimat-Hydroxycinnamoyltransferase aus Schachtelhalm gemessen (Hohlfeld et al., 1996b). Die erstmalige Sequenzierung einer Hydroxycinnamoyltransferase gelang Yang et al. (1997). Die Hydroxycinnamoyl/Benzoyl-CoA:Anthranilat *N*-Hydroxycinnamoyl/Benzoyltransferase aus Nelke besitzt hauptsächlich Benzoyl-CoA-Aktivität und ist in die Phytoalexin Biosynthese eingegliedert.

1.4 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit setzt sich zum Ziel, einen Beitrag zur Aufklärung der Regulation der Biosynthese von Hydroxyzimtsäuramiden in Pflanzen zu leisten. Die Untersuchungen sind eingegliedert in die physiologische, biochemische und molekularbiologische Analyse der Pathogen-induzierten Abwehrreaktion.

Die Biosynthese der Hydroxyzimtsäureamide steht im Mittelpunkt der Untersuchung. Sie führt damit Arbeiten fort, die am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln begonnen und vor allem von Dr. Hartwig Hohlfeld 1991–1995 am Institut für Pflanzenbiochemie in Halle/Saale durchgeführt wurden (Keller, 1990; Hohlfeld, 1998). Das Untersuchungsobjekt ist die Kartoffelpflanze (*S. tuberosum* L. cv. Desirée). An ihr werden Strukturveränderungen der Zellwand entweder am Modellsystem der elicitierbaren Zellkulturen oder durch direkte Sporeninokulation der Blätter von Kartoffelpflanzen hervorgerufen. Als Pathogen fungiert ein Kulturfiltrat (Elicitor) oder eine Sporensuspension aus *P. infestans*. Im Gegensatz zu den vorausgegangenen Untersuchungen mit der Zellkultur "Datura" wurde die Zellkultur der Sorte "Desirée" gewählt. Der Grund für den Wechsel waren geplante molekularbiologische Arbeiten, die an dieser Kartoffelsorte bereits etabliert waren. Dies betraf vor allem die Transformierbarkeit der Pflanze.

Das experimentelle Ziel der vorliegenden Arbeit beinhaltet zunächst die Detektion der akkumulierenden Hydroxyzimtsäureamide sowie die Messung der Enzymaktivität der THT, der PAL sowie der TyrDC. Auf diesen Versuchen aufbauend war geplant, eine cDNA der THT zu klonieren, zu sequenzieren und in *E. coli* zu exprimieren. Zusätzlich sollte das rekombinante Enzym näher charakterisiert und die Eigenschaften mit der gereinigten THT verglichen werden. Abschließend waren Versuche zur Induktion der Genexpression dieses Enzyms vorgesehen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsmaterial

2.1.1 Zellkultur

2.1.1.1 Anzucht und Kultivierung

Die Kultivierung der Zellsuspensionkultur von *S. tuberosum* L. cv Desirée erfolgte in 200 ml Erlenmeyerkolben mit je 50 ml Murashige-Skoog/Gamborg B5 Vitamin-Medium (pH 5,7) (DUCHEFA, Haarlem, Niederlande) unter Zusatz von 30 g/l Saccharose und 2 mg/l 2,4-D (SIGMA, Deisenhofen).

Nach 7 Tage wurden ca. 3,2 g Zellen, die zuvor in einem Sieb filtriert und anschließend verfeinert wurden, in frisches Medium überführt. Die Kulturen wurden bei einer Temperatur von 25°C im Dunklen auf einem Schüttler bei 120 Umdrehungen pro Minute gehalten.

2.1.1.2 Versuchsanzucht

Die Vermehrung der Zellkultur für Versuchszwecke erfolgte vergleichbar der standardmäßigen Anzucht. Nach Ablauf der Versuchszeit wurde der Inhalt des Kolbens über eine Porzellannutsche abgesaugt, zweimal mit Wasser gewaschen, anschließend in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.1.1.3 Elicitierung

Der sterile Kulturfiltrat-Elicitor wurde freundlicherweise von Prof. D. Scheel zur Verfügung gestellt worden. Für die Präparation wurde Pilzmycel von *P. infestans* (Rasse 4) für 5 Wochen in flüssigem Henninger Medium kultiviert (Henninger, 1959). Das Medium wurde durch Filtration vom Mycel getrennt, lyophilisiert, in wenig Wasser resuspendiert und 48 h gegen Wasser dialysiert. Das Filtrat wurde im Anschluss daran sterilfiltriert (0,2 µm Filter), der Kohlenhydratgehalt mittels Anthron-Methode (Dubois et al., 1959) bestimmt und der Rohelicitor portionsweise bei -80°C eingefroren.

Fünf Tage nach Überimpfung der Zellkultur in frisches Medium wurde zur Suspensionkultur der Elicitor pipettiert. Die Endkonzentration im Medium betrug 10 µg/ml Glucoseäquivalente.

2.1.2 Pflanzenmaterial

2.1.2.1 Anzucht von Kartoffelpflanzen (*S. tuberosum* L. cv. Desirée)

Die Kultivierung von Kartoffelpflanzen (*S. tuberosum* L. cv. Desirée) erfolgte im Gewächshaus oder der Phytokammer unter nahezu natürlichen Bedingungen. Dazu wurden Kartoffelknollen etwa 3 Monate bei 15°C gelagert, anschließend in Raumtemperatur überführt und nach einer Akklimatisierungszeit von 2 Tagen in ein Einheitserde ED 73/Sand-Gemisch (1:1) ausgelegt.

2.1.2.2 Versuchsdurchführung bei Kartoffelpflanzen

Nach einer Wachstumszeit von etwa 4-6 Wochen wurden die Kartoffelpflanzen für Versuchszwecke genutzt. Dazu wurden die benötigten Organe mit einem Skalpell abgetrennt, gewaschen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.1.2.3 Induktionsexperimente an Blättern der Kartoffelpflanze nach Hormonbehandlung

Drei in der Blattstellung vergleichbare Blätter wurden abgetrennt und in den angegebenen Lösungen bei Dauerlicht (weiß, 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) und 25°C gestellt. Synthetisches \pm Methyljasmonat (FIRMENICH; Genf, Schweiz), (+)-cis,trans-Abscisinsäure, Arachidonsäure sowie Salicylsäure (SIGMA; Deisenhofen) wurden in einer Konzentration von 10 und 100 μM eingesetzt. Als Kontrolle diente mit Wasser behandeltes bzw. frisch eingefrorenes identisches Pflanzenmaterial.

Zur Verwundung der Pflanzen wurde ein Blatt mit Hilfe einer Dialyseklammer quer zur Blattspreite gequetscht. Zusätzlich wurde die nicht von der Klammer bedeckte Blattoberfläche mit Hilfe einer Pinzette zerdrückt. Als Kontrolle dienten die Blätter einer unverletzten Pflanze.

Nach Ablauf der Versuchszeit wurden die Blätter, bei dem Verwundungsexperiment zusätzlich noch nicht verwundete Blätter, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.1.2.3.1 Induktionsexperimente an Knollen der Kartoffelpflanze nach *P. infestans*-Behandlung

Aus 1 cm dicken Scheiben äußerlich keimarmen Kartoffelknollen wurden mit einem Korkbohrer Fragmente (\varnothing 1 cm) herausgestanzt, in ein abgeschlossenes Glasgefäß mit Wasserreservoir gelegt und für 24 Stunden bei 15°C gelagert. Anschließend wurden die Scheiben mit 100 μl einer, vor dem Auftragen für 1 Stunde in Wasser inkubierten frisch gewonnenen Pilzsporenlösung (2×10^5 Sporen/ml) von *P. infestans* gleichmäßig bestrichen und bei 15°C gehalten. Im Kontrollexperiment wurde Wasser verwendet.

2.1.2.3.2 Induktionsexperimente an Blättern der Kartoffelpflanze nach *P. infestans*- bzw. *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (*Psm*) Behandlung

Kartoffelpflanzen wurden in einem mit Folie geschaffenen abgeschlossenen System bei einer Luftfeuchtigkeit von 100 %, einer Temperatur von 15°C und einem Licht-, Dunkelwechsel von 18 und 6 Stunden gehalten. Auf der Unterseite der Blätter wurden 20 Tropfen von je 20 μl einer *P. infestans*-Sporenlösung ($1,2 \times 10^5$ Sporen/ml) gleichmäßig verteilt, bzw. die Blätter mit einer *Psm*-Bakteriensuspension infiltriert. In Kontrollpflanzen wurde Wasser verwandt.

2.1.2.4 Anzucht von Tabak- (*Nicotiana tabacum*, Petit Havana SRI) und Tomatenpflanzen (*Lycopersicon esculentum* Mill. Moneymaker)

Die Anzucht der Tabak- und Tomatenpflanzen erfolgte standardmäßig im Gewächshaus oder der Phytokammer unter nahezu natürlichen Bedingungen. Nach einer Wachstumszeit von etwa 3 Wochen wurden die Pflanzen unter der im Punkt 2.1.1.1 beschriebenen Versuchsdurchführung weiter bearbeitet.

2.1.3 Bakterienanzucht

Zur Anzucht von *Escherichia coli*-Zellen (*E. coli*) XL1-Blue MRF' wurden 3 ml LB-Medium [mit 0,2 % Maltose (w/v) und 10 mM MgSO₄] mit einer Einzelkolonie, welche von einer LB-Tetracyclin-Agarplatte (12,5 µg/ml) isoliert wurde, inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Die Bakterien wurden für 10 min bei 500 x g zentrifugiert, im halben Volumen 10 mM MgSO₄ resuspendiert und auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt.

Die Anzucht von *E. coli*-Zellen DH5 α, K 802 und XL2-Blue erfolgte standardmäßig in einer Über-Nacht-Kultur aus Einzelkolonien.

Zur Anzucht von Expressionskulturen [M15 (pREP4) mit pQE 30-6xHis] wurden 20 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicilin, 25 µg/ml Kanamycin) mit einer Einzelkolonie oder 100 µl der Glycerinstammlöung inokuliert und über Nacht bei 37°C und 120 rpm inkubiert. Mit dieser Kultur wurde 1 Liter LB-Medium angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,9 wachsen gelassen. Darauf folgend wurde IPTG (Endkonzentration 2 mM) gegeben, die Kultur 5 Stunden bei 120 rpm und 37°C belassen sowie anschließend bei 4.000 x g für 10 min zentrifugiert und das Pellett bei -80°C gelagert.

2.1.4 Anzucht von Bakteriophagen

Für die Gewinnung von Bakteriophagen-DNA lysierte Bakterien (siehe 2.6.6) wurde ein positiver Einzelplaque (siehe 2.14.1) in 20 µl einer Übernachtskultur von *E. coli*-Stamm Y 1088 bzw. K 802 [LB mit 0,2 % Maltose (w/v), 10 mM MgSO₄] und 20 ml LB mit 10 mM MgSO₄ bei 37°C und 200 rpm über Nacht inkubiert.

2.2 Extraktion phenolischer Verbindungen

2.2.1 Extraktion löslicher phenolischer Inhaltsstoffe

Zur Extraktion der nach Elicitierung in Kartoffelzellkulturen gebildeten löslichen phenolischen Verbindungen wurden 2 g Zellfrischmasse mit 20 ml 80%igem wässrigem Methanol (v/v) versetzt und mit einem Ultra-Turrax (Jahnke und Kunkel, Staufen) homogenisiert. Anschließend wurde 30 min bei Raumtemperatur unter Rühren extrahiert, 30 min bei 51.250 x g zentrifugiert und die Überstände dekantiert. Die Extrakte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert oder direkt für die HPLC-Analyse eingesetzt. Als interner Standard wurde Zimtsäure verwandt.

2.2.2 Extraktion zellwandgebundener phenolischer Inhaltsstoffe

Die unlöslichen Rückstände der methanolischen Extraktion (siehe 2.2.1) wurden nacheinander mit Methanol, Wasser, Aceton und Diethylether ausgewaschen. Jeder Extraktionsschritt wurde unter Rühren für 30 min bei 4°C und anschließender Zentrifugation von 30 min bei 51.250 x g durchgeführt und dreimal wiederholt. Die Überstände wurden verworfen. Die Rückstände der Etherextraktion wurden über Nacht im Exsikkator mit Blaugel getrocknet und anschließend alkalisch hydrolysiert.

Die Hydrolyse erfolgte in Stickstoffatmosphäre und Lichtabschluss unter Rühren in 1 N NaOCH₃ für 120 min bei 80°C. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 2 N H₃PO₄ auf pH 2-3 angesäuert und abgestoppt.

Nach 60 min Rühren bei Raumtemperatur wurden die freigesetzten phenolischen Verbindungen durch dreimaliges Ausschütteln mit je 12 ml Diethylether extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, am Rotationsverdampfer (ROTAVAPOR und VACUUBRAND, Büchi und Wertheim, Schweiz) eingengt, in 500 µl Methanol (MERCK, Darmstadt) aufgenommen und zur HPLC-Analyse eingesetzt. Als interner Standard wurde Isovanillinsäure benutzt.

2.3 Identifizierung niedermolekularer Verbindungen

2.3.1 Analyse phenolischer Verbindungen mit Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC wurde analytisch für die Identifikation der löslichen- und Zellwand gebundenen phenolischen Verbindungen sowie für die Bestimmung der Enzymaktivität der THT und der TyrDC eingesetzt.

Das verwendete Gerät (MILLIPORE WATERS, Eschborn) setzt sich aus der Kontrolleinheit (Waters™ 600-MS System Controller), einem Photodioden-Array-Detektor (Waters™ 996 Photodiode Array Detector) und einem automatischen Probengeber (Waters™ Modell 717) zusammen. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der Software Millennium 2010 (MILLIPORE, Eschborn) auf einem angeschlossenen Rechner.

Die Flussrate betrug 1 ml/min, das Injektionsvolumen 20 µl. Zur Trennung wurden 5 µm-Nucleosil RP-18-Säulen (250 x 4 mm, MACHEREY-NAGEL, Düren) verwandt.

Die Identifizierung der einzelnen Verbindungen erfolgte mit Vergleichssubstanzen bzw. mit der von Dr. Hartwig Hohlfeld erstellten Datenbibliothek der HPLC-Software.

Folgendes lineares Gradientensystem wurde benutzt:

- zur Analyse der löslichen- und Zellwand-gebundenen Phenole sowie zur Bestimmung der Enzymaktivität der nativen THT:

Zeit (min)	Anteil A (%)	Anteil B (%)
0	100	0
20	65	35
30	30	70

- zur Analyse der Enzymaktivität der rekombinanten THT:

Zeit (min)	Anteil A (%)	Anteil B (%)
0	100	0
3,5	70	30
17	40	60

Als Laufmittel A wurde 1,5 % ortho-Phosphorsäure (v/v) (MERCK) in Wasser, als Laufmittel B Acetonitril (MERCK) benutzt. Die Detektion erfolgte im Bereich zwischen 260 und 340 nm.

Folgende isokratische Laufmittelverteilung wurde zur Bestimmung der Enzymaktivität der TyrDC verwendet:

Zeit (min)	Anteil A (%)	Anteil B (%)
0	100	0
30	100	0
31	0	100

Als Laufmittel A wurde 0,1 M Ammoniumacetat/Citrat (pH 6,5) benutzt, als Laufmittel B Acetonitril. Die Detektion erfolgte im Bereich von 260 bis 340 nm.

2.3.2 Analyse phenolischer Verbindungen mit Elektrospray Massenspektrometrie (ES)

Die Analyse mittels ES-MS wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung Naturstoffchemie des Instituts für Pflanzenbiochemie von Dr. Jürgen Schmidt durchgeführt. Die Spektren wurden von einem Massenspektrometer Finnigan MA TSQ 7000 aufgenommen, die Spannung betrug 4,5 kV und 3,5 kV (positive bzw. negative Ionen), die Kapillartemperatur 220°C, das Hüllgas war Stickstoff. Das Gerät war gekoppelt an ein "Micro-Tech Ultra-Plus Micro Flüssigchromatographie-System" mit RP 18-Säule (4 µm, 1 x 100 mm; SEPSERV).

Die Detektion erfolgte mittels HPLC und einem Gradienten mit 15 min von 20-90 % Acetonitril mit 0,2 % Essigsäure (v/v), auf 10 min 90% Acetonitril (v/v) mit 0,2 % Essigsäure (v/v). Die Flussrate betrug 70 µl/min. Die positiven ES Massenspektren wurden erhalten mit einer CID von 20 eV. Von allen Massenspektren wurden Durchschnittswerte berechnet und die Hintergrundsignale subtrahiert.

2.3.3 Detektion von *E*-Zimtsäure mit UV-Spektroskopie

Zur Aktivitätsbestimmung der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) wurde *E*-Zimtsäure, spektralphotometrisch bei 290 nm nachgewiesen. Dazu wurde die Absorption in einem temperierbaren Küvettenhalter bestimmt (Spektrophotometer DU 640; BECKMANN, Berlin).

2.4 Mikrobiotest zur Bestimmung des fungalen Wachstumseinflusses von eliciertem Zellwandmaterial und Hydroxyzimtsäureamiden

Kartoffel-Zellkulturen wurden wie unter den Punkten 2.1.1.2 und 2.1.1.3 beschrieben behandelt, unter flüssigem Stickstoff gemörsert, in unterschiedlichen Verhältnissen mit Kieselgel HF₂₅₄ (MERCK) gemischt, in Wasser aufgetaut, und auf einer definierten Fläche einer Dünnschichtchromatographie-Glasplatte aufgetragen, die anschließend getrocknet wurde. Die restliche Oberfläche der Platte war mit getrocknetem Kieselgel von einer Schichtdicke mit 0,5 mm bedeckt. Die gesamte Platte wurde anschließend mit 15 ml einer Pilzsporen enthaltenden Hefelösung von *Cladosporium cucumerinum* Ell. et Arth. ($2,5 \times 10^6$ Sporen/ml) besprüht und 48 Stunden bei 25°C im Dunklen inkubiert. Auf der Dünnschichtplatte hemmen Stellen mit fungistatisch wirksamen Substanzen das Wachstum des dunkelgrau gefärbten Myzels und sind als weiße Flecke deutlich erkennbar (Gottstein et. al., 1984).

Hydroxyzimtsäure-Amide wurden weiterhin in Konzentrationen von 100 nM direkt auf einer definierten Fläche des getrockneten Kieselgels aufgetragen. 100 µl wurden in gleicher Weise von dem in 2 ml Methanol eingeeengten, mit *P. infestans*-Elicitor behandelten Nähranzuchtmedium aufgegeben.

2.5 Bestimmung der Enzymaktivitäten

2.5.1 Herstellung eines Proteinrohextraktes aus kultivierten Kartoffelzellen

Der Proteinrohextrakt wurde durch Homogenisation von 2 g Zellmaterial unter Zugabe von 0,5 g Quarzsand und flüssigem Stickstoff im Porzellanmörser hergestellt. Nach Zuführung von 3 ml Extraktionspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 5 mM DTT) wurden die Proteine durch 60 minütiges Rühren bei 4°C extrahiert. Der Ansatz wurde anschließend 20 min bei 51.250 x g zentrifugiert, die Überstände über Sephadex-G25 (SIGMA) Säulen entsalzt und durch Miracloth (CALBIOCHEM, Bad Soden) filtriert. Die Proteinlösung wurde abschließend aliquotiert und bis zur Bestimmung der Enzymaktivitäten bei -20°C gelagert.

2.5.2 Aktivitätsbestimmung der THT (E.C. 2.3.1.110)

Der Aktivitätsnachweis des Enzyms THT wurde standardmäßig als Endpunktbestimmung über die Quantifizierung des Reaktionsproduktes Feruloyltyramin durch HPLC (siehe 2.3.1). Die Identifizierung erfolgte mit der Vergleichssubstanz bzw. der vorhandenen Datenbank der Software. Der Standard-Enzymassay setzte sich wie folgt zusammen:

Imidazol (pH 6,8)	1	M
Tyramin (in 1 M Imidazol, pH 6,8)	2	mM
Feruloyl-CoA	0,5	mM

Die Reaktion wurde durch Zugabe der Proteinlösung gestartet und nach 30 min Inkubation bei 30°C durch Zugabe von gleichem Volumen 10 %iger wässriger TCA-Lösung (v/v) und Einfrieren in flüssigem Stickstoff gestoppt.

2.5.2.1 Charakterisierung der rekombinaten THT

2.5.2.1.1 Enzymkinetische Studien

Für enzymkinetische Untersuchungen des rekombinaten Protein wurden 0,5 M KPi, pH 6,8 als Reaktionspuffer und Inkubationszeiten zwischen 5 sek und 30 min verwendet (vgl. 2.5.2). Die Berechnung der THT-Aktivität erfolgte in diesen Fällen über das jeweilige Reaktionsprodukt.

Für die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter über Michaelis-Menten-Kinetik, Lineweaver-Burk-Blot und Hanes-Diagramm stand das Programm "EKI" (VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1994) zur Verfügung (Lineweaver & Burk, 1934; Hanes, 1932).

2.5.2.1.2 Abhängigkeit von Ca^{2+} Ionenzusätzen

Die Abhängigkeit der THT-Aktivität von Ca^{2+} wurde durch Ionenzusätze getestet. Eingesetzt wurden 10 mM CaCl_2 sowie 3 und 6 mM EGTA. Die jeweiligen Verbindungen wurden im Reaktionspuffer gelöst. Bei der Verwendung von EGTA wurde der Reaktionsassay vor Zugabe des Proteins 3 min inkubiert (Graziana et al., 1983).

2.5.2.1.3 Abhängigkeit vom pH-Wert

Die Bestimmung der THT-Aktivität im pH-Bereich von 5,0 bis 12,0 erfolgte durch den Einsatz von verschiedenen Puffersystemen. Eingesetzt wurden Tris/HCl-, HEPES/NaOH-, MOPS/NaOH-, PIPES/HCl-, MES/HCl-, Kaliumphosphat- und Imidazol/HCl-Puffer.

2.5.3 Aktivitätsbestimmung der TyrDC (E.C. 4.1.1.25)

Der Aktivitätsnachweis der TyrDC erfolgte als Endpunktbestimmung über Quantifizierung des Reaktionsproduktes Tyramin durch HPLC (siehe 2.3.1). Die Identifizierung erfolgte mit der Vergleichssubstanz bzw. der vorhandenen Datenbank. Der Enzymassay (nach Marques & Brodelius, 1988) setzte sich wie folgt zusammen:

Tris-HCl (pH 7,5)	50	mM
Tyrosin (in Tris-HCl, pH 7,5)	1	mM
Pyridoxal 5-Phosphat	0,1	mM

Der Assay wurde mit der Proteinlösung 5 min bei 37°C vorinkubiert, die Enzymreaktion bei 37°C für 60 min mit Tyrosin gestartet und durch Zugabe von gleichem Volumen 10 %iger wässriger TCA-Lösung (v/v) und Einfrieren in flüssigem Stickstoff gestoppt.

2.5.4 Aktivitätsbestimmung der PAL (E.C. 4.3.1.5)

Der Aktivitätsnachweis des Enzyms Phenylalanin-Ammoniak-Lyase erfolgte spektrophotometrisch über Quantifizierung des Reaktionsproduktes *E*-Zimtsäure (siehe 2.3.2). Der Enzymassay setzte sich wie folgt zusammen:

Natrium-Borat (pH 8,8)	0,1	mM
L-Phenylalanin	10	mM

Die Reaktion wurde durch Zugabe der Proteinlösung gestartet, das entstehende Reaktionsprodukt wurde bei 30°C über einen Zeitraum von 60 min spektrophotometrisch bei 290 nm vermessen.

2.6 Isolierung von Nukleinsäuren

2.6.1 RNA-Isolierung aus Zellkulturen

Die RNA-Isolierung erfolgte in Anlehnung an Dunsmuir et al. (1988). Pro Extraktion wurden 5 g Zellen in flüssigem Stickstoff mit 1 g Quarzsand zu einem feinen Pulver zermörsert und in 9 ml Extraktionspuffer [0,1 M NaCl; 0,01 M Tris-HCl, pH 7,5; 0,001 M EDTA; 0,1 % SDS (w/v) und 6 ml Phenol/Chloroform (Roti[®] Phenol/Chloroform, ROTH, Karlsruhe) aufgenommen. Mörser und Pistill wurden anschließend mit dem gleichen Volumina Puffer und Phenol/Chloroform ausgespült. Beide Mischungen wurden danach je 5 min auf dem Vortex geschüttelt, vereinigt und bei 4°C mit 3.200 x g 15 min zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde mit 12 ml Phenol/Chloroform, die Phenol/Chloroformphase mit 12 ml Extraktionspuffer versetzt, je 1 min auf dem Vortex geschüttelt und unter gleichen Bedingungen wie oben zentrifugiert. Zu den wässrigen Oberphasen wurden wiederum 20 ml Phenol/Chloroform gegeben, 1 min auf dem Vortex geschüttelt und zentrifugiert. Die Oberphase wurde anschließend gleichmäßig auf 4 Falcon[®]-Röhrchen verteilt, mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat, pH 5,2, und dem zweifachen Volumen kalten (-20°C) absoluten Ethanol (SERVA, Deisenhofen) versetzt, gemischt und über Nacht bei -20°C gehalten. Anschließend wurde bei 4°C mit 3.200 x g 15 min zentrifugiert und das Sediment mit 5 ml 70%igem Ethanol (v/v) gewaschen. Die Präzipitate wurden in insgesamt 5 ml sterilem Wasser gelöst, mit 5 ml 4 M LiCl/20 mM Na-Acetat, pH 5,2 versetzt und 3 h auf Eis gehalten. Das nach der anschließenden Zentrifugation erhaltene Sediment wurde getrocknet, in 1,8 ml Wasser gelöst, mit 0,2 ml 3M Na-Acetat, pH 5,2, und dem zweifachen Volumen absoluten Ethanol versetzt und über Nacht bei -20°C gehalten. Nach der anschließenden Zentrifugation wurde das Pellet mit 5 ml 70%igem Ethanol (v/v) gewaschen, im Exsikkator getrocknet, in 500 µl sterilem Wasser aufgenommen und bei -80°C gelagert. Die optische Dichte der RNA wurde bei 320, 280, 260 und 230 nm vermessen und über die Absorption bei 260 nm quantifiziert. Eine Absorptionseinheit (1,0) entsprach dabei 45 µg RNA.

2.6.2 RNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial

Pro Extraktion wurden etwa 3 g Pflanzengewebe mit 0,5 g Quarzsand in flüssigem Stickstoff gemörsert und in 10 ml Extraktionspuffer (8 M Guanidiniumchlorid; 20 mM MES-NaOH, pH 7,0; 20 mM EDTA) aufgenommen. Nach Zugabe von 0,7 Volumen Phenol/Chloroform (Roti[®]Phenol/Chloroform, ROTH) wurde der Ansatz 1 min auf dem Vortex geschüttelt und anschließend 20 min bei 3.200 x g und 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit 1/20 Volumen an 1 M Essigsäure und 0,7 Volumen absolutem Ethanol (SERVA) versetzt und für

eine Stunde bei -20°C belassen. Nach der sich anschließenden Zentrifugation von 15 min bei $8.000 \times g$ und 4°C wurde das Sediment mit 4 ml 70 %igem Ethanol (v/v) gewaschen. Darauf folgend wurde das Pellet mit 4 ml 3 M Na-Acetat, pH 4,8, versetzt, zentrifugiert und mit 70 %igem Ethanol gewaschen (v/v). Das erhaltene Sediment wurde getrocknet und in 1 ml sterilem Wasser aufgenommen.

Alternativ wurde zur Gewinnung von RNA aus Pflanzenmaterial der "RNeasy-Plant Mini Kit" (QIAGEN, Hilden) nach den Herstellerangaben genutzt. Die aufgeführten Puffer waren in diesem Kit enthalten. 100 mg Pflanzenmaterial wurden mit 0,2 g Quarzsand in flüssigem Stickstoff gemörsert und im RLT-Extraktionspuffer aufgenommen. Nach einminütiger Zentrifugation bei $20.800 \times g$ wurde der Überstand auf die "Qia-shredder"-Säule gegeben, 2 min bei $20.800 \times g$ zentrifugiert und der Durchfluss mit 225 μl absolutem Ethanol versetzt. Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf die "Qia-spin"-Säule gegeben, 15 sek bei $20.800 \times g$ zentrifugiert und mit 700 μl RW1-Puffer sowie zweimal mit 500 μl Puffer RPE-Puffer gewaschen. Auf die trockene Säulenmembran wurde 50 μl steriles Wasser gegeben und die gebundene RNA mit dem abschließenden Zentrifugationsschritt von 1 min bei $20.800 \times g$ eluiert. Die Quantifizierung der erhaltenen RNA erfolgte nach der unter 2.6.1 beschriebenen Methode.

2.6.3 Poly(A)⁺ RNA-Isolierung

Messenger RNA wurde aus der unter Punkt 2.6.1 isolierten Gesamt-RNA unter Verwendung des "DYNABEADS[®] mRNA Purification Kits" und den darin enthaltenen Puffern isoliert (DYNAL, Hamburg). Hierzu wurden 75 μg Gesamt-RNA aus 5 Stunden elicierter Zellkultur in 100 μl DEPC behandeltem Wasser aufgenommen, für 2 min bei 65°C erhitzt, mit zuvor in 2 x Bindepuffer equilibrierten 1 mg Dynabeads[®] Oligo (dT)₂₅ Partikeln versetzt und für 4 min bei RT hybridisiert. Dieser Ansatz wurde in einen magnetischen Reaktionsgefäßständer gestellt und der sich bildende Überstand entfernt. Die mit der mRNA beladenen magnetischen Partikel wurden anschließend zweimal mit je 200 μl Waschpuffer behandelt, mit 10 ml Elutionspuffer versetzt und für 2 min auf 65°C erhitzt. Die eluierte mRNA konnte im Anschluss daran aufgenommen werden und wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.6.4 Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA aus pflanzlichem Material erfolgte mit den im "Plant DNA Isolation Kit" enthaltenen Puffern (BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim). Hierzu wurden 3 g Blattmaterial mit 0,5 g Quarzsand in flüssigem Stickstoff gemörsert, in 15 ml Puffer 1 aufgenommen und nach Zugabe von 1 ml Puffer 2 für 5 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden 5 ml Puffer 3 zugegeben, der Ansatz 5 min auf Eis gehalten und für 10 min bei $25.000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde dem filtrierten Überstand 10 ml kaltes Isopropanol zugegeben, die DNA 10 min bei -20°C ausgefällt und 10 min

bei 20.000 x g zentrifugiert. Das Präzipitat wurde für 5 min getrocknet und vollständig in 700 µl Puffer 4 resuspendiert. Nach Zentrifugation von 5 min bei 9.880 x g und 4°C wurde der Überstand mit 75 µl 3 M Natrium-Acetat (pH 5,2) und 500 µl kaltem Isopropanol (MERCK) versetzt und die DNA 5 min bei 9.880 x g und 4°C präzipitiert. Nach Trocknung im Vakuum Konzentratoren 5301 (EPPENDORF, Hamburg) erfolgte die Aufnahme in 300 µl TE (pH 8,0).

2.6.5 Plasmid-DNA Isolierung

Die Isolierung und Reinigung von Plasmiden aus Bakterien erfolgte mit dem "Qiaprep Spin Plasmid Kit" nach den Herstellerangaben (QIAGEN). Die aufgeführten Puffer waren im Kit enthalten. 3 ml einer Über-Nacht-Kultur (LB) 10 min wurden bei 20.800 x g zentrifugiert und das Präzipitat in 250 µl Resuspensionspuffer P1 aufgenommen. Nachfolgend wurden 250 µl Lysispuffer P2, 350 µl Neutralisationspuffer N3 zugegeben und 10 min bei 20.800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die "Qiaprep"-Säulen aufgetragen und 45 sek bei 20.800 x g zentrifugiert. Die an das Säulenmaterial gebundenen Plasmide wurden anschließend mit 500 µl Waschpuffer PB und 750 µl Waschpuffer PE mittels Zentrifugation gewaschen. Die Elution der DNA erfolgte durch Zentrifugation mit 50 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.

Zur Isolierung und Reinigung der Plasmide für die Sequenzierung wurde ein größerer Ansatz gewählt. Dazu wurde der "Plasmid Midi Kit" (Qiagen) mit den dazu gehörigen Puffern nach den Herstellerangaben genutzt.

25 ml einer Über-Nacht-Kultur (LB) wurden 10 min bei 20.800 x g zentrifugiert und das Pellett in 4 ml Puffer P1 aufgenommen. Nach Addition von 4 ml Puffer P2 und einer anschließenden Inkubation von 5 min bei RT, wurden 4 ml auf 4°C gekühlter Puffer P3 zugegeben, 15 min auf Eis inkubiert und 30 min bei 4°C und 20.800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die vorher mit 4 ml Puffer QBT equilibrierte Säule "Qiagen tip 100" gegeben. Die an das Säulenmaterial beim Durchfluss gebundene Plasmid-DNA wurde zweimal mit 10 ml Puffer QC gewaschen und mit 5 ml Puffer QF eluiert. Durch Zugabe von 0,7 Volumeneinheiten Isopropanol wurde die DNA ausgefällt, anschließend durch Zentrifugation für 30 min bei 12.000 x g und 4°C präzipitiert, mit 2 ml 70 %igem Ethanol (v/v) gewaschen und in TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen.

2.6.6 Isolierung von Lambda-DNA (λ gt11) und Bakteriophagen-DNA (EMBL3 SP6/T7)

20 ml lysierte Bakterienflüssigkultur (siehe 2.1.3.1) wurden mit 50 µl Chloroform (ROTH) versetzt, 10 min bei RT inkubiert und mit 5.000 x g bei 4°C zentrifugiert. 10 ml des Überstandes wurden anschließend mit je 10 U DNase I und RNase A (BOEHRINGER MANNHEIM) 30 min bei 37°C inkubiert, darauf mit 2 ml 30 % PEG 6.000 (w/v); 3 M NaCl versetzt und für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 12.800 x g und 4°C wurde das Pellett in 500 µl SM-Puffer [100 mM NaCl; 10 mM MgSO₄; 50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,01 % Gelatine (w/v)] aufgenommen, mit 500 µl Chloroform versetzt und auf dem Vor-

tex 30 sek geschüttelt. Nach der sich anschließenden Zentrifugation von 20.800 x g für 5 min wurden der wässrigen Phase 5 µl 10% SDS (w/v) und 5 µl 0,5 M EDTA zugegeben und bei 68°C für 15 min inkubiert. Anschliessend wurden 500 µl Phenol/Chloroform zugesetzt und bei 20.800 x g zentrifugiert. Die obere Phase wurde anschließend mit 50 µl 3 M Na-Acetat, pH 4,8 und 1,5 ml Ethanol versetzt. Die DNA präzipitierte bei -20°C in 30 min, wurde zentrifugiert und abschließend mit 70 %igem Ethanol (v/v) gewaschen. Das getrocknete Pellett wurde in 50 µl TE, pH 7,2 aufgenommen.

2.7 Agarose-Gelelektrophoresen

Alle Agarose-Gelelektrophoresen wurden mit der horizontalen Elektrophoreseeinheit Horizon[®] 58 bzw. Horizon[®] 11.14 (GIBCO BRL, Eggenstein) durchgeführt. Als Spannungsquelle diente das Modell 200/2.0 Power supply (BIORAD, München).

2.7.1 RNA-Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese

15 µg Gesamt-RNA bzw. 25 µg bei den Induktionsexperimenten wurden im dreifachen Volumen RNA-Probenpuffer [87% (v/v) 37 % Formaldehyd; 13 % 0,2 M MOPS (v/v) (0,2 M MOPS, pH 7,0; 0,5 M Natrium-Acetat; 0,01 M EDTA)] gelöst, 90 sek auf 65°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und mit 3 µl Auftragungspuffer [1 mM EDTA; 50 % Glycerin (w/v); 1 mg/ml Bromphenolblau (w/v); 1 mg/ml Xylenxyanol (w/v)] versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte im Agarose-Formaldehyd-Gel [1 % Agarose (w/v); 10 % 0,2 M MOPS (v/v), pH 7,0; 18 % (v/v) Formaldehyd (37 %); 1 ng/ml Ethidiumbromid] mit RNA-Elektrophoresepuffer [10 % 0,2 M MOPS (v/v), pH 7,0; 18 % (v/v) Formaldehyd (37 %)] als Laufpuffer für 3 Stunden bei 7 V/cm. Parallel wurden 10 µl RNA-Größenmarker (0,24-9,5 kB, 1 µg/µl; GIBCO BRL) mitgeführt.

2.7.2 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Vor der Elektrophorese wurden die Proben mit 0,1 Volumen Auftragungspuffer (siehe 2.7.1) versetzt. Die Auftrennung von DNA-Molekülen erfolgte im Agarosegel [0,8 % Agarose (w/v), 1 x TBE, 1 ng/ml Ethidiumbromid] mit 1 x TBE (0,089 M Tris/HCl, pH 8,0; 0,089 M Borsäure; 2 mM EDTA) als Laufpuffer für ca. 2 Stunden bei einer Spannung von 3 Volt pro cm Elektrodenabstand.

Ein Agarosegel [1 % Agarose (w/v), 1 x TAE, 1 ng/ml Ethidiumbromid] mit 1 x TAE (40 mM Tris/Essigsäure, pH 8,2; 10 mM Natrium-Acetat; 1 mM EDTA) als Laufpuffer diente zur Auftrennung von 50 µg mit Restriktionsendonukleasen geschnittener, genomischer DNA. Die Elektrophorese lief für 12 Stunden bei 1,5 V/cm.

Parallel wurden 5 µl DNA-Größenmarker (1 kB; 0,1 µg/µl; GIBCO BRL) mitgeführt.

2.8 Amplifikation von DNA mittels PCR

2.8.1 Amplifikation von DNA mittels RT-PCR

Grundlage für eine Amplifikation von THT-homologer DNA war die Erstellung spezifischer PCR-Primer aus den von Dr. R. Grimm (HEWLETT PACKARD) erhaltenen Peptidsequenzen. Diese ergaben sich aus der von Dr. Hartwig Hohlfeld (Hohlfeld, 1998) gereinigten THT.

Die erhaltenen Peptidbruchstücke hatten folgende Sequenzen:

N-Terminal	TDSSxENNNT
Peptid 1	LHGE/RN/TLQR
Peptid 2	ITTNEG
Peptid 3	FPVVEGQVEEFRSK
Peptid 4	FPVVEGEVEEFRS
Peptid 5	PVLTTF
Peptid 6	ATESS/HLA/YQLFYQIHA/EYHNNT
Peptid 7	DLYHIYQLFYQIHE/AYHNYT
Peptid 8	ENPLPLFYGPSVLL(C)EVSPTPFNE
Peptid 9	TESSLANL

Die sich aus den einzelnen Fragmenten abgeleiteten degenerierten Primer hatten folgende Sequenzen:

Primer 4-1	5'- CCI GTIGTIGAA/GGGIG/CAA/GGTIGAA/GG -3'
Primer 4-2	5'- CC/TTCIACC/TTG/CICCC/TTCIACIACIGG - 3'
Primer 7/1-1	5'- CAC/TATITAC/TCAA/GC/TTITTC/TTAC/TCAA/GATIC -3'
Primer 7/1-2	5'- GIATC/TTGA/GTAA/GAAIAA/GC/TTGA/GTAIATA/GT -3'
Primer 7/2-1	5'- CAA/GC/TTITTC/TTAC/TCAA/GATICAC/TGA/CITAC/TC -3'
Primer 7/2-2	5'- GA/GTAIG/TCA/GTGIATC/TTGA/GTAA/GAAIAA/GC/TT - 3'
Primer 8-1	5'- GAA/GAAC/TCCIC/TTICCCIC/TTITTC/TTAC/TGG -3'
Primer 8-2	5'- CCA/GTAA/GAAIAA/GIGGIAA/GIGGA/GTTC/TTC - 3'

Da sich die aus dem N-terminalen Peptidende abgeleiteten möglichen Primer nicht für eine Amplifikation mittels PCR eigneten, wurden alle aus den Peptidfragmenten ergebenden Kombinationen ebenfalls in entgegengesetzter Orientierung eingesetzt. Inosin ersetzte mehrere an gleicher Position stehende mögliche Nukleotide (MWG BIOTECH, Ebersberg).

Die reverse Transkription wurde mit Gesamt-RNA, die 5 Stunden nach Elicitierungsbeginn aus Kartoffel-Zellkulturen gewonnen wurde, und der reversen Transkriptase Superscript[®] II (GIBCO BRL) nach den Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurden 1 µl Primer uni, 5 µl Gesamt-RNA (4 µg) und 6 µl steriles Wasser für 10 min auf 70°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 4 µl Erststrangpuffer, 2 µl DTT und 1 µl 10 mM dNTP zugefügt, für 2 min bei 42°C und nach Zugabe von 1 µl reverser Transkriptase Superscript[®] II für 50 min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen des Ansatzes für 15 min auf 70°C abgestoppt.

Der erhaltene cDNA-RNA Duplex wurde anschließend mittels PCR amplifiziert. Dazu wurden je 4,5 µl Primer uni; 5,3 µl Primer reverse; 10 µl 10 x Polymerase-Puffer; 2 µl dNTP-Mix (je 200 µM); 5 µl Taq-Polymerase (1:100 verdünnt, 5 U/ml Endkonzentration; APPLIGENE, Heidelberg) 2 µl cDNA-RNA und 71,2 µl Wasser zusammenpipettiert und mit

einem Tropfen Mineralöl (SIGMA) überschichtet. Die Polymerase-Reaktion erfolgte im RoboCycler® Gradient 96 (STRATAGENE, Heidelberg) innerhalb von 35 Zyklen (1 min 94°C, 1 min eingestellter Temperaturgradient und 1 min 72°C). Der Reaktion ging eine Denaturierung von 2 min bei 94°C voraus und wurde durch eine abschließende DNA-Polymerisation von 10 min bei 72°C abgeschlossen. Der Gradient zur Feststellung einer optimalen Primer-Anlagerungstemperatur verlief in 2°C-Intervallen von 42°C - 64°C.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden abschließend im Agarosegel aufgetrennt (siehe Punkt 2.7.2).

2.8.2 Amplifikation von Bakteriophagen-DNA-Insertionen

Zur Identifizierung des 5`-Endes der cDNA wurde mit Phagen-DNA aus den positiven Plaques eine PCR durchgeführt. Hierzu wurden der interne THT-Primer sowie Primer verwendet, die vom Bakteriophagen λ gt 11 abgeleitet waren (ARK SCIENTIFIC, Darmstadt).

Primer λ gt 11	KPN	5´- CGGACATGGCTGAATATCGACGGTTTC -3´
	SST	5´- GGCACATGGCTGAATATCGACGGTTTC -3´
Primer THT	PLPL	5´-GGATGGACCGTAGAAAAGTGGAAGAGG-3´

Zu 1 μ l vorher für 5 min bei 95°C denaturiertem Phagenlysat wurden je 2 μ l Primer, 2 μ l dNTP-Mix (je 200 μ M), 2 μ l 10 x Polymerase-Puffer, 2 μ l *Taq*-Polymerase (1:100 verdünnt, 5 U/ml Endkonzentration; APPLIGENE) und 8 μ l Wasser pipettiert. Der Ansatz wurde mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und amplifizierte unter folgenden Bedingungen: 2 min 94°C, 40 Zyklen (1 min 94°C, 1 min 60°C, 1 min 72°C) und 10 min 72°C.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden abschließend im Agarosegel aufgetrennt (siehe Punkt 2.7.2).

2.9 Elution von DNA-Fragmenten

Die Elution von DNA-Fragmenten wurde mit dem "QIAEX" DNA-Isolierungskit (QIAGEN) durchgeführt. Der Bereich der DNA-Bande wurde hierzu unter UV-Licht freien Bedingungen aus dem Gel herausgeschnitten, gewogen, mit 300 μ l QX1-Puffer pro 100 mg Gelstück und 10 μ l QIAEX-Glassuspension vermischt und 10 min bei 50°C erhitzt. Im Anschluss daran wurde die QIAEX-Suspension 30 sek bei 20.800 x g zentrifugiert, je zweimal mit 500 μ l QX2 und QX3 gewaschen und die gebundene DNA, nach dem Trocknen des Sedimentes, zweimal mit 30 μ l TE, pH 8,0 eluiert.

2.10 Markierung von DNA-Fragmenten

Eine Markierung der als Sonde dienenden, amplifizierten cDNA-Fragmente erfolgte mit dem "Mega-Prime Labelling Kit" (AMERSHAM, Braunschweig). Dazu wurden 5 μ l DNA (ca. 25 ng) mit 5 μ l Zufallsprimer für 5 min bei 95°C denaturiert. Zu diesem Ansatz wurden 16 μ l Wasser, 5 μ l 10 x Reaktionspuffer, je 4 μ l dCTP, dGTP und dTTP, 5 μ l Desoxyadenosin 5´-[α -³²P]triphosphosphat (3.000 Ci/mmol; ICN, Eschwege) und 2 μ l DNA Polymerase I

(Klenow) in der genannten Reihenfolge gegeben und 10 min bei 37°C inkubiert.

Nicht eingebaute Nukleotide wurden anschließend über eine Sephadex® G25-Säule (Qick Spin®, BOEHRINGER MANNHEIM) abgetrennt. Dazu wurde die Säule 2 min bei 1.100 x g zentrifugiert und anschließend mit 50 µl Markierungsansatz beladen. Nach 4 minütiger Zentrifugation konnte die gereinigte Sonde als Eluat gewonnen werden, die nicht eingebauten Nukleotide verblieben auf der Säule.

Die radioaktiv markierte Sonde wurde unmittelbar vor Zugabe zur Hybridisierungslösung für 5 min bei 95°C denaturiert.

2.11 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Für den DNA-Verdau wurden je 50 µg genomischer DNA mit 1 x Restriktionspuffer, 10 Einheiten RNase A und 100 Einheiten einer spezifischen Restriktionsendonuklease (*Bam* HI, *Eco* RI, *Hind* III, *Xba* I) über Nacht bei 37°C verdaut. Der Verdau von Plasmiden erfolgte standardmäßig.

2.12 Übertragung von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen

2.12.1. RNA-Transfer (Northern-Blot)

Das Agarose-Formaldehyd-Gel mit der elektrophoretisch aufgetrennten RNA (siehe Kapitel 2.7.2) wurde zweimal 10 min in Wasser und 15 min in 10 x SSPE-Puffer (0,1 M NaH₂PO₄ 2 H₂O/NaOH pH 7,4; 1,5 M NaCl; 0,01 M EDTA) gewaschen. Der Transfer auf die ungeladene Nylon-Membran (Hybond N, AMERSHAM) erfolgte durch Kapillarwirkung mit 10 x SSPE für ca. 12 Stunden. Durch zweimalige UV-Behandlung im UV-Stratalinker® 1800 (STRATAGENE) mit dem Programm "Autocrosslinking" und nachfolgendem Backen der Membran für 2 Stunden bei 80°C wurde die RNA fixiert.

2.12.2 DNA-Transfer (Southern-Blot)

Das Agarosegel (siehe Kapitel 2.7.2) mit der durch Endonukleasen verdauten DNA wurde je 45 min denaturiert (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl) und neutralisiert (0,5 M Tris/HCl, pH 7,0; 3 M NaCl), jeweils gefolgt von zweimaligem Waschen in Wasser. Der Transfer auf die Membran "Nylon Hybond N" (AMERSHAM) erfolgte in 20 x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Natrium-Citrat/NaOH, pH 7,0). Darauf folgend wurde die Nylonmembran in 3 x SSC gewaschen, an der Luft getrocknet, zweimal mit UV-Licht des Programms "Autocrosslinking" im UV-Stratalinker® 1800 (STRATAGENE) bestrahlt sowie abschließend bei 80°C für 2 Stunden gebacken.

Für standardmäßige Hybridisierungsanalysen geschnittener Plasmid-DNA kam ein vereinfachtes Verfahren zur Anwendung. In diesem wurde das Gel 10 min mit 0,25 M HCl behandelt, anschließend 5 min in Wasser gewaschen und 10 min mit 0,4 N NaOH denaturiert. Der Kapillartransfer erfolgte unter alkalischen Bedingungen in 0,4 N NaOH über Nacht. Die

Membran wurde anschließend in 3 x SSC gewaschen und zweimal mit UV-Strahlung behandelt.

2.12.3 Bakteriophagen-DNA-Transfer

Bakteriophagen-DNA wurde von Agarplatten (4°C; siehe 2.14.1) auf eine Trägermembran transferiert. Diese Nylonfilter (Qiabrane; QIAGEN) wurden für 8 min auf die Platte aufgelegt und markiert. Die Membran wurde anschließend zur Phagen-DNA-Denaturierung für 5 min mit 0,5 N NaOH; 1,5 M NaCl behandelt, darauf 5 min mit 1 M Tris/HCl, pH 7,5; 1,5 M NaCl neutralisiert und für 15 min mit 2 x SSC gewaschen. Im Anschluss daran wurde die DNA durch UV-Bestrahlung (UV-Stratalinker, STRATAGENE) und zweistündiges Backen bei 80°C an die Membran fixiert.

2.13 Radioaktiver Nachweis

Die Vorhybridisierung der Filter erfolgte für 1 Stunde bei 42°C im Hybridisierungssinkubator 7601 (GFL, Burgwedel). Die Hybridisierungslösung enthielt 45 % Formamid (v/v) (FLUKA, Deisenhofen), 10 % Lachs-Sperma-DNA (v/v) (GIBCO BRL, Endkonzentration 100 µg/ml), 45 % (v/v) [0,2 % PVP (w/v) (SIGMA), 0,2 % Ficoll 400 (w/v) (SERVA), 0,2 % BSA (w/v) (BOEHRINGER MANNHEIM) in 100 mM NaH₂PO₄, pH 7,0; 1,8 M NaCl; 10 mM EDTA; 0,2 % SDS (w/v)]. Zur radioaktiven Hybridisierung der Filter wurde der Vorhybridisierungslösung die ³²P-markierte, denaturierte Sonde zugegeben (siehe Kapitel 2.10) und für mindestens 16 Stunden bei 42°C belassen.

Die Filter wurden nach Entfernen der Hybridisierungslösung 3 x 20 min in 3 x SSC, 0,1 x SDS bei 62,5°C im Hybridisierungssinkubator gewaschen. Darauf folgend wurde kurz mit 3 x SSC gespült, die Filter mit Folie abgedeckt und gegen Röntgenfilm (BioMax MS 1; KODAK, Deisenhofen) mit Verstärkerfolie BioMax MS 1 (KODAK) bei -80°C oder mit Phosphorimager Storm 860-Verstärkerfolie (MOLECULAR DYNAMICS, Krefeld) bei RT exponiert. Die Expositionszeit richtete sich nach der Stärke des radioaktiven Signals und betrug zwischen einer und 20 Stunden.

2.14 cDNA-Synthese/Klonierung

Die Herstellung der cDNA erfolgte mit dem "Time Saver"[®]cDNA Synthese Kit (PHARMACIA BIOTECH) entsprechend der Gebrauchsanweisung des Herstellers. Hierzu wurden 5 µg Poly(A)⁺ RNA (siehe Kapitel 2.6.3) in 20 µl Wasser aufgenommen, für 10 min bei 65°C denaturiert und auf Eis gelagert. Darauf folgend wurden zum "Erststrang-Reaktionmix" 1 µl DTT, 1 µl Zufallsprimer (mittlere Länge) sowie die RNA gegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Im Anschluss daran wurde der entstandene RNA-cDNA Duplex zum "Zweitstrang-Reaktionsmix" gegeben, für 12 min bei 30°C und eine Stunde bei 22°C inkubiert, für 10 min bei 65°C denaturiert, mit 100 µl Phenol/Chloroform (ROTH) extrahiert und für eine Minute zentrifugiert. Größere doppelsträngige cDNA-Bruchstücke wurden

darauf folgend mit der lt. Herstellerangaben vorbereiteten, Sepharose[®] CL-4B Gel enthaltenden Säule von kleineren separiert.

Das Eluat des Separationschrittes wurde anschließend mit 30 µl PEG-Puffer, 1 µl gelöster ATP-Lösung sowie 5 µl *Eco* RI/*Not* I-Adaptatoren-Lösung versetzt, zentrifugiert, für eine Stunde bei 16°C inkubiert sowie im Anschluss daran für 10 min bei 65°C denaturiert und auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 1,5 µl ATP-Lösung und 1 µl T4 Polynukleotid Kinase wurde der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert, für 10 min bei 65°C denaturiert, mit 140 µl Phenol/Chloroform (ROTH) präzipitiert und abschließend für eine Minute zentrifugiert. Die in der oberen Phase enthaltende, mit *Eco* R I/*Not* I-Adaptatoren versehene cDNA, wurde darauf mit der lt. Herstellerangaben vorbereiteten, Sepharose[®] CL-4B Gel enthaltenden Säule separiert.

Für die im Anschluss daran sich anschließende Ligation in den λgt 11/*Eco* RI CIAP-Vektor (500 µg/ml ; STRATAGENE) wurden drei verschiedene Ansätze gewählt. Das Säuleneeluat wurde vorher mit Ligationspuffer auf 150 µl aufgefüllt:

	1	2	3
Säulenefflux	17 µl	12µl	7µl
Vektor	2 µl	2 µl	2µl
Ligationspuffer	0 µl	5 µl	10µl

Jedem Ansatz wurde 1 µl 3 M Natrium-Acetat, pH 7,0 und 50 µl kaltes Ethanol (SERVA) zugesetzt und die cDNA mit Vektor für 15 min bei -70°C präzipitiert und anschließend für 10 min zentrifugiert. Das Pellett wurde getrocknet, in 8 µl Ligationspuffer (66 mM Tris/HCl, pH 7,6; 0,1 mM Spermidin; 6,6 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 150 mM NaCl) und 1 µl 1:75 in Ligationspuffer verdünnter ATP-Lösung aufgenommen, mit 1 µl T4 DNA Ligase versetzt und über Nacht bei 16°C inkubiert.

Die Verpackung der rekombinanten DNA in Lambda-Phagen Hüllproteine wurde mit dem Gigapack[®] III Gold Verpackungsextrakt (STRATAGENE) durchgeführt. Hierzu wurden 3 x 4 µl DNA zum auftauenden "Verpackungsextrakt" gegeben und für 2 Stunden bei 22°C inkubiert. Nach zwei Stunden wurden 500 µl SM-Puffer [100 mM NaCl; 10 mM MgSO₄; 50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,01 % Gelatine(w/v)] und 20 µl Chloroform zugeführt, zentrifugiert und der Überstand bei 4°C gelagert.

Nachfolgend wurde die Effizienz der einzelnen Verpackungsreaktionen bestimmt. Dazu wurden 1 µl einer unverdünnten und einer 1:10 Verdünnung der jeweiligen Verpackungsreaktion mit 200 µl einer Kultur des *E. coli*-Stamms Y 1088 (in 10 mM MgSO₄; OD₆₀₀ 0,5) 5 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit 3 ml LB Topagar [48°C, LB broth mit 0,7 % Agar (w/v), 10 mM MgSO₄, 15 µl 0,5 M IPTG, 50 µl X-Gal (EUROGENTEC)] auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 39°C inkubiert. Abschließend wurden die Plaques gezählt.

2.14.1 Auffinden und Anreicherung spezifischer Klone

Für das Auffinden und Anreichern spezifischer cDNA-Klone wurden ca. 600.000 Plaquebildende Einheiten (pfu) verwendet. Dazu wurden je 30.000 pfu pro Agarplatte (Ø 145 mm) mit 600 µl Kultur des *E. coli*-Stamms Y 1088 (in 10 mM MgSO₄; OD₆₀₀ 0,5) 15 min bei 37°C inkubiert, in 9 ml LB-Topagar aufgenommen und auf LB-Agarplatten ausplattiert. Nach einer Inkubation für 8 Stunden bei 37°C wurde von jeder vorher gekühlten Platte ein Replikaabdruck genommen (siehe 2.12.1.3) und dieser mit einer ³²P-markierten Sonde hybridisiert (siehe 2.13). Anhand der Lage des Signals auf dem Filterabdruck konnten die positiven Plaques auf den Agarplatten ausgestochen, in 1 ml SM-Puffer überführt und bei RT für 1 Stunde inkubiert werden. Verschiedene Bakteriophagen-Konzentrationen wurden darauf erneut mit 200 µl *E. coli*-Stamm Y 1088 (in 10 mM MgSO₄; OD₆₀₀ 0,5) auf LB-Topagar/Agarplatten (Ø 90 mm) ausplattiert. Nach 8stündiger Inkubation der Platten waren Einzelplaques zu selektieren, deren Replikaabdruck (siehe 2.12.1.3) mit der ³²P-markierten Sonde hybridisiert wurde (siehe 2.13).

2.14.2 Subklonierung des *Eco* RI-Fragmentes der THT-cDNA in pUC18

Vor einer Ligation des Lambda-*Eco* RI-Fragmentes (siehe 2.6.6) war eine Dephosphorylierung des Vektors erforderlich. Hierzu wurden 25 µl Vektor-DNA mit 3 µl CIP-Puffer und 1 µl alkalischer Phosphatase (BOEHRINGER MANNHEIM) versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Darauf folgend wurde nochmals 1 µl Enzym zugesetzt, für 30 min bei 55°C belassen und abschließend für 10 min bei 75°C denaturiert. Nach einer Ethanol-Fällung wurde der dephosphorylierte Vektor pUC-18 mit dem Lambda-*Eco* RI-Fragment ligiert. Dazu wurden 1 µl (2 µl), 7 µl (6 µl) Fragment, 2 µl Ligationspuffer und 1 µl T4 DNA-Ligase in zwei Ansätzen bei 13°C über Nacht inkubiert.

Für die Transformation von Epurican Coll[®] XL2-Blue (STRATAGENE) wurden 3 bzw. 7 µl des Ligationansatzes zu den kompetenten Zellen pipettiert, diese für 30 min auf Eis gehalten, für 90 sek auf 42°C erwärmt und wiederum für 5 min auf Eis gehalten. Anschließend wurden 500 µl LB zugegeben, 1 Stunde bei 200 rpm und 37°C geschüttelt, 100 µl und 200 µl auf LB-Agarplatten (Amp 50 µg/ml; X-Gal 50 µg/ml; IPTG 0,4 mg/ml) ausplattiert und über Nacht inkubiert.

Weißer Bakterienkolonien wurden auf Anwesenheit des cDNA-Fragmentes über Plasmid-Minipräparation überprüft. (siehe 2.6.5).

2.15 Screening einer genomischen Bank

Eine genomische Bank von 2 Monate alten Kartoffelblättern, *Solanum tuberosum* L. cv. Desirée (CLONTECH, Heidelberg) in EMBL3 SP6/T7 wurde auf K802-Zellen ausplattiert, es wurden analog zum Screenen der cDNA-Bank nach Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten THT-Sonde positive Plaques erhalten (siehe Kapitel 2.14.1).

2.16 Klonierung

2.16.1 Klonierung von PCR-Fragmenten

Die Klonierung von PCR-Fragmenten erfolgte unter Nutzung des "TA-Cloning-Kits" (INVITROGEN, Leek, Niederlande). Dazu wurden die aus der PCR erhaltenen DNA-Fragmente standardmäßig in den Vektor pCR[®] II kloniert und in *E. coli* DH5 α transformiert.

2.16.2 Expressionsklonierung

Der cDNA-Klon pTHT3 wurde in den Expressionsvektor pQE 30 (QIAGEN) kloniert. Dazu wurde die Plasmid-DNA des cDNA-Klons mit der Restriktionsendonuklease *Nco* I geschnitten und mit Ethanol gefällt. Einzelsträngige DNA-Bereiche wurden anschließend in einer "fill-in-Reaktion" durch die Klenow-DNA-Polymerase I (GIBCO) aufgefüllt, die Plasmid DNA wurde wiederum mit Ethanol gefällt und mit *Hind* III erneut geschnitten. Der Expressionsvektor wurde ebenso behandelt; es wurde *Nco* I durch *Bam* HI ersetzt. Anschliessend konnten beide Fragmente ligiert und in *E. coli* XL-2 Blue (STRATAGENE) transferiert werden. Nach Identifizierung rekombinanter Klone wurden *E. coli* M15 (pREP 4) Zellen mit Plasmid-DNA der positiven Klone transformiert.

2.17 Sequenzierung

2.17.1 Sequenzreaktion

Die DNA-Sequenzierung wurde mit dem "T7-Sequencing[®]-Kit" (PHARMACIA BIOTECH, Freiburg) durchgeführt. Die aufgeführten Puffer waren darin enthalten. 32 μ l Plasmid DNA (2 μ g) wurden mit 8 μ l 2 M NaOH denaturiert, zentrifugiert und für 10 min bei RT belassen. Nach Zugabe von 7 μ l 3 M Natrium-Acetat (pH 4,8), 4 μ l Wasser und 120 μ l Ethanol (SERVA) wurde die DNA präzipitiert. Sie wurde anschließend bei 4°C und 12.000 x g zentrifugiert, mit 70 %igem kaltem Ethanol (v/v) gewaschen, getrocknet und in 10 μ l Wasser, 2 μ l "Annealing"-Puffer und 2 μ l Primer aufgenommen. Darauf folgend wurde der Ansatz für 5 min bei 65°C, 10 min bei 37°C und 5 min bei RT inkubiert und zentrifugiert. Für die enzymatische Reaktion wurde pro 14 μ l Ansatz 4 μ l "³⁵Sequetide[®]" (NEN DU PONT, Bad Homburg), 1,6 μ l Enzym-Verdünnungspuffer und 0,4 μ l T7 DNA Polymerase zugegeben, kurz zentrifugiert und 5 min bei RT inkubiert. In 4 μ l "³⁵Sequetide[®]" waren Desoxyadenosin 5' [α -³⁵S]thiotriphosphat sowie 1,5 μ M dCTP, dGTP, dTTP enthalten. Aliquots des Reaktionsansatzes von 4,5 μ l wurden anschließend auf die vier 2,5 μ l Didesoxynukleotid-Ansätze (enthielten 840 μ M dNTP-Mix und 2,1 μ M ("Long-Mix") eines ddNTP) verteilt, jeweils für 5 min bei 37°C inkubiert und durch Zugabe von 5 μ l "Stop-Lösung" abgestoppt.

2.17.2 Sequenziergel

Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe der kühlbaren Vertikal-Elektrophoresekammer LKB

Macrophor 2010, zur Stromversorgung diente das LKB 2297 Macrophor Power Supply (je PHARMACIA BIOTECH).

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 55°C und 2.800 V im 6 %igen Acrylamid-Gel [80 ml Sequenzierpuffer (8 M Harnstoff; 16 % (v/v) Acrylamid/Bis Lösung 40 % (ROTH), 10 % 10 x TBE (v/v)); 200 µl 10 % (w/v) APS; 80 µl TEMED] für etwa 3 Stunden. Als Laufpuffer diente 1 x TBE. Nach dem Lauf wurde das Gel für 20 min mit 10 %iger Essigsäure (v/v) behandelt, für 5 min in Wasser gespült und ca. 2 h bei 80°C getrocknet. Die Detektion erfolgte durch Exposition gegen Röntgenfilm (BioMax MR, KODAK) für 12 h bei RT.

2.17.3 automatisierte Sequenzierung

Die automatisierte Sequenzierung erfolgte durch Frau R. Weiss mit dem DNA-Sequenziergerät "LI-COR, DNA Sequencer Model 4.000 L". Die Auswertung erfolgte mit der Software "Base ImagIR Version 4.00" (MWG BIOTECH).

2.18 Proteinnachweismethoden

2.18.1 Gelfiltration

Für das Verfahren der Gelfiltration wurde das automatisierte Flüssig-Chromatographie-System "Äkta Explorer" mit "Unicorn" Auswerteversion 2.10. (PHARMACIA BIOTECH) in Verbindung mit Sephadex[®] G-75 16/160 als Säulenmaterial genutzt. Als Laufpuffer kam 50 mM KPi, pH 6,5; 150 mM NaCl bei einer Flussrate von 0,4 ml/min zum Einsatz. Chymotrypsinogen A (25 kDa), Eialbumin (45 kDa) und Rinderalbumin (67 kDa) (BOEHRINGER MANNHEIM) wurden als externe Proteinstandards zur Erstellung der Eichgeraden verwandt. Der Verteilungskoeffizient von $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$ wurde berechnet unter Verwendung von Blue Dextran 2000 zur Bestimmung des Ausschlussvolumens V_0 (BOEHRINGER MANNHEIM) und Aceton zur Bestimmung des Gesamtvolumens V_t .

2.18.2 Diskontinuierliche Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE)

Alle Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (nach Laemmli, 1970) wurden mit Mini-Protean II Cell (BIORAD) durchgeführt. Als Spannungsquelle diente der Electrophoresis Power Supply PHERO-stab 500 (BIOTEC FISCHER GmbH, Reiskirchen).

Vor dem Auftragen der Proteinproben wurde die Proteinlösung zu gleichen Teilen mit Probenpuffer [0,125 M Tris/HCl, pH 6,8; 5 mM EDTA; 15 % Glycerin (v/v); 2 % SDS (w/v); 0,1 % Bromphenolblau (w/v); 1 % β-Mercaptoethanol (v/v)] gemischt und 5 min bei 95°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation wurde der Überstand auf das Sammelgel [2,5ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8; 1,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid 30:0,8 % (ROTH); 6 ml Wasser; 100 µl 10 % SDS (w/v); 30 µl 10 % APS (w/v); 10 µl TEMED] aufgetragen und für ca. 10 min bei einer Stromstärke von 15 mA pro Gel laufen gelassen. Die elektrophoretische Auftrennung er-

folgte in 12 %igem Trenngel [5 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8; 8 ml Acrylamid/Bisacrylamid 30:0,8 % (w/v); 6,7 ml Wasser; 200 µl 10 % SDS (w/v); 100 µl 10 % APS (w/v); 10 µl TEMED] während ca. 1 Stunde bei einer Stromstärke von 25 mA pro Gel.

2.18.3 Coomassie-Färbung

Das Gel wurde etwa 2 Stunden in Färbelösung [50 % Methanol (v/v); 0,05 % Coomassie Brilliant Blau R-250 (v/v) (SIGMA); 10 % Essigsäure (v/v)] geschwenkt und nachfolgend mit Entfärbelösung [50 % Methanol (v/v); 10 % Essigsäure (v/v)] und 10 %iger Essigsäure (v/v) entfärbt bzw. fixiert.

2.18.4 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Der Proteingehalt von Enzymlösungen wurde in Anlehnung an die Methode von Bradford (1976) bestimmt. Zur Herstellung des Bradford-Reagenzes wurden 65 mg Serva Blau G (SERVA) in 50 ml Methanol gelöst, 60 min gerührt und abfiltriert (S&S Rundfilter Nr. 595, SCHLEICHER & SCHUELL). Zu dem Filtrat wurden 100 ml 85 %ige ortho-Phosphorsäure und Wasser ad. 1000 ml gegeben. Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurden 2 µl der zu untersuchenden Lösung mit 1 ml Bradford Reagenz versetzt und 7 min bei RT inkubiert. Die Extinktion wurde bei 595 nm gegen reines Bradford-Reagenz vermessen (DU 640, Spectrophotometer, BECKMANN). Eine BSA-Standardproteinlösung (100 µg/ml) diente bei jeder Serie als Eichwert.

2.18.5 Reinigung rekombinanter Proteine

Die Reinigung rekombinanter cytoplasmatischer Proteine erfolgte nach den Herstellerhinweisen (QIAGEN).

Dazu wurden die unter 2.1.3 abzentrifugierten Bakterien in 10 ml Aufschluss-Puffer (50 mM Na-Phosphat, pH 8,0; 300 mM NaCl) aufgenommen, kurz in Trockeneis/Ethanol eingefroren und 1 min im Ultraschall-Homogenisator (BANDELIN, Berlin) aufgeschlossen. Anschließend wurde der Ansatz mit RNase A (10 µg/ml) und DNase I (5 µg/ml; BOEHRINGER MANNHEIM) versetzt, 15 min auf Eis inkubiert und für 20 min bei 15.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 8 ml 50 %iger Ni-NTA (Nickelgarose, QIAGEN) versetzt und für 60 min bei 4°C unter leichtem Rühren belassen. Der Ansatz wurde auf eine Säule gegeben, und mit Aufschluss- und Waschpuffer [50 mM Na-Phosphat, pH 6,0; 300 mM NaCl; 10 % Glycerin (v/v)] gewaschen. Das rekombinate Protein wurde mit 30 ml eines Gradienten von 0-0,5 M Imidazol (in Waschpuffer) eluiert, fraktioniert, bei -80°C eingefroren oder nach 10 min bei 37°C auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen (siehe 2.18.2).

2.18.6 Nachweis von Proteinen mit Antikörpern (Western Blot)

Das in 2.18.2 erhaltene Proteingel wurde in Transfer-Puffer [10 mM CAPS/NaOH, pH 11,0; 10 % Methanol (v/v)] 15 min inkubiert und das Proteinmuster mittels "Trans-Blot-Cell System" (BIORAD) auf die vorher in Methanol equilibrierte PVDF-Membran (BIORAD) übertragen. Der Proteintransfer erfolgte durch das Anlegen einer elektrischen Spannung von 50 V in einer Stunde.

Im Anschluss daran wurde die Membran in 5 % Magermilchpulver (w/v) (BIORAD) in PBS (1,4 mM KH_2PO_4 , pH 7,2; 4,3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2,7 mM KCl; 137 mM NaCl) für 30 min geschwenkt und über Nacht in 1:1000 in PBS mit 5 % Magermilchpulver (w/v) verdünntem Antiserum inkubiert. Es folgte eine Behandlung für je 15 min in PBS, zweimal in PBS mit 0,2 % Tween 20 (v/v) (SERVA) und wiederum in PBS, ehe für 1 Stunde mit 1:1000 in PBS mit 5 % Magermilchpulver (w/v) verdünntem 2. Antikörper inkubiert wurde. Anschließend wurde je 15 min in PBS, zweimal in PBS mit 0,2 % Tween 20 (v/v) (SERVA) und wiederum in PBS gewaschen.

Die Membran wurde anschließend in Markierungslösung (100 mM Tris/HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl_2) inkubiert und mit 10 ml Färbelösung [Markierungslösung mit 45 μl NBT-Stock und 35 μl X-Phosphat-Stock (SIGMA)] behandelt. Dabei kamen für den 2. Antikörper sowohl Anti-Kaninchen-Alkalische Phosphatase (SIGMA), Anti-Huhn-Alkalische Phosphatase (SIGMA) als auch Anti-Kaninchen-Peroxidase (AMERSHAM PHARMACIA, Freiburg) zur Anwendung. Für die Detektion des Peroxidase-Antikörpers wurde das Western-Blot-Detektionssystem ECL (AMERSHAM PHARMACIA) über Chemilumineszenz auf Biomax MS1-Filme (KODAK) verwandt. Die Expositionszeit betrug 1 min.

Der verwendete polyklonale THT-Antikörper aus Hühnereidotter und Kaninchenantiserum (Ig G) wurde von der Firma Davids, Regensburg hergestellt.

2.19 Herstellung transgener THT-sense Pflanzen

Die *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Transformation von Kartoffel- und Tabakpflanzen erfolgte im Labor von Frau Dr. S. Rosahl in der Abteilung Stress- und Entwicklungsphysiologie des IPB. Transgene Pflanzen, die das THT-Fragment in 5'-3' Richtung enthielten (sense), wurden zur RNA-, DNA- und Proteinanalyse zur Verfügung gestellt. Das verwendete THT-Konstrukt (Abbildung 2.1) enthielt den 35S-Promotor sowie als Resistenzgen die Hygromycin-Phosphotransferase (HPT II).

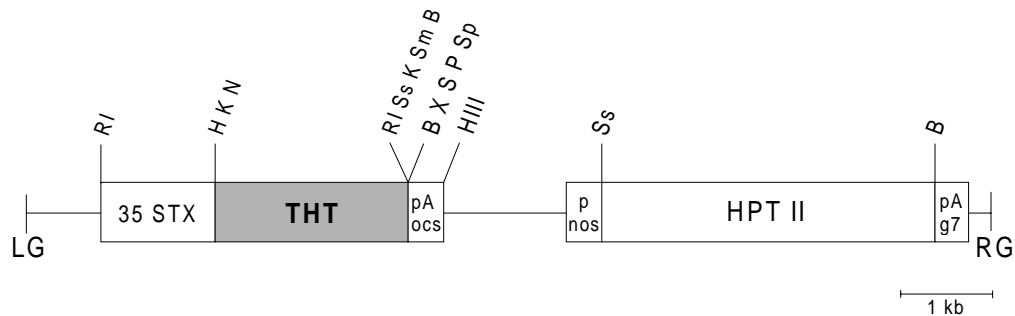


Abbildung 2.1: THT-sense Konstrukt zur Transformation von Kartoffel- und Tabakpflanzen; B-*Bam* HI, H-*Hpa* I, HIII-*Hind* III, K-*Kpn* I, N-*Nco* I, P-*Pst* I, RI-*Eco* RI, S-*Sal* I, Sm-*Sma* I, Sp-*Sph* I, Ss-*Sst* I, X-*Xba* I HPT II - Hygromycin-Phosphotransferase; LG; RG - linke bzw. rechte Grenze; 35 STX - 35S Promotor (Gatz et al., 1991)

2.20 Datenbanksuche und Verarbeitung von Sequenzdaten

Die Datenbanksuche bzw. Sequenzvergleiche wurden mit "BLAST X" des "Nationalen Zentrums für biotechnologische Information" (NCBI; Bethesda, USA) unter Nutzung des Internets durchgeführt. Eine Bearbeitung der Sequenzdaten erfolgte mit den Programmen "PC Gene" oder "DNA Star".

2.21 Anmerkungen

Alle Lösungen wurden mit destilliertem, deionisiertem Wasser angesetzt. Für Arbeiten mit Nukleinsäuren, Bakterien und Phagen wurden alle Lösungen, Gefäße und Pipettenspitzen sterilisiert.

Zentrifugationsschritte wurden, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt. Es kamen die Zentrifugen 5415 C, 5417 R (EPPENDORF) oder RC 28 S (SORVALL, Bad Homburg) zum Einsatz.

Standardmäßige molekularbiologische Arbeitsmethoden wurden nach Ausubel et al., (1997) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Akkumulation phenolischer Verbindungen

Kartoffelzellen reagieren auf Elicitorbehandlung mit einer Induktion von Abwehrreaktionen, die den eindringenden Pilz in seinem weiteren Wachstum einschränken sollen. In Kartoffel-Zellkulturen (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée) wurde nach Elicitierung mit *Phytophthora infestans* (*P. infestans*) eine deutliche Braunfärbung der Zellkultur festgestellt, was bereits 20 Stunden nach Elicitierungsbeginn ersichtlich war.

Dieser hypersensitiven Reaktion war in Kartoffel-Zellkulturen eine Akkumulation von Phenylpropanen zeitlich vorgelagert. Um dieses Phänomen quantifizieren zu können, wurden verschiedene Fraktionen der Kartoffel-Suspensionskultur auf ihre phenolischen Inhaltsstoffe hin untersucht. Dies betraf zuerst die Analyse der in 80 % wässrigem Methanol (v/v) löslichen Phenole, der Zellwand-gebundenen Akkumulate sowie der in das Zellanzuchtsmedium ausgeschiedenen Verbindungen.

In der Fraktion der löslichen Phenole (nicht graphisch dargestellt) konnte die Existenz von Arbutin (4-*O*- β -Glucopyranosylhydrochinon) und 4-Cumaroyltyramin nachgewiesen werden. Der Gehalt dieser Verbindungen stieg während der Elicitierung auf das Doppelte der jeweiligen Menge des Kontrollansatzes an. Die Umsatzrate an gebildetem 4-Cumaroyltyramin betrug 60 Stunden nach Elicitierungsbeginn 1,5 nmol/g Frischgewicht, bei Arbutin 5,6 nmol/g Frischgewicht. In Kontrollexperimenten, in denen Wasser statt Elicitor zugegeben wurde, konnte dagegen kein erhöhter Umsatz gemessen werden. 4-Hydroxybenzoesäure- und Vanillinsäure-Glucosid (3-Methoxy-4-*O*- β -Glucopyranosylbenzoat) veränderten ihren Akkumulationsgrad nach Elicitierung dagegen nur geringfügig.

Eine im Vergleich zu den löslichen Phenolen stärkere Akkumulation konnte dagegen bei der Analyse der Zellwand-gebundenen Fraktion gefunden werden (Abbildung 3.1). Dies betraf die Verbindungen *p*-Hydroxybenzaldehyd, *p*-Hydroxybenzoesäure, 4-Cumaroyltyramin, Feruloyltyramin sowie 4-Cumaroyloctopamin und Feruloyloctopamin. In allen Fällen, bis auf Cumaroyloctopamin, konnte während kinetischer Studien eine stete Steigerung des Gehaltes der jeweiligen Verbindung während der gesamten Versuchszeit verzeichnet werden. So wurde bei *p*-Hydroxybenzaldehyd 60 Stunden nach Versuchsbeginn eine Erhöhung auf das 4,3-fache des Kontrollexperimentes, bei *p*-Hydroxybenzoesäure auf das 3,6-fache registriert. Dies entsprach einer Stoffmenge von 70 nmol/g Frischgewicht bzw. 4,8 nmol/g Frischgewicht. Der Akkumulationsgrad von 4-Cumaroyltyramin sowie vom Feruloylderivat stieg nach der gleichen Zeit auf das 12- bzw. 7-fache der Kontrolle, was 2,9 nmol/g Frischgewicht bzw. 2,7 nmol/g Frischgewicht entsprach. Eine vergleichbare, ebenso signifikante Erhöhung konnte bei den jeweiligen Octopaminen gemessen werden. So stieg im Vergleich zur Wasser-behandelten Probe bereits 40 Stunden nach Elicitierung der Gehalt an Cumaroyloctopa-

min auf das 6-fache, der von Feruloyloctopamin nach 60 Stunden auf das 9-fache. Dies entsprach in beiden Fällen einer Konzentration von 1 nmol/g Frischgewicht. Im Gegensatz zu den anderen Zellwand-gebundenen phenolischen Verbindungen nahm die Konzentration von Cumaroyloctopamin nach Erreichen des maximalen Wertes nach 40 Stunden wieder ab, lag nach 60 Stunden aber noch bei 58 % des Maximums.

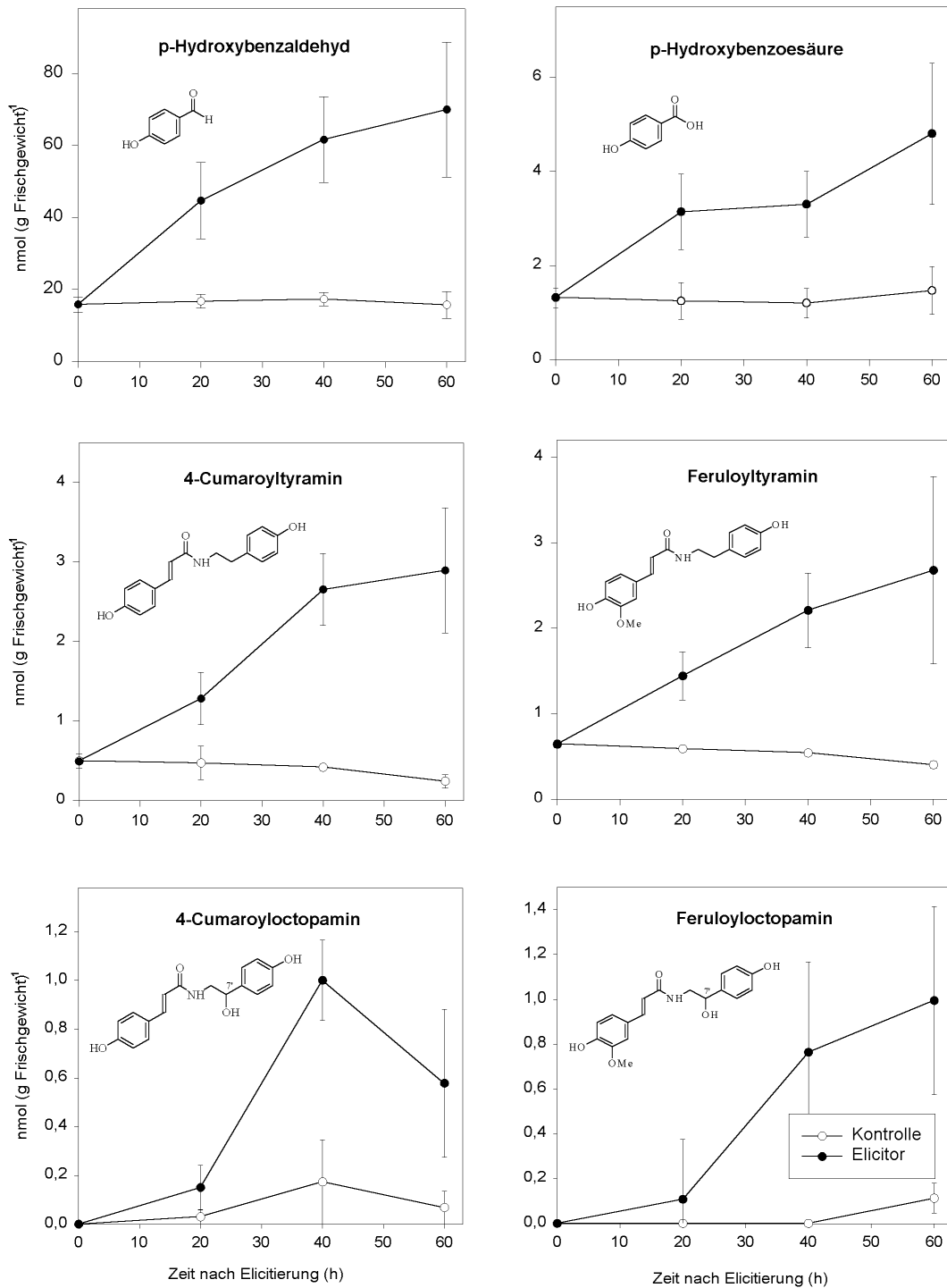


Abbildung 3.1: Akkumulation phenolischer Verbindungen in der pflanzlichen Zellwand von Kartoffel-Zellkulturen (*Solanum tuberosum*) nach Elicitierung mit *P. infestans*-Kulturfiltrat

In Abbildung 3.1 nicht dargestellt ist der im Vergleich zu den genannten Verbindungen wesentlich geringere Anstieg von Vanillin (3-Methoxy-4-Hydroxybenzaldehyd).

Ebenfalls konnte nach Behandlung der Kartoffel-Zellkultur mit *P. infestans*-Kulturfiltrat eine erhöhte Akkumulation von Phenylpropanen im Anzuchtsmedium registriert werden (Abbildung 3.2).

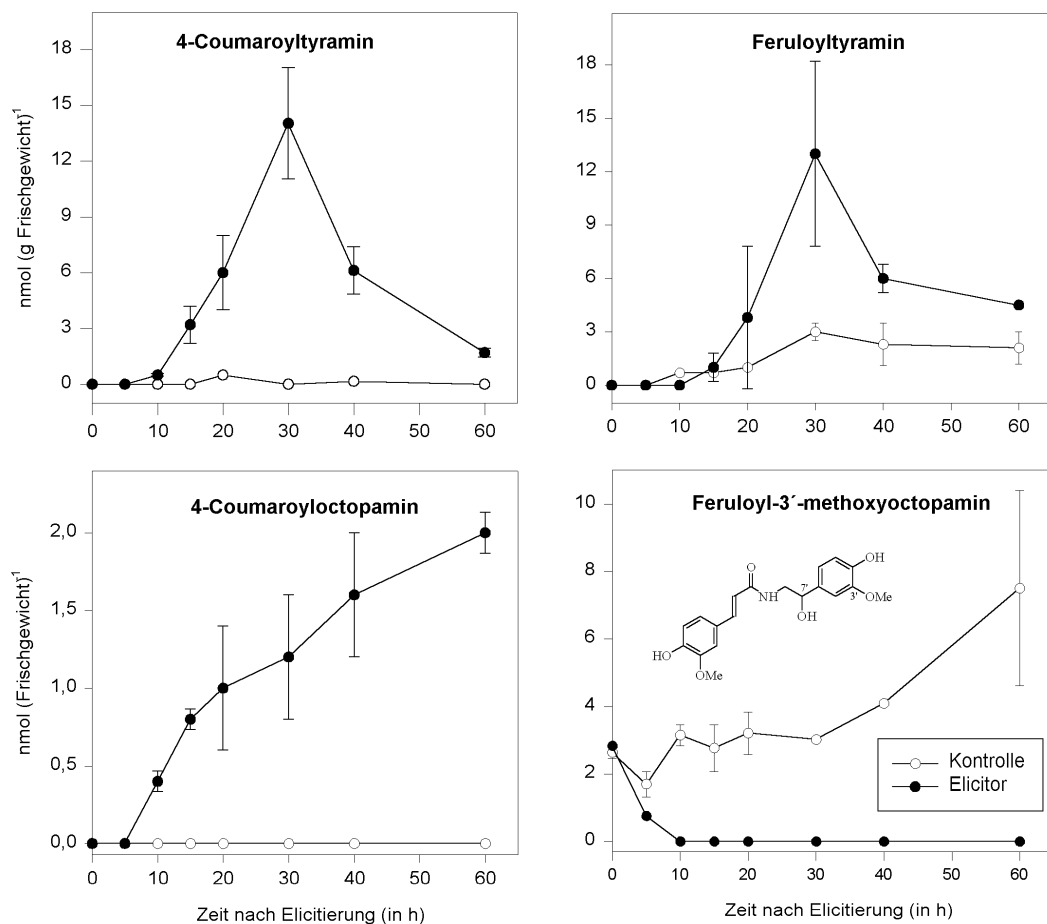


Abbildung 3.2: Akkumulation phenolischer Verbindungen im Anzuchtsmedium von Kartoffel-Zellkulturen (*Solanum tuberosum*) nach Elicitierung mit *P. infestans*-Kulturfiltrat

Es wurden die Hydroxyzimtsäurekonjugate 4-Cumaroyl- und Feruloyltyramine als auch 4-Cumaroyl- und Feruloyloctopamin sowie Feruloyl-3'-methoxyoctopamin identifiziert. Beide Tyramide besaßen nach 30 Stunden ihr Akkumulationsmaximum. Es konnten von 4-Cumaroyltyramin und Feruloyltyramin jeweils 30 Stunden nach Inokulationsbeginn 14 nmol/g Frischgewicht bzw. 13 nmol/g Frischgewicht gefunden werden. Die Gehalte der Kontrollen lagen unterhalb der Nachweisgrenze. Beide Kinetiken zeichnete aus, dass im Gegensatz zu den Zellwand-gebundenen Phenolen die maximale Akkumulationsmenge im Anzuchtmedium etwa fünffach höher war. Demgegenüber stieg die Konzentration an Coumaroyloctopamin innerhalb des Versuchszeitraumes nahezu konstant an. 60 Stunden nach Elicitierung wurden 2 nmol/g Frischgewicht gemessen. Somit konnte die vergleichbare Konzentration im An-

zuchtsmedium wie in der Zellwand gefunden werden. Im Kontrollexperiment wurde dagegen keine Akkumulation festgestellt. Gegenätzlich verhielt sich Feruloyl-3'-methoxyoctopamin. Diese Verbindung wurde im Kontrollversuch, 60 Stunden nach Elicitierung, mit 7,5 nmol/g Frischgewicht identifiziert. In elicitierten Kulturen sank dagegen der Gehalt nach den ersten 10 Stunden unter die Nachweisgrenze ab.

In Abbildung 3.2 nicht dargestellt ist der im Vergleich zu den genannten Verbindungen wesentlich geringere Anstieg von Feruloyloctopamin.

3.2 Identifizierung der Verbindungen

Die Aminkonjugate Feruloyloctopamin (**1**), Feruloyl-3'-methoxyoctopamin (**2**), 4-Cumaroyltyramin (**3**), 4-Cumaroyloctopamin (**4**) und Feruloyltyramin (**5**) wurden mittels LC/MS (positive and negative Electrosprayionisierung) and HPLC/Photodiodenarraydetektion identifiziert. Die Molekulargewichte der Feruloyl- bzw. Cumaroylamide **1** - **5** wurden aus den Electrospray(ES)-Massenspektren unter positiver und negativer Ionisierung ($[M+H]^+/[M+2H]^+$ - bzw. $[M-H]^-$ Ionen) abgeleitet. Die massenspektrometrische Fragmentierung der Verbindungen **1** - **5** der positiven Ionen ist hauptsächlich durch die Bildung eines Ions vom Typ **a** (Abbildung 3.3), das sowohl den Feruloyl- (m/z 177) als auch den Cumaroylteil (m/z 147) anzeigt, charakterisiert (Tabelle 3.1). In den Massenspektren der Aminkonjugates mit einer Hydroxyfunktion am C-7' (**1**, **2**, **4**) zeigen die Negativionen-ES-Massenspektren ein signifikantes $[M-H-H_2O]^-$ -Ion. Außerdem ist in diesen Fällen ein schwaches $[M+H]^+/[M+2H]^+$ -Ion und ein intensives $[M+H-H_2O]^+$ -Ion in den Positivionen-ES-Massenspektren zu beobachten. Diese Ionen können für eine Unterscheidung zwischen 7'-Hydroxy-Verbindungen und jenen mit unsubstituierter Benzylposition des Aminteils benutzt werden. In den Positivionen-ES-Massenspektren der Tyraminderivate **3** und **5** ist darüber hinaus ein Ion bei m/z 121 vorhanden, das typisch für die ES-Spektren von Tyraminkonjugaten ist (Miersch et al., 1998).

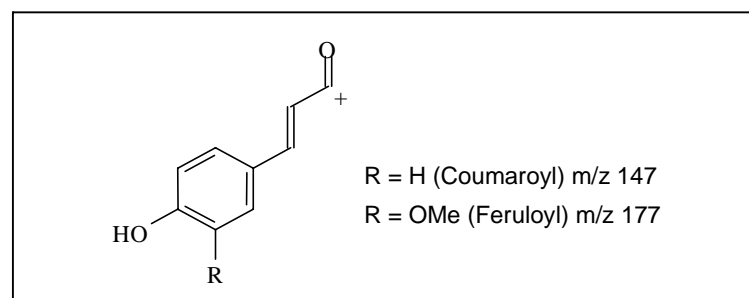


Abbildung 3.3: Struktur von Ion a

	Verbindungen				
	1	2	3	4	5
Positive Ionen					
[M+2H] ⁺	331 (4)	-	-	301 (5)	-
[M+H] ⁺	330 (2)	-	284 (35)	300 (2)	314 (58)
[M+H-H ₂ O] ⁺	312 (16)	342 (34)	-	282 (12)	-
a	177 (100)	177 (100)	147 (100)	147 (100)	177 (100)
m/z 145	(27)	(22)	-	-	(7)
m/z 121	-	-	(38)	-	(10)
Negative Ionen					
[M-H] ⁻	328 (100)	358 (66)	282 (100)	298 (17)	312 (100)
[M-H-Me] ⁻	-	-	-	-	297 (8)
[M-H-H ₂ O] ⁻	310 (54)	340 (100)	-	280 (100)	-
RT [#]	6.83	6.45	9.50	5.78	9.62
RT [§]	23.00	22.80	26.20	21.60	26.80
λ_{MAX} [§]	221	288	224	222	222
	319	319	292	290	319

Tabelle 3.1: ES-Massenspektren positiver und negativer Ionen (m/z, relative Intensität), HPLC Retentionszeiten (RT, min) und UV-Maxima (λ_{MAX} , nm) der Verbindungen Feruloyloctopamin (**1**), Feruloyl-3'-methoxyoctopamin (**2**), 4-Cumaroyltyramin (**3**), 4-Cumaroyloctopamin (**4**) und Feruloyltyramin (**5**),
[#] HPLC-MS; [§] HPLC-DAD (siehe Material und Methoden)

Die Detektion der Zellwand-gebundenen sowie der im Anzuchtmedium akkumulierenden Verbindungen erfolgte mittels HPLC. Dabei wurden p-Hydroxybenzoesäure, p-Hydroxybenzaldehyd, Vanillin, 4-Cumaroyloctopamin, Feruloyloctopamin, 4-Cumaroyltyramin, Feruloyltyramin und Feruloyl-3'-methoxyoctopamin detektiert. Ausschnitte der HPLC-Analysen eines elicierten- als auch eines Kontroll-Versuchsansatzes sind in Abbildung 3.4 ersichtlich. Isovanillinsäure diente als interner Standard der zellwandgebundenen Verbindungen.

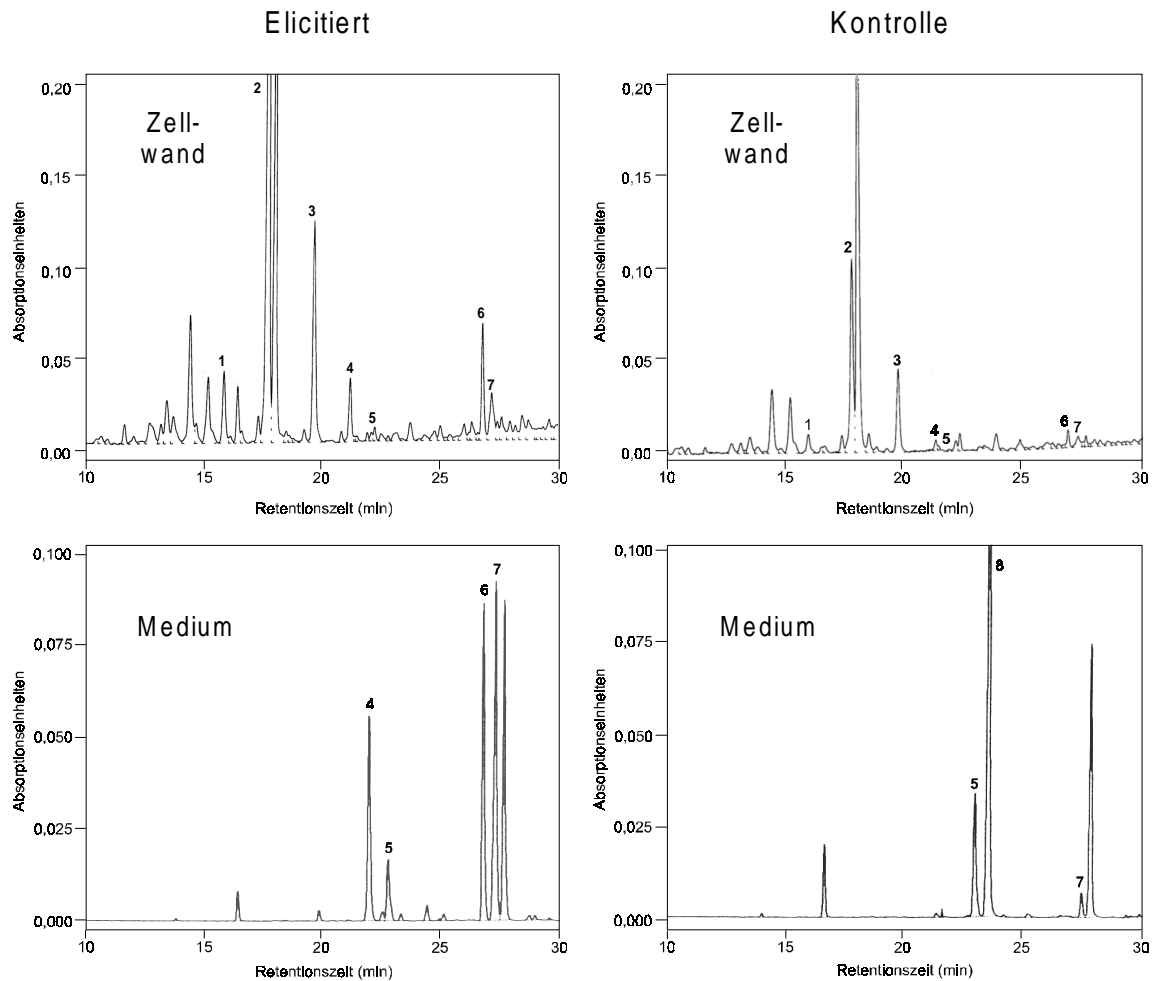


Abbildung 3.4: HPLC-Profile der in der Zellwand sowie im Anzuchtmedium akkumulierenden Verbindungen

1- p-Hydroxybenzoesäure, 2- p-Hydroxybenzaldehyd, 3- Vanillin, 4- 4-Cumaroyloctopamin, 5- Feruloyloctopamin, 6- 4-Cumaroyltyramin, 7- Feruloyltyramin und 8- Feruloyl-3'-methoxyoctopamin detektiert. Isovanillinsäure diente als interner Standard der zellwandgebundenen Verbindungen (Retentionszeit 17,9 min).

3.3 Mikrobiotest-Analyse

In diesem Biotest nach Gottstein et al. (1984) wurde elicitiertes Zellwandmaterial der Kartoffel-Zellkulturen auf seine fungistatische Wirkung hin untersucht. Diesem Test liegt zugrunde, dass die zu untersuchenden Proben in eine Kieselschicht eingelagert werden, die nach Behandlung mit einer Nährlösung als Wachstumsuntergrund für den Pilz *Cladosporium cucumerinum* Ell. et Arth. dient. Aufgrund der unterschiedlichen Wachstumsintensität können Rückschlüsse über die fungistatischen Eigenschaften der eingelagerten Verbindungen gezogen werden. In unserem Versuch wurde ein hemmender Einfluss auf das Pilzwachstum in den Fällen registriert, in denen die größte Menge Zellwandmaterial dem Wachstumsuntergrund beigegeben wurde. So wurde bei 0,2 g elicitiertem Zellwandmaterial, vermengt mit 0,2 g Kieselgel, sowie bei 0,3 g Zellwandmaterial mit 0,1 g Kieselgel ein signifikanter Hemmeffekt auf den wachsenden Pilz festgestellt. Dieser war durch seine abgegrenzten weißen

Flecken (Hemmhöfe) auf dem ansonsten grau gefärbten Myzelbelag erkennbar (Abbildung 3.5). In den mit Wasser behandelten Kontrollkulturen sowie im Versuchsansatz mit dem kleinsten Zellwand/Kieselgel-Verhältnis (0,1 g : 0,3 g) konnte kein Einfluss auf das Wachstum des Biotest-Pilzes festgestellt werden.

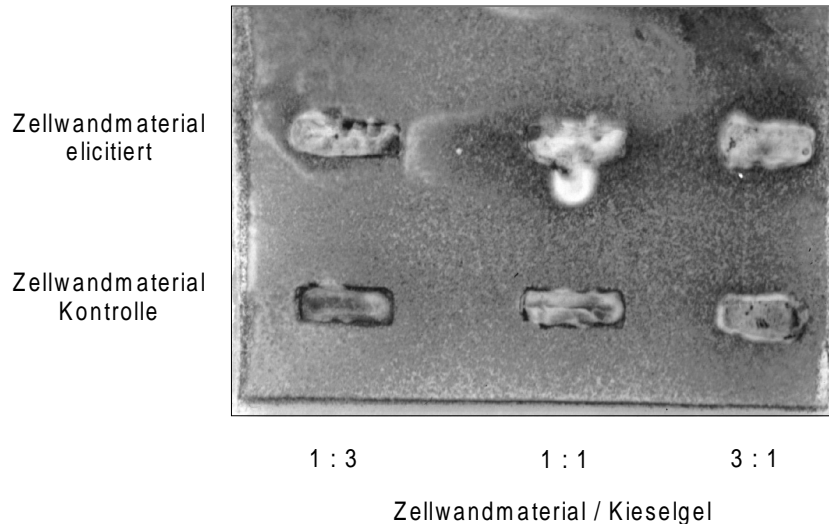


Abbildung 3.5: Biotest zum Nachweis fungitoxischer Verbindungen in elicitiertem Zellwandmaterial

In gleicher Weise wurde geprüft, ob isolierte freie Hydroxyzimtsäure-Amide oder Bestandteile des Anzuchtmediums für das inhibierte Wachstum von *Cladosporium cucumerinum* verantwortlich sein könnten. Weder im Fall von 4-Cumaroyltyramin noch Feruloyltyramin konnten bei aufgetragenen Stoffmengen von 100 nmol Einflüsse auf das Wachstumsverhalten des Biotest-Pilzes registriert werden. Ebenso wurde bei der Auftragung von 100 µl des eingedampften und in 2 ml Methanol aufgenommenen, also 25fach konzentrierten, Anzuchtmedium kein messbarer Effekt festgestellt.

Diese Versuche wurden in den angegebenen Volumina und Konzentrationen nur einmal durchgeführt.

3.4 Aktivierung von Enzymen des Phenylpropanstoffwechsels

Nach Behandlung der Kartoffel-Zellkulturen mit einem Kulturfiltrat aus *P. infestans* wurden drei Enzyme des Phenylpropanstoffwechsels auf ihre Elicitor-induzierte Aktivitätsänderungen hin untersucht. Die Enzyme waren die Hydroxycinnamoyl-CoA:Tyramin-Hydroxycinnamoyltransferase (THT), die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) und Tyrosin-Decarboxylase (TyrDC).

Die zeigte nach Elicitierung einen deutlichen Anstieg der Enzymaktivität (Abbildung 3.6). Das Maximum der Aktivität wurde nach einer Elicitierungszeit von etwa 15 Stunden erreicht. Es konnte in diesem Bereich eine spezifische katalytische Enzymaktivität von 8,2 mkat/kg Protein gemessen werden. 60 Stunden nach Elicitierung wurden noch etwa 80% des Beta-

ges der Maximalaktivität gemessen; sie betrug zu diesem Zeitpunkt 6 mkat/kg Protein. Die mit Wasser behandelten Proben zeigten im Gegensatz dazu nur eine Aktivität unterhalb von 1 mkat/kg Protein.

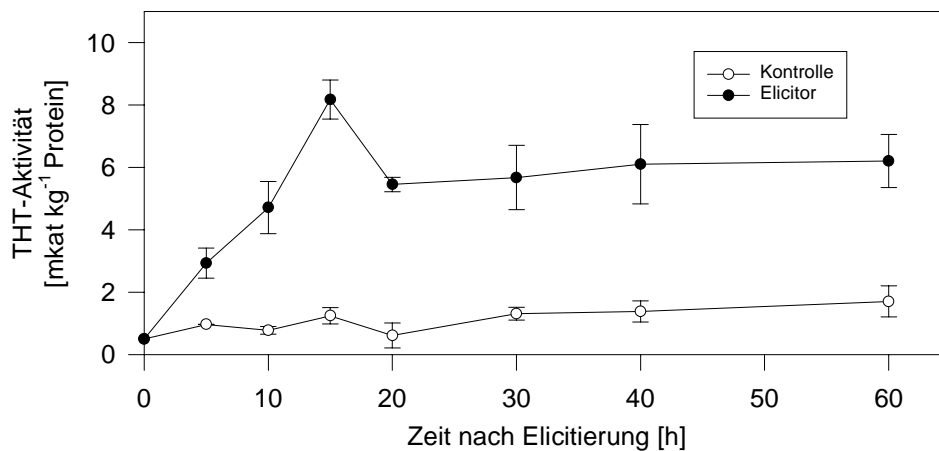


Abbildung 3.6: Aktivierung der THT in Kartoffel-Zellkulturen nach Elicitierung mit einem Kulturfiltrat aus *P. infestans*

Die PAL wurde nach Elicitierungsbeginn transient in ihrer Enzymaktivität aktiviert (Abbildung 3.7). Das Maximum konnte 10 Stunden nach Elicitierungsbeginn festgestellt werden. Die spezifische Aktivität erreichte zu dieser Zeit etwa das 50-fache des Kontrollwertes, was einem Betrag von 50 μ kat/kg Protein entsprach. Nach etwa 20 Stunden sank die Enzymaktivität wieder auf den Wert der nicht elicierten Probe. Diese Kontrolle zeigte nahezu keine Aktivität.

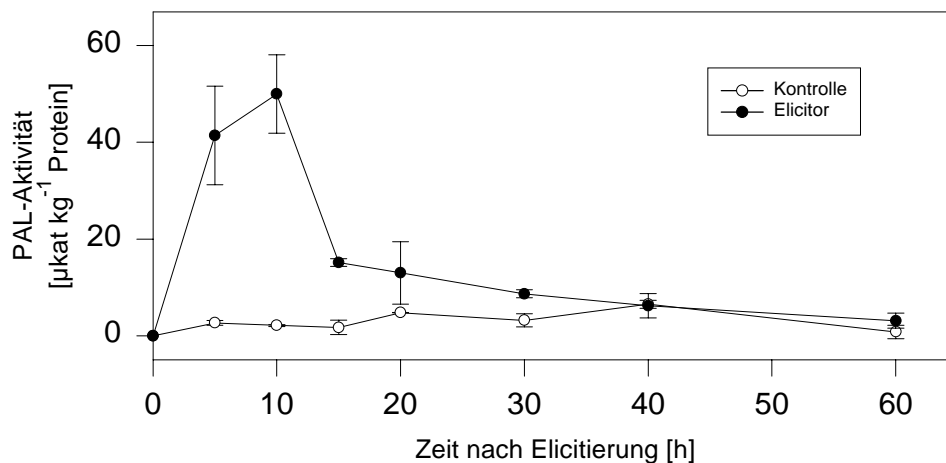


Abbildung 3.7: Aktivierung der PAL in Kartoffel-Zellkulturen nach Elicitierung mit einem Kulturfiltrat aus *P. infestans*

Eine der PAL ähnliche Aktivierung wurde für die TyrDC gemessen (Abbildung 3.8). Auch hier konnte ein deutlicher Anstieg nach Elicitierungsbeginn festgestellt werden. Das Maximum der Aktivität lag bereits nach 5 Stunden bei etwa dem 20-fachen der Kontrolle und entsprach einer spezifischen Aktivität von 0,6 μ kat/kg Protein. Da davor kein weiterer Wert gemessen wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich das Maximum der Enzymakti-

vität bereits zu einem früheren Zeitpunkt befand. Nach etwa 15 Stunden stimmt die Enzymaktivität mit der nicht elicitierten Probe überein. Die mit Wasser behandelten Kontrollansätze wiesen keine Aktivität aus

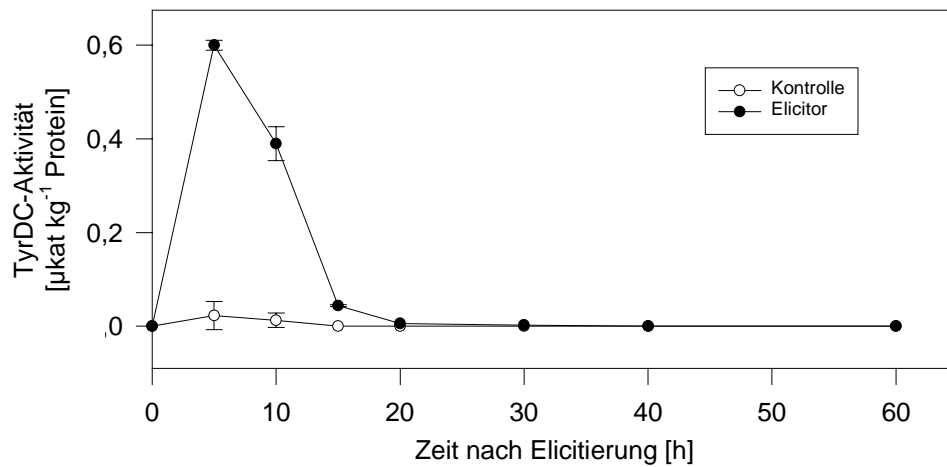


Abbildung 3.8: Aktivierung der TyrDC in Kartoffel-Zellkulturen nach Eliciterung mit einem Kulturfiltrat aus *P. infestans* (aus Schmidt et al., 1998)

3.5 Erhalt einer THT-homologen Sonde

Das HPLC-Profil der von Hohlfeld (1998) aus Kartoffel-Zellkulturen gereinigte THT wurde von Dr. R. Grimm (Hewlett-Packard, Waldbronn) mit der Endopeptidase LysC verdaut. Es wurden 10 verschiedene Peptide erhalten und sequenziert. Zur Verdeutlichung ist die Auftrennung mittels HPLC im Folgenden noch einmal aufgeführt (Material und Methoden, Kapitel 2.8.1). Die Sequenzinformation dieser Peptide war Voraussetzung um degenerierte spezifische Primer für den Erhalt einer THT-homologen Sonde herstellen zu lassen.

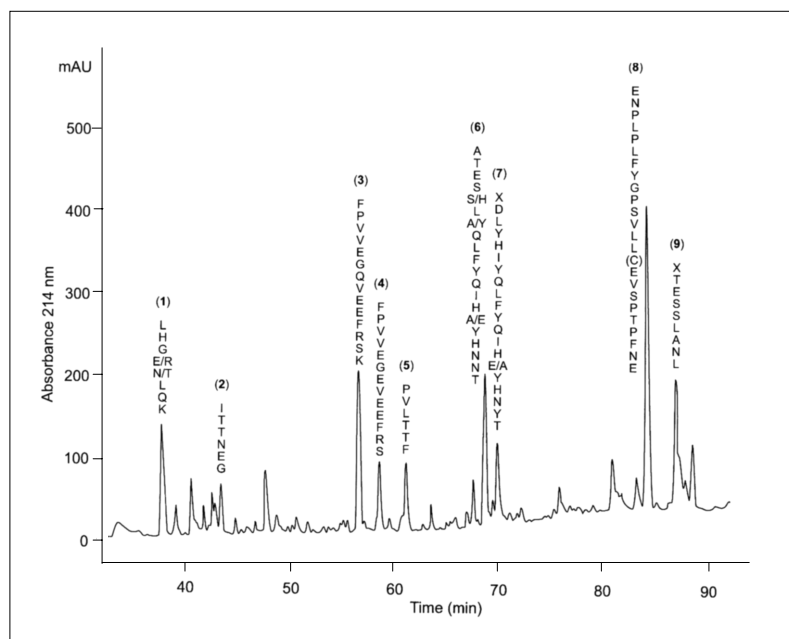


Abbildung 3.9: HPLC-Profil der aus Kartoffel Zellkulturen gereinigten THT nach LysC-endopeptidalen Verdau. Die Auftrennung und Sequenzierung wurde von Dr. R. Grimm durchgeführt (Hewlett-Packard). Die erhaltenen Peptidfragmente sind nummeriert.

Bei der Auswahl der Nukleotidsequenz der Primer wurde berücksichtigt, dass die Aminosäuresequenzen von Fragment 3 und 4 bis auf eine Differenz zwischen Glutamin (Q) und Glutamat (E) identisch waren. Aus den Peptidbruchstücken 3 bzw. 4 und 7 wurden Primer abgeleitet, die für die RT-PCR eingesetzt wurden.

Primer 4-2	5'- CC/TTCIACC/TTG/CICCC/TTCIACIACIGG - 3'
Primer 7/1-1	5'- CAC/TATITAC/TCAA/GC/TTITTC/TTAC/TCAA/GATIC - 3'

Nach reverser Transkription mit dem Primer 4-2 und nachfolgender Polymerase-Kettenreaktion des cDNA/RNA-Hybrids mit dem zusätzlichen Primer 7/1-1, wurde bei einer Anlagerungstemperatur von 42 °C bis 48 °C ein 253 kB großes Fragment erhalten, das kloniert und sequenziert wurde. Nach Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit den bekannten Peptidsequenzen wurde Homologie zu den Bruchstücken 2, 5, 8 und 9 gefunden (Abbildung 3.10). Die übereinstimmenden Bereiche sind in der Abbildung unterstrichen und nummeriert.

1	-CATATGTATCAGTTGTTTTATCAGATGCATGAATACCATAACTATACTCATTATACAA	59
	<u>I Y Q L F Y Q I H E Y H N Y T</u> H L Y K	19
	⑦	
60	AGCTACTGAGTCCTCCTTAGAAGGCTTGCTTTTTAAAGAAAATCCTCTTCCACTTTTCTA	119
20	A <u>T E S S L A N L</u> L F K <u>E N P L P L F Y</u>	39
	⑨	
120	CGGTCCATCCGTACTTCTACTTGAAGTCTCTCCAACCCCTTTTAACGAACCCAAAAATAC	179
40	<u>G P S V L L L E V S P T P F N E</u> P K <u>N T</u>	59
	⑧	
180	CACGAACGAAGGGTTCAAGCCTGTCCTTACAACGTTTGGACCTTAAATTCCCCGTCGTCGA	239
60	<u>T N E G</u> F K <u>P V L T T F</u> D L K <u>F P V V E</u>	79
	② ⑤ ③ ④	
240	GGGCAAGTCGAAG	
80	<u>G Q V E</u>	

Abbildung 3.10: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des THT-homologen RT-PCR-Fragments. Die mit den bekannten Peptiden übereinstimmenden Sequenzen sind hervorgehoben und nummeriert.

3.6 Herstellung und Screening einer cDNA-Bank

Die cDNA-Bank wurde hergestellt aus Poly A⁺ RNA, die aus Gesamt-RNA von 5 Stunden *P. infestans*-elicierter Kartoffel-Suspensionskultur isoliert wurde. Diese wurde in einer Erst- und Zweitstrangsynthese in cDNA umgeschrieben, mit *Eco RI*-Adaptoren versehen, gereinigt und in den λ gt 11/*Eco RI* CIAP-Vektor ligiert. Anschließend erfolgte die Verpackung der rekombinanten Phagen und nach Ausplattierung mit *E. coli* Y 1088-Zellen die Auffindung und Anreicherung THT-homologer DNA aus insgesamt 7×10^6 Plaque bildenden Einheiten. 111 positive Plaques wurden nach dem ersten Screen isoliert, 30 zur weiteren Gewinnung von

Einzelplaques ausgewählt. Es wurden die durch *Eco RI* geschnittenen Fragmente in pUC 18 subkloniert und in Epicurian Coli[®] XL2-Blue gebracht.

Nach Sequenzierung der Plasmidinsertionen wurden cDNA-Klone gefunden, die vollständig oder in Teilbereichen die THT kodierten. 3 THT-cDNA-Klone, die den größten Bereich an THT homologer DNA enthielten, sind in Abbildung 3.11 dargestellt.

cDNA-Klon pTHT 3	0,9 kB	5'-Startcodon (Translationsstart) vorhanden
		3'-poly A ⁺ -Bereich nicht vorhanden
cDNA-Klon pTHT 26	2,1 kB	5'-1.-5. Aminosäuren der kodierenden Region fehlten
		3'-poly A ⁺ -Bereich vorhanden
cDNA-Klon pTHT 41	0,7 kB	5'-1.-59. Aminosäuren der kodierenden Region fehlten
		3'-poly A ⁺ -Bereich vorhanden

Abbildung 3.11: Strukturvergleich von drei isolierten THT cDNA-Klonen

Der cDNA-Klon pTHT 3, der insgesamt 938 Basenpaare beinhaltete, enthielt den THT-kodierenden Bereich. Dieser wurde vollständig bidirektional sequenziert und bestand aus 747 Basenpaaren, die für 248 Aminosäuren kodierten. Die errechnete molare Masse des Proteins betrug 28,4 kDa, der isoelektrische Punkt lag bei pH 5,2. Der translatierte Bereich der in Abbildung 3.12 gezeigten Sequenz beginnt mit dem Startcodon ATG in Position 53 und endet in Position 799. Die Länge des 5'-untranslatierten Bereiches betrug 52 Basenpaare, die der 3'-untranslatierten Region 142 Basenpaare. Es wurde kein poly A⁺-Bereich gefunden.

1	TCTTTTATCTTAAACCTCAATATTCCTCTCAAACCTTAACTAAACAATATCCCATGGCTCC	60
	M A P	3
61	TGCTCCTCAACTTCCTACACCATCTGAAACAATAACCACCGATGCATCATCGGAAAAACAA	120
4	A P Q L P T P S E T I T T D A S S E N N	23
121	CAATGTTACCATCACTGAAAAGATATACACACGAGTCCGTCTGGCTACGAAATCTGATCT	180
24	N V T I T E K I Y T R V R L A T K S D L	43
181	GTCTCATATATACCAATTGTTTTATCAAATCCATGAATACCATAACTATACTCATTTATA	240
44	S H I Y Q L F Y Q I H E Y H N Y T H L Y	63
241	CAAAGCTACTGAGTCCTCCTTAGCCAACCTTGCTCTTTAAAGAAAACCCCTTCCCTTTTT	300
64	K A T E S S L A N L L F K E N P L P L F	83
301	CTACGGGCCATCCGTACTTCTACTTGAAGTCTCTCCAACCCCTTTTAAACGAACCCAAAAA	360
84	Y G P S V L L L E V S P T P F N E P K N	103
361	TACCACAAACGAAGGGTTCAAGCCTGTCCTTACAACCTTTTGACCTTAAATTCCTGTGGT	420
104	T T N E G F K P V L T T F D L K F P V V	123
421	GGAAGGACAAGTTGAGGAGTTCAGGTCCAAATATGACGATAAGAATGATGCTTACATTGC	480
124	E G Q V E E F R S K Y D D K N D A Y I A	143
481	AGGATATGCTTTCTTTTACGCTAATTATTCATGTTTCTATGACAAGCCAGGATTCTATTT	540
144	G Y A F F Y A N Y S C F Y D K P G F Y F	163
541	TGAGAGTCTTTACTTCAGAGAGAGTTATAGAAAGTTGGGAATGGGGAGTTTGTGTTTGG	600
164	E S L Y F R E S Y <u>R K L G M G S L L F G</u>	183
601	AACAGTTGCATCTATTGCTGCAACAATGGCTTCGTATCGGTAGAGGGAATAGTAGCAGT	660
184	T V A S I A A N N G F V S V E G I V A V	203
661	TTGGAATAAAAAGTCATATGATTTTTTACATAAATATGGGAGTTGAAATTTTTGATGAGTT	720
204	W N K K S Y D <u>F Y I N M G V E I F D E F</u>	223
721	TAGGTATGGCAAGTTGCATGGTGAATACTTCAAAAGTATGCTGATAAAAAAGGACGAAAA	780
224	R Y G K L H G E N L Q K Y A D K K D E N	243
781	CGGCGAAGGGAGCTGTTAGTAGAGAATGGCTTTTTTGTGTGCCTAATTGTGCAATTTATTA	840
244	G E G S C *	248
841	ATTTCTATTTGTGATTATATTGTA AAC CAGAATGCTCATTATATTTGTAATTTGAAAAT	900
901	AAAATAAAATTGGTAATTGTGATATTATATTAATCCA	938

Abbildung 3.12: *Eco* RI Fragment des Klons pTHT 3 mit der Nukleotid- und abgeleiteten Aminosäuresequenz der THT kodierenden cDNA aus Kartoffel. Homologiebereiche zu bekannten anderen Acetyltransferasen sind unterstrichen.

Für die dargestellte cDNA-Sequenz gab es nur wenige Sequenzhomologien in den vorhandenen Datenbanken. Die auf Proteinebene höchsten Gesamthomologien ergaben sich für die bisher in der Funktion unbekanntenen Proteine gi 3928087 und gi 3928086 aus *Arabidopsis thaliana*. Die Sequenzen waren zu 36 bzw. 38 % mit der in Abbildung 3.12 gezeigten identisch, die Ähnlichkeit betrug 52 bzw. 54 %. Weitere, in Abbildung 3.13 ersichtliche Homologien fanden sich gegenüber Acetyltransferasen aus *Schizosaccharomyces pombe* (Spaltheife), *Caenorhabditis elegans* (Fadenwurm) und *Homo sapiens* (Mensch). So korreliert

die für die Aktivität der genannten Transferasen essentielle Aminosäure-Teilsequenz RFGIGS (Lu et al. 1996) mit der THT-Sequenz RKLGMGS der Kartoffel-THT für die notwendigen Aminosäuren Arginin-173, Glycin-176, Glycin-178 und Serin-179 (vgl. Abbildung 3.12). Andere Sequenzhomologien bestanden in dem Bereich FYINMG (Aminosäure 211-217). Ebenso war die Anzahl der sich zwischen beiden beschriebenen Bereichen befindlichen Aminosäuren gleich (Lu et al. 1996).

	Domäne I	Abstand	Domäne II
Konsensus	U EDUUVXXXURGXGUGSXUU	22	NXPAUXUYXRUG
THT	F ESLYFRESYRKLGMGSLLF	22	NKKSDFYINMG

Abbildung 3.13: Aminosäuresequenz-Teilvergleich zwischen der von Lu et al., (1996) beschriebenen Konsensus-Sequenz für Spermidin/Spermin:*N*-Acetyltransferasen und der THT. Übereinstimmende Aminosäuren sind hervorgehoben. U –hydrophobe Aminosäure, X –beliebige Aminosäure

3.7 Expression in *Escherichia coli*

Die THT-cDNA aus Klon pTHT3 wurde über die Schnittstelle Nco I am Translationstart (CCATGG) in den Expressionsvektor Typ IV pQE-30 (QIAGEN) kloniert (siehe Kapitel Material und Methoden).

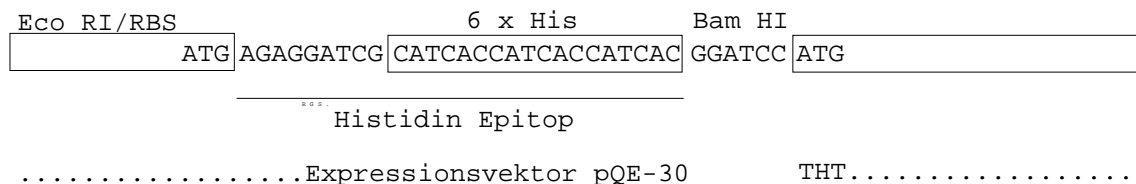


Abbildung 3.14: 5'-Bereich des in den Expressionsvektor pQE-30 klonierten, THT-kodierenden Bereiches von cDNA-Klon pTHT 3 (Translationsstart)

Der THT-Expressionsklon wurde anschließend in *E. coli* transferiert und die Expression mittels SDS-PAGE überprüft (Abbildung 3.15). Dazu wurden folgende Proteinextrakte aufgetragen: Proteinextrakte aus Bakterien mit pQE-Vektor ohne THT-Fragment (Bahn 1), Proteinextrakte aus Bakterien deren vektorkodierte Expression der THT durch den *lac*-Repressor unterdrückt wurde (Bahn 2) und Proteinextrakte aus Bakterien deren vektorkodierte Expression der THT durch IPTG induziert wurde (Bahn 3). In Bahn 4 wurde das gereinigte Protein aufgetragen. Nach Coomassie-Färbung des Gels war in den aufgetrennten Extrakten der Bahn 3, im Gegensatz zu Bahn 1 und 2, eine zusätzliche Proteinbande von etwa 30 kDa zu erkennen. Diese Molekularmasse entspricht der aus der Auftragung des gereinigten, rekombinanten Proteins in Bahn 4 erhaltenen Masse. Die rechnerisch aus dem THT-kodierenden Bereich des cDNA-Klones pTHT 3 ermittelte Molekularmasse des Proteins von 28,4 kDa wurde damit bestätigt.

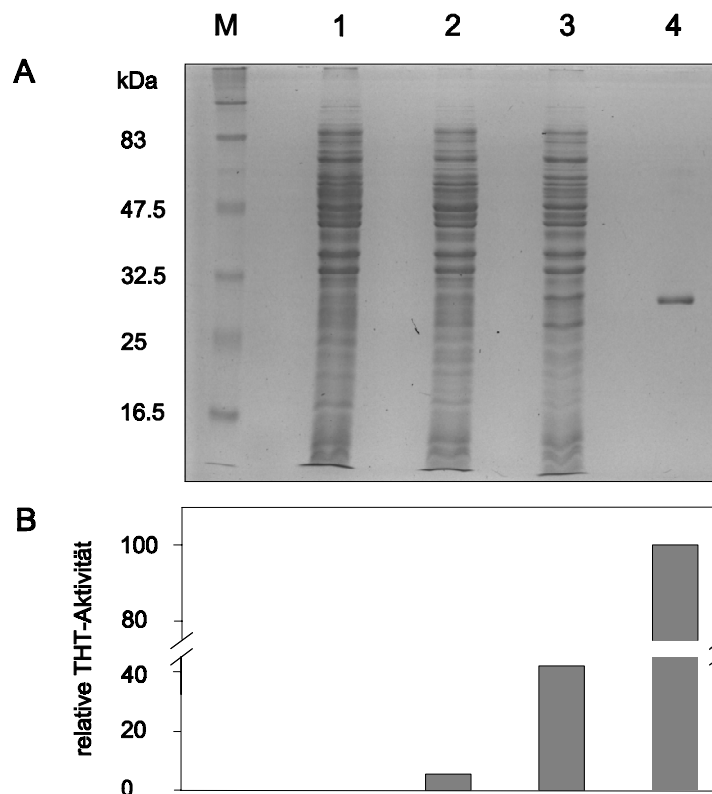


Abbildung 3.15: A - Coomassie gefärbtes SDS-PAGE Gel mit Bakterien-Proteinextrakten zum Nachweis der THT-Expression in *E. coli*

- B - Messung der THT-Enzymaktivität aus Bakterien-Proteinextrakten
- 1 - Bakterien-Proteinextrakt mit Expressionsvektor ohne THT-Fragment
 - 2 - Bakterien-Proteinextrakt mit unterdrückter Expression der THT
 - 3 - Bakterien-Proteinextrakt mit Expression der THT
 - 4 - gereinigtes, rekombinantes Protein
100 % entsprechen 73 mkat/kg Protein.
Die Proteingehalte betragen in Bahn 1-3, 10 µg; in Bahn 4, 3 µg.

Parallel zur Auftragung der Proteinextrakte erfolgte von den verwandten Bakterien-Proteinextrakten die Bestimmung der Enzymaktivität. Es wurde sowohl in Extrakten aus Bakterien, deren vektorkodierte Expression der THT durch IPTG induziert wurde, als auch der gereinigten Proteinfraction (Bahn 3 und 4) Enzymaktivität gemessen. Diese betrug 30 bzw. 73 mkat/kg Protein. Ferner konnte in Proteinextrakten, deren vektorkodierte Expression der THT durch den *lac*-Repressor unterdrückt wurde (Bahn 2), die Enzymaktivität von 5 mkat/kg Protein gemessen werden. Dies war wahrscheinlich auf eine nicht vollständige Unterdrückung der Expression durch den *lac*-Repressor zurückzuführen. Die Kontrolle des Bakterienextraktes ohne Vektorinsertion (Bahn 1) zeigte dagegen keine messbare Enzymaktivität

Die Isolierung des rekombinanten Proteins aus Bakterien-Proteinextrakten, deren vektorkodierte Expression der THT durch IPTG-induziert wurde (Abbildung 3.15, Bahn 3), erfolgte über einer Nickel-Agarosesäule. Dabei wurde die durch Chelatbindung der Histidine des Ex-

pressionsvektors (siehe Abbildung 3.14) mit den Nickelionen des Säulenmaterials gebundene THT bei etwa 250 mM Imidazol enthaltendem Waschpuffer eluiert.

3.8 Charakterisierung der rekombinanten THT

Um die Substratspezifität des rekombinanten Enzyms und der von Hohlfeld et al. (1995) aus Kartoffel-Zellkulturen gereinigten THT miteinander vergleichen zu können, wurde die kinetischen Eigenschaften der rekombinanten THT untersucht. Die Ergebnisse dieser Studien sind in Tabelle 3.2 dargestellt.

Das rekombinante Enzym akzeptierte neben Feruloyl-CoA und Cumaroyl-CoA auch die Coenzym A-Ester der Zimtsäure, Kaffeesäure und Sinapinsäure als Acyl-Donoren. Bei Verwendung von Tyramin als Akzeptor nahm die Substratspezifität von Cinnamoyl-CoA, über Feruloyl-CoA, Kaffeoyl-CoA, 4-Cumaroyl-CoA bis zu Sinapoyl-CoA ab. Vergleicht man die halbmaximale Substratsättigung (K_M), stieg diese von 0,06 mM bei Cinnamoyl-CoA, 0,1 mM bei Feruloyl-CoA, 0,14 mM bei Kaffeoyl-CoA und 0,27 mM bei 4-Cumaroyl-CoA auf 0,38 mM bei Sinapoyl-CoA. Die höchste Enzymspezifität (V_{max}/K_M) wurde ebenso für Cinnamoyl-CoA gezeigt (100 %), gefolgt von Feruloyl-CoA (47 %) und Kaffeoyl-CoA (20 %). Die Werte der anderen Ester betragen zwischen 4 und 8 %.

Als Akzeptoren der enzymatischen Reaktion wurden neben Tyramin auch Octopamin, Dopamin und Noradrenalin akzeptiert. Jeweils mit Feruloyl-CoA als Acyl-Donor war ersichtlich, dass Tyramin und Octopamin die höchste Substratspezifität besaßen, während Dopamin und vor allem Noradrenalin eher unspezifisch waren. Vergleicht man die enzymatische Spezifität (V_{max}/K_M), besaß Octopamin (100 %) die höchste, gefolgt von Tyramin (50 %), Dopamin (8 %) und Noradrenalin (2 %). Für Tyramin wurde zusätzlich die Abhängigkeit von den jeweiligen CoA-Donoren untersucht. Der halbmaximale Wert der Substratsättigung (K_M) stieg in diesem Fall von 0,04 mM bei Cinnamoyl-CoA und Feruloyl-CoA auf 0,48 mM bei Kaffeoyl-CoA, 0,77 mM bei 4-Cumaroyl-CoA und 0,93 mM bei Sinapoyl-CoA (Tabelle 3.2) an. Bezogen auf die Spezifität (V_{max}/K_M) und mit den vergleichbaren Maximalgeschwindigkeiten (V_{max}) der Donor-Kinetik berechnet, sank diese von 100 % (Cinnamoyl-CoA) und 38 % (Feruloyl-CoA) auf Werte zwischen 2 und 4% bei den anderen CoA-Estern ab.

Substrat	K_m (mM)	V_{max} (mkat/kg)	V_{max}/K_m
Donor ^a			
Cinnamoyl-CoA	0,06	55,9	932
Feruloyl-CoA	0,10	43,5	435
Kaffeoyl-CoA	0,14	26,3	187
4-Cumaroyl-CoA	0,27	21,3	78
Sinapoyl-CoA	0,38	16,1	42
Akzeptor ^b			
Tyramin			
mit Cinnamoyl-CoA	0,04		1088 ^c
mit Feruloyl-CoA	0,04		412 ^c
mit Kaffeoyl-CoA	0,48		44 ^c
mit 4-Cumaroyl-CoA	0,77		34 ^c
mit Sinapoyl-CoA	0,93		17 ^c
Octopamin	0,03	65,8	2193
Dopamin	0,43	72,4	168
Noradrenalin	2,11	85,5	40

^a Mit Tyramin als Akzeptor.

^b Mit Feruloyl-CoA als Acyl-Donor, außer bei Tyramin.

^c V_{max} von der Donor-Kinetik.

Tabelle 3.2: Substratspezifität der rekombinanten THT Enzymaktivität,

Die rekombinante THT war in ihrer Aktivität weder durch Ca^{2+} -noch durch Mg^{2+} -Zusätze zu beeinflussen. Verschiedene applizierte Konzentrationen sowie differierende Inkubationszeiten hatten keinen Einfluss auf die Enzymaktivität. Ebenso ergaben sich keine Veränderungen beim Zusatz von EGTA.

Ein definiertes pH-Optimum konnte nicht gemessen werden. Die THT besaß ihr Aktivitätsmaximum in einem pH-Bereich von 6,0 bis 9,0, die halb-maximalen Werte bewegten sich zwischen den pH-Werten 5,3 und 12,4.

Um die Molekularmasse des rekombinanten Protein zu bestimmen, wurde diese unter nicht denaturierenden Bedingungen mittels Gelfiltration ermittelt. Der zur Berechnung notwendige Verteilungskoeffizient wurde mit der Gleichung $K_{av} = V_e - V_0 / V_t - V_0$ bestimmt. V_e entsprach dabei dem Elutionsvolumen, V_t dem Gesamtvolumen und V_0 dem Ausschlussvolumen der Gelfiltrationssäule. Durch Erstellung einer Eichgeraden mit den gemessenen Verteilungskoeffizienten der Proteine Chymotrypsinogen A (25 kDa), Eieralbumin (45 kDa) und Rinderalbumin (67 kDa) konnte für die THT eine Masse von 64 kDa berechnet werden [K_{av} (THT) = 0,217]. Da sich die aus dem kodierenden Bereich der cDNA-Sequenz errechnete Masse, wie auch die gereinigte denaturierte Proteinbande aus Abbildung 3.15 etwa bei 30 kDa befand, kann somit unter rechnerischer Einbeziehung des Histidin-Epitopes (siehe Abbildung 3.14) auf eine homodimere Struktur des nativen Enzym geschlossen werden (Abbildung 3.16).

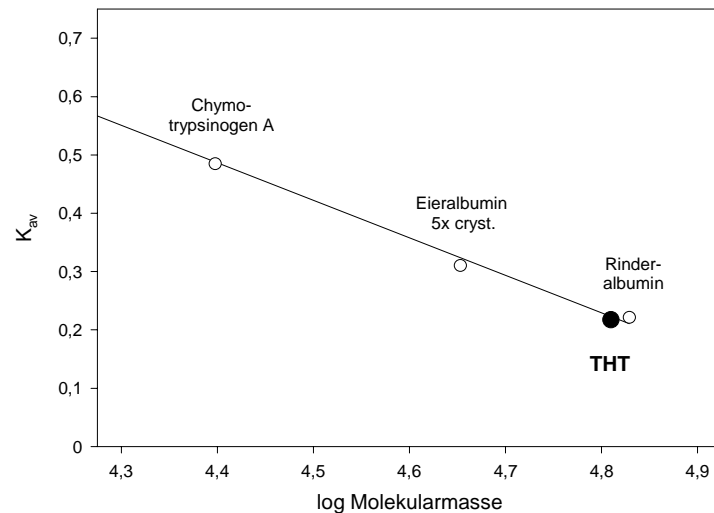


Abbildung 3.16: Bestimmung der molekularen Masse der rekombinanten THT durch Gelfiltration. Die Erstellung der Eichgeraden erfolgte mittels Bestimmung des Verteilungskoeffizienten K_{av} der Proteine Chymotrypsinogen A (25 kDa), Eieralbumin (45 kDa) und Rinderalbumin (67 kDa).

$$K_{av}(\text{THT}) = 0,217$$

3.9 Akkumulation der THT-Transkripte nach Elicitierung

Für Untersuchungen zur Akkumulation der THT-Transkripte in mit *P. infestans*-Kulturfiltrat behandelten Kartoffel-Zellkulturen, wurde nach verschiedenen Zeitpunkten RNA aus den elicitierten Zellen isoliert und in einem Northern-Blot gegen das 0,95 kB große *Eco* RI Fragment des Klons pTHT3 als Sonde hybridisiert. Wie aus Abbildung 3.17 ersichtlich, wurde eine deutliche Akkumulation der THT-Transkripte festgestellt. Die Transkript-Akkumulationsraten zeichneten einen transienten Kurvenverlauf. Charakteristisch war, dass sie bereits fünf Stunden nach Elicitierungsbeginn ihre Maxima (100%) erreichten und etwa nach 30 Stunden auf unter 20 % abfielen. Transkripte in unbehandelten Zellen, als auch in den Kontrollen waren vorhanden, veränderten ihre Mengen nach Wasserbehandlung aber nur geringfügig. Die Hybridisierung mit radioaktiv markierter, ribosomaler RNA aus Kartoffel zeigte, dass gleiche Mengen an RNA aufgetragen wurden.

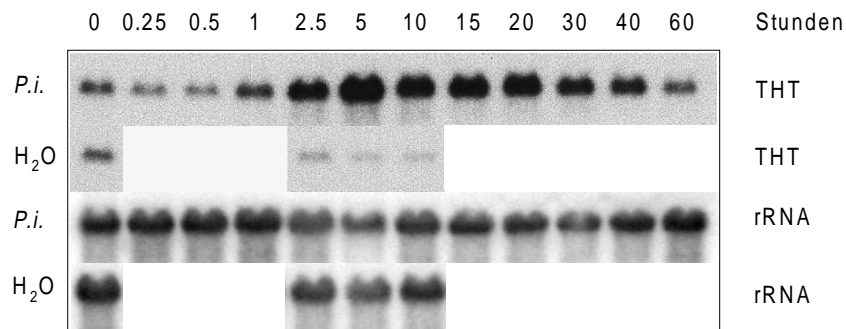


Abbildung 3.17: THT-Transkriptakkumulationen in Kartoffelsuspensionkulturen nach Behandlung mit *P. infestans*-Elicitor

P. i. - RNA aus *P. infestans*-elicitierten Zellkulturen

H₂O - RNA aus mit Wasser behandelten Kontrollzellen

Die aufgetragene Menge an Gesamt-RNA betrug 15 µg, die Filter wurden gegen das 0,95 kB-*Eco* RI THT-Fragment und gegen Kartoffel rRNA hybridisiert.

3.10 Akkumulation der PAL-Transkripte nach Elicitierung

Um neben der THT auch die Transkriptakkumulationen der PAL, dem Schlüsselenzym des nach Elicitierung induzierten Phenylpropanstoffwechsels zu untersuchen, wurde RNA aus *P. infestans*-Elicitor behandelten Zellkulturen isoliert und gegen eine PAL-Sonde aus Kartoffel hybridisiert (Abbildung 3.18). Dabei wurde ein der THT vergleichbarer, transients Kurvenverlauf gemessen. Die Akkumulationsrate der PAL-Transkripte stieg etwa eine Stunde nach Elicitierungsbeginn an, erreichte nach 2,5 bzw. 5 Stunden das Maximum, und erreichte nach 30 Stunden wieder den Ausgangswert. Die Menge der PAL-Transkripte in den Wasser behandelten Kontrollen war deutlich geringer. Die Hybridisierung mit radioaktiv markierter, ribosomaler RNA aus Kartoffel zeigte, dass gleiche Mengen an RNA aufgetragen wurden.

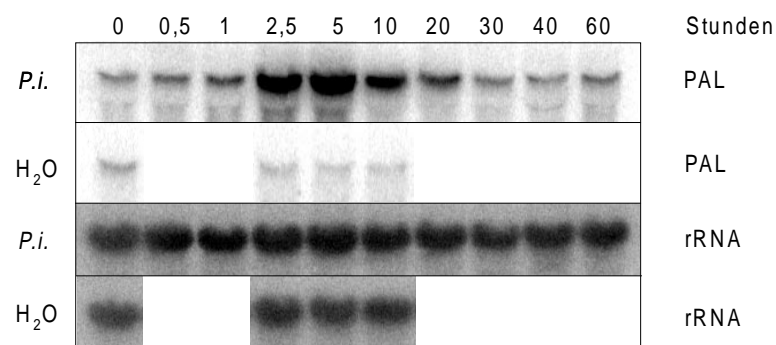


Abbildung 3.18: PAL-Transkriptakkumulationen in Kartoffelsuspensionkulturen nach Behandlung mit *P. infestans*-Elicitor

P. i. - RNA aus *P. infestans*-elicitierten Zellkulturen

H₂O - RNA aus mit Wasser behandelten Kontrollzellen

Die aufgetragene Menge an Gesamt-RNA betrug 15 µg, die Filter wurden gegen ein PAL Fragment und gegen Kartoffel rRNA hybridisiert.

3.11 Expression in Pflanzen

Im folgenden Experiment wurde die organspezifische THT-Transkriptakkumulation in der Kartoffelpflanze untersucht. Die Auswertung des Northern-Blottes zeigte, dass THT-mRNA vor allem in Wurzeln auftrat (Abbildung 3.19). Geringe Mengen an mRNA wurden in jungen und alten Blättern, dem Blattstiel, der Sprossachse und in Kartoffelknollen nachgewiesen. Keine Transkripte konnten in Blüten der Kartoffelpflanze gefunden werden. Zur Überprüfung der Menge an aufgetragener RNA wurde der verwandte Filter gegen rRNA aus Kartoffel hybridisiert. Es wurden, bis auf Ausnahme der Blüten-RNA jeweils gleiche Mengen aufgetragen.

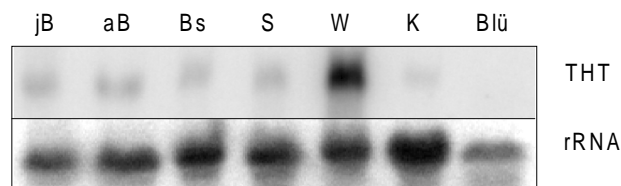


Abbildung 3.19: Organspezifische Transkriptakkumulation der THT in Kartoffelpflanzen; jB-junge Blätter, aB-alte Blätter, Bs-Blattstiel, S-Sprossachse, W-Wurzel, K-Knollen, Blü-Blüten
Die aufgetragene Menge an Gesamt-RNA betrug 15 µg, die Filter wurden gegen das 0,95 kB-*Eco* RI THT-Fragment und gegen Kartoffel rRNA hybridisiert.

In Anlehnung an die Änderungen der THT-Transkriptakkumulation in Zellkulturen nach Elicitierung mit einem Kulturfiltrat aus *P. infestans* wurde untersucht, ob auch in Pathogen-behandelten Kartoffelblättern THT-Transkripte festzustellen waren. Nach Behandlung von Kartoffelblättern mit einer Sporensuspension aus *P. infestans* wurde zu verschiedenen Zeitpunkten RNA isoliert und einer Northern-Analyse unterzogen. Es wurde eine Transkript-Mengenzunahme in Kartoffelblättern festgestellt (Abbildung 3.20). Erhöhte Transkriptmengen traten erstmals 24 Stunden nach Versuchsbeginn auf und wurden in zunehmendem Maße bis zu einer Zeitdauer von 4 Tagen gemessen. Eine weitere Beobachtung zu späteren Zeitpunkten war nicht möglich, da aus den infizierten Blättern keine undegradierete RNA mehr isoliert werden konnte. In mit Wasser behandelten Kontrollblättern wurden keine Veränderungen der Transkriptmenge festgestellt. Die Hybridisierung mit radioaktiv markierter rRNA aus Kartoffel zeigte, dass vergleichbare RNA-Mengen aufgetragen wurden.

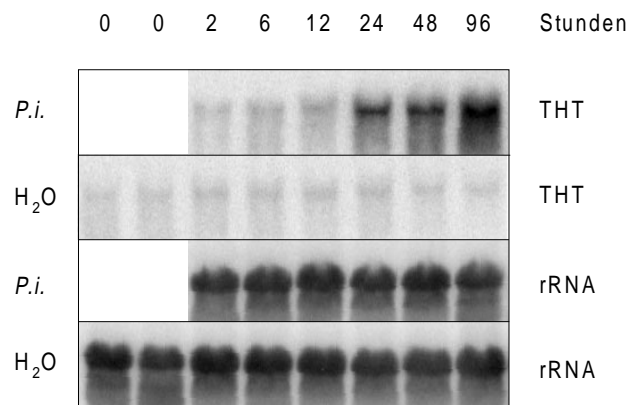


Abbildung 3.20: THT-Transkriptakkumulation in Kartoffelblättern, die mit einer Sporenlösung aus *P. infestans* behandelt wurden;
P. i. - RNA aus *P. infestans*-behandelten Blättern
 H₂O - RNA aus mit Wasser behandelten Blättern
 Die aufgetragene Menge an Gesamt-RNA betrug 20 µg, die Filter wurden gegen das 0,95 kB-*Eco* RI THT-Fragment und gegen Kartoffel rRNA hybridisiert.

In einem weiteren Ansatz konnte nach Infiltration von Kartoffelblätter mit dem Brassica-Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (*Psm*) die Existenz von THT-Transkripten gezeigt werden. Auch in dieser Nichtwirts-Pathogen-Interaktion wurde ein deutlicher Anstieg der Menge an THT mRNA festgestellt (Abbildung 3.21). Die Akkumulationsrate nahm 30 Minuten nach Inokulationsbeginn zu, besaß nach zwei Stunden ein Maximum und lag auch nach 48 Stunden über den mit Magnesiumchlorid-Lösung behandelten Kontrollblättern. Zur Überprüfung der Menge an aufgetragener RNA wurde der Filter gegen Kartoffel rRNA hybridisiert.

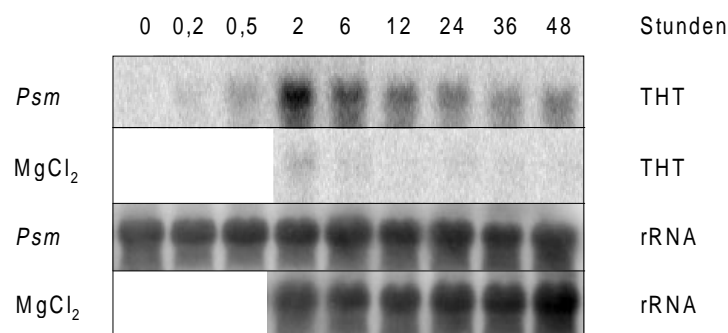


Abbildung 3.21: Transkriptakkumulation der THT in Kartoffelblättern nach Inokulation mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (*Psm*)
Psm - RNA aus *Psm* inokulierten Blättern
 MgCl₂ - RNA aus MgCl₂ inokulierten Blättern
 Die aufgetragene Menge an Gesamt-RNA betrug 15 µg, die Filter wurden gegen das 0,95 kB-*Eco* RI THT-Fragment und Kartoffel rRNA hybridisiert.

Die Kraut- und Knollenfäule kann durch *P. infestans*-Sporeninfection der Kartoffelblätter wie über sporenbefallene Knollen der Kartoffelpflanze übertragen werden. Aus diesem Grund wurde auf RNA-Ebene untersucht, ob durch eine Behandlung von Kartoffelknollenscheiben mit einer *P. infestans*-Sporenlösung Veränderungen in der THT-

Transkriptanzahl bedingt werden. Es wurde ein deutlicher Anstieg der Transkriptmenge nach Verwundung der Knollen bei der Herstellung der Knollenscheiben festgestellt (Abbildung 3.22). Es war eine deutliche Akkumulation der THT-Transkripte in den unbehandelten, 24 h nach der Präparation und unmittelbar vor Versuchsbeginn ausgelegten Kartoffelscheiben (K_2) sowie in den mit Wasser behandelten Kontrollversuchen (H_2O) zu registrieren. Zusätzlich konnte eine darüber hinausgehende, *P. infestans*-abhängige Akkumulation gefunden werden. Diese additive THT-Transkriptakkumulation konnte nur nach 6 und 12 stündiger Sporenbehandlung gemessen werden. Die Hybridisierung mit radioaktiv markierter rRNA aus Kartoffel zeigte, dass bis auf die Werte für 96 und 120 Stunden, annähernd gleiche Mengen an RNA aufgetragen wurden.

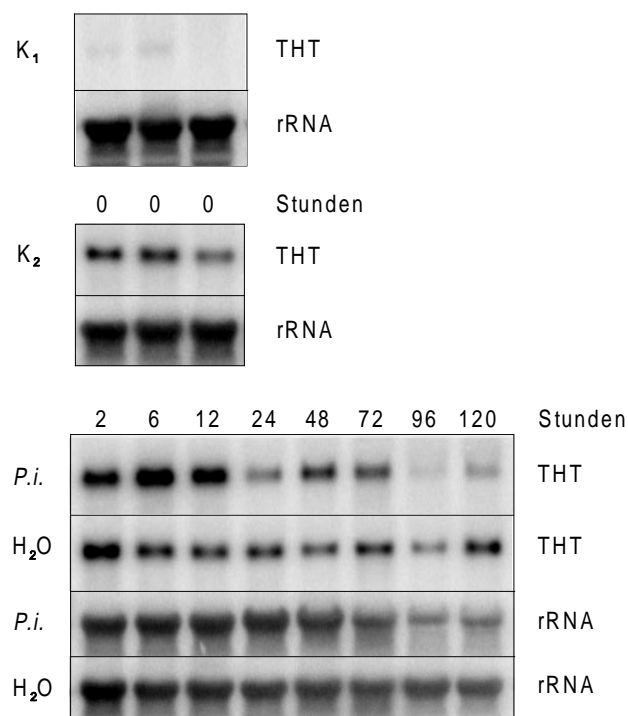


Abbildung 3.22: THT-Transkriptakkumulation in *P. infestans*-behandelten Knollenscheiben
 K_1 - RNA aus Kartoffelknollen vor Präparation der Scheiben
 K_2 - Kontroll-RNA aus Kartoffelscheiben vor *P. infestans*-Behandlung
(jeweils Dreifachbestimmung)
P. i. - RNA aus *P. infestans*-behandelten Knollenscheiben
 H_2O - RNA aus mit Wasser behandelten Kontrollversuchen
Der aufgetragene Gehalt an Gesamt-RNA betrug 20 μg , die Filter wurden gegen das 0,95 kB-*Eco* RI THT-Fragment und gegen Kartoffel rRNA hybridisiert.

Um zu untersuchen, ob auch eine Verwundung ähnliche Veränderungen im Muster der Genaktivierung hervorruft, wie sie von mit Pathogenen behandelten Pflanzen bekannt sind, wurden Kartoffelblätter durch Quetschen verwundet, nach verschiedenen Zeitpunkten RNA isoliert und einer Northern-Analyse unterzogen. Es konnten zu allen Zeiten deutliche Zunahmen der THT-Transkriptmengen festgestellt werden (Abbildung 3.23). Dies äußerte sich in einer deutlichen Transkriptakkumulation bereits 3 Stunden nach Versuchsbeginn, die auch nach 24 Stunden nicht signifikant abnahm. Im Gegensatz dazu konnte in nicht verwundeten

Blättern von verwundeten Pflanzen keine zusätzliche Anzahl an THT-mRNA gefunden werden. Zur Überprüfung des aufgetragenen RNA Gehaltes wurde zusätzlich gegen Kartoffel rRNA hybridisiert.

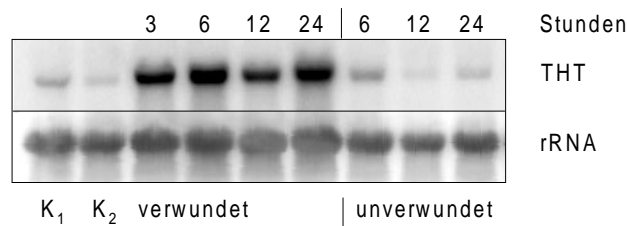


Abbildung 3.23: THT-Transkriptzunahme in Kartoffelblättern nach Verwundung
 K₁ - RNA unverwundeter Pflanzen vor Versuchsbeginn
 K₂ - RNA unverwundeter Kontrollpflanzen nach Versuchsende
 verwundet - RNA verwundeter Blätter
 unverwundet - RNA unverwundeter Blätter verwundeter Pflanzen
 Der aufgetragene Gehalt an Gesamt-RNA betrug 20 µg, die Filter wurden gegen das 0,95 kB-*Eco* RI THT-Fragment und Kartoffel rRNA hybridisiert.

Pflanzenhormone können an der durch Pathogenbefall ausgelösten Signalkaskade direkt oder indirekt beteiligt sein. Untersuchungen auf RNA-Ebene zeigten, dass eine konzentrationsabhängige Aufnahme von Arachidonsäure, Abscisinsäure und Methyljasmonat in einzelne Kartoffelblätter zu einer von der Inkubationszeit abhängigen, verstärkten Induktion der THT-mRNA-Synthese führt (Abbildung 3.24). Diese war jeweils 6 Stunden nach Versuchsbeginn maximal und sank nach 24 Stunden auf den Wert des Kontrollversuches ab. Die Transkriptmengen nach Applikation von 100 µM lagen über denen der Behandlung mit 10 µM. Die grösste Transkriptmengen konnte nach 6 Stunden Abscisinsäure-Behandlung (100 µM) registriert werden, bei Arachidonsäure und Methyljasmonat war sie dagegen ähnlich. Die Applikation von Salicylsäure zeigte ebenso wie die von 5 %iger Saccharose-Lösung (w/v) keinen induzierenden Einfluss auf die THT-mRNA Transkription. In den Ausgangsblättern (Doppelbestimmung) und dem mit Wasser durchgeführten Kontrollversuch wurde kein Effekt beobachtet. Anhand der Hybridisierung mit radioaktiv markiertem Proteinase Inhibitor II (PIN II)-Fragment (Sanchez-Serrano et al., 1986), welches nach Abscisin- und Jasmonatbehandlung in Pflanzen induziert ist (Hildmann et al., 1992; Dammann et al., 1997) konnte die Versuchsdurchführung kontrolliert werden. Durch die Hybridisierung mit radioaktiv markierter rRNA wurde die aufgetragene Menge an RNA überprüft.

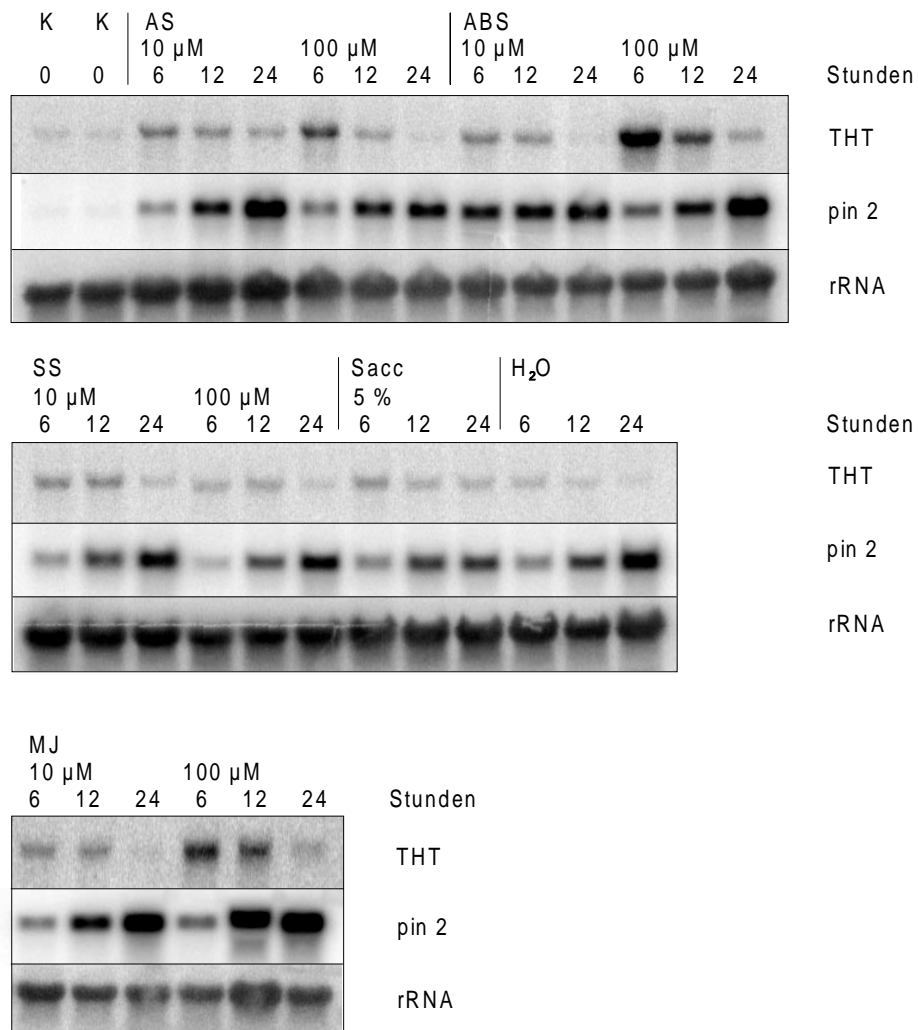


Abbildung 3.24: Zunahme der THT-Transkriptmenge in Kartoffelblättern nach Hormonbehandlung

ABS - RNA nach Applikation von (+)-cis,trans Abscisinsäure

AS - RNA nach Applikation von Arachidonsäure

MJ - RNA nach Applikation von \pm Methyljasmonat

SS - RNA nach Applikation von Salicylsäure

Sacc - RNA nach Applikation von 5% (w/v) Saccharose-Lösung

H₂O - RNA nach Applikation von Wasser als Kontrollversuch

K - Kontroll RNA vor Versuchsbeginn (Doppelbestimmung)

Kartoffelblätter wurden abgeschnitten und in Lösungen (10 bzw. 100 μ M) für die angegebenen Zeiten inkubiert.

Die aufgetragene Menge an Gesamt-RNA betrug 25 μ g, die Filter wurden gegen das 0,95 kB-*Eco* RI THT-Fragment, gegen ein PIN II-Fragment sowie gegen Kartoffel rRNA hybridisiert.

Der Einfluss von Trockenstress führte im Gegensatz dazu nicht zu einer Erhöhung der THT-Transkriptmenge. Die Blätter der Kartoffelpflanze zeigten nach 14-tägigem Trockenstress keine Veränderungen in der THT-mRNA Synthese (Daten nicht gezeigt).

3.12 Genomischer Southern-Blot

Um die Struktur der THT-kodierenden Gene zu analysieren, wurde ein genomischer Southern-Blot durchgeführt (Abbildung 3.25). Nach DNA-Verdau mit den Restriktionsenzymen *Bam* HI, *Eco* RI, *Hind* III, *Xba* I und anschließender Hybridisierung mit THT-homologer Sonde waren verschiedene Banden zu erkennen. Dies zeigt, dass die THT in Kartoffelpflanzen durch eine Multigen-Familie kodiert wird.

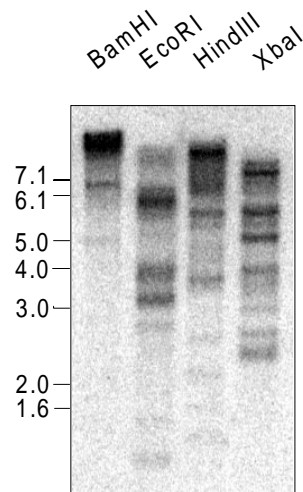


Abbildung 3.25: Genomischer Southern Blot des THT-Gens
DNA junger Kartoffelblätter wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam* HI, *Eco* RI, *Hind* III, *Xba* I behandelt, geblottet und gegen das 0,95 kB-*Eco* RI THT-Fragment hybridisiert. (aus Schmidt et al., 1999)

3.13 Screening einer genomischen Bank

Um genomische THT-Sequenzen zu wurde eine genomische Bank aus Kartoffel nach der THT gescreent. Es wurde die aus 2 Monate alten Kartoffelblättern gewonnene genomische DNA in EMBL3SP6/T7 kloniert. In der ersten Anreicherung konnten 66 THT-positive Plaques selektiert werden, die Nummern 1-20 wurden zur Gewinnung von Einzelplaques ausgewählt. Aus Plaque Nr. 10 wurde DNA isoliert und einer Restriktionsanalyse unterzogen. Ein 4,5 kB großes *Eco* RI-Fragment wurde in pUC 18 subkloniert. Anschließend erfolgte die Transformation von *E. coli* DH5 α (siehe Material und Methoden).

Der genomische Subklon genTHT 10 wurde einer Restriktionsanalyse unterzogen und anschließend über 5'-*Hinc* II / *Eco* RI-3' und einer Größe von 3,7 kB religiert. Das 3'-Ende befand sich in Position der Aminosäure 129 des THT-translatierten Bereiches (vgl. Abbildung 3.12). Der in Abbildung 3.26 dargestellte Sequenzbereich beinhaltet die Sequenz der ersten 890 sich in 5'-Richtung an den THT-translatierten Bereich anschließenden Nukleotide.

-892	TCCATGGCTCCTGCTCCTCAACTTTCTACTCCATCTGAAACAATAGCCAC	-842
-841	CGATGCATCATTGGAAAGCAACAACGTTACCATTACTGGAAACATATACA	-791
-790	CACGAGTCCGTCTGGCTACGAAATCTGATCTGTCTCATATATACCAATTG	-740
-739	TTTTATCAAATCCATGAATATCATAACTATACTCATTTATACAAAGCTAC	-689
-688	TGAGTCCTCCTTAGCTAACTTGCTCTTTAAAGAAAACCTCTTCCACTTT	-638
-637	TCTATGGGCCATCCATACTTATACTTGAAGTCTCTCCAAGTATATCTTAA	-587
-586	AAAGAGTATATCTTTATGGACTTTTTTTGCGAAACAACCTGAGACCCAACA	-536
-535	TAAGTAAAATGTTGATAGCATTATTAATTTTACAATGTGTTCATTATTCA	-485
-484	CGAACTAACTAAAAATCAAAACGTGTCATATAAAATTCAGATAGAAAATAGT	-434
-433	TAATTACTATTCCCTCCGTTTCAGTTTTCTTGTCACTGTTTGACTTGACAT	-383
-382	ACCCATTAAGAAAATAATTATTGATAAATGTATTTTATCAAACCTATCCCT	-332
-331	ATTAAATGATACTTAATATTAGGTCTTGAAAAATGATTTAGAAAATATGT	-281
-280	ATTTAATGGTGAGGATAAAATATAGAAAAAATAATTATCTTTTCTTAAT	-230
-229	<u>AAGTTAAAAGGAACAAGTAAAAATGAAAATCTATTATAAAAATAAATGACA</u>	-179
-178	AGTAAAATGAACGAAAGTAGTATCAACTACATAAAATTTGGTGCCAAAAGGC	-128
-127	CAAACCAATTGCATCAATGACTCGACCCTATAGAACGCACGTCAGAGTTG	-77
-76	TCCTCCACCAACCATAACCAACATTTTTTTATTGTTGGAAAATCCAGTACT	-26
-25	TATCCCATGGCTCCTGCTCCTCATT CTTTTTATCTTAAACCTCAATATTC	+ 25
+ 26	CTCTCAAACCTTAACTAAACAATATCCCATG	+ 55

Abbildung 3.26: Genomische Teilsequenz des Klons genTHT 10
Die Nummerierung bezieht sich auf den cDNA Klon pTHT 3 (Abbildung 3.12), die übereinstimmende Sequenz bis zum THT Translationsstart ist hervorgehoben. Homologiebereiche zum PAL-Promotor aus Tomate und zu Regionen des 70b PR1a Promotors sind unterstrichen.

Nach Sequenzvergleich in den zur Verfügung stehenden Datenbanken wurden für diese genomische Teilsequenz partielle Homologien auf Nukleotidebene festgestellt. Die Nukleotide -244 bis -181 zeigten 77% Übereinstimmung zum Sequenzbereich 595-534 des PAL-Promotors aus Tomate sowie 78 % Homologie zu Bereichen des 70b PR1a Promotors (Abbildung 3.26).

3.14 Analyse transgener THT-sense Pflanzen

Transgene THT-sense Kartoffelpflanzen könnten auf Grund ihrer verstärkten THT Expression resistent gegenüber dem Befall mit *P. infestans* sein.

Um Resistenzstudien vorzubereiten, ist es in einer vorherigen Analyse notwendig, die transgenen Pflanzen auf den Ebenen der Transkription und Translation bezüglich der zusätzlich exprimierten THT zu testen.

Die Pflanzen, die den THT-kodierenden Bereich in 5´-3´ Orientierung (*sense*) hinter einem 35S-Promotor enthielten, wurden im Labor von Frau Dr. Rosahl angefertigt (siehe Kapitel Material und Methoden).

Fünf Kartoffelkeimlinge, die auf Hygromycin enthaltendem Nähragar wuchsen, wurden in Erde ausgepflanzt und nach zwei Wochen Wachstum auf Northern- und Southern-Ebene untersucht. Es konnten nach *Eco* RI-Verdau zusätzliche THT-Transkripte bzw. ein THT-DNA Fragment von etwa 1 kB in den transgenen Pflanzen Nr. 35 und 54 nachgewiesen werden (Abbildung 3.27). In der Kontrollpflanze sowie in den Pflanzen Nr. 4, 44 und 47 wurde keine zusätzlichen Hybridisierungen festgestellt.

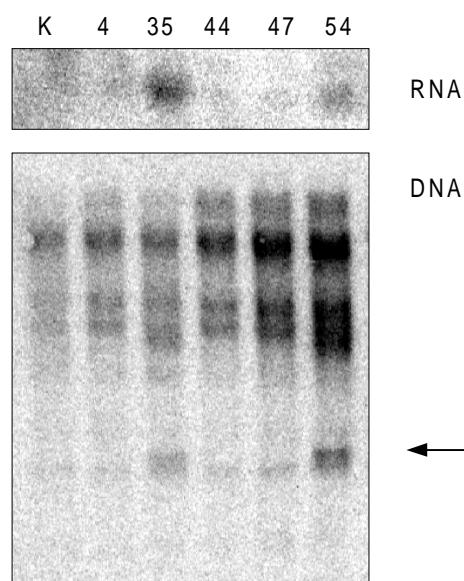


Abbildung 3.27: Akkumulation von THT-Transkripten und THT-DNA Fragment in verschiedenen transgenen Kartoffelpflanzen.
 K -RNA bzw. DNA aus Kartoffelpflanzen (Wildtyp)
 4-54-RNA bzw. DNA aus THT-transgenen Kartoffelpflanzen
 Die Menge an aufgetragener RNA betrug 15 µg. Die Filter wurden gegen das 0,95 kB-*Eco* RI THT-Fragment hybridisiert.

Der Nachweis des THT-Proteins in den transgenen Pflanzen Nr. 35 und 54 mittels „Western“-Analyse des geblottetem SDS-Proteingels mit polyklonalem Antikörper (Ig Y) aus Hühnereiweiß bzw. Kaninchenantiserum (Ig G) konnte auf Grund der zu geringen Spezifität der jeweils verwendeten Antiseren nicht erfolgen.

Die Messung der Enzymaktivität in Blättern mittels Detektion der Reaktionsprodukte durch HPLC-Analyse erbrachte keinen signifikanten Unterschied zwischen transgenen Kartoffelpflanzen und der Kontrolle. In allen untersuchten Blättern wurde THT-Aktivität zwischen 0,5 und 1,0 mkat/kg Protein gemessen. Es konnten keine Differenzen zwischen den untersuchten Pflanzen festgestellt werden. Auf eine graphische Darstellung wurde aus diesem Grund verzichtet.

Parallel zu den Versuchen an Kartoffelpflanzen wurde THT-transgener Tabak (*Nicotiana tabacum*) auf eine erhöhte Expression des Enzyms hin untersucht. Diese Pflanzen wurden im Labor von Frau Dr. Rosahl angefertigt (siehe Kapitel Material und Methoden).

Es wurden THT-Transkripte in den Pflanzen Nr. 2, 3 und 6 nachgewiesen (Abbildung 3.28). In den Kontrollpflanzen sowie in den Pflanzen Nr. 1, 4, 5 und 7 konnte im Gegensatz dazu keine Akkumulation festgestellt werden.

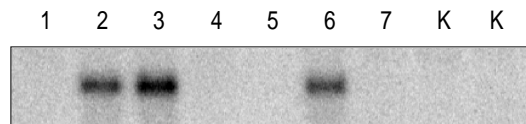


Abbildung 3.28: THT-Transkriptakkumulation in sense-Tabakpflanzen
 K - RNA aus Tabakpflanzen (Wildtyp; Doppelbestimmung)
 1-7 - RNA aus THT-transgene Tabakpflanzen
 Die Menge an aufgetragener RNA betrug 15 µg. Die Filter wurden gegen das 0,95 kB-*Eco* RI THT-Fragment hybridisiert.

Die Messung der Enzymaktivität in Blättern erbrachte keinen Unterschied zwischen den transgenen THT Tabakpflanzen und der Kontrolle. Es konnte THT-Aktivität von 0,5-1,0 mkat/kg Protein festgestellt werden, die allerdings nicht in ausreichendem Maße zwischen Versuchspflanzen und Kontrolle differierte (nicht graphisch dargestellt).

3.15 THT-Transkriptakkumulation in Tomate

Die Existenz der THT ist in der Literatur vor allem in den Solanaceen Kartoffel, Tabak und Tomate beschrieben worden. Es wurde daher in einem zusätzlichen Experiment untersucht, ob eine THT-Transkriptererkennung auch in Tomatenpflanzen (*Lycopersicon esculentum* Mill.) gezeigt werden kann. In organspezifischen Untersuchungen wurde eine erhöhte Transkriptmenge in der Wurzel festgestellt (Abbildung 3.29). Im Gegensatz dazu konnten in Blättern und im Blattstiel weniger THT-Transkripte sowie kein Transkript in der Sprossachse registriert werden.

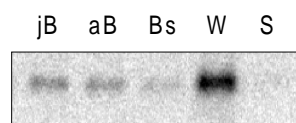


Abbildung 3.29: Organspezifische Transkriptakkumulation der THT in Tomatenpflanzen;
 jB-junge Blätter, aB-alte Blätter, Bs-Blattstiel, W-Wurzel, S-Sprossachse
 Die Menge an aufgetragener RNA betrug 15 µg. Die Filter wurden gegen das 0,95 kB-*Eco* RI THT-Fragment hybridisiert.

3.16 Patentanmeldung

Aufgrund der möglichen Pathogenresistenz THT-transgener Kartoffelpflanzen wurde beantragt, diese patentrechtlich zu schützen.

Die Antragstellung erfolgte in Kooperation des IPB Halle mit BIOPLANT GmbH, Ebsdorf.

4 Diskussion

4.1 Akkumulation phenolischer Verbindungen

Die Analyse der in Kartoffelzellkulturen akkumulierenden phenolischen Verbindungen erfolgte in Anlehnung an die Untersuchungen von Hohlfeld (1998) bzw. Keller (1990). Das Hauptaugenmerk galt dem elicitierungsabhängigen Nachweis der Akkumulation von Hydroxycinnamsäureamiden als Reaktionsprodukte der Hydroxycinnamoyl-CoA:Tyramin *N*-Hydroxycinnamoyltransferase (THT).

In bisher durchgeführten Studien ist in Solanaceen eine Vielzahl von phenolischen Verbindungen beschrieben worden, die als Reaktion auf Elicitorbehandlung oder Pathogenbefall gebildet werden. Dies trifft u. a. für Säuren (z.B. 4-Cumarsäure, Ferulasäure, Benzoessäure), Hydroxycinnamsäure-Konjugate (Chlorogensäure, Kaffeesäure-3- β -glucosid), Aldehyde (4-Hydroxybenzaldehyd, Vanillin) und Amide (4-Cumaroyltyramin, 4-Cumaroyloctopamin, 4-Cumaroylputrescin) zu, die in Kartoffelpflanzen beschrieben wurden (Paynot et al., 1983; Malmberg & Theander, 1984; Martin-Tanguy, 1985; Beimen et al., 1992). Eine detaillierte Literaturübersicht der in diesem Zusammenhang bisher detektierten Derivate ist bei Hohlfeld (1998) ersichtlich. In dieser, wie auch in der vorliegenden Arbeit, wurden allerdings in Zellkulturen geringe Abweichungen im Gehalt gegenüber Pflanzen festgestellt. Dieser Fakt ist nicht ungewöhnlich, da zwar Zellkulturen aus Blättern kultiviert werden, aber trotzdem nur ein *in vitro* Modellsystem für die Gesamtpflanze darstellen. Zellkulturen und Pflanzen scheinen trotz der genannten Schwankungen bei den phenolischen Verbindungen in ihrer Pathogenreaktion vergleichbar zu sein. In diesem Zusammenhang zeigten speziell Keller et al. (1996), dass pilzinfizierte Kartoffelblätter sowie elicitorbehandelte Zellkulturen gleiche Inhaltsstoffe akkumulieren.

Bei den durchgeführten Untersuchungen zur Akkumulation von phenolischen Verbindungen nach Kulturfiltrat-Elicitierung wird zwischen Methanol-löslichen Substanzen und Zellwandhydrolysaten unterschieden.

4.1.1 Lösliche Phenole

Bei der Analyse der nach Elicitierung akkumulierenden löslichen Phenole wurden Unterschiede im Vergleich zur Literatur festgestellt. In dieser werden als Hauptvertreter dieser Stoffklasse Chlorogensäure (5-*O*-Kaffeoylchinchoninsäure) (Clifford, 1999), die freien Hydroxycinnamsäuren, 4-Cumarsäure, Ferulasäure, deren Amide, sowie Vanillin (3-Methoxy-4-Hydroxybenzaldehyd) und 4-Hydroxybenzaldehyd beschrieben. Die Akkumulation dieser Substanzen konnte Hohlfeld (1998) in Kartoffel-Zellkulturen der Sorte Datura allerdings ebenfalls nicht bestätigen. Ihm gelang neben der Identifizierung von Kaffeoyl- und Feruloyl-

putrescin, Feruloylaspartat, 4-Cumaroyl- und Feruloyltyramin der erstmalige Nachweis von Arbutin (4-*O*- β -Glucopyranosylhydrochinon), 4-Hydroxybenzoesäure-Glucosid, Vanillinsäure-Glucosid (3-Methoxy-4-*O*- β -Glucopyranosylbenzoat), sowie von Salicylsäure-Glucosid (2-*O*- β -Glucopyranosylbenzoat). In der vorliegenden Arbeit konnte dagegen die Existenz von 4-Hydroxybenzoesäure-Glucosid, Vanillinsäure-Glucosid, sowie 4-Cumaroyltyramin und Arbutin gezeigt werden. Nur bei den zwei letztgenannten Verbindungen konnte eine zeitliche Akkumulation innerhalb des gesamten Versuchszeitraumes beobachtet werden. Das ist ungewöhnlich, da unter anderem Hohlfeld (1998), Keller (1990) und Keller et al. (1996) eine wesentlich größere Anzahl unterschiedlicher Verbindungen sowohl in Zellkulturen als auch in Kartoffelblättern nachweisen konnten. Ebenso beschrieben Martin-Tanguy et al. (1978) das ubiquitäre Vorkommen der Hydroxyzimtsäureamide im gesamten Pflanzenreich. Allerdings wurde die Kartoffelsorte Desirée erstmalig analysiert. Daraus resultierende sortenspezifische Differenzen im Akkumulationsmuster sind somit erklärbar. Ebenso unterliegen Zellkulturen jahreszeitlich bedingten Schwankungen in der Pathogen-Induzierbarkeit, so dass zudem die Heterogenität der äußeren Systembedingungen Änderungen im Metabolitenmuster bedingen kann.

Hydroxyzimtsäureamide sind die einzigen Verbindungen des Sekundärstoffwechsels, die in löslicher oder zellwandgebundener Form in allen Pflanzenteilen der Kartoffelpflanze nachgewiesen wurden. Die im Gegensatz zu den löslichen Phenolen andersartige Akkumulation in der Zellwand, die nachfolgend betrachtet wird, deutet allerdings auf ein mit Keller et al. (1996) vergleichbares Verhalten der Zellkultur nach Pathogenbefall hin. Aus diesem Grund könnte auch eine erhöhte Einbaurrate in die Zellwände der Zellsuspensionskultur, die beobachteten, unter der Nachweisgrenze liegenden Akkumulationsraten der löslichen Phenole bedingen.

4.1.2 Zellwandgebundene Phenole

Im Vergleich zu den löslichen Verbindungen wurde bei den zellwandgebundenen Verbindungen eine Akkumulation der am häufigsten in der Literatur beschriebenen Substanzen registriert. In der vorliegenden Arbeit konnten insgesamt acht verschiedene Verbindungen detektiert werden. Neben Hydroxybenzoesäure und 4-Hydroxybenzaldehyd traf das für die Hydroxyzimtsäureamide 4-Cumaroyl- und Feruloyltyramin sowie 4-Cumaroyl- und Feruloyloctopamin zu. In geringeren Mengen wurde Vanillin gefunden. Damit wurde die von Clarke (1982) erstmals beschriebene, elicitierungsabhängige Akkumulation dieser Substanzen in der Zellwand bestätigt. Im Gegensatz zu Hohlfeld (1998), konnten erstmalig in Zellkulturen der Kartoffelsorte Desirée die Octopamin-Derivate Cumaroyloctopamin und Feruloyloctopamin gefunden werden. Die nach Elicitierung erreichten maximalen Stoffmengen aller Verbindungen sind vergleichbar. Eine der Hauptkomponenten, 4-Hydroxybenzaldehyd, erreichte

bei Keller et al. (1996) und Hohlfeld (1998) Stoffmengen zwischen 50 und 70 nmol/g Frischgewicht. Weitere Übereinstimmungen mit den Literaturdaten bestehen bei den für 4-Cumaroyltyramin und Feruloyltyramin erhaltenen Werten. Diese differieren zwischen 2,3 und 4 nmol/g Frischgewicht.

Wie kann die Inkorporation der beschriebenen Verbindungen in die Zellwand erfolgen? Prinzipiell erfolgt die Quervernetzung von Hydroxyzimtsäuren sowie der entsprechenden Amide über kovalente Bindung an Carboxyl- und phenolische Gruppen. Die Verbindungen werden über Ether- oder/und Esterbindung an Polysaccharide wie Arabinoxylane, Xyloglucane, Pectin und Lignin fest in der Zellwand verankert (Iiyama et al., 1994; Ikegawa et al., 1996; Franke et al., 1998; Baucher et al., 1998). Ein in diesem Zusammenhang entscheidendes Enzym könnte die Feruloyltransferase sein, die in Mikrosomen von Petersilie-Zellkulturen Ferulasäure auf Polysaccharide wie Pectin überträgt (Meyer et al., 1991).

Es ist weiterhin bekannt, dass Hydroxyzimtsäuren Dimere bilden (Ralph et al., 1997; Brett et al., 1999), die entweder direkt in die Zellwand eingebaut werden können, oder durch Peroxidasen oder Wasserstoffperoxid in Dehydrodimere umwandelbar sind (Negrel et al., 1996; Hatfield & Ralph, 1999; Kroon et al., 1999). Dehydroferulate und deren Amide besitzen nun ebenso wie Ferulasäure die Möglichkeit, über die erwähnten Ester- bzw. Ether-Brücken Zellwand-Polysaccharide mit Lignin zu vernetzen, was bisher u. a. in Bambussprossen und Tabak gezeigt werden konnte (Ishii, 1991; Ralph et al., 1997). Als Modell der pflanzlichen Zellwand könnten auch Weizenkleie und Zuckerrübenbrei gelten. In diesen Systemen wurde die Existenz von Esterbindungen u.a. nach Behandlung mit den Dihydroferulat abspaltenden Feruloyl-Esterasen gezeigt (Kroon et al., 1999). Dihydroferulate in den Formen 8-O-4', 8-5', 5-5' und 8-8' wurden nach alkalischer Verseifung aus Maiskleie isoliert, könnten also ebenso in die Zellwand eingebaut sein (Saulnier & Thibault, 1999). Zusätzlich zu den genannten Bindungsformen von Hydroxyzimtsäuren und -amiden in die Zellwand wird die Möglichkeit in Erwägung gezogen, dass diese Verbindungen über Tyrosin- und Cystein-Reste Zellwand-Proteine binden und somit zu einem Stabilitätsgewinn der Zellwand beitragen können (Iiyama, 1994). Eine andere Art der chemischen Bindung außer der dargelegten Ether- und Esterbindungen scheint für Mono- sowie Dimere gleichermaßen unwahrscheinlich.

Chemische Modifikationen könnten eine Teilfunktion innerhalb der Pflanzenzellwand gegenüber dem Angriff eines pathogenen Pilzes besitzen. In der Literatur wurde allerdings bisher nur für Feruloyltyramin eine inhibitorische Wirkung auf das Wachstum des Mykorrhizapilzes *Glomus intraradices* beschrieben (Grandmaison et al., 1993). Das Ergebnis erscheint für pathogene Pilze allerdings nur bedingt übertragbar. So konnte zum einen mit dem von uns durchgeführten Mikrobiotest nach Applikation der isolierten Verbindungen keine Inhibierung des Wachstums des Pilzes *Cladosporium cucumerinum* festgestellt werden. Ebenso wurde bei Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen kein fungitoxischer Einfluss von

4-Cumaroyltyramin, Feruloyltyramin und Feruloyl-3'-Methoxytyramin auf *Botrytis allii* in Zwiebel gefunden (Keller, 1990; McLusky et al., 1999). Isolierte, freie Hydroxyzimtsäureamide scheinen also keinen Einfluss auf das Pathogenwachstum zu besitzen. Ihre Wirkung könnte aber im Komplex mit der Zellwand auf einer Abgrenzung gegenüber dem Pathogen und einer Behinderung dessen weiteren Wachstums beruhen. Diese Art Barriere wird in einer Vielzahl von Publikationen erwähnt. (Prell, 1996; Heitefuss, 1997; Schlösser, 1997). Dabei beeinflusst neben der Quantität der phenolischen Verbindungen wahrscheinlich auch die Qualität, d.h. die Struktur oder die Art des Einbaus der Substanzen deren fungistatische Wirkung. In diesem Zusammenhang muss eine These von Friend Erwähnung finden, die wahrscheinlich eine der Hauptprinzipien der Zellwandlyse darstellt. Als Voraussetzung wird angenommen, dass z.B. im Kartoffelpektin die Hydrolyse der als Galaktan 1,4 verknüpften β -D-Galaktopyranose-Einheiten durch β -1,4-Galaktosidaseaktivität von *P. infestans* messbar ist. In den Fällen, in denen das Galaktan an der C₂- bzw. C₃-Hydroxylgruppe verestert ist, stellt es allerdings kein Substrat der Pathogen-Galaktosidase mehr dar (Friend, 1976; Ampomah & Friend, 1988). Ein hoher Phenolgehalt in Verbindung mit der Veresterung bestimmter pathogener "Signalgruppen" könnte also analog diesem Beispiel zum Schutz vor proteolytischen Enzymen beitragen. Die chemischen Verbindungen wären als solche also nicht fungistatisch, würden aber nach Einbau in der Zellwand eine vergleichbare Wirkung ermöglichen. Zusätzlich wäre es in diesem Zusammenhang auch denkbar, dass für das Pilzwachstum notwendige Erkennungssignale der pflanzlichen Zellwand maskiert werden. Pilzhyphen infizieren zielgerichtet pflanzliche Zellen (Freytag et al., 1994), so dass entsprechende Regionen der Signalperzeption vorhanden sein müssten.

Eine Dimerisierung der Hydroxyzimtsäure-Derivate scheint in vergleichbarer Form zum Schutz der pflanzlichen Zellwand beizutragen. Diese Form der chemischen Modifikation wird gegenüber der Suberinisierung und Lignifizierung als weniger zeitaufwendig dargestellt wird (Ralph et al., 1998). Aus diesem Grund ist die Bildung von Dimeren der Polymerisierung zeitlich vorgelagert und könnte so eher Einfluß auf das Pathogen ausüben.

In diesem Zusammenhang wären die ersten Ansätze zur fungistatischen Wirkung von Zellwandmaterial zu sehen, die durch den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Mikrobiotest gezeigt wurden. Im Gegensatz zu isolierten Hydroxyzimtsäureamiden und dem Anzuchtmedium hatte in diesem Versuch nur Zellwandmaterial von elicitierten Zellkulturen einen Einfluss auf das Wachstum des als Testpilz fungierenden *C. cucumerinum*.

Letztendlich muss aber betont werden, dass ein schlüssiger Beweis für die postulierten fungistatischen Eigenschaften der akkumulierten Verbindungen oder der damit bedingten Modifikationen der pflanzlichen Zellwand noch aussteht.

4.1.3 Phenolakkumulation im Anzuchtsmedium

Zusätzlich zu den löslichen sowie den Zellwand-gebundenen phenolischen Verbindungen wurde das Anzuchtsmedium untersucht. Nachdem darin bereits Keller et al. (1996) und Hohlfeld (1998) die Akkumulation von Hydroxyzimtsäureamiden gezeigt haben, wurde dies ebenso für Zellkulturen der Kartoffelsorte Desirée festgestellt. Darüberhinaus wurde 4-Cumaroyloctopamin identifiziert, während Feruloyloctopamin nicht nachgewiesen werden konnte. Interessanterweise wird 30 Stunden nach Versuchsbeginn die fünffach höhere Menge an Hydroxyzimtsäuretyramiden in das Kulturmedium sekretiert, als in der zellwandgebundenen Fraktion akkumuliert wurde. Im Vergleich dazu stellte Hohlfeld (1998) 60 Stunden nach *P. infestans*-Elicitierung eine etwa 50fache Erhöhung fest. In den vorliegenden Studien sank der Gehalt an 4-Cumaroyltyramin und Feruloyloctopamin allerdings wieder ab, was auf weitere Folgereaktionen, z.B. wie Di- und Polymerisierungen zurückzuführen sein könnte. Worin die Ursachen des vielfach höheren Gehaltes der Amide liegen, ist nicht geklärt. Eine Abgabe der Verbindungen in das umgebende Anzuchtsmedium könnte in der Pflanze einer Sekretion in den apoplastischen Raum der Zellwand entsprechen. Weiterhin könnte eine nur in Zellkulturen verstärkte Pathogenantwort eine zusätzliche, über das eigentliche "Fassungsvermögen" (*sink*) der Zellwand hinausgehende, Sekretion zur Folge haben.

Eine scheinbar gegensätzliche Akkumulationskinetik besitzt das aus dem Anzuchtsmedium der Kontrollkulturen isolierte Feruloyl-3'-methoxyoctopamin. Die Abnahme der Konzentration nach Elicitierung könnte allerdings in einer vollständigen weiter gehenden Metabolisierung der Substanz begründet sein, so dass aus diesem Grund keine Sekretion von Feruloyl-3'-methoxyoctopamin gemessen werden konnte. Diese Verbindung stellt ebenso ein mögliches Reaktionsprodukt der THT dar (Negrel & Javelle, 1997) und wurde als Tyramid in Form von Feruloyl-3'-methoxytyramin in Pathogen behandelte Zwiebelepide mis detektiert. Eine Funktion innerhalb der Pathogenabwehr scheint aus diesem Grund möglich (McLusky et al., 1999).

4.2 Induktion von Enzymaktivitäten

Nach Elicitierung von Kartoffel-Zellkulturen wurde die Akkumulation von Hydroxyzimtsäureamiden sowohl in der Zellwand als auch im Anzuchtsmedium festgestellt. Diese Amide werden in einer Kondensationsreaktion durch die THT synthetisiert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Induktion der THT-Enzymaktivität nach Elicitorbehandlung mit einem *P. infestans*-Kulturfiltrat untersucht. Zusätzlich erfolgte die Aktivitätsbestimmung der für die Substratbereitstellung essentiellen Enzyme, der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) und der Tyrosin-Decarboxylase (TyrDC).

Mit unseren Untersuchungen wurden die Ergebnisse der bisher zu diesem Thema erschienenen Publikationen bestätigt. Durchgehend wurde berichtet, dass die THT in einer

Zeitspanne von etwa 10 Stunden bis zu mehreren Tagen nach Pathogenbehandlung bzw. einer vergleichbaren Induktion aktiv ist. Dies betraf sowohl Zellkulturen der Kartoffelsorte Datura (Hohlfeld, 1998), als auch elicierte Tabak-Zellkulturen (Negrel & Javelle, 1995). Hohlfeld hatte 60 Stunden nach Elicitierung mit einem *P. infestans*-Kulturfiltrat, Negrel & Javelle 100 Stunden nach Pronase-Behandlung noch eine dem Maximum vergleichbare Enzymaktivität gemessen. Der annähernd vergleichbare Zeitverlauf der THT-Aktivität konnte ebenso nach Verwundung von Kartoffelknollen in Gegenwart von Pektinase registriert werden. In diesem Fall lagen 9 Tage nach Verwundungsbeginn noch etwa 38 % der maximalen Enzymaktivität vor (Negrel et al., 1993). Durch Northern-Analysen wurde nach Elicitierung ein deutlicher Anstieg der Transkriptmenge sowie ein transients Kurvenverlauf der Akkumulationsrate mit einem Maximum nach 5 Stunden festgestellt (siehe Abbildung 3.17). Da keine zusätzliche Transkription der THT nach dieser Zeit registriert wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die THT ein stabiles Enzym ist.

Die Enzyme PAL und TyrDC lagen dagegen nur während einer kurzen Zeit aktiv vor. Beide Enzyme erreichten zwar ebenso unmittelbar nach Elicitierung ihre Aktivitätsmaxima, etwa 15 Stunden nach Versuchsbeginn wurde allerdings wieder die Ausgangsaktivität registriert. Diese Beobachtung korreliert mit vergleichbaren Studien über die Induktion dieser Enzyme (Rumeau et al., 1990; Taguchi et al., 1998). Ein im Vergleich zur THT zeitlich früheres Aktivitätsmaximum scheint einen schnellen Start des für den Sekundärstoffwechsel der Pflanze essentiellen Phenylpropan- bzw. Tyraminstoffwechsels nach einer Pilzinfektion zu ermöglichen. Auch die Substratbereitstellung für die THT kann in diesem Zusammenhang erfolgen.

4.3 Untersuchungen zum rekombinanten Protein

Die Klonierung einer THT-cDNA und die Überexpression in *E. coli* ermöglichte die Beschreibung und Charakterisierung der rekombinanten THT. Bezugnehmend auf den in Abbildung 3.12 dargestellten Sequenzabschnitt liegt das Startcodon in Position des Nukleotids 53. Es ist das erste ATG, welches sich im Leserahmen stromaufwärts der bekannten Peptide (Abbildung 3.9) befindet. Hinweise auf dazwischen liegende Introns wurden nicht gefunden. Ebenso konnte ein Stop-codon, 42 Basenpaare in 5'-Richtung vom Start-codon entfernt, gefunden werden.

Die THT gehört zur Klasse der Acyltransferasen (EC 2.3.1). Es wurden übereinstimmende Peptidsequenzen zwischen Enzymen dieser Klasse festgestellt. So fanden sich Teilhomologien in dem Sequenzbereich der Spermidin/Spermin *N*-Acetyltransferasen, der für die Transferaseaktivität essentiell ist [siehe Abbildung 3.12; (Lu et al. 1996)], während die zur Polyamin-Bindung notwendige C-terminale Sequenz MATEE nicht zu finden war (Colemann et al., 1995). Überraschenderweise wurde auch keine Homologie zwischen der THT und der Hydroxycinnamoyl/Benzoyl-CoA:Anthranilat *N*-Hydroxycinnamoyl/Benzoyltransferase aus

Dianthus caryophyllus festgestellt, welche bis dato die einzige klonierte Transferase mit Hydroxycinnamoylaktivität war (Yang et al., 1997). Allerdings konnte die Zugehörigkeit dieses Enzyms zu einer neuen, von *N*-Acyltransferasen abweichenden, multifunktionellen *O*-Acyltransferase kürzlich gezeigt werden (St-Pierre et al., 1998), so dass fehlende Sequenzhomologien erklärbar sind.

Vergleichende kinetische Studien belegen, dass die Substratspezifität des rekombinanten und des gereinigten, nativen Enzyms sich ähnelt (Hohlfeld et al. 1995; Hohlfeld, 1998). Die von Hohlfeld (1998) erhaltenen Ergebnisse konnten in Bezug auf die ausgewählten Donoren sowie Akzeptoren prinzipiell bestätigt werden. Zwar differieren die Donorspezifitäten der CoA-Ester geringfügig in beiden Arbeiten, signifikante Abweichungen wurden allerdings nicht gefunden. Einzig Octopamin und nicht Tyramin besaß die höchste Akzeptorspezifität des rekombinanten Enzyms. Cinnamoyl-CoA galt als das am besten akzeptierte Substrat, im Gegensatz zu Feruloyl-CoA der THT aus Kartoffel. Beiden Enzymen war allerdings gemeinsam, dass Sinapoyl-CoA als Donor bzw. Dopamin und Noradrenalin als Akzeptor am schlechtesten umgesetzt wurden. Ähnlich verhielt sich die aus Tabak-Zellkulturen gereinigte THT (Negrel & Javelle, 1997). In diesem Fall besaß Feruloyl-CoA die höchste (0,6 μM) und Cumaroyl-CoA die geringste Affinität (2 μM), allerdings lagen die Beträge um den Faktor 100 unter denen der vorliegenden Arbeit. Kaffeoyl-CoA wird im Unterschied zur rekombinanten THT von der aus Tabak gereinigten nicht umgesetzt und dient dort als kompetitiver Inhibitor (Negrel & Javelle, 1997). Im Kontrast dazu ist die übereinstimmende, wesentlich höhere Akzeptanz der Akzeptoren Tyramin und Octopamin gegenüber Dopamin und Noradrenalin ein gemeinsames Merkmal.

Hohlfeld (1998) und Negrel & Javelle (1997) bestimmten den Reaktionsmechanismus der Enzymreaktion. Die Reihenfolge der Substratbindung durch das dimere Enzym folgt einem geordneten sequentiellen Bi-Bi-Mechanismus. Zuerst erfolgt die Bindung des Esters, anschließend kommt es nach Konformationsänderung zur Anlagerung des zweiten Substrates. Diese Änderung der Enzymstruktur führt zu den für verschiedene CoA-Ester differierenden K_M -Werten für Tyramin. Die dazu an der Kartoffel-THT nur anhand der Untersuchungen an Feruloyl- und 4-Cumaroyl-CoA gewonnenen bisherigen Erkenntnisse (Hohlfeld, 1998) konnten am rekombinanten Protein bestätigt werden. In diesem Fall wurden zusätzlich die CoA-Ester Kaffeoyl-CoA, Cinnamoyl-CoA und Sinapoyl-CoA getestet. Cinnamoyl-CoA besaß dabei die größte Affinität, aufgrund des kleinsten K_M -Wertes, was durch die verhältnismäßig kleine sterische Struktur ohne Hydroxyl- und Methoxygruppen bedingt sein könnte. Es wäre also eine Einlagerung in das aktive Zentrum des Enzyms ohne räumliche Behinderungen möglich, was weiterführend Konformationsänderungen für die Anlagerung des zweiten Substrates, des Amins, bedingt. Für Sinapoyl-CoA, das größte Molekül, wurde der höchste K_M -

Wert gemessen. In diesem Fall könnte man davon ausgehen, dass durch die Substratanlagerung des Esters die nachfolgende Tyramin-Bindung nur unzureichend ermöglicht wird.

In Zusammenhang mit der Bestimmung des Reaktionsmechanismus der Enzymreaktion wurde außerdem eine negative Kooperativität zwischen Feruloyl-CoA und Tyramin festgestellt. Obwohl die endgültige Bedeutung für dieses Phänomen *in vivo* noch unklar ist, kann gesagt werden, dass die Affinität der THT für Tyramin oder allgemeiner für den Acyl-Akzeptor nicht nur von der Art sondern auch von der Konzentration des CoA-Esters abhängig ist. Tyramin scheint aufgrund der im Vergleich zu den CoA-Estern geringeren Metabolisierung innerhalb des Sekundärstoffwechsels eine größere Bedeutung bei der Synthese der Hydroxizimtsäureamide zuzukommen. Außerdem wird vermutet, dass die zelluläre Konzentration des Tyramins zumeist höher liegt als die der Cinnamoyl-CoA Derivate (Hahlbrock & Scheel, 1989; Negrel & Javelle, 1997). Negative Kooperativität zwischen Acyl-Donor und Akzeptor bedeutet in diesem Zusammenhang, dass ein Ansteigen der zellulären Amin-Konzentration, trotz nahezu gleich bleibender Konzentration des Esters, zu einer verstärkten Synthese des Amides führen kann. Eine Erhöhung der Konzentration des CoA-Esters würde hingegen nur bei paralleler Steigerung des Amingehaltes zu einer Synthese der Hydroxizimtsäureamide führen. Diese Anpassung an unterschiedliche Konzentrationen, die eine Erhöhung der Anfangsgeschwindigkeit der Enzymreaktion nach sich zieht, scheint einen bedeutenden physiologischen Reaktionsmechanismus innerhalb der Regulation der Hydroxizimtsäureamid-Biosynthese und des Phenylpropanstoffwechsels darzustellen (Negrel & Javelle, 1997). Eine weiterreichende Aufklärung des Reaktionsmechanismus ist wahrscheinlich erst nach Analyse der dreidimensionalen Struktur des aktiven Zentrums des Enzyms möglich. Dazu wäre allerdings eine vollständige Kristallisation der THT erforderlich.

Neben der Substratspezifität wurde auch das pH-Optimum des Enzyms untersucht. Die rekombinante THT besaß die höchste Aktivität innerhalb der pH-Werte 9,0 und 10,0 mit halbmaximalen Aktivitäten zwischen pH 5,3 und 12,4. Damit ist sie nicht mit dem aus Kartoffel gereinigten Enzym zu vergleichen, das bei leicht saurem pH (6,5 – 6,8) das Aktivitätsmaximum und zwischen pH 6,0 und 9,1 die halbmaximale Aktivität besaß (Hohlfeld, 1998). Weitere, darüber hinausgehende zusätzliche Angaben zum pH-Optimum des Enzyms, die eine Einordnung der erhaltenen Werte ermöglichen könnten, wurden in der vorhandenen Literatur bisher nicht publiziert.

Das rekombinante Protein wurde im Gegensatz zum gereinigten Protein aus Kartoffel durch Kationenzugabe in seiner Aktivität nicht beeinflusst. Nach Zugabe von Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen wurde im Gegensatz zu dem von Hohlfeld (1998) beschriebenen Enzym keine Stimulation der Enzymaktivität gemessen. EDTA und EGTA als spezieller Ca^{2+} -Chelator (Graziana et al., 1983) zeigten keinen Einfluss auf die Aktivität. Das aus Tabak-Zellkulturen gereinigte

Enzym zeigte dem rekombinanten Enzym gegenüber vergleichbare Eigenschaften (Negrel & Javelle, 1997).

Für menschliche Spermidin/Spermin *N*-Acetyltransferasen ist eine Dimerisierung der Untereinheiten für die Bildung des aktiven Enzyms von entscheidender Bedeutung (Coleman & Pegg, 1997). Die THT aus Kartoffel wurde mit einer Molekularmasse von 49 kDa angegeben, die sich aus Untereinheiten von etwa 25 kDa zusammensetzt. Es kann also angenommen werden, dass das Enzym als Dimer vorliegt (Hohlfeld, 1998). Negrel & Javelle fanden 1997 gleichfalls eine Molekularmasse der Tabak-THT von etwa 48 kDa, zusammengesetzt aus zwei 25 kDa-Untereinheiten. Mittels Gelfiltration wurde demgegenüber in der vorliegenden Arbeit die relative Molekularmasse des aktiven rekombinanten Enzyms mit etwa 63 kDa bestimmt. Wenn man bedenkt, dass die berechnete Masse der rekombinanten THT (28,4 kDa), wie auch die Molekularmasse nach SDS-PAGE etwa 30 kDa betrug, scheint das rekombinante Enzym als Homodimer vorzuliegen. Damit liegt die molekulare Masse nur etwas über der aus Kartoffel gereinigten THT [25 kDa (Hohlfeld et al., 1996; Hohlfeld 1998)]. Eine vergleichbare molekulare Masse wurde von Negrel & Javelle (1997) in mit Pronase behandelten Tabak-Zellkulturen beschrieben. Eine weitere Übereinstimmung zu diesem Enzym wurde beim Vergleich der isoelektrischen Punkte deutlich. Der berechnete *pI* des rekombinanten Proteins lag bei 5,1, für das aus Tabak gereinigte Enzym wurde 5,2 gemessen.

Nach dem Screenen der cDNA Bank wurden nicht alle THT spezifischen cDNA-Klone nach eventuellen Sequenzunterschieden analysiert. Aus diesem Grund kann daher bisher nicht ausgeschlossen werden, dass mehrere cDNA-Klassen existieren und somit die postulierte heterodimere Struktur (Hohlfeld et al., 1996) zutreffend ist. Aus der Ähnlichkeit der sequenzierten Peptidfragmente, die aus der gereinigten Kartoffel-THT erhalten wurden (Abbildung 3.9), sind allerdings nur bedingt Rückschlüsse auf eine Heterogenität des Enzyms möglich. Einzelne Differenzen [Peptid 3 und 4; (Abbildung 3.9)] könnten auch auf Fehler während des Sequenziervorganges zurückzuführen sein.

Über die Lokalisation des Enzyms kann nur spekuliert werden. Eine cytoplasmatische Lokalisation wäre denkbar, da in N-terminalen Protein-Sequenzbereichen der THT keine Anzeichen für ein Signalpeptid gefunden wurden. Klarheit könnten in dieser Frage aber Untersuchungen z. B. mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie schaffen.

4.4 Molekulare Untersuchungen zur THT

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine reine Hydroxycinnamoyltransferase kloniert und sequenziert (Schmidt et al., 1999). Es war daher zusätzlich zu den bereits dargelegten Ergebnissen möglich, die Genstruktur sowie die Genaktivierung nach Elicitierung bzw. Pathogenbehandlung in Kartoffelpflanzen zu untersuchen. Zusätzlich gelang die Detektion

der THT-Transkripte nach Verwundung sowie nach Behandlung mit unterschiedlichen Hormonen in Blättern.

Die THT ist von einer Multigenfamilie kodiert. Es liegen also mehrere Gene vor, die aufgrund ihrer Homologien in der Nukleotidsequenz miteinander verwandt sind. Bis auf die Darstellungen von Yang et al. (1997) wurden keine weiteren Hydroxycinnamoyltransferasen sequenziert. Ebenso sind, wie bereits betrachtet, keine Sequenzhomologien zu anderen Enzymen bekannt. Aus diesem Grund kann nicht ausgeschlossen werden, dass weitere, homologe, bisher unbekannte Transferasen ebenfalls in der Southern-Analyse detektiert wurden.

Repräsentativ für Solanaceen wurde weiterhin die gewebespezifische Verteilung der THT-Transkripte in Kartoffel- und Tomatenpflanzen untersucht. In beiden Arten sind sie vor allem in der Wurzel präsent. Der Grund dafür könnte sein, dass die Pflanzenwurzel im Erdreich mit einer Vielzahl von Pathogenen konfrontiert ist und somit die THT-Expression im Rahmen der Pathogenabwehr induziert wird. Dies wurde durch Messungen der THT-Enzymaktivität bestätigt, da nur in Wurzeln der Kartoffelpflanze eine Aktivität von $1 \text{ mkat (kg Protein)}^{-1}$ gemessen werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde in Blättern keine Aktivität gemessen. Andererseits ist auch aus Studien anderer Pathogen-induzierter Gene bekannt, dass neben einer blütenspezifischen Expression die entsprechenden Transkripte ebenfalls zu einem großen Teil in Wurzeln vorkommen können. Das betrifft z.B. Untersuchungen in Kartoffel von Dammann et al., 1997 für ein PIN II Analoga sowie von Niebel et al. (1995) über eine Pathogen-induzierte Katalase.

Eine organspezifische Detektion des Proteins mittels Western-Analyse scheiterte an der fehlenden Spezifität der aus Kaninchen sowie aus Hühnereiweiß hergestellten polyklonalen Antikörper.

Die Ergebnisse, die nach Elicitierung von Kartoffel-Zellkulturen erhalten wurden, ähneln denen nach Pathogenbehandlung von Kartoffelpflanzen. Es kann somit angenommen werden, dass die Verwendung von elicitierten Zellkulturen zur Vereinfachung des komplexeren Pflanze-Pathogen-Systems repräsentativ für die Pflanze ist. In der vorliegenden Arbeit konnte das durch die Untersuchungen zur mRNA-Akkumulation nach Elicitierung mit einem *P. infestans*-Kulturfiltrat im Vergleich zur Inokulation von Blättern mit einer Bakteriensuspension von *Pseudomonas syringae* bestätigt werden. In beiden Fällen wurde eine frühe Zunahme der Transkriptmenge gemessen. Bis zu einer Zeit von 60 Stunden konnte man eine monophasische Akkumulationskinetik beobachten (Batz et al., 1998). Im Vergleich zur Enzymaktivität, die ihr Maximum erst nach 15 Stunden erreichte, ist diese Transkriptakkumulation also zeitlich vorverlagert, was mit dem Verständnis zum Ablauf der Transkription und Proteinbiosynthese korreliert.

Eine der THT vergleichbare Kinetik zur akkumulierenden Transkriptmenge wurde für die PAL gemessen. Auch in diesem Fall korrelieren die Zeitpunkte der maximalen Transkriptmenge mit der Enzymaktivität. Bisher publizierte Untersuchungen zur Aktivierung dieses "Startenzyms" des Phenylpropanstoffwechsels nach Pathogenbefall konnten somit bestätigt werden (Joos & Hahlbrock, 1992). Im Gegensatz zu der dargestellten Arbeit wurde hingegen in Untersuchungen zur PAL-Transkriptakkumulation in Petersilie (*Petroselinum crispum*) ein biphasischer Kurvenverlauf gefunden (Batz et al., 1998). Die Ursachen dieses Unterschieds sind unklar. RNA-Analysen der TyrDC, des dritten auf elicitorinduzierte Aktivität untersuchten Enzyms, konnten nicht durchgeführt werden, da die verwendete TyrDC-cDNA Sonde aus Petersilie zu der Sequenz aus Kartoffel offensichtlich nur gering homolog war. Weitere Sonden wurden nicht verwandt. In der vorhandenen Literatur wird in Petersilie bzw. Opium-Mohn von einer monophasischen Akkumulation mit einer maximalen TyrDC-Transkriptmenge etwa 2 Stunden nach Elicitierung ausgegangen. Somit scheint diese der Akkumulation der THT- und PAL-Transkriptmenge in Kartoffel zu ähneln (Kawalleck et al., 1993; Facchini, 1998).

Die Infektion der Kartoffelpflanze mit *P. infestans* findet hauptsächlich über die Epidermis statt. Der Beginn der Transkriptakkumulation 24 Stunden nach Auftropfen der Sporenlösung auf die Blätter unterscheidet sich damit deutlich von den Ergebnissen, die an elicitierten Zellkulturen bzw. an Bakterien-infiltrierten Blättern gewonnen wurden. Man kann davon ausgehen, dass diese Zeitdifferenz durch die Penetration und das Wachstum des Pilzes im Blatt bedingt ist. Zusätzlich wäre möglich, dass sämtliche an der Außenseite des Blattes lokalisierten pflanzlichen Schutzmechanismen, wie Cutikula oder lignifizierte Zellschichten, verzögert auf den Verlauf der Infektion wirken.

Neben dem Befall des Kartoffelblattes ist nach Eindringen von Pilzhyphen in den Erdboden ebenso eine Infektion der Pflanze über die Knollen bekannt. In diesen ist die vermutete Transkriptzunahme nach Pilz-Sporenbildung nicht so klar zu erkennen, da bereits eine Verwundung des Versuchsmaterials eine erhöhte Transkriptmenge verursacht. Trotzdem kann davon ausgegangen werden, dass durch die Auftragung der Sporenlösung eine zusätzliche Akkumulation bedingt ist. Diese Beobachtungen gehen dabei mit Untersuchungen von Negrel et al. (1993; 1996) konform, die in verwundeten Kartoffelknollen eine erhöhte THT-Enzymaktivität bzw. gesteigerte Mengen an Reaktionsprodukten nachweisen konnten.

In einem weiterführenden Experiment wurde die THT-Transkriptakkumulation auch in verwundeten Blättern gezeigt. Es war ersichtlich, dass eine signifikante Erhöhung der THT-Transkriptmenge drei Stunden nach Versuchsbeginn stattfand. Da dies der erste beobachtete Meßwert war, erfolgt der Beginn der Akkumulation also bereits zu einem früheren Zeitpunkt. In der Literatur ist eine solche Parallelität zwischen Pathogen- bzw. Elicitor-induzierten und Verwundungsprozessen beschrieben worden (Ebel & Mithöfer, 1998; Hutchison, 1998; Pearce et al., 1998; Scheel, 1998; Somssich & Hahlbrock, 1998). Wahr-

scheinlich durchlaufen demzufolge beide Signaltransduktionsketten gleiche Zwischenprodukte bzw. werden durch identische Induktoren, wie z.B. reaktive Sauerstoffspezies, pH-Wert-Änderungen und Änderungen verschiedener Ionenkonzentrationen, Jasmonat oder Salicylsäure ausgelöst.

Als sekundäre Messenger in dem angesprochenem Signalweg können auch pflanzliche Hormone und Fettsäuren fungieren (Preisig & Kuc, 1985; Sharan et al., 1998; Taguchi et al., 1998). Diese sind ebenso befähigt, eine dem Pathogenbefall bzw. der Verwundung vergleichbare Stressreaktion der Pflanze auszulösen (Hildmann et al., 1992; Dammann et al., 1997; Titarenko et al., 1997). Dies wurde durch die Zunahme der THT-Transkriptmenge nach Applikation von Arachidonsäure, (+)-cis,trans Abscisinsäure sowie \pm Methyljasmonat bestätigt. Im Gegensatz dazu war Salicylsäure nicht an einer Aktivierung der THT-Transkription beteiligt. Deren Wirkungsweise wird im Gegensatz zu den anderen bereits dargestellten Hormonen auch als unabhängig von der Pathogenantwort bzw. als suppressiv auf die Jasmonat-Biosynthese wirkend beschrieben (Pena-Cortes et al., 1993; Pieterse & van Loon, 1999). Die genaue Funktion der Salicylsäure stellt sich allerdings sehr vielschichtig dar, da ebenso eine Auslösung von Abwehrreaktionen der Kartoffel möglich erscheint (Yu et al., 1997; Reymond & Farmer, 1998). Die verwendeten Konzentrationen der einzelnen Hormonlösungen wurden in der Literatur bestätigt (Hildmann et al., 1992; Dammann et al., 1997; Sharan et al., 1998). Die Kontrolle des Versuchsablaufs bzw. der Lösungsaufnahme in die Kartoffelblätter erfolgte durch Hybridisierung mit radioaktiv markiertem PIN II-Fragment. Dieser Proteinase Inhibitor II ist in Kartoffelblättern als responsiv für Abscisinsäure und Methyljasmonat beschrieben worden (Hildmann et al., 1992; Pena-Cortes et al., 1994; Dammann et al., 1997).

In transgenen Pflanzen konnte trotz Detektion der Transgen-Transkripte bisher keine erhöhte THT-Aktivität nachgewiesen werden. Die gemessenen Enzymaktivitäten differierten, unterschieden sich aber nicht signifikant von denen der Kontrollpflanzen. Eine zusätzliche Kontrolle der Expression des Proteins durch Western-Analyse konnte wegen der bereits erwähnten Unspezifität der verwendeten Antikörper nicht erfolgen. Daher sind keine Aussagen in Bezug auf erhöhte Proteinmengen in den transgenen Kartoffelpflanzen zu erhalten.

Aufgrund der erwähnten Schwankungen der THT-Aktivität in Kontrollpflanzen sowie in transgenen Pflanzen gestalteten sich auch Resistenzuntersuchungen der THT-sense Kartoffelpflanzen als schwierig. Hintergrund dieser Versuche ist die Hoffnung, dass sich aufgrund der Überexpression des Enzyms in Pflanzen eine erhöhte Resistenz der Kartoffel auf *P. infestans* ergeben könnte. Hierfür spricht einerseits die späte Eingliederung des Enzyms in den Primär- und Sekundärstoffwechsel der Pflanze (Somssich & Hahlbrock, 1998). Diese Position ist dabei im Vergleich zu vorgelagerten Enzymen wie PAL, C4H oder 4CL zu sehen.

Als Resultat können die Reaktionsprodukte direkt in die Zellwand eingebaut werden und stehen nicht wie bei den erwähnten anderen Enzymen für weitere Metabolisierungen zur Verfügung. Andererseits ist das Enzym aufgrund seiner Stabilität mehrere Tage nach Pathogenbefall aktiv (Negrel et al., 1993) und könnte aufgrund der ungewöhnlich breiten Substratspezifität eine Vielzahl verschiedener Hydroxycimtsäure-CoA-Ester und Amine umsetzen. Für die Reaktionsprodukte wird letztendlich angenommen, dass durch deren Einbau in die pflanzliche Zellwand fungistatische Veränderungen bedingt werden, die das Resistenzverhalten der Kartoffel beeinflussen könnten.

4.5 Zukünftige Arbeiten

Aufgrund der bisher unzureichenden Untersuchungen zur THT in transgenen Pflanzen, sollten weiterführende Studien durchgeführt werden. So könnte einerseits der Versuch unternommen werden, über eine erneute Produktion von Antikörpern die Expression des Proteins zu überprüfen. Andererseits erscheint ebenso eine erneute Transformation, evtl. mit anderem Promotor, als sinnvoll.

Weitere, sich an die vorliegende Arbeit anschließende Untersuchungen könnten der Gegenstand folgender Experimente sein:

Einmal bieten sich aufgrund der relativ starken Akkumulation der THT-Transkripte nach Pilzinfektion Promotorstudien des Gens an. Diese Untersuchungen werden durch die Existenz von genomischen Klonen ermöglicht, die z.T. auch bereits in 5'-Richtung der THT-kodierenden Region sequenziert wurden und Homologien zu anderen Pathogen-induzierten Promotoren zeigen. Weiterhin könnte der Sequenzbereich, der für die Bildung des aktiven Zentrums des Enzyms verantwortlich ist, durch *site directed mutagenesis* identifiziert werden. Diese Fragestellung könnte ebenso auf biochemischem Wege untersucht werden. Da das rekombinante Protein theoretisch in ausreichender Menge und Sauberkeit herzustellen ist, erscheint in Kooperation mit darauf spezialisierten Arbeitsgruppen eine Kristallisation der THT möglich. Erste Vorversuche in Zusammenarbeit mit Dr. Hecht von der GBF in Braunschweig wurden im Rahmen dieser Promotion durchgeführt, allerdings wurde auf eine Darstellung der entsprechenden Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit verzichtet. Durch die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der THT könnten weiterhin entscheidende Ergebnisse zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus sowie zur Wirkungsweise der negativen Kooperativität geleistet werden. Dies wäre beispielgebend für andere Enzyme des Sekundärstoffwechsels.

Ein weiteres zukünftiges Forschungsthema könnten Untersuchungen zur THT-Induktion nach der Mykorrhizierung betreffen. In diesem Zusammenhang publizierten Grandmaison et al. (1993) das Auftreten von Feruloyltyramin, also eines THT-Reaktionsproduktes in mykorrhizierten Wurzeln. Ebenso berichteten Cordier et al. (1998) über die Beteiligung der My-

korrhizierung an der Ausprägung von lokaler und systemischer Resistenz. Da Kartoffelpflanzen diese Symbiose eingehen können, ist eine Überprüfung dieser Aussage an Kartoffelpflanzen möglich.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Synthese von Hydroxyzimtsäureamiden durchgeführt. Diesen Substanzen wird nach deren Einlagerung in die pflanzliche Zellwand bei der Pathogenantwort eine Abwehrfunktion zugeschrieben. Ihre Synthese wird durch die Hydroxycinnamoyl-CoA:Tyramin *N*-Hydroxycinnamoyltransferase (THT) katalysiert. Das Pathosystem *Solanum tuberosum/Phytophthora infestans* wurde sowohl für biochemische Untersuchungen als auch für die Isolierung und molekulare Analyse eines THT-cDNA Klons verwendet.

In Kartoffelzellkulturen wurde nach Behandlung mit einer Elicitorpräparation von *Phytophthora infestans* die Akkumulation von 12 phenolischen Verbindungen nachgewiesen. Hydroxyzimtsäureamide wurden sowohl in Zellwandhydrolysaten als auch im Kulturmedium gefunden. Nach Elicitierung wurde eine Aktivierung der PAL, TyrDC und der THT beobachtet.

Mit Hilfe degenerierter Primer, die von der partiellen Aminosäuresequenz der gereinigten THT abgeleitet wurden, konnte ein cDNA-Klon isoliert werden, der die kodierende Region der THT enthält. Das von der cDNA kodierte Protein wies eine Molekularmasse von 28,4 kDa auf und zeigte geringe Sequenzhomologien zu Acetyltransferasen. Die biochemischen Eigenschaften des rekombinanten Proteins wurden nach Expression in *E. coli* untersucht und stimmten weitgehend mit den für das gereinigte Protein ermittelten Daten überein.

RNA-Analysen zeigten eine Pathogen- und wundinduzierte Expression der THT in Kartoffel. So akkumulieren THT-Transkripte in Elicitor-behandelten Kartoffelzellen sowie nach Infiltration von Blättern mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* und Infektion mit *P. infestans*.

Genomische Analysen wiesen auf die Existenz einer Multigenfamilie der THT hin.

Mit der erstmaligen Klonierung einer THT-cDNA wurden die Voraussetzungen für die funktionelle Analyse geschaffen. Erste Untersuchungen von transgenen Kartoffel- und Tabakpflanzen, welche die THT ektopisch exprimieren, konnten im Rahmen dieser Arbeit begonnen werden. Diese Analysen sollten zur Aufklärung der Rolle der THT bei der Pathogenantwort in Kartoffel sowie ihrer Funktion im Sekundärstoffwechsel beitragen.

6 Literatur

- Abad, Z. G. und Abad, J. A. (1997) Another Look at the Origin of Late Blight of Potatos, Tomatos, and Pear Melon in the Andes of South America, *Plant Dis.* **81**, 682-688
- Ampomah, Y. A. und Friend, J. (1988) Insoluble phenolics compounds and resistance of potato tuber disc to *Phytophthora infestans* and *Phoma*, *Phytochemistry* **27**, 2533-2541
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidmann, J. G., Smith, J. A. und Struhl, K. (1997) Short Protocols in Molecular Biology, 3. Ausgabe, John Wiley, New York
- Bailey, J. A. (1983) Biological perspectives of host-pathogen interactions. (Eds.: Bailey, J. A., Deverall, B. J.) The dynamics of the host defense, Academic Press, New York, 1-32
- Barz, W. (1997) Phytoalexins, In: *Resistance of crop plants against fungi* (Ed.: Hartleb, H.), Gustav Fischer Verlag Jena, 183-201
- Batz, O., Logemann, E., Reinold, S. und Hahlbrock, K. (1998) Extensive reprogramming of primary and secondary metabolism by fungal elicitor or infection in parsley cells, *Biol. Chem.* **379**, 1127-1135
- Baucher, M., Monties, B., Van Montagu, M. und Boerjan, W. (1998) Biosynthesis and Genetic Engineering of Lignin, *Critical Reviews in Plant Sciences* **17**, 125-197
- Beimen, A., Witte, L. und Barz, W. (1992) Growth Characteristics and Elicitor-induced Reactions of Photosynthetically Active and Heterotrophic Cell Suspension Cultures of *Lycopersicon peruvianum* (Mill.), *Bot. Acta* **105**, 152-169
- Bernards, M. A. und Lewis, N. G. (1998) The macromolecular aromatic domain in suberized tissue: A changing paradigm, *Phytochemistry* **47**, 915-933
- Bernards, M. A., Lopez, M. L., Zajicek, J. und Lewis, N. G. (1995) Hydroxycinnamic acid-derived polymers constitute the polyaromatic domain of suberin, *J. Biol. Chem.* **270**, 7382-7386
- Bestwick, C. S., Brown, I. R., Bennett, M. H. und Mansfield, J. W. (1997) Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Plant Cell* **9**, 209-221
- Bonas, U. und Van den Ackerveken, G. (1997) Recognition of bacterial avirulence proteins occurs inside the plant cell: a general phenomenon in resistance to bacterial disease? *Plant J.* **12**, 1-8
- Booker, F. G. und Miller, J. E. (1998) Phenylpropanoid metabolism and phenolic composition of soybean [*Glycine max.* (L.) Merr.] leaves following exposure to ozone, *Journal of Experimental Botany* **49**, 1191-1202
- Bostock, R. M., Laine, R. A. und Kuc, J. A. (1982) Factors affecting the elicitation of sesquiterpenoid phytoalexin accumulation by eicosapentanoic and arachidonic acids in potato, *Plant Physiol.* **70**, 1417-1424
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- Bradley, D. J., Kjellbom, P. und Lamb, C. (1992) Elicitor- and wound induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response, *Cell* **70**, 21-30
- Brett, C. T., Wende, G., Smith, A. C. und Waldron, K. W. (1999) Biosynthesis of cell-wall ferulate and diferulate, *J. Sci. Food Agric.* **79**, 421-424

- Campbell, M. M. und Ellis, B. E. (1992) Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures: Cell wall-bound phenolics, *Phytochemistry* **31**, 737-742
- Choi, J. S. und Go, C. H. (1996) Further Study on the constituents of *Allium tuberosum* leaves, *Arch. Pharm. Res.* **19**, 60-61
- Clarke, D. D. (1982) The accumulation of cinnamic acid amides in the cell wall of potato tissue as an early response to fungal attack, In: Active Defence Mechanisms in Plants (Ed.: Wood, R. K. S.), Plenum Press, New York, 321-322
- Clifford, M. N. (1999) Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden, *J. Sci. Food Agric.* **79**, 362-372
- Coleman C. S. und Pegg, A., E. (1997) Proteasomal Degradation of Spermine/Spermine N¹-Acetyltransferase Requires the Carboxyl-terminal Glutamic Acid Residues, *J. Biol. Chem.* **272**, 12164-12169
- Colemann, C. S., Huang, H. und Pegg, A. E. (1995) Role of the Carboxyl Terminal MATEE Sequence of Spermine/Spermine N¹-Acetyltransferase in the Activity and Stabilization by the Polyamine Analog N¹, N¹²-Bis(ethyl)spermine, *Biochemistry* **34**, 13423-13430
- Cordier, C., Pozo, M. J., Barea, J. M., Gianinazzi, S. und Gianinazzi-Pearson, V. (1998) Cell Defense Responses Associated with Localized and Systemic Resistance to *Phytophthora parasitica* Induced in Tomato by an Arbuscular Mycorrhizal Fungus, *MPMI* **11**, 1017-1028
- Dammann, C., Rojo, E. und Sanchez-Serrano, J. J. (1997) Abscisic acid and jasmonic acid activate wound-inducible genes in potato through separate, organ-specific signal transduction pathways, *Plant J.* **11**, 773-782
- Dangl, J. L., Dietrichs, R. A. und Richberg, M. H. (1996) Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions, *Plant Cell* **8**, 1793-1807
- de Bary, A. (1876) Die gegenwärtig herrschende Kartoffelkrankheit, ihre Ursache und ihre Verhütung. A. Förster'sche Buchhandlung, Leipzig, 75 S
- de Wit, P. J. G. M. (1992) Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the applications of avirulence genes in control of plant pathogens, *Annu. Rev. Phytopath.* **30**, 391-418
- de Wit, P. J. G. M. (1995) Fungal avirulence genes and plant resistance genes: unrevealing the molecular basis of gene-for-gene interactions, *Adv. Bot. Res.* **21**, 147-185
- Dixon, R. A., Lamb, C. J., Masoud, S., Sewalt, V. J. H. und Paiva, N. L. (1996a) Metabolic engineering: prospects for crop improvement through the genetic manipulation of phenylpropanoid biosynthesis and defense responses – a review, *Gene* **179**, 61-71
- Dixon, R. A., Lamb, C. J., Paiva, N. L. und Masoud S. (1996b) Improvement of Natural Defense Responses, *Annals of the New York Academy of Sciences* **792**, 126-139
- Douglas, C. (1996) Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees, *Trends Plant Sci.* **1**, 171-178
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. und Smith, F. (1959) Colorimetric method of the determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.* **68**, 350-356
- Dunsmuir, P., Bond, D., Lee, K., Gidoni, D. und Townsend, J. (1988) Stability of introduced genes and stability in expression, In: *Plant Molecular Biology Manual* (Eds.: Gelvin, S. B. und Schilperoort, R. A.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1-17
- Ebel, J. und Mithöfer, A. (1998) Early events in the elicitation of plant defence, *Planta* **206**, 335-348

- Ebel, J. und Scheel, D. (1992) Elicitor recognition and signal transduction, In: *Plant gene research. Gene involved in plant defense* (Eds.: Boller, T., Meins, F.), Springer, Vienna, 183-205
- Eberhard, T. L., Bernards, M. A., He, L., Davin, L. B., Wooten, J. B. und Lewis, N. (1993) Lignification in cell suspension cultures of *Pinus taeda*. *In situ* characterization of a gymnosperm lignin, *J. Biol. Chem.* **268**, 21088-21096
- Erwin, D. C. und Ribeiro, O. K. (1996) *Phytophthora – Diseases Worldwide*, APS Press; St. Paul, Minnesota, USA
- Facchini, P. J. (1998) Temporal correlation of tyramine metabolism with alkaloid and amide biosynthesis in elicited opium poppy cell cultures, *Phytochemistry* **49**, 481-490
- Fauld, C. B. und Williamson, G. (1999) The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall, *J. Sci. Food Agric.* **79**, 393-395
- Fleurence, J. und Negrel, J. (1989) Partial purification of tyramine feruloyltransferase from TMV inoculated tobacco leaves, *Phytochemistry* **28**, 733-736
- Flor, H. H. (1956) The complementary genetic system in flax and flax rusts, *Adv. Genet.* **8**, 29-54
- Flores, H. E., Protacio, C. M. und Signs, M. W. (1989) Primary and secondary metabolism of polyamines in plants, *Rec. Adv. Phytochem.* **23**, 329
- Forbes, G. A., Goodwin, S. B., Drenth, A., Oyarzun, P., Eugenia, M. und Fry, W. E. (1998) A Global Marker Database for *Phytophthora infestans*, *Plant Dis.* **82**, 811-818
- Franke, R., Fry, S. C. und Kaus, H. (1998) Low-molecular-weight precursors for defense-related cell wall hydroxycinnamoyl esters in elicited parsley suspension cultures, *Plant Cell Report* **17**, 379-383
- Freytag, S., Arabatzis, N., Hahlbrock, K. und Schmelzer, E. (1994) Reversible cytoplasmic rearrangements precede wall apposition, hypersensitive cell death and defense-related gene activation in potato / *Phytophthora infestans* interactions, *Planta* **194**, 123-135
- Fric, F. und Tamás, L. (1993) Barley responses to *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* (Marchal) attack in the preparasitic stage of their interaction, *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* **28**, 161-172
- Friend, J. (1976) Lignification in infected tissue, In: *Biochemical aspects of plant-parasite relationships, Phytochemical Society Symposium Series*, Vol. **13** (Eds.: Friend, J. und Threfall, D. R.), Academic press, New York, 291-303
- Fritzemeyer, K. H., Cretin, C., Kombrink, E., Rohwer, F., Taylor, J., Scheel, D. und Hahlbrock, K. (1987) Transient induction of phenylalanine ammonia-lyase and 4-coumarate:CoA Ligase mRNAs in potato leaves infected with virulent or avirulent races of *Phytophthora infestans*, *Plant. Physiol.* **85**, 34-41
- Fry, W. E. und Goodwin, S. B. (1997) Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States, *Plant Dis.* **81**, 1349-1357
- Fry, W. E., Goodwin, S. B., Dyer, A. T. und Matuszak, J. M., (1993) Historical and recent migration of *Phytophthora infestans*: chronology, pathways and implications, *Plant Dis.* **77**, 653-661
- Gatz, C., Kaiser, A. und Wendenburg, R. (1991) Regulation of a modified CaMV 35 S promoter by the Tn 10-encoded Tet repressor in transgenic tobacco, *Mol Gen Genet* **225**, 761-770
- Goodwin, S. B., Smart, C. D., Samrock, R. W., Deahl, K. L., Punja, Z. K. und Fry, W. E. (1998) Genetic Change Within Populations of *Phytophthora infestans* in the United States and Canada During 1994 to 1996: Role of Migration and Recombination, *Phytopathology* **88**, 939-949

- Gottstein, D. Gross, D. und Lehmann, H. (1984) Mikrobiotest mit *Cladosporium cucumerinum* Ell. et Arth. zum Nachweis fungitoxischer Verbindungen auf Dünnschichtplatten, *Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz* **20**, 111-116
- Grandmaison, J., Olah, G. M., Van Calsteren, M.-R. und Furlan, V. (1993) Characterization of plant phenolics likely involved in the pathogen resistance expressed by endomycorrhizal roots, *Mycorrhiza* **3**, 155-164
- Graziana, A., Ranjewa, R., Salimath, B. P. und Boudet A. M. (1983) The reversible association of quinate:NAD⁺ oxidoreductase from carrot with a putative regulatory subunit depends on light conditions, *FEBS letters* **163**, 306-310
- Hahlbrock, K. und Grisebach, H. (1979) Enzymic controls in the biosynthesis of lignin and flavonoids, *Annu. Rev. Plant. Physiol.* **30**, 105-130
- Hahlbrock, K. und Scheel, D. (1987) Biochemical responses of plants to pathogen. In: *Innovative approaches to plant disease control*, (Ed.: Chet, I), John Wiley & Sons, New York, 229-254
- Hahn, M., Deising, H., Struck, C. und Mendgen, K. (1997) Fungal morphogenesis and enzyme secretion during pathogenesis, In: *Resistance of crop plants against fungi* (Ed.: Hartleb, H.) Gustav Fischer Verlag Jena, 33-57
- Halpin, C., Knight, M. E., Foxin, G. A., Campbell, M. M., Boudet, A.-M., Boon, J. J., Chabbert, B., Tollier, M.-T. und Schuch, W. (1994) Manipulation of lignin quality by downregulation of cinnamoyl alcohol dehydrogenase, *Plant J.* **6**, 339-350
- Hammond-Kosack, K. E. und Jones, J. D. G. (1996) Resistance Gene – Dependent Plant Defense Responses, *Plant Cell* **8**, 1773-1791
- Hanes, C. S. (1932) Studies on plant amylase. I. The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley, *Biochem J.* **26**, 1406-1421
- Hatfield, R. D. und Ralph, J. (1999) Modelling the feasibility of intramolecular dehydrodiferulate formation in grass walls, *J. Sci. Food Agric.* **79**, 425-428
- Hatfield, R. D., Ralph, J. und Grabber, J. H. (1999) Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses, *J. Sci. Food Agric.* **79**, 403-407
- Hedberg, C., Hesse, M. und Werner, C. (1996) Spermine and spermidine hydroxycinnamoyl transferases in *Aphelandra tetragona*, *Plant Science* **113**, 149-156
- Heitefuss, R. (1997) Cell wall modifications in relation to resistance, In: *Resistance of crop plants against fungi* (Ed.: H. Hartleb), Gustav Fischer Verlag Jena, 100-125
- Henninger, H. (1959) Versuche zur Kultur verschiedener Rassen von *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary auf künstlichem Nährboden, *Phytopathol. Z.* **94**, 285-306
- Herrmann, K. (1978) Hydroxycimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren enthaltende Naturstoffe in Pflanzen, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **35**, 73-88
- Hildmann, T., Ebnet, M., Pena-Cortés, H., Sanchez-Serrano, J. J. und Willmitzer L. (1992) General Roles of Abscisic and Jasmonic Acids in Gene Activation as a Result of Mechanical Wounding, *Plant Cell* **4**, 1157-1170
- Hohl, H. R. und Inselin, K. (1984) Strains of *Phytophthora infestans* from Switzerland with A₂ mating type behavior, *Trans. Br. Mycol. Soc.* **83**, 529-530
- Hohlfeld, H. (1998) Strukturaufklärung phenolischer Verbindungen und Charakterisierung der Hydroxycimtsäure-Coenzym A:Tyramin-Hydroxycimtsäuretransferase in Zellkulturen von *Solanum tuberosum* L., Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg

- Hohlfeld, H., Scheel, D. und Strack, D. (1996) Purification of hydroxycinnamoyl-CoA: tyramine hydroxycinnamoyltransferase from cell suspension cultures of *Solanum tuberosum* L. cv Datura, *Planta* **199**, 166-168
- Hohlfeld, H., Schürmann, W., Scheel, D. und Strack, D. (1995) Partial purification and characterization of hydroxycinnamoyl-CoA: tyramine hydroxycinnamoyltransferase from cell suspension cultures of *Solanum tuberosum*, *Plant Physiol.* **107**, 545-522
- Hohlfeld, M., Veit, M. und Strack, D. (1996b) Hydroxycinnamoyltransferases Involved in the Accumulation of Caffeic Acid Esters in Gametophytes and Sporophytes of *Equisetum arvense*, *Plant. Physiol.* **111**, 1153-1159
- Hutcheson, S. W. (1998) Current concepts of active defense in plants, *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**, 59-90
- Iiyama, K., Lam, T. B. T. und Stone, B. A. (1994) Phenolics acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internodes, *Phytochemistry* **29**, 733-737
- Ikegawa, T., Mayama, S., Nakayashiki, H. und Kato, H. (1996) Accumulation of diferulic acid during the hypersensitive response of oat leaves to *Puccinia coronata* f. sp. avenae and its role in the resistance of oat tissues to cell wall degrading enzymes, *Physiological and Molekular Plant Pathology* **48**, 245-255
- Ishihara, A., Matsukawa, T., Miyagawa, H., Ueno, T., Mayama, S. und Iwamura, H. (1997) Induction of Hydroxycinnamoyl-CoA:Hydroxyanthranilate *N*-Hydroxycinnamoyltransferase (HHT) Activity in Oat Leaves by Victorin C, *Z. Naturforsch.* **52c**, 756-760
- Ishihara, A., Miyagawa, H., Matsukawa, T., Ueno, T., Mayama, S. und Iwamura, H. (1998) Induction of hydroxyanthranilate hydroxycinnamoyl transferase activity by oligo-*N*-Acetylchitooligosaccharides in oats, *Phytochemistry* **47**, 969-974
- Ishii, T. (1991) Isolation and characterization of a diferuloyl arabinoxylan hexasaccharide from bamboo shoot cell-walls, *Carbohydrate Research* **219**, 15-22
- Jackson, A. O. und Taylor, C.B. (1996) Plant-microbe interactions: life and death at the interface, *Plant Cell* **8**, 1651-1668
- Jones, D. A., Thomas, C. M., Hammond-Kosack, K. E., Balint-Kurti, P. J. und Jones, J. D. G. (1994) Isolation of tomato *CF-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging, *Science* **266**, 789-793
- Jones, L. R., Giddings, N. J. und Lutman, B. F. (1912) Investigations of the potato fungus *Phytophthora infestans*, *Vt. Agric. Exp. Stn. Bull.* **168**, 100-112
- Joos, H. J. und Hahlbrock, K. (1992) Phenylalanine-ammonia-lyase in potato (*Solanum tuberosum* L.). Genomic complexity, structural comparison of two selected genes and modes of expression, *Eur. J. Biochem.* **204**, 621-629
- Jung, H.-J., Ni, W. (1998) Lignification of plant cell walls: Impact of genetic manipulation, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 12742-12743
- Kamoun, S., van West, P. und Govers, F. (1998) Quantification of late blight resistance of potato using transgenic *Phytophthora infestans* expressing β -glucuronidase, *Eur. J. Plant Pathol.* **104**, 521-525
- Kauss, H., Waldmann, T., Jeblick, W., Euler, G., Ranjeva, R. und Domard, A. (1989) Ca^{2+} is an important but not the only signal in callose synthesis induced by chitosan, saponins and polyene antibiotics, In: *Signal molecules in plants and plant-microbe-interactions*, Vol.1; Springer Verlag Berlin, 107-116

- Kawalleck, P., Keller, H., Hahlbrock, K., Scheel, D. und Somssich, I. E. (1993) A pathogen-responsive gene of parsley encodes tyrosine decarboxylase, *J. Biol. Chem.* **268**, 2189-2194
- Keller, H. (1990) Die Interaktion zwischen *Solanum tuberosum* L. und *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary: Der Phenylpropanstoffwechsel als Teil der pflanzlichen Abwehrreaktion, Dissertation, Universität Köln
- Keller, H., Hohlfeld, H., Wray, V., Hahlbrock, K., Scheel, D. und Strack D. (1990) Changes in the accumulation of soluble and cell wall-bound phenolics in elicitor-treated cell suspension cultures and fungus-infected leaves of *Solanum tuberosum*, *Phytochemistry* **42**, 389-396
- Kohmoto, K. und Otani, H. (1991) Host recognition by toxigenic plant pathogens, *Experientia* **47**; 755-764
- Kombrink, E. und Somssich, I. E. (1995) Defense responses of plant to pathogens, *Advances in Botanical Research* (Eds.: Andrews, J. H., Tommerup, I. C.), Academic Press, New York, 1-34
- Kombrink, E. und Somssich, I. E. (1997) Pathogenesis-related proteins and plant defense, In: *The Mycota* (Part A, Plant Relationships) (Eds.: Carroll, G., Tudzynski, P.) Springer Verlag Berlin, 107-128
- Körber-Grohne, U. (1988) *Nutzpflanzen in Deutschland: Kulturgeschichte und Biologie*, Theiss Verlag, Stuttgart
- Kroon, P. A. und Williamson, G. (1999) Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives, *J. Sci. Food Agric.* **79**, 355-361
- Kroon, P. A., Garcia-Conesa, M. T., Fillingham, I. J., Hazlewood, G. P. und Williamson, G. (1999) Release of ferulic acid dehydrodimers from plant cell walls by feruloyl esterases, *J. Sci. Food Agric.* **79**, 428-434
- Kuc, J. (1995) Phytoalexins, Stress metabolism, and Disease Resistance in Plants, *Annu. Rev. Phytopathol.* **33**, 272-97
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680-685
- Lam, T. B. T., Iiyama, K. und Stone, B. A. (1994) Determination of etherified hydroxycinnamic acids in cell wall of grasses, *Phytochemistry* **36**, 773-775
- Leubner-Metzger, G. und Amrhein, N. (1993) The distribution of Hydroxycinnamoylputrescines in different organs of *Solanum tuberosum* and other Solanaceous species, *Phytochemistry* **32**, 551-556
- Lewis, N. G. und Yamamoto, E. (1990) Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation, *Ann. Rev. Plant. Physiol Plant Mol. Biol.* **41**, 455-496
- Lineweaver, H. und Burk, D. (1934) The determination of enzyme dissociation constants, *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 658-666
- Lofty, S., Negrel, J. und Javelle, F. (1994) Formation of omega-feruloyloxypalmitic acid by an enzyme from wound-healing potato tuber discs, *Phytochemistry* **35**, 1419-1424
- Lofty, S., Negrel, J. und Javelle, F. (1995) Distribution of hydroxycinnamoyl-CoA:omega-hydroxypalmitinsäure O-hydroxycinnamoyltransferase in higher plants, *Phytochemistry* **40**, 389-391
- Louis, V. und Negrel, J. (1991) Tyramine hydroxycinnamoyl transferase in the roots of wheat and barley seedlings, *Phytochemistry* **30**, 2519-2522

- Low, P. S. und Merida, J. R. (1996) The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction, *Physiol. Plant.* **96**, 533-542
- Lu, L., Berkey, K. A. und Casero, R. A., Jr. (1996) RGFGIGS Is an Amino Acid Sequence Required for Acetyl Coenzyme A Binding and Activity of Human Spermidine/Spermine N¹ Acetyltransferase, *J. Biol. Chem.* **271**, 18920-18924
- Malmberg, A. G. und Theander, O. (1984) Free and conjugated phenolic acids and aldehydes in potato tuber, *Swed. J. Agric. Res.* **14**, 119-125
- Marques, I. A. und Brodelius, P. E. (1988) Elicitor-induced L-tyrosine decarboxylase from plant cell suspension cultures. I. Induction and purification, *Plant. Physiol.* **88**, 46-51
- Martin-Tanguy, J. (1985) The occurrence and possible function of hydroxycinnamoyl acid amides in plants, *Plant Growth Regulation* **3**, 381-399
- Martin-Tanguy, J., Cabanne, F., Pedrizet, E. und Martin, C. (1978) The distribution of hydroxycinnamic acid amides in flowering plants, *Phytochemistry* **17**, 1927-1928
- Martius, C. F. P. von. (1842) Die Kartoffelepidemie der letzten Jahre oder die Stockfäule und Räude der Kartoffeln, München (zitiert in Jones et al., 1912)
- Matern, U., Grimmig, B. und Kneusel, R. E. (1995) Plant cell wall reinforcement in the disease-resistance response: molecular composition and regulation, *Can. J. Bot.* **73**, 511-517
- McLusky, S. R., Bennett, M. H., Beale, M. H., Lewis, M. J., Gaskin, P. und Mansfield, J. W. (1999) Cell wall alterations and localized accumulation of feruloyl -3'-methoxytyramin in onion epidermis at sites of attempted penetration by *Botrytis allii* are associated with actin polarisation, peroxidase activity and suppression of flavanoid biosynthesis, *Plant J.* **17**, 523-534
- Meurer, B., Wiermann, R. und Strack, D. (1988) Phenylpropanoid patterns in Fagales pollen and their phylogenetic relevance *Phytochemistry* **27**, 823
- Meyer (1890) Meyers Konversationslexikon, Verlag des Bibliographischen Institutes, Leipzig/Wien
- Meyer, K., Kohler, A. und Kauss, H. (1991) Biosynthesis of ferulic acid esters of plant cell wall polysaccharides in endomembranes from parsley cells, *FEBS letters* **290**, 209-212
- Miersch, O., Knöfel, H. D., Schmidt, J., Kramell, R. und Parthier, B. (1998) A jasmonic acid conjugate, N-[(-)-jasmonoyl]-tyramine, from *Petunia* pollen, *Phytochemistry* **47**, 327-329
- Miyagawa, H., Ishihara, A., Lim, C.-H., Ueno, T. und Furuichi, N. (1998) Induction of N-p-Coumaroyloctopamine in Potato Tuber Discs by β -1,3-Glucooligosaccharide, *J. Pesticide Sci.* **23**, 49-53
- Mueller, M. J. (1997) Enzymes involved in jasmonic acid bioynthesis, *Physiol. Plant.* **100**, 653-663
- Mühlenbeck, U., Kortenbusch, A. und Barz, W. (1996) Formation of hydroxycinnamoylamides and hydroxyacetovanillone in cell cultures of *Solanum khasianum*, *Phytochemistry* **42**, 1573-1579
- Müller, K. O. und Börger, H. (1940) Experimentelle Untersuchungen über die *Phytophthora*-Resistenz der Kartoffel, *Arb. Biol. Reichsanst. Land. Forstw.* **23**, 189-231
- Murata, M., Okada, H. und Homma, S. (1995) Hydroxycinnamic Acid Derivatives and p-Coumaroyl-(L)-tryptophan, A Novel Hydroxycinnamic Acid Derivative from Coffee Beans, *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 1887-1890
- Negrel, J. und Javelle, F. (1995) Induction of phenylpropanoid and tyramine metabolim in pectinase- or pronase-elicited cell suspension cultures of tobacco (*Nicotiana tabacum*), *Physiol. Plant.* **95**, 569-574

- Negrel, J. und Javelle, F. (1997) Purification, characterization and partial amino acid sequencing of hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine *N*-(hydroxycinnamoyl)transferase from tobacco cell-suspension cultures, *Eur. J. Biochem.* **247**, 1127-1135
- Negrel, J. und Jeandet, P. (1987) Metabolism of tyramine and feruloyltyramine in TMV inoculated leaves of *Nicotiana tabacum*, *Phytochemistry* **26**, 2185-2190
- Negrel, J. und Martin, C. (1984) The biosynthesis of feruloyltyramine in *Nicotiana tabacum*, *Phytochemistry* **23**, 2797-2801
- Negrel, J., Javelle, F. und Paynot, M. (1992) Purification and properties of putrescine hydroxycinnamoyl transferase from tobacco (*Nicotiana tabacum*) cell suspensions, *Plant Physiology* **98**, 1264-1269
- Negrel, J., Javelle, F. und Paynot, M. (1993) Wound-induced tyramine hydroxycinnamoyl transferase in potato (*Solanum tuberosum*) tuber discs, *J. Plant Physiol.* **142**, 518-524
- Negrel, J., Lofty, S. und Javelle, F. (1995) Modulation of the activity of two hydroxycinnamoyl transferases in wound healing potato tuber discs in response to pectinase or abscisic acid, *J. Plant Physiol.* **146**, 318-322
- Negrel, J., Pollet, B. und Lapierre, C. (1996) Ether-linked ferulic acid amides in natural and wound periderms of potato tuber, *Phytochemistry* **43**, 1195-1199
- Niebel, A., Heungens, K., Barthels, N., Inze, D., van Montagu, M. und Geysen, G. (1995) Characterization of a pathogen-induced potato catalase and its systemic expression upon nematode and bacterial infection, *MPMI* **8**, 371-378
- Nishioka, T., Watanabe, J., Kawabata, J. und Niki, R. (1997) Isolation and Activity of *N*-p-Coumaroyltyramine, an alpha-Gluconidase Inhibitor in Welsh Onion (*Allium fistulosum*), *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 1138-1141
- Nürnbergger, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W. R., Hahlbrock, K. und Scheel, D. (1995) High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses, *Cell* **78**, 449-460
- Parker, J. E. und Coleman, M. J. (1997) Molecular intimacy between proteins specifying plant-pathogen recognition, *Trends Biochem Sci.* **22**, 291-296
- Parker, J. E., Schulte, W., Hahlbrock, K. und Scheel, D. (1991) An extracellular glycoprotein from *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* elicits phytoalexin synthesis in cultured parsley cells and protoplasts, *MPMI* **4**, 19-27
- Paynot, M., Perennec, P., Martin, C., Martin-Tanguy, J, Vernoy, R. und Javelle, F. (1983) Photoperidisme, tuberisation et phenolamides, *C. R. Acad. Sc.* **297**, 87-90
- Pearce, G., Marchand, P. M., Griswold, J., Lewis, N. G. und Ryan, C. A. (1998) Accumulation of Feruloyltyramine and p-Coumaroyltyramine in tomato leaves in response to wounding, *Phytochemistry* **47**, 659-664
- Pena-Cortes, H., Albrecht, T., Prat, S., Weiler, E. W. und Willmitzer L. (1993) Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis, *Planta* **191**, 123-128
- Pena-Cortes, H., Sanchez-Serrano, J., Prat, S. und Willmitzer, L. (1994) Signals involved in the wound-induced expression of the proteinase inhibitor II gene of potato, *Biochem. Soc. Symp.* **60**, 143-148
- Peterson, P. D., Jr., Campbell, C. L. und Griffith, C. S. (1992) James E. Teschemacher and the cause and management of potato blight in the United States, *Plant Dis.* **76**, 754-756

- Pieterse, C. M. J. und van Loon, L. C. (1999) Salicylic acid-independent plant defence pathways, *Trends Plant Sci.* **4**, 52-58
- Piquemal, J., Lapierre, C., Myton, K., O'Connell, A., Schuch, W., Grima-Pettanati, J. und Boudet, A. M. (1998) Down-regulation of Cinnamoyl-CoA Reductase induces significant changes of lignin profiles in transgenic tobacco plant, *Plant Journal* **13**, 71-83
- Ponchet, M., Martin-Tanguy, J., Marais, A. und Martin, C. (1982) Hydroxycinnamoyl acid amides and aromatic amines in the inflorescences of some araceae species, *Phytochemistry* **21**, 2865-2869
- Preisig, C. L. und Kuc, J. A. (1985) Arachidonic acid-related elicitors of the hypersensitive response in potato and enhancement of their activities by glucans from *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, *Arch. Biochem. Biophys.* **236**, 379-389
- Prell, H. H. (1996) Interaktionen von Pflanzen und phytopathogenen Pilzen, Gustav Fischer Verlag Jena
- Ralph, J., Hatfield, R. D., Piquemal, J., Yahiaoui, N., Pean, M., Lapierre, C. und Boudet, A. M. (1998) NMR characterization of altered lignins extracted from tobacco plants down-regulated for lignification enzymes cinnamoyl-alcohol dehydrogenase and cinnamoyl-CoA reductase, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 12803-12808
- Ralph, J., Mac Kay, J. J., Hatfield, R. D., O'Malley, D. M., Whetten, A.-M. und Sederoff, R. R. (1997) Abnormal lignin in a loblolly pine mutant, *Science* **277**, 235-239
- Reymond, P. und Farmer, E. E. (1998) Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression, *Curr. Opin. Plant. Biol.* **1**, 404-411
- Robertson, N. F. (1991) The challenge of *Phytophthora infestans*. In: *Phytophthora infestans, the Cause of Late blight of Potato* (Eds.: Ingrams, D. S. und Williams, P. H.), *Advances in Plant Pathology*. Vol 7, Academic Press, New York, 224-265
- Rohde, S. (1998) Prüfung und Anwendung eines ELISAs für *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary unter praktischen Bedingungen, Diplomarbeit, Universität Hannover
- Rumeau, D., Maher, E. A., Kelman, A. und Showalter, A. M. (1990) Extensin and phenylalanine ammonia-lyase gene expression altered in potato tubers in response to wounding, hypoxia, and *Erwinia carotovora* infection, *Plant Physiol.* **93**, 1134-1139
- Ryan, C. A. und Farmer, E. E. (1991) Oligosaccharide signals in plants: a current assessment, *Annu. Rev. Plant. Physiol.* **42**, 651-674
- Sánchez-Serrano, J. J., Schmidt, R., Schell, J. und Willmitzer, L. (1986) Nucleotide sequence of proteinase inhibitor II encoding cDNA of potato (*Solanum tuberosum*) and its mode of expression, *Mol. Gen. Genet.* **203**, 15-20
- Saulnier, L., Thibault, J.-F. (1999) Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans, *J. Sci. Food Agric.* **79**, 396-402
- Scheel, D. (1998) Resistance response physiology and signal transduction, *Curr Opin Plant Biol.* **1**, 305-310
- Schlösser, E. (1997) Preformed structural and chemical barriers, In: *Resistance of crop plants against fungi* (Ed.: H. Hartleb), Gustav Fischer Verlag Jena, 84-99
- Schmidt, A., Grimm, R., Schmidt, J., Scheel, D., Strack, D. und S. Rosahl (1999) Cloning and Expression of a Potato cDNA Encoding Hydroxycinnamoyl-CoA:Tyramine *N*-(Hydroxycinnamoyl)transferase, *J. Biol. Chem.* **274**, 4273-4280

- Schmidt, A., Scheel, D. und Strack, D. (1998) Elicitor-stimulated biosynthesis of hydroxycinnamoyltyramines in cell suspension cultures of *Solanum tuberosum*, *Planta* **205**, 51-55
- Schöber, B. (1981) Die Kraut- und Braunfäule der Kartoffel. KALI-BRIEFE (Büntehof), **15**, 397-403
- Schraudner, M., Langebartels, C., Negrel, J. und Sandemann, H. (1993) Plant defense reactions induced in tobacco by the air pollutant ozone, In: *Mechanisms of plant defense responses* (Eds.: Fritig, B. und Legrand, M.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 286-290
- Sharan, M., Taguchi, G., Gonda, K., Jouke, T., Shimosaka, M., Hayashida, N. und Okazaki, M. (1998) Effects of methyl jasmonate and elicitor on the activation of phenylalanine ammonia-lyase and the accumulation of scopoletin and scopolin in tobacco cell cultures, *Plant Science* **132**, 13-19
- Sharp, J. K., Valent, B. und Albersheim, P. (1984) Purification and partial characterization of a β -glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean, *J. Biol. Chem.* **259**, 11312-11320
- Sholtens-Toma, I. M. J. und de Wit, P. J. G. M. (1988) Purification and primary structure of a necrosis-inducing peptide from apoplastic fluids of tomato infected with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*), *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* **33**, 59-67
- Smith, C. J. (1996) Accumulation of phytoalexins: defence mechanism and stimulus response system, *New. Phytol.* **132**, 1-45
- Somssich, I. E. und Hahlbrock, K. (1998) Pathogen defence in plants – a paradigm of biological complexity, *Trends Plant Sci.*, **3**, 86-90
- Spielmann, L. J., Drenth, A., Davidsw, L. C., Sujkowski, L. J., Gu, W., Tooley, P. W. und Fry, W. E. (1991) A second world-wide migration and population displacement of *Phytophthora infestans*? *Plant Pathol.* **40**, 42-430
- St-Pierre, B., Laflamme, P., Alarco, A.-M., De Luca, V. (1998) The terminal O-acetyltransferase involved in vinoline biosynthesis defines a new class of protein responsible for coenzyme A-dependent acyl transfer, *Plant J.* **14**, 703-713
- Taguchi, G., Sharan, M., Gonda, K., Yanagisawa, K., Shimosaka, M., Hayashida, N. und Okazki, M. (1998) Effect of Methyl Jasmonate and Elicitor on PAL Gene Expression in Tobacco Cultured Cells, *J. Plant Biochem. Biotech.* **7**, 79-84
- Tawata, S., Taira, S., Kobamoto, N., Zhu, J., Ishihara, M. und Toyama, S. (1995) Synthesis and Antifungal Activity of Cinnamic Acid Esters, *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**, 909-910
- Titarenko, E., Rojo, E., Leon, J. und Sanchez-Serrano, J. J. (1997) Jasmonic acid-dependent and independent signaling pathways control wound-induced gene activation in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiol.* **115**, 817-826
- Van der Zaag, D. E. (1956) Overwintering en epidemiologie van *Phytophthora infestans*, tevens einige nieuwe bestrijdingsmogelijkheden, *Tijdschr. Planteziekten*, **62**, 69-156
- Vance, C. P., Kirk, T. K. und Sherwood, R. T. (1980) Lignification as a mechanism of disease resistance, *Ann. Rev. Phytopath.* **18**, 259-288
- Veit, M. und Gumbinger, H. G. (1993) Hydroxyzimtsäuren und Derivate, *Deutsche Apothekerzeitung* **11**, 33-55
- Villegas, M. und Brodelius, P. E. (1990) Elicitor-induced hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine hydroxycinnamoyltransferase in plant cell suspension cultures, *Physiologia Plantarum* **78**, 414-420
- Wojtaszek, P. (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection, *Biochem J.* **322**, 681-692

- Yang, Q., Reinhard, K., Schiltz, E. und Matern U. (1997) Characterization and heterologous expression of hydroxycinnamoyl/benzoyl-CoA:anthranilate *N*-Hydroxycinnamoyl/benzoyl-transferase from elicited cell cultures of carnation, *Dianthus caryophyllus* L., *Plant Molecular Biology* **35**, 777-789
- Yang, Y., Shah, J., und Klessig, D. F. (1997) Signal perception and transduction in plant defense responses, *Genes Dev.* **11**, 1621-1639
- Ye, Z. und Varmer, J. E. (1993) Gene expression patterns associated with in vitro tracheary element formation in isolated single mesophyll cells of *Zinnia elegans*, *Plant Physiol.* **103**, 805-813
- Young, P. A. (1926) Penetration phenomena and facultative parasitism in *Alternaria*, *Diplodia*, and other fungi, *Bot. Gazette* **81**, 258-279
- Yu, D., Liu, Y., Fan, B., Klessig, D. F. und Chen, Z. (1997) Is the High Basal Level of Salicylic Acid Important for Disease Resistance in Potato? *Plant. Physiol.* **115**, 343-349
- Zwankhuizen, M. J., Govers, F., Zadoks, J. C. (1998) Development of Potato Late Blight Epidemics: Disease Foci, Disease Gradients, and Infection Sources, *Phytopathology* **88**, 754-763

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Axel Schmidt

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Schmidt
Vorname: Axel
Anschrift: Goethestr. 16
06114 Halle/S

Geburtsdatum: 27.02.69
Geburtsort: Dresden
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Angaben zum Bildungsgang

Schulbildung: 1975 – 1985 Polytechnische Oberschule,
Dippoldiswalde
1985 – 1987 Erweiterte Oberschule „Glück auf“,
Dippoldiswalde
Studium: 10/1990 – 09/95 Studium der Biochemie,
Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
Weiterbildung: 01/1996 - wissenschaftlicher Mitarbeiter am
Institut für Pflanzenbiochemie Halle/S
Arbeit an vorliegender Dissertation