

Isolierung und Charakterisierung pathogen- und streß-  
induzierter Gene von Kartoffel *Solanum*  
*tuberosum* L.

Dissertation

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

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

von Frau Julia Petters  
geb. am 26.06.69 in Halle/Saale

**urn:nbn:de:gbv:3-000002738**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000002738>]

Gutachter:

1. Prof. Dr. D. Scheel
2. Prof. Dr. B. Dräger
3. PD. Dr. E. Tacke

Halle (Saale)

Tag der Verteidigung: 23. 11. 2001

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Genetische Grundlagen der pflanzlichen Resistenz .....	2
1.2	Konstitutive und induzierte Abwehrmechanismen .....	3
1.2.1	Pathogen- und streßinduzierte Genaktivierung .....	4
1.2.2	Signaltransduktionskaskaden .....	6
1.2.3	Systemisch erworbene und induzierte Resistenz .....	10
1.2.3.1	Systemisch erworbene und induzierte Resistenz in Kartoffel .....	11
1.3	Ziele der Arbeit .....	12
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>13</b>
2.1	Material .....	13
2.1.1	Chemikalien, Enzyme, Kits, Radioisotope, Oligonukleotide .....	13
2.1.2	Medien und Puffer .....	13
2.1.3	Geräte .....	14
2.1.4	Bakterienstämme, Vektoren und Pilz-Rassen .....	14
2.2	Allgemeine Labormethoden .....	15
2.2.1	Restriktionsspaltungen .....	15
2.2.2	Agarose-Gelelektrophorese .....	15
2.2.3	Isolierung von Fragmenten aus Agarosegelen .....	16
2.2.4	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	16
2.2.5	Klonierung .....	16
2.3	Pflanzenmaterial .....	17
2.3.1	Anzucht von Kartoffelpflanzen zur Versuchsdurchführung .....	18
2.3.2	Anzucht und Infiltration von <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> , Durchführung der SAR-Induktionsexperimente .....	18
2.3.3	Inokulation von Kartoffelpflanzen mit Sporen von <i>Phytophthora infestans</i> .....	18
2.3.4	Verwundung von Kartoffelpflanzen .....	19
2.3.5	Behandlung mit UV-Strahlung .....	19
2.3.6	Behandlung mit Phytohormonen und Signalsubstanzen .....	19
2.3.7	Elicitierung von Zellkulturen .....	20
2.3.8	Anzucht von Tabakpflanzen .....	20
2.4	Bemerkungen .....	20
2.5	Isolierung von Nukleinsäuren .....	20
2.5.1	Präparation von Gesamt-RNA .....	20
2.5.2	Präparation von Poly(A) <sup>+</sup> -mRNA .....	21
2.5.3	Präparation von genomischer DNA .....	21
2.5.4	Präparation von Plasmid-DNA .....	21
2.5.4.1	Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA (Mini-Präparation) .....	21

2.5.4.2	Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA (Midi-Präparation).....	22
2.5.4.3	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	22
2.5.5	Präparation von Phagen-DNA.....	22
2.6	Identifizierung differentiell exprimierter Gene .....	23
2.6.1	„mRNA-Differential Display“ (DDRT-PCR) .....	23
2.6.2	cDNA-AFLP .....	24
2.7	Markierung von Nukleinsäuren .....	26
2.7.1	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten .....	26
2.7.2	Nichtradioaktive Markierung von RNA ( <i>in-vitro</i> -Transkription) .....	26
2.8	Hybridisierungsexperimente.....	26
2.8.1	Northern-Blot-Hybridisierungen.....	26
2.8.1.1	Radioaktive Detektion .....	27
2.8.1.2	Nichtradioaktive Detektion .....	27
2.8.2	Southern-Blot-Hybridisierungen .....	27
2.9	Anlegen und Screenen einer cDNA-Bank .....	28
2.10	Anlegen und Screenen einer genomischen Bank.....	28
2.11	DNA-Sequenzierung .....	29
2.11.1	Auswertung der Sequenzdaten.....	29
2.12	Herstellung transgener Pflanzen .....	29
2.12.1	Medien.....	29
2.12.2	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	30
2.12.3	Transformation und Regeneration von Kartoffelpflanzen .....	30
2.12.4	Transformation und Regeneration von Tabakpflanzen.....	31
2.13	Proteinanalytik .....	31
2.13.1	Herstellung der Expressionsplasmide .....	31
2.13.2	Expression in <i>E. coli</i> .....	31
2.13.3	Reinigung des rekombinanten Proteins.....	31
1.1.4	SDS-PAGE .....	32
1.1.5	Western-Blot-Analyse .....	32
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>34</b>
3.1	Ermittlung optimaler Bedingungen zur Pflanzenanzucht .....	34
3.1.1	Voraussetzungen.....	34
3.1.2	Veränderte Anzuchtbedingungen.....	34
3.2	Identifizierung pathogenresponsiver Gene aus Kartoffel .....	36
3.2.1	“mRNA-Differential Display“ .....	36
3.2.2	cDNA-AFLP .....	39
3.2.3	Expression der identifizierten Gene nach <i>Psm</i> -Infiltration .....	41
3.3	Expression von <i>PP2C</i> , <i>ELH</i> und <i>PPP</i> .....	48
3.3.1	Expression der <i>PPP</i> nach Behandlung von Kartoffelblättern mit Sporen von <i>P. infestans</i> .....	48
3.3.2	Einfluß von Phytohormonen und Signalsubstanzen auf die Genexpression .....	50

3.3.2.1	Untersuchung der Genexpression in abgetrennten Blättern nach Phytohormon- und Signalsubstanzbehandlung .....	50
3.3.2.2	Untersuchung der Genexpression nach Infiltration von Arachidonsäure .....	52
3.3.2.3	Untersuchung der <i>PPP</i> -Genexpression nach Systeminbehandlung.....	54
3.3.3	Untersuchung der Genexpression nach Verwundung .....	55
3.3.4	Untersuchung der Genexpression nach UV-Bestrahlung .....	57
3.3.5	Organspezifisches Expressionsmuster von <i>PP2C</i> , <i>ELH</i> und <i>PPP</i> .....	58
3.3.6	Untersuchung der <i>PPP</i> -Genexpression in <i>nahG</i> -Pflanzen nach Pathogenbehandlung.....	59
3.3.7	Untersuchung der <i>PPP</i> -Genexpression in elicitierten Zellkulturen.....	60
3.4	Isolierung genomischer Klone .....	61
3.4.1	Southern-Blot-Analyse .....	61
3.4.2	PCR mit genomischer DNA.....	63
3.4.3	Screenen einer genomischen Bank .....	63
3.4.3.1	Isolierung und Charakterisierung genomischer Klone der <i>PP2C</i> .....	64
3.4.3.2	Isolierung und Charakterisierung genomischer Klone des <i>ELH</i> .....	64
3.4.3.3	Sequenzähnlichkeiten des genomischen Subklons 903/2-6.....	65
3.5	Screenen einer cDNA-Bank .....	66
3.5.1	Anlegen einer cDNA-Bank .....	66
3.5.2	Isolierung von <i>PP2C</i> -cDNA-Klonen.....	66
3.5.2.1	Homologien der Nukleotid- und abgeleiteten Aminosäuresequenzen des Klons c110-2 zu Sequenzen aus Datenbanken.....	67
3.5.3	Isolierung von <i>ELH</i> -cDNA-Klonen .....	69
3.5.3.1	Homologien der Nukleotid- und abgeleiteten Aminosäuresequenzen der <i>ELH</i> -cDNA Klone zu Sequenzen aus Datenbanken.....	71
3.5.4	Isolierung von <i>PPP</i> -cDNA-Klonen.....	72
3.5.4.1	Homologien der Nukleotid- und abgeleiteten Aminosäuresequenzen der <i>PPP</i> -cDNA Klone zu Sequenzen aus Datenbanken.....	73
3.5.4.2	Der vollständige cDNA-Klon einer putativen Phosphatase F(A) gl-3 .....	74
3.6	Die Expression der putativen Phosphatase in <i>Escherichia coli</i> .....	76
3.6.1	Subklonierung in zwei Expressionsvektoren .....	76
3.6.2	Expression des rekombinanten Proteins in <i>E. coli</i> .....	77
3.6.3	Versuche zur Reinigung des Proteins und Western-Blot-Analyse .....	78
3.7	Erzeugung und Analyse transgener Pflanzen .....	78
3.7.1	Herstellung der Promotor-Gen-Kassetten .....	78
3.7.2	Transformation und Analyse von Kartoffelpflanzen .....	79
3.7.3	Expression der putativen Phosphatase nach Pathogenbehandlung.....	81
3.7.4	Transformation und Analyse von Tabakpflanzen .....	84
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>86</b>
4.1	Identifizierung differentiell exprimierter Gene – „mRNA-Differential Display“ (DDRT-PCR) und cDNA-AFLP.....	86
4.2	Die <i>PP2C</i> , ein Gen mit Homologie zu einer Proteinphosphatase Typ 2C.....	88
4.3	Das <i>ELH</i> , ein Gen mit Homologie zu einem ELIP-Homologen .....	91

4.4	Die <i>PPP</i> , ein Gen mit Homologie zu einer Phosphatmangel-induzierten sauren Phosphatase .....	93
5	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>99</b>
6	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>101</b>
7	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>103</b>
8	<b>ANHANG</b> .....	<b>118</b>

ABA	Abscisinsäure
Acc. No.	Accession Nummer, Zugangsnummer in Datenbanken
AFLP	Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism
Amp <sup>r</sup>	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
AVR	Avirulenz
BAP	Benzylaminopurin
BSA	Rinderserumalbumin
CaMV	cauliflower mosaic virus
cDNA	komplementäre DNA
CDPK	Calciumabhängige Proteinkinase („calciumdependent protein kinase“)
cfu	Kolonieformende Einheit („colony forming unit“)
CHTA	Saure Chitinase (Chitinase A)
C-Terminus	Carboxy-Terminus
cv.	Kultivar
DDRT-PCR	„Differential Display“ RT-PCR
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Deoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
dpi	Tage nach der Infektion („days postinfection“)
DTT	Dithiotreithol
E	Einstein
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELH	ELIP-Homolog
ELIP	frühes, lichtinduziertes Protein („early light induced protein“)
EtOH	Ethanol
<i>F. s.</i>	<i>Fagus silvatica</i>
GA3	Gibberellin A3
HAD	„L-2-haloacid dehalogenases“
hpi	Stunden nach der Infektion („hours postinfection“)
HR	hypersensitive Reaktion
HSP	Hitzeschockprotein („heat shock protein“)
IPTG	Isopropyl-D-thiogalactosid
ISR	Induzierte systemische Resistenz
JA	Jasmonsäure
Kan <sup>r</sup>	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
K <sub>M</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
LB	Luria-Bertani-Medium
<i>M. c.</i>	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>
MAP	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCS	Polylinker („multiple cloning site“)
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MOPS	2-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA („messenger RNA“)
MS-Salze	Murashige-Skoog-Salze
NAA	Naphthylessigsäure
nt	Nukleotid(e)
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
P/C/I	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAL	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
pfu	Plauebildende Einheit („plaque forming unit“)

Pin2	Proteinaseinhibitor II
PP	Phosphatase
PP2C	Proteinphosphatase Typ 2C
PPP	putative saure Phosphatase aus Kartoffel („potato putative
phosphatase“)	
PR	„pathogenesis related“
<i>Psm</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>
pv.	Pathovar
PVP	Polyvinylpyrrolidon
R	Resistenz
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur oder reverse Transkription
RT-PCR	Revers-Transkriptions-Kettenreaktion
s	Sekunde(n)
<i>S. t.</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
SA	Salicylsäure
SAR	systemisch erworbene Resistenz („systemic acquired resistance“)
SAR	systemisch erworbene Resistenz
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
THT	Hydroxycinnamoyl-CoA:Tyramin N-(Hydroxycinnamoyl)transferase
TMV	Tabak-Mosaikvirus
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminoethan
U	Einheiten („units“)
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
v/v	Volumen je Volumen
Wt	Wildtyp
w/v	Masse je Volumen

# 1 Einleitung

Im Unterschied zu höheren Wirbeltieren verfügen Pflanzen nicht über ein hochspezialisiertes Immunsystem, das auf den Kontakt mit Infektionserregern bzw. deren Giften mit Antikörperbildung reagiert und damit zu einer Resistenz bei erneutem Antigenkontakt führt. Es haben sich dennoch eine Vielzahl spezifischer und komplexer pflanzlicher Abwehrmechanismen entwickelt, die dem Schutz vor schädigenden Umwelteinflüssen und Pathogenen dienen. Sie können zum Einen nebeneinander existieren, sich aber auch ergänzen oder überlagern und weisen in ihren Signaltransduktionswegen häufig Parallelen zu den sogenannten "innate immunity pathways" des Säugerimmunsystems auf [1, 2].

Die Aufklärung von pflanzlichen Abwehrmechanismen ist vor allem für landwirtschaftlich genutzte Pflanzen von großer Bedeutung, da resistent werdende Krankheitserreger einen immer höheren Einsatz von Fungiziden und Pestiziden mit z. T. erheblichen Belastungen für die Umwelt erfordern. Durch klassische Züchtungsmethoden, aber auch durch gezielten Einsatz gentechnischer Methoden zur Entwicklung krankheitsresistenter Pflanzenkultivare soll dieser Entwicklung entgegen gewirkt werden.

Ein Beispiel dafür ist die Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.), eine der wichtigsten Kulturpflanzen Europas, die im 16. Jahrhundert aus Südamerika eingeführt wurde. Sie entwickelte sich im 18. Jahrhundert aufgrund ihres problemlosen Anbaus, ihrer guten Lagerfähigkeit und eines ausgewogenen Nährstoffgehaltes zu einem Hauptnahrungsmittel. Neben Rost, Brand und Mehltau ist die Kraut- und Knollenfäule die schwerwiegendste Krankheit der Kartoffel. Diese wird durch den Oomyzeten *Phytophthora infestans* hervorgerufen. Die Sporen werden durch Wind und Regen übertragen und keimen auf den Blättern aus. Dies führt zunächst zur Bildung wässriger Läsionen und später über verschiedene Krankheitsstadien zur Vernichtung der Pflanze. Symptome sind gelblich-grüne ölige Flecken und zum Teil grau-weißer Myzelflaum. Befallene Knollen, die eine Infektionsquelle in Lagerbeständen darstellen, zeigen unregelmäßige braungraue Flecken und sind bis ins Knolleninnere braun und trockenfaulig [3, 4]. Um die erheblichen Ertragseinbußen einzudämmen, die diese Krankheit verursacht (1843-1847 Irland, 1917/18 Deutschland, 1994/95 USA), ist gegenwärtig ein kostenintensiver und umweltbelastender Fungizideinsatz notwendig. Daher ist das Interesse an alternativen Methoden zur Bekämpfung der Kraut- und Knollenfäule groß. Ein kurzzeitiger Züchtungserfolg konnte z. B. erzielt werden, indem Resistenzgene gegen verschiedene *P. infestans*-Rassen aus den Wildtypformen *Solanum demissum* und *Solanum commersonii* in kultivierte Kartoffelsorten eingekreuzt wurden [5]. Einen weiteren Ansatzpunkt stellt das sogenannte „Genetic engineering“ dar. Dabei wird mittels gentechnologischer Verfahren ein einzelnes isoliertes und charakterisiertes Resistenzgen in anfällige Kultivare eingebracht [6, 7, 8]. Bei einem neueren Verfahren wird ein Gen für einen Elicitor unter Kontrolle eines pathogeninduzierbaren Promotors in der Pflanze exprimiert, so daß es bei einem Pathogenbefall zur hypersensitiven Reaktion und zur Initiierung von Abwehrreaktionen kommt [9].

Erkenntnisse über die molekularen Grundlagen der Pathogenerkennung und -abwehr stehen deshalb im Mittelpunkt des Interesses der Phytopathologie und sind Gegenstand des nachfolgenden Überblicks.

## 1.1 Genetische Grundlagen der pflanzlichen Resistenz

Pflanzen sind in ihrer natürlichen Umgebung fortlaufend dem Angriff von Insekten, Viren, Viroiden, Pilzen, Bakterien und Nematoden sowie schädigenden Umwelteinflüssen ausgeliefert. Nur in wenigen Fällen kommt es dabei zu einem Krankheitsausbruch. Grund hierfür sind die verschiedenen Resistenz- und Abwehrmechanismen [10, 11].

Die am weitesten verbreitete Form der Resistenz ist die Basis- bzw. **Nichtwirtsresistenz**, bei der eine Pflanzenspezies keinen Wirt für ein spezifisches Pathogen darstellt, da das Pathogen die konstitutiven bzw. induzierten Abwehrmechanismen nicht durchbrechen kann [12]. Ein Beispiel dafür ist die Interaktion des Oomyceten *Phytophthora sojae* (Sojapathogen) mit Petersilie (*Petroselinum crispum* L.).

Nur in wenigen Fällen kommt es in einer kompatiblen Interaktion zwischen einer Pflanze mit einem Pathogen zur Krankheitsausbildung. Dabei ist die Pflanze suszeptibel und das Pathogen virulent. Hierfür ist die Interaktion des Kartoffel-Kultivars Désirée mit dem Oomyceten *Phytophthora infestans* ein Beispiel. Die zweite Form der Resistenz, die sich im Laufe der Evolution als Folge der Koexistenz von Pflanze und Pathogen herausgebildet hat und sich auch weiterhin entwickelt, ist die Sorten-spezifische bzw. **Wirtsresistenz** eines an sich suszeptiblen Pflanzenkultivars gegenüber einer physiologischen Rasse eines Pathogens [12, 13].

Die Wirtsresistenz wird nochmals in die horizontale (multigene) und vertikale (monogene) Resistenz unterteilt [4]. Die horizontale Resistenz wird auch als generelle, unspezifische bzw. Feldresistenz bezeichnet und ist polygen bedingt. Dabei ist eine Wirtspflanze gegenüber allen Rassen eines Pathogens resistent, was sich in einer verringerten Infektionsrate und einem langsameren Wachstum des Pathogens zeigt. Die genetischen Grundlagen sind bisher nicht geklärt.

Die zweite Form der Wirtsresistenz ist die vertikale Resistenz. Sie ist rassenspezifisch und beruht auf dem Vorhandensein eines Avirulenz- und eines komplementären Resistenz-Genproduktes. Sie wird mit der Gen-für-Gen-Hypothese erklärt [14]: treffen ein Pathogen mit einem Avirulenzgen und eine Pflanze mit einem korrespondierenden Resistenzgen aufeinander, so kommt es, ausgelöst durch einen vom Pathogen freigesetzten rassenspezifischen Elicitor, im Allgemeinen zu einer Abwehrreaktion der Pflanze, der hypersensitiven Reaktion [15]. Eine solche Interaktion wird als inkompatibel bezeichnet, das Pathogen ist in diesem Fall avirulent und die Pflanze resistent. Fehlt dagegen entweder das Avirulenzgen des Pathogens oder das komplementäre Resistenzgen der Pflanze, kommt es zur sogenannten kompatiblen Interaktion, die Pflanze ist suszeptibel und das Pathogen virulent [16].

Zahlreiche Resistenz- und Avirulenzgene wurden in den letzten Jahren isoliert und charakterisiert [17, 18, 19]. Es werden virale, bakterielle und pilzliche Avirulenzgene (*Avr*-Gene) unterschieden, deren Produkte, die Avirulenzproteine, als rassenspezifische Elicitoren wirken können und direkt an einen membranständigen Rezeptor oder ein *R*-Gen-Produkt innerhalb der pflanzlichen Zelle binden können. Gut charakterisierte bakterielle Avirulenzgene sind beispielsweise *avrPto* und *avrPt2* aus *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *avrRPM1* aus *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, *avrXa21* aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* sowie die *avrBs3*-Familie aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* [20]. Auffällig ist, daß diese bakteriellen *avr*-Gene die Anwesenheit von *hrp*-Genen erfordern, die für das TypIII-Sekretionssystem kodieren und die Sekretion der AVR-

Proteine in die pflanzliche Zelle ermöglichen [21]. *Avr*- und *hrp*-Gene sind z. T. in Genclustern lokalisiert und werden coreguliert [22]. Pilzliche Avirulenzgene sind das Gen *avr-Pita*, das vermutlich für eine Metalloprotease kodiert [23] sowie die *Avr-Gene* 2, 4, 5, und 9 aus *Cladosporium fulvum*.

Den Avirulenzgenen stehen die pflanzlichen Resistenzgene (*R*-Gene) gegenüber, deren Proteine aufgrund ihrer strukturellen Merkmale in fünf verschiedene Klassen eingeteilt werden [1, 18, 19, 24]: intrazelluläre Proteinkinasen, rezeptorähnliche Proteinkinasen mit einer extrazellulären LRR-Domäne (leucin-rich repeat), intrazelluläre LRR-Proteine mit einer Nukleotidbindungsstelle (Nucleotide Binding Site, NBS) und einem LZ-Motif (Leucine Zipper), intrazelluläre NBS-LRR-Proteine mit einer Region mit Ähnlichkeit zur cytoplasmatischen Toll/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne von Säugern bzw. aus *Drosophila* (TIR) und membrangebundene extrazelluläre LRR-Proteine [25].

Bisher konnten nur zwei molekulare Interaktionen zwischen einem *R*- und dem korrespondierenden *avr*-Gen-Produkt nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich einerseits um die Interaktion zwischen AVR<sub>Pto</sub> aus *P. syringae* pv. *tomato* und dem von Tomate gebildeten *R*-Gen-Produkt Pto, einer Serin-Threonin-Kinase [26]. Weiterhin wurde eine direkte Interaktion zwischen dem von *Magnaporthe grisea* exprimierten AVR-Pita und dem Pi-ta aus Reis gezeigt [23].

## 1.2 Konstitutive und induzierte Abwehrmechanismen

Zur konstitutiv präformierten Abwehr zählen vor allem mechanische Barrieren wie verdickte Zellwände (auch mit Lignin- und Suberineinlagerungen), die Cuticula mit aufgelagerten Wachsschichten, die das Eindringen von Phytopathogenen erschweren oder verhindern, aber auch von der Pflanze abgesonderte phenolische Verbindungen, Inhibitoren lytischer Enzyme, Saponine und weitere, für die Pathogene toxische Verbindungen [4]. Ein Beispiel hierfür ist auch das kürzlich aus Kartoffelknollen isolierte antimikrobielle Peptid Snakin-1, das die Aggregation von Bakterien bewirkt und dem vermutlich eine Funktion beim Schutz von reproduktiven und Speicher-Organen zukommt [27].

Ergänzend zu den konstitutiven Abwehrmechanismen existieren weitere aktive, induzierte Mechanismen, die es einer Wirtspflanze ermöglichen, einer Pathogenattacke zu widerstehen. Diese können sowohl durch Pathogene selbst als auch durch Verwundung und chemische Noxen hervorgerufen werden und beruhen häufig auf der Transkriptionsaktivierung bestimmter Gene [28, 29].

Man unterscheidet sehr schnelle (innerhalb von Minuten ablaufende), schnelle (über Stunden andauernde) und langsame (Tage bis Monate anhaltende) Reaktionen einer Pflanze auf einen Pathogenbefall. Unmittelbar nach dem Pathogenbefall kommt es zur Kallosebildung und Einlagerung phenolischer Verbindungen wie Lignin und Suberin in die Zellwand direkt an der Penetrationsstelle des Pathogens. Zu den sehr schnellen Reaktionen zählt auch die Synthese extrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, das Hydroxylradikal OH<sup>•</sup> und das Superoxidradikal O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). Diese reaktiven Sauerstoffspezies haben sowohl eine direkte toxische Wirkung auf Pathogene als auch Funktionen beim oxidativen Crosslinking der Zellwand und bei der Auslösung der hypersensitiven Reaktion [30, 31]. Der als „oxidative burst“ bezeichnete Prozeß ist der Synthese von ROS in humanen Makrophagen ähnlich [12, 32].

Die hypersensitive Reaktion (HR), die durch spezifische oder generelle Elicitoren (s. 1.2.2) ausgelöst wird, wird sowohl in Wirts- als auch Nichtwirtspflanzen hervorgerufen und ist durch einen lokalisierten Zelltod an der Infektionsstelle gekennzeichnet [1, 12]. Diese so entstandenen Nekrosen entziehen dem Pathogen die Nährstoffgrundlage, so daß es zu keiner weiteren Ausbreitung des Pathogens in der Pflanze kommt.

Außerdem entstehen und akkumulieren Signalsubstanzen wie Stickoxid, Jasmonat, Salicylat und Ethylen, die dann wiederum in die Signaltransduktionskaskaden eingebunden sind (s. 1.2.2).

### 1.2.1 Pathogen- und streßinduzierte Genaktivierung

Neben den oben genannten sehr schnellen Abwehrreaktionen kommt es nachfolgend zu Veränderungen in der Genaktivität. Hervorzuheben ist hierbei die Induktion von PR-Genen (pathogenesis-related genes), die zur Synthese der PR-Proteine führt. Als PR-Proteine werden Polypeptide bezeichnet, die in der gesunden Pflanze nicht akkumulieren sondern erst nach Pathogenattacken bzw. unter bestimmten Streßbedingungen synthetisiert werden. Die PR-Proteine weisen eine große Komplexität auf und werden in 14 verschiedene Familien eingeteilt (PR 1-PR 14) [33].

Zur Familie 1 gehören die Proteine des Typs PR 1, die zunächst aus mit TMV infizierten Tabakblättern isoliert wurden und später auch in Tomate, Kartoffel, *Arabidopsis*, Mais, Weizen und Gerste gefunden wurden. Alle PR 1-Proteine besitzen ein N-terminales Signalpeptid, das für den Transport der Proteine ins endoplasmatische Retikulum verantwortlich ist: die sauren Formen der PR 1-Proteine werden in den Interzellularraum sekretiert, die basischen akkumulieren in der Vakuole. Allerdings ist bisher keine Funktion der PR 1-Proteine bekannt.

Dagegen ist bekannt, daß die PR-Proteine der Familie 2, die 1,3- $\beta$ -Glucanasen *in vitro* antifungale Wirkung zeigen. 1,3- $\beta$ -Glucanasen werden in 3 Klassen eingeteilt: Klasse 1, basische Glucanasen, die in der Vakuole akkumulieren; Klasse 2, saure Isoformen, die extrazellulär zu finden sind und die Klasse 3, die ebenfalls saure, extrazelluläre Proteine sind. Sie wurden u. a. in Kartoffel [34], Tomate [35], Tabak [36], Paprika [37] und *Arabidopsis* [38] gefunden und zeigen eine starke Akkumulation nach Pathogenbefall.

Zur Familie 3 der PR-Proteine zählen die Chitinasen, die ebenfalls pilzliches Wachstum hemmen, indem sie die Hauptkomponenten der pilzlichen Zellwand, das Chitin ( $\beta$ -1,4-N-Acetylglucosamin), hydrolisieren [39]. Sie werden in die Klassen I-V unterteilt, wobei zur Klasse I die in der Vakuole lokalisierten basischen Isoformen gehören und zur Klasse II die extrazellulären sauren Isoformen. Aufgrund großer Sequenzunterschiede werden die Chitinasen der Klasse III zur Familie 8 der PR-Proteine gezählt. Chitinasen der Klasse IV unterscheiden sich zu denen der Klasse I durch ihre Größe, und Klasse V-Proteine zeigen keine Sequenzähnlichkeiten zu pflanzlichen Chitinasen sondern zu bakteriellen Exochitinasen [40]. Chitinasen wurden nach Pathogenbefall aber auch nach Behandlung mit Phytohormonen und Ethylen u. a. in Zuckerrübe, Kohl, Bohne, Mais, Tabak, Kartoffel, Tomate, Gurke und Petersilie [41] nachgewiesen. Für Chitinasen A und B aus Kartoffel konnte gezeigt werden, daß sie nach Pathogeninfektion, Elicitor-, Salicylsäure- und Ethylenbehandlung und nach Verwundung akkumulieren [42]. Außerdem wurde ein neuer Typ, der Chitinase-Typ C (ChtC) isoliert, dessen mRNA ebenfalls nach Pathogeninfektion, Elicitor- und Ethylenbehandlung sowie nach Verwundung akkumuliert [40].

Die größte antifungale Wirksamkeit erreichen die basischen, vakuolär lokalisierten Isoformen der Glucanasen (Familie 2) und Chitinasen (Familie 3) im Zusammenspiel, während den sauren Chitinasen mit geringerer antifungaler Wirkung eine Rolle bei der Ausprägung der SAR zugewiesen wird (s. 1.2.3) [33].

Eine kleine und weniger gut untersuchte Gruppe mit unbekannter Funktion stellen die PR-Proteine der Familie 4 dar. Die aus Tabak und Tomate isolierten Proteine sind den wundinduzierten Proteinen Win 1 und 2 aus Kartoffel ähnlich, wohingegen andere PR 4-Proteine, z. B. aus *Arabidopsis*, als strukturelle Gemeinsamkeit eine chitinbindende Funktion bzw. eine Hevein-Domäne zeigen. Das Hevein als Hauptbestandteil des Latex stellt ein Homolog Chitin-bindender Domänen aus Pflanzen dar.

Zur Familie 5 der PR-Proteine zählen die Thaumatin-ähnlichen Proteine bzw. die Osmotine. Sie wurden aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeiten zum Thaumatin, einem süß schmeckenden Protein aus *Thaumatococcus daniellii*, zu einem Trypsin/ $\alpha$ -Amylase-Inhibitor aus Mais und zum Osmotin aus salzgestreßten Tabakzellkulturen dieser Familie zugeordnet. Proteine der Familie 5 wurden bisher aus Tabak, Tomate, Kartoffel [43], Gerste, Weizen [44], Paprika [37] und *Arabidopsis* [45, 46] nach Pathogeninfektion, ABA- und Ethylenbehandlung, Salz- und Trockenstreß sowie Verwundung gefunden. Aber auch in Samenkörnern von Gerste, Mais, Flachs, Hafer, Hirse und Weizen wurden Thaumatin-ähnliche Proteine identifiziert, die das Wachstum von *Candida albicans* inhibieren [47]. PR 5-Proteine besitzen antifungale Wirkung, die im Falle des Zeamatins (PR 5-Protein aus Mais) auf eine Permeabilisierung der pilzlichen Membran zurückgeführt wird [47]. Diese Wirkung gegen Pilze und *Oomyceten*, die sich in einer erhöhten Toleranz gegenüber einer Infektion mit *P. infestans* äußert, wurde in transgenen Kartoffelpflanzen, die ein Osmotin-ähnliches Protein konstitutiv exprimieren, gezeigt [43].

Proteinase-Inhibitoren (Familie 6 der PR-Proteine) zählen nicht zu den klassischen PR-Proteinen, da sie nach Verwundung und Insektenfraß bzw. entwicklungspezifisch akkumulieren. Sie inhibieren die von pflanzenschädigenden Insekten abgesonderten Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metallo-Proteinasen, die die Freisetzung von pflanzlichen Aminosäuren katalysieren [48]. Isoliert wurden Proteinase-Inhibitoren u. a. aus Tabak, Mais [49], Tomate und Kartoffel [50]. Konstitutiv exprimierte Proteinase-Inhibitoren in verschiedenen Pflanzen führen zu einem Absterben von pflanzenschädigenden Insekten [48, 51].

Weniger bekannt ist über die PR-Proteine der Familien 7, 8, 9 und 10. Zur Familie 7 gehören pathogeninduzierte Proteinasen aus Tomate. Familie 8 umfaßt Chitinasen der Klasse III aus Gurke, Tabak, Bohne und Kichererbse, wobei die basische Isoform des Enzyms aus Tabak Lysozymaktivität zeigt. Die pathogeninduzierten, anionischen, extrazellulären, Lignin-formenden Peroxidasen verschiedener Spezies, die aber auch in physiologische Prozesse involviert sind, zählen zur Familie 9. Als intrazelluläre Proteine (IPR) werden die Proteine der Familie 10 bezeichnet, die sowohl nach Pathogenbefall als auch streßbedingt und entwicklungspezifisch akkumulieren, für die aber bisher keine Funktionen bekannt sind [52, 53, 54]. Eine Ausnahme bildet das LaPR-10 aus Lupine, für das eine Ribonukleaseaktivität gezeigt werden konnte [55]. Zur Familie 11 der PR-Proteine zählen Chitinasen der Klasse V aus Tabak.

Antimikrobielle Peptide, die sowohl als präformierte Komponenten fungieren als auch nach Pathogenbefall akkumulieren, sind Teil der pflanzlichen Abwehr. Zu den antimikrobiellen Peptiden zählen Defensine (Proteine der Familie 12), Thionine (Proteine der Familie 13), die

durch Änderung der Membranpermeabilität antibakteriell und antifungal wirken, Lipid-Transfer-Proteine (Proteine der Familie 14) und andere Peptide [56].

Neben den PR-Genen, die durch Pathogene aber auch durch andere schädigende Umwelteinflüsse aktiviert werden, akkumulieren weitere Proteine streßaktivierter Gene, von denen einige näher erwähnt werden sollen.

Die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) ist ein Schlüsselenzym des Phenylpropanstoffwechsels und Ausgangspunkt für die Synthese von zahlreichen phenolischen Komponenten wie Flavonoide, Anthozyan und Tannin. Diese sind als Schutzstoffe gegen biotischen und abiotischen Streß (Phytoalexine, Antioxidantien), als Pigmente aber auch als Signalsubstanzen von Bedeutung [57]. Die Regulierung der PAL erfolgt einerseits entwicklungspezifisch durch endogene Phytohormone und andererseits durch äußere Stimuli wie Pathogenbefall, Elicitoren, UV-Bestrahlung, Kälte und Verwundung [58].

Ebenfalls sowohl entwicklungspezifisch als auch differentiell exprimiert sind Calmodulin-Gene, deren Produkte die bestuntersuchten calciumbindenden Proteine mit multifunktionellem Regulationspotential darstellen. So sind die verschiedenen Isoformen durch Regulation des intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Spiegels an der Sensibilisierung bzw. Desensibilisierung abiotischer (Licht, Hitze, Kälte, Trockenheit, Chemikalien, Verwundung) und biotischer (Pathogene, Elicitoren) Reize beteiligt. Zielstrukturen der Calmoduline sind dabei verschiedene Enzyme wie NAD-Kinasen,  $Ca^{2+}$ -ATPasen und Proteinkinasen [59, 60]. Pflanzliche Lipoxygenasen spielen außer bei Keimung, Fruchtreifung und Seneszens eine große Rolle bei der Streßantwort und akkumulieren vor allem nach Pathogenattacken, Elicitorbehandlung und Verwundung [61, 62]. Lipoxygenasen sind die ersten Enzyme des Lipoxygenaseweges und oxidieren ungesättigte Fettsäuren (Linolensäure) zu Hydroperoxiden. Diese Hydroperoxide als hochreaktive Moleküle können entweder direkt gegen Bakterien wirken oder gehen u. a. in den Peroxygenase-, Lyase- bzw. Allenoxidsynthese-Weg ein und führen zur Synthese verschiedener Oxylipine u. a. zu Jasmonsäure, einem bedeutenden pflanzlichen Signalmolekül (s. 1.2.2) aus dem Allenoxid-Synthese-Weg [63, 64].

Ausgehend von einer Signalerkennung an oder in einer pflanzlichen Zelle, werden Signale generiert, die die aufgeführten Gene über verschiedene Signaltransduktionswege transkriptionell aktivieren. Diese pathogen- und streßaktivierten Gene sind oftmals nicht nur im geschädigten und daran angrenzenden Gewebe exprimiert, sondern werden nachfolgend, als langsame Reaktion auf Pathogenbefall, auch in entfernter liegenden ungeschädigten Geweben bzw. Pflanzenteilen exprimiert und führen dort zu einer erhöhten Resistenz gegen ein breites Spektrum von Pathogenen. In diesem Fall handelt es sich um die systemisch erworbene Resistenz (SAR, s. 1.2.3).

### 1.2.2 Signaltransduktionskaskaden

Voraussetzung für die Initiierung von Signaltransduktionskaskaden, die zur Auslösung von Abwehrreaktionen führen, ist die Erkennung eines vom Pathogen freigesetzten Elicitors durch pflanzliche Rezeptoren, die membranständig oder intrazellulär lokalisiert sein können [19, 65].

Dabei werden rassenspezifische und generelle Elicitoren unterschieden. Die rassenspezifischen Elicitoren sind im weitesten Sinne Produkte von Avirulenzgenen (s. 1.1).

Bei den generellen Elicitoren handelt es sich um strukturell verschiedenartige Substanzen wie Proteine, Glycoproteine, Fettsäuren, Lipopolysaccharide und Oligosaccharide, die meistens Bestandteile der pilzlichen Zellwand sind und aus dieser direkt oder durch pflanzliche, hydrolytische Enzyme aus ihr freigesetzt werden [31].

Durch die transiente Änderung der Permeabilität der Plasmamembran kommt es zur Öffnung von Ionenkanälen, was zum Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{H}^+$  sowie zum Ausstrom von  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  führt. Der erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ - Spiegel bewirkt einerseits die Auslösung von Proteinphosphorylierungskaskaden, die die wichtigsten posttranskriptionellen Regulationsmechanismen darstellen (Aktivierung von Mitogen-aktivierte Proteinkinasen, MAP-Kinasen [31, 66, 67, 68] und CDPK [69]). Eine direkte Beteiligung von MAP-Kinasen in der Pathogenabwehr wurde für Tabak gezeigt. Die konstitutive Expression von *NtMEK2*, einer MAPK-Kinase, führt zu einem HR-ähnlichen Zelltod und der Expression von Abwehrgenen [70]. Andererseits führt der erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ - Spiegel zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), dem „oxidative burst“ [31, 71]. Dieser „burst“ kann biphasisch auftreten: ein erster, schwächerer direkt an der Angriffsstelle des Pathogens, der sowohl in der kompatiblen als auch in der inkompatiblen Interaktion auftritt und ein zweiter, der nur in der inkompatiblen Interaktion auftritt und zum Absterben der Pflanzenzelle, den hypersensitiven Zelltod, führt [72]. Dabei konnte gezeigt werden, daß ROS notwendig, aber nicht ausreichend für den hypersensitiven Zelltod sind [73].

Neben den unter 1.2 erwähnten Abwehrreaktionen führt der durch ROS ausgelöste hypersensitive Zelltod zur Induktion von Abwehrgenen. Gezeigt wurde die Bedeutung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei der Etablierung der Pathogenresistenz anhand von transgenen Pflanzen. So zeigen Kartoffelpflanzen, die das  $\text{H}_2\text{O}_2$ -generierende Enzym Glucose-Oxidase konstitutiv exprimieren, erhöhte Resistenz gegenüber *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* [74]. Ebenso weisen transgene Tabak-Pflanzen, denen das  $\text{H}_2\text{O}_2$ -abbauende Enzym Catalase I fehlt, eine erhöhte Pathogenresistenz auf [75]. Eine Beteiligung von ROS im Abwehrprozeß konnte auch in *Arabidopsis* gezeigt werden: einem eng begrenzten „oxidative burst“ folgen kleinere, sogenannte „microbursts“ im entfernteren Gewebe und die Ausprägung der SAR [76].

In jüngster Zeit wird auch die Rolle von NO im Signaltransduktionsprozeß diskutiert. Es wird ein synergistischer Effekt von ROS, NO und Salicylsäure bei der Auslösung der Pathogenabwehr bestätigt [77].

Bisher ist die Bedeutung der HR für die lokale und systemische Genaktivierung und Resistenzantwort ungeklärt [78]. *Arabidopsis*-Mutanten, mit deren Hilfe die Bedeutung des hypersensitiven Zelltods bei der Induktion von PR-Genen und der Ausprägung der SAR aufgeklärt werden können, sind die sogenannten „lesion mimic mutants“ *Isd1* (lesions simulating disease), die in Abwesenheit von Pathogenen HR-ähnliche Läsionen zeigen und die PR-Proteine akkumulieren [79] sowie die Mutante *dnd1* (defense, no death), die nach Pathogenbehandlung keine HR ausprägt, aber dennoch erhöhte Resistenz gegenüber einem breiten Spektrum von Pathogenen zeigt [80]. Transgene Kartoffelpflanzen, die die bakterielle lichtabhängige Protonenpumpe Bacterio-Opisin konstitutiv exprimieren und einen „lesion mimic“ Phenotyp aufweisen, zeigen einen erhöhten Salicylsäuregehalt und erhöhte Pathogenresistenz [81].

Ein weiteres Gen, das für ein Protein der Signaltransduktion kodiert, ist das Gen *NDR1* (non-race-specific disease resistance) aus *Arabidopsis*. *NDR1* scheint ein membrangebundenes

Protein zu sein, dessen Funktion noch ungeklärt ist. Mutationen im Gen führen zu einer erhöhten Anfälligkeit gegen verschiedene Pilz- und Bakterienrassen [82].

Bekannte endogene Signalmoleküle im Transduktionsprozeß sind Salicylsäure, Ethylen sowie Jasmonsäure und deren Derivate, wobei die Signale unterschiedlicher Stimuli wie Pathogenattacken, Verwundung und Umweltstreß in einem Netzwerk einzelner Signaltransduktionswege integriert werden und auf diese Weise effizient verstärkt und weitergeleitet werden [83]. Es ist seit langem bekannt, daß die

### *Salicylsäure (SA)*

dabei eine Schlüsselposition sowohl bei der lokalen Abwehr als auch bei der Ausprägung der SAR einnimmt (ein Phänomen, auf das unten näher eingegangen wird) [84, 85]. Die Biosynthese, der eine Akkumulation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vorausgeht [86] und die durch Genaktivierung der beteiligten Enzyme ausgelöst wird, führt von Phenylalanin über Zimt- und Benzoesäure zur Salicylsäure [87]. Daran kann sich eine Glycosylierungsreaktion anschließen, so daß das SA-β-Glycosid als inaktive Speicherform vorliegt [88]. Für die am besten untersuchten Pflanzen Tabak, Gurke und *Arabidopsis* wird deutlich, daß ein ansteigender SA-Gehalt nicht nur notwendig sondern auch ausreichend ist, um die SAR auszuprägen [89]. Ein Beispiel hierfür sind *Arabidopsis*-Mutanten, die ein Hybrid-Gen aus zwei bakteriellen Genen der Salicylsäuresynthese exprimieren. Das führt zu einem erhöhten cytosolischen SA-Gehalt und einer erhöhten Resistenz [90]. Übereinstimmend damit zeigen Tabakpflanzen, die die bakterielle Salicylathydroxylase konstitutiv exprimieren (*nahG*-Pflanzen), keine SA-Akkumulation und sind nicht in der Lage, SAR auszuprägen [91].

Hohe basale SA-Level wurden in Reis und Kartoffel gefunden. In diesem Fall wird angenommen, daß die SA-Sensitivität nach einem Pathogenbefall zunimmt [92].

Für die Gene *eds1* (enhanced disease susceptibility) und *pad4* (phytoalexin-deficient) wurden Sequenzhomologien zu eukaryotischen Triacylglycerol-Lipasen gefunden [93, 94]. Sie kodieren für Proteine, die vermutlich an der Regulierung der SA-Akkumulation beteiligt sind. Mutationen in beiden Genen führen zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber verschiedenen Pathogenen. Ebenso zeigen die *Arabidopsis*-Mutanten *sid1*- und *sid2* (salicylic acid-induction deficient) bei fehlender SA-Akkumulation erhöhte Pathogenanfälligkeit. Höchstwahrscheinlich kodieren *SID1* und *2* für Proteine der SA-Biosynthese [95].

Ob SA ein mobiles Signal bei der Auslösung der SAR darstellt, wird kontrovers diskutiert. Einerseits wurde SA im Phloem pathogeninfiltrierter Tabak- und Gurkenpflanzen gefunden, andererseits zeigen Pfropfungsexperimente mit *nahG*-Pflanzen, daß SA nicht das mobile Signal ist [96]. In einem Mutantenscreen wurde die *Arabidopsis*-Mutante *dir1* (defective in induced resistance) mit einer Mutation in einem Lipid-Transfer-Protein identifiziert, die kein Signalmolekül weiterleitet und keine SAR zeigt [97]. Lipid-Transfer-Proteine stellen also ebenso wie SA selbst mögliche mobile Signale dar. Außerdem wird Methylsalicylat als flüchtiges Signalmolekül postuliert, das von mit TMV infizierten Tabakblättern freigesetzt wird und in benachbarten nicht infizierten Pflanzen zu erhöhter Resistenz gegen TMV und zur *PR 1*-Induktion führt [98].

Zur Aufklärung der unterschiedlichen Wirkungsweisen von SA innerhalb der Resistenzantworten wird nach salicylsäurebindenden Proteinen gesucht. Das erste identifizierte salicylsäurebindende Protein (SABP1) ist eine Catalase aus Tabak [99, 100],

die durch SA inhibiert wird und die an der Regulation von Redoxprozessen beteiligt sein könnte. Ein weiteres Protein mit hoher Affinität zu SA ist das SABP2, für das aufgrund seiner Bindungskonstanten und der Inhibitorkonzentration eher eine Rezeptorfunktion denkbar wäre als für SABP1 [101].

Als Teil der Signaltransduktion, die zur *PR*-Gen-Expression führt, wurde eine MAP-Kinase in Tabak identifiziert, die durch SA induzierbar ist (SIPK; SA-inducible protein kinase [102]). Eine weitere Komponente dieser Signaltransduktion stromabwärts der SA-Akkumulation ist NPR1. Mutationen im Gen *npr1* (nonexpresser of PR genes), auch als *nim1* (noninducible immunity) bzw. *sai1* (salicylic acid insensitive) bezeichnet, verhindern die Ausprägung der SAR und die salicylsäurevermittelte Induktion von *PR*-Genen [96], wohingegen *Arabidopsis*-Mutanten, die *NPR1* überexprimieren, eine erhöhte Resistenz gegenüber verschiedenen Pathogenen zeigen [103]. NPR1 ist ein lösliches Protein mit Sequenzähnlichkeiten zum I $\kappa$ B-Protein (einem Transkriptionsregulator der Säugetiere) und 4 Ankyrin-repeats. Diese sind für eine kernlokalisierte Interaktion mit einer Unterklasse von bZIP-Transkriptionsfaktoren (basische Leucin-Zipper-Proteine), der TGA-Familie, verantwortlich [104]. Durch einen Hefe-Zwei-Komponenten-Screen konnte gezeigt werden, daß dieser Protein-Protein-Komplex dann in Wechselwirkung mit einem SA-responsiven Promotorelement des *PR 1*-Gens tritt, so daß es nachfolgend zur *PR 1*-Aktivierung kommt [105]. Weitere nach Pathogenbefall akkumulierende Transkriptionsfaktoren der SA-vermittelten Induktion von Abwehrreaktionen sind MYB1, ein Homolog des *myb*-Onkogens aus Tabak [106] und tWRKY3 und tWRKY4 aus Tabak [107]. Während die bZip- und Myb-Transkriptionsfaktoren sowohl in pflanzlichen als auch tierischen Organismen gefunden wurden, scheinen die WRKY's pflanzenspezifisch zu sein [108, 109]. Die korrespondierenden Gene wurden in verschiedenen Pflanzenarten identifiziert und sind durch Viren, Bakterien und *Oomyceten*, aber auch durch SA, deren Analoga und weitere Stressoren induzierbar. Die Proteine enthalten die für WRKY's konservierte Aminosäuredomäne WRKYGQK, die für die Bindung an W-Boxen in der Promotorregion verschiedener *PR*-Gene verantwortlich zu sein scheint.

Außerdem wird eine Beteiligung der SA an einer Rückkopplungsreaktion der O<sub>2</sub><sup>-</sup>-generierenden Peroxidaseaktivität vermutet [86].

Neben der salicylsäurevermittelten Genaktivierung gibt es auch den salicylatunabhängigen Weg bei der Etablierung der SAR, bei dem die Phytohormone

#### *Ethylen und Jasmonsäure (JA)*

bzw. deren Derivate, die Jasmonate, eine bedeutende Rolle spielen [110].

Deutlich wird das durch einen Anstieg des Ethylengehaltes während der HR nach Pathogenbefall und Verwundung, was zu Abwehrreaktionen wie beschleunigter Seneszenz, Abtrennen befallener Organe und Induktion spezifischer Gene führt [111], wobei die Signaltransduktion von der Perzeption bis zur Geninduktion weitgehend unbekannt ist. Signaltransduktionsmutanten mit veränderter Ethylenantwort sind die insensitiven Mutanten vom *etr1/ein1*-Typ bzw. die *ctr1*-Mutante, die in Abwesenheit von Ethylen den „triple response“-Phänotyp ausprägen. Die Gene kodieren für Rezeptoren, die dem bakteriellen Zweikomponentensystem von Histidin-Kinase-Rezeptoren (*etr1/ein1*) bzw. der Raf-Proteinkinase-Familie (*ctr1*) ähnlich ist [112]. CTR1 wird stromabwärts vom ETR1-Rezeptor eingeordnet. Außerdem wurden die sogenannten EREBPs (ethylene-responsive element

binding proteins), Proteine, die in Anwesenheit eines hohen Ethylengehaltes akkumulieren und an *cis*-Elemente ethylenresponsiver Gene binden, identifiziert [112].

Als flüchtiges interzelluläres und interpflanzliches Signalmolekül kann Methyljasmonat fungieren [113].

Eng verbunden mit dem wundvermittelten Anstieg des Ethylengehaltes ist die Erhöhung des Jasmonsäure- bzw. Jasmonatgehalts. Dies geschieht durch die wund- und/oder elicitorvermittelte Freisetzung und Akkumulation von JA aus Linolsäure über den Lipoxygenaseweg in Anlehnung an die Prostaglandinsynthese der Säuger [114]. Ein erhöhter JA-Gehalt bzw. exogen applizierte JA führen u. a. zur transkriptionellen Aktivierung von Genen für Proteinaseinhibitoren (*Pin2*) in Kartoffel [115], für Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (*Pal*), für verschiedene Lipoxygenasen sowie für *Thi2.1* und *PDF1.2* in *Arabidopsis*. Die beiden letztgenannten Gene kodieren für kleine, cysteinreiche basische Proteine, Defensin (PR 12) und Thionin (PR 13), mit antimikrobieller Wirkung [110]. Die Bedeutung der JA für die Genaktivierung, den Signaltransduktionsweg und die Interaktionen zwischen dem salicylatabhängigen und –unabhängigen Weg werden mit Hilfe von Mutanten aufgeklärt. JA-defiziente Mutanten sind die „triple fad“-Mutanten, die keine dreifach ungesättigten Fettsäuren und damit auch keine JA synthetisieren können und eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber dem Bodenpathogen *Pythium mastophorum* zeigen, die sich aber durch JA-Zugabe überwinden läßt [116]. In der *coi1*-Mutante (coronatine-insensitive), einer in der JA-Perzeption beeinträchtigten Mutante, führt die exogene Applikation von JA dagegen nicht zu einem Schutz gegen das Bodenpathogen *P. mastophorum* [117]. Weitere Mutanten sind die jasmonatinsensitiven Mutanten *jar1* (jasmonate-resistant) sowie die pathogenanfälligeren Mutanten *jin1* und *jin4* (jasmonate-insensitive), die Veränderungen in der Aktivierung jasmonatregulierter Gene aufweisen [118].

Ob in *Arabidopsis* die salicylsäureabhängige oder –unabhängige Signaltransduktionskaskade abläuft, scheint auch von der Art und Wirkungsweise des angreifenden Pathogens abzuhängen: biotrophe Bakterien lösen die salicylsäureabhängige Abwehr aus, nekrotrophe Bakterien dagegen die jasmonat-/ethylenabhängige, wobei es dennoch zu Überlagerungen, Potenzierung oder Inhibierung der Signaltransduktionskaskaden innerhalb eines komplexen Netzwerkes kommen kann [110, 119, 120]. So konnte beispielsweise gezeigt werden, daß der Regulationsfaktor NPR1 sowohl an der SA-abhängigen PR-Gen-Expression als auch an der jasmonat- und ethylenabhängigen Resistenz beteiligt ist [110, 121].

### 1.2.3 Systemisch erworbene und induzierte Resistenz

Nach einer inkompatiblen Interaktion zwischen Pflanze und Pathogen kommt es neben den bereits erwähnten sehr schnellen und schnellen Abwehrreaktionen (1.2) zur Ausprägung einer unspezifischen, systemisch erworbenen Resistenz. Dieses als SAR (systemic acquired resistance) bezeichnete Phänomen ist seit längerem bekannt. Die SAR wird durch eine Erstinfektion mit einem nekrotisierenden Pathogen ausgelöst und ist durch eine langanhaltende Resistenz der gesamten Pflanze gegenüber einem breiten Spektrum verschiedenartiger Pathogene (Pilze, Bakterien, Viren) gekennzeichnet [122]. Dabei ist eine Nekrose nicht unbedingt erforderlich, um die SAR auszulösen [123]. Die SAR wurde zuerst für Tabak beschrieben und molekular charakterisiert [124], indem Pflanzen mit dem Tabak-Mosaik-Virus (TMV) vorinfiziert wurden und 7 Tage später erneut mit dem Virus inokuliert

wurden. Es konnte gezeigt werden, daß sich die sichtbaren Krankheitssymptome verringerten sowie das Wachstum der eindringenden Pathogene abnahm und die Ausprägung der SAR mit der Expression von sogenannten SAR-Markergenen korrelierte. Diese Markergene gehören zu mindestens neun Familien und kodieren häufig für PR-Proteine, wie beispielsweise saure und basische PR 1-Proteine, Glucanasen und Chitinasen. Aber auch Gurke, Tomate und *Arabidopsis* sind gut untersuchte pflanzliche Systeme. So wurden *PR 1*, *PR 2* und *PR 5* als SAR-Markergene in *Arabidopsis* identifiziert [122]. Tomatenpflanzen erwarben durch Inokulation mit dem Tabak-Nekrose-Virus (TNV) eine Resistenz gegen *Phytophthora infestans*, die von einer systemischen Akkumulation von 6 PR-Proteinen (u. a. Chitinase und Glucanase) und einem Anstieg einer Peroxidase-Aktivität begleitet war [125]. Auf die SAR speziell in Kartoffel wird im nächsten Kapitel eingegangen.

Wie schon erwähnt, spielt SA sowohl in Form eines erhöhten endogenen Gehaltes als auch exogen zugeführt eine bedeutende Rolle bei der Ausprägung der SAR (s. 1.2.2). Aber auch die exogene Applikation funktioneller Analoga der SA wie Benzothiadiazol (BTH), Acibenzolar-S-methyl (ASM, ein BTH-Derivat) und 2,6-Dichlorisonicotinsäure (INA) sowie bakterieller Lipopolysaccharide und Elicidine führen zur Ausprägung der SAR [126, 127, 128]. Während BTH u. a. unter dem Namen BION® kommerzielle Anwendung findet, wird INA nicht im Pflanzenschutz eingesetzt. Im Zusammenhang mit den chemischen Induktoren der SAR steht das sogenannte „Priming“, das an elicitierten Petersilienzellen untersucht wird [129]. Es wird mit dem „Priming“ menschlicher Makrophagen in Verbindung gebracht und beschreibt die Fähigkeit einer pflanzlichen Zelle, nach einer Sensibilisierung mit chemischen SAR-Induktoren die Antwort auf einen Pathogenbefall, Verwundung bzw. osmotischen Streß zu verstärken.

Eine weitere Form der Resistenz stellt die induzierte systemische Resistenz dar (ISR; induced systemic resistance), wobei beide Begriffe seit neuestem synonym benutzt werden und man vorteilhafter zwischen pathogeninduzierter (vorher SAR) und Rhizobakterien-induzierter (vorher ISR) Resistenz differenziert [97]. Im Unterschied zur „SAR“ wird die „ISR“ durch ausgewählte Stämme Pflanzenwachstum-fördernder Rhizobakterien (PGPR; plant growth-promoting rhizobacteria) ausgelöst. Für *A. thaliana* Ökotyp Columbia (Col-0) und Landsberg *erecta* (Ler) konnte beispielsweise gezeigt werden, daß eine Kolonisierung der Rhizosphäre mit *Pseudomonas fluorescens* Stamm WCS417r nachfolgend Resistenz gegen *P. syringae* pv. *tomato* und *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* bewirkte [130], ohne daß typische SAR-Markergene wie *PR 1*, *PR 2* und *PR 5* induziert wurden [131]. Diese werden erst nach einem erneuten Pathogenbefall, dann aber schneller und stärker als in der pathogeninduzierten Abwehrreaktion, exprimiert. Dabei erfolgt die Signaltransduktion SA-unabhängig, erfordert aber die Sensitivität für Jasmonat und Ethylen [132].

Daß die Pathogenabwehr in Monokotylen und Dikotylen über ähnliche Mechanismen abläuft, zeigen neben den o. g. Beispielen Versuche an Reis, Gerste, Weizen und Mais [133].

#### 1.2.3.1 Systemisch erworbene und induzierte Resistenz in Kartoffel

Auch an Kartoffelpflanzen wurde das Phänomen der SAR vor allem gegen den Erreger der Kraut- und Knollenfäule *P. infestans* untersucht und beschrieben. Sie kann durch eine lokale Infektion mit dem Oomyceten selber, einer Inokulation mit dem *Brassica*-Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (*Psm*), für welches Kartoffel eine Nicht-Wirtspflanze

darstellt, sowie durch Behandlung mit verschiedenen Elicitoren, wie Zellwandrohextrakten aus *P. infestans*, ungesättigte Fettsäuren (z. B. Arachidonsäure) und Jasmonat, induziert werden [134, 135, 136, 137]. Bei einer nachfolgenden Infektion mit einer virulenten *P. infestans*-Rasse kommt es zu einer verzögerten Ausbreitung des Pathogens und einer Reduktion der Krankheitssymptome. Auf molekularer Ebene konnte gezeigt werden, daß es zur lokalen und systemischen Akkumulation von mRNAs kommt, die für basische und saure Chitinasen sowie 1,3- $\beta$ -Glucanasen kodieren [138, 139] und die deshalb als SAR-Markergene fungieren. Außerdem wurden im Rahmen zweier Promotionsarbeiten in der Arbeitsgruppe zwei systemisch responsive Gene identifiziert und charakterisiert (*stsrc1* und *sre2*), für die bisher jedoch keine Funktion bekannt ist [140, 141].

Im Gegensatz zu Tabak, Gurke, Tomate und *Arabidopsis* zeigen SA und ihre funktionellen Analoga keinen induzierenden Einfluß auf die systemische Genaktivierung und die Ausprägung der SAR in Kartoffel, was mit einem generell hohen Gehalt an SA erklärt wird [142]. Damit bleibt die Rolle von SA bei der Ausprägung der SAR in Kartoffel bisher ungeklärt, scheint aber vor allem in der durch Arachidonsäure induzierten SAR von Bedeutung zu sein: es zeigte sich, daß es nur in den arachidonsäurebehandelten Blättern zu einem Anstieg des SA-Gehaltes während der Ausprägung der SAR kommt [142]. Einerseits zeigen transgene Pflanzen mit der bakteriellen Protonenpumpe Bakterio-Opsonin unabhängig vom jeweiligen endogenen SA-Gehalt einzelner transgener Linien erhöhte Pathogenresistenz, die aber auf einzelne Erreger limitiert ist [81]. Andererseits führt der erniedrigte SA-Spiegel in *nahG*-Pflanzen zur Unterdrückung der *PR*-Gen-Expression, nicht aber zu erhöhter Suszeptibilität gegenüber *P. infestans*. Die SAR konnte nicht durch eine Behandlung mit Arachidonsäure induziert werden. Als Wirkungsmechanismus wird daher eine erhöhte Sensitivität für SA bei der Etablierung der SAR vermutet [143].

### 1.3 Ziele der Arbeit

Gegenwärtig werden große Mengen von Fungiziden eingesetzt, um Verlusten im Kartoffelanbau vorzubeugen. Probleme dabei sind u. a. die Resistenzentwicklung von Pathogenen, Schäden für Mensch und Umwelt, aber auch hohe Kosten [144]. Durch Aufklärung von Mechanismen, die zur Ausprägung der SAR und damit zur Aktivierung der pflanzeigenen Abwehr und einer erhöhten Resistenz gegen pilzliche, bakterielle und virale Erreger führen, könnten sich neue Möglichkeiten im Pflanzenschutz eröffnen.

Ziel der Arbeit war es deshalb, mit Hilfe der Methoden „mRNA-Differential Display“ und cDNA-AFLP Gene zu isolieren, die nach einer Inokulation mit dem Nichtwirts-Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* in Kartoffel differentiell exprimiert werden. Dabei sollten vor allem für Kartoffel bisher unbekannte, früh induzierte Gene identifiziert werden, die möglicherweise an der Etablierung der SAR beteiligt sind. Diese Gene sollten in Bezug auf ihre Struktur und ihr Expressionsmuster nach Pathogenbehandlung, Behandlung mit Phytohormonen, Signalsubstanzen und nach Verwundung untersucht werden.

Eine funktionelle Charakterisierung der Gene sollte mittels transgener Pflanzen erfolgen, die Charakterisierung der Proteine nach Expression in *Escherichia coli*.

Auf diese Weise sollten langfristig Gene identifiziert werden, die potentielle Kandidaten zur Generierung transgener, pathogenresistenter Kartoffelpflanzen darstellen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Kits, Radioisotope, Oligonukleotide

Die Laborchemikalien (analytischer Reinheitsgrad) wurden hauptsächlich von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Roche (Mannheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Die zur Herstellung der Medien verwendeten Substanzen stammten von der Firma Difco Lab. (Detroit). DNA-modifizierende Enzyme, Restriktionsendonukleasen, DNase I und RNase A wurden von den Firmen GibcoBRL (Eggenstein) bzw. Boehringer (Mannheim) erworben. Die Herkunft der Kits wird im Text erwähnt.

Das Radioisotop  $\alpha$ -[<sup>33</sup>P]-dATP wurde von NEN Dupont bezogen, die Isotope  $\gamma$ -[<sup>33</sup>P]-dATP und  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dATP von der Firma Amersham.

Die Oligonukleotide, deren Sequenzen in Anhang 1 aufgeführt sind, wurden von den Firmen ARC Scientific (Dieburg) und MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

#### 2.1.2 Medien und Puffer

Zur Herstellung von Medien und Puffern wurde destilliertes, deionisiertes Wasser verwendet. Für Arbeiten mit RNA wurde dem Wasser vor dem Autoklavieren DEPC (0,1 %) zugesetzt und über Nacht unter Rühren inkubiert.

Medien und Puffer wurden 20 min bei 121°C sterilisiert. Lösungen, die nicht hitzestabil waren, wurden sterilfiltriert.

Medien (1l), die prozentualen Angaben beziehen sich auf w/v

LB	1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl
SOB	2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,05 % NaCl; pH=7,5 nach Autoklavieren und Abkühlen Zugabe von 20 mM MgSO <sub>4</sub> (steril)
YEB-Medium	0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,1 % Hefeextrakt, 0,05 % Beefextrakt; nach Autoklavieren und Abkühlen Zugabe von 2 mM MgSO <sub>4</sub> (steril)
King's B	2 % Glycerin, 4 % Proteose Pepton No. 3; nach Autoklavieren und Abkühlen Zugabe von je 10 ml K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> und MgSO <sub>4</sub> (je 10 %, steril) und Rifampicin (50 µg/ml, steril)
NCZYM	1 % NZ amine (Casein-Hydrolysat), 0,5 % NaCl, 0,5 % Hefeextrakt, 0,1 % Casamino acids, 0,2 % MgSO <sub>4</sub> •7 H <sub>2</sub> O; pH=7,0

Für Platten wurden dem entsprechenden Medium 15 g Agar/l zugesetzt. Für Top-Agar wurde dem NZCYM-Medium 7,2 g Agarose/l zugesetzt. Zur Selektion wurden die entsprechenden Antibiotika nach dem Autoklavieren und Abkühlen der Medien in folgenden Mengen zugegeben: Kanamycin 20 mg/l, Ampicillin und Rifampicin je 50 mg/l Medium. Konzentrationen der Antibiotika-Stammlösungen sind unter 2.12.1 aufgeführt.

## Puffer und Lösungen

20 x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Na-tricitrat
SM-Puffer	0,1 M NaCl, 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 50 mM Tris-HCl; pH=7,5
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH=7,5, 0,2 mM EDTA
50 x TAE	2 M Tris-Acetat, 50 mM EDTA; pH=7,0
5 x TBE	0,44 M Tris-HCl, 0,44 M Borsäure, 10 mM EDTA; pH=8,0
Denaturierungslösung	0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl
Neutralisierungslösung	0,5 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl; pH=7,2
Lösung N	1,8 M NaCl, 100 mM NaPhosphatgemisch, 10 mM EDTA, 0,2 % SDS; pH=7,0
Hybridisierungspuffer	0,2 % PVP, 0,2 % Ficoll und 0,2 % BSA in 240 ml Lösung N lösen, 240 ml Formamid und 6 ml frisch hitzedenaturierte Fischsperma-DNA (10 mg/ml) zugeben
Polyacrylamidgel 6 %	80 ml Sequenzgellösung, 200 µl APS 10 %, 80 µl TEMED
Sequenzgellösung	42 % Harnstoff, 20 ml 5 x TBE, 15 ml Roti <sup>®</sup> Phoresse 40 (Roth), Wasser ad 100 ml

### 2.1.3 Geräte

Häufig verwendete Geräte sind in Anhang 5 aufgeführt.

### 2.1.4 Bakterienstämme, Vektoren und Pilz-Rassen

Bakterienstämme	wichtige Merkmale	Herkunft/Referenz
<i>Escherichia coli</i>	DH5α	[145]
	XL1-Blue MRF'	Stratagene
	SOLR	Stratagene
	BL 21	Invitrogen
	K802	
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> (Psm M2)		[146]
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Stamm 4404		[147]
Vektor-Plasmide		
pUC18	<i>lacZ</i> , MCS, Amp <sup>r</sup>	Invitrogen
pCR <sup>™</sup> II	<i>lacZ</i> , MCS, Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , SP6 und T7-Promotor	Invitrogen
pCR <sup>®</sup> 2.1	<i>lacZ</i> , MCS, Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , T7-Promotor	Invitrogen
pSPT19	MCS, Amp <sup>r</sup> , SP6 und T7-Promotor	Boehringer
pBluescript <sup>®</sup> SK(+/-)	<i>lacZ</i> , MCS, Amp <sup>r</sup>	Stratagene
pBKTX		[148]

### λ-Vektoren

$\lambda$ ZAP <sup>®</sup> II Vektor		Stratagene
$\lambda$ EMBL3 SP6/T7	SP6 und T7-Promotor	Clontech
pQE 30	Proteinexpression, Amp <sup>r</sup>	Qiagen
pRSET A	Proteinexpression, Amp <sup>r</sup>	Invitrogen

Oomyzet-Rasse

*Phytophthora infestans* Rasse 1, 3, 4, 7

## 2.2 Allgemeine Labormethoden

### 2.2.1 Restriktionsspaltungen

Für die Analyse genomischer DNA in Southern-Blot-Hybridisierungen (s. 2.8.2) wurden ca. 10  $\mu$ g DNA (Präparation s. 2.5.3) im entsprechenden 1 x Restriktionspuffer (Gesamtansatz 150  $\mu$ l) unter Zusatz von 10 Einheiten RNase A mit 50 Einheiten einer Restriktionsendonuklease über Nacht bei 37°C gespalten. Zur Konzentrierung der gespaltenen DNA wurde eine Ethanolfällung durchgeführt und die DNA in 40  $\mu$ l Wasser gelöst.

Die mittels Mini-Präparation gewonnene Plasmid-DNA (s. 2.5.4.1) wurde in einem Gesamtansatz von 20  $\mu$ l unter Zusatz von RNase A mit Restriktionsenzym nach Herstellerangaben mindestens 1 h gespalten.

Die mittels Midi-Präparation gewonnene Plasmid-DNA (s. 2.5.4.2) wurde ebenfalls in einem Gesamtansatz von 20  $\mu$ l mit Restriktionsenzym nach Herstellerangaben mindestens 1 h gespalten.

### 2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

#### *Denaturierende Gele zur Auftrennung von RNA*

RNA wurde in denaturierenden Agarose-Horizontalgelen aufgetrennt [149]. Dazu wurden 1 % Agarose in 105 ml Wasser und 12,5 ml 10 x MOPS-Puffer (200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA; pH=7,0) geschmolzen, nach dem Abkühlen auf ca. 60°C mit 7,5 ml Formaldehyd gemischt und in den Gelträger gegossen.

15-20  $\mu$ g Gesamt-RNA (s. 2.5.1) in 10  $\mu$ l DEPC-Wasser wurden mit 15  $\mu$ l RNA-Probenpuffer (50 % Formamid, 38 % 1 x MOPS-Puffer, 6 % Formaldehyd, 6 % Glycerin, 0,04 % Bromphenolblau) versetzt, 10 min auf 65°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1  $\mu$ l Ethidiumbromid (1 mg/ml) wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x MOPS Puffer über 90 min bei 80 V.

Als Größenstandard diente der RNA-Längenstandard I (Boehringer).

#### *Gele zur Auftrennung von DNA*

Genomische DNA (s. 2.5.3) wurde mit 0,2 Volumen 6 x Probenpuffer (0,25 % Bromphenolblau in 30 % Glycerin) gemischt, 10 min auf 65°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und auf ein 1 %-iges horizontales Agarosegel in 1 x TAE-Puffer aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit 1 x TAE bei 20 V über Nacht.

Plasmid-DNA wurde nach Restriktionsspaltung und Mischen mit 0,2 Volumen 6 x Probenpuffer je nach erwarteter Größe des Fragments auf ein 0,8- bis 2 %-iges

horizontales Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 80-100 V 60-90 min in 1 x TAE-Puffer.

Als Größenstandard diente mit der Restriktionsendonuklease Pst I geschnittene  $\lambda$ -DNA. Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele mit Ethidiumbromid (0,5  $\mu$ g/ml) 10 min angefärbt und auf dem UV-Transilluminator fotografiert.

### 2.2.3 Isolierung von Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung und Reinigung der im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgte mit dem QIAEX II-Gelextraktionskit (Qiagen) nach Herstellerangaben, nachdem das gewünschte, mit Ethidiumbromid angefärbte Fragment auf dem Transilluminator ausgeschnitten worden war.

### 2.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

#### *Semiquantitative RT-PCR*

2  $\mu$ g der wie unter 2.6.1 beschrieben gewonnenen cDNA wurden zur semiquantitativen PCR eingesetzt. Die Nukleotidsequenzen der verwendeten spezifischen Primer befinden sich im Anhang 1. Das Reaktionsvolumen betrug 50  $\mu$ l. Die spezifischen Primer wurden in einer Endkonzentration von 0,4  $\mu$ M, die dNTP's in einer Konzentration von 0,2 mM verwendet. Die PCR wurde mit der Taq-DNA-Polymerase von Pharmacia nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei sich die Zyklenanzahl und die Dauer der einzelnen Schritte nach den zu amplifizierenden Fragmenten richtete. Die Schmelz- bzw. Annealing-Temperaturen wurden folgendermaßen berechnet:

$$T_M = 69,3^\circ\text{C} + (0,41 \cdot \% \text{ GC}) - 650 / \text{Länge des Primers}$$

$$T_A = T_M - 5^\circ\text{C}$$

$T_M$  Schmelztemperatur

$T_A$  Annealingtemperatur

#### *PCR mit genomischer DNA*

1  $\mu$ g genomische DNA (Präparation s. 2.5.3) wurden in 40 Zyklen amplifiziert, wobei die Bedingungen und Konzentrationen den oben genannten entsprachen.

Zur Kontrolle wurde in beiden Fällen Plasmid-DNA in 1000-facher Verdünnung parallel amplifiziert.

### 2.2.5 Klonierung

#### *Dephosphorylierung*

Zur Verhinderung der Selbstligation gespaltener Vektoren wurden diese direkt nach der Restriktionsspaltung mit alkalischer Phosphatase aus Schrimps (Roche) nach Herstellerangaben behandelt.

### *Ligation*

Die Ligation erfolgte entweder mit dem „Rapid DNA Ligation<sup>®</sup>“ Kit (Roche) oder dem „TOPO TA Cloning<sup>®</sup>“ Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben bzw. nach folgender Methode: Aus einem Agarosegel isolierte Vektor-DNA und isoliertes DNA-Fragment (s. 2.2.3) wurden in einem 10 µl-Ansatz in einem Verhältnis 3:1 (Überschuß an DNA-Fragment) gemischt, mit 2 µl 5 x Ligationspuffer und 1 U T4 DNA-Ligase (GibcoBRL) versetzt und über Nacht bei 16°C bzw. 2 h bei RT inkubiert.

### *Herstellung kompetenter Zellen*

Sofern nicht die in einem Kit (z. B. „TOPO TA Cloning<sup>®</sup>“ Kit; Invitrogen) mitgelieferten kompetenten Zellen zur Transformation verwendet wurden, wurden *E. coli* Zellen des Stamms DH5α mit Hilfe der Rubidiumchlorid-Methode [150] kompetent gemacht, aliquotiert (100 µl), sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und höchstens 3 Monate bei –80°C gelagert.

Kompetente Zellen von *Agrobacterium tumefaciens* Stamm 4404 wurden hergestellt, indem 2 ml YEB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft wurden und über Nacht bei 28°C schüttelnd inkubiert wurden. Mit dieser Übernachtskultur wurden 50 ml YEB-Medium angeimpft und die Kultur bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,6 bei 28°C schüttelnd inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min, 5000 U/min, 4°C), das Pellet in 1 ml YEB-Medium resuspendiert, die Zellen in Aliquots von 200 µl bei –80°C eingefroren und höchstens 3 Monate gelagert.

### *Transformation*

Zur Transformation von Bakterien wurden die aliquotierten kompetenten Zellen 30 min auf Eis aufgetaut, 30 min mit der Plasmid-DNA auf Eis inkubiert, 90 s im Wasserbad auf 42°C erhitzt und für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl SOB-Lösung wurde 30-45 min bei 37°C schüttelnd inkubiert und anschließend auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37°C.

Kompetente *A. tumefaciens* wurden ebenfalls 30 min auf Eis aufgetaut, anschließend vorsichtig mit 2 µl Plasmid-DNA gemischt und jeweils 5 min auf Eis, in flüssigem Stickstoff und bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml YEB-Medium wurde der Transformationsansatz 2 h bei 28°C geschüttelt. Danach wurden 200 µl des Ansatzes auf YEB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum plattiert und 2 Tage bei 28°C inkubiert.

### *Glycerinkulturen*

Von positiven Klonen wurden Dauerkulturen angelegt, indem 250 µl steriles 80 %-iges Glycerin mit 750 µl einer Bakterienkultur gemischt und sofort bei –80°C eingefroren wurde.

## 2.3 Pflanzenmaterial

Für die Induktionsexperimente, zur Isolierung genomischer DNA und organspezifischer RNA wurden Kartoffelpflanzen *Solanum tuberosum* L. cv. Désirée verwendet.

Zur Überexpression der putativen Phosphatase im heterologen System wurde Tabak *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SRI verwendet.

Außerdem wurden in einem Versuch Kartoffelpflanzen *Solanum tuberosum* L. cv. Désirée verwendet, die mit dem *nahG*-Gen transformiert worden waren (*nahG*-Konstrukt von Bob Dietrich, Novartis; Transformation von Dr. Peter Landgraf, IPB Halle).

### 2.3.1 Anzucht von Kartoffelpflanzen zur Versuchsdurchführung

Die Kartoffelpflanzen wurden in steriler Gewebekultur vermehrt. Dazu wurden in vierwöchigem Abstand Stengelsegmente mit einer Rasierklinge abgetrennt und diese Stücke in einen neuen Plastikpflanztopf Phytakon (Sigma) mit 2 MS (s. 2.12.1) überführt. Die Kultivierung erfolgte in einer Gewebekulturkammer bei 23°C und einer Belichtungsdauer von 16 h.

Zur Vorbereitung der Versuche wurden die Kartoffelpflanzen aus Sterilkultur in ein zuvor autoklaviertes (30 min, 121°C) Erde-Sand-Gemisch (Einheitserde ED 73/Sand 1:1) ausgepflanzt und für eine Woche zur Gewährleistung hoher Luftfeuchtigkeit in Minigewächshäusern, die in der Phytokammer standen, kultiviert. Die weitere Anzucht erfolgte in der Phytokammer unter folgenden Bedingungen: 8 h Dunkelheit, 18°C, 16 h Lichtphase (100-200 µE), 20°C, 60 % Luftfeuchtigkeit. Nach 4-5 Wochen erfolgte die Versuchsdurchführung.

### 2.3.2 Anzucht und Infiltration von *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, Durchführung der SAR-Induktionsexperimente

Die DMSO-Dauerkultur der zur Induktion der SAR verwendeten Bakterien *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (*Psm* M2) [146] stammt aus dem Labor von J. Dangl (Univ. of North Carolina, Chapel Hill, USA). Für SAR-Induktionsexperimente wurde aus der Dauerkultur eine King's B-Platte (mit Rifampicin 50 µg/ml) beimpft und bei 28°C kultiviert. Von dieser Platte wurde eine Einzelkolonie zur Anzucht einer Übernachtskultur in King's B-Medium mit 50 µg/ml Rifampicin verwendet, der am nächsten Tag frisches Medium im Verhältnis 1:50 zugegeben wurde und bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,2 angezogen wurde. Danach wurden die Bakterien 5 min bei 2700 x g abzentrifugiert, in 50 ml 10 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung gewaschen und in einer 10 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung so resuspendiert, daß sich eine OD<sub>600</sub> von etwa 0,2 ergab. Das entspricht einer Bakteriendichte von 1 x 10<sup>8</sup> cfu/ml.

Die Infiltration zweier Blätter von Kartoffelpflanzen *Solanum tuberosum* L. cv. Désirée mit den Bakterien erfolgte mit einer 1-ml-Insulinspritze durch die Stomata auf der Blattunterseite, so daß etwa die Hälfte der Blattfläche infiltriert war. Kontrollpflanzen wurden mit einer 10 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung infiltriert. Über einen Zeitraum von 3 bis 48 Stunden wurden zu bestimmten Zeitpunkten die infiltrierten und die beiden darüberliegenden nichtinfiltrierten Blätter geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

### 2.3.3 Inokulation von Kartoffelpflanzen mit Sporen von *Phytophthora infestans*

Die Kultivierung und Ernte der Sporen des Oomyzeten *Phytophthora infestans* erfolgte wie unter [64] beschrieben. Zur Inokulation der Blätter von Kartoffelpflanzen *Solanum tuberosum* L. cv. Désirée wurde eine Sporendichte von 5 x 10<sup>5</sup>/ml in Wasser eingestellt. Von dieser Suspension wurden etwa zwanzig 10 µl-Tropfen auf die Blattunterseite aufgetragen, die Pflanzen unter eine Folienhaube gestellt und die Töpfe mit Wasser umspült, um die für die

Infektion durch Pilzsporen nötige hohe Luftfeuchtigkeit zu erreichen. Auf Blätter von Kontrollpflanzen wurde Wasser aufgetropft. Die Temperatur in der Phytokammer betrug 15°C. Die inokulierten und die darüberliegenden nichtinokulierten Blätter wurden über einen Zeitraum von 7 Tagen geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

#### 2.3.4 Verwundung von Kartoffelpflanzen

Die Verwundung der Kartoffelpflanzen *Solanum tuberosum* L. cv. Désirée erfolgte durch Quetschen der Blattrippen eines Blattes mit einer geriffelten Pinzette und Anbringen einer Dialyseklammer an der Blattspitze über den gesamten Versuchszeitraum. Die verwundeten Blätter wurden zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 3 und 24 Stunden geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

#### 2.3.5 Behandlung mit UV-Strahlung

Kartoffelpflanzen *Solanum tuberosum* L. cv. Désirée wurden nach Anzucht im normalen Tag-Nacht-Rhythmus am Ende der Dunkelphase in eine andere Phytokammer überführt (Kontrollpflanzen verblieben in der Tageslichtkammer), die eine zusätzliche UV-Bestrahlung mit 1100 µE zuließ. Blätter der unbestrahlten und der UV-bestrahlten Pflanzen wurden nach 2, 4 und 8 Stunden geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

#### 2.3.6 Behandlung mit Phytohormonen und Signalsubstanzen

Für die Behandlung mit Phytohormonen und Signalsubstanzen wurden von Kartoffelpflanzen *S. tuberosum* L. cv. Désirée je 3 Blätter an der Basis der Pflanzen abgetrennt und mit den Blattstielen in je 10 ml folgender Lösungen gestellt: H<sub>2</sub>O (Kontrollen), 5 % (w/v) Saccharose, Methyljasmonat (10 und 100 µM; FIRMENICH, Genf), Salicylsäure (10 und 100 µM; SIGMA, Deisenhofen), Arachidonsäure (10 und 100 µM; SIGMA, Deisenhofen) und Abscisinsäure (10 und 100 µM; SIGMA, Deisenhofen). Die Lösungen befanden sich in Plastik-Röhrchen, die zum Verdunstungsschutz mit Parafilm abgedichtet waren. Der Versuch wurde im Dauerlicht bei 25°C durchgeführt, wobei die Blätter nach 6, 12 bzw. 24 Stunden in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden.

Zur Applikation von Systemin (von Dr. Thorsten Nürnberger, IPB Halle, zur Verfügung gestellt) in abgetrennte Blätter (s. oben) wurden Konzentrationen von 0,1 nM, 1 nM und 10 nM verwendet. Die Blätter wurden nach 3, 6, 12 bzw. 24 h eingefroren, als Kontrollen dienten mit Wasser behandelte Blätter.

Außerdem wurde Systemin in Blätter von Kartoffelpflanzen *S. tuberosum* L. cv. Désirée in Konzentrationen von 0,1 nM und 10 nM infiltriert, die infiltrierten und die darüberliegenden nichtinfiltrierten Blätter nach 3, 6, 12 bzw. 24 h geerntet und eingefroren. Kontrollpflanzen wurden mit Wasser infiltriert und zu den gleichen Zeitpunkten geerntet und eingefroren.

Arachidonsäure wurde in einer Konzentrationen von 2 mg/ml (entspricht 6,6 mM) in Blätter von Kartoffelpflanzen *S. tuberosum* L. cv. Désirée infiltriert und die infiltrierten und die darüberliegenden nichtinfiltrierten Blätter nach 30 Minuten, 1, 5 und 10 Stunden bzw. 1, 2, 3, 4 und 5 Tage nach Infiltration geerntet und eingefroren. Blätter von Kontrollpflanzen wurden mit Wasser infiltriert und die infiltrierten und nichtinfiltrierten Blätter 5 und 10 Stunden bzw. 2 und 5 Tage nach Behandlung geerntet und eingefroren.

### 2.3.7 Elicitierung von Zellkulturen

Einer 5 Tage alten Zellsuspensionskultur von *Solanum tuberosum* L. cv. Désirée [151] wurde Kulturfiltrat von *P. infestans* zugesetzt (Endkonzentration 10 µg/ml Glucoseäquivalente) und für unterschiedliche Zeiten inkubiert. Danach wurden die Zellen mittels eines Büchnertrichters abgesaugt, zweimal gewaschen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.3.8 Anzucht von Tabakpflanzen

Zur Expression der putativen Phosphatase im heterologen System wurden Tabakpflanzen *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SRI verwendet, die in steriler Gewebekultur vermehrt wurden, wobei alle 6 Wochen Stengelstücke mit einer Rasierklinge abgetrennt wurden und in neue Phytacon-Töpfe mit 2 MS (s. 2.12.1) überführt wurden. Die Kultivierung erfolgte in einer Gewebekulturrkammer bei 23°C und einer Belichtungsdauer von 16 h.

## 2.4 Bemerkungen

Standardisierte molekularbiologische Arbeiten wurden nach Sambrook *et al.* ausgeführt [150]. Für die Arbeiten mit Nukleinsäuren, Bakterien und Phagen wurden alle Lösungen, Gefäße und Pipettenspitzen sterilisiert (20 min, 121°C) und Handschuhe getragen.

### 2.5 Isolierung von Nukleinsäuren

#### 2.5.1 Präparation von Gesamt-RNA

Zur Präparation von Gesamt-RNA wurde das in flüssigem Stickstoff eingefrorene bzw. bei -80°C gelagerte pflanzliche Material unter flüssigem Stickstoff gemörsert und ca. 0,3 g des Stickstoffpulvers auf Eis nach folgenden Methoden aufgearbeitet.

#### *Guanidiniumchlorid-Methode* [152]

Zum Stickstoffpulver wurde 1 ml RNA-Extraktionspuffer (8 M Guanidiniumchlorid, 20 mM MES, 20 mM EDTA; pH=7,0 mit NaOH eingestellt) gegeben und gründlich gemischt. Nach Zugabe von 0,7 Volumenteilen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde erneut kräftig gemischt, zentrifugiert (20 min, 5000 U/min, 4°C) und der wäßrige Überstand abgenommen. Zu diesem wurden 1/20 Volumenteil 1 M Essigsäure und 0,7 Volumenteile absolutes Ethanol gegeben, gemischt und für mindestens 1 h bei -20°C inkubiert. Nach Zentrifugation (15 min, 15000 U/min, 4°C) wurde das Sediment mit kaltem 70 %-igem EtOH gewaschen, zentrifugiert (15 min, 15000 U/min, 4°C) und mit 1 ml kaltem Natriumacetat pH=4,8 versetzt. Nach einem weiteren Waschschriff mit 70 %-igem Ethanol wurde das Pellet bei RT getrocknet und in 30 µl DEPC-Wasser gelöst.

#### *Lithiumchlorid-Methode*

Zum Stickstoffpulver wurden 0,5 ml RNA-Extraktionspuffer (0,2 M Tris-HCl pH=7,5, 0,1 M LiCl, 5 mM EDTA, 1 % SDS) und vor dem vollständigen Auftauen des Stickstoffpulvers 0,5 ml Roti®-Phenol (Phenol/Chloroform 1:1; Roth) zugegeben und 30 Sekunden kräftig

gemischt. Die wäßrige und organische Phase wurde durch Zentrifugation (5 min, 12000 U/min, 4°C) getrennt, 650 µl abgenommen, mit 650 µl Roti<sup>®</sup>-Phenol versetzt und gründlich gemischt. Nach einer weiteren Zentrifugation (5 min, 12000 U/min, 4°C) wurden 500 µl vom wäßrigen Überstand abgenommen, mit 500 µl 6 M LiCl versetzt und für 3-4 h auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 15000 U/min, 4°C) wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 3 M LiCl gewaschen, nochmals zentrifugiert, das Pellet in 150 µl DEPC-Wasser gelöst und die RNA durch Zugabe von 15 µl 3 M Natriumacetat und 300 µl absolutem Ethanol und Inkubation über Nacht bei -20°C ausgefällt. Nach Zentrifugation (10 min, 15000 U/min, 4°C) und Waschen des Pellets mit 70 %-igem Ethanol wurde der Überstand verworfen, das Pellet bei RT unter Vakuum getrocknet und in 30 µl DEPC-Wasser gelöst.

### *TRIZOL-Methode*

Zur Präparation von Gesamt-RNA mittels TRIZOL wurde das TRIZOL<sup>®</sup>-Reagenz (GibcoBRL) verwendet und nach Herstellerangaben verfahren.

#### 2.5.2 Präparation von Poly(A)<sup>+</sup>-mRNA

Ausgehend von 75 µg Gesamt-RNA (s. 2.5.1) wurde mit Hilfe des „DYNABEADS<sup>®</sup> mRNA Purification“ Kits (DYNAL, Hamburg) nach Herstellerangaben Poly(A)<sup>+</sup>-mRNA aufgereinigt.

#### 2.5.3 Präparation von genomischer DNA

Ca. 0,5 g Stickstoffpulver junger Blätter wurde mit 1 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl pH=8,0, 50 mM EDTA, pH=8,0, 500 mM NaCl, 1,5 % SDS) versetzt und 10 min bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl kaltem Kaliumacetatpuffer (3 M Kaliumacetat, 11,5 ml Eisessig, 28,5 ml Wasser; pH=4,8) und vorsichtigem Mischen wurde 10 min bis 1 h auf Eis inkubiert und zentrifugiert (10 min, 15000 U/min, 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 800 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und vorsichtig gemischt. Nach Zentrifugation (10 min, 12000 U/min, 4°C) wurde der Überstand (ca. 1 ml) vorsichtig mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze abgehoben, mit 500 µl Isopropanol versetzt und gemischt. Nach Zentrifugation (5 min, 15000 U/min, 4°C) wurde das Pellet mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, bei RT 30 min getrocknet, vorsichtig in 50 µl Wasser oder TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH=7,5) gelöst und im Kühlschrank gelagert.

#### 2.5.4 Präparation von Plasmid-DNA

##### 2.5.4.1 Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA (Mini-Präparation)

Diese Methode diente der Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien zur schnellen Identifizierung positiver Klone durch anschließende Restriktionsspaltung. Dazu wurde von einer 3 ml-Übernachtskultur von *E. coli* DH5α in LB mit dem entsprechenden Antibiotikum, die nicht länger als 16 h gewachsen war, 1,5 ml abgenommen und zentrifugiert (1 min, 12000 U/min, 4°C). Das Pellet wurde in 100 µl Lysisbuffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 15 % Saccharose) aufgenommen, mit 200 µl frisch zubereiteter alkalischer SDS-Lösung

(0,2 N NaOH, 100 µl 1 % SDS) versetzt und vorsichtig gemischt. Nach einer maximalen Inkubationszeit von 5 min wurden 150 µl kalter Kaliumacetatpuffer (s. 2.5.3) zugegeben, umgeschwenkt und mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde zentrifugiert (10 min, 15000 U/min, 4°C), der Überstand abgenommen und durch Zugabe von 0,6 Volumenteilen Isopropanol die Nukleinsäuren ausgefällt. Nach Zentrifugation (15 min, 15000 U/min, 4°C) wurde das Pellet mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 µl Wasser gelöst.

#### 2.5.4.2 Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA (Midi-Präparation)

Zur Isolierung größerer Mengen von Plasmid-DNA mit hohem Reinheitsgrad für die DNA-Sequenzierung, zum Markieren von Sonden zur Hybridisierung oder zur Transformation wurde der „Plasmid Midi Purification“ Kit (Qiagen) verwendet. Dazu wurde von einer Einzelkolonie eine 50 ml-Übernackkultur in LB mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und nicht länger als 16 h bei 37°C geschüttelt. Nach Sedimentation des Pellets durch Zentrifugation (10 min, 5000 U/min, 4°C) wurde nach Herstellerangaben verfahren. Die DNA wurde in 80 µl Wasser gelöst.

#### 2.5.4.3 Präparation von Plasmid-DNA aus *Agrobacterium tumefaciens*

1,5 ml einer Agrobakterien-Kultur, die von einer Einzelkolonie angeimpft und 2 Tage in YEB-Medium mit Kanamycin (20 µg/ml) bei 28°C geschüttelt worden war, wurden abzentrifugiert und das gewonnene Bakterienpellet in 100 µl Lösung I (0,9 % wasserfreie Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, ca. 0,4 % Lysozym) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei RT wurden 200 µl Lösung II (1 % SDS, 0,2 N NaOH) zugegeben, vorsichtig gemischt und nochmals 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden sehr schnell nacheinander 30 µl alkalisches Phenol (250 µl Phenol, 15 µl 1 M NaOH) (2-4 Sekunden kräftig mischen) und 150 µl 3 M Kaliumacetat zugegeben und gemischt. Nach Zentrifugation (5 min, 15000 U/min, 4°C) wurde der Überstand abgenommen, dabei das Volumen bestimmt, ein Volumenteil P/C/I zugegeben, gemischt und erneut zentrifugiert (3 min, 12000 U/min, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen, mit 1 Volumenteil Chloroform gemischt und zentrifugiert (2 min, 12000 U/min, 4°C). Der abgenommene Überstand wurde zum Ausfällen der DNA mit 500 µl Isopropanol gemischt, 5 min bei RT inkubiert und zentrifugiert (20 min, 15000 U/min, 4°C). Das Pellet wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 40 µl Wasser gelöst.

#### 2.5.5 Präparation von Phagen-DNA

Zur Isolierung von λ-DNA wurde lysierte Bakterienflüssigkultur verwendet, die folgendermaßen gewonnen wurde. Bakterien *E. coli* K802 wurden in NCZYM-Medium mit 2 % Maltose bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 angezogen und mit Phagen infiziert, indem mit einer Pipettenspitze in einen positiven Plaque gestochen und in der Bakterienkultur mehrfach auf- und abpipettiert wurde. Die Inkubation erfolgte über Nacht unter mäßigem Schütteln bei 37°C.

20 ml dieses Bakterienlysats wurden mit 50 µl Chloroform gemischt und 30 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (10 min, 4500 U/min, 4°C). 10 ml des Überstandes wurden in einem Corex-Röhrchen mit 1 µl DNase I (16 mg/ml) und 10 µl

RNase A (1 mg/ml) gemischt und 30 min bei RT inkubiert, der Rest des Überstandes wurde nach Zugabe von 100 µl reinstem Chloroform bei 4°C als Phagenlysat aufbewahrt. Zum DNase/RNase-behandelten Überstand wurden 2 ml PEG/NaCl (PEG<sub>6000</sub> 30 %, 3 M NaCl) gegeben, gut gemischt und 1 h auf Eis inkubiert. Die Zentrifugation (10 min, 10000 U/min, 4°C) erfolgte in einer Sorvall-Zentrifuge. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 500 µl SM-Puffer gelöst, in ein Eppendorfgefäß überführt, mit 500 µl Chloroform versetzt und kräftig gemischt. Nach Zentrifugation (5 min, 12000 U/min, 4°C) wurden 500 µl wässrige Phase abgenommen, mit 5 µl 10 % SDS-Lösung und 5 µl 0,5 M EDTA gemischt und 15 min bei 68°C inkubiert. Nach Abkühlung auf RT wurden 500 µl P/C/I zugegeben, kräftig gemischt und erneut zentrifugiert (5 min, 12000 U/min, 4°C). Zur wässrigen Phase wurden nun 50 µl 3 M Natriumacetat pH=4,8 und 1 ml kaltes absolutes Ethanol gegeben und 3 h bei -20°C inkubiert. Nach Zentrifugation (20 min, 15000 U/min, 4°C) wurde das Pellet mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, kurz bei RT getrocknet und vorsichtig in 100 µl Wasser gelöst.

## 2.6 Identifizierung differentiell exprimierter Gene

### 2.6.1 „mRNA-Differential Display“ (DDRT-PCR)

Das „mRNA-Differential Display“ wurde in Anlehnung an die von Liang [153] bzw. Linskens [154] veröffentlichten Methoden durchgeführt.

50 µg der wie unter 2.5.1 (Guanidiniumchloridmethode) beschrieben isolierten Gesamt-RNA wurden in einem 150 µl-Ansatz mit 30 µl 5 x Erststrangpuffer (GibcoBRL), 0,25 µl RNase Inhibitor (40 U/µl, Boehringer) und 1 µl DNase I (10 U/µl, Boehringer) versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach einer Phenol/Chloroform- und einer Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)-Extraktion wurde der wässrige Überstand (150 µl) abgenommen, mit 15 µl 3 M Natriumacetat und 425 µl kaltem, absoluten Ethanol gemischt und die RNA über Nacht bei -20°C ausgefällt. Nach Zentrifugation (10 min, 15000 U/min, 4°C) wurde das Pellet mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, 10 min unter Vakuum getrocknet und in 50 µl DEPC-Wasser gelöst.

4 µl der RNA wurden zur Vorbereitung der reversen Transkription mit 13 µl DEPC-Wasser und 4 µl eines T-reichen Primers (20 µM; Sequenzen s. Anhang 1 A) gemischt, 10 min auf 70°C erwärmt und schnell auf Eis abgekühlt. Danach wurden 8 µl 5 x Erststrangpuffer (GibcoBRL), 4 µl dNTP's (2 mM; Pharmacia), 4 µl DTT (0,1 M; GibcoBRL) und 3 µl Reverse Transcriptase (SuperScript™ II RNase H<sup>-</sup>; 600 U; GibcoBRL) zugegeben und vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 40°C wurde der Reaktionsansatz 5 min auf 95°C erhitzt und auf Eis abgekühlt.

Zur PCR wurden in einem 20 µl-Ansatz 2 µl cDNA, 9 µl Wasser, 2 µl eines Zufallsprimers (5 µM; Sequenzen s. Anhang 1 A), 2 µl des bereits zur reversen Transkription verwendeten T-reichen Primers (20 µM), 2 µl dNTP's ohne dATP (20 µM; Pharmacia), 2 µl 10 x PCR-Puffer (mit MgCl<sub>2</sub>; Pharmacia), 0,2 U Taq-DNA-Polymerase (Pharmacia) und 1,5 µCi α-[<sup>33</sup>P]-dATP (NEN Dupont) gemischt und mit 40 µl Mineralöl überschichtet. Die Amplifikation wurde in einem Thermo-Cycler (Perkin Elmer) mit folgendem Programm durchgeführt:

	Denaturieren	2 min	94°C
4 Zyklen	Denaturieren	45 s	94°C
	Annealing	60 s	41°C
	Polymerisation	60 s	72°C
18 Zyklen	Denaturieren	45 s	94°C
	Annealing	45 s	60°C
	Polymerisation	120 s	72°C
Polymerisation		10 min	72°C

abkühlen auf 4°C.

Nach der PCR wurden 7 µl des Reaktionsansatzes mit 5 µl „Sequencing Stop“-Lösung („T7 Sequencing“ Kit, Pharmacia) gemischt und zur gelelektrophoretischen Auftrennung auf ein 6 %-iges Polyacrylamidgel (s. 2.1.2) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 2800 V und 50°C über 2 h. Danach wurde das Gel auf der Platte fixiert (20 min in 10 % Eisessig, 1 % Glycerol), mit Wasser gewaschen, 2 h bei 60°C getrocknet und ein Röntgenfilm (Fuji, Tokio) aufgelegt.

Mit Hilfe von Farbmarkierungen wurden Film und Gel übereinandergelegt, die interessierenden Banden auf Film und Gel markiert und mit einer Rasierklinge aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten. Die DNA wurde durch zehninütiges Rehydrieren bei RT und 15-minütiges Kochen des Gelstückes in 100 µl Wasser aus dem Gel gelöst, die Gelstücke abzentrifugiert und der Überstand zum Ausfällen der DNA mit 10 µl 3 M Natriumacetat, 5 µl Glycogenlösung (10 mg/ml) und 220 µl reinem Ethanol gemischt und 1 h bei -80°C inkubiert. Nach Zentrifugation (30 min, 15000 U/min, 4°C) wurde das Pellet mit 80 %-igem Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und vorsichtig in 10 µl Wasser gelöst.

4 µl der eluierten cDNA wurden zur Reamplifikation verwendet. Dazu wurden zur cDNA 18 µl Wasser, 4 µl T-reicher Primer (100 µM), 4 µl Zufallsprimer (10 µM), 4 µl 10 x PCR-Puffer (mit MgCl<sub>2</sub>; Pharmacia), 4 µl dNTP's (200 µM) und 1 U Taq-DNA-Polymerase (Pharmacia) gegeben und die PCR wie folgt durchgeführt:

	Denaturieren	3 min	92°C
35 Zyklen	Denaturieren	45 s	92°C
	Annealing	45 s	55°C
	Polymerisation	60 s	72°C
Polymerisation		10 min	72°C

abkühlen auf 4°C.

8 µl des PCR-Ansatzes wurden auf einem 2 %-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.2.2). Bei erfolgreicher Amplifikation eines cDNA-Fragmentes wurde dieses entweder aus dem Gel isoliert, mit der Restriktionsendonuklease Hind III behandelt und in den Hind III-gespaltenen Vektor pUC18 kloniert oder direkt mit Hilfe des „TOPO TA Cloning<sup>®</sup>“ Kits (Invitrogen) in den Vektor pCR™ II kloniert.

## 2.6.2 cDNA-AFLP

Das cDNA-AFLP wurde mit dem „displayPROFILE™“ Kit (Display Biotech) nach Herstellerangaben durchgeführt. Ausgehend von 1 µg DNase-behandelter Gesamt-RNA

(s. 2.6.1), die aus MgCl<sub>2</sub>- bzw. pathogeninfiltrierten und darüberliegenden nichtinfiltrierten Blättern 3 und 12 hpi isoliert worden war, wurde die Erststrangsynthese mit den vom Hersteller nicht näher charakterisierten degenerierten 5'-T<sub>n</sub>V<sup>a</sup>-Primern durchgeführt. Daran schlossen sich die Zweitstrangsynthese, ein Restriktionsverdau mit Taq I und die Adapterligation zur Präparation von cDNA-Untergruppen (laut Herstellerangaben) an. Zur spezifischen Amplifizierung einzelner cDNA-Untergruppen wurden zur PCR mit nachfolgendem Programm die Primer Eu 1-16 (Sequenzen s. Anhang 1 B) und der mit  $\gamma$ -[<sup>33</sup>P]-dATP (0,25 mCi; Amersham) markierte „0-extension-primer“ nach Herstellerangaben verwendet.

	Denaturieren	60 s	94°C
2 Zyklen	Denaturieren	60 s	94°C
	Annealing	30 s	60°C
	Polymerisation	60 s	72°C
2 Zyklen	Denaturieren	60 s	94°C
	Annealing	30 s	59°C
	Polymerisation	60 s	72°C
2 Zyklen	Denaturieren	60 s	94°C
	Annealing	30 s	58°C
	Polymerisation	60 s	72°C
2 Zyklen	Denaturieren	60 s	94°C
	Annealing	30 s	57°C
	Polymerisation	60 s	72°C
2 Zyklen	Denaturieren	60 s	94°C
	Annealing	30 s	56°C
	Polymerisation	60 s	72°C
27 Zyklen	Denaturieren	60 s	94°C
	Annealing	30 s	55°C
	Polymerisation	60 s	72°C
Polymerisation		10 min	72°C

abkühlen auf 4°C.

Zum Reaktionsansatz wurden 15 µl „loading buffer“ gegeben, 5 min auf 85°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und 5 µl zur gelelektrophoretischen Auftrennung auf ein 6 %-iges Polyacrylamidgel (s. 2.1.2) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 60 W über 2 h. Danach wurde das Gel auf ein Whatman Papier aufgezogen, über Nacht vakuumgetrocknet und ein Röntgenfilm (Fuji, Tokio) aufgelegt.

Mit Hilfe von Farbmarkierungen wurden Film und Gel übereinandergelegt, die interessierenden Banden auf Film und Gel markiert und mit einer Rasierklinge das Filterpapierstück mit dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten. Zur Isolierung der DNA wurden zum Filterpapierstück 50 µl TE-Puffer gegeben, 15 min gekocht und die Papierstücke durch Zentrifugation (10 min, 15000 U/min, RT) abgetrennt. Zur Reamplifikation wurden 5 µl der die DNA enthaltenden Lösung mit 20,2 µl Wasser, 1,6 µl dNTP's (5 mM), 0,8 µl unmarkiertem „0-extension-primer“, 8 µl des zum cDNA-AFLP verwendeten Primers EU 1-16, 4 µl

---

<sup>a</sup> V entspricht A, C und G

10 x PCR-Puffer (Boehringer) und 0,4 µl Taq-DNA-Polymerase (10 U/µl; Boehringer) gemischt und die PCR wie folgt durchgeführt:

30 Zyklen	Denaturieren	30 s	94°C
	Annealing	30 s	55°C
	Polymerisation	60 s	72°C
Polymerisation		10 min	72°C

abkühlen auf 4°C.

8 µl des PCR-Ansatzes wurden auf einem 2 %-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.2.2). Bei erfolgreicher Amplifikation eines cDNA-Fragmentes wurde dieses direkt mit Hilfe des „TOPO TA Cloning“ Kits (Invitrogen) in den Vektor pCR™ II kloniert.

## 2.7 Markierung von Nukleinsäuren

### 2.7.1 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Zur Herstellung von Sonden für Northern- und Southern-Blot-Hybridisierungen wurden ca. 25 ng der wie unter 2.2.3 beschrieben frisch isolierten DNA nach dem „Random prime“-Verfahren [155] mit 50 µCi  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dATP (Amersham) markiert. Dazu wurde der „Megaprime™ DNA labeling“ Kit (Amersham) nach Herstellerangaben verwendet. Die Abtrennung der nicht inkorporierten Nukleotide erfolgte über „Chroma Spin™“ Säulen (Clontech) nach Herstellerangaben. Abschließend wurde die Sonde 5 min bei 95°C denaturiert.

### 2.7.2 Nichtradioaktive Markierung von RNA (*in-vitro*-Transkription)

Neben der radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten wurde auch von einem cDNA-Fragment der Chitinase A eine DIG-UTP-markierte Antisense-RNA-Sonde für Northern-Blot-Hybridisierungen hergestellt. Das entsprechende Fragment befand sich als Eco RI-Fragment im Vektor pSPT19. Die isolierte Plasmid-DNA (s. 2.5.4.2) wurde zur Linearisierung mit der Restriktionsendonuklease Sac I behandelt. Ausgehend von 1 µg cDNA wurde die Markierungsreaktion mit der SP6-Polymerase des „DIG-RNA Labeling“ Kits SP6/T7 (Boehringer) nach Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend wurde die Probe zur Entfernung der cDNA mit RNase-freier DNase I 15 min bei 37°C behandelt und die DIG-UTP-markierte RNA mit 0,1 Volumenteil 4 M LiCl und 3 Volumenteilen reinem Ethanol 30 min bei -80°C ausgefällt. Nach Zentrifugation (20 min, 15000 U/min, 4°C) wurde das Pellet mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, kurz bei RT getrocknet, in 15 µl DEPC-Wasser gelöst (30 min, 37°C) und als Sonde eingesetzt.

## 2.8 Hybridisierungsexperimente

### 2.8.1 Northern-Blot-Hybridisierungen

RNA wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.2.2) und unter Verwendung von Filterpapier (Filtrak) mit 10 x SSC über Nacht auf eine positiv geladene Nylonmembran (Boehringer) übertragen. Anschließend wurde die RNA durch UV-Bestrahlung im Stratalinker kovalent an die Membran gebunden.

### 2.8.1.1 Radioaktive Detektion

Die Prähybridisierung erfolgte mit 20 ml Hybridisierungspuffer in einer Hybridisierungsröhre für mindestens 1 h bei 42°C. Danach wurde der Prähybridisierungspuffer entfernt und die in 10 ml Hybridisierungspuffer aufgenommene, radioaktiv markierte und frisch denaturierte Gensonde (s. 2.7.1) zugefügt. Bei Wiederverwendung einer Gensonde wurde diese 10 min auf 80°C erhitzt. Die Hybridisierung wurde im Hybridisierungskubator für mindestens 14 h bei 42°C durchgeführt. Sonden, die wiederverwendet werden sollten, wurden danach bei 4°C aufbewahrt.

Die Filter wurden nach dem Entfernen der Hybridisierungslösung 3 x 20 min in 3 x SSC/0,1 % SDS bei 60°C im Hybridisierungskubator gewaschen. Anschließend wurden die Filter mit Folie abgedeckt und in einem „Phospho-Screen“, der nachfolgend am Phospho-Imager eingescannt wurde, bei RT exponiert. Sollte ein Filter nochmals mit einer anderen Gensonde hybridisiert werden, wurde die membrangebundene DNA durch zweimaliges Waschen mit einer 0,1 %-igen SDS-Lösung (je 20 min, 68°C) entfernt.

### 2.8.1.2 Nichtradioaktive Detektion

Die Prähybridisierung erfolgte mit 20 ml Hybridisierungslösung [5 x SSC, 50 % Formamid, 2 % (w/v) „Blocking Reagent“ (Boehringer), 0,02 % SDS, 0,1 % (w/v) N-Laurylsarkosin] in einer Hybridisierungsröhre für mindestens 2 h bei 68°C. Danach wurde die Lösung entfernt, die wie unter 2.7.2 beschrieben markierte und frisch denaturierte Sonde in 10 ml Hybridisierungslösung aufgenommen und zum Filter gegeben. Vor jeder weiteren Verwendung der Sonde, die bei -20°C aufbewahrt wurde, wurde diese 10 min bei 75°C denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte im Hybridisierungskubator für mindestens 14 h bei 68°C.

Anschließend wurde die Membran 2 x 5 min bei RT mit Waschlösung I (2 x SSC/0,1 % SDS) und 2 x 15 min bei 68°C mit Waschlösung II (0,1 x SSC/0,1 % SDS) gewaschen.

Die Detektion erfolgte bei RT. Dazu wurde die Membran in einer Fotoschale 5 min mit Maleinsäurepuffer (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl; pH=7,5) und anschließend 45 min mit „Blocking Puffer“ [1 % (w/v) „Blocking Reagent“ (Boehringer) in Maleinsäurepuffer] inkubiert. Danach wurde das Anti-DIG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat (Fab-Fragmente, Roche) zugegeben (Verdünnung 1:15000) und 90 min inkubiert. Nach dem Waschen (3 x 20 min mit Maleinsäurepuffer) wurde die Membran 5 min in Substratpuffer (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl; pH=9,5) equilibriert. Die Chemilumineszenz-Reaktion wurde durch Inkubation mit dem Substrat CSPD® (Boehringer) in einer Verdünnung von 1:100 in Substratpuffer gestartet. Nach 5 min wurde überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapier entfernt, die Membran in Folie eingeschweißt und mit einem Röntgenfilm 5 min bis 1 h bei 37°C exponiert.

### 2.8.2 Southern-Blot-Hybridisierungen

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA (s. 2.2.2) bei 20 V über 16 h wurde das Gel auf einem Taumler je 45 min in Denaturierungslösung und Neutralisierungslösung bewegt. Danach erfolgte der Transfer der DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Boehringer) unter Verwendung von Filterpapier (Filtrak) und 10 x SSC über Nacht und das kovalente Binden an die Membran durch UV-Bestrahlung im Stratalinker.

Die Hybridisierung und Detektion erfolgte analog der radioaktiven Detektion von RNA (s. 2.8.1.1).

## 2.9 Anlegen und Screenen einer cDNA-Bank

Die cDNA-Bank wurde aus Blattmaterial von Kartoffelpflanzen *Solanum tuberosum* L. cv. Désirée angelegt, das mit *Psm* infiziert worden war und nach 12, 24 und 36 hpi geerntet worden war. RNA- und mRNA-Präparation erfolgten wie unter 2.5.1 bzw. 2.5.2 beschrieben. Zur Synthese der cDNA wurde der „TimeSaver™ cDNA-Synthesis“ Kit (Amersham Pharmacia) nach Herstellerangaben verwendet. Um mittellange cDNA-Fragmente zu erhalten, wurde einem 20 µl-Ansatz 1 µl des 1:10 verdünnten pd(N)6-Primers zugesetzt. Die cDNA wurde ungerichtet in den Vektor λZAP II (Stratagene) kloniert und die rekombinanten Phagen mittels Gigapack Gold II (Stratagene) verpackt. Der Titer der cDNA-Bank wurde mit 400-500 pfu/µl bestimmt.

Zum Screenen der Bank wurden in einer Übernachtskultur in NZCYM-Medium mit 0,2 % Maltose XL1-Blue MRF' angezogen, 600 µl dieser Übernachtskultur mit 600 µl SM-Puffer und 50 µl Phagensuspension versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert (insgesamt 10 Ansätze). Nach Zugabe von 9 ml Top-Agar wurden die einzelnen Ansätze auf LB-Platten (Durchmesser 135 mm) ausplattiert, über Nacht bei 37°C inkubiert und danach 2 h bei 4°C gekühlt. Anschließend wurden die Phagen auf Nylon-Filter (Qiagen) durch einminütiges Auflegen auf die Platten übertragen, 2 min auf Denaturierungslösung denaturiert, 5 min auf Neutralisierungslösung neutralisiert, die Filter abschließend 10 min in 3 x SSC gewaschen und getrocknet. Das kovalente Binden der DNA an die Membran erfolgte durch UV-Bestrahlung im Stratalinker, die Hybridisierung mit den entsprechenden radioaktiv markierten Sonden wie unter 2.8.1.1 beschrieben. Kleine Bereiche der Agarplatten um positive Plaques wurden ausgestochen und die Phagen mit 1 ml SM-Puffer über Nacht im Kühlschrank bzw. 2 h bei RT eluiert, verdünnt und weiteren Screeningrunden bis zur Plaque-Homogenität unterzogen. Die Phagensuspensionen wurden durch Zugabe von 20 µl Chloroform haltbar gemacht (Lagerung bei 4°C).

Die korrespondierenden pBluescript Phagemide mit der integrierten cDNA wurden aus dem λZAP II Vektor mit Hilfe des Helferphagen ExAssist (*in vivo*-Excision) nach Herstellerangaben („Lambda ZAP® II Predigested Eco RI/CIAP-Treated Vector“ Kit, Stratagene) isoliert und in SOLR-Zellen übertragen.

## 2.10 Anlegen und Screenen einer genomischen Bank

Die von Clontech erhältliche genomische Bank Lambda EMBL3 SP6/T7 wurde nach genomischen Klonen der *PP2C* und des *ELH* durchsucht. Dazu wurden die Phagen, die nach Herstellerangaben  $1 \times 10^5$  pfu/µl enthielten, 1:100 mit SM-Puffer verdünnt, 45 µl dieser Verdünnung zusammen mit 10 ml Bakterienkultur des *E. coli* Stammes K802 (Anzucht über Nacht bei 37°C mit 0,2 % Maltose) und 10 ml SM-Puffer 30 min bei 37°C inkubiert, mit 140 ml Top-Agar gemischt, auf LB-Platten (Durchmesser 135 mm) ausplattiert (ca. 10 ml) und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Das Screenen der genomischen Bank erfolgte analog dem Screenen der cDNA-Bank (s. 2.9) bis zur Plaque-Homogenität. Von positiven Plaques wurde λ-DNA isoliert wie unter 2.5.5 beschrieben, Restriktionsanalysen unterzogen und einzelne Restriktionsfragmente in mit Sal I gespaltenen Vektor pUC18 kloniert.

## 2.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit einem automatischen DNA-Sequenzierer (MWG-Biotech): LiCor, Modell 4000L oder LONGREADIR 4200, wobei die aufgetrennten DNA-Fragmente über die 5'-Fluoreszenzmarkierung der verwendeten Primer (IRD800 bzw. IRD700, MWG Biotech) detektiert wurden. Die Sequenzreaktionen wurden mit verschiedenen Kits unterschiedlicher Firmen durchgeführt. Die Rohdaten wurden mit der Software „Base ImagIR Version 4.00“ (MWG Biotech) verarbeitet.

Außerdem wurden DNA-Proben zur Sequenzierung an die Firmen TopLab (Am Klopferspitz 19, 82152 Martinsried) und MWG AG Biotech (Anzinger Str. 7, 85560 Ebersberg) geschickt.

### 2.11.1 Auswertung der Sequenzdaten

Zum Vergleich von DNA- und Proteinsequenzen mit bereits bekannten Sequenzen wurde das Blast-Programm (Basic Local Alignment Search Tool) [156] als Service des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/>) genutzt.

Die Bearbeitung der Sequenzdaten erfolgte mit unterschiedlichen Programmen, u. a. TAIR Restriction Analysis (<http://arabidopsis.org/cgi-bin/patmatch/RestrictionMapper.pl>), JaMBW Chapter 2.1 (<http://www.embl-heidelberg.de/~toldo/JaMBW/2/1/>) und mit verschiedenen Programmen, die vom ExPASy Molecular Biology Server (<http://www.expasy.ch/>) angeboten werden.

## 2.12 Herstellung transgener Pflanzen

### 2.12.1 Medien

#### Medien (1l)

3 MS-Medium	4,41 g MS-Salze (Duchefa), 30 g Saccharose, 0,5 g MES; pH=5,8; nach dem Autoklavieren Zugabe von 1 ml Vitaminlösung*
2 MS-Medium	wie 3 MS, statt 30 g Saccharose 20 g
GMS	wie 3 MS, statt Saccharose 16 g Glucose
CG 76	1l GMS, 1 ml Vitaminlösung*, 5 ml NAA*, 0,1 ml BAP*, 0,5 ml Cefotaxim*, 1 ml Kanamycin*
CG 75	1l GMS, 1 ml Vitaminlösung*, 2 ml Zeatinriboside*, 20 µl NAA*, 20 µl GA <sub>3</sub> *, 0,5 ml Cefotaxim*, 0,5 ml Kanamycin*
MS 16	1l 3 MS, 1 ml Vitaminlösung*, 0,5 ml BAP*, 0,1 ml NAA*
F 16 K	1l 3 MS, 1 ml Vitaminlösung*, 0,5 ml BAP*, 0,1 ml NAA*, 1 ml Kanamycin*

Zur Herstellung fester Medien für Platten und Anzuchtstöpfe wurde dem entsprechenden Medium 7,5 g/l Agar zugesetzt.

#### \* Stammlösungen

100 ml Vitaminlösung	Nicotinsäure 50 mg, Pyridoxin HCl 50 mg, Thiamin HCl 10 mg, Glycin 200 mg; sterilfiltrieren
----------------------	---

NAA	1 mg/ml in Ethanol
BAP	1 mg/ml in Ethanol
GA <sub>3</sub>	1 mg/ml in Ethanol
Zeatinriboside	1 mg/ml in Ethanol
Ampicillin	100 mg/ml in Wasser oder 70 %-igem Ethanol
Kanamycin	50 mg/ml in Wasser
Chloramphenicol	35 mg/ml in Ethanol
Rifampicin	25 mg/ml in Methanol
Carbenicillin	100 mg/ml in Wasser
Cefotaxim	100 mg/ml in Wasser

### 2.12.2 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Die vollständige cDNA der putativen Phosphatase wurde aus dem Vektor pBluescript II herausgespalten und in sense- bzw. antisense-Orientierung in den binären Vektor pBKTX ligiert. Mit diesen Konstrukten (schematische Darstellungen der Konstrukte s. Abbildung 27 und Abbildung 28) wurden die kompetenten Zellen von *A. tumefaciens* transformiert (s. 2.2.5), auf LB-Platten mit Kanamycin (50 mg/l) ausplattiert und 2 d bei 28°C inkubiert. Nach Plasmidpräparation (s. 2.5.4.3) und Restriktionsspaltung wurde von je einer positiven Kolonie eine Übernachtskultur in 20 ml YEB-Medium mit Kanamycin (50 mg/l) angelegt und bei 28°C geschüttelt.

Für die Agrobakterien-vermittelte Transformation wurde die Übernachtskultur abzentrifugiert (10 min, 5000 U/min, RT), mit 20 ml 10 mM MgSO<sub>4</sub> gewaschen und das Pellet in 20 ml 3 MS-Medium resuspendiert.

### 2.12.3 Transformation und Regeneration von Kartoffelpflanzen

Zur Blattscheibentransformation wurden von steril angezogenen Kartoffelpflanzen (s. 2.3.1) *Solanum tuberosum* L. cv. Désirée mit einer Rasierklinge Blätter abgetrennt, die Petiolen entfernt und die Blätter an der Unterseite eingeritzt. Mit der Blattoberseite wurden sie schwimmend in Petrischalen ohne Nocken auf 3 MS-Medium (10 ml) gelegt. Ins Medium wurden 100 µl der mit dem sense- oder antisense-Konstrukt transformierten *A. tumefaciens* und wie oben beschrieben hergestellten Bakteriensuspension pipettiert und leicht umgeschwenkt. Die Platten wurden mit Aluminiumfolie umwickelt und 2 d in der Gewebekulturkammer (23°C) kultiviert. Danach wurden die Blätter mit der Oberseite nach unten in Petrischalen mit CG 76 (Kallus-induzierend) gelegt und etwa 10 Tage in der Gewebekulturkammer inkubiert. Anschließend wurden die Blätter auf CG 75 (Sproß-induzierend) umgesetzt und dieser Vorgang 14-tägig wiederholt, bis nach 4-6 Wochen Sprosse ausgebildet waren. Die Blätter wurden dann in Phytakon-Töpfe mit CG 75 transferiert und weitere 2-4 Wochen kultiviert, bis die Sprosse eine Länge von 2-3 cm erreicht hatten. Die Sprosse wurden abgetrennt und in Phytakon-Töpfe mit 3 MS mit Carbenicillin (50 mg/l) (Induktion des Wurzelwachstums) gesetzt.

Die Erhaltung der regenerierten Pflanzenlinien und die Anzucht von Pflanzen für Versuche erfolgte wie unter 2.3.1 beschrieben.

#### 2.12.4 Transformation und Regeneration von Tabakpflanzen

Zur Blattscheibentransformation wurden von in steriler Gewebekultur angezogenen Tabakpflanzen *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SRI Blätter abgetrennt, auf einem mit 3 MS getränkten Filterpapier mit einer Rasierklinge eingeritzt und in Stücke von etwa 1 cm<sup>2</sup> zerteilt, wobei die Blattrippen abgetrennt wurden. Diese Blattstücke wurden einige Minuten in einer wie unter 2.12.2 beschriebenen Bakteriensuspension der sense-Konstruktion inkubiert, auf Filterpapier abgetupft und mit der Blattoberseite nach unten auf MS 16 in Petrischalen gelegt. Die Petrischalen wurden luftdicht verschlossen, mit Aluminiumfolie umwickelt und 2 d in der Gewebekulturkammer bei 23°C kultiviert. Danach wurden die Blattstücke auf F 16 K überführt und 14-tägig umgesetzt, bis sich nach etwa 6 Wochen Kalli und Sprosse gebildet hatten. Die Sprosse wurden abgeschnitten, in Phytacon-Töpfe mit 2 MS mit Cefotaxim (100 mg/l) gesetzt und in der Gewebekulturkammer (23°C, 16 h Lichtphase) kultiviert. Die Erhaltung der regenerierten Pflanzenlinien erfolgte wie unter 2.3.8 beschrieben.

#### 2.13 Proteinanalytik

##### 2.13.1 Herstellung der Expressionsplasmide

Zur Expression der putativen Phosphatase in *E. coli* wurde das PCR-Produkt PCR gl-3 (vollständige cDNA der PPP ohne Stopcodon, Nukleotidsequenz s. Anhang 4 E) verwendet. Die Klonierungsstrategie ist unter 3.7.1 beschrieben.

Es wurden die Expressionsvektoren pQE 30 (Qiagen) und pRSET A (Invitrogen) benutzt, mit deren Hilfe Fusionsproteine exprimiert werden, die N-terminal einen Histidin-Anker tragen. Es wurde nach Herstellerangaben verfahren und die *E. coli* Zellen XL1-Blue MRF' bzw. BL 21 mit den Expressionsplasmiden transformiert.

##### 2.13.2 Expression in *E. coli*

Von den mit den Expressionsplasmiden transformierten Zellen wurden Übernachtskulturen einer Einzelkolonie in LB für die XL1-Blue MRF'-Zellen (mit Ampicillin 50 µg/ml und Kanamycin 20 µg/ml) bzw. SOB für die BL 21-Zellen (mit Ampicillin 50 µg/ml und Chloramphenicol 35 µg/ml) angelegt. Mit diesen wurden Hauptkulturen angeimpft und bei 37°C bis zu 5,5 h bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,5 geschüttelt.

Durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM wurde die Expression des rekombinanten Proteins induziert. Die Kultivation wurde weitere 5 Stunden fortgesetzt (Kontrollkulturen wurden ohne IPTG-Zusatz weiterkultiviert) und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen. Diese wurden zentrifugiert (2 min, 11000 U/min, 4°C) und die Pellets bei -20°C eingefroren.

##### 2.13.3 Reinigung des rekombinanten Proteins

Zur Reinigung des Proteins wurde ein Liter Bakterienkultur (10 x 100 ml in SOB) bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,5 angezogen, mit 1 mM IPTG induziert und 5 h bei 37°C weiterschüttelt. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge; 20 min, 5000 U/min, 4°C) und das Pellet in 40 ml „Native Binding Buffer“ pH=7,8 (angefertigt nach Herstellerangaben; „ProBond™ Purification Systems“ von Invitrogen) resuspendiert. Daran schlossen sich eine Sonifizierung (20 x 5 s bei 60 Watt), ein Frier- (in flüssigem Stickstoff) und ein Tauprozeß

(20 min im Wasserbad bei 37°C) an. Diese Behandlung wurde insgesamt viermal durchgeführt. Anschließend wurden die Zellreste abzentrifugiert (15 min, 4500 U/min, 4°C). Die Aufreinigung des Lysats erfolgte unter nativen Bedingungen mit dem „ProBond™ Purification System“ (Invitrogen) nach Herstellerangaben. Die Elution des Proteins erfolgte mit Hilfe eines pH-Gradienten.

#### 2.13.4 SDS-PAGE

##### *Isolierung löslicher Proteine*

Zu den gefrorenen Pellets (s. 2.13.2) wurden 500 µl Lysispuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) gegeben, die Pellets aufgetaut und sonifiziert (20 x 5 s bei 60 Watt). Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (30 min, 15000 U/min, 4°C) abgetrennt und der Überstand bei -80°C eingefroren.

##### *Konzentrationsbestimmung*

Die Proteinkonzentration der Bakterienextrakte wurde mit dem Bradford-Assay (BioRad) bestimmt. Dazu wurden 5 µl Extrakt mit 800 µl Wasser und 200 µl Bradford-Reagenz gemischt, 10 min bei RT inkubiert und die Extinktion bei 595 nm bestimmt. Der Gehalt errechnete sich aus Extinktion x 25/5.

##### *Diskontinuierliche Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen*

20 µg Protein wurden mit Wasser ad 20 µl und 10 µl 2 x Probenpuffer [125 mM Tris/HCl, pH=6,8; 5 mM EDTA; 15 % Glycerin (v/v); 2 % SDS (w/v); 0,1 % Bromphenolblau (w/v); 1 % β-Mercaptoethanol (v/v)] gemischt und 5 min auf 95°C erhitzt.

Zur Auftrennung [157] wurde eine Mini-PROTEAN® 3 Cell-Kammer (BioRad) mit einem 12 %-igen Trenngel (hergestellt mit dem Acrylamidmix „Rotiphorese® Gel 30“, Roth) und einem 5 %-igen Sammelgel verwendet [150]. Die Stromstärke während der Auftrennung betrug pro Gel 20 mA. Als Größenmarker wurde der „Prestained Protein Marker“ (Broad Range 6-175 kDa; BioLab) verwendet.

Für die Coomassiefärbung der Gele wurde die Roti® Blue Lösung (Roth) nach Herstellerangaben verwendet.

#### 2.13.5 Western-Blot-Analyse

Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine mit der „Trans-Blot® SD-Apparatur“ (BioRad) auf eine Nitrocellulosemembran (Porablot NCL; Macherey-Nagel) übertragen. Als Transferpuffer wurde Towbin-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol; pH=8,3) verwendet, der Transfer erfolgte 30 min bei 15 V. Die geblotteten Gele wurden danach zur Kontrolle mit Coomassie-Blue angefärbt.

Die Membran wurde 1 h in 10 ml Blocking-Puffer (TBS-Puffer 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl; pH=7,5 unter Zusatz von 1 % BSA) unter leichtem Schütteln inkubiert und 2 x 5 min in je 20 ml TBST-Puffer (TBS-Puffer unter Zusatz von 0,05 % Tween 20). Die Inkubation mit dem 1. Antikörper (Anti-His Antibody; Invitrogen) in einer Verdünnung von 1:5000 in Blocking Puffer erfolgte über Nacht unter leichtem Schütteln. Danach wurde die Membran 2 x 5 min

mit je 20 ml TBST und 1 x 5 min mit TBS gewaschen. Die Inkubation mit dem 2. Antikörper, dem Peroxidase-gekoppelten Anti-Maus IgG-Antikörper (Sigma) in einer Verdünnung von 1:4000 in Blocking Puffer erfolgte 1 h unter leichtem Schütteln.

Nach dem Waschen der Membran (3 x 20 min mit TBS) erfolgte die Detektion des Peroxidase-Antikörpers durch Chemilumineszenz mit dem „ECL+“ Kit (Amersham Pharmacia) nach Herstellerangaben, wobei die Expositionszeiten auf Biomax MS 1 Filmen (Kodak) zwischen 1 min und 1 h lagen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Ermittlung optimaler Bedingungen zur Pflanzenanzucht

##### 3.1.1 Voraussetzungen

Auf der Suche nach neuen, pathogeninduzierten Genen in Kartoffel wurden die Versuchspflanzen zunächst aus Saatgutknollen von *Solanum tuberosum* L. cv. Désirée angezogen. Dazu wurden die Knollen ca. 2 Wochen vor dem Auslegen in gedämpfte Erde (Erde/Sand 1:1, aus der Institutsgärtnerei) bei Raumtemperatur vorgekeimt. Die vier- bis fünfwöchige Anzucht der Pflanzen erfolgte im Gewächshaus bei etwa 18-24°C und 15-16 h Licht.

Zur Induzierung der SAR wurden 2 ältere Blätter der Kartoffelpflanzen mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (*Psm*) infiltriert. Die Kontrollpflanzen wurden mit 10 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung inokuliert. Die Induktion der SAR wurde mit Hilfe einer Sonde des molekularen Markers saure Chitinase (*CHTA*) in RNA-Hybridisierungsexperimenten überprüft, da nachgewiesen werden konnte, daß die systemische Aktivierung dieses Gens mit der Ausprägung der SAR korreliert [42, 138,140].

Nach der Durchführung der SAR-Induktionsexperimente und dem Abreifen der Pflanzen wurden die Knollen mindestens 6 Wochen bei 4°C gelagert und dann erneut zur Pflanzenanzucht verwendet.

Um auszuschließen, daß in der Kartoffelknolle überdauernde Viren zur Geninduktion führen, wurde von einer Anzucht der Versuchspflanzen aus Knollen Abstand genommen. Außerdem war es während der Sommermonate problematisch, Pflanzen anzuziehen, die nicht bereits vor den Infektionsexperimenten mit Schadinsekten (z. B. Blattläuse, Thripse) in Kontakt gekommen waren. Deshalb kam es häufig zu Induktion des SAR-Markergens Chitinase A, und das Blattmaterial konnte nicht verwendet werden, um nach pathogeninduzierten Genen zu suchen. Aus diesen Gründen wurden zunächst die Anzuchtbedingungen verändert.

##### 3.1.2 Veränderte Anzuchtbedingungen

Die Vermehrung der Versuchspflanzen erfolgte nun in Gewebekultur. 4-5 Wochen alte Pflanzen wurden in sterilisierte Erde (Einheitserde ED73/Sand 1:1) ausgetopft und 1 Woche in Minigewächshäusern angezogen. Danach wurden die Pflanzen in der Phytokammer unter definierten Bedingungen kultiviert und verschiedene Parameter wie das Alter der Pflanzen und der Einfluß von Düngung und Pestiziden auf die Ausprägung der SAR getestet. Tabelle°1 zeigt die Ergebnisse, die in Northern-Blot-Analysen anhand des molekularen Markergens Chitinase A erhalten wurden.

SAR-Induktions-experiment	Alter der Pflanzen	Bemerkungen	lokale Induktion von <i>CHTA</i>	systemische Induktion von <i>CHTA</i>
1	2 Wochen		+	unklar
2	2 Wochen		+	unklar
3	5 Wochen	Pflanzen aus Knollen angezogen	+	nur 24 hpi nur 1 Pflanze
4	4 Wochen		+	+
5	4 Wochen	Behandlung mit Bi 58 <sup>#</sup> 1 Woche vor Induktionsexperiment	unklar	unklar
6	4 Wochen	Behandlung mit Bi 58 <sup>#</sup> 3 Wochen vor Induktionsexperiment	+	unklar
7	4.5 Wochen	Behandlung mit Lizetan <sup>*</sup>	+	unklar
8	5 Wochen		+	nur 48 hpi
9	5 Wochen		+	+
10	5 Wochen	Blattmaterial mehrerer Pflanzen gemischt	+	überwiegend wie erwartet
11	5 Wochen	Blattmaterial mehrerer Pflanzen gemischt	+	überwiegend wie erwartet
12	5 Wochen	Blattmaterial mehrerer Pflanzen gemischt	+	überwiegend wie erwartet
13	5 Wochen	Blattmaterial mehrerer Pflanzen gemischt	+	überwiegend wie erwartet

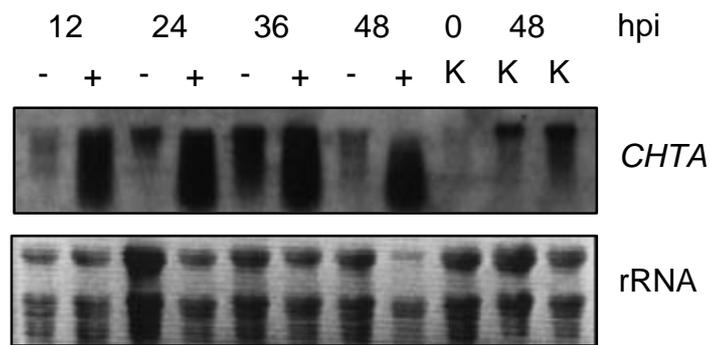
Tabelle 1 Unterschiedliche Anzuchtbedingungen und Induktion der SAR in Kartoffelpflanzen *Solanum tuberosum* L. cv. Désirée

# Bi 58<sup>®</sup> Pestizid gegen beißende Insekten (Chemie GmbH Bitterfeld-Wolfen)

\* Lizetan<sup>®</sup> Dünger und Pestizid (Bayer)

Es konnte gezeigt werden, daß ein Alter der Versuchspflanzen von 4-5 Wochen, angezogen aus Sterilkultur und ohne vorherige Behandlung mit Pestiziden und/oder Dünger Voraussetzungen sind, um die Akkumulation der sauren Chitinase durch Bakterieninfiltration 12 hpi in infiltrierten bzw. 36 hpi in den nichtinfiltrierten darüberliegenden Blättern zu induzieren. Ein Beispiel eines SAR-Induktionsexperimentes ist in Abbildung 1 dargestellt. Allerdings kam es auch unter diesen Anzuchtbedingungen in einigen Fällen zur Induktion von Chitinase A in Kontrollpflanzen. Diese Pflanzen waren vermutlich bereits vor der SAR-Induktion einem Pathogenbefall oder einer Verwundungsreaktion ausgesetzt.

### Infiltrierte Blätter



### Nichtinfiltrierte Blätter

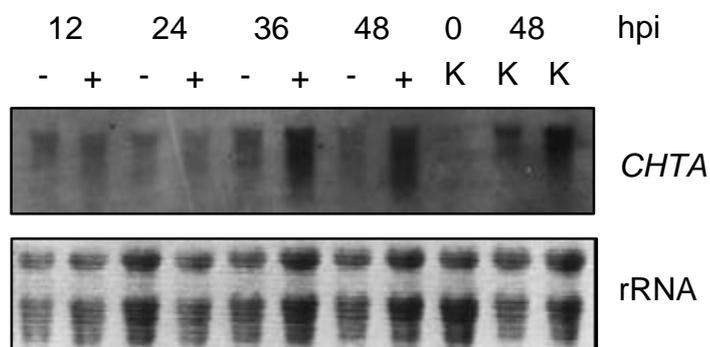


Abbildung 1 Transkriptakkumulation von Chitinase A in Kartoffelblättern nach Infiltration mit *Psm*

K unbehandelte Kontrolle  
- Infiltration von 10 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung  
+ Infiltration von *Psm*

Es wurden 25 µg Gesamt-RNA aufgetragen, isoliert aus zu den oben angegebenen Zeitpunkten geerntetem Blattmaterial, elektrophoretisch aufgetrennt und auf einen Nylonfilter geblottet. Der Filter wurde gegen eine DIG-markierte Chitinase-Sonde hybridisiert. Als Ladungskontrolle dient das ethidiumbromidgefärbte RNA-Gel.

Das gezeigte Hybridisierungsmuster ist repräsentativ für 5 Experimente.

## 3.2 Identifizierung pathogenresponsiver Gene aus Kartoffel

### 3.2.1 "mRNA-Differential Display"

Das „mRNA-Differential Display“, auch als „Differential Display RT-PCR“ (DDRT-PCR) bezeichnet, bietet gegenüber anderen Methoden zur Untersuchung der differentiellen Genexpression, wie z. B. „Differential screening“ oder subtraktive Hybridisierung, einige Vorteile. So ist es möglich, transiente Änderungen im Expressionsmuster festzustellen, den zeitlichen Verlauf einer Genexpression zu verfolgen, organ- bzw. gewebespezifische Expression zu vergleichen und Gene zu identifizieren, deren Expression reprimiert ist [158]. Das zeigt sich in einer verstärkten bzw. verringerten Bandenintensität auf einem Polyacrylamidgel, auf dem die cDNA-Teilpopulationen aufgetrennt werden. Diese cDNA-Teilpopulationen erhält man durch reverse Transkription von Gesamt- oder Poly(A)<sup>+</sup>-mRNA mit einem Oligo-dT-Ankerprimer und anschließender PCR mit dem Ankerprimer und einem Zufallsprimer.

Zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene mittels DDRT-PCR wurde RNA aus unbehandelten Blättern *Psm*- bzw.  $MgCl_2$ -behandelter Pflanzen isoliert, die 12, 24, 36 und 48 hpi geerntet worden waren. Dieses Material wurde zum Teil von Catherine Kistner (IPB Halle) zur Verfügung gestellt.

Die Bedingungen entsprachen weitgehend den von Liang [153] bzw. Linskens [154] veröffentlichten Methoden. Zur cDNA-Erststrangsynthese wurden drei Oligo-dT-Primer (a, c, e) benutzt, zur nachfolgenden PCR 15 Zufallsprimer (1-15) mit einer Länge von 22 nt, deren Sequenzen im Anhang 1 A aufgelistet sind. Beide Primertypen enthielten eine Hind III-Schnittstelle, um die amplifizierten Fragmente anschließend besser klonieren zu können [154]. Es wurden insgesamt 45 Primerkombinationen getestet und dabei 28 PCR-Fragmente identifiziert, die nach *Psm*-Infiltration verstärkt bzw. verringert auftraten. Diese wurden aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten und eluiert, mittels PCR reamplifiziert und kloniert. Die zu diesen Fragmenten korrespondierenden cDNAs wiesen im Vergleich mit Sequenzen aus Datenbanken mehrheitlich Homologien zu chloroplastidärer RNA auf, nur wenige zeigten begrenzte Homologien zu anderen Sequenzen. Da die Fragmente kurz waren und die Signifikanz der Homologien nicht hoch, ließen die Sequenzanalysen keinen Schluß auf eine mögliche Funktion der korrespondierenden Gene zu. Zwei cDNA-Klone wurden aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeiten weiterbearbeitet.

Klon dd110 (*PP2C*)<sup>b</sup> stammt von einem Fragment, das 24 Stunden nach *Psm*-Infiltration verstärkt auftrat, dargestellt in Abbildung 2.

---

<sup>b</sup> Der zu einem späteren Zeitpunkt isolierte cDNA-Klon c110-2 (s. 3.5.2.1) weist signifikante Homologien zu Proteinphosphatasen Typ 2C auf, so daß aus Gründen der Überschaubarkeit die Bezeichnung *PP2C* vorweggenommen wird.

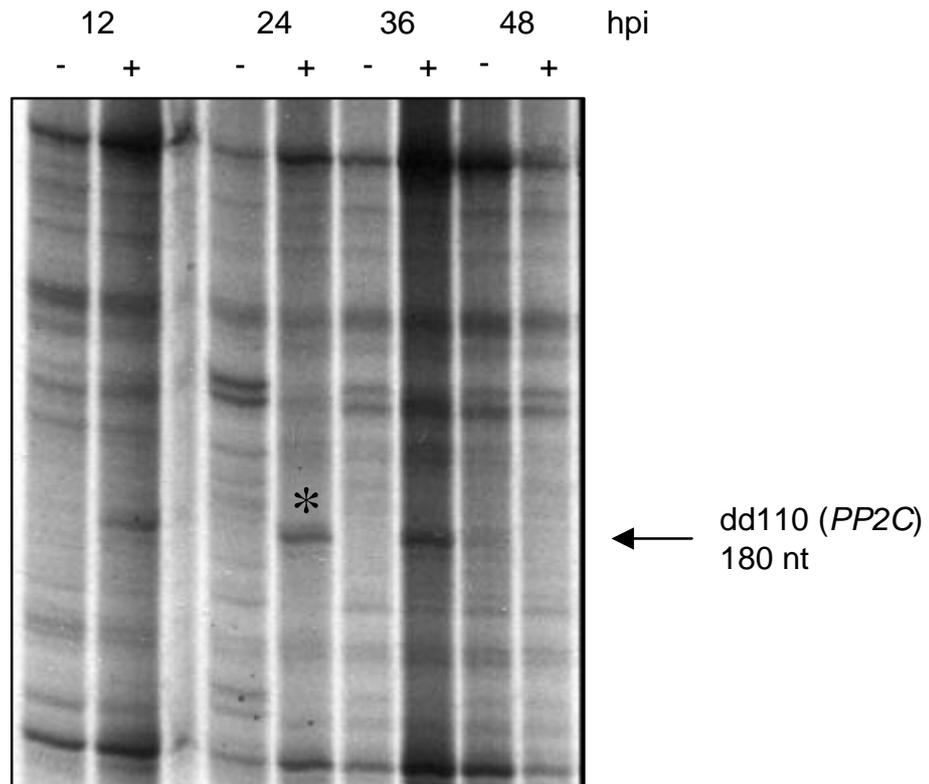


Abbildung 2 Ausschnitt aus einem Polyacrylamidgel nach DDRT-PCR (Autoradiogramm)

- Infiltration von 10 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung  
 + Infiltration von *Psm*

Zur RT-PCR wurde 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt, die aus zu den oben angegebenen Zeitpunkten geernteten unbehandelten Blättern infiltrierter Kartoffelpflanzen isoliert worden war. Als Primer wurden der Oligo-dT-Primer e und der Zufallsprimer 6 verwendet. Die Markierung der Fragmente erfolgte mit α-[<sup>33</sup>P]dATP.

Das klonierte „differentielle“ Fragment dd110 ist mit \* gekennzeichnet.

Das Fragment dd110, dessen Nukleotidsequenz sich in Anhang 2 A befindet, hat eine Länge von 180 nt. Es zeigt bei Vergleichen mit Sequenzen in der Datenbank begrenzte Homologie zu einem Zinkfingerprotein aus *Arabidopsis thaliana* (Acc. No. X98669). Diese Homologie erstreckt sich von nt 119-156 der Kartoffel-cDNA bzw. von nt 1604-1641 des *A. t.*-Gens. Es wurden der Oligo-dT-Primer e und der Zufallsprimer 6, mit denen die RT-PCR durchgeführt wurde wiedergefunden.

Der zweite Klon dd903 (*ELH*)<sup>c</sup> stammt von einem 36 Stunden nach *Psm*-Behandlung verstärkt auftretenden Fragment (Daten nicht gezeigt). Der Klon ist 207 nt lang (Sequenz s. Anhang 2 B) und zeigt begrenzte Homologie zu einem Phosphoprotein aus *Plasmodium bergheii* (Acc. No. L21710). Die Sequenzähnlichkeit liegt zwischen den Nukleotiden 73-144 des „Differential Display“ Fragmentes und den Nukleotiden 536-607 des *P. bergheii*-Gens. Es sind sowohl der Oligo-dT-Primer e als auch der Zufallsprimer 10 vorhanden.

<sup>c</sup> Der zu einem späteren Zeitpunkt isolierte genomische Klon 903/2-6 (s. 3.4.3.3) weist signifikante Homologien zu einem ELIP-Homolog aus *Arabidopsis thaliana* auf, so daß aus Gründen der Überschaubarkeit die Bezeichnung *ELH* vorweggenommen wird.

### 3.2.2 cDNA-AFLP

Da das cDNA-AFLP, auch „Restriction Fragment Differential Display“ (RFDD) genannt, effektiv zum Screenen nach differentiell exprimierten Genen eingesetzt wird [159, 160], wurde diese Methode ebenfalls genutzt, um nach pathogeninduzierten Genen in Kartoffel zu suchen. Dazu wurde in Kartoffelblätter von *S. tuberosum* L. cv. Désirée 10 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung bzw. *Psm* infiltriert. 3 und 12 hpi wurden die infiltrierten und die darüberliegenden nichtinfiltrierten Blätter geerntet und aus diesem Blattmaterial Gesamt-RNA isoliert. Außerdem wurden Blätter unbehandelter Pflanzen zur RNA-Isolierung geerntet. Ausgehend von 1 µg Gesamt-RNA wurde das cDNA-AFLP mit dem „displayProfile™“ Kit (Display Biotech) durchgeführt. Dabei werden zur cDNA-Synthese degenerierte 5'-T<sub>n</sub>V<sup>d</sup>-Primer eingesetzt. Die gewonnene doppelsträngige cDNA wird mit Taq I, einer Restriktionsendonuklease mit häufiger Erkennungssequenz in cDNAs [161] geschnitten. Daran schließt sich die Adaptorligation an, wobei einer der beiden Adaptoren eine Schutzgruppe trägt, die eine 3'-5'-fill in-Reaktion an überhängenden Fragmentenden verhindert [162]. Zur PCR wird ein <sup>33</sup>P-endmarkierter Primer, der sogenannte „0-extension-primer“ (komplementär zum Adaptor mit Schutzgruppe) und ein zum 2. Adaptor komplementärer Primer mit je 3 Basen am 3'-Ende verwendet. So soll gewährleistet werden, daß nur ein Subset der cDNA-Fragmente spezifisch amplifiziert wird [163]. Von den möglichen 64 Primern wurden die Primer Eu 1-16 getestet, deren Sequenzen sich im Anhang 1 B befinden.

Es wurden 24 PCR-Fragmente identifiziert, die nach *Psm*-Infiltration verstärkt auftraten. Sie wurden aus dem Sequenzgel ausgeschnitten, eluiert, reamplifiziert und kloniert. Die Ergebnisse der Sequenzanalyse des cDNA-AFLP unterscheiden sich deutlich von denen des „Differential Display“: die zu den PCR-Fragmenten gehörenden cDNA-Sequenzen zeigen nur in einem Fall Homologien zu chloroplastidärer RNA. Andere cDNAs kodieren für Polypeptide, die Homologien zu pflanzlichen PR-Proteinen und menschlichen Proteinen aufweisen. Im Falle einiger cDNAs konnten keinerlei Sequenzähnlichkeiten gefunden werden. Die Ergebnisse der Sequenzanalyse sind in Tabelle<sup>o</sup>2 dargestellt.

---

<sup>d</sup> V entspricht A, C und G

Fragment Nr.	Sequenzähnlichkeit zu
3-1	<i>Homo sapiens</i> Protein
3-2	<i>Homo sapiens</i> PAC Klon
<b>7-1</b>	<b>Glucanase</b> aus <i>Lycopersicon esculentum</i>
7-2	Serin–Threonin–Kinase aus <i>Rattus rattus</i>
<b>7-3</b>	<b>Osmotin</b> aus <i>Solanum commersonii</i>
9-1	Phosphatmangel-induzierte saure Phosphatase aus <i>Lycopersicon esculentum</i>
9-2	NADH-Oxidoreduktase aus <i>Flaveria ramosissima</i>
9-3	konserviertes Protein aus <i>Candida albicans</i>
9-4	<i>Homo sapiens</i> Protein
9-5	keine Sequenzähnlichkeiten
11-1	keine Sequenzähnlichkeiten
<b>11-2</b>	<b>PAL</b> aus <i>Nicotiana tabacum</i>
11-3	keine Sequenzähnlichkeiten
11-4	keine Sequenzähnlichkeiten
12-1	keine Sequenzähnlichkeiten
12-2	chloroplastidäre rRNA aus <i>Nicotiana tabacum</i>
12-3	mitochondriale tRNA aus <i>H. annuus</i>
13-1	HSP-assoziiertes Protein aus <i>Arabidopsis thaliana</i>
14-1	keine Sequenzähnlichkeiten
<b>14-2</b>	<b>Calmodulin</b> aus <i>Phaseolus vulgaris</i>
14-3	keine Sequenzähnlichkeiten
14-4	L-Carnitin-Dehydratase aus <i>Caenorhabditis elegans</i>
16-1	keine Sequenzähnlichkeiten
16-2	Photosystem Q(B) Protein aus <i>Glycine max.</i>

Tabelle 2 Ähnlichkeiten von cDNA-AFLP-Fragmenten zu Sequenzen aus Datenbanken

Hervorgehoben wurden Fragmente mit Sequenzähnlichkeiten zu PR-Proteinen und das Fragment mit Homologie zu einer Phosphatmangel-induzierten sauren Phosphatase aus *Lycopersicon esculentum* (grau unterlegt), das näher charakterisiert wurde.

Unter den klonierten Fragmenten war auch das Fragment 9-1 mit Sequenzähnlichkeiten zu einer Phosphatmangel-induzierten sauren Phosphatase aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*; in Tabelle<sup>2</sup> grau unterlegt) von Interesse. Es hat eine Länge von 331 nt und trat als starke Bande im Autoradiogramm 12 h nach *Psm*-Infiltration auf, wie aus Abbildung 3 hervorgeht.

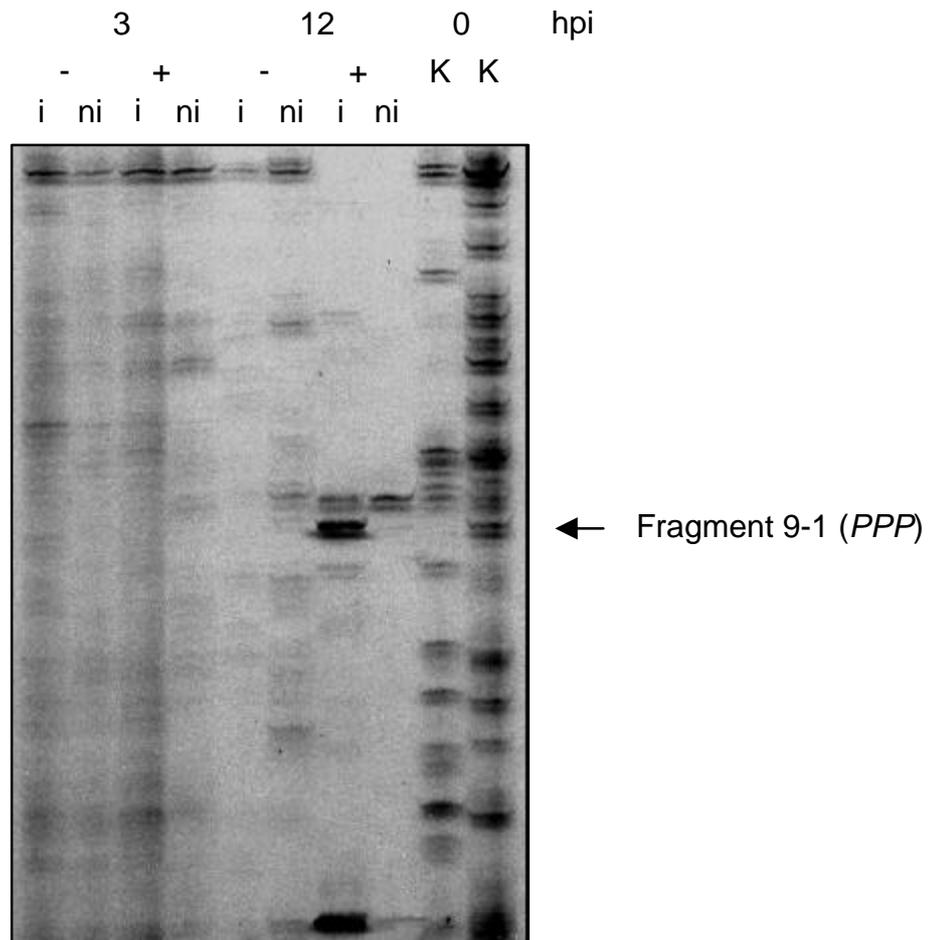


Abbildung 3 Ausschnitt aus einem Polyacrylamidgel nach cDNA-AFLP (Autoradiogramm)

K unbehandelte Kontrollpflanze  
 - Infiltration mit 10<sup>0</sup>mM MgCl<sub>2</sub>  
 + Infiltration mit *Psm*  
 i infiltrierte Blätter  
 ni nichtinfiltrierte darüberliegende Blätter

Zum cDNA-AFLP wurde 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt, die zu den oben angegebenen Zeitpunkten aus dem genannten Blattmaterial isoliert worden war. Als Primer wurden der „0-extension Primer“ und der Primer Eu-9 verwendet. Die Markierung der Fragmente erfolgte mit γ- [<sup>33</sup>P]dATP. Das klonierte Fragment 9-1 (*PPP*) ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Auch dieser Klon [*PPP* (potato putative phosphatase)] wurde wie die Klone dd110 (*PP2C*) und dd903 (*ELH*) weiteren Untersuchungen unterzogen.

### 3.2.3 Expression der identifizierten Gene nach *Psm*-Infiltration

Durch Expressionsanalysen wurde die Pathogenresponsivität der mittels DDRT-PCR bzw. cDNA-AFLP gefundenen Gene überprüft. Dazu wurden je 2 ältere Blätter einer Kartoffelpflanze von *S. tuberosum* L. cv. Désirée mit *Psm* bzw. MgCl<sub>2</sub> infiltriert, diese behandelten und die beiden darüberliegenden nicht behandelten Blätter zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und daraus Gesamt-RNA isoliert. Als Sonden dienten zunächst die subklonierten und radioaktiv markierten PCR-Fragmente. In einigen Fällen, auf die im Weiteren näher eingegangen wird, konnte eine differentielle Expression der zugehörigen Gene festgestellt werden. In den meisten Fällen konnten entweder gar keine bzw. nur

unspezifische schwache Signale detektiert werden, so daß keine Aussage über eine differentielle Genexpression getroffen werden konnte.

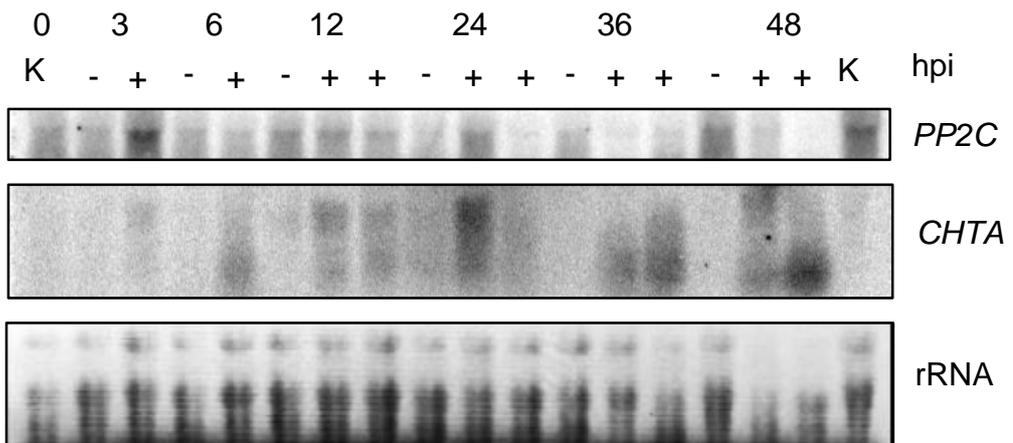
Für die DDRT-PCR-Klone dd110 (*PP2C*) und dd903 (*ELH*) konnten mit den radioaktiv markierten PCR-Fragmenten als Sonden keine Signale in Northern-Blot-Analysen gefunden werden. Das kann zum einen daran liegen, daß die Fragmente mit einer Länge von 180 bzw. 207 nt zu kurz sind, um eine ausreichende Markierung zu gewährleisten. Andererseits könnten die zu den induzierten Fragmenten korrespondierenden mRNAs nur gering abundant sein.

#### *Semiquantitative RT-PCR*

Da mit den radioaktiv markierten „Differential Display“-Fragmenten dd110 (*PP2C*) und dd903 (*ELH*) als Sonden keine Signale in Northern-Hybridisierungsexperimenten detektiert werden konnten, wurde versucht, eine differentielle Genexpression mittels semiquantitativer RT-PCR zu zeigen. Dazu wurden sequenzspezifische Primer aus den Randbereichen der „Differential Display“ Fragmente ausgewählt (Sequenzen s. Anhang 1 C) und die PCR unter unterschiedlichen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Auch mit dieser Methode ließ sich keine eindeutige Induktion der zu den „Differential Display“-Fragmenten dd110 und dd903 korrespondierenden Gene feststellen (Daten nicht gezeigt).

Die Expression der *PP2C* nach Pathogenbehandlung wurde mit einem ca. 7.5 kb langen, radioaktiv markierten Fragment als Sonde, das aus einer genomischen Bank isoliert wurde untersucht (s. 3.4.3.1). Es wurden mehrere Hybridisierungsexperimente durchgeführt, dennoch konnte kein einheitliches Muster gefunden werden. Ein Beispiel eines Hybridisierungsexperimentes ist in Abbildung 4 dargestellt.

### Infiltrierte Blätter



### Nichtinfiltrierte Blätter

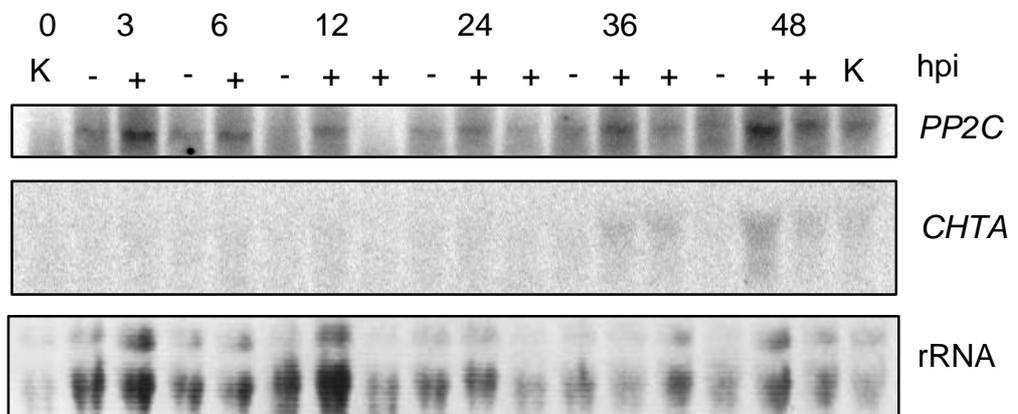


Abbildung 4 Transkriptakkumulation der *PP2C* in Kartoffelblättern nach *Psm*-Infiltration  
 K unbehandelte Kontrolle  
 - Infiltration von 10 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung  
 + Infiltration von *Psm*

Es wurden 25 µg Gesamt-RNA aufgetragen, isoliert aus zu den angegebenen Zeitpunkten geerntetem Blattmaterial, elektrophoretisch aufgetrennt und auf einen Nylonfilter geblottet. Der Filter wurde gegen das radioaktiv markierte 7.5 kb Pst-Fragment aus der genomischen Bank (s. 3.4.3.1) hybridisiert. Als Ladungskontrolle dient das ethidiumbromidgefärbte RNA-Gel.

Das gezeigte Hybridisierungsmuster konnte für kein weiteres Experiment bestätigt werden.

Im dargestellten Experiment sind erhöhte *PP2C*-Transkriptmengen im infiltrierten Blattmaterial 3 Stunden nach Bakterieninfiltration zu erkennen. Chitinase-Transkripte akkumulieren 24-48 hpi im mit *Psm* infiltrierten Gewebe, die RNA ist aber degradiert, da Banden unterschiedlicher Größe hybridisieren. Die systemische Transkriptakkumulation beginnt 3 Stunden nach *Psm*-Infiltration und hält bis zu 48 hpi an. Ausnahmen bilden je eine Pflanze, deren Blätter 12 bzw. 24 hpi geerntet wurden und in denen keine erhöhten *PP2C*-Transkriptmengen zu detektieren waren. Zu erkennen sind allerdings auch erhöhte *PP2C*-Transkriptmengen in einer unbehandelten Kontrollpflanze, wobei in dieser Pflanze keine *CHTA*-mRNA detektiert wurde. In diesem Experiment stieg die *CHTA*-mRNA-Menge in nichtinfiltrierten Blättern schwächer als in vergleichbaren Experimenten an (s. Abbildung 1). In einem weiteren Experiment wurden *PP2C*-Transkripte im infiltrierten Blattmaterial, nicht aber in unbehandelten Blättern nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Die Expression des *ELH* nach Pathogenbehandlung wurde mit einem ca. 0.5 kb langen, radioaktiv markierten Fragment als Sonde gezeigt und ist in Abbildung 5 dargestellt. Das als Sonde verwendete Fragment wurde aus einer cDNA-Bank isoliert (s. 3.5.3).

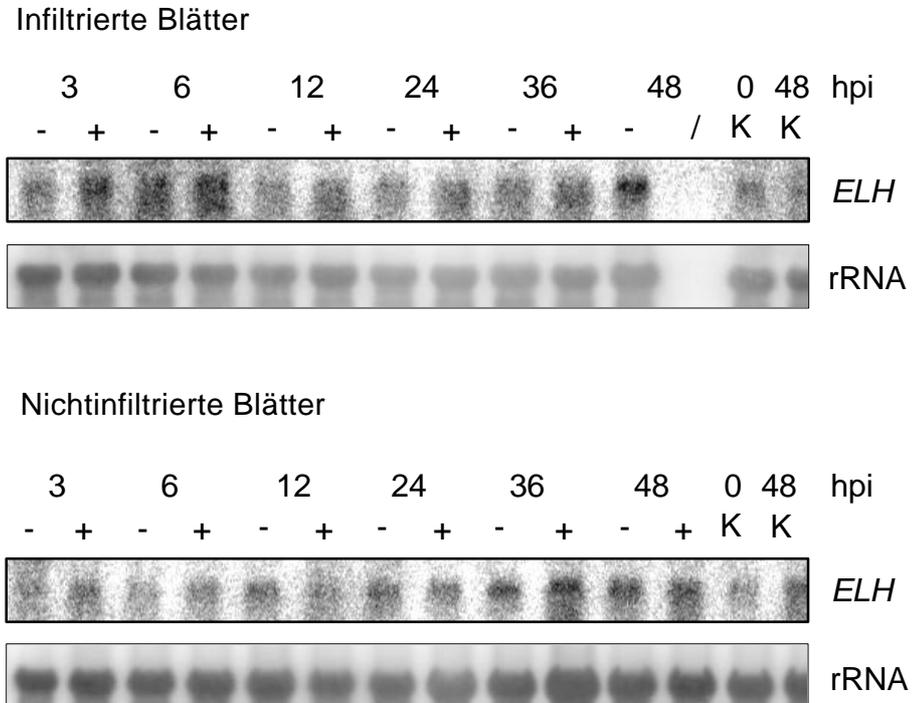


Abbildung 5 Transkriptakkumulation des *ELH* in Kartoffelblättern nach *Psm*-Infiltration  
 K unbehandelte Kontrolle  
 - Infiltration von 10 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung  
 + Infiltration von *Psm*

Es wurden 25 µg Gesamt-RNA aufgetragen, isoliert aus zu den angegebenen Zeitpunkten geerntetem Blattmaterial, elektrophoretisch aufgetrennt und auf einen Nylonfilter gebロットet. Der Filter wurde gegen das radioaktiv markierte 0.5 kb Eco RI-Fragment aus der cDNA-Bank (s. 3.5.3) und gegen eine rRNA-Sonde als Ladungskontrolle hybridisiert.

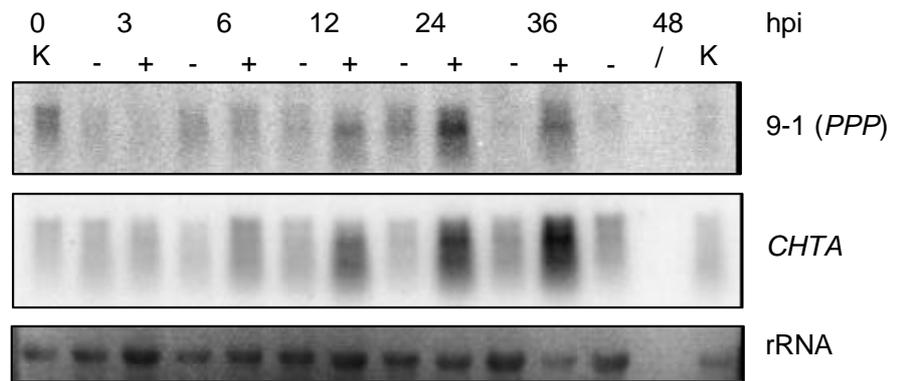
Das gezeigte Hybridisierungsmuster ist repräsentativ für 4 Experimente.

Es konnte keine differentielle Genexpression gezeigt werden, denn *ELH*-Transkripte wurden sowohl in einzelnen mit MgCl<sub>2</sub>-Lösung als auch mit *Psm* infiltrierten Blättern und in darüberliegenden unbehandelten Blättern detektiert. 48 hpi nach *Psm*-Infiltration konnte aus dem behandelten Blattmaterial keine ausreichenden RNA-Mengen isoliert werden. In weiteren Experimenten konnte das gezeigte Expressionsmuster bestätigt werden, nur in einem Fall wurden *ELH*-Transkripte in mit *Psm* infiltrierten Blättern detektiert.

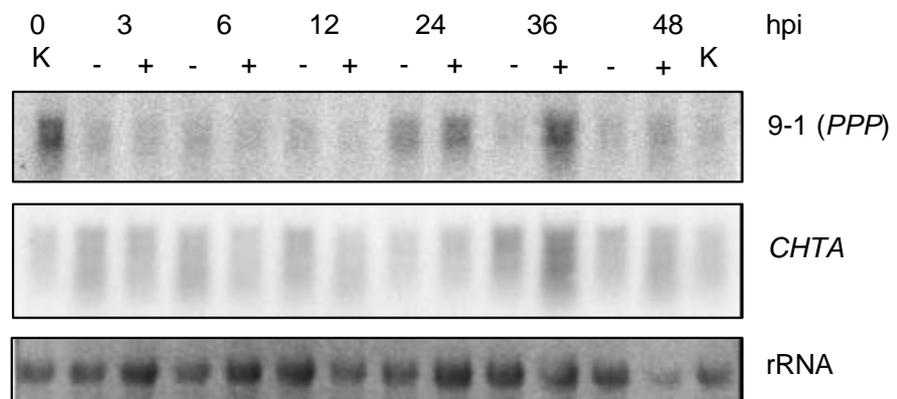
Für das mittels cDNA-AFLP isolierte Fragment 9-1 (*PPP*) konnte in mehreren Experimenten eine differentielle Transkriptakkumulation des korrespondierenden Gens gezeigt werden. Zwei Kinetiken sind in Abbildung 6 A und B dargestellt. Als Sonde für die Northern-Blot-Hybridisierungen diente das radioaktiv markierte 331 nt lange Eco RI-Fragment, das nach cDNA-AFLP isoliert und kloniert worden war (s. 3.2.2).

**A**

Infiltrierte Blätter



Nichtinfiltrierte Blätter



**B**

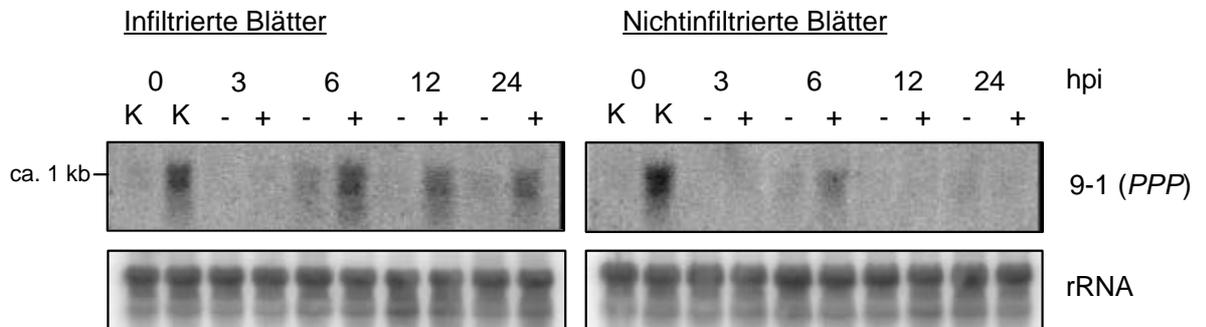


Abbildung 6 Transkriptakkumulation des Fragmentes 9-1 mit Homologie zu einer Phosphatmangel-induzierten sauren Phosphatase aus *Lycopersicon esculentum* (PPP) in Kartoffelblättern nach Infiltration mit *Psm* in zwei ausgewählten Experimenten (A und B)

- K unbehandelte Kontrolle
- Infiltration von 10 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung
- + Infiltration von *Psm*

Es wurden 25 µg Gesamt-RNA aufgetragen, isoliert aus zu den angegebenen Zeitpunkten geerntetem Blattmaterial, elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylonfilter geblottet. Die Filter wurden gegen das radioaktiv markierte 0.3 kb Eco RI-Fragment 9-1 (PPP), die Chitinase-Sonde und eine rRNA-Sonde hybridisiert.

Im Unterschied zum im cDNA-AFLP Experiment gefundenen Expressionsmuster, in dem das Fragment 9-1 nur 12 Stunden nach *Psm*-Infiltration lokal auftrat (s. Abbildung 3), wurden

erhöhte mRNA-Transkriptmengen des korrespondierenden Gens (*PPP*) in den Northern-Analysen sowohl im infiltrierten als auch darüberliegenden nichtinfiltrierten Gewebe zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infiltration detektiert.

Im ersten Experiment (Abbildung 6 A) akkumuliert die *PPP*-mRNA 12-36 Stunden nach *Psm*-Infiltration im infiltrierten bzw. 24 und 36 hpi im nichtinfiltrierten Blattmaterial. Daß die Pathogenbehandlung erfolgreich war, zeigte die anschließende Hybridisierung mit einer Chitinase A-Sonde. Auch die Chitinase-mRNA-Transkriptmengen sind wie erwartet nach *Psm*-Infiltration im infiltrierten (12-36 hpi) und nichtinfiltrierten (36 hpi) Blattmaterial erhöht. Auffallend ist die hohe *PPP*-Transkriptmenge in einer unbehandelten Kontrollpflanze. Diese Pflanze war möglicherweise bereits vor Versuchsbeginn verwundet oder von Pathogenen befallen.

Ein weiteres Experiment (Abbildung 6 B) zeigt, daß die *PPP*-Induktion bereits zu früheren Zeitpunkten, nämlich 6 Stunden nach *Psm*-Behandlung im infiltrierten Gewebe beginnen kann. In nichtinfiltrierten Blättern war nur 6 hpi eine erhöhte Transkriptmenge zu detektieren. Auch in diesem Experiment war eine unbehandelte Kontrollpflanze wahrscheinlich bereits mechanisch geschädigt oder von Pathogenen befallen, was sich in einer hohen *PPP*-Transkriptmenge äußert. Die Größe des detektierten Transkriptes wurde mit Hilfe eines RNA-Größenmarkers bestimmt und beträgt ca. 1 kb.

Anhand von Northern-Blot-Analysen konnte weiterhin gezeigt werden, daß die Gene mit Homologien zu bekannten PR-Proteinen (s. Tabelle 2) durch Pathogenbehandlung im infiltrierten Blattmaterial induziert wurden (Abbildung 7).

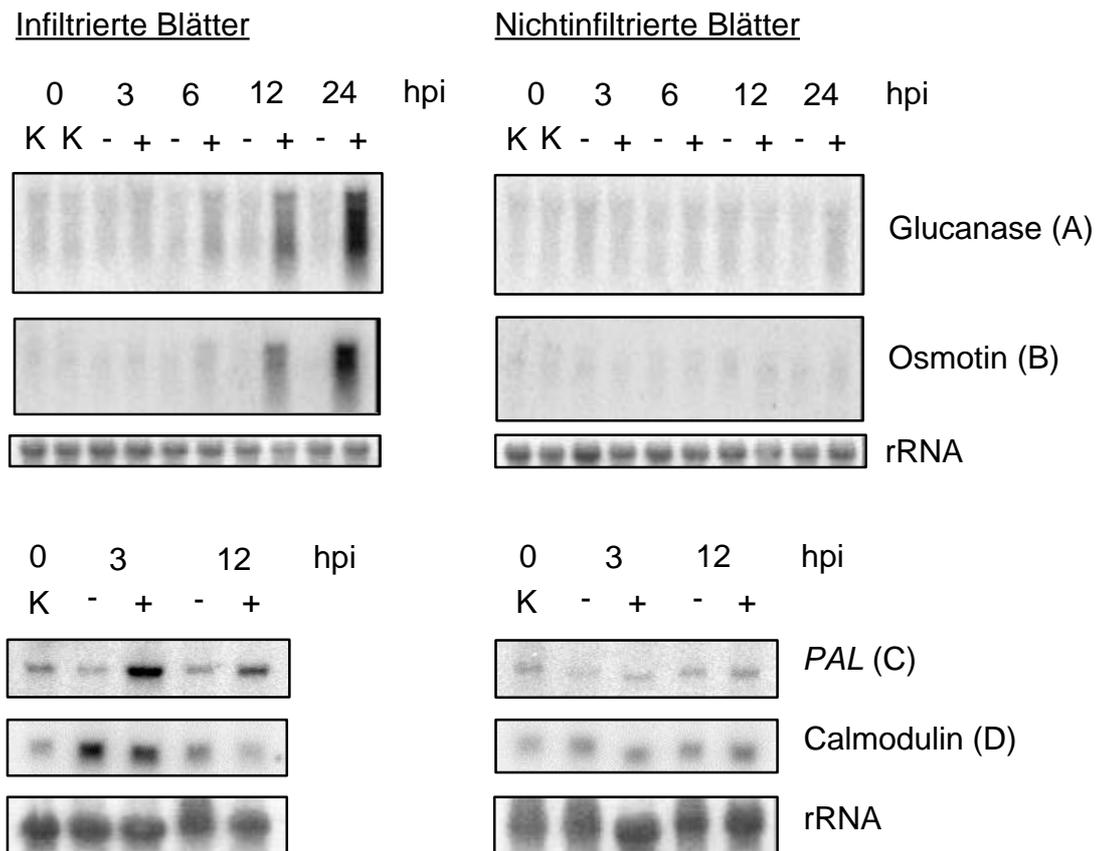


Abbildung 7 Transkriptakkumulation verschiedener Gene mit Homologien zu PR-Proteinen in Kartoffelblättern nach Infiltration mit *Psm*  
 K unbehandelte Kontrolle  
 - Infiltration von 10 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung  
 + Infiltration von *Psm*

Es wurden 25 µg Gesamt-RNA, isoliert aus zu den angegebenen Zeitpunkten geerntetem Blattmaterial, aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylonfilter geblottet. Die Filter wurden gegen die entsprechenden Sonden (radioaktiv markierte cDNA-AFLP-Fragmente) hybridisiert.

- A Fragment mit Homologie zu einer Glucanase aus *Lycopersicon esculentum* (ca. 0.3 kb)
- B Fragment mit Homologie zu Osmotin aus *Solanum commersonii* (ca. 0.3 kb)
- C Fragment mit Homologie zu *PAL* aus *Nicotiana tabacum* (ca. 0.3 kb)
- D Fragment mit Homologie zu Calmodulin aus *Phaseolus vulgaris* (ca. 0.15 kb)

Zur Ladungskontrolle wurde gegen eine rRNA-Sonde hybridisiert.

mRNA-Transkripte des Gens mit Homologie zu einem Glucanase-Gen aus *Lycopersicon esculentum* akkumulieren 12 und 24 Stunden nach Pathogenbehandlung (Abbildung 7 A). Bekannt sind pathogeninduzierte Glucanasen u. a. auch aus Weizen [44], Tomate [164] und Paprika [37].

Ebenso zeigt das Gen mit Homologie zu Osmotin eine differentielle Expression. Die mRNA akkumuliert 12-24 Stunden nach Infiltration mit *Psm* (Abbildung 7 B). Diese Aktivierbarkeit verschiedener Osmotingene durch Infektion mit Bakterien oder Pilzen ist für Weizen [44], Paprika [37], Tomate [164], Tabak und Kartoffel *Solanum commersonii* [43, 165] beschrieben.

Erhöhte Transkriptmengen für PAL-mRNA konnten 3 und 12 Stunden nach *Psm*-Infiltration detektiert werden. Auch in *S. tuberosum* L. cv. Datura wurde nach Elicitierung von Zellkulturen eine schnelle und transiente Akkumulation von 3 PAL- mRNAs gefunden [166].

Nach TMV- bzw. Elicitorbehandlung erhöht sich auch in Tabak die *PAL*-Transkriptmenge [167].

Das Gen mit Homologie zu Calmodulin ist 3 Stunden nach Infiltration sowohl von *Psm* als auch  $MgCl_2$ -Lösung induziert. Das läßt auf eine Induktion durch Verwundung schließen, wie sie auch für Tomate gefunden wurde [168]. In *S. tuberosum* L. cv. Russet Burbank wurden verschiedene Calmodulinisoformen gefunden, die durch Berührung induzierbar sind [169]. Andere Isoformen des Calmodulins werden aber auch durch Elicitorbehandlung induziert, wie in Sojabohne gezeigt wurde [170].

Zur Überprüfung der erfolgreich durchgeführten Pathogenbehandlung wurden die Filter, nachdem sie mit den PCR-Fragmenten hybridisiert worden waren, der Hybridisierung mit einer *CHTA*-Sonde unterzogen. Dabei zeigte sich, daß die Chitinase-Induktion im infiltrierten Gewebe 24 Stunden nach *Psm*-Inokulation und im nichtinfiltrierten Gewebe 36 hpi begann (Daten nicht gezeigt).

### 3.3 Expression von *PP2C*, *ELH* und *PPP*

Da zahlreiche bekannte PR-Gene sowohl durch verschiedenartige Pathogene wie Bakterien und Pilze als auch durch Phytohormone, chemische Signalsubstanzen oder Streß induziert sein können, sollte der Einfluß biotischer und abiotischer Effektoren für die drei mittels DDRT-PCR bzw. cDNA-AFLP identifizierten Gene untersucht werden.

#### 3.3.1 Expression der *PPP* nach Behandlung von Kartoffelblättern mit Sporen von *P. infestans*

Da der Oomycet *Phytophthora infestans* als Auslöser der Kraut- und Knollenfäule einen der wichtigsten Erreger von Kartoffelkrankheiten darstellt, wurde neben dem *Brassica*-Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* auch eine Sporensuspension dieses Oomyceten verwendet, um die Aktivierung der *PPP* durch Pathogene zu untersuchen.

Dazu wurde auf die Unterseite von Kartoffelblättern eine Sporensuspension von *P. infestans* (Sporendichte von  $5 \times 10^5$ /ml) bzw.  $H_2O$  (Kontrollpflanzen) aufgetropft, behandeltes und darüberliegendes unbehandeltes Blattmaterial zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und die Gesamt-RNA für Northern-Blot-Analysen verwendet. Das Blattmaterial zur RNA-Gewinnung bzw. die RNA wurden von Cornelia Göbel (IPB, Halle) zur Verfügung gestellt.

Zunächst wurde die *PPP*-Expression in mit Phytophthorasporien inokuliertem Gewebe untersucht. Als Kontrolle für die erfolgte Infektion diente die anschließende Hybridisierung des Filters mit einer *4CL*-Sonde. Wie in Abbildung 8 A zu sehen ist, akkumulieren sowohl *PPP*- als auch *4CL*-Transkripte 4-6 Tage nach Infektion mit einem Maximum nach 6 Tagen, wobei die *4CL*-Transkriptakkumulation bereits nach 2 Tagen beginnt.

Auffällig ist die Expression der *PPP* in einer mit  $H_2O$  behandelten Kontrollpflanze 7 Tage nach der Behandlung (wobei keine *4CL*-Transkripte detektierbar waren), für die es keine schlüssige Erklärung gibt. Die erhöhten Transkriptmengen von *PPP* und der *4CL* 0 dpi sind auf eine größere Menge an aufgetragener RNA zurückzuführen.

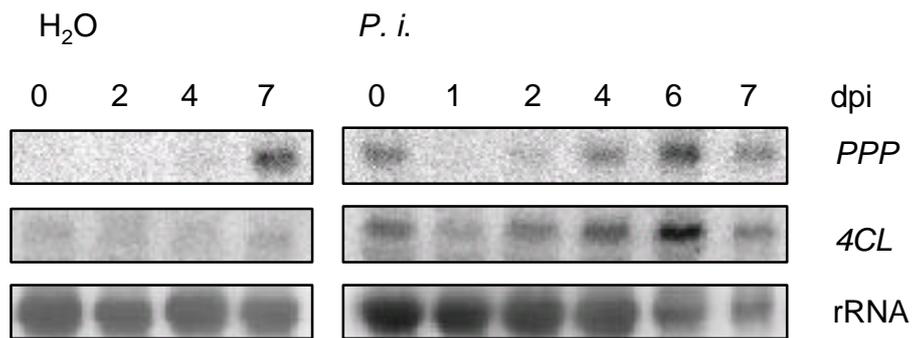
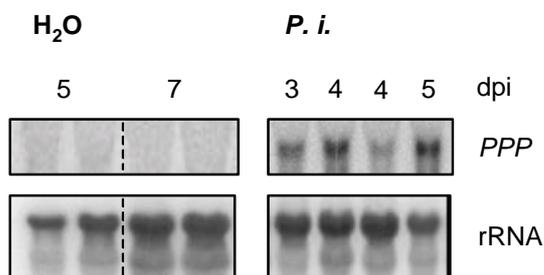
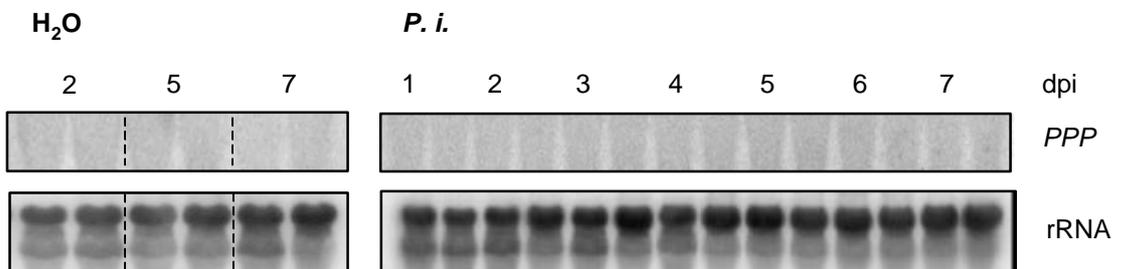
**A****B**Inokulierte BlätterNichtinokulierte Blätter

Abbildung 8 Transkriptakkumulation der *PPP* in Kartoffelblättern nach Infektion mit einer Sporensuspension von *Phytophthora infestans* in zwei Experimenten (A und B)

H<sub>2</sub>O Auftropfen von Wasser auf die Blattunterseite (Kontrollen)

*P. i.* Auftropfen einer Sporensuspension von *P. infestans* auf die Blattunterseite

*4CL* 4-Cumarat:CoA Ligase

Es wurden 25 µg Gesamt-RNA, isoliert aus zu den angegebenen Zeitpunkten geerntetem Blattmaterial, aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf einen Nylonfilter geblotet. Die Filter wurden gegen das radioaktiv markierte 0.9 kb Not I-cDNA-Fragment (*PPP*), eine *4CL*- und eine rRNA-Sonde hybridisiert.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob es neben der lokalen Aktivierung der *PPP*-Gene nach Infektion mit einer Sporensuspension von *P. infestans* auch zu einer systemischen Transkriptakkumulation kommt.

Abbildung 8 B zeigt eine lokale Genaktivierung 3-5 Tage nach der Behandlung mit einer *P. i.*-Sporensuspension. In den unbehandelten Blättern von mit Sporen behandelten Pflanzen kommt es zu keiner *PPP*-Transkriptakkumulation.

### 3.3.2 Einfluß von Phytohormonen und Signalsubstanzen auf die Genexpression

Phytohormone sind, wie auch bestimmte chemische Substanzen, nicht nur an der Merkmalsausprägung und Regulierung physiologischer Prozesse beteiligt, sondern auch an Signaltransduktionsketten, die zur Pathogenabwehr und der Etablierung der SAR führen. Deshalb wurde der Einfluß von Phytohormonen und Signalsubstanzen zum einen an abgeschnittenen Blättern, die bis zu 24 Stunden in den entsprechenden Lösungen inkubiert wurden, und zum anderen an Pflanzen, in deren Blätter die Lösungen infiltriert wurden, untersucht.

#### 3.3.2.1 Untersuchung der Genexpression in abgetrennten Blättern nach Phytohormon- und Signalsubstanzbehandlung

Für diese Versuche wurden von Kartoffelpflanzen *S. tuberosum* L. cv. Désirée Fiederblätter abgeschnitten und für 6, 12 bzw. 24 Stunden in folgende Lösungen gestellt: H<sub>2</sub>O (Kontrollen), Saccharose, Methyljasmonat, Salicylsäure, Arachidonsäure und Abscisinsäure. Die aus diesen Blättern gewonnene Gesamt-RNA wurde für Northern-Blot-Analysen eingesetzt, deren Ergebnisse in Abbildung 9 dargestellt sind.

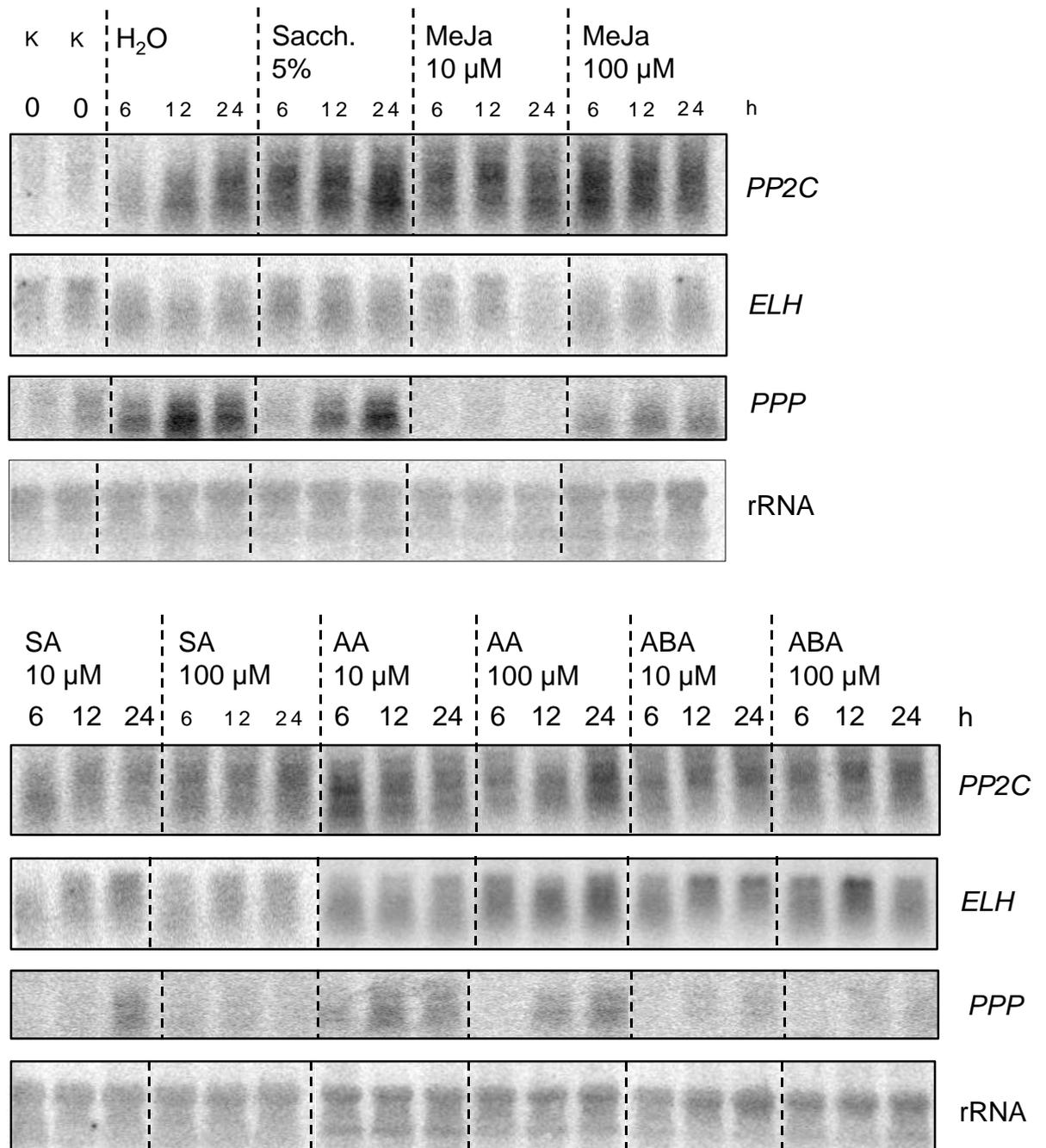


Abbildung 9 Transkriptakkumulation von *PP2C*, *ELH* und *PPP* nach Applikation von Phytohormonen und Signalsubstanzen in abgetrennte Kartoffelblätter

K Blätter unbehandelte Kontrollen  
H<sub>2</sub>O mit Wasser behandelte Kontrollblätter  
Sacch 5% mit 5% (w/v) Saccharose behandelte Blätter  
MeJa mit Methyljasmonat (10 und 100 μM) behandelte Blätter  
SA mit Salicylsäure (10 und 100 μM) behandelte Blätter  
AA mit Arachidonsäure (10 und 100 μM) behandelte Blätter  
ABA mit (+)-cis, trans Abscisinsäure (10 und 100 μM) behandelte Blätter

Es wurden 25 μg Gesamt-RNA aufgetragen, die zu den angegebenen Zeitpunkten aus dem genannten Blattmaterial isoliert worden war. Die RNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylonfilter geblotet. Die Filter wurden gegen folgende radioaktiv markierte Sonden hybridisiert:

*PP2C* ein ca. 2.3 kb Eco RI-cDNA-Fragment  
*ELH* ein ca. 0.5 kb Eco RI-cDNA-Fragment  
*PPP* ein ca. 0.9 kb Not I-cDNA-Fragment

Zur Ladungskontrolle wurde gegen eine rRNA-Sonde hybridisiert.

Es ist zu erkennen, daß bereits das Abtrennen der Blätter und die Inkubation in **Wasser** einen induzierenden Einfluß auf die Genexpression von *PP2C* und *PPP* hat, nicht aber auf die Expression des *ELH*. Dieser induzierende Einfluß des Wassers auf die *PPP* war in weiteren Versuchen nicht zu beobachten (s. Abbildung 11).

Die Behandlung mit 5 %-iger **Saccharose**lösung führt zur Zunahme der *PP2C*-Transkriptmenge zu allen Zeitpunkten, wohingegen die Gene der *PPP* und des *ELH* nicht durch Saccharose aktiviert werden.

Da bekannt ist, daß Jasmonsäure als Signalmolekül in der pflanzlichen Abwehr agiert [117] und außerdem nach *Psm*-Infiltration ein Anstieg der Menge freier Jasmonsäure in Kartoffelblättern nachgewiesen werden konnte (Dr. Peter Landgraf, persönliche Mitteilung), wurde der Einfluß von **Methyljasmonat** in zwei unterschiedlichen Konzentrationen auf die Genexpression untersucht. Dabei zeigt sich, daß sowohl die Inkubation in 10 als auch in 100 µM Methyljasmonatlösung zu einer Erhöhung der *PP2C*-mRNA-Transkriptmenge 6-24 Stunden nach Behandlungsbeginn führt. Für das *ELH* und die *PPP* konnte in keinem Fall eine nennenswerte Transkriptakkumulation detektiert werden.

**Salicylsäure** wird eine zentrale Rolle als Signalmolekül bei der Pathogenabwehr und der Ausprägung der SAR zugeschrieben [96, 171]. Der Einfluß von Salicylsäure in unterschiedlichen Konzentrationen (10 und 100 µM) auf das Genexpressionsmuster war daher von besonderem Interesse. Es ist zu erkennen, daß es zu keiner Akkumulation der zur *PP2C*, zum *ELH* bzw. zur *PPP* korrespondierenden mRNA kommt.

Nach **Arachidonsäure**behandlung (10 und 100 µM) akkumulieren *PP2C*-, *ELH*- und *PPP*-Transkripte, die aber weder von der Konzentration noch von der Inkubationszeit abhängig sind. Die untersuchten Gene sind also nicht durch Arachidonsäure induzierbar.

**Abscisinsäure**, die an einigen Signalkaskaden der pflanzlichen Streß- und Pathogenantwort beteiligt ist [29, 115, 172], ist ein weiteres Hormon, dessen Einfluß auf die Expressionsmuster untersucht wurde. Auch diese Behandlungsart (10 und 100 µM) führt zur konzentrations- und inkubationszeitunabhängigen Erhöhung von *PP2C*- und *ELH*-Transkripten. Im Gegensatz dazu waren für die *PPP* in keinem Fall erhöhte mRNA-Transkriptmengen nachzuweisen. Aus diesem Versuch wurde geschlossen, daß die untersuchten Gene nicht durch Abscisinsäure induzierbar sind.

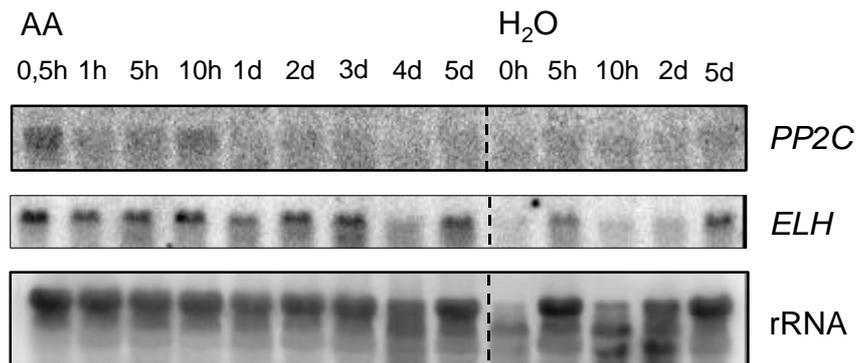
In einem weiteren Versuch gleichen Aufbaus wurde die fehlende Induzierbarkeit der Expression der untersuchten Gene bestätigt.

### 3.3.2.2 Untersuchung der Genexpression nach Infiltration von Arachidonsäure

Aus der Literatur ist der elicitierende Einfluß der Arachidonsäure auf streß- und pathogeninduzierte Gene in Kartoffel bekannt. Außerdem hatte die Behandlung abgetrennter Fiederblätter von Kartoffel Hinweise darauf ergeben, daß Arachidonsäure die Expression der *PP2C* und des *ELH* beeinflusst. Deshalb sollte untersucht werden, wie sich eine Infiltration von Arachidonsäure auf das lokale und systemische Expressionsmuster auswirkt.

Dazu wurde in Blätter von Kartoffelpflanzen *S. tuberosum* L. cv. Désirée eine Arachidonsäurelösung (2 mg/ml) bzw. Wasser (Kontrollpflanzen) infiltriert und die infiltrierten und die darüberliegenden unbehandelten Blätter zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 30 min bis 5 d geerntet. Die daraus gewonnene Gesamt-RNA, die für Northern-Blot-Analysen verwendet wurde, wurde von Cornelia Göbel zur Verfügung gestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt.

### Infiltrierte Blätter



### Nichtinfiltrierte Blätter

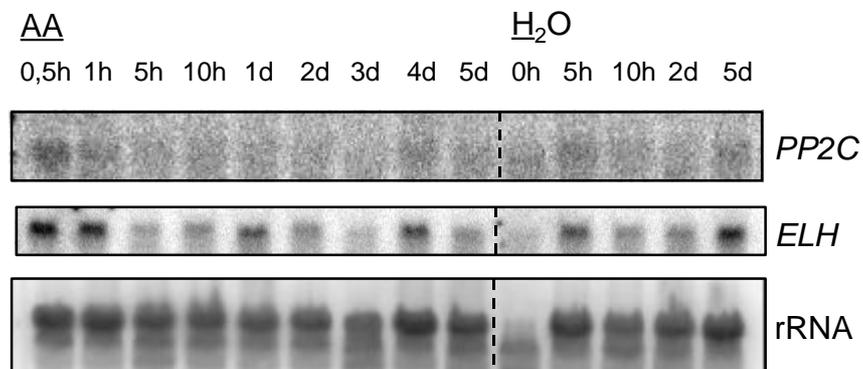


Abbildung 10 Transkriptakkumulation der *PP2C* und des *ELH* in Kartoffelblättern nach Infiltration mit Arachidonsäure (2 mg/ml)

Es wurden 25 µg Gesamt-RNA aufgetragen, isoliert aus zu den angegebenen Zeitpunkten geerntetem Blattmaterial, elektrophoretisch aufgetrennt und auf einen Nylonfilter geblottet. Der Filter wurde gegen folgende radioaktiv markierte Sonden hybridisiert:

*PP2C* ein ca. 0.4 kb Eco RI-cDNA-Fragment  
*ELH* ein ca. 0.5 kb Eco RI-cDNA-Fragment

Zur Ladungskontrolle wurde gegen eine rRNA-Sonde hybridisiert.

Die Infiltration von Arachidonsäure in Kartoffelblättern führt bereits nach 30 min zur Induktion der *PP2C*-mRNA-Synthese im infiltrierten Gewebe, die bis zu 10 h mehr oder weniger stark anhält. Auch in unbehandelten Blättern arachidonsäurebehandelter Pflanzen wurden 30 min nach der Infiltration erhöhte Transkriptmengen nachgewiesen. In mit Wasser behandelten Pflanzen kommt es weder in den infiltrierten noch in den darüberliegenden nichtinfiltrierten Blättern zu einer Akkumulation von *PP2C*-Transkripten.

Auch die zum *ELH* korrespondierenden Transkripte sind nach Behandlung mit Arachidonsäure erhöht. In behandelten Blättern hält die mRNA-Akkumulation über den gesamten zeitlichen Verlauf des Experimentes von 30 min bis zu 5 Tagen an (Ausnahme: niedrigere Transkriptmengen nach 4 Tagen). Im darüberliegenden unbehandelten Blattmaterial waren erhöhte Transkriptmengen 30 min, 1 Stunde, 1 Tag und 4 Tage nach Arachidonsäurebehandlung nachweisbar. *ELH*-Transkripte akkumulieren allerdings auch nach Wasserbehandlung in infiltrierten und nichtinfiltrierten Blättern 5 h und 5 d nach der

Infiltration. Die Infiltration von Arachidonsäure hat demzufolge nur einen induzierenden Einfluß auf die *ELH*-Transkriptakkumulation im infiltrierten Blattmaterial.

### 3.3.2.3 Untersuchung der *PPP*-Genexpression nach Systeminbehandlung

Eine weitere Substanz, deren Einfluß auf die Expression der *PPP* untersucht wurde, war Systemin. Dieses Oligopeptid ist als Wundsignal bekannt, das sowohl in verwundeten als auch in unverwundeten Blättern die Akkumulation des Proteinase-Inhibitors II (*PIN2*) induziert [124, 173, 174]. Dazu wurde zunächst eine 0,1 bzw. 10 nM Systeminlösung in Blätter von Kartoffelpflanzen *S. tuberosum* L. cv. Désirée infiltriert. Kontrollpflanzen wurden mit Wasser infiltriert. Behandelte und darüberliegende unbehandelte Blätter wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infiltration geerntet und daraus Gesamt-RNA isoliert, die für Northern-Blot-Analysen eingesetzt wurde. *PPP*-mRNA-Transkripte akkumulieren zeit- und dosisunabhängig sowohl in einzelnen, mit H<sub>2</sub>O als auch systemininfiltrierten Blättern und in einzelnen darüberliegenden unbehandelten Blättern (Daten nicht gezeigt).

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluß der Systeminapplikation unterschiedlicher Konzentrationen auf die *PPP*-Expression in abgetrennten Blättern von *S. tuberosum* L. cv. Désirée untersucht. Aus den Blättern, die 3, 6, 12 bzw. 24 Stunden nach Behandlungsbeginn geerntet wurden, wurde Gesamt-RNA isoliert und diese in Northern-Blot-Analysen eingesetzt. Um zu prüfen, ob die Systeminbehandlung erfolgreich war, wurden die Filter anschließend mit einer *PIN2*-Sonde hybridisiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 gezeigt. Es ist zu erkennen, daß die Applikation einer 0,1 nM Systeminlösung keinen induzierenden Einfluß auf die *PPP*-Expression hat, die zum Proteinase-Inhibitor II korrespondierende mRNA aber 6-24 h nach Behandlungsbeginn akkumuliert. Durch die Behandlung mit einer 1 nM Systeminlösung kommt es nach 24 h zur Erhöhung der *PPP*-Transkriptmenge in zwei von drei parallel behandelten abgetrennten Blättern. Die systemininduzierte *PIN2*-Aktivierung hält über den Versuchszeitraum von 6-24 h an. Nur in einem von drei Blättern waren 24 h nach Applikation der 10 nM Systeminlösung erhöhte *PPP*-Transkriptmengen nachweisbar, wohingegen auch unter diesen Versuchsbedingungen das *PIN2*-Expressionsmuster wie erwartet ausfiel. Die Behandlung der Kontrollpflanzen mit Wasser führt zu keiner nachweisbaren Akkumulation der *PPP*-mRNA, aber zu einem leichten Anstieg der *PIN2*-Trankriptmengen 12 und 24 h nach Versuchsbeginn.

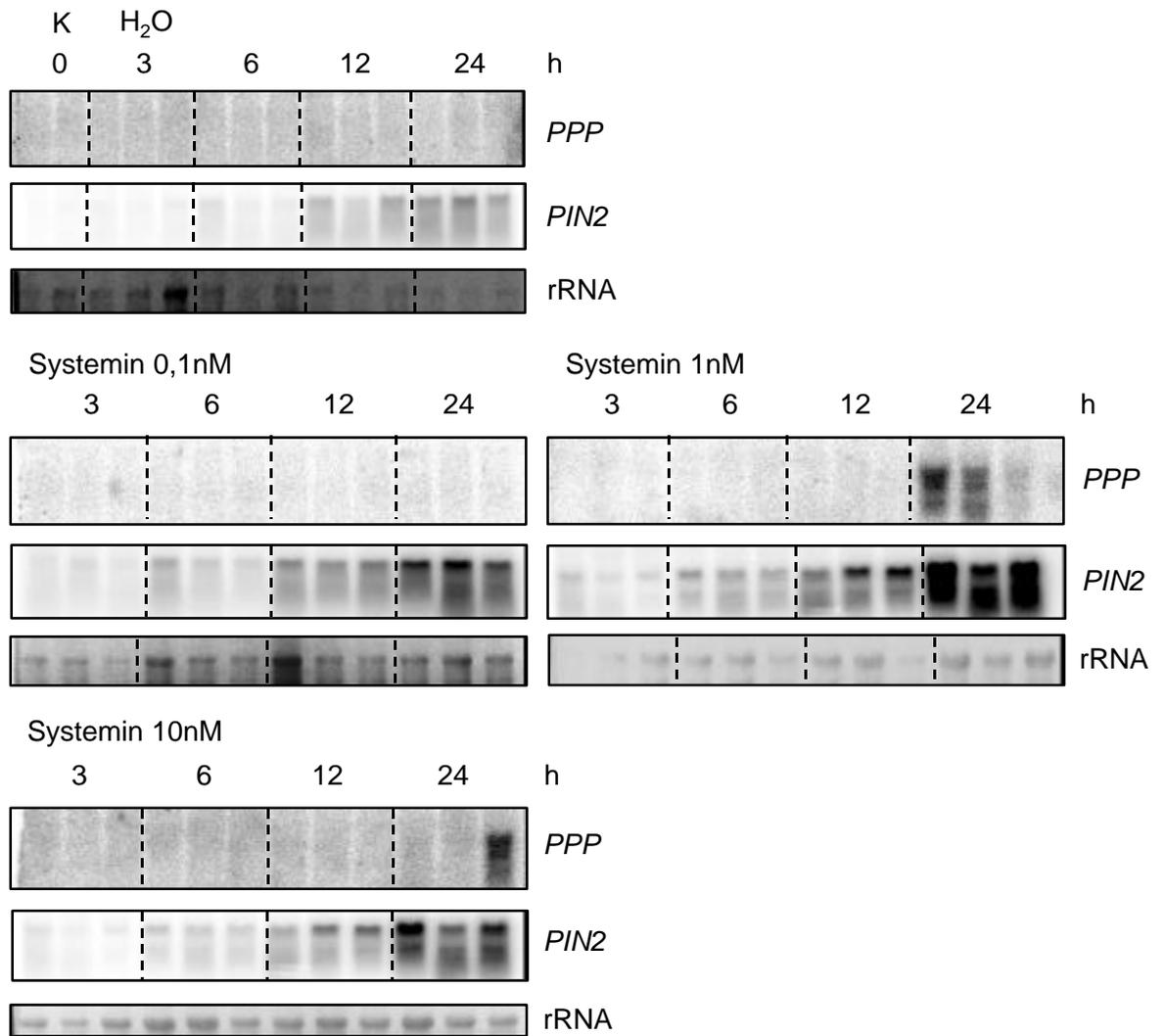


Abbildung 11 Transkriptakkumulation der *PPP* in Kartoffelblättern nach Applikation von Systeminlösungen in abgetrennte Kartoffelblätter  
 K unbehandelte Kontrollen

Es wurden 25 µg Gesamt-RNA aufgetragen, isoliert aus zu den angegebenen Zeitpunkten geerntetem Blattmaterial, elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylonfilter geblottet. Die Filter wurden gegen das radioaktiv markierte 0.9 kb Not I-cDNA-Fragment (*PPP*), eine 0.6 kb lange *PIN2*-Sonde und eine rRNA-Sonde hybridisiert.

Auch mit diesem Versuch ließ sich keine Induktion der *PPP*-Transkriptakkumulation durch Systemin nachweisen.

### 3.3.3 Untersuchung der Genexpression nach Verwundung

Da zahlreiche pathogenaktivierte Gene auch durch eine Verwundung induziert sein können, wurde untersucht, wie sich eine starke Verwundung auf das Expressionsmuster von *PP2C*, *ELH* und *PPP* auswirkt. Diese starke Verwundung wurde durch Quetschen der Blattrippen von Kartoffelblättern zu Versuchsbeginn und Anbringen einer Dialyseklammer an den Blattspitzen über den gesamten Versuchszeitraum hervorgerufen. Das repräsentative Ergebnis mehrerer Versuche sind in Abbildung 12 dargestellt, wobei die für die Northern-Blot-Hybridisierungen A und B verwendete Gesamt-RNA von Axel Schmidt (IPB Halle) zur Verfügung gestellt wurde.

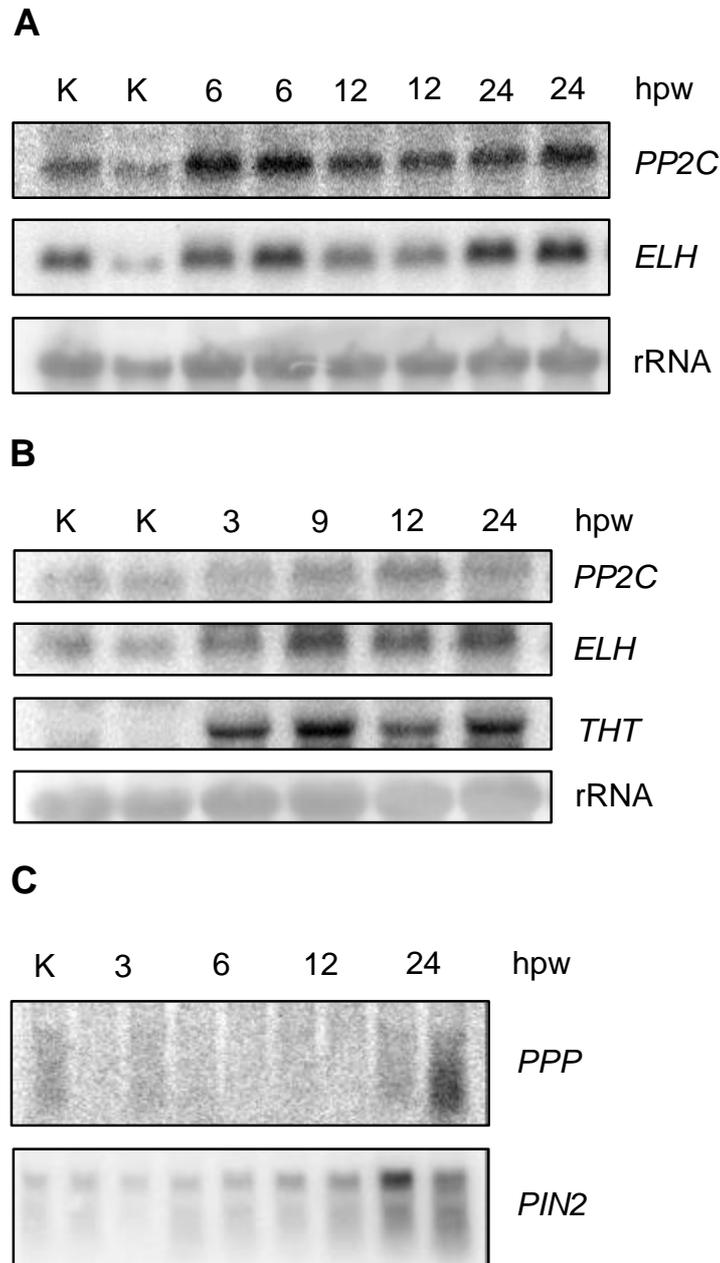


Abbildung 12 Transkriptakkumulation von *PP2C*, *ELH* und *PPP* in Kartoffelblättern nach Verwundung

Es wurden 25 µg Gesamt-RNA aufgetragen, isoliert aus zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten Blattmaterial, elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylonfilter geblottet. Die Filter wurden gegen folgende radioaktiv markierte Sonden hybridisiert:

<i>PP2C</i>	ein ca. 0.4 kb Eco RI-cDNA-Fragment
<i>ELH</i>	ein ca. 0.5 kb Eco RI-cDNA-Fragment
<i>PPP</i>	ein ca. 0.9 kb Not I-cDNA-Fragment
<i>PIN2</i>	eine ca. 0.6 kb lange <i>Pin2</i> -Sonde

Zur Ladungskontrolle wurde gegen eine rRNA-Sonde hybridisiert.

Durch die starke Verwundung kam es im ersten Experiment (Abbildung 12 A) zu einer *PP2C*-Transkriptakkumulation innerhalb von 6 Stunden, die nach 12 Stunden leicht abnahm und danach wieder anstieg. Das Expressionsmuster des *ELH* sieht ähnlich aus. Da aber die abschließende Hybridisierung mit einer rRNA-Sonde geringere aufgetragene RNA-Mengen im Falle einer unbehandelten Kontrolle und der nach 12 Stunden geernteten Blätter zeigt,

könnten die geringeren Transkriptmengen der zur *PP2C* bzw. zum *ELH* korrespondierenden mRNA darauf zurückzuführen sein.

In einem weiteren Experiment (Abbildung 12 B) war die Erhöhung der *PP2C*-Transkriptmengen deutlich schwächer als im ersten Experiment und lag nur wenig über der Basalexpression. Die mRNA-Akkumulation des *ELH* beginnt bereits 3 Stunden nach Verwundung und hält bis zu 24 Stunden nach der Verwundung an. Da bekannt ist, daß die Hydroxycinnamoyl-CoA:Tyramin *N*-(Hydroxycinnamoyl)transferase (*THT*) aus Kartoffel wundinduziert ist [175], wurde der Filter zur Kontrolle einer erfolgreichen Verwundung mit einer *THT*-Sonde hybridisiert. Erwartungsgemäß akkumulieren die *THT*-Transkripte 3-24 Stunden nach Verwundung in den Blättern.

In Abbildung 12 (C) ist zu erkennen, daß 24 Stunden nach Verwundung im Blatt einer Pflanze die *PPP*-Transkriptmenge erhöht ist. Das korreliert allerdings nicht mit der wundinduzierten Expression des Proteinase-Inhibitors II, dessen mRNA-Synthese bereits 6 Stunden nach Verwundung einsetzen sollte und bis zu 24 Stunden anhält [50, 141]. Das spricht für eine nur schwache Verwundung, so daß der Einfluß auf die Expression der *PPP* in weiteren Experimenten überprüft werden muß.

#### 3.3.4 Untersuchung der Genexpression nach UV-Bestrahlung

Aus zahlreichen Beispielen in der Literatur geht die Induzierbarkeit von ELIPs und ELIP-Homologen in *A. thaliana* [176], Erbse [177] und Getreide [178, 179] durch starke Bestrahlung hervor. Deshalb wurde der Einfluß einer UV-Bestrahlung auf die Genexpression untersucht. Dazu wurden Kartoffelpflanzen *S. tuberosum* L. cv. Désirée im normalen Tag-Nacht-Rhythmus in der Phytokammer angezogen. Blätter einer Kontrollpflanze wurden nach 7-stündiger Dunkelphase geerntet. Während die Kontrollpflanzen in der Tageslichtkammer verblieben, wurden die anderen Pflanzen zusätzlich einer UV-Bestrahlung ausgesetzt. Die Gesamt-RNA, die aus den zu unterschiedlichen Zeitpunkten geernteten Blättern isoliert wurde, wurde in Northern-Blot-Analysen eingesetzt, deren Ergebnisse in Abbildung 13 dargestellt sind.

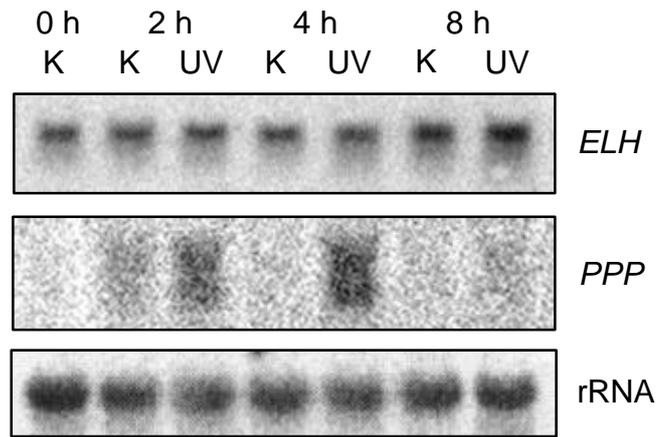


Abbildung 13 Transkriptakkumulation des *ELH* und der *PPP* in Kartoffelblättern nach UV-Bestrahlung

K, 0 h RNA aus Blättern, nach 7-stündiger Dunkelphase geerntet  
 K RNA aus Blättern von Kontrollpflanzen, die normaler Phytokammerbeleuchtung ausgesetzt waren  
 UV RNA aus Blättern von Pflanzen, die unterschiedlich lange einer UV-Bestrahlung ausgesetzt waren

Es wurden 25 µg Gesamt-RNA aufgetragen, isoliert aus zu den angegebenen Zeitpunkten geerntetem Blattmaterial, elektrophoretisch aufgetrennt und auf einen Nylonfilter geblottet. Der Filter wurde gegen folgende radioaktiv markierte Sonden hybridisiert:

*ELH* ein ca. 0.5 kb Eco RI-cDNA-Fragment  
*PPP* ein ca. 0.9 kb Not I-cDNA-Fragment

Zur Ladungskontrolle wurde gegen eine rRNA-Sonde hybridisiert.

Es ist zu erkennen, daß die basale Expression des *ELH*, auch nach der Dunkelphase, relativ hoch ist und es zu keinem Anstieg der *ELH*-Transkriptmenge durch UV-Bestrahlung kommt. Dagegen akkumulieren *PPP*-mRNA-Transkripte 2-4 Stunden nach UV-Bestrahlung. Das Experiment wurde bisher nur einmal durchgeführt.

### 3.3.5 Organspezifisches Expressionsmuster von *PP2C*, *ELH* und *PPP*

Die organspezifische Expression wurde untersucht, indem Gesamt-RNA aus verschiedenen Pflanzenteilen (Blüten, junge und alte Blätter, Blattstiele, Sproßachse, Wurzeln und Knollen) von *S. tuberosum* L. cv. Désirée isoliert wurde und für Northern-Blot-Hybridisierungen mit den entsprechenden Sonden verwendet wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 gezeigt.

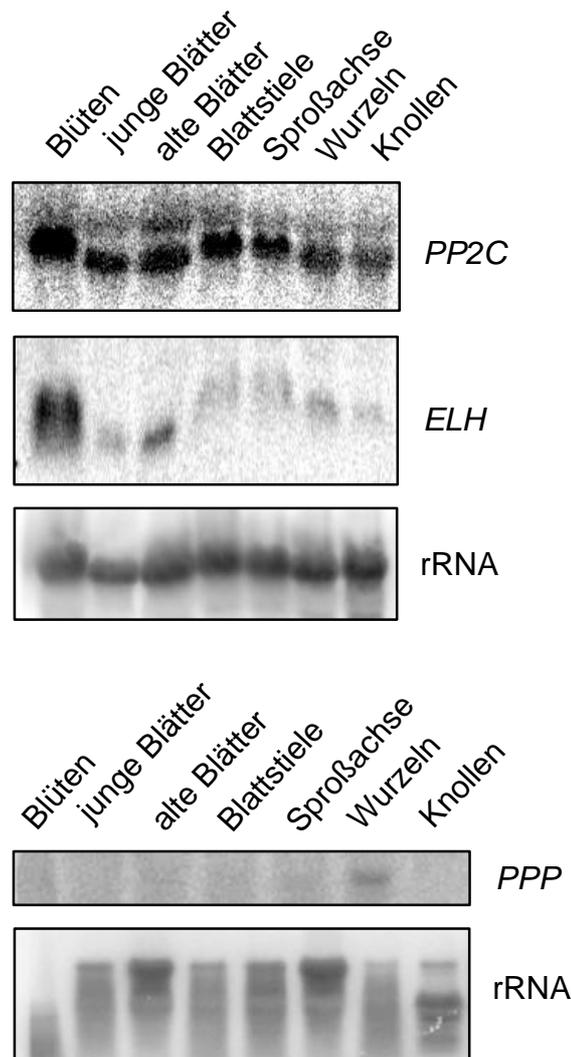


Abbildung 14 Organspezifische Transkriptakkumulation von *PP2C*, *ELH* und *PPP*

Es wurden 25 µg Gesamt-RNA aufgetragen, isoliert aus den unterschiedlichen Pflanzenteilen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylonfilter geblottet. Die Filter wurden gegen folgende radioaktiv markierte Sonden hybridisiert:

<i>PP2C</i>	ein ca. 0.4 kb Eco RI-cDNA-Fragment
<i>ELH</i>	ein ca. 0.5 kb Eco RI-cDNA-Fragment
<i>PPP</i>	ein ca. 0.9 kb Not I-cDNA-Fragment

Zur Ladungskontrolle wurde gegen eine rRNA-Sonde hybridisiert.

*PP2C*-Transkripte wurden in allen Pflanzenteilen gefunden, und ihre Mengen variieren kaum. Lediglich in Blüten wurde eine etwas größere Transkriptmenge detektiert. Dagegen akkumuliert die zum *ELH* korrespondierende mRNA in Blüten. Eine detaillierte Untersuchung der Expression des *ELH* in Blüten ergab, daß die Transkripte in Kelchblättern, Blütenblättern und Staubblättern, nicht aber im Fruchtknoten oder Stempel akkumulieren (Daten nicht gezeigt). Auch die *PPP* wird organspezifisch exprimiert. Geringe Transkriptmengen wurden in Wurzeln gefunden, wobei auch diese Mengen nur knapp über der Nachweisgrenze liegen.

### 3.3.6 Untersuchung der *PPP*-Genexpression in *nahG*-Pflanzen nach Pathogenbehandlung

In unserer Arbeitsgruppe wurden Kartoffelpflanzen generiert, die das bakterielle Gen für eine Salicylathydroxylase exprimieren (*nahG*) und damit nicht mehr in der Lage sind, Salicylsäure

zu akkumulieren (Dr. Peter Landgraf, persönliche Mitteilung). Da in Wildtyppflanzen erhöhte *PPP*-Transkriptmengen nach der Pathogenbehandlung nachgewiesen wurden (s. Abbildung 6), wurde die Auswirkung einer Pathogenbehandlung auf die Akkumulation der zur *PPP* korrespondierenden mRNA in *nahG*-Pflanzen untersucht. Es wurden 2 Linien transgener Kartoffelpflanzen verwendet (A und D2), die mit *Psm* bzw.  $MgCl_2$  infiltriert wurden. Die aus den infiltrierten Blättern gewonnene RNA wurde in Northern-Blot-Analysen eingesetzt, deren Ergebnisse in Abbildung 15 dargestellt sind. Das Blattmaterial wurde von Astrid Hunger (IPB Halle) zur Verfügung gestellt.

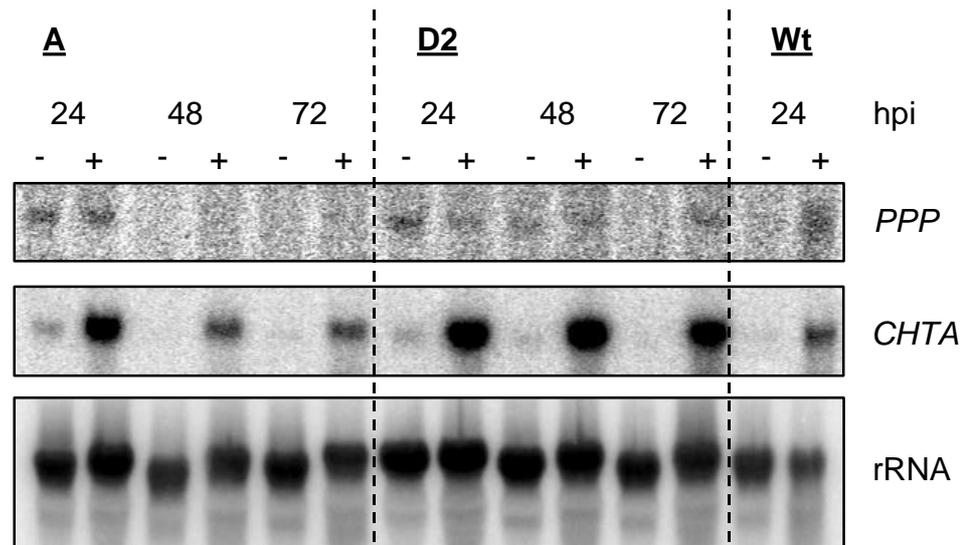


Abbildung 15 Transkriptakkumulation der *PPP* in Kartoffelblättern nach Behandlung von *nahG*-Pflanzen mit *Psm*

A, D2 Pflanzen unabhängiger transgener Linien

Wt Wildtyp-Pflanzen

- mit  $10^9$  mM  $MgCl_2$ -behandelte Kontrollpflanzen

+ *Psm*-behandelte Pflanzen

Es wurden 20  $\mu$ g Gesamt-RNA aufgetragen, isoliert aus zu den angegebenen Zeitpunkten geerntetem Blattmaterial, elektrophoretisch aufgetrennt und auf einen Nylonfilter gebロットet. Der Filter wurde gegen das radioaktiv markierte 0.9 kb Not I-cDNA-Fragment (*PPP*), eine Chitinase-Sonde (*CHTA*) und eine rRNA-Sonde hybridisiert.

Zu keinem Zeitpunkt konnte eine pathogeninduzierte Transkriptakkumulation der *PPP* beobachtet werden. Pathogeninduziert ist dagegen die *PPP* in einer Wildtyp-Pflanze 24 Stunden nach Infiltration mit *Psm*. Danach wurde der Filter gegen eine Chitinase-Sonde hybridisiert. Es zeigt sich, daß die saure Chitinase in beiden transgenen Linien und im Wildtyp durch Pathogenbehandlung aktiviert wird. Dieses Experiment wurde bisher nur einmal durchgeführt, so daß die Ergebnisse nur als vorläufig betrachtet werden können und durch weitere Experimente abgesichert werden müssen.

### 3.3.7 Untersuchung der *PPP*-Genexpression in elicitierten Zellkulturen

Da verschiedene pathogeninduzierte Gene auch durch Eliciterung in Zellkulturen aktiviert werden können [64, 175, 180], sollte das Expressionsmuster der *PPP* in elicitierten Kartoffelzellen untersucht werden. Dazu wurden Zellkulturen von *S. tuberosum* L. cv. Désirée mit einem Kulturfiltrat von *P. infestans* und dem für Petersilie bekannten Elicitor

Pep13 [181] und dessen Analoga A2 und A5 bzw. Wasser (Kontrollen) behandelt. Die Gesamt-RNA, die aus den zu verschiedenen Zeitpunkten geernteten Zellkulturen isoliert wurde, wurde für Northern-Blot-Hybridisierungen verwendet. Es ergab sich ein sehr uneinheitliches Bild, oft war schon die basale *PPP*-Expression in wasserbehandelten Zellkulturen hoch. In keinem Fall war eine Genaktivierung durch die Elicitoren oder die Analoga nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

### 3.4 Isolierung genomischer Klone

#### 3.4.1 Southern-Blot-Analyse

Zur Untersuchung der genomischen Organisation des Gens mit Homologie zu einer PP2C, des Gens mit Homologie zu einem ELIP-Homolog aus *A. thaliana* und des Gens mit Homologie zu einer Tomatenphosphatase wurde DNA aus Blätter von *S. tuberosum* L. cv. Désirée isoliert, mit den Restriktionsendonukleasen Eco RI, Eco RV, Bam HI, Hind III und Xba I geschnitten und anschließend einer Southern-Blot-Analyse unterzogen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt.

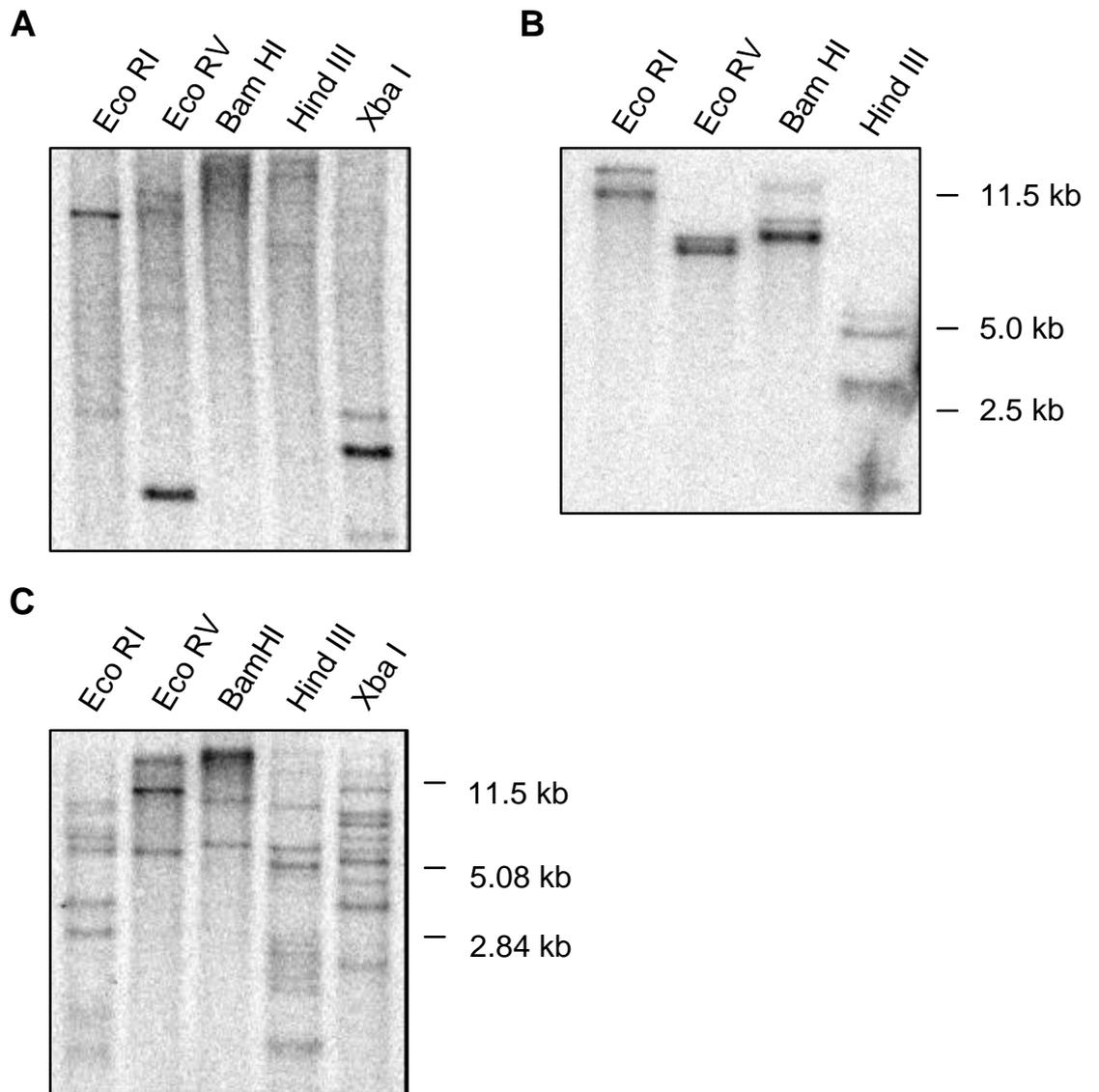


Abbildung 16 Genomische Southern-Blot-Analyse des Gens mit Homologie zu einer Proteinphosphatase Typ 2C (A), des Gens mit Homologie zu einem *A. thaliana* ELIP-Homolog (B) und des Gens mit Homologie zu einer Phosphatmangel-induzierten sauren Phosphatase aus *L. esculentum* (C)

Genomische DNA aus Kartoffelblättern von *S. tuberosum* L. cv. Désirée wurde mit den angegebenen Restriktionsendonukleasen geschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und gegen folgende radioaktiv markierte Sonden hybridisiert:

<i>PP2C</i>	ein ca. 0.4 kb Eco RI-cDNA-Fragment
<i>ELH</i>	ein ca. 0.5 kb Eco RI-cDNA-Fragment
<i>PPP</i>	ein ca. 0.9 kb Not I-cDNA-Fragment

Rechts sind die Positionen des Größenstandards angegeben.

Für die *PP2C* wurden eine stark hybridisierende und mehrere schwächer hybridisierende Banden gefunden. Das läßt darauf schließen, daß das Gen mit Homologie zu einer Proteinphosphatase 2C von einer kleinen Genfamilie kodiert wird (Abbildung 16 A).

Das Hybridisierungsmuster des Gens mit Homologie zu einem *A. thaliana* ELIP-Homolog sieht ähnlich aus: zwei stark hybridisierende Banden und mehrere schwach hybridisierende Banden, so daß auch für dieses Gen eine kleinere Genfamilie vermutet wird (Abbildung 16 B).

Das Gen mit Homologie zu einer Phosphatmangel-induzierten sauren Phosphatase aus Tomate scheint von einer Multigenfamilie kodiert zu werden, denn es wurden zahlreiche etwa gleich stark hybridisierende Banden detektiert (Abbildung 16 C).

### 3.4.2 PCR mit genomischer DNA

Mittels PCR mit genomischer DNA wurde versucht, längere Fragmente zu generieren, die dann in RNA- oder DNA-Hybridisierungsexperimenten als Sonden eingesetzt werden sollten. Die PCR wurde mit genomischer DNA, isoliert aus Blättern von *S. tuberosum* L. cv. Désirée und den sequenzspezifischen Primern, die auch zur quantitativen RT-PCR verwendet wurden, durchgeführt.

Bei Verwendung der Primer 110-5 und 110-3 (Sequenzen s. Anhang 1 C) wurde ein etwa 900 nt langes Fragment amplifiziert, das in den pCR™ II Vektor kloniert wurde. Von den erhaltenen Klonen wurde der Klon g110/7 sequenziert. Er enthält eine 748 nt lange Insertion, bei der es sich um ein Intron handeln könnte, da es von den Sequenzen 5'-GT-3' bzw. 5'-AG-3 flankiert wird (Abbildung 17, Nukleotidsequenz Anhang 3 A ).

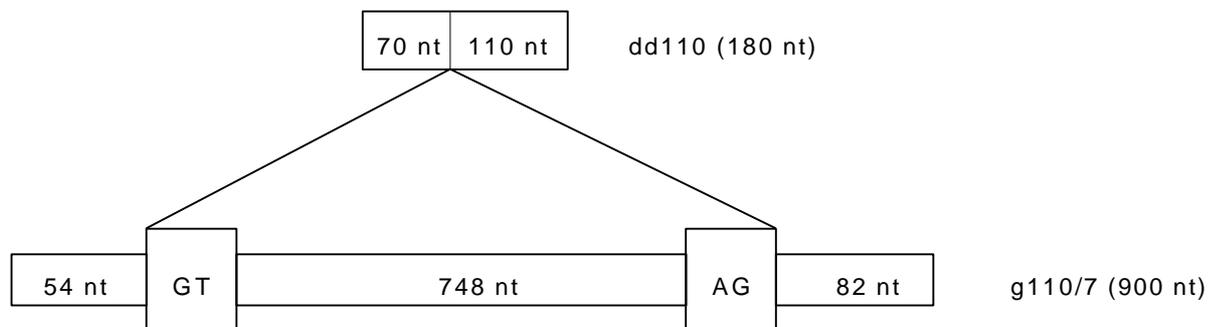


Abbildung 17 Schematische Darstellung des „Differential Display“ Fragmentes dd110 und des Fragmentes g110/7, das nach PCR mit genomischer DNA erhalten wurde  
 GT, AG flankierende Sequenzen  
 748 nt mögliche Intronsequenzen  
 54 nt, 82 nt mögliche Exonsequenzen

Mit diesem aus genomischer DNA amplifizierten und radioaktiv markierten Fragment waren in Northern-Blot-Hybridisierungen jedoch auch keine spezifischen Signale für die *PP2C* detektierbar.

Die Verwendung der Primer 903-5 und 903-3 (Sequenzen Anhang 1 C) in der PCR mit genomischer DNA führte nicht zur Amplifizierung eines längeren Fragmentes mit Intronsequenzen.

### 3.4.3 Screenen einer genomischen Bank

Zum Screenen wurde eine von Clontech erhältliche Bibliothek verwendet, für die genomische DNA aus Blättern zwei Monate alter Kartoffelpflanzen von *S. tuberosum* L. cv. Désirée isoliert und in  $\lambda$  EMBL3 SP6/T7 kloniert worden war. Es wurden etwa 300.000 Plaques gescreent.

### 3.4.3.1 Isolierung und Charakterisierung genomischer Klone der *PP2C*

Die genomische Bank wurde mit dem radioaktiv markierten Fragment g110/7 (ca. 900 nt, s. 3.4.2) durchsucht. Ausgehend von 25 Primärsignalen wurden nach drei Screeningrunden 8 Einzelphagenklone isoliert. Xho I-Restriktionsfragmente von zwei Klonen (110/1 und 110/2) wurden in pUC18 subkloniert.

Der Subklon 110/1-2 enthielt ein Fragment von ca. 13 kb Länge und wurde keinen weiteren Untersuchungen unterzogen.

Der Subklon 110/2-9, der eine Länge von ca. 10 kb hatte, wurde mittels Restriktionsverdau und Southern-Blot-Hybridisierungen näher charakterisiert. Die mit der Sonde g110/7 hybridisierende Region liegt zwischen einer Pst I- und einer Xba I-Schnittstelle, schematisch dargestellt in Abbildung 18. Dieses Fragment wurde subkloniert (SIII 110/2-9, ca. 3.3 kb), Sequenzanalysen und Vergleiche mit Sequenzen aus Datenbanken ergaben aber keine signifikanten Homologien. Dennoch wurde es, radioaktiv markiert, als Sonde eingesetzt.

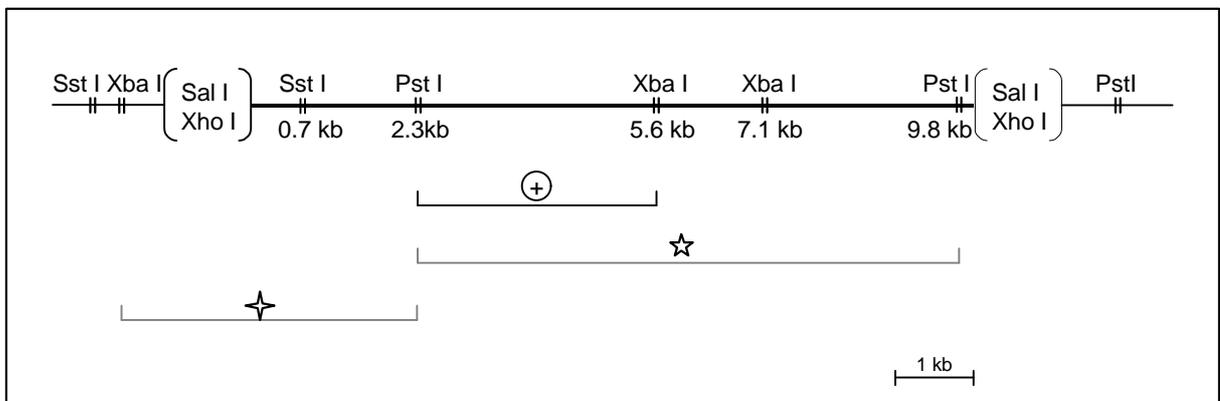


Abbildung 18 Schematische Darstellung der Struktur des genomischen Subklons 110/2-9

In Sal I-gespaltenen pUC18 wurde ein Xho I-Fragment des Lambda-Klones 110/2 kloniert. Dargestellt sind Erkennungsstellen einiger Restriktionsenzyme im Vektor (dünnere Linie) und im klonierten Fragment (dickere Linie)

- ⊕ Bereich, in dem die Sonde g110/7 hybridisiert
- ★ 7.5 kb Pst-Fragment, das radioaktiv markiert als Sonde diente
- ✦ 2.3 kb Xba/Pst-Fragment, das radioaktiv markiert als Sonde diente

Das etwa 7.5 kb große Pst I-Fragment wurde radioaktiv markiert und als Sonde in Northern-Blot-Analysen eingesetzt, um die Expression der *PP2C* nach Pathogenbehandlung zu untersuchen (s. 3.2.3, Abbildung 4).

Ein weiteres Fragment, das radioaktiv markiert als Sonde zum Screenen einer cDNA-Bank eingesetzt wurde (s. 3.5.2), war das 2.3 kb Xba/Pst-Fragment. Auch dieses Fragment zeigte bei Vergleichen mit Sequenzen aus Datenbanken keine signifikanten Homologien zu bekannten Genen.

### 3.4.3.2 Isolierung und Charakterisierung genomischer Klone des *ELH*

Die genomische Bank (s. 3.4.3) wurde mit dem radioaktiv markierten Fragment dd903 (ca. 200 nt) durchsucht. In drei Reinigungsrounden konnten, ausgehend von 7 Primärsignalen, 3 Lambda-Klone isoliert werden. Vom Phagenklon 903/2 wurden Xho I-Restriktionsfragmente (ca. 2.0 kb) in pUC18 kloniert und die so gewonnenen Subklone

903/2-6 und 903/2-10, die das Fragment in entgegengesetzter Orientierung enthielten, näher charakterisiert.

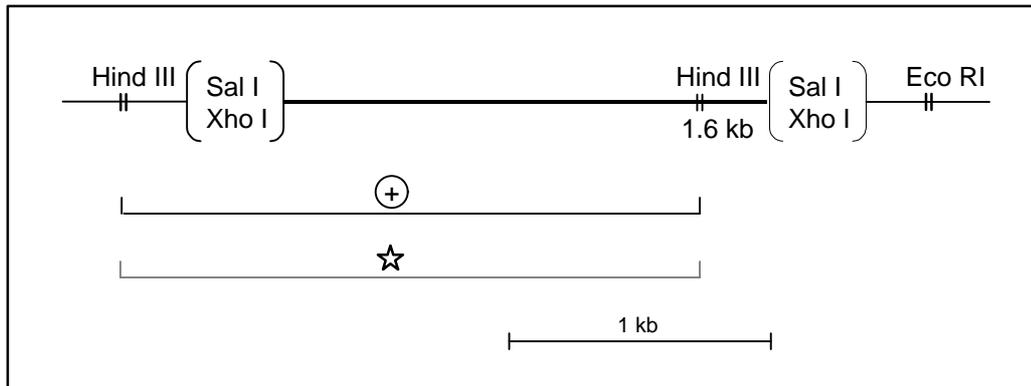


Abbildung 19 Schematische Darstellung der Struktur des genomischen Subklons 903/2-6

In Sal I-gespaltenen pUC18 wurde ein Xho I-Fragment kloniert. Dargestellt sind Erkennungsstellen einiger Restriktionsenzyme im Vektor (dünnere Linie) und im klonierten Fragment (dickere Linie).

- ⊕ Bereich, in dem die Sonde dd903 hybridisiert
- ★ 1.6 kb Hind III-Fragment, das radioaktiv markiert als Sonde diente

Die mit der Sonde dd903 hybridisierende Region liegt zwischen den Hind III-Schnittstellen (Abbildung 19). Das mit einem Stern gekennzeichnete 1.6 kb große Hind III-Fragment diente radioaktiv markiert als Sonde für Northern- bzw. Southern-Blot-Analysen.

### 3.4.3.3 Sequenzähnlichkeiten des genomischen Subklons 903/2-6

Die partielle Sequenzanalyse zeigt, daß der genomische Subklon 903/2-6 ab Nukleotid 338 Homologien zum „Differential Display“ Fragment dd903 aufweist, was die Nukleotidsequenzen im Anhang 3 B und die schematische Darstellung in Abbildung 20 verdeutlichen.

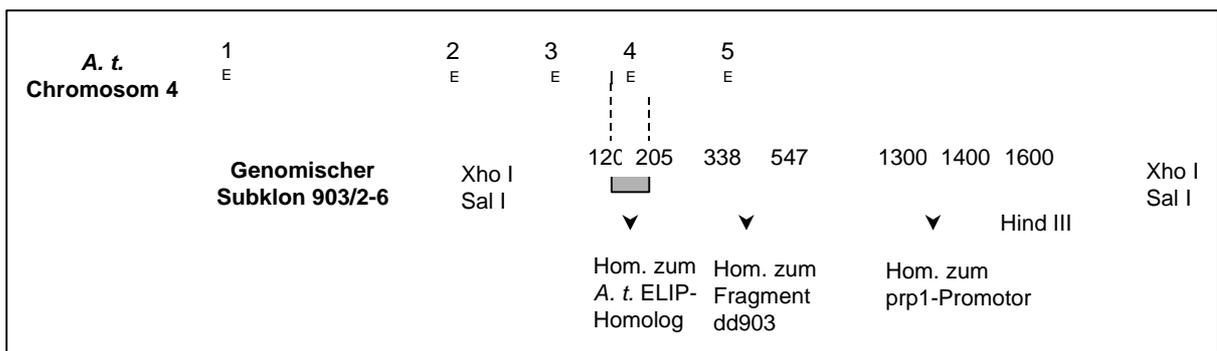


Abbildung 20 Schematische Darstellung eines Abschnitts auf dem *A. thaliana*-Chromosom 4, des genomischen Subklons 903/2-6 und der Sequenzhomologien untereinander bzw. zu anderen bekannten Sequenzen E 1-5 Exon 1-5

- (Xho I) Klonierungsstelle
- (Sal I)

Außerdem wurden stromaufwärts der „Differential Display“ Sequenzen 90 Nukleotide (nt 120-210) gefunden, die mehr als 80 % Homologie zum Exon 4 eines Gens auf dem Chromosom 4 von *Arabidopsis thaliana* aufweisen.

Dieses Gen auf Chromosom 4 von *A. thaliana* (Acc. No. AL 021712) kodiert für ein putatives Protein, das wiederum beim Vergleich mit Sequenzen aus Datenbanken Ähnlichkeiten zu einem Early Light Induced Protein (ELIP) aus Sonnenblume zeigte. Aus diesem Grund wurde das zum „Differential Display“ Fragment dd903 korrespondierende Gen als *ELH* (ELIP-Homolog) bezeichnet. Die hohe Übereinstimmung der beiden Gene zeigt sich nicht nur auf Nukleotid-, sondern auch auf Proteinebene.

Stromabwärts der „Differential Display“ Sequenzen wurde eine Region identifiziert (nt 1300-1400), die beim Vergleich mit Datenbanksequenzen Homologie zum prp1-Promotor (Glutathion-S-Transferase aus *S. tuberosum*, Acc. No. J03679) aufwies (Abbildung 20).

Die Praktikantin Nicole Goldhorn, die weitere Subklonierungen und Sequenzanalysen mit dem genomischen Klon 903/2-6 durchführte, fand in der 5'-Region Übereinstimmung auf Nukleotidebene mit dem Exon 3 des *A. thaliana* ELIP-Homologs.

### 3.5 Screenen einer cDNA-Bank

#### 3.5.1 Anlegen einer cDNA-Bank

Als Ausgangsmaterial für die cDNA-Bank wurden Kartoffelblätter von *S. tuberosum* L. cv. Désirée verwendet, die 12, 24 und 36 Stunden nach Infiltration mit *Psm* geerntet wurden. Aus diesem Blattmaterial wurde Gesamt-RNA isoliert, die wiederum zur Isolierung von mRNA mit Hilfe von Dynabeads® (Dynal) verwendet wurde. Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem „Time Saver™“ Kit (Pharmacia): zur Erststrangsynthese wurde der Zufallsprimer pd(N) 6 verwendet, die Zweitstrangsynthese erfolgte mit dem Zweitstrangsynthesemix, und abschließend wurden Eco/Not-Adaptoren ligiert. Die so vorbereitete cDNA wurde ungerichtet in den Vektor λZAP II (Stratagene) kloniert und die rekombinanten Phagen mittels „Gigapack Gold II“ (Stratagene) verpackt. Der Titer der cDNA-Bank wurde mit 400-500 pfu/μl bestimmt.

#### 3.5.2 Isolierung von PP2C-cDNA-Klonen

Die cDNA-Bank wurde mit dem radioaktiv markierten „Differential Display“ Fragment dd110 (ca. 180 nt) und dem radioaktiv markierten 2.3 kb Xba/Pst-Fragment aus der genomischen Bank (S III 110/2-9, s. 3.4.3.1) durchsucht. Ausgehend von 12 Primärsignalen, die beim Screenen mit der letztgenannten Sonde erhalten wurden, konnten nach 3 Screeningrunden drei korrespondierende pBluescript-Phagemide mit integrierter cDNA identifiziert und durch in-vivo-Excision ausgeschnitten werden: c110-1, c110-2 und c110-3. Diese wurden Restriktions- und Sequenzanalysen unterzogen, wobei die Klone jeweils vom 3'- und 5'-Ende ansequenziert wurden.

Die Klone c110-1 und c110-3 enthalten in den sequenzierten Bereichen weder das „Differential Display“ Fragment noch zeigen sie signifikante Homologien zu bekannten Nukleotid- bzw. Proteinsequenzen aus Datenbanken.

Der Klon c110-2 weist eine Länge von ca. 3.5 kb auf, in dessen sequenzierten Bereichen keine Homologien zum „Differential Display“ Fragment dd110 zu identifizieren waren. Sowohl der sequenzierte 3'- als auch 5'-Bereich weist auf Nukleotid- und auf Proteinebene Ähnlichkeiten zu Proteinphosphatasen verschiedener Spezies auf (s. 3.5.2.1).

Die cDNA-Bank wurde von der Praktikantin Claudia Reh nochmals mit dem radioaktiv markierten cDNA-Fragment c110-2 durchsucht. Auch dieses Screening führte nicht zur Isolierung eines Gesamtlängenklones der *PP2C*.

### 3.5.2.1 Homologien der Nukleotid- und abgeleiteten Aminosäuresequenzen des Klons c110-2 zu Sequenzen aus Datenbanken

Der Klon c110-2, der eine Länge von etwa 3.5 kb hat, wurde aus 3'- und 5'- Richtung ansequenziert.

Vom 5'-Ende aus wurde ein Bereich von 641 Nukleotiden sequenziert (Abbildung 21 A). In diesem Teilbereich der cDNA bestehen auf **Nukleotidenebene** signifikante Sequenzähnlichkeiten zu einem PP2C-Homologen aus *Mesembryanthemum crystallinum* (Acc. No. AF097667) und zur mRNA der ABA- und calciuminduzierten PP2C aus *Fagus sylvatica* (Acc. No. FSY277744, 84 % Identität). Der zum PP2C-Homolog aus *M. crystallinum* ähnliche Bereich zeigt ab Nukleotid 205 des sequenzierten Bereiches 89 % Identität.

#### A

<i>S. t.</i>	TCCAGTCTATGCTCTGTTGAGGTGATTCGGAAAGCATTTC AAGCAACAGAA	50
<i>S. t.</i>	TAAGGTTTCCTCTCTGTTGTGACTAGACAATGGCCGACGAAACCWt tYWT	100
<i>S. t.</i>	TGCTGCTGTTGGATCATGCTGTCTTGTGGAGTTATCTGCAGTGGAAACCT	150
<i>S. t.</i>	TATATGTAGCCAACCTTGGTACTCGAGGGCAGTCTTAGGGAGACTTGT	200
<i>S. t.</i>	AGATCAACTGGCGAGGTTCTTGCGATTTCAGCTCTCTGCAGAACACAATGT	250
<i>S. t.</i>	GAGCATTGAATCTGTAAGACAGGAGATGCAATCTTTGCATCCAGATGATT	300
<i>S. t.</i>	CACAAATTGTAGTTTTAAAGCACAAATGTCTGGCGTGTCAAGGGGCTTATA	350
<i>S. t.</i>	CAGGTAACCTTCTATTCCATTTTCCTTAGCAGTTTCTGTTTTATGTTTGCT	400
<i>S. t.</i>	CAACGCAAAGTACCGATTTGATCTTATTATTAATGAGTGTCTTTTCAATA	450
<i>S. t.</i>	ACAATATACACATTACGCCTATTACTAATTCATACTACACTCTCCCCCTA	500
<i>S. t.</i>	ATCGTTTTATGCCTTTTGAAGCTTTAAGATCGGGGTGCTCCCAAGGCCTAG	550
<i>S. t.</i>	CTCGAGTGGCAAAGGTGGAGGATTTGTGGCTTAGGTTCGAGGTTCAAGC	600
<i>S. t.</i>	CCCACACCATGCAAAGCGAACCCCGGTATTTAAGTGGAGTA	641

#### B

<i>S. t.</i>	QSMSVEVIRKAFQATE*GFLSVVTRQWP TKPFXA AVGSCCLVGVICSGTLYVANLGD SRA	182
	QMSV+VI+KAFQATE GF SVV +QWP KP AAVGSCCLVGV+C+G LY+ANLGD SRA	
<i>M. c.</i>	QSMSVDVIKAFQATEEGFFSVVAKQWPMKPQIAAVGSCCLVGVV CNGILYIANLGD SRA	171
<i>S. t.</i>	VLGRLV RSTGEVLAIQLSAEHNVSIESVRQEMQSLHPDDSQIVVLKHNVWRVKGLIQVT	359
	VLGR V+++TGEVLAIQLSAEHN SIESVRQEMQ+ HP+D IVVLKHNVWRVKGLIQ+T	
<i>M. c.</i>	VLGRAVKATGEVLAIQLSAEHNASIESVRQEMQATHPEDKDIVVLKHNVWRVKGLIQIT	230

Abbildung 21 Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des cDNA-Klons c110-2 im 5'-Bereich

- A) cDNA-Nukleotidsequenz aus Kartoffel (*S. t.*)  
 B) Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz aus Kartoffel (*S. t.*) mit der PP2C aus *Mesembryanthemum crystallinum* (*M. c.*, Acc. No. AAD11430.1)

Die Zahlen auf der rechten Seite beziehen sich auf das letzte Nukleotid bzw. die letzte AS der jeweiligen Zeile.

Abbildung 21 B zeigt die Homologie der abgeleiteten **Proteinsequenz** von 119 Aminosäuren zur Sequenz der PP2C aus *M. crystallinum* (AAD11430.1, 80 % Identität). Außerdem bestehen Übereinstimmungen zu PP2C-Proteinsequenzen folgender Pflanzen: PP2C-Homolog aus *Fagus sylvatica* (CAB90634.1, 82 % Identität), zu einem PP2C-ähnlichen Protein aus *A. thaliana* (CAB63001.1, 79 % Identität), zu einer PP2C aus *Medicago sativa* (CAA72341.1, 36 % Identität), zu einer putativen PP2C aus *Oryza sativa* (AAG13599.1, 38 % Identität) und zu einer Typ 2C-Proteinphosphatase aus *Lotus japonicus* (AAD17804.1, 45 % Identität).

Der vom 3'-Ende aus sequenzierte Bereich umfaßt 678 Nukleotide (Abbildung 22 A). In diesem Bereich befinden sich Sequenzähnlichkeiten auf **Nukleotidebene** zu Proteinphosphatasen verschiedener Pflanzen. Die größte signifikante Homologie besteht mit 86 % Identität zur mRNA einer ABA- und calciuminduzierten Proteinphosphatase 2C (PP2C2-Gen) aus Buche (*Fagus sylvatica*) mit der Acc. No. AJ277744. Die Sequenzähnlichkeit beginnt bei Nukleotid 311 und erstreckt sich über 202 nt.

## A

<i>S. t.</i>	AAAAAAAAAAAAAGCATTCTTAGGAGCCGTCATGACACTGAGTTTCTCTCC	50
<i>S. t.</i>	TTGATGGAGCCTGCAGCTAGACCTTAGAGAGCTAGATTTATTTCTCGAAG	100
<i>S. t.</i>	TGTTGCAGATCTTCTGGTAAGGTATTCCCTGTGCTAATTAATGGCTTTTG	150
<i>S. t.</i>	ACATTCATTAGCTGTTTCAATCTTTTCAGAAATACTTATCTTTTACTTGTT	200
<i>S. t.</i>	AATTTAATGGGGTACGATACTTTCTTTAGGAAGCACATTTAGTAAGGTTG	250
<i>S. t.</i>	TGCTTTTCATGACTCAAAAAAATTTGATCTGCACTTAGGATGACTGAAT	300
<i>S. t.</i>	ACTTTATTTTGCAGATTTCAAGATCCATTGGTGATGTGTACTTGAAGAAA	350
<i>S. t.</i>	TCTGAATTCAACAGGGAGCCATTATATGCTAAGTTTCGCCTTCGAGAACC	400
<i>S. t.</i>	ATTCGGAAAGCCCATATTGAGCGCAGATCCAGCAATTTCAAGTGCACCATT	450
<i>S. t.</i>	TGCAACCTGACGATCAGTTTATCATATTTGCATCGGATGGTCTCTGGGAG	500
<i>S. t.</i>	CACCTAAGTAACCAAGGAGCAGTGTGACATTGTACAAAATCACCCACGAA	550
<i>S. t.</i>	ATGGGATAACTAGAAGGTTAGTGAAGAACTGCACTACAAGAAGCAGCAAAG	600
<i>S. t.</i>	AAAAGGGAAATGAGATATTCAGACTTGAAGAAAATCGATCGTGGAGTTCG	650
<i>S. t.</i>	TCGACTATTTCCACGATGACATCTCAGA	678

## B

<i>S. t.</i>	RSIGDVYLKKE-----FNREPLYA-KFRLREPFKPILSADPAISVHHLQPDDQ	467
	R+ GDV LK S+                      FN E L    +F            + P L+A+P ++ H L+P D+	
<i>H. s.</i>	RAFGDVQLKWSKELQRSILERGFNTEALNIYQFTPPHYTTPPYLTAEPEVTYHRLRPQDK	405
<i>S. t.</i>	FIIIFASDGLWEHLNSQGA	524
	F++ ASDGLW+ LSN+ V	
<i>H. s.</i>	FLVLASDGLWDMLSNEDVV	424

Abbildung 22 Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des cDNA-Klons c110-2 im 3'-Bereich

- A) cDNA-Nukleotidsequenz aus Kartoffel (*S. t.*)  
 B) Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz aus Kartoffel (*S. t.*) mit einer menschlichen Pyruvatdehydrogenase-Phosphatase (PDPC2) (*H. s.*, Acc. No. Q9P2J9)

Die Zahlen auf der rechten Seite beziehen sich auf das letzte Nukleotid bzw. die letzte AS der jeweiligen Zeile.

Weitere Ähnlichkeiten auf Nukleotidebene zu bekannten Sequenzen aus der Datenbank bestehen u. a. noch zu einer *PP2C* aus *Mesembryanthemum crystallinum* (Acc. No. AF079355, 80 % Identität).

Auf **Proteinebene** zeigt die abgeleitete Aminosäuresequenz über 68 AS im vom 3'-Ende aus sequenzierten Bereich der cDNA 39 % Identität zu einer menschlichen Pyruvatdehydrogenase-Phosphatase (PDPC2, Acc. No. Q9P2J9) (Abbildung 22 B). Zudem gibt es Homologien zu Pyruvatdehydrogenase-Phosphatase aus Ratte (Acc. No. O88484, 35 % Identität) und Rind (Acc. No. P35816, 40 % Identität).

### 3.5.3 Isolierung von *ELH*-cDNA-Klonen

Die oben beschriebene cDNA-Bank wurde mit dem radioaktiv markierten „Differential Display“ Fragment dd903 als Sonde auf korrespondierende cDNA-Klone durchsucht. Nach 3 Reinigungsrounds konnten, ausgehend von sieben Primärsignalen, die drei cDNA-Klone c903-1, c903-2 und c903-3 identifiziert und die pBluescript-Phagemide mittels in-vivo-Excision isoliert werden. Sie wurden Restriktions- und Sequenzanalysen unterzogen.

Klon c903-1 wurde aus 5'-Richtung vollständig sequenziert. Er umfaßt 476 Nukleotide und zeigt ab Nukleotid 257 hohe Übereinstimmung zur Sequenz des „Differential Display“ Fragmentes dd903 (Abbildung 23 und Anhang 4 A). Außerdem bestehen große Übereinstimmungen mit den Nukleotidsequenzen der cDNA-Klone c903-2 und c903-3. Am 3'-Ende befindet sich ein Poly(A)-Schwanz. Auf Homologien zu bekannten Nukleotid- bzw. Proteinsequenzen aus Datenbanken soll im nächsten Kapitel (3.5.3.1) eingegangen werden.

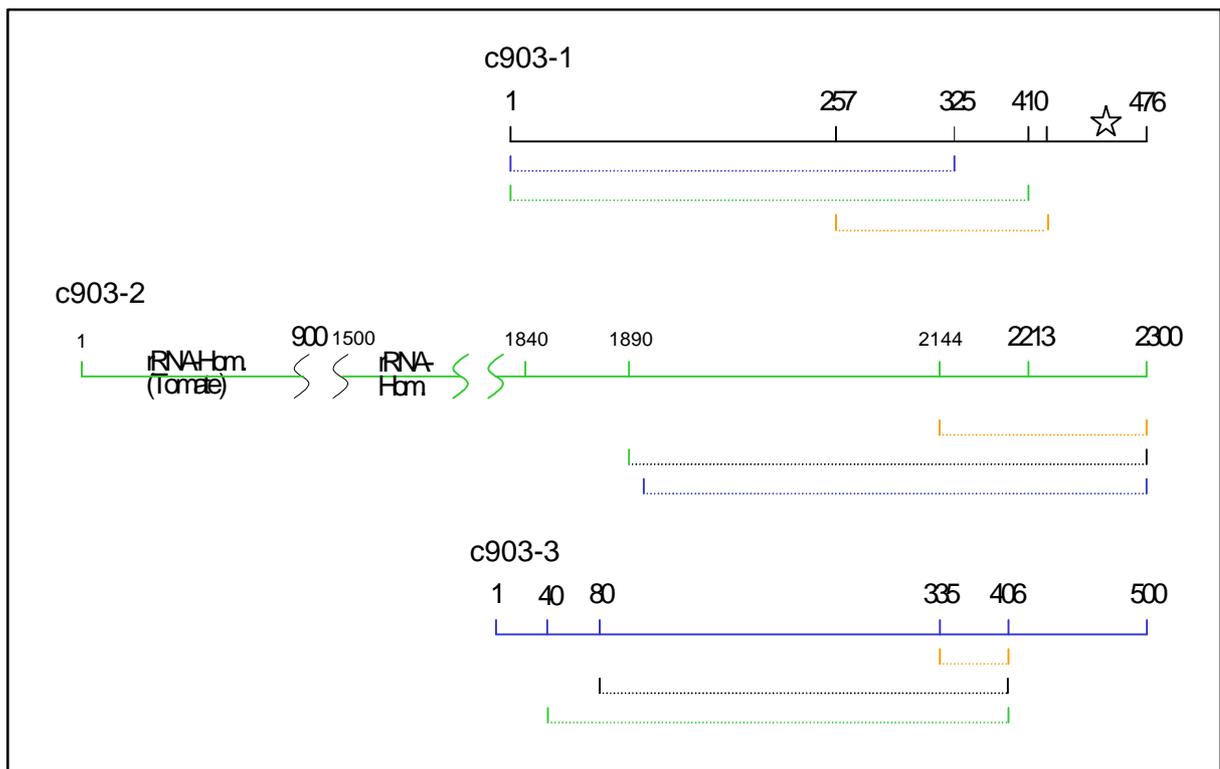


Abbildung 23 Schematische Darstellung der Struktur der cDNA Klone

Weitgehend übereinstimmende Nukleotidsequenzen sind wie folgt gekennzeichnet:

- schwarz Übereinstimmung mit Sequenzen des cDNA-Klons c903-1
- grün Übereinstimmung mit Sequenzen des cDNA-Klons c903-2
- blau Übereinstimmung mit Sequenzen des cDNA-Klons c903-3
- orange Übereinstimmung mit Sequenzen des „Differential Display“ Fragmentes dd903
- ☆ Poly(A)<sup>+</sup>-Sequenz

Der Klon c903-2 ist ein zusammengesetzter Klon und ca. 2.3 kb lang. Aus der 5'-Richtung wurden 913 Nukleotide sequenziert (Nukleotidsequenz s. Anhang 4 B), die Homologien zu Sequenzen ribosomaler RNA zeigen. Diese werden in Kapitel 3.5.3.1 näher behandelt. Vom 3'-Ende aus wurden 841 Nukleotide sequenziert (Nukleotidsequenz s. Anhang 4 C). In diesem Bereich stimmen die cDNA-Sequenzen von nt 2144-2300 mit der Sequenz des „Differential Display“ Fragmentes dd903 überein. Ab den Nucleotiden 1890 bzw. 1894 stimmt die Sequenz mit denen von c903-1 und 903-3 überein (s. Abbildung 23). Von nt 1840 bis nt 1890 weist der Klon c903-2 Homologien zu rRNA-Sequenzen auf.

Der Klon c903-3, der ein vollständiger Klon ist, umfaßt 490 Nucleotide. Es wurden aus 5'-Richtung 406 Nucleotide und aus 3'-Richtung 418 Nucleotide sequenziert. In einem überlappenden Bereich von 104 Nucleotiden sind sie identisch, so daß die Gesamtsequenz aus diesen beiden Teilsequenzen zusammengesetzt wurde. Die cDNA enthält ein Start- und ein Stopcodon (Nucleotide 34-36 bzw. 361-363). Der kodierende Bereich umfaßt 327 Nucleotide, die für 109 Aminosäuren kodieren, dargestellt in Abbildung 24 (s. 3.5.3.1). Die computergestützt errechnete molare Masse des Proteins beträgt 12.3 kDa, der isoelektrische Punkt liegt bei pH 10.08. Auf Homologien zu bekannten Nucleotid- bzw. Proteinsequenzen aus Datenbanken wird im Folgenden eingegangen. Aus Abbildung 23 gehen die Übereinstimmungen zu den anderen cDNA-Klonen und zum „Differential Display“ Fragment dd903 hervor.

Der Vergleich mit der Sequenz des genomischen Subklons 903/2-6 ergab, daß Teilsequenzen der cDNA-Klone den Exon-Sequenzen des genomischen Subklons entsprechen, wobei der Übergang vom Intron zum Exon durch 5'-AG-3' und der Übergang vom Exon zum Intron durch 5'-GT-3' gekennzeichnet ist. Gezeigt ist das am Beispiel des Vergleichs der Nukleotidsequenzen von g903/2-6 und c903-3 im Anhang 3 C. Die beiden Nukleotidsequenzen stimmen im Exonbereich zu 96 % überein.

### 3.5.3.1 Homologien der Nukleotid- und abgeleiteten Aminosäuresequenzen der *ELH*-cDNA Klone zu Sequenzen aus Datenbanken

Alle drei cDNA-Klone c903-1, c903-2 und c903-3 haben auf **Nukleotidebene** Homologien zur mRNA des putativen Proteins T10I14.140 aus *Arabidopsis thaliana* mit der Acc. No. AL021712. Klon c903-1 weist im 5'-Bereich von nt 7-221 85 % Identität zur *A. th.* mRNA in gleicher Orientierung auf. Ebenfalls in der 5'-Region liegen die Übereinstimmungen des cDNA-Klons c903-3 mit den Sequenzen des *A. th.* Gens (Nukleotide 89-300, 86 % Identität). Bei Klon c903-2 bestehen diese Homologien mit 85 % Identität im 3'-Bereich des cDNA-Klons von nt 1872-2109.

Klon c903-2 zeigt außerdem in der 3'-Region bis nt 1890 Homologien zu rRNAs verschiedener Arten. Die größte Homologie besteht zum 26S rRNA-Gen aus *Myriophyllum exalbescens* (Acc. No. AF274655) mit 96 % Identität. Die 5'-Region des Klons c903-2 weist über 894 Nukleotide 98 % Identität zur 25S rRNA aus Tomate auf (Acc. No. LE25SRIB) (s. Anhang 4 B und C). Geringere Identität besteht zu den 26S rRNA Genen aus *Platanus occidentalis* (Acc. No. AF274662, 96 % Identität) und *Humulus lupulus* (Acc. No. AF223066, 96 % Identität).

Die vom cDNA-Klon c903-1 abgeleitete Aminosäuresequenz weist hohe Homologien zum hypothetischen Protein T10I14.140 aus *Arabidopsis thaliana* (T04912, 86 % Identität) und zu verschiedenen wahrscheinlich lichtinduzierten Proteinen aus *A. th.* (F71409, CAB10248.1 und CAB78511.1, je 80 % Identität) auf.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz von Klon c903-2 zeigt im 3'-Bereich ebenfalls große Ähnlichkeiten zu den putativen lichtinduzierten *A. th.* Proteinen (F71409, CAB10248.1 und CAB78511.1, je 88 % Identität) und zum hypothetischen Protein T10I14.140 aus *A. th.* (T04912, 58 % Identität). Die abgeleitete Aminosäuresequenz der 5'-Region zeigt Homologien zu einem Cytochrom P450 ähnlichen Protein aus Tabak (BAA10929.1, 81 % Identität in einem Bereich über 80 AS) und einer Cytochrom P450 Monooxygenase aus Mais (CAA06156.1).

Aus Abbildung 24 geht die Sequenzähnlichkeit der vom cDNA-Klon c903-3 abgeleiteten Aminosäuresequenz zum hypothetischen Protein T10I14.140 aus *A. thaliana* (T04912) hervor. Die Identität beider Proteine beträgt 84 %.

```

S. t. TAGAGAATCTTTCAGAAAGCAGAGTTTTTACTTTTCATGGCGACTTCAAAGCT
S. t.                               M A T S K L
                                   - - - - -
A. t.                               M A T S K L
S. t. CCAGGCTCTATGGAATCATCCTGCTGGCCCAAAGACCATTCTTTCTGGG
S. t.   Q A L W N H P A G P K T I H F W
       - - + - - - - - - - - - - -
A. t.   Q A I W N H P A G P K T I H F W
S. t. CACCAACCTTCAAGTGGGGCATCAGTATTGCAAATATTGCAGACTTTGCT
S. t. A P T F K W G I S I A N I A D F A
       - - - - - - - - - - - - - -
A. t. A P T F K W G I S I A N I A D F A
S. t. AAACCACCAGAAAAGATTTTCATATCCTCAGCAAATAGCGGTTACAGCAAC
S. t. K P P E K I S Y P Q Q I A V T A T
       - - - - - + - - - - - - - -
A. t. K P P E K L S Y P Q Q I A V T C T
S. t. TGGAATTATATGGTCTCGCTATAGCTTGGTAATTACTCCGAAAAACTGGA
S. t.   G I I W S R Y S L V I T P K N W
       - + - - - - - - + - - - - -
A. t.   G V I W S R Y S M V I N P K N W
S. t. ACCTCTTTAGTGTAATGTGGCAATGGCTGGAACAGGCATATACCAGCTT
S. t. N L F S V N V A M A G T G I Y Q L
       - - - - - - - - - - - - - -
A. t. N L F S V N V A M A G T G I Y Q L
S. t. TCACGAAAAATCCGGAATGATTATTTCAACGAGGAGCAACAACCCGCGCT
S. t. S R K I R N D Y F N E E Q Q P A L
       + - - - + + - - - - - + - - +
A. t. A R K I K H D Y A T . E A E P A V
S. t. AGCTAAAGAATGATGATGAAAATTGTGATTATTCAGGATCATCTAACTCC
S. t.   A K E
       - -
A. t.   A S E
S. t. TGAGCTTTGAATATTGTTCTAGCAATTTGATGTTTTACTTCTTCTGATAT

S. t. CACTGTTAATGTGAGACAAGTAATTAAGTGAATAATGACA

```

Abbildung 24 Nukleotidsequenz des Kartoffel-cDNA-Klons c903-3 (*S. t.*), abgeleitete Aminosäuresequenz und Vergleich zu einem hypothetischen Protein aus *A. thaliana* (*A. t.*)

Start- und Stopcodon sind unterstrichen. Das hypothetische Protein aus *A. thaliana* ist blaugrün dargestellt.

Ferner bestehen Homologien zu den putativen lichtinduzierten *A. th.* Proteinen (F71409, CAB10248.1 und CAB78511.1, je 81 % Identität) und zu anderen putativen Proteinen verschiedener Organismen.

### 3.5.4 Isolierung von *PPP*-cDNA-Klonen

Die unter 3.5.1 beschriebene cDNA Bank wurde mit dem radioaktiv markierten 0.3 kb Eco RI-Fragment 9-1 (*PPP*, s. 3.2.2) auf korrespondierende Klone untersucht. Ausgehend von 18 Primärsignalen konnten nach drei Screeningrunden 14 korrespondierende pBluescript-Phagemide identifiziert und durch in-vivo-Excision ausgeschnitten werden:

F(A) 9-1a-n. Diese wurden Restriktions- und Sequenzanalysen unterzogen, deren Ergebnisse in Tabelle°3 dargestellt sind.

cDNA-Klon F(A) 9-1	Größe des Inserts	Homologie zur mRNA aus <i>L. esculentum</i> (Nukleotide und %)	Homologie zur Phosphatase (AS und % Identität)
c	477 nt	473 nt, 91 %	158 AS, 90 %
e	709 nt	150 nt, 81 %	211 AS, 69 %
g	799 nt	732 nt, 92 %	243 AS, 92 %
h	298 nt	296 nt, 89 %	98 AS, 87%
i	540 nt	527 nt, 92 %	178 AS, 81 %
j	704 nt	642 nt, 92 %	212 AS, 92 %
k	219 nt	219 nt, 88 %	72 AS, 87 %
l	486 nt	452 nt, 89 %	149 AS, 85 %
m	614 nt	593 nt, 92 %	204 AS, 90 %
n	1024 nt	5`-Bereich: 495 nt, 92 % 3`-Bereich: 324 nt, 90 %	5`-Bereich: 49 AS, 93 % 3`-Bereich: 125 AS, 72 %

Tabelle 3 Vergleich der isolierten *PPP*-cDNA-Klone

Die Klone wurden vollständig, teilweise doppelsträngig sequenziert.

Die Klone F(A) 9-1a, b, d und f enthalten in ihren Sequenzen weder Homologien zum RFDD-Fragment F(A) 9-1 noch zur Phosphatase aus Tomate und sind deshalb nicht dargestellt.

Die Klone F(A) 9-1c, e, g, h, i, j, k, l und m enthalten Inserts unterschiedlicher Länge, die alle Homologien zu einer Phosphatmangel-induzierten sauren Phosphatase aus Tomate zeigen (s. 3.5.4.1). Es konnte kein Gesamtlängenklon identifiziert werden. Der längste Klon F(A) 9-1n hat eine Größe von ca. 1 kb. Aus 3'- Richtung wurden 719 Nukleotide und aus 5'-Richtung 691 Nukleotide sequenziert. In einem überlappenden Bereich von 64 Nukleotiden sind sie identisch, so daß die Gesamtsequenz von 1024 nt aus diesen beiden Teilsequenzen zusammengesetzt wurde.

Basierend auf den Sequenzen wurden die cDNAs in verschiedene Klassen eingeteilt. Der Bereich, in dem die cDNA-Klone untereinander hohe Homologie zeigen, erstreckt sich über eine Länge von etwa 240 Nukleotiden (siehe Anhang 4 D). In dieser Region liegen auch die Homologien zum RFDD-Fragment F(A) 9-1, die zwischen 80 % [F(A)9-1e] und 100 % [F(A) 9-1h, F(A) 9-1k] betragen.

Kein cDNA-Klon enthält einen Poly(A)-Schwanz.

#### 3.5.4.1 Homologien der Nukleotid- und abgeleiteten Aminosäuresequenzen der *PPP*-cDNA Klone zu Sequenzen aus Datenbanken

Die cDNA-Klone F(A) 9-1c, e, g, h, i, j, k, l, m und n weisen sowohl auf Nukleotid- als auch auf Proteinebene hohe Homologien zu einer erst kürzlich beschriebenen Phosphatmangel-induzierten sauren Phosphatase aus *Lycopersicon esculentum* auf (Acc. No. AF305968) [182]), zusammengefaßt in Tabelle°3 und im Anhang 4 D. Die cDNA-Klone mit Homologien zur Tomaten-Phosphatase weisen ebenso Sequenzähnlichkeiten zwischen 30 und 43 % Identität zu einer putativen Phosphatase aus *Gallus gallus* (Acc. No. AJ006529) auf [183].

Die mRNA der Phosphatase aus *L. esculentum* enthält 942 Nukleotide, wobei die Nukleotide 30-839 die kodierende Region für 269 Aminosäuren bilden. Im Vergleich der

Nukleotidsequenzen der sauren Phosphatase aus Tomate mit den cDNA-Klonen aus Kartoffel fallen 9 fehlende Nukleotide in der Tomaten-cDNA auf.

Die Klone F(A) 9-1g, j und n enthalten Sequenzen des 5'-untranslatierten Bereiches und besitzen eine „ATG“ Sequenz, die als Startcodon dienen könnte (s. Anhang 4 D). Der 5'-untranslatierte Bereich beträgt 67 (Klone j und n) bzw. 68 (Klon g) nt. Durch Insertion jeweils eines Nukleotids in den Klonen j und n verschiebt sich das Leseraster dieser Klone. Sie besitzen kein durchgehendes Leseraster. Der längste Klon, Klon F(A) 9-1 g zeigt Übereinstimmung zur Tomaten-Phosphatase bis Nukleotid 751 (732 nt mit 92 % Identität) und stellt damit einen fast vollständigen cDNA-Klon dar.

Die Klone e und l besitzen ein potentiell Stopcodon und, ebenso wie Klon n, Sequenzen im 3'-untranslatierten Bereich. Klon e enthält 2 Insertionen mit 3 bzw. 6 Nukleotiden.

Die Klone c, h, i, k und m besitzen weder Start- noch Stopcodon, Klon k im Gegensatz zu den anderen 3 Klonen auch kein durchgehendes Leseraster.

#### 3.5.4.2 Der vollständige cDNA-Klon einer putativen Phosphatase F(A) gl-3

Das Screenen der cDNA-Bank führte nicht zur Isolierung eines Gesamtlängenklones. Dieser wurde aus den cDNA-Klonen F(A) 9-1g und F(A) 9-1l zusammengesetzt. Beide Klone stimmen in einem überlappenden Bereich von 363 Nukleotiden überein (100 %). Klon g enthält einen potentiellen Translationsstart, Klon l ein mögliches Stopcodon. Zur Klonierung eines Gesamtlängenklones wurden beide cDNA-Klone deshalb mit der Restriktionsendonuklease Spe I, die in beiden Insertsequenzen und im Vektor je eine Erkennungsstelle hat, gespalten. Der Klon F(A) gl-3 wurde Restriktions- und Sequenzanalysen unterzogen. Die Nukleotid- und die abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind in Abbildung 25 dargestellt, die Plasmidkarte in Anhang 4 G.

A

Klonierungsstelle

GGAAATTCGCGGCCGCTGAACAACAAACAGAGGTCTTCTCTCTTTTCTCGT  
CTCTAATTCCTCCATAATTTAATCAAAAAAGA**ATGG**CTGGAATTGTAGTG  
TTTTTCGACTTTGACAAGACGATTATCGATGTGGATAGTGATAATTGGGT  
GGTGGATGAGTTAGGCGCCACTGATTTGTTCAATCAGCTTCTCCCCACTA  
TGCCATGGAACACTCATGGATAGAATGATGAACGAACTTCATACACAA  
GGCAAAACAATACAAGACATTGAAGAGGTACTGAAACGGGTCCCATAACA  
CCCTAGGATTGTTCCAGCTATTAAATCAGCTTATGCATTAGGGTGTGATT  
TGAGAGTAATAAGCGATGCAAATGTATTCTTCATTGAAGCTATTTTGAAA  
CATCTCGGAATTAGGGATTGTTTCTCTGAGATCAATACGAATCCAGGCTA  
CGTCGATAAAGAAGGCAGGCTTCGAATCCTTCCTTATGTTGATTTTCAA  
CATCCCCTCATGGTTGCAATCTCTGCCCTCCCAACATGTGCAAGGGTAGG  
ATAGTAAAGAGAATTCAAGCCATCTTGGCTAAGGAAGGGAAGAAAAGAA  
GATCTATCTAGGCGATGGAATCGGCGATTTCTGCCCCAGTTTGAAGCTAA  
GGGAAGGAGATTTTGTGATGCCAAGAAAAGATTTCCCAGCCTGGAATTTG  
ATAAACAAAAACAGGACA**ACTAGT**AAAAGCAGCTGTCCACGAGTGGACTGA  
TGGGGAAGAACTCGAGCGAATTTCTGCTACAACATAACACAATCAACA  
TTGAAGAAAGCCAATTGTTATCATTGGAGTTCTGCAAATTCAGACGATA  
CCCAAAGCAGCTCATGGAGCCTTGCCACAGGCTCTTCTGTGCCTTACT**G**  
**AA**ACTAATGGCAAATCATCAACATGAAGAAAGAAAAGCGGCCGCGAAT**T**  
C

B

*S. t.* MAGIVVFF**DFDKT**IIDVSDNWVDELGATDLFNQLLPTMPWNSLMDRMMNELHTQGKTI  
MAGIVV **DFDKT**II+VSDNWVDELGATDLFNQLLPTMPWNSLMDRMM ELHTQGKTI  
*L. e.* MAGIVVVF**DFDKT**IIIEVSDNWVDELGATDLFNQLLPTMPWNSLMDRMMKELHTQGKTI

*S. t.* QDIEEVLKRVPIHPRIVPAIKSAYALGCDLRVISDANVFFIEAILKHLGIRDCFSEINTN  
QDIEEVLKRVPIHPRIVPAIKSA+ALGCDLRVISDANVFFIE ILKHLGIRDCFSEINTN  
*L. e.* QDIEEVLKRVPIHPRIVPAIKSAHALGCDLRVISDANVFFIETILKHLGIRDCFSEINTN

*S. t.* PGYVDKEGRLRILPYVDFQTSPhGCNLCPPNMCKGRIVKRIQAILAKEGKKRMIY**LDGI**  
PGYVD EGRLRILPYVDFQ SPH CNLCPPNMCKG IV+RIQ AKEGKKRMIY**LDGI**  
*L. e.* PGYVDGEGRLRILPYVDFQKSPHSCNLCPPNMCKGMIVERIQ---AKEGKKRMIY**LDGI**

*S. t.* **GD**FCPSLKLREGDFVMPRKDFPAWNLINKNRTLKAAVHEWTDGEELERILLQLINTINI  
**GD**FCPSLKLRE DFVMPRKDFPAWNLINKNRTLKAA VHEWT+G+ELE ILLQ INTINI  
*L. e.* **GD**FCPSLKLREADFVMPRKDFPAWNLINKNRTLKAGVHEWTNGKELEHILLQWINTINI

*S. t.* EESQLLSLEFCKFQTIPKAAHGALPQALPVPY  
EESQLLS+E CKFQT AAHGALP+ LPVPY  
*L. e.* EESQLLSMENCKFQTKHNAAHGALPRPLPVPY

Abbildung 25 Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des zusammengesetzten Gesamtlängenklones F(A) gl-3

- A) Dargestellt ist die zusammengesetzte Nukleotidsequenz aus den cDNA-Klonen F(A) 9-1g (schwarz) und F(A) 9-1l (blaugrün). Start- und Stopcodon sowie die Restriktionsschnittstelle Spe I sind hervorgehoben. Im 5'-untranslatierten Bereich ist ein weiteres Stopcodon unterstrichen.
- B) Dargestellt ist die abgeleitete Aminosäuresequenz (*S. t.*) und ihre Homologie zur Phosphatmangel-induzierten sauren Phosphatase aus Tomate (*L. e.*). Zwei konservierte Phosphatase-Domänen sind blaugrün dargestellt.

Der zusammengesetzte cDNA-Klon F(A) gl-3, der insgesamt 922 Nukleotide enthält, wurde vollständig sequenziert. Abbildung 25 A zeigt die Nukleotidsequenz, wobei die Nukleotide des cDNA-Klons g schwarz dargestellt sind und die Nukleotide, die vom cDNA-Klon I stammen, blaugrün dargestellt sind. Start- und Stopcodon sowie die Spe I-Restriktionsschnittstelle sind hervorgehoben. Im 5'-untranslatierten Bereich, der 67 nt enthält, befindet sich im Leseraster 15 nt stromaufwärts vom Translationsstart ein Stopcodon (unterstrichen), was einer direkten Expression des Proteins in *E. coli* entgegensteht.

Der kodierende Bereich umfaßt 816 Nukleotide, die für 272 Aminosäuren kodieren (Abbildung 25 B). Auf Aminosäureebene zeigt die abgeleitete Sequenz 90 % Identität zur sauren Phosphatase aus *Lycopersicon esculentum* (AAG40473.1), die aus 269 Aminosäuren besteht. Außerdem wurden Homologien zur putativen Phosphatase aus *Gallus gallus* (Acc. No. CAA07090.1, 30 % Identität), zum Homöodomänen-Transkriptionsfaktor KNAT6 aus *Arabidopsis thaliana* (Acc. No. AAG40858.1, 36 % Identität) und zum Homöobox-Protein HD1 aus *Brassica napus* (Acc. No. AAF75812.1, 36 % Identität) gefunden. Zwei für Phosphotransferasen der Familie der HADs (haloacid dehalogenases) konservierte Motive (DXDXT und GDGXXD [184]) sind blaugrün hervorgehoben.

Das errechnete Molekulargewicht des Proteins beträgt 31.85 kDa, der isoelektrische Punkt liegt bei pH 5.9. Es trägt nach Computervorhersage keine N-terminale Signalsequenz und zeigt keine Transmembrandomäne.

Das Not I-Fragment des vollständigen cDNA-Klons F(A) gl-3 (930 nt) wurde, radioaktiv markiert, als Sonde für Northern-Blot-Analysen verwendet.

### 3.6 Die Expression der putativen Phosphatase in *Escherichia coli*

Zur Anreicherung und Reinigung und zur Aufklärung der Funktion des Proteins mit Homologie zu einer putativen sauren Phosphatase aus *L. esculentum* sollte die cDNA in *E. coli* exprimiert werden.

#### 3.6.1 Subklonierung in zwei Expressionsvektoren

Da sich 15 Nukleotide stromaufwärts vom Translationsstart im Leseraster ein Stopcodon befindet (siehe Abbildung 25), war eine direkte Klonierung in einen Expressionsvektor nicht möglich. Deshalb wurden Primer zur PCR generiert. Mit Hilfe des Primers gl 5 (Sequenz s. Anhang 1 D), der das ATG enthält, wurde der 5'-untranslatierte Bereich entfernt und eine Xho I- und eine Bam HI-Restriktionsschnittstelle eingeführt. Der 3'-Primer (gl 3, Sequenz s. Anhang 1 D) enthält das Stopcodon, eine Hind III- und eine Xba I-Restriktionsschnittstelle. Die so eingeführten Schnittstellen dienten der Vereinfachung der nachfolgenden Klonierung in den Expressionsvektor.

Der Klon der cDNA ohne Stopcodon, genannt PCR gl-3, wurde in den Vektor pCR<sup>®</sup> 2.1 subkloniert und vollständig sequenziert (siehe Anhang 4 E).

Zur Expression der putativen Phosphatase in *E. coli* wurden die Vektoren pQE 30 (Qiagen) und pRSET A (Invitrogen) gewählt. Beide Expressionsvektoren bieten einerseits die Möglichkeit, die Expression des rekombinanten Proteins durch IPTG-Zugabe zu induzieren. Andererseits vereinfacht sich die Aufreinigung und der Nachweis in Western-Blot-Analysen durch das N-terminale Anheften eines Histidin-Ankers an das rekombinante Protein.

Die Klonierung der Phosphatase-cDNA in den Expressionsvektor pRSET A und die klonierungsbedingten Veränderungen in der Sequenz wurden durch vollständige

Sequenzierung und Restriktionsanalysen überprüft (siehe Anhang 4 F). Die vektorkodierte cDNA wurde in geeignete Wirtsstämme transferiert (XL1-Blue MRF' bzw. BL 21).

### 3.6.2 Expression des rekombinanten Proteins in *E. coli*

Durch Zugabe von IPTG zur wachsenden Zellkultur sollte die Expression der vektorkodierten Phosphatase induziert werden. In Abbildung 26 sind in einem Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel die Bandenmuster der bakteriellen Proteinextrakte gezeigt.

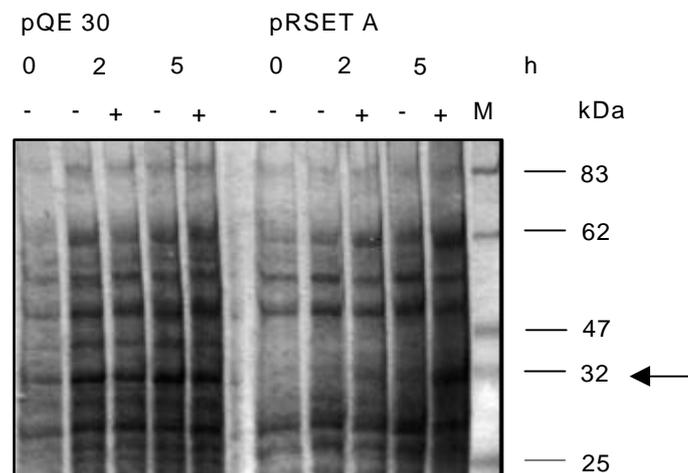


Abbildung 26 Expression der rekombinanten putativen Phosphatase in *E. coli*

Dargestellt ist ein Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel. Rekombinante Bakterien, die mit der putativen sauren Phosphatase im Expressionsvektor pQE 30 bzw. pRSET A transformiert worden waren, wurden mit bzw. ohne IPTG kultiviert und zu den oben angegebenen Zeitpunkten gewonnen. Die Überstände der Bakterienextrakte wurden auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie-Brilliantblau angefärbt.

Das mögliche rekombinante Protein ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

M	Molekulargewichtsmarker
pQE 30	Proteinextrakte aus Bakterien, die pQE 30/PCR gl-3 enthalten
pRSET A	Proteinextrakte aus Bakterien, die pRSET A/PCR gl-3 enthalten
-	Inkubation ohne IPTG
+	Zugabe von IPTG

Es wurden Kulturen der mit den Expressionsvektoren transformierten Bakterien mit IPTG inkubiert und Proben vor bzw. 2 und 5 Stunden nach IPTG-Zugabe entnommen. Nach Sonifizierung und Abzentrifugieren der Zelltrümmer wurden die Proteine des Überstands elektrophoretisch aufgetrennt und angefärbt.

Die mit dem Expressionsvektor pQE 30 transformierten Bakterien akkumulierten nach IPTG-Zugabe kein Fusionsprotein. Ein Protein von ca. 32 kDa, bei dem es sich um das Fusionsprotein handeln könnte, wurde sowohl im Überstand unbehandelter Kontrollen als auch in den Überständen von mit IPTG behandelten Kulturen detektiert.

Im Überstand der mit der putativen Phosphatase im Expressionsvektor pRSET A transformierten Bakterien fehlt dieses Protein in der Kontrollkultur zu Versuchsbeginn (0 h). Das Protein von ca. 32 kDa wurde nach 2- bzw. 5-stündiger Inkubationszeit mit oder ohne IPTG detektiert. Das könnte auf eine geringe Aktivität des *lacUV5*-Promotors im nichtinduzierten Zustand zurückzuführen sein. Der *lacUV5*-Promotor induziert bei IPTG-Zugabe die T7 Polymerase-Synthese, die dann wiederum den T7 Promotor im Vektor pRSET A aktiviert und damit die Transkription der stromabwärts gelegenen cDNA induziert.

Durch Anzucht der Bakterienkulturen mit 20 mM Glucose im Medium sollte diese nichtinduzierte Proteintranslation verhindert werden. Nach fünfstündiger Inkubationszeit mit oder ohne IPTG wurden gleichermaßen 32 kDa-Banden detektiert (Daten nicht gezeigt).

### 3.6.3 Versuche zur Reinigung des Proteins und Western-Blot-Analyse

Zur Reinigung des Proteins wurde ein mit der putativen Phosphatase transformierter *E. coli* Klon in einer 1 l-Kultur vermehrt. Die Transkription wurde durch eine fünfstündige Inkubation mit IPTG induziert. Die Aufreinigung erfolgte unter nativen Bedingungen unter Verwendung des ProBond™ Purification Systems (Invitrogen), bei dem das rekombinante Protein aufgrund des N-terminalen Histidin-Ankers an einer Nickel-Agarose-Säule gebunden wird. Die Elution des Proteins erfolgte mit Hilfe eines pH-Gradienten. Unter diesen Bedingungen kam es zu keiner Aufreinigung und Anreicherung des rekombinanten Proteins.

Die Western-Blot-Analyse erfolgte mit dem Anti-His-Antikörper (Invitrogen), welcher den Histidin-Anker des Fusionsproteins detektiert. Es konnte kein rekombinantes Protein identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

### 3.7 Erzeugung und Analyse transgener Pflanzen

Neben der Expression der putativen Phosphatase in *E. coli* sollten Kartoffelpflanzen generiert werden, die das Gen in sense- und antisense-Orientierung exprimieren, um Kenntnisse über einen veränderten Phänotyp bzw. über eine veränderte Pathogenresponsivität zu erlangen und eventuell Aussagen über eine physiologische Rolle der putativen Phosphatase treffen zu können. Zur Expression des Gens in einem heterologen System wurde Tabak gewählt, der mit dem Gen in sense-Orientierung transformiert werden sollte. Dazu mußte das Gen zunächst unter die Kontrolle des CaMV 35S Promotors, eines für Pflanzen konstitutiven Promotors, gebracht werden.

#### 3.7.1 Herstellung der Promotor-Gen-Kassetten

Ausgangspunkt für die Erstellung der Konstrukte war der binäre Vektor pBKTX, der einen modifizierten konstitutiven CaMV 35S Promotor enthält [148] und sich aufgrund des nptII-Gens für eine Selektionierung der transformierten Pflanzen mittels Kanamycin eignet. Die kodierende Region der putativen Phosphatase aus Kartoffel wurde in sense- und antisense-Orientierung stromabwärts vom 35S Promotor in den Vektor kloniert.

Für die sense-Konstruktion wurden sowohl der Vektor als auch das Plasmid F(A) gl-3, das für die putative Phosphatase kodiert, (siehe 3.5.4.2 und Anhang 4 G) mit den Restriktionendonukleasen Sma I und Sal I gespalten. Nach Ligation der DNA und Transformation von *E. coli* XL1-Blue MRF' wurde die Orientierung des Gens im Vektor durch Restriktionsspaltungen der Plasmid-DNA rekombinanter Bakterienklone überprüft. Das sense-Konstrukt ist schematisch in Abbildung 27 dargestellt.

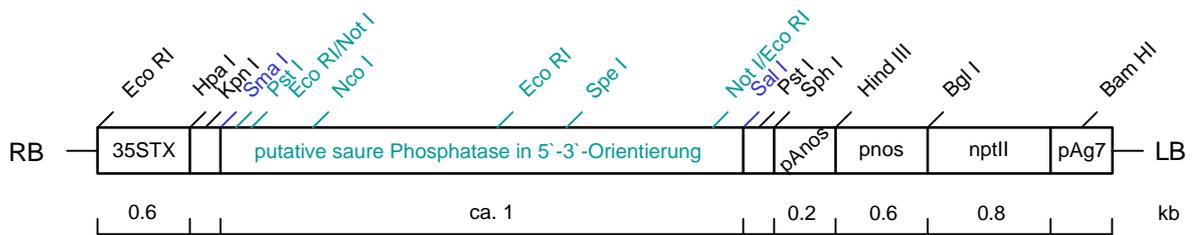


Abbildung 27 Schematische Darstellung der sense-Konstruktion der putativen sauren Phosphatase im binären Vektor pBKTX

RB rechte Grenze (right border)  
 LB linke Grenze (left border)  
 35STX 35S Promotor  
 Blau Klonierungsstellen

Ausgewählte Restriktionsschnittstellen in der kodierenden Region der Phosphatase sind blaugrün hervorgehoben.

Für die antisense-Konstruktion wurde der Vektor mit den Restriktionsenzymen Sma I und Xba I behandelt. Die für die putative Phosphatase kodierende Region wurde aus dem Plasmid F(A) gl-3 (siehe 3.5.4.2) mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen Xba I und Eco RV ausgeschnitten und mit dem wie oben beschrieben gespaltenen Vektor ligiert. Mit diesem Konstrukt wurden *E. coli* XL1-Blue MRF' transformiert. Die Orientierung des Gens im Vektor wurde durch Restriktionsspaltungen der Plasmid-DNA rekombinanter Bakterienklone überprüft und ist schematisch in Abbildung 28 dargestellt.

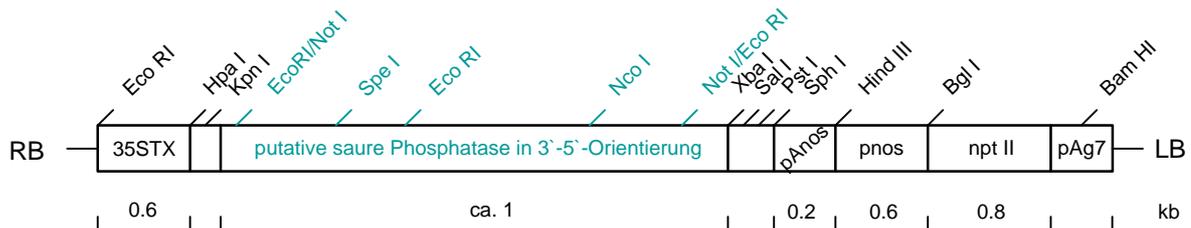


Abbildung 28 Schematische Darstellung der antisense-Konstruktion der putativen sauren Phosphatase im binären Vektor pBKTX

RB rechte Grenze (right border)  
 LB linke Grenze (left border)  
 35STX 35S Promotor

Ausgewählte Restriktionsschnittstellen in der kodierenden Region der Phosphatase sind blaugrün hervorgehoben.

### 3.7.2 Transformation und Analyse von Kartoffelpflanzen

Nach Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* mit den unter 3.7.1 beschriebenen sense- und antisense- Promotor-Gen-Kassetten wurden rekombinante *Agrobacterium*-Klone durch Restriktionsanalyse identifiziert und zum *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer in Kartoffel *S. tuberosum* L. cv. Désirée verwendet. Die sich regenerierenden Pflanzen wurden auf einem kanamycinhaltigen Nährmedium selektioniert.

Es wurden 22 potentielle transgene Kartoffelpflanzen mit der putativen Phosphatase in sense-Orientierung bzw. 18 Pflanzen mit dem Gen in antisense-Orientierung erhalten. Sie zeigten keinen veränderten Phänotyp bzw. kein verändertes Wachstumsverhalten im

Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen. Zur Untersuchung der Genexpression wurden Southern-Blot-Analysen durchgeführt, deren Ergebnisse in Abbildung 29 A und B dargestellt sind.

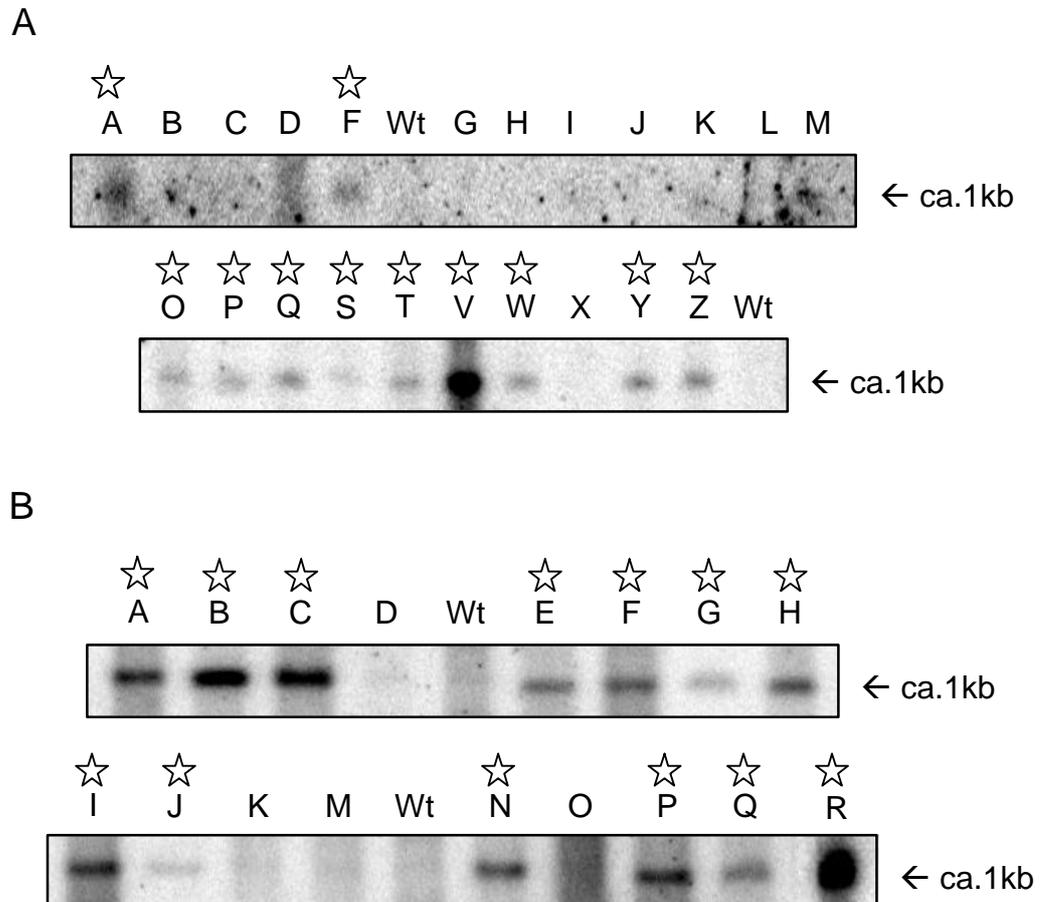


Abbildung 29 Southern-Blot-Analyse transgener Kartoffelpflanzen

- A) Blätter von *S. tuberosum* L. cv. Désirée wurden mit dem binären Vektor pBKTX, der die putative saure Phosphatase in sense-Orientierung enthält, transformiert.
- B) Blätter von *S. tuberosum* L. cv. Désirée wurden mit dem binären Vektor pBKTX, der die putative saure Phosphatase in antisense-Orientierung enthält, transformiert.

Aus Blättern kanamycinresistenter Pflanzen wurde genomische DNA isoliert, mit den Restriktionsendonukleasen Pst I (sense-Pflanzen; A) bzw. Not I (antisense-Pflanzen; B) gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt und gebロットet. Die Hybridisierung erfolgte gegen das ca. 1 kb lange Bam HI/Hind III Fragment des Klon PCR gl-3 (Gesamtlängenklon der putativen sauren Phosphatase).

Wt Wildtyp-Kartoffelpflanzen *S. tuberosum* L. cv. Désirée

Aus Blättern aller kanamycinresistenten Pflanzen wurde genomische DNA isoliert, diese einer Restriktionsspaltung unterzogen und elektrophoretisch aufgetrennt. Als Sonde zur Southern-Blot-Hybridisierung diente ein mittels Bam HI und Hind III isoliertes Fragment aus dem Klon PCR gl-3 (Gesamtlängenklon der putativen Phosphatase, siehe 3.5.4.2).

Die genomische DNA aus Blättern potentieller transgener Pflanzen mit dem sense-Konstrukt wurde mit der Restriktionsendonuklease Pst I gespalten, die je eine Schnittstelle im binären Vektor und eine in der inserierten DNA besitzt (siehe Abbildung 27). In untransformierten Kontrollpflanzen (Wildtyp, Wt) wurde kein ca. 1 kb großes Fragment detektiert. Ein Fragment dieser Größe fehlt ebenso in den transformierten, kanamycinresistenten Pflanzen B, C, D, G,

H, I, J, K, L, M und X. In den Pflanzen A, F, O, P, Q, S, T, V, W, Y und Z wurde ein ca. 1 kb großes Fragment detektiert, das der putativen Phosphatase entspricht (Abbildung 29 A). Die genomische DNA aus Blättern potentieller transgener Pflanzen mit dem antisense-Konstrukt wurde mit der Restriktionsendonuklease Not I gespalten. Damit wird die gesamte kodierende Region der Phosphatase aus dem Vektor herausgespalten (ca. 1 kb, siehe Abbildung 28). In den untransformierten Wildtyppflanzen (Wt) und in den transformierten, kanamycinresistenten Pflanzen D, K, M und O wurde kein ca. 1 kb großes Fragment detektiert. Die Pflanzen A, B, C, E, F, G, H, I, J, N, P, Q und R enthalten die putative Phosphatase, gezeigt durch Hybridisierung eines etwa 1 kb großen Fragments (Abbildung 29 B).

### 3.7.3 Expression der putativen Phosphatase nach Pathogenbehandlung

Ferner sollte untersucht werden, ob es Unterschiede in der Pathogenresponsivität transgener Kartoffelpflanzen im Vergleich zu Wildtyppflanzen gibt. Dazu wurden die Pflanzen aus Sterilkultur in Erde ausgepflanzt und ca. 4 Wochen in der Phytokammer angezogen. Je ein Blatt wurde mit *Psm* infiltriert. Als Kontrollpflanzen dienten untransformierte Wildtyppflanzen, die mit *Psm* infiltriert wurden und unbehandelte Wildtyppflanzen. 24 Stunden nach der Infiltration waren phänotypisch keine Unterschiede in der Nekrosenbildung zwischen untransformierten Kontrollpflanzen und sense- bzw. antisense-Pflanzen zu erkennen, was aus Abbildung 30 hervorgeht.



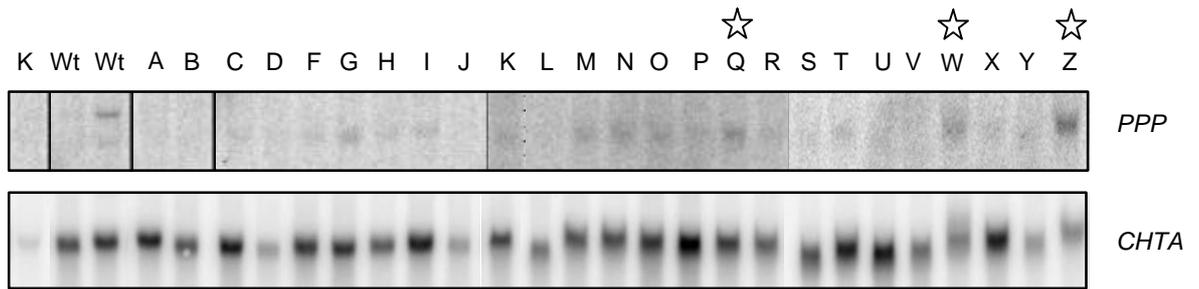
Abbildung 30 Kartoffelpflanzen *S. tuberosum* L. cv. Désirée nach Inokulation mit *Psm*.  
 24 hpi  
 linkes Bild Wildtyppflanze  
 rechtes Bild transgene Pflanze, transformiert mit der sauren Phosphatase in sense-Orientierung

Außerdem wurde geprüft, ob die Pathogenbehandlung zu Unterschieden in der Transkriptakkumulation der putativen Phosphatase und des SAR-Markergens saure Chitinase (*CHTA*) zwischen Kontrollpflanzen und transgenen Pflanzen führt. Da 24 Stunden nach Pathogeninfiltration sowohl die Chitinase A (s. 3.1.2, Abbildung 1) als auch die putative Phosphatase (s. 3.2.3, Abbildung 6) im infiltrierten Blattmaterial induziert sind, wurden auch von den transgenen Pflanzen 24 hpi das behandelte und das darüberliegende unbehandelte Blatt geerntet, aus diesem Material Gesamt-RNA isoliert und für Northern-Blot-Analysen

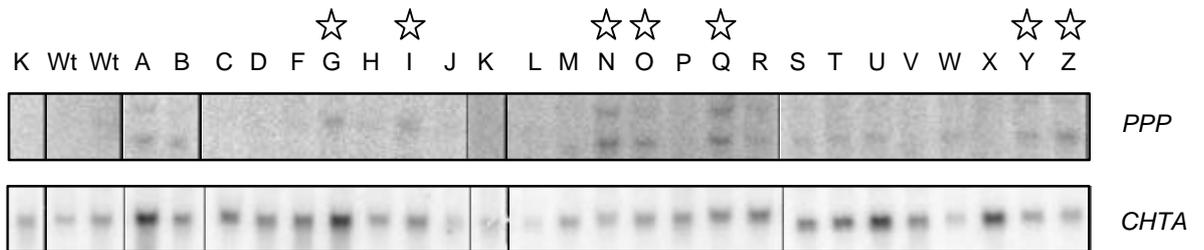
verwendet. Als Sonden für die Hybridisierungen, deren Ergebnisse in Abbildung 31 A und B dargestellt sind, dienten das ca. 1 kb lange Not I-Fragment des Klons F(A) gl-3 (siehe 3.5.4.2) und das ca. 1 kb lange Eco RI-Fragment der Chitinase A.

A

Infiltrierte Blätter

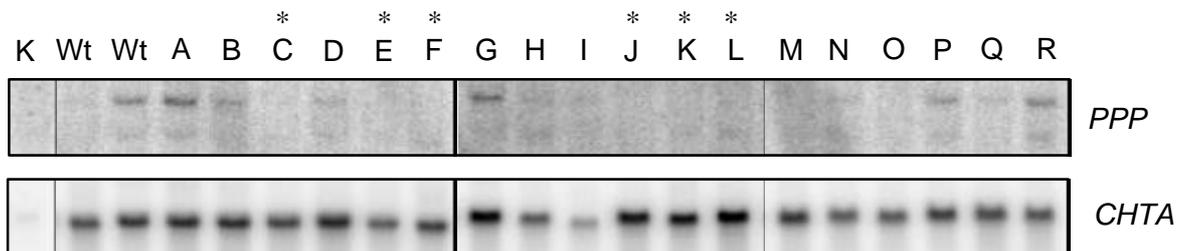


Nichtinfiltrierte Blätter



B

Infiltrierte Blätter



Nichtinfiltrierte Blätter

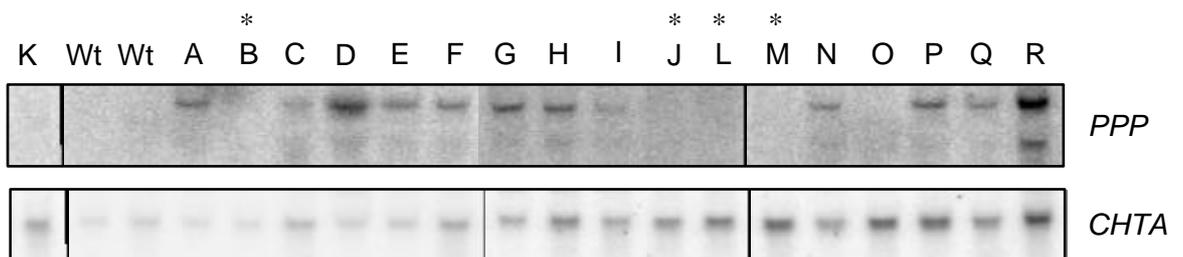


Abbildung 31 Transkriptakkumulation der *PPP* und der Chitinase A (*CHTA*) in Blättern transgener Kartoffelpflanzen nach Infiltration mit *Psm*

A) Kartoffelpflanzen, die den *PPP*-kodierenden Bereich in sense-Orientierung enthalten

B) Kartoffelpflanzen, die den *PPP*-kodierenden Bereich in antisense-Orientierung enthalten

K untransformierte, unbehandelte Wildtyppflanze  
 Wt untransformierte, mit *Psm* behandelte Wildtyppflanze  
 ☆ transgene Pflanzen mit erhöhten *PPP*-Transkriptmengen  
 \* transgene Pflanzen ohne *PPP*-Transkripte

Es wurden 20 µg Gesamt-RNA aufgetragen, isoliert aus 24 h nach *Psm*-Infiltration geerntetem Blattmaterial, elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Die Filter wurden gegen die im Text genannten Sonden hybridisiert.

Abbildung 31 A zeigt die Transkriptakkumulation der putativen Phosphatase in Wildtyppflanzen und in Kartoffelpflanzen, die mit dem Phosphatase-Gen in 5'-3' Orientierung transformiert wurden. In der untransformierten, unbehandelten Kontrollpflanze wurde keine Transkriptakkumulation detektiert. Dagegen wurden im infiltrierten Gewebe einer von zwei untransformierten, mit *Psm* behandelten Pflanzen *PPP*-Transkripte nachgewiesen. Erhöhte *PPP*-Transkriptmengen wurden 24 Stunden nach *Psm*-Infiltration in den behandelten Blättern der Pflanzen Q, W und Z gefunden. In den darüberliegenden unbehandelten Blättern wurden höhere *PPP*-Transkriptmengen in den Pflanzen G, N, O, Q, Y und Z detektiert, wobei die Sonde in der mRNA der Pflanzen N, O und Q zwei Transkripte unterschiedlicher Größe erkannte. Nach der Hybridisierung mit der Phosphatase-Sonde wurde der Filter mit einer *CHTA*-Sonde hybridisiert. Die *CHTA*-Transkripte akkumulieren 24 Stunden nach *Psm*-Infiltration im behandelten Blattmaterial sowohl der Wildtyp- als auch den meisten der transgenen Kartoffelpflanzen. In den unbehandelten Blättern einiger bakterienbehandelter transgener Pflanzen akkumulieren *CHTA*-Transkripte, wohingegen in der untransformierten, unbehandelten und in den mit *Psm* behandelten Wildtyppflanzen keine *CHTA*-Transkripte detektiert wurden.

Abbildung 31 B zeigt das Expressionsmuster der putativen Phosphatase in Wildtyppflanzen und in Kartoffelpflanzen, die mit dem Phosphatase-Gen in antisense-Orientierung transformiert wurden. Die RNA für die Kontrollen wurde aus den gleichen Pflanzen isoliert, die bereits für die Northern-Blot-Hybridisierung der sense-Pflanzen als Kontrollpflanzen dienten, so daß die Expressionsmuster einander entsprechen. 24 Stunden nach Bakterieninfiltration wurden keine *PPP*-Transkripte in den infiltrierten Blättern der Pflanzen C, E, F, J, K und L detektiert, dagegen kommt es zu einer starken Akkumulation von *CHTA*-Transkripten. In den unbehandelten Blättern der Pflanzen B, I, J, L und M wurden keine *PPP*-Transkripte gefunden. Im Falle der Pflanze R erkannte die Sonde zwei RNA-Transkripte unterschiedlicher Größe. Nach der Hybridisierung mit der Phosphatase-Sonde wurde der Filter ebenfalls mit einer *CHTA*-Sonde hybridisiert. Es konnte gezeigt werden, daß die *CHTA*-Transkripte 24 Stunden nach Pathogenbehandlung in den infiltrierten Blättern der untransformierten Kontrollpflanzen und in den infiltrierten und darüberliegenden nichtinfiltrierten Blättern der antisense-Pflanzen akkumulieren.

Dieser Versuch wurde einmal durchgeführt und muß zur Überprüfung einer veränderten Pathogenresponsivität in den transgenen Pflanzen wiederholt werden.

#### 3.7.4 Transformation und Analyse von Tabakpflanzen

Neben der Expression der putativen Phosphatase im homologen System sollte das Gen auch in einem heterologen System überexprimiert werden, um Aussagen über eine mögliche Funktion des Gens in der Pathogenabwehr treffen zu können. Dazu wurden Blattstückchen von Tabakpflanzen *Nicotiana tabacum* SR1 transformiert. Die zur Transformation verwendeten Bakterien *A. tumefaciens* trugen im binären Vektor pBKTX die kodierende Region der putativen Phosphatase in 5'-3' Orientierung (siehe 3.7.1, Abbildung 27). Die sich regenerierenden Pflanzen wurden mittels Kanamycin selektioniert.

Es wurden 9 potentielle transgene Tabakpflanzen gefunden, die phänotypisch keine Veränderungen im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen zeigten. Vor Resistenzstudien wurden die transgenen Pflanzen auf Transkriptionsebene untersucht, das Ergebnis ist in Abbildung 32 dargestellt.

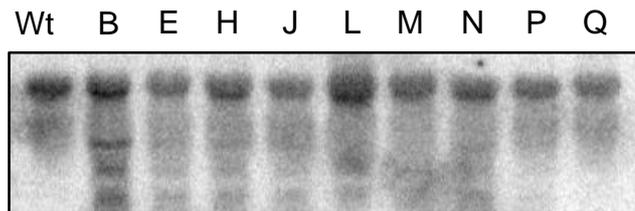


Abbildung 32 Expression der putativen sauren Phosphatase aus Kartoffel in Blättern von transgenen Tabakpflanzen *N. tabacum* SRI

Es wurden 25 µg Gesamt-RNA, isoliert aus Blattmaterial, aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf einen Nylonfilter geblottet. Der Filter wurde gegen das radioaktiv markierte Fragment F(A) gl-3 (ca. 1 kb) hybridisiert.

Wt untransformierter Wildtyp-Tabak *N. tabacum* SR I

Für die Northern-Blot-Analyse wurde aus Blättern der kanamycinresistenten Tabakpflanzen Gesamt-RNA isoliert und nach elektrophoretischer Auftrennung die Hybridisierung gegen das ca. 1 kb große radioaktiv markierte Not I-Fragment des Plasmids F(A) gl-3 (siehe 3.5.4.2, vollständiger cDNA-Klon der *PPP*) durchgeführt. Es wurde sowohl in der untransformierten Kontrollpflanze als auch in den mit der Kartoffel-Phosphatase transformierten Pflanzen ein Transkript detektiert, bei dem es sich um die korrespondierende RNA einer endogenen Phosphatase aus Tabak handeln könnte. Außerdem wurden von der Sonde in den transgenen Pflanzen zusätzliche Transkripte unterschiedlicher Größe detektiert. Hervorzuheben ist hierbei Pflanze B, in deren RNA drei weitere Transkripte mit der *PPP*-Sonde hybridisieren. Niedrigere Transkriptmengen weisen die Pflanzen E, H, J und N auf. In einer weiteren Northern-Blot-Analyse wurden, neben den obengenannten Pflanzen, in den Pflanzen M, S und T ebenfalls *PPP*-Transkripte nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

## 4 Diskussion

### 4.1 Identifizierung differentiell exprimierter Gene – „mRNA-Differential Display“ (DDRT-PCR) und cDNA-AFLP

Zur Identifizierung und Isolierung differentiell exprimierter Gene werden verschiedene Methoden wie subtraktive Hybridisierung [185] (speziell SSH; Supression Subtractive Hybridization [186]), cDNA-RDA („cDNA-representational difference analysis“ [187]), Methoden des „RNA fingerprintings“ [188] (DDRT-PCR, „Differential Display reverse transcription PCR“ [153]; RAP-PCR, „RNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR“ [189]) und auf AFLP basierende Techniken (cDNA-AFLP, „cDNA amplified fragment length polymorphism“ [159]) genutzt.

Als relativ einfache und robuste Methode, die Standardtechniken der Molekularbiologie vereint, wurde die DDRT-PCR zunächst für tierische Systeme entwickelt [153, 190] und später auch zur Isolierung pflanzlicher, differentiell exprimierter Gene genutzt [138, 141, 191, 192, 193]. Obwohl die Methode prinzipiell Vorteile aufweist (s. 3.2.1), ist eine Optimierung und Anpassung an das jeweilige experimentelle System erforderlich, um methodische Mängel und limitierende Faktoren auszugleichen [158, 194].

Mit Hilfe der von Liang [153] bzw. Linskens [154] veröffentlichten und modifizierten Methoden wurden die zur *PP2C* und die zum *ELH* korrespondierenden cDNAs isoliert. Zur reversen Transkription wurden dabei Oligo-dT-Primer mit 2 Ankerbasen verwendet, die teilweises „mismatch priming“ (Basenfehlpaarungen) bei der Primerbindung bedingen. Diese Unspezifität ist einerseits erwünscht, da sie eine Voraussetzung zur Amplifizierung eines mRNA- Subsets ist. Andererseits ist sie die Ursache für die nur mäßige Reproduzierbarkeit des detektierten Bandenmusters. Auffällig war außerdem der hohe Anteil an Fragmenten, die nur mit Hilfe des T-reichen Primers amplifiziert wurden (13 von 28 Fragmenten), was eventuell damit zusammenhängen könnte, daß Gene im 3'-untranslatierten Bereich einen hohen A-T-Gehalt aufweisen, so daß dort ebenfalls die T-reichen Ankerprimer binden können. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Linskens *et al.* [154], die gefunden hatten, daß ausschließlich 5'-GC-3'-reiche Ankerprimer zu einer Amplifizierung von Fragmenten führten, wurde festgestellt, daß nur der Oligo-dT-Primer e (Ankerbasen 5'-GC-3') zur Amplifizierung von „differentiellen“ Fragmenten führte.

Um das „mismatch priming“ etwas einzuschränken und damit die Reproduzierbarkeit des Bandenmusters zu erhöhen, wurden Primer mit einer Länge von 22 nt verwendet, die es ermöglichten, die Annealingtemperatur nach 4 Zyklen von 41°C auf 60°C heraufzusetzen (EDD, enhanced Differential Display; [154]). Generell wurden nur wenige „differentielle“ Banden detektiert, was nicht mit Daten aus der Literatur übereinstimmt und wofür keine Erklärung gefunden wurde.

Die Amplifikation und Identifikation gering abundanter Transkripte in Konkurrenz zu abundanten Transkripten mittels PCR gestaltet sich schwierig [195]. Die zu diesen Genen korrespondierenden Fragmente blieben im Polyacrylamidgel möglicherweise unsichtbar bzw. wurden von Fragmenten gleicher Größe überdeckt [158, 196]. Andererseits können „Falsch-Positive“ Fragmente durch degradierte RNA oder Kontamination mit DNA entstehen [197].

Das Problem „Falsch-Positiver“ trat auch bei der anschließenden Verifikation in Northern-Blot-Hybridisierungen auf. Die klonierten Fragmente hatten Größen zwischen 150-300 nt. Mit ihnen als Sonden konnte in keinem Fall eine differentielle Genexpression nachgewiesen

werden. Das kann mit geringer Abundanz der korrespondierenden Transkripte bzw. geringerer Sensitivität von Northern-Blot-Hybridisierungen erklärt werden. Allerdings ließ sich auch durch semiquantitative RT-PCR keine Induktion von *PP2C* und *ELH* zeigen.

Die zu den „Differential Display“ Fragmenten korrespondierenden cDNAs wiesen mehrheitlich Homologien zu chloroplastidärer RNA auf (20 von 28 Fragmenten). Dafür konnte keine schlüssige Erklärung gefunden werden, da es auch in der Literatur keine Hinweise auf dieses Phänomen gibt. Da nur wenige hundert Basen im 3'-Bereich eines Gens amplifiziert werden, könnte das ein Grund sein, weshalb in den anderen Fällen keine signifikanten Homologien zu bekannten Genen in Datenbanken gefunden wurden.

Mit Hilfe des cDNA-AFLP lassen sich einige Probleme der DDRT-PCR umgehen. Im Unterschied zur DDRT-PCR werden für das cDNA-AFLP nach der Erststrangsynthese mit einem Oligo-dT-Primer anstelle von Zufallsprimern spezifische Primer verwendet. Das wird durch eine vorherige Restriktionsspaltung der cDNA und eine sich daran anschließende Adaptorligation möglich. Die zu den Adaptoren komplementären Primer sind die Voraussetzung für eine höhere Annealingtemperatur und damit auch eine höhere Spezifität und Reproduzierbarkeit der Methode [159]. Die unter Verwendung des „displayProfile™“ Kit isolierten Fragmente waren länger als die mittels DDRT-PCR amplifizierten Fragmente. Möglicherweise ist das ein Grund, weshalb die Sequenzanalysen in den meisten Fällen signifikante Homologien zu bekannten Genen, u. a. zu *PR*-Genen und einer Phosphatmangel-induzierten sauren Phosphatase, ergaben. Mit diesen Fragmenten als Sonde konnte die differentielle Expression der korrespondierenden Gene in Northern-Blot-Analysen direkt gezeigt werden (s. Abbildung 6 und Abbildung 7).

Außerdem wurde zum cDNA-AFLP auch RNA verwendet, die aus mit  $MgCl_2$ - bzw. *Psm*-behandelten Blättern isoliert worden war. So wurde das zur *PPP* korrespondierende Fragment 9-1 aus RNA amplifiziert, die aus *Psm*-behandelten Blättern isoliert worden war. Prokaryotische mRNA enthält zwar im 3'-Bereich keine Poly(A)<sup>+</sup>-Sequenzen, dennoch sollte im Falle fehlender signifikanter Homologien zu bekannten pflanzlichen Genen sichergestellt werden, daß aus mit Bakterien behandelten Blättern isolierter RNA keine bakterielle RNA amplifiziert wurde [198].

Sowohl DDRT-PCR als auch cDNA-AFLP sind geeignete Techniken, um pathogeninduzierte Gene zu identifizieren. Beide Verfahren sind relativ einfach und ohne größere Kosten durchführbar, erfordern nur geringe Mengen an RNA und sind unabhängig von existierenden Datenbanken und cDNA-Bibliotheken [196]. Als nachteilig erweist sich dabei aber die hohe Zahl zu testender Primerkombinationen, die notwendig ist, um das gesamte Spektrum möglicher induzierter Gene, z. T. auch gering abundanter Gene, abzudecken. So wurden durch Durrant *et al.* bei Verwendung von RNA aus elicitierten Tabak-Zellkulturen als Ausgangsmaterial mit Hilfe von 512 Primerkombinationen 290 „differentielle“ Banden identifiziert [160]. Insgesamt stellte sich das cDNA-AFLP mit dem „displayProfile™“ Kit zur Isolierung pathogeninduzierter Gene im Vergleich zur DDRT-PCR als erfolgreicher heraus.

Ständig wachsende Datenbanken durch Genom-Sequenzierprojekte (u. a. Mensch, *Arabidopsis*, Reis) ermöglichen perspektivisch Analysemethoden mit einem sehr hohen Probendurchsatz zur Identifizierung aller in bestimmten Geweben oder in bestimmten Entwicklungsphasen, aber auch in Pflanze-Pathogen-Interaktionen exprimierten Genen. Dazu gehört u. a. SAGE (Serial Analysis of Gene Expression), die auf Concatemerisierung und Sequenzierung kurzer, aus mRNA gewonnener cDNA-Anker beruht und die eine schnelle Isolierung der zugehörigen cDNA erlaubt [199, 200]. Auf einer anderen Basis

beruhen verschiedene Formen von Microarrays. Ausgehend von bereits bekannten Genen werden die entsprechenden cDNAs bzw. Oligonukleotide auf Unterlagen wie Glas oder Membranen fixiert und anschließend mit zwei unterschiedlich markierten RNA-Sonden der zu vergleichenden Zustände (z. B. pathogenbehandelte *versus* unbehandelte Pflanzen) hybridisiert [201]. Mit Hilfe dieser Microarrays können sogenannte Expressionsprofile erstellt werden (Expression profiling [202, 203]). Die genannten Analysemethoden sind im Moment noch sehr kosten- und arbeitsintensiv, so daß sie nicht ohne weiteres in jedem Labor durchgeführt werden können. Eine Alternative könnte deshalb das von Qin *et al.* entwickelte Programm GenEST zur Auswertung von cDNA-AFLP-Daten darstellen [204].

#### 4.2 Die *PP2C*, ein Gen mit Homologie zu einer Proteinphosphatase Typ 2C

Die reversible Phosphorylierung von Proteinen ist einer der wichtigsten posttranslationalen Regulationsmechanismen zellulärer Prozesse der Eukaryoten. Im menschlichen Genom gibt es beispielsweise mehr als 2000 für Proteinkinasen kodierende Gene und 1000 für Proteinphosphatasen kodierende Gene [205]. Dabei übertragen Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen) als Teil von Signaltransduktionskaskaden (extrazelluläre) Signale in den Nukleus. MAP-Kinasen sind Serin/Threonin Proteinkinasen, die durch Hormone, abiotischen Stress, Pathogene und von Pathogenen freigesetzten Elicitoren sowie entwicklungspezifisch aktiviert werden [206, 207, 208].

Den MAP-Kinasen stehen als Regulatoren die Phosphoproteinphosphatasen gegenüber [209]. Zunächst aus tierischen Organismen isoliert, werden zunehmend pflanzliche Homologe identifiziert und charakterisiert [210]. Proteinphosphatasen werden in die Typen 1 und 2 unterteilt. Phosphatasen des Typs 1, die Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs), dephosphorylieren die Tyrosin-Reste ihrer Substrate und werden nochmals in drei Untergruppen unterteilt: intrazelluläre PTPs, rezeptorähnliche PTPs und die „Dual-specificity MAPK phosphatases“ (DSPs) [209, 211]. Das erste pflanzliche stressregulierte Gen mit Sequenzhomologien zu PTPs wurde in *Arabidopsis* identifiziert und charakterisiert (*AtPTP1*, [212]). Phosphatasen des Typs 2, die Protein-Serin/Threonin-Phosphatasen (PSPs), dephosphorylieren Serin- und Threonin-Reste ihrer Substrate [213].

Die Serin/Threonin-Phosphatasen werden aufgrund ihrer Sequenzhomologien in ihren katalytischen Domänen in zwei große Gruppen unterteilt. Zur ersten Gruppe, den Phosphoproteinphosphatasen, gehören PP1, PP2A und PP2B, wobei bisher keine Proteinphosphatasen des Typs 2B in Pflanzen gefunden wurden. Die zweite Gruppe bilden die PP2Cs. Diese besitzen im Gegensatz zu den Phosphoproteinphosphatasen kein regulatorisches Element, aber strukturelle Ähnlichkeiten zu Säuger-PP2Cs in der katalytischen Domäne. Sie werden nochmals untergliedert. Außerdem ist  $Mg^{2+}$  bzw.  $Mn^{2+}$  für ihre enzymatische Aktivität notwendig [214].

Mit Hilfe der DDRT-PCR wurde ein Fragment identifiziert und isoliert, das 24 h nach *Psm*-Infiltration von Kartoffelpflanzen in unbehandelten Blättern verstärkt auftrat. Das korrespondierende Gen wurde wegen seiner Sequenzhomologien mit *PP2C* (Proteinphosphatase 2C) bezeichnet.

Bisher wurde für Kartoffel keine Proteinphosphatase Typ 2C beschrieben und näher charakterisiert.

Der aus einer cDNA-Bank isolierte Klon weist sowohl auf Nukleotid- als auch Proteinebene signifikante Homologien zu Proteinphosphatasen Typ 2C (Serin/Threonin-Phosphatasen) verschiedener Pflanzen auf, u. a. Buche, Tabak, *A. thaliana*, *Mesembryanthemum crystallinum* und Lotus, wobei Letztere auch mit Hilfe der DDRT-PCR-Technik identifiziert wurde [215].

Aus Kartoffel wurde kein Gesamtlängenklon isoliert, so daß keine der für die oben aufgeführten, aus anderen Pflanzen isolierten *PP2Cs* charakteristische katalytische Domäne gefunden wurde.

Die Southern-Blot-Analyse ergab für die Kartoffel-*PP2C*, daß sie zu einer kleinen Genfamilie gehört (s. Abbildung 16). Von den etwa 70 aus *Arabidopsis* isolierten putativen *PP2Cs* [216] wird die Proteinphosphatase *AtPP2C-HA* dagegen nur von einem einzelnen Gen kodiert [217]. Bekannt sind aber auch zehn *PP2C*-cDNAs aus *M. crystallinum*, die einer Multigenfamilie angehören [218].

In Northern-Blot-Analysen wurde die transkriptionelle Regulierung der *PP2C* überprüft. Die Pathogenresponsivität wurde in mit *Psm* infiltrierte und darüberliegenden nichtinfiltrierten Blättern von Kartoffel untersucht. Dabei wurde in mehreren Experimenten ein uneinheitliches Expressionsmuster beobachtet (Beispiel s. Abbildung 4), so daß man daraus keine Pathogenresponsivität ableiten kann. Diese ist bisher auch nicht für Proteinphosphatasen Typ 2C beschrieben worden. Allerdings führt die symbiotische Interaktion zwischen *Lotus japonicus* und *Mesorhizobium loti* zur Induktion einer Proteinphosphatase (*LjNPP2C1*) während der Wurzelknöllchenbildung [215], so daß prinzipiell die Induktion der *PP2C* in einer Pflanze-Bakterien-Interaktion denkbar wäre.

*PP2C*-Transkripte akkumulieren in einigen Fällen zu frühen Zeitpunkten nach Pathogenbehandlung noch vor der Bildung sichtbarer Nekrosen, die etwa 6 hpi einsetzt und vor der Akkumulation von *CHTA*-Transkripten (s. Abbildung 4). Während die Akkumulation von *CHTA*-Transkripten durch den salicylatabhängigen Signaltransduktionsweg beeinflusst wird, könnte die *PP2C*-Transkriptakkumulation durch einen erhöhten endogenen Abscisinsäuregehalt induziert werden.

Nach Verwundung wurden gering erhöhte Transkriptmengen der *PP2C* detektiert (s. Abbildung 12). Eine schnelle und transiente Wundinduktion wurde auch für die *MP2C* aus *M. sativa* gefunden [219, 220]. Für *Solanaceae* wurde gezeigt, daß die wundinduzierte Genexpression mit erhöhten Mengen Abscisinsäure, Jasmonat und Ethylen einhergeht, wobei oftmals erst das Zusammenspiel mehrerer Signale zur Genexpression führt [221].

Der Einfluß von Phytohormonen und chemischen Signalsubstanzen, die in der pflanzlichen Pathogen-, Wund- bzw. Streßantwort von Bedeutung sind, wurde in verschiedenen Experimenten untersucht, um Hinweise auf mögliche Signaltransduktionswege und die Regulation der *PP2C*-Expression zu erhalten. Die Untersuchungen wurden mit abgetrennten Blättern durchgeführt (s. Abbildung 9). Vergleichbare Experimente an *M. crystallinum* wurden dagegen mit Ganzpflanzen durchgeführt [218]. Sowohl die Inkubation in Wasser als auch Saccharose führen zu einer Induktion der *PP2C*. Es könnte sich hierbei um eine Reaktion auf die Verwundung, die durch das Abtrennen der Blätter hervorgerufen wird, handeln. Auch die Behandlung mit Methyljasmonat, Salicylsäure und Arachidonsäure führt zu erhöhten Transkriptmengen, für die es in der Literatur keine Hinweise gibt. Die Induzierbarkeit durch Abscisinsäure ist für mehrere *PP2Cs* beschrieben worden [217, 218, 222]. In den

abgetrennten Kartoffelblättern kommt es in unseren Experimenten zu keiner Induktion der Transkriptakkumulation der *PP2C*. Möglicherweise führt das Abtrennen der Blätter als Folge einer Verwundung zum Anstieg des endogenen ABA-Spiegels und damit zur wundvermittelten *PP2C*-Induktion, so daß es letztendlich zu einer Überlagerung der Effekte aus Verwundung und Phytohormonapplikation kommt.

Aus den Ergebnissen der durchgeführten Experimente kann man vermuten, daß es sich bei der *PP2C* aus Kartoffel um eine eventuell durch Pathogene und durch Verwundung induzierbare Proteinphosphatase des Typs 2C handelt.

Obwohl es sich bei der *PP2C* nur möglicherweise um ein pathogenresponsives Gen handelt, wäre eine weitere molekularbiologische Charakterisierung denkbar. Zunächst sollte versucht werden, durch nochmaliges Screenen der cDNA-Bibliothek einen Gesamtlängenklon zu isolieren und charakterisieren, um die Kartoffel-*PP2C* einer bestimmten Unterklasse der Proteinphosphatasen des Typs 2C zuordnen zu können und gezielte Expressionsanalysen durchführen zu können. Bisher wurden niedrige Temperatur, Trocken- und Salzstreß, durch die *PP2Cs* anderer Spezies induziert werden [218, 223], für Kartoffel nicht untersucht. Außerdem müßte versucht werden, die Untersuchung von Pathogen- und Wundresponsivität voneinander zu trennen.

In der organspezifischen Expressionsanalyse wurden erhöhte Transkriptmengen in Blüten gefunden (s. Abbildung 14). Das korreliert mit den Ergebnissen von Kapranov *et al.*, die in Lotusblüten erhöhte *PP2C*-Transkriptmengen fanden [215].

Den unterschiedlichen *PP2Cs* werden verschiedene Funktionen als essentielle Komponenten in der ABA-Signaltransduktion zugeordnet. Für die aus *M. crystallinum* isolierten *PP2Cs* ist bisher keine Funktion bekannt. Da sie aber durch Salzstreß, Trockenheit bzw. Kälte induzierbar sind, wird für sie eine Rolle bei der Antwort auf Umweltstreß vermutet [218]. Auch die aus Tabak isolierte *PP2C* (*NtPP2C1*), die ein Homologes der *AtPP2C* aus *Arabidopsis* darstellt, scheint eine Rolle in der Streßantwort zu spielen [224]. Für die Kinase-assoziierte Proteinphosphatase aus *Arabidopsis* (KAPP) konnte gezeigt werden, daß sie mit der RLK, einer Transmembran-Rezeptor-ähnlichen Kinase unbekannter Funktion interagiert. Diese ist vermutlich an der Übertragung extrazellulärer Signale ins Zellinnere beteiligt [225]. Die ebenfalls aus *Arabidopsis* isolierten Proteinphosphatasen *ABI1*, *ABI2*, *AtPP2C* und *AtPP2C-HA* sind zentrale Komponenten (Negativregulatoren) der ABA-Signaltransduktion und durch ABA induzierbar [217, 226, 227]. Für die aus *Medicago sativa* stammende *PP2C* (*MP2C*) konnte *in vitro* gezeigt werden, daß sie mit der MAP Kinase Kinase Ste11 interagiert. Sie fungiert als Negativregulator der streßaktivierten MAP-Kinase (SAMK) und greift damit in die durch Verwundung, Trockenheit und Kälte aktivierte Signaltransduktion ein [219]. Durch einen Hefe-Zwei-Komponenten-Screen wurde das K<sup>+</sup>-Kanal-Protein AKT3 gefunden, das mit der *AtPP2C* interagiert [228]. K<sup>+</sup>-Kanäle kontrollieren das Membranpotential. Vorstellbar wäre, daß es bei einer Verwundung durch ein Pathogen zur Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden und damit zur Öffnung von Ionenkanälen kommt (s. 1.2.2). Diese Reaktion würde gleichzeitig die Negativregulation durch beispielsweise Proteinphosphatasen erfordern, um die Reaktion abzuschalten.

Diese Beispiele belegen die Bedeutung von Proteinphosphatasen des Typs 2C in der Negativregulation von streßaktivierten Signaltransduktionskaskaden, so daß auch für die *PP2C* aus Kartoffel eine regulatorische Funktion in der Streßantwort denkbar wäre. Für eine

Rolle in der Signaltransduktion könnte die schnelle Transkriptakkumulation nach Verwundung sprechen.

Neben ihrer Funktion in der streßaktivierten Signaltransduktion sind Proteinphosphatasen des Typs 2C aber auch an der Regulationentwicklungsspezifischer Prozesse beteiligt [215, 218].

Aufschluß darüber könnte die funktionelle Analyse transgener Kartoffelpflanzen bilden, die mit dem Gen in sense- und antisense-Orientierung transformiert worden sind bzw. die Expression des rekombinanten Proteins in *E. coli* und die anschließende biochemische Charakterisierung des Enzyms.

#### 4.3 Das *ELH*, ein Gen mit Homologie zu einem ELIP-Homologen

Mit Hilfe des photosynthetischen Apparates wandeln Pflanzen Licht in chemische Energie um, die dann zur Fixierung von CO<sub>2</sub> und für Assimilationsreaktionen verwendet wird. Äußere Einflüsse wie Schwankungen in der Lichtintensität (Tag-Nacht-Rhythmik, jahreszeitliche Schwankungen), Kälte, Trockenheit sowie Nährstoffmangel, die zu einer Limitierung der CO<sub>2</sub>-Fixierung führen, haben oft die Absorption größerer Lichtmengen zur Folge als letztendlich zur Photosynthese verwendet werden können. So entstehen reaktive Intermediate, die den photosynthetischen Komplex schädigen [229]. Zum Schutz vor diesen photooxidativen Defekten dienen verschiedene Mechanismen wie Antioxidantien, Wiederherstellung zerstörter reaktiver Zentren des Photosystems sowie die Verteilung und Ableitung überschüssiger Elektronen in Form von Wärme und Fluoreszenz. Eine wichtige Rolle dabei spielen die „Early light induced proteins“ (ELIPs).

ELIPs sind kernkodierte Proteine, deren Vorstufen im Cytoplasma synthetisiert werden und die nach Modifizierung (Abspaltung der Transitpeptide) in die Thylakoidmembran der Chloroplasten integriert werden. Sie werden bei Lichteinwirkung auf etioliierte Keimlinge, unter Lichtstreß und unter verschiedenen anderen Streßzuständen in ausgewachsenen Pflanzen gebildet. Sie besitzen strukturelle Ähnlichkeiten zu den „Light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins“ der Photosysteme I und II und binden an Pigmente wie Chlorophyll und Lutein [230, 231]. Entwicklungsgeschichtlich stammen sie von den „High light induced proteins“ (HLIP's) der Cyanobakterien ab [232]. ELIPs und ELIP-Homologe sind für verschiedenartige Pflanzen beschrieben worden, so z. B. für Erbse [231, 233, 234]], Gerste [235], Weizen [179], Sonnenblume [236], *Arabidopsis* [237], *Craterostigma plantagineum* [238] und kürzlich für Tabak [239].

Mittels DDRT-PCR wurde aus Kartoffel ein Fragment identifiziert und isoliert, das 36 h nach *Psm*-Infiltration in den unbehandelten Blättern verstärkt auftrat. Das korrespondierende Gen wurde aufgrund seiner Sequenzähnlichkeiten mit *ELH* (ELIP-Homolog) bezeichnet und näher charakterisiert.

Aus einer cDNA-Bibliothek wurde ein Gesamtlängenklon isoliert, der sowohl auf Nukleotid- als auch Proteinebene signifikante Homologien zu einem putativen Protein aus *A. thaliana* aufweist. Diese beiden Proteine aus Kartoffel und *Arabidopsis* weisen in ihren N-terminalen Regionen Homologien zur C-terminalen Region eines weiteren *Arabidopsis*-Proteins auf. Dieses zweite *Arabidopsis*-Protein wird als ELIP-Homolog bezeichnet, da es in seinem N-Terminus Sequenzhomologien zu ELIPs aufweist. Allerdings fehlen sowohl dem *Arabidopsis*-, als auch dem Kartoffelprotein die für ELIPs typischen Sequenzen einschließlich der

Transitpeptide für die Chloroplastenlokalisierung [240], so daß es sich bei dem aus Kartoffel identifizierten Gen wahrscheinlich nicht um ein *ELIP* handelt.

In Northern-Blot-Analysen wurde gezeigt, daß es sich beim *ELH* um ein streßinduziertes, aber nicht pathogeninduziertes Gen handelt. Die Pathogenresponsivität wurde in mit *Psm* infiltrierten und darüberliegenden nichtinfiltrierten Blättern von Kartoffel untersucht. Obwohl die cDNA aus einer pathogeninduzierten cDNA-Bank isoliert worden ist, wurde in mehreren Experimenten keine reproduzierbare Induzierbarkeit durch Pathogene festgestellt (s. Abbildung 4). Diese ist bisher auch nicht für *ELIPs* beschrieben worden.

Der Einfluß von Phytohormonen und chemischen Signalsubstanzen, die in der pflanzlichen Pathogen-, Wund- bzw. Streßantwort von Bedeutung sind, ist in abgetrennten Blättern untersucht worden (s. Abbildung 9). Weder die Behandlung der Kontrollblätter mit Wasser noch die Behandlung mit Saccharose sowie verschiedenen Konzentrationen Methyljasmonat bzw. Salicylsäure führten zur Induktion des *ELH*. Aus der Literatur sind mehrere durch Abscisinsäure induzierbare *ELIPs* bekannt, sie wurden in Sonnenblume [236], *C. plantagineum* [241], Gerste [178] und Weizen [179] identifiziert. Auch das aus Kartoffel isolierte *ELH* wird durch ABA-Behandlung induziert. Ebenso führt die Applikation von Arachidonsäure zu einem leichten Anstieg der mRNA-Transkripte, was aus der Literatur nicht bekannt ist.

Eine schnelle Induktion des *ELH* aus Kartoffel wurde nach Verwundung gefunden (s. Abbildung 12). Die Wundinduzierbarkeit wurde auch für verschiedene *ELIPs* und *SEPs* (stress-enhanced proteins) in *Arabidopsis* untersucht [237]. Hier wurde keine Induktion nach Verwundung festgestellt, wobei nur ein Zeitpunkt (zwei Stunden nach Verwundung) ausgewählt wurde, während unsere Untersuchungen erst 3 Stunden nach Verwundung begannen und sich über einen Zeitraum bis 24 Stunden erstreckten.

Im Unterschied zu *ELIPs* anderer Spezies [176, 178, 235] bzw. zum *ELIP*-Homologen aus *C. plantagineum* [238] konnten in Kartoffel nach Lichtstreß keine erhöhten *ELH*-Transkriptmengen detektiert werden (s. Abbildung 13). Allerdings ist bekannt, daß die Induzierbarkeit der verschiedenen *ELIPs* in starkem Maße von der Dauer und Intensität der Bestrahlung abhängig ist. So akkumulieren *ELIP*-Transkripte aus *Arabidopsis* und Gerste zwar bereits drei bzw. vier Stunden nach Beginn der Lichtexposition, aber bei einer weitaus höheren als den bei unseren Experimenten verwendeten Strahlungsintensitäten [235]. Für ein weiteres *ELIP*-Homolog aus *Arabidopsis* wurden erhöhte Transkriptmengen 24 Stunden nach Lichtstreß detektiert [176, 178]. Unsere Versuchspflanzen wurden dagegen nur acht Stunden erhöhter Bestrahlung ausgesetzt. Es sind aber auch *ELIPs* bekannt, die beispielsweise allein durch Kälte und nicht notwendigerweise durch hohe Lichtintensitäten induziert werden [179]. Es ist also nicht auszuschließen, daß es sich auch im Falle des *ELH* aus Kartoffel um ein streß- aber nicht lichtinduziertes Gen handelt oder aber unpassende Versuchsbedingungen in Bezug auf Strahlungsintensität und –dauer gewählt wurden, um die lichtabhängige Induzierbarkeit zu untersuchen.

Das *ELH* ist nicht durch Pathogene, aber durch verschiedene andere Stressoren induzierbar, weshalb weiterführende Untersuchungen lohnend sein könnten. Ausgehend von den durchgeführten Experimenten zur Induzierbarkeit des *ELH* durch Lichtstreß wären detailliertere Versuche in Bezug auf Lichtintensität und Dauer der Bestrahlung sowie zur diurnalen Rhythmik der Expression, die für ein *ELIP* aus *Arabidopsis* gezeigt wurde [176], nötig. Daraus könnten Schlüsse über eine Funktion entweder unter Lichtstreß oder in Anpassungssituationen gezogen werden.

Die organspezifische Expressionsanalyse zeigte erhöhte Transkriptmengen in Blüten und älteren Blättern (s. Abbildung 14). In *C. plantagineum* wurde mit Hilfe polyklonaler Antikörper ein ELIP-ähnliches Protein (DSP-22) in ausgetrockneten Blättern und in Samen detektiert [238], dessen korrespondierendes Gen durch Abscisinsäure und Licht reguliert wird.

Eine unterschiedlich starke Akkumulation von ELIP-mRNA-Transkripten innerhalb eines Blattes, wie sie für Gerste gefunden wurde [178] bzw. die Induzierbarkeit von *ELIPs* durch Austrocknung, wie sie für Sonnenblume und *C. plantagineum* gefunden wurden [236, 241], wurden bisher nicht untersucht.

Bislang ist für ELIPs bzw. ELIP-Homologe höherer Pflanzen keine konkrete Funktion bekannt. Von Montané *et al.* werden zwei Möglichkeiten ihrer Funktion diskutiert [232]: Bei einem Elektronenüberschuß, der durch einen blockierten Elektronenfluß im Photosystem (hervorgerufen durch Lichtstreß oder niedrige Temperatur) entsteht, können die ELIPs durch Verteilung der Energie die photosynthetischen Pigmente vor Photooxidation schützen. Diese Schutzfunktion aufgrund des Ausgleichs der Energiebalance wird von weiteren Autoren postuliert [176, 231, 242,]. Die zweite Funktion von ELIPs könnte im Schutz von Photosynthesepigmenten während der Adaption an veränderte Umweltbedingungen bestehen. Ein Beispiel hierfür sind Austrocknung und Rehydratation von *C. plantagineum*, wobei das ELIP-Homolog DSP22 Pigment-stabilisierend wirkt, bis sich die Chloroplasten strukturell und funktionell reorganisiert haben [241, **Fehler! Textmarke nicht definiert.**].

Beim *ELH* aus Kartoffel handelt es sich wahrscheinlich nicht um ein ELIP-Homolog, dennoch könnte man aufgrund der Expression unter verschiedenen Streßbedingungen, nicht aber unter erhöhter Lichteinwirkung, eine Funktion in der Anpassung an Streßsituationen postulieren.

#### 4.4 Die *PPP*, ein Gen mit Homologie zu einer Phosphatmangel-induzierten sauren Phosphatase

Phosphor spielt als anorganisches Phosphatanion oder als Organophosphat in Nucleinsäuren, Phospholipiden oder Phosphoestern gebunden, eine außerordentliche Rolle in der pflanzlichen Zelle, so als Substrat bzw. regulatorischer Faktor der Photosynthese, als Regulator von Enzymaktivitäten (Phosphorylierung und Dephosphorylierung) und als Teil von Signaltransduktionsketten [243]. Er wird von Pflanzen hauptsächlich in seiner anorganischen Form aus dem Boden aufgenommen. Das geschieht in einem aktiven Transportmechanismus entgegen des Konzentrationsgefälles. Vermutet werden hochaffine, protonengekoppelte Transporter, die durch die internen Phosphatpools der Vakuolen reguliert werden. Da anorganisches Phosphat im Gegensatz zu den anderen Nährstoffen im Boden häufig nicht in ausreichenden Mengen verfügbar ist (Komplexierung an Aluminium oder organisch gebunden [244]) und es auch unter verschiedenen Streßbedingungen zu Phosphatmangel kommen kann, haben Pflanzen verschiedene Mechanismen entwickelt, um die Phosphataufnahme zu steigern bzw. pflanzeninternes Phosphat zu mobilisieren [245]. Dazu gehören beispielsweise die Vergrößerung der Wurzeloberfläche oder die Mykorrhizierung als Anpassungsmechanismen an Phosphatmangel [246]. Die vom pflanzlichen Phosphatspiegel bestimmte Ausbildung einer symbiontischen arbuskulären Mykorrhiza trägt entscheidend zur Nährstoffbalance einer Pflanze bei: während die Pflanze den Pilz mit Zuckern versorgt, liefert dieser an die Pflanze Phosphat und andere Nährstoffe

[247]. Für Zwiebel konnte beispielsweise gezeigt werden, daß die unter Phosphatmangel von den Wurzeln abgegebenen Exudate die Bildung der arbuskulären Mykorrhiza stimulieren [248]. Bekannt sind aber auch von den Wurzeln in die Rhizosphäre sekretierte Nukleasen [249, 250, 251, 252], die die Verwertung von Phosphat aus Nukleinsäuren gewährleisten und sekretierte saure Phosphatasen, die anorganisches Phosphat aus organischem Material freisetzen [253]. Ein solches die Phosphathomöostase regulierendes Element ist das aus Hefe bekannte PHO-Regulon, das zahlreiche, von Phosphat coreguliert Gene wie Phosphattransporter (z. B. *PHO84*) und Phosphatasen (z. B. *PHO5*) enthält [254]. Auch in Pflanzen wurden Phosphatmangel-induzierte Gene mit Sequenzhomologien zu Genen des PHO-Regulons identifiziert [255].

Die Phosphattransporter sind relativ gut charakterisiert [256, 257, 258]. Die aus Pflanzen Pilzen und Hefe bekannten Phosphattransporter zeigen signifikante strukturelle Ähnlichkeiten: 12 membranständige Domänen, die durch eine große hydrophile Region in zwei Gruppen geteilt sind [255].

Im Gegensatz dazu ist über die Phosphatasen weniger bekannt. Das liegt offenbar an der großen Heterogenität dieser Enzymfamilie [259]. Man unterscheidet prinzipiell basische (substratspezifisch, z. B. Fructose-1,6-bisphosphatase) und saure Phosphatasen, die geringere Substratspezifitäten aufweisen. Die sauren Phosphatasen werden wiederum in extra- und intrazelluläre Phosphatasen unterteilt, wobei die extrazellulären in der Zellwand von Wurzeln lokalisiert sein können oder in die Rhizosphäre sekretiert werden können. Intrazelluläre saure Phosphatasen findet man dagegen nicht organspezifisch, sondern in allen Pflanzenteilen vornehmlich, aber nicht ausschließlich, in den Vakuolen. Für einige Phosphatasen sind Funktionen bekannt, so u. a. für die Phytasen und die Phosphoenolpyruvatphosphatase PEP [259]. Andere saure Phosphatasen zeigen Ähnlichkeiten zu den sogenannten "purple acid phosphatases", insbesondere zu den sauren Phosphatasen Typ 5 aus Säugetieren, deren Farbigkeit von Metallionen hervorgerufen wird [259]. Die unterschiedlichen Typen der sauren Phosphatasen weisen z. T. deutliche Unterschiede in ihren Expressionsmustern auf, und es werden verschiedenartige Funktionen postuliert.

Sequenzvergleiche erbrachten, daß es in Mensch, Hefe und in verschiedenen Bakterienarten mindestens neun Phosphatasen bzw. Phosphomutasen gibt, die in ihren N-Termini das hochkonservierte Motiv „DXDXT“ aufweisen [184]. Dazu zählen verschiedene Phosphatasen (z. B. Phosphoserinphosphatasen), ATPasen des P-Typs und die HADs (L-2-Haloacid dehalogenases) [260]. Dieses Motiv gilt als intermediärer Phosphatazeptor, wobei mit Hilfe von Mutationen gezeigt werden konnte, daß das erste Aspartat phosphoryliert wird [184]. Eine weitere konservierte Domäne von Phosphatasen, nicht aber der Phosphomutasen, ist das Motiv „GDGXXD“ [183].

Mit Hilfe des cDNA-AFLP wurde aus Kartoffel ein Fragment identifiziert und isoliert, das eine Länge von 331 nt hat und 12 h nach *Psm*-Infiltration von Kartoffelpflanzen in behandelten Blättern verstärkt auftrat. Aufgrund von Sequenzhomologien wurde das korrespondierende Gen mit *PPP* (potato putative phosphatase) bezeichnet und näher charakterisiert. Für Kartoffel wurde bisher kein Gen einer sauren Phosphatase beschrieben, das nach Pathogenbehandlung und unter verschiedenen Streßbedingungen exprimiert wird.

Aus einer cDNA-Bank wurden zwei Klone isoliert, aus denen ein Gesamtlängenklon zusammengesetzt werden konnte. Er besitzt ein potentiell Start- und ein Stopcodon und zeigt auf Nukleotidebene 92 % bzw. auf Proteinebene 90 % Identität zu einer Phosphatmangel-induzierten sauren Phosphatase aus Tomate (*LepS2*; [182]), die nach der Beendigung der eigenen praktischen Arbeiten veröffentlicht wurde. Die in Northern-Blot-Analysen detektierte Größe der mRNA von ca. 1 kb korreliert mit der Länge der cDNA. Die abgeleitete Aminosäuresequenz der *PPP* besitzt die beiden konservierten Domänen der HADs (L-2-Haloacid dehalogenases) und der P-Typ-ATPasen. Da ihr aber sowohl Transmembrandomänen als auch N-terminale Transitpeptide fehlen, handelt es sich wahrscheinlich weder um eine ATPase des Typs P, noch um einen Phosphattransporter oder eine extern wirkende Phosphatase.

Die Southern-Blot-Analyse ergab, daß die *PPP* zu einer Multigenfamilie gehört. Dagegen werden zahlreiche andere saure Phosphatasen, u. a. *LepS2* [182] und eine Phosphoserin-Phosphatase (*PSP*) aus *Arabidopsis* [261], von kleinen Genfamilien repräsentiert. Das Screenen einer genomischen Bibliothek und die Charakterisierung der Klone würden zur Aufklärung der genomischen Organisation der Genfamilie beitragen.

Northern-Blot-Analysen zeigen die transkriptionelle Regulierung der *PPP*. Die Pathogenresponsivität wurde in mit *Psm* infiltrierten und darüberliegenden nichtinfiltrierten Blättern von Kartoffel untersucht. Es konnte in mehreren Experimenten eine differentielle Transkriptakkumulation des korrespondierenden Gens sowohl in infiltrierten als auch darüberliegenden nichtinfiltrierten Blättern gezeigt werden (s. Abbildung 6). Auch die Behandlung mit einer Sporensuspension von *P. infestans* führt zur Akkumulation von *PPP*-Transkripten, die in diesem Fall auf behandelte Blätter begrenzt bleibt (s. Abbildung 8). Daraus kann eine generelle Induzierbarkeit durch Pathogene abgeleitet werden, die aber bisher nicht für saure Phosphatasen in Pflanzen beschrieben ist.

Bekannt ist dagegen, daß einige Phosphatmangel-induzierte saure Phosphatasen entwicklungspezifisch und unter verschiedenen Streßbedingungen akkumulieren [259]. Deshalb wurde der Einfluß von Phytohormonen und chemischen Signalsubstanzen, die in der pflanzlichen Pathogen-, Wund- bzw. Streßantwort von Bedeutung sind, in abgetrennten Blättern untersucht (s. Abbildung 9). Das Abtrennen der Blätter und die Inkubation in Wasser führte hierbei bereits zu erhöhten *PPP*-Transkriptmengen. Dies könnte durch rasche Kallosebildung an der Schnittfläche und damit veränderte „source-sink-Bedingungen“ hervorgerufen worden sein [262, 263]. Eine Zuckerresponsivität wurde ebenso für ein Gen einer sauren Phosphatase aus *Arabidopsis Atvsp* [264] und die Gene für zwei Sojabohnenspeicherproteine *VSPa* und *VSPb* [265] gefunden.

Weder die Applikation von Salicylsäure noch von Methyljasmonat führt zu einer deutlichen *PPP*-Transkriptakkumulation in Kartoffel. Ähnliche Ergebnisse wurden für eine *Arabidopsis*-Phosphatase gefunden: diese ist nicht durch Jasmonat induzierbar, eine salicylsäureabhängige Induzierbarkeit ist noch nicht vollständig geklärt [266]. Dagegen akkumulieren die Transkripte der Gene für Speicherproteine aus Sojabohne und *Arabidopsis* (*VSPa*, *VSPb* und *Atvsp*) nach Methyljasmonatbehandlung [264, 267]. Eine andere *Arabidopsis*-Phosphatase, die durch Phosphatmangel, aber nicht durch Jasmonat bzw. Salicylsäure induzierbar ist, ist eine saure Phosphatase Typ 5 (*AtACP5* [268]). Deren Transkripte akkumulieren jedoch nach Abscisinsäurebehandlung, was für Kartoffel nicht

gefunden wurde. Auch Arachidonsäure induziert die *PPP*-Transkriptakkumulation nicht. Für die Induktion saurer Phosphatasen durch Elicitoren ist aus der Literatur kein Beispiel bekannt.

Der Einfluß von UV- Bestrahlung auf die Expression von Phosphatasen wurde bislang nicht gezeigt. In Kartoffel wurde eine UV-induzierte Transkriptakkumulation gefunden. Lediglich in *Arabidopsis* wurde gezeigt, daß *Atvsp* durch ein Zusammenspiel von Licht, Methyljasmonat und Saccharose induziert wird [264].

Eine eindeutige Wundresponsivität konnte für die *PPP* nicht gezeigt werden (s. Abbildung 12). Aus der Literatur sind sowohl wundinduzierte saure Phosphatasen [264, 267], als auch solche, die nicht durch Verwundung induzierbar sind, bekannt [268].

Aus diesen Ergebnissen kann man postulieren, daß es sich bei der *PPP* aus Kartoffel um eine durch Pathogene und wenige Stressoren induzierbare saure Phosphatase handelt. Die Responsivität der *PPP* aus Kartoffel auf Phosphatmangel, wie sie für alle oben genannten sauren Phosphatasen gefunden wurde, wird derzeit untersucht.

Zur weiteren molekularbiologischen Charakterisierung des Gens wären Expressionsanalysen nach osmotischem Streß, Trockenheit, niedrigen Temperaturen und unter Mangel verschiedener Nährstoffe sinnvoll. Zusätzlich zu den Expressionsanalysen tragen Promotoranalysen zur Identifizierung eventuell vorhandener regulatorischer Elemente bei, so daß Signaltransduktionswege, die die Phosphataseaktivität beeinflussen, abgeleitet werden können.

Die organspezifische Analyse zeigt gering erhöhte Transkriptmengen in Wurzeln. Durch Messung der Phosphataseaktivitäten in Wurzeln von Indischem Senf [266] und Kohl [269] konnte gezeigt werden, daß die Enzymaktivität unter Phosphatmangel stark ansteigt. Es sind aber auch Phosphatasen bekannt, die nicht wurzelspezifisch exprimiert werden. So akkumulieren Transkripte der *Atvsp* und der sauren Phosphatase Typ 5 *AtACP5*, ebenfalls aus *Arabidopsis*, in Blüten und Knospen [264] bzw. in Blüten und alten Blättern [268].

Zur funktionellen Charakterisierung des Proteins wurde die cDNA der *PPP* in *E. coli* exprimiert. Sequenz- und Restriktionsanalysen zeigten die Vollständigkeit der cDNA und die Einfügung ins Leseraster des Klonierungsvektors pRSET A. Sowohl in mit IPTG versetzten als auch ohne IPTG wachsenden Bakterienkulturen akkumuliert ein Protein von etwa 32 kDa (s. Abbildung 26). Das stimmt mit dem theoretisch errechneten Molekulargewicht der abgeleiteten Peptidsequenz und dem Molekulargewicht des gereinigten rekombinanten Proteins aus Tomate (LePS2) überein. Mit Hilfe des Anti-His-Antikörpers, der den Histidin-Anker des Fusionsproteins detektiert, konnte kein rekombinantes Protein identifiziert werden. LepS2 aus Tomate wurde nach der Expression in *E. coli* und Aufreinigung mit Hilfe des N-terminalen Histidin-Ankers sowohl in der löslichen Fraktion als auch in inclusion bodies gefunden [182]. Die alleinige Aufarbeitung der Überstände der mit der *PPP*-cDNA transformierten *E. coli*-Kulturen führte jedoch nicht zur Anreicherung und Aufreinigung des rekombinanten Proteins. Aus diesem Grund konnte auch keine Phosphatase-Aktivität bestimmt und das rekombinante Protein damit als saure Phosphatase nachgewiesen werden. Eine Untersuchung der Phosphatase-Aktivitäten in Überständen von Bakterien, die mit der *PPP*-cDNA transformiert waren und von Kontrollkulturen erbrachte aufgrund hoher Hintergrundaktivität keine signifikanten Unterschiede in der Phosphataseaktivität gegenüber dem synthetischen Substrat p-Nitrophenylphosphat (Anja Grohnert, persönliche Mitteilung).

Nach Erhalt, Reinigung und Konzentrierung des rekombinanten Proteins könnten Untersuchungen zur Stabilität, Substratspezifität, Ionenabhängigkeit, der Erfordernis von Cofaktoren und zur Inhibierbarkeit des Enzyms durchgeführt werden. Weitere Enzymcharakteristika wären die Bestimmung des  $K_m$ -Wertes, von  $v_{max}$ , des isoelektrischen Punktes und des pH-Optimums. Nach Generierung von spezifischen Antikörpern kann eine Korrelationen zwischen der *PPP*-Transkriptakkumulation und dem Auftreten des Proteins in verschiedenen Geweben und nach unterschiedlichen Behandlungsarten hergestellt werden.

Für die verschiedenen intrazellulären sauren Phosphatasen werden unterschiedliche Funktionen postuliert. Sie spielen in entwicklungspezifischen Prozessen und bei Umweltstreß, beides verbunden mit Phosphatlimitierung, eine Rolle [259]. So wird den Proteinen Atvsp, VSP $\alpha$  und VSP $\beta$  aufgrund ihrer Phosphataseaktivität nicht nur eine Speicherfunktion zuerkannt, sondern auch eine Bedeutung bei Wachstumsprozessen in apikalem Gewebe [264, 265]. Auch für eine weitere Phosphatase aus *Arabidopsis* wird eine Doppelfunktion postuliert: die Peroxidaseaktivität spricht für eine Bedeutung in metabolischen Prozessen, die Phosphataseaktivität dagegen für eine Beteiligung an der Phosphatmobilisierung im altersbedingten Geschehen [268]. Ebenso wird für eine saure Phosphatase aus Bohne eine Funktion in der Phosphatmobilisierung und nicht bei der Anpassung an Phosphatmangel angenommen [270]. Dabei kommt es vermutlich zu einer Remobilisierung des Phosphates aus metabolisch weniger aktivem Gewebe und aus Vakuolen in metabolisch hochaktives junges Gewebe.

Aufgrund ähnlicher Expressionmuster der *PPP* und der o. g. intrazellulären sauren Phosphatasen kann man eine Funktion der *PPP* in metabolischen und/oder phosphatmobilisierenden Prozessen vermuten. Da die höchsten *PPP*-Transkriptmengen in Wurzeln und nicht, wie in Bohne, in Blättern gefunden wurden, könnte es sich bei der *PPP* um ein Gen handeln, das an der Adaption an einen niedrigen Phosphatspiegel beteiligt ist.

Ein Phosphatmangel könnte durch einen Pathogenbefall hervorgerufen werden. Biotrophe pathogene Pilze entziehen über spezielle Organe, die in der Wirtszelle lokalisierten Haustorien, der Pflanze Zucker, Aminosäuren und andere Nährstoffe. Dabei müssen die Substanzen die verschiedenen Wand- und Membranstrukturen der Haustorien überwinden [271]. Hierzu dienen spezifische Transporter: kürzlich wurde aus Haustorien von *Uromyces fabae*, einem Bohnenpathogen, das Gen eines Hexosetransporters *HXT1* identifiziert und erstmalig der Zuckertransport von der Wirtspflanze zum Pilz gezeigt [272]. Ein putativer Aminosäuretransporter *PIG2* ist schon länger bekannt [273, 274]. Ein solcher durch Pathogene hervorgerufener Nährstoff- und speziell Phosphatmangel könnte also zur Induktion der *PPP* führen.

Die Expression eines Gens im homologen bzw. heterologen System kann durch Veränderung des Phänotyps der Pflanze oder durch veränderte Reaktionen auf Pathogene und verschiedene Streßsituationen Rückschlüsse auf die Funktion des Gens bzw. des Genproduktes zulassen. Dabei kann die Einführung des Transgens in sense- oder antisense-Orientierung erfolgen. Im zweiten Fall kommt es zur Geninaktivierung durch Bildung doppelsträngiger Hybride von inserierter antisense- und endogener RNA [275]. Auch im ersten Fall kann es zu Wechselwirkungen zwischen der sense- und der korrespondierenden endogenen RNA kommen. Dieser Vorgang wird als Cosuppression bezeichnet und kann ebenfalls zur Geninaktivierung führen [276].

Zur Erzeugung transgener Pflanzen wurde die *PPP* ins Genom von Kartoffel (homologes System) und Tabak (heterologes System) integriert. Dabei erfolgte die Transformation von Kartoffelpflanzen mit dem Gen sowohl in sense- als auch in antisense-Orientierung. Tabakpflanzen wurden mit der *PPP* in sense-Orientierung transformiert. Weder die transgenen Kartoffelpflanzen noch die Tabakpflanzen wiesen unter den gegebenen Anzuchtbedingungen einen veränderten Phänotyp auf. Möglicherweise wären phänotypische Veränderungen bei Anzucht in einem phosphatarmen Medium sichtbar geworden, denn transgene Tabakpflanzen, die allein eine bakterielle Citratsynthase exprimieren und damit größere Mengen Citrat produzieren und sekretieren, zeigen eine bessere Anpassung an Phosphatmangel im Boden [277].

In einem ersten Versuch wurde überprüft, ob es zu Unterschieden in der Pathogenantwort kommt. 24 Stunden nach der Pathogenbehandlung gab es keine Differenzen in der Ausprägung der Läsionen (s. Abbildung 30). Die Northern-Blot-Analysen ergaben keine klaren Aussagen einer pathogeninduzierten Transkriptakkumulation (s. Abbildung 31 A). Dabei fällt auf, daß Pflanzen, die in der Southern-Blot-Analyse ein starkes Signal aufwiesen, in der Northern-Blot-Analyse nach Pathogenbehandlung keinerlei Signal zeigten. Dieses Phänomen könnte durch Cosuppression hervorgerufen worden sein. Dabei kann es in Abhängigkeit von der Kopienzahl des Transgens zu Wechselwirkungen mit der endogenen RNA bzw. DNA kommen. Das wiederum löst unterschiedliche Reaktionen wie z. B. Methylierungsreaktionen aus, die letztendlich zum Abbau der RNA und damit zu einer transkriptionellen Repression des Gens führen [278, 279]. Vor allem unter Kontrolle eines starken Promotors kann es zur Erhöhung der Kopienzahl des Transgens und damit zu so starker Cosuppression kommen, daß diese Technik als Alternative zur antisense-Technologie angesehen werden kann [280]. In mit Bakterien infiltrierten und darüberliegenden nichtinfiltrierten Blättern von Pflanzen, die mit der *PPP* in antisense-Orientierung transformiert wurden, konnten in einigen Pflanzen keine *PPP*-Transkripte detektiert werden (s. Abbildung 31 B). Das könnte dafür sprechen, daß endogene sense- und transgene antisense-RNA doppelsträngige Hybride gebildet haben, die in der Northern-Blot-Analyse nicht mehr sichtbar werden. Damit besteht größtenteils Übereinstimmung mit der Southern-Blot-Analyse, in der für fast alle kanamycinresistenten Pflanzen Signale detektiert wurden, die vom Transgen stammen können. Damit ist die Suppression der *PPP* erklärbar.

Zur weiteren funktionellen Analyse und zur Aufklärung der physiologischen Rolle der putativen Phosphatase sollten die Untersuchungen an transgenen Pflanzen fortgesetzt werden. Wichtig wäre hierbei zunächst eine Untersuchung der Pflanzen nach Anzucht unter Phosphatmangelbedingungen. Damit könnte geklärt werden, ob es sich bei der putativen sauren Phosphatase aus Kartoffel um ein Enzym handelt, das an der Adaption an einen niedrigen externen Phosphatspiegel beteiligt ist oder eine Rolle in der Phosphatremobilisierung spielt.

## 5 Zusammenfassung

Pflanzen sind naturgemäß einer Vielzahl von potentiellen Pathogenen und anderen schädigenden Umwelteinflüssen ausgesetzt, gegen die sie sich u. a. durch die Aktivierung effizienter Abwehrmechanismen wehren. Eine Pflanze-Pathogen-Interaktion mit weitreichenden wirtschaftlichen Folgen ist die Interaktion zwischen Kartoffel und dem Oomyzeten *Phytophthora infestans*. In bereits bekannten Untersuchungen wurde gezeigt, daß eine lokal begrenzte Infektion entweder mit *P. infestans* oder dem *Brassica*-Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* zu einer erhöhten Resistenz der ganzen Pflanze bei einer nachfolgenden Infektion mit virulenten Rassen von *P. infestans* führt. Dieses als systemisch erworbene Resistenz (SAR) bezeichnete Phänomen geht mit der Aktivierung verschiedener Abwehrgene einher [138,140, 141]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Gene aus Kartoffel identifiziert und charakterisiert, die nach Infiltration mit dem Nichtwirts-Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* differentiell exprimiert erschienen. Dabei war das Hauptaugenmerk darauf gerichtet, früh induzierte Gene zu identifizieren, die möglicherweise an der Etablierung der SAR beteiligt sind.

Mit Hilfe der Techniken des „mRNA-Differential Display“ und cDNA-AFLP wurden zahlreiche differentiell auftretende cDNA-Fragmente isoliert und kloniert. Für die Mehrzahl der identifizierten Gene ließ sich in Northern-Blot-Analysen keine Transkriptakkumulation nach Pathogenbehandlung nachweisen. Darüber hinaus wurden aber auch Fragmente isoliert, deren korrespondierende Gene Sequenzhomologien zu bekannten *PR*-Genen aufwiesen: ein Gen mit Ähnlichkeiten zu einer Glucanase aus *L. esculentum*, ein Osmotin-ähnliches Gen aus *S. commersonii*, ein Gen mit Sequenzähnlichkeiten zu einer *PAL* aus *N. tabacum* sowie ein weiteres mit Homologien zu einem Calmodulin aus *Ph. vulgaris*.

Aufgrund ihrer Homologien zu bekannten Sequenzen aus Datenbanken wurden drei weitere der identifizierten Gene näher charakterisiert: ein Sequenzhomologes verschiedener Proteinphosphatasen des Typs 2C, genannt *PP2C*, ein Gen mit Sequenzähnlichkeit zu einem ELIP-Homologen aus *A. thaliana*, genannt *ELH* und ein zu einer Phosphatmangel-induzierten sauren Phosphatase aus Tomate ähnliches Gen, mit *PPP* (potato putative phosphatase) bezeichnet.

Ein partieller cDNA-Klon der *PP2C* wurde durch Screenen einer cDNA-Bibliothek mit einem der „Differential Display“ Fragmente erhalten. Die Sequenz weist signifikante Homologien zu Proteinphosphatasen des Typs 2C unterschiedlicher Spezies auf. Aus Northern-Blot-Analysen und semiquantitativer RT-PCR ging keine reproduzierbare Pathogenresponsivität hervor. In abgetrennten Blättern führten bereits das Abschneiden und die Inkubation in Wasser zur Induktion der *PP2C*. Die Inkubation mit Saccharose, Methyljasmonat, Salicylsäure, Arachidonsäure und Abscisinsäure bewirkte keine Induktion der Genexpression, wohingegen die Verwundung von Kartoffelblättern zur Akkumulation von *PP2C*-Transkripten führte. Die Southern-Blot-Analyse zeigte, daß die *PP2C* zu einer kleinen Genfamilie gehört. Die Funktion der *PP2C* könnte in der Negativregulation von streßaktivierten Signaltransduktionskaskaden liegen, wie sie auch für *PP2Cs* aus anderen Spezies bekannt ist.

Mittels Screenen einer genomischen Bank mit einem weiteren „Differential Display“ Fragment wurde das *ELH* isoliert; aus einer cDNA-Bibliothek wurde ein Gesamtlängenklon isoliert. Das *ELH* zeigt auf Nuklotid- und Proteinebene hohe Sequenzhomologien zu einem putativen Protein aus *Arabidopsis*, welches wiederum Ähnlichkeiten zu einem weiteren

*Arabidopsis*-Protein mit Sequenzhomologien zu verschiedenen Early Light Induced Proteins (ELIPs) in seinem N-Terminus aufweist. Auch für das *ELH* konnte keine Induktion durch Pathogene in Northern-Blot-Analysen und mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR gezeigt werden. Von den o. g. Phytohormonen und chemischen Signalmolekülen führten Abscisinsäure und Arachidonsäure zur *ELH*-Transkriptakkumulation in abgetrennten Blättern. Die Verwundung von Kartoffelblättern führte zu einer schnellen Induktion der Genexpression. Dagegen wurden nach UV-Bestrahlung keine erhöhten Transkriptmengen gefunden. Die Southern-Blot-Analyse zeigte, daß das *ELH* zu einer kleinen Genfamilie gehört. Für das *ELH* wäre aufgrund seines Expressionsmusters eine Funktion in der Anpassung an Streßsituationen denkbar.

Mit Hilfe der cDNA-AFLP-Technik wurde ein Fragment isoliert, dessen korrespondierendes Gen signifikante Sequenzhomologien zu Genen für verschiedene saure Phosphatasen aufweist. Das Screenen einer cDNA-Bank führte zur Isolierung mehrerer Klone, wobei aus zwei Klonen ein Gesamtlängenklon zusammengesetzt wurde. Dieser zeigt auf Nukleotid- und Proteinebene 92 bzw. 90 % Homologie zu einer Phosphatmangel-induzierten sauren Phosphatase aus Tomate und besitzt die konservierten Domänen saurer Phosphatasen. Die Pathogenresponsivität für dieses Gen wurde in Northern-Blot-Analysen nachgewiesen. So akkumulierten *PPP*-Transkripte nach Infiltration mit dem *Brassica*-Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* in infiltrierten als auch darüberliegenden nichtinfiltrierten Blättern sowie nach Inokulation des Oomyzeten *Phytophthora infestans* in den inokulierten Blättern. Die Inkubation abgetrennter Blätter in Wasser und Saccharose führte zu erhöhten *PPP*-Transkriptmengen. Weder Methyljasmonat, Salicylsäure, Arachidonsäure noch Abscisinsäure induzierten die Expression der *PPP*, ebensowenig wie die Infiltration von Systemin in Blätter von Ganzpflanzen. UV-Bestrahlung führte zu einer Transkriptakkumulation der *PPP*. In der Southern-Blot-Analyse wurde gezeigt, daß die *PPP* zu einer Multigenfamilie gehört.

Die kodierende Region der cDNA der putativen sauren Phosphatase wurde in *E. coli* exprimiert. Erste Versuche zur Isolierung und Reinigung des Fusionsproteins mit Hilfe des N-terminalen Histidin-Ankers sowie der Phosphataseaktivitätstest führten bisher zu keinem Ergebnis.

Zur funktionellen Analyse des Gens wurden Kartoffelpflanzen mit der putativen sauren Phosphatase in sense- und antisense-Orientierung sowie Tabakpflanzen mit dem Gen in sense-Orientierung transformiert. Weder die transgenen Kartoffel- noch die Tabakpflanzen wiesen einen veränderten Phänotyp im Vergleich zu Wildtyppflanzen auf. Die Infiltration des *Brassica*-Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* in die transgenen Kartoffelpflanzen führte zur Ausprägung von Läsionen wie in Wildtyppflanzen. Weiterführende Untersuchungen an den transgenen Pflanzen könnten zu einer Aufklärung der Funktion der putativen Phosphatase aus Kartoffel in der Pathogenabwehr beitragen.

## 6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Transkriptakkumulation von Chitinase A in Kartoffelblättern nach Infiltration mit <i>Psm</i> .....	36
Abbildung 2	Ausschnitt aus einem Polyacrylamidgel nach DDRT-PCR (Autoradiogramm) .....	38
Abbildung 3	Ausschnitt aus einem Polyacrylamidgel nach cDNA-AFLP (Autoradiogramm) .....	41
Abbildung 4	Transkriptakkumulation der <i>PP2C</i> in Kartoffelblättern nach <i>Psm</i> -Infiltration .....	43
Abbildung 5	Transkriptakkumulation des <i>ELH</i> in Kartoffelblättern nach <i>Psm</i> -Infiltration .....	44
Abbildung 6	Transkriptakkumulation des Fragmentes 9-1 mit Homologie zu einer Phosphatmangel-induzierten sauren Phosphatase aus <i>Lycopersicon esculentum</i> ( <i>PPP</i> ) in Kartoffelblättern nach Infiltration mit <i>Psm</i> in zwei ausgewählten Experimenten (A und B) .....	45
Abbildung 7	Transkriptakkumulation verschiedener Gene mit Homologien zu PR-Proteinen in Kartoffelblättern nach Infiltration mit <i>Psm</i> .....	47
Abbildung 8	Transkriptakkumulation der <i>PPP</i> in Kartoffelblättern nach Infektion mit einer Sporensuspension von <i>Phytophthora infestans</i> in zwei Experimenten (A und B) .....	49
Abbildung 9	Transkriptakkumulation von <i>PP2C</i> , <i>ELH</i> und <i>PPP</i> nach Applikation von Phytohormonen und Signalsubstanzen in abgetrennte Kartoffelblätter .....	51
Abbildung 10	Transkriptakkumulation der <i>PP2C</i> und des <i>ELH</i> in Kartoffelblättern nach Infiltration mit Arachidonsäure (2 mg/ml) .....	53
Abbildung 11	Transkriptakkumulation der <i>PPP</i> in Kartoffelblättern nach Applikation von Systeminlösungen in abgetrennte Kartoffelblätter .....	55
Abbildung 12	Transkriptakkumulation von <i>PP2C</i> , <i>ELH</i> und <i>PPP</i> in Kartoffelblättern nach Verwundung .....	56
Abbildung 13	Transkriptakkumulation des <i>ELH</i> und der <i>PPP</i> in Kartoffelblättern nach UV-Bestrahlung .....	58
Abbildung 14	Organspezifische Transkriptakkumulation von <i>PP2C</i> , <i>ELH</i> und <i>PPP</i> .....	59
Abbildung 15	Transkriptakkumulation der <i>PPP</i> in Kartoffelblättern nach Behandlung von <i>nahG</i> -Pflanzen mit <i>Psm</i> .....	60
Abbildung 16	Genomische Southern-Blot-Analyse des Gens mit Homologie zu einer Proteinphosphatase Typ 2C (A), des Gens mit Homologie zu einem <i>A. thaliana</i> ELIP-Homolog (B) und des Gens mit Homologie zu einer Phosphatmangel-induzierten sauren Phosphatase aus <i>L. esculentum</i> (C) .....	62
Abbildung 17	Schematische Darstellung des „Differential Display“ Fragmentes dd110 und des Fragmentes g110/7, das nach PCR mit genomischer DNA erhalten wurde .....	63
Abbildung 18	Schematische Darstellung der Struktur des genomischen Subklons 110/2-9 .....	64
Abbildung 19	Schematische Darstellung der Struktur des genomischen Subklons 903/2-6 .....	65
Abbildung 20	Schematische Darstellung eines Abschnitts auf dem <i>A. thaliana</i> -Chromosom 4, des genomischen Subklons 903/2-6 und der Sequenzhomologien untereinander bzw. zu anderen bekannten Sequenzen .....	65
Abbildung 21	Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des cDNA-Klons c110-2 im 5`-Bereich .....	67
Abbildung 22	Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des cDNA-Klons c110-2 im 3`-Bereich .....	68

Abbildung 23	Schematische Darstellung der Struktur der cDNA Klone .....	70
Abbildung 24	Nukleotidsequenz des Kartoffel-cDNA-Klons c903-3 ( <i>S. t.</i> ), abgeleitete Aminosäuresequenz und Vergleich zu einem hypothetischen Protein aus <i>A. thaliana</i> ( <i>A. t.</i> ).....	72
Abbildung 25	Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des zusammengesetzten Gesamtlängenklones F(A) gl-3.....	75
Abbildung 26	Expression der rekombinanten putativen Phosphatase in <i>E. coli</i> .....	77
Abbildung 27	Schematische Darstellung der sense-Konstruktion der putativen sauren Phosphatase im binären Vektor pBKTX .....	79
Abbildung 28	Schematische Darstellung der antisense-Konstruktion der putativen sauren Phosphatase im binären Vektor pBKTX.....	79
Abbildung 29	Southern-Blot-Analyse transgener Kartoffelpflanzen .....	80
Abbildung 30	Kartoffelpflanzen <i>S. tuberosum</i> L. cv. Désirée nach Inokulation mit <i>Psm</i> . 24 hpi .....	81
Abbildung 31	Transkriptakkumulation der <i>PPP</i> und der Chitinase A ( <i>CHTA</i> ) in Blättern transgener Kartoffelpflanzen nach Infiltration mit <i>Psm</i> .....	83
Abbildung 32	Expression der putativen sauren Phosphatase aus Kartoffel in Blättern von transgenen Tabakpflanzen <i>N. tabacum</i> SRI .....	85

- 
- 1 Cohn, J., Sessa, G. und Martin, G. B. (2001) Innate immunity in plants. *Curr Opin Immunol* 13: 55-62
  - 2 Nürnberger, Th. und Scheel, D. (2001) Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci* 6: 372-379
  - 3 Schöber, B. (1983) Die Kraut- und Braunfäule der Kartoffel. *KALI-BRIEFE (Büntehof)* 15: 397-403
  - 4 aus: Agrios, G. N. (1997) *Plant pathology*. Academic press, 4<sup>th</sup> edition
  - 5 Erwin, D. C. und Ribeyro, O. K. (1996) *Phytophthora – Diseases Worldwide*. APS Press; St. Paul, Minnesota, USA
  - 6 Strittmatter, G., Janssens, J., Opsomer, C. und Botterman, J. (1995) Inhibition of fungal disease development in plants by engineering controlled cell death. *Biotechnol* 13: 1085-1089
  - 7 Borkowska, M., Krzymowska, M., Talarczyk, A., Awan, M. F., Yakovleva, L., Kleczkowski, K. und Wielgat, B. (1998) Transgenic potato plants expressing soybean beta-1,3-endoglucanase gene exhibit an increased resistance to *Phytophthora infestans*. *Z Naturforsch [C]*, 53: 1012-1016.
  - 8 Melchers, L. S. und Stuijver, M. H. (2000) Novel genes for disease-resistance breeding. *Curr Opin Plant Biol* 3: 147–152
  - 9 Stuijver, M. H. und Custers, J. H. H. V. (2001) Engineering disease resistance in plants. *Nature* 411: 865-868
  - 10 Jackson, A. O. und Taylor, C. B. (1996) Plant-microbe interactions: life and death at the interface. *Plant Cell* 8: 1651-1668
  - 11 Dangl, J. D. und Jones, J. J. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-833
  - 12 Heath, M. C. (2000) Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr Opin Plant Biol* 3: 315–319
  - 13 Rausher, M. D. (2001) Co-evolution and plant resistance to natural enemies. *Nature* 411: 857-864
  - 14 Flor, H. H. (1971) Current status of gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol* 9: 275-296
  - 15 Ji, Ch., Smith-Becker, J. und Keen, N. T. (1998) Genetics of plant-pathogen interactions. *Curr Opin Biotechnol* 9: 202-207
  - 16 Somssich, I. E. und Hahlbrock, K. (1998) Pathogen defence in plants – a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci* 3: 86-90
  - 17 Hammond-Kosack, K. E. und Jones, J. D. G. (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773-1792
  - 18 Bent, A. F. (1996) Plant disease resistance genes: funktion meets structure. *Plant Cell* 8: 1757-1771
  - 19 De Wit, P. J. G. M. (1997) Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. *Trends Plant Sci*. 2: 452-458
  - 20 Bonas, U. und Van den Ackerveken, G. (1999) Gene-for-gene interactions: bacterial avirulence proteins specify plant disease resistance. *Curr Opin Microbiol* 2: 94-98
  - 21 Alfano, J. R. und Collmer A. (1997) The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J Bacteriol* 179: 5655-5662
  - 22 Staskawicz, B. J. (2001) Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. *Plant Physiol* 125: 73-76

- 
- 23 Jia, Y., Mc Adams, S. A., Bryan, G. T., Hershey, H. P. und Valent, B. (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J* 19: 4004-4014
- 24 Ellis, J. und Jones, D. (1998) Structure and function of proteins controlling strain-specific pathogen resistance in plants. *Curr Opin Plant Biol* 1: 288-293
- 25 Martin, G. M. (1999) Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors. *Curr Opin Plant Biol* 2: 273-279
- 26 Tang, X., Frederick, R. D., Zhou, J., Halterman, D. A., Jia, Y. und Martin, G. B. (1996) Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. *Science* 274: 2060-2063
- 27 Segura, A., Moreno, M., Madueño, F., Molina, A. und García-Olmedo, F. (1999) Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Mol Plant-Microbe Interact* 12: 16-23
- 28 Maleck, K. und Dietrich, R. A. (1999) Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? *Trends Plant Sci* 4: 215-219
- 29 Hildmann, Th., Ebnet, M., Peña-Cortés, H., Sánchez-Serrano, J. J., Willmitzer, L. und Prat, S. (1992) General roles of abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding. *Plant Cell* 4: 1157-1170
- 30 Dixon, R. A., Harrison, M. J. und Lamb, C. (1994) Early events in the activation of plant defense responses. *Annu Rev Phytopathol* 32: 479-501
- 31 Scheel, D. (1998) Resistance response physiology and signal transduction. *Curr Opin Plant Biol* 1: 305-310
- 32 Lam, E., Kato, N. und Lawton, M. (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411: 848-853
- 33 Kombrink, E. und Somssich, I. E. (1995) Pathogenesis-related proteins and plant defense. In *Plant Relationships*, 6 (Carroll, G. and Tudzynski, P., eds). Berlin: Springer-Verlag, 107-128
- 34 Beerhues L. und Kombrink E. (1994) Primary structure and expression of mRNAs encoding basic chitinase and 1,3-beta-glucanase in potato. *Plant Mol Biol* 24: 353-367
- 35 Joosten, M. H. A. J. und de Wit, P. J. G. M. (1989) Identification of several pathogenesis-related proteins in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) are 1,3- beta-glucanases and chitinases. *Plant Physiol* 89: 945-951
- 36 Ponstein, A. S., Bres-Vloemans, S. A., Sela-Buurlage, M. B., van den Elzen, P. J., Melchers, L.S. und Cornelissen, B. J. (1994) A novel pathogen- and wound-inducible tobacco (*Nicotiana tabacum*) protein with antifungal activity. *Plant Physiol* 104: 109-118
- 37 Jung, H. W. und Hwang, B. K. (2000) Isolation, partial sequencing, and expression of pathogenesis-related cDNA genes from pepper leaves infected by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Plant-Microbe Interact* 13: 136-142
- 38 Delp, G. und Palva, E. T. (1999) A novel flower-specific *Arabidopsis* gene related to both pathogen-induced and developmentally regulated plant  $\beta$ -1,3-glucanase genes. *Plant Mol Biol* 39: 565-575
- 39 Schlumbaum, A., Mauch, F., Vögeli, U. und Boller, Th. (1986) Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* 324: 365-367
- 40 Ancillo, G., Witte, B., Schmelzer, E. und Kombrink, E. (1999) A distinct member of the basic (class I) chitinase gene family in potato is specifically expressed in epidermal cells. *Plant Mol Biol* 39: 1137-1151
- 41 Ponath, Y., Vollberg, H., Hahlbrock, K. und Kombrink, E. (2000) Two differentially regulated class II chitinases from parsley. *Biol Chem* 381: 667-678
- 42 Büchter, R., Strömberg, A., Schmelzer, E. und Kombrink, E. (1997) Primary structure and expression of acidic (class II) chitinase in potato. *Plant Mol Biol* 35: 749-761

- 
- 43 Zhu, B., Chen, T. H. H. und Li, P. H. (1995) Expression of three osmotin-like protein genes in response to osmotic stress and fungal infection in potato. *Plant Mol Biol* 28: 17-26
- 44 Pritsch, C., Muehlbauer, G. J., Bushnell, W. R., Somers, D. A. und Vance, C. P. (2000) Fungal development and induction of defense response genes during early infection of wheat spikes by *Fusarium graminearum*. *Mol Plant-Microbe Interact* 13: 159-169
- 45 Hu, X. und Reddy, A. S. (1997) Cloning and expression of a PR5-like protein from *Arabidopsis*: inhibition of fungal growth by bacterially expressed protein. *Plant Mol Biol* 6: 949-959
- 46 Capelli, N., Diogon, T., Greppin, H. und Simon, P. (1997) Isolation and characterization of a cDNA clone encoding an osmotin-like protein from *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 191: 51-56
- 47 Vigers, A., Roberts, W. K. und Selitrennikoff, C. P. (1991) A new family of plant antifungal proteins. *Mol Plant-Microbe Interact* 4: 315-323
- 48 Schuler, T. H., Poppy, G. M., Kerry, B. R. und Denholm, I. (1998) Insect-resistant transgenic plants. *TIBTECH* 16: 168-175
- 49 Tamayo, M. C., Rufat, M., Bravo, J. M. und San Segundo B. (2000) Accumulation of a maize proteinase inhibitor in response to wounding and insect feeding, and characterization of its activity toward digestive proteinases of *Spodoptera littoralis* larvae. *Planta* 211: 62-71
- 50 Sánchez-Serrano, J. J., Schmidt, R., Schell, J. und Willmitzer, L. (1986) Nucleotide sequence of proteinase inhibitor II encoding cDNA of potato (*Solanum tuberosum*) and its mode of expression. *Mol Gen Genet* 203: 15-20
- 51 Duan, X., Li, X., Xue, Q., Abo-el-Saad, M., Xu, D. und Wu, R. (1996) Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. *Nat Biotechnol* 14: 494-498.
- 52 Constabel, C. P., Bertrand, C. und Brisson, N. (1993) Transgenic potato plants overexpressing the pathogenesis-related STH-2 gene show unaltered susceptibility to *Phytophthora infestans* and potato virus X. *Plant Mol Biol* 22: 775-782
- 53 Wang, C. S., Huang, J. C. und Hu, J. H. (1999) Characterization of two subclasses of PR-10 transcripts in lily anthers and induction of their genes through separate signal transduction pathways. *Plant Mol Biol* 40: 807-814
- 54 Robert, N., Ferran, J., Breda, C., Coutos-Thévenot, P., Boulay, M., Buffard, D. und Esnault, R. (2001) Molecular characterization of the incompatible interaction of *Vitis vinifera* leaves with *Pseudomonas syringae* pv. *poti*: Expression of genes coding for stilbene synthase and class 10 PR protein. *Eur J Plant Pathol* 107: 249-261
- 55 Bantignies, B., Seguin, J., Muzac, I., Dedaldechamp, F., Gulick, P. und Ibrahim, R. (2000) Direct evidence for ribonucleolytic activity of a PR-10-like protein from white lupin roots. *Plant Mol Biol* 42: 871-881
- 56 García-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J.-M. und Rodríguez-Palenzuela, P. (1998) Plant Defense Peptides. *Biopolymers (Peptide Science)* 47: 479-491
- 57 Dixon, R. A. (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411: 843-847
- 58 Weisshaar, B. und Jenkins, G. I. (1998) Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Curr Opin Plant Biol* 1: 251-257
- 59 Snedden, W. A. und Fromm, H. (1998) Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment. *Trends Plant Sci* 3: 299-304
- 60 Lewit-Bentley, A. und Rety, S. (2000) EF-hand calcium-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* 10: 637-643
- 61 Geerts, A., Feltkamp, D. und Rosahl, S. (1994) Expression of lipoxygenase in wounded tubers of *Solanum tuberosum* L. *Plant Physiol* 105: 269-277

- 
- 62 Royo, J., Vancanneyt, G., Pérez, A. G., Sanz, C., Störmann, K., Rosahl, S. und Sánchez-Serrano, J. J. (1996) Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. *J Biol Chem* 271: 21012-21019
- 63 Blée, E. (1998) Phytooxylipins and plant defense reactions. *Prog Lipid Res* 37: 33-72
- 64 Göbel, C., Feussner, I., Schmidt, A., Scheel, D., Sánchez-Serrano, J. J., Hamberg, M. und Rosahl, S. (2001) Oxylipin profiling reveals the preferential stimulation of the 9-Lipoxygenase pathway in elicitor-treated potato cells. *J Biol Chem* 276: 6267-6273
- 65 Grant, M. und Mansfield, J. (1999) Early events in host-pathogen interactions. *Curr Opin Plant Biol* 2: 312-319
- 66 Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K. und Scheel, D. (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and  $O_2^-$  from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4800-4805
- 67 Ligterink, W., Kroj, Th., zur Nieden, U., Hirt, H. und Scheel, D. (1997) Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science* 276: 2054-2057
- 68 Stratmann, J. W. und Ryan, C. A. (1997) Myelin basic protein kinase activity in tomato leaves is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and oligosaccharide elicitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11085-11089
- 69 Romeis, T., Piedras, P. und Jones, J. D. G. (2000) Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response. *Plant Cell* 12: 803-815
- 70 Yang, K.-Y., Liu, Y. und Zhang, S. (2001) Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 741-746
- 71 Blumwald, E., Aharon, G. S. und Lam, B. C.-H. (1998) Early signal transduction pathways in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* 3: 342-346
- 72 Feys, B. J. und Parker, J. E. (2000) Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends Genet* 16: 449-455
- 73 Glazener, J. A., Orlandi, E. W. und Baker, C. J. (1996) The active oxygen response of cell suspensions to incompatible bacteria is not sufficient to cause hypersensitive cell death. *Plant Physiol* 110: 759-763
- 74 Wu, G., Shortt, B. J., Lawrence, E. B., Levine, E. B., Fitzsimmons, K. C. und Shah, D. M. (1995) Disease resistance conferred by expression of a gene encoding  $H_2O_2$ -generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell* 7: 1357-1368
- 75 Chamnongpol, S., Willekens, H., Moeder, W., Langebartels, C., Sandermann, H., Jr., van Montagu, M., Inze, D. und van Camp, W. (1998) Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by  $H_2O_2$  in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5818-5823
- 76 Alvarez, M. E., Pennell, R. I., Meijer, P.-J., Ishikawa, A., Dixon, R. A. und Lamb, C. J. (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92: 773-784
- 77 McDowell, J. M. und Dangl, J. L. (2000) Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochem Sci* 25: 79-82
- 78 Kombrink, E. und Schmelzer, E. (2001) The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. *Eur J Plant Pathol* 107: 69-78
- 79 Glazebrook, J. (1999) Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Curr Opin Plant Biol* 2: 280-286
- 80 Yu, I., Parker, J. und Bent, A. (1998) Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7819-7824

- 
- 81 Abad, M. S., Hakimi, S. M., Kaniewski, W. K., Rommens, C. M., Shulaev, V., Lam, E. und Shah, D. M. (1997) Characterization of acquired resistance in lesion-mimic transgenic potato expressing bacterio-opsin. *Mol Plant-Microbe Interact* 10: 635-645
- 82 Century, K. S., Shapiro, A. D., Repetti, P. P., Dahlbeck, D., Holub, E. und Staskawicz, B. J. (1997) NDR1, a pathogen-induced component required for *Arabidopsis* disease resistance. *Science* 278: 1963-1965
- 83 Genoud, Th. und Métraux, J.-P. (1999) Crosstalk in plant cell signaling: structure and function of genetic network. *Trends Plant Sci* 4: 503-507
- 84 Raskin, I. (1992) Role of salicylic acid in plants. *Annu Rev Plant Physiol* 43: 439-463
- 85 Alvarez, M. E. (2000) Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol Biol* 44: 429-442
- 86 Martinez, C., Baccou, J.-C., Bresson, E., Baissac, Y., Daniel, J.-F., Jalloul, A., Montillet, J.-L., Geiger, J.-P., Assigbetsé, K. und Nicole, M. (2000) Salicylic acid mediated by oxidative burst is a key molecule in local and systemic responses of cotton challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Plant Physiol* 122: 757-766
- 87 Lee, H.-I., León, J. und Raskin, I. (1995) Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4076-4079
- 88 Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willitis, M. G., Molina, A., Steiner, H.-Y. und Hunt, M. D. (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8: 1809-1819
- 89 Dong, X. (1998) SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr Opin Plant Biol* 1: 316-323
- 90 Mauch, F., Mauch-Mani, B., Gaille, C., Kull, B., Haas, D. und Reimann, C. (2001) Manipulation of salicylate content in *Arabidopsis thaliana* by the expression of an engineered bacterial salicylate synthase. *Plant J* 25: 67-77
- 91 Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H. und Ryals, J. (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261: 754-756
- 92 Yu, D., Liu, Y., Fan, B., Klessig, D. F. und Chen, Z. (1997) Is the high basal level of salicylic acid important for disease resistance in potato? *Plant Physiol* 115: 343-349
- 93 Falk, A., Feys, B. J., Frost, L. N., Jones, J. D., Daniels, M. J. und Parker, J. E. (1999) EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 3292-3297
- 94 Jirage, D., Tootle, T. L., Reuber, T. L., Frost, L. N., Feys, B. J., Parker, J. E., Ausubel, F. M. und Glazebrook, J. (1999) *Arabidopsis thaliana* PAD4 encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13583-13588.
- 95 Nawrath, Ch. und Métraux, J.-P. (1999) Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express *PR-2* and *PR-5* and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell* 11: 1393-1404
- 96 Durner, J., Shah, J. und Klessig, D. F. (1997) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci* 7: 266-274
- 97 Métraux, J.-P. (2001) Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. *Eur J Plant Pathol* 107: 13-18
- 98 Shulaev, V., Silverman, P. und Raskin, I. (1997) Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature* 385: 718-721
- 99 Chen, Z., Silva, H. und Klessig, D. F. (1993) Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262: 1883-1886
- 100 Chen, Z., Ricigliano, J. W. und Klessig, D. F. (1993) Purification and characterization of a soluble salicylic acid-binding protein from tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9533-9537

- 
- 101 Du, H. und Klessig, D. F. (1997) Identification of a soluble, high-affinity salicylic acid-binding protein in tobacco. *Plant Physiol* 113: 1319-1327
- 102 Zhang, S. Q. und Klessig, D. F. (1997) Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. *Plant Cell* 9: 809-824
- 103 Cao, H., Li, X. und Dong, X. (1998) Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6531-6536
- 104 Zhang, Y., Fan, W., Kinkema, M., Li, X. und Dong, X. (1999) Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the *PR-1* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6523-6528
- 105 Zhou, J. M., Trifa, Y., Silva, H., Pontier, D., Lam, E., Shah, J. und Klessig, D. F. (2000) NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the *PR-1* gene required for induction by salicylic acid. *Mol Plant-Microbe Interact* 13: 191-202
- 106 Yang, Y. und Klessig, D. F. (1996) Isolation and characterization of a tobacco mosaic virus-inducible *myb* oncogene homolog from tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14972-14977
- 107 Chen, Ch. und Chen, Zh. (2000) Isolation and characterization of two pathogen- and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco. *Plant Mol Biol* 42: 387-396
- 108 Eulgem, Th., Rushton, P. J., Robatzek, S. und Somssich, I. E. (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci* 5: 199-206
- 109 Rushton, P. J. und Somssich, I. E. (1998) Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Curr Opin Plant Biol* 1: 311-315
- 110 Pieterse, C. M. J. und van Loon, L. C. (1999) Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci* 4: 52-58
- 111 Chang, C. und Shockey, J. A. (1999) The ethylene-response pathway: signal perception to gene regulation. *Curr Opin Plant Biol* 2: 352-358
- 112 Fluhr, R. (1998) Ethylene perception: from two-component signal transducers to gene induction. *Trends Plant Sci* 3: 141-146
- 113 Farmer, E. E. (2001) Surface-to-air signals. *Nature* 411: 854-856
- 114 Creelman, R. A. und Mullet, J. E. (1995) Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4114-4119
- 115 Dammann, C., Rojo, E. und Sánchez-Serrano, J. J. (1997) Abscisic acid and jasmonic acid activate wound-inducible genes in potato through separate, organ-specific signal transduction pathways. *Plant J* 11: 773-782
- 116 McConn, M., Creelman, R. A., Bell, E., Mullet, J. E. und Browse, J. (1997) Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5473-5477
- 117 Vijayan, P., Shockey, J., Lévesque, C. A., Cook, R. J. und Browse, J. (1998) A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7209-7214
- 118 Staswick, P. E., Yuen, G. Y. und Lehman, C. C. (1998) Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *Plant J* 15: 747-754
- 119 Thomma, B. P., Penninckx, I. A., Broekaert, W. F. und Cammue, B. P. (2001) The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr Opin Immunol* 13: 63-68
- 120 Reymond, P. und Farmer, E. E. (1998) Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr Opin Plant Biol* 1: 404-411
- 121 van Wees, S. C. M., de Swart, E. A. M., van Pelt, J. A., van Loon, L. C. und Pieterse, C. M. J. (2000) Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8711-8716

- 
- 122 Uknes, S. J., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S.,  
Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E. und Ryals, J. (1992) Acquired Resistance in  
*Arabidopsis*. Plant Cell 4: 645-656
- 123 van Loon, L. C. (1997) Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-  
related proteins. Eur J Plant Pathol 103: 753-765
- 124 Ward, E. R., Uknes, S. J., Williams, S. C., Dincher, S. S., Wiederhold, D. L.,  
Alexander, D. C., Ahl-Goy, P., Métraux, J.-P. und Ryals, J. A. (1991) Coordinate gene  
activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. Plant Cell 3:  
1085-1094
- 125 Anfoka, G. und Buchenauer, H. (1997) Systemic acquired resistance in tomato  
against *Phytophthora infestans* by pre-inoculation with tobacco necrosis virus.  
Physiological and Molecular plant pathology 50: 85-101
- 126 Yang, Y., Shah, J. und Klessig, D. F. (1997) Signal perception and transduction in  
plant defense responses. Genes and Development 11: 1621-1639
- 127 Kessmann, H., Staub, Th., Hofmann, Ch., Maetzke, Th. und Herzog, J. (1994)  
Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. Annu Rev  
Phytopathol 32: 439-459
- 128 Oostendorp, M., Kunz, W., Dietrich, B. und Staub, Th. (2001) Induced disease  
resistance in plants by chemicals. Eur J Plant Pathol 107: 19–28
- 129 Conrath, U., Katz, V., Schwindling, S. und Kohler, A. (2001) Priming as a mechanism  
in induced systemic resistance of plants. Eur J Plant Pathol 107: 113-119
- 130 van Wees, S. C. M., Pieterse, C. M. J., Trijssenaar, A., van't Westende, Y. A. M.,  
Hartog, F. und van Loon, L. C. (1997) Differential induction of systemic resistance in  
*Arabidopsis* by biocontrol bacteria. Mol Plant-Microbe Interact 10: 716-724
- 131 van Wees, S. C. M., Luijendijk, M., Smoorenburg, I., van Loon, L. C. und Pieterse, C.  
M. J. (1999) Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in  
*Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-  
related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp*  
upon challenge. Plant Mol Biol 41: 537-549
- 132 Knoester, M., Pieterse, C. M. J., Bol, J. F. und van Loon, L. C. (1999) Systemic  
resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent  
signaling at the site of application. Mol Plant-Microbe Interact 12: 720-727
- 133 Morris, S. W., Vernooij, B., Titatarn, S., Starrett, M., Thomas, S., Wiltse, C. C.,  
Frederiksen, R. A., Bhandhufalck, A., Hulbert, S. und Uknes, S. J. (1998) Induced  
resistance responses in maize. Mol Plant-Microbe Interact 11: 643-658
- 134 Doke, N., Ramirez, A. V. und Tomiyama, K. (1987) Systemic induction of resistance  
in potato plants against *Phytophthora infestans* by local treatment with hyphal wall  
components of the fungus. J Phytopathol 119: 232-239
- 135 Strömberg, A. und Brishammar, S. (1993) A histological evaluation of induced  
resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in potato leaves. J Phytopathol  
137: 15-25
- 136 Cohen, Y., Gisi, U. und Möisinger, E. (1991) Systemic resistance of potato plants  
against *Phytophthora infestans* induced by unsaturated fatty acids. Physiol Mol Plant  
Pathol 38:255-273
- 137 Cohen, Y., Gisi, U. und Niderman, T. (1993) Local and systemic protection against  
*Phytophthora infestans* induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and  
jasmonic methyl ester. Phytopathol 83: 1054-1062
- 138 Kombrink, E., Büchter, R., Wegener, S. und Scheel, D. (1995) Systemic acquired  
resistance in potato. In: Modern Fungicides and Antifungal Compounds. Proc Int  
Symp, 11<sup>th</sup>. (Lyr, H., Russel, P. E. and Sisler, H. D. eds.) Intercept, Andover, England:  
483-491

- 
- 139 Bächter, R. (1997) Charakterisierung von Chitinasen und 1,3- $\beta$ -Glucanasen zur Identifizierung von Markergenen der systemisch erworbenen Resistenz in *Solanum tuberosum* L. Dissertation, Universität Köln
- 140 Wegener, S. (1996) Untersuchungen zur systemisch erworbenen Resistenz in *Solanum tuberosum* L.: Identifizierung und Charakterisierung des systemisch responsiven Gens *stsrG1*. Dissertation, Universität Köln
- 141 Kistner, C. (1999) Isolierung und Charakterisierung eines nach Infektion mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* systemisch responsiven Gens von *Solanum tuberosum* L. Dissertation, Universität Halle
- 142 Coquoz, J.-L., Buchala, A. J., Meuwly, Ph. und Métraux, J.-P. (1995) Arachidonic acid induces local but not systemic synthesis of salicylic acid and confers systemic resistance in potato plants to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. *Phytopathol* 85: 1219-1224
- 143 Yu, D., Xie, Z., Chen, C., Fan, B. und Chen, Z. (1999) Expression of tobacco class II catalase gene activates the endogenous homologous gene and is associated with disease resistance in transgenic potato plants. *Plant Mol Biol* 39: 477-488
- 144 Kuć, J. (2001) Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *Eur J Plant Pathol* 107: 7-12
- 145 Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580
- 146 Debener, T., Lehnackers, H., Arnold, M. und Dangl, J. L. (1991) Identification and molecular mapping of a single *Arabidopsis thaliana* locus determining resistance to a phytopathogenic *Pseudomonas syringae* isolate. *Plant J* 1: 289-302
- 147 Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J. und Schilperoort, R. A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Nature* 303: 179-180
- 148 Gatz, C., Kaiser, A. und Wendenburg, R. (1991) Regulation of a modified CaMV 35S promotor by the Tn 10-encoded Tet repressor in transgenic tobacco. *Mol Gen Genet* 225: 761-770
- 149 Fourney, R. M., Miyakoshi, J., Day, R. S. und Paterson, M. C. (1988) Northern blotting: Efficient RNA staining and transfer. *Focus* 10: 5-7
- 150 Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- 151 Schmidt, A., Grimm, R., Schmidt, J., Scheel, D., Strack, D. und Rosahl, S. (1999) Cloning and expression of a potato cDNA encoding Hydroxycinnamoyl-CoA:Tyramine *N*-(Hydroxycinnamoyl)transferase. *J Biol Chem* 274: 4273-4280
- 152 Logemann, J., Schell, J. und Willmitzer, L. (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissue. *Anal Biochem* 163: 16-20
- 153 Liang, P. und Pardee, A. B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971
- 154 Linskens, M. H. K., Feng, J., Andrews, W. H., Enlow, B. E., Saati, S. M., Tonkin, L. A., Funk, W. D. und Villeponteau, B. (1995) Cataloging altered gene expression in young and senescent cells using enhanced differential display. *Nucl Acids Res* 23: 3244-3251
- 155 Feinberg, A. P. und Vogelstein, B. (1984) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 167: 266-267
- 156 Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410
- 157 Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- 158 Zhang, J. S., Duncan, E. L., Chang, A. C.-M. und Reddel, R. R. (1998) Differential Display of mRNA. *Mol Biotechnol* 10: 155-165

- 
- 159 Bachem, C. W. B., van der Hoeven, R. S., de Bruijn, S. M., Vreugdenhil, D., Zabeau, M. und 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: 745-753
- 160 Durrant, W. E., Rowland, O., Piedras, P., Hammond-Kosack, K. E. und Jones, J. D. G. (2000) cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *Plant Cell* 12: 963-977
- 161 Habu, Y., Fukada-Tanaka, S., Hisatomi, Y. und Iida, S. (1997) Amplified restriction fragment length polymorphism-based mRNA fingerprinting using a single restriction enzyme that recognizes a 4-bp sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 234: 516-521
- 162 „displayProfile™ Kit“ Restriction Fragment Differential Display Kit manual version 2.0
- 163 Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. und Zabeau, M. (1995) AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res* 23: 4407-4414
- 164 Jia, Y. und Martin, G. B. (1999) Rapid transcript accumulation of pathogenesis-related genes during an incompatible interaction in bacterial speck disease-resistant tomato plants. *Plant Mol Biol* 40: 455-465
- 165 Zhu, B., Chen, T. H. und Li, P. H. (1996) Analysis of late-blight disease resistance and freezing tolerance in transgenic potato plants expressing sense and antisense genes for an osmotin-like protein. *Planta* 198: 70-77
- 166 Joos, H.-J. und Hahlbrock, K. (1992) Phenylalanine ammonia-lyase in potato (*Solanum tuberosum* L.) Genomic complexity, structural comparison of two selected genes and modes of expression. *Eur J Biochem* 204: 621-629
- 167 Pellegrini, L., Rohfritsch, O., Fritig, B. und Legrand, M. (1994) Phenylalanine ammonia-lyase in tobacco. Molecular cloning and gene expression during hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus and the response to a fungal elicitor. *Plant Physiol* 106: 877-886
- 168 Bergey, D. R. und Ryan, C. A. (1999) Wound- and systemin-inducible calmodulin gene expression in tomato leaves. *Plant Mol Biol* 40: 815-823
- 169 Takezawa, D., Liu, Z. H., An, G. und Poovaiah, B. W. (1995) Calmodulin gene family in potato: developmental and touch-induced expression of the mRNA encoding a novel isoform. *Plant Mol Biol* 27: 693-703
- 170 Heo, W. D., Lee, S. H., Kim, M. C., Kim, J. C., Chung, W. S., Chun, H. J., Lee, K. J., Park, C. Y., Park, H. C., Choi, J. Y. und Cho, M. J. (1999) Involvement of specific calmodulin isoforms in salicylic acid-independent activation of plant disease resistance responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 766-771
- 171 Klessig, D. F. und Malamy, J. (1994) The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol Biol* 26: 1439-1458
- 172 Leung, J. und Giraudat, J. (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 199-222
- 173 Constabel, C. P., Yip, L. und Ryan, C. A. (1998) Prosystemin from potato, black nightshade, and bell pepper: primary structure and biological activity of predicted systemin polypeptides. *Plant Mol Biol* 36: 55-62
- 174 Peña-Cortés, H. Prat, S., Atzorn, R., Wasternack, K. und Willmitzer, L. (1996) Abscisic acid-deficient plants do not accumulate proteinase inhibitor II following systemin treatment. *Planta* 198: 447-451
- 175 Schmidt, A. (1999) Hydroxymethylglutaryl-CoA in Zellkulturen von Kartoffel: Isolierung und Charakterisierung eines THT cDNA-Klons aus *Solanum tuberosum*. Dissertation, Universität Halle
- 176 Jansson, S., Andersson, J., Kim, S. J. und Jackowski, G. (2000) An *Arabidopsis thaliana* protein homologous to cyanobacterial high-light-inducible proteins. *Plant Mol Biol* 42: 345-351

- 
- 177 Adamska, I., Kloppstech, K. und Ohad, I. (1992) UV light stress induces the synthesis of the early light-inducible protein and prevents its degradation. *J Biol Chem* 267: 24732-24737
- 178 Pötter, E. und Kloppstech, K. (1993) Effects of light stress on the expression of early light-inducible proteins in barley. *Eur J Biochem* 14: 779-786
- 179 Shimosaka, E., Sasanuma, T. und Handa, H. (1999) A wheat cold-regulated cDNA encoding an early light-inducible protein (ELIP): its structure, expression and chromosomal location. *Plant Cell Physiol* 40: 319-325
- 180 Fellbrich, G., Blume, B., Brunner, F., Hirt, H., Kroj, Th., Ligterink, W., Romanski, A. und Nürnberger, Th. (2000) *Phytophthora parasitica* elicitor-induced reactions in cells of *Petroselinum crispum*. *Plant Cell Physiol* 41: 692-701
- 181 Nürnberger, Th., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W. R., Hahlbrock, K. und Scheel, D. (1994) High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* 78: 449-460
- 182 Baldwin, J. C., Karthikeyan, A. S. und Raghothama, K. G. (2001) *LEPS2*, a phosphorus starvation-induced novel acid phosphatase from tomato. *Plant Physiol* 125: 728-737
- 183 Houston, B., Seawright, E., Jefferies, D., Hoogland, E., Lester, D., Whitehead, C. und Farquharson, C. (1999) Identification and cloning of a novel phosphatase expressed at high levels in differentiating growth plate chondrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1448: 500-506
- 184 Collet, J. F., Stroobant, V., Pirard, M., Delpierre, G. und van Schaftingen, E. (1998) A new class of phosphotransferases phosphorylated on an aspartate residue in an amino-terminal DXDX(T/V) motif. *J Biol Chem* 273: 14107-14112
- 185 Sargent, T. (1987) Isolation of differentially expressed genes. *Methods Enzymol* 152: 423-432
- 186 Birch, P. R. J., Avrova, A. O., Duncan, J. M., Lyon, G. D. und Toth, R. L. (1999) Isolation of potato genes that are induced during an early stage of the hypersensitive response to *Phytophthora infestans*. *Mol Plant-Microbe Interact* 12: 356-361
- 187 Hubank, M. und Schatz, D. G. (1994) Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucl Acids Res* 22: 5640-5648
- 188 McClelland, M., Mathieu-Daude, F. und Welsh, J. (1995) RNA fingerprinting and differential display using arbitrarily primed PCR. *Trends Genet* 11: 242-246
- 189 Welsh, J. und McClelland, M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl Acids Res* 20: 4965-4970
- 190 Appel, M., Bellstedt, D. U. und Gresshoff, P. M. (1999) Differential display of eukaryotic mRNA: meeting the demands of the new millenium? *J Plant Physiol* 154: 561-570
- 191 Lee, J., Parthier, B. und Löbler, M. (1996) Jasmonate signalling can be uncoupled from abscisic acid signalling in barley: identification of jasmonate-regulated transcripts which are not induced by abscisic acid. *Planta* 199: 625-632
- 192 Joshi, C. P. und Nguyen, H. T. (1996) Differential display-mediated rapid identification of different members of a multigene family, HSP 16.9 in wheat. *Plant Mol Biol* 31: 575-584
- 193 Benito, E. P., Prins, Th. und van Kan, J. A. L. (1996) Application of differential display RT-PCR to the analysis of gene expression in a plant-fungus interaction. *Plant Mol Biol* 32: 947-957
- 194 Bauer, D., Müller, H., Reich, J., Riedel, H., Ahrenkiel, V., Warthoe, P. und Strauss, M. (1993) Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucl Acids Res* 21: 4272-4280
- 195 Bertoli, D. J., Schlichter, U. H. A., Adams, M. J., Burrows, P. R., Steinbiss, H.-H. und Antoniw, J. F. (1995) An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNAs. *Nucl Acids Res* 23: 4520-4523

- 
- 196 Baldwin, D., Crane, V. und Rice, D. (1999) A comparison of gel-based, nylon filter and microarray techniques to detect differential RNA expression in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2: 96–103
- 197 Vögeli-Lange, R., Bürckert, N., Boller, Th. und Wiemken, A. (1996) Rapid selection and classification of positive clones generated by mRNA differential display. *Nucl Acids Res* 24: 1385-1386
- 198 Birch, P. R. J. und Kamoun, S. (2000) Studying interaction transcriptomes: coordinated analyses of gene expression during plant–microorganism interactions. *New technologies for life sciences: A Trends Guide* 2000 6: 77-82
- 199 Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B. und Kinzler, K. W. (1995) Serial analysis of gene expression. *Science* 270: 484-487
- 200 Velculescu, V. E., Vogelstein, B. und Kinzler, K. W. (2000) Analysing uncharted transcriptomes with SAGE. *Trends Genet* 16: 423-425
- 201 Reymond, Ph. (2001) DNA microarrays and plant defence. *Plant Physiol Biochem* 39: 313-321
- 202 Kagnoff, M. F. und Eckmann, L. (2001) Analysis of host responses to microbial infection using gene expression profiling. *Curr Opin Microbiol* 4: 246–250
- 203 Maleck, K., Levine, A., Eulgem, Th., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K. A., Dangl, J. L. und Dietrich, R. A. (2000) The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat Genet* 26: 403–410
- 204 Qin, L., Prins, P., Jones, J. T., Popeijus, H., Smant, G., Bakker, J. und Helder J. (2001) GenEST, a powerful bidirectional link between cDNA sequence data and gene expression profiles generated by cDNA-AFLP. *Nucl Acids Res* 29: 1616-1622
- 205 Hunter, T. (1995) Protein kinases and phosphatases: the ying and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80: 225-236
- 206 Tena, G., Asai, T., Chiu, W.-L. und Sheen, J. (2001) Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Curr Opin Plant Biol* 4: 392–400
- 207 Hirt, H. (2000) Connecting oxidative stress, auxin, and cell cycle regulation through a plant mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 2405-2407
- 208 Somssich, I. E. (1997) MAP kinases and plant defence. *Trends Plant Sci* 2: 406-408
- 209 Luan, Sh. (1998) Protein phosphatases and signaling cascades in higher plants. *Trends Plant Sci* 3: 271-275
- 210 Broz, A. K., Thelen, J. J., Muszynski, M. G., Miernyk, J. A. und Randall, D. D. (2001) *ZMPP2*, a novel type-2C protein phosphatase from maize. *J Exp Bot* 52: 1739-1740
- 211 Fordham-Skelton, A. P., Skipsey, M., Eveans, I. M., Edwards, R. und Gatehouse, J. A. (1999) Higher plant tyrosine-specific protein phosphatases (PTPs) contain novel amino-terminal domains: expression during embryogenesis. *Plant Mol Biol* 39: 593–605
- 212 Xu, Q., Fu, H.-H., Gupta, R. und Luan, Sh. (1998) Molecular characterization of a tyrosine-specific protein phosphatase encoded by a stress-responsive gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 849–857
- 213 Cohen, P. (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* 58: 453-508
- 214 Rodríguez, P. L. (1998) Protein phosphatase 2C (PP2C) function in higher plants. *Plant Mol Biol* 38: 919-927
- 215 Kapranov, P., Jensen, T. J., Poulsen, C., de Bruijn, F. J. und Szczyglowski, K. (1999) A protein phosphatase 2C gene, *LjNPP2C1*, from *Lotus japonicus* induced during root nodule development. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1738-1743
- 216 „The Arabidopsis Genome Initiative“ (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815

- 
- 217 Rodríguez, P. L., Leube, M. P. und Grill, E. (1998) Molecular cloning in *Arabidopsis thaliana* of a new protein phosphatase 2C (PP2C) with homology to ABI1 and ABI2. *Plant Mol Biol* 38: 879–883
- 218 Miyazaki, S., Koga, R., Bohnert, H. J. und Fukuhara, T. (1999) Tissue- and environmental response-specific expression of 10 PP2C transcripts in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Mol Gen Genet* 261: 307-316
- 219 Meskiene, I., Bögre, L., Glaser, W., Balog, J., Brandstätter, M., Zwerger, K., Ammerer, G. und Hirt, H. (1998) MP2C, a plant protein phosphatase 2C, functions as a negative regulator of mitogen-activated protein kinase pathways in yeast and plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1938–1943
- 220 Baudouin, E., Meskiene, I. und Hirt, H. (1999) Short communication: unsaturated fatty acids inhibit MP2C, a protein phosphatase 2C involved in the wound-induced MAP kinase pathway regulation. *Plant J* 20: 343-3488
- 221 Leon, J., Rojo, E. und Sanchez-Serrano, J. J. (2001) Wound signalling in plants. *J Exp Bot* 52: 1-9
- 222 Lorenzo, O., Rodríguez, D., Nicolás, G., Rodríguez, P. L. und Nicolás, C. (2001) A new protein phosphatase 2C (*FsPP2C1*) induced by abscisic acid is specifically expressed in dormant beechnut seeds. *Plant Physiol* 125: 1949–1956
- 223 Tähtiharju, S. und Palva, T. (2001) Antisense inhibition of protein phosphatase 2C accelerates cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 26: 461-472
- 224 Vranova, E., Langebartels, C., van Montagu, M., Inze D. und van Camp, W. (2000) Oxidative stress, heat shock and drought differentially affect expression of a tobacco protein phosphatase 2C. *J Exp Bot* 51:1763-1764
- 225 Stone, J. M., Collinge, M. A., Smith, R. D., Horn, M. A. und Walker, C. J. (1994) Interaction of a protein phosphatase with an *Arabidopsis* serine-threonine receptor kinase. *Science* 266: 793-795
- 226 Leung, J., Merlot, S. und Giraudat, J. (1997) The *Arabidopsis abscisic acid-insensitive2 (ABI2)* and *ABI1* genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell* 9: 759-771
- 227 Sheen, J. (1998) Mutational analysis of protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 975–980
- 228 Vranova, E., Tähtiharju, S., Sriprang, R., Willekens, H., Heino, P., Palva, E. T., Inze, D. und van Camp, W. (2001) The AKT3 potassium channel protein interacts with the AtPP2CA protein phosphatase 2C. *J Exp Bot* 52: 181-182.
- 229 Niyogi, K. K. (2000) Safety valves for photosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 3: 455–460
- 230 Adamska, I., Kruse, E. und Kloppstech, K. (2001) Stable insertion of the early light-induced proteins into etioplast membranes requires chlorophyll A. *J Biol Chem* 276: 8582-8587
- 231 Adamska, I., Roobol-Bóza, M., Lindahl, M. und Andersson, B. (1999) Isolation of pigment-binding early light-inducible proteins from pea. *Eur J Biochem* 260: 2453-2460
- 232 Montané, M.-H. und Kloppstech, K. (2000) The family of light-harvesting-related proteins (LHCs, ELIPs, HLIPs): was the harvesting of light their primary function? *Gene* 258: 1–8
- 233 Kolanus, W., Scharnhorst, C., Kühne, U. und Herzfeld, F. (1987) The structure and light-dependent transient expression of a nuclear-encoded chloroplast protein gene from pea (*Pisum sativum*). *Mol Gen Genet* 225: 468-473
- 234 Blecken, J., Weisshaar, B. und Herzfeld, F. (1994) Two distinct *cis*-acting elements are involved in light-dependent activation of the pea *elip* promoter. *Mol Gen Genet* 245: 371-379
- 235 Wierstra, I. und Kloppstech, K. (2000) Differential effects of methyl jasmonate on the expression of the Early Light-Inducible Proteins and other light-regulated genes in barley. *Plant Physiol* 124: 833-844

- 
- 236 Ouvrard, O., Cellier, F., Ferrare, K., Tousch, D., Lamaze, T., Dupuis, J. M. und Casse-Delbart, F. (1996) Identification and expression of water stress- and abscisic acid-regulated genes in a drought-tolerant sunflower genotype. *Plant Mol Biol* 31: 819-829
- 237 Heddad, M. und Adamska, I. (2000) Light stress-regulated two-helix proteins in *Arabidopsis thaliana* related to the chlorophyll *a/b*-binding gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3741-3746
- 238 Bartels, D., Hanke, Ch., Schneider, K., Michel, D. und Salamini, F. (1992) A desiccation-related *Elip*-like gene from *Craterostigma plantagineum* is regulated by light and ABA. *EMBO J* 11: 2771-2778
- 239 Binyamin, L., Falah, M., Portnoy, V., Soudry, E. und Gepstein, S. (2001) The early light-induced protein is also produced during leaf senescence of *Nicotiana tabacum*. *Planta* 212: 591-597
- 240 Karlin-Neumann, G. A. und Tobin, E. M. (1986) Transit peptides of nuclear-encoded chloroplast proteins share a common amino acid framework. *EMBO J* 5: 9-13
- 241 Alamillo, J. M. und Bartels, D. (2001) Effects of desiccation on photosynthesis pigments and the ELIP-like dsp 22 protein complexes in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Sci* 160: 1161-1170
- 242 Krol, M., Ivanov, A. G., Jansson, S., Kloppstech, K. und Huner, N.P. (1999) Greening under high light or cold temperature affects the level of xanthophyll-cycle pigments, early light-inducible proteins, and light-harvesting polypeptides in wild-type barley and the *chlorina f2* mutant. *Plant Physiol* 120: 193-204
- 243 aus: Buchanan, B. B., Gruissem, W. und Jones, R. L (2000) Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists
- 244 Raghothama, K. G. (2000) Phosphorus acquisition; plant in the driver's seat! *Trends Plant Sci* 5: 412-413
- 245 Raghothama, K. G. (2000) Phosphate transport and signaling. *Curr Opin Plant Biol* 3:182-187
- 246 Hell, R. und Hillebrand, H. (2001) Plant concepts for mineral acquisition and allocation. *Curr Opin Biotechnol* 12: 161-168
- 247 Harrison, M. J. (1998) Development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr Opin Plant Biol* 1: 360-365
- 248 Tawaraya, K., Hashimoto, K. und Wagatsuma, T. (1998) Effect of root exudate fractions from P-deficient and P-sufficient onion plants on root colonisation by the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Mycorrhiza* 8: 67-70
- 249 Green, P. J. (1994) The ribonucleases of higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45: 421-445
- 250 Bariola, P. A., Howard, C. J., Taylor, C. P., Verburg, M. T., Jaglan, V. D. und Green, P. J. (1994) The *Arabidopsis* ribonuclease gene *RNS1* is tightly controlled in response to phosphate limitation. *Plant J* 6: 673-685
- 251 Dodds, P. N., Clarke, A. E. und Newbigin, E. (1996). Molecular characterization of the S-like RNase of *Nicotiana glauca* that is induced by phosphate starvation. *Plant Mol Biol* 31: 227-238
- 252 Kock, M., Löffler, A., Abel, St. und Glund, K. (1995) cDNA structure and regulatory properties of a family of starvation-induced ribonucleases from tomato. *Plant Mol Biol* 27: 477-485.
- 253 Chen, D. L., Delatorre, C. A., Bakker, A. und Abel, St. (2000) Conditional identification of phosphate-starvation-response mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 211: 13-22
- 254 Bun-Ya, M., Nishimura, M., Harashima, S. und Oshima, Y. (1991) The *PHO84* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. *Mol Cell Biol* 11: 3229-3238
- 255 Raghothama, K. G. (1999) Phosphate acquisition. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 665-693

- 
- 256 Leggewie, G., Willmitzer, L. und Riesmeier, J. W. (1997) Two cDNAs from potato are able to complement a phosphate uptake-deficient yeast mutant: identification of phosphate transporters from higher plants. *Plant Cell* 9: 381-392
- 257 Muchhal, U. S., Pardo, J. M. und Raghothama, K. G. (1996) Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 10519–10523
- 258 Liu, C., Muchhal, U. S., Mukatira, U., Kononowicz, A. K. und Raghothama, K. G. (1998) Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. *Plant Physiol* 116: 91-99
- 259 Duff, St. M. G., Sarath, G. und Plaxton, W. C. (1994) The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiol Plant* 90: 791-800
- 260 Aravind, L., Galperin, M. Y. und Koonin, E. V. (1998) The catalytic domain of the P-type ATPase has the haloacid dehalogenase fold. *Trends Biochem Sci* 23: 127-129
- 261 Ho, Ch.-L., Noji, M. und Saito, K. (1999) Plastidic pathway of serine biosynthesis. *J Biol Chem* 274: 11007-11012
- 262 Sheen, J. Zhou, L. und Jang, J.-C. (1999) Sugars as signaling molecules. *Curr Opin Plant Biol* 2: 410–418
- 263 Roitsch, Th. (1999) Source–sink regulation by sugar and stress. *Curr Opin Plant Biol* 2: 198–206
- 264 Berger, S., Bell, E., Sadka, A. und Mullet, J. E. (1995) *Arabidopsis thaliana Atvsp* is homologous to soybean *VspA* and *VspB*, genes encoding vegetative storage protein acid phosphatases, and is regulated similarly by methyl jasmonate, wounding, sugars, light and phosphate. *Plant Mol Biol* 27: 933-942
- 265 de Wald, D. B., Mason, H. S. und Mullet, J. E. (1992) The soybean vegetative storage proteins VSP $\alpha$  and VSP $\beta$  are acid phosphatases active on polyphosphates. *J Biol Chem* 267: 15958-15964
- 266 Haran, Sh., Logendra, S., Seskar, M., Bratanova, M. und Raskin, I. (2000) Characterization of *Arabidopsis* acid phosphatase promoter and regulation of acid phosphatase expression. *Plant Physiol* 124: 615–626
- 267 Mason, H. S. und Mullet, J. E. (1990) Expression of two soybean vegetative storage protein genes during development and in response to water deficit, wounding and jasmonic acid. *Plant Cell* 2: 569-579
- 268 del Pozo, J. C., Allona, I., Rubio, V., Leyva, A., de la Peña, A., Aragoncillo, C. und Paz-Ares, J. (1999) A type 5 acid phosphatase gene from *Arabidopsis thaliana* is induced by phosphate starvation and by some other types of phosphate mobilising/oxidative stress conditions. *Plant J* 19: 579-589
- 269 Duff, S. M. G., Plaxton, W. C. und Lefebvre, D. D. (1991) Phosphate-starvation response in plant cells: *de novo* synthesis and degradation of acid phosphatases. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9538-9542
- 270 Yan, X., Liao, H., Trull, M. C., Beebe, St. E. und Lynch, J.- P. (2001) Induction of a major leaf acid phosphatase does not confer adaptation to low phosphorus availability in common bean. *Plant Physiol* 125: 1901–1911
- 271 Szabo, L. J. und Bushnell, W. R. (2001) Hidden robbers: The role of fungal haustoria in parasitism of plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 7654–7655
- 272 Voegelé, R. T., Struck, Ch., Hahn, M. und Mendgen, K. (2001) The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 8133–8138
- 273 Hahn, M., Neef, U., Struck, Ch., Gottfert, M. und Mendgen, K. (1997) A putative amino acid transporter is specifically expressed in haustoria of the rust fungus *Uromyces fabae*. *Mol Plant-Microbe Interact* 10: 438-445
- 274 Hahn, M. und Mendgen, K. (2001) Signal and nutrient exchange at biotrophic plant-fungus interfaces. *Curr Opin Plant Biol* 4: 322-327
- 275 Kim, S. K. und Wold, B. J. (1985) Stable reduction of thymidine kinase activity in cells expressing high levels of anti-sense RNA. *Cell* 42: 129-138

- 
- 276 Smyth, D. R. (1997) Gene silencing: Cosuppression at a distance. *Curr Biol* 7: R793–R795
- 277 López-Bucio, J., de la Vega, O. M., Guevara-Garcia, A. und Herrera-Estrella, L. (2000) Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate. *Nat Biotechnol* 18: 450-453
- 278 Gallie, D. R. (1998) Controlling gene expression in transgenics. *Curr Opin Plant Biol* 1: 166–172
- 279 Matzke, A. J. M. und Matzke, M. A. (1998) Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Curr Opin Plant Biol* 1: 142–148
- 280 Gelvin, S. B. (1998) The introduction and expression of transgenes in plants. *Curr Opin Biotechnol* 9: 227–232

## Anhang

### Anhang 1 Verwendete Primer

#### A) Oligonukleotidprimer für die DDRT-PCR

##### 3`Primer (T-reich)

a 5`-GCG **CAA GCT TTT** TTT TTT TTC C-3`  
c 5`-GCG **CAA GCT TTT** TTT TTT TTG A-3`  
e 5`-GCG **CAA GCT TTT** TTT TTT TTG C-3`

##### 5`Primer (Zufallsprimer)

1 5`-CGG **GAA GCT TAT** CGA CTC CAA G-3`  
2 5`-CGG **GAA GCT TTA** GCT AGC ATG G-3`  
3 5`-CGG **GAA GCT TGC** TAA GAC TAG C-3`  
4 5`-CGG **GAA GCT TTG** CAG TGT GTG A-3`  
5 5`-CGG **GAA GCT TGT** GAC CAT TGC A-3`  
6 5`-CGG **GAA GCT TGT** CTG CTA GGT A-3`  
7 5`-CGG **GAA GCT TAG** ACG CTA GTG T-3`  
8 5`-CGG **GAA GCT TTA** GCT AGC AGA C-3`  
9 5`-CGG **GAA GCT TAC** TCC ATG ACT C-3`  
10 5`-CGG **GAA GCT TAT** TAC AAC GAG G-3`  
11 5`-CGG **GAA GCT TAT** TGG ATT GGT C-3`  
12 5`-CGG **GAA GCT TAT** CTT TCT ACC C-3`  
13 5`-CGG **GAA GCT TAT** TTT TGG CTC C-3`  
14 5`-CGG **GAA GCT TTA** TCG GTC ATA G-3`  
15 5`-CGG **GAA GCT TTA** GGT ACT AAG G-3`

#### Markiert: Hind III-Schnittstellen

#### B) Primer für das cDNA-AFLP

Eu 1 TAT-3`  
Eu 2 TTA-3`  
Eu 3 AAC-3`  
Eu 4 AAG-3`  
Eu 5 ACA-3`  
Eu 6 AGA-3`  
Eu 7 CAA-3`  
Eu 8 GAA-3`  
Eu 9 ATC-3`  
Eu 10 ATG-3`  
Eu 11 ACT-3`  
Eu 12 AGT-3`  
Eu 13 CAT-3`  
Eu 14 GAT-3`  
Eu 15 TAC-3`  
Eu 16 TAG-3`

C) Spezifische Primer für die RT-PCR

110-5

5`-GGAATGGCATTTGCATAAAGCCC-3`

110-3

5`-GGGTCTCTTTTGCTTTTTTCCCG-3`

903-5

5`-CTAAAGAATGATGATGAAAATTGTG-3`

903-3

5`-GGAATTATCAACTGTCATTATTCAC-3`

D) Primer für die PCR zur Schaffung eines Gesamtlängenklones der putativen sauren Phosphatase (PCR gl-3) ohne Stopcodon

gl 5

Bam HI

5`-CTCGAGGATCCATGGCTGGAATTGTAGTG-3`

gl 3

Hind III

5`-TCTAGAAGCTTTCAGTAAGGCACAGGAAG-3`

## Anhang 2 Sequenzen der "Differential Display" Fragmente

Die Zahlenangaben bezeichnen das jeweils erste Nukleotid der Zeile. Kursiv geschriebene Nukleotide symbolisieren die Primer, die zur DDRT-PCR eingesetzt wurden.

### A) Nukleotidsequenz des Fragments dd110 (*PP2C*)

*Zufallsprimer 6*  
1 *GTCTGCTAGGTAGTAAGGAATGGCATTTCATATAAGCCCATGGCTTTAAT*  
51 TTCTTTCCTGGAACACAAAGTATTGAGATTCTAGCTGTGTTTAAACGAGG  
101 CAGAGGAGCTAGCACCAAGAAGAAGAAATCGGGAAAAAAGCAAAGAGAC  
*T-reicher Primer e*  
151 CCCACTGAAGAATTCAGCTTTTTTTTTTTTTT

### B) Nukleotidsequenz Display Fragments dd903 (*ELH*)

*Zufallsprimer 10*  
1 *CGGGAAGCTTATTACAACGAGGAGCAACAACCCGCGCTACTAAAGAATGA*  
51 TGATGAAAATTGTGATTATTCAGGATCATCTAACTCCTGAGCTTTGAATA  
101 TTGTTCTAGCAATTTGATGTTTTACTTCTTCTGATATCACTGTTAATGTG  
*T-reicher*  
151 AGACAAGTAATTAAGTGAATAATGACAGTTGATAATTCCATTTGCTTTTTT  
*Primer e*  
201 TTTTTTT

### Anhang 3 Sequenzen genomischer Klone

A) Vergleich der Nukleotidsequenzen des genomischen Klons g110/7 (g) und des „Differential Display“ Fragments dd110 (dd, kursiv)

Die Zahlenangaben beziehen sich auf das jeweils erste Nukleotid der Zeile.

**blaugrün:** Sequenzen, die ein mögliches Intron begrenzen  
**kursiv:** Homologie zum „Differential Display“ Fragment

g 1	GGAATGGCATTTCGCATAAAGCCCATGGCTTTAATTTCTTTCTGGAACAC
dd	<i>GGAATGGCATTTCGCATAAAGCCCATGGCTTTAATTTCTTTCTGGAACAC</i>
g 51	AAAG <b>GT</b> TTTGCCTTTCCCTTAGTCCTACAGACAAGTTTAAACTTGTATTT
dd	<i>AAAG</i>
g 101	GTTTCAACTAACATTAATTTTCATCCAACATGGTTACAAAATAACTTCTA
g 151	TTATTTATTATTGCCATTACGTATATGCATAATGAACACATCTGCTTGA
g 201	AGGAAGAAACTCTGTGCTGCACAAAAAATTGTGAATGGTCTTCCAGCATA
g 251	GTGTTATATCCGTGCCACTATGGAGAAGAGGATGGAAGATTCTCAATCAC
g 301	TGCTCACAAATACTGACATTTCTGTTTACATCACTTCTATGTGGAAATTG
g 351	CTACTCTATGTAGTGTTAGATGTGTTGAAGGGACTTACTAATTTTGATTA
g 401	AGCCTGTTGTTAGGACATTTCTAAATTTGAGATTGTGCGTTGGTGGTCAC
g 451	TGATTGTTGAGAAATATAGGTCTCAACTGGAACCTCAGCAATCCCATTTGGT
g 501	GATAGCAAGGGATGAAAGACATCACAGAAGATCAGTAGGTTGAAGGGCTG
g 551	GGGTTTCGTAGATGCTCACTAAAGGCACCAAAAAGAAAGATTTGTTTTTTC
g 601	TATTTAGGACATAGATAATTCGTGTTAAATAAGTGTTCCTTACCTTTT
g 651	TTTTCTTTTGTFTTATTTTTAAACTCCTCTTCCTTATGCATATTGTTATC
g 701	TTCTTCTTTTTCTAGATCCTGTCCCTTGCTTTGTTGGTAGTGCTTTTGCT
g 751	TGAAGCTTCATTCTTTTGACAGCTTTGGTGATCTTTTAATCTAACTGGAG
g 801	<b>CAG</b> TATTGAGATTCTAGCTGTGTTTAAACGAGGCAGAGGAGCTAGCACCA
dd	<i>TATTGAGATTCTAGCTGTGTTTAAACGAGGCAGAGGAGCTAGCACCA</i>
g 851	AGAAGAAGAAATCGGGAAAAAAGCAAAAGAGACCC
dd	<i>AGAAGAAGAAATCGGGAAAAAAGCAAAAGAGACCC</i>

B) Vergleich der Nukleotidteilsequenzen des genomischen Subklons 903/2-6 (g) und des „Differential Display“ Fragments dd903 (dd)

Die Zahlenangaben beziehen sich auf das jeweils erste Nukleotid der Zeile.  
Bindestriche symbolisieren Lücken.

**blaugrün:** Homologie zum *A.thaliana* Chromosom 4

**kursiv:** Homologie zum „Differential Display“ Fragment

g 1	TGGGGCATGAATCTACTTTTATTTTCCCCAGTTTGCATTATGACTTTGAAG
g 51	CCACTTTGATGCATGATTTTCTTTACTAGCTTCTCGTTTTCTCTTTATCT
g 101	TGTAATCCATACTTGTGAAT <b>TGCAGAAAMACTGGAACCTCTTTTAGTGTA</b>
g 151	<b>AATGTGGCAATGGCTGGAACAGGCATATAACCAGCTATCACGAAAAATCCG</b>
g 201	<b>GTGAGGAGTCAGTTCATGATAGGGAATCCCATCTCTTATAGCTTCTTCTT</b>
g 251	TTTTCCGTTATAAACTACATTCGTTTTTCTTGATTTCAGTAGACATTTTTG
g 301	TTGCAGCTATAACTTAAGTTTTTTTCTTTTTTCGGATTTCAGGAATGATTAT
<i>dd</i>	<i>CGGGCAGCTTAT</i>
g 351	TTCAACGAGGAGCAACAACCCGCGCTAGCTAAAGAATGATGATGAAAATT
<i>dd</i>	<i>TACAACGAGGAGCAACAACCCGCGCXA-CTAAAGAATGATGATGAAAATT</i>
g 401	GTGATAATT-----TAATTCCTGAGCTTTGAATGTTCTTCTATGC
<i>dd</i>	<i>GTGATTATTCAGGATCATCTAACTCCTGAGCTTTGAATATTGTTCTA-GC</i>
g 451	AATTTGATGTTTTACTTCTTCTGATATCACTGTTAATGTGAGACAAGTAA
<i>dd</i>	<i>AATTTGATGTTTTACTTCTTCTGATATCACTGTTAATGTGAGACAAGTAA</i>
g 501	CTGAGTGAATAATGATAGTTGATAATTCCATTTGTCGAGTTTAACTATAT
<i>dd</i>	<i>TTAAGTGAATAATGACAGTTGATAATTCCATTTGCXAAAAAAAAAAAA</i>
g 551	GAATCTTTTTTATCCATTCGCGTAGAGTTATAAGGCC

C) Vergleich der Nukleotidteilsequenzen des genomischen Subklons g903/2-6 (g) und des cDNA-Klons c903-3 (c, blaugrün)

Die Zahlenangaben beziehen sich auf das jeweils erste Nukleotid der Zeile. Bindestriche symbolisieren Lücken, Intron-Exon-Übergänge sind hervorgehoben.

```

c 1 TAGAGAATCTTCAGA

c 16 AGCAGAGTTTTTACTTTTCATGGCGACTTCAAAGCTCCAGGTTCTATGGAA

c 66 TCATCCTGCTGGCCCAAAGACCATTTCATTTCTGGGCACCAACCTTCAAGT

g 1 TGGGGCATGAATCTACTTTTATTTTCCCCAGTTTGCATTATGACTTTGAAG
c 116 GGGGCATCAGTATTGCAAATATTGCAGACTTTGCTAAACCACCAGAAAAG

g 51 CCACTTTGATGCATGATTTCCTTTACTAGCTTCTCGTTTTCTCTTTATCT
c 166 ATTTTATATTCTCAGCAAATAGCGGTTACAGCAACTGGAATTATATGGTC

g 101 TGTAATCCATACTTGTGAATTGCAGAAAMACTGGAACCTCTTTTAGTGTA
      ||| | ||||| ||||| ||||| |||||
c 216 TCGCTATAGCTTGGTAATTACTCCGAAAAACTGGAACCTCTT-TAGTGTA

g 151 AATGTGGCAATGGCTGGAACAGGCATATACCAGCTATCACGAAAAATCCG
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
c 266 AATGTGGCAATGGCTGGAACAGGCATATACCAGCTTTCACGAAAAATCCG

g 201 GTGAGGAGTCAGTTCATGATAGGGAATCCCATCTCTTATAGCTTCTTCTT
      |
c 316 G

g 251 TTTTCCGTTATAAACTACATTCGTTTTTCTTGATTTCAGTAGACATTTTTTG

g 301 TTGCAGCTATAACTTAAGTTTTTTTCTTTTTCGGATTCAGGAATGATTAT
      ||||| |||||
c 317 --AATGATTAT

g 351 TTCAACGAGGAGCAACAACCCGCGCTAGCTAAAGAATGATGATGAAAATT
      ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
c 326 TTCAACGAGGAGCAACAACCCGCGCCCCCAGAATGAAGATAGAAAATT

g 401 GTGATAATTTAATTCCTGAGCTTTGAATGTTCTTCTATGCAATTTGATGT
c 376 GTAATTTATTCTAGGATCATCTAACTCCTGAG

g 451 TTTACTTCTTCTGATATCACTGTTAATGTGAGACAAGTAACTGAGTGAAT

g 501 AATGATAGTTGATAATTCATTTGTCGAGTTTAACTATATGAATCTTTTTT

g 551 TATCCATTTCGCGTAGAGTTATAAGGCC

```

## Anhang 4 Sequenzen von cDNA-Klonen

### A) Vergleich der Nukleotidsequenzen des cDNA-Klons c903-1 (cDNA) und des „Differential Display“ Fragments dd903 (dd, **blaugrün**)

Die Zahlenangaben beziehen sich auf das jeweils erste Nukleotid der Zeile.

	Klonierungsstelle
cDNA 1	GAATTCGCGGCCGCTCAAAGACCATTCATTTCTGGGCACCAACCTTCAAG
cDNA 51	TGGGGCATCAGTATTGCAAATATTGCAGACTTTGCTAAACCACCAGAAAA
cDNA 101	GATTCATATCCTCAGCAAATAGCGGTTACAGCAACTGGAATTATATGGT
cDNA 151	CTCGCTATAGCTTGGTAATTACTCCGAAAACTGGAACCTCTTTAGTGTA
cDNA 201	AATGTGGCAATGGCTGGAACAGGCATATACCAGCTTTCACGAAAAATCCG
cDNA 251	GAATGATTATTTCAACGAGGAGCAACAACCCGCGCTACCAAAGAATGATG
dd 1	AGCAACAACCCGCGCTACTAAAGAATGATG
cDNA 301	ATGAAAATTGTGATTATTCAGGATCATCTAACTCCTGAGCTTTGAATATT
dd 31	ATGAAAATTGTGATTATTCAGGATCATCTAACTCCTGAGCTTTGAATATT
cDNA 351	GTTCTAGCAATTTGATGTTTTACTTCTTCTGATATCACTGTTAATGTGAG
dd 81	GTTCTAGCAATTTGATGTTTTACTTCTTCTGATATCACTGTTAATGTGAG
cDNA 401	AGAAGTAATTAAGTGAATAATGACAGTAGATAATTCATTTGTCTCAAAT
dd 131	ACAAGTAATTAAGTGAATAATGACAGTTGATAATTCATTTGCG
	Klonierungsstelle
cDNA 451	TATTCGAGTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGGGG

### B) Vergleich der Nukleotidsequenzen des cDNA-Klons c903-2 (*S. t.*) und der 25S rRNA aus Tomate (Acc. No. LE25SRIB, **blau**)

Dargestellt ist der 5`-Bereich der cDNA in 5´-3´ Orientierung.

Die Zahlenangaben beziehen sich auf das jeweils erste Nukleotid der Zeile, Bindestriche symbolisieren Lücken.

	Klonierungsstelle
<i>S. t.</i> 1	GAATTCGCGGCCGCTGTTTCGCTGGATAGTAGACAGGGACAGTGGGAATC
<i>L. e.</i> 1	gtttcgctggatagtagacagggacagtgggaatc
<i>S. t.</i> 51	TCGTTAATCCATTCATGCGCTCACTAATTAGATGACGAGGCATTTGGCT
<i>L. e.</i> 36	tcgttaatccattcatgcgctcactaattagatgacgaggcatttggct
<i>S. t.</i> 101	ACCTTAAGAGAGTCATAGTTACTCCCGCCGTTTACCCGCGCTTGGTTGAA
<i>L. e.</i> 86	accttaagagagtcatagttactcccgccgtttaccgcgcttggttgaa
<i>S. t.</i> 151	TTTCTTCACTTTGACATTCAGAGCACTGGGCAGAAATCACATTGCGTAAA
<i>L. e.</i> 136	tttct-cactttgacattcagagcactgggcagaaatcacattgcgtaaa
<i>S. t.</i> 201	CATCCGTTGGGACCATCGCAATGCTTTGTTTTAATTAACAGTCGGATTTC
<i>L. e.</i> 186	catccgttgggaccatcgcaatgctttgTTTTAATTAACAGTCGGATTTC

S. t. 251 L. e. 236	CCCTTGTCGGTACCAGTTCTGAGTTGGCTGTTTCGACGCCCGGGGAAGGCC cccttggtccgtaccagttctgagttggctgttcgacgcccggggaaggcc
S. t. 301 L. e. 286	CCCGAAG-AACCGTTCCCAGTCCGTCCCCCGGCCGGCACGCGGGCAGCCCG cccgaaggaaccggtcccagtcggtccccggccggcagcggcgaccgg
S. t. 351 L. e. 336	CTCTCGCCGCGGGAGCAGCTCGAGCAGTCCACCGACAGCCGACGGGTTCG ctctcgccgcgggagcagctcgagcgatccaccgacagccgacgggttcg
S. t. 401 L. e. 386	GGACTGGGACCCCCGTGCCAGCCCTCAGAGCCAATCCTTTTCCCGAAGT ggactgggacccccgtgccagccctcagagccaatccttttcccgaagt
S. t. 451 L. e. 436	TACGGATCCATTTTGCCGACTTCCCTTGCCCTACATTGTTCCATCGACCAG tacggatccatTTTgccgacttcccttgccctacattgttccatcgaccag
S. t. 501 L. e. 486	AGGCTGTTACCTTGGAGACCTGATGCGGTTATGAGTACGACCGGGCGTG aggctgttaccttggagacctgatgcggttatgagtacgaccgggctg
S. t. 551 L. e. 536	GACGGCATTTCGGTCTCCGG-ATTTTCAAGGGCCCGGGAGCGCACCCGG gaacgcattcgggtcctccggaatTTTcaagggccgcccgggagcgcaccgg
S. t. 601 L. e. 586	ACACCACGCGA-CGTGCGGTGCTCTTCCAGCCGCTGGACCCTACCTCCGG acaccacgagaccgtgcggtgctcttccagccgctggaccctacctccgg
S. t. 651 L. e. 636	CTGAGCCGATTCCAGGGTGGGCAGGCTGTTAAACAGAAAAGATAACTCTT ctgagccgattccagggtgggcaggctgTTAAACAGAAAAGATAACTCTT
S. t. 701 L. e. 686	CCCGAGGCTCCCGCCGACGTCTCCGGACTTCCCTAACGTTGCCGTCAACCG cccgaggctcccgcgacgtctccggacttccctaacgTTGCCGTCAACCG
S. t. 751 L. e. 736	CCACGTCCCGGTTTCAGGAATTTTAACCCGATTCCCTTTCGGAGTACGCGC ccacgtcccggttcaggaatTTTAACCCGATTCCCTTTCGGAGTACGCGC
S. t. 801 L. e. 786	GAAACGC-TAATCTGTTCGGGTTCCCCGACCCTTAGGATCGACTAAACCA gaaacgcgctatctgtcggggttccccgacccttaggatcgactaaccCA
S. t. 851 L. e. 836	TGTGCAAGTGCCGTTACATGGAACCTTCCCCTCTTCGGCCTTCAAAGTT tgtgcaagtGCCGTTACATGGAACCTTCCCCTCTTCGGCCTTCAAAGTT
S. t. 901 L. e. 886	CTCATTGGAATATTTGTTATAACACCAAATT ctcatttgaatatt

C) Vergleich der Nukleotidsequenzen des cDNA-Klons c903-2 (*S. t.*), der mRNA Sequenz des *A. thaliana* Proteins T10I14.140 (Acc. No. AF325008, [blaugrün](#)) und der 26S rRNA aus *Myriophyllum exalbescens* (Acc. No. AF274655, [blau](#))

Dargestellt ist der 3'-Bereich der cDNA in 3'-5' Orientierung.  
Die Zahlenangaben beziehen sich auf das jeweils erste Nukleotid der Zeile, Bindestriche symbolisieren Lücken.



D) Vergleich der Nukleotidsequenzen der cDNA-Klone F(A) 9-1c, e, g, h, i, j, k, l, m, n, des RFDD Fragments F(A) 9-1 (RFDD) und der mRNA einer Phosphatmangel-induzierten sauren Phosphatase aus *L. esculentum* (ACC. No. AF305968) (LEPS2)

rot markiert Start- und Stopcodons

\* Übereinstimmung aller cDNA-Sequenzen mit der Sequenz des RFDD-Fragments und der mRNA der Phosphatmangel-induzierten sauren Phosphatase *L. esculentum*

Bindestriche symbolisieren Lücken, die Zahlenangaben rechts zeigen das letzte Nukleotid der jeweiligen Zeile an.

LEPS2	-----CTTTTCTCGTCTCT-----AATTTACTCA	24
RFDD	-----	
c	-----	
e	-----	
g	TGAACAACAAACAGAGGTCTTCTCTCTTTTCTCGTCTCTAATTCCTCCATAATTTAATCA	60
h	-----	
i	-----	
j	TCAACAACAAACAGAGGTCTTCTCTCTTTTCTCGTCTCTAATTCCTCGACAATTTAATCA	60
k	-----	
l	-----	
m	-----	
n	TCAACAACAAACAGAGGTCTTCTCTCTTTTCTCGTCTCTAATTCCTCGATAATTTAATCA	60
LEPS2	AAAAA---ATGGCTGGAATTGTAGTGGTTTTCGACTTTGACAAGACAATTATTGAGGTGG	81
RFDD	-----	
c	-----	
e	-----	
g	AAAAAAGAATGGCTGGAATTGTAGTGGTTTTCGACTTTGACAAGACGATTATCGATGTGG	120
h	-----	
i	-----	
j	AAAAA-GAATGGCTGGAATTGTAGTGGTTTTCGACTTTGACAAGACGATTATCGATGTGG	119
k	-----	
l	-----	
m	-----	
n	AAAAA-GAATGGCTGGAATTGTAGTGGTTTTCGACTTTGACAAGACGATTATCGATGTGG	119
LEPS2	ATAGTGATAATTGGGTGGTGGATGAGTTAGGCGCCACTGATTTGTTCAATCAACTTCTCC	141
RFDD	-----	
c	-----	
e	-----	
g	ATAGTGATAATTGGGTGGTGGATGAGTTAGGCGCCACTGATTTGTTCAATCAGCTTCTCC	180
h	-----	
i	-----	
j	ATAGTGATAATTGGGTGGTGGATGAGTTAGGCGCCACTGATTTGTTCAATCAGCTTCTCC	179
k	-----	
l	-----	
m	-----TGATGAGTTAGGCGCCACTGATTTGTTCAATCAGCTTCTTC	41
n	ATAGTGATAATTGGGTGGTGGATGAGTTAGGCGCCACTGATTTGTTCAATCAGCTTCTTC	179
LEPS2	CTACTATGCCATGGAACCTCTCTCATGGATAGAAT-GATGAAGGAGCTTCATACACAAGGC	200
RFDD	-----	
c	-----TCGAGGC	7
e	-----TCAA-----	4
g	CCACTATGCCATGGAACCTCACTCATGGATAGAAT-GATGAACGAACTTCATACACAAGGC	239
h	-----	
i	-----	
j	CCACTATGCCATGGAACCTCTCTCATGGATAGAAT-GATGAACGAACTTCATACACAAGGC	238
k	-----	
l	-----	
m	CCACTATGCCATGGAACCTCTCTCATGGATAGAAT-GATGAAGGAGCTTCATACACAAGGC	100
n	CCACTATGCCATGGAACCTCTCTCATGGATAGAATTGATGAAGGAGCTTCATACACAAGGC	239

```

LEPS2      AAAACAATACAAGACATTGAAGAGGTAAGGTTCCCATACACCCAGGATTGTT      260
RFDD      -----GGCTT---      5
c      AAAACGATACAAGACATTGAAGAGGTAAGGTTCCCATACACCCTAGGATTGTT      67
e      -----GTACTGAAACGGGCACCCGTAATTCCTCGGTTGTT      40
g      AAAACAATACAAGACATTGAAGAGGTAAGGTTCCCATACACCCTAGGATTGTT      299
h      -----
i      -----TTACACCCTAGGATTGTT      18
j      ATAACAATACAAGATATTGAAGAGGTAAGGTTCCCATACATCCTAGGATTGTT      298
k      -----
l      -----
m      AAAACGATACAAGACATTGAAGAGGTAAGGTTCCCATACACCCTAGGATTGTT      160
n      AAAACGATACAAGACATTGAAGAGGTAAGGTTCCCATACACCCTAGGATTGTT      299

LEPS2      CCGGCTATTAAATCAGCTCATGCATTAGGGTGTGATTTGAGAGTAATTAGCGATGCAAAAT      320
RFDD      -----ATG-----      8
c      CCAGCTATTAAATCAGCTTATGCATTAGGGTGTGATTTGAGAGTAATAAGCGATGCAAAAT      127
e      CCCGCCATTAAAGCTGCTCATGCTTTAGGGTGTGATTTGAGAGTAATAAGCGATGCAAAAT      100
g      CCAGCTATTAAATCAGCTTATGCATTAGGGTGTGATTTGAGAGTAATAAGCGATGCAAAAT      359
h      -----
i      CCAGCTATTAAATCAGCTTATGCATTAGGGTGTGATTTGAGAGTAATAAGCGATGCAAAAT      78
j      CCAGCTATTAAATCAGCTTATGCATTAGGGTGTGATTTGAGAGTAATAAGCGATGCAAAAT      358
k      -----
l      -----
m      CCAGCTATTAAATCAGCTTATGCATTAGGGTGTGATTTGAGAGTAATAAGCGATGCAAAAT      220
n      CCAGCTATTATTTAGCTTATGCATTAGGGTGTGATTTGATAGTTATAAGCTATGCAAAAT      359

LEPS2      GTATTCTTCATCGAAACAATATTGAAACATCTCGGAATCAGGGATTGTTTTCTGAGATC      380
RFDD      -----AGTC-----CTGA---C      17
c      GTATTCTTCATTGAAACAATCTTGAACATGTCGGAATTAGGGATTGTTTTCTGAGATC      187
e      CTCTTCTACATCGAGACGATTTTGAATCATCTGGAATAAGTGATTCACCGAGATC      160
g      GTATTCTTCATTGAAAGCTATTTTGAACATCTCGGAATTAGGGATTGTTTTCTGAGATC      419
h      -----TGATTGTTTTCTGAGATC      19
i      GTATTCTTCATTGAAACAATCTTGAACATGTCGGAATTAGGGATTGTTTTCTGAGATC      138
j      GTATTCTTCATTGAAACAATCTTGAACATGTCGGAATTAGGGATTGTTTTCTGAGATC      418
k      -----
l      -----TC-----      2
m      GTATTCTTCATTGAAACAATCTTGAACATGTCGGAATTAGGGATTGTTTTCTGAGATC      280
n      GTATTCTTCATTGATACAATCTTGAACATGTCGGAATTAGGGATTGTTTTCTGATATC      419

LEPS2      AACACCAATCCAGGCTACGTCGATGGGAAGGCAGGCTTCGAATCCTCCCTTATGTTGAT      440
RFDD      -----CGAATCTCCCTTGTGTTGAT      38
c      AACACCAATCCAGGCTACGTCGATGAAGAAGGCAGGCTTCGAATCTCCCTTGTGTTGAT      247
e      AACACCAATCCAGGCTACGTTGATGAAGAAGGAAAACCTTAGAATCCGTCCTCACCATGAT      220
g      AATACGAATCCAGGCTACGTCGATAAAGAAGGCAGGCTTCGAATCCTCCCTTATGTTGAT      479
h      AACACCAATCCAGGCTACGTCGATGAAGAAGGCAGGCTTCGAATCTCCCTTGTGTTGAT      79
i      AACACCAATCCAGGCTACGTCGATGAAGAAGGCAGGCTTCGAATCCTCCCTTATGTTGAT      198
j      AACACGAATCCAGGCTACGTCGATGAGGAAGGCAGGCTTCGAATCCTCCCTTATGCTGAT      478
k      -----TGTTGAT      7
l      -----GTCGATAAAGAAGGCAGGCTTCGAATCCTCCCTTATGTTGAT      44
m      AACACCAATCCAGGCTACGTCGATGAAGAAGGCAGGCTTCGAATCCTCCCTTGTGTTGAT      340
n      AACACCAATCCAGGCTACGTCGATGAAGAAGGCAGGCTTCGAATCCTCCCTATTGTTGAT      479
      ****

LEPS2      TTTCAAAAATCCCCTCATAGTTGCA-----ATCTCTGCCCTCCCAACATGTGCAAGGGT      494
RFDD      TTTATAACATCCCCTCATGGCTGCA-----ATCTCTGCCCTCCCAACATGTGCAAGGGC      92
c      TTTATAACATCCCCTCATGGCTGCA-----ATCTCTGCCCTCCCAACATGTGCAAGGGC      301
e      TTTACACCTCCTCTCATGGCTGCAGCTCCAATACTTGCCTCCCAACATGTGCAAGGGG      280
g      TTTCAAAACATCCCCTCATGGTTGCA-----ATCTCTGCCCTCCCAACATGTGCAAGGGT      533
h      TTTATAACATCCCCTCATGGCTGCA-----ATCTCTGCCCTCCCAACATGTGCAAGGGC      133
i      TTTCAAAACATCCCCTCATGGATGCA-----ATCTCTGCCCTCCCAACATGTGCAAGGGT      252
j      TTTCAAAAATCCCCTCATGGATGCA-----ATCTCTGCCCTCCCAACATGTGCAAGGGT      532
k      TTTATAACATCCCCTCATGGCTGCA-----ATCTCTGCCCTCCCAACATGTGCAAGGGC      61
l      TTTCAAAACATCCCCTCATGGTTGCA-----ATCTCTGCCCTCCCAACATGTGCAAGGGT      98
m      TTTATAACATCCCCTCATGGCTGCA-----ATCTCTGCCCTCCCAACATGTGCAAGGGC      394
n      TTTTAAACATCCCCTCATGGATGCT-----ATCTCTGCCCTCCCAACATGTGCAAGGGT      533
      *** * *** ***** * *** ** *****

```

LEPS2	ATGATAGTAGAGAGAATTCAAGC-----TAAGGAAGGGAAGAGAAGAAATGATTTAT	545
RFDD	ACGATAGTAGAAAAGAATTCAAGCCAGCATGGCTAAAGAAGGGAAGAAAAGAATGATCTAT	152
c	ACGATAGTAGAAAAGAATTCAAGCCAGCATGGCTAAAGAAGGGAAGAAAAGAATGATCTAT	361
e	CTAGTAATAGAAAAGAATCAAGCTTCATTTGGCTATGGAAGGGAAGAAAAGAATGATTTAT	340
g	AGGATAGTAAAGAGAATTCAAGCCATCTTGGCTAAGGAAGGGAAGAAAAGAATGATCTAT	593
h	ACGATAGTAGAAAAGAATTCAAGCCAGCATGGCTAAAGAAGGGAAGAAAAGAATGATCTAT	193
i	ATGATAGTAGAGAGAATTCAAGCCATCTTGGCTAAGGAAGGGAAGAAAAGAATGATCTAT	312
j	ACGATAGTAGAAAAGAATTCAAGCCAGCATCCCTAAAGAAGGGAAGAAAAGAATGATCTAT	592
k	ACGATAGTAGAAAAGAATTCAAGCCAGCATGGCTAAAGAAGGGAAGAAAAGAATGATCTAT	121
l	AGGATAGTAAAGAGAATTCAAGCCATCTTGGCTAAGGAAGGGAAGAAAAGAATGATCTAT	158
m	ACGATAGTAGAAAAGAATTCAAGCCAGCATGGCTAAAGAAGGGAAGAAAAGAATGATCTAT	454
n	ATGATAGTAGATATATTTCTAGCCATCTTGGCTAAGGAAGGGAAGATAAGAATGATCTAT	593
	* *	
LEPS2	CTAGGCGATGGAATCGGGGATTTCTGCCCCAGTTTGAAGCTGAGGGAAGCAGATTTTGTG	605
RFDD	CTAGGTGATGGAATCGGGGATTTCTGTCCCAGTTTGAAGCTCATGGAAACAGATTTTGTG	212
c	CTAGGTGATGGAATCGGGGATTTCTGTCCCAGTTTGAAGCTCATGGAAACAGATTTTGTG	421
e	CTCGGTGACGGAGCAGGAGATTTTGTCCAAGCTTGAAGCTGAAAAGCAGATTTTGTG	400
g	CTAGGCGATGGAATCGGGGATTTCTGCCCCAGTTTGAAGCTAAGGGAAGGAGATTTTGTG	653
h	CTAGGTGATGGAATCGGGGATTTCTGTCCCAGTTTGAAGCTCATGGAAACAGATTTTGTG	253
i	CTAGGCGATGGAATCGGGGATTTCTGCCCCAGTTTGAAGCTGAGGGAAGGAGATTTTGTG	372
j	CTAGGTGATGGAATCGGGGATTTCTGTCCCAGTTTGAAGCTCATGGAAACAGATTTTGTG	652
k	CTAGGTGATGGAATCGGGGATTTCTGTCCCAGTTTGAAGCTCATGGAAACAGATTTTGTG	181
l	CTAGGCGATGGAATCGGGGATTTCTGCCCCAGTTTGAAGCTAAGGGAAGGAGATTTTGTG	218
m	CTAGGTGATGGAATCGGGGATTTCTGTCCCAGTTTGAAGCTCATGGAAACAGATTTTGTG	514
n	CTAGGCGATGGAATCGGGGATTTCTGCCCCAGTTTGAAGCTGAGGGAAGGAGATTTTGTG	653
	* *	
LEPS2	ATGCCAAGAAAAGATTTCCAGCCTGG-AATTTGATAAATAAAAAACAGGACACTAGTAAA	664
RFDD	ATGCCAAGAAAAGATTTCCAGCCTGG-AATTTGATAA-TAAAAACAGGACACTAGTAAA	270
c	ATGCCAAGAAAAGATTTCCAGCCTGG-AATTTGATAAATAAAAAACAGGACACTAGA---	477
e	ATGCCAAGAAAAGATTTCCCTGTCTGG-AAATTAATAAATGAAAATCGCGATCTCGTAAA	459
g	ATGCCAAGAAAAGATTTCCAGCCTGG-AATTTGATAAATAAAAAACAGGACACTAGTAAA	712
h	ATGCCAAGAAAAGATTTCCAGCCTGG-AATTTGATAAATAAAAA-----	298
i	ATGCCAAGAAAAGATTTCCAGCCTGG-AATTTGATAAATGAAAACAGGAGACTAGTAAA	431
j	ATGCCAAGAAAAGATTTCCAGCCTGGGAATTTGATAAATAAAAAACAGGACA-----	704
k	ATGCCAAGAAAAGATTTCCAGCCTGG-AATTTGATAA-----	219
l	ATGCCAAGAAAAGATTTCCAGCCTGG-AATTTGATAAATAAAAAACAGGACACTAGTAAA	277
m	ATGCCAAGAAAAGATTTCCAGCCTGG-AATTTGATAAATAAAAAACAGGACACTAGTAAA	573
n	ATGCCAAGAAAAGATTTCCAGCCTGG-AATTTGATAAATGAAAACAGGAGACTAGTAAA	712
	* *	
LEPS2	AGCAGGGGTCCACGAGTGGACCAACGGCAAGAACTTGAACACATTTTGCTACAATGGAT	724
RFDD	AGCAACTGTCCACGAGTGGACTGATGGGCAAGAATTCGGG----T-----	311
c	-----	
e	AGCAGAGATCCATGGGTGGAGTATGGAGAAGGCAAGAACACATTTCTGCTTACAGATAAT	519
g	AGCAGCTGTCCACGAGTGGACTGATGGGGAAGAACTCGAGCGAATTTCTGCTACAATAAT	772
h	-----	
i	AGCAGCGGTCCACGAGTGGACTGATGGGGAAGAACTGGAGAACATTTCTGCTACAATAAT	491
j	-----	
k	-----	
l	AGCAGCTGTCCACGAGTGGACTGATGGGGAAGAACTCGAGCGAATTTCTGCTACAATAAT	337
m	AGCAACTGTCCACGAGTGGACTGATGGGCAAGAATTCGAGA-----	614
n	AGCAGCGGTCCACGAGTGGACTGATGGGGAAGAACTGGAGAACATTTCTGCTACAATAAT	772
LEPS2	CAACACAATCAACATTGAAGAAAGCCAATTGTTATCAATGGAGAATTGCAAATTCAGAC	784
RFDD	--ACGCAGTCTAC-----GAGA-CCAGT-----	331
c	-----	
e	CAAAACGATTTCCATGGAAGATAATCAATTTTTATCGGTTGA--T-TGCAAGTTTCAGAC	576
g	CAACACAATCAACATTGAAGAAAGCCA-----	799
h	-----	
i	CAACACAATCAACATTGAAGAAAGCCAATTGTTATCACTCGAGTACTGA-----	540
j	-----	
k	-----	
l	CAACACAATCAACATTGAAGAAAGCCAATTGTTATCATTGGAGTTCTGCAAATTCAGAC	397
m	-----	
n	CAACACAATCAACATTGAAGAAAGCCAATTGTTATCACTCGAGTACTGCAAATTCAGAC	832

LEPS2	GAAACA---CAATGCAGCTCATGGAGCCTTGCCACGGCCTCTTCCAGTACCTTACTAAAT	841
RFDD	-----	
c	-----	
e	GATTCGGATCAATGCAGTTCATGAAGCCATGCCAAAAGCTCTCCCTGTGCCTTACTAATT	636
g	-----	
h	-----	
i	-----	
j	-----	
k	-----	
l	GATACC---CAAAGCAGCTCATGGAGCCTTGCCACAGGCTCTTCCCTGTGCCTTACTGAAT	454
m	-----	
n	AATAGC---CAAACCAGC-----CTTACCACGGGCTCTTCCAGTGCCTTACTAAAT	880
LEPS2	A--CTAATGGCTACAAGATTATTGTACTTTGTTTTGTACGTATGACATGTTTACTATCAA	899
RFDD	-----	
c	-----	
e	AAGCAAAAGTTAAACTG-----TGACAATAATTAAGAGTTGGCTTTAAT	681
g	-----	
h	-----	
i	-----	
j	-----	
k	-----	
l	A--CTAATGGCAAAT-----	467
m	-----	
n	A--CTAATGGGTTTC-GAAATTTTGTGTTGGTCTTGAATTAAAAATAAGTTAAATATATC	937
LEPS2	AACTTAAAAAATACTACTATTTGCCATAAAAAAAAAAAAAAAAA-----	942
RFDD	-----	
c	-----	
e	TACTTGTA-----TTTATGGTTTTATTGAAA-----	709
g	-----	
h	-----	
i	-----	
j	-----	
k	-----	
l	-----CATCAACATGAAGAAAGAA-----	486
m	-----	
n	AAATTATTTTAAATCTTGTGATATTAACATGTCACGTGCAAAATAGGAATTATCAAGTT	997
LEPS2	-----	
RFDD	-----	
c	-----	
e	-----	
g	-----	
h	-----	
i	-----	
j	-----	
k	-----	
l	-----	
m	-----	
n	GCTAAAAAGGAAATGAGTCACTCATTT	1024

E) Nukleotidsequenz des cDNA-Klons PCR gl-3

**rot** markiert                      Start- bzw. Stopcodon  
hervorgehoben                  Restriktionsschnittstellen  
*kursiv*                              generierte Primer mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen

Klonierungsstelle    *Primer mit Bam HI-Schnittstelle*

**GAATTC**GGCTTCTCGAG**GGATCC****ATG**GGCTGGAATTGTAGTGTTTTTTCGACT  
TTGACAAGACGATTATCGATGTGGATAGTGATAATTGGGTGGTGGATGAG

Nco I

TTAGGCGCCACTGATTTGTTCAATCAGCTTCTCCCCACTATG**CCATGG**AA  
CTCACTCATGGATAGAATGATGAACGAACCTCATAACACAAGGCAAAACAA  
TACAAGACATTGAAGAGGTACTGAAACGGGTTCCCATACACCCTAGGATT  
GTTCCAGCTATTAATCAGCTTATGCATTAGGGTGTGATTTGAGAGTAAT  
AAGCGATGCAAATGTATTCTTCATTGAAGCTATTTTGAAACATCTCGGAA  
TTAGGGATTGTTTCTCTGAGATCAATACGAATCCAGGCTACGTCGATAAA  
GAAGGCAGGCTTCGAATCCTTCCTTATGTTGATTTTCAAACATCCCCTCA  
TGGTTGTAATCTCTGCCCTCCCAACATGTGCAAGGGTAGGATAGTAAAGA

Eco RI                      Bgl II

**GAATTC**AAGCCATCT**TTGG**CTAAGGAAGGGAAGAAAAGAATGATCTATCTA  
GGCGATGGAATCGGCGATTTCTGCCCCAGTTTGAAGCTAAGGGAAGGAGA  
TTTGTGATGCCAAGAAAAGATTTCCCAGCCTGGAATTTGATAAACAAAA

Spe I

ACAGGAC**ACTAGT**AAAAGCAGCTGTCCACGAGTGGACTGATGGGGAAGAA

Xho I                      Eco RI

**CTCGAGCGAATTC**TGCTACAACATAACACAATCAACATTGAAGAAA  
CCAATTGTTATCATTGGAGTTCTGCAAATTCAGACGATACCCAAAGCAG

*Primer mit Hind III Schnittstelle*

CTCATGGAGCCTTGCCACAGGCTCTTCTGTGCCTTACT**TGAAGCTT**CTA  
GAAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGG

F) Nukleotidsequenz der putativen sauren Phosphatase (PCR gl-3) im  
Expressionsvektor pRSET A

**rot** markiert                      Startcodons  
hervorgehoben                  Restriktionsschnittstellen  
*kursiv*                              Histidin-Anker

AAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAACAT**ATG**CGGGGTTCTC  
*HIS-Tag*

*ATCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATG*

Bam HI

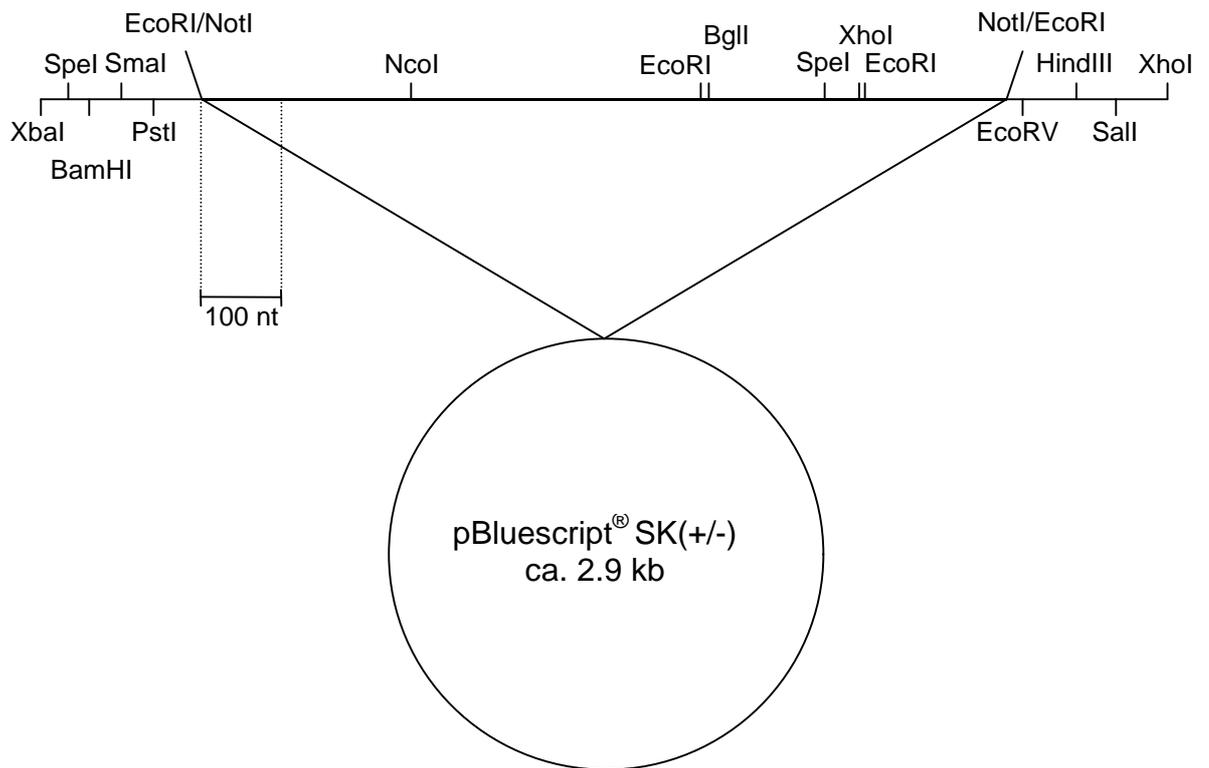
GGTCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCGATGG**GGATCC****ATG**GC  
TGGAATTGTAGTGTTTTTTCGACTTTGACAAGACGATTATCGATGTGGATA  
GTGATAATTGGTGGTGGATGAGTTAGGCGCCACTGATTTGTTCAATCAG

Nco I

CTTCTCCCCACTATG**CCATGG**

Dargestellt ist lediglich der 5'-Bereich bis zur Nco I-Schnittstelle, da die Nukleotidsequenzen von PCR gl-3 im Vektor pCR®2.1 (s. Anhang 4 E) und im Expressionsvektor pRSET A identisch sind.

F) Plasmidkarte des Klons F(A) gl-3



## Anhang 5 Häufig verwendete Geräte

Zentrifugen Centrifuge 5415 C (Eppendorf)  
Centrifuge 5403 (Eppendorf; wurde verwendet, wenn nichts anderes angegeben)  
Sorvall® RC-5B (Du Pont Instruments)

Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)

Thermomixer 5436 (Eppendorf)

Vakuumtrockner speedvac SC 100 (Savant)

Sonifiziergerät Sonopuls HD 60 (Bandelin)

Taumler Polymax 1040 (Heidolph)

PCR-Gerät GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer)

Elektrophoresekammern Horizon® 11.14 (Life Technologies)  
Horizon® 58 (Life Technologies)  
Mini-PROTEAN® 3 Cell (BioRad)

Elektrophoresis Power Supply ST 606 T (Life Technologies)

UV-Transilluminator FotoPrep I (Biometra)

UV-Stratalinker 1800 (Stratagene)

Hybridisierungssinkubator 7601 (GFL)

Inkubationsschränke 3032 (GFL)  
Unitron (Infors AG Bottmingen)

Phospho Imager Storm 860 (Molecular Dynamics)

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, daß ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, September 2001

## Publikationsliste

### Vortrag

Systemically activated genes during SAR in potato-experience with DDRT-PCR.  
DFG Workshop on Differential Display (SPP 1005), MPI für Züchtungsforschung, Köln, 20.-  
21. 2. 1997

### Poster

Analysis of genes systemically activated during SAR in potato.  
9<sup>th</sup> International Congress "Molecular Plant-Microbe Interactions", Amsterdam, 25.-30. 7.  
1999

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem wissenschaftlichen Betreuer Herrn Prof. Dr. Dierk Scheel für die Überlassung der interessanten Thematik sowie für die gewährte Unterstützung, Förderung und Freiheit bei der Bearbeitung des Themas.

Zu außerordentlichem Dank bin ich Frau Dr. Sabine Rosahl verpflichtet, in deren Labor ich die Arbeiten durchführen konnte. In einer vertrauensvollen und freundschaftlichen Zusammenarbeit konnte sie mir durch ihre Kreativität und Kritik wertvolle Erfahrungen vermitteln und damit wissenschaftliches Denken fordern und fördern.

Großer Dank gilt Cornelia Göbel und Axel Schmidt für ihre Unterstützung und anregende Diskussionen sowie Catherine Kistner für die anschauliche Einführung in die Thematik. Mein Dank geht an alle Mitarbeiter der Abteilung Streß- und Entwicklungsbiologie, die durch ihre Anregungen sowie Schaffung eines angenehmen Arbeitsklimas zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, vor allem Markus Tschöpe, Heidi Zinecker, Thomas Kroj, Justin Lee, Magda Krzymowska, Frédérique Brunner, Guido Fellbrich, Nicole Goldhorn, Claudia Reh und Anja Grohnert.

Astrid Hunger danke ich für die zur Verfügung gestellten nahG-Pflanzen, Birgit Kemmerling für die zweijährige kollegiale Zusammenarbeit.

Besonders bedanke ich mich bei Jan Vogel, der durch seine Unterstützung wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ich danke Frau Angelika Weinel ganz herzlich, die mit ihren Erfahrungen eine große Hilfe bei allen Arbeiten im Labor war. Außerdem bedanke ich mich bei Frau Regina Weiß und Herrn Holger Bartz und den Mitarbeitern der Gärtnerei.

Diese Arbeit wurde im Rahmen des DFG-Schwerpunktprogramms „Genetische und molekulare Aufklärung von Prozessen der Merkmalsausprägung bei Nutzpflanzen“ angefertigt. Deshalb danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung.

## Lebenslauf

Name	Julia Petters
Geburtsdatum	26.06.1969
Geburtsort	Halle/Saale
Wohnort	Halle/Saale
Familienstand	ledig, keine Kinder

## Ausbildung

1976-1986	Oberschule "Adam-Kuckhoff" Halle/S.
1986-1988	Erweiterte Oberschule "Thomas-Müntzer" Halle/S., Abitur
1988-1989	Einjähriges Praktikum in der Zentral-Apotheke Halle-Neustadt
1989-1993	Pharmaziestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Okt. 1991	1. Staatsexamen nach Approbationsordnung
Okt. 1993	2. Staatsexamen nach Approbationsordnung
1993-1994	Pharmaziepraktikum in einer öffentlichen Apotheke in Leuna
1994-1995	Erarbeitung einer Diplomarbeit im Fachbereich Pharmazie der Universität Halle/S., Abt. Biochemie und Biotechnologie
Okt. 1994	3. Staatsexamen nach Approbationsordnung
1995-1996	Stipendiat nach Graduiertenförderungsgesetz des Landes Sachsen-Anhalt; Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Fachbereich Pharmazie der Universität Halle/S., Abt. Biochemie und Biotechnologie
1996-2000	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pflanzenbiochemie, Abt. Streß- und Entwicklungsbiologie; Erarbeitung einer Promotionsarbeit unter Betreuung von Prof. Dr. Dierk Scheel
seit 2001	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Fachbereich Pharmazeutische Biologie der Universität Halle/S.