

**Molekulare, physiologische und biochemische Untersuchung der Immunmodulation  
von Abscisinsäurewirkungen in den Blättern transgener Tabakpflanzen**

Dissertation



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

vorgelegt der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Fachbereich Biologie

von Jana Wigger  
geb. am 06.09.1970 in Wolfen

Gatersleben 2000

Gutachter:   1.   Herr Prof. Dr. Gunter Reuter  
              2.   Herr Prof. Dr. Ulrich Wobus  
              3.   Herr Prof. Dr. Bernd Müller-Röber

Datum der öffentlichen Verteidigung:   19.10.2000

## **Inhaltsverzeichnis**

### **1. Einleitung**

1.1	Die Rolle der Abscisinsäure bei der Regulation der Stomatabewegung und der Genexpression	1
1.2	Expression von Antikörpern und Antikörperfragmenten in Pflanzen	3
1.3	Immunmodulation der Abscisinsäureaktivität in transgenen Tabakpflanzen	4
1.4	"High-throughput"-Methoden zur Analyse der differentiellen Genexpression	6
1.4.1	Offene Systeme zur Untersuchung der differentiellen Genexpression	7
1.4.2	DNA-"Arrays"	9
1.5	Zielstellung der Arbeit	13

### **2. Material**

2.1	Pflanzenmaterial	14
2.2	Bakterienstämme und Phagen	14
2.3	Vektoren und Primer	14
2.4	Enzyme	15
2.5	Pflanzenhormone und Antibiotika	15
2.6	Antikörper und Konjugate	15
2.7	DNA- und Proteinmarker	15
2.8	Weitere Chemikalien und Kits	15
2.9	Medien	16
2.10	Puffer und weitere Lösungen	17
2.11	Geräte und Software	17
2.12	Spezielle Materialien	18

### **3. Methoden**

3.1	Normalisierung von anti-ABA-scFv transgenen Pflanzen durch Behandlung mit Abscisinsäure	18
3.1.1	Anzucht der Pflanzen und Behandlung mit Abscisinsäure	18
3.1.2	Biochemische und physiologische Untersuchungen	19
3.1.2.1	Nachweis des scFv-Proteins mittels "Western blot"	19
3.1.2.2	Bestimmung des Gesamt-ABA-Gehaltes	20
3.1.2.3	Berechnung der theoretisch freien ABA	21

3.1.2.4 Gaswechselfmessungen	22
3.2 Molekularbiologische Standardprozeduren	22
3.3 Cosmidbank TLC	23
3.3.1 Isolation hochmolekularer genomischer DNA	23
3.3.2 Herstellung und erste Charakterisierung der Cosmidbank	24
3.3.3 Ordnen der Cosmidbank durch "Picking" und "Spotting"	24
3.3.4 Prozessierung der Koloniefilter (Cosmide und Plasmide)	25
3.4 Präparation der komplexen cDNA	26
3.4.1 Präparation epidermaler Fragmente	26
3.4.2 GTC-RNA-Extraktion	26
3.4.3 Reinigung der mRNA	27
3.4.4 Synthese der komplexen cDNA	27
3.5 Stomata cDNA-Bank TStP	28
3.5.1 Herstellung der Stomata cDNA-Bank TStP	28
3.5.2 Ordnen der cDNA-Bank durch "Picking" und "Spotting"	28
3.6 cDNA-Plasmid-"Arrays" für die "reversed Northern"-Analyse	29
3.7 Hybridisierungen und Auswertung	29
3.7.1 Hybridisierung der Kolonie- und Plasmid-Filter mit radioaktiv markierten Sonden	29
3.7.2 Hybridisierung von Plasmidfiltern mit nichtradioaktiv markierten Sonden	30
3.7.3 Qualitative und quantitative Auswertung der Images	31
<b>4. Ergebnisse</b>	
4.1 Normalisierung der anti-ABA scFv transgenen Tabakpflanzen	32
4.1.1 Die externe, langfristige Gabe von 50 µM ABA normalisiert den spezifischen Phänotyp der RA-Pflanzen	32
4.1.1.1 Erstes Komplementationsexperiment	32
4.1.1.2 Zweites Komplementationsexperiment	36
4.1.2 Kurzzeitbehandlung der transgenen Pflanzen durch ABA-Gabe über die Blattstiele führt nicht zu einer Normalisierung	40
4.1.3 Bei langzeitbehandelten RA-Pflanzen kann der Stomataschluß durch ABA-Gabe über die Blattstiele wieder induziert werden	41

4.1.4	In wasser- und ABA-behandelten RA-Pflanzen kann nahezu die gesamte Abscisinsäure vom Antikörper gebunden werden	42
4.2	Molekulare Charakterisierung der anti-ABA Immunglobulintransgenen Tabakpflanzen	43
4.2.1	Herstellung und erste Charakterisierung der Cosmidbank TLC	44
4.2.2	Organellogenome und chromosomale rRNA-Gene in der Cosmidbank	45
4.2.3	Komplexe Analyse der Genexpression in Wildtyp- und RA-Pflanzen mit Hilfe der Cosmidbank	47
4.2.3.1	Charakterisierung des Expressionsmusters im Blatt	49
4.2.3.2	Charakterisierung des Expressionsmusters in den epidermalen Fragmenten	53
4.2.4	Herstellung und erste Charakterisierung der schließzellspezifischen cDNA-Bank	56
4.2.5	Charakterisierung der geordneten schließzellspezifischen cDNA-Bank TStP	57
4.2.5.1	Nutzung der geordneten cDNA-Bank TStP zur Identifizierung interessanter Cosmidklone und häufiger Transkripte in der cDNA-Bank	57
4.2.5.2	Sequenzanalyse von 281 zufällig ausgewählten cDNA-Klonen der schließzellspezifischen cDNA-Bank	59
4.2.6	Komplexe Analyse der Genexpression in Schließzellen von RA- und Wildtyppflanzen mittels der geordneten schließzellspezifischen cDNA-Bank	63
4.2.7	Vergleich der Genexpression in Schließzellen und Blatt mittels der schließzellspezifischen cDNA-Bank	66
4.2.8	Untersuchung des Einflusses der Langzeitbehandlung mit ABA auf die Genexpression in Schließzellen mit Hilfe der geordneten cDNA-Bank	76
4.3	Die Morphologie der Schließzellen ist in den RA-Pflanzen verändert	80
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	
5.1	RA-Pflanzen weisen einen spezifischen, morphologisch und physiologisch veränderten Phänotyp auf	82
5.2	Die Behinderung des Stomataschlusses in den RA-Pflanzen ist auf die Wirkung des anti-ABA-Einzelkettenantikörpers zurückzuführen	83
5.3	Mechanismen der Modulation von ABA-Wirkungen durch das anti-ABA scFv-Protein	84
5.4	In Hybridisierungsstudien mit radioaktiv markierten komplexen Proben können häufige und mittelhäufige Transkripte untersucht werden	89

5.5	Die durch Immunmodulation und Normalisierung erzielten Effekte lassen sich auf Transkriptionsebene in den voll entwickelten Pflanzen nicht erfassen	90
5.6	Abscisinsäure ist für die Entwicklung funktionsfähiger Schließzellen notwendig	91
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>95</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>97</b>

## Abkürzungen

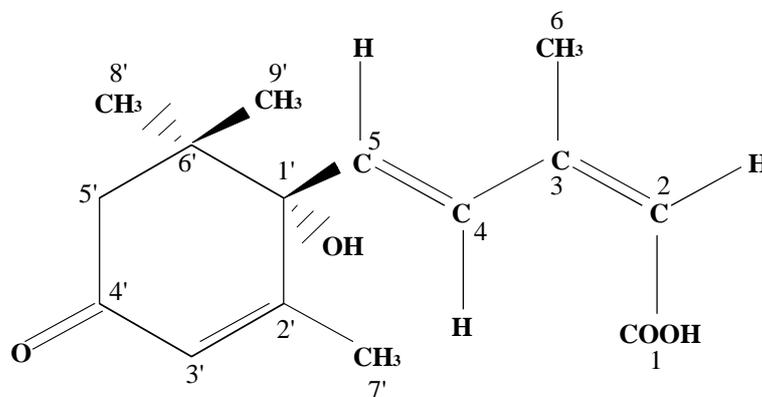
ABA	<i>cis, trans</i> -Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Ai	ABA-induzierbarer Klon
Amp <sup>r</sup>	Ampicillinresistenz
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
c <sub>a</sub>	Kohlendioxidkonzentration
Cab	Chlorophyll a/b-bindendes Protein
CaMV	"cauliflower mosaic virus", Blumenkohl-Mosaik-Virus
cDNA	"complementary" DNA, komplementäre DNA
CIAP	"calf intestinal alkaline phosphatase", alkalische Phosphatase
cfu	"colony forming units", koloniebildende Einheiten
Da	Dalton
DIG	Digoxigenin
DK	differentieller Klon
DTT	Dithiothreitol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
EST	"expressed sequence tag"
g	Gramm, Erdbeschleunigung
g <sub>L</sub>	stomatäre Leitfähigkeit
I	Lichtintensität
KDEL	Lysin-Asparaginsäure-Glutaminsäure-Leucin-Peptid
LK	Leitklon
M	Molarität
μ	mikro
MB	Megabyte

min	Minute
mRNA	"messenger", Boten-Ribonukleinsäure
MMLV	"Moloney Murine Leukemia Virus"
n	nano
OD	optische Dichte
PBS	"phosphate-buffered saline", phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	"polymerase chain reaction", Polymerasekettenreaktion
pfu	"plaque forming units", plaquebildende Einheiten
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
Rubisco	Ribulose-1,5-biphosphatcarboxylase
scFv	"single chain variable fragment", Einzelkettenantikörper
SDS	"sodium dodecyl sulfate", Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
T-DNA	Transfer-DNA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
Tet <sup>r</sup>	Tetracyclinresistenz
TLC	"tobacco leaf cosmids", Tabakblatt-Cosmide (genomische Bank)
Tris	Tris- hydroxymethylaminomethan
t-RNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TSP	"total soluble protein", gesamtlösliches Protein
TStP	"tobacco stomata phagemide", schließzellspezifische cDNA-Bank aus Tabak
UE	Untereinheit
V	Volumen, Volumina bzw. Volt
V <sub>H</sub>	variabler Teil der schweren Antikörperkette
V <sub>L</sub>	variabler Teil der leichten Antikörperkette
Wo.	Woche
YAC	"yeast artificial chromosome", künstliches Hefechromosom

## 1. Einleitung

### 1.1 Die Rolle der Abscisinsäure bei der Regulation der Stomatabewegung und der Genexpression

Das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) wurde in den fünfziger Jahren als eine Substanz beschrieben, die Blattseneszenz und Knospendormanz reguliert. Später konnte durch die Untersuchung von ABA-Biosynthesemutanten (ABA-defizienten Mutanten) und ABA-insensitiven Mutanten verschiedener Pflanzenarten die Beteiligung von ABA an vielen physiologischen Prozessen und Entwicklungsvorgängen gezeigt werden.



**Abb.1:** Strukturformel der (+)-Abscisinsäure (3-Methyl-5-[1'-hydroxy-4'-oxo-2'-cyclohexen-1'-yl]-*cis*-2,4-pentadiensäure).

ABA spielt eine große Rolle bei der Anpassung der Pflanzen an Umweltstress wie Trockenheit, Kälte (Übersicht bei Shinozaki und Yamaguchi-Shinozaki, 1996; Tabaeizadeh, 1998) oder Salzstress sowie bei der Regulation von Pflanzenwachstum (Übersicht bei Himmelbach et al., 1998), Samenentwicklung und -reife. Eine entscheidende Bedeutung hat die Abscisinsäure bei der Regulation von Spaltöffnungs-bewegungen. Unter Wasserstressbedingungen steigt die ABA-Konzentration an, der Zellturgor wird reduziert und die Spaltöffnungen werden geschlossen, um den Wasser-verlust durch Transpiration zu limitieren. Die meisten der ABA-defizienten und ABA-insensitiven Mutanten tendieren zum Welken unter normalen Luftfeuchtigkeits-

bedingungen, was auf eine Störung des Stomataschlusses hinweist (Übersicht bei Giraudat et al., 1994; Leung und Giraudat, 1998).

Der ABA-Gehalt pro Blatteinheit ändert sich vor dem Stomataschluß nicht. Unter den Bedingungen des Trockenstresses induzieren komplexe pH-Änderungen in den Kompartimenten eine Umverteilung der Abscisinsäure zwischen den verschiedenen Zellkompartimenten (Übersicht bei Hartung und Slovik, 1991).

Es gibt Hinweise darauf, daß Schließzellen mindestens zwei Orte der ABA-Wahrnehmung besitzen, die an der Regulation der Spaltöffnungsbewegung beteiligt sind. Es wurde sowohl die Lokalisierung an der Apoplastenseite der Plasmamembran als auch eine intrazelluläre Lokalisierung nachgewiesen (MacRobbie, 1995a, 1995b; Schwartz et al., 1994; Übersicht bei Allan und Trewavas, 1994). Kürzlich wurden ABA-bindende Proteine in der mikrosomalen Fraktion von *Arabidopsis*-Zellen entdeckt (Pedron et al., 1998). Es wird vermutet, daß interne Rezeptoren die Ionenkanäle des Tonoplasten zur Freisetzung von Ionen aus der Vakuole regulieren, während externe Rezeptoren den Ionenausstrom an der Plasmamembran stimulieren (MacRobbie, 1995a, 1995b). Bisher wurden jedoch noch keine ABA-Rezeptoren identifiziert.

Neben den schnellen Einflüssen der Abscisinsäure auf die Signaltransduktion in Schließzellen sind auch die Effekte von ABA auf die Genexpression in Samen und vegetativen Geweben bekannt. Eine große Anzahl von ABA-regulierten Genen wurde identifiziert, vorwiegend als Antwort auf Umweltstreß (z.B. Kälte oder Austrocknung), auf Verwundung oder im Zusammenhang mit der späten Samenentwicklung (Übersicht bei Chandler und Robertson, 1994; Shinozaki und Yamaguchi-Shinozaki, 1996). Dabei ist zu erwähnen, daß ABA nicht an allen Signalketten beteiligt ist, die zur Expression von streßinduzierten Genen führen. So kontrollieren mindestens fünf Signalketten die Expression von Genen, die durch Trockenheit oder Kälte induziert werden. Zwei dieser Signaltransduktionswege sind ABA-abhängig, drei sind ABA-unabhängig (Shinozaki und Yamaguchi-Shinozaki, 1996). Die Mechanismen, mit denen ABA die Genexpression reguliert, können transkriptionelle Prozesse und / oder posttranskriptionelle Ereignisse wie die Prozessierung von Transkripten, mRNA-Stabilität, translationale Kontrolle sowie Proteinaktivität und –"turnover" einschließen (Chandler und Robertson, 1994). Unter Streßbedingungen konnte die Expression von Genen beobachtet werden, die auch in nichtgestreßtem Gewebe durch exogene ABA-Gabe induziert werden können (Singh et al., 1987; Gomez et al., 1988; Mundy und Chua, 1988). Bei der Charakterisierung von Biosynthesemutanten und transgenen Pflanzen wurde jedoch festgestellt, daß die

Induzierbarkeit eines Gens durch exogen applizierte ABA nicht notwendigerweise die Regulation dieses Gens durch endogene ABA bei Streß einschließt (Gilmour und Thomashow, 1991; Nordin et al., 1991; Imai et al., 1995).

Durch die Untersuchungen von ABA-responsiven Promotoren konnten verschiedene *cis*-aktive Elemente identifiziert werden, die an der ABA-induzierten Genexpression beteiligt sind. Neben den ABRE ("ABA response elements") -ähnlichen Motiven mit einem ACGT-Kernmotiv, spielen unter anderem sogenannte "Sph"- und ABRC-Elemente eine Rolle (Übersicht bei Leung und Giraudat, 1998; Busk und Pages, 1998). Die *trans*-aktiven Elemente, die die ABA-Regulation über die obengenannten *cis*-Elemente vermitteln, sind noch weitgehend unbekannt. Verschiedene Proteine mit Leucin-Zipper-Motiven (bZIP), die an ABREs *in vivo* binden und / oder durch ABA auf mRNA-Ebene induziert werden, wurden bereits kloniert (Übersicht bei Leung und Giraudat, 1998; Busk und Pages, 1998).

## **1.2 Expression von Antikörpern und Antikörperfragmenten in Pflanzen**

Mit der Entwicklung von rekombinanten DNA-Techniken in den letzten Jahren wurde es möglich, hochspezifische rekombinante Antikörper und Antikörperfragmente zu konstruieren und in einer Vielzahl von Wirtsorganismen zu exprimieren. Antikörpermoleküle sind multimere Proteine, bestehend aus schweren und leichten Immunglobulinketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und als Produkt zweier unterschiedlicher Gene gebildet werden. 1989 konnte erstmalig die Expression eines vollständigen Antikörpers in Pflanzen gezeigt werden (Hiatt et al., 1989). Voraussetzung für die Erzielung der Antigenbindungsaktivität ist die korrekte Faltung und Assemblierung der leichten und schweren Immunglobulinketten zum kompletten Antikörpermolekül. Diese kann nur in bestimmten pflanzlichen Zellkompartimenten (wie dem endoplasmatischen Retikulum) mit günstigem Redoxpotential und vorhandenen Chaperonen, die Faltung und Zusammenlagerung der Immunglobulinketten unterstützen, erreicht werden. Dieser Nachteil kann mit der Konstruktion und Expression von sogenannten Einzelkettenantikörpern (scFv) umgangen werden. ScFv-Fragmente bestehen aus den variablen Domänen der schweren ( $V_H$ ) und leichten ( $V_L$ ) Polypeptidkette des ursprünglichen Immunglobulins, die über ein flexibles Linkerpeptid kovalent miteinander verbunden sind (Bird et al., 1988). ScFv's können durch Fusions-PCR mit den aus Hybridomzellen isolierten variablen Genen hergestellt werden (Chaudhary et al., 1990).

Sie enthalten die komplette Bindungsstelle des ursprünglichen Antikörpers und besitzen daher eine nahezu vollständige antigenbindende Aktivität (Bird et al., 1988).

Rekombinante Antikörper und Antikörperfragmente können durch intrazelluläre, kompartimentspezifische Expression zur Blockierung von biologischen Funktionen ausgewählter Antigene, wie beispielsweise regulatorischer Faktoren oder Pathogene, genutzt werden. Diese "intrazelluläre Immunisierung", auch Immunmodulation genannt, wurde bisher in Säugerzellen angewandt, um Onkoproteine (Biocca et al., 1993, 1994) und Zelloberflächenrezeptoren, die an der Krebsentwicklung beteiligt sind (Richardson et al., 1995), zu inaktivieren und die Replikation des HIV-Virus zu hemmen (Marasco et al., 1993; Duan et al., 1994). Die Expression von rekombinanten Antikörpern in Pflanzen ermöglicht, neben der biotechnologischen Nutzung als kostengünstige Produktionssysteme (Übersicht bei Fiedler et al., 1999), die Modulation von pflanzlichen zellulären Antigenen. So konnte bei der Expression von rekombinanten Antikörpern bzw. -fragmenten gegen zwei Pflanzenviren (Tavladoraki et al., 1993; Voss et al., 1995) eine deutliche Reduktion der Infektion beobachtet werden. Weiterhin wurde ein Einzelkettenantikörper gegen den regulatorischen Photorezeptor Cytochrom in Tabakpflanzen exprimiert (Owen et al., 1992).

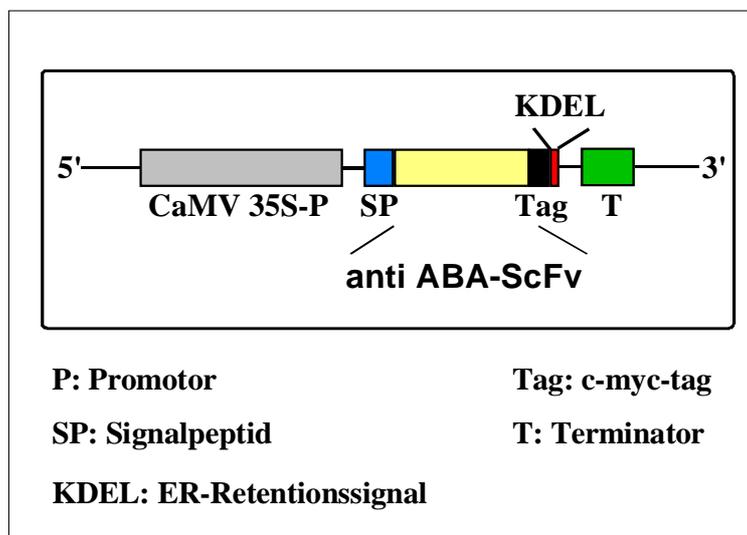
### **1.3 Immunmodulation der Abscisinsäureaktivität in transgenen Tabakpflanzen**

Die Immunmodulation stellt eine vielversprechende Methode dar, um die regulatorischen Funktionen von kleinen, in geringen Konzentrationen biologisch aktiven Molekülen wie Phytohormonen zu untersuchen. Dabei ist von Vorteil, daß Hormonaktivitäten und Hormonkonzentrationen nicht nur in der gesamten Pflanze, sondern auch gewebe- und stadienspezifisch moduliert werden können. Weiterhin kann das Hormon selbst als Endprodukt eines Biosyntheseweges vom Antikörper gebunden, in bestimmten Kompartimenten angereichert und / oder inaktiviert werden, ohne die Funktion einer Vorstufe zu beeinflussen. Im Gegensatz dazu wird bei vielen Biosynthesemutanten und bei der Anwendung von Hemmstoffen die Synthese in frühen Schritten beeinflusst.

In einem neuen Ansatz wurde endogene Abscisinsäure durch einen intrazellulär exprimierten spezifischen Einzelkettenantikörper (anti-ABA scFv) blockiert (Artsaenko et al., 1995; Phillips et al., 1997).

Aus einer Hybridoma-Zelllinie, die einen monoklonalen Antikörper (15-I-C5) mit einer hohen Spezifität und Affinität gegenüber freier Abscisinsäure produziert (Mertens et al., 1983), wurde ein synthetisches Einzelketten-Antikörpermolekül konstruiert und charakterisiert (Artsaenko et al., 1994). Der monoklonale Antikörper kreuzreagiert nicht mit (-)-*cis*, *trans*-ABA, (+)-*trans*, *trans*-ABA, (+)-*cis*, *trans*-ABA Methylester oder anderen ABA-Vorstufen und -Metaboliten (Mertens, 1985).

Es wurden Pflanzenexpressionskassetten hergestellt, die eine Expression des scFv-Genes zum einen ubiquitär in nahezu allen Pflanzenzellen und zum anderen samenspezifisch ermöglichen. Die samenspezifische Expression unter Kontrolle des USP-Promotors führte zu phänotypisch normalen Tabakpflanzen, die jedoch deutliche Veränderungen in der Embryoentwicklung aufweisen. Durch die Inaktivierung der Abscisinsäure wird das Samenreifungsprogramm unterbrochen und eine vegetative Entwicklung ausgelöst (Phillips et al., 1997). Zur Untersuchung der pleiotropen physiologischen Effekte der Abscisinsäure wurde der konstitutive CaMV 35S-Promotor für die Transkriptionsregulation des anti-ABA scFv-Genes eingesetzt (Artsaenko et al., 1995). Das sogenannte RA-Genkonstrukt (Abb.2) ermöglicht die Anreicherung des scFv-Proteins bis zu 6,8 % TSP (Fiedler et al., 1997) im Lumen des endoplasmatischen Retikulums der Pflanzenzellen.



**Abb.2:** Schematische Darstellung der Expressionskassette des anti-ABA-Einzelkettenantikörpers.

Das Legumin B4-Signalpeptid (N-terminal) bewirkt die Translokation des single chain-Antikörpers durch die ER-Membran in das Lumen des ER und damit den Eintritt in den sekretorischen Weg. Die Retention des scFv-Proteins im endoplasmatischen Retikulum wird durch die C-terminale KDEL-Sequenz ermöglicht. Die Fusion eines c-myc-tags erlaubt die Detektion des scFv-Proteins im "Western blot" und die affinitätschromatografische Reinigung unter Verwendung von anti-c-myc-Antikörpern.

Das scFv-Protein konnte durch Elektronenmikroskopie und Immunolokalisierung mittels anti-c-myc-Antikörpern im ER und in der Kernmembran der transgenen Pflanzen nachgewiesen werden (Artsaenko et al., 1995). Die Anreicherung des spezifischen anti-ABA-Einzelkettenantikörpers im ER der transgenen Tabakpflanzen (RA-Pflanzen) führte zu Ausbildung eines welkenden Phänotyps (Artsaenko et al., 1995). In physiologischen Untersuchungen konnten eine Überempfindlichkeit gegenüber Wasserstreß und erhöhte stomatare Leitfähigkeiten selbst bei hohen Kohlendioxidkonzentrationen nachgewiesen werden (Artsaenko et al., 1995). Offensichtlich ist der Stomataschluß in den transgenen Pflanzen behindert.

Ähnlich den ABA-Mangelmutanten zeigen die RA-Pflanzen typische Symptome für ABA-Mangel, besitzen aber 2- bis 10-fach höhere ABA-Gehalte als Wildtyppflanzen (Artsaenko et al., 1995). Die Pflanzen weisen neben einem langsameren Wachstum eine veränderte Morphologie mit verringerter Apikaldominanz, sproßbürtigen Wurzeln und schmaleren, gewellten Blättern auf (Artsaenko, 1996).

Im Anschluß an die oben aufgeführten Charakterisierungen sollten die transgenen RA-Pflanzen im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit auf molekularer Ebene untersucht werden. Zur Analyse der Gentranskription sollten Methoden angewandt werden, die eine qualitative und quantitative Untersuchung einer großen Anzahl von Genen erlauben.

#### **1.4 "High-throughput"-Methoden zur Analyse der differentiellen Genexpression**

Obwohl die Feineinstellung der Genexpression unter anderem mRNA-Stabilität, posttranslationale Modifikationen, Regulation der Transportmechanismen und Proteinabbau einschließt, wird die eukaryotische Genexpression primär auf Transkriptionsebene reguliert. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Methoden entwickelt, die eine systematische Untersuchung einer großen Anzahl von Transkripten in einem hohen Durchsatz erlauben. Diese, häufig an medizinischen Problemstellungen im

Rahmen des Humangenomprojektes eingeführten Techniken, sind eng mit der Entwicklung von Robotertechnologien sowie der automatisierten Datenerfassung und -analyse gekoppelt. Zunehmend finden diese Technologien auch Einsatz in der Pflanzenmolekularbiologie, um die zwischen zwei oder mehr Populationen von RNA-Transkripten differentiell exprimierte Gene zu erfassen. So können beispielsweise Transkripte identifiziert werden, die für spezielle Gewebe, Organe oder Entwicklungsstadien spezifisch sind oder durch Umweltstreß und Pathogene beeinflusst werden. Weiterhin können Unterschiede in der Genexpression von Transgenen bzw. Mutanten und Wildtyp untersucht und daraus Rückschlüsse auf physiologische Vorgänge gezogen werden. Die meisten dieser Techniken basieren auf der Gelfraktionierung und der PCR-Amplifizierung von cDNA oder auf der Hybridisierung von komplexer cDNA mit immobilisierter DNA.

#### **1.4.1 Offene Systeme zur Untersuchung der differentiellen Genexpression**

Methoden, die hauptsächlich auf der Gelfraktionierung von cDNA-Populationen und auf PCR-Amplifikation differentiell exprimierter Sequenzen beruhen, wurden in den vergangenen Jahren sehr intensiv genutzt, um viele wichtige, differentiell exprimierte Gene zu isolieren. Es handelt sich dabei um offene Systeme, d.h. sie sind nicht auf existierende Datenbanken oder Banken von Klonen beschränkt. Im folgenden sollen die wichtigsten Methoden kurz vorgestellt werden.

Das "Differential Display" ist eine von Liang und Pardee (1992) entwickelte Methode, um individuelle mRNAs zu isolieren und zu klonieren. Ein Oligo-dT-Primer wird am polyadenylierten 3'-Ende der mRNAs verankert, ein anderer mit willkürlich gewählter Sequenz bindet in Abhängigkeit von der mRNA-Sequenz an verschiedene Positionen. Die amplifizierten cDNA-Sequenzen werden in einem Polyacrylamidgel fraktioniert. Wird eine ausreichende Anzahl von Primern verwendet, so können die meisten Transkripte einer mRNA-Probe erfaßt werden. Die Unterschiede in der Genexpression werden durch die Ab- bzw. Anwesenheit einer Bande bzw. durch Intensitätsunterschiede auf dem Gel visualisiert. Von Nachteil sind hohe Raten von "falschen Positiven" sowie die häufige Isolation von Mischpopulationen. Die erhaltenen cDNA-Sequenzen umfassen häufig nur 3'-nichtcodierende Sequenzen, so daß die Identifikation der Gene erschwert wird. Zur

Verbesserung der "Differential Display"-Technik wurden zahlreiche Modifikationen entwickelt.

Die Technik des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (AFLP, "Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism"; Vos et al., 1995) wurde erstmals von Bachem et al. (1996) in der Pflanzenbiologie zur Untersuchung der Knollenentwicklung von Kartoffel eingesetzt. Bei dieser Technik wird genomische DNA bzw. cDNA mit zwei Restriktionsenzymen geschnitten, Adapter an die resultierenden kohäsiven Enden anligiert, die Restriktionsfragmente selektiv amplifiziert und auf einem Gel analysiert. Durch eine strenge Hybridisierung der Primer an die Adapter wird die Variabilität des traditionellen "Differential Display" reduziert, jede Region der cDNA kann amplifiziert werden und somit können verstärkt codierende Regionen erfaßt werden.

Zahlreiche Methoden zur cDNA-Subtraktion und Konstruktion von Subtraktionsbanken (Hedrick et al., 1984) wurden entwickelt. Das Prinzip besteht darin, daß die cDNA einer ersten Population, die zusätzlich exprimierte Gene enthält, mit einem Überschuß an cDNA einer zweiten Population hybridisiert wird. Die nichthybridisierende Fraktion, die die differentiellen Gene enthält, wird von den Hybriden (meist physikalisch) abgetrennt. Diese konventionellen Methoden haben den Nachteil, daß seltene differentielle Transkripte nicht erfaßt werden können.

Eine weiterentwickelte Technik, die repräsentative Differenzanalyse (RDA, "Representational Difference Analysis"), isoliert die zwischen zwei DNA-Populationen differentiellen Sequenzen durch Subtraktion und reichert sie durch PCR-Schritte kinetisch an. Die RDA wurde ursprünglich zur Erfassung der Unterschiede zwischen zwei komplexen Genomen entwickelt (Lisitsyn et al., 1993) und später auf die cDNA-Analyse übertragen (Hubank und Schatz, 1994).

Eine der RDA ähnliche Methode, die "Suppression Subtractive Hybridisation" SSH (Diatchenko et al., 1996) basiert auf einer "Suppressions-PCR" (Siebert et al., 1995) und kombiniert Normalisierung und Subtraktion in einem Schritt. Durch den Normalisierungsschritt können seltene Transkripte in der differentiellen Fraktion über 1000-fach angereichert werden.

Die Entwicklung von automatisierten, hocheffizienten Sequenzierungsgeräten in den neunziger Jahren bot einen völlig neuen Ansatz zur Untersuchung der Genexpression. Die Repräsentation einer bestimmten Sequenz in einer durch Sequenzierung erstellten Datenbank wird verwendet, um Aussagen über die Häufigkeit dieses Transkriptes zu treffen.

Die Sequenzierung von ESTs ("Expressed Sequence Tags") wurde erstmalig von Adams et al. (1991) publiziert. cDNA-Bänke werden hergestellt und die Klone nach dem Zufallsprinzip isoliert. In einer Sequenzierungsreaktion werden Fragmente von ca. 300 bp produziert, die das Transkript eindeutig identifizieren ("Tags"). Voraussetzungen sind automatisierte Techniken zur DNA-Sequenzierung und Datenanalyse. Die EST-Sequenzierung ist eine bedeutende Strategie zur Identifizierung neuer Gene und ermöglicht in Kombination mit der DNA-"Array"-Technik (siehe 1.4.2) eine Analyse der Genexpression in hohem Durchsatz.

Die "high throughput"-Methode der seriellen Analyse der Genexpression (SAGE) wurde 1995 durch Velculescu et al. entwickelt und ist im wesentlichen eine beschleunigte Variante der EST-Sequenzierung. Bei dieser Methode wird eine für jedes Transkript der Zelle oder des Gewebes einzigartige, aus 13 oder mehr Basen bestehende Sequenz ("Tag") hergestellt. Durch Kombination dieser Sequenzen in definierten Ligationsschritten erhält man eine Bank, in der jeder Klon kurze, einzigartige Sequenzen für 20 oder mehr Gene enthält. Durch die effizient durchführbare Sequenzierung der SAGE-Bank können Transkriptionsprofile in hohem Durchsatz erstellt werden.

#### **1.4.2 DNA-"Arrays"**

Diese Methode des Expressionsprofilings basiert auf der Hybridisierung von Transkripten mit geordneten DNA-Molekülen, die an ein festes Trägermaterial gebunden sind. Die trägergebundene DNA liegt im Überschuß vor, so daß die Menge der Probe, die an eine bestimmte immobilisierte DNA hybridisiert, ein Maß für die Häufigkeit dieses Transkriptes in der mRNA-Population darstellt. Es können Bakterienkolonien aus genomischen oder cDNA-Banken, Plasmid-DNA, PCR-Produkte (z.B. ESTs) oder Oligonukleotide immobilisiert werden. Als Trägermaterialien werden Nylon- oder Nitrozellulosemembranen ("Macro-Arraying") sowie Glaschips oder Silikon ("Micro-Arraying") eingesetzt. Die Detektion erfolgt hauptsächlich radioaktiv ("Macro-Arraying") oder durch Chemifluoreszenz sowie Chemilumineszenz.

Die differentielle Hybridisierung von ungeordneten genomischen und cDNA-Banken in Form von Kolonie- oder Plaquefiltern ist bereits seit vielen Jahren eine Standardmethode (St. John et al., 1979). Mit dieser Methode konnten unter anderem gewebespezifisch exprimierte Gene von *Arabidopsis thaliana* isoliert werden (Simoens et al., 1988).

Das Ordnen von DNA-Sequenzen in "Arrays" eröffnet eine Reihe von Vorteilen. Quantitative Informationen tausender Gensequenzen (Expressionsprofile) können simultan in einer Hybridisierung erfaßt werden. Jede Information über einen Klon oder eine cDNA-Sequenz kann in Datenbanken gesammelt werden. Bei geordneten Banken liegt jeder Klon in Reinkultur in der Mikrotiterplatte vor, hat eine definierte Adresse und kann problemlos für weitere Untersuchungen isoliert werden. Daher entfallen aufwendige Rückscreening-schritte.

Nachteil dieses geschlossenen Systems ist, daß die Expressionsuntersuchungen auf die Gensequenzen beschränkt sind, die auf der Membran bzw. dem Chip aufgebracht sind.

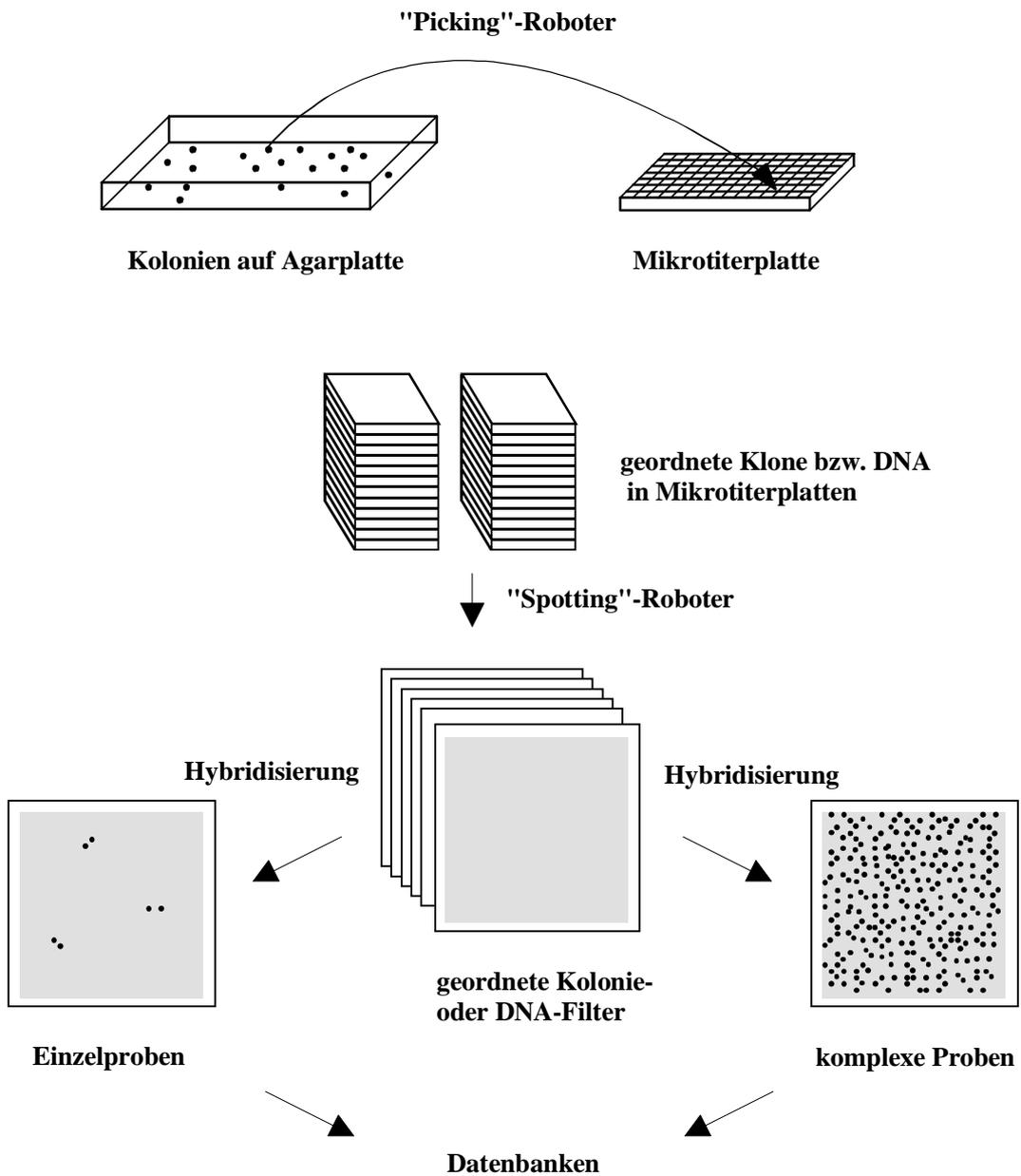
### "Macro-Arraying"

Auf Membranen geordnete bakterielle Kolonien (genomische Banken, cDNA-Banken) sowie DNA-"Spots" stellen geeignete Ressourcen für vergleichende Hybridisierungsstudien dar (Lennon und Lehrach, 1991; Gress et al., 1992).

Voraussetzung war die Entwicklung einer automatisierten Technologie, die eine Herstellung von großen geordneten Banken erlaubt (Maier et al., 1994, 1997). Roboter übernehmen Arbeitsschritte, die sich ständig wiederholen oder eine sehr hohe Präzision erfordern.

Für die Herstellung geordneter Banken werden die Klone auf Agarplatten ausplattiert und mit Hilfe eines Roboters in die Vertiefungen von Mikrotiterplatten überführt ("Picking"; Abb.3). In einem zweiten Schritt werden die Klone bzw. die DNA-Sequenzen robotergestützt in geordneter Weise auf Membranen übertragen ("Spotting"; Abb.3). Derzeit sind mit handelsüblichen Robotern (z.B. "BioGrid"; BioRobotics) auf hochdichten Koloniefiltern Spottingdichten bis ca. 120 Kolonien / cm<sup>2</sup> (Spottingmuster 5 x 5) und bei DNA-Filtern bis ca. 170 "Spots" / cm<sup>2</sup> (Spottingmuster 6 x 6) erreichbar.

Die Verwendung von Nylonfiltern bietet eine Reihe von Vorteilen. Ihre Handhabung ist einfach, sie sind wiederverwendbar und für die Detektion ist keine spezielle Ausrüstung nötig. Weiterhin können jederzeit neue Kopien angefertigt werden. Seit einiger Zeit sind diverse automatisierte "Spot"-Auswertungsprogramme im Handel erhältlich, die eine quantitative Auswertung erheblich erleichtern.



**Abb.3:** Herstellung von geordneten Kolonie- oder DNA-Filtern durch robotergestütztes "Picking" und "Spotting". Durch Vergleich der Hybridisierungsmuster verschiedener komplexer Proben können differentiell exprimierte Gene identifiziert werden.

### "Micro-Arraying"

Die "Microarray"-Technik wurde von Schena et al. (1995) an der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* entwickelt. Sie ist durch die Miniaturisierung und die Aufbringung höherer Klondichten auf anderen Oberflächen gekennzeichnet. So können auf Glaträgern über 1000 cDNA "Spots" / cm<sup>2</sup> untergebracht werden (Schena, 1996).

Allgemein lassen sich zwei Arten von mikroskopischen DNA-"Arrays" unterscheiden. Zum einen werden cDNA-Fragmente oder chemisch synthetisierte Oligonukleotide robotergestützt auf mit positiv geladenem Polylysin beschichteten Glaträgern aufgebracht (mechanisches "Microspotting"). Im zweiten Fall werden Oligonukleotide direkt *in situ* auf dem Chip synthetisiert, wobei photolithografische oder piezoelektrische Methoden eingesetzt werden (Übersicht bei Schena et al., 1998).

Beide zu vergleichenden mRNA-Populationen werden während der Umschreibung in cDNA mit zwei verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen markiert. Die cDNA-"Pools" werden gemischt und mit der geordneten DNA hybridisiert. Nach der Hybridisierung wird der Glaschip bei geeigneten Wellenlängen mit speziellen Laserscannern eingelesen. Differentielle Gene können durch ihre Farbgebung leicht erkannt werden (Schena et al., 1995).

Das "Array" nimmt eine nur sehr kleine Fläche ein, so daß das Volumen der Hybridisierungslösung extrem reduziert werden kann. Folglich werden Sondenkonzentration und Sensitivität gesteigert. Multiple Proben können in einem Hybridisierungsschritt getestet werden. Der Einsatz der "Microarray"-Technik wird bisher noch durch die hohen technischen Anforderungen an Herstellung und Detektion begrenzt.

Derzeit werden "BioChips" entwickelt, die das gesamte Genom von *Arabidopsis* und Mais abdecken.

Eine neue, ergänzende Entwicklung zum DNA-Genexpressionsprofiling sind Protein-"Microarrays", die eine Analyse der Genexpression auf Proteinebene und das "Screening" mit Antikörpern ermöglichen (Lueking et al., 1999).

## 1.5 Zielstellung der Arbeit

Im Anschluß an die unter 1.3 aufgeführten morphologischen, biochemischen und physiologischen Charakterisierungen der anti-ABA immunmodulierten Pflanzen sollten im Rahmen dieser Arbeit folgende Schwerpunkte untersucht werden:

1. Es sollte geprüft werden, ob der spezifische Phänotyp der RA-Pflanzen durch eine kurzzeitige ABA-Applikation bzw. durch eine Langzeitbehandlung mit Abscisinsäure normalisiert werden kann. Zunächst sollte ein geeignetes Behandlungskonzept hinsichtlich der erforderlichen Abscisinsäurekonzentration und der Behandlungsdauer entwickelt werden. Weiterführende physiologische und biochemische Untersuchungen (Gesamt-ABA-Gehalte und theoretisch freie ABA) der langzeitbehandelten transgenen Pflanzen sollten sich anschließen. Aus den Ergebnissen sollten Schlußfolgerungen auf die Wirkungsweise der Einzelkettenantikörper und die durch sie hervorgerufenen Effekte gezogen werden.
2. Der durch Expression des anti-ABA scFv-Antikörpers verursachte charakteristische Phänotyp der RA-Pflanzen sollte weiterhin auf molekularer Ebene studiert werden. Es sollte untersucht werden, ob zwischen hochexprimierenden RA-Pflanzen und Wildtyp Unterschiede in der Gentranskription von Blatt und Schließzellen erfaßbar sind. Unter Berücksichtigung der verfügbaren Techniken zum Zeitpunkt der Konzipierung dieser Arbeiten wurde das "Macro-Arraying" als Methode zur simultanen Untersuchung einer großen Anzahl von Transkripten ausgewählt. Zu diesem Zweck wurden eine geordnete genomische sowie eine schließzellspezifische cDNA-Bank aus Wildtyptabak hergestellt, charakterisiert und zu vergleichenden Hybridisierungsstudien genutzt. Derartige Expressionsprofile bieten weiterhin die Möglichkeit, die Gentranskription in Blatt und Schließzellen zu vergleichen und den Einfluß der Langzeitbehandlung mit Abscisinsäure zu untersuchen. Aus den Ergebnissen sollten Schlußfolgerungen auf die funktionell bedingte spezifische Genexpression in Schließzellen und die Rolle der Abscisinsäure bei der Regulation der Genexpression gezogen werden.
3. Im Rahmen einer Kooperation sollten die Schließzellen der transgenen RA-Pflanzen sowie der Einfluß der langfristigen ABA-Behandlung auf die Stomataentwicklung rasterelektronenmikroskopisch untersucht werden.

Mit diesen zellulären und molekularen Analysen der transgenen Pflanzen sollte es möglich sein, Rückschlüsse auf Abscisinsäure-vermittelte Signalübertragungs- und Regulationsprozesse zu ziehen.

## 2. Material

### 2.1 Pflanzenmaterial

Wildtyp *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN (SNN), anti-ABA scFv transgene Tabakpflanzen (RA-Pflanzen, Linien 5/1, 16/7 und *in vitro*- Klon RA 27), anti-Oxazolone scFv transgene Tabakpflanzen (Linien UF 9/13 und 9/38)

### 2.2 Bakterienstämme und Phagen

#### E. coli- Stämme:

XL1- Blue MR (Stratagene)  $\Delta(\text{mrcA})183 \Delta(\text{mrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac}$ .

XL1- Blue MRF<sup>'</sup> (Stratagene)  $\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI}^{\text{q}}\Delta\text{M15 Tn10 (Tet}^{\text{r}}\text{)]}$ .

SOLR (Stratagene)  $e14^-(\text{McrA}^-) \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})171 \text{ sbcC recB recJ uvrC umuC}::\text{Tn5 (Kan}^{\text{r}}) \text{ lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1 } \lambda^{\text{R}} [\text{F' proAB lacI}^{\text{q}}\Delta\text{M15}] \text{ Su}^-$ .

VCS 257 (Stratagene)

#### Phagen:

ExAssist<sup>TM</sup> - Helferphage (Stratagene)

### 2.3 Vektoren und Primer

Vektoren: SuperCos 1 Amp<sup>r</sup> (Stratagene)  
Uni- ZAP XR Amp<sup>r</sup> (Stratagene)

Primer für die Erststrangsynthese: Linker-Primer (Stratagene)  
Oligo (dT)<sub>25</sub> -Primer (Pharmacia)

### Sequenzierungsprimer:

"M13 universal" (Pharmacia)      5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3'

"M13 reverse"(Pharmacia)      5' AAC AGC TAT GAC CAT G 3'

## **2.4 Enzyme**

Alkalische Phosphatase CIAP ("calf intestinal alkaline phosphatase", Gibco BRL),  
Reverse Transkriptase ("Expand Reverse Transcriptase", Boehringer Mannheim),  
Lysozym (Sigma), Pronase (Boehringer Mannheim), Proteinase K (Serva),  
Restriktionsendonukleasen (Gibco BRL), RNase A (Boehringer Mannheim),  
T4 DNA Ligase (Invitrogen)

## **2.5 Pflanzenhormone und Antibiotika**

(±)-*cis, trans*- Abscisinsäure (Sigma), Ampicillin (Duchefa), Kanamycin (Duchefa),  
Tetracyclin (Serva)

## **2.6 Antikörper und Konjugate**

anti-c-myc-Antikörper (monoklonal; Munroe und Pelham, 1986), anti-Maus-  
Immunglobulin-Peroxidase-Konjugat (Amersham), Kaninchen anti-Maus-Immunglobulin  
(monoklonal, Sigma), Maus anti-ABA-Antikörper 15-I-C5 (E.W.Weiler, Bochum), ABA-  
alkalische Phosphatase-Konjugat (Weiler, 1986)

## **2.7 DNA- und Proteinmarker**

100 bp-DNA-Leiter (Gibco BRL), 1 kb-DNA-Leiter (Gibco BRL),  $\lambda$  DNA / Hind III-  
Fragmente (Gibco BRL), "Kaleidoscope Prestained Standards" (BioRad)

## **2.8 Weitere Chemikalien und Kits**

Amersham: [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] dATP, "ECL Western blotting analysis system", "Megaprime<sup>TM</sup> DNA  
Labelling System"

Biomol: p-Nitrophenylphosphat  
 BioRad: "Bio-Rad-protein assay"  
 Boehringer Mannheim: "AttoPhos™ Substrate Set", Blockierungsreagens, Heringssperma-DNA, IPTG, "DIG DNA Labelling and Detection Kit"  
 Difco: Bacto-Agar, Bacto-Trypton, Hefeextrakt  
 DuPont: [ $\alpha^{33}\text{P}$ ] dATP, [ $\alpha^{33}\text{P}$ ] dCTP  
 Gibco BRL: TEMED, Heringssperma-DNA  
 National Diagnostics: 30 % Acrylamid / Bisacrylamid  
 Pharmacia: "mRNA Purification Kit"  
 Premier Beverages: Marvel (fettfreie Trockenmilch)  
 Reanal (Ungarn): Acrylex P-30  
 Roth: Phenol, Chloroform, Phenol / Chloroform- Lösung, n-Butanol, Isopropanol, Cäsiumchlorid, Ethidiumbromid  
 Serva: BSA  
 Sigma: DTT, DMSO, DEPC, Bromphenolblau, Lithiumacetat, N-laurylsarcosyl, Guanidiniumthiocyanat  
 Stratagene: "SuperCos1 Cosmid Vector Kit", "Uni- ZAP XR Vector Kit", "Gigapack II XL Packaging Extract", "Gigapack III Gold Packaging Extract", "cDNA Synthesis Kit"  
 Qiagen: "DNA Gel Extraction Kit", "Plasmid Mini Kit", "Plasmid Midi Kit"  
 USB: SDS, Ammoniumpersulfat

## 2.9 Medien

### Medien zur Anzucht von Bakterien und Phagen:

LB 1% NaCl, 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt (pH 7,0)

NZY 0,5% NaCl, 0,2%  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5% Hefeextrakt, 1% NZ Amin  
(Caseinhydrolysat) (pH 7,5)

2YT 1% NaCl, 1,6% Trypton, 1% Hefeextrakt (pH 7,5)

Für feste Medien wurde Agar zu 2%, für halbfeste Medien ("Top-Agar") zu 0,7% zugegeben.

### Medium zur Sterilkultur von Tabakpflanzen:

Murashige und Skoog (MS)-Vollmedium (Duchefa)

Alle Medien wurden 15 min bei 121°C autoklaviert.

## 2.10 Puffer und weitere Lösungen

1. Carbonatpuffer: 50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9,6.
2. Church-Puffer: 1 Volumen 10% SDS, 1 Volumen 0,5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,2), 0,25% 0,5 M EDTA.
3. Denaturierungspuffer: 1 M NaCl, 0,4 M NaOH.
4. Extraktionspuffer: 0,2 M NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 10 mM DTT, 0,2% SDS, 100 µg/ml Proteinase K.
5. 10 x HMF<sub>M</sub> ("Hogness Modified Freezing Medium"):  
Lösung A: 5 mM MgSO<sub>4</sub> x 4 H<sub>2</sub>O, 20 mM Natriumcitrat, 85 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 45 % Glycerin.  
Lösung B: 0,66 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,3 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.  
4/5 Lösung A + 1/5 Lösung B = 10 x HMF<sub>M</sub>.
6. Neutralisierungspuffer: 1 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl (pH 7,5).
7. PBST-Puffer: 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween, pH 7,5.
8. Pronase-Puffer: 50 mM Tris- HCl pH 8,5, 50 mM EDTA, 0,1 M NaCl, 1% N-laurylsarcosyl.
9. SDS-Gel-Probenpuffer: 10 % Glycerin, 14% Trenngel- Puffer, 2% SDS, 5 % Mercaptoethanol, Bromphenolblau.
10. SM-Puffer: 0,58% NaCl, 0,2% MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 0,05 M Tris-HCl (pH 7,5), 0,01% Gelatine.
11. 20 x SSC-Puffer: 17,53 % NaCl, 8,82% Natriumcitrat (pH 7,0).
12. TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA.

## 2.11 Geräte und Software

1. "Array Vision", "Spot"-Auswerteprogramm (Imaging Research Inc.)
2. "BioGrid", "Spotting"-Roboter (BioRobotics)
3. "BioPick", "Picking"-Roboter (BioRobotics)
4. Dynatech MR 7000
5. Pulsfeld-Gelelektrophorese Rotaphor (Biometra)
6. Schwingmühle Typ MM-2 (Retsch)

7. STORM 860, Software: "Scanner Control Version 4.1", "Image Quant Version 4.1"  
(Molecular Dynamics)
8. Ultrazentrifuge LE- 70 (Beckmann)
9. UV Stratalinker™ 2400 (Stratagene)
10. "Waring Blendor" (Standmixer, Waring Products Division Dynamics Corporation of  
America)
11. Weißlichtscanner (Pdi), TINA-Programm (Raytest)

## **2.12 Spezielle Materialien**

1. "Bio-Assay"-Schalen, 22 x 22 cm (Nunc)
2. Dialysierschlauch (Serva)
3. Filterpapier (Whatman)
4. Hybond N+ Nylonmembran (Amersham)
5. Mikrotiterplatten, 384er (Genetix, Nunc)
6. Nitrozellulosemembran BA 85 (Schleicher und Schüll)
7. Phosphor Screen (Imagefolie, Kassette) (Molecular Dynamics)
8. Röntgenfilme (Retina)
9. "SizeSep 400 Spun Columns" (Pharmacia Biotech)
10. Verstärkerfolien (Perlux)
11. Zeichentusche, schwarz (Pelikan)

## **3. Methoden**

### **3.1 Normalisierung von anti-ABA-scFv transgenen Pflanzen durch Behandlung mit Abscisinsäure**

#### **3.1.1 Anzucht der Pflanzen und Behandlung mit Abscisinsäure**

Anti-ABA scFv Immunglobulintransgene Pflanzen verschiedener Linien (RA 5/1, RA 16/7 und *in vitro*-Klon RA 27) sowie als Kontrollen anti-Oxazolone scFv transgene Pflanzen (Linien UF 9/13 und 9/38) und Wildtyppflanzen (SNN) wurden in verschiedene Behandlungsexperimente mit Abscisinsäure einbezogen.

Für einen ersten Behandlungsversuch, in dem eine geeignete ABA-Konzentration sowie der zeitliche Ablauf der Behandlung ermittelt werden sollte, wurden Samen von Wildtyp-tabak SNN und der transgenen Linien RA 5/1, RA 16/7, 9/13 und 9/38 zur Keimung auf MS-Medium ausgelegt. Nach einer Woche wurde ein Teil der Sämlinge jeder Linie auf MS-Medium mit Zusatz von 10  $\mu\text{M}$  ABA bzw. 50  $\mu\text{M}$  ABA umgesetzt. Nach 4 Wochen wurden die Pflanzen in Erde getopft und in die Phytokammer überführt. Hier erfolgte die weitere Behandlung durch tägliches Besprühen der Pflanzen mit Wasser oder 10  $\mu\text{M}$  bzw. 50  $\mu\text{M}$  ABA-Lösung über weitere 9 Wochen hinweg. Dabei wurden die Pflanzen so kombiniert, daß jeweils ein Teil der in den ersten vier Wochen unbehandelten und mit ABA in beiden Konzentrationen behandelten Pflanzen in die drei möglichen Besprühgruppen eingeteilt wurden.

In einem zweiten Behandlungsexperiment wurden *in vitro* auf MS-Medium angezogene anti-ABA scFv transgene Pflanzen der Linie RA 27 sowie Wildtyppflanzen SNN in Erde getopft und über 9 Wochen hinweg täglich mit Wasser bzw. 50  $\mu\text{M}$  ABA besprüht.

Weitere Behandlungsexperimente mit RA 27 und dem Wildtyp als Kontrolle, die im Ablauf dem zweiten Experiment entsprachen, wurden durchgeführt, um Pflanzen zur RNA-Isolierung aus Gesamtblatt und Schließzellen sowie zur elektronenmikroskopischen Untersuchung der Schließzellen anzuziehen.

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte in der Phytokammer unter definierten Bedingungen (18°C, 95% relative Luftfeuchtigkeit, Beleuchtungsdauer 16 h, Beleuchtungsintensität 30 % bzw. 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

### **3.1.2 Biochemische und physiologische Untersuchungen**

#### **3.1.2.1 Nachweis des scFv-Proteins mittels "Western blot"**

Die Proben für die Bestimmung des scFv-Gehaltes (Conrad et al., 1998) wurden in der 8. bzw. 6. Behandlungswoche (erstes bzw. zweites Behandlungsexperiment) genommen.

Zum Nachweis der rekombinanten Proteine wurden die Blattscheiben (ca. 20 bis 30 mg Frischgewicht) in einem Eppendorf-Gefäß unter Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  SDS-Probenpuffer mit Hilfe einer entsprechend geformten Eppendorf-Mikropistille, die in eine Bohrmaschine eingespannt wurde, homogenisiert. Das Homogenisat wurde 10 min gekocht und 15 min bei 14.000 g zentrifugiert (Sambrook et al., 1989). Der Proteingehalte des Überstandes

(gesamtlösliches Protein) wurde mit dem "Bio-Rad-protein assay"-Kit nach Bradford (1976) bestimmt.

Die Auftrennung der Proteine (in Abhängigkeit von der scFv-Konzentration 6 bis 40 µg) erfolgte in einem 12,5 %igen Polyacrylamidgel (Sambrook et al., 1989). Um eine spätere Quantifizierung zu ermöglichen, wurde als Standardkontrolle ein gereinigtes scFv-Protein bekannter Konzentration in verschiedenen Verdünnungsstufen aufgetragen. Nach dem Transfer der Proteine auf Nitrozellulose (10 h, 18 V) wurden die Membranen über Nacht bei 4°C in 0,4 %igem Marvel-Puffer (180 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8, 0,4% Marvel) inkubiert. Zur Detektion der scFv-Proteine wurden die Filter zunächst 2 h bei Raumtemperatur mit einem anti-c-myc monoklonalen Antikörper (Munroe und Pelham, 1986) und anschließend 1 h 45 min mit einem anti-Maus-Immunglobulin-Peroxidase-Konjugat (Amersham) inkubiert. Nach dem Waschen konnten die scFv-Proteine auf dem Filter mit Hilfe des "ECL"-Systems (Amersham) enzymatisch detektiert werden. Die Röntgenfilme wurden mit einem Weißlichtscanner eingelesen. Anschließend wurden die scFv-Proteine durch Vergleich mit der Standardkontrolle quantifiziert (TINA-Programm).

### **3.1.2.2 Bestimmung des Gesamt-ABA-Gehaltes**

Die Quantifizierung der Gesamt-ABA-Konzentration erfolgte wie bei Conrad et al. (1998) beschrieben. Die Blattproben wurden im ersten Behandlungsexperiment in der 8. bis 11. Woche (1.ABA-Wert) sowie in der 13. Woche (2.ABA-Wert), im zweiten Behandlungsversuch in der 6. Woche (1.ABA-Wert) bzw. in der 9. Woche (2.ABA-Wert) genommen. Die Blattscheiben der zu testenden Tabakpflanzen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren, pulverisiert und in 1 ml 80 % Aceton resuspendiert. Nach der Extraktion (24 h, 4°C, unter Schütteln im Dunkeln) und der Zentrifugation wurde der ABA-Gehalt des Überstandes in einem ABA-ELISA getestet. In Vorbereitung wurden die ELISA-Platten mit Kaninchen anti-Maus Immunglobulin (Sigma) verdünnt in 0,05 M Carbonatpuffer beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen der Platten erfolgte die Zugabe von Maus anti-ABA monoklonalem Antikörper 15-I-C5 verdünnt in PBST und die Inkubation bei 4°C über Nacht. Nach dem Waschen wurden die Proben bzw. eine Standard (+)-*cis, trans*-ABA (Sigma)- Lösung, vermischt mit ABA-alkalische Phosphatase-Konjugat (Herstellung nach Weiler, 1986) in PBST zugegeben. Es folgte eine Inkubation bei 4°C über Nacht. Die enzymatische Reaktion wurde mit

p-Nitrophenylphosphat ( $1 \text{ g l}^{-1}$  in  $0,05 \text{ M}$  Carbonatpuffer) bei  $37^\circ\text{C}$  für  $1 \text{ h}$  durchgeführt. Die optische Dichte wurde bei  $405 \text{ nm}$  mit einem Dynatech MR 7000 gemessen.

Durch Vergleich der gemessenen optischen Dichte mit der auf jeder ELISA-Platte angelegten Standardkurve (Bereich von  $1$  bis  $200 \text{ pg}$  pro Vertiefung) und den Bezug dieses Wertes auf das Frischgewicht der Blattscheiben erhält man den Gesamt-ABA-Gehalt in  $\text{ng g}^{-1}$  Frischgewicht.

### 3.1.2.3 Berechnung der theoretisch freien ABA

Die theoretisch freie ABA kann mit Hilfe der folgenden Gleichung nach Neri et al. (1996)

$$K_d = \frac{[\text{scFv}] \times [\text{ABA}]}{[\text{scFv ABA Komplex}]}$$

berechnet werden. Diese Formel resultiert aus der Gleichgewichtsreaktion zwischen dem freien monovalenten Antikörper und dem freien Antigen sowie dem Antigen-Antikörperkomplex. Das Gleichgewicht wird durch die Dissoziationskonstante  $K_d$  charakterisiert.

Zur Lösung der Gleichung wurden die Werte für die Konzentration des scFv (in % TSP) sowie für Gesamt-ABA (in  $\text{ng g}^{-1}$  Frischgewicht) in Molaritäten umgerechnet. Für die Berechnungen wurde die Dichte der Blätter der von Wasser gleichgesetzt. Somit ist  $\text{mol / kg}$  equivalent zu  $\text{M}$ .

Die Dissoziationskonstante  $K_d$  des anti-ABA scFv-Antikörpers gegenüber freier ABA ( $1,5 \times 10^{-9} \text{ M}$ ) wurde mittels Kompetitions-ELISA des aus Tabakblättern isolierten und affinitätsgereinigten scFv-Proteins bestimmt (Artsaenko et al., 1995).

Der Gehalt an theoretisch freier ABA resultiert aus der Subtraktion der Konzentration des scFv-ABA-Komplexes von der Gesamt-ABA-Konzentration.

### 3.1.2.4 Gaswechselfmessungen

Das physiologische Verhalten der Tabakpflanzen wurde anhand von Gaswechselfmessungen im ersten Behandlungsversuch in der 9. bis 13. Woche, im zweiten Experiment in der 8. bis 9. Woche untersucht.

Die Messungen der Transpirationsraten wurden von M. Peisker am IPK Gatersleben, wie in Wigger et al. (in Vorbereitung) beschrieben, durchgeführt. Die stomatären Leitfähigkeiten in Abhängigkeit von der Kohlendioxidkonzentration und der Lichtintensität wurden aus der Transpirationsrate und der Blattemperatur in Anlehnung an von Caemmerer und Farquhar (1981) berechnet.

Die Gleichgewichtswerte für die Transpirationsrate und die stomatäre Leitfähigkeit der Blätter wurden zunächst bei einer konstanten Photonenfluxdichte von  $370 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und zwischen 600 und 330 ppm variierenden Kohlendioxidgehalten bestimmt. Anschließend wurden die Messungen bei  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen von etwa 330 ppm und variierenden Photonenfluxdichten zwischen  $650$  und  $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  durchgeführt.

## 3.2 Molekularbiologische Standardprozeduren

### Plasmid- und Cosmidpräparationen

Die Präparation von Plasmid-DNA im kleinen ("Minipreps") und im größeren ("Midipreps") Maßstab durch alkalische Lyse wurde in Anlehnung an Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Die Cosmidpräparationen erfolgten unter Verwendung des "Qiagen Mini"- bzw. "Midi"-Kits nach den entsprechenden Empfehlungen für Cosmidisolationen.

### Isolation der Gesamt-DNA aus *E.coli*

Das Bakterienpellet aus 10 ml Übernachtskultur wurde zentrifugiert, in 500  $\mu\text{l}$  TE-Puffer resuspendiert und mit 28  $\mu\text{l}$  Lysozym-Lösung (10 mg/ml) sowie 17  $\mu\text{l}$  RNase A (5 mg/ml) für 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden 500  $\mu\text{l}$  1,6 % N-laurylsarcosyl in TE-Puffer und 6  $\mu\text{l}$  Proteinase K (10 mg/ml) zugegeben und bei  $50^\circ\text{C}$  bis zur Klärung der Lösung inkubiert. Es schlossen sich die folgenden Extraktionsschritte an: 2 x Phenol, 2 x Phenol/Chloroform, 1 x Chloroform. Die Gesamt-DNA wurde mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetatlösung und 2,5 Volumen Ethanol 1 h bei  $-80^\circ\text{C}$  ausgefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und in 80  $\mu\text{l}$  TE-Puffer resuspendiert.

### Elektrophoresen, DNA-Transfer und DNA-Quantifizierung

Die Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophoresen sowie der DNA-Transfer von Agarosegelen auf Nitrozellulose oder Nylonmembranen unter alkalischen Bedingungen ("Blotting") wurden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

Für die Extraktion und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der "DNA Gel Extraction Kit" (Qiagen) verwendet.

Die Quantifizierung der DNA erfolgte im Ethidiumbromid-Platten-Test (Handbuch "cDNA-Synthesis Kit", Stratagene).

### Sequenzierungen

Die DNA-Sequenzierungen wurden von S. König am IPK Gatersleben unter Verwendung von Fluorescein-markierten Primern mit einem A.L.F. DNA-Sequencer (Pharmacia) durchgeführt.

## **3.3 Cosmidbank TLC**

### **3.3.1 Isolation hochmolekularer genomischer DNA**

Zur Präparation hochmolekularer genomischer DNA aus Wildtyp-Tabakblättern wurde eine modifizierte Methode nach Thompson et al. (1983) genutzt. 6 x 10 g Blattmaterial junger *in vitro*-Wildtyppflanzen SNN wurde in flüssigem Stickstoff zu feinem Puder zermörsert, in jeweils 70 ml Extraktionspuffer aufgenommen und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das resultierende Lysat wurde zunächst mit Phenol, zweimal mit Phenol/Chloroform und anschließend mit Chloroform extrahiert. Die wäßrige Oberphase wurde in einer Petrischale mit dem gleichen Volumen an Ethanol überschichtet und die ausfallende hochmolekulare DNA mit einem Glasstab aufgewickelt. Die DNA wurde über Nacht bei 4°C in einem mit 0,1 % SDS versetzten TE-Puffer gelöst.

Die hochmolekulare DNA wurde in einer Cäsiumchlorid-Ethidiumbromid-Gradienten-Zentrifugation (Refraktionsindex 1,3860; Sambrook et al., 1989) für 24 h bei 45.000 rpm und 15°C gereinigt. Nach Entnahme der chromosomalen hochmolekularen DNA-Fraktion wurde das Ethidiumbromid durch fünfmaliges Ausschütteln mit n-Butanol sowie das Cäsiumchlorid durch eine ausgedehnte Dialyse (1 x 1h, 3 x 24h) in TE-Puffer bei 4°C entfernt (Sambrook et al., 1989). In einer Pulsfeld-Gelelektrophorese (Rotaphor; Sambrook

et al., 1989) konnte eine Größe der genomischen Fragmente von ca. 150 kb nachgewiesen werden. Die hochmolekulare DNA wurde in Vorbereitung auf die Ligation partiell mit MboI gespalten. In einer Testrestriktion konnten Enzymkonzentration ( 0,1 U / $\mu$ g DNA ) und Reaktionszeit (10 min) optimiert werden.

### **3.3.2 Herstellung und erste Charakterisierung der Cosmidbank**

Die Cosmidbank TLC ("tobacco leaf cosmids", Tabakblatt-Cosmide) wurde mit Hilfe des "SuperCos 1 Cosmid Vector Kits" und des "Gigapack II XL"-Verpackungsextraktes der Firma Stratagene hergestellt. Die Vorgehensweise entsprach den Empfehlungen der Herstellerfirma.

Die genomischen Fragmente wurden mit CIAP dephosphoryliert und mit dem vorbereiteten SuperCos 1 Cosmid-Vektor in 7 Ansätzen mit T4 DNA-Ligase zu hochmolekularen Concatemeren ligiert. Mit Hilfe des Verpackungsextraktes wurde die genomische DNA in 42 Ansätzen gröbenselektiv (40-50 kb) in  $\lambda$ -Phagenpartikel verpackt. Bakterielle Wirtszellen XL1-Blue MR wurden mit den Phagenpartikeln infiziert und amplifiziert. Die Lagerung der Cosmidbank erfolgte in Aliquoten bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Für einen ersten Test auf Rekombinanz der Cosmidklone wurde von 18 zufällig ausgewählten Klonen die Gesamt-DNA isoliert, mit EcoRI gespalten, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und die Membran mit radioaktiv markierter genomischer Tabak-DNA hybridisiert (siehe 3.7.1) .

### **3.3.3 Ordnen der Cosmidbank durch "Picking" und "Spotting"**

Das Ordnen von 54.000 Cosmidklonen durch "Picking" und "Spotting" wurde mit Unterstützung des Ressourcenzentrums des MPI für Molekulare Genetik in Berlin durchgeführt.

Die Bakteriensuspension wurde auf einen Titer von ca. 5000 cfu / ml eingestellt und in 1 ml-Aliquoten auf 22 x 22 cm große Agarplatten (1YT-Agar, 50  $\mu$ g / ml Ampicillin) ausplattiert. Um eine gleichmäßige Verteilung der Kolonien zu erzielen, wurden zum Ausplattieren Glasperlen (5 mm Durchmesser) verwendet. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Mit Hilfe von sterilisierbaren Nadeln eines "Picking"-

Roboters (entwickelt am MPI für Molekulare Genetik, Berlin) wurden die Bakterienkolonien von den Agarplatten in die Vertiefungen von 384er Mikrotiterplatten (Flüssigmedium: 2YT, 1 x HMF, 50 µg / ml Ampicillin) überführt. Dabei werden die Kolonien vom Roboter mittels einer Kamera visualisiert und entsprechend ihrer Form und Größe ausgewählt. Die Inkubation der Mikrotiterplatten erfolgte über Nacht bei 37°C, die weitere Lagerung bei – 80°C.

Von den 144 "gepickten" Mikrotiterplatten ("master plates", Originalplatten) wurden durch manuelle Replikation drei Kopien hergestellt.

Die 54.000 genomischen Klone der dritten Kopie (Q03), nun in geordneter Form in 144 Mikrotiterplatten vorliegend, wurden mit Hilfe eines "Spotting"-Roboters (entwickelt am MPI für Molekulare Genetik, Berlin) auf zwei Chargen von Nylon N+ -Membranen (22 x 22 cm) überführt. Die Koloniefilter wurden im Spottingmuster 5 x 5 hergestellt, d.h. die kleinste Spotting-Einheit besteht aus einem Quadrat von 25 "Spots". Die zentrale Position der einzelnen Quadrate, belegt mit einem Tinten-"Spot", dient als Orientierungshilfe. Diese Tintenpunkte bilden auf dem Koloniefilter ein 48 x 48 Muster, wobei jeder Tintenpunkt von 12 verschiedenen jeweils doppelt "gespotteten" Klonen umgeben ist. Das Doppel-"spotting" ist wichtig, um positive Signale von Hybridisierungsartefakten unterscheiden zu können. Folglich enthält jeder Koloniefilter 27.000 jeweils doppelt "gespottete" Cosmidklone. Aus der Anordnung jedes Klonpaares bezüglich des Tintenpunktes und der Position auf den Filtern kann eindeutig Rückschlus auf die Position dieses Klons innerhalb der Mikrotiterplatten gezogen werden.

Anschließend wurden die Filter auf Agarplatten (1YT- Agar, 50 µg / ml Ampicillin) aufgelegt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Cosmidbank ist unter der Bezeichnung TLC 126 am RZPD (Ressourcenzentrum, Primärdatenbank) in Berlin in Form von hochdichten Koloniefiltern und Einzelklonen erhältlich.

### **3.3.4 Prozessierung der Koloniefilter (Cosmide und Plasmide)**

Die Prozessierung der Koloniefilter erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Hoheisel et al. (1991). Zur Denaturierung und Neutralisierung wurden die mit Kolonien bewachsenen Membranen auf mit den jeweiligen Lösungen angefeuchtetes Filterpapier gelegt. Die Denaturierung erfolgte zunächst 4 min bei Raumtemperatur, dann weitere

4 min bei 95°C. Es folgte eine vierminütige Neutralisierung bei Raumtemperatur. Zur Proteolyse wurden die Filter 30 bis 40 min untergetaucht in 600 ml Pronase-Puffer mit 0,25 mg / ml Pronase bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Filter 2 Tage bei Raumtemperatur getrocknet, UV-behandelt ("auto-cross-link", 120 mJ) und zwischen trockenem Filterpapier gelagert.

### **3.4 Präparation der komplexen cDNA**

#### **3.4.1 Präparation epidermaler Fragmente**

Die Präparation der epidermalen Fragmente erfolgte in Anlehnung an Kopka et al. (1997). Von vier bis fünf Tabakpflanzen wurden die Blätter, mit Ausnahme der sehr jungen und seneszenten, geerntet, die Hauptadern entfernt und die Blattstücke in destilliertem Eiswasser gesammelt. Die Blattstücke wurden im 1l-Becher eines "Waring Blendor"-Standmixers durch vier Pulse der Stufe "high" für 15 s mit jeweils 15 s Pause zerkleinert. Anschließend wurde die Suspension durch ein 220 µm-Nylonsieb filtriert und der Überstand mehrmals mit destilliertem Eiswasser gespült. Es folgte eine weitere Zerkleinerung des Überstandes in einem 250 ml-Becher des "Waring Blendors" durch fünf Pulse der Stufe "low" für 15 s mit jeweils 15 s Pause. Die Suspension wurde durch ein 220 µm-Nylonsieb filtriert und der Überstand mit destilliertem Eiswasser gespült. Die erhaltenen epidermalen Fragmente wurden unter einem Mikroskop auf Kontaminationen durch Mesophyll untersucht, ausgewogen und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren.

#### **3.4.2 GTC- RNA- Extraktion**

Für die Isolation der Gesamt-RNA aus Blättern und epidermalen Fragmenten wurde eine modifizierte Methode nach Chomczynski et al. (1987) verwendet.

Das Blattmaterial wurde unter Zugabe einer Spatelspitze DTT-Pulver auf 1 bis 3 g Probe in flüssigem Stickstoff zermörsert.

Für die RNA-Extraktion aus epidermalen Fragmenten erfolgte die Zerkleinerung in gefrorenem Zustand in einer Kugelmühle (Retsch) für 5 min unter Zugabe einer Spatelspitze DTT.

Das Probenmaterial wurde in 5 bis 6 Volumen GTC-Lysepuffer (4 M Guanidiniumthiocyanat, 25 mM Natriumcitrat pH 7, 0,5 % N-laurylsarcosyl) überführt. Im Anschluß an eine Ansäuerung mit 1/10 Volumen 2 M Natriumacetat pH 4 wurde eine Extraktion mit 1 Volumen Phenol und 0,2 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol durchgeführt. Die Proben wurden 15 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (4000 x g, 20 min, Raumtemperatur). Es schloß sich eine zweimalige Extraktion des wäßrigen Überstandes mit Chloroform-Isoamylalkohol an. Die mit Hilfe von Isopropanol (über Nacht, 4°C) ausgefällte RNA wurde zentrifugiert und das Pellet in 1-2 ml TES- Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8, 0,5 % SDS) bei 65°C resuspendiert. Der zentrifugierte Überstand wurde mit 2 Volumen 4 M Lithiumacetat über Nacht bei 4°C gefällt. Nach einer Zentrifugation wurde das RNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und in DEPC-Wasser resuspendiert. Die Quantifizierung der Gesamt-RNA erfolgte durch Messung der OD bei 260 nm, die Reinheit wurde durch das Verhältnis  $OD_{260} / OD_{280}$  beurteilt.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Gesamt-RNA erfolgte nach einer Denaturierung mit Glyoxal und Dimethylsulfoxid (Sambrook et al., 1989).

### **3.4.3 Reinigung der mRNA**

Die Reinigung der polyadenylierten mRNA aus der Gesamt-RNA erfolgte an Oligo (dT)-Zellulose ("mRNA Purification Kit", Pharmacia ).

### **3.4.4 Synthese der komplexen cDNA**

Für die Synthese der doppelsträngigen cDNA aus polyadenylierter RNA wurde der "cDNA Synthesis Kit" der Firma Stratagene verwendet. Die Erst- und Zweitstrangsynthese wurde dem Handbuch der Herstellerfirma entsprechend durchgeführt. Jeweils 5 µg mRNA wurde in Anwesenheit von Nukleotiden, dem Erststrangpuffer und dem Linker-Primer mit MMLV-Reverser Transkriptase in einzelsträngige cDNA umgeschrieben (1 h, 37°C). Der Zweitstrang wurde in einer Reaktion mit DNA-Polymerase I synthetisiert (2,5 h, 16°C).

In einem Versuch zur Modifikation der cDNA-Synthese wurden für die Erststrangsynthese ein Oligo (dT)<sub>25</sub> -Primer (Pharmacia) sowie die bei höheren Temperaturen (42°C) aktive "Expand Reverse Transcriptase" (Boehringer Mannheim) verwendet.

Die komplexe cDNA wurde in Aliquoten bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **3.5 Stomata cDNA-Bank TStP**

#### **3.5.1 Herstellung der Stomata cDNA-Bank TStP**

Wildtyppflanzen SNN wurden als *in vitro*- Klone auf MS-Medium angezogen und anschließend in Erde 5 Wochen im Gewächshaus kultiviert. Die Präparation der epidermalen Fragmente, die GTC-RNA-Extraktion und mRNA-Reinigung sowie die cDNA-Synthese erfolgten wie unter 3.4 beschrieben. Nach dem "Blunting" der Enden wurde die cDNA mit Hilfe von "Size Sep 400 Spun Columns" (Pharmacia) größenfraktioniert, in den Uni-ZAP XR-Vektor (Stratagene) kloniert und mit Hilfe des "Gigapack III Gold"-Verpackungsextraktes in  $\lambda$ -Phagenpartikel verpackt.

Ein Teil der Phagenbank wurde einer Massen-Excision mit Hilfe des ExAssist-Helferphagen unterzogen und die erhaltenen Phagemide (Vektor pBluescript<sup>®</sup> SK(+/-)) in SOLR-*E.coli*-Zellen transformiert. 27.000 der resultierenden bakteriellen cDNA-Klone wurden durch "Picking" und "Spotting" geordnet.

#### **3.5.2 Ordnen der cDNA-Bank durch "Picking" und "Spotting"**

Das Ausplattieren von etwa 5000 Klonen pro Agarplatte erfolgte wie in 3.3.3 beschrieben. Mit Hilfe des "BioPick"-Roboters (BioRobotics) wurden 27.000 schließzellspezifische cDNA-Klone in insgesamt 72 Mikrotiterplatten (384er Format) überimpft. Von diesen Originalplatten (TStP 1–72) wurde unter Verwendung des Replikationsprogrammes des "BioGrid"-Roboters (BioRobotics) eine Kopie (Copy TStP 1–72) angelegt. Diese Kopie diente als Vorlage zum "Spotting" und zur Entnahme interessanter cDNA-Klone.

Mit Hilfe des "BioGrid"-Roboters wurden die 27.000 Klone jeweils in Doppel-"Spots" auf Nylon N+-Membranen übertragen (Spottingdichte 5 x 5). Im Gegensatz zu den Cosmidfiltern wurden die Tintenpunkte nicht zentral, sondern neben der unteren linken Ecke der einzelnen 5 x 5 Quadrate plaziert. Die Inkubation der Filter erfolgte über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Die Prozessierung der Koloniefilter wurde wie in Kapitel 3.3.4 beschrieben durchgeführt.

### **3.6 cDNA-Plasmid-"Arrays" für die "reversed Northern"-Analyse**

Von den durch "reversed Northern" zu testenden cDNA-Klonen wurden zunächst Plasmid-Präparationen in größerem Maßstab (50 ml Anzuchtvolumen, Ausbeute mind. 150 µg Plasmid) nach der Methode der alkalischen Lyse (Sambrook et al., 1989) hergestellt.

Die Konzentration der isolierten Plasmide wurde einheitlich auf 1,5 µg/µl eingestellt.

Die Plasmide wurden in jeweils drei Verdünnungsstufen (Konzentrationen 1,5 µg/µl, 750 ng/µl und 375 ng/µl) und Volumina von 85 µl in die Vertiefungen von Mikrotiterplatten (384er Format) eingefüllt. Als "Leitklone", die in der Hybridisierung ein sehr starkes Signal geben, wurden für Blatt ein Cab 21-Transkript und für Schließzellen eine cDNA, codierend für ein prolinreiches Protein StGCPRP (Konzentration 500 ng/µl und 50 ng/µl), ausgewählt. Um eine gute Orientierung auf dem zu erstellenden Filter zu ermöglichen, wurden einige Vertiefungen der Mikrotiterplatten mit Tinte (Zeichentusche, Pelikan) gefüllt.

Mit Hilfe des "BioGrid"-Roboters wurden die Plasmide im Muster 2 x 2 auf Nylon N+-Membranen übertragen. Um die DNA-Menge auf dem Filter zu erhöhen, wurde jede Verdünnungsstufe achtmal auf dieselbe Stelle der Nylonmembran "gespottet". Anschließend wurden die Filter kurz getrocknet, 3 min auf mit Denaturierungslösung angefeuchtetem Filterpapier denaturiert und zweimal 3 min neutralisiert. Nach dem Trocknen bei Raumtemperatur erfolgte die UV-Behandlung ("auto-cross-link") und die Lagerung zwischen trockenem Filterpapier. Die Mikrotiterplatten wurden bei -80°C gelagert.

### **3.7 Hybridisierungen und Auswertung**

#### **3.7.1 Hybridisierung der Kolonie- und Plasmid-Filter mit radioaktiv markierten Sonden**

Die Koloniefilter wurden in 2 x SSC eingeweicht und vorsichtig von Zellresten befreit.

Die Vorhybridisierung erfolgte über Nacht oder mindestens 6 h bei 65°C in Church-Puffer. Unter Verwendung des "Megaprime<sup>TM</sup> DNA Labelling Systems" (Amersham) wurden die als Sonden dienende komplexen cDNAs und Plasmid- bzw. Cosmid-Inserts radioaktiv mit [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] dATP (Blatt) bzw. [ $\alpha^{33}\text{P}$ ] dATP oder [ $\alpha^{33}\text{P}$ ] dCTP (epidermale

Fragmente) markiert. Die Abtrennung der freien Nukleotide von der markierten DNA erfolgte in Acrylex-Säulen. Nach der Denaturierung (10 min 100°C) wurde die radioaktiv markierte Sonde der Hybridisierungslösung (Church-Puffer, 100 µg / ml denaturierte Heringssperma-DNA, 1/10 Volumen 10 % Blockierungsreagens) zugesetzt. Die Hybridisierung erfolgte ca. 24 h bei 65°C. Die hybridisierten Filter wurden nach folgendem Protokoll gewaschen:

- viermal kurz mit Waschlösung 1 (2 x SSC, 0,5 % SDS) bei Raumtemperatur,
- zweimal mit Waschlösung 2 (1 x SSC, 0,1 % SDS) für ca. 1 h bei 65°C,
- bei Bedarf weiter mit Waschlösung 3 (0,2 x SSC, 0,5 % SDS) bei 65°C.

Die Exposition erfolgte auf einer Phosphor-Imagefolie (Molecular Dynamics, bei <sup>32</sup>P etwa 1 bis 2 Tage, bei <sup>33</sup>P ca. 4 bis 5 Tage, Raumtemperatur) bzw. auf Röntgenfilm mit Verstärkerfolie bei -80°C.

Zwischen den einzelnen Hybridisierungen wurden die radioaktiv markierten Sonden durch "Strippen" von den Membranen entfernt:

- 5 min Striplösung 1 (2 x SSC) bei 80-90 °C,
- 20 min Striplösung 2 (0,4 M NaOH, 0,1 % SDS) bei 65°C,
- zweimal 15 min Striplösung 3 (0,1 M Tris-HCl pH 7,4, 2 x SSC, 0,1 % SDS) bei Raumtemperatur.

Die Lagerung der Membranen erfolgte in 2 x SSC bei 4°C.

### **3.7.2 Hybridisierung von Plasmidfiltern mit nichtradioaktiv markierten Sonden**

Für nichtradioaktive Hybridisierungen wurde die Sonden-DNA mittels "DIG DNA Labelling and Detection Kit" (Boehringer Mannheim) mit Digoxigenin-dUTP markiert. Die Hybride konnten über die Bindung eines Anti-Digoxigenin-alkalische Phosphatase-Konjugates und die sich anschließende enzymatische Spaltung des AttoPhos-Substrates (Boehringer Mannheim) nachgewiesen werden. Das fluoreszierenden Spaltungsprodukt wurde durch Einscannen am STORM 860 (Molecular Dynamics) bei einer Anregungswellenlänge von 440 nm detektiert.

Vorhybridisierungen, Hybridisierungen, Strippen und Lagerung der Membranen erfolgten wie unter 3.7.1 dargelegt.

### 3.7.3 Qualitative und quantitative Auswertung der Images

Die exponierten Phosphor-Imagefolien wurden mit dem Programm "Scanner Control Version 4.1" des STORM 860 (Molecular Dynamics) eingelesen. Dafür wurde am Phosphorscanner 100 Micron (100 Datenpunkte / cm) als Parameter für die Pixelgröße (Bildpunktgröße) eingestellt. Die entstehenden "gel"-Dateien (16 bit) besitzen eine Größe von ca. 13 MB. Im Programm "Image Quant Version 4.1" (Molecular Dynamics) wurde eingestellt, wie die als radioaktives Signal detektierten Pixelintensitäten auf dem Bildschirm angezeigt werden sollten. Den stärksten radioaktiven Signalen ("High"-Wert) wird Schwarz und den schwächsten radioaktiven Signalen ("Low-Wert") Weiß zugeordnet, so daß ein Graustufenbild entsteht. Die Bilddateien hochdichter Koloniefilter wurden in das 8 bit-Format konvertiert ("tif"-Dateien) und qualitativ (visuell) im Bildbearbeitungsprogramm "Photoshop"(Microsoft) analysiert und miteinander verglichen.

Für die quantitative Analyse der hochdichten cDNA-Koloniefilter sowie der "reversed Northern"-Filter (als 16 bit "gel"-Dateien) wurde das Programm "Array Vision" verwendet. Entsprechend den Spottingmustern auf den Filtern (5 x 5 bei Koloniefiltern bzw. 2 x 2 beim "reversed Northern") werden spezielle Gitter konstruiert, die durch sogenannte Primär- und Sekundärelemente definiert werden. Als Primärelemente werden die einzelnen Quadrate bezeichnet, die 2 x 2 bzw. 5 x 5 Klone enthalten. Sekundärelemente sind die innerhalb dieser Quadrate angeordneten Klone. Obwohl die Kolonie- und cDNA-"Spots" in regelmäßigen Mustern angeordnet sind, lassen sich Abweichungen innerhalb eines Filters bzw. zwischen verschiedenen Filtern technisch nicht vermeiden (z.B. durch ungleichmäßige Anordnung der einzelnen Nadeln im "Spotting"-Werkzeug, Verzerrung der Filter während der Exposition). Daher wurden die flexiblen Gitter jedem einzelnen Filtern manuell (bei hochdichten Klonanordnungen) oder automatisch ("Autoalignment", bei weniger dichten "Spots") angepaßt. Auf diese Weise kann die Signalintensität jedes einzelnen "Spots" gemessen werden. Erfasst wurden zunächst die Mittelwerte der Pixelintensitäten jedes "Spots", multipliziert mit dessen Fläche. Der lokale Hintergrund wurde als Begrenzungsfläche der einzelnen Primärelemente definiert und anteilmäßig vom Intensitätswert abgezogen.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Normalisierung der anti-ABA scFv transgenen Tabakpflanzen**

#### **4.1.1 Die externe, langfristige Gabe von 50 $\mu$ M ABA normalisiert den spezifischen Phänotyp der RA-Pflanzen**

In Behandlungsexperimenten sollte geprüft werden, ob der spezifische Phänotyp der RA-Pflanzen durch eine Langzeitbehandlung mit ABA komplementiert werden kann. Zwei dieser Versuche werden im folgenden ausführlich dargestellt. In einem ersten Behandlungsversuch sollte zunächst ein geeignetes Konzept hinsichtlich der zu applizierenden ABA-Konzentration und des zeitlichen Ablaufes entwickelt werden.

Bereits 1970 wurden Sämlinge der welkenden ABA-Mangelmutante *flacca* der Tomate durch tägliches Besprühen der Blätter mit 1,0 mg / l (3,8  $\mu$ M) bzw. 10,0 mg / l (38  $\mu$ M) ABA-Lösung über 14 Tage hinweg behandelt (Imber und Tal, 1970). Dabei konnte zwar eine vorübergehende phänotypische, jedoch keine vollständige physiologische Normalisierung erreicht werden.

Die physiologisch notwendige Konzentration der Abscisinsäure an den Wirkungsorten in der Zelle ist bisher nicht bekannt. Wird die ABA-Lösung auf die Blattoberfläche gesprüht, so sind weitere komplexe und schwer zu erfassende Prozesse wie Aufnahme, Transport und Verteilung im Gewebe und in der Zelle sowie Abbau der Abscisinsäure zu berücksichtigen.

##### **4.1.1.1 Erstes Komplementationsexperiment**

Im ersten Experiment, das insgesamt 174 Pflanzen einschloß, wurden anti-ABA immunoglobulintransgene Pflanzen der Linien RA 5/1 und RA 16/7 über einen Zeitraum von insgesamt 13 Wochen mit Wasser und / oder ABA in den Konzentrationen 10 $\mu$ M oder 50 $\mu$ M in verschiedenen Kombinationen behandelt. Als Kontrollpflanzen wurden der Wildtyp SNN und anti-Oxazolone immunoglobulintransgene Pflanzen der Linien UF 9/13 und UF 9/38 in das Experiment einbezogen. UF-Pflanzen akkumulieren einen Einzelkettenantikörper gegen Oxazolone in hohen Konzentrationen in den Blättern (Fiedler et al., 1997). Dieses Hapten kommt nicht in Pflanzengewebe vor, daher ist kein Einfluß auf das

Wachstum und das physiologische Verhalten der Pflanzen zu erwarten (Fiedler und Conrad, 1995). Die Gehalte an scFv-Protein wurden in der 8. Behandlungswoche bestimmt. Die geringsten und höchsten Expressionswerte sowie Durchschnittswerte innerhalb der einzelnen Linien sind in Tabelle 1 dargestellt.

**Tab.1:** Konzentration an scFv-Protein in Wildtyp (SNN), anti-ABA immunglobulintransgenen Pflanzen (RA 5/1 und RA 16/7) sowie anti-Oxazoln immunglobulintransgenen Kontrollpflanzen (9/13 und 9/38).

Pflanzenbezeichnung	Anzahl der getesteten Pflanzen	ScFv- Konzentration in % TSP
SNN	35	0
RA 5/1	34	0,7 – 2,2 (Durchschnitt 1,7)
RA 16/7	35	1,2 – 4,4 (Durchschnitt 2,9)
9/13	35	0,7 – 3,9 (Durchschnitt 2,0)
9/38	35	0 – 1,4 (Durchschnitt 0,6)

Die ABA-Konzentrationen wurden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Die stomatäre Leitfähigkeit sowie deren Abhängigkeit von der Kohlendioxidkonzentration und der Lichtintensität wurde in der 9. bis 13. Woche der ABA-Behandlung gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Transgene RA-Pflanzen, die den scFv-Antikörper zu hohen Konzentrationen im ER anreichern, zeigen bedeutend höhere Werte für die stomatäre Leitfähigkeit als Wildtyppflanzen (Artsaenko et al., 1995). Dieses physiologische Verhalten konnte nicht durch eine Langzeitbehandlung mit Wasser beeinflußt werden. Wie bereits von Artsaenko et al., (1995) festgestellt, konnte die Abhängigkeit der stomatären Leitfähigkeit von der Kohlendioxidkonzentration bei Wildtyppflanzen, nicht jedoch bei den anti-ABA transgenen Pflanzen beobachtet werden. Außerdem führte die Expression des anti-ABA scFv-Antikörpers zu einer Unterdrückung der Lichtabhängigkeit der stomatären Leitfähigkeit.

**Tab.2:** Effekte der Langzeitbehandlung mit Wasser und / oder 10  $\mu\text{M}$  bzw. 50  $\mu\text{M}$  ABA in verschiedenen Kombinationen auf den Gesamt-ABA-Gehalt, den Gehalt an theoretisch freier ABA sowie auf die  $\text{CO}_2$ -Abhängigkeit und die stomatäre Leitfähigkeit  $g_L$  von anti-ABA immunglobulintransgenen Tabakpflanzen und Kontrollpflanzen (Mittelwerte aus zwei (\*) bzw. drei (\*\*)) gemessenen Pflanzen).

Pflanzennummer	ABA-Behandlung ( $\mu\text{M}$ )	ABA-Behandlung ( $\mu\text{M}$ )		scFv (%) TSP)	Gesamt-ABA-Gehalt (nM)		theoretisch ungebundene ABA (nM)		CO <sub>2</sub> -Abhängigkeit	g <sub>L</sub> (mol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )
		Wo. 1-4	Wo. 5-13		Woche 8 - 11	Woche 13	Woche 8 - 11	Woche 13		
4	SNN	0	0	0	38	1649	38	1649		
79	SNN	0	10	0	82	608	82	608		
102	SNN	10	10	0	34	241	34	241		
7	RA 5/1	0	0	1,2	384	1308	0,11	0,47	-	0,557
31, 34	RA 5/1	10	0	1,3*	306*	2055*	0,08*	0,88*	+/-	0,316*
57	RA 5/1	50	0	1,5	407	1067	0,10	0,28	-	0,403
92,93,94	RA 5/1	0	10	1,7**	450**	1351**	0,35**	0,35**	+/-	0,287**
115,117	RA 5/1	10	10	1,4*	457*	1658*	0,12*	0,62*	+/-	0,255*
143	RA 5/1	0	50	1,1	1286	1945	0,53	0,97	+	0,107
168,169	RA 5/1	50	50	1,7*	794*	2746*	0,31*	0,75*	+	0,074*
10,12,14	RA 16/7	0	0	1,9**	515**	2036**	0,09**	0,66**	-	0,551*
36,37	RA 16/7	10	0	1,4*	188*	673*	0,04*	0,18*	+/-	0,080*
61	RA 16/7	50	0	2,3	429	951	0,06	0,15	+	0,102
98,99	RA 16/7	0	10	3,0*	730*	2044*	0,09*	0,42*	+/-	0,365*
121,124	RA 16/7	10	10	3,1*	810*	3488*	0,10*	0,48*	+/-	0,304*
146,147, 149	RA 16/7	0	50	3,6**	2361**	4417**	0,28**	0,52**	+	0,162**
170,171	RA 16/7	50	50	3,1*	1437*	2910*	0,16*	0,51*	+	0,106*
24	9/13	0	0	2,8	130	681	130	681		
109	9/13	10	10	2,2	71	326	71	326		
16,19	9/38	0	0	0,7*	48*	1311*	48*	1311*		
43	9/38	10	0	1,4	82	649	82	649		
113	9/38	10	10	1,0	125	278	125	278		
164	9/38	50	50	1,1	3140	490	3140	490		

Die Komplementierung des spezifischen Phänotyps der RA-Pflanzen durch die ABA-Behandlung ist sowohl von der applizierten ABA-Konzentration als auch von der Behandlungsstrategie abhängig (Tab.2 und 3).

Die Behandlung der RA-Pflanzen mit 10  $\mu\text{M}$  ABA führte zu einem intermediären Phänotyp. Ein Teil der Pflanzen verhielt sich physiologisch ähnlich dem Wildtyp. Der andere Teil der Pflanzen behielt den typischen Phänotyp der RA-Pflanzen, charakterisiert durch die hohe und von der Kohlendioxidkonzentration und der Lichtintensität unabhängige stomatäre Leitfähigkeit, bei. Es traten auch Pflanzen auf, die keiner der beiden Gruppen eindeutig zugeordnet werden konnten. Die Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  ABA ist nicht ausreichend, um alle behandelten Pflanzen zu normalisieren. Ebenso konnte bei Pflanzen, die nur in den ersten vier Wochen auf Medium mit 50  $\mu\text{M}$  ABA wuchsen und

dann 8 Wochen mit Wasser besprüht wurden, dieser intermediäre Phänotyp beobachtet werden.

**Tab.3:** Normalisierung von transgenen RA 5/1 und RA 16/7 durch ABA-Behandlung: zeitlicher Ablauf und Variation der ABA-Konzentrationen.

ABA-Behandlung (1. bis 4. Wo. / 5. bis 13. Wo.) in $\mu\text{M}$	Anzahl der physiologisch getesteten RA- Pflanzen	Anzahl der normalisierten Pflanzen	Anzahl der nicht- normalisierten Pflanzen	nicht eindeutige
0 / 0	3	0	3	0
10 / 0	4	2	1	1
0 / 10	5	2	1	2
10 / 10	5	2	1	2
50 / 0	2	1	1	0
0 / 50	5	5	0	0
50 / 50	4	4	0	0

Im Gegensatz dazu konnte bei Behandlung der RA-Pflanzen mit 50  $\mu\text{M}$  ABA, beginnend mit dem Auspflanzen in Erde (0/50) ebenso wie mit der Anzucht auf einem Medium mit Zusatz von 50  $\mu\text{M}$  ABA und anschließender ABA-Behandlung (50/50), eine Normalisierung aller getesteten Pflanzen beobachtet werden. Eine tägliche Behandlung der Blätter mit 50  $\mu\text{M}$  ABA-Lösung während der gesamten Entwicklungsperiode resultierte in einer kompletten Wiederherstellung der Abhängigkeit der stomatären Leitfähigkeit von der Kohlendioxidkonzentration und ebenso von der Lichtintensität. Das Verhalten der Wildtyppflanzen wurde durch die ABA-Behandlung nicht merklich beeinflusst.

Diese Ergebnisse zeigen, daß es für eine erfolgreiche Normalisierung notwendig ist, die Pflanzen über ihre gesamte Wachstumsperiode hinweg mit 50  $\mu\text{M}$  ABA zu behandeln. Daher wurden die Pflanzen in allen weiteren sechs Behandlungsexperimenten, beginnend mit dem Auspflanzen in Erde, täglich mit 50  $\mu\text{M}$  ABA über einen Zeitraum von ca. 6 Wochen hinweg besprüht.

#### Gesamt-ABA-Gehalt

Die Blattscheiben für die Quantifizierung der ABA-Konzentration wurden in der 8. bis 11. Woche (1. ABA-Wert) sowie in der 13. Woche (2. ABA-Wert) gerntet.

Bei wasserbehandelten Wildtyppflanzen ist mit zunehmendem Alter ein Anstieg der Gesamt-ABA-Konzentrationen zu beobachten. Eine Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  ABA bewirkt offensichtlich keinen zusätzlichen Anstieg (Tab.2). Ähnliche Werte traten bei den anti-Oxazolone-immunglobulintransgenen Tabakpflanzen (UF 9/13, 9/38) auf. Bei einer Pflanze der Linie UF 9/38 (Pflanze Nr.164, Tab.2), die über die gesamte Kultivationsperiode hinweg mit 50  $\mu\text{M}$  ABA behandelt wurde, ist der ABA-Gehalt in der 8. Behandlungswoche (3140 nM) deutlich höher als die Werte für unbehandelte oder mit 10  $\mu\text{M}$  ABA behandelte Pflanzen und nimmt nach 13 Wochen drastisch ab (490 nM). Ähnliche Effekte konnten im zweiten Behandlungsexperiment an mit 50  $\mu\text{M}$  besprühten Wildtyppflanzen beobachtet werden. Die nur mit Wasser behandelten RA-Pflanzen der Linien 5/1 und 16/7 weisen im Vergleich zum Wildtyp in der 8. bis 11. Woche einen 10- bis 14-fach höheren Gesamt-ABA-Gehalt auf, der ebenfalls mit dem Alter der Pflanzen weiter ansteigt. In RA-Pflanzen, die mit 10  $\mu\text{M}$  ABA-Lösung behandelt wurden, sind keine oder nur sehr geringe Anstiege der ABA-Konzentrationen im Vergleich zu den wasserbehandelten Pflanzen zu finden. Vergleicht man jedoch die ABA-Werte der mit 50  $\mu\text{M}$  ABA (nach der 4. Woche) behandelten RA-Pflanzen mit denen der unbehandelten, so fällt der deutlich höhere ABA-Gehalt in der 8.-11. Woche (2,1- bis 3,4-fach höher bei RA 5/1 und 2,8- bis 4,6-fach höher bei RA 16/7; Tab.2) auf. Dieser Wert steigt mit fortlaufender Abscisinsäurebehandlung weiter an.

#### **4.1.1.2 Zweites Komplementationsexperiment**

In einem zweiten Behandlungsexperiment wurden jeweils 8 *in vitro*-Wildtyppflanzen SNN und 8 anti-ABA-immunglobulintransgene *in vitro*-Pflanzen des Klons RA 27 über 9 Wochen der Pflanzenentwicklung hinweg täglich mit Wasser bzw. 50  $\mu\text{M}$  ABA-Lösung besprüht.

Während der Experimente wurden der Gehalt an scFv-Protein und Abscisinsäure zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt sowie die stomatäre Leitfähigkeit und ihre Abhängigkeit von der Kohlendioxidkonzentration und Lichtintensität in der fünften Woche der ABA-Behandlung gemessen (Tab.4).

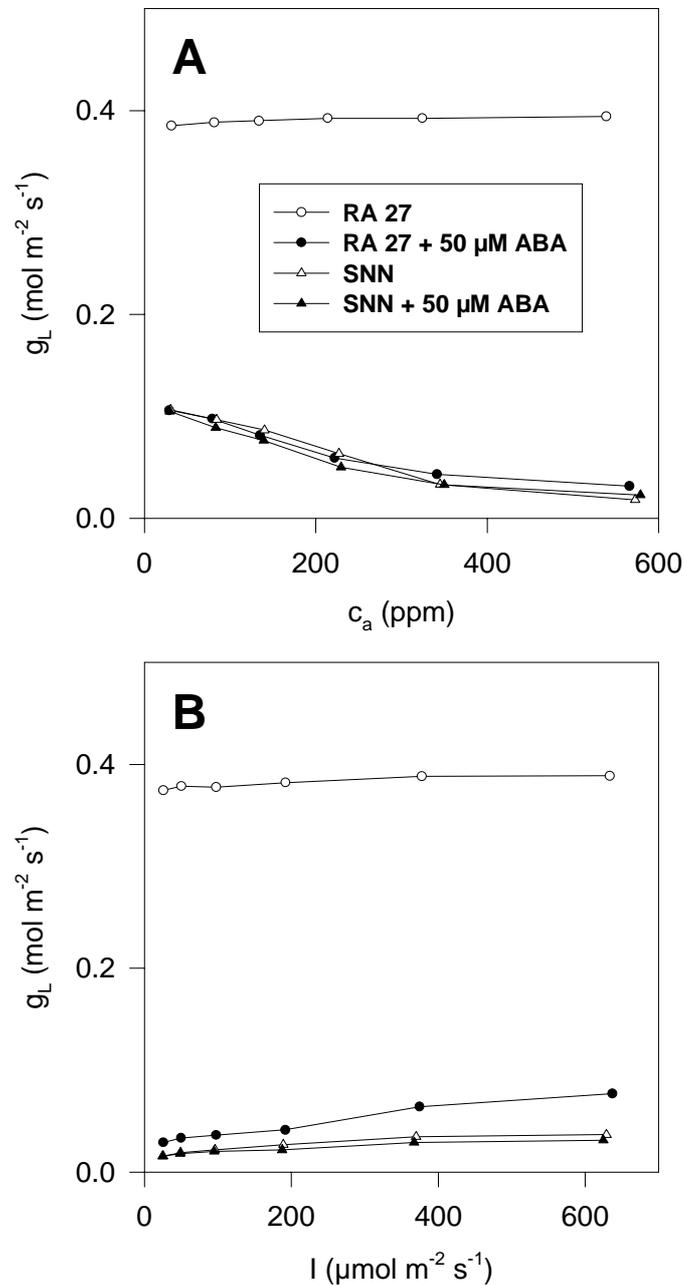
**Tab.4:** Effekte langfristiger externer Abscisinsäuregaben auf den Gesamt-ABA-Gehalt, den Gehalt an theoretisch ungebundener ABA sowie auf die CO<sub>2</sub>-Abhängigkeit und die stomatäre Leitfähigkeit  $g_L$  von anti-ABA immunglobulintransgenen Tabakpflanzen RA 27 und Kontrollpflanzen SNN.

Pflanzen- nummer	ABA- Behandlung ( $\mu$ M)	ABA-		scFv (% TSP)	Gesamt-ABA- Gehalt (nM)		theoretisch ungebundene ABA (nM)		CO <sub>2</sub> - Ab- hängig- keit	$g_L$ (mol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )
		Wo.	Wo.		Woche	Woche	Woche	Woche		
		1-2	3-9		6	9	6	9		
1	RA 27	0	0	4,8	1165	2928	0,1	0,2	-	0,312
2	RA 27	0	0	4,5	677	2838	0,1	0,3	-	0,392
3	RA 27	0	0	5,1	541	2512	0	0,2	-	0,350
4	SNN	0	0	0	91	68	91	68	+	0,033
5	SNN	0	0	0	102	144	102	144	+	0,032
6	SNN	0	0	0	83	288	83	288	+	0,030
7	RA 27	0	50	2,7	2478	4336	0,4	0,9	+	0,080
8	RA 27	0	50	2,4	3102	3095	0,5	0,5	+	0,273
9	RA 27	0	50	4,7	2282	3859	0,2	0,3	+	0,043
10	RA 27	0	50	4,7	3152	2096	0,3	0,2	+	0,041
11	SNN	0	50	0	2758	511	2758	511	+	0,034
12	SNN	0	50	0	3178	636	3178	636	+	0,034

Die anti-ABA transgenen RA-Pflanzen akkumulieren den Einzelkettenantikörper im Blatt in einer Konzentration von 2,4 bis 5,1 % des gesamtlöslichen Proteins (Tab.4). Die Linie RA 27 wurde aufgrund ihrer hohen Stabilität der Antikörperexpression für alle weiteren Behandlungsversuche und für die molekulare Charakterisierung ausgewählt. Außerdem sichert die Verwendung von *in vitro*-Pflanzen relativ konstante Expressionshöhen.

Das tägliche Besprühen der Blätter der transgenen RA 27 mit 50  $\mu$ M ABA-Lösung über die gesamten Entwicklungsperiode hinweg resultierte, wie bereits im ersten Behandlungsexperiment festgestellt, in einer kompletten Wiederherstellung der Abhängigkeit der stomatären Leitfähigkeit von der Kohlendioxidkonzentration und der Lichtintensität (Abb.4). Ebenso wie im ersten Behandlungsexperiment wurde das physiologische Verhalten der Wildtyppflanzen durch die ABA-Behandlung nicht merklich beeinflusst (Abb.4).

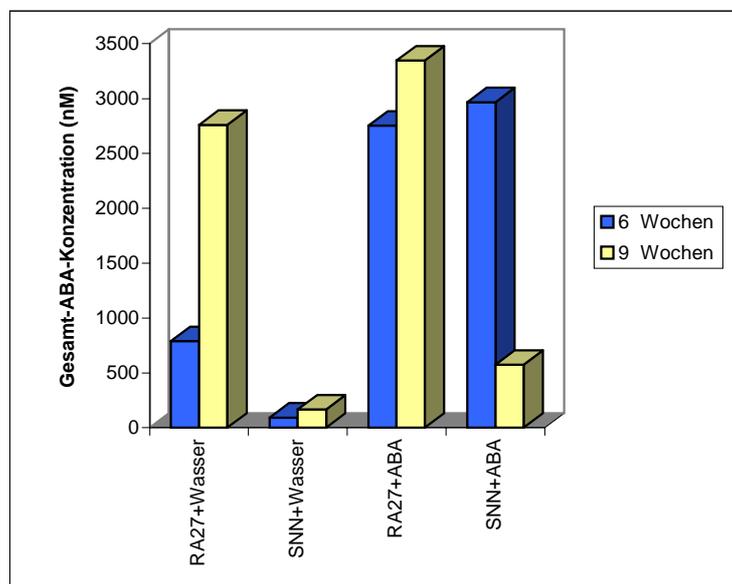
Diese Ergebnisse konnten durch insgesamt fünf weitere Langzeitbehandlungsexperimente bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb.4:** Einfluß der  $\text{CO}_2$ -Konzentration  $c_a$  (A) und Lichtintensität  $I$  (B) auf die stomatare Leitfähigkeit  $g_L$  von wasser- und ABA ( $50 \mu\text{M}$ )- behandelten Wildtyp- und RA 27-Pflanzen. Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse der Messung einer individuellen Pflanze (1 von 8 RA + Wasser, 1 von 8 RA + ABA, 1 von 5 SNN + Wasser, 1 von 3 SNN + ABA). Die parallelen Messungen zeigten vergleichbare Ergebnisse.

Wasserbehandelte anti-ABA transgene Pflanzen RA 27 weisen Gesamt-ABA-Gehalte im Bereich von 541 bis 1165 nM in der 6. Behandlungswoche und 2512 bis 2928 nM in der 9. Behandlungswoche auf (Tab.4; Abb.5). Die Abscisinsäurekonzentration war 10- (Woche 6) bis 16-fach (Woche 9) höher als in den Blättern von Wildtyppflanzen. Dieser Effekt konnte bereits in früheren Studien beobachtet werden (Artsaenko et al., 1995).

Die Blätter ABA-behandelter transgener RA-Pflanzen enthalten Gesamt-ABA-Werte im Bereich von 2478 bis 3152 nM in der sechsten Woche und von 2096 bis 4336 nM in der neunten Woche (Tab.4; Abb.5). Im Gegensatz dazu ist der ABA-Gehalt täglich mit ABA-Lösung besprühter Wildtypblätter ähnlich in der sechsten Woche, aber 6-fach niedriger in der neunten Woche (Abb.5). In den mit Abscisinsäure besprühten transgenen Pflanzen nimmt der ABA-Gehalt deutlich während der Pflanzenentwicklung zu. Im Gegensatz dazu steigt in Wildtyppflanzen der ABA-Gehalt während der ersten drei Behandlungswochen an und sinkt nach sechs Behandlungswochen ab (Abb.5). Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt könnte die Induktion ABA-abbauender Enzyme durch die hohen ABA-Gehalte sein. In den transgenen Pflanzen könnte die Abscisinsäure direkt durch die Bindung an den Antikörper oder durch die Akkumulation im ER vor Abbau geschützt sein.



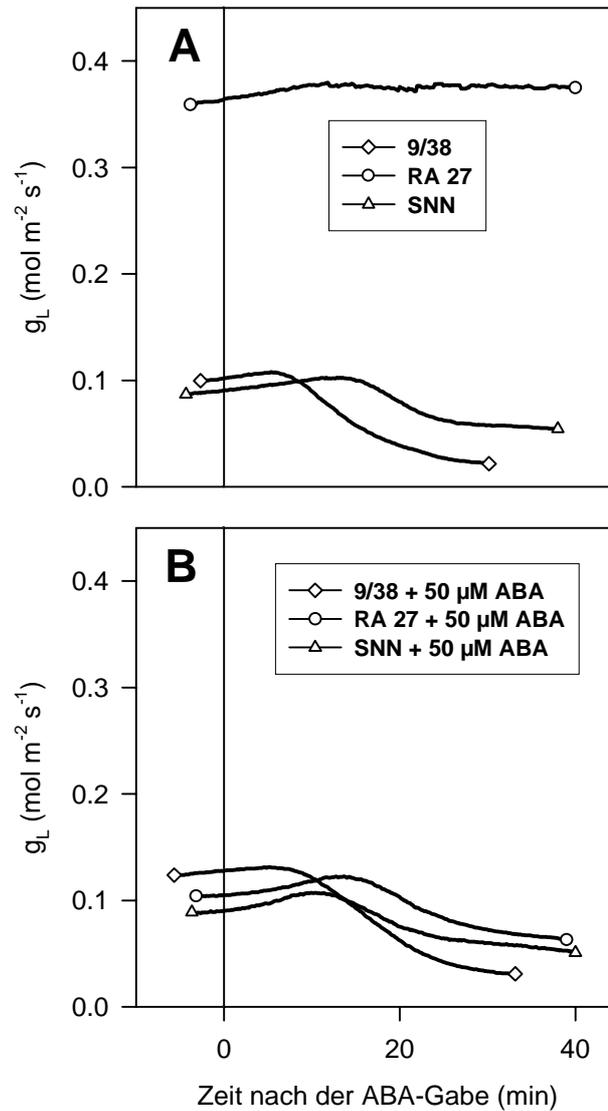
**Abb.5:** Gesamt-ABA-Konzentrationen von wasser- bzw. ABA-behandelten transgenen Pflanzen und Wildtyppflanzen nach 6 und 9 Wochen (Mittelwerte aus 3 [RA 27 + Wasser und SNN + Wasser], 4 [RA 27+ ABA] bzw. 2 [SNN+ABA] gemessenen Pflanzen; siehe Tab.4).

#### **4.1.2 Kurzzeitbehandlung der transgenen Pflanzen durch ABA-Gabe über die Blattstiele führt nicht zu einer Normalisierung**

In einem Kurzzeitbehandlungsversuch sollte untersucht werden, ob der welkende Phänotyp der RA-Pflanzen durch eine einmalige ABA-Gabe über die Blattstiele normalisiert werden kann.

Wasserbehandelte Blätter von Wildtyp- und transgenen Pflanzen RA 27 des zweiten Behandlungsversuches wurden abgeschnitten und durch Eintauchen der Blattstiele in eine 50  $\mu$ M ABA-Lösung mit Abscisinsäure gefüttert. In Wildtyppflanzen begann der Stomataschluß 10 bis 20 min nach Beginn der ABA-Applikation, detektierbar durch das Absinken der stomatären Leitfähigkeit (Abb.6 A). Dieses Verhalten wurde sowohl bei *in vitro*- als auch bei aus Samen angezogenen Wildtyppflanzen (Daten nicht gezeigt) beobachtet. Transgene Pflanzen (Linie UF 9/38, Anzucht aus Samen), die einen Einzelkettenantikörper gegen Oxazolon exprimieren, wurden als zusätzliche Kontrollen in das Experiment einbezogen, um unspezifische Effekte solcher Proteine auf den Stomataschluß auszuschließen. Die Pflanzen der Linie UF 9/38 verhielten sich wie Wildtyppflanzen und schlossen ihre Stomata ca. 10 min nach Beginn der ABA-Gabe (Abb.6 A). Im Gegensatz dazu werden die Spaltöffnungen der anti-ABA scFv transgenen Pflanzen bei ABA-Applikation nicht geschlossen (Abb.6 A).

Diese Ergebnisse zeigen, daß die kurzfristige Gabe von ABA über die Blattstiele den spezifischen Phänotyp der anti-ABA transgenen Pflanzen nicht komplementieren kann.



**Abb.6:** Änderung der stomatären Leitfähigkeit von Wildtyp, anti-Oxazolon transgenen Pflanzen (9/38) und RA 27, wasser- (A) bzw. ABA-behandelt (B) nach der Gabe von 50  $\mu$ M ABA-Lösung über die Blattstiele.

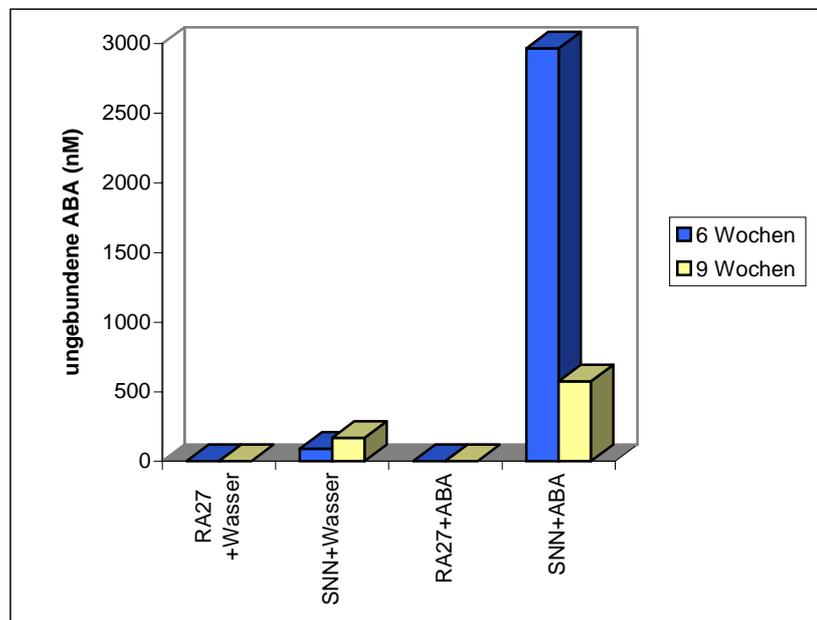
#### 4.1.3 Bei langzeitbehandelten RA-Pflanzen kann der Stomaschluß durch ABA-Gabe über die Blattstiele wieder induziert werden

Das gleiche Kurzzeitbehandlungsexperiment, wie unter 4.1.2 beschrieben, wurde auch mit ABA-langzeitbehandelten RA 27 und Wildtyp-Kontrollpflanzen (2. Behandlungsexperiment) sowie anti-Oxazolon transgenen Pflanzen durchgeführt. Das tägliche Besprühen der Blätter mit ABA-Lösung während der gesamten Kultivationsperiode beeinflusste das Verhalten der Wildtyppflanzen und anti-Oxazolon Kontrollpflanzen im Kurzzeitbehandlungsexperiment nicht (Abb.6 B). In langzeitbehandelten anti-ABA

transgenen Pflanzen konnte jedoch der Stomataschluß durch die Applikation von Abscisinsäure über die Blattstiele wieder induziert werden (Abb.6 B). Die Behandlung mit Abscisinsäure über die Pflanzenentwicklung hinweg konnte den spezifischen Phänotyp der immunmodulierten Pflanzen normalisieren.

#### 4.1.4 In wasser- und ABA-behandelten RA-Pflanzen kann nahezu die gesamte Abscisinsäure vom Antikörper gebunden werden

Berechnet man die theoretisch freie ABA (siehe 3.1.2.3), so liegt diese bei allen getesteten RA-Pflanzen des ersten Behandlungsexperimentes (RA 5/1 und RA 16/7), unabhängig von der applizierten ABA-Lösung und dem zeitlichen Ablauf der Behandlung, nahe Null (zwischen 0,04 und 0,97 nM; Tab.2). In Wildtyp- und anti-Oxazolon-Kontrollpflanzen entsprechen die Werte für die theoretisch freie ABA den Gesamt-ABA-Werten von 34 bis 3140 nM (Tab.2).



**Abb.7:** Berechnete Konzentrationen an ungebundener ABA von wasser- bzw. ABA-behandelten transgenen Pflanzen und Wildtyppflanzen nach 6 und 9 Wochen (Mittelwerte aus 3 [RA 27 + Wasser und SNN + Wasser], 4 [RA 27+ ABA] bzw. 2 [SNN+ABA] gemessenen Pflanzen; siehe Tab.4).

Diese Ergebnisse konnten im zweiten Behandlungsversuch bestätigt werden. Die anti-ABA immunmodulierten Pflanzen (RA 27), wasserbehandelte ebenso wie ABA-behandelte, enthalten theoretisch freie bzw. nicht vom Antikörper gebundene Abscisinsäure in einer Konzentration von 0 bis 0,9 nM (Tab.4; Abb.7). Theoretisch kann also das im ER akkumulierte scFv-Protein sogar die höheren Konzentrationen an ABA, resultierend aus der Langzeitbehandlung, nahezu vollständig binden. Auch in diesen Fällen konnte eine Normalisierung der Pflanzen beobachtet werden (Tab.4, Pflanzen Nummer 7-10).

#### **4.2 Molekulare Charakterisierung der anti-ABA Immunglobulintransgenen Tabakpflanzen**

Die Langzeitbehandlung der RA-Pflanzen mit 50 µM ABA über den gesamten Zeitraum der Pflanzenentwicklung hinweg normalisiert den welkenden Phänotyp, obwohl nahezu die gesamte Abscisinsäure vollständig von dem scFv-Antikörper gebunden werden kann. Aus diesen Ergebnissen kann geschlußfolgert werden, daß Abscisinsäure auf dem Weg von der Blattoberfläche über den Apoplasten zum hypothetischen ABA-"sink" im ER, dem Anreicherungsort des Antikörpers, wirken muß. Die Umverteilung der ABA während der Pflanzenentwicklung, hervorgerufen durch die Bindung an das scFv-Protein, könnte zu einer Änderung im Gentranskriptionsprogramm der immunmodulierten Pflanzen führen. Diese Änderung verursacht die Behinderung des Stomataschlusses. Eine mögliche Folge wäre der Verlust der ABA-Sensitivität des Signaltransduktionssystems der Schließzellen. In einem molekularen Ansatz sollte untersucht werden, wie sich Immunmodulation, d.h. die Expression des anti-ABA scFv-Proteins im ER der RA-Pflanzen, und Normalisierung, hervorgerufen durch die Langzeitbehandlung mit ABA, auf die Gentranskription auswirken. Dafür wurden Methoden verwendet, die eine komplexe Analyse der Expressionshöhen einer großen Anzahl von Transkripten erlauben. Diese Methoden sind:

- die Hybridisierung von geordneten genomischen und cDNA-Bänken mit komplexer cDNA,
- die Identifizierung interessanter genomischer Klone durch Nutzung geordneter cDNA-Banken sowie
- die Expressionsanalyse durch "reversed Northern".

#### 4.2.1 Herstellung und erste Charakterisierung der Cosmidbank TLC

Die genomischen DNA-Fragmente, isoliert aus Tabakblättern des Wildtyps SNN, wurden in den SuperCos 1 Cosmidvektor kloniert.

Ausgehend von 17,5 µg genomischer DNA konnten 440.000 unabhängige Rekombinante (Titer  $7,2 \times 10^7$  Klone / ml) mit einem genomischen Insert von etwa 45 kb erzeugt werden. Soll eine gesuchte Sequenz mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit (P) in der Bank enthalten sein, so berechnet sich die Anzahl der erforderlichen Rekombinanten (N) folgendermaßen (Sambrook et al., 1989):

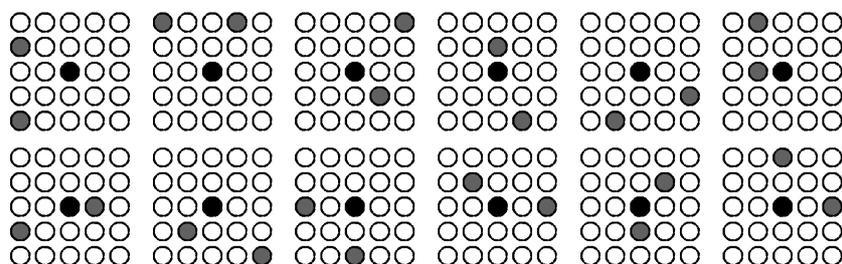
$$N = \ln(1-P) / \ln(1-F).$$

F ist das Verhältnis der Insertgröße (ca.  $4,5 \times 10^4$  bp) zur Größe des Tabakgenoms (ca.  $3 \times 10^9$  bp).

Für 440.000 rekombinante Cosmidklone ist somit eine bestimmte DNA-Sequenz mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,9 % in der Bank enthalten.

Für eine erste Charakterisierung der genomischen Bank wurde von 18 Cosmidklonen die Gesamt-DNA isoliert, mit EcoRI gespalten und auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Dieser Filter wurde mit radioaktiv markierter genomischer DNA hybridisiert. Alle Klone konnten als Rekombinante identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

54.000 Cosmidklone, diese Anzahl entspricht 55,5 % des Tabakgenoms, wurden robotergestützt in Mikrotiterplatten geordnet und hochdicht im Spottingmuster  $5 \times 5$  (Abb.8) auf Nylonmembranen (zwei Filtersätze) übertragen.



**Abb.8:** Anordnung der 12 doppelt "gespotteten" genomischen Klone in einem  $5 \times 5$ -Feld (Spottingmuster). Der Tintenpunkt in der Mitte der Felder dient zur Orientierung.

#### 4.2.2 Organellengenome und chromosomale rRNA-Gene in der Cosmidbank

Die geordnete Cosmidbank wurde hinsichtlich des Gehaltes an Organellengenomen und des Gehaltes an chromosomalen rRNA-Genen charakterisiert. Dazu wurden cDNA-Inserts bzw. genomische Fragmente aus Tabak, codierend für mitochondrielle, chloroplastidäre und chromosomale rRNA, radioaktiv markiert und als Sonden für die Hybridisierung der Cosmidfilter eingesetzt (siehe Abb.9).

##### Chloroplastidäre und mitochondrielle Sequenzen

Beide Filtersätze wurden mit einem chloroplastidären genomischen Fragment aus Tabak, codierend für die 16S rRNA und für ein hypothetisches Protein (Cosmid DK 2 / 70; 4,3 kb-Fragment) sowie mit einem cDNA-Fragment aus Tabak für mitochondriell codierte rRNA (Homologie zu *Oenothera berteriana* 26S rRNA; cDNA-Klon 109/10; Insert 1,6 kb) hybridisiert. Es konnten 312 Cosmidklone detektiert werden, die ein Insert für mitochondriell codierte rRNA enthalten. 750 genomische Klone zeigten ein deutliches Signal bei der Hybridisierung mit dem chloroplastidären rRNA-Genfragment.

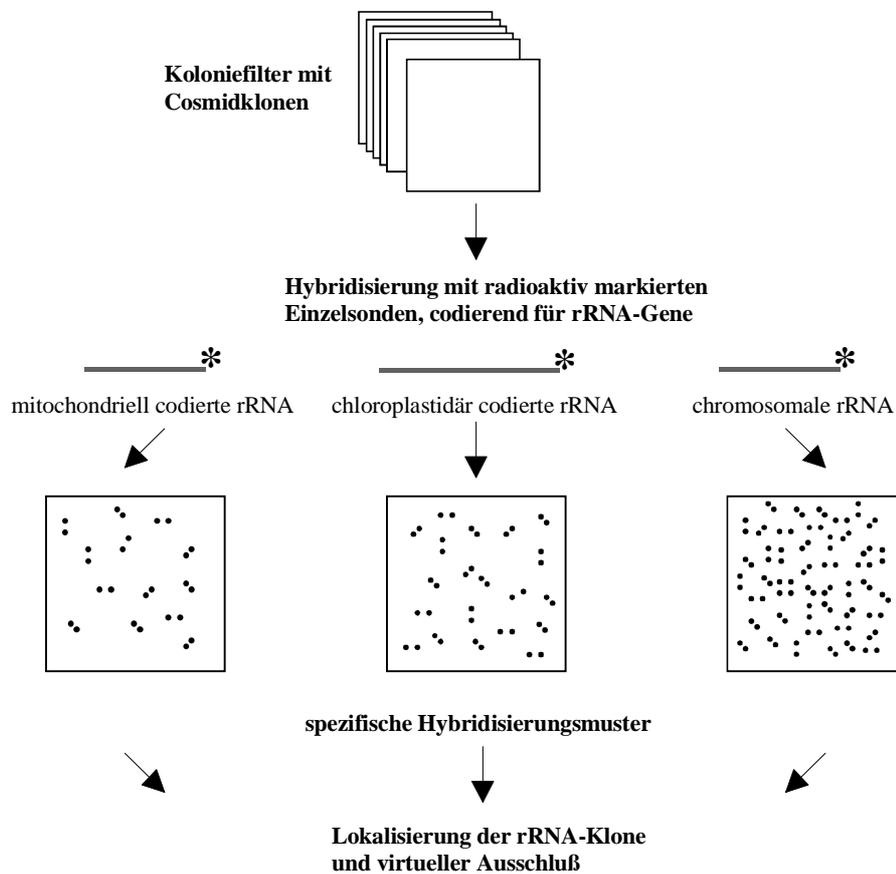
Das Chloroplastengenom von *Nicotiana tabacum* umfaßt 155,8 kb und wurde bereits vollständig sequenziert (Shinozaki et al., 1986). Die Größe des Mitochondriengenoms von Pflanzen ist sehr variabel (200 bis 2200 kb) und kann aus verschiedenen zirkulären Chromosomen bestehen (Bork et al., 1982). Da die Größe des mitochondrialen Genoms von Tabak bisher noch nicht bekannt ist, wird für die weiteren Betrachtungen ein Wert in der Größenordnung des Chloroplastengenoms angenommen.

Die Größe der Cosmidinserts von 45 kb entspricht etwa einem Viertel des Organellengenoms. Somit enthalten aufgerundet etwa 5000 Klone (ca. 1 %) von 54.000 ein Insert aus den Organellengenomen.

##### Chromosomale rRNA-Gene

Zwei genomische Subfragmente des Cosmidklons DK 2 / 26 wurden radioaktiv markiert und unabhängig voneinander als Sonden in der Hybridisierung eines genomischen Filters (Filtersatz 2) eingesetzt. Das 1,2 kb-Fragment codiert für das 5,8S rRNA-Gen und die internen Spacer 1 und 2 (*Nicotiana tabacum*), das 2,8 kb-Fragment zeigt Homologie zum 26 S rRNA-Gen von *Tragopogon dubius*. Aus beiden Hybridisierungen resultierte das gleiche Hybridisierungsmuster, es konnten ca. 4500 Cosmidklone detektiert werden. Somit

enthalten ca. 17 % der Cosmidklone auf ihren Inserts Gensequenzen, die chromosomale rRNA codieren.



**Abb.9:** Die Hybridisierung der Cosmidfilter mit Einzelsonden, codierend für rRNA-Gene, ermöglicht die Lokalisierung dieser genomischen Klone auf den Filtern und ihren virtuellen Ausschluß.

Die Prozentsätze an Organellengenomenen in der Cosmidbank entsprechen Werten, die gewöhnlich in genomischen Banken von Pflanzen, hergestellt aus grünem Gewebe, auftreten. So konnten beispielsweise in einer YAC-Bank von *Beta vulgaris* L. mit einer Insertgröße von 140 kb 2,3 % der Klone als chloroplastidäre und 0,9 % als mitochondrielle Klone identifiziert werden (Eyers et al., 1992). In einer YAC-Bank von *Arabidopsis thaliana* enthielten sogar 6 % der Klone ein Insert aus dem Chloroplastengenom (Ward und Jen, 1990).

Mit der Lokalisierung der chloroplastidär und mitochondriell codierten Sequenzen und der chromosomalen rRNA-Gene auf den Cosmidfiltern wird es möglich, diese genomischen Klone virtuell von weiteren Untersuchungen auszuschließen (Abb.9). So können beispielsweise differentiell exprimierte Klone, die für ribosomale RNA codieren, sofort identifiziert werden.

#### **4.2.3 Komplexe Analyse der Genexpression in Wildtyp- und RA-Pflanzen mit Hilfe der Cosmidbank**

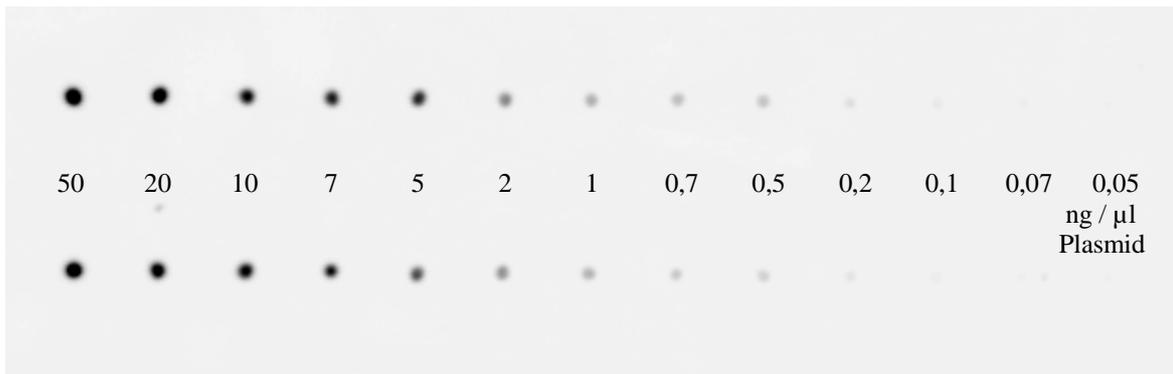
Die Nutzung der genomischen Bank zur Untersuchung der differentiellen Genexpression hat den entscheidenden Vorteil, daß mit nur zwei Filtersätzen, die 54.000 jeweils doppelt "gespottete" Cosmidklone enthalten, die Hälfte des Tabakgenoms untersucht werden kann. Differentiell detektierte Klone stehen sofort als genomische Fragmente zur Verfügung, die neben dem oder den differentiellen Genen auch regulatorische Elemente wie Promotoren enthalten können.

Um die Unterschiede in der Genexpression von transgenen RA- und Wildtyppflanzen zu erfassen, wurden die genomischen Filter mit komplexen cDNA-Proben hybridisiert. Die komplexen cDNAs wurden aus der mRNA von Gesamtblatt und epidermalen Fragmenten, jeweils wasser- bzw. ABA-behandelt, synthetisiert. Die Bilddateien (Expressionsmuster) der einzelnen Hybridisierungen wurden per Auge am Bildschirm verglichen.

##### Visuelle Auswertung der Genexpressionsmuster

In einem Vorversuch wurde geprüft, wie Expressionsunterschiede und die Abhebung der Signale vom Hintergrund per Auge im Vergleich zu einem Quantifizierungsprogramm (TINA) erfaßt werden können.

Es wurde ein Filter hergestellt, auf dem die Plasmide zweier cDNA-Klone, die im Blatt sehr stark exprimiert werden, in 13 Verdünnungsstufen von 50 ng/µl bis 50 pg/µl mit Hilfe des "BioGrid"-Roboters aufgetragen wurden. Die cDNA-Sequenzen codieren für Cab 21 (LK 54) und für die kleine Untereinheit Rubisco (LK 62). Dieser Filter wurde mit dem Digoxigenin-markierten pBS-Vektor hybridisiert (Abb.10). Das Hybridisierungsmuster wurde quantitativ mit Hilfe des TINA-Programms und qualitativ per Auge am Bildschirm ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 aufgeführt.



**Abb.10:** Hybridisierung des Plasmidfilters (cDNA-Plasmide Cab 21 [obere Reihe] und kleine UE Rubisco [untere Reihe] in den Konzentrationen von 50 ng/ $\mu$ l bis 50 pg/ $\mu$ l) mit dem DIG-markierten Vektor.

**Tab.5:** Quantitative (TINA-Programm) und qualitative (visuelle) Auswertung eines Hybridisierungsmusters.

Konzentration der Plasmide	Optische Dichte (TINA-Programm)	Visuelle Einschätzung
50 ng/ $\mu$ l	17603 (im Sättigungsbereich)	++ (sehr starke Expression)
20 ng/ $\mu$ l	15612 (im Sättigungsbereich)	++
10 ng/ $\mu$ l	10865 (im Sättigungsbereich)	++
7 ng/ $\mu$ l	9378	+ (starke Expression)
5 ng/ $\mu$ l	9155	+
2 ng/ $\mu$ l	4365	+/- (mittlere Expression)
1 ng/ $\mu$ l	2821	+/-
700 pg/ $\mu$ l	2380	+/-
500 pg/ $\mu$ l	2244	+/-
200 pg/ $\mu$ l	1276	- (schwache Expression)
100 pg/ $\mu$ l	1073	- - (sehr schwache Expression)
70 pg/ $\mu$ l	938	nicht detektierbar
50 pg/ $\mu$ l	860 (entspricht Hintergrund)	nicht detektierbar

Signale, deren Werte für die optische Dichte etwa zweifach über dem Hintergrund liegen, können mit dem Auge detektiert werden (Tab.5). Nah am Hintergrund liegende Signalintensitäten sind allgemein schwer akkurat zu messen, da sie starken Schwankungen unterliegen und in hohem Maße von der Methode der Hintergrundkorrektur beeinflusst werden (Richmond et al., 1999). Unterhalb des Sättigungsbereiches können als Minimum

3- bis 4-fache Unterschiede in der Expressionshöhe deutlich mit dem Auge wahrgenommen werden (Tab.5).

Im allgemeinen haben Hybridisierungsintensitäten, die um einen Faktor von mehr als zwei variieren, eine große Chance signifikant zu sein (Granjeaud et al., 1996). In der Literatur ist häufig zu finden, daß ein Klon dann als differentiell klassifiziert wird, wenn sein Signal in der zu vergleichenden Hybridisierung mindestens 3-fach über oder unter der Signalintensität in der Kontrollprobe liegt (Geng et al., 1998). Diese Signalunterschiede können bereits mit dem Auge erfaßt werden.

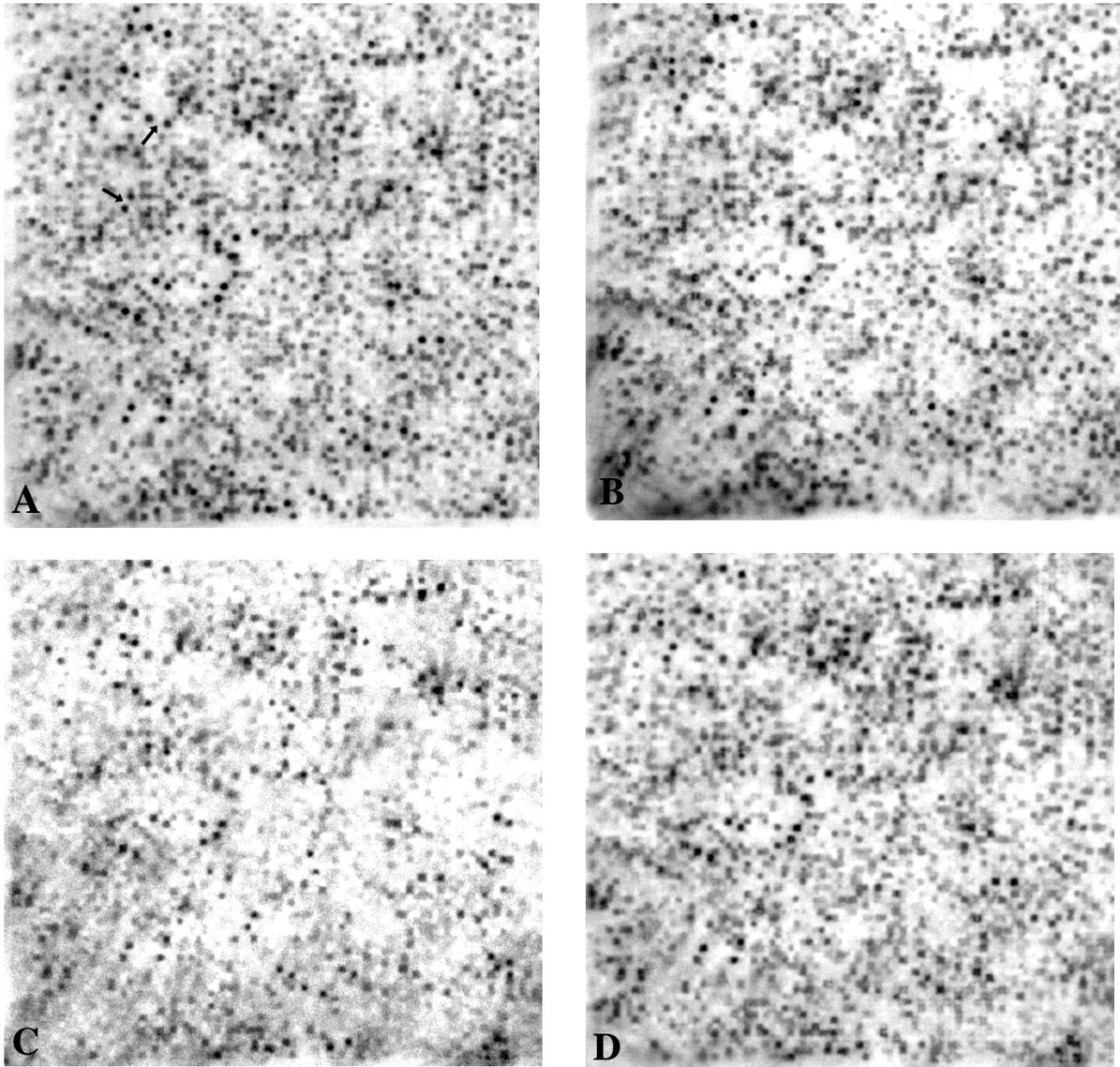
#### 4.2.3.1 Charakterisierung des Expressionsmusters im Blatt

Zur Untersuchung der Genexpression im Blatt wurden die beiden genomischen Filtersätze mehrfach mit den komplexen Blatt-cDNAs, resultierend aus den Langzeitbehandlungsexperimenten (Wildtyp- und RA-Pflanzen, wasser- und ABA-behandelt), hybridisiert. Die durchgeführten Hybridisierungen sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

**Tab.6:** Übersicht über die Hybridisierungen der Cosmidfilter mit den komplexen cDNAs Blatt.

Physiologische Situation	Komplexe cDNA Blatt	Filtersatz 1	Filtersatz 2	Verwendetes Isotop
SNN (Wasser)	6/97	2	2	<sup>32</sup> P
RA 27 (Wasser)	6/97	3	1	<sup>32</sup> P
	6/98		1	<sup>33</sup> P
SNN (ABA)	6/97	1	1	<sup>32</sup> P
RA 27 (ABA)	6/97	1	2	<sup>32</sup> P

Zur Auswertung wurden die einzelnen Images am Bildschirm in 9 Felder aufgeteilt. Abbildung 11 zeigt einen solchen Filterausschnitt, hybridisiert mit den vier verschiedenen komplexen cDNAs aus Gesamtblatt.



**Abb.11:** Filterausschnitt (1/9, Filtersatz 1, Feld 7) der komplexen Hybridisierung mit cDNA Gesamtblatt; (A) Wildtyp SNN, wasserbehandelt, (B) Wildtyp SNN, ABA-behandelt, (C) RA 27, wasserbehandelt, (D) RA 27, ABA-behandelt. Die Pfeile (in A) weisen auf differentiell erscheinende Klone zwischen wasserbehandelter RA 27 und dem Wildtyp.

Im Blatt gaben etwa 4800 der 54.000 Cosmidklone ein deutliches Hybridisierungssignal. Zur Charakterisierung des Hybridisierungsmusters wurden zunächst 22 sogenannte "Leitklone" ausgewählt, die besonders starke und in allen vier physiologischen Situationen gleiche Expressionshöhen zeigten. 21 dieser Klone konnten als Fragmente des Chloroplastengenoms identifiziert werden, die ein Gen für ribosomale RNA enthalten. Beim Vergleich der Hybridisierungsmuster von wasserbehandeltem Wildtyp und wasserbehandelter RA 27 konnten 56 differentiell erscheinende Klone detektiert werden. Die

Differenz im Hybridisierungssignal dieser Klone konnte in einer parallelen Hybridisierung der Koloniefilter mit der gleichen cDNA (6/97) reproduziert werden. Von diesen 56 genomischen Klonen enthalten vier Klone, in RA schwächer exprimiert als in SNN, ein Fragment codierend für chromosomale ribosomale RNA. Fünf differentielle Cosmidklone tragen ein Insert aus dem Chloroplastengenom codierend für ribosomale RNA, davon ist ein Klon im Wildtyp und drei sind in RA-Pflanzen stärker detektierbar.

Bei der überwiegenden Anzahl der differentiellen Klone (43) konnte eine höhere Expression im Wildtyp als in den Transgenen nachgewiesen werden.

Außerdem konnten 43 Klone detektiert werden, deren Expression in Wildtyp und transgenen Pflanzen durch die Langzeitbehandlung mit ABA beeinflusst wurden. Davon konnten vier Klone, deren Expression durch die langfristige ABA-Gabe gehemmt wurde, als chloroplastidär codierte rRNA identifiziert werden. Die Ergebnisse des Vergleiches der Hybridisierungsmuster sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

**Tab.7** : Ergebnisse des Vergleiches der Hybridisierungsmuster der vier komplexen cDNAs aus Gesamtblatt.

"Gespottete" Cosmidklone	54.000	
Klone mit detektierbarem Hybridisierungssignal	4.800	
22 zufällig ausgewählte "Leitklone"	56 differentiell erscheinende Klone	43 durch ABA-Gabe beeinflusste Klone
21 Klone enthalten ein chloroplastidäres rRNA-Gen	SNN > RA: 43 (1 Klon enthält ein chloroplastidäres rRNA-Gen, 4 Klone enthalten ein genomisches rRNA-Gen)	durch ABA induziert: 34
	SNN < RA: 13 (4 Klone enthalten ein chloroplastidäres rRNA-Gen)	durch ABA gehemmt: 9 (4 Klone enthalten ein chloroplastidäres rRNA-Gen)

Auffällig ist die schwankende Signalintensität von Cosmidklonen, die neben weiteren chloroplastidären Genen eine Sequenz für die chloroplastidär codierte rRNA enthalten. Diese Klone treten zum einen als differentielle Klone, überwiegend stärker in RA detektierbar als in SNN, auf. Zum anderen scheint die Transkription dieser Gene durch die Langzeitbehandlung mit ABA gehemmt zu werden.

Die Signalintensität von Cosmidklonen in einer Hybridisierung mit komplexer cDNA ist jedoch mit Vorsicht zu bewerten. Auf einem genomischen Fragment von 45 kb können mehrere Gene enthalten sein, die sich im Hybridisierungssignal überlagern. Daher ist eine Bestätigung der differentiellen Gene durch eine quantitative Analyse wie dem „reversed Northern“ unverzichtbar. Hier werden Restriktionsfragmente von differentiell erscheinenden genomischen Klonen untersucht, um differentielle Banden bzw. die differentiellen Gene zu identifizieren.

#### Reproduzierbarkeit der Ergebnisse durch "reversed Northern"-Analyse

Durch "reversed Northern" mit Restriktionsfragmenten wurde getestet, ob die durch Koloniehybridisierung ermittelten Differenzen in der Genexpression reproduzierbar sind. Differentiell erscheinende Cosmidklone wurden vermehrt, die Cosmide isoliert und mit EcoRI bzw. EcoRI / BamHI enzymatisch gespalten. Die Restriktionsfragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Dieser Filter wurde in zwei unabhängigen Hybridisierungen mit den radioaktiv markierten komplexen Blatt-cDNAs SNN und RA (wasserbehandelt) hybridisiert. Zwischen den beiden Hybridisierungen wurde die erste Sonde durch "Strippen" entfernt. Als komplexe Sonden wurden Blatt-cDNAs aus unabhängigen Behandlungsexperimenten (6/98 bzw. 6/99) verwendet. 45 Cosmidklone (davon 4 Klone codierend für chromosomale rRNA) wurden getestet, die in SNN stärker detektierbar sind als in RA 27. Außerdem wurden wurden 7 Cosmidklone untersucht, die in RA ein stärkeres Hybridisierungssignal gaben als in SNN. Die Unterschiede in der Signalintensität konnten durch "reversed Northern"-Analyse bei 51 der 52 Cosmidklone nicht bestätigt werden. Nur bei einem Cosmidklon (DK 2 / 70, codierend für rRNA Chloroplast) konnte die stärkere Expression in RA-Pflanzen im Vergleich zu Wildtyppflanzen reproduzierbar detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Die spezifischen physiologischen Eigenschaften der RA-Pflanzen beruhen darauf, daß sie nicht mehr in der Lage sind, ihre Spaltöffnungen zu schließen.

In der Gesamtblatt-cDNA sind jedoch Schließzelltranskripte nur in geringem Maße oder gar nicht enthalten, da Schließzellen eine besonders stabile Zellwand besitzen. Diese wird beim manuellen Mörsern wahrscheinlich nicht aufgebrochen. Daher sollten sich weitere Genexpressionsuntersuchungen speziell auf Transkripte aus epidermalen Fragmenten, einer an Schließzellen angereicherten Fraktion, konzentrieren.

#### 4.2.3.2 Charakterisierung des Expressionsmusters in den epidermalen Fragmenten

Zur Erfassung der Genexpression in den epidermalen Fragmenten von wasser- und ABA-behandelten Wildtyp- und RA-Pflanzen wurden die genomischen Filter mit unabhängig voneinander synthetisierten komplexen cDNAs hybridisiert. Tabelle 8 gibt eine Übersicht über die Hybridisierungen und die verwendeten cDNAs.

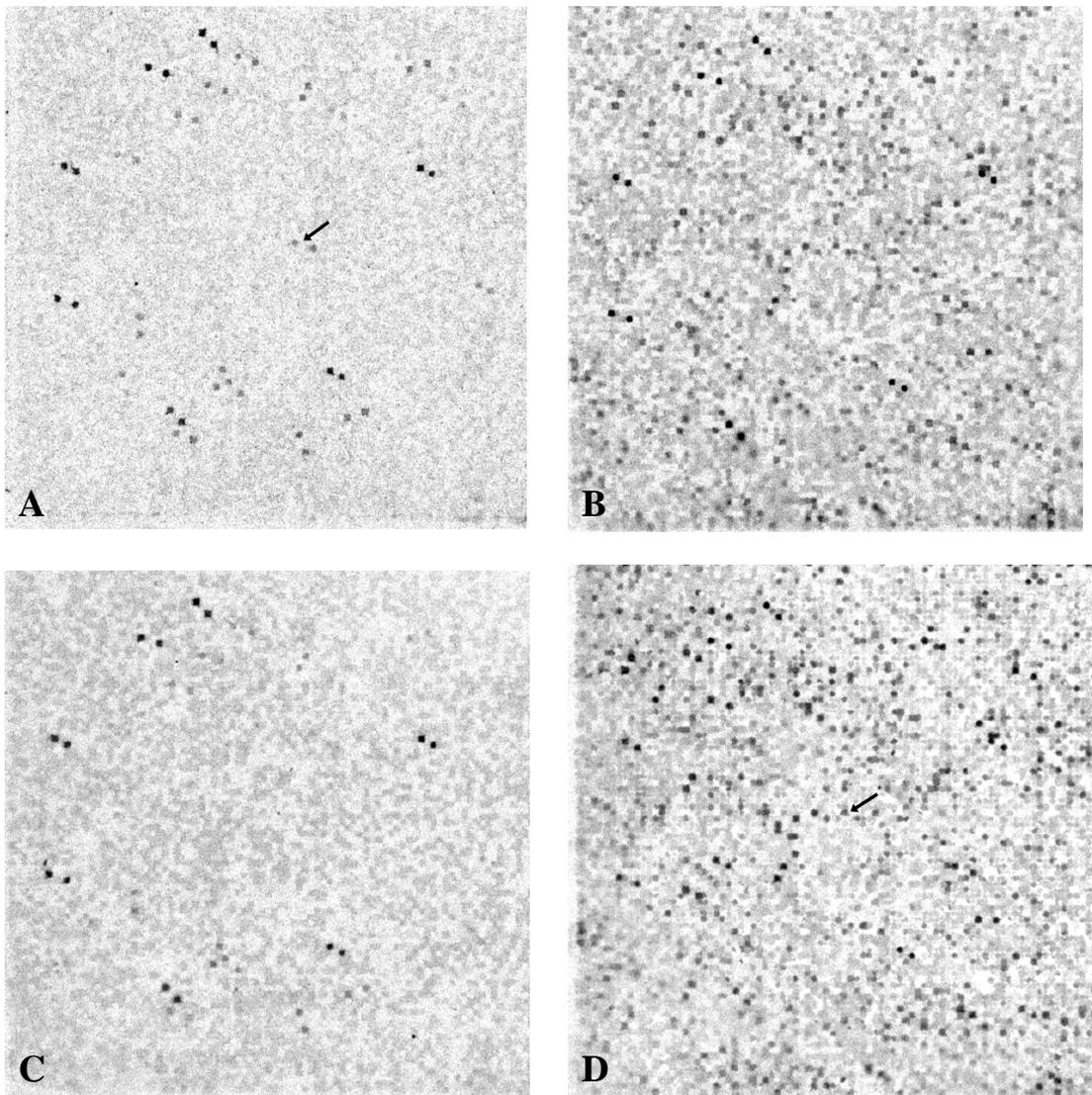
**Tab.8:** Übersicht über die Hybridisierungen der genomischen Filter mit den komplexen cDNAs aus epidermalen Fragmenten.

Physiologische Situation	Komplexe cDNA aus epidermalen Fragmenten	Filtersatz 1	Filtersatz 2	Verwendetes Isotop
SNN (Wasser)	3/98	1	1	$^{32}\text{P}$
	6/98	4	1	$^{32}\text{P}, ^{33}\text{P}$
	6/99		1	$^{33}\text{P}$
RA 27 (Wasser)	3/98		1	$^{32}\text{P}$
	6/98	2	1	$^{32}\text{P}, ^{33}\text{P}$
SNN (ABA)	3/98			$^{32}\text{P}$
	6/98	1	1	$^{33}\text{P}$
RA 27 (ABA)	3/98		1	$^{32}\text{P}$
	6/98	1	1	$^{33}\text{P}$

Zu Beginn der Arbeiten wurde zur radioaktiven Markierung der komplexen Sonden das Isotop  $^{32}\text{P}$  verwendet. Später wurde zum weniger energiereichen  $^{33}\text{P}$  übergegangen, was eine Reihe von Vorteilen bietet. Die Hybridisierungssignale werden deutlich schärfer und "Überstrahlungen" nebeneinander liegender Klone werden verringert. Nachteilig wirken sich der höhere Preis und die deutlich längeren Expositionszeiten aus. Trotzdem ist das

Isotop  $^{33}\text{P}$  für Hybridisierungen gerade von hochdichten Kolonie- und DNA-Filtern zu empfehlen.

Bei der Hybridisierung der Cosmidfilter mit den komplexen cDNAs aus epidermalen Fragmenten von wasserbehandelten Wildtyp- und RA-Pflanzen trat ein spezifisches Hybridisierungsmuster auf, das durch die detektierbare Expression nur weniger Klone (518 von 54.000) gekennzeichnet ist (Abb.12 A und C).



**Abb.12:** Filterausschnitt (1/9, Filtersatz 1, Feld 7) der komplexen Hybridisierung mit cDNA aus epidermalen Fragmenten; (A) Wildtyp SNN, wasserbehandelt, (B) Wildtyp SNN, ABA-behandelt, (C) RA 27, wasserbehandelt, (D) RA 27, ABA-behandelt. Der Pfeil weist auf einen zwischen RA 27 und dem Wildtyp differenziell erscheinenden Klon.

Im Gegensatz dazu konnten bei den Hybridisierungen mit der komplexen cDNA aus ABA-behandelten Wildtyp- und RA-Pflanzen etwa 3000 Klone detektiert werden. Durch die Langzeitbehandlung mit ABA wird also die ca. fünffache Menge an Klonen im Vergleich zur wasserbehandelten Situation exprimiert (Abb.12 B und D).

Sechs stomataspezifische "Leitklone", die eine sehr starke Expression in allen vier physiologischen Situationen aufwiesen und außerdem im Blatt nicht detektiert werden konnten, wurden ausgewählt und analysiert. Die Identifizierung erfolgte in allen Fällen als mitochondrielles Fragment, das unter anderem das Gen für 26S ribosomale RNA enthält. Das Fehlen des Signales nach der Hybridisierung mit komplexer Blatt-cDNA kann damit erklärt werden, daß Schließzellen eine erheblich höhere Anzahl an Mitochondrien enthalten als Mesophyllzellen (Allaway und Setterfield, 1972). Somit weist die cDNA aus epidermalen Fragmenten einen höheren Anteil an mitochondriellen Sequenzen als die komplexe cDNA aus Gesamtblatt auf.

Beim Vergleich der Expressionsmuster von wasserbehandelten Wildtyp- und RA-Pflanzen konnten 13 scheinbar differentielle Klone isoliert werden, die ein stärkeres Hybridisierungssignal beim Wildtyp als bei RA zeigten. Zur Identifizierung dieser Cosmidklone wurde die geordnete schließzellspezifische cDNA-Bank (siehe 4.2.5.1) verwendet. Sämtliche differentielle Cosmidklone konnten als chloroplastidäre oder mitochondrielle genomische Fragmente identifiziert werden (Tab.9).

**Tab.9:** Identifizierung von differentieell erscheinenden Klonen in den epidermalen Fragmenten von Wildtyp und RA 27 .

Differentieell erscheinende Cosmidklone SNN > RA	Identifizierung der korrespondierenden cDNA-Klone als
DK 106, 109, 110, 112, 113, 114, 116	mitochondriell codierte 26S rRNA
DK 107, 111, 115	chloroplastidär codierte 16S rRNA
DK 108, 117, 118	chloroplastidäres ribosomales Protein L2

#### Modifizierung der komplexen cDNA aus epidermalen Fragmenten

Durch eine Modifikation der cDNA-Synthese sollte versucht werden, den Anteil an mitochondriellen und chloroplastidären Sequenzen in der komplexen cDNA zu verringern. Zunächst wurde die mRNA zweimalig über Oligo-(dT)-Säulen gereinigt, um den Gehalt an

nichtpolyadenylierten RNA-Sequenzen zu senken. Bei der modifizierten cDNA-Synthese (6/99) wurde ein Oligo (dT)<sub>25</sub>-Primer und die "Expand" reverse Transkriptase mit einem Temperaturoptimum von 42°C verwendet, um eine spezifischere Erststrangsynthese zu erreichen.

Beim Vergleich der Expressionsmuster der modifizierten mit der konventionell (nach Vorschrift des Stratagene Kits) hergestellten cDNA sind die chloroplastidären und mitochondrialen Cosmidklone nicht mehr oder nur noch schwach detektierbar, allerdings treten keine zusätzlichen detektierbaren Signale auf. Es ist keine prozentuale Anreicherung anderer Sequenzen in der komplexen cDNA zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

#### **4.2.4 Herstellung und erste Charakterisierung der schließzellspezifischen cDNA-Bank**

Bei der schließzellspezifischen cDNA-Bank TStP ("tobacco stomata phagemide", Tabak-Stomata-Phagemide) wurde cDNA insertiert, die aus der mRNA epidermaler Fragmente von Wildtyptabak SNN synthetisiert wurde. Die Eignung von epidermalen Fragmenten zur Isolation von schließzellspezifischer RNA wurde durch Kopka et al. (1997) nachgewiesen. Ausgehend von 100 ng cDNA und 1 µg Vektor (Uni-ZAP XR) konnten  $2,2 \times 10^6$  rekombinante Lambda-Phagen erzeugt werden. Mit einem Teil der Phagenbank ( $1 \times 10^6$  pfu) wurde eine Massen-Excision ("Zappen") ohne vorausgehende Amplifikation durchgeführt.

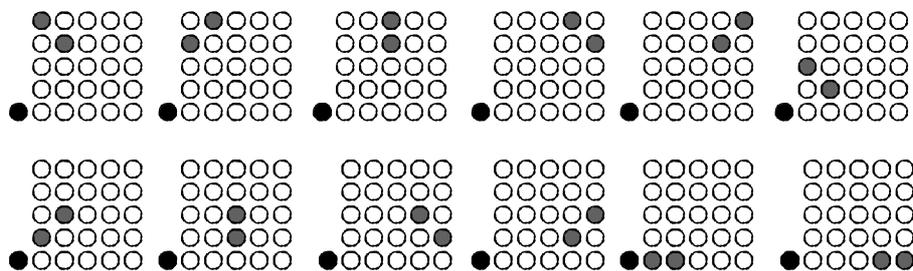
Von 36 bakteriellen Klonen wurde die Phagemid-DNA (Vektor pBluescript<sup>®</sup> SK(+/-)) präpariert und das Insert mit Pvu II herausgespalten. Alle untersuchten Klone waren rekombinant, die Insertgrößen lagen zwischen 0,5 und 2,2 kb (Durchschnitt 1,3 kb).

Zu erwähnen ist, daß die Auswahl eines geeigneten Wirtsstammes für die Qualität der hochdichten Koloniefilter entscheidend ist. Ein gleichmäßiges Wachstum der Kolonien ist eine wichtige Voraussetzung für eindeutige Hybridisierungssignale und die Vergleichbarkeit der einzelnen Filter untereinander. Die verwendeten *E.coli*-Stämme XL1-Blue MR (Stratagene) für die Cosmidbank sowie SOLR (Stratagene) für die cDNA-Bank sind für diesen Zweck sehr gut geeignet.

## 4.2.5 Charakterisierung der geordneten schließzellspezifischen cDNA-Bank TStP

### 4.2.5.1 Nutzung der geordneten cDNA-Bank TStP zur Identifizierung interessanter Cosmidklone und häufiger Transkripte in der cDNA-Bank

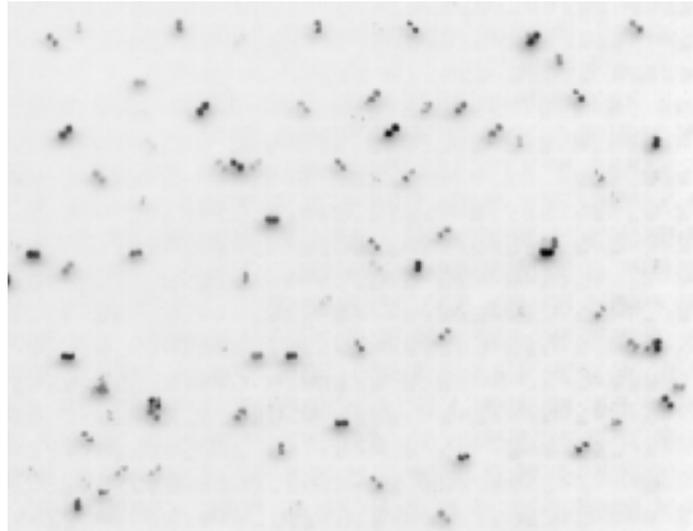
27.000 bakterielle cDNA-Klone wurden in dem robotergestützten Prozeß des "Pickings" in Mikrotiterplatten geordnet und durch "Spotting" (Spottingmuster 5 x 5, "BioGrid"-Roboter; Abb. 13) auf Nylonmembranen übertragen.



**Abb.13:** Anordnung der 12 doppelt "gespotteten" cDNA-Klone in einem 5 x 5-Feld (Spottingmuster, "BioGrid"-Roboter). Der Tintenpunkt links neben den Feldern dient zur Orientierung.

Diese geordnete cDNA-Bank wurde als Hilfsmittel zur Identifizierung interessanter Cosmidklone, die auch in Schließzellen exprimiert werden, verwendet. Die Cosmidklone wurden aus den Mikrotiterplatten (TLC, Kopie Q03) entnommen und vermehrt, die Cosmide isoliert und die Inserts mit Not I aus dem SuperCos 1-Vektor herausgespalten. Die einzelnen Inserts wurden radioaktiv markiert und als Sonde für Hybridisierungen der cDNA-Koloniefilter eingesetzt. Korrespondierende cDNA-Klone, die ein Hybridisierungssignal gaben, wurden aus den Mikrotiterplatten der cDNA-Bank (Kopie TStP) isoliert, vermehrt und das Phagemid sequenziert.

Im Laufe dieser Untersuchungen konnte die schließzellspezifische cDNA-Bank hinsichtlich einiger häufiger Transkripte charakterisiert werden. 1,5 % der cDNA-Klone wurden als mitochondriell codierte 26S rRNA, 0,7 % der cDNA-Klone als mitochondriell codierte F1-ATP-Synthase (UE alpha) sowie 1 % der Klone als chloroplastidär codiertes ribosomales Protein L2 identifiziert (Abb.14).



**Abb.14:** Identifizierung eines Cosmidklons (DK St. 2/118) mit Hilfe der geordneten cDNA-Bank TStP (Filterausschnitt). Die cDNA-Sequenzen der detektierbaren, korrespondierenden Klone codieren für das chloroplastidäre ribosomale Protein L2.

Hier stellt sich die Frage, weshalb chloroplastidäre und mitochondrielle Sequenzen in die cDNA-Bank bzw. in die komplexen cDNA-Sonden gelangen, die aus polyadenylierter mRNA synthetisiert wurden. Polyadenylierte RNA wurde auch in Chloroplasten detektiert (Haff und Borogard, 1976), die poly (A)-Stränge sind sehr lang (bis zu 270 bp) und enthalten zu geringeren Anteilen auch Guanosine, Cytidine und Uridine (Lisitsky et al., 1996). Die meisten der Polyadenylierungen wurden innerhalb der codierenden Regionen der mRNA gefunden, nur ein geringer Anteil am 3'-Ende (Lisitsky et al., 1996). Sie können aus der endonucleolytischen Spaltung von vollständigen Transkripten bzw. durch Polyadenylierung von unvollständig transkribierten Molekülen entstehen und scheinen für den Abbau von Chloroplasten-mRNA notwendig zu sein (Übersicht bei Schuster et al., 1999).

Die mitochondriell codierten mRNAs von Pflanzen sind nicht polyadenyliert. Mitochondrien sind in Schließzellen sehr zahlreich, worauf die hohe metabolische Aktivität dieser Zellen beruht. Allaway und Setterfield (1972) ermittelten eine 2- bis 3-fache Anzahl von Mitochondrien in Schließzellen von *Allium porrum* und *Vicia faba* im Vergleich zu Mesophyllzellen. Aufgrund der großen Häufigkeit mitochondrieller Transkripte in der schließzellspezifischen Gesamt-RNA kann wahrscheinlich auch durch eine zweifache Reinigung der mRNA über Oligo (dT)-Säulen das Auftreten von

mitochondriellen Sequenzen in der cDNA nicht verhindert werden. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, daß mitochondrielle RNAs mit Polyadenylierungen innerhalb der codierenden Region bei der Reinigung an Oligo (dT)-Zellulose gebunden und nachfolgend bei der Erststrangsynthese in cDNA umgeschrieben werden. So weist das mitochondrielle F1-ATP-Synthase (UE alpha)-Gen (*N.tabacum* x *N.bigelovii*; Kofer et al., in Druck) innerhalb der codierenden Region zwei 10 bp umfassende poly (A)-Sequenzen auf. Genau diese Sequenzen traten in den untersuchten cDNA-Klonen als polyadenylierte Regionen an den Enden der Inserts auf.

#### **4.2.5.2 Sequenzanalyse von 281 zufällig ausgewählten cDNA-Klonen der schließzell-spezifischen cDNA-Bank**

Nach der Hybridisierung der genomischen Filter mit den komplexen cDNAs aus epidermalen Fragmenten (wasserbehandelt) wurde nur für sehr wenige Klone ein Signal nachgewiesen. Der größte Teil dieser Klone wurde als mitochondriell und chloroplastidär codierte Fragmente identifiziert. Unter den schließzellspezifischen Transkripten gibt es nur sehr wenige häufige, die einen großen prozentualen Anteil der komplexen cDNA einnehmen. Durch die Sequenzanalyse von 281 zufällig ausgewählten geordneten cDNA-Klonen sollte getestet werden, ob und welche Klone statistisch gesehen häufig in der Bank vertreten sind.

Gleichzeitig dient die Identifizierung einer großen Anzahl von Klonen der weiteren Charakterisierung der geordneten cDNA-Bank. Die cDNA-Klone wurden aus den Mikrotiterplatten (Kopie TStP) isoliert, vermehrt und die Phagemide durch alkalische Lyse präpariert. Die Sequenzen der Klone wurden mit Hilfe der BLAST ("Basic Local Alignment Search Tool") N und BLAST X-Programme mit den Daten der nicht-redundanten Nukleotid (NR)- und Proteindatenbank (Swissprot) des NCBI (Nationales Zentrum für Biotechnologische Informationen) verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 dargestellt. Als stark bzw. gering homolog werden Sequenzen bezeichnet, wenn mehr als 200 bzw. 100 bp zu einem hohen Prozentsatz mit der entsprechenden Sequenz in der Datenbank übereinstimmen.

Die Redundanz unbekannter Sequenzen wurde mit Hilfe des CLUSTAL W- Sequenzvergleichsprogrammes (interaktives multiples Sequenzvergleichsprogramm) ermittelt.

**Tab.10:** Ergebnisse des Sequenzvergleiches von 281 zufällig ausgewählten, geordneten schließzellspezifischen cDNA-Klonen mit den Daten der nichtredundanten Nukleotid- und Proteindatenbank (NCBI).

	Anzahl der Klone	Redundanz	Homologie zu
zufällig ausgewählte Klone	281 (100 %)		
Klonierungsartefakte	24 (8,5 %)		
Klone mit starker Homologie zu proteincodierenden Sequenzen von Pflanzen	108 (38,4 %)		
-mehrfach auftretende Klone	6	11 (3,9 %)	<b>Metallothionein-ähnliches Protein Typ 2</b> ( <i>Nicotiana plumbaginifolia</i> )
		8 (2,8 %)	während der Blattseneszenz hochregulierte cDNA <b>SENU1</b> ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )
		4 (1,4 %)	translational kontrolliertes <b>Tumorprotein-Homologes</b> ( <i>Nicotiana tabacum</i> )
		3 (1,1 %)	während der Knollenbildung auftretendes <b>hypothetisches Protein</b> ( <i>Solanum tuberosum</i> )
		2 (0,7 %)	<b>Metallothionein-ähnliches Protein Typ 3</b> ( <i>Malus domestica</i> )
		2 (0,7 %)	<b>Cab 21</b> ( <i>Nicotiana tabacum</i> )
Klone mit geringerer Homologie zu proteincodierenden Sequenzen von Pflanzen	19 (6,8 %)		
unbekannte Klone	152 (54,1 %)		
-Klone mit starker Homologie zu hypothetischen Proteinen von <i>A. thaliana</i>	5		
-Klone mit geringer Homologie zu hypothetischen Proteinen von <i>A. thaliana</i>	16		
-mehrfach auftretende unbekannte Klone	3	4 (1,4 %)	(entsprechen den 20-fach auftretenden, schließzellspezifischen Klonen beim Vergleich epidermale Fragmente / Blatt, vgl. 4.2.7)
		2 (0,7 %)	
		2 (0,7 %)	

8,5 % der untersuchten Klone sind Artefakte, bei denen entweder zwei poly (A)-Stränge hintereinander kloniert einen Strang bilden oder beide Stränge aus unterschiedlichen cDNA-Sequenzen bestehen.

Von 152 unbekanntem cDNA-Klonen weisen 21 Homologien zu hypothetischen Proteinen von *A.thaliana* auf. Den verbleibenden 131 Klonen konnten keine Nukleotid- oder Proteinsequenzen der Datenbank zugeordnet werden.

Von 108 Klonen, die eine starke Homologie zu proteincodierenden Sequenzen von Pflanzen aufweisen, traten 6 Klone mehrfach auf. Dabei wurden am häufigsten Sequenzen gefunden, die Metallothionein-ähnliche Proteine des Typs 2 codieren (11 Klone). 2 Klone weisen eine starke Homologie zu den Genen von Metallothionein-ähnlichen Proteinen des Typs 3 auf. Metallothioneine sind niedermolekulare, Cystein-reiche Proteine mit einer hohen Metallbindungskapazität. In Säugetieren und Pilzen sind sie an zellulären Entgiftungsprozessen beteiligt, ihre Funktion in Pflanzen ist noch weitgehend unbekannt.

Acht der zufällig ausgewählten cDNA-Klone zeigen eine starke Homologie zu einer als SENU1 bezeichneten cDNA-Sequenz. SENU1 wurde von John et al. (1997) gemeinsam mit einer Reihe anderer cDNA-Sequenzen isoliert, die während der Blattseneszenz von Tomate auf- oder abreguliert wurden. "Northern Blot"-Analysen zeigten, daß SENU1 in 4 bis 6 Wochen alten grünen Blättern stark exprimiert wird. In 8 Wochen alten grünen Blättern, unmittelbar vor dem Beginn der Seneszenz, nimmt die Expression ab und steigt dann während der folgenden Seneszenzstadien wieder an. Eine deutliche Expression der SENU1-mRNA konnte auch in Wurzel und Stengel detektiert werden, nicht jedoch in grünen und reifen Früchten (John et al., 1997).

Vierfach trat eine cDNA-Sequenz auf, die als translationales kontrolliertes Tumorprotein-Homologes (*N.tabacum*; Kang und Park, unveröffentlicht) identifiziert werden konnte. Die Funktionen solcher zu tierischen und menschlichen Tumorproteinen homologen Pflanzenproteine sind bisher nicht bekannt.

Weiterhin wurden drei Klone isoliert, die eine deutliche Homologie zu einer cDNA-Sequenz aufweisen, die während der Knollenbildung von Kartoffel auftritt (Macleod et al., unveröffentlicht).

127 der 281 zufällig ausgewählten cDNA-Klone zeigen eine deutliche Homologie zu den Genen pflanzlicher Proteine bzw. RNAs (Tab.11). Dabei weisen 108 Klone eine stärkere (> 200 bp Übereinstimmung), 19 Klone eine schwächere (> 100 bp Übereinstimmung) Ähnlichkeit auf.

Diese Ergebnisse bestätigen, daß es unter den schließzellspezifischen Transkripten tatsächlich nur wenige sehr häufige gibt, die einen hohen prozentualen Anteil in der

**Tab.11:** Zufällig ausgewählte cDNA-Klone weisen deutliche Homologien zu pflanzlichen proteincodierenden Sequenzen und RNA-Genen auf.

<b>1. Starke Homologie (&gt; 200 bp Übereinstimmung)</b>
<b>Schließellspezifisches Protein:</b> prolinreiches Protein StGCPRP
<b>Transkription und Translation:</b> verschiedene Histone H4, RNA-bindendes glycinreiches Protein, DNA-bindendes Protein (T231), Nukleinsäure-bindendes Protein, Valyl-tRNA-Synthetase, Methionyl-tRNA-Synthetase, Translationsinitiationsfaktoren (5A-1, 5A-2, 5A-3, eIF-4), Elongationsfaktoren (1-alpha, EF-2), chromosomale ribosomale Proteine (60S, S3a)
<b>Signaltransduktion:</b> putativer Chloridkanal, Plasmamembran-H <sup>+</sup> -ATPase, vakuoläre H <sup>+</sup> -ATPase, H <sup>+</sup> -anorganische Pyrophosphatase, 14-3-3 Protein, GTP- bindende Proteine (mgp1 bzw. RAB11B, sral), verschiedene Calmodulin-ähnliche Proteine, Proteinkinasen (ATMRK1, TMK1 [wahrscheinliche Rezeptorproteinkinase])
<b>Proteine, die im Zusammenhang mit Hormonwirkungen stehen:</b> Auxin- bindendes Protein, ENOD 40-Peptid, H1 Histon-ähnliches Protein, ABA-Streß-Reifungsprotein
<b>Allgemeiner Metabolismus:</b> Aminotransferase, mitochondriell prozessierende Peptidase, Pre-Pro-Cystein-Proteinase, Cystein-Proteinase-Inhibitor, Aspartat-Proteinase, Ubiquitin-Fusionsprotein, Polyubiquitin, Ubiquitin-aktivierendes Enzym, Proteasom Beta-UE, Delta 1-Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthase, Cystathionin- gamma-Synthase, Phosphoglyceromutase, cytosolische Phosphoglyceratkinase, Triosephosphatisomerase, Enolase, chloroplastidäre Carbonatdehydratase, Lipoxygenase, D12 Oleat-Desaturase, Naringenin, S-Adenosylmethionin-Decarboxylase
<b>Energieproduktion und Transduktion:</b> Cytochrom P450-Monooxygenase (78A3, 76B1, 89A2, 71A1), Cytochrom C Reduktase, mitochondrielle F1-ATP Synthase (UE delta, UE gamma), mitochondrielles ribosomales Protein S19, mitochondrielle Malatdehydrogenase, ADP/ATP-Translokator
<b>Chloroplast / Photosynthese:</b> chloroplastidäre ATP-Synthase (A-Ketten-Vorstufe), Ftsh-ähnliches Protein, Photosystem II 22 kD Polypeptid, Photosystem II 10 kD Polypeptid-Vorstufe, sauerstoffentwickelndes Protein, hypothetisches Protein YCF3, chloroplastidäre 23S ribosomale RNA, Chlorophyll A/B-bindende Proteine (21, 29), genomische DNA Chloroplast, kleine UE Rubisco
<b>Streßproteine und Pathogenabwehr:</b> Metallothionein-ähnliche Proteine (Typ 2 und 3), Hitzeschockproteine (60 [mitochondriell] und 70), Chitinasen (134 und C), Cyclophilin, cytosolische Ascorbat-Peroxidase
<b>Sonstige:</b> DNAJ- Protein Homologes, Epoxid-Hydrolase, SENU1, translational kontrolliertes Tumorprotein-Homologes
<b>2. Schwächere Homologie (100 – 200 bp Übereinstimmung)</b>
während der Knollenbildung auftretendes hypothetisches Protein, Calmodulin und Calmodulin-ähnliche Proteine, anorganischer Phosphattransporter, LEA- Protein, homeotisches Protein APETALA2, D-Cadinene-Synthase, geschlechtsbestimmendes Protein, Salztoleranz-Protein, AP2-Domänenprotein, Germin-ähnliches Protein, während der Pathogenese auftretendes Protein, Permease, mitochondriell prozessierende Peptidase, Kupfer-Homeostase-Faktor, Serin-Carboxypeptidase

cDNA-Bank bzw. in der komplexen cDNA einnehmen. Bei der Untersuchung von 281 zufällig ausgewählten Klonen konnten lediglich neun mehrfach auftretende Sequenzen identifiziert werden.

#### 4.2.6 Komplexe Analyse der Genexpression in Schließzellen von RA- und Wildtyppflanzen mittels der geordneten schließzellspezifischen cDNA-Bank

Bei der differentiellen Genexpressionsanalyse mit Hilfe der Cosmidfilter konnten lediglich Schwankungen in der Expressionshöhe mitochondriell und chloroplastidär codierter Sequenzen festgestellt werden. Weitere Unterschiede auf Transkriptionsebene zwischen wasserbehandelten epidermalen Fragmenten von Wildtyp und RA-Pflanzen konnten nicht detektiert werden. Auf den genomischen Filtern zeigen nur sehr wenige (1 %) der "gespotteten" genomischen Klone ein Hybridisierungssignal, welches sich deutlich vom Hintergrund abhebt.

Daher wurden die 27.000 geordneten schließzellspezifischen cDNA-Klone zusätzlich zur Suche nach differentiell exprimierten Genen eingesetzt.

Die cDNA-Filter wurden mit komplexer cDNA aus epidermalen Fragmenten von wasserbehandelten Wildtyp- und RA-Pflanzen hybridisiert. Die Hybridisierungen wurden mehrfach mit jeweils unabhängig voneinander synthetisierten cDNAs (6/98, 6/99) aus unterschiedlichen Behandlungsexperimenten durchgeführt (Tab.12).

**Tab.12:** Übersicht über die Hybridisierungen der schließzellspezifischen cDNA-Filter mit komplexen cDNA-Proben aus epidermalen Fragmenten und Gesamtblatt.

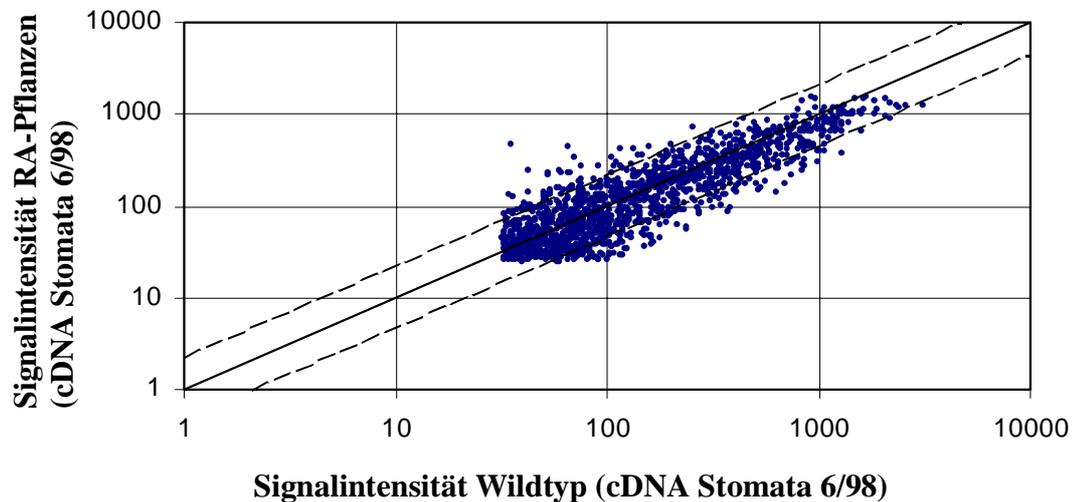
Physiologische Situation	Komplexe cDNA	Anzahl der Hybridisierungen
	<b>Epidermale Fragmente</b>	
SNN (Wasser)	6/98	2
	6/99	3
RA (Wasser)	6/98	1
	6/99	2
SNN (ABA)	6/98	2
RA (ABA)	6/98	2
	<b>Gesamtblatt</b>	
SNN (Wasser)	6/99	3
SNN (ABA)	6/98	1

Zur Auswertung wurden die Images (Bilder) der exponierten Filter in 6 Felder aufgeteilt. Jedes Feld umfaßt bei dem verwendeten Spottingmuster ("BioGrid", 5 x 5) ein Mikrotiterplattenformat und enthält jeweils die Klone aus 12 verschiedenen Platten. Die Bilder wurden visuell am Bildschirm miteinander verglichen. Bei der Hybridisierung der cDNA-Filter mit schließzellspezifischer komplexer cDNA geben sowohl bei Wildtyp als auch bei Transgenen ca. 6200 (23 %) der 27.000 cDNA-Klone ein deutliches Hybridisierungssignal. Von den 281 zufällig ausgewählten und sequenzierten Klonen konnten 50 (18 %) detektiert werden. Dabei korreliert die Signalintensität mit der Häufigkeit dieser Klone in der geordneten cDNA-Bank (vgl. Tab.10).

In ersten Analysen der Genexpressionsmuster wasserbehandelter epidermaler Fragmente von RA-Pflanzen und Wildtyp (cDNA 6/99) konnten zwar differentiell erscheinende Klone detektiert werden, diese konnten jedoch in Wiederholungsexperimenten mit unabhängiger cDNA (6/98) nicht bestätigt werden.

Die cDNA-Koloniefilter wurden zusätzlich mit Hilfe des "Array Vision"-Programmes ausgewertet. Prinzipiell ist es möglich, hochdichte Kolonie- und DNA-Filter mit dieser Software quantitativ auszuwerten. Es ist jedoch zu beachten, daß ein Spottingmuster verwendet wird, bei dem zwischen den einzelnen Primärelementen ein gewisser Abstand erzeugt wird. So ist es möglich ein Gitter zu konstruieren, dieses jedem Filter individuell anzupassen und den lokalen Hintergrund zu definieren. Fehlt dieser Abstand, so ist die Auswertung mit diesem speziellen Programm kaum möglich (siehe genomische Koloniefilter, Abb. 11 und 12). Eine weitere Voraussetzung für die erfolgreiche Anwendung, d.h. für die Messung von vergleichbaren Signalintensitäten, sind gleichmäßige Hybridisierungen über die gesamte Filterfläche. Dies kann in der Praxis bei der Handhabung von großen 22 x 22 cm-Nylonfiltern nicht in jedem Fall gewährleistet werden. Aus diesem Grund konnten jeweils nur Teile der cDNA-Koloniefilter miteinander verglichen werden. Da für die hier dargelegten vergleichenden Hybridisierungen jeweils derselbe Filter verwendet wurde, konnte auf Referenzhybridisierungen und Normalisierung der Signalintensitäten verzichtet werden. Wie bereits bei der visuellen Auswertung dargelegt, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den transgenen Pflanzen und dem Wildtyp festgestellt werden. In Abb.15 sind die Intensitäten von 1920 doppelt "gespotteten" Klonen bei Hybridisierung mit komplexer cDNA aus RA und SNN dargestellt. In die Auswertung wurden nur Signalintensitäten einbezogen, die mindestens zweifach über dem Hintergrund lagen. Differentiell erscheinende, d.h. von der Mittelgeraden stark abweichende Klone, konnten in Wiederholungsexperimenten nicht bestätigt

werden. Einzelne abweichende Klone sind auf starke Signalunterschiede zwischen den beiden Doppel-"Spots" zurückzuführen.

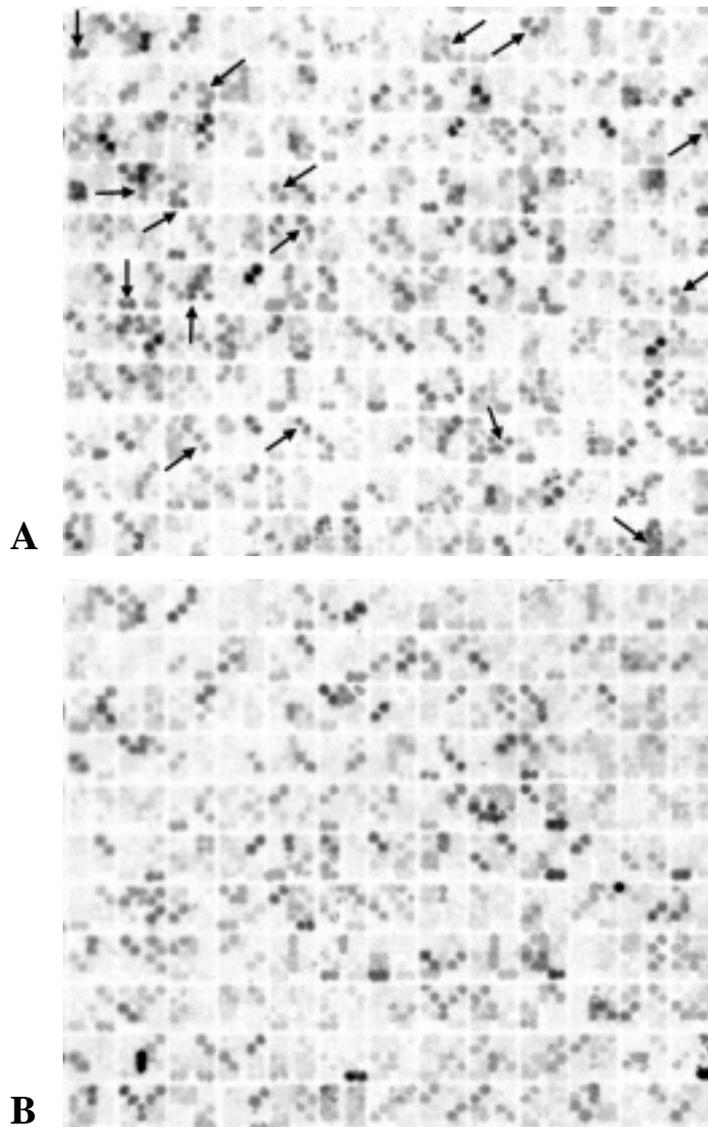


**Abb.15:** Zweidimensionale logarithmische Darstellung der Signalintensitäten eines Ausschnittes (ca. 1/14, 1920 doppelt "gespottete" Klone) des cDNA-Koloniefilters. Zur Hybridisierung wurde komplexe cDNA (6/98) aus Wildtyp und RA-Pflanzen verwendet. Aufgeführt sind nur Klone, deren Signalintensitäten mehr als zweifach über dem lokalen Hintergrund liegen. Die Datenpunkte außerhalb der gestrichelten Linien veranschaulichen eine mehr als zweifach höhere Expression zwischen Wildtyp und RA.

Durch die Modifizierung der cDNA-Synthese können mitochondrielle Sequenzen reduziert werden

Vergleicht man die Hybridisierungsmuster von konventionell hergestellter cDNA (6/98) und modifizierter cDNA (6/99) aus epidermalen Fragmenten auf dem TStP-Filter, so wird deutlich, daß vor allem die Klone codierend für die mitochondrielle F1-ATP-Synthase (Untereinheit alpha) kaum noch nachweisbar sind (Abb.16). Die cDNA-Klone codierend für rRNA (Mitochondrium) zeigen nahezu unverändert ein sehr schwaches bis schwaches Signal. Die Klone codierend für das ribosomale Protein L2 (Chloroplast) treten unverändert schwach bis mittelstark in Erscheinung.

Durch die Modifizierung der cDNA-Synthese konnten somit, wie auch bereits bei der Hybridisierung der genomischen Filter festgestellt, die mitochondriell codierten Sequenzen deutlich verringert werden.

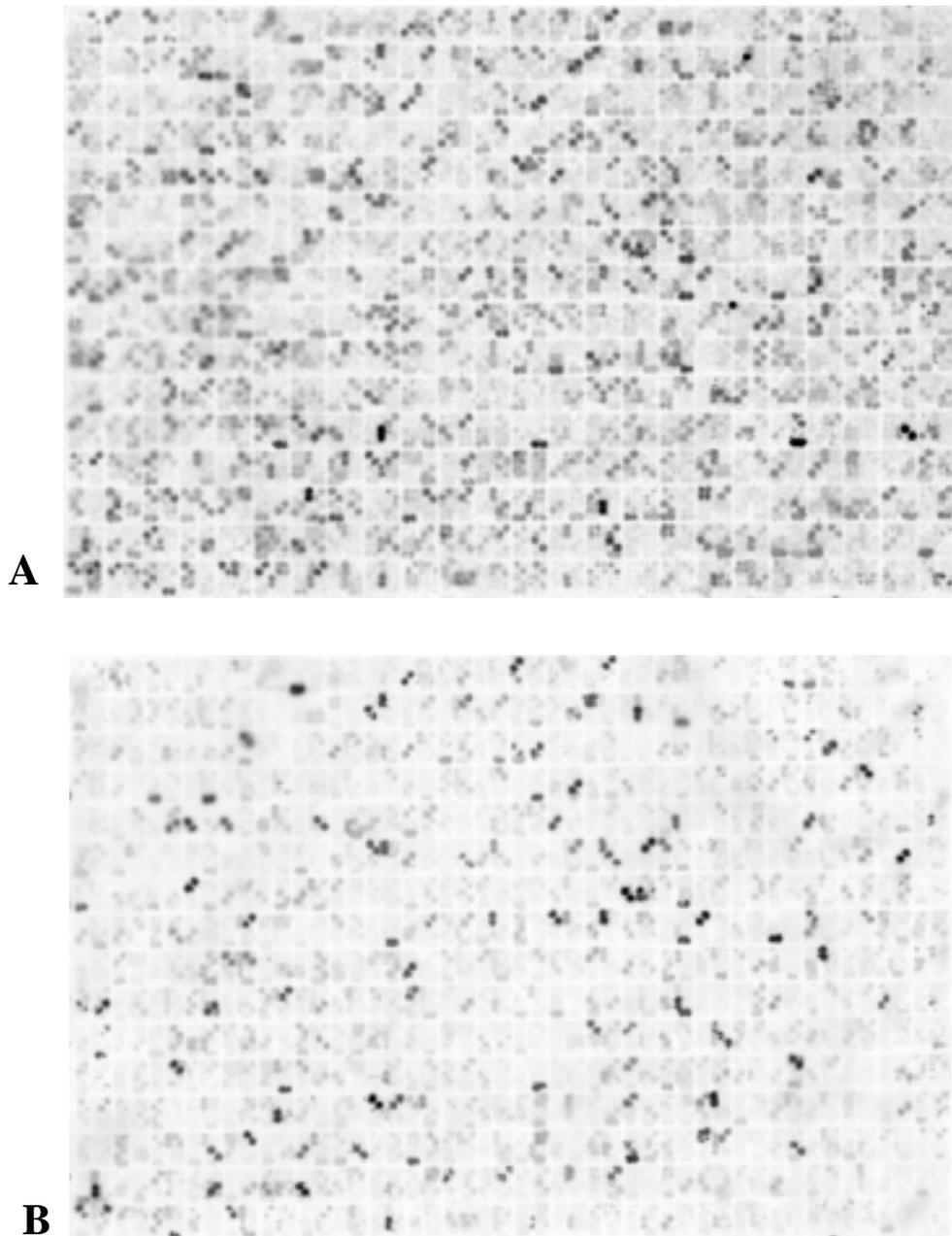


**Abb.16:** Ausschnitt der Hybridisierungsmuster von konventionell hergestellter cDNA (A; wasserbehandelte RA, 6/98) und modifizierter cDNA (B; wasserbehandelte RA, 6/99) an einem schließzellspezifischen cDNA-Filter. Die Pfeile weisen auf cDNA-Klone, codierend für die mitochondrielle ATP-Synthase (UE alpha), die in der modifizierten cDNA kaum noch nachweisbar sind.

#### 4.2.7 Vergleich der Genexpression in Schließzellen und Blatt mittels der schließzellspezifischen cDNA-Bank

Wie in allen anderen pflanzlichen Zelltypen kann erwartet werden, daß Schließzellen eine Reihe von Genen exprimieren, die zu den zelltypspezifischen Funktionen beitragen und daher in den meisten anderen Zelltypen oder Geweben inaktiv sind (Müller-Röber et al., 1998).

Um die Genexpression in Schließzellen und Blatt vergleichen zu können, wurde ein cDNA-Filter mit komplexer Blatt-cDNA (6/99) des Wildtyps hybridisiert. Dabei konnten ca. 4900 Klone (18 %) detektiert werden. Beim Vergleich der Expressionsmuster von Blatt und Stomata traten zahlreiche differentielle Klone auf (Abb.17).



**Abb.17:** Ausschnitt (1/6, Feld 4) des Expressionsmusters eines schließzellspezifischen cDNA-Filters hybridisiert mit komplexer cDNA aus epidermalen Fragmenten Wildtyp (A; 6/99) und komplexer cDNA aus Gesamtblatt Wildtyp (B; 6/99).

Es treten sowohl Klone auf, die in Schließzellen deutlich höher exprimiert werden, als auch Klone, die im Blatt ein stärkeres Hybridisierungssignal geben. Dabei überwiegen die in Schließzellen höher exprimierten Klone, was auf den stomataspezifischen Ursprung der Bank zurückzuführen ist.

37 cDNA-Klone, die in den epidermalen Fragmenten sehr stark und im Blatt nicht oder nur schwach exprimiert werden, wurden aus den Mikrotiterplatten isoliert und sequenziert. 12 Klone sind Klonierungsartefakte, bei denen entweder zwei poly(A)-Stränge hintereinander kloniert einen Strang bilden oder beide Stränge aus unterschiedlichen cDNA-Sequenzen bestehen. Die Ergebnisse sind in Tab.13 dargestellt.

**Tab.13:** Identifizierung von 37 ausgewählten cDNA-Klonen, die sehr stark in epidermalen Fragmenten und schwach bzw. nicht im Gesamtblatt detektiert wurden.

Redundanz der Klone bzw. Stränge von Klonierungsartefakten	Homologie zu
9	Metallothionein-ähnliches Protein Typ 2 ( <i>N. plumbaginifolia</i> )
3	Metallothionein ( <i>Nicotiana glutinosa</i> )
1	Myo-Inositol-1-Phosphat-Synthase ( <i>Nicotiana paniculata</i> )
20	unbekanntes Protein (identisch bzw. starke Homologie untereinander)
3	unbekannte Proteine (keine Homologie untereinander)

Transkripte für Metallothionein-ähnliche Proteine sind in epidermalen Fragmenten stark exprimiert

Durch die Sequenzierung zufällig ausgewählter Klone der cDNA-Bank aus epidermalen Fragmenten konnten die mit 4,6 % (Typ 2 und 3) statistisch am häufigsten auftretenden Transkripte codierend für verschiedene Metallothionein-ähnliche Proteine identifiziert werden. Durch Vergleich der Genexpressionsmuster konnte eine eindeutig höhere Expression dieser Transkripte in den epidermalen Fragmenten als im Gesamtblatt nachgewiesen werden.

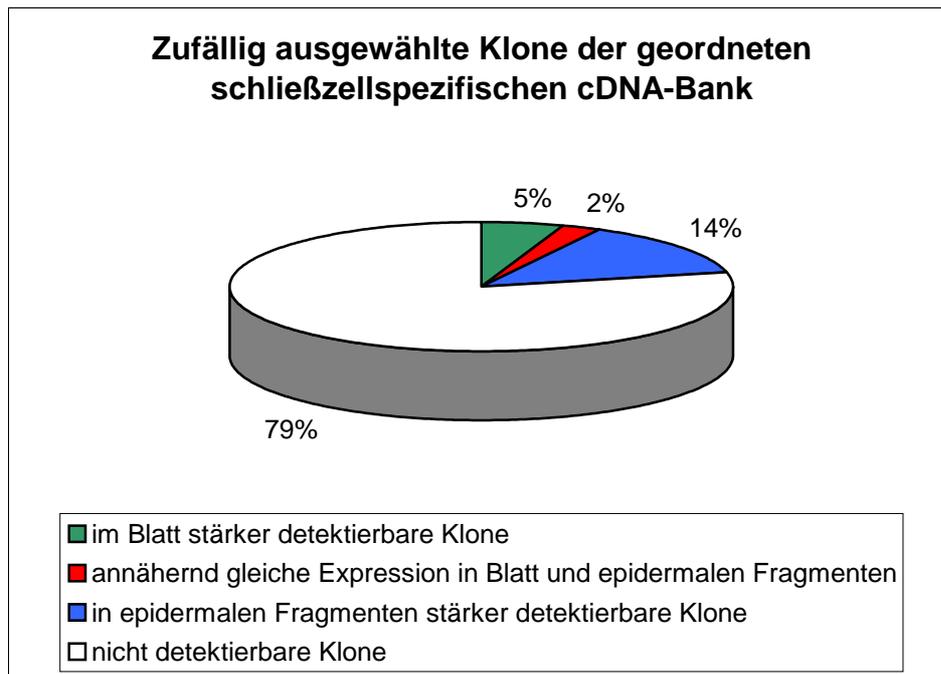
Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnten unter 515 untersuchten ESTs aus Schließzellprotoplasten von *Brassica campestris* keine Metallothionein-ähnlichen Proteine gefunden werden (Kwak et al., 1995). Daher könnte das häufige Auftreten von Transkripten für Metallothionein-ähnliche Proteine spezifisch für Schließzellen von Tabak

sein. Wahrscheinlicher ist es jedoch, daß die hohen Transkriptmengen auf Verunreinigungen der Schließzellfraktion mit anderen Zelltypen zurückzuführen sind. So enthalten Präparationen von epidermalen Fragmenten gewöhnlich neben den zu etwa 90 % angereicherten Schließzellen noch intakte Trichome und zu geringerem Anteil Epidermiszellen (Kopka et al., 1997). Und gerade in Trichomen konnte eine auffallend hohe Expression von Metallothionein-ähnlichen Transkripten nachgewiesen werden. Foley und Singh (1994) isolierten durch differentielles Screening eine cDNA aus *Vicia faba*, die ein Metallothionein-ähnliches Protein codiert und im Gesamtblatt, nicht jedoch in Mesophyllprotoplasten exprimiert wird. In *in situ*-Hybridisierungen konnte eine vorwiegend auf Trichome beschränkte Expression beobachtet werden. Diese Resultate konnten auch in *Arabidopsis* bestätigt werden (Garcia-Hernandez et al., 1998). Vermutet wird eine Beteiligung der Metallothionein-ähnlichen Proteine unter anderem bei der Metallentgiftung in den Blättern und beim Wiederaufbau der Lignin-haltigen Trichomzellwand nach Verwundung (Garcia-Hernandez et al., 1998).

Ein cDNA-Klon, codierend für die Myo-Inositol-1-Phosphat-Synthase, ist ebenfalls in epidermalen Fragmente stärker detektierbar als im Blatt. Dieses Enzym ist für die Synthese von Phosphatidylinositol verantwortlich, welches als Zellmembrankomponente und bei der Signaltransduktion von Calcium-abhängigen Prozessen in der Zelle eine Rolle spielt (Übersicht bei De Camilli, 1996).

Die zwanzigfach auftretenden, unbekannt Sequenzen, die untereinander identisch oder stark homolog sind, zeigen sehr schwache Ähnlichkeiten zu den Genen von Strukturproteinen wie einem glycinreichen Zellwandprotein (*Phaseolus vulgaris*) und menschlichem Keratin. Die gleiche unbekannt Sequenz trat unter den 281 zufällig ausgewählten cDNA-Klonen viermal auf (vgl. Tab.10).

Durch Vergleich der Expressionsmuster der zufällig ausgewählten cDNA-Klone, die sequenziert wurden, konnten weiterhin Aussagen zur Genexpression in Schließzellen und Blatt getroffen werden. Von diesen 281 Klonen zeigen bei Hybridisierung mit komplexer cDNA aus epidermalen Fragmenten und Blatt insgesamt 60 eine deutlich über dem Hintergrund liegende Signalintensität. Von diesen 60 detektierbaren Klonen (ein Teil codiert für gleiche Proteine; siehe auch Tab.10), sind 38 in den epidermalen Fragmenten und 15 im Blatt höher exprimiert (Abb.18). Tabelle 14 faßt Klone zusammen, die in Schließzellen und Blatt deutliche Unterschiede in der Expressionshöhe zeigen.



**Abb.18:** Expressionsanalyse der 281 zufällig ausgewählten Klone der schließzellspezifischen cDNA-Bank. Anteile von nicht detektierbaren sowie in epidermalen Fragmenten und / oder Blatt detektierbaren Klonen.

**Tab.14:** Vergleich der Genexpression identifizierter Klone in epidermalen Fragmenten und Blatt: cDNA-Sequenzen, die in epidermalen Fragmenten und Blatt deutliche Unterschiede in der Expressionshöhe zeigen.

Höhere Expression in	
epidermalen Fragmenten	Gesamtblatt
Metallothionein-ähnliche Proteine während der Blattseneszenz hochregulierte cDNA SENU1 während der Knollenbildung auftretendes Protein prolinreiches Protein StGCPRP der Schließzellen Cyclophilin 10 unbekannte Proteine	Cab 21 chloroplastidäre rRNA Photosystem II 10 und 20 kD- Polypeptid kleine UE Rubisco Carbonatdehydratase translational kontrolliertes Tumorprotein- Homologes 1 unbekanntes Protein

Insbesondere cDNA-Klone mit Homologie zu dem während der Knollenbildung von Kartoffel auftretenden Protein sind in den epidermalen Fragmenten deutlich stärker detektierbar (mittelstark bis stark) als im Blatt (schwach). Bei den Klonen, die eine Homologie zur SENU1-mRNA zeigen, ist dieser Expressionsunterschied geringer.

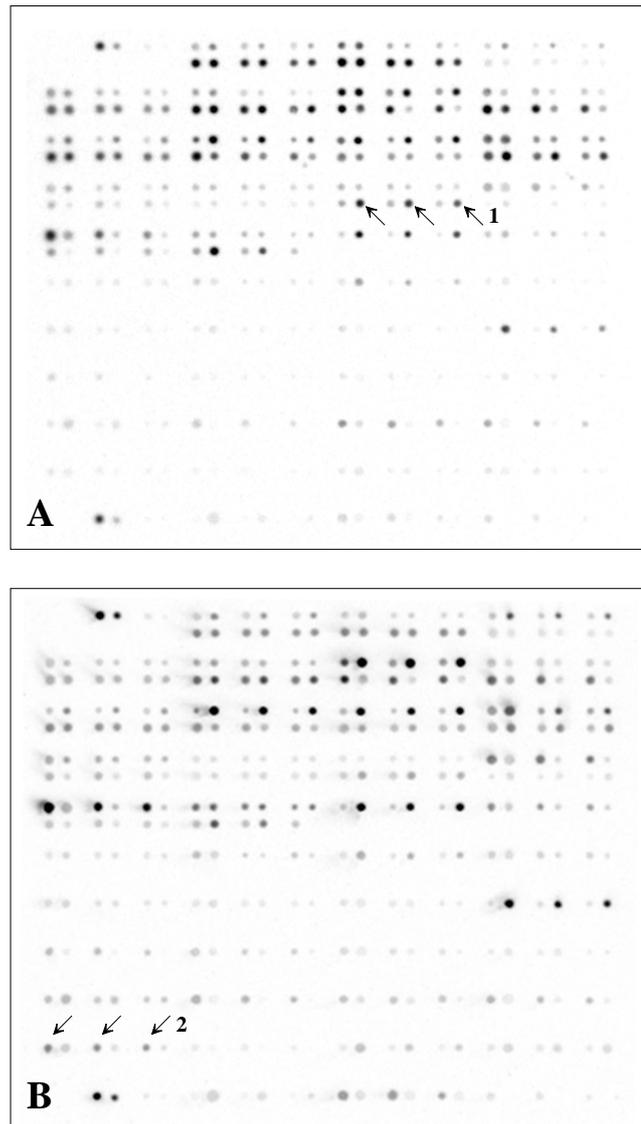
Cyclophilin, auch als Cyclosporin A-bindendes Protein bezeichnet, zeigt eine deutlich höhere Transkription in epidermalen Fragmenten (mittelstark) als im Gesamtblatt (schwach). Dieses Protein der Pathogenabwehr wird durch Pilzinfektionen und abiotischen Streß reguliert. Durch "Northern Blot"-Analysen wurden erhöhte Transkriptmengen an cytosolischem Cyclophilin in Schließzellprotoplasten im Vergleich zu Blattgewebe und Wurzeln von *Vicia faba* detektiert (Kinoshita und Shimazaki, 1999).

Ein cDNA-Klon (St.197) zeigt starke Homologie zu einem prolinreichen Protein StGCPRP ("*S. tuberosum* guard cell Pro-rich protein"), das vor kurzem von Menke et al. (2000) in Schließzellen von Kartoffel gefunden und charakterisiert wurde. In Kartoffel konnte eine hohe Expression in epidermalen Fragmenten sowie eine entwicklungspezifische Expression im Blatt (hoch in jungen, niedrig in reifen Blättern) nachgewiesen werden. Das Transkript StGCPRP wird bei Trockenstreß herunterreguliert und codiert vermutlich ein Protein der Stomata-Zellwand (Menke et al., 2000). In Tabak wird das Transkript St.197 sehr stark in den epidermalen Fragmenten exprimiert, ist jedoch auch im Gesamtblatt mittelstark detektierbar.

Im Blatt werden insbesondere Transkripte, die an der Photosynthese beteiligte Proteine codieren, stärker exprimiert als in den epidermalen Fragmenten (Tab.14). Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten auch Kwak et al. (1997) beim Vergleich von 133 identifizierten ESTs aus Schließzellprotoplasten von *Brassica campestris* mit 128 identifizierten ESTs aus voll entwickelten Blättern von *Zea mays*. Sie stellten fest, daß Proteine, die an Abwehr- oder Streßreaktionen beteiligt sind bzw. Proteine der Signaltransduktion wie Proteinkinasen und -phosphatasen, zahlenmäßig häufiger unter den Schließzell-ESTs (19,5 % bzw. 11,3 %) als unter den Blatt-ESTs (10,9 % bzw. 3,9 %) auftreten. Im Gegensatz dazu wurden Strukturproteine sowie Proteine der Photosynthese häufiger unter den Blatt-ESTs (9,4 % bzw. 7,8 %) als unter den Schließzell-ESTs (2,3 % bzw. 0,7 %) gefunden (Kwak et al., 1997).

Die Ergebnisse der Koloniehybridisierungen konnten durch "reversed Northern"-Analyse bestätigt werden

Durch eine "reversed Northern"-Analyse ("Dot blot") sollte geprüft werden, ob sich die Ergebnisse der differentiellen Genexpression in epidermalen Fragmenten und Gesamtblatt bestätigen lassen. Die cDNA-Plasmid-"Arrays" wurden wie unter 3.6 beschrieben hergestellt.



**Abb.19:** "Reversed Northern"-Filter, hybridisiert mit komplexer cDNA aus epidermalen Fragmenten (A) und Gesamtblatt (B) des Wildtyps. Als Beispiele sind zwei differentiell hybridisierende Plasmide (in drei Verdünnungsstufen) mit Pfeilen markiert. Die Plasmamembran- $H^+$ -ATPase (1) wird stärker in Schließzellen, die Rubisco-Aktivase (2) stärker im Blatt exprimiert.

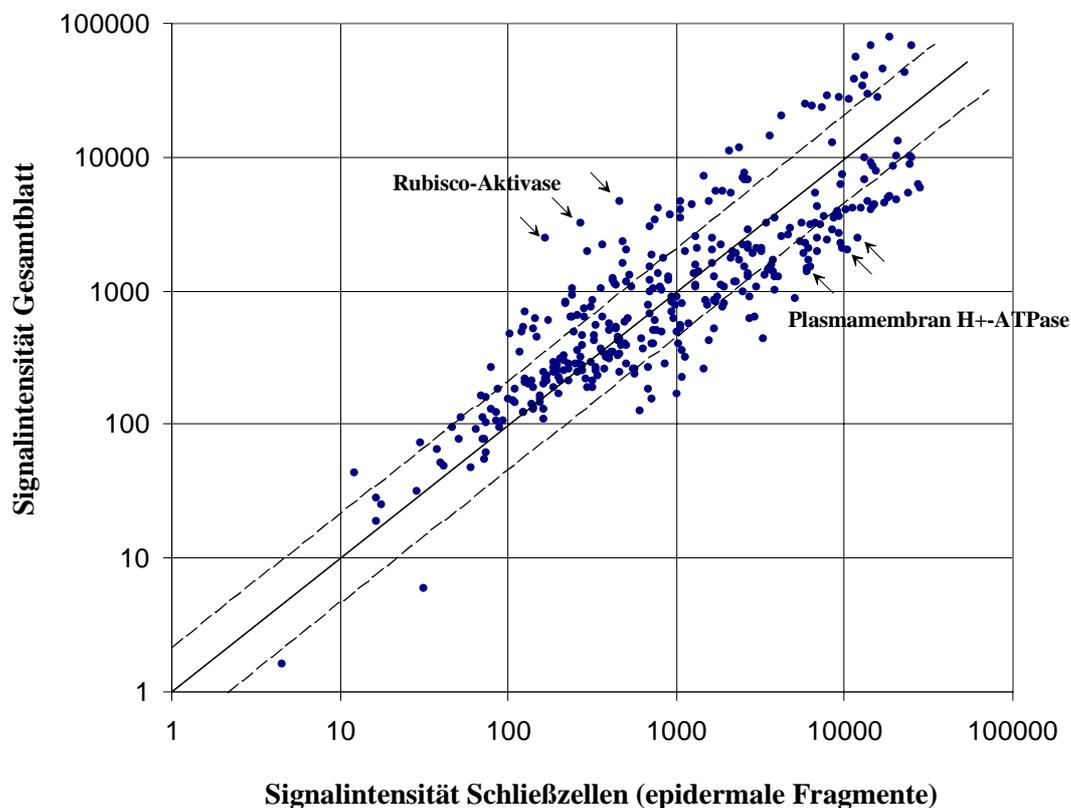
Die Filter enthalten insgesamt 117 cDNA-Plasmide in jeweils zwei ("Leitklone") bzw. drei Verdünnungsstufen. 34 ausgewählte cDNA-Klone der schließzellspezifischen Bank, von denen die überwiegende Anzahl in epidermalen Fragmenten höher exprimiert wird als im Blatt, wurden in diese Untersuchung einbezogen. 40 cDNA-Klone wurden im Zusammenhang mit der Identifizierung von genomischen Blatt-Klonen isoliert (Daten nicht gezeigt). Weitere 43, hauptsächlich im Blatt exprimierte Klone, stammen aus Kooperationen mit anderen Arbeitsgruppen.

Zwei "reversed Northern"-Filter wurden zunächst mit der radioaktiv ( $^{33}\text{P}$ ) markierten komplexen cDNA aus epidermalen Fragmenten des Wildtyps (6/99) hybridisiert (Beispielfilter siehe Abb.19 A). Nach der Entfernung der Sonde durch "Strippen" folgte die Hybridisierung beider Filter mit der zu vergleichenden komplexen cDNA aus dem Gesamtblatt des Wildtyps (6/99; Beispielfilter siehe Abb.19 B).

Die Bilddateien wurden mit Hilfe des " Array Vision " Spoterkennungs- und -auswerteprogrammes analysiert. Die Quantifizierung der Signalintensitäten wurde im Anschluß an die Hintergrundkorrektur und die Anpassung der Hybridisierungsstärken durchgeführt. Sie berücksichtigt die Mittelwerte aus den Signalen der beiden unabhängigen Filter, aus den zwei bzw. drei Verdünnungsstufen und gegebenenfalls verschiedene cDNA-Plasmide, die für das gleiche Protein codieren. Als differentiell wurden Klone klassifiziert, deren Signalintensitäten sich bei Hybridisierung mit komplexer cDNA aus epidermalen Fragmenten und Gesamtblatt um mehr als das Doppelte unterschieden. Von den 117 Klonen wurden 28 (24 %) in den epidermalen Fragmenten und 22 (19 %) im Gesamtblatt stärker exprimiert. Die Ergebnisse sind in Abb.20 und Tab.15 aufgeführt.

In den epidermalen Fragmenten konnten die Ergebnisse der Koloniehybridisierung zum größten Teil bestätigt werden (Metallothionein, Metallothionein-ähnliche Proteine, SENU1, während der Knollenbildung auftretendes Protein, prolinreiches Protein StGCPRP der Schließzelle, Cyclophilin, unbekannte Proteine). Eine signifikant höhere Expression der Myo-Inositol-1-Phosphat-Synthase in den epidermalen Fragmenten konnte nicht bestätigt werden. So wurde in den epidermalen Fragmenten lediglich ein 1,8-fach höheres Signal detektiert. Aufgrund der höheren DNA-Konzentration der einzelnen Plasmide (je nach Verdünnungsstufe ca. 75 bis 300 ng) auf dem "reversed Northern"-Filter im Vergleich zu Koloniefiltern konnten einige differentielle Klone detektiert werden, die auf den Koloniefiltern kein Signal gaben. Die Transkripte der Plasmamembran  $\text{H}^+$ -ATPase, des Calmodulin-ähnlichen sowie H1 Histon-ähnlichen Proteins sind in epidermalen Fragmenten stärker exprimiert als im Gesamtblatt.

Die hohe Expression von Plasmamembran  $H^+$ -ATPasen in Schließzellen ist seit einigen Jahren bekannt. Die hohe Protonenpumpenaktivität befähigt die Schließzellen, schnell auf veränderte Umweltbedingungen zu reagieren (Müller-Röber et al., 1998). Biochemische Untersuchungen an *Vicia faba* ergaben, daß Schließzellen eine 2-fach höhere Protonenpumpenaktivität sowie größere Mengen an  $H^+$ -ATPase-Protein aufweisen als Mesophyllzellen (Becker et al., 1993). Auf Transkriptionsebene konnte sogar eine 15-fach höhere Transkriptmenge einer Plasmamembran- $H^+$ -ATPase in Schließzellprotoplasten von *Vicia faba* im Vergleich zu Mesophyllprotoplasten gezeigt werden (Nakajima et al., 1995).



**Abb.20:** Zweidimensionale logarithmische Repräsentation der Signalintensitäten des "reversed Northern". Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus zwei Filtern. Die Datenpunkte außerhalb der gestrichelten Linien veranschaulichen eine mehr als zweifach höhere Expression. Als Beispiele sind die Datenpunkte (jeweils drei Verdünnungsstufen) für die Rubisco-Aktivase (12,5-fach stärkere Expression im Blatt) und für die Plasmamembran  $H^+$ -ATPase (4,2-fach stärkere Expression in epidermalen Fragmenten) gekennzeichnet.

**Tab.15:** Gene, deren Transkriptmengen in epidermalen Fragmenten und Gesamtblatt deutliche Unterschiede aufweisen (Mittelwerte aus den Signalintensitäten von \*zwei bzw. \*\*vier Plasmiden).

Höhere Expression in epidermalen Fragmenten		Höhere Expression im Gesamtblatt	
SENU1	2,6-fach**	Chlorophyll a/b-bindende Proteine	
während der Knollenbildung auf-tretendes Protein	3,8-fach*	Cab 21	4,0-fach*
Metallothionein	2,1-fach	Cab 13	3,7-fach
Metallothionein-ähnliches Protein (Typ 3)	4,1-fach	photosynthetisches, Sauerstoff-entwickelndes Protein	
Cyclophilin	2,1-fach	23 kDa-Polypeptid	2,9-fach
Calmodulin-ähnliches Protein	2,1-fach	16 kDa-Einheit	3,6-fach*
Plasmamembran H <sup>+</sup> -ATPase	4,2-fach	33 kDa-Einheit	3,2-fach
Histon H1C	4,0-fach	kleine UE Rubisco	4,6-fach
prolinreiches Protein StGCPRP Schließzelle	2,2-fach	Rubisco-Aktivase	12,5-fach
Thioredoxin	2,6-fach	nuklear codierte Chloroplasten-proteine	
mitochondriell codierte 26S rRNA	4,9-fach*	CP12	2,3-fach
Chloroplasten-Gen für 23S rRNA	2,8-fach*	PsbY-Vorstufe	5,2-fach
Germin-ähnliches Protein	2,4-fach	PsaL UE des Photosystems I	4,3-fach
Transkriptionsaktivator	2,1-fach	plastidäre Aldolase	2,3-fach*
Cellulase	3,9-fach	Fruktose-1,6-biphosphat-1-Phosphatase	4,1-fach
mitochondrieller ADP/ATP-Translokator	4,0-fach	ATP Citrat-Lyase	2,4-fach
unbekanntes Protein (Gruppe 1)	3,5-fach*	Hydroxymethylglutaryl CoA-Reduktase	3,7-fach
unbekanntes Protein (Gruppe 2)	3,2-fach*	Protochlorophyllid-Oxidoreduktase	3,1-fach
unbekanntes Protein	2,9-fach	5-Epi-Aristolochen-Synthase	3,4-fach
unbekanntes Protein	2,8-fach	cytosolische Cu/Zn-Superoxid-dismutase	3,8-fach
		SAR 8.2	3,6-fach
		unbekanntes Protein	5,3-fach

Calmodulin-ähnliche (Calcium-bindende) Proteine sind an der Signaltransduktion von Calcium-vermittelten Prozessen beteiligt und vermitteln hier die Kontrolle einer großen Anzahl von Enzymen wie Proteinkinasen und -phosphatasen durch Calcium.

Ein 4,0-fach höher exprimierter Klon, codierend für Histon H1C aus Tabak (Przewloka et al., unveröffentlicht) weist Homologien zu streßinduzierbaren H1-Histonen von *Arabidopsis* und Tomate auf. Die Transkripte aus *Lycopersicon pennellii* sind konstitutiv in den Wurzeln exprimiert und unterliegen in den Blättern circadianen Expressionsschwankungen mit einem Minimum in den Morgenstunden. In den oberirdischen Pflanzenteilen kann die Expression durch Trockenstreß und ABA induziert werden (Wei und O'Connell, 1996).

Weiterhin konnten unter den zusätzlich auf dem "reversed Northern"-Filter vorhandenen Plasmiden einige detektiert werden, die in epidermalen Fragmenten ein deutlich höheres Signal gaben. Wie aus dem hohen Energiebedarf der Schließzellen und dem häufigen Vorkommen von Mitochondrien zu erwarten war, wurde mitochondriell codierte rRNA sowie ein mitochondrieller ADP/ATP-Translokator (nuklear codiert) detektiert. Ein Klon weist Homologien zu einem Germin-ähnlichen Protein (Saglp) aus der Langtagpflanze *Sinapis alba* auf (Heintzen et al., 1994). Das Transkript wird in der Epidermis und dem Schwammparenchym junger Blätter sowie in verschiedenen Regionen der Epidermis und der Rinde der Stengel und Blattstiele exprimiert. Es unterliegt zyklischen Schwankungen und wird mit primären Zellwänden assoziiert (Heintzen et al., 1994). Weiterhin konnte in den epidermalen Fragmenten eine höhere Expression von Transkripten mit Homologie zu einem Transkriptionsaktivator (*N.tabacum*, Estruch et al., 1994), einem Thioredoxin, einer Cellulase und überraschenderweise zu chloroplastidär codierter rRNA festgestellt werden. Im Blatt konnte vor allem eine signifikant höhere Expression von Genen, codierend für chloroplastidäre Proteine und Proteine des Photosyntheseapparates sowie des Schlüsselenzyms der Chlorophyllbiosynthese Protochlorophyllid-Oxidoreduktase, festgestellt werden. Weiterhin sind Transkripte, codierend für Enzyme des Primärstoffwechsels (FBPase, Aldolase, ATP Citrat-Lyase) und Sekundärstoffwechsels (Hydroxymethylglutaryl CoA-Reduktase), höher exprimiert als in epidermalen Fragmenten. Im Blatt werden außerdem drei Gene, codierend für Proteine, die an der Abwehr von oxidativem Streß (Cu/Zn-Superoxiddismutase), Pathogenstreß (SAR 8.2, beteiligt an der systemisch erworbenen Resistenz) und an der Phytoalexinsynthese (5-Epi-Aristolochen-Synthase) beteiligt sind, stärker exprimiert. Die höhere Expression eines Transkriptes codierend für ein Tumorproteinhomologes im Blatt (vgl. Tab.14) konnte nicht bestätigt werden.

#### **4.2.8 Untersuchung des Einflusses der Langzeitbehandlung mit ABA auf die Genexpression in Schließzellen mit Hilfe der geordneten cDNA-Bank**

Bei den vergleichenden Hybridisierungsstudien mit den genomischen Filtern wurde festgestellt, daß in ABA-behandelten epidermalen Fragmenten etwa die fünffache Menge an Klonen im Vergleich zu wasserbehandelten epidermalen Fragmenten nachweisbar exprimiert werden (siehe 4.2.3.2). Von Nachteil ist die aufwendige Analyse und Identifizierung der Cosmidklone. Daher sollte auch die schließzellspezifische cDNA-Bank

zur Untersuchung des Einflusses der Langzeitbehandlung mit Abscisinsäure auf die Genexpression in transgenen RA-Pflanzen und Wildtyppflanzen eingesetzt werden. Zu diesem Zweck wurden die cDNA-Filter mehrfach mit den komplexen cDNAs aus den epidermalen Fragmenten von ABA-behandelten RA 27 und SNN (6/98) hybridisiert. Der erste Vergleich wurde mit den Hybridisierungsmustern RA (Wasser) 6/98 und RA (ABA) 6/98 durchgeführt. Es konnten 96 durch die Langzeitbehandlung mit ABA beeinflusste Klone detektiert werden, davon wurden 49 induziert und 47 gehemmt. Anschließend wurde die Expression dieser Klone in Hybridisierungen mit unabhängigen komplexen cDNAs, wasser- (6/98, 6/99) sowie ABA-behandelt (6/98), aus RA 27 und Wildtyp analysiert. In weitere Untersuchungen wurden ausschließlich Klone einbezogen, die in allen unabhängigen komplexen Hybridisierungen, sowohl in den transgenen RA-Pflanzen als auch in Wildtyppflanzen, vergleichbare differentielle Expressionshöhen zeigten (ca. 1/4 der Klone). Auf den cDNA-Filtern konnten lediglich 19 durch Abscisinsäure induzierbare und 5 hemmbare Klone reproduzierbar detektiert werden (Tab.16).

**Tab.16:** Identifizierung der durch Langzeitbehandlung mit Abscisinsäure in den epidermalen Fragmenten induzierten bzw. gehemmten Transkripten.

Redundanz der Klone bzw. Stränge von Klonierungsartefakten	Homologie zu
<b>durch ABA induzierte Klone</b>	
4	plastidäre Aldolase ( <i>Nicotiana paniculata</i> )
2	Polyubiquitin (U4, <i>N.tabacum</i> ; Ubi11, <i>N.sylvestris</i> )
2	Austrocknungsstreß-Protein DSP-22 ( <i>Craterostigma plantagineum</i> )
3	Rekombinationspunkt zwischen T-DNA und Pflanzen-DNA ( <i>N.tabacum</i> )
2	unbekannt (identisch)
7	unbekannt (keine Homologien untereinander)
<b>durch ABA gehemmte Klone</b>	
1	Cab 40 ( <i>N.tabacum</i> )
1	kleine UE Rubisco (S41, <i>Nicotiana sylvestris</i> )
1	Cyclophilin ( <i>Solanum tuberosum</i> )
2	unbekannt (keine Homologien untereinander)

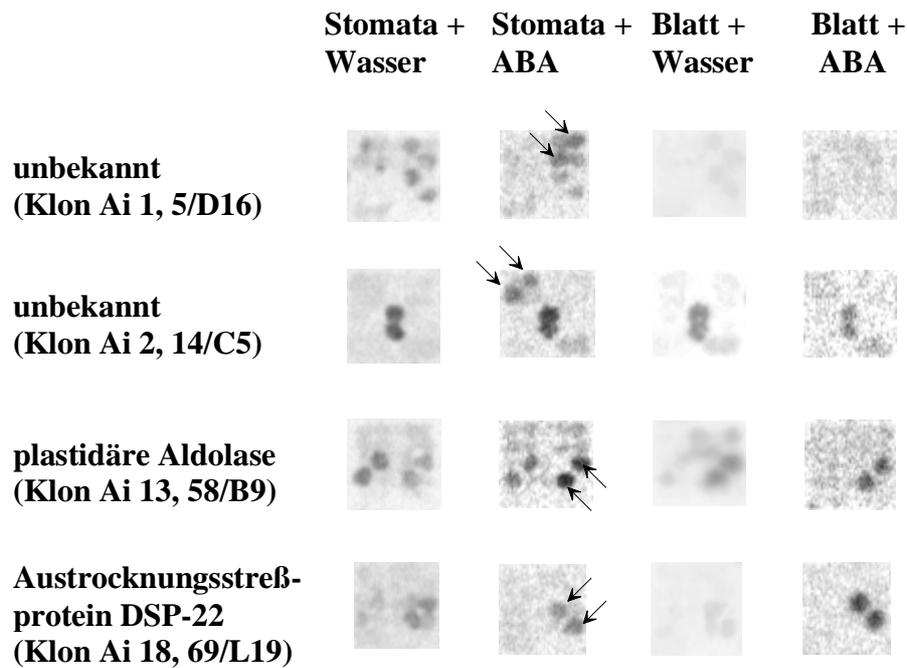
Die geringe Anzahl durch ABA induzierbarer Transkripte auf dem cDNA-Filter ist darauf zurückzuführen, daß die schließzellspezifische Bank aus der cDNA unbehandelter Tabakpflanzen hergestellt wurde. Der überwiegende Teil der ABA-induzierbaren Klone ist somit in dieser Bank bzw. unter den 27.000 cDNA-Transkripten nicht enthalten. Für weitere Untersuchungen der durch Langzeitbehandlung mit ABA induzierbaren Transkripte müßte eine zweite cDNA-Bank aus ABA-behandelten epidermalen Fragmenten hergestellt werden.

Unter den unbekanntem, durch ABA induzierten Transkripten sind doch einige schließzellspezifische zu finden (z.B. Abb.21, Klone Ai 1 und 2). Von den acht unbekanntem, in Schließzellen durch ABA heraufregulierten Klonen können lediglich drei auch im Blatt durch ABA induziert werden.

Vier der durch Langzeitbehandlung mit ABA induzierten Klone, die im wasserbehandelten Blatt deutlich stärker als in epidermalen Fragmenten detektierbar sind (siehe auch Tab.15 ), wurden als plastidäre Aldolase identifiziert (z.B. Abb.21, Klon Ai 13). Eine mögliche Induktion der plastidären Aldolase (Fruktose-1,6-biphosphat-Aldolase), einem Schlüsselenzym des Calvin-Zyklus, durch ABA wurde bisher noch nicht beobachtet. Die plastidäre Aldolase besitzt keine bekannten regulatorischen Eigenschaften und scheint somit unbedeutend für die Kontrolle des Stoffwechsels und des Wachstums zu sein. Eine "Antisense"-Expression des Gens der plastidären Aldolase in Kartoffel, resultierend in geringen Änderungen der Enzymaktivität, brachte jedoch eine Hemmung der Photosynthese und des Wachstums mit sich (Haake et al., 1998).

Wie aus der Funktion der Abscisinsäure als Streßvermittler zu erwarten war, wurden ABA-induzierbare Klone gefunden, die an pflanzlichen Streßantworten beteiligt sind.

Zwei Klone, im wasserbehandelten Blatt etwa gleich stark detektierbar wie in Schließzellen, codieren für zwei verschiedene Polyubiquitin-Gene. Ubiquitine sind unter anderem am Abbau zellulärer Proteine und an der Regulation der Genexpression beteiligt. Die verschiedenen Mitglieder der Polyubiquitin-Genfamilie können unabhängig voneinander als Antwort auf veränderte Umweltbedingungen (z.B. Licht, Hitzeschock und andere Streßsituationen) reguliert werden (Sun und Callis, 1997).



**Abb.21:** Expressionsanalyse vier ausgewählter ABA-induzierbarer cDNA-Klone. Die Koloniefilter wurden mit komplexer cDNA aus wasser- bzw. ABA-behandelten Schließzellen und Blatt hybridisiert.

Weiterhin wurden zwei (nicht identische) Klone gefunden, die Homologien zu einem Gen DSP-22 aus *Craterostigma plantagineum* (Bartels et al., 1992) aufweisen, das als Antwort auf Austrocknungsstreß exprimiert wird. Dieses Transkript wird sowohl in den Schließzellen als auch im Gesamtblatt durch die Langzeitbehandlung mit ABA induziert (Abb.21, Klon Ai 18). Das nuklear codierte Protein ist in der Thylakoidmembran der Chloroplasten lokalisiert und hier vermutlich am Schutz des Photosyntheseapparates bei Trockenstreß beteiligt. Die durch ABA vermittelte Genaktivierung führte ausschließlich unter Lichteinfluß zu einer Anreicherung des Transkriptes (Bartels et al., 1992).

Einige Metallothioneine sind durch ABA induzierbar, wie erstmals von Kawashima et al. (1992) während der Embryogenese von Weizen gezeigt wurde. Beim Vergleich der Genexpressionsmuster von unbehandelten sowie ABA-langzeitbehandelten Wildtyp- und transgenen Tabakpflanzen konnte kein Einfluß auf die Transkripte der Metallothionein-ähnlichen Proteine beobachtet werden.

Zwei der durch ABA gehemmten Klone wurden als Cab 40 und kleine UE Rubisco (S41) identifiziert. Die negative Regulation der Genexpression von Cab-Proteinen und der

kleinen Untereinheiten Rubisco auf Transkriptionsebene durch Wasserstreß und exogene ABA wurde bereits von Bartolomew et al. (1991) in Tomate gezeigt.

Ein weiterer hemmbarer Klon enthält ein Insert codierend für ein Cyclophilin. Im Gegensatz zu diesem Ergebnis wurde kürzlich die Induktion verschiedener Cyclophiline als Antwort auf Kälte, hormonalen (ABA) und osmotischen Streß in proembryogenen Massen von *Digitalis lanata* festgestellt (Küllertz et al., 1999).

Weiterführende Arbeiten sollen sich mit der Reproduzierbarkeit und Quantifizierung dieser Ergebnisse durch "reversed Northern"-Analysen befassen.

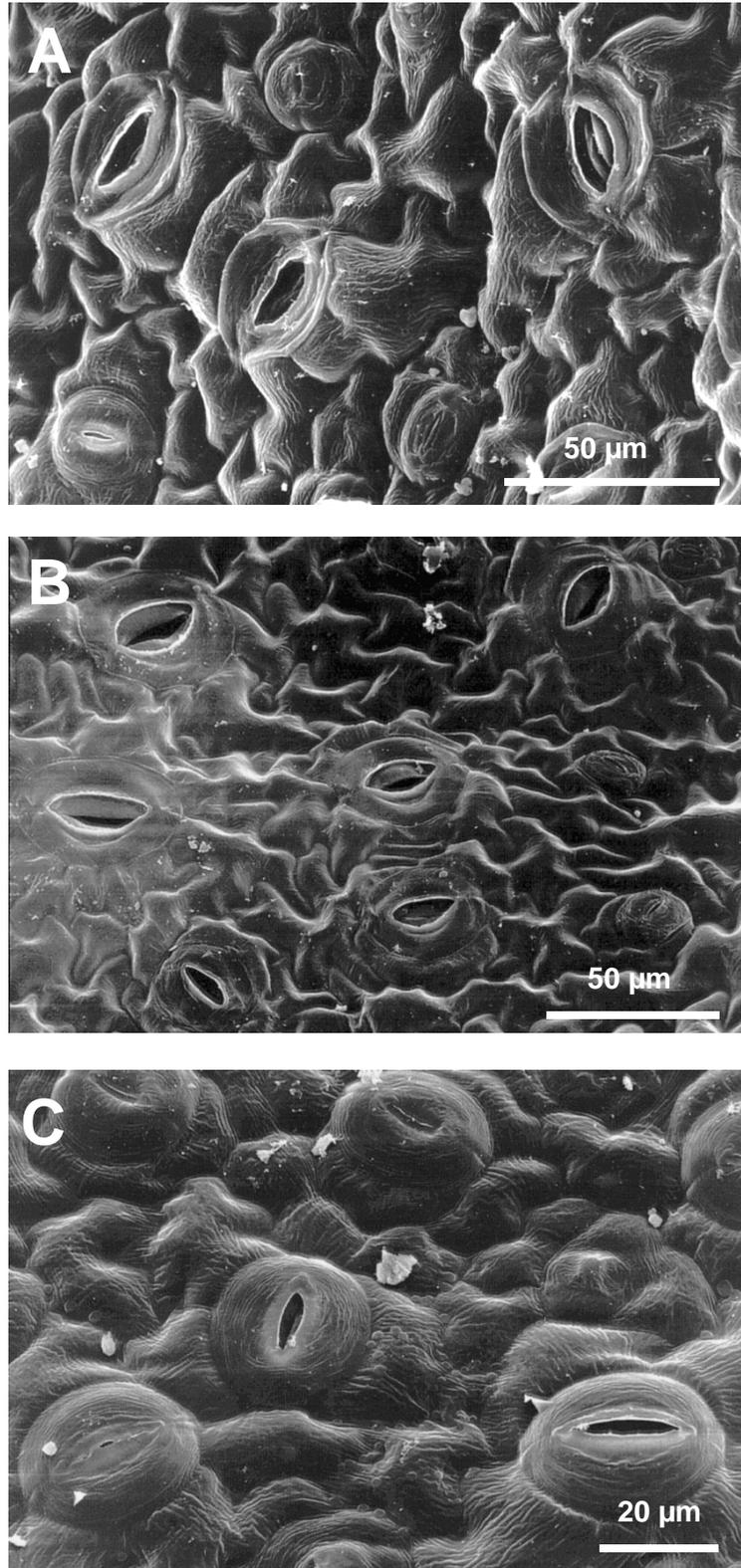
#### **4.3 Die Morphologie der Schließzellen ist in den RA-Pflanzen verändert**

In Kooperation mit W. Hartung (Universität Würzburg) wurden die Blattoberflächen wasserbehandelter Wildtyppflanzen sowie wasser- und ABA-behandelter transgener RA 27 rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Die Blattproben wurden zunächst in einer Mischung aus Ethanol, Formalin und Eisessig (90:5:5) fixiert und das Wasser in einer Ethanolreihe entfernt. Die getrockneten Proben wurden mit Gold beschichtet ("Besputterung") und in einem Zeiss DSM 962 -Rasterelektronenmikroskop analysiert.

Im Gegensatz zum Wildtyp zeigen die Schließzellen von RA 27 eine von der Norm abweichende Morphologie. In vielen Fällen sind die Stomata asymmetrisch, wobei eine der beiden Schließzellen deutlich kleiner ist als die andere. Sehr oft weist die Zentralöffnung zwischen den beiden Schließzellen eine dreieckige Form auf (Abb.22 A). Solche Spaltöffnungen scheinen ständig geöffnet zu sein, ein Stomataschluß ist aus strukturellen Gründen verhindert.

Werden die RA-Pflanzen jedoch während ihrer gesamten Entwicklungsperiode mit ABA behandelt, so entwickeln sich normale, funktionsfähige Stomata (Abb.22 B).

Die Änderungen der ABA-Verteilung in den Zellen, hervorgerufen durch die Expression des Antikörpers im ER, bewirkt strukturelle Veränderungen in den sich entwickelnden Schließzellen, die eine normale Funktion der Spaltöffnungen verhindern.



**Abb.22:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Blattoberflächen von transgenen anti-ABA scFv immunmodulierten Pflanzen (RA 27; A), von sechs Wochen mit ABA behandelten transgenen RA 27-Pflanzen (B) sowie Wildtyppflanzen (C) (Wigger et al., in Vorbereitung).

## 5. Diskussion

Die Akkumulation von hohen Konzentrationen an anti-ABA scFv-Antikörpern im ER von immunglobulintransgenen Tabakpflanzen (RA-Pflanzen) führt zur Blockierung der endogenen Abscisinsäure. In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß der dadurch hervorgerufene welkende Phänotyp der RA-Pflanzen durch tägliches Besprühen mit 50 µM ABA über den gesamten Zeitraum der Pflanzenentwicklung hinweg dem Wildtyp angeglichen werden kann. Es wurde festgestellt, daß der behinderte Stomataschluß auf einer veränderten Schließzellmorphologie beruht, die durch die Langzeit-ABA-Behandlung normalisiert werden kann. Die Mechanismen der Immunmodulation und der Normalisierung wurden auf Transkriptionsebene durch vergleichende Hybridisierungsstudien mit einer geordneten genomischen und einer schließzellspezifischen cDNA-Bank untersucht. Durch die Umverteilung der endogenen Abscisinsäure in den RA-Pflanzen werden Effekte hervorgerufen, die sich jedoch in voll entwickelten Pflanzen unter den häufigen und mittelhäufigen Transkripten nicht erfassen lassen.

In den folgenden Kapiteln sollen die Wirkungsweise der anti-ABA scFv-Antikörper und die daraus resultierende Modulation der ABA-Wirkungen hinsichtlich der Stomatabewegung diskutiert werden. Abscisinsäure scheint für die Entwicklung funktionsfähiger Schließzellen notwendig zu sein. Es ist jedoch noch unklar, zu welchem Zeitpunkt ABA in den Schließzellentwicklungsprozeß eingreift und welche Vorgänge dabei reguliert werden.

### 5.1 RA-Pflanzen weisen einen spezifischen, morphologisch und physiologisch veränderten Phänotyp auf

Die untersuchten transgenen Tabakpflanzen reichern den anti-ABA scFv-Antikörper in hohen Konzentrationen bis zu 6,8 % TSP (Artsaenko et al., 1995; Fiedler et al., 1997; Tab.2 und 4) im ER an. Die Expression des Antikörpers in nahezu allen Zelltypen des Blattes unterliegt der Kontrolle des ubiquitären CaMV 35S-Promotors. Die RA-Pflanzen wurden umfassend biochemisch, morphologisch und physiologisch untersucht.

Neben einem langsameren Wachstum weisen die RA-Pflanzen eine veränderte Morphologie mit verringerter Apikaldominanz, sproßbürtigen Wurzeln und schmaleren, gewellten Blättern auf. Die Blattseneszenz ist verzögert, die meisten der

hochexprimierenden RA-Pflanzen sind steril oder produzieren weniger Samen als Wildtyppflanzen (Artsaenko, 1996).

Die Akkumulation des spezifischen anti-ABA scFv-Proteins in hohen Konzentrationen im ER der Zellen transgener Pflanzen führte zur Ausbildung eines welkenden Phänotyps (Artsaenko et al., 1995), der umfassend physiologisch charakterisiert wurde. Eine typische Eigenschaft ist die im Vergleich zum Wildtyp höhere stomatäre Leitfähigkeit (Artsaenko et al., 1995; Artsaenko et al., 1999; Tab.2 und 4), die nicht mehr von der Kohlendioxidkonzentration (Artsaenko et al., 1995; Abb.4 A) und der Lichtintensität (Abb.4 B) abhängig ist. Aufgrund eines morphologischen Defektes der Schließzellen (Abb.22 A) sind die transgenen Pflanzen nicht mehr in der Lage, ihre Spaltöffnungen zu schließen. Der Stomataschluß kann weder durch eine kurzfristige ABA-Gabe (Abb.6 A) noch durch hohe CO<sub>2</sub>-Konzentrationen (Abb.4 A) oder Verdunkelung (Abb. 4 B) induziert werden.

Obwohl die RA-Pflanzen typische Symptome für ABA-Mangel zeigen, besitzen sie 2- bis 16-fach höhere ABA-Gehalte als Wildtyppflanzen (Artsaenko et al., 1995; Tab.2 und 4; Abb.5).

## **5.2 Die Behinderung des Stomataschlusses in den RA-Pflanzen ist auf die Wirkung des anti-ABA-Einzelkettenantikörpers zurückzuführen**

Der anti-ABA scFv-Antikörper weist eine hohe Bindungsaffinität gegenüber freier ABA auf, wie in einem kompetitiven ELISA durch die Bestimmung der Affinitätskonstante nachgewiesen werden konnte (Artsaenko et al., 1995).

In die Behandlungsexperimente mit ABA wurden neben den zu untersuchenden anti-ABA immunglobulintransgenen Pflanzen (RA 5/1, RA 6/7 bzw. RA 27) stets Kontrollpflanzen (Wildtyp SNN und anti-Oxazolone scFv-transgene Pflanzen UF) einbezogen. UF-Pflanzen akkumulieren einen Einzelkettenantikörper gegen das Hapten Phenyloxazolone in hohen Konzentrationen in den Blättern (Fiedler et al., 1997). Oxazolone kommt nicht in Pflanzengewebe vor, daher ist kein physiologischer Einfluß zu erwarten (Fiedler und Conrad, 1995). Durch die Integration dieser transgenen Kontrollpflanzen in die Untersuchungen können unspezifische Einflüsse, hervorgerufen durch die Anreicherung eines Antikörpers im ER, ausgeschlossen werden.

Bei den RA-Pflanzen kann durch kurzfristige ABA-Gabe über die Blattstiele der Stomataschluß nicht mehr induziert werden. Im Gegensatz dazu zeigen UF-Pflanzen, ebenso wie

der Wildtyp, ein normales stomatäres Verhalten (Abb.6). Die Transpirationsraten sind nicht erhöht, sie entsprechen denen von Wildtyppflanzen (Daten nicht gezeigt). RA-Pflanzen besitzen im Vergleich zum Wildtyp bis zu 16-fach höhere Gesamt-ABA-Konzentrationen, die bei Langzeitbehandlung mit ABA weiterhin ansteigen (Tab.2 und 4; Abb.5). Dagegen weisen mit Wasser bzw. ABA behandelte UF-Pflanzen ähnliche ABA-Werte wie Wildtyppflanzen auf (Tab.2, Pflanzen 9/13 und 9/38).

Es gibt weitere Hinweise darauf, daß die morphologischen und physiologischen Effekte in den RA-Pflanzen auf den anti-ABA-Antikörper zurückzuführen sind. So konnte bei der Untersuchung verschiedener RA-Linien eine Korrelation zwischen der Expressionshöhe des scFv-Proteins und dem morphologischen Erscheinungsbild bzw. der Wachstumsgeschwindigkeit der Pflanzen beobachtet werden. Ebenso korrelieren die Transpirationsraten mit der Expressionshöhe, nur hochexprimierende Pflanzen (>1 % TSP) sind überempfindlich gegenüber Wasserstreß und welken bei normaler Luftfeuchtigkeit (Artsaenko, 1996). Hochexprimierende anti-Oxazolon transgene Tabakpflanzen hingegen entsprechen morphologisch und physiologisch dem Wildtyp.

Diese Ergebnisse sprechen gegen eine Beeinflussung der Entwicklung und des physiologischen Verhaltens der Pflanzen durch die Expression eines beliebigen scFv-Antikörpers im ER. Damit wird die spezifische Wirkung des anti-ABA scFv-Antikörpers *in vivo* bestätigt.

### **5.3 Mechanismen der Modulation von ABA-Wirkungen durch das anti-ABA scFv-Protein**

#### Kompartimentspezifität

Intrazellulär ist das anti-ABA scFv-Protein im Lumen des ER und in der Kernmembran lokalisiert (Artsaenko et al., 1995). Der Transport des Einzelkettenantikörpers in das endoplasmatische Retikulum wird durch das N-terminal angefügte Legumin-Signalpeptid ermöglicht, die C-terminale KDEL-Region bewirkt die Retention im ER (Artsaenko et al., 1995).

Im Gegensatz zu ABA-Mangelmutanten, bei denen verschiedene Schritte des ABA-Biosyntheseweges blockiert sind, bindet der Antikörper in den transgenen Pflanzen direkt an das ABA-Molekül. Während der Blattentwicklung der RA-Pflanzen ändert sich durch die Bindung an den Antikörper die intrazelluläre Verteilung der ABA. Da die protonierte Form

der Abscisinsäure leicht Biomembranen durchdringen kann (Hartung und Slovik, 1991), ist eine Abnahme der ABA-Konzentration in anderen zellulären Kompartimenten, einschließlich des Cytosols, zu erwarten (Artsaenko et al., 1995). Wie aus Untersuchungen der Struktur-Funktions-Beziehungen im ABA-Molekül (Walton, 1983) und der Epitopspezifität des parentalen Antikörpers des scFv-Proteins (Walker-Simmons et al., 1991; Artsaenko et al., 1999) hervorgeht, ist vermutlich die biologische Aktivität der Abscisinsäure durch die Bindung an den Antikörper gehemmt.

#### ABA-Synthese und -Metabolismus

Es wird vermutet, daß die ABA-Synthese und / oder der ABA-Metabolismus ebenfalls in den transgenen Pflanzen beeinflusst ist. Die RA-Pflanzen besitzen bis zu 16-fach höhere ABA-Werte als Wildtyppflanzen (Tab.2 und 4; Abb.5). Durch die Bindung an den Antikörper könnte die "Feedback"-Regulation der ABA-Synthese und / oder der ABA-Katabolismus gestört sein (Artsaenko et al., 1999).

Der erste Schritt des oxidativen ABA-Abbaus ist die Hydroxylierung der 8' Methylgruppe durch eine Cytochrom-P450-Monooxygenase ([+]-ABA 8'-Hydroxylase). Diese Hydroxylase ist in den Membranen cytosolischer Vesikel lokalisiert und wird durch ihr eigenes Substrat induziert (Übersicht bei Cutler und Krochko, 1999). In Wildtyppflanzen steigt der ABA-Gehalt während der ersten sechs Woche der ABA-Behandlung an und sinkt nach neun Wochen wieder ab (Tab.4; Abb.5). Durch die hohen ABA-Gehalte könnte die [+]-ABA 8'-Hydroxylase und somit der oxidative ABA-Abbau induziert werden. In den transgenen Pflanzen ist die Abscisinsäure durch die Bindung an den Antikörper und / oder ihre Akkumulation im ER vor Abbau geschützt. Außerdem könnte die Anreicherung hoher Konzentrationen von anti-ABA-Einzelkettenantikörpern im ER der transgenen Pflanzen die Aktivität der ABA-Hydroxylierung beeinflussen.

#### Kurzzeit- und Langzeitbehandlungsexperiment

Um das Phänomen des behinderten Stomataschlusses in den transgenen Pflanzen zu erklären, wurde von Artsaenko (1996) eine Hypothese aufgestellt. Diese besagt, daß durch die Bindung der ABA an den im ER lokalisierten Antikörper der Transport und die Interaktion der Abscisinsäure mit den (hypothetischen) ABA-Rezeptoren in den Schließzellen verhindert wird. Um diese Hypothese zu testen, wurde ein Kurzzeitbehandlungsexperiment durchgeführt. Abscisinsäure wurde den Blättern transgener RA-Pflanzen sowie Kontrollpflanzen über die Blattstiele zugeführt, um die durch den Antikörper im ER

gebundene ABA zu komplementieren. In diesem Experiment konnte jedoch in den RA-Pflanzen, im Gegensatz zu den Kontrollpflanzen, kein Stomataschluß induziert werden (Abb.6 A). Somit ist der behinderte Spaltöffnungsschluß nicht unmittelbar auf die Inaktivierung von Abscisinsäure in den voll entwickelten Schließzellen durch den Antikörper zurückzuführen.

Durch das tägliche Besprühen der transgenen Pflanzen mit 50  $\mu\text{M}$  ABA-Lösung über 6 bis 8 Wochen hinweg können jedoch die Morphologie der Schließzellen (Abb.22 B) sowie das physiologische Verhalten der RA-Pflanzen vollständig normalisiert werden. Die Abhängigkeit der stomatären Leitfähigkeit von der Kohlendioxidkonzentration und ebenso von der Lichtintensität wird komplett wiederhergestellt (Abb.4). Das Schließen der Spaltöffnungen kann nun auch durch die kurzfristige ABA-Gabe über die Blattstiele wieder induziert werden (Abb.6 B).

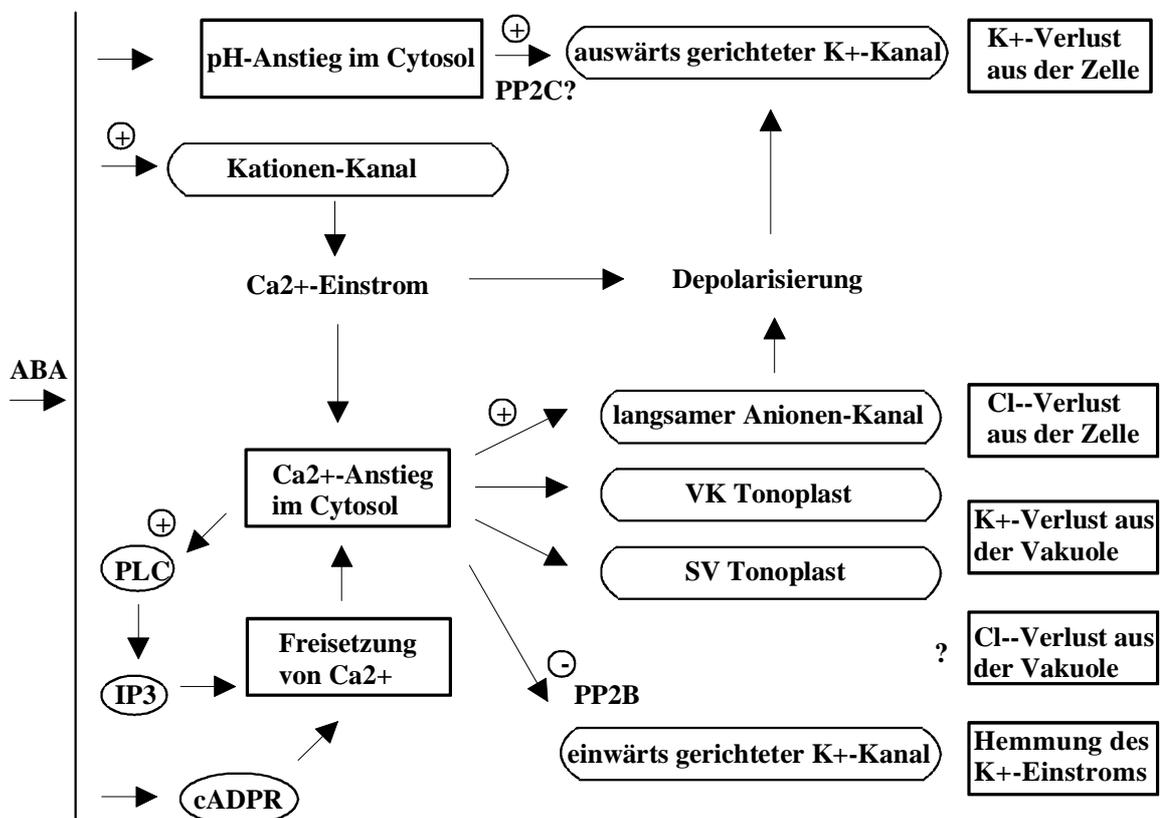
Berechnungen der theoretisch freien ABA-Konzentrationen zeigen, daß sowohl in wasserbehandelten als auch in langfristig mit ABA besprühten RA-Pflanzen theoretisch die gesamte verfügbare Abscisinsäure vom Antikörper im ER gebunden werden kann (Tab.2 und 4; Abb.7). Trotzdem kann durch die Langzeitbehandlung mit ABA eine Komplementierung des welkenden Phänotyps erreicht werden. Daraus resultierend, muß die regelmäßig zugeführte ABA auf dem Weg von der Blattoberfläche über den Apoplasten zum hypothetischen ABA-"sink" im ER, dem Anreicherungsort des Antikörpers, wirken. Die Umverteilung der ABA während der Pflanzenentwicklung, hervorgerufen durch die Bindung an das im ER lokalisierte scFv-Protein, könnte zu einer Änderung im Gentranskriptionsprogramm speziell in den Schließzellen oder in deren Vorläuferzellen führen. Diese Änderungen auf Transkriptionsebene führen zu strukturellen Änderungen der Schließzellen und könnten zum anderen den Verlust der ABA-Sensitivität des Signaltransduktionssystems der Schließzellen zur Folge haben.

#### Signaltransduktion in Schließzellen

Spaltöffnungsbewegungen werden als Antwort auf verschiedene Umweltsignale durch Turgoränderungen, ausgelöst durch Ionenflüsse in den Membranen von Schließzellen, hervorgerufen. Abscisinsäure, hohe Kohlendioxidkonzentrationen und Verdunkelung gehören zu den Signalen, die den Stomataschluß induzieren können. In den anti-ABA immunmodulierten Pflanzen kann das Schließen der Spaltöffnungen jedoch weder durch die kurzfristige Gabe von ABA über die Blattstiele (Abb.6 A), noch durch erhöhte  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen oder Verdunkelung ausgelöst werden (Abb.4 A und B).

Der bisherige Kenntnisstand zur Signaltransduktion und zu Ionenkanälen in Schließzellen resultiert vorwiegend aus elektrophysiologischen Studien (z.B. "Patch-Clamping" von Membranen), aus der Verwendung von fluoreszenten Farbstoffen zur Messung von  $\text{Ca}^{2+}$ - und pH-Wert -Änderungen sowie aus "Tracer-Flux"-Studien.

Es sind  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige und -unabhängige Wege der Signaltransduktion bekannt, verschiedene Proteinphosphatasen und -kinasen sind für die Regulation der Kanalaktivitäten von Bedeutung. Mögliche Signalwege zwischen der Abscisinsäure und Ionenkanaländerungen, die zum Stomatenschluß beitragen, sind in Abb.23 dargestellt.



**Abb.23:** Vermutete Wege der ABA-Signaltransduktion, die zum Stomatenschluß beitragen. PP2B bzw. PP2C: Proteinphosphatase 2B bzw. 2C, PLC: Phospholipase C,  $\text{IP}_3$ : Inositol-1,4,5-Triphosphat, cADPR: zyklische ADP-Ribose, VK: spannungsunabhängiger  $\text{K}^+$ -Kanal, SK: langsamer Anionenkanal (nach MacRobbie, 1998).

Neuere Untersuchungen zeigen die Beteiligung der Farnesyltransferase (Pei et al., 1998) und der Phospholipase D (Jacob et al., 1999) an der ABA-vermittelten Signaltransduktion in Schließzellen. Weiterhin konnte die Regulation der langsamen Anionenkanäle der Plasmamembran durch eine schließzellspezifische, ABA-aktivierte Serin-Threonin-Proteinkinase (AAPK) nachgewiesen werden (Li et al., 2000).

Über den Prozeß des Stomataschlusses durch hohe Kohlendioxidkonzentrationen ist bisher noch wenig bekannt. Hohe CO<sub>2</sub>-Konzentrationen induzieren ebenfalls die Steigerung der cytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. Die Effekte auf die Kalium- und Anionenkanäle sind ähnlich wie bei ABA, jedoch nicht identisch. Es ist keine Änderung des cytoplasmatischen pH-Wertes zu beobachten (Übersicht bei MacRobbie, 1998).

Die Effekte von ABA auf die Genexpression speziell in Schließzellen wurden bisher kaum untersucht. Schließzellen sind in der Lage, ein ABA-Signal von seinem Wahrnehmungsort in den Zellkern zu übertragen (Taylor et al., 1995) und somit eine Änderung des Transkriptionsprogrammes auszulösen. Erste Untersuchungen wurden durchgeführt um zu analysieren, ob identische oder unterschiedliche Signaltransduktionsketten die ABA-Regulation der Ionenkanäle und der Genexpression in Schließzellen vermitteln (Hey et al., 1997). Der Übertragungsweg des ABA-Signals ist jedoch noch weitgehend unbekannt, es wird eine Beteiligung von Proteinkinasen und -phosphatasen (Hey et al., 1997), cADPR (Wu et al., 1997) sowie Ca<sup>2+</sup>-Ionen und Calmodulin vermutet (Übersicht bei McAinsh et al., 1997).

1995 wurde von Taylor et al. die durch ABA und Austrocknung induzierbare Expression eines Reportergenes (GUS) unter Kontrolle eines Promotors aus *Craterostigma plantagineum* (CDeT6-19) in den Schließzellen gezeigt. Die Induzierbarkeit durch ABA in den Schließzellen konnte bisher für ein Wassertransport-Protein (AthH2; Kaldenhoff et al., 1995) und eine mRNA codierend für ein Dehydrin (Neill et al., 1993; Hey et al., 1997) nachgewiesen werden. Es ist allerdings noch offen, ob es Genprodukte gibt, die an der Kontrolle der Stomatabewegung beteiligt sind und durch ABA transkriptionell reguliert werden (Leung und Giraudat, 1998).

#### **5.4 In Hybridisierungsstudien mit radioaktiv markierten komplexen Proben können häufige und mittelhäufige Transkripte untersucht werden**

Bei Hybridisierungen mit radioaktiv markierten komplexen Sonden liegt die geringste, reproduzierbar detektierbare Expression bei ca. 0,1 % der gesamten mRNA-Population. Nur häufige (> 1 % der mRNA-Population) und mittelhäufige (0,1 bis 1 % der mRNA-Population) Transkripte können in der Koloniehybridisierung detektiert werden (Simoens et al., 1988).

Vergleichende Hybridisierungsstudien mit hochdichten Koloniefiltern und cDNA-"Arrays" wurden in der vorliegenden Arbeit erfolgreich zur Detektion von differentiell exprimierten häufigen und mittelhäufigen Transkripten eingesetzt. So konnten auf den genomischen und cDNA-Filtern deutliche Unterschiede in der Transkription zwischen Gesamtblatt und Schließzellen (epidermalen Fragmenten) festgestellt werden (genomische Filter siehe Abb.11 und 12; cDNA-Filter siehe Abb.17 und 18, Tab.13 und 14). Diese Ergebnisse konnten durch eine "reversed Northern"-Analyse mit gereinigten Plasmiden bestätigt werden (Abb.19 und 20; Tab.15). Im allgemeinen werden zwischen Koloniehybridisierungen und "reversed Northern" (mit Restriktionsfragmenten und als cDNA-"Arrays") sowie der konventionellen "Northern"-Analyse gute Korrelationen erreicht (z.B. Simoens et al., 1988; Nguyen et al., 1995; Pietu et al., 1996). Der "reversed Northern" bietet im Vergleich zur konventionellen "Northern"-Analyse den Vorteil, daß sämtliche differentiell erscheinende Klone in einem Hybridisierungsschritt getestet werden können. Bei der systematischen Expressionsanalyse tausender Transkripte ist die Entwicklung derartiger "high throughput"-Methoden nicht zu umgehen.

Auch die Einflüsse der Langzeitbehandlung mit ABA auf die Transkription konnten studiert werden. So wurde bei Verwendung der genomischen Bank in den epidermalen Fragmenten von Wildtyp und transgenen RA-Pflanzen eine Expression der fünffachen Menge an Klonen im Vergleich zu wasserbehandelten Pflanzen detektiert (siehe Abb.12). Bei der Untersuchung der Genexpression mit Hilfe der cDNA-Bank konnte ebenfalls eine Reihe von Klonen reproduzierbar detektiert werden, die durch die langfristige ABA-Gabe induziert oder gehemmt werden (Tab.16; Abb.21).

An dieser Stelle ist anzumerken, daß bei Wildtyppflanzen sowohl in den physiologischen Untersuchungen der Transpirationsrate und deren Abhängigkeit von der CO<sub>2</sub>-Konzentration und der Lichtintensität (Abb.4; Tab.4), als auch morphologisch kein Einfluß durch die Langzeit-ABA-Gabe zu erkennen war.

## **5.5 Die durch Immunmodulation und Normalisierung erzielten Effekte lassen sich auf Transkriptionsebene in den voll entwickelten Pflanzen nicht erfassen**

Die anti-ABA immunglobulintransgenen RA-Pflanzen weisen markante physiologische und morphologische Unterschiede gegenüber Wildtyppflanzen auf.

Ziel der umfassenden Expressionsstudien war es nun, differentielle Gene zu erfassen, die tatsächlich relevant für das spezifische physiologische Verhalten der transgenen RA-Pflanzen sind. Diese Transkripte müssen in allen unabhängigen Experimenten reproduzierbar eine relativ konstante differentielle Expressionshöhe zeigen. Überraschenderweise lassen sich die deutlichen Effekte der Immunmodulation auf Transkriptionsebene in den voll entwickelten RA-Pflanzen nicht erfassen. Zwar wurden in ersten Analysen der Transkription in Gesamtblatt und Schließzellen der RA-Pflanzen und des Wildtyps differentiell erscheinende Klone detektiert (z.B. Tab.7), doch diese Unterschiede konnten in entsprechenden Wiederholungsexperimenten mit unabhängig synthetisierter cDNA bzw. im "reversed Northern" mit den Restriktionsfragmenten der Cosmidklone nicht bestätigt werden. Somit konnten unter den erfaßbaren, häufigen und mittelhäufigen Transkripten aus Gesamtblatt und Schließzellen keine relevanten Unterschiede zwischen RA-Pflanzen und Wildtyp gefunden werden. Lediglich Schwankungen von chloroplastidären und mitochondriellen Sequenzen wurden beobachtet. Diese traten sowohl zwischen RA und Wildtyp als auch zwischen verschiedenen cDNA-Präparationen der gleichen Pflanzenlinien auf.

Eine differentielle Expression seltener Transkripte in den anti-ABA immunglobulintransgenen Pflanzen kann jedoch mit den verwendeten Methoden nicht ausgeschlossen werden. In den letzten Jahren wurden beispielsweise verschiedene Transkriptionsfaktoren (z.B. Kusano et al., 1995; Nakagawa et al., 1996; Sodermann et al., 1999) und Proteinkinasen (z.B. Hong et al., 1997; Lee et al., 1998; Gomez-Cadenas et al., 1999) identifiziert, deren Genexpression durch ABA reguliert wird.

Bei der Untersuchung von 281 zufällig ausgewählten Klonen der geordneten schließzell-spezifischen Bank konnten einige, möglicherweise an der Signalübertragung des Stomataschlusses beteiligte Transkripte (z.B. putativer Chloridkanal, vakuoläre und Plasmamembran- $H^+$ -ATPase, Proteinkinasen und Calmodulin-ähnliche Proteine) identifiziert werden. Diese Klone konnten jedoch in der komplexen Hybridisierung der cDNA-Koloniefilter nicht detektiert und ihre Expressionshöhe daher nicht beurteilt werden. Im Gegensatz dazu scheint die "reversed Northern"-Analyse aufgrund der höheren

DNA-Konzentration der einzelnen Plasmide sensitiver als die Koloniehybridisierung zu sein. Hier zeigten die Transkripte, codierend für die Plasmamembran- $H^+$ -ATPase sowie für ein Calmodulin-ähnliches Protein, deutliche Hybridisierungssignale. Nachteil einer umfangreichen Genexpressionsanalyse mit Hilfe von cDNA-"Arrays" ist der große Aufwand bei Amplifizierung (z.B. durch PCR), Reinigung und Konzentrationsbestimmung der DNA vor dem "Spotting". Die Ergebnisse der im Rahmen dieses Projektes durchgeführten Hybridisierungsstudien zeigen, daß es sinnvoll ist, sich in Koloniehybridisierungen zunächst einen Überblick über die Gentranskription tausender Klone zu verschaffen und interessante Klone dann in einem DNA-"Array" zu quantifizieren.

Das Hauptproblem aller verwendeten Methoden liegt in der mangelnden Sensitivität, seltene Transkripte können nicht erfaßt werden. In den letzten drei Jahren wurden verschiedene Methoden zur Verbesserung der Sensitivität des Expressionsprofilings entwickelt. Dabei werden DNA-"Macro-" oder "Micro-Array"-Techniken mit effizienten Subtraktionsmethoden wie SSH (von Stein et al., 1997; Yang et al., 1999), "Differential Display" (Trenkle et al., 1999) oder RDA (Welford et al., 1998; Geng et al., 1998) kombiniert, um die Vorzüge beider Techniken zu koppeln. Zum einen können seltene, differentielle Klone bzw. DNA-Fragmente angereichert, in "Arrays" geordnet und in hohem Durchsatz analysiert werden. Zum anderen wird es möglich, für die Hybridisierungen der "Arrays" spezielle Sonden zu verwenden, in denen differentielle DNA-Sequenzen angereichert wurden.

## **5.6 Abscisinsäure ist für die Entwicklung funktionsfähiger Schließzellen notwendig**

Die unter 4.3 beschriebenen Veränderungen der Schließzellmorphologie erklären die spezifischen physiologischen Eigenschaften der RA-Pflanzen. Der Stomataschluß ist aus strukturellen Gründen verhindert und kann daher weder durch kurzzeitige ABA-Applikation (Abb.6 A) noch durch hohe Kohlendioxidkonzentrationen (Abb.4 A) oder Verdunkelung (Abb.4 B) induziert werden.

Die morphologischen Änderungen der Schließzellen sind ein spezifisches Merkmal der RA-Pflanzen. Nur Pflanzen mit ubiquitärer Expression des anti-ABA-Einzelkettenantikörpers im ER zeigen eine Behinderung des Stomataschlusses. Dagegen resultiert die Expression des anti-ABA scFv-Antikörpers ausschließlich in den Schließzellen durch

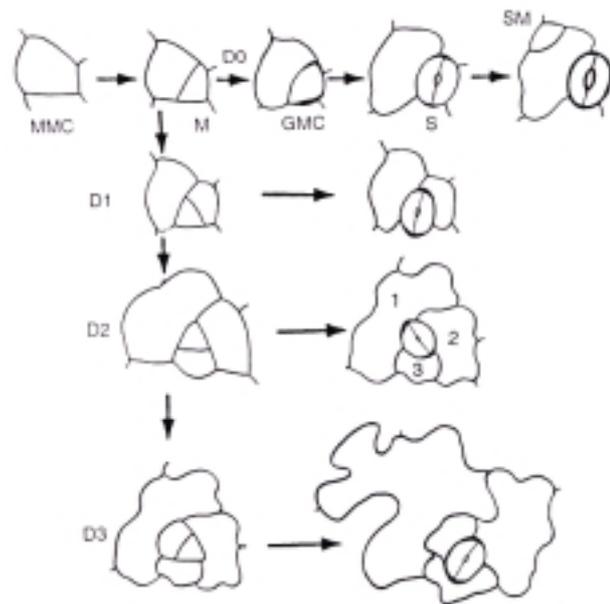
einen spezifischen Promotor (verkürzter ADP-Glucose-Pyrophosphorylase-Promotor) in physiologisch normalen transgenen Pflanzen. Wird das scFv-Protein in einer späten Phase der Blattentwicklung in Mesophyllzellen (unter Kontrolle des cytosolischen Fructose-1,6-biphosphat-Promotors) exprimiert, so weisen die transgenen Pflanzen ebenfalls ein normales stomatäres Verhalten auf (Wigger et al., in Vorbereitung). Diese Ergebnisse zeigen, daß nur die Expression in allen Blattzellen während eines frühen Zeitpunktes in der Blattentwicklung genügend rekombinante Antikörper zur Verfügung stellt, um den Gehalt an freier ABA in den Kompartimenten der sich entwickelnden Schließzellen ausreichend zu reduzieren. Abscisinsäure scheint somit für die Entwicklung funktionsfähiger Schließzellen notwendig zu sein. Der Einfluß von ABA auf die Ausbildung von Schließzellen konnte bereits in der semi-aquatischen Pflanze *Potamogeton nodosus*, die zur Ausbildung von submersen und emersen Blättern fähig ist (Heterophyllie), beobachtet werden (Gee und Anderson, 1998). Als Antwort auf die Applikation von 1 µM Abscisinsäure über vier Stunden hinweg wurden in den folgenden Tagen submerse Blätter entwickelt, die in ihrer Morphologie den emersen Blättern entsprachen und Stomata auf ihrer adaxialen Oberfläche ausbildeten. Vor der ABA-Behandlung bereits vorhandene, differenzierte Blätter wurden nicht beeinflusst (Gee und Anderson, 1998).

Die morphologischen Veränderungen sind durch die asymmetrische Form der beiden zusammengehörigen Schließzellen und durch die untypische dreieckige Form der Zentralöffnung gekennzeichnet (Abb.22 A). Aufgrund dieser Beobachtungen wäre es denkbar, daß in den RA-Pflanzen die Differenzierung der Schließzellen und / oder die Zellwandbiosynthese beeinflusst sind.

Die Schließzellendifferenzierung aus Vorläuferzellen bringt hochspezialisierte Zellen mit einzigartigen morphologischen und funktionalen Eigenschaften hervor. Der Differenzierungsprozeß könnte durch die fehlende Verfügbarkeit der Abscisinsäure beeinflusst sein. Die Ultrastruktur der stomatären Entwicklung wurde von Zhao und Sack (1999) an *Arabidopsis* untersucht. Abb.24 gibt eine Übersicht über die beteiligten Zelltypen und ihre Teilungsmuster.

Aus der asymmetrischen Teilung einer meristemoiden Mutterzellen (MMC, "meristemoid mother cell") geht eine meristemoide Zelle (M, "meristemoid") hervor. Diese wird, wahrscheinlich ohne eine Zellteilung, in eine Schließzell-Mutterzelle (GMC, "guard mother cell") differenziert. Eine symmetrische Teilung der Schließzell-Mutterzelle, verbunden mit einer Verdickung der Zellwandenden, resultiert in zwei Schließzellen, die die Spaltöffnung (S) formen (Zhao und Sack, 1999). Die normalerweise symmetrische

Teilung der Schließzell-Mutterzelle könnte in den anti-ABA-immunglobulintransgenen RA-Pflanzen beeinflusst sein, denn ihre Schließzellen weisen asymmetrische Formen auf. Weitere rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen an sich entwickelnden Blättern könnten klären, ob bereits Vorläuferzellen morphologische Änderungen aufweisen oder ob sich die Mißbildungen erst bei der Differenzierung der Schließzellen aus den GMC manifestieren. Unter dem Rasterelektronenmikroskop konnten bisher keine morphologischen Veränderungen der Epidermiszellen beobachtet werden.



**Abb.24:** Die Entwicklung des stomatären Komplexes in Blättern von *Arabidopsis* (Zhao und Sack, 1999).

Die meristemoiden Zellen können sich bis zu dreimal asymmetrisch teilen (D1 bis D3, Abb.24), bevor sie in eine Schließzell-Mutterzelle umgewandelt werden. Die stomatären Komplexe der Brassicaceae sind anisocytisch mit drei Nachbarzellen unterschiedlicher Größe (D2, Zellen 1-3, Abb.24). Diese Nachbarzellen können sich ebenfalls asymmetrisch teilen und eine meristemoide Satellitenzelle (SM) bilden (Abb.24, Zhao und Sack, 1999). Weiterhin ist es denkbar, daß Strukturproteine und Enzyme in der Genexpression beeinflusst sind, die während der Differenzierung der Schließzellen an der Zellwandbiosynthese und -modifikation beteiligt sind. Diese Prozesse sind sehr komplex und in

Schließzellen kaum untersucht. Pennell (1998) gibt eine Übersicht über die Strukturen pflanzlichen Zellwände, ihre Differenzierungsprozesse und ihre Beteiligung an der Zellentwicklung. Zellen besitzen in den verschiedenen Stadien des Zellzyklusses charakteristische Wandstrukturen. Im Anschluß an den Zellwandaufbau während der Teilung der Mutterzelle wird während der Differenzierung der Tochterzellen das Zellvolumen stark vergrößert. An der damit verbundenen Entspannung und Ausdehnung der Zellwand sind vor allem strukturelle und katalytische, Polysaccharid-abbauende Proteine beteiligt. Nachfolgende Prozesse sind die Verstärkung der Zellwand und die Änderung der Zellwandstruktur, beispielsweise durch Modifikation von Polysacchariden. Durch den Einbau neuer Komponenten oder der weiteren Vernetzung vorhandener Komponenten kann die Wand (oder Teile der Wand) irreversibel verstärkt werden (Übersicht bei Pennell, 1998).

Über die Zellwand von Schließzellen ist bisher sehr wenig bekannt. Sie ist stark spezialisiert und wahrscheinlich einzigartig unter den Zellwänden anderer Zelltypen (Willmer und Fricker, 1996). Eine unterschiedliche Dicke und Orientierung der Zellulose-Mikrofibrillen (vorwiegend strahlenförmig) bestimmt die Richtung der Zellausdehnung und die resultierenden Formänderungen während der Stomatabewegung (Willmer und Fricker, 1996).

Die stomatäre Zellwand kann verschiedene Funktionen bei der Signaltransduktion und der Regulation des Zellvolumens wahrnehmen (Übersicht bei McAinsh et al., 1997). Es wird vermutet, daß zwischen der pflanzlichen Zellwand und der Plasmamembran in bestimmten Regionen Adhäsionen bestehen, die Verbindungen zwischen dem Actin-Cytoskelett sowie Transmembranproteinen und Anker molekülen der Zellwand einschließen (Übersicht bei McAinsh et al., 1997). Diese Komplexe könnten direkt an der Regulation von mechanisch-sensitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen der Plasmamembran beteiligt sein, die eine zentrale Rolle bei der Übertragung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen in das Cytoplasma spielen (Pickard, 1994). Mechanisch-sensitiven  $\text{K}^+$ -,  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Cl}^-$  - Kanäle wurden in der Plasmamembran von *Vicia faba*-Schließzellen identifiziert (Cosgrove und Hedrich, 1991). Die Aktivität von mechanisch-sensitiven Kanälen wird wahrscheinlich in den verschiedenen Regionen der Plasmamembran durch die Variationen in den mechanischen Eigenschaften der Zellwand reguliert (Taylor et al., 1996).

Weiterführende Arbeiten sollen klären, ob nur die während der ABA-Behandlung neu entstehenden Schließzellen normalisiert sind, oder ob auch bereits angelegte Schließzellen

der RA-Pflanzen durch ABA normalisiert werden können (z.B. durch Umbau von Zellwandkomponenten).

Die Prozesse, die zu den morphologischen Änderungen der Schließzellen in den RA-Pflanzen führen, können auf Transkriptionsebene in den voll entwickelten Pflanzen bzw. ausdifferenzierten Schließzellen nicht erfaßt werden. Weitere Untersuchungen an sich entwickelnden Blättern, entsprechende Techniken zur Isolation sich entwickelnder Schließzellen vorausgesetzt, könnten Aufschluß bringen.

## **6. Zusammenfassung**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkungsweise des anti-ABA scFv-Antikörpers und dessen Effekte auf Abscisinsäurewirkungen in immunmodulierten Tabakpflanzen zu studieren. Daraus sollten Rückschlüsse auf Abscisinsäure-vermittelte Regulationsprozesse gezogen werden. Folgende wesentliche Ergebnisse wurden erzielt:

1. Der spezifische welkende Phänotyp der anti-ABA immunmodulierten Pflanzen konnte durch eine Langzeitbehandlung mit 50  $\mu$ M ABA über den Zeitraum der gesamten Pflanzenentwicklung hinweg komplementiert werden. Das physiologische Verhalten der RA-Pflanzen ist durch hohe Transpirationsraten und den Verlust der Abhängigkeit der stomatären Leitfähigkeit von der Kohlendioxidkonzentration und der Lichtintensität charakterisiert. Der Stomataschluß ist behindert und kann auch durch eine kurzfristige Gabe von ABA über die Blattstiele nicht mehr induziert werden. Durch die ABA-Langzeitbehandlung gelang es, das physiologische Verhalten der RA-Pflanzen vollständig dem Wildtyp anzugleichen. Auch die Kurzzeitinduzierbarkeit des Stomataschlusses durch ABA ist wieder hergestellt. Selbst in langzeitbehandelten RA-Pflanzen kann theoretisch die gesamte Abscisinsäure vom Antikörper gebunden werden, trotzdem sind die Pflanzen normalisiert. Daher muß die regelmäßig zugeführte ABA auf dem Weg von der Blattoberfläche über den Apoplasten zum ER, dem Anreicherungsort des Antikörpers, wirken. Die Inaktivierung der Abscisinsäure während der Pflanzenentwicklung löst Änderungen im Gentranskriptionsprogramm aus, die in der Behinderung des Spaltöffnungsschlusses resultieren.

2. In rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde festgestellt, daß bei den RA-Pflanzen die Morphologie der Schließzellen verändert und daher der Stomata-schluß aus strukturellen Gründen verhindert ist. Durch Behandlung mit ABA über den Zeitraum der Blatentwicklung hinweg kann die Schließzellmorphologie normalisiert werden. Aus diesen Ergebnissen konnte geschlußfolgert werden, daß ABA für die Entwicklung funktionsfähiger Schließzellen notwendig ist.
3. Die Transkription wurde in adulten RA- und Wildtyppflanzen mit modernen Methoden des cDNA-"Arrayings" untersucht. Zu diesem Zweck wurden eine genomische Bank sowie eine schließzellspezifische cDNA-Bank aus Wildtyptabak hergestellt, mit Hilfe von Robotern geordnet auf Nylonmembranen aufgebracht und charakterisiert. 54.000 genomische und 27.000 cDNA-Klone wurden in vergleichenden Hybridisierungsstudien mit komplexen cDNA-Sonden aus Blatt und Schließzellen (epidermalen Fragmenten) nach differentiellen Transkripten durchsucht. Mit diesen Methoden können häufige und mittelhäufige Transkripte ( $\geq 0,1$  % der mRNA-Population) erfaßt werden. Trotz der drastischen morphologischen und physiologischen Eigenschaften der RA-Pflanzen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Transkription von RA- und Wildtyppflanzen gefunden werden. Die strukturellen Veränderungen der Schließzellen manifestieren sich vermutlich während der Schließzeldifferenzierung und -entwicklung und können somit in voll entwickelten Pflanzen nicht erfaßt werden.
4. Zusätzlich ermöglichten die Hybridisierungsstudien einen Vergleich der Transkription in Blatt und Schließzellen sowie die Untersuchung des Einflusses der Langzeitbehandlung mit Abscisinsäure auf die Genexpression in Schließzellen. In Schließzellen werden Transkripte, codierend für Proteine, die an der Signaltransduktion sowie an Abwehr- und Streßreaktionen beteiligt sind, stärker exprimiert als im Blatt. Dagegen sind im Blatt hauptsächlich Transkripte, codierend für photosynthetische Proteine, höher exprimiert als in Schließzellen. Schließzellen induzieren als Antwort auf die langfristige ABA-Gabe die Transkription zahlreicher Gene. Auf den genomischen Filtern konnte die fünffache Menge an hybridisierenden Klonen im Vergleich zu unbehandelten Schließzellen detektiert werden. Weitere 24 ABA-induzierbare bzw. durch ABA-gehemmte Klone wurden mit Hilfe der cDNA-Bank detektiert und identifiziert.

## 7. Literaturverzeichnis

Adams, M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Merril, C.R., Wu, A., Olde, B., Moreno, R.F., Kerlavage, A.R., McCombie, W.R., Venter, J.C. (1991): Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252, 1651-1656.

Allan, A.C., Trewavas, A.J. (1994): Abscisic acid and gibberellin perception: inside or out? *Plant Physiol.* 104, 1107-1108.

Allaway, W.G., Setterfield, G. (1972): Structure and functioning of stomata. In: *Water Deficits and Plant Growth, Vol.IV*, Academic Press, New York, 57-102.

Artsaenko, O. (1996): Immunomodulation of ABA activity in transgenic tobacco plants. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doctor rerum naturalium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachbereich Biologie.

Artsaenko, O., Peisker, M., zur Nieden, U., Fiedler, U., Weiler, E.W., Müntz, K., Conrad, U. (1995): Expression of a single-chain Fv antibody against abscisic acid creates a wilted phenotype in transgenic tobacco. *Plant J.* 8, 745-750.

Artsaenko, O., Phillips, J., Fiedler, U., Peisker, M., Conrad, U. (1999): Intracellular immunomodulation in plants- a new tool for the investigation of phytohormones. In: *Recombinant Antibodies- applications in plants science and plant pathology* (Hrsg. K. Harper und A. Ziegler), 145-153, Taylor und Francis, London.

Artsaenko, O., Weiler, E.W., Müntz, K., Conrad, U. (1994): Construction and functional characterisation of a single chain Fv antibody binding to the plant hormone abscisic acid. *J. Plant Physiol.* 144, 427-429.

Bachem, C.W.B., van der Hoeven, R.S., de Bruijn, S.M., Vreugdenhil, D., Zabeau, M., Visser, R.G.F. (1996): Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J.* 9 (5), 745-753.

Bartels, D., Hanke, C., Schneider, K., Michel, D., Salamini, F. (1992): A desiccation-related elip-like gene from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* is regulated by light and ABA. *EMBO J.* 11 (8), 2771-2778.

Bartholomew, D.M., Bartley, G.E., Scolnik, P.A. (1991): Abscisic acid control of *rbcS* and *cab* transcription in tomato leaves. *Plant Physiol.* 96, 291-296.

Becker, D., Zeilinger, C., Lohse, G., Depta, H., Hedrich, R. (1993): Identification and biochemical characterization of the plasmamembrane  $H^+$ -ATPase in guard cells of *Vicia faba* L. *Planta* 190, 44-50.

Biocca, S., Pierandrei-Amaldi, P., Campioni, N., Cattaneo, A. (1994): Intracellular immunization with cytosolic recombinant antibodies. *Biotechnology* 12 (4), 396-399.

Biocca, S., Pierandrei-Amaldi, P., Cattaneo, A. (1993): Intracellular expression of anti-p21ras single chain Fv fragments inhibits meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197 (2), 422-427.

- Bird, R.E., Hardman, K.D., Jacobson, J.W., Johnson, S., Kaufman, B.M., Lee, S.-M., Lee, T., Pope, H.S., Riordan, G.S., Whitlow, M. (1988): Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242, 423-426.
- Borck, K.S., Walbot, V. (1982): Comparison of the restriction endonuclease digestion patterns of mitochondrial DNA from normal and male sterile cytoplasms of *Zea mays* L. *Genetics* 102, 109-128.
- Bradford, M.M. (1976): Rapid and quantitative method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-252.
- Busk, P.K., Pages, M. (1998): Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol. Biol.* 37, 425-435.
- Chandler, P.M., Robertson, M. (1994): Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Ann.Rev. in Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45, 113-143.
- Chaudhary, V.K., Batra, J.K., Gallo, M.G., Willingham, M.C., FitzGerald, D.J., Pastan, I. (1990): A rapid method of cloning functional variable-region antibody genes in *Escherichia coli* as single-chain immunotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1066-1070.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Conrad, U., Fiedler, U., Artsaenko, O., Phillips, J. (1998): Single chain Fv antibodies expressed in plants. In: *Recombinant Proteins in Plants - Production and Isolation of Clinically Useful Compounds* (Hrsg. C. Cunningham und A.J.R. Porter), 103-127, *Methods in Biotechnology* 3, Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Cosgrove, D.J., Hedrich, R. (1991): Stretch-activated chloride, potassium and calcium channels coexisting in plasma membranes of guard cells of *Vicia faba* L. *Planta* 186, 143-153.
- Cutler, A.J., Krochko, J.E. (1999): Formation and breakdown of ABA. *Trends in Plant Science* 4 (12), 472-478.
- De Camilli, P., Emr, S.D., McPherson, P.S., Novick, P. (1996): Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. *Science* 271 (5255), 1533-1539.
- Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D., Siebert, P.D. (1996): Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (12), 6025-6030.
- Duan, L., Bagasra, O., Laughlin, M.A., Oakes, J.W., Pomerantz, R.J. (1994): Potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by an intracellular anti-Rev single-chain antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (11), 5075-5079.
- Estruch, J.J., Crossland, L., Goff, S.A. (1994): Plant activating sequences: positively charged peptides are functional as transcriptional activation domains. *Nucleic Acids Res.* 22 (19), 3983-3989.
- Eyers, M., Edwards, K., Schuch, W. (1992): Construction and characterisation of a yeast artificial chromosome library containing two haploid *Beta vulgaris* L. genome equivalents. *Gene* 121 (2), 195-201.

- Fiedler, U., Artsaenko, O., Phillips, J., Conrad, U. (1999): Transgenic plants- a low cost production system for recombinant antibodies. In: *Recombinant Antibodies- Applications in Plant Science and Plant Pathology* (Hrsg. K. Harper und A. Ziegler ), 129-144, Taylor und Francis, London.
- Fiedler, U., Conrad, U. (1995): High-level production and long-term storage of engineered antibodies in transgenic tobacco seeds. *Biotechnology* 13, 1090-1093.
- Fiedler, U., Phillips, J., Artsaenko, O., Conrad, U. (1997): Optimization of scFv antibody production in transgenic plants. *Immunotechnology* 3, 205-216.
- Foley, R.C., Singh, K.B. (1994): Isolation of a *Vicia faba* metallothionein-like gene: expression in foliar trichomes. *Plant Mol. Biol.* 26 (1), 435-444.
- Garcia-Hernandez, M., Murphy, A., Taiz, L. (1998): Metallothioneins 1 and 2 have distinct but overlapping expression patterns in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 118 (2), 387-397.
- Gee, D., Anderson, L.W.J. (1998): Influence of leaf age on responsiveness of *Potamogeton nodosus* to ABA-induced heterophylly. *Plant Growth Regulation* 24, 119-125.
- Geng, M., Wallrapp, C., Muller-Pillasch, F., Frohme, R., Hoheisel, J.D., Gress, T.M. (1998): Isolation of differentially expressed genes by combining representational difference analysis (RDA) and cDNA library arrays. *Biotechniques* 25 (3), 434-438.
- Gilmour, S.J., Thomashow, M.F. (1991): Cold acclimation and cold-regulated gene expression in ABA mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 17, 1233-1240.
- Giraudat, J., Parcy, F., Bertauche, N., Gosti, F., Leung, J., Morris, P.-C., Bouvier-Durand, M., Vartanian, N. (1994): Current advances in abscisic acid action and signalling. *Plant Mol. Biol.* 26, 1557-1577.
- Gomez, J., Sanchez-Martinez, D., Stiefel, V., Rigau, J., Puigdomenech, P., Pages, M. (1988): A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glycine-rich protein. *Nature* 334, 262-264.
- Gomez-Gadenas, A., Verhey, S.D., Holappa, L.D., Shen, Q., Ho, T.H., Walker-Simmons, M.K. (1999): An abscisic acid-induced protein kinase, PKABA1, mediates abscisic acid-suppressed gene expression in barley aleurone layers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (4), 1767-1772.
- Granjeaud, S., Nguyen, C., Rocha, D., Luton, R., Jordan, B.R. (1996): From hybridization image to numerical values: a practical, high throughput quantification system for high density filter hybridizations. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* 12, 151-162.
- Gress, T.M., Hoheisel, J.D., Lennon, G.G., Zehetner, G., Lehrach, H. (1992): Hybridization fingerprinting of high-density cDNA-library arrays with cDNA pools derived from whole tissues. *Mammalian Genome* 3, 609-619.
- Haake, V., Zrenner, R., Sonnewald, U., Stitt, M. (1998): A moderate decrease of plastid aldolase activity inhibits photosynthesis, alters the levels of sugars and starch, and inhibits growth of potato plants. *Plant J.* 14 (2), 147-157.
- Haff, L.A., Borogard, L. (1976): Poly (adenylic acid)-containing RNA from plastids of maize. *Biochemistry* 15, 4110-4115.

- Hartung, W., Slovik, S. (1991): Physicochemical properties of plant growth regulators and plant tissues determine their distribution and redistribution: stomatal regulation by abscisic acid in leaves. *The New Phytol.* 119, 361-382.
- Hedrick, S.M., Cohen, D.I., Nielsen, E.A., Davies, M.M. (1984): Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. *Nature* 308 (8), 149-153.
- Heintzen, C., Fischer, F., Melzer, S., Kappeler, S., Apel, K., Staiger, D. (1994): Circadian oscillations of a transcript encoding a germin-like protein that is associated with cell walls in young leaves of the long-day plant *Sinapis alba* L. *Plant Physiol.* 106, 905-915.
- Hey, S.J., Bacon, A., Burnett, E., Neill, S.J. (1997): Abscisic acid signal transduction in epidermal cells of *Pisum sativum* L. Argenteum: both dehydrin mRNA accumulation and stomatal responses require protein phosphorylation and dephosphorylation. *Planta* 202, 85-92.
- Hiatt, A., Cafferkey, R., Bowdish, K. (1989): Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* 342, 76-78.
- Himmelbach, A., Iten, M., Grill, E. (1998): Signalling of abscisic acid to regulate plant growth. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 353 (1374), 1439-1344.
- Hoheisel, J.D., Zehetner, G., Lehrach, H., Lennon, G.G. (1991): Use of high coverage reference libraries of *Drosophila melanogaster* for relational data analysis. A step towards mapping and sequencing of the genome. *J. Mol. Biol.* 220, 903-914.
- Hong, S.W., Jon, J.H., Kwak, J.M., Nam, H.G. (1997): Identification of a receptor-like protein kinase gene rapidly induced by abscisic acid, dehydration, high salt, and cold treatments in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 113 (4), 1203-1212.
- Hubank, M., Schatz, D.G. (1994): Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res.* 22 (25), 5640-5648.
- Imai, R., Moses, M.S., Bray, E.A. (1995): Expression of an ABA-induced gene of tomato in transgenic tobacco during periods of water deficit. *J. Exp. Bot.* 46, 1077-1084.
- Imber, D., Tal, M. (1970): Phenotypic reversion of *flacca*, a wilted mutant of tomato, by abscisic acid. *Science* 169, 592-593.
- Jacob, T., Ritchie, S., Assmann, S.M., Gilroy, S. (1999): Abscisic acid signal transduction in guard cells is mediated by phospholipase D activity. *PNAS* 96 (21), 12192-12197.
- John, I., Hackett, R., Cooper, W., Drake, R., Farrell, A., Grierson, D. (1997): Cloning and characterization of tomato leaf senescence-related cDNAs. *Plant Mol. Biol.* 33, 641-651.
- Kaldenhoff, R., Kölling, A., Meyers, J., Karmann, U., Ruppel, G., Richter, G. (1995): The blue light-responsive AthH2 gene of *Arabidopsis thaliana* is primarily expressed in expanding as well as differentiating cells and encodes a putative channel protein of the plasmalemma. *Plant J.* 7, 87-96.
- Kang, J.-G., Park, C.-M. (unveröffentlicht): Isolation of cDNA clone encoding a putative translationally controlled tumor protein homolog in *Nicotiana tabacum*. (NCBI-Nukleotid-datenbank, 1998).

- Kawashima, I., Kennedy, T.D., Chino, M., Lane, B.G. (1992): Wheat Ec metallothionein genes. Like mammalian Zn<sup>2+</sup> metallothionein genes, wheat Zn<sup>2+</sup> metallothionein genes are conspicuously expressed during embryogenesis. *Eur. J. Biochem.* 209 (3), 971-976.
- Kinoshita, T., Shimazaki, K. (1999): Characterization of cytosolic cyclophilin from guard cells of *Vicia faba* L. *Plant Cell Physiol.* 40 (1), 53-59.
- Kofer, W., Bergman, P., Haakansson, G., Glimelius, K. (in Druck): A chimeric and truncated mitochondrial atpA gene is associated with flower morphology and cytoplasmic male-sterility in alloplasmic tobacco with *Nicotiana bigelovii* mitochondria. *Plant Cell*.
- Kopka, J., Provar, N.J., Müller-Röber, B. (1997): Potato guard cells respond to drying soil by a complex change in the expression of genes related to carbon metabolism and turgor regulation. *Plant J.* 11, 871-882.
- Küllertz, G., Liebau, A., Rucknagel, P., Schierhorn, A., Diettrich, B., Fischer, G., Luckner, M. (1999): Stress-induced expression of cyclophilins in proembryonic masses of *Digitalis lanata* does not protect against freezing / thawing stress. *Planta* 208 (4), 599-605.
- Kusano, T., Berberich, T., Harada, M., Suzuki, N., Sugawara, K. (1995): A maize DNA-binding factor with a bZIP motif is induced by low temperature. *Mol. Gen. Genet.* 248 (5), 507-517.
- Kwak, J.M., Kim, S.A., Hong, S.W., Nam, H.G. (1997): Evaluation of 515 expressed sequence tags obtained from guard cells of *Brassica campestris*. *Planta* 202, 9-17.
- Lee, S.H., Lee, M.H., Chung, W.I., Liu, J.R. (1998): WAPK, a Ser/Thr protein kinase gene of *Nicotiana tabacum*, is uniquely regulated by wounding, abscisic acid and methyl jasmonate. *Mol. Gen. Genet.* 259 (5), 516-522.
- Leung, J., Giraudat, J. (1998): Abscisic acid signal transduction. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* 49, 199-222.
- Li, J., Wang, X.-Q., Watson, M.B., Assmann, S.M. (2000): Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. *Science* 287 (5451), 300-303.
- Liang, P., Pardee, A.B. (1992): Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257, 967-971.
- Lisitsky, I., Klaff, P., Schuster, G. (1996): Addition of poly (A)-rich sequences to endonucleolytic cleavage sites in the degradation of spinach chloroplast mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13398-13403.
- Lisitsyn, N., Lisitsyn, N., Wigler, M. (1993): Cloning the differences between two complex genomes. *Science* 259 (5097), 946-951.
- Lueking, A., Horn, M., Eickhoff, H., Büssow, K., Lehrach, H., Walter, G. (1999): Protein microarrays for gene expression und antibody screening. *Anal. Biochem.* 270 (1), 103-111.
- Macleod, M.R., Taylor, M.A., Jarvis, S.B., Davies, H.V. (unveröffentlicht): Cloning, characterisation and transgenic analysis of a tuberisation-related cDNA clone from potato (*Solanum tuberosum* L.). (NCBI-Nukleotiddatenbank, 1998).
- MacRobbie, E.A.C. (1995a): Effects of ABA on 86Rb<sup>+</sup> fluxes at plasmalemma and tonoplast of stomatal guard cells. *Plant J.* 7, 835-843.

- MacRobbie, E.A.C. (1995b): ABA-induced ion efflux in stomatal guard cells: multiple actions of ABA inside and outside the cell. *Plant J.* 7, 565-576.
- MacRobbie, E.A.C. (1998): Signal transduction and ion channels in guard cells. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 353, 1475-1488.
- Maier, E., Bancroft, D.R., Lehrach, H. (1997): Large-scale library characterization. In: *Automation Technologies for Genome Characterization* (Hrsg. T.J.Beugelsdiik und John Wiley & Sons), Inc., 65-88.
- Maier, E., Meier-Ewert, S., Ahmadi, A.R., Curtis, J., Lehrach, H. (1994): Application of robotic technology to automated sequence fingerprint analysis by oligonucleotide hybridisation. *J. Biotechnology* 35, 191-203.
- Marasco, W.A., Haseltine, W.A., Chen, S.Y. (1993): Design, intracellular expression, and activity of a human anti-human immunodeficiency virus type 1 gp120 single-chain antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (16), 7889-7893.
- McAinsh, M.R., Brownlee, C., Hetherington, A.M. (1997): Calcium ions as second messengers in guard cell signal transduction. *Physiol. Plant.* 100, 16-29.
- Menke, U., Renault, N., Müller-Röber, B. (2000): StGCPRP, a potato gene strongly expressed in stomatal guard cells, defines a novel type of repetitive proline-rich proteins. *Plant Physiol.* 122 (3), 677-686.
- Mertens, R. (1985): Herstellung und Einsatz monoklonaler Antikörper gegen Pflanzenhormone. Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften der Abteilung für Biologie an der Ruhr-Universität Bochum.
- Mertens, R., Deus-Neumann, B., Weiler, E.W. (1983): Monoclonal antibodies for the detection and quantitation of the endogenous plant growth regulator abscisic acid. *FEBS Lett.* 160, 269-272.
- Müller-Röber, B., Ehrhardt, T., Plesch, G. (1998): Molecular features of stomatal guard cells. *J. Exp. Bot.* 49, 293-304.
- Mundy, J., Chua, N.H. (1988): Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO J.* 7, 2279-2286.
- Munroe, S., Pelham, H. (1986): An Hsp 70- like protein in the ER: Identity with the 78 kD glucose regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* 46, 291-300.
- Nakagawa, H., Ohmiya, K., Hattori, T. (1996): A rice bZIP protein, designated OSBZ8, is rapidly induced by abscisic acid. *Plant J.* 9 (2), 217-227.
- Nakajima, N., Saji, H., Aono, M., Kondo, N. (1995): Isolation of cDNA for a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from guard cells of *Vicia faba* L. *Plant Cell Physiol.* 36, 919-924.
- Neill, S.J., Hey, S.J., Barratt, D.H.P. (1993): Guard cell gene expression in *Pisum sativum* L. *J. Exp. Bot.* 44 S, 3.
- Neri, D., Montagiani, S., Kirkham, P.M. (1996): Biophysical methods for the determination of antibody-antigen affinities. *Trends in Biotechnology* 14, 465-470.

- Nguyen, C., Rocha, D., Granjeaud, S., Baldit, M., Bernard, K., Naquet, P., Jordan, B.R. (1995): Differential gene expression in the murine thymus assayed by quantitative hybridization of arrayed cDNA clones. *Genomics* 29 (1), 207-216.
- Nordin, K., Heino, P., Palva, E.T. (1991): Separate signal pathways regulate the expression of a low temperature-induced gene in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynth. *Plant Mol. Biol.* 16, 1061-1071.
- Owen, M., Gandecha, A., Cockburn, B., Whitlam, G. (1992): Synthesis of a functional anti-phytochrome single-chain Fv protein in transgenic tobacco. *Biotechnology* 10 (7), 790-794.
- Pedron, J., Brault, M., Nake, C., Miginiac, E. (1998): Detection of abscisic-acid-binding proteins in the microsomal protein fraction of *Arabidopsis thaliana* with abscisic-acid-protein conjugates used as affinity probes. *Eur. J. Biochem.* 252, 385-390.
- Pei, Z.M., Ghassemian, M., Kwak, C.M., McCourt, P., Schroeder, J.I. (1998): Role of farnesyltransferase in ABA regulation of guard cell anion channel and plant water loss. *Science* 282 (5387), 287-290.
- Pennell, R. (1998): Cell walls: structures and signals. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1 (6), 504-510.
- Phillips, J., Artsaenko, O., Fiedler, U., Horstmann, C., Mock, H.-P., Müntz, K., Conrad, U. (1997): Seed specific immunomodulation of abscisic acid activity induces a developmental switch. *EMBO J.* 16, 4489-4496.
- Pickard, B.G. (1994): Contemplating the plasmalemmal control centre model. *Protoplasma* 182, 1-9.
- Pietu, G., Alibert, O., Guichard, V., Lamy, B., Bois, F., Leroy, E., Mariage-Samson, R., Houlgatte, R., Soularue, P., Auffray, C. (1996): Novel gene transcripts preferentially expressed in human muscles revealed by quantitative hybridization of a high density cDNA array. *Genome Research* 6, 492-503.
- Przewloka, M.R., Stemmer, C., Grasser, K.D., Prymakowska-Bosak, M., Jerzmanowski, A. (unveröffentlicht): Identification in tobacco of a histone H1 variant homologous to the stress-inducible H1 of *Arabidopsis* and tomato. (NCBI-Nukleotiddatenbank, 1999).
- Richardson, J.H., Sodroski, J.G., Waldmann, T.A., Marasco, W.A. (1995): Phenotypic knockout of the high-affinity human interleukin 2 receptor by intracellular single-chain antibodies against the alpha subunit of the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (8), 3137-3141.
- Richmond, C.S., Glasner, J.D., Mau, R., Jin, H., Blattner, F.R. (1999): Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 27, 3821-3835.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): *Molecular Cloning – a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press, New York.
- Schena, M. (1996): Genome analysis with gene expression microarrays. *Bioessay* 18 (5), 427-431.
- Schena, M., Heller, R.A., Thériault, T.P., Konrad, K., Lachenmeier, E., Davis, R.W. (1998): Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends Biotechnol.* 16 (7), 301-306.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., Brown, P.O. (1995): Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270 (5235), 467-470.

- Schuster, G., Lisitsky, I., Klaff, P. (1999): Polyadenylation and degradation of mRNA in the chloroplast. *Plant Physiol.* 120, 937-944.
- Schwartz, A., Wu, W.-H., Tucker, E.B., Assmann, S.M. (1994): Inhibition of inward K<sup>+</sup>-channels and stomatal response by abscisic acid: An intracellular locus of phytohormone action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4019-4023.
- Shinozaki, M., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B.Y., Sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimada, H., Sugiura, M. (1986): The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J.* 5, 2043-2049.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (1996): Molecular responses to drought and cold stress. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7 (2), 161-167.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (1997): Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* 115, 327-334.
- Siebert, P.D., Chenchik, A., Kellogg, D.E., Lukyanov, K.A., Lukyanov, S.A. (1995): An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 23 (6), 1087-1088.
- Simoens, C.R., Peleman, J., Valvekens, D., Van Montagu, M., Inze, D. (1988): Isolation of genes expressed in specific tissues of *Arabidopsis thaliana* by differential screening of a genomic library. *Gene* 67, 1-11.
- Singh, N.K., La Rosa, P.C., Handra, A.K., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. (1987): Hormonal regulation of protein synthesis associated with salt tolerance in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 739-743.
- Sodermann, E., Hjellstrom, M., Fahleson, J., Engstrom, P. (1999): The HD-Zip gene *ATHB6* in *Arabidopsis* is expressed in developing leaves, roots and carpels and up-regulated by water deficit conditions. *Plant Mol. Biol.* 40 (6), 1073-1083.
- St. John, T.P., Davis, R.W. (1979): Isolation of galactose-inducible DNA sequences from *Saccharomyces cerevisiae* by differential plaque filter hybridization. *Cell* 16, 443-452.
- Sun, C.W., Callis, J. (1997): Independent modulation of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin mRNAs in different organs and in response to environmental changes. *Plant J.* 11 (5), 1017-1027.
- Tabaeizadeh, Z. (1998): Drought-induced responses in plant cells. *Int. Rev. Cytol.* 182, 193-247.
- Tavladoraki, P., Benvenuto, E., Trinca, S., De Martinis, D., Cattaneo, A., Galeffi, P. (1993): Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. *Nature* 366 (6454), 469-472.
- Taylor, A.R., Manison, N.F.H., Fernandez, C., Wood, J.W., Brownlee, C. (1996): Spatial organization of calcium signalling involved in cell volume in the *Fucus* rhizoid. *Plant Cell* 8, 2015-2031.
- Taylor, J.E., Montgomery, L., Renwick, K.F., Webb, A.A.R., McAinsh, M.R., Furini, A., Bartels, D., Quatrano, R.S., Marcotte, W.R. Jr., Hetherington, A.M. (1995): ABA-regulated promoter activity in stomatal guard cells. *Plant J.* 7, 129-134.

- Thompson, R.D., Bartels, D., Harberd, N.P., Flavell, R.B. (1983): Multigene family coding for HMW glutenin using cDNA clones. *Theor. Appl. Genet.* 67, 87-96.
- Trenkle, T., Welsh, J., McClelland, M. (1999): Differential display probes for cDNA arrays. *Biotechniques* 27 (3), 554-560, 562, 564.
- Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B., Kinzler, K.W. (1995): Serial analysis of gene expression. *Science* 270 (5235), 484-487.
- von Caemmerer, S., Farquhar, G.D. (1981): Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153, 376-387.
- von Stein, O., Thies, W.-G., Hofmann, M. (1997): A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res.* 25 (13), 2598-2602.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23 (21), 4407-4414.
- Voss, A., Niersbach, M., Hain, R., Hirsch, H.J., Liao, Y., Kreuzaler, F., Fischer, R. (1995): Reduced virus infectivity in *N.tabacum* secreting a TMV-specific full size antibody. *Molecular Breeding* 1, 39-50.
- Walker-Simmons, M.K., Reaney, M.J., Quarrie, S.A., Perata, P., Vernierey, P., Abrams, S.R. (1991): Monoclonal antibody recognition of abscisic acid analogs. *Plant Physiol.* 95, 46-51.
- Walton, D.C. (1983): Structure-activity relationships of abscisic acid analogs and metabolites. In: *Abscisic Acid* (Hrsg. F.T. Addicot), 113-146, Praeger, New York.
- Ward, E.R., Jen, G.C. (1990): Isolation of single-copy-sequence clones from a yeast artificial chromosome library of randomly-sheared *Arabidopsis thaliana* DNA. *Plant Mol. Biol.* 14 (4), 561-568.
- Wei, T., O'Connell, M.A. (1996): Structure and characterization of a putative drought-inducible H1 histone gene. *Plant Mol. Biol.* 30, 255-268.
- Weiler, E.W. (1986): Plant hormone immunoassays based on monoclonal and polyclonal antibodies. In: *Immunology in Plant Science. Modern Methods of Plant Analysis, Volume 4.* Berlin: Springer, 1-17.
- Welford, S.M., Gregg, J., Chen, E., Garrison, D., Soerensen, P.H., Denny, C.T., Nelson, S.F. (1998): Detection of differentially expressed genes in primary tumor tissues using representational differences analysis coupled to microarray hybridization. *Nucleic Acids Res.* 26 (12), 3059-3065.
- Wigger, J., Peisker, M., Hartung, W., Artsaenko, O., Conrad, U. (in Vorbereitung): Prevention of stomatal closure by immunomodulation of endogenous ABA: Physiological behaviour and morphological features of tobacco stomata and its reversion by ABA treatment.
- Willmer, C., Fricker, M. (1996): Stomata. *Topics in plant functional biology 2* (Hrsg. M. Black und B. Charlwood), Chapman and Hall, London.
- Wu, Y., Kuzma, J., Marechal, E., Graeff, R., Lee, H.C., Foster, R., Chua, N.-H. (1997): Abscisic acid signaling through cyclic ADP-Ribose in plants. *Science* 278, 2126-2130.

Yang, G.P., Ross, D.T., Kuang, W.W., Brown, P.O., Weigel, R.J. (1999): Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res.* 27 (6), 1517-1523.

Zhao, L., Sack, F.D. (1999): Ultrastructure of stomatal development in *Arabidopsis* (Brassicaceae) leaves. *Amer. J. Bot.* 86 (7), 929-939.

## **Danksagung**

Hiermit möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben, insbesondere bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Phytoantikörper, für das freundliche Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit bedanken. Mein besonderer Dank gilt dem Arbeitsgruppenleiter Herrn Dr. Udo Conrad für seine freundliche Betreuung und seine ständige Diskussionsbereitschaft. Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Ulrich Wobus (Leiter der Abteilung "Molekulare Genetik") und Herrn Prof. Dr. Klaus Müntz (ehemals Leiter der Abteilung "Molekulare Zellbiologie") für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Ich danke Frau Dr. Olga Artsaenko für die Herstellung der transgenen Pflanzen, Herrn Dr. Martin Peisker und Frau Ingrid Heinemann für die Transpirationmessungen sowie Frau Susanne König für die zahlreichen DNA-Sequenzierungen. Ich bedanke mich bei Frau Isolde Tillack und Frau Elisabeth Nagel für die technische Unterstützung, bei Frau Carla Liebing und Frau Ursula Schumann für ihre Hilfe bei der Anzucht der Pflanzen und bei den Mitarbeitern der Gärtnerei des IPK für ihre Unterstützung bei der Betreuung der Pflanzen in der Phytokammer und im Gewächshaus.

Frau Susan Kirby (RZPD, Berlin) und Herrn Dr. Gerald Walter (ehemals MPI für Molekulare Genetik, Berlin) möchte ich für die freundliche Kooperation beim "Picking" und "Spotting" der genomischen Bank danken. Bei Herrn Dr. Bernd Müller-Röber (MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm) und seinen Mitarbeitern möchte ich mich für die Einweisung in die Präparation der epidermalen Fragmente bedanken.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Dr. Wolfram Hartung (Universität Würzburg) für die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen der Blattoberflächen.

Das Projekt wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 363) finanziell unterstützt.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Mit dieser Arbeit bewerbe ich mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrades.

Gatersleben, Mai 2000

## **Lebenslauf**

Name: Jana Wigger  
Anschrift: K.-Kollwitz-Str.10  
06406 Bernburg  
geboren am: 06.09.1970 in Wolfen  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

Sept.1977 - Juli 1987 Zehnklassige polytechnische Oberschule Sandersdorf  
Sept.1987 - Juli 1989 Erweiterte Oberschule Bitterfeld, Abitur

### Berufsausbildung und Studienzeiten

Sept.1989 - Juli 1990 Praktikum bei der Anhaltinischen Molkereigenossenschaft / Betrieb Bitterfeld, Ausbildung zum Facharbeiter für Milchwirtschaft  
Sept.1990 - Aug.1995 Studium an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg / Außenstelle Köthen in der Fachrichtung Biotechnologie, Abschluß als Dipl.-Ing. (TU) für Biotechnologie, Titel der Diplomarbeit: "Mischkulturen einer mikrobiellen Stickstoffeliminationsstufe und deren Immobilisierung an speziellen Trägern"  
Okt.1995 - März 1996 Zusatzstudium an der FH Anhalt / Standort Köthen auf dem Gebiet Biotechnologie / Schwerpunkt Pharmatechnik  
seit Mai 1996 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben in der Arbeitsgruppe Phytoantikörper (Gruppenleiter Dr. U. Conrad), Anfertigung der Dissertation, Titel der Doktorarbeit: " Molekulare, physiologische und biochemische Untersuchung der Immunmodulation von Abscisinsäurewirkungen in den Blättern transgener Tabakpflanzen"