

**Identifizierung und Charakterisierung
systemisch responsiver Gene der Kartoffel
(*Solanum tuberosum* L.)
nach Inokulation mit dem nichtpathogenen Bakterium
Pseudomonas syringae pv. *maculicola***

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 Birgit Kemmerling

geb. am 09.03.1970
in Warburg/Westf.

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dierk Scheel
2. Prof. Dr. Jean-Pierre Metraux
3. Prof. Dr. Holger B. Deising

Halle (Saale), den 6. September 2001

urn:nbn:de:gbv:3-000002866

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000002866>]

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Pflanzen und ihre Interaktion mit Mikroorganismen	2
1.2	Pflanzliche Resistenzmechanismen	2
1.2.1	Präformierte Abwehr	3
1.2.2	Induzierbare Abwehrreaktionen	3
1.3	Pathogenperzeption und Signaltransduktion	3
1.4	Erworbene Resistenz	7
1.4.1	Salizylat-abhängige erworbene Resistenz	8
1.4.2	Salizylat-unabhängige erworbene Resistenz	10
1.4.3	Signaltransduktionsnetzwerke erworbener Resistenz	10
1.5	SAR in Kartoffel	11
1.5.1	Das systemisch responsive Gen <i>sre 2</i>	12
1.6	Ziele der Arbeit	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Verwendete Materialien	14
2.1.1	Chemikalien	14
2.1.2	Nährmedien	14
2.2	Pflanzenmaterialien und Anzuchtbedingungen	15
2.2.1	Pflanzenanzucht aus Kartoffelknollen	15
2.2.2	Pflanzenanzucht aus Gewebekultur	16
2.2.3	Inokulation mit SAR-induzierenden Bakterien	16
2.2.4	Analyse des Bakterienwachstums <i>in planta</i>	16
2.2.5	Phytohormonbehandlungen	17
2.2.6	Verwundung und andere abiotische Stressfaktoren	17
2.2.7	Agrobakterien vermittelte Pflanzentransformation	17
2.3	Molekularbiologische Techniken	18
2.3.1	Allgemeine Grundtechniken der Nukleinsäureanalytik	18
2.3.1.1	Verwendete Bakterienstämme	18
2.3.1.2	Verwendete Plasmide	19
2.3.1.3	Klonierung von DNA-Fragmenten	19
2.3.1.4	Bakterientransformation (<i>E. coli</i>)	19
2.3.1.5	Agrobakterientransformation	20
2.3.1.6	Konzentrationsbestimmungen	20
2.3.1.7	Agarosegelelektrophorese	20
2.3.1.8	Polyacrylamidgelelektrophorese	21
2.3.2	RNA-Isolation	21
2.3.2.1	Isolation von Gesamt-RNA	21
2.3.2.2	Isolation von Poly(A) ⁺ -RNA	22
2.3.3	DNA-Isolation	22
2.3.3.1	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien (<i>E. coli</i>)	22
2.3.3.2	Isolation von genomischer DNA aus Pflanzen	23
2.3.3.3	Isolation von DNA aus λ-Phagen	23

2.3.3.4	Isolation von Plasmid-DNA aus Agrobakterien	23
2.3.3.5	Reinigung von DNA-Fragmenten	24
2.3.4	Markierung von Nukleinsäure-Fragmenten	24
2.3.4.1	Radioaktive Markierung	24
2.3.4.2	Nichtradioaktive Markierung	24
2.3.5	DNA-Hybridisierungsexperimente (Southern)	24
2.3.6	RNA-Hybridisierungsexperimente (Northern)	25
2.3.6.1	Radioaktive Hybridisierungsexperimente	25
2.3.6.2	Nichtradioaktive Hybridisierungsexperimente	25
2.3.7	<i>Differential Display</i>	25
2.3.7.1	Klassisches <i>Differential Display</i> (Liang und Pardee, 1992)	25
2.3.7.2	<i>Enhanced Differential Display</i>	26
2.3.8	Reverse Northern	26
2.3.9	RT-PCR	26
2.3.10	RACE	27
2.3.11	Herstellung von cDNA-Bibliotheken	27
2.3.12	Durchsuchen von cDNA-Bibliotheken	27
2.3.13	<i>Genome Walking</i>	28
2.3.14	Sequenzierung von DNA	28
2.3.14.1	Radioaktive Sequenzierung (Sanger <i>et al.</i> , 1977)	28
2.3.14.2	Nichtradioaktive, automatisierte Sequenzierung	28
2.3.15	Computergestützte Sequenzdatenverarbeitung	28
2.3.16	Herstellung von Expressionsplasmiden	28
2.3.17	Expression von rekombinantem Protein in Bakterien	29
2.4	Proteinanalytik	29
2.4.1	Proteinisolation aus Pflanzen und Bakterien	29
2.4.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	29
2.4.3	Proteinfärbungen	29
2.4.3.1	Coomassiefärbung	29
2.4.3.2	Fast Green Färbung	29
2.4.4	Peptidsynthese	30
2.4.5	Western-Analysen	30
3	Ergebnisse	31
3.1	Identifizierung systemisch responsiver Gene	31
3.1.1	(<i>Enhanced</i> -) <i>Differential Display</i>	31
3.1.2	Identifizierte cDNA-Fragmente	31
3.1.2.1	<i>Enhanced Differential Display</i>	31
3.1.2.2	<i>Differential Display</i>	33
3.2	Charakterisierung von <i>sre 3</i>	35
3.2.1	Überprüfung der Transkriptakkumulation von <i>sre 3</i>	35
3.2.2	Genomische Organisation von <i>sre 3</i>	36
3.3	Charakterisierung von <i>sre 4</i>	37
3.3.1	Amplifizierung längerer cDNA-Fragmente mittels 5'- und 3'-RACE	37
3.3.2	Amplifizierung der Gesamt-cDNAs mittels RT-PCR	38

3.3.3	Struktur der verschiedenen cDNAs des Gens <i>sre 4</i>	39
3.3.4	Charakteristika der kodierten Proteine Sre 4-p1 bis 4	41
3.3.4.1	Primärstruktur	41
3.3.4.2	3D-Struktur.....	41
3.3.4.3	Intrazelluläre Lokalisation	42
3.3.5	Sequenzhomologien zu <i>sre 4</i> aus Datenbanken	43
3.3.5.1	Sequenzhomologe Gene/Proteine zu <i>sre 4</i> /Sre 4	43
3.3.5.2	Homologe Proteine zu Sre 4 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	44
3.4	Genomische Struktur des Gens <i>sre 4</i>	44
3.4.1	Southern-Blot-Analyse zur Bestimmung der Kopienzahl im Genom.....	44
3.4.2	Klonierung des genomischen Bereiches des Gens <i>sre 4</i>	45
3.4.3	Promotoranalyse	45
3.5	Expressionsanalyse des Gens <i>sre 4</i>	47
3.5.1	Transkriptakkumulation nach Bakterieninfiltration.....	48
3.5.1.1	Northern-Experimente.....	48
3.5.1.2	RT-PCR	49
3.5.2	Organspezifische Expression von <i>sre 4</i>	50
3.5.3	Circadiane- bzw. Licht/Dunkel-Rhythmik des mRNA-Niveaus.....	50
3.5.4	Effekte von Verwundungen auf die Transkriptmenge von <i>sre 4</i>	51
3.5.5	Einfluss der Behandlung mit Phytohormonen auf die <i>sre 4</i> Expression	52
3.5.5.1	Salizylat.....	52
3.5.5.2	Abszinsinsäure.....	53
3.5.5.3	Methyljasmonat und Ethylen.....	54
3.5.6	Änderung der Expression durch osmotischen Stress, Kälte und Trockenheit	54
3.6	Charakterisierung des Proteins Sre 4	56
3.6.1	Heterologe Expression des Proteins Sre 4-p1 in Bakterien	56
3.6.2	Analyse der Proteinexpression in Kartoffelpflanzen.....	57
3.7	Überexpression von <i>sre 2</i> in Kartoffelpflanzen.....	58
3.7.1	Charakteristika des Gens <i>sre 2</i>	58
3.7.2	Generierung transgener <i>sre 2-sense</i> - und <i>antisense</i> -Pflanzen	58
3.7.3	Analyse der transgenen <i>sre 2</i> -Pflanzen	59
3.7.3.1	Southern-Blot Analyse	59
3.7.3.2	Northern-Blot- und RT-PCR-Analyse.....	60
3.7.4	Analyse der transgenen <i>sre 2</i> -Pflanzen nach Bakterieninfiltration.....	62
3.7.4.1	Makroskopische Beobachtungen.....	62
3.7.4.2	Vergleich des Bakterienwachstums in Wildtyp- und transgenen Pflanzen	63
4	Diskussion.....	65
4.1	DDRT-PCR als Methode zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene	65
4.1.1	Erfahrungen im System Kartoffel	66
4.1.1.1	<i>Enhanced</i> contra klassisches <i>Differential Display</i>	66
4.1.1.2	Identifizierte Fragmente differentiell exprimierter cDNA	67
4.1.2	Alternativen	67

4.2	Charakterisierung des Gens <i>sre 3</i>	68
4.3	Charakterisierung des Gens <i>sre 4</i>	69
4.3.1	Aufklärung der Genstruktur von <i>sre 4</i>	69
4.3.2	Sequenzähnlichkeiten zu anderen Genen/Proteinen	70
4.3.3	Die kodierenden Bereiche	71
4.3.4	Analyse der putativen Proteine	72
4.4	Regulation der Genexpression von <i>sre 4</i>	73
4.4.1	Änderungen der <i>sre 4</i> -Transkriptmengen nach Bakterieninfiltration	73
4.4.2	Änderungen der <i>sre 4</i> -Transkriptmengen nach Verwundung	74
4.4.3	Änderungen der <i>sre 4</i> -Transkriptmengen durch Umwelteinflüsse	74
4.4.4	Analyse der Promotorregion.....	76
4.4.4.1	Standardpromotorelemente	76
4.4.4.2	Putative regulatorische Elemente im 5'-Bereich von <i>sre 4</i>	76
4.4.5	Mögliche Funktionen von Sre 4 in der SAR-Ausprägung	79
4.5	Analyse der Überexpression von <i>sre 2</i> in Kartoffeln	79
4.5.1	Makroskopische Effekte nach Bakterieninokulation	80
4.5.2	Einfluss der Expression von <i>sre 2</i> auf das Bakterienwachstum <i>in planta</i> ..	80
4.5.3	Mögliche Funktionen von <i>sre 2</i> in der SAR-Ausprägung	81
5	Zusammenfassung.....	82
6	Literatur	84
7	Anhang.....	A
	Anhang A Abkürzungen.....	A
	Anhang B Medienzusätze.....	B
	Anhang C Primer	C
	Anhang D Genomische Sequenz von <i>sre 4</i>	E
	Anhang E Sequenzen der cDNA-Klone <i>sre 4-c1</i> bis <i>c4</i>	F
	Anhang F Sequenzen der putativen Proteine Sre 4-p1 bis 4	H
	Anhang G Genstruktur von <i>sre 2</i>	I

Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Arabidopsis</i>	MAP-Kinase	Mitogen aktivierte Protein-Kinase
Ab	<i>Alternaria brassicicola</i>	MeJA	Jasmonsäure-methylester
ABA	Abszinsinsäure	MOPS	3-[N-Morpholino]-propansulfonsäure
Abb.	Abbildung	mRNA	<i>messenger</i> RNA
Acc.	<i>Accession</i> ; Zugangscod	N.	<i>Nicotiana</i>
	Datenbank	N.	Northern-Experiment
AP	Adaptorprimer	NAD(P)H	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid(Phosphat), reduziert
APS	Ammoniumperoxodisulfat	<i>nahG</i>	bakterielles Salizylat-hydroxylase-Gen
AS	Aminosäure(rest)	NBS	Nukleotid-Bindungsstellen
as	<i>antisense</i>	n.d.	nicht detektierbar
Avr / <i>avr</i>	Avirulenz	NLS	<i>nuclear localisation signal</i>
B.	<i>Beta</i>	NO	Stickstoffmonoxid
bp	Basenpaar	Nr.	Nummer
BSA	Rinderserumalbumin	nt	Nukleotide
BTH (Benzo-thiadiazol)	Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-carbothiosäure-S-methylester	N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins
cDNA	komplementäre DNA	OD	Optische Dichte
cfu	Kolonie-bildende Einheiten	ORF	offene Leseraster
CS-RBD	<i>consensus sequence RNA-binding domain</i>	P.	<i>Porphyromonas</i>
C-Terminus	Carboxyl-Terminus eines Proteins	PAA	Polyacrylamid
cv.	Kultivar	PAGE	PAA-Gelelektrophorese
DDRT-PCR	<i>Differential Display</i> -RT-PCR	PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
Dig	Digoxygenin	PCR	Polymerasekettenreaktion
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PEG	Polyethylenglykol
DNAse	Desoxyribonuklease	pfu	Plaque-bildende Einheiten
DEPC	Diethylpyrocarbonat	<i>Pi</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
dNTP	2'-Deoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat	Poly A ⁺	Polyadenylierung
E.	<i>Escherichia</i>	<i>Pp</i>	<i>Peronospora parasitica</i>
E	Extinktion	PR / <i>pr</i>	<i>pathogenesis-related</i>
EDDRT-PCR	<i>Enhanced</i> DDRT-PCR	<i>Pss</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> pathovar
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraazetat	PVDF	Polyvinylidendifluorid
ET	Ethylen	R	Resistenz
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> ; und andere	RACE	<i>random amplification of cDNA ends</i>
Fmoc-	Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl-	RBP	RNA-bindendes Protein
Frag.	Fragment	RLK	<i>receptor like kinase</i>
<i>f.sp.</i>	<i>forma specialis</i>	RN	Reverse Northern
g	Erdbeschleunigung	RNA	Ribonukleinsäure
GRP / <i>grp</i>	glyzinreiches RNA-bindendes Protein	RNAse	Ribonuklease
H.	<i>Homo</i>	rRNA	ribosomale RNA
h	Stunde	ROS	reaktive Sauerstoff Spezies
H ₂ O _{dd}	Wasser (reinst)	RT	Raumtemperatur
(hn)RNP	<i>(heterogenous) Ribonucleoprotein</i>	RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
hpi	Stunden nach Inokulation	S.	<i>Solanum</i>
HR	Hypersensitive Reaktion	s.	siehe
INA	2,6-Dichlorisonicotinsäure	SA	Salizylat
IPB	Institut für Pflanzenbiochemie	SAR	systemisch erworbene Resistenz
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid	SDS	Sodiumdodecylsulfat
ISR	Induzierte systemische Resistenz	s	<i>sense</i>
JA	Jasmonat	Sre / <i>sre</i>	systemisch responsiv
K	Kontrolle	Tab.	Tabelle
Kb	Kilobasenpaare	TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
Kap.	Kapitel	TIR	Toll- oder Interleukin-Rezeptor-ähnliche Domäne
KDa	Kilodalton	TMV	Tabak Mosaik Virus
KLH	<i>keyhole limpet hemocyanin</i>	Tris	N-Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan
L.	<i>Lycopersicum</i>	UV	Ultraviolett
LAR	lokal erworbene Resistenz	vgl.	vergleiche
Lox	Lipoxygenase	Vol.	Volumina
LRR	Leucinreiche Domänen	W.	<i>Wisteria</i>
LZ	<i>leucine zipper</i>	wt	Wildtyp

1 Einleitung

Die Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.) stammt ursprünglich aus dem Grenzgebiet zwischen Bolivien und Peru und ist dort schon seit über 6000 Jahren als Nahrungsmittel bekannt. Im 16. Jahrhundert wurde sie von den Spaniern nach Europa gebracht und im 18. Jahrhundert durch Friedrich II. von Preußen in Deutschland als Volksnahrungsmittel etabliert. Heute steht die Kartoffel mit einer Weltjahresproduktion von über 300 Mio. t an Position 4 der Liste der weltweit produzierten Nahrungsmittelpflanzen hinter Weizen, Reis und Mais (FAOSTAT, Datenbank der *Food and Agriculture Organisation* der UN) und hat im Gegensatz zu diesen eine ansteigende Tendenz, die hauptsächlich auf die Produktions- und Absatzsteigerungen in Entwicklungsländern zurückzuführen ist (aus: *potato facts*¹). Damit spielt die Kartoffel auch derzeit eine entscheidende Rolle in der Welternährung.

Durch den extensiv betriebenen Anbau von Pflanzen als Nahrungsmittel kam es zur verstärkten Ausprägung von Krankheiten, die zu Schädigungen der Pflanzen und Ernteverlusten führen. Die Kraut- und Knollenfäule ist die weltweit schwerwiegendste Krankheit der Kartoffel. Wie Anton de Bary feststellte, wird sie durch den Oomyceten *Phytophthora infestans* (gr. *phyto* = Pflanze, *phthora* = Zerstörer) hervorgerufen. Eine *Phytophthora*-Infektion manifestiert sich in braunen Flecken und weißlichem Myzel auf Blättern und Knollen, die im weiteren Verlauf der Krankheit trocken faulen und die ganze Pflanze abtöten können. Der Pilz verbreitet sich bei feuchtem Klima über Sporangien und Zoosporen in Wind und Wasser und kann unter günstigen Bedingungen einen vegetativen Generationszyklus in 4 Tagen abschließen, sodass er sich rasch auch in gesunden Beständen ausbreiten kann (Erwin und Robeiro, 1996).

In den 40er Jahren des 19. Jahrhunderts kam es zu einer *Phytophthora*-Epidemie in Europa, die fast die gesamte Kartoffelernte vernichtete und allein in Irland 2 Mio. Menschen der Hungersnot zum Opfer fallen ließ und viele zwang, das Land zu verlassen (Goodwin *et al.*, 1994). Auch der sogenannte „Steckrübenwinter“ 1917/18 kann neben den Kriegswirkungen auf eine *Phytophthora*-Epidemie zurückgeführt werden. Aber auch in neuester Zeit treten auf Grund von aggressiveren und fungizidresistenten Pilzrassen erneut größere Schäden durch *Phytophthora*-Befall auf, die in den 80er Jahren in Europa und in den 90er Jahren auch in Nordamerika zu Verlusten in dreistelliger Millionenhöhe führten (230 Mio. \$ allein in den USA 1994/5)(Fry und Goodwin, 1997). Das *International Potato Center*, Lima, schätzt die Ernteverluste, die durch *Phytophthora*-Infektionen hervorgerufen werden, auf ca. 15 % der Weltkartoffelproduktion.

Die landwirtschaftliche Produktion von Kartoffeln wird durch Einkreuzungen von Resistenzen aus Wildkartoffeln in die angebauten Kartoffelsorten und durch Fungizide vor dem Einfluss des Schaderregers geschützt, doch beide Methoden bieten weder einen vollständigen noch einen dauerhaften Schutz, da sich neue Pilzrassen entwickeln, die die Resistenzen der Kartoffeln brechen und selbst gegen Fungizide Resistenzen entwickeln können. Die molekulare, biochemische und zelluläre

¹ CIP Potato Facts: A compendium of key figures and analysis for 32 important potato-producing countries - Production, Use, Consumption and Trade (<http://www.cipotato.org/market/potatofacts/potatofacts.htm>)

Erforschung weiterer Möglichkeiten, Resistenzen zu erhalten, ist daher ein zentrales Gebiet der Phytopathologie. Hierzu könnten Mechanismen gehören, die neben den genetisch manifestierten, pflanzeigene induzierbare Abwehrmechanismen nutzen, die auf der Wirkung multipler Gene beruhen, und somit nicht schnell durch sich entwickelnde Pilzrassen überwunden werden können.

1.1 Pflanzen und ihre Interaktion mit Mikroorganismen

Die meisten Pflanzen sind gegen die meisten Pathogene resistent, da sie keine Wirte für diese darstellen, was als Nichtwirts- oder Basisresistenz bezeichnet wird (Ebel und Scheel, 1992). Manche Pathogene haben Mechanismen entwickelt, um diese Basisresistenz, die durch präformierte Abwehrbarrieren und durch induzierbare Abwehrreaktionen ausgeprägt wird, durch sogenannte Pathogenitätsfaktoren zu überwinden oder durch Suppressoren zu unterdrücken (Shiraishi *et al.*, 1994). Die Pflanzen werden zu Wirtspflanzen und ihre Interaktion mit den Pathogenen wird kompatibel genannt. Dieser Zustand wird als Basiskompatibilität bezeichnet. Durch Koevolution von Pflanzen mit einzelnen Pathogenen kann diese Basiskompatibilität überwunden werden, sodass innerhalb einer Pflanzenart Sorten entstehen, die resistent gegen einzelne Rassen eines Pathogens geworden sind. Man unterscheidet zwischen rassenunspezifischen Resistenzen, die gegen alle Mitglieder einer Pathogenspezies gerichtet sind und spezifischen Rasse-Kultivar-Interaktionen. Nach der Gen-für-Gen-Hypothese von (Flor, 1955) wird die Letztere durch die Interaktion von einzelnen pflanzlichen Resistenzgenprodukten mit Avirulenzgenprodukten des Pathogens determiniert, die nur dann zur rassenspezifischen Resistenz führt, wenn die Wirtspflanze das zu dem jeweiligen Avirulenzgen (*avr*-Gen) des Pathogens komplementäre Resistenzgen (*R*-Gen) trägt. Diese Interaktion wird inkompatibel genannt im Gegensatz zur kompatiblen Interaktion, die durch das Fehlen eines oder beider Spezifität-vermittelnden Gene etabliert wird und zur Krankheit führt (Prell und Day, 2000).

Nach der Erkennung eines Mikroorganismus kann es, unabhängig ob es sich um eine Nichtwirts- oder rassenspezifische Erkennung handelt, zur Ausprägung lokaler (LAR) bzw. systemischer (SAR) Resistenzen kommen, die einen Schutz der ganzen Pflanze gegen Pathogene gewährleisten (s. Kap. 1.4). Die lokal begrenzte Reaktion der Pflanze auf eindringende Mikroorganismen resultiert in einer „Immunsierung“ des umgebenden gesunden Gewebes sowie der gesamten Pflanze, die eine langandauernde und gegen ein breites Spektrum angreifender Pathogene gerichtete Resistenz vermittelt (Hammerschmidt, 1999).

1.2 Pflanzliche Resistenzmechanismen

Die Abwehrreaktionen der Pflanze unterscheiden sich nur wenig zwischen den verschiedenen Resistenztypen, selbst die Unterschiede zwischen kompatiblen und inkompatiblen Interaktionen unterliegen meist keiner Alles-oder-Nichts-Regulation sondern manifestieren sich durch den schnelleren oder effizienteren Einsatz der Abwehrmaßnahmen in resistenten Pflanzen (Nürnberg und Nennstiel, 1998). Dass die Induktion der Abwehrreaktionen in verschiedenen Pflanze/Pathogen-Interaktionen

ähnlich verläuft, zeigt sich auch an den überraschenden Übereinstimmungen der Signaltransduktionskomponenten, die in *R/avr*-genspezifischen Interaktionen identifiziert wurden, aber ebenso Abwehrreaktionen gegenüber virulenten Pathogenen vermitteln können (Reuber *et al.*, 1998). Man unterscheidet präformierte, passive und induzierbare, aktive Abwehrreaktionen (Ebel und Scheel, 1997).

1.2.1 Präformierte Abwehr

Zu den präformierten Abwehrreaktionen zählen strukturelle Beschaffenheiten der Pflanzenabschlussgewebe, die eine Infektion durch Pathogene erschweren, wie etwa lipophile Blattüberzüge, Verholzungen, die Anzahl und Beschaffenheit der Stomata, die natürliche Zugänge für Pathogene darstellen, Trichome, ebenso wie das dauerhafte Vorhandensein von antimikrobiellen Substanzen wie Suberinen auf der Oberfläche oder auch im Inneren der Pflanze (Scheel und Parker, 1990; Hammond-Kosack und Jones, 1996). Auch werden in den Vakuolen oft antibiotische Substanzen als Glykoside zwischengelagert, die erst nach dem Eindringen des Pathogens in das biologisch aktive Aglykon und den Zuckerrest gespalten werden (Lactone, Phenole, Saponine, cyanogene Glykoside, Schwefelverbindungen, Acetophenone, Stilbene) (Elstner *et al.*, 1996; Osbourn, 1996).

1.2.2 Induzierbare Abwehrreaktionen

Zu den induzierbaren Abwehrreaktionen gehören alle, die durch eindringende Pathogene initiiert werden und in gesunden Pflanzen nicht auftreten. Beispiele für mechanisch wirkende Mechanismen sind die Papillenbildung am Eintrittsort des Pathogens. Durch Auflagerung von Kallose zwischen Plasmalemma und Zellwand wird das Abschlussgewebe verstärkt, sodass das Pathogen die Zellwand nicht penetrieren kann (Kauss, 1985). Desweiteren werden durch die verstärkte Lignifizierung der Zellwand, Einlagerungen von Proteinen wie den (hydroxy-)prolin- und glyzinreichen (Glyko-)Proteinen (Keller, 1993) sowie die verstärkte Vernetzung der Zellwand durch Peroxidasen die strukturellen Eigenschaften des pflanzlichen Abschlussgewebes verbessert (Otte und Barz, 2000). Neben diesen mechanischen Barrieren gibt es auch aktiv wirkende Mechanismen, die eine Infektion verhindern. Hierzu werden die Bildung von Phytoalexinen, niedermolekularen antimikrobiell wirkenden Substanzen (Shiraishi *et al.*, 1994), die Generierung reaktiver Sauerstoff-Intermediate (*oxidative burst*) (Levine *et al.*, 1994; Alvarez *et al.*, 1998; Grant und Loake, 2000), die Hypersensitive Reaktion (HR) (Heath, 2000) und die verstärkte Expression von sogenannten *PR*-Proteinen (*pathogenesis related*) gezählt (Kombrink und Somssich, 1997; van Loon und van Strien, 1999).

1.3 Pathogenperzeption und Signaltransduktion

Voraussetzung für die Induktion von Abwehrreaktionen ist die Erkennung von Pathogenen durch die Pflanze. Dabei spielen exogene und endogene Signalmoleküle eine Rolle, die als Elicitoren bezeichnet werden (Ebel und Scheel, 1997; Bonas und Van den Ackerveken, 1999). Exogene Elicitoren sind zumeist Oberflächenstrukturen der pathogenen Organismen (Hammond-Kosack und Jones, 1996) oder sekretierte

Substanzen, die zum Teil auch in die Pflanzenzellen eindringen können (Bonas und Van den Ackerveken, 1999; Jia *et al.*, 2000), wie Oligosaccharide (Sharp *et al.*, 1984), Proteine oder Peptide (Nürnberger *et al.*, 1994; Yu, 1995) Glyko- (Parker *et al.*, 1991) oder Lipoproteine (Bostock *et al.*, 1982) aber auch Fettsäuren (Bostock *et al.*, 1982), während endogene Elicitoren Zellwandbruchstücke der Pflanzen sind, die durch hydrolytische Enzyme aus ihr herausgelöst werden (Ryan und Farmer, 1991).

Die Erkennung der Elicitoren erfolgt über plasmamembranständige oder zytosolische Bindungsstellen, die dann eine Signaltransduktionskaskade aktivieren, die zur Induktion einer Resistenzreaktion führt (Parker und Coleman, 1997). In Nichtwirtsresistenzmodellen wurden Bindungsproteine identifiziert, die Elicitoren erkennen (Cosio *et al.*, 1992; Baureithel *et al.*, 1994; Ito *et al.*, 1997) und Signaltransduktionswege aktivieren können (Nürnberger *et al.*, 1994; Ebel, 1998). Auch der generelle Resistenzmechanismus, der in Gerste Resistenz gegen Mehltau vermittelt, wird über einen rezessiven Locus, *mlo*, reguliert, der für ein G-Protein gekoppeltes Rezeptor-homologes Protein kodiert (Büschges *et al.*, 1997). Die Signalkette beinhaltet noch mindestens zwei weitere Proteine ROR1 und 2, die für die Ausbildung der Resistenz benötigt werden (Peterhänsel *et al.*, 1997). Äquivalent dazu wurden in kultivarspezifischen Resistenzmodellen in den letzten Jahren eine Reihe von *R*-Genen identifiziert, deren Produkte mittelbar oder unmittelbar mit *avr*-Genprodukten interagieren und dadurch Abwehrprozesse auslösen können. Die Mehrzahl der *R*-Gene teilt drei strukturelle Gemeinsamkeiten, leucinreiche Domänen (LRR), Nukleotid-Bindungsstellen (NBS) und entweder eine TIR- (*Toll* oder *Interleukin* Rezeptoren) oder eine *leucin-zipper*-Domäne (LZ). Die LRRs können die Spezifität der Pathogenerkennung determinieren (Ellis *et al.*, 1999), während die NBS für die Signaltransduktion und die LZ- oder TIR-Domänen für Protein-Protein-Interaktionen zuständig sind (Martin, 1999). Beispiele für LZ-NBS-LRR-Proteine sind die Resistenzgene RPM1, RPS2, RPS5, RPP8 während RPS4, RPP1, L6 und N eine TIR-Domäne tragen, *Pto* teilt diese Strukturen nicht und zeigt ausschließlich Homologie zu intrazellulären Proteinkinasen (Cohn *et al.*, 2001). Auch andere bakterielle Resistenz vermittelnde *R*-Gene (z.B. *RPS2*, *RPS4*, *RPS5*) sind zytoplasmatisch lokalisiert (Bonas und Van den Ackerveken, 1999). Für viele bakterielle *avr*-Gene konnte gezeigt werden, dass ihre transiente Expression in Pflanzenzellen zu einer *R*-genspezifischen HR führt (Tang *et al.*, 1996; Van den Ackerveken *et al.*, 1996; Stevens *et al.*, 1998) Die Erkennung der *avr*-Genprodukte (z.B. *AvrPphE* (Stevens *et al.*, 1998), *AvrBs3* (Van den Ackerveken *et al.*, 1996), *AvrPto* (Tang *et al.*, 1996)) scheint also auch intrazellulär zu erfolgen, wobei die bakteriellen Proteine direkt in die Pflanzenzellen injiziert werden (wie z.B. *AvrBs2* (Mudgett *et al.*, 2000)), wie es auch für Pathogenitätsfaktoren der humanpathogenen *Yersinia*-Bakterien gezeigt wurde (Cornelis, 1998). Eine direkte Interaktion von *avr*- und *R*-Genprodukten konnte bislang für *Pto*-*AvrPto* gezeigt werden (Tang *et al.*, 1996) und kürzlich wurden auch Hinweise auf eine Interaktion von RPS2 mit *AvrRPT2* gefunden (Leister und Katagiri, 2000). Überraschenderweise konnte auch für ein pilzliches *avr*-Genprodukt (*Avr-Pita*) eine Lokalisation im pflanzlichen Zytosol sowie die Interaktion mit dem korrespondierenden *R*-Gen *Pi-ta* in diesem Kompartiment nachgewiesen werden (Bryan *et al.*, 2000; Jia *et*

al., 2000). Andere *R*-Gene sind offenbar membranständig, wie etwa *Cf-9*, das extrazelluläre LRRs, eine Transmembrandomäne und einen kleinen zytoplasmatischen Anhang trägt, für das aber gezeigt werden konnte, dass es nicht mit dem korrespondierenden *avr*-Genprodukt AVR9 interagiert (de Wit *et al.*, 1997; Luderer, 2001). Auch *Xa21* besteht aus extrazellulären LRRs einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Serin/Threonin-Kinase-Domäne und gehört damit zu den *receptor-like-kinases* (RLK) (Song *et al.*, 1995), die durch eine Ligandenbindung ein Signal über die Plasmamembran translozieren und durch ihre Kinasedomäne spezifische Signaltransduktionswege aktivieren können (He *et al.*, 2000). Für die zytoplasmatisch lokalisierten *Avr*-Genprodukte könnte ein Mechanismus, der durch Myristoylierung die zytosolischen Proteine an Membranen assoziieren lässt, eine Interaktion mit membranständigen Bindungsproteinen ermöglichen (Nimchuk *et al.*, 2000).

Die frühesten Prozesse, die nach der Signalperzeption detektierbar sind, sind Ionenflüsse über der Plasmamembran, Ca^{2+} und H^+ -Einstrom und K^+ - und Cl^- -Ausstrom. Diese Ionenflüsse sind in *Petersilie* notwendig und hinreichend für die Auslösung des *oxidative burst*, die Phytoalexinproduktion und die Aktivierung von *pr*-Genexpression (Jabs *et al.*, 1997; Blume *et al.*, 2000). Als Bindeglied zwischen Elicitorperzeption und Ionenflüssen werden heterotrimere G-Proteine diskutiert, deren Existenz indirekt durch pharmakologische Studien und durch transgene Ansätze gezeigt werden konnte (Beffa *et al.*, 1995; Kawasaki *et al.*, 1999). Sie könnten die Bildung von extrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Superoxidationen (O_2^-) und Hydroxylradikalen (OH^\cdot) vermitteln, die zusammengenommen als *oxidative burst* bezeichnet werden (Grant und Loake, 2000), und durch eine membranständige NAD(P)H-Oxidase gebildet werden können (Keller *et al.*, 1998; Torres *et al.*, 1998). Die reaktiven Sauerstoffspezies wirken selbst antibiotisch und katalysieren gleichzeitig die oxidative Vernetzung der Zellwand, aber sie können auch direkt in der Signaltransduktionskaskade gelegene Prozesse aktivieren wie HR, Phytoalexinbildung und *pr*-Genaktivierung (Lamb und Dixon, 1997). ROS, allein appliziert, sind jedoch nicht in der Lage, die volle Ausprägung der Resistenzreaktionen zu induzieren. Im Zusammenspiel mit Stickstoffmonoxyd (NO) potenziert sich ihre aktivierende Wirkung, was einen synergistischen Effekt dieser beiden Signalmolekültypen belegt. Es scheint jedoch zwei separate Signalwege zu geben, da auch NO allein Abwehrreaktionen induzieren kann (Delledonne *et al.*, 1998). NO scheint ähnlich wie in der tierischen Immunabwehr über cGMP und cADP-Ribose, die Signaltransduktion zu aktivieren (Durner und Klessig, 1999; Klessig *et al.*, 2000), wenn auch in Pflanzen nicht alle Komponenten des tierischen Systems nachgewiesen werden konnten. Andere Studien zeigen, dass Phosphorylierungsprozesse eine Rolle bei der Signaltransduktion spielen, bei denen das Signal über die sukzessive Phosphorylierung von Mitogen-aktivierbaren Proteinkinasen (MAP-Kinasen) weitergeleitet wird (Hirt, 1997; Ligterink *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2001). Aber auch andere Stressreaktionen der Pflanzen werden über MAP-Kinasekaskaden reguliert, sodass dieser Teil der Signaltransduktionswege ein Knotenpunkt in der Spezifizierung der einzelnen Abwehrreaktionen sein könnte (Romeis *et al.*, 1999; Ligterink und Hirt, 2001). In *Petersilie* konnte gezeigt werden, dass MAP-Kinasen in den Zellkern

transportiert werden (Ligterink *et al.*, 1997). Dort könnten sie durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren die Expression von Abwehrgenen stimulieren. Kürzlich wurde eine MAP-Kinase identifiziert, die ein negativer Regulator in der Signaltransduktionskette, die zu SAR führt, zu sein scheint (Petersen *et al.*, 2000).

Transkripte sogenannter *pr*-Gene akkumulieren lokal bereits wenige Minuten bis einige Stunden nach einer Infektion oder der Behandlung mit Elicitoren (Somssich und Hahlbrock, 1998). Sie wurden ursprünglich von van Loon und van Kammen (1970) als Tabak Mosaik Virus- (TMV) induzierte Proteine definiert. Später wurden strukturell ähnliche Proteine auch in anderen Pathosystemen entdeckt und der Begriff PR-Proteine auf diese ausgeweitet (van Loon, 1990). Ihre Charakteristika sind extreme pI-Werte, Resistenz gegen Proteasen und geringe Molekulargewichte und sie lassen sich zur Zeit in 14 Familien einteilen. Die bestuntersuchteten sind die Familien 2 sowie 3, 4, 8 und 11, deren Funktion als hydrolytische Chitinasen (PR-3, 4, 8, 11) und β -1,3-Glukanasen (PR-2) identifiziert werden konnte (van Loon und van Strien, 1999). Andere kodieren für Proteinase-Inhibitoren (PR-6), Endoproteinasen (PR-7), Peroxidasen (PR-9) oder haben Ähnlichkeiten zu Thaumatin (PR-5) oder Ribonukleasen (PR-10). Für die meisten anderen PR-Proteine ist ihre Funktion bislang unbekannt, dennoch wirken manche *in vitro* antifungal (Sela-Buurlage *et al.*, 1993; Niderman *et al.*, 1995) oder können, überexprimiert in transgenen Pflanzen, die Resistenz gegenüber Pathogenen erhöhen (Punja und Raharjo, 1996; Uknes *et al.*, 1996; Nakajima *et al.*, 1997). Neben den klassischen PR-Proteinen akkumulieren nach Pathogenbefall auch Enzyme des Phenylpropanstoffwechsels (z.B. Phenylalaninammoniaklyase (PAL), 4-Coumarat:CoA-Ligase (4-Cl) (Logemann *et al.*, 1995)), glyzinreiche Proteine (Bowles, 1990), Defensine (Penninckx *et al.*, 1996), Thionine (Epple *et al.*, 1995), Lipoxygenasen (Rosahl, 1996) und Phospholipasen (Ryan, 2000), die in verschiedenster Weise an der Abwehr beteiligt sind (Kombrink und Somssich, 1997).

Am Ende der Signaltransduktionskette steht die Synthese von Substanzen, die die Resistenz gegen Pathogene vermitteln. Dazu gehören die Phytoalexine, die schon 1940 von Müller und Borger (1940) nach Pathogenbefall in Kartoffeln als antimikrobiell wirkende Substanzen entdeckt wurden. Das erste entdeckte Phytoalexin war das Rishitin, ein Sesquiterpen aus der Kartoffel, aber auch andere Verbindungen wie Flavonoide, Tannine oder cyanogene Glykoside gehören zu dieser heterogenen Gruppe (Grayer und Kokubun, 2001).

Nicht zuletzt ist die Hypersensitive Reaktion (HR) eine Reaktion der Pflanze, die bei vielen Pathogeninteraktionen auftritt (Dangl *et al.*, 1996; Heath, 2000) und zuerst 1915 von Stakman, (1915) an Getreide/Rost-Interaktionen beobachtet wurde. Die HR ist gekennzeichnet durch ein rasches Absterben von Zellen, das eine weitere Ausbreitung des Pathogens verhindern soll (Goodman und Novacky, 1994). Obwohl HR und Resistenz eng miteinander verknüpft sind, konnte bislang keine direkte Korrelation zwischen beiden Prozessen gezeigt werden (Kombrink und Schmelzer, 2001).

1.4 Erworbene Resistenz

Wie schon erwähnt (s. Kap. 1.1), ist der genetisch determinierten Resistenz eine weitere überlagert, die durch die Stimulation von Pflanzen durch eine lokal begrenzte Infektion, Nekrosenbildung oder Applikation von chemischen Induktoren ausgelöst werden kann. Dieses Phänomen der erworbenen Resistenz wurde zuerst von Chester (1933) im System Tabak/TMV beschrieben und später in demselben System genauer untersucht. Nach einer lokal begrenzten Infektion von Tabak mit TMV wurde das Gewebe am Ort der Infektion, aber auch in gesunden Pflanzenteilen resistenter gegen eine nachfolgende Infektion, was Ross als lokale (Ross, 1961a) bzw. systemisch erworbene Resistenz (Ross, 1961b) bezeichnete. Diese Art der Resistenz konnte in den meisten höheren Pflanzenfamilien detektiert werden. Sie ist sehr langlebig (einige Wochen bis Monate) und gegen ein breites Spektrum von Pathogenen gerichtet (Madamanchi und Kuc, 1991), was sie interessant macht für biotechnologische Anwendungen (Sticher *et al.*, 1997).

Einhergehend mit der Ausprägung der Resistenz kommt es zur lokalen Bildung von Phytoalexinen (Kuc und Rush, 1985), einer Nekrotisierung des infizierten Gewebes (Kombrink und Schmelzer, 2001) sowie kleiner systemisch auftretender HR-ähnlicher Läsionen, die mit der Bildung von ROS einhergehen (Alvarez *et al.*, 1998). Darüber hinaus kommt es zu einer Akkumulation von niedermolekularen Signalmolekülen wie Salizylat (Sticher *et al.*, 1997; Dempsey *et al.*, 1999), Jasmonat und Ethylen (Penninckx *et al.*, 1996) sowie der verstärkten Expression von PR bzw. SAR-Genen (Ward *et al.*, 1991; van Loon und van Strien, 1999).

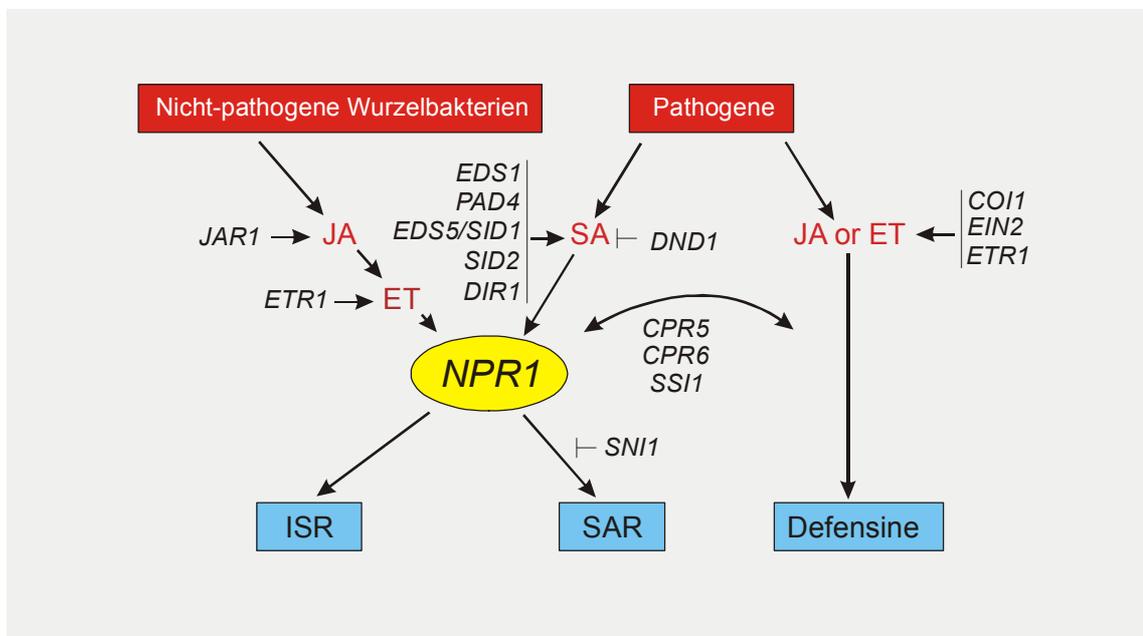


Abb. 1.1: Modell der systemischen Signaltransduktion

Dargestellt sind verschiedene Signaltransduktionswege, die über die Signalmoleküle Salizylat (SA), Jasmonat (JA) und Ethylen (ET) zu drei verschiedenen Arten der systemischen Resistenz führen. Die Proteine, die induzierend \rightarrow oder reprimierend \vdash auf diese Wege einwirken, sind durch Mutanten in *Arabidopsis thaliana* identifiziert worden und als dreibuchstellige Abkürzungen dargestellt. Die Erklärungen zu den Mutanten finden sich im Text unter Kap. 1.4.1, 1.4.2 und 1.4.3. Die Abbildung wurde leicht verändert von Feys und Parker (2000) übernommen.

Am besten untersucht ist die SAR in Tabak, Gurke und in der Modellpflanze *Arabidopsis*. Die Suche nach *Arabidopsis*-Mutanten, die in einer oder mehrerer der oben erwähnten Abwehrreaktionen eingeschränkt sind, führte zur Identifizierung einer Reihe von Komponenten, die zum Verständnis der Signaltransduktionswege beitragen (Übersicht in: (Glazebrook, 1999; Feys und Parker, 2000; Thomma *et al.*, 2001)).

Allgemein lassen sich bislang drei verschiedene Signaltransduktionswege definieren, von denen einer Salizylat-abhängig zur Aktivierung von PR-1, PR-2 und PR-5 führt (SAR) (Ryals *et al.*, 1996), einer Jasmonat/Ethylen-abhängig zur Aktivierung des pflanzlichen Defensins PDF1.2 (PR-12) (Penninckx *et al.*, 1996; Penninckx *et al.*, 1998) und einer, der Jasmonat-abhängig zur Induzierten Systemischen Resistenz (ISR) führt (Pieterse *et al.*, 1998) (Abb.1.1). Aber dies kann nur ein vorläufiges Bild sein, das sich durch die Aufklärung neuer Komponenten und Interaktionen zwischen den einzelnen Wegen ständig verändern wird.

1.4.1 Salizylat-abhängige erworbene Resistenz

Lange Zeit wurde angenommen, dass SAR ausschließlich über das Signalmolekül Salizylat vermittelt wird, da es nach SAR-Induktion sowohl lokal als auch systemisch akkumuliert und in der Lage ist, direkt eine Gruppe von PR-Proteinen zu aktivieren (Dempsey *et al.*, 1999). Pflanzen, die ein bakterielles Gen exprimieren, das für Salizylathydroxylase (*nahG*) kodiert, welches Salizylat in das physiologisch unwirksame Catechol umwandelt, zeigen deutlich reduzierte SA-Gehalte. Mit Hilfe dieser Pflanzen konnte gezeigt werden, dass ohne Salizylatakkumulation sowohl die PR-Genexpression als auch die Resistenzbildung unterdrückt ist. Pfropfungsexperimente mit diesen *nahG*-Pflanzen lieferten jedoch den Beweis, dass SA zwar notwendig für die Expression der SAR-Markergene, nicht jedoch das Signal ist, dass zur Vermittlung der systemischen Resistenz in der Pflanze transportiert wird (Willits und Ryals, 1998). SA kann zwar auch im Phloem transportiert werden (Shulaev *et al.*, 1995), es konnte jedoch gezeigt werden, dass SA in uninferierten Sproßachsen und Blattvenen *de novo* synthetisiert wird (Smith-Becker *et al.*, 1998). Auch das flüchtige SA-Derivat Methylsalizylat wurde als systemisches Signal diskutiert (Shulaev *et al.*, 1997), ebenso wie Lipidtransferproteine (Molina und Garcia-Olmedo, 1997), deren Mutation in der *dir1*-Mutante dazu führen, dass von vorinokulierten Blättern keine SAR-induzierende Wirkung mehr ausgeht (Metraux, 2001). Mutanten, die einen direkten Einfluss auf die SA-Biosynthese haben wie *sid1* (= *eds5*) und *2*, zeigen einen identischen Phänotyp zu *nahG*-Pflanzen und untermauern die Bedeutung, die SA in der SAR-Ausprägung zukommt (Nawrath und Metraux, 1999). In der *Arabidopsis*-Mutante *npr1* (Cao *et al.*, 1997), die allelisch zu *nim1* (Ryals *et al.*, 1997) und *sai1* (Shah *et al.*, 1997) ist, akkumulieren normale Mengen an SA, sie zeigt jedoch weder PR-Genexpression noch Resistenz gegenüber *Peronospora parasitica* (*Pp*), sodass NPR1 unterhalb von SA eine Schlüsselposition in der Signalkaskade einnehmen muss. Es enthält Ankyrinwiederholungen, die an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind und hat Homologie zu dem tierischen Transkriptionsfaktorinhibitor I κ B (Ryals *et al.*, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass NPR1 mit Transkriptionsfaktoren des TGA-

Typs interagiert, die die SA-abhängige Aktivierung von PR-Proteinen vermitteln, und so als positiver Regulator der SA-abhängigen SAR wirkt (Despres *et al.*, 2000). Mit Hilfe dieser Mutanten konnte auch gezeigt werden, dass chemische Induktoren, die ebenfalls SAR induzieren können, wie INA (2,6-Dichlorisonicotinsäure) oder BTH (Benzothiadiazol), als SA-Analoga über denselben Signalweg wirken wie SA selbst (Shah *et al.*, 1997). Die Suche nach Mutationen, die die Defekte der *npr1*-Mutante wieder ausgleichen können, führte zur Identifizierung eines kernlokalisierten negativen Regulators der SAR, SNI1, der nicht mit NPR1 interagiert, aber als Antagonist sowohl die PR-Genexpression als auch die Resistenzausprägung beeinflusst (Li *et al.*, 1999). Zusammen mit den Proteinen, die über *cpr*- (s.u.) und *lsd*-Mutanten, die spontane HR-ähnliche Läsionen ohne Pathogeneinfluss ausprägen, identifiziert wurden, ergibt dies eine Gruppe von negativen SAR-Regulatoren, die möglicherweise sicherstellen, dass zerstörerische oder energieaufwendige Abwehrreaktionen räumlich und zeitlich begrenzt werden (Feys und Parker, 2000). Ein andere Mutante, *ssi1*, kann ebenfalls alle Defekte der *npr1*-Mutante kompensieren und exprimiert außerdem das als JA-abhängig beschriebene PR-Protein PDF1.2 in SA-abhängiger Weise (Shah *et al.*, 1999). Damit reguliert SSI1 einen NPR1-unabhängigen Signalweg und ist ein Kandidat für einen regulatorischen Knotenpunkt in der Interaktion JA/ET- und Salizylat-vermittelter Signalwege (vgl. Kap. 1.4.3 und Abb. 1.1). Konstitutiv PR-Proteine exprimierende Mutanten (*cpr*'s) zeigten ebenfalls konstitutiv hohe SA-Gehalte und erhöhte Resistenz. Doppelmутanten aus *npr1* und *cpr5* zeigten keine PR-Genexpression, waren suszeptibel gegen *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) aber weiterhin resistent gegen *Pp*, was auf einen weiteren SA-abhängigen Weg deutet, der aber nicht über NPR1 reguliert wird (Bowling *et al.*, 1997). *cpr6npr1* Doppelmутanten zeigten konstitutive *pr*-Genexpression, waren aber nicht resistent gegen *Pss*, was die Resistenz von der Expression von PR-Proteinen entkoppelt und weitere antibiotische Mechanismen vermuten lässt, die durch NPR1 reguliert werden und bakterielle Resistenz vermitteln (Clarke *et al.*, 1998). PAD4, ein Lipase-ähnliches Protein, scheint oberhalb von SA als Signalverstärker zu agieren. Seine Mutation *pad4* führt zu reduzierten PR-1-, SA- und Phytoalexin- (Camalexin) Mengen, die aber durch eine Pathogeninfektion wiederhergestellt werden können (s. Abb. 1.1) (Jirage *et al.*, 1999). Trotzdem ist SA in der Lage, PAD4 zu aktivieren, was auf eine *feed-back* Schleife hindeutet, in der Salizylat und möglicherweise weitere Substanzen, die pflanzliche Abwehr potenzieren (Shirasu *et al.*, 1997; Delledonne *et al.*, 1998). Nicht zuletzt kann die HR in *dnd1*-Mutanten von der Etablierung der Resistenz entkoppelt werden. In *dnd1*-Mutanten sind aber auch die SA- und PR-1-Mengen stark erhöht, was eine direkte Wirkung von DND1 als Zelltodinduktor unwahrscheinlich macht (s. Abb. 1.1). Daher wurde SA als möglicher Repressor des Hypersensitiven Zelltods diskutiert (Yu *et al.*, 1998) SA wurde immer mit der Regulation der HR durch Aktivierung reaktiver Sauerstoffspezies in Verbindung gebracht (Chen *et al.*, 1993), doch neuere Studien zeigen, dass H₂O₂ auch SA-induzierend wirkt (Neuenschwander *et al.*, 1995). Als Modell für die Wirkung von SA bei der Zelltodregulation wird eine *feed-back* Schleife vorgeschlagen, die zusammen mit H₂O₂ und je nach der lokalen

Konzentration antagonistisch entweder Zelltod aktiviert oder antioxidative Zellschutzprogramme auslöst (Alvarez, 2000).

1.4.2 Salizylat-unabhängige erworbene Resistenz

Die Analyse einiger Mutanten (s. Kap. 1.4.1: *cpr's*, *pad4*,...) zeigt, dass SA allein nicht das gesamte Spektrum der Pflanzenabwehr regulieren kann. In den vergangenen Jahren wurde eine zunehmende Anzahl von zusätzlichen Signaltransduktionswegen identifiziert, die über die Signalmoleküle JA und/oder Ethylen reguliert werden. Nach Inokulation von *Arabidopsis* mit dem nichtpathogenen Pilz *Alternaria brassicicola* (*Ab*) akkumuliert lokal und systemisch das Defensin PDF1.2 (Penninckx *et al.*, 1996), das unabhängig von SA oder NPR1 aber abhängig von Jasmonat und Ethylen induziert wird (Penninckx *et al.*, 1998). Auf JA-insensitiven *coi1*-Mutanten ist *Ab* virulent, ebenso wie *Pythium* auf *jar1*- (Staswick *et al.*, 1998) und *fad3fad7fad8*- (Tripel-) Mutanten, die kein JA synthetisieren können (Vijayan *et al.*, 1998) oder *Botrytis* auf *etr1*- oder *ein2*-Mutanten, die in der Ethylensignalperzeption bzw. -transduktion gestört sind (s. Abb. 1.1) (Chang und Shockey, 1999). Das zeigt, dass JA/ET-abhängige Resistenzreaktionen notwendig sind, um Pathogene abzuwehren. Das *coi1*-Gen wurde kloniert und es scheint, dass sein Produkt als LRR-Protein mit einer F-Box an der Ubiquitinierung von Proteinen beteiligt ist, die deren Abbau steuert (Xie *et al.*, 1998). Auch Mutanten (*pad3*), die durch einen Defekt in der Phytoalexinbiosynthese anfällig gegen *Ab* sind, werden durch JA-Behandlung wieder deutlich resistenter (Thomma *et al.*, 1998). SA scheint keinen Anteil an der Resistenzausprägung gegen *Alternaria* oder *Pythium* zu haben, da sowohl *nahG*-Pflanzen als auch *npr1*-Mutanten keine veränderte Suszeptibilität zeigen (Thomma *et al.*, 1998).

Eine dritte Art der Resistenz wird durch nichtpathogene, wachstumsfördernde Wurzelbakterien (*Pseudomonas fluorescens* WCS417r) hervorgerufen und vermittelt Resistenz gegenüber *Fusarium oxysporum* f.sp. *raphani* und *Pseudomonas syringae* (Pieterse *et al.*, 1996). Da diese Art der Resistenz in *jar1*-Mutanten durch Ethylen induzierbar ist, wird angenommen, dass sie durch die Aufeinanderfolge von Jasmonat- und Ethylen-Signalen reguliert wird (s. Abb. 1.1) (Pieterse *et al.*, 1998). Kürzlich wurde der Locus ISR1 lokalisiert, der mit ISR-Induzierbarkeit und Ethylenresponsivität kosegregiert, aber nicht über JA reguliert wird (Ton *et al.*, 2001). Die ISR-Signaltransduktion scheint jedoch auf einem anderen Weg zu erfolgen als für die oben beschriebene JA-abhängige Abwehr, da keines der JA- oder ET-regulierten Gene transkriptionell aktiviert wird. Einzig das Gen *Atvsp*, eine saure (Vegetatives Speicher Protein-) Phosphatase, wird nach Infektion stärker aktiviert als in nicht ISR-induzierten Pflanzen (van Wees *et al.*, 1999). Überraschenderweise ist ISR abhängig von dem als SA-abhängig beschriebenen NPR1 und in *nahG*-Pflanzen unterdrückt (Pieterse *et al.*, 1998).

1.4.3 Signaltransduktionsnetzwerke erworbener Resistenz

Die in Kap. 1.4.1 und 1.4.2 beschriebenen Beispiele zeigen, dass die jeweiligen Modelle nie alle Phänomene der Pflanze/Pathogeninteraktion erklären können. Das

lässt vermuten, dass es sich nicht um lineare Signaltransduktionsketten sondern um Netzwerke handelt, die über die verschiedenen Signalkomponenten synergistisch reguliert werden. Ein offensichtliches Beispiel ist die Reaktion von *Arabidopsis* auf Infektionen mit dem nekrotrophen Bakterium *Erwinia carotovora*, die zur Expression von Ethylen-, Jasmonat, und Salizylat-responsiven Genen führt. Dabei scheinen die Signalmoleküle nicht nur direkt auf die Genexpression sondern auch regulativ auf die Signaltransduktion der anderen Signale zu wirken. So wirken Ethylen und Salizylat inhibierend auf die Expression Jasmonat-responsiver Gene, während Salizylat Ethylen-responsive Gene aktiviert (Norman-Setterblad *et al.*, 2000). Eine Vielzahl von Studien belegt sowohl synergistische (van Wees *et al.*, 2000) als auch antagonistische (Stout *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2000) Effekte von SA- und JA-abhängiger Resistenz (Reymond und Farmer, 1998), wobei auffällt, dass die SA-abhängige Abwehr überwiegend von biotrophen Pathogenen ausgelöst wird, während JA-abhängige Wege über nekrotrophe Pathogene aktiviert werden (Thomma *et al.*, 2001). Eine konzertierte Analyse der Auswirkungen von SA, JA, ET und Infektion von *Arabidopsis* mit *Ab* auf die Expression von Genen zeigte, dass ein Großteil durch mindestens zwei verschiedene Stimuli aktivierbar ist. Ein Gen konnte sogar durch alle vier Applikationen stimuliert werden (Schenk *et al.*, 2000), sodass auch auf der Ebene der PR-Proteine eine Modulation der Abwehrreaktionen möglich ist. Auch genetische Ansätze haben Hinweise auf Verbindungen zwischen den Signalwegen aufgezeigt. Der Einfluss der *ssi1*-Mutante, die SA-abhängige Resistenz vermittelt (vgl. Kap.1.4.1), auf das Jasmonat-abhängig regulierte Gen *PDF1.2* (Shah *et al.*, 1999), der selektive Einfluss der *cpr5*-Mutante auf Resistenz gegenüber dem bakteriellen Pathogen *Pss* und dem Pilz *Pp* (Clarke *et al.*, 1998) und die synergistische Expression von SA-abhängig und –unabhängig regulierten Genen in *cpr6*-Mutanten zeigen (Bowling *et al.*, 1997), dass diese drei Gene an Schnittstellen zwischen den verschiedenen Signalwegen agieren (s. Abb. 1.1) (Feys und Parker, 2000) .

1.5 SAR in Kartoffel

SAR kann in Kartoffel durch lokale begrenzte Infektion mit dem pathogenen Pilz *Phytophthora infestans* (*Pi*) (Strömberg und Brishammar, 1991) oder durch Inokulation mit den nichtpathogenen Bakterien *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* induziert werden (Kombrink *et al.*, 1995). In beiden Fällen treten lokal Nekrosen bzw. HR (Vleeshouwers *et al.*, 2000) auf und es kommt zu einer Aktivierung von Abwehrgenen, die PR-Proteine wie PR-1, β -1,3-Glukanasen und Chitinasen umfassen (Martini *et al.*, 1993; Beerhues und Kombrink, 1994; Büchter *et al.*, 1997). Aus *Pi* wurden elicitoraktive Komponenten isoliert, die als Lipoglykoproteinkomplexe (Bostock *et al.*, 1981) und Glukane (Doke *et al.*, 1987) identifiziert wurden. Der aktive Bestandteil der Komplexe war der Lipidanteil, genauer Eicosatrien-, -pentaen- und Arachidonsäure (Bostock *et al.*, 1981). Die Behandlung von Kartoffelblättern mit Arachidonsäure führt in Kartoffelpflanzen und Knollen zur Ausprägung von SAR gegen *Pi* und *Alternaria solanii* und außerdem zur lokalen aber nicht zu systemischer Akkumulation von SA (Cohen *et al.*, 1991; Coquoz *et al.*, 1998). Da Kartoffelpflanzen sehr hohe endogene SA-Konzentrationen aufweisen, die mit der Resistenz der Pflanzen gegen Pathogene

korrelieren (Yu *et al.*, 1997) und sich in *nahG*-Pflanzen zudem eine deutlich erhöhte Suszeptibilität gegenüber Pathogenen zeigte, wird diskutiert, ob die hohen SA-Gehalte der Kartoffel auch für die systemisch induzierte Resistenz essentiell sind (Yu *et al.*, 1997). Auch die systemisch induzierbare Expression eines SA-bindenden Proteins könnte Abwehrprozesse unabhängig davon regulieren, ob der SA-Gehalt in unbehandeltem Gewebe ansteigt (Yu *et al.*, 1999). Arachidonsäure eliciert aber auch eine Lipoxygenase in Kartoffelknollen (Bostock *et al.*, 1992), was eine Verbindung zur Synthese des JA schaffen würde, das ebenfalls systemische Resistenz in Kartoffel gegen *Pi* auslösen kann (Cohen *et al.*, 1993). Metabolitenmessungen an SAR-induzierten Kartoffelpflanzen bestätigten, dass nicht JA aber dessen Vorstufe, die 12-Oxo-Phytodiensäure, sowohl lokal als auch systemisch stark akkumuliert, während SA und JA nur lokal vermehrt gebildet werden (Peter Landgraf, IPB Halle, unveröffentlichte Daten). Auch chemische SAR-Induktoren, die als SA-Analoga wirken, wie INA oder BTH, sind in Kartoffel unwirksam (Kistner, 1999). Es bleibt also ungeklärt, welche Signalmoleküle in Kartoffel an der Etablierung von SAR beteiligt sind. Weitere bekannte Komponenten der pflanzlichen Signaltransduktion von Abwehrreaktionen wurden auch in Kartoffel identifiziert. So vermitteln Glukose-Oxidase-exprimierende Kartoffelpflanzen, die apoplastidär H₂O₂ bilden, eine erhöhte Resistenz gegen *Pi* und *Erwinia carotovora* (Wu *et al.*, 1995) und Bakterio-Opsin-exprimierende Kartoffelpflanzen, die spontane Läsionen ausbilden, zeigen erhöhte SA-Gehalte und Resistenz gegenüber *Pi* (Abad *et al.*, 1997).

Eine lokale Inokulation von Kartoffelpflanzen des Kultivars Désirée mit dem auf Kartoffel nichtpathogenen Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* führt nach ca. 6 h zur Ausbildung von nekrotischen Läsionen und zur Ausprägung von Resistenz in der ganzen Pflanze gegen Nachfolgeinfektionen mit dem virulenten Pilz *Phytophthora infestans* (Kombrink *et al.*, 1995; Wegener, 1996). Die SAR-Induktion resultiert in einer signifikant verzögerten und quantitativ geringeren Ausprägung von Krankheitssymptomen (Wegener, 1996). Im Zuge dieser SAR-Induktion kommt es zu einer verstärkten lokal begrenzten Expression von Genen, die für Phenylalanin-Ammoniak-Lyase, Osmotin-ähnliches Protein, Glukanase und Chitinase kodieren (Julia Petters, IPB Halle, unveröffentlichte Daten)(Büchter *et al.*, 1997), und zur systemischen Expression einer Chitinase (Büchter *et al.*, 1997), Phosphotransferase (Julia Petters, IPB Halle, unveröffentlichte Daten) sowie eines weiteren unbekanntes systemisch responsiven Gens, *sre 2* (Kistner, 1999).

1.5.1 Das systemisch responsive Gen *sre 2*

Das Gen *sre 2* wurde in einer früheren Doktorarbeit am IPB Halle von Catherine Kistner identifiziert (Kistner, 1999). Seine Expression ist bereits zu sehr frühen Zeitpunkten und nur transient nach *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*-Inokulation lokal und auch systemisch induziert. Darüber hinaus wird es durch keines der bekannten Signalmoleküle SA, JA, MeJA, ET oder Abszissinsäure aktiviert, unterliegt jedoch einer tagesrhythmischen Schwankung und ist schwach wundresponsiv. Es konnten verschiedene *sre 2*-Transkripte identifiziert werden, die wahrscheinlich durch alternatives Spleißen und differentielle Polyadenylierung entstehen. Sie enthalten zwei

offene Leseraster, die je nach Transkript für 49 sowie 83, 86 oder 116 Aminosäuren kodieren. Die Analyse der genomischen Organisation ergab, dass es sich um eine Familie von mindestens sechs ähnlichen Genen in Kartoffeln handelt, von denen *sre 2* einige Promotorelemente aufweist, die auf eine pathogenspezifische Expressionsregulation hinweisen (Kistner, 1999). Um die Funktion dieses ungewöhnlichen Gens zu charakterisieren, sollten in dieser Arbeit Analysen an transgenen *sre 2*-Kartoffelpflanzen durchgeführt werden.

1.6 Ziele der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, Gene zu identifizieren, deren Expression in systemischem Gewebe zu frühen Zeitpunkten nach der Induktion von SAR aktiviert wird. Die Wahl eines frühen Zeitfensters sollte es ermöglichen, Gene zu finden, die nicht an der Ausprägung der antibiotischen Wirkung beteiligt sind, wie etwa die Gene der antifungal wirkenden PR-Proteine, sondern solche, die die Regulation der SAR kontrollieren. Da die Natur des systemischen Signals, das in der Pflanze transportiert werden muss, um zur Ausprägung der Resistenz in der ganzen Pflanze führen zu können, nicht bekannt ist, gibt jedes charakterisierte Gen, das an der Signaltransduktionskette beteiligt ist, neue Hinweise zur Aufklärung des Phänomens SAR. Die daraus resultierende Möglichkeit, regulatorische Prozesse der polygen determinierten systemisch erworbenen Resistenz zielgerichtet zu modulieren, würde der biotechnologischen Phytomedizin ein weites Anwendungsfeld eröffnen, Pflanzenschutz ökologisch verträglich betreiben zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien

Alle Laborchemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Biorad (München), Fluka (Buchs, CH), Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Steinheim) geliefert. Organische Lösungsmittel wurden von den Firmen Riedel-de-Haen (Hannover), Fluka und Merck bezogen. Die Inhaltsstoffe der Nährmedien stammen von Difco Lab. (Detroit, USA), Merck und Duchefa (Haarlem, NL). Nukleinsäure modifizierende Enzyme wurden von Boehringer (Mannheim), Roche Diagnostics (Mannheim), Clontech (Heidelberg), Eurogentec (Seraing, B), Gibco BRL (Eggenstein), Promega (Mannheim) und Pharmacia Biotech verwendet. Blottingmembranen wurden von Boehringer (Mannheim) bezogen. Radiochemikalien wie α -[³²P]-dATP, α -[³³P]-dATP, α -[³⁵S]-dATP sowie γ -[³²P]-UTP wurden von NEN Dupont (Bad Homburg) bzw. von ICN Pharmaceuticals (Irvine, USA) geliefert. Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG (Ebersberg) oder ARK (Darmstadt) synthetisiert. Autoradiographien wurden mittels des Phosphormagers Storm II der Firma Molecular Dynamics - Amersham-Pharmacia oder mit Filmen der Firmen Fuji (Tokio, Japan) oder Kodak (bezogen über Sigma, Steinheim) detektiert.

2.1.2 Nährmedien

Die Tabelle 2.2 fasst häufig verwendete Nährmedien zusammen. Für Platten wurde 15 g/l Agar, für Softtop-Agar 7 g/l Agarose und für MS-Agar 7,5 g/l Agar-Agar verwendet. Zu Selektionsmedien wurde nach Abkühlen auf 55°C das jeweilige Antibiotikum in folgenden Konzentrationen zugegeben:

Tab. 2.1: Antibiotikazusätze zu Selektionsmedien

Antibiotikum	Endkonzentration / Stammlösung
Ampicillin	50 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Tetracyclin	50 µg/ml / aus 5 mg/ml in Ethanol
Carbenicillin	200 µg/ml
Cefotaxim	200 µg/ml
Rifampicin	50 µg/ml / aus 25 mg/ml in Methanol
Gentamycin	10 µg/ml
Cycloheximid	50 µg/ml

Tab. 2.2 Häufig verwendete Nährmedien

Medium	Inhaltsstoffe
LB	10 g/l Bacto-trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 5g/l NaCl
LBM	LB plus 10 mM MgSO ₄ ; (für Phagenscreen:+ 0,2 % Maltose)
SOB	20 g/l Bacto-trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 0,5 g/l NaCl pH 7,5 nach dem Autoklavieren 20 ml/l 1M MgSO ₄ zugeben
King's B	20 g/l Glycerol; 40 g/l Proteose-pepton 3; nach dem Autoklavieren 10ml/l 10% K ₂ HPO ₄ , 10 ml/l 10% MgSO ₄ zugeben
G bzw. (2 oder 3)MS	40 ml/l Makroelemente ¹ ; 1ml/l Mikroelemente ¹ ; 5 ml/l Fe-EDTA-Lösung ¹ , 0,1g/l myo-Inosit; 0,5 g/l MES ² ; 16 g/l Glukose (20 oder 30 g/l Saccharose); pH 5,8; nach dem Autoklavieren 1ml/l Vitamine ¹ zugeben
2MS (Duchefa)	4,41 g/l MS-Fertigmedium; 0,5 g/l MES; 20 g/l Saccharose; pH 5,8; nach dem Autoklavieren 1ml/l Vitamine ¹ zugeben
FG75K	1 l GMS, nach dem autoklavieren 1ml Vitamine ¹ ; 2mg Zeatinriboside; 20 µg NAA ³ ; 20µg GA ₃ ⁴ zugeben
FG76K	1 l GMS, nach dem Autoklavieren 1 ml Vitamine ¹ ; 100µg BAP ⁵ ; 5 mg NAA ³ zugeben
NZCYM	10 g/l NZ-Amine; 5g/l NaCl; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 1 g/l Casaminosäuren; 2 g/l MgSO ₄ ; pH 7,0
YEB	5 g/l Beef Extrakt; 1 g/l Hefeextrakt; 5 g/l Pepton; 5 g/l Saccharose; 2 mM MgCl ₂

¹ siehe Anhang; ² MES = Morpholinoethansulfonsäure; ³ NAA: Naphtyllessigsäure; ⁴ GA₃= Gibberellinsäure;

⁵ BAP= Benzylaminopurin

2.2 Pflanzenmaterialien und Anzuchtbedingungen

2.2.1 Pflanzenanzucht aus Kartoffelknollen

Die Pflanzen für die Infektionsexperimente wurden zunächst aus Knollen angezogen. Dazu wurden *Solanum tuberosum* cv. Désirée-Knollen, die zuvor mindestens 6 Wochen bei 4-6°C gelagert sowie 1 Woche bei Raumtemperatur vorgekeimt wurden, in ein Einheitserde-Sand-Gemisch ausgetopft und für 4-6 Wochen im Gewächshaus angezogen. Im Gewächshaus waren die Pflanzen Temperaturen zwischen 18 und 26°C sowie Tages- bzw. Zusatzlicht von ~16 h/ Tag ausgesetzt. Drei Tage vor geplanten Experimenten wurden die Pflanzen zur Anpassung an die standardisierten Bedingungen in die Phytokammer gebracht, wo ein Lichtdunkelwechsel von 16 h zu 8 h bei einer Beleuchtungsstärke von 100 µmol/m²s herrschte sowie 60 % Luftfeuchte, 20°C in der Licht- und 18°C in der Dunkelphase.

2.2.2 Pflanzenanzucht aus Gewebekultur

Da die Pflanzen sehr empfindlich auf äußere Störfaktoren reagieren, wurden die Pflanzen für 4 Wochen in steriler Gewebekultur auf 2MS-Medium angezogen, bevor sie in ein Einheitserde-Sand-Gemisch ausgepflanzt und in pathogenarme Phytokammern überführt wurden. Dort wurden sie zur Anpassung an die geringere Luftfeuchte noch 4-6 Tage in kleinen Gewächshäusern gehalten. Unter den in Kap. 2.2.1 angegebenen Bedingungen wuchsen sie für 4-5 Wochen heran, bevor sie für weitere Experimente benutzt wurden.

2.2.3 Inokulation mit SAR-induzierenden Bakterien

Die Pflanzen wurden wie oben beschrieben angezogen und mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* M² (Debener *et al.*, 1991) inokuliert, die J. Dangl (Univ. of North Carolina, Chapel Hill, USA) zur Verfügung gestellt hat. Dafür wurden die Bakterien aus einer Glycerinkultur auf King's B/ Rifampicin-Platten ausgestrichen und mit einer Einzelkolonie eine Übernachtskultur in King's B/ Rifampicin angeimpft, die nach ~16 h durch Zentrifugation bei 3000g geerntet wurde. Die Bakterienpellets wurden in 10 mM MgCl₂ gewaschen, erneut zentrifugiert und so in 10 mM MgCl₂ aufgenommen, dass eine OD₂₀₀ von 0,2 resultierte, was einer Bakteriendichte von ~1x10⁸ cfu/ml entspricht. Diese Bakterienlösung wurde mittels einer 1ml-Spritze ohne Nadel durch die Stomata auf der Unterseite der Blätter injiziert, sodass mindestens die Hälfte des Blattes infiltriert war. Zur Kontrolle wurden Kartoffelblätter nach derselben Methode mit 10 mM MgCl₂-Lösung infiltriert. Für jede Kartoffelpflanze wurden 2 ältere Blätter mit Bakterien/ MgCl₂ behandelt, die im weiteren als „lokal“ bezeichnet werden. Ebenso wie die lokalen Blätter wurden nach verschiedenen Zeitpunkten auch je Pflanze 2 Blätter geerntet, die jünger als die lokalen sind und damit apikal lokalisiert sind und nicht selber mit Bakterien behandelt wurden. Diese jüngeren Blätter werden „systemisch“ genannt.

Das Blattmaterial wurde direkt nach der Ernte in Alufolie verpackt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.4 Analyse des Bakterienwachstums *in planta*

Für die Analyse ihres Wachstumspotentials in der Pflanze wurden Bakterien einer Dichte von ~1x10⁵ cfu/ml in Blätter infiltriert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Blattscheiben mit einem Durchmesser von 0,6 cm aus den Inokulationstellen ausgestochen und zu je zwei Scheiben (=1cm²) in 100 µl 10 mM MgCl₂ gemörsert. Verschiedene Verdünnungen wurden auf King's B/Rifampicin/Cycloheximid-Platten ausplattiert, 1½ Tage bei 28°C inkubiert und anschließend ausgezählt.

2.2.5 Phytohormonbehandlungen

Von Pflanzen, die wie in Kap. 2.2.2 beschrieben angezogen worden waren, wurden Fiederblätter vorsichtig am Blattgrund abgetrennt und in Gläschen gestellt, die 10 ml der jeweiligen Substanzlösung enthielten. Die folgende Tabelle zeigt die verschiedenen angewendeten Substanzen sowie ihre Konzentrationen.

Tab. 2.3 Verwendete Phytohormone und Stress auslösende Substanzen

Substanz	Konzentration
Natriumsalicylat pH 8,0	100, 200, 400, 600, 800, 1000 μM
Abszissinsäure	10, 50, 100, 200 μM
Methyljasmonat in 0,01% Ethanol	45 μM
Saccharose	200 mM
Sorbitol	200 mM

Zur Kontrolle dienten in Wasser gestellte Fiederblätter. Im Falle des flüchtigen Methyljasmonates wurde die Blätter auf der Oberfläche der Lösung in einer verschlossenen Petrischale flotiert. Zur Kontrolle wurden Blättchen auf 0,01% Ethanol flotiert. Die Versuche wurden in einer auf 22°C temperierten Gewebekulturkammer bei Dauerlicht durchgeführt. Die Blätter wurden nach 6, 12, 24 h aus den Lösungen genommen, abgetrocknet, in Alufolie verpackt, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert. Von einem Doppelerperiment stellte Catherine Kistner, IPB Halle Material zur Verfügung.

2.2.6 Verwundung und andere abiotische Stressfaktoren

Zur Untersuchung der Wundeffekte wurden Pflanzen, die wie unter Kap. 2.2.1 beschrieben angezogen worden waren, mit geriffelten Pinzetten gequetscht, mit Dialyseklammern für eine Stunde eingeklemmt und mit Rasierklingen zerschnitten. Die so behandelten Blätter wurden nach 3, 6, 18 und 24 h geerntet, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert.

Trocken- und Kältestress wurde durch Austrocknen 4 Wochen alter Pflanzen in der Phytokammer für 10 Tage bzw. durch Überführen der Pflanzen in 15°C für 3 Tage herbeigeführt. Nach diesen Behandlungen wurden altersmäßig den infiltrierten Blättern entsprechende Blätter geerntet und wie oben beschrieben konserviert.

2.2.7 Agrobakterien vermittelte Pflanzentransformation

Die Kartoffeltransformation erfolgte nach der Blattscheibentransformationsmethode. Dabei wurden junge, sterile Kartoffelblätter aus Gewebekultur mit einer Rasierklinge oberflächlich verletzt und nachfolgend für 2 Tage im Dunkeln auf einer Agrobaktériensuspension in MS-Medium (s. Tab. 2.2) flotiert. Dabei dürfen die Petrischalen auf keinen Fall luftdicht verschlossen werden. Anschließend wurden die

Blättchen auf Petrischalen mit FG76K-Agar (s. Tab. 2.2) umgesetzt, der die Kallusbildung induziert. Nach einer Woche wurden sie erneut umgesetzt auf FG75K-Agar (s. Tab. 2.2) und solange 14-tägig umgesetzt bis die aus den Kalli wachsenden Sprossachsen groß genug sind, um sie vom Kallus zu trennen (ca. 5 cm Länge). Die abgetrennten Sprosse wurden auf 3MS-Medium (s. Tab. 2.2) überführt, das die Wurzelbildung unterstützt. Nach einer Generation kann der Zuckergehalt des Mediums auf 2MS reduziert werden. Die Zugabe des entsprechenden Antibiotikums in die Medien führt zu einer Selektion transformierter Pflanzen. Die Transformanden wurden in ca. 4-wöchigem Abstand auf neues 2 MS-Medium umgesetzt, wobei jeweils nur die Sprossspitze abgetrennt und überführt wurde. Soll eine Transformande vermehrt werden, können auch aus Sprosstücken mit mindestens einem Nodium Ganzpflanzen regeneriert werden.

2.3 Molekularbiologische Techniken

2.3.1 Allgemeine Grundtechniken der Nukleinsäureanalytik

2.3.1.1 Verwendete Bakterienstämme

In Tab. 2.4 sind die verwendeten Bakterienstämme mit ihren Genotypen aufgeführt.

Tab. 2.4 Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
DH5 α	supE44 Δ lacU169 (F80 lacI ^q Z Δ M15) hsdR17 recA1 end A1 gyr A96 thi-1 rel A1
XL1-Blue (Stratagene)	MRF ⁺ D(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F ⁺ proAB lacI ^q ZDM15 Tn10 (Tet ^r)]
XL0LR (Stratagene)	D(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F ⁺ proAB lacI ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^r)] ^c Su ⁻ (nonsuppressing, λ resistant)
ONE SHOT TOP10 (Invitrogen)	F ⁺ {lacI ^q Tn10 (Tet ^r)} mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80 lacZ Δ M15 lacZX74 deoR araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str ^r) endA1 nupG
ONE SHOT TOP 10 (Invitrogen)	F ⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80 lacZ Δ M15 lacZX74 deoR araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str ^r) endA1 nupG
K802 (Stratagene)	e14 (McrA ⁻) mcrB1 hsdR2 galK2 galT22 supE44 metB1
BL21-(DE3)	F ⁻ omp T hsdSB (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3)

2.3.1.2 Verwendete Plasmide

In Tab. 2.5 sind die verwendeten Plasmide mit ihren Charakteristika und dem jeweiligen Verwendungszweck dargestellt.

Tab. 2.5 Verwendete Plasmide

Vektor	Charakteristika	Verwendung
pCR II (-TOPO)	f1 ori pMB1 ori lacZ α MCS M13 forward und reverse Primer Bindungsstellen T7 und SP6 Promotor Kan ^r Amp ^r	PCR-Produkt Klonierungsvektor (mit Topoisomerase zur beschleunigten Ligation)
pCR 2.1 (-TOPO)	f1 ori pMB1 ori lacZ α MCS M13 forward und reverse Primer Bindungsstellen T7 Promotor Kan ^r Amp ^r	PCR-Produkt Klonierungsvektor (mit Topoisomerase zur beschleunigten Ligation)
pUC 18	pMB1 ori lacZ α MCS M13 forward und reverse Primer Bindungsstellen Amp ^r	Klonierungsvektor
pRT100	pMB1 ori lacZ α MCS M13 forward und reverse Primer Bindungsstellen Amp ^r CaMV 35S Promotor poly A-Signal	Expressionsvektor für Pflanzentransformation
pBKTX-Kan	T-DNA borders Tripel-35 S-Promotor poly A-Signal <i>npt II</i>	binärer Vektor zur Transformation von Agrobakterien und Expression von Genen in Pflanzen
pJC40	Shine-Delgarno Sequenz T7 Promotor His 10-tag Faktor Xa-Schnittstelle MCS Tripel Stopp-Codon colE1 ori Amp ^r	Expressionsvektor zur Proteinexpression in Bakterien

2.3.1.3 Klonierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden durch Polymerasekettenreaktion (PCR) oder Restriktion mittels geeigneter Endonukleasen nach den Angaben und mit den Puffern der entsprechenden Hersteller gewonnen. PCR-Fragmente wurden entweder über den A-Überhang, den die *Taq*-Polymerase anhängt, mittels T4-Ligase nach den Angaben des Herstellers in pCR-Vektoren (s. Tab. 2.5) oder über die Topoisomerasefunktion der TOPO-Vektoren (s. Tab. 2.5) ligiert. Restriktionsfragmente wurden mittels T4-Ligase mit glatten oder kompatiblen überhängenden Enden in linearisierte Vektoren kloniert.

2.3.1.4 Bakterientransformation (*E. coli*)

Chemisch kompetente Bakterien wurden mittels Hitzeschock transformiert. Die zu transformierenden Plasmide wurden zu den kompetenten Bakterien gegeben, diese für 5-30 Min. auf Eis inkubiert, für 30-90 s einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und

anschließend weitere 5 Min. auf Eis gestellt. Danach wurde vorgewärmtes LB- bzw. SOC zugegeben und die Kulturen für 30-60 Min. bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden Aliquots der Kulturen auf entsprechenden Agarplatten ausplattiert.

2.3.1.5 Agrobakterientransformation

Ein 200 µl Aliquot kompetenter Agrobakterien des Stammes LBA 4404 wurde mit 2 µg binärer Plasmid-DNA (pBKTX-Kan-*sre 2-sense* oder -*antisense*) versetzt und 5 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 5 Min. in flüssigem Stickstoff und dann 5 Min. bei 37°C inkubiert. Diesem Ansatz wurde 1 ml YEB-Medium zugegeben und unter Schütteln bei 28°C weitere 1-3 h inkubiert. Je 200 µl wurden dann auf YEB-Platten mit Rifampicin, Gentamycin und Kanamycin ausplattiert und 2 Tage bei 28°C wachsen gelassen

2.3.1.6 Konzentrationsbestimmungen

Die Nukleinsäurekonzentrationen in Lösungen wurden spektroskopisch ermittelt. Dazu wurde die Extinktion der Lösungen bei 260 nm bestimmt. Über die folgenden Formeln lässt sich die Konzentration der Lösungen errechnen:

DNA: $E_{260}=1$ entspricht 50 µg/ml RNA: $E_{260}=1$ entspricht 40 µg/ml

Geringkonzentrierte poly A⁺-Lösungen wurden über den Vergleich der Leuchtintensität mit Standard-RNA-Lösungen auf Ethidiumbromid-Agarose-Platten bestimmt (Sambrook *et al.*, 1989).

2.3.1.7 Agarosegelelektrophorese

Diese Gelelektrophorese erlaubt die Auftrennung von DNA und in denaturierenden Gelen auch von RNA in einer Matrix aus Agarose, bei der die Prozentigkeit die Maschenweite des Gels bestimmt. Durch das Anlegen einer Spannung an horizontale pufferüberschichtete Gele können die negativ geladenen Nukleinsäuren im elektrischen Feld nach ihrer Größe getrennt werden.

Für die DNA-Trennung wurden 0,8-3 %ige Agarosegele in 1xTAE-Puffer (aus 50xTAE-Puffer: 2 M Tris-azetat pH 8,0; 100 mM EDTA pH 8,0) bei einer Spannung von 60-100 V genutzt. Als Größenstandards wurde *Pst I*-geschnittene λ-DNA oder die 1 Kb+-Leiter von Gibco verwendet. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte über eine Färbung in einer Ethidiumbromidlösung (50µg/ml) und anschließender Detektion auf einem UV-Transilluminator, der über ein Videosystem die Dokumentation der Gele erlaubte.

Für die RNA-Trennung wurden 1 %ige Agarosegele in 1x MOPS-Puffer (20 mM MOPS; 5 mM Natriumazetat; 1 mM EDTA; pH 7,0) mit 10 % Formaldehyd (37 %ig) zur Denaturierung verwendet. Die RNA wurde in Probenpuffer (7,5 ml Formamid; 2,5 ml Formaldehyd; 1,5 ml 10x MOPS-Puffer; 2,45 ml H₂O; 1 ml Glycerol; 50 µl 10% Bromphenolblau) aufgenommen, 10 Min. bei 65°C denaturiert und anschließend auf

Eis abgekühlt, mit 1 µl Ethidiumbromidlösung (1mg/ml) versetzt und auf das horizontale Gel aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei einer Spannung von ca. 80 V. Als Größenstandards wurden die RNA-Marker II und III der Firma Boehringer verwendet. Die Detektion auf dem UV-Transilluminator ermöglicht eine Kontrolle der gleichmäßigen Gelbeladung über die Quantifizierung der sichtbaren rRNA-Banden.

2.3.1.8 Polyacrylamidgelelektrophorese

a) SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-PAGE wurde nach dem Protokoll von Laemmli, (1970) als diskontinuierliche Elektrophorese nach den Anweisungen von Sambrook *et al.*, (1989) durchgeführt. Das Acrylamid,/N,N'-Methylen-bisacrylamid-Gemisch wurde als Gel 30-Lösung von der Firma ROTH bezogen.

Die Proteine wurden in 12-15 %igen Trenngelen mit 5 %igen Sammelgelen in den Minigelelektrophoreseapparaturen *Mighty Small* der Firma Hoefer (San Francisco, USA) aufgetrennt und anschließend mit Coomassie Brilliant Blue R-250 gefärbt (vgl. Kap. 2.4.3.1) oder der Western-Detektion unterzogen (s. Kap. 2.4.5).

b) Harnstoffsequenzgele

Für die manuelle Sequenzierung und die *Differential Display*-Technik wurden 6 %ige denaturierende Polyacrylamidgele (8M Harnstoff; 1 x TBE: 0,1M Tris, 0,1M Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8,0; 15% Gel 40-Lösung der Firma ROTH: Acrylamid/N,N'-Methylen-bisacrylamid 19:1; 38 %) zur Auftrennung der Polynukleotide verwendet. Dazu wurden die Gele zwischen silanisierte Glasplatten der LKB MacoPhorTM-Apparatur der Firma Pharmacia gegossen, die Proben in Stopppuffer (97,5 % Formamid; 10 mM EDTA, pH 7,5; 0,3 % Bromphenolblau, 0,3 % Xylencyanol) aufgetragen und bei 60 W in 1x TBE-Puffer für 2-2,5 h aufgetrennt. Die Gele wurden auf einer Platte haftend mit 10%iger Essigsäure fixiert, neutralisiert und gewässert und anschließend bei 80°C auf einer Glasplatte getrocknet. Die Detektion erfolgte über die Exposition eines Röntgenfilms über Nacht in lichtdichten Behältnissen.

Auf 80 ml Sequenzgellösung wurden 200 µl 10 %iges Ammoniumpersulfat und 80 µl TEMED zur Aktivierung der Polymerisation eingesetzt.

2.3.2 RNA-Isolation

2.3.2.1 Isolation von Gesamt-RNA

Das geerntete Kartoffelblattmaterial wurde bei -80°C aufbewahrt. Zur Extraktion der Gesamt-RNA wurde dieses Material ohne aufzutauen in Mörsern unter flüssigem Stickstoff mit Seesand fein vermahlen und entweder wieder bei -80°C gelagert oder der Extraktion zugeführt. Für besonders reine RNA-Proben wie etwa für die *Differential Display*-Versuche wurde eine Extraktionsmethode nach einem Protokoll von Logemann *et al.* (1987) angewendet. Für andere Experimente wurde eine Mini-Extraktionsmethode verwendet, die die Extraktion im 300 mg-Maßstab erlaubt. Dazu wurden 300 mg stickstoffgemörsertes Blattmaterial in 500 µl Extraktionspuffer (0,2 mM

Tris/HCl pH 7,5; 0,1 M LiCl; 5 mM EDTA; 1 % SDS) und 500 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) (PCI) resuspendiert bis das Material aufgetaut ist und die Phasen vollständig durchmischt sind. Nach der Phasentrennung durch Zentrifugation wurde die wässrige Phase erneut mit PCI extrahiert und die resultierende wässrige Phase mit 1 Vol. 6 M LiCl 4 h auf Eis gefällt. Das Pellet wurde mit 3 M LiCl gewaschen, in DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen und erneut mit 0,1 Vol. 3M Natriumazetat und 2 Vol. eiskaltem Ethanol gefällt. Das entstehende Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in DEPC-Wasser aufgenommen.

Alternativ zu dieser Minipräparation wurde die Trizol-Methode (Gibco) nach den Angaben des Herstellers angewendet. Die dabei anfallenden Phenolphasen wurden zur Extraktion der enthaltenen Proteine bei -80°C aufbewahrt (s. Kap. 2.4.1).

2.3.2.2 Isolation von Poly(A)⁺-RNA

Gesamt-RNA besteht zu etwa 99 % aus r- und t-RNA und nur zu etwa 1% aus mRNA. Zu ihrer Anreicherung nutzt man die Tatsache, dass in eukaryotischen Systemen den mRNAs ein poly A-Schwanz angehängt wird. Mit einer Affinitätschromatographie an immobilisierten oligo-dT-Nukleotiden, die sowohl an Säulenmaterialien (z. B. Sepharose) als auch an magnetische Kügelchen gekoppelt sein können, werden die Transkripte aus dem Pool der RNAs herausgereinigt.

Beide Methoden der Immobilisierung fanden Verwendung. Es wurde der *mRNA purification kit* (Pharmacia) für die Säulenchromatographie und *Dynabeads* (Dynal) für die magnetische Reinigung jeweils nach den Angaben der Hersteller benutzt.

2.3.3 DNA-Isolation

2.3.3.1 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien (*E.coli*)

Je nach Verwendungszweck wurden verschiedene Arten der Plasmidpräparation eingesetzt. Für einfache Anwendungen, die einen hohen Probendurchsatz erfordern, wurde die Methode der alkalischen Lyse modifiziert nach Birnboom und Doly (1979) verwendet. Die pelletierten Bakterien aus 2 ml Übernachtskulturen wurden in 100 μl Lysispuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 50 mM EDTA pH 8,0; 15 % Saccharose) aufgenommen, mit 200 μl alkalischer SDS-Lösung (200 mM NaOH; 1 % SDS) maximal 5 Min. lysiert und anschließend mit 150 μl Kaliumazetat-Puffer (60 ml 5 M Kaliumazetat; 11,5 ml Essigsäure; 28,5 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ {doppelt destilliert oder MilliQ-Reinstwasser}) versetzt. Die Zelltrümmer sowie die ausgefallenen Proteine wurden abzentrifugiert und die DNA aus dem wässrigen Überstand mit 0,6 Vol. Isopropanol gefällt. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und in TE-Puffer (10mM Tris/HCl, 1mM EDTA, pH 8,0) oder 10 mM Tris/HCl pH 8,5 aufgenommen.

Für Anwendungen, die eine hohe Reinheit der Plasmid-DNA erfordern, wurden Mini- und Midi-Plasmidreinigungskits der Firmen Macherey und Nagel sowie Qiagen nach den Angaben der Hersteller verwendet, die nach der alkalischen Lyse die DNA über einen säulenchromatographischen Schritt aufreinigen.

2.3.3.2 Isolation von genomischer DNA aus Pflanzen

Aus je 3 jungen Fiederblättchen der Kartoffel wurde im Mikromaßstab genomische DNA extrahiert. Dazu wurde das Blattmaterial unter flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zermörsert, 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 bei 65°C mindestens 10 min inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl Kaliumazetat-Puffer (s. Kap. 2.3.3.1) wurde die Suspension für 10 Min. bis 1 h auf Eis belassen, abzentrifugiert und der wässrige Überstand mit 800 µl PCI extrahiert. Nach der Phasentrennung wurde die wässrige Phase abgenommen und die genomische DNA mit Isopropanol ausgefällt. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE pH 7,5 aufgenommen.

2.3.3.3 Isolation von DNA aus λ -Phagen

Die Phagen-DNA wurde aus Flüssiglysaten isoliert, die durch Lyse von frischen Bakterienlösungen (K802) einer OD_{600} von 0,6 in LBM oder NZCYM-Medium mit Phageneluat (10⁵ bis 10⁷ pfu) gewonnen wurden. Die Flüssigkulturen wurden dazu bei 37°C inkubiert bis eine Lyse der Bakterien durch Aufklaren der Lösung evident wird. Zu 20 ml Flüssiglysat wurden 50 µl Chloroform zugegeben und bei 37°C für 10 Min. inkubiert. Anschließend wurden die Bakterienzelltrümmer abzentrifugiert und der Überstand in 2 Teile geteilt. Je 10 ml wurden mit 100 µl Chloroform versetzt und als Stammlösungen bei 4°C aufbewahrt, die anderen 10 ml wurden mit DNase und RNase mit einer Endkonzentration von 1 µg/ml bei 37°C für 30 Min. behandelt. Die Phagenpartikel wurden mit 1/5 Vol. PEG/NaCl-Lösung (30 % PEG 6000; 3 M NaCl) in 1 h auf Eis ausgefällt, abzentrifugiert (10 Min., 15000xg) und sorgfältig vom PEG befreit. Die Pellets wurden in 500 µl SM-Puffer (100 mM NaCl; 10 mM MgSO₄ * 7H₂O; 35 mM Tris /HCl pH 7,5; 0,01 % Gelatine) vorsichtig resuspendiert, mit 1 Vol. Chloroform versetzt, 30 sek. homogenisiert und abzentrifugiert (15 Min., 3000xg). Der wässrige Überstand wurde in einem neuen Gefäß mit 1/100 Vol. 10 % SDS und 1/100 Vol. 0,5 M EDTA versetzt und 20 Min. bei 68°C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde die Phagen-DNA mit 1 Vol. PCI extrahiert, die wässrige Phase mit 1/10 Vol. 3 M Natriumazetat pH 4,8 und 2 Vol. Ethanol 30 Min. bei -20°C gefällt. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in 50-100 µl H₂O_{dd} aufgenommen.

2.3.3.4 Isolation von Plasmid-DNA aus Agrobakterien

Zur Präparation der binären Plasmide aus Agrobakterien wurden 3 ml einer Übernachtskultur pelletiert und in 100 µl Lösung I (0,045 g Glukose; 0,02 g Lysozym in 0,25 M EDTA; 0,5 M Tris/HCl pH 7,5) der frisch das Lysozym zugesetzt wurde, resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 Min. bei RT wurden 200 µl alkalische SDS-Lösung (s. Kap. 2.3.3.1) zugegeben und vorsichtig durch Umwenden gemischt. Nach weiteren 30-60 Min. bei RT wurden 30 µl alkalisches Phenol (30 µl Phenol; 1,8 µl 1 N NaOH) zugesetzt, schnell vermischt und sofort 150 µl Kaliumazetat-Puffer (s. Kap. 2.3.3.1) zugegeben. Die Zelltrümmer und gefällten Proteine wurden abzentrifugiert und der Überstand mit 1 Vol. PCI extrahiert. Die wässrige Phase wurde nochmals mit 1 Vol.

Chloroform extrahiert und aus der resultierenden wässrigen Phase wurde die DNA mit 500 µl Isopropanol 5 Min. bei RT ausgefällt. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 40 µl H₂O_{dd} oder TE pH 7,5 gelöst.

2.3.3.5 Reinigung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden angefärbt mit Ethidiumbromid unter UV-Licht aus Agarosegelen ausgeschnitten. Durch Adsorption der DNA an Glasmilch unter Verwendung des QiaEx kits (Qiagen) wurde die DNA aus der Agarosegelmatrix nach den Angaben des Herstellers isoliert.

2.3.4 Markierung von Nukleinsäure-Fragmenten

2.3.4.1 Radioaktive Markierung

Zur Detektion von RNA und DNA in Hybridisierungsexperimenten wurden DNA-Fragmente (s. Kap. 2.3.3.5) mit Hilfe des *Megaprime DNA-labelling kits* (Amersham) mit 50 µCi α-[³²P]-dATP nach der Methode von Feinberg und Vogelstein (1984) radioaktiv markiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch eine anschließende Gelfiltrationschromatographie mit *ProbeQuant™ G-50 Micro Columns* (Pharmacia) oder *Chroma Spin-100*-Säulen (Clontech) abgetrennt. Die Menge der in die DNA-Fragmente eingebauten Radioaktivität wurde in dem Mikroquantifizierer QC4000 XER (Bioscan) quantifiziert.

2.3.4.2 Nichtradioaktive Markierung

Für die nichtradioaktive Markierung von Sonden für Hybridisierungsexperimente wurde der Dig-RNA-labeling kit SP6/T7 (Boehringer) verwendet, der über einen SP6 oder T7-Promotor mit einer Reversen Transkriptase unter Einbau von Dig-markiertem UTP eine *antisense*-RNA generiert, die mit Hilfe eines Anti-Dig-Fab-Antikörperfragments detektiert werden kann (s. Kap. 2.3.6.2).

2.3.5 DNA-Hybridisierungsexperimente (Southern)

Die DNA wurde in Agarosegelen aufgetrennt (s. Kap. 2.3.1.7), die Gele für 30 Min. in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) geschwenkt und mit Neutralisierungslösung (0,5 M Tris/HCl pH 7,0; 1,5 m NaCl) wieder neutralisiert. Die so vorbereiteten Gele wurden mit 10xSSC (1,5 M NaCl; 0,15 M Natriumzitat pH 7,0) auf positiv geladene Nylon-Membranen mittels Kapillarblottechnik transferiert und im Stratalinker (Stratagene) durch UV-Bestrahlung kovalent an die Membran gekoppelt. Anschließend wurde die Membran mit Prähybridisierungspuffer (1 Vol. Lösung N: 1,8 M NaCl, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM EDTA, 0,2 % SDS pH 7,0; 0,2 % Polyvinylpyrrolidon; 0,2 % Ficoll 400; 0,2 % BSA Fraktion V; 1 Vol. Formamid; frisch > 100µg/ml Lachssperma-DNA hitzedenaturiert zugeben) bei 42°C für mindestens 2 h geblockt und über Nacht mit der Prähybridisierungslösung, der das radioaktiv markierte Fragment zugesetzt wurde (s. Kap. 2.3.4.1), im Rotationsinkubator bei 42°C inkubiert.

Danach wurde 2 x 15 Min. mit Waschlösung I (2xSSC; 0,1 % SDS) bei RT und 2 x 30 Min. bei 42 bis 65°C, je nach gewünschter Stringenz, mit Waschlösung II (0,2xSSC; 0,1 % SDS) gewaschen. Die Membranen wurden in SaranTM-Folie verpackt und die Autoradioaktivität durch die Exposition eines Phosphorimager Screens detektiert. Zur Beschleunigung der Hybridisierungsexperimente wurde auch der ExpressHyb Puffer der Firma Clontech nach den Angaben des Herstellers für Hybridisierungs- und Waschschriffe eingesetzt.

2.3.6 RNA-Hybridisierungsexperimente (Northern)

2.3.6.1 Radioaktive Hybridisierungsexperimente

Nach der Auftrennung der RNAs im Agarosegel (s. Kap. 2.3.1.7) wurden die radioaktiven RNA-Hybridisierungsexperimente analog den DNA-Experimenten (s. Kap. 2.3.5) durchgeführt. Die Denaturierungs- und Neutralisierungsschritte entfallen dabei.

2.3.6.2 Nichtradioaktive Hybridisierungsexperimente

Für die nichtradioaktive Detektion wurden die RNA-Gele wie oben beschrieben geblottet (s. Kap. 2.3.5 und 2.3.6), bei 65°C mit der Dig-markierten Sonde (s. Kap. 2.3.4.2) über Nacht hybridisiert und anschließend mit dem *Dig-chemiluminescence detection kit* (Boehringer) nach den Angaben des Herstellers detektiert. Die Dokumentation erfolgte über die Exposition eines Röntgenfilms.

2.3.7 Differential Display

Zur Identifizierung von differentiell exprimierten Genen nach SAR Induktion wurde die Methode des *Differential Display* eingesetzt. Pflanzenmaterial, das wie unter Kap. 2.2.3 beschrieben gewonnen wurde, diente dabei als Ausgangsmaterial. Die aus diesem Material gewonnene RNA bzw. poly A⁺-RNA (s. Kap. 2.3.2) wurde zur Reinigung von kontaminierender genomischer DNA mit RNase-freier DNase (Boehringer) nach den Angaben des Herstellers behandelt und die DNase durch Extraktion mit PCI und anschließender Ethanol-fällung wieder entfernt.

2.3.7.1 Klassisches *Differential Display* (Liang und Pardee, 1992)

Mit einem 4 µg Aliquot der RNA wurde unter Verwendung eines oligo dT-Primers mit 2 Ankerbasen (s. Anhang) und der Superscript Reversen Transkriptase (Gibco) die Erststrangsynthese nach den Angaben des Herstellers in 40 µl durchgeführt und das Enzym durch Hitzeeinwirkung (5 Min. 95°C) inaktiviert. Je 2 µl der Erststrang-cDNA wurden in die PCR eingesetzt, bei der mit Hilfe des oben erwähnten oligo-dT-Primers und eines Zufallsprimers (s. Anhang) die cDNA-Fragmente unter Einbau von α -[³³P]-dATP amplifiziert wurden (PCR-Ansatz: ~2 µg cDNA; 0,5 µM Zufallsprimer; 1 µM oligo-dT Primer; je 2 µM dCTP, dGTP, dTTP; 1,5 µCi α -[³³P]-dATP; 1 x *Taq*-Puffer mit 1,5 mM MgCl₂; 0,2 U *Taq*-Polymerase in 20 µl Gesamtvolumen; Mineralöl zum Überschichten der Proben).

Das PCR-Programm wurde wie folgt durchgeführt (94°C 2 Min.; 40 x {94°C 30 s, 40°C 2 Min., 72°C 30 s}; 72°C 7 Min.; 4°C bis ∞). Die Proben wurden mit 5 µl Stopplösung (s. Kap. 2.3.1.8) versetzt und je 3 µl wurden auf ein 6 %iges Harnstoff-Polyacrylamid-Sequenziergel aufgetragen (s. Kap. 2.3.1.8). Nach der Autoradiographie wurden der Film und das Gel in Übereinstimmung gebracht und die detektierten Banden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, in 100 µl H₂O_{dd} für 10 Min. bei 95°C inkubiert und anschließend in Anwesenheit von Glycogen als Carrier mit 1/10 Vol. 3 M Natriumazetat und 2 Vol. Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Die gefällte cDNA wurde als Matrize in eine erneute PCR unter den oben beschriebenen Bedingungen eingesetzt und die Amplifikationsprodukte wurden in den T-Überhang-Vektor pCR II oder 2.1 (s. Tab. 2.5) kloniert und sequenziert (s. Kap. 2.3.14).

2.3.7.2 *Enhanced Differential Display*

Das *Enhanced Differential Display* unterscheidet sich von dem klassischen durch die Wahl längerer Primer und daraus resultierend in der Möglichkeit, höhere Annealingtemperaturen zu wählen (Linskens *et al.*, 1995). Das Ausgangsmaterial wurde wie unter Kap. 2.3.7.1 beschrieben vorbereitet und die PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt. (PCR-Ansatz: ~2 µg cDNA; 0,5 µM Zufallsprimer (lang); 1 µM oligo-dT Primer (lang); je 2 µM dCTP, dGTP, dTTP; 1,5 µCi α-[³³P]-dATP; 1x *Taq*-Puffer mit 1,5 mM MgCl₂; 0,2 U *Taq*-Polymerase in 20 µl Gesamtvolumen; Mineralöl zum Überschichten der Proben. PCR-Programm: 94°C 2 Min.; 4 x {94°C 45 s, 41°C 60 s, 72°C 60 s} 18 x {94°C 45 s, 60°C 45 s, 72°C 120 s} 72°C 10 Min.; 4°C bis ∞). Die reamplifizierten eluierten Fragmente wurden mit der Restriktionsendonuklease *Hind*III geschnitten und in den ebenfalls *Hind*III geschnittenen Vektor pUC 18 kloniert und sequenziert.

2.3.8 Reverse Northern

Nach der Methode von Vögeli-Lange *et al.* (1996) kann durch den Vergleich der Bandenintensität zwischen Kontroll-DNA-Blots und induzierten Blots die differentielle Expression mehrerer cDNA-Fragmente gleichzeitig verifiziert werden.

Gleiche Mengen der gefundenen cDNA-Fragmente (10µg) wurden doppelt auf Agarosegelen aufgetrennt und auf Nylonmembranen transferiert. Je eine Membran wurde mit einem Kontrollansatz und einer mit einer induzierten Sonde wie unter Kap. 2.3.5 beschrieben hybridisiert. Als Sonden dienen dabei α-[³³P]-dATP markierte cDNA-Pools, wie sie bei der DDRT-PCR entstehen (s. Kap. 2.3.7).

2.3.9 RT-PCR

Die RT-PCR-Experimente wurden entweder mittels Erststrangsynthese mit der Superscript Reversen Transkriptase und anschließender PCR mit *Taq*-Polymerase (Pharmacia) oder mit dem *Ready-to-go* RT-PCR kit (Pharmacia) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Ausgangsmaterial wurden 1-4 µg RNA eingesetzt. Die Primer wurden in einer Endkonzentration von 0,5-1 µM verwendet und die PCR-

Bedingungen den Primern und der Länge des zu amplifizierenden Bereiches angepasst (Annealingtemperaturen von 45 bis 65 °C; Syntheszeiten von 30 bis 120 s; Programm siehe Kap. 2.3.7.1). Bei semi-quantitativen Experimenten wurde ein Fragment der 23S rRNA aus verdünnten Probenlösungen (1:5000 verdünnt) in 22 PCR-Zyklen mitamplifiziert.

2.3.10 RACE

Zur Erlangung weiterer Sequenzinformationen, die weiter 5'- bzw 3'- der *Differential Display*-Fragmente liegen, wurde eine RACE (*random amplification of cDNA ends*) durchgeführt. Dabei wurde eine adaptorligierte cDNA-Bank mit dem Marathon-RACE kit (Clontech) nach den Angaben des Herstellers generiert und aus dieser mit Hilfe von Adaptorprimern und verschiedenen genspezifischen Primern (3'-RACE, 5'-RACE und DDX-RACE-5'; Sequenzen s. Anhang), die jeweiligen Enden des Gens *sre 4* amplifiziert. Zur Gesamtklonierung der cDNAs wurde eine PCR mit den Primern X-5'c und X-3'c durchgeführt.

2.3.11 Herstellung von cDNA-Bibliotheken

Es wurden zwei cDNA-Bibliotheken aus lokalem und systemischem Material der Zeitpunkte 12-36 h nach Infiltration hergestellt. Dafür wurde 2,2 bzw 1,7 µg poly A⁺-RNA gewonnen (s. Kap. 2.3.2.2) und mit Hilfe des Timesaver cDNA-Synthese kits (Pharmacia) nach den Angaben des Herstellers mit einem oligo-dT Primer bzw. mit einem Zufallshexamer-Primer in cDNA umgeschrieben. Nach der *EcoRI*-Adaptorligation an die doppelsträngige cDNA wurde der Ansatz mit dem *Lambda ZAP^R II predigested EcoRI/ CIAP-treated Vector kit* (Stratagene) ligiert und mit dem *Gigapack II GOLD packaging extract* (Stratagene) zu λ-Phagen verpackt. Die verpackten Ligationsprodukte konnten in XL1-blue MRF'-Zellen vermehrt und analysiert werden.

Die Anzahl der Primärtransformanden pro µg DNA betrug 3×10^6 pfu bzw. $8,5 \times 10^6$ pfu bei nicht mehr als 10^5 pfu Nichttransformierten aus religiertem Vektor. Die 2. Bibliothek wurde einmal auf Platten amplifiziert.

2.3.12 Durchsuchen von cDNA-Bibliotheken

Die Phagen wurden titriert und in einer Dichte von 5×10^5 pfu/Platte auf NZCYM-Medium in NZCYM oder LBM-Weichagar mit 600 µl XL0LR-Wirtsbakterien $OD_{600}=0,5$ ausplattiert. Von den Platten wurden Abdrücke auf Nylonmembranen genommen, die wie DNA-Blots weiterbearbeitet wurden (s. Kap. 2.3.5). Als Sonden dienten die radioaktiv markierten *Differential Display*-Fragmente XIV= *sre 3* und X= *sre 4*. Auf diese Weise wurden 5×10^6 pfu einer cDNA-Bank analysiert, die Sigrun Wegener, MPIZ Köln, aus systemischem Blattmaterial 12-72 h nach Bakterieninfiltration angelegt hat (Wegener, 1996); 2×10^6 pfu einer cDNA-Bibliothek, die Julia Petters, IPB Halle, aus

lokalem und systemischem Material hergestellt hat und die unter Kap. 2.3.11 beschriebenen Bibliotheken mit 3×10^6 bzw. $8,5 \times 10^6$ pfu.

2.3.13 Genome Walking

Um die zu der *sre 4* cDNA korrespondierenden genomischen Bereiche zu klonieren wurde die Methode des *genome walking* (Clontech) angewendet. Dabei wurde genomische DNA mit glatt schneidenden Restriktionsendonukleasen geschnitten, Adapter anligiert und anschließend wie bei einer RACE (s. Kap. 2.3.10) die Bereiche 5' und 3' der bekannten Sequenzen amplifiziert, in pCR 2.1 kloniert und sequenziert. Mit den im Anhang angegebenen Primern gX-3'gWdown, gX5'-UTR down, gX5'-UTR up und X5'-UTR konnten 1 kb in 5'-Richtung und das 3'-Ende des Gens *sre 4* identifiziert werden.

2.3.14 Sequenzierung von DNA

2.3.14.1 Radioaktive Sequenzierung (Sanger *et al.*, 1977)

Für die manuelle Sequenzierung wurde der T7-*Sequencing kit* (Pharmacia) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Auftrennung und Detektion erfolgte wie in Kap. 2.3.1.8 beschrieben.

2.3.14.2 Nichtradioaktive, automatisierte Sequenzierung

Die automatisierte Sequenzierung wurde im Service von Regine Weiss nach der Methode des *cycle sequencing* mit fluoreszenzmarkierten Primern (IRD 700 bzw. 800, MWG-Biotech) auf einem LICOR (4000L oder LONGREADIR 4200; MWG-Biotech) durchgeführt.

2.3.15 Computergestützte Sequenzdatenverarbeitung

Die Sequenzdaten wurden mit Hilfe der DNASIS- und der Lasergene DNA*STAR-Software analysiert sowie mit öffentlich zugänglichen *online*-Programmen, die im Ergebnisteil jeweils angegeben werden.

2.3.16 Herstellung von Expressionsplasmiden

Zur Expression des Gens *sre 4* in Bakterien musste das offene Leseraster des Klons *sre 4-c1 in frame* mit dem N-terminalen His10-*tag* in den Expressionsvektor pJC40 (Clos und Brandau, 1994) kloniert werden. Dazu wurde mittels PCR mit den Primern X-5'c und X-3'c am 5'-Ende eine *Nde I* und am 3'-Ende eine *EcoRI*-Schnittstelle in die cDNA eingeführt, die die direktionale Klonierung erlaubt. Das entstandene Konstrukt pJC40-*sre 4-c1* wurde sequenziert und erst in DH5 α und als *supercoiled* Plasmid in BL21-(DE3)-Zellen transformiert.

2.3.17 Expression von rekombinantem Protein in Bakterien

Die mit dem Konstrukt pJC40-*sre 4-c1* bzw. leerem Vektor pJC40 transformierten BL21-(DE3)-Zellen wurden aus einer Übernachtskultur frisch überimpft, bis zu einer OD_{600} von 0,6 wachsen gelassen und dann mit 1 mM IPTG induziert, um die T7-Polymerase zu exprimieren, die wiederum die Expression des Transgens vollzieht. Nach 3-5 h wurden die Bakterien in 100 μ l Aliquots pelletiert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert oder direkt im SDS-Polyacrylamidgel analysiert (s. Kap. 2.4.1 und 2.3.1.8).

2.4 Proteinanalytik

2.4.1 Proteinisolation aus Pflanzen und Bakterien

Zur Analyse der in Bakterien exprimierten Proteine wurden gleiche Mengen der Induktionskulturen (s. Kap. 2.3.17) pelletiert und in SDS-Probenpuffer 5 Min. im Wasserbad aufgeköcht oder 7 Min. bei 95°C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurden ungelöste Bestandteile abzentrifugiert und Aliquots dieser Bakterienlysate auf SDS-Polyacrylamidgelen (s. Kap. 2.3.1.8) analysiert.

Für pflanzliche Proteine, die in Western-Blots analysiert werden sollten, wurden die phenolischen Phasen der Trizol-RNA-Präparationen (Gibco) als Ausgangsmaterial gewählt, aus denen nach dem Protokoll des Herstellers die Proteine extrahiert werden können.

2.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteingehalte der Lösungen wurden mit dem Bradford *protein assay* (BioRad) oder dem *BCA protein assay reagent kit* (Pierce) mit Eichkurven auf Basis von Standardalbuminlösungen nach den Angaben der Hersteller bestimmt.

2.4.3 Proteinfärbungen

2.4.3.1 Coomassiefärbung

Zur Kontrolle der Gelbeladung und der Bloteffizienz wurden die Proteingele nach dem Transfer (s. Kap. 2.4.5) mit Coomassie-Brilliant Blue R-250-Lösung (0,25 g Coomassie Brilliant Blue R-250; 45 % Methanol; 45 % H_2O ; 10 % Eisessig) angefärbt, mit Entfärbelösung (45 % Methanol; 45 % H_2O ; 10 % Eisessig) überschüssiger Farbstoff wieder entfernt und nach 30-minütiger Haltbarmachung in Trockenlösung (20 % Glycerol) in Folie getrocknet.

2.4.3.2 Fast Green Färbung

Vor der Western-Analyse kann die Proteinmenge, die auf die Membran transferiert wurde, mittels der Fast Green-Färbemethode überprüft werden (Allen *et al.*, 1980). Dazu wurde die Membran kurz in der Färbelösung inkubiert und anschließend mit Wasser gewaschen. Die Proteinbanden werden dadurch reversibel grün angefärbt. Die

Membranen lassen sich durch eine kurze Inkubation in 0,1 % NaOH wieder vollständig entfärben und können nach dem Neutralwaschen mit Wasser, wie unter Kap. 2.4.5 beschrieben, der Antikörperanalyse unterzogen werden.

2.4.4 Peptidsynthese

Für die Herstellung von Antikörpern durch die Firma Eurogentec wurde ein putatives endogenes Peptid (TDEKSMRNAIEAMNGQNC ; AS 56 bis 72) aus dem Klon *sre 4-c1* abgeleitet und freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von Thorsten Nürnberger, IPB Halle, synthetisiert und mittels Reversed-Phase-HPLC analysiert. Die Peptidsynthese wurde auf einem Economy Peptide Synthesizer EPS 221 (Abimed) als Durchfluss-Festphasensynthese an einer Amidträgermatrix mit Fmoc-Aminosäurederivaten nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (Nennstiel *et al.*, 1998). Das Peptid wurde an KLH (*keyhole limpet hemocyanin*: Hämocyanin des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus*) gekoppelt und zur Immunisierung von 2 Kaninchen, 7761 und 7762, verwendet. Das Serum 7762 zeigte eine geringere Kreuzreaktivität mit Bakterienextrakten und wurde für die Western-Analysen verwendet.

2.4.5 Western-Analysen

Die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden halbtrocken auf PVDF-Membran transferiert (Kyhse-Anderson, 1984), wobei ein dreistufiger Puffergradient wie folgt angelegt wurde (Puffer 1: 300 mM Tris/HCl pH 10,4; 20 % Methanol; Puffer 2: 25 mM Tris/HCl pH 10,4; 20 % Methanol; Puffer 3: 300 mM Tris/HCl pH 9,4; 20 % Methanol; 40 mM 6-Aminocapronsäure). Der Transfer erfolgte bei 50 mA für 1½ h in einer *semi-dry* Blot-Apparatur der Firma Biotech Fischer. Anschließend wurden die Membranen entweder getrocknet und bei RT gelagert oder direkt 1 h unter Schütteln oder über Nacht bei 4°C in 3% BSA in PBS (1,5 mM Na₂HPO₄ * 2 H₂O; 0,3 mM NaH₂PO₄ * H₂O; 100 mM NaCl) inkubiert, um die Membran abzublocken. Der erste Antikörper (antiHis 6, Babco oder antiSre 4-7762, Eurogentec) wurde 1:500 bis 1:8000 verdünnt in 1,5 % BSA in PBS 1 h unter Schwenken auf der Membran belassen. Anschließend wurde überschüssiger Antikörper 2 x 10 Min. mit PBST (PBS mit 0,1 % Tween 20) und 2 x 15 Min. mit 1,5 % BSA in PBS gewaschen. Der zweite Antikörper, ein anti-Kaninchen-Peroxidase-Konjugat wurde 30 Min. inkubiert und 4 x 15 Min. mit PBS gewaschen. Die Detektion erfolgte nach den Angaben des Protokolls zu dem *chemiluminescence western blotting kit (mouse/rabbit)* der Firma Boehringer. Die Lumineszenz wurde mit Hilfe von Biomax XR-Filmen detektiert.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung systemisch responsiver Gene

Die Infiltration von Kartoffelpflanzen mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*-Bakterien löst die Induktion einer systemisch erworbenen Resistenz (SAR) aus (Kombrink *et al.*, 1995), die mit der Akkumulation von PR- bzw. SAR-Proteinen (Kombrink und Somssich, 1997) sowohl in dem bakterieninfiltrierten Gewebe (lokal) als auch in apikalen Blättern (systemisch) einhergeht. Das Ziel dieser Arbeit war es, Gene zu identifizieren, die transient in systemischem Gewebe nach Bakterieninokulation akkumulieren, um molekulare Prozesse, die in Korrelation zur Resistenzausprägung ablaufen, zu charakterisieren.

3.1.1 (Enhanced-) Differential Display

Zur Identifizierung neuer systemisch responsiver Gene wurde die Methode des *Differential Displays* (DDRT-PCR) bzw. des *Enhanced Differential Displays* (EDDRT-PCR) ausgewählt, die gegenüber anderen zur Verfügung stehenden differentiellen Screeningmethoden mehrere Vorteile aufweist.

Die Amplifikation von cDNA-Teilpopulationen mittels PCR führt zu einer hohen Sensitivität, die die Detektion gering abundanter Transkripte erlaubt. Die Methode bietet außerdem die Möglichkeit, gleichzeitig mehrere Probenansätze zu bearbeiten, sodass die Kinetik der Expression verfolgt werden kann. Durch den direkten Vergleich von behandelten und unbehandelten Proben können sowohl positiv als auch negativ regulierte Transkripte erfasst werden.

Zunächst wurde das *Enhanced Differential Display* (Linskens *et al.*, 1995) angewendet, das im Vergleich zur ursprünglichen Methode (Liang und Pardee, 1992a) durch die Wahl längerer *Primer* und höherer Annealingtemperaturen eine verbesserte Reproduzierbarkeit der Amplifikationsprodukte versprach.

Die 90 Primerkombinationen, die getestet wurden, setzen sich aus je 3 Primern des Typs dT₁₂-VN und je 15 Zufallsprimern (10mere für DDRT-PCR; 22mere für EDDRT-PCR)² zusammen. Jede Primerkombination wurde in mindestens drei Parallelen durchgeführt und nur Fragmente, die in mindestens zwei der Wiederholungen ein differentielles Expressionsmuster zeigten, wurden kloniert.

3.1.2 Identifizierte cDNA-Fragmente

3.1.2.1 Enhanced Differential Display

Die Autoradiogramme der EDDRT-PCR-Experimente wurden mit dem Gel in Übereinstimmung gebracht, die differentiell exprimierten cDNA-Fragmente ausgeschnitten, die DNA eluiert, anschließend reamplifiziert, in pUC 18 kloniert und sequenziert. Dabei können auf Grund gleichen Laufverhaltens im Gel mehrere cDNAs aus einer Bande kloniert werden.

² V= A, C und G; N= A, C, G und T; Sequenzen der Primer s. Anhang;

In den beiden folgenden Tabellen ist eine Auswahl der Fragmente/Klone aufgeführt, die mittels EDDRT-PCR gefunden wurden. Die Größen, die in der Sequenz tatsächlich gefundenen Primer sowie die Ergebnisse der Datenbankrecherchen mit Homologien, *Accession*-Nummern und dem Signifikanzwert E, sind angegeben. Die Fragmente I-VIII repräsentieren positiv regulierte Transkripte während das Fragment IX aus einer negativ regulierten mRNA stammt.

Tab. 3.1: Differenziell exprimierte EDDRT-PCR-Fragmente

Frag. Klon	Größe [bp]	Primer ³	Sequenzhomologie ⁴	<i>Accession</i> -Nr.	Signifikanz [E-Wert]	Prüfung der Expression
I-1	194	b-(-)	keine Homologien	-	-	N (n.d.)
II-1	282	b-b	<i>A. thaliana</i> Chromosom 5, BAC F12M12	AL355775.1	2e ⁻⁰⁷	RN (-)
III-1	172	b-b	keine Homologien	-	-	N (n.d.)
IV-1	276	b-b	<i>N. tabacum</i> ATPase-Untereinheit I und III	M10124.1	6e ⁻⁹²	N (-)
V-1	295	b-6	<i>N. tabacum</i> 23 S rRNA	J01446	3,1e ⁻³³	-
V-2	295	b-6	keine Homologien	-	-	RN (+) N (rRNA)
V-3	292	b-6	<i>N. tabacum</i> Chloroplastengenom	Z000044	6,9e ⁻⁶⁷	-
VI-1	107	b-14	<i>W. sinensis</i> 18 S rRNA	X66691	6,5e ⁻²⁵	-
VI-2	117	b-14	<i>L. esculentum</i> 25 S rRNA	X13557	3,5e ⁻³¹	-
VII-1	200	b-4	<i>N. tabacum</i> Chloroplastengenom	Z000044	2,3e ⁻⁶³	-
VII-2	195	b-4	<i>A. thaliana</i> aha 9 Gen	X73676	0,76	N (n.d.)
VIII-1	201	b-4	<i>N. tabacum</i> Chloroplastengenom	Z000044	3,5e ⁻⁷	-
VIII-2	195	b-4	keine Homologien	-	-	N (n.d.)

N: Northern-Blot; RN: Reverse Northern-Blot; (n.d.): kein Signal detektierbar; (+): induziert; (-): nicht induziert; rRNA: Hybridisierung mit rRNA; -: nicht untersucht

Tab. 3.2: Reprimierte EDDRT-PCR-Klone

Frag. Klon	Größe [bp]	Primer ³	Sequenzhomologie ⁴	<i>Accession</i> -Nr.	Signifikanz [E-Wert]	Prüfung der Expression
IX-1	223	b-13	keine Homologien	-	-	-
IX-2	221	b-13	<i>S. oleracea</i> Polypeptid aus PS II	X85038	4,6e ⁻¹⁹	-
IX-3	239	b-13	<i>B. vulgaris</i> cdc2-bezogene Proteinkinase	Z71703	1,0e ⁻¹¹	-

³ Sequenzen s. Anhang

⁴ BLAST Sequenzähnlichkeitsalgorithmus (Altschul *et al.*, 1997)

Wie aus Tab. 3.1 und 3.2 zu entnehmen, führte die Methode der EDDRT-PCR zu einer Vielzahl falschpositiver Fragmente (V-1/ 3, VI-1/2, VII-1; VIII-1; ca. 60% der cDNA-Klone chloroplastidären Ursprungs), die auch durch die Nutzung von aufgereinigter mRNA als Ausgangsmaterial nicht reduziert werden konnte (nicht dargestellt). Diese Kontamination mit plastidenkodierten Genen ist vermutlich auf die unspezifische Amplifikation AT-reicher Regionen mit langen oligo-dT Primern zurückzuführen. Die Klone, die Homologien zu chloroplastidären oder rRNA-Sequenzen aufweisen, wurden nicht weiter analysiert. Alle weiteren wurden im Reverse Northern und/oder Northern-Blot auf ihr Expressionsverhalten überprüft, wobei für keines dieser neun Fragmente eine differentielle Expression nach Bakterieninfiltration nachgewiesen werden konnte. Zum einen kam es zu Kreuzhybridisierungen mit rRNA (Fragment: V-2), die möglicherweise die Detektion der eigentlichen Transkripte überlagern, in den meisten Fällen konnte jedoch kein Signal auf Northern-Blots detektiert werden (Fragmente: I-1, III-1, VII-2 und VIII-2). Das Fragment IV-1 zeigte ein konstitutives Expressionsmuster im Northern-Blot (nicht dargestellt).

3.1.2.2 Differential Display

Die mittels klassischem *Differential Display* identifizierten Klone wurden analog den unter Kapitel 3.1.2.1 beschriebenen cDNAs kloniert und sequenziert.

Tab. 3.3: Differentiell exprimierte *Differential Display*-Fragmente

Frag. Klon	Größe [bp]	Primer ³	Sequenzhomologie ⁴	Acc.-Nr.	Signifikanz [E-Wert]	Prüfung der Expression
X-1 = sre 4	316	1-1	<i>N. tabacum</i> RNA-bindendes glyzinreiches Protein 1	D16206	0,0023	N (+) RT-PCR (+)
X-2	290	b-1	keine Homologien	-	-	-
XI-1	418	5-5	<i>H. sapiens</i> ADP/ATP-Carrierprotein	L78810	3,3e ⁻⁹	N (n.d.)
XI-2	393	5-5	<i>N. tabacum</i> Chloroplastengenom	Z00044	5,8e ⁻¹⁴⁸	-
XI-3	394	5-5	keine Homologien	-	-	N (n.d.)
XI-4	338	5-5	<i>S. tuberosum</i> Patatin	X03932	4,8e ⁻¹²	-
XI-5		5-5	<i>A. thaliana</i> genomic clone P1: MX110	AB 005248	2,3e ⁻²⁸	RN (-)
XII-1	451	1-1	<i>A. thaliana</i> genomische Sequenz	AC00229 4	9,6e ⁻⁷	N (n.d.)
XII-2	447	1-1	keine Homologien	-	-	RN (-)
XII-3	318	1-?	<i>P. gingivalis</i> Cystein-protease (bakteriell)	U68468	0,18	-
XIII-1	447	b-7	<i>A. thaliana</i> genomische Sequenz	AC00010 3	4,1e ⁻¹¹	N (rRNA)
XIII-2	399	7-7	keine Homologien	-	-	-
XIV-1 = sre 3	319	12-12	<i>H. sapiens</i> Chromosom X Cosmid J256K24	Z72004	0,11	RN (+) N lokal (+) RT-PCR (+)

N: Northern-Blot; RN: Reverse Northern-Blot; (n.d.): kein Signal detektierbar; (+): induziert; (-): nicht induziert; rRNA: Hybridisierung mit rRNA; -: nicht untersucht; die weiterbearbeiteten Fragmente sind **fett** dargestellt

^{3/4} Fußnoten siehe vorherige Tabelle

Im Gegensatz zum EDDRT-PCR-Ansatz wurden hierbei kaum Fragmente chloroplastidären Ursprungs gefunden und die Anzahl der verschiedenen Klone pro ausgeschnittenem Fragment war geringer, sodass mit hoher Wahrscheinlichkeit die tatsächlich differentiell regulierten mRNAs identifiziert werden konnten. Diese Methode führte zu einer Erhöhung der Verlässlichkeit der gefundenen Klone, sodass Einbußen in der Reproduzierbarkeit des Bandenmusters im Vergleich zur EDDRT-PCR zu Gunsten einer Verringerung der falschpositiven Klone hingenommen werden konnten. Für die Fragmente X und XIV konnte sowohl im Northern-Blot (s. Abb. 3.2 und Abb. 3.13) als auch mit RT-PCR (s. Abb. 3.3 und Abb. 3.14) die differentielle Expression nachgewiesen werden. Die Fragmente XI bis XIII waren hingegen nicht eindeutig als induziert zu beweisen, da die Sensitivität der Northern-Analysen nicht ausreichend war, um ihre Transkripte nachzuweisen.

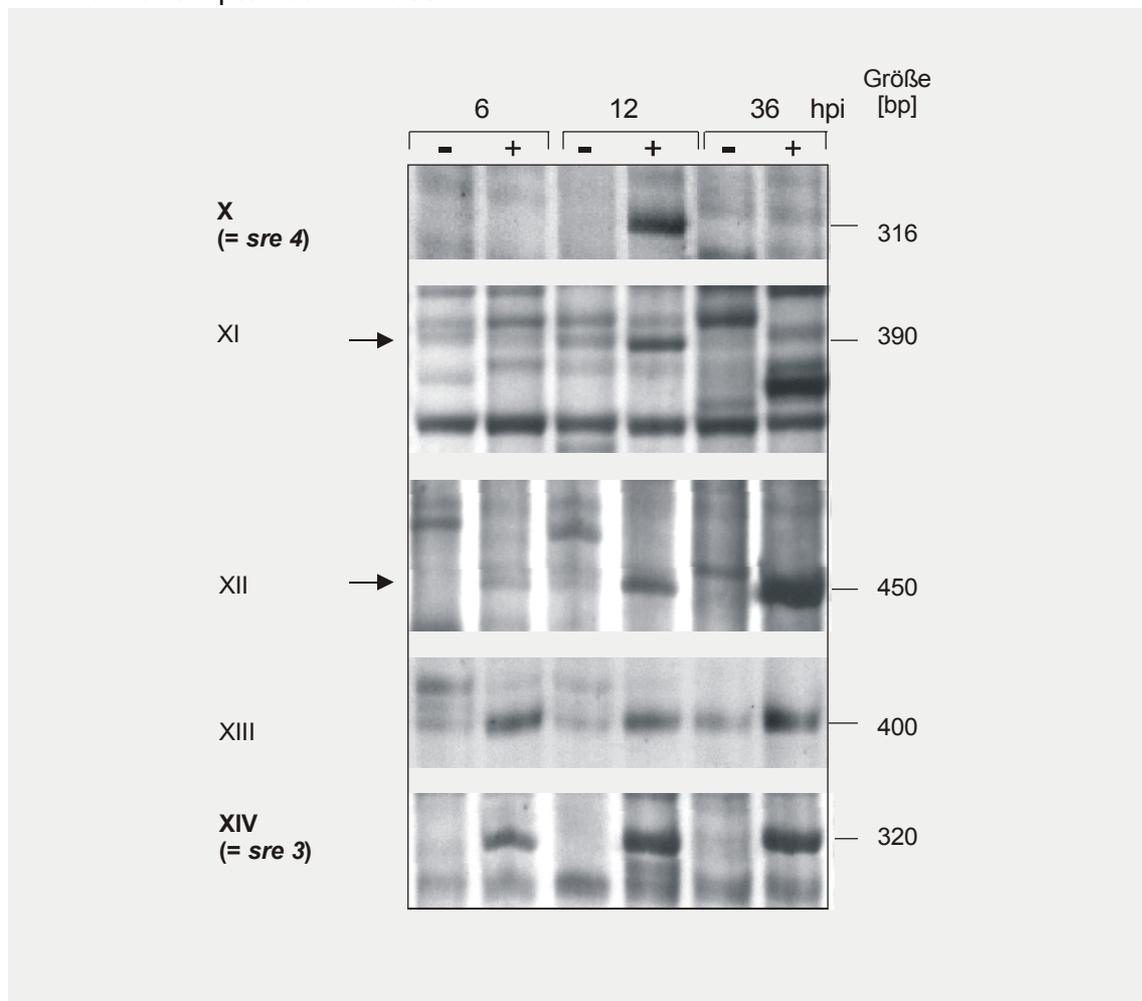


Abb. 3.1: Ausschnitte aus DDRT-PCR-Autoradiogrammen korrespondierend zu den cDNA-Fragmenten X-XIV

Dargestellt ist die Kinetik der systemischen Expression differentiell exprimierter cDNA-Fragmente in unbehandelten Kartoffelblättern nach der Infiltration von 10^8 cfu/ml *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (+) bzw. 10 mM $MgCl_2$ (-) in unterhalb der untersuchten Gewebe gelegenen Blätter. Gesamt-RNA der unbehandelten Blätter wurde isoliert (Kap. 2.3.2.1) und in DDRT-PCR-Experimenten (Kap. 2.3.7.1) eingesetzt, gezeigt sind Ausschnitte der Autoradiogramme. Die weiterbearbeiteten Fragmente sind fett gedruckt.

Die Abb. 3.1 zeigt Bereiche der Autoradiogramme der DDRT-PCRs, die den Fragmenten X bis XIV entsprechen. Während die Fragmente X und XI transient nur zu einem Zeitpunkt – 12 h nach Inokulation – induziert waren, konnte für die Fragmente XII bis XIV über den gesamten betrachteten Zeitraum eine im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöhte Transkriptmenge detektiert werden.

Die Fragmente X und XIV wurden auf Grund ihres Expressionsverhaltens für eine Weiterbearbeitung ausgewählt. Das zu Fragment XIV korrespondierende Gen wurde *sre 3* (systemisch responsiv 3), das zu Fragment X korrespondierende Gen *sre 4* genannt.

3.2 Charakterisierung von *sre 3*

3.2.1 Überprüfung der Transkriptakkumulation von *sre 3*

Das Gen *sre 3* wird schon zu sehr frühen Zeitpunkten nach Bakterieninokulation aktiviert, wie man auf den in Abb. 3.2 dargestellten Autoradiogrammen von Northern-Analysen erkennen kann. Bereits nach 6 h ließen sich deutlich erhöhte Transkriptmengen in den infiltrierten Blattbereichen nachweisen. Auf Northern-Blots war es nicht möglich, *sre 3*-mRNA in unbehandelten Blattbereichen zu detektieren (nicht dargestellt).

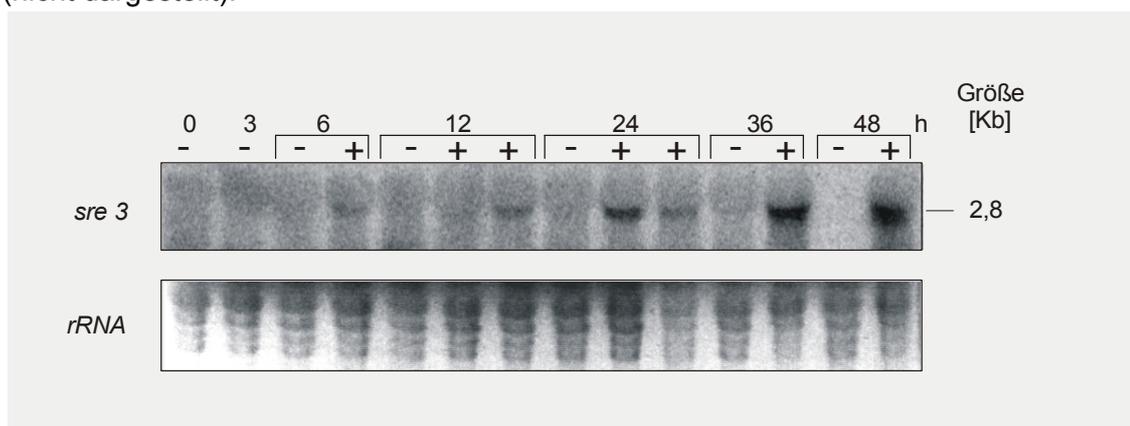


Abb. 3.2: Zeitlicher Verlauf der lokalen Expression von *sre 3* in Kartoffelblättern

Zwei Kartoffelblätter wurden mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (+) bzw. 10 mM MgCl₂ (-) infiltriert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet, RNAs wurden isoliert und in Northern-Experimenten mit dem radioaktiv markierten DDRT-PCR-Fragment *sre 3* hybridisiert. Es wurden 25 µg Gesamt-RNA eingesetzt; die Gleichmäßigkeit der RNA-Mengen wurde durch die Färbung des Agarosegels mit Ethidiumbromid überprüft (*rRNA*). Die Radioaktivität wurde mittels des Phosphormagers detektiert. Dargestellt ist eins von sechs konsistenten Experimenten.

Mit der weit sensitiveren Methode der RT-PCR konnte jedoch sowohl lokal als auch systemisch die Induktion 36 bis 48 h nach Inokulation nachgewiesen werden. Dazu wurden die größenfraktionierten Produkte der RT-PCR auf Nylonmembranen transferiert und mit dem radioaktiv markierten DDRT-PCR-Fragment hybridisiert. Die Intensität der resultierenden Banden wurden mit Hilfe eines Phosphormagers detektiert und quantifiziert. Die Menge der lokal akkumulierenden Transkripte unterscheidet sich von der systemischen etwa um den Faktor 20. In Abb. 3.3 wurde deshalb die Intensität des Blotbereiches, der die systemische Induktion zeigt, verstärkt, um die Banden sichtbar zu machen.

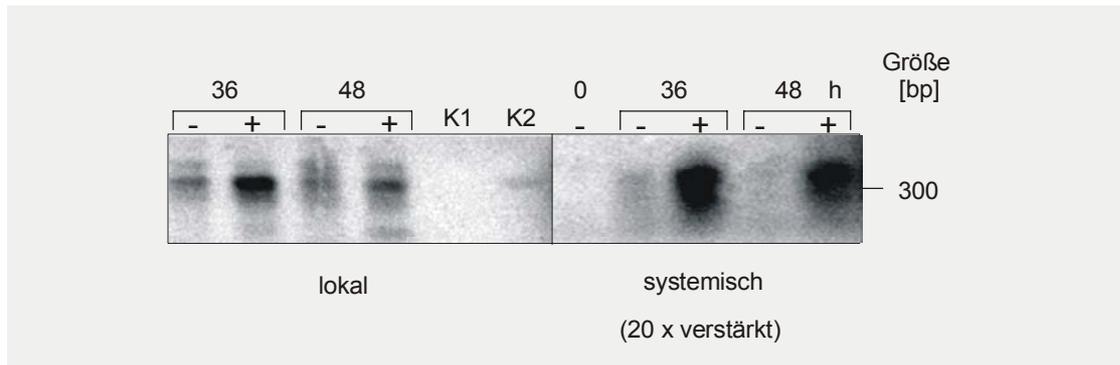


Abb. 3.3: Expression von *sre 3* in mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* inokulierten (lokalen) und unbehandelten (systemischen) Kartoffelblättern

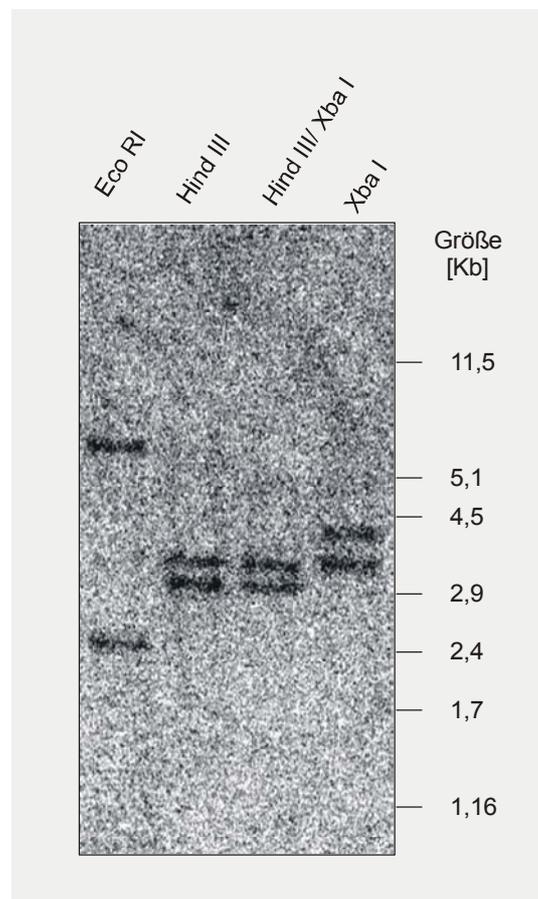
Zwei Kartoffelblätter wurden mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (+) bzw. 10 mM $MgCl_2$ (-) infiltriert. Nach 36 und 48 h wurden diese und 2 apikal gelegene Blätter derselben Pflanze geerntet, RNAs wurden isoliert und mittels RT-PCR mit den Primern XIV-2A und XIV-2B (s. Anhang) amplifiziert. Als Kontrollen wurden eine Probe ohne RNA (K1) und eine mit einem *sre 3* cDNA-Klon (K2) als Matrize amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt, denaturiert, neutralisiert, auf Nylonmembranen transferiert und mit dem radioaktiv markierten DDRT-PCR-Fragment *sre 3* hybridisiert. Es wurden 2 μ g Gesamt-RNA eingesetzt. Die Radioaktivität wurde mittels des Phosphorimagers detektiert, wobei die Intensität des rechten Blots um den Faktor 20 verstärkt wurde. Dargestellt ist eins von vier konsistenten Experimenten.

3.2.2 Genomische Organisation von *sre 3*

Um Einblick in die genomische Organisation von *sre 3* zu bekommen, wurden Southern-Analysen durchgeführt. Wie Abb. 3.4 zeigt, handelt es sich dabei um ein Gen mit geringer Kopienzahl. Unter den hier gewählten moderat stringenten Bedingungen, konnten je Restriktionsansatz zwei Banden detektiert werden, die mit dem DDRT-PCR-Fragment hybridisieren.

Abb. 3.4: Analyse der genomischen Organisation von *sre 3*

Aus Kartoffelblättern wurde genomische DNA isoliert, mit den angegebenen Restriktionsenzymen geschnitten und im 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde denaturiert, neutralisiert, gebロットet und mit dem radioaktiv markiertem DDRT-PCR-Fragment *sre 3* hybridisiert. Der Blot wurde anschließend unter moderat stringenten Bedingungen (2x {2xSSC, RT}, 2x {0,2xSSC 48°C}) gewaschen und die Radioaktivität mittels des Phosphorimagers detektiert. Dargestellt ist eins von drei konsistenten Experimenten.



Die Isolierung genomischer Klone aus einer käuflich erworbenen genomischen λ -Phagen Bibliothek und ihre Sequenzierung nach Subklonierung ergaben ein komplexes Gefüge aus invertierten repetitiven Bereichen, das auch das DDRT-PCR-Fragment umfasst. Eine computergestützte Analyse dieses genomischen Bereiches ergab keinerlei Anzeichen eines kodierenden Bereiches (nicht dargestellt).

3.3 Charakterisierung von *sre 4*

3.3.1 Amplifizierung längerer cDNA-Fragmente mittels 5'- und 3'-RACE

Wie unter Kap. 2.3.11 und 2.3.12 beschrieben, wurden mehrere cDNA-Bibliotheken hergestellt und durchsucht. Da diese Suche mit dem DDRT-PCR-Fragment *sre 4* zunächst erfolglos gewesen war, wurde die sensitivere Methode der RACE (*random amplification of cDNA ends*) angewandt. Die nötige Sequenzinformation lieferte die Reamplifikation, Klonierung und Sequenzierung der DDRT-PCR-Bande, die ein 316 bp langes Fragment ergeben hatte.

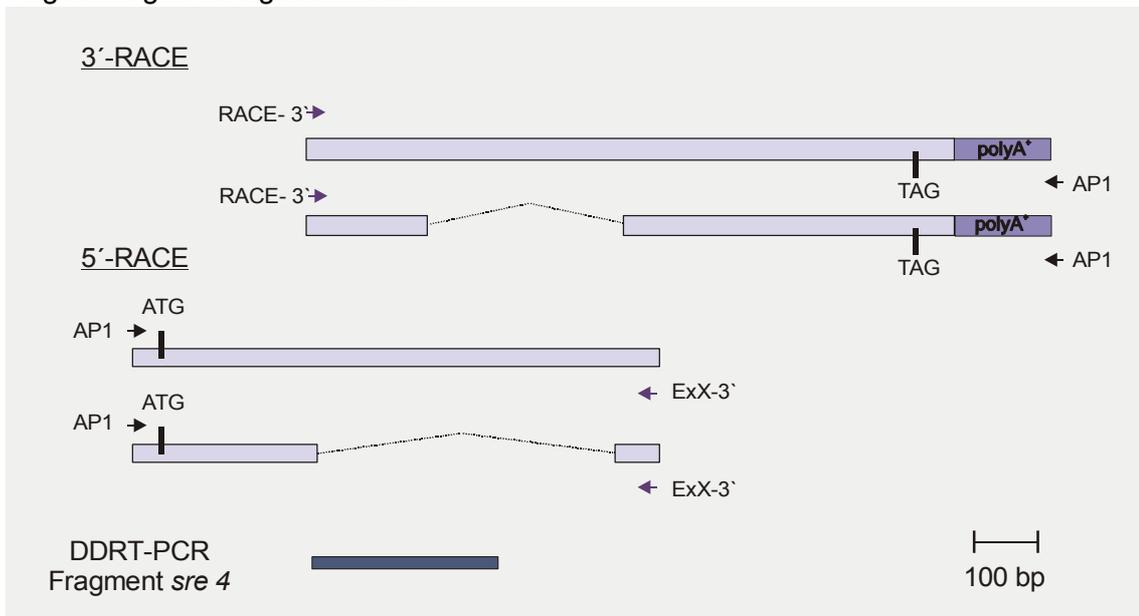


Abb. 3.5: Strategie zur Klonierung des Gens *sre 4* mittels RACE

Mit Hilfe der angegebenen Primer RACE-5' und AP1 (Adaptorprimer 1, (Clontech)) wurden aus der Adaptor-ligierten cDNA-Bibliothek zunächst die 3'-RACE Klone amplifiziert. Die Sequenzinformationen dieser Klone dienen als Grundlage für das Design des Primers ExX-3', mit dem die 5'-RACE Klone amplifiziert werden konnten. Die grauen Boxen geben die cDNA-Bereiche an, die gepunkteten Linien repräsentieren putative Introns, die dunkler grauen Boxen stellen den poly A⁺-Schwanz dar. Das DDRT-PCR Fragment *sre 4* ist in dunkelgrau in räumlicher Relation zu den RACE-Klonen dargestellt. ATG bzw. TAG markieren die prognostizierten Translationsstart- bzw. -stopcodons. Die Sequenzen der Primer finden sich im Anhang.

Aus mRNA von behandelten und unbehandelten Blättern vorinfizierter Kartoffelpflanzen, die 24 bis 48 h nach der Inokulation mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* geerntet wurden, wurde eine Adaptor-ligierte cDNA-Bibliothek hergestellt. Mit Primern, die für das DDRT-PCR Fragment *sre 4* spezifisch sind, und einem Adaptorprimer wurden zunächst in 3'-Richtung 2 längere cDNA-Bereiche von ca. 800

und 900 bp Länge amplifiziert und in pCR Vektoren kloniert. Die Sequenzierung der Klone ergab, dass es sich dabei um zwei verschiedene Varianten des 3'-Endes desselben Gens handelt, die beide einen poly A⁺-Schwanz aufweisen und somit die vollständigen 3'-Enden der cDNAs repräsentieren. Sie unterscheiden sich in einem Bereich von 177 bp, der in einem der Klone fehlt (s. Abb. 3.5).

Die 5'-RACE blieb mit DDRT-PCR-Fragment-spezifischen Primern zunächst ergebnislos. Die Sequenzinformationen über die 3'-Enden des Gens erlaubten aber die Wahl eines weiter 3' gelegenen Primers (ExX-3'). Die Amplifikationsprodukte von 200 bis 550 bp Länge lassen sich in 2 Klassen aufteilen, die sich in einem Bereich von 339 bp unterscheiden. Das Display Fragment *sre 4* ist bis auf 14 bp in einem putativen Intronbereich lokalisiert, der in einem der Klone fehlt (s. Abb. 3.5).

3.3.2 Amplifizierung der Gesamt-cDNAs mittels RT-PCR

Da die Produkte der RACE sowohl ein mögliches Start- als auch ein Stopcodon enthalten, wurden Primer für die Enden der kodierenden Bereiche abgeleitet und mittels RT-PCR die gesamte cDNA amplifiziert. Die Primer X-5'c und X-3'c enthalten außer den homologen Bereichen noch je eine *Nde* I-bzw. *Eco*RI-Restriktionschnittstelle, die eine Klonierung in Expressionsvektoren erleichtern sollte (vgl. Kap. 2.3.16).

Die RT-PCR mit diesen Primern ergab eine starke Bande von ca. 500 bp Länge, zwei schwächere Banden von ca. 650 und 850 bp Länge sowie eine sehr schwache Bande von etwa 350 bp Länge (Abb. 3.6 A), die alle mit dem DDRT-PCR-Fragment *sre 4* in Korrelation stehen, wie Hybridisierungsexperimente ergeben haben (nicht dargestellt).

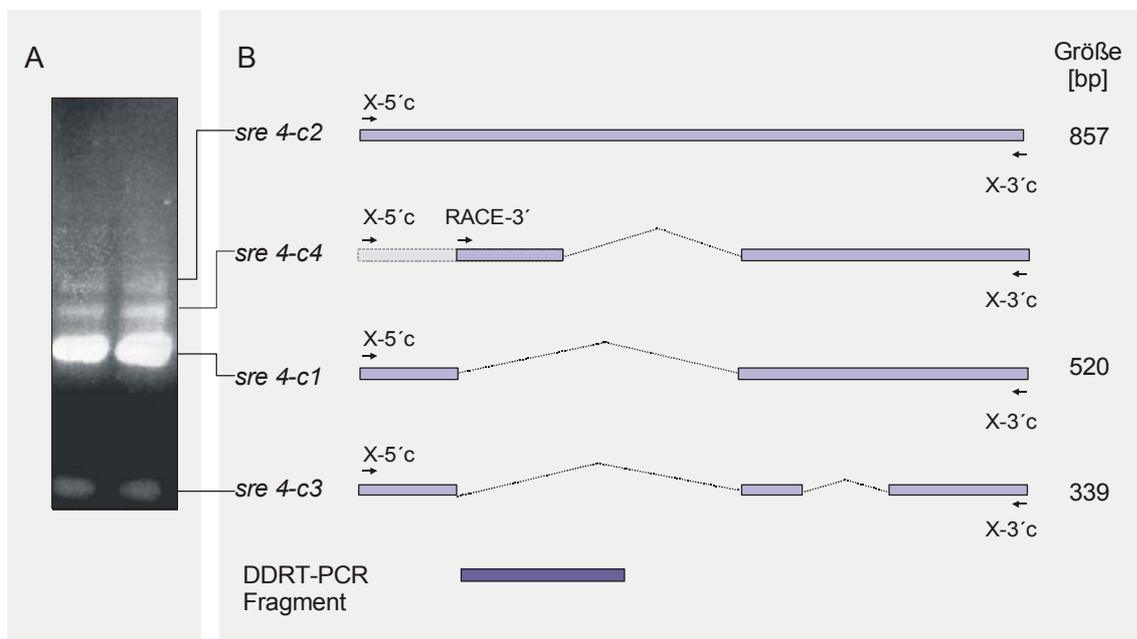


Abb. 3.6: Struktur der cDNA-Klone des Gens *sre 4*

Die mittels RT-PCR erhaltenen cDNA-Klone des Gens *sre 4* lassen sich in vier Transkriptklassen einteilen, die mit verschieden großen Banden der RT-PCR (A) korrelieren (*sre 4-c1* bis 4). Nach der Sequenzierung der verschiedenen Klontypen ergab sich das dargestellte Schema (B), das zeigt, dass sich die vier Typen durch unterschiedliche Exon/Intronstruktur auszeichnen. Die cDNA *sre 4-c4* konnte nicht vollständig kloniert werden, dargestellt ist der 3'-RACE-Klon, der heller dargestellte Bereich zeigt den putativen 5'-Bereich dieser cDNA an. Die Pfeile mit den Beschriftungen bezeichnen die benutzten Primer – die Sequenzen finden sich im Anhang.

Das Haupttranskript dieses Gens, *sre 4-c1* (vgl. Abb. 3.7), kodiert für 166 Aminosäuren (AS). Der ungespleißte Klon *sre 4-c2* enthält ein kürzeres offenes Leseraster (100 AS), verursacht durch ein Stopkodon, das in der ersten Intronregion liegt und zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation führt (vgl. Kap. 3.4.2). Der Klon *sre 4-c3*, der im 3'-Bereich noch ein weiteres Intron (II) herausgespleißt hat, kodiert für 113 AS, die sich im letzten Exon durch eine Leserasterverschiebung von denen der anderen Klone unterscheiden. Der putative Klon *sre 4-c4* kodiert wahrscheinlich für 114 AS, da auch hier eine Leserasterverschiebung dazu führt, dass ein Stopcodon eingeführt wird. Die vollständigen Sequenzen der Klone finden sich im Anhang.

Die Exon/Intronübergänge sind für das erste Intron sehr konserviert, wenn man sie mit Konsensussequenzen von *Arabidopsis*-Introns vergleicht (Brown *et al.*, 1996). Wie in Abb. 3.8 zu sehen ist, wird sowohl das erste große (Ia) als auch das kleinere Intron (Ib) von den typischen Basenkonstellationen eingerahmt. Das zweite Intron (II) hat an seinem 5'-Ende einen schwach konservierten Übergang und am 3'-Ende einen Übergang, der gar nicht konserviert erscheint. Nur 6 Nukleotide vor der scheinbaren Spleißstelle im Intron II gibt es jedoch einen putativen Intron/ Exonübergang, der sehr gut zu der Konsensussequenz korrespondiert. Da dieses Intron in seiner Nukleotidzusammensetzung ungewöhnlich GC-reich (AU-Gehalt 38 %) ist (durchschnittlicher AU-Gehalt in Dicotyledonen 70 % (Goodall und Filipowicz, 1991), ist aber auch eine Spleißstelle denkbar, die nicht dem Konsensus entspricht (vgl. Kap. 3.4.2).

	5'-Spleißstelle								3'-Spleißstelle											
	Exon				Intron				Intron				Exon							
Konsensus	C/A	A	G		G	U	A	A	G	U	U	U	U	U	G	C	A	G	G	U
%	36/35	62	78		100	99	68	57	52	51	52	49	53	63	39	66	100	100	55	34
Intron Ia (<i>sre 4-c1/3</i>) nt 152-491	A	*	*		*	*	C	C	*	*	*	*	*	*	U	*	*	*	A	*
Intron Ib (<i>sre 4-c4</i>) nt 309-491	A	C	*		*	*	*	C	*	*	*	*	*	*	U	*	*	*	A	*
Intron II (<i>sre 4-c3</i>) gefunden nt 604-786	A	T	*		*	*	C	G	T	A	A	G	G	*	*	G	C	C	*	*
Intron II (<i>sre 4-c3</i>) putativ nt 604-780	A	T	*		*	*	C	G	T	A	*	*	A	*	*	G	*	*	*	*

Abb. 3.8: Exon/Intronübergänge in den verschiedenen *sre 4* cDNA-Klonen

Dargestellt sind die Sequenzbereiche der Exon/Intronübergänge für die verschiedenen Spleißvarianten der cDNA Klone *sre 4-c1* bis 4 im Vergleich zu der aus 998 Exon/Intronübergängen aus *Arabidopsis thaliana* abgeleiteten Konsensussequenz (Brown *et al.*, 1996). Die Prozentzahlen unter der Konsensussequenz geben die Häufigkeit der angegebenen Base an. Die Nummerierung der Nukleotide bezieht sich auf die genomische Sequenz (Sequenzen im Anhang). * symbolisieren Übereinstimmungen mit der Konsensussequenz, Abweichungen sind mit den Symbolen der Basen dargestellt. Die Exonbereiche sind dunkelgrau, Intronbereiche hellgrau unterlegt.

3.3.4 Charakteristika der kodierten Proteine Sre 4-p1 bis 4

3.3.4.1 Primärstruktur

Betrachtet man die kodierenden Bereiche des cDNA-Klons *sre 4-c1*, so fällt sofort eine deutliche Zweiteilung des Proteins auf. Der Glyzingehalt des C-terminalen Bereichs des kodierten Proteins ist sehr hoch und macht einen Glyzinanteil an dem Gesamtprotein Sre 4-p1 von 33,7 % aus. Darüberhinaus weist dieser Bereich noch weitere Elemente glyzinreicher Domänen auf wie GXGX⁵-Wiederholungen, beispielsweise konservierte Tyrosine (AS: 117; 128; 136) sowie ein GXXXG⁵-Element des Typs RRE⁴ (AS: 119-21) (Sachetto-Martins *et al.*, 2000).

Der N-Terminus zeigt signifikante Homologie zu einer 80 Aminosäuren langen konservierten RNA-bindenden Domäne (CS-RBD), die zwei streng konservierte Boxen beinhaltet. Diese wurde als Minimalstruktur für RNA-Bindung identifiziert (Nietfeld *et al.*, 1990). Die Boxen – RNP-CS und RNP-2 (*ribonucleoprotein-consensus sequence*) – sind beide in Sre 4-p1 konserviert. In den anderen Versionen der Sre 4 Proteine (Sre4-p2-4) ist die RNA-bindende Domäne nur unvollständig enthalten und in Sre 4-p2 und 4 ist nur die RNP-2-Box nicht aber die RNP-CS-Box enthalten (vgl. Abb. 3.7 und Tab. 3.).

3.3.4.2 3D-Struktur

Vergleicht man die Sekundärstrukturen und die 3D-Modelle von bekannten RNA-Bindungsdomänen mit der prognostizierten Struktur des N-terminalen Bereiches von Sre 4-p1, so wird deutlich, dass dieser Bereich den RNA-Bindungsdomänen von hnRNPs (*heterogenous nuclear Ribonucleoprotein*) sehr ähnlich ist.

Die Struktur des N-terminalen, aus 86 Aminosäuren bestehenden Bereiches von Sre 4-p1 wurde mit Hilfe des *online*-Programms SWISS-Pdb-Viewer⁶ und SWISS-MODEL⁷ (Schwede *et al.*, 2000) an Hand der Konformationsenergien und auf Homologie basierenden Modellen von verifizierten Strukturen berechnet. Mit dem 3D-Visualisierungsprogramm Cn3D v3.0⁸ (NCBI) wurde Sre 4-p1 mit bekannten Strukturen (1HD0.pdb; RNA-Bindungsdomäne des menschlichen hnRNP D0) verglichen und die übereinstimmenden Bereiche, wie in Abb. 3.9 sichtbar, rot-blau hervorgehoben, während nichthomologe Bereiche grau dargestellt wurden. Die gesamte Bindungsdomäne von Sre 4 zeigt Homologien zu der des hnRNP D0, insbesondere die gelb markierten Bereiche, die die beiden konservierten Boxen RNP-2 und RNP-CS repräsentieren. Diese sind Teil einer antiparallelen β -Faltblattstruktur (hellblau), an die die RNA gebunden wird, wie die Analyse von RNA-Proteinkomplexen für das hnRNP D0 ergeben hat (Nagata *et al.*, 1999)

⁵ G= Glyzin; X= jede beliebige Aminosäure inklusive Glyzin; R= Arginin; E= Glutaminsäure; eine vollständige Liste der Aminosäureabkürzungen findet sich im Anhang

⁶ <http://www.expasy.ch/spdbv/>

⁷ <http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>

⁸ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>

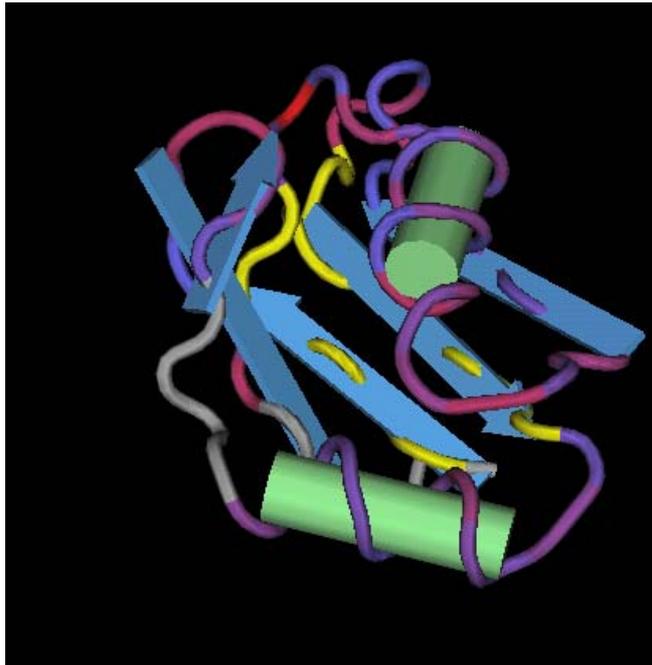


Abb. 3.9: 3D-Modell der RNA-bindenden Domäne des putativen Proteins Sre 4-p1

Mit Hilfe der online-Programme Swiss-Pdb-Viewer und Swiss-Model wurde die putative Struktur des Sre 4-p1-Proteins berechnet, in das Programm Cn3D v3.0 importiert und als Überlagerung mit der RNA-Bindungsdomäne des humanen hnRNP (1HD0.pdb) dargestellt. Homologe Bereiche der Proteinsequenzen sind je nach Übereinstimmungsgrad blau bis rot dargestellt, nichthomologe Bereiche grau; die blauen Pfeile stellen die β -Faltblattsekundärstruktur dar, während die grünen Zylinder die α -Helizes symbolisieren. Der gelb hervorgehobene Bereich repräsentiert die beiden konservierten Boxen RNP-2 und RNP-CS.

3.3.4.3 Intrazelluläre Lokalisation

In der glyzinreichen Domäne konnte mit dem *online*-Programm PredictNLS⁹ ein potentielles Kernlokalisierungssignal (*nuclear localisation signal*, NLS) identifiziert werden (AS 96-104: GRRGGGGG), das auch in den glyzinreichen Proteinen GRP 1 und 2 aus *Sinapis alba* enthalten ist. Für diese Sre 4-homologen Proteine konnte eine Kernlokalisation nachgewiesen werden (Heintzen *et al.*, 1994). Mit PSORT¹⁰, einem Programm zur Vorhersage der intrazellulären Lokalisation von Proteinen, wurde Sre 4-p1 andererseits dem Zytosol zugeordnet.

Die drei anderen potentiellen Proteine werden auf Grund hydrophober Domänen in ihren C-Termini als membranständig eingestuft, wobei das Protein Sre 4-p3 der Plasmamembran zugeordnet wird, während die anderen beiden ein ER-Retentionssignal aufweisen, das sie der ER-Membran zuweist.

⁹ <http://cubic.bioc.columbia.edu/predictNLS>

¹⁰ PSORT-Version Febr. 2000 <http://psort.nibb.ac.jp/> (Nakai und Kanehisa, 1992)

Tab. 3.4: Charakteristika der kodierten putativen Proteine Sre 4-p1 bis 4

Protein	Anzahl Aminosäuren	MW [KDa]	pI	konservierte Boxen	putative Lokalisation ^{9,10}
Sre 4-p1	166	16,7	9,2	RNP-CS und RNP- 2	Zytosol oder Kern
Sre 4-p2	100	11,7	9,5	RNP-2	ER-Membran
Sre 4-p3	113	12,5	4,5	RNP-CS und RNP-2	Plasmamembran
putatives Sre 4-p4	114	13,2	7,8	RNP-2	ER-Membran

^{9 10} Fussnoten siehe vorherige Seite

3.3.5 Sequenzhomologien zu *sre 4* aus Datenbanken

3.3.5.1 Sequenzhomologe Gene/Proteine zu *sre 4*/Sre 4

Die gefundenen *sre 4* cDNA-Klone zeigen auf Nukleotidebene eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit zu mRNAs glyzinreicher, RNA-bindender Proteine aus einer Vielzahl von Organismen (BLAST-Sequenzähnlichkeitsalgorithmus (Altschul *et al.*, 1997)¹¹). Die höchste Homologie besteht zu *RGP-1c* aus *Nicotiana tabacum* (Acc.-Nr: D16206; E-Wert: $8e^{-35}$). Dieses Gen kodiert wie *sre 4* für mehrere Transkriptvarianten, die durch alternatives Spleißen spezifisch in verschiedenen Gewebetypen gebildet werden (Hirose *et al.*, 1993). Auch hier zeichnet sich das alternative Spleißen durch eine selektive Auswahl der 5'-Spleißstellen aus. Neben anderen Sequenzhomologen aus *Euphorbia* (Acc.-Nr: AF036339.1; E-Wert: $2e^{-11}$), *Citrus* (Acc.-Nr: AB007819.1; E-Wert: $4e^{-10}$), *Daucus* (Acc.-Nr.: X58146.1; E-Wert: $3e^{-5}$), *Medicago* (Acc.-Nr.: AF191305.1; E-Wert: $4e^{-4}$) und *Sinapis* (Acc.-Nr.: L31378.1; E-Wert: $4e^{-4}$) wurde auch ein Homologes aus der Kartoffel, *Solanum tuberosum* (Acc.-Nr.: Z49197.1; E-Wert: $4e^{-10}$), und aus der Wildkartoffel, *Solanum commersonii* (Acc.-Nr.: Y12424.1; E-Wert: $4e^{-7}$), gefunden.

Auf Proteinebene ist die Sequenzhomologie des von der Basensequenz abgeleiteten putativen Proteins Sre 4-p1 zu dem *Nicotiana sylvestris*-Protein RGP-1c (Acc.-Nr.: S59529; E-Wert: $2e^{-71}$) mit einer über das gesamte Protein reichenden Identität der Aminosäuren von 80 % am höchsten. Das Protein SGRP-1 aus Wildkartoffel ist zu 76 % identisch bei einem E-Wert von $2e^{-64}$ (Acc.-Nr.: T10479) und das Kartoffelhomologe zu 68 % bei einem E-Wert von $5e^{-63}$ (Acc.-Nr.: S54255). Die von Sre 4-p1 abweichenden Bereiche der putativen Proteine Sre 4-p2 bis 4 zeigen keine signifikanten Ähnlichkeiten zu Sequenzen aus Datenbanken.

¹¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/>

Datenbanken: DNA Sequenzen aus GenBank, EMBL und DDBJ; Protein Sequenzen aus PIR, SWISSPROT, PRF, Protein Data Bank (PDB)

3.3.5.2 Homologe Proteine zu Sre 4 aus *Arabidopsis thaliana*

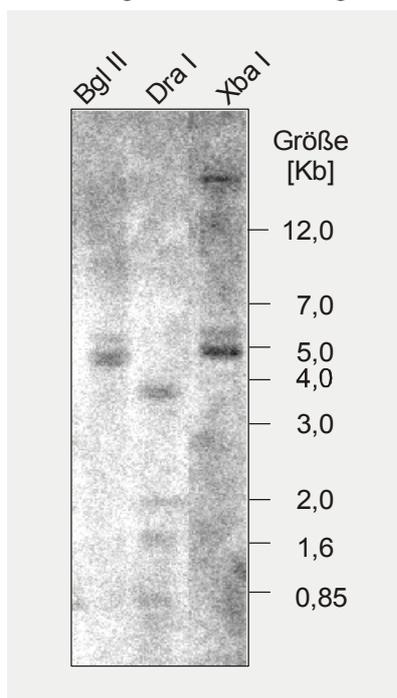
Ein *Arabidopsis*-Protein, das Grp 8 oder Ccr 1 (*cell cycle* und *circadian regulated*; Acc.-Nr.: Q03251; E-Wert: $2e^{-60}$) zeigt ebenfalls hohe Sequenzähnlichkeiten zu Sre 4-p1. Dieses Gen ist Mitglied einer Genfamilie in *Arabidopsis*, die mindestens 8 Mitglieder umfasst. Ein phylogenetischer Baum der verschiedenen *Arabidopsis thaliana* GRP-Proteine und des Sre 4-p1 zeigt, dass die höchste Ähnlichkeit zwischen Grp 6 bis 8 und dem Sre 4-p1 Protein besteht (nicht dargestellt).

In Kooperation mit Dorothea Staiger, Zürich, die die *Atgrp 8* cDNA zur Verfügung gestellt hat, und Anne Varet, IPB Halle, die die SAR-Induktionsexperimente durchgeführt hat, wurde getestet, ob *grp 8* in *Arabidopsis* ein ähnliches Expressionsmuster wie *sre 4* nach Infiltration mit Bakterien zeigt. *Arabidopsis*-Pflanzen, die mit den pathogenen Bakterien *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* M2, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*), sowie mit *Pst*-stämmen, die die Avirulenzgene *avrRpm 1* und *avrRpt 2* tragen, infiltriert wurden, zeigten in keinem Fall eine signifikant erhöhte Expression des *grp 8* (nicht dargestellt). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass eines der anderen Mitglieder der Genfamilie ein ähnliches Expressionsmuster wie *sre 4* aufweisen könnte. In neueren Arbeiten von Maleck *et al.* (2000) zeigte sich bei einem *microarray*-Ansatz, bei dem ca 25-30 % der Gene aus *Arabidopsis* auf ihre Expression unter SAR-induzierenden Bedingungen untersucht wurden, dass ein anderes Mitglied der *grp*-Genfamilie durch SAR-Induktoren positiv reguliert wird, nämlich *grp3s*.

3.4 Genomische Struktur des Gens *sre 4*

3.4.1 Southern-Blot-Analyse zur Bestimmung der Kopienzahl im Genom

Die Komplexität der cDNA-Struktur legte eine Analyse des genomischen Aufbaus des Gens *sre 4* nahe, sodass zunächst mittels Southern-Blot Analyse die Kopienzahl der Homologen im Kartoffelgenom bestimmt wurde. Der Blot, hybridisiert mit dem cDNA-



Klon *sre 4-c1*, ergab unter stringenten Bedingungen mindestens zwei hybridisierende Banden für die getesteten Restriktionsendonukleasen.

Abb. 3.10: Analyse der genomischen Organisation von *sre 4*

Aus Kartoffelblättern wurde genomische DNA isoliert, mit den angegebenen Restriktionsenzymen geschnitten und im 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde denaturiert, neutralisiert, geblottet und mit der radioaktiv markierten cDNA *sre 4-c1* hybridisiert. Die Membran wurde anschließend unter stringenten Bedingungen ($2x \{2xSSC, RT\}$, $2x \{0,2xSSC, 65^{\circ}C\}$) gewaschen und die Radioaktivität mittels des Phosphorimagers detektiert. Dargestellt ist eins von drei konsistenten Experimenten.

Für die *Dra* I-Endonuklease ist in *sre 4* eine Schnittstelle innerhalb des hybridisierenden Bereiches bekannt, die eine zusätzliche Bande auf dem Southern-Blot mit diesem Enzym erklärt. Eine zweite *Dra* I-Schnittstelle im 5'-untranslatierten Bereich des Gens, die bei der späteren Analyse der genomischen Sequenzen identifiziert wurde, läßt ein ca. 750 bp-Fragment erwarten, das als Bande im Southern-Blot wiederzufinden ist. Man muss also von mindestens zwei Kopien des Gens im Kartoffelgenom ausgehen. Diese Aussage korrespondiert auch dazu, dass ein *sre 4*-sequenzhomologes Gen in Kartoffel bereits beschrieben ist (s. Kap. 3.3.5).

3.4.2 Klonierung des genomischen Bereiches des Gens *sre 4*

Um die genomische Sequenz des Gens zu erhalten, das für die klonierten cDNAs kodiert, wurde die Methode des *genome walkings* benutzt, bei der ausgehend von einer bekannten Teilsequenz 5'- und 3'- gelegene Bereiche amplifiziert werden. An genomische Fragmente, die mit den Restriktionsendonukleasen *Dra* I, *Sca* I und *EcoRV* geschnitten wurden, wurden Adaptoren ligiert und mittels eines genspezifischen Primers und eines Adaptorprimers konnten 5' und 3' der bekannten Sequenz gelegene genomische Bereiche amplifiziert werden. So konnten ein ca. 2 Kb großes *EcoRV*-Fragment in 5'-Richtung und ein ca. 0,6 Kb großes *Dra* I-Fragment in 3'-Richtung kloniert werden. Die Sequenzanalyse ergab, dass alle so gewonnenen genomischen Klone auf ein Gen zurückzuführen waren, von dem sich alle 4 klonierten cDNAs ableiten. Der cDNA-Klon *sre 4-c2* enthält alle Introns, die auch in der genomischen DNA enthalten sind. Die genomischen Klone decken einen Bereich ab, der ca. 1 Kb stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt beginnt und bis in den 3'-untranslatierten Bereich hineinreicht. Die Kenntnis des 5'-Bereiches ließ eine computergestützte Promotoranalyse zu, die Aufschluss über die Regulationsmöglichkeiten dieses Gens geben kann.

3.4.3 Promotoranalyse

Die *in silico* Analyse des genomischen 5'-Bereiches läßt deutliche Promotorelemente erkennen, die bestätigen, dass es sich hier um den Anfangsbereich eines Gens handelt. Das *online*-Programm *neural network promotor prediction*¹² (Reese und Eeckman, 1995) hat mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % den Transkriptionsstartpunkt für den in Abb. 3.11 dargestellten Bereich 41 Nukleotide stromaufwärts des Translationsstartpunktes berechnet.

```
-40 bis +10  TCTCCTTGGC CTATAAAAGG CAGCATTTTG TACCCAGAAA ATGCACATCT
                                     -30                                     1
```

Abb. 3.11: Transkriptionsstart des Gens *sre 4*

Angegeben ist der Bereich der genomischen Sequenz, der mittels des Programms *neural network promotor prediction*¹² als Promotor für das Gen *sre 4* berechnet wurde. Die Zahlen geben die Nukleotidpositionen in Bezug auf das Transkript an (Gesamtsequenz siehe Anhang). Die TATA-Box ist kursiv und unterstrichen dargestellt, der Transkriptionsstartpunkt ist durch einen größeren Schriftsatz hervorgehoben.

¹² http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html

Eine der Konsensussequenz „TATAAA“ identische TATA-Box liegt ebenfalls in dem vorhergesagten Promotorbereich 30 Nukleotide stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes, wie es für eukaryotische Promotoren beschrieben ist.

Neben diesen Standardelementen wurden in dem Promotorbereich von *sre 4* auch einige in Pflanzen beschriebene konservierte Boxen sowie *Enhancer*- und *Suppressor*-Elemente gefunden, die die Expressionsstärke eines Gens kontrollieren können. In Abb. 3.12 sind diese Elemente, die mit Hilfe der Transfac¹³ (Wingender *et al.*, 2000) und PLACE¹⁴-Datenbank (Higo *et al.*, 1999) annotiert wurden, proportional zu der Sequenz des Promotorbereiches dargestellt.

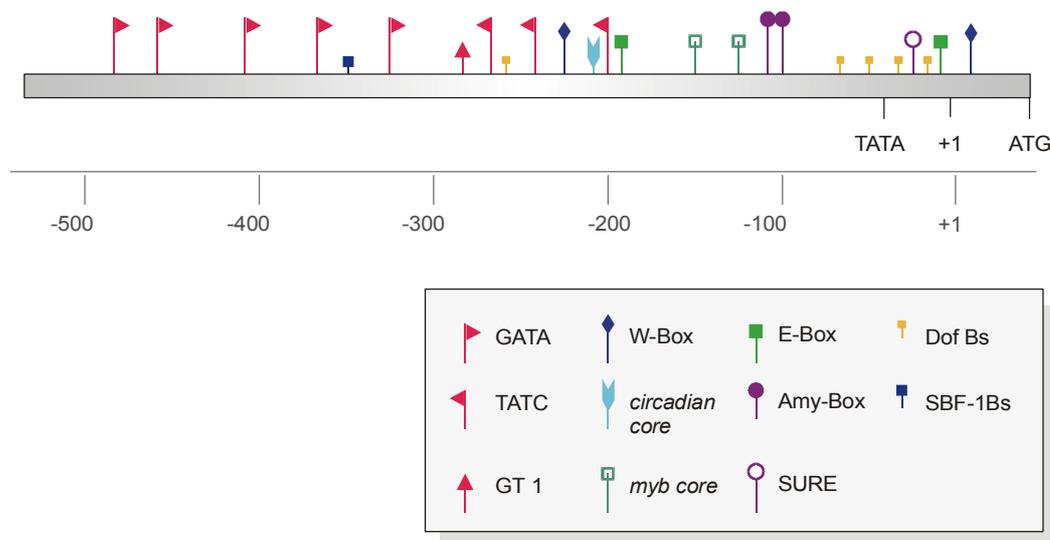


Abb. 3.12: Regulatorische Elemente im 5'-Bereich des Gens *sre 4*

Mit Hilfe der Datenbanken Transfac¹³ und PLACE¹⁴ wurde der 5'-untranslatierte Bereich des Gens *sre 4* auf mögliche regulatorische Promotorelemente untersucht. Dargestellt sind die wichtigsten Elemente, die im Bereich von -500 bis zum Startcodon ATG gefunden wurden. Eine Beschreibung der Elemente findet sich in Tab. 3.5.

Auffällig ist die große Anzahl an sogenannten GATA-Elementen, die in aufeinanderfolgender Reihe die I-Box formieren. Ihnen wird eine Rolle bei der lichtabhängigen Regulation zugeschrieben (Gilmartin *et al.*, 1990). In diesem Zusammenhang muß auch das GT 1-Element erwähnt werden, das ebenfalls als lichtregulatorisches Element diskutiert wird (Lam und Chua, 1990) aber auch im *pr 1a*-Promotor aus Tabak an der salizylatabhängigen *pr*-Genexpression beteiligt ist (Buchel *et al.*, 1999). Auch befinden sich zwei Enhancer-Elemente, sogenannte W-Boxen, an die die elicitorinduzierten WRKY-Transkriptionsfaktoren binden können, in diesem genomischen Bereich (Rushton *et al.*, 1996; Eulgem *et al.*, 1999). Bei Position -200 ist ein *circadian core*-Element lokalisiert, das in Tomate für die circadiane Regulation des *Ihc*-Gens verantwortlich ist (Piechulla *et al.*, 1998). Desweiteren finden sich eine SBF-1-Box, die als Supressorelement der Chalconsynthese in *Phaseolus vulgaris*

¹³ <http://transfac.gbf.de>

¹⁴ <http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/>

beschrieben wurde (Hotter *et al.*, 1995) sowie eine E-Box und zwei myb-Konsensussequenzen, die in die Trockenstress und Abszinsäure-abhängige Genregulation involviert sein könnten (Urao *et al.*, 1993; Stalberg *et al.*, 1996). Sogenannte amy1 und 2-Boxen, die im α -Amylase Promotor gefunden wurden und ein SURE (*sugar response element*) weisen auf eine Zucker-abhängige Regulationsmöglichkeit im *sre 4*-Promotor hin (Hwang *et al.*, 1998). Nicht zuletzt wurden mehrere sogenannte Dof-Bindungsstellen gefunden, an die eine pflanzenspezifische Gruppe von Dof-Transkriptionsfaktoren binden, für die aber noch kein Regulationsmechanismus bekannt ist (Yanagisawa und Schmidt, 1999).

Tab. 3.5: Promotorelemente in der 5'-Region stromaufwärts des Translationsstartpunktes von *sre 4*

Promotorelement	Konsensus/ gefundene Sequenz	Position	mögliche Funktion in anderen Genen
W-Box	TTGAC/ aTGACctnnnnnGTCA TTGAC/ ATGACCAAACGGGTCA	-658; -224; +19	Pathogen und SA regulierte Expression
GATA TATC (I-Box)	GATAag TATC GATAa TATC	-636; -587; -554, -545; -534; -357, -312; -282; -256, -237;	Licht und Stickstoff regulierte Expression
GT-1	GRWAAW GAAAAA; GAAAAT	-319; -180	TATA-Komplexstabilisierung; Licht und SA-reguliert
E-Box	CANNTG CAGATG	-221; +60	ABA reguliert
myb-Erkennungsstelle	CNGTTR CTGTTA; CAGTTA	-172; -128	ABA und Trockenstress regulierte Expression
SURE	AATAGAAAA AATAGAAAA	+28	Zucker reguliert
Amy-Box 1	TAACARA TAACAAA	-102	in Amylase Promotor
Amy-Box 2	TATCCAT TATCCAT	-124	in Amylase Promotor
<i>circadian core</i> -Element	CAANNNNATC CAATAAAATC	-279	circadiane Rhythmik
Dof core 2M Bindungsstelle	AAAG/ AAAG	-304; -55; -47; -25; +35	pflanzenspezifischer Transkriptionsfaktor, bindet an Prolaminbox
SBF-1	atactgTTAAtaga ATTTTGTAAATC	-353	Suppression der Chalconsynthese aus Bohne

Abkürzungen der Nukleotide und Nukleotidgemische (s. Anhang): N=A/C/G/T R=A/G W=A/T K=G/T M=A/C
kleine Buchstaben bedeuten Nukleotide außerhalb der Konsensus-Region

3.5 Expressionsanalyse des Gens *sre 4*

Die Computeranalyse des Promotors ergab eine Vielzahl von regulatorischen Elementen, die die Vermutung nahe legten, dass es sich bei *sre 4* nicht um ein konstitutiv exprimiertes Gen des Primärstoffwechsels handelt sondern um ein Gen, das

durch Umwelteinflüsse oder Stressfaktoren aktiviert werden kann. In diesem Kapitel wird der Einfluss einiger dieser Faktoren auf die Expression von *sre 4* beschrieben.

3.5.1 Transkriptakkumulation nach Bakterieninfiltration

Im *Differential Display* hatte sich für das Gen *sre 4* eine transiente Expression nach der Applikation von *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*- Bakterien gezeigt, die durch weitere unabhängige Untersuchungen zu bestätigen war. Zu diesem Zweck wurden Northern- und RT-PCR-Experimente durchgeführt.

3.5.1.1 Northern-Experimente

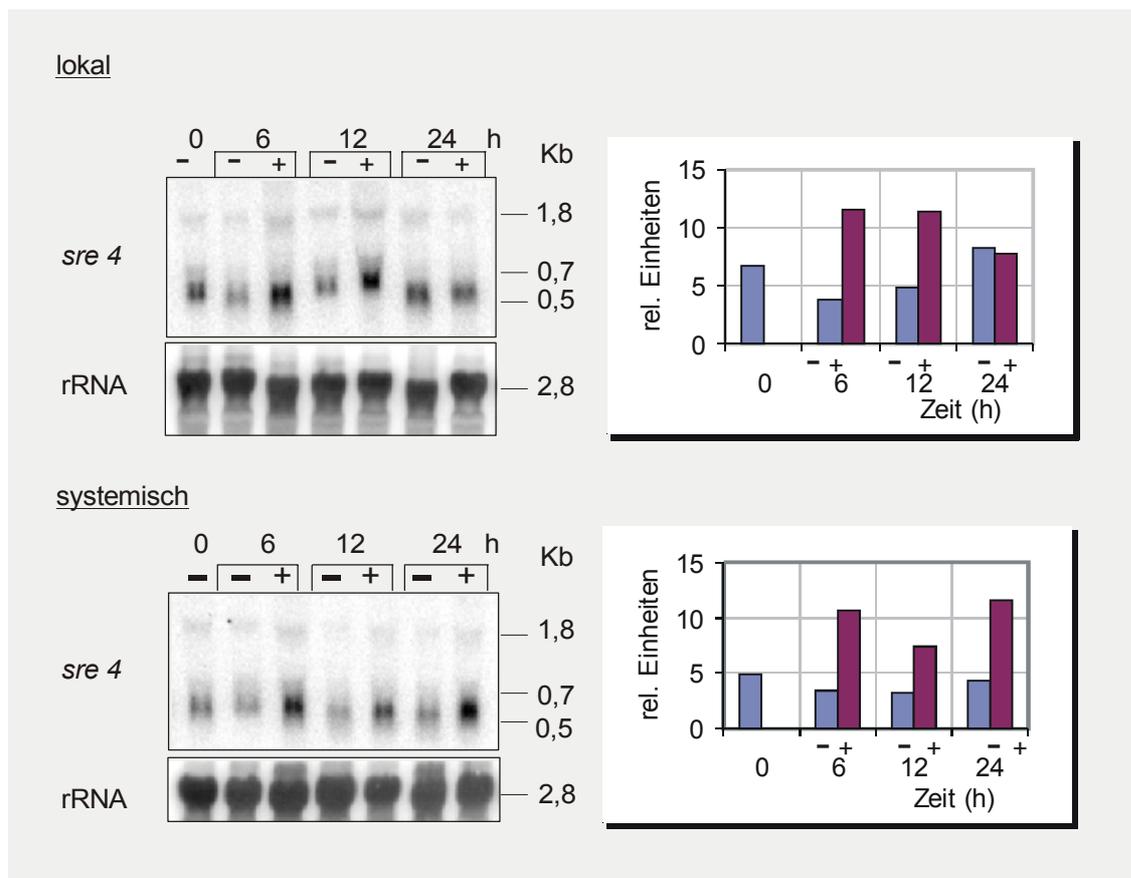


Abb. 3.13: Analyse der *sre 4* Transkripte nach *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*-Inokulation

Zwei ältere Kartoffelblätter wurden mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (+) bzw. 10 mM MgCl₂ (-) infiltriert und die beiden folgenden jüngeren Blätter wurden zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet, RNAs wurden isoliert und in Northern-Experimenten mit der radioaktiv markierten *sre 4*-cDNA hybridisiert. Es wurden 25 µg Gesamt-RNA eingesetzt; die tatsächlich eingesetzten RNA-Mengen wurden durch Hybridisierung des Blots mit einer 23S rRNA-Sonde überprüft (rRNA). Die Radioaktivitätsverteilung wurde mittels des Phosphorimagers detektiert und quantifiziert. Nach Abgleich mit dem Hintergrund wurden die gemessenen Werte zu den Werten der Ladungskontrolle (rRNA) in Relation gesetzt (rel. Einheiten). Im linken Teil des Bildes sind die Autoradiogramme zu sehen, rechts die Ergebnisse der relativen Quantifizierung. Dargestellt ist eins von fünf konsistenten Experimenten.

Die SAR-Induktion mittels *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* wurde wie in Kap. 2.2.3 beschrieben durchgeführt und sowohl inokulierte als auch unbehandelte, apikale Blätter 6, 12 und 24 h nach Bakterieninfiltration geerntet. Die Northern-Blots zeigen die

Hybridisierung der RNA aus diesen Blättern mit der *sre 4-c1* cDNA sowie einer 23S rRNA-Sonde zur Beladungskontrolle. Die Quantifizierung der Radioaktivität (ImageQuant, Pharmacia) wurde jeweils mit dem Hintergrund abgeglichen und zu der geladenen RNA-Menge in Relation gesetzt.

Die Northern-Blots (Abb. 3.13) zeigten, dass die *sre 4*-Transkripte nach Bakterieninokulation im Vergleich zur $MgCl_2$ -Kontrolle sowohl lokal als systemisch schon nach 6 h stärker akkumulierten. In systemischem Gewebe (Abb. 3.13; unten) war auch nach 24 h noch ein signifikanter Unterschied zwischen infizierten und Kontrollpflanzen zu detektieren.

Es konnten mindestens drei hybridisierende Transkripte von ca. 0,6, 0,8 und 1,8 Kb Größe detektiert werden, was mit der Tatsache einhergeht, dass *sre 4* für verschieden große Transkripte kodiert. Die kleineren Transkripte erschienen stärker exprimiert als das 1,8 Kb-Transkript. Eine direkte Zuordnung der Transkriptgrößen zu den klonierten cDNAs war nicht möglich, da die Trennschärfe der Agarosegele nicht ausreichte, um alle Banden darzustellen und sich die Größen der Transkripte durch die Länge der Poly A⁺-Schwänze verändern.

3.5.1.2 RT-PCR

Mittels RT-PCR konnte eine differentielle Expression des Transkripts, das in der DDRT-PCR gefunden worden war, nach Bakterieninokulation nachgewiesen werden. Die RT-PCR wurde mit Primern durchgeführt, die spezifisch für die erste Intronregion von *sre 4* sind und somit einen Teil des Transkripts *sre 4-c2* amplifizieren. Wie in Abb. 3.14 zu sehen, akkumulierte das Transkript *sre 4-c2* in inokulierten Pflanzen sowohl lokal als auch systemisch in höherem Maße als in Kontrollpflanzen. Obwohl die Expression der kleineren Transkripte im Northern-Experiment stärker induziert wirkte, konnte somit auch für die intronenthaltende mRNA eine deutliche Induktion nach 6 bis 24 h nachgewiesen werden.

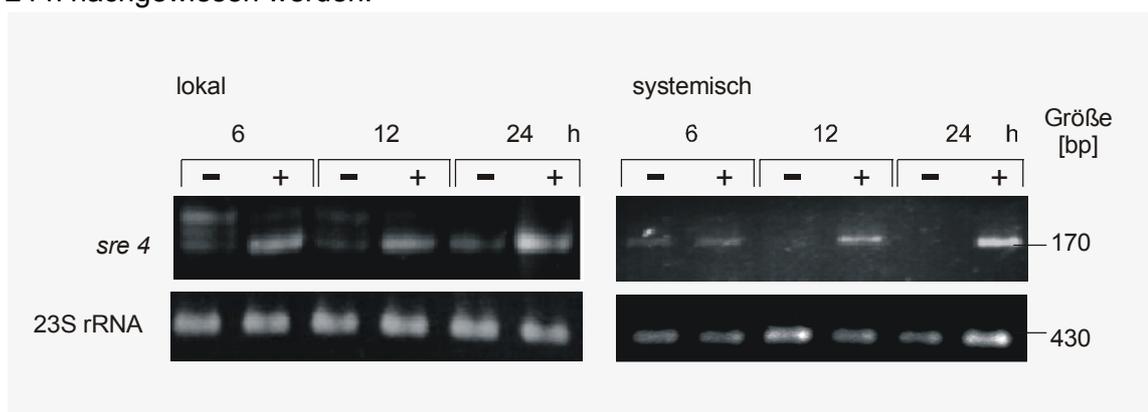


Abb. 3.14: RT-PCR Analyse der Expression des cDNA-Klon *sre 4-c2*

Zwei ältere Kartoffelblätter wurden mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (+) bzw. 10 mM $MgCl_2$ (-) infiltriert und zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet, RNAs wurden isoliert und in RT-PCR Experimenten mit Intron I spezifischen Primern (X-Int 5' und X-Int 3') amplifiziert. Es wurden 2 μ g Gesamt-RNA eingesetzt; die Gleichmäßigkeit der eingesetzten RNA-Mengen wurde durch Amplifikation eines 23S rRNA-Fragmentes überprüft. Dargestellt ist eins von drei konsistenten Experimenten.

3.5.2 Organspezifische Expression von *sre 4*

Die Northern-Blot-Analyse der *sre 4*-Transkripte in verschiedenen Organen von Kartoffelpflanzen hat ergeben, dass in sehr jungen Blättern die *sre 4*-mRNA-Menge unterhalb der Nachweisgrenze liegt, während sie in älteren Blättern akkumuliert (Abb. 3.15). Sowohl in der Sproßachse als auch in den Wurzeln wurde *sre 4* schwach, in Knollen moderat und in Blüten stark exprimiert.

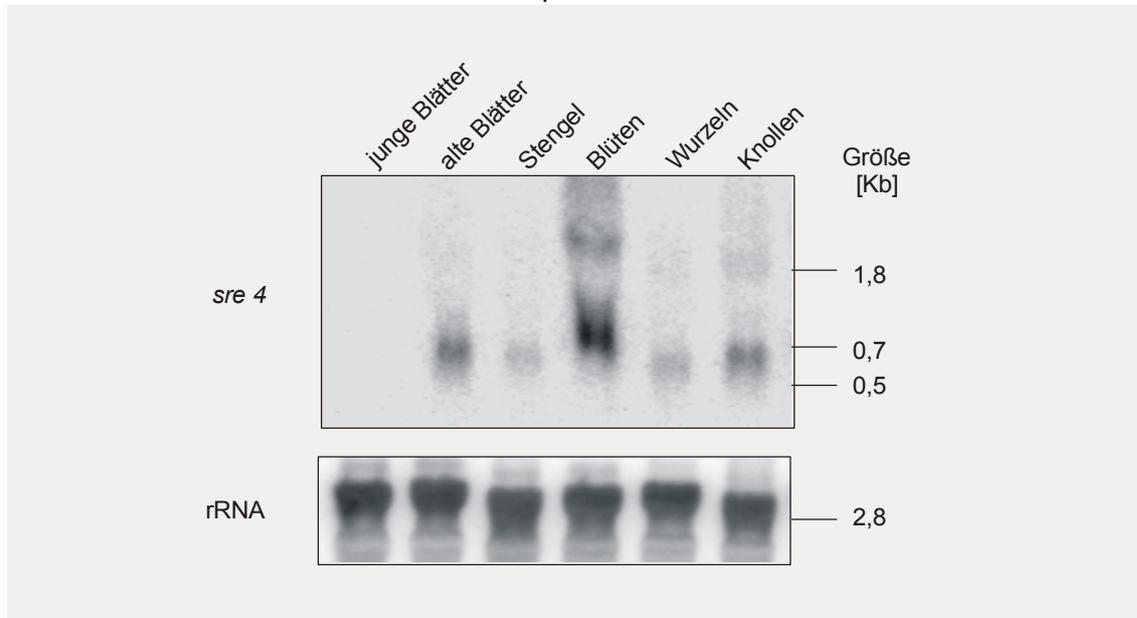


Abb. 3.15: Organspezifische Expression von *sre 4*

Gesamt-RNA wurde aus verschiedenen Geweben isoliert und im Northern-Experiment mit der radioaktiv markierten *sre 4-c1* cDNA hybridisiert. Die Radioaktivität wurde mit dem Phosphorimager detektiert. Zur Kontrolle der eingesetzten RNA-Mengen (35 µg) wurde dieselbe Membran mit einer 23S rRNA-Sonde hybridisiert. Dargestellt ist eins von zwei konsistenten Experimenten.

3.5.3 Circadiane- bzw. Licht/Dunkel-Rhythmik des mRNA-Niveaus

Die Sequenzähnlichkeit von *sre 4* zu dem circadian regulierten *grp 8* aus *Arabidopsis*, sowie ein circadian regulierendes Promotorelement legten eine Analyse der Änderung der *sre 4*-Transkriptmenge im Tagesverlauf nahe.

Im Abstand von 4 Stunden wurden von unbehandelten Kartoffelpflanzen einige Blätter geerntet und im Northern-Blot analysiert. Deutlich war ein Abfall der Transkriptmengen in der Dunkelphase (5:00 bis 13:00 Uhr) zu erkennen, der sein Minimum zu Beginn der Lichtphase erreichte. Mit zunehmender Belichtungszeit akkumulierten die Transkripte erneut. Die relative Quantifizierung der Northern-Blot-Ergebnisse verdeutlicht die Veränderung der Expressionsstärke über die Zeit (Abb. 3.16)

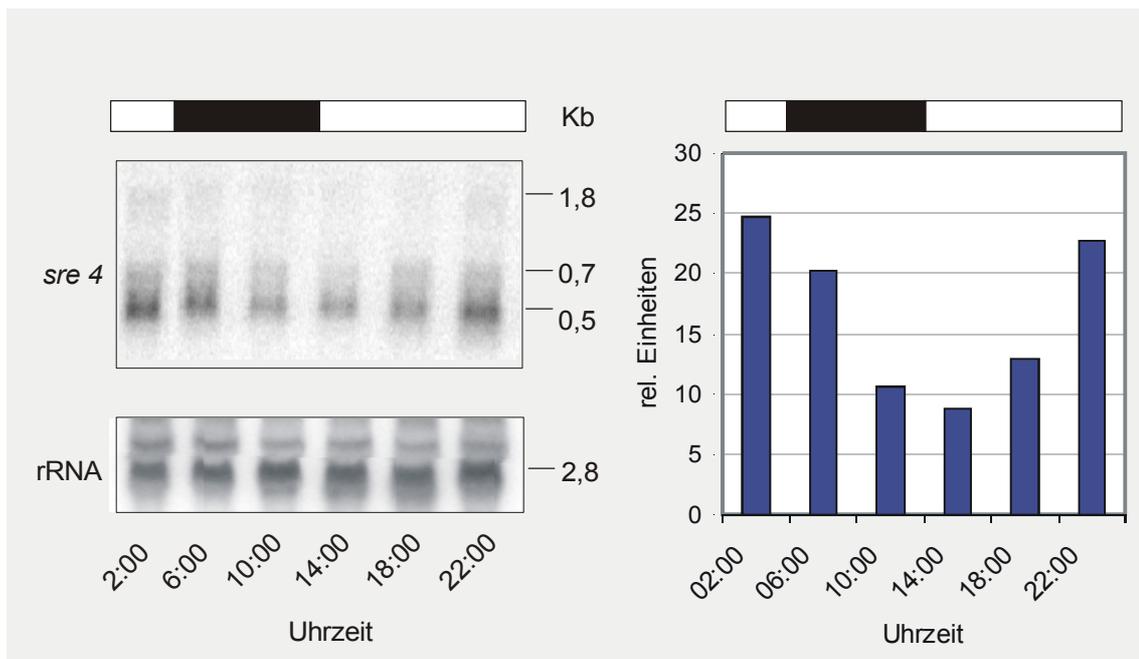


Abb. 3.16: Tagesverlauf der Expression von *sre 4*

Zu den angegebenen Tageszeiten wurden Blätter unbehandelter Kartoffelpflanzen geerntet, die RNA isoliert und 40 µg Gesamt-RNA im Northern Blot Experiment analysiert. Die Membran wurde mit der radioaktiv markierten *sre 4*-cDNA hybridisiert und anschließend zur Kontrolle der Beladung mit einer 23 S-rRNA-Sonde. Die Radioaktivität wurde mit dem PhosphorImager detektiert. Die Banden wurden mit dem Programm ImageQuant quantifiziert und zu der Beladungskontrolle in Relation gesetzt. Die Ergebnisse dieser Quantifizierung finden sich in dem Graphen rechts. Die schwarzen Balken oberhalb der Abbildungen bezeichnen die Zeit der Dunkelphase. Dargestellt ist eins von zwei konsistenten Experimenten.

3.5.4 Effekte von Verwundungen auf die Transkriptmenge von *sre 4*

Viele pathogen-responsive Gene werden auch durch Verwundung aktiviert. Daher wurden Kartoffelpflanzen verwundet und die Transkriptakkumulation von *sre 4* zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. In einem Versuch wurden die Zeitpunkte 3, 6 und 24 h nach Verwundung gewählt, in einem Parallelversuch wurde auch noch 18 h nach Verwundung Pflanzenmaterial geerntet. Zur Kontrolle wurde ein Blot mit dem Proteinaseinhibitor *pin II* hybridisiert, für den eine Wundresponsivität beschrieben ist (Sanchez-Serrano *et al.*, 1986).

Wie in Abb. 3.17 zu sehen, war nach 18 bzw. 24 h eine schwache aber deutliche Akkumulation der *sre 4*-mRNAs zu erkennen, die aber deutlich unter den Transkriptmengen lag, die durch Bakterieninokulation erreicht wurden. Auch war der zeitliche Verlauf der Induktion deutlich verzögert im Vergleich zur Induktion durch SAR-induzierende Bakterien (vgl. Abb. 3.13).

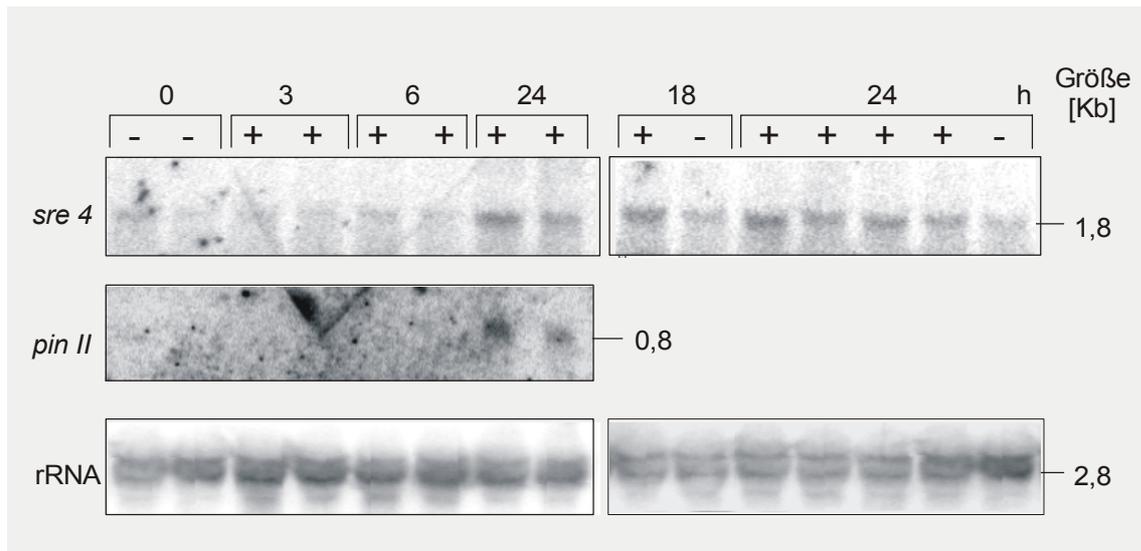


Abb. 3.17: Verwundungseffekte auf die *sre 4*-Expression

Verwundete und unbehandelte Kontrollblätter wurden nach den angegebenen Zeiten geerntet, die RNA isoliert und im Northern-Experiment analysiert. Die Membranen wurden mit dem radioaktiv markierten DDRT-PCR-Fragment *sre 4* und als Kontrolle der Wundeffekte mit einer *pin II*-Sonde hybridisiert, die Gleichmäßigkeit der eingesetzten RNA-Mengen wurde durch die Hybridisierung mit einer 23S rRNA-Sonde überprüft. Die Radioaktivität wurde mit dem Phosphorimager detektiert. Dargestellt sind zwei von vier konsistenten Experimenten, wobei der 18 h-Wert nur einmal analysiert wurde.

3.5.5 Einfluss der Behandlung mit Phytohormonen auf die *sre 4* Expression

Phytohormone spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der verschiedensten Prozesse in Pflanzen. Für die Pathogenantwort in Pflanzen wurde neben Salizylat und Jasmonat (Methyljasmonat) auch Abszisin säure und Ethylen eine regulatorische Funktion zugeschrieben (van Wees *et al.*, 2000). Um herauszufinden, welche Hormone Einfluss auf die transkriptionelle Regulation von *sre 4* haben, wurden Kartoffelblätter den verschiedenen Phytohormonen ausgesetzt und die Expressionsänderungen untersucht.

3.5.5.1 Salizylat

Salizylat (SA) ist das meist diskutierte Signalmolekül in der Ausprägung der SAR und führt in vielen Pflanzen, exogen appliziert, zur Etablierung der systemischen Resistenz. Für Kartoffel ist die Rolle von SA noch wenig untersucht, doch führt SA trotz hoher endogener SA-Gehalte der Kartoffel zur verstärkten Expression des klassischen *pr*-Gens *pr 1a* (Kistner, 1999).

Um den Einfluss von SA auf die *sre 4*-Expression zu untersuchen, wurden abgeschnittene Blätter von Kartoffelpflanzen in SA-Lösungen verschiedener Konzentrationen zwischen 100 μ M und 1 mM gestellt und nach 3 bis 72 h Inkubation geerntet. Northern-Blots wurden mit einer *sre 4*-cDNA und anschließend zur Kontrolle der SA-Applikationsbedingungen mit einer *pr 1a*-Sonde (Kistner, 1999) hybridisiert. Wie in Abb. 3.18 zu sehen, war eine Akkumulation der mRNA bereits nach 6 h zu erkennen, die in konzentrationsabhängiger Weise erfolgte. Nach 24 h waren auch niedrige Konzentrationen in der Lage, die Transkriptakkumulation zu induzieren. Der SA-Effekt konnte auch nach 72 h noch beobachtet werden. Damit folgte die *sre 4*-Expression wenngleich schwächer exakt der des *pr 1a*-Gens.

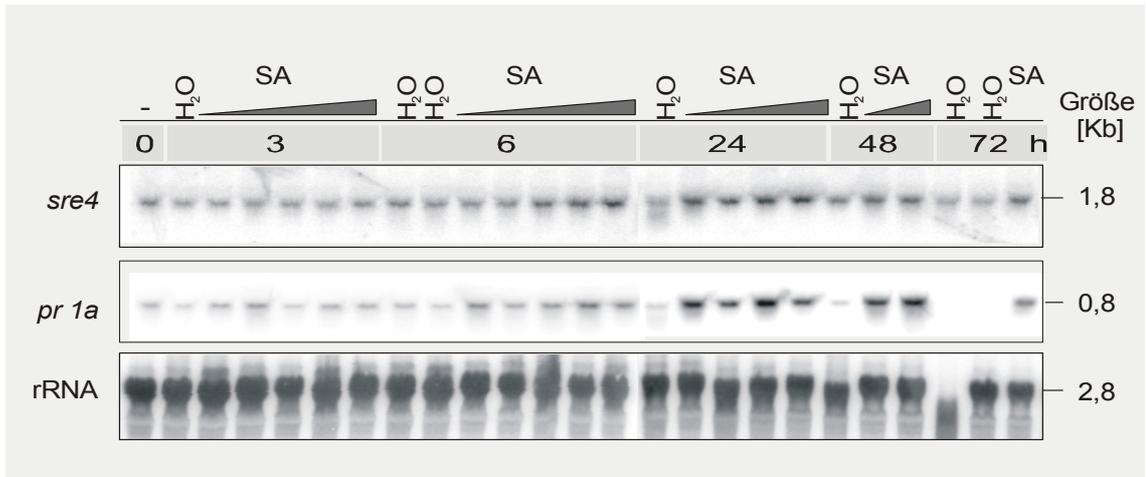


Abb. 3.18: Einfluss von Salizylat auf die Expression von *sre 4*

Abgeschnittene Fiederblätter von Kartoffelpflanzen wurden in Salizylatlösungen von 100 μM bis 1 mM^{15} gestellt und nach den angegebenen Zeitpunkten geerntet, die RNA wurde isoliert und im Northern-Experiment analysiert. Die Membranen wurden mit dem radioaktiv markierten *sre 4*-DDRT-PCR-Fragment hybridisiert, zur Kontrolle der Hormonbehandlung mit einer *pr 1a*-Sonde und zur Beladungskontrolle (20 μg) mit einer 23S rRNA-Sonde hybridisiert. Die Radioaktivität wurde mit dem Phosphorimager detektiert. Dargestellt ist eins von vier konsistenten Experimenten.

3.5.5.2 Abszisionsäure

Die Abszisionsäure ist nicht nur an der Seneszenzausprägung in Pflanzen beteiligt sondern auch an stressregulierten Reaktionen wie der Antwort auf osmotischen Stress oder Trockenheit. Auch *sre 4*-sequenzhomologe Gene aus *Arabidopsis* werden in Abhängigkeit von ABA nach Trocken- und Salzstress aktiviert.

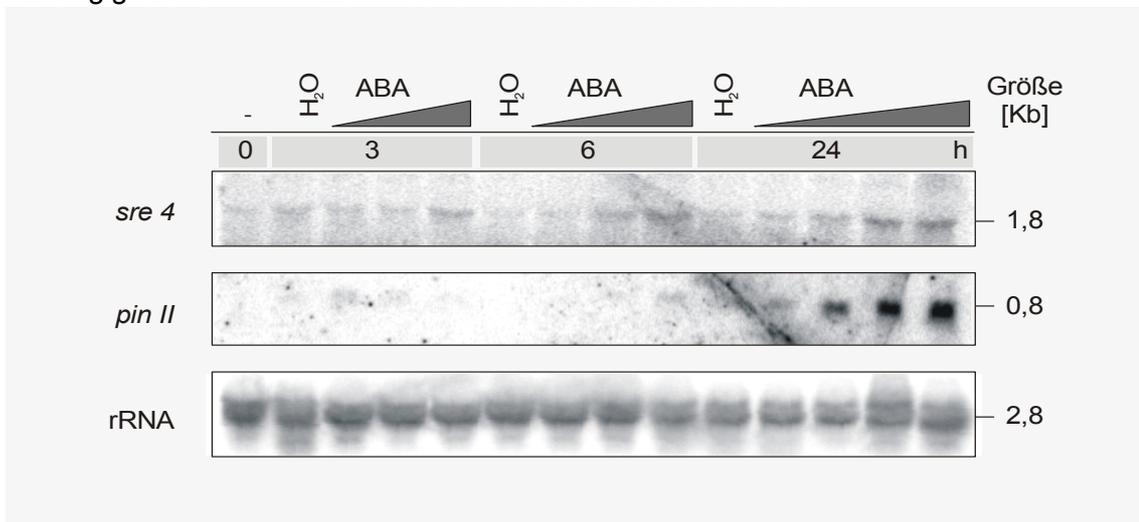


Abb. 3.19: Expression von *sre 4* nach Abszisionsäure-Behandlung

Abgeschnittene Fiederblätter von Kartoffelpflanzen wurden in Abszisionsäurelösungen von 10 μM bis 200 μM^{16} gestellt und nach den angegebenen Zeitpunkten geerntet, die RNA isoliert und im Northern-Experiment analysiert. Die Membranen wurden mit dem radioaktiv markierten *sre 4*-DDRT-PCR-Fragment hybridisiert, zur Kontrolle der Hormonbehandlung mit einer *pin II*-Sonde und zur Beladungskontrolle (20 μg) mit einer 23S rRNA-Sonde hybridisiert. Die Radioaktivität wurde mit dem Phosphorimager detektiert. Dargestellt ist eins von drei konsistenten Experimenten.

¹⁵ *3h: 100, 200, 400, 600, 800 μM ; 6 h: 100, 200, 400, 600, 800 μM ; 24 h: 200, 400, 800, 1000 μM ; 48 h: 200, 800 μM ; 72 h: 800 μM

¹⁶ * 3 h/ 6 h: 10, 50, 100 μM ; 24 h: 10, 50, 100, 200 μM

Daher wurden abgeschnittene Kartoffelblätter in ABA-Lösungen verschiedener Konzentrationen von 10-100/200 μM gestellt und nach 3 bis 24 h Inkubationszeit geerntet. In Northern-Experimenten wurde der Einfluss von Abszissinsäure auf die *sre 4*-Regulation untersucht. Zur Kontrolle wurden die Northern-Blots mit einer *pin II*-Sonde (Sanchez-Serrano *et al.*, 1986) hybridisiert.

Wie in Abb. 3.19 zu sehen, konnte bereits nach 3 h eine schwache Induktion der *sre 4*-mRNA nach Applikation von 100 μM ABA detektiert werden. Nach 6 und 24 h reichte eine Konzentration von 50 μM ABA aus, um *sre 4* zu exprimieren. Die Kontrollhybridisierung mit *pin II* konnte nach 3 und 6 h sehr schwach detektiert werden. Nach 24 h war eine deutliche Induktion der Expression in konzentrationsabhängiger Weise detektierbar.

3.5.5.3 Methyljasmonat und Ethylen

Die Phytohormone Jasmonat/Methyljasmonat und Ethylen werden sowohl als Bestandteile der Pathogen- als auch der Wundsignaltransduktion beschrieben. Auch systemische Prozesse wie die SA-unabhängige SAR und die ISR werden durch Jasmonat reguliert (van Wees *et al.*, 2000).

Um die Rolle dieser Phytohormone in der Regulation von *sre 4* zu untersuchen, wurden abgeschnittene Kartoffelblätter auf einer 45 μM Methyljasmonatlösung in verschlossenen Petrischalen floriert, da Methyljasmonat sehr flüchtig ist.

Da eine exakte Applikation von Ethylen technisch aufwendig ist, wurde ein Vorversuch zur Abschätzung der Ethylenresponsivität von *sre 4* durchgeführt. Dazu wurden sehr reife Bananen, die Ethylen ausgasen, zusammen mit Kartoffelpflanzen in Folie verpackt, um den Gasaustausch zu minimieren. Blattmaterial wurde nach verschiedenen Zeiten geerntet und in Northern-Experimenten der Einfluss des Ethylens auf die Expression von *sre 4* untersucht. Als Kontrolle wurden die Northern-Blots der Experimente mit *pin II* (Sanchez-Serrano *et al.*, 1986) für das Jasmonatexperiment und *Stprb-1b* (Sessa *et al.*, 1995; Kistner, 1999) für das Ethylenexperiment hybridisiert. In beiden Fällen war eine deutliche Induktion der Kontrolltranskriptexpression zu erkennen, während *sre 4* in keinem Fall eine Änderung seines Expressionsniveaus erfahren hat (nicht dargestellt).

3.5.6 Änderung der Expression durch osmotischen Stress, Kälte und Trockenheit

Veränderungen des osmotischen Milieus können, hervorgerufen durch Zucker- oder auch durch Salzstress, zu einer Aktivierung von *pr*-Genen in Kartoffel führen (Zhu *et al.*, 1995). Auch hat ein erhöhter Zuckergehalt, wie er beispielsweise nach Pathogeninfektionen beobachtet wird, Effekte auf die Expression einzelner *pr*-Gene (Herbers *et al.*, 1996). Sorbitol erzeugt ohne direkten Einfluss auf metabolische Prozesse osmotischen Stress, der zu einem erhöhten endogenen Jasmonatgehalt in Pflanzen führt, und lässt so eine Unterscheidung von ernährungsphysiologischen Einflüssen und osmotischem Stress zu. Daher wurden Kartoffelblätter sowohl in

Saccharose- als auch in Sorbitollösungen gestellt und zu verschiedenen Zeiten geerntet. Wie in Abb. 3.20 zu sehen, kam es 12 h nach der Zuckergabe zu einer starken Akkumulation der Transkripte, die auch nach Bakterieninokulation detektiert werden konnten (ca. 0,6, 0,8 und 1,8 Kb). Die Sorbitolbehandlung führte bei einer Konzentration von 200 mM bereits nach 6 h zu einer deutlichen Induktion der *sre 4*-Transkripte. Nach 12 und 24 h war außerdem noch ein weiteres Transkript von ca. 2 Kb Größe zu detektieren.

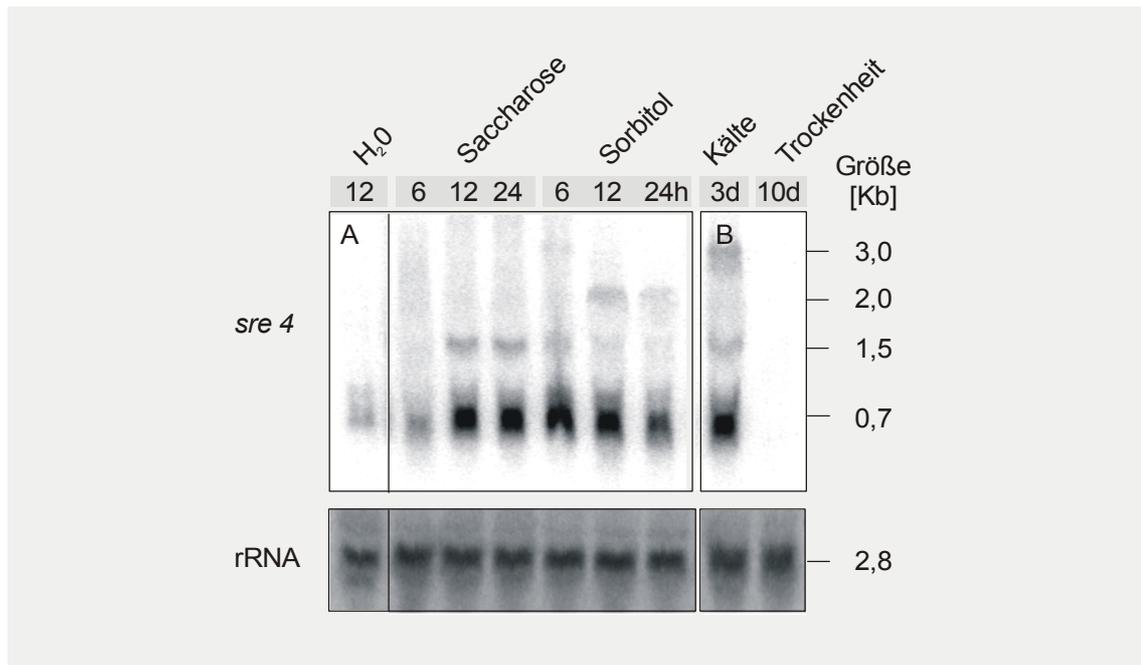


Abb. 3.20: Einfluss von osmotischem-, Kälte und Trockenstress auf die *sre 4*-Expression

A: Abgeschnittene Fiederblätter von Kartoffelpflanzen wurden in Saccharose bzw. Sorbitollösungen (je 200 mM) gestellt und nach verschiedenen Zeitpunkten geerntet. B: Ganzpflanzen wurden von den Standardanzuchtbedingungen in einen Thermokonstantraum zu 15°C überführt und nach 3 Tagen geerntet sowie für 10 Tage unter Standardbedingungen aber ohne Wasserzufuhr gehalten. Aus dem geernteten Blattmaterial wurde die RNA isoliert und im Northern-Experiment analysiert. Die Membranen wurden mit der radioaktiv markierten *sre 4-c1* cDNA und zur Beladungskontrolle (20µg) mit einer 23S rRNA-Sonde hybridisiert. Die Radioaktivität wurde mit dem Phosphorimager detektiert. Dargestellt ist je eins von zwei konsistenten Experimenten für A und Kältebehandlung und ein Einzelexperiment für Trockenstress, das aber in fünf Parallelen durchgeführt wurde.

Kälte- bzw. Trockenschutzmechanismen beinhalten eine transkriptionelle Modulation glyzinreicher Gene aus verschiedensten Pflanzenfamilien und sogar aus Vertebraten (Carpenter *et al.*, 1994; Dunn *et al.*, 1996; Nishiyama *et al.*, 1997; Harrak *et al.*, 1999). Wie in Abb. 3.20 zu sehen, zeigen die *sre 4*-Transkripte ebenfalls eine starke Induktion nach dreitägiger Erniedrigung der Anzuchttemperatur auf 15°C. Zudem konnte ein weiteres Transkript von ca. 3 Kb detektiert werden. Wurden die Kartoffelpflanzen über 10 Tage nicht gegossen und trockneten somit zur Welke, so war keines der *sre 4*-Transkripte mehr zu detektieren.

3.6 Charakterisierung des Proteins Sre 4

Für die funktionelle Charakterisierung des Gens *sre 4* ist es unerlässlich, die kodierten Proteine zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden zunächst Antikörper gegen ein internes Peptid generiert. Dieses Peptid TDEKSMRNAIEAMNGQN, das sich in 7 Aminosäuren von dem homologen Gen aus *Solanum tuberosum* unterscheidet, wurde synthetisiert, gereinigt und die Antikörper wurden bei Eurogentec, Belgien, erzeugt. Zwei Antiseren wurden getestet und das Antiserum antiSre 4-7762 für weitere Versuche ausgewählt. Das Präimmunserum erkannte in Bakterienextrakten eine Reihe von Proteinen, in Kartoffelextrakten waren jedoch keine unspezifischen Kreuzreaktionen mit endogenen Proteinen zu detektieren (nicht dargestellt).

Parallel zu der Peptidantikörpergenerierung wurde die *sre 4-c1* cDNA in *E.coli* exprimiert, um auch das Gesamtprotein als Antigen zur Verfügung stellen zu können.

3.6.1 Heterologe Expression des Proteins Sre 4-p1 in Bakterien

Für die Expression wurde das offene Leseraster des Klon *sre 4-c1* in den Expressionsvektor pJC40 kloniert, der eine IPTG-induzierbare T7-spezifische Promotorstruktur enthält und das Konstrukt mit einer abspaltbaren N-terminalen Fusion von 10 Histidinresten exprimiert. Diese erlaubt eine Reinigung des rekombinanten Proteins über eine Metall-Chelat-Chromatographie und erhöht das Molekulargewicht des rekombinanten Proteins um 2,5 auf 19,2 KDa.

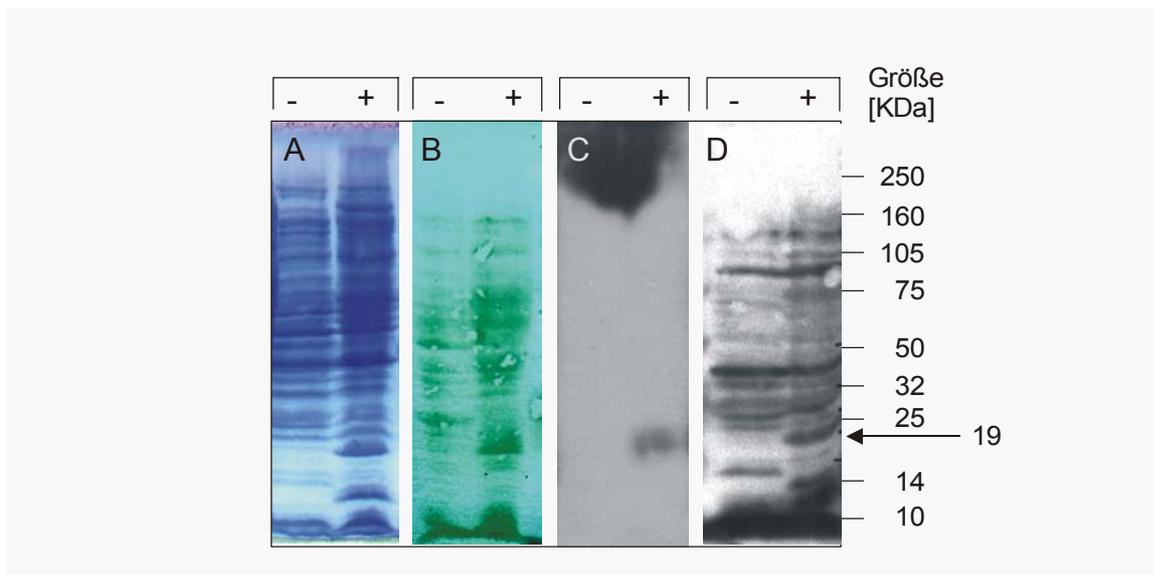


Abb. 3.21: Heterologe Expression von Sre 4-p1 in Bakterien

Mit dem Konstrukt pJC40-*sre 4-c1* (+) bzw. dem leeren Vektor (-) transformierte BL21 (DE3)-Zellen wurden 4 h nach der Induktion der Transgenexpression pelletiert, in Probenpuffer aufgekocht und im 15 %igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Die Gele wurden halbtrocken auf PVDF-Membranen geblottet und in Western-Experimenten mit dem Peptidantiserum antiSre 4-7762 bzw. mit dem antiHis 6-Antikörper (Babco) und dem *chemiluminescence western blotting kit (mouse/rabbit)* (Boehringer) detektiert. Die Lumineszenz wurde mit Biomax AR-Filmen visualisiert. A: Coomassie-gefärbtes SDS-PAA-Gel; B: Fast Green-gefärbte PVDF-Membran; C: Western-Blot mit antiHis 6-Antikörper; D: Western-Blot mit antiSre 4-7762. Dargestellt ist je eins von drei konsistenten Experimenten.

Mittels PCR wurde eine 5'-*Nde* I-Schnittstelle und eine 3'-*EcoRI*-Schnittstelle in die cDNA eingeführt, die eine direktionale, leserasterspezifische Klonierung des Konstruktes mit den N-terminalen Histidinen erlaubte. Nach der Transformation von pJC40-*sre 4-c1* (bzw. pJC40 als Kontrolle) in BL21-(DE3)-Zellen und der Induktion der Polymerase durch IPTG wurde ein Protein in den transgenen Bakterien exprimiert, das mit ca. 19 KDa die erwartete Größe hatte. Das Peptidantiserum antiSre 4-7762 erkannte neben anderen Proteinen auch diese Bande, die in den Vektor-transformierten Kontrollen nicht gebildet wurde (Abb. 3.21 D). Ein antiHis 6-Antikörper (Babco) erkannte hingegen in den Gesamtbakterienextrakten spezifisch diese eine Bande, sodass man davon ausgehen kann, dass es sich um das zu exprimierende Protein handelt (Abb. 3.21 C).

3.6.2 Analyse der Proteinexpression in Kartoffelpflanzen

In Proteinextrakten aus Kartoffelblättern ließen sich im Western-Experiment mit dem Antiserum antiSre 4-7762 zwei Banden von ca. 16 und 15 KDa detektieren, die sich durch Zugabe des freien Peptides im Überschuß kompetieren ließen. Dabei handelte es sich wahrscheinlich um das Protein, das von dem Klon *sre 4-c1* kodiert wird und um ein weiteres, das nur wenig kleiner ist, wobei es sich um das Sequenzhomologe (vgl. Kap. 3.3.5.1) handeln könnte. Das wesentlich kleinere Protein, das von *sre 4-c3* (12,5 KDa) kodiert würde, konnte nicht nachgewiesen werden. In den anderen beiden putativen Proteinen ist das Peptid, gegen das der Antikörper gerichtet ist, nicht enthalten.

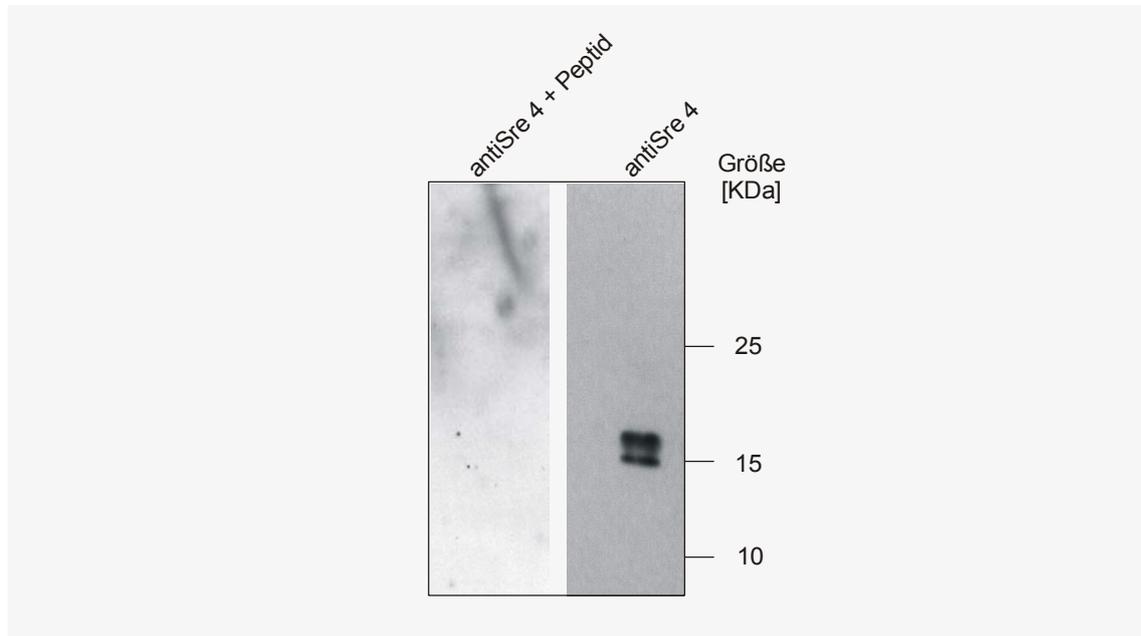


Abb. 3.22: Detektion des Sre 4-Proteins im Western-Blot

Proteinextrakte aus bakterieninfiltrierten Blättern wurden im 15 %igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt, halbtrocken auf PVDF-Membranen transferiert und mit Hilfe des antiSre 4-7762 Serums und dem *chemiluminescence western blotting kit* (mouse/rabbit) (Boehringer) detektiert. Zur Kompetition des Antikörpers (links) wurde dem Serum ein Überschuss des antigenen Peptides zugesetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Dargestellt ist eins von zwei konsistenten Experimenten.

3.7 Überexpression von *sre 2* in Kartoffelpflanzen

3.7.1 Charakteristika des Gens *sre 2*

Das Gen *sre 2* wurde von Catherine Kistner am IPB in einem ähnlichen Ansatz wie dem in dieser Arbeit beschriebenen, identifiziert und charakterisiert (Kistner, 1999). Es handelt sich dabei um ein Gen, dessen Transkripte in bakterieninfiltrierten Kartoffelblättern transient zu 12 bis 36 h akkumulieren und mittels DDRT-PCR nachgewiesen wurden. In Northern-Experimenten konnte eine frühe Aktivierung nach 3 h sowohl in systemischem als auch in lokalem Material gezeigt werden. Das Gen *sre 2* gehört zu einer Multigenfamilie und hat eine sehr komplexe Exon/Intronstruktur, die eine Vielzahl unterschiedlicher mRNAs generieren. Dabei entstehen Transkripte, die für 49 bis 116 Aminosäuren kodierende offene Leseraster enthalten. Eine Detailübersicht über die Genstruktur findet sich im Anhang.

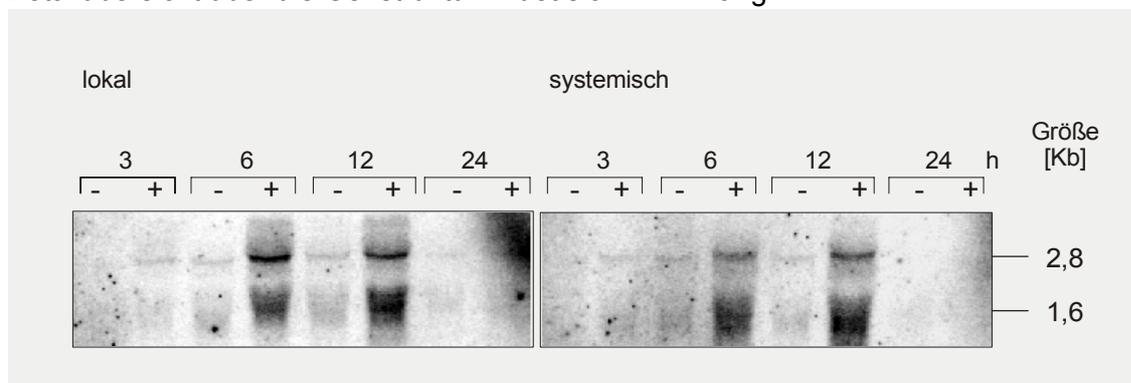


Abb. 3.23: Expressionsverhalten des Gens *sre 2*

Zwei ältere Kartoffelblätter wurden mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (+) bzw. 10 mM MgCl₂ (-) infiltriert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet, RNAs wurden isoliert und in Northern-Experimenten mit der radioaktiv markierten *sre 2R*-cDNA hybridisiert. Es wurden 25 µg Gesamt-RNA eingesetzt; die tatsächlich eingesetzten RNA-Mengen wurden durch Hybridisierung des Blots mit einer 23S-rRNA-Sonde überprüft (rRNA). Die Radioaktivität wurde mittels des Phosphorimagers detektiert. Dieses Experiment wurde von Catherine Kistner durchgeführt.

Ein Weg, die Funktion eines unbekanntes Gens zu charakterisieren, ist, das Gen in *sense*- und *antisense*-Orientierung im ursprünglichen Organismus zu exprimieren. Die Überexpression sollte den eigentlichen Effekt des Gens verstärken, der *antisense*-Ansatz sollte zum Verlust der Funktion führen. Im günstigsten Fall manifestieren sich diese Expressionen in einer Änderung des Phänotyps.

3.7.2 Generierung transgener *sre 2-sense*- und *antisense*-Pflanzen

Für die Transformation von Kartoffelpflanzen wurde ein cDNA-Klon ausgewählt, der sowohl das erste offene Leseraster, das für 49 AS kodiert, als auch das zweite enthält, welches für 86 AS kodiert (*sre 2c31/3-17*). Dieser Klon wurde mit glatten *EcoRV*-Enden in *sense*- und *antisense*-Orientierung in die *Sma* I-Schnittstelle des binären Vektors pBKTX kloniert. Dieser Vektor enthält ein *npt II*-Gen, das die Selektion der transformierten Pflanzen auf Kanamycin erlaubt. Kartoffelfiederblätter wurden mit dem Agrobakterienstamm LBA 4404 inokuliert, in den dieses Konstrukt transformiert worden war. Aus den nach dem Gentransfer entstehenden Kalli wurden 38 *sense*- (*s*) und 27 *antisense*- (*as*) Linien regeneriert, von denen 18 näher charakterisiert wurden.

3.7.3 Analyse der transgenen *sre 2*-Pflanzen

Durch die Regeneration der transformierten Pflanzen auf Selektionsmedium, konnten die tatsächlich transgenen Pflanzen angereichert werden. Zur Überprüfung, ob das Transgen in das Kartoffelgenom integriert wurde, wurden Southern-Experimente durchgeführt.

Tab. 3.6: Übersicht über die *sre 2*-sense und -antisense-Linien

Linie	regenerierte Pflanzen	Pflanzen getestet mittels Northern	Pflanzen getestet mittels Southern	inokulierte Pflanzen getestet im Northern
<i>antisense</i>				
1	1-2	2		
2	1-2	1		
4	1-4		4	
5	1-4	2-4	2-4	2-4
7	1-3	1	1	
9	1-3	3	3	3
21	1-4	1		
<i>sense</i>				
4	1-4	1,2+4	1,2+4	1,4
8	1-2	2	2	2
9	1-2	1,2	2	
10	1	1	1	1
11	1-3		1,2	
15	1-2	2		
16	1-2	2		
18	1-3	1		

Angegeben sind jeweils die Pflanzen einer Linie, die als transgen verifiziert wurden.

3.7.3.1 Southern-Blot Analyse

Da *sre 2* zu einer Multigenfamilie gehört, war es nicht einfach, auf Southern-Blots die zusätzliche Bande des Transgens zu detektieren. Außerdem existiert in Kartoffel ein endogenes Gen, das mit einer Sonde des *npt II*-Gens kreuzhybridisiert und somit die Detektion des Reportergens ebenfalls stört. Für die Southern-Experimente zur Überprüfung des transgenen Status wurde daher mit einer Sonde für den 35 S-Promotor hybridisiert, der ebenfalls auf der T-DNA lokalisiert ist und somit zusammen mit dem Transgen in das Genom integriert werden sollte.

Genomische DNA der putativ transgenen Pflanzen wurde mit der Restriktionsendonuklease *Eco RV* geschnitten und im Southern-Experiment eingesetzt. Wie in Abb. 3.24 deutlich zu erkennen, enthalten alle hier untersuchten Pflanzen die t-DNA. Geschwisterpflanzen, die von demselben Fiederblatt stammten, zeigten ein identisches Restriktionsmuster (as 5-2 und 5-4; s 4-1 und 4-2) und waren somit auf dieselben Insertionsereignisse zurückzuführen. Die meisten Linien enthalten mehr als eine Insertion. Daher wurden im Folgenden immer mehrere transgene Linien untersucht, um Insertionseffekte ausschließen zu können.

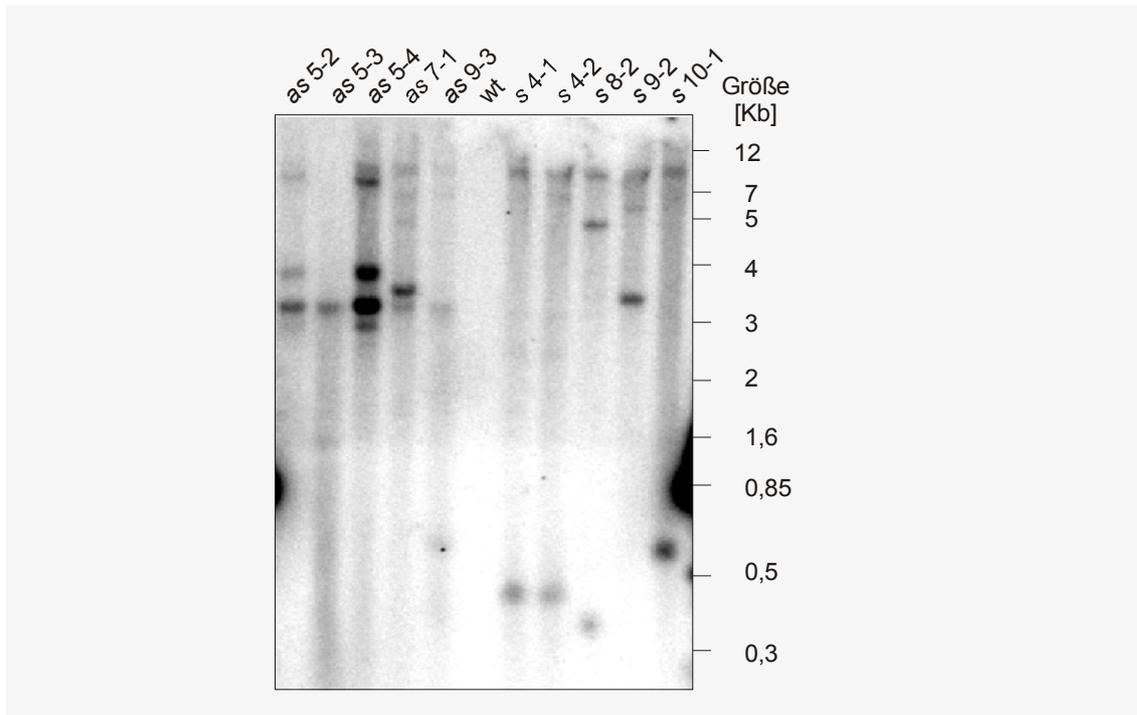


Abb. 3.24: Southern Analyse der transgenen *sre 2*-Linien

Aus Kartoffelblättern von Wildtyppflanzen (wt), *antisense*- (*as*) und *sense*- (*s*) -Linien wurde genomische DNA isoliert, mit der Restriktionsendonuklease *EcoRV* geschnitten und im 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde denaturiert, neutralisiert, geblotet und mit einem radioaktiv markierten 35S-Promotorfragment aus dem Vektor pRT100 hybridisiert. Der Blot wurde anschließend unter stringenten Bedingungen (2x {2xSSC, RT}, 2x {0,2x SSC 65°C}) gewaschen und die Radioaktivität mittels des Phosphorimaggers detektiert.

3.7.3.2 Northern-Blot- und RT-PCR-Analyse

Mit der quantitativen Analyse der Transkriptmengen des überexprimierten Gens konnte im Gegensatz zu dem indirekten Beweis im Southern-Experiment (Kap. 3.9.3.1) ein direkter Beweis für den Transgenstatus geführt werden.

Gesamt-RNA aus Wildtyp- und transgenen Pflanzen wurde in Northern-Experimenten eingesetzt und die Blots mit einer *sre 2R*-Sonde hybridisiert. In unbehandelten Wildtyppflanzen war kein Transkript detektierbar, während in den *antisense*-Pflanzen sowohl ein 0,9 Kb-Transkript als auch eine größere mRNA von ca. 2,8 Kb zu erkennen war. Die 0,9 Kb-Bande entspricht dem Transgen, das in die Pflanzen transformiert wurde. Das größere Transkript muss hier unerklärt bleiben, da diese Bande nicht mit einer *npt II*-Sonde hybridisierte und es sich somit nicht um ein nichtterminiertes Transgenprodukt handelte. Dieses größere Transkript war auch in den *sense*-Pflanzen in gleicher Intensität enthalten. Das Transgen wurde in den untersuchten *sense*-Linien nur schwach exprimiert, akkumulierte aber doch zu deutlich erhöhten Mengen im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle. Die saure Chitinase als Markergen für die SAR zeigte keine Korrelation zur Transgentranskriptmenge und scheint somit unbeeinflusst vom Transgen exprimiert zu werden.

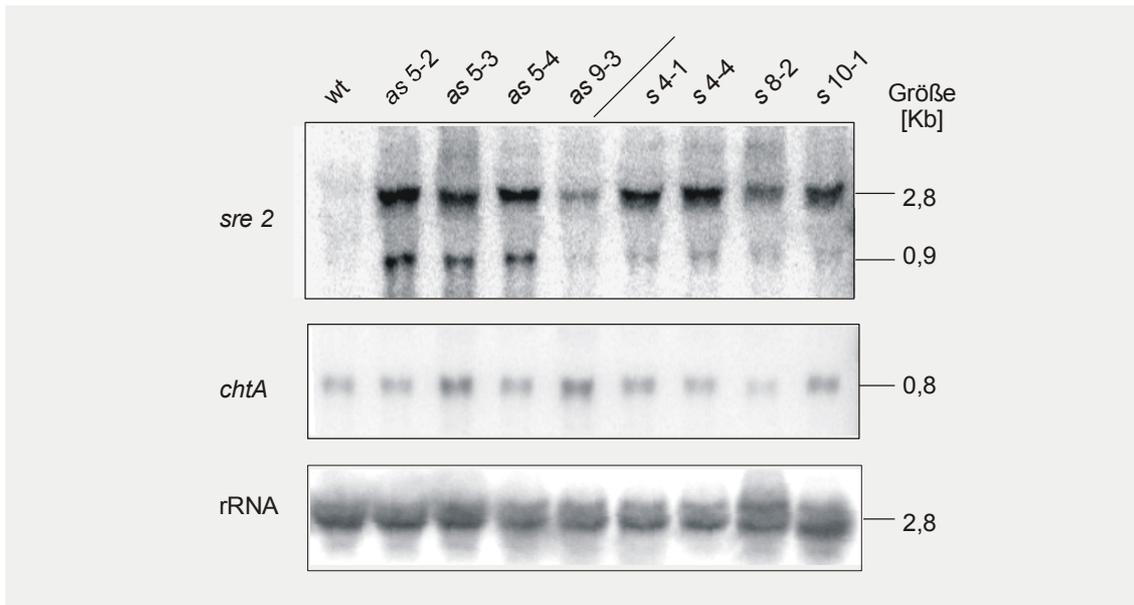


Abb. 3.25: Transkriptanalyse der transgenen *sre 2* sense- und antisense Linien

Unbehandelte Blätter von Wildtyp- (wt), antisense- (as) und sense- (s) Linien wurden geerntet, die RNA isoliert und im Northern-Experiment analysiert. Die Membranen wurden mit der radioaktiv markierten *sre-2R*-cDNA, der sauren Chitinase (*chtA*) und einer 23S rRNA-Sonde hybridisiert. Die Radioaktivität wurde mittels des Phosphorimagers detektiert. Dargestellt ist eins von drei konsistenten Experimenten.

Da mit den Mitteln der Northern-Analyse nicht zwischen endogenen und transgenkodierten Transkripten unterschieden werden kann, wurden RT-PCR-Experimente durchgeführt. Durch die strangspezifische Erststrangsynthese bei der reversen Transkription lassen sich sense- und antisense-Transkripte unterscheiden. Zur Analyse der sense-Linien wurden außerdem zwei unterschiedliche 3'-Primer gewählt, mit denen zwischen endogenen und Gesamt-Transkripten diskriminiert werden kann.

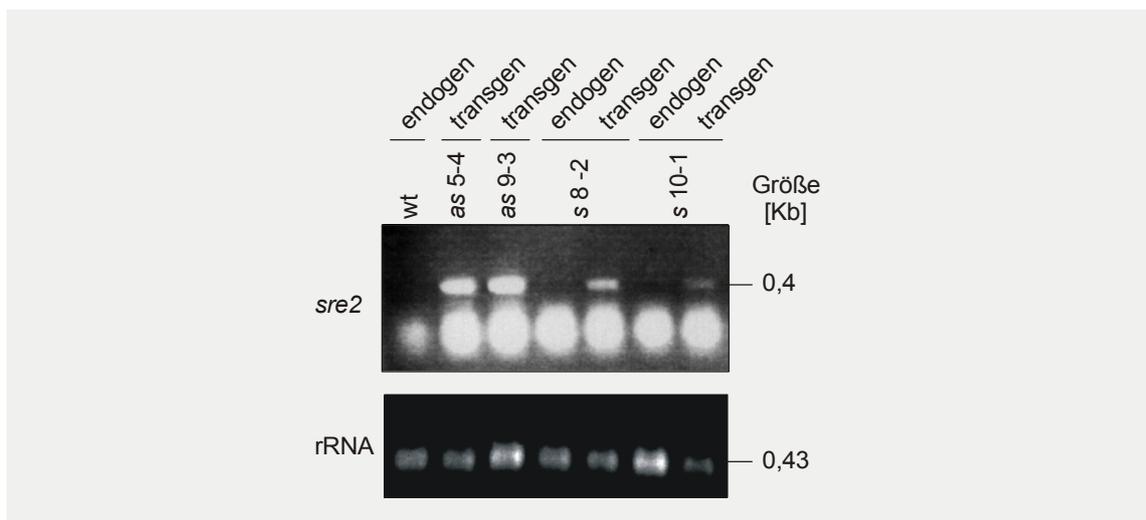


Abb. 3.26: RT-PCR-Analyse der transgenen *sre 2*-Linien

Unbehandelte Blätter von Wildtyp- (wt), antisense- (as) und sense- (s) Linien wurden geerntet, die RNA isoliert und im RT-PCR-Experiment analysiert. Für die antisense-Linien wurden der Primer B8c3-5p für die Erststrangsynthese verwendet, für die endogenen sense Transkripte der Primer B8-NCT und für die Gesamt-sense-Transkripte der Primer B8c3'up. Mit dem antisense 5'-Primer B8c3'up und dem sense 5'-Primer B8c3-5p wurde eine PCR durchgeführt und die Produkte auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Die DNA-Fragmente lassen sich durch Ethidiumbromideinlagerung unter UV-Licht sichtbar machen und mit einem Videoscanner dokumentieren. Die Sequenzen der Primer finden sich im Anhang.

Die RT-PCR zeigte deutlich, dass die beiden analysierten *antisense*-Linien 5-4 und 9-3 das *antisense*-Konstrukt stark exprimierten. Die Expression der *sense*-Konstrukte war schwächer aber dennoch deutlich erhöht im Vergleich zum endogenen *sre 2*-Transkriptniveau.

3.7.4 Analyse der transgenen *sre 2*-Pflanzen nach Bakterieninfiltration

3.7.4.1 Makroskopische Beobachtungen

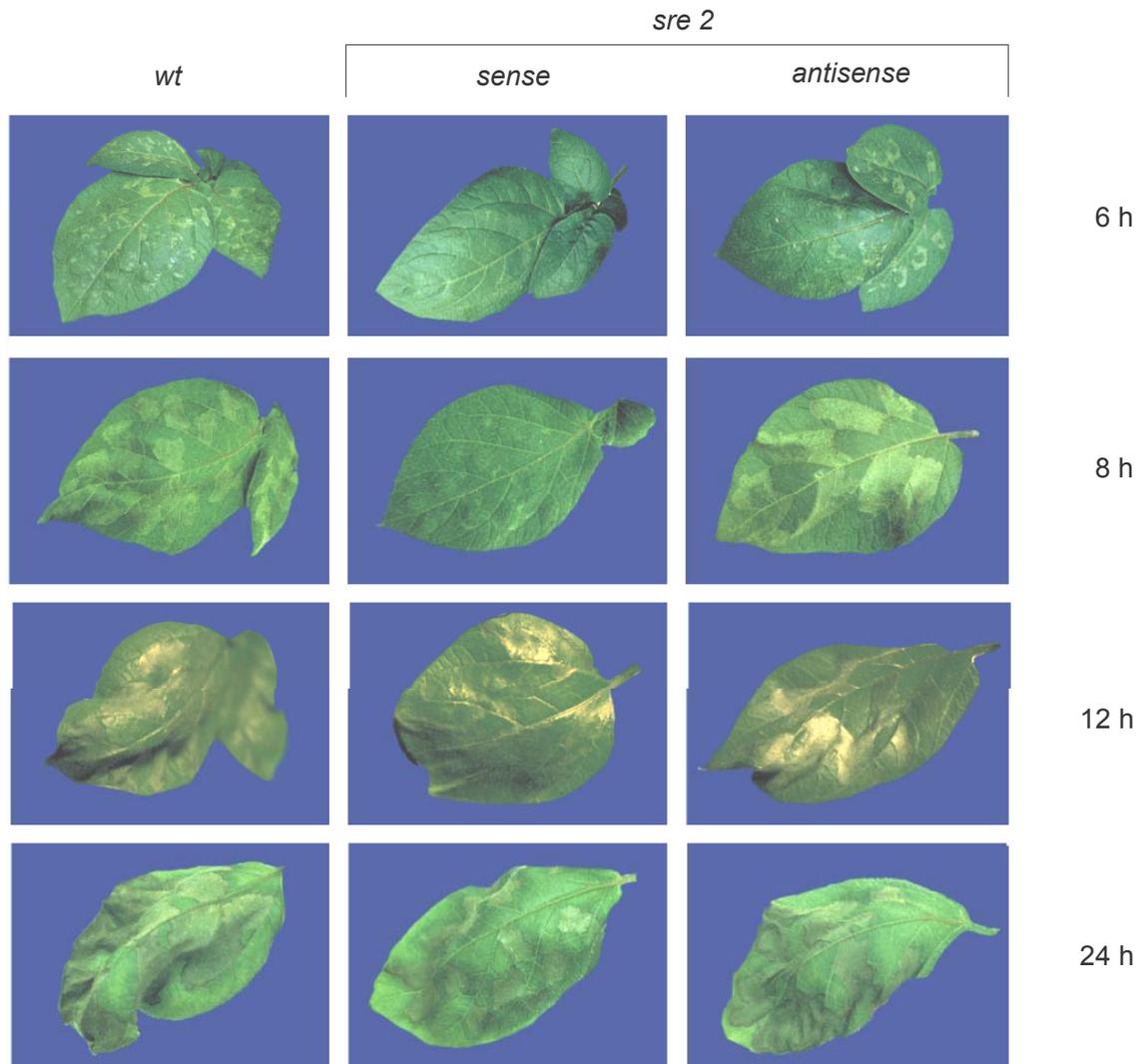


Abb. 3.27: Makroskopische Effekte der Expression von *sre 2-sense* und *-antisense* in Kartoffelpflanzen

Zwei voll entwickelte Kartoffelblätter von Wildtyp- (*wt*), *sre 2-sense*- (*s 10-2*) und *antisense*- (*as 5-4*) Kartoffelpflanzen wurden mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (+) in einer Dichte von $1 \cdot 10^8$ infiltriert und nach 6 bis 24 h fotografiert. Dargestellt ist je ein Blatt einer Wildtyp-, *sense*- und *antisense*-Pflanze. Das Experiment wurde doppelt und mit je 5 bzw. je 2 transgenen Linien durchgeführt.

Nach Inokulation von *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* in Kartoffelblätter kommt es nach 6 bis 8 Stunden zur Ausprägung von Läsionen, die zunächst heller erscheinen und dann bräunliche, zusammengefallene Nekrosen bilden. Es wurden *Pseudomonas*

syringae pv. *maculicola* in Wildtyp-Kartoffeln, sowie in je 5 verschiedene *sense*- (4-1, 4-4, 8-2, 9-2, 10-1) und *antisense*- (4-4, 5-2, 5-4, 7-1, 9-3) *sre* 2-Linien infiltriert und die Nekrosenbildung in den ersten 24 h nach Inokulation beobachtet. In Abb. 3.27 sind der Wildtyp und je 1 *sense*- (10-2) und *antisense*-(5-4) Linie dargestellt. Während die *antisense*-Pflanzen wie der Wildtyp nach 6 bis 8 h Stunden die üblichen Nekrosen ausbildeten, kam es in den *sense-sre* 2-Pflanzen zu einer deutlichen Verzögerung der Reaktion. Bis zu 18 h nach Inokulation konnte diese Verzögerung im Vergleich zum Wildtyp und *antisense*-transgenen Pflanzen beobachtet werden. Nach 24 h hatte sich dieser Effekt jedoch angeglichen und die Nekrosen in den verschiedenen transgenen Linien liessen sich kaum mehr unterscheiden. Ein zweites unabhängiges Experiment mit den Linien *as* 5-4 und 9-3 sowie *s* 8-2 und 10-1 bestätigte die temporäre Veränderung in der Ausprägung des Phänotyps nach Bakterieninfiltration in Kartoffelblättern.

3.7.4.2 Vergleich des Bakterienwachstums in Wildtyp- und transgenen Pflanzen

Der makroskopische Verzögerungseffekt in der Nekrosenbildung nach *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*-Infiltration wurde durch eine Untersuchung des bakteriellen Wachstumsverhaltens *in planta* weiter analysiert. Dazu wurden gering konzentrierte ($1 \cdot 10^5$ cfu/ml) Bakterienlösungen in Kartoffelblätter injiziert und Blattscheiben der infiltrierten Bereiche nach verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Diese Blattscheiben wurden homogenisiert und erneut auf Nährmedium ausplattiert, um die Anzahl der Bakterien in den Pflanzenbereichen zu bestimmen.

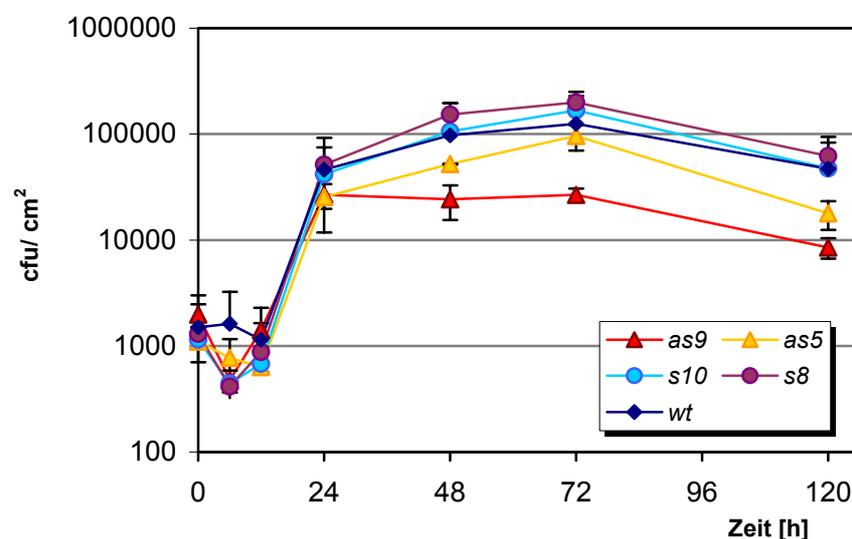


Abb. 3.28: Wachstumsraten von *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* in Wildtyp, *antisense*- und *sense-sre* 2-Linien

Pseudomonas syringae pv. *maculicola* Suspensionen der Zelldichte $1 \cdot 10^5$ cfu/ml wurden in Wildtyp- (wt), *antisense*- (as9, as5) und *sense*- (s10, s8) Kartoffelpflanzen infiltriert. Anschließend wurden nach verschiedenen Zeitpunkten Blattscheiben aus den Inokulationsstellen ausgestochen, in 10 mM MgCl₂ homogenisiert und in verschiedenen Verdünnungen auf Kings B/Rifampicin/Cycloheximid-Platten ausplattiert. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten pro Blattfläche wurde bestimmt und in Relation zur Zeit aufgetragen. Die Abweichungen zwischen Parallelwerten sind als Fehlerbalken dargestellt.

Wie die Abb. 3.28 zeigt, war in den transgenen *sense-sre* 2-Linien ein leicht erhöhtes Bakterienwachstum zu detektieren im Vergleich zu Wildtyp oder *antisense*-Linien. Da dieses Experiment nur einmalig durchgeführt werden konnte, können sichere Aussagen aus den Parallelansätzen nicht geschlossen werden. Die Tendenz, dass das Wachstum in den *antisense*-Linien reprimiert wird, kann jedoch als Hinweis für weitere Untersuchungen genutzt werden.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, Gene aus Kartoffel zu identifizieren, die nach Bakterieninokulation differentiell in systemischem Gewebe akkumulieren. Zu diesem Zweck sollte die Methode der *Differential Display*-RT-PCR (DDRT-PCR) genutzt werden, die in verschiedenen Variationen angewendet wurde, um optimale Resultate zu erzielen.

4.1 DDRT-PCR als Methode zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene

Die Methode der DDRT-PCR wurde von Liang und Pardee (1992) entwickelt und erlaubt die Identifizierung und Klonierung von individuellen, differentiell exprimierten cDNAs aus komplexen cDNA-Pools. Dabei besteht die Möglichkeit, auch sehr gering abundante Transkripte zu erfassen, die bei anderen differentiellen Screeningmethoden ohne (exponentiellen) Amplifikationsschritt wie etwa der subtraktiven Hybridisierung (Rothstein *et al.*, 1993) nicht zu detektieren wären. Ob jedoch in der praktischen Anwendung mit der DDRT-PCR tatsächlich seltene Transkripte detektiert werden, wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Bertioli *et al.*, 1995). Es gibt jedoch einige Beispiele, in denen sehr gering exprimierte Transkripte identifiziert wurden (Liang *et al.*, 1993) und nicht zuletzt gibt es auch Beispiele aus dem Pflanzenreich (Roux *et al.*, 1998). Auch die bereits in unserem Labor identifizierten Gene aus *Solanum tuberosum* *stsr* 1 und *sre* 2 (Wegener, 1996; Kistner, 1999) fallen in die Klasse der seltenen Transkripte, sodass die Methode auch im Falle der Kartoffel geeignet ist, gering abundante Transkripte zu detektieren. Neben der hohen Sensitivität ist die Möglichkeit, mehrere Probenansätze zu vergleichen und dabei reprimierte Gene erfassen zu können, ein großer Vorteil der DDRT-PCR und unterscheidet sie von Methoden, die auf dem Vergleich von cDNA-Bibliotheken beruhen wie etwa RDA (*representative differential analysis*) (Hubank und Schatz, 1994), suppressive, subtraktive Hybridisierungen (SSH) (Diachenko *et al.*, 1996a) oder serielle Analyse der Genexpression (SAGE) (Velculescu *et al.*, 1995). Dieselben Vorteile hat aber auch die Methode des cDNA-AFLPs, das sich von der DDRT-PCR durch einen Restriktionsschritt und die anschließende Ligation von Adaptern unterscheidet (Bachem *et al.*, 1996). Die Möglichkeit, spezifische Primer für die Amplifikation einzusetzen und somit hohe Annealingtemperaturen nutzen zu können, führt zu einer hohen Reproduzierbarkeit der PCR-Ergebnisse. Der unspezifische Amplifikationsschritt bei der DDRT-PCR, bei dem ein ungenaue Basenpaarung willentlich in Kauf genommen wird, um die Anzahl der amplifizierten cDNAs pro PCR-Ansatz zu erhöhen, birgt auch die Möglichkeit der schlechten Reproduzierbarkeit in sich.

Mit oligo-dT geprimte DDRT-PCRs führen zu einer Amplifikation von 3'-Enden, was in Bezug auf die Generierung genspezifischer Sonden von Vorteil, bei der Suche nach sequenzhomologen Genen allerdings von Nachteil sein kann. Dieser Aspekt kann gegebenenfalls durch die Nutzung eines weiteren Zufallsprimers an Stelle des oligo-dT-Primers behoben werden (AP-PCR: arbitrarily primed PCR; (Welsh *et al.*, 1992)) oder aber auch durch die Nutzung einer *long-distance*-PCR, die Fragmente von bis zu

2 Kb Länge amplifizieren kann (Diachenko *et al.*, 1996b; Jurecic *et al.*, 1998). Ein entscheidender Nachteil AT-reicher Primer bei pflanzlichem Ausgangsmaterial liegt in der unspezifischen Amplifikation chloroplastidärer mRNAs, die einen geringeren GC-Gehalt aufweisen als kernkodierte Transkripte. Das größte Problem scheint jedoch die unspezifische Amplifikation der sehr abundanten rRNAs zu sein, die ebenfalls sehr AU-reich sind und selbst in angereicherten poly A⁺-RNA-Populationen noch einen so großen Anteil der RNA ausmachen, dass sie geringer abundante Transkripte überdecken.

Inzwischen sind eine Reihe von Variationen der klassischen DDRT-PCR veröffentlicht worden, die einige dieser Probleme berücksichtigen (Liang *et al.*, 1992; Liang *et al.*, 1993; Liang *et al.*, 1994; Liang und Pardee, 1995; Liang und Pardee, 1997; Liang und Pardee, 1998; Tugores und Belmonte, 1999). So wurden beispielsweise Methoden entwickelt, die optimierte Primer nutzen (Bauer *et al.*, 1993), zwei Zufallsprimer einsetzen, um die Nachteile der Klonierung von 3'-Enden zu umgehen (Chaqour *et al.*, 1999) (Welsh *et al.*, 1992), domänenspezifische Primer verwenden, um die Mitglieder einer Genfamilie klonieren zu können (Chen und Chen, 2000), eine nichtradioaktive Detektion erlauben (Doss, 1996) oder spezifische Primer für prokaryotische Systeme beinhalten (Fislage *et al.*, 1997). So wurde auch in dieser Arbeit zunächst die Methode des *Enhanced Differential Display* (EDDRT-PCR) ausprobiert, die eine höhere Reproduzierbarkeit auf Grund von längeren Primern und somit höheren Annealingtemperaturen verspricht (Linskens *et al.*, 1995).

4.1.1 Erfahrungen im System Kartoffel

4.1.1.1 Enhanced contra klassisches Differential Display

Die Reproduzierbarkeit der EDDRT-PCR war sehr hoch, sodass das Muster der differentiell exprimierten cDNA-Fragmente in unabhängigen Experimenten beinahe zu 100% verifiziert werden konnte. Die Analyse der identifizierten cDNA-Klone machte jedoch einige Probleme offenbar, die die Anwendbarkeit dieser Methode für Pflanzenmaterial unzureichend erscheinen lässt. Zunächst zeigte sich, dass häufig an beiden Enden der cDNA-Fragmente oligo dT-Primer gefunden wurden (vgl. Fragmente I-IV; Tab 3.1). Die Sequenzanalyse ergab einen hohen Anteil an chloroplasten-kodierten und ribosomalen RNAs, die beide einen höheren AU-Gehalt aufweisen als kernkodierte mRNAs. Die überproportional häufige Amplifikation der AU-reichen cDNAs führt zu einer unerwünschten Anzahl falschpositiver EDDRT-PCR-Klone, die auch durch die Anreicherung der mRNAs im Ausgangsmaterial nicht vermieden werden konnten. Wie auch von Ayala *et al.* (1995) beschrieben, korreliert die Länge der oligo dT-Primer mit der Anzahl der AU-reichen falschpositiven Fragmente. Um die hohe Anzahl Falschpositiver zu reduzieren, wurde auf die konventionelle DDRT-PCR (Liang und Pardee, 1992) zurückgegriffen, die mit kurzen Primern durchgeführt wird. Wie bereits erste Experimente zeigten, wurde mit dieser Methode die Anzahl der Klone, die pro ausgeschnittener Bande gefunden wurden, deutlich reduziert.

Insgesamt war die Anzahl der detektierten differentiell exprimierten cDNA-Fragmente relativ gering, was sich mit den Erwartungen deckt, dass in unbehandeltem Gewebe

nur wenige Gene differentiell reguliert werden. Wird derselbe Versuchsansatz mit bakterieninfiltriertem Gewebe durchgeführt, das mehr differentiell exprimierte Gene erwarten lässt, ist auch die Anzahl der detektierten differentiellen Banden weit höher (Kistner, 1999), sodass die Methode der DDRT-PCR zur Identifizierung systemisch responsiver Gene als gut geeignet eingestuft werden kann.

4.1.1.2 Identifizierte Fragmente differentiell exprimierter cDNA

Mit Hilfe der DDRT-PCR konnten in Kartoffel nach SAR-Induktion einige differentiell regulierte cDNA-Fragmente identifiziert werden (vgl. Abb. 3.1 und Tab. 3.3). Um sicherzustellen, dass gefundene Transkripte keine Falschpositiven darstellen, sollten die Ergebnisse in unabhängigen Experimenten verifiziert werden. Dies kann bei der Anzahl der verschiedenen Klone zu einem substantiellen Problem werden, da diese oft gering abundante Transkripte repräsentieren, die nicht in Northern-Blot-Analysen detektierbar sind. Auch kann auf Northern-Blots selbst bei differentieller Expression des Transkripts die Expression konstitutiv erscheinen, da andere Mitglieder einer Genfamilie mit der Sonde kreuzhybridisieren und die differentielle Expression einzelner Mitglieder überdecken können. Desweiteren ist die Analyse einer großen Anzahl von Fragmenten in Northern-Experimenten schlecht handhabbar, weshalb neue Methoden wie die des Reverse Northern (Martin-Laurent *et al.*, 1995) etabliert wurden, bei dem die cDNA-Fragmente mit mehreren markierten cDNA-Pools hybridisiert werden, die die zu vergleichenden Zustände repräsentieren. So kann eine Vielzahl von Fragmenten gleichzeitig auf ihre differentielle Expression untersucht werden. Die Sensitivität und Reproduzierbarkeit dieser Methode hängt jedoch entscheidend von der Quantität der eingebauten radioaktiven Markierung in die cDNA-Pools und der genauen Quantifizierung der cDNA-Fragmente ab (Martin-Laurent *et al.*, 1995). Eine weitere Methode, gering abundante Transkripte nachzuweisen, ist die RT-PCR, die unter Mitführung interner Amplifikationskontrollen auch relative quantitative Aussagen erlaubt und so zur Analyse der differentiellen Expression in Frage kommt.

So konnten beispielsweise die Fragmente X und XIV mit Hilfe der RT-PCR eindeutig als differentiell reguliert nachgewiesen werden, während in systemischem Gewebe auf Northern-Blots keine zu Fragment XIV korrespondierenden Transkripte nachweisbar waren.

4.1.2 Alternativen

Eine der meistdiskutierten Alternativen zur Analyse des Transkriptoms ist die *microarray*-Technologie, mit der eine Vielzahl von cDNAs gleichzeitig auf ihr Expressionsverhalten untersucht werden kann (Duggan *et al.*, 1999). Dennoch birgt auch diese Methode ihre Schwierigkeiten. Zunächst müssen die cDNA-Fragmente zur Verfügung stehen, was bei wenig sequenzierten und bearbeiteten Genomen wie beispielsweise dem der Kartoffel problematisch war. Zum anderen werden, wie schon oben beim Northern-Experiment erwähnt, Mitglieder einer Genfamilie, die unterschiedlich reguliert werden, maskiert, ebenso wie gering abundante Transkripte, die nicht detektiert werden können. Zur Lösung dieses Problems werden heutzutage bevorzugt 3'-untranslatierte Bereiche aus genspezifischen Bereichen für *microarrays*

eingesetzt. Unterschiedliche Spleißvarianten eines Gens können allerdings nicht erfasst werden. Die Sensitivität der *array*-Technik bleibt deutlich hinter PCR-basierenden Methoden zurück, kann jedoch durch die Kombination mit alternativen Markierungsmethoden und Spezifizierungen auf seltene Transkripte verbessert werden, wie etwa durch Markierungen von RAP-PCR-Fragmenten als Sonden (Trenkle *et al.*, 1998).

Die Methode des cDNA-AFLPs vereint alle Vorteile, die die DDRT-PCR aufweist, ebenfalls in sich und bietet außerdem den Vorteil der guten Reproduzierbarkeit auf Grund spezifischer, adaptorabgeleiteter Primer. Es können jedoch nur eine begrenzte Anzahl von Parallelansätzen gleichzeitig bearbeitet werden, sodass eine genomabdeckende Analyse mit erheblich mehr Aufwand verbunden wäre als bei der *microarray*-Technik. Will man jedoch eine Vielzahl verschiedener Zustände eines Systems untersuchen, so ist dies mit cDNA-AFLPs einfacher zu bewerkstelligen als mit *arrays*. Der entscheidende Vorteil für Organismen, deren Genome bislang nicht durchsequenziert sind, ist, dass mit dem cDNA-AFLP neue, bislang unbekannte Transkripte identifiziert werden können.

Je nach Anwendung muß abgewogen werden, welche dieser Methoden die günstigeren Bedingungen liefert (Überblick: Baldwin *et al.*, 1999; Kozian und Kirschbaum, 1999; Harrington *et al.*, 2000; Lockhart und Winzeler, 2000). Für den Fall dieser Arbeit würde heutzutage sicher eher das cDNA-AFLP in Frage kommen als die DDRT-PCR.

4.2 Charakterisierung des Gens *sre 3*

Das mittels DDRT-PCR isolierte cDNA-Fragment XIV= *sre 3* wurde auf seine Expression und genomische Struktur hin untersucht. Dabei war es nicht möglich, cDNA-Sequenzen zu erhalten, die über das DDRT-PCR-Fragment hinausgehen.

Weder das Durchsuchen von cDNA-Banken noch RACE lieferten mehr Informationen über die cDNA-Struktur des Gens *sre 3*. Die Northern-Analysen und die RT-PCR zeigen jedoch eindeutig, dass ein Transkript nach Infiltration von *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* in Kartoffelblätter sowohl in behandeltem als auch in systemischem Gewebe differentiell akkumuliert. Ob die lokal im Northern-Blot detektierte Bande tatsächlich ein *sre 3*-Transkript ist, oder ob es sich um eine Missinterpretation von Kreuzhybridisierungen mit unbekanntem Transkripten handelt, konnte nicht eindeutig bewiesen werden. Die in der RT-PCR als differentiell exprimiert erscheinenden Banden konnten jedoch durch Sequenzierung eindeutig als *sre 3*-Fragmente nachgewiesen werden. Lokal akkumulieren die Transkripte bereits zu frühen Zeitpunkten und dieses differentielle Expressionsmuster bleibt bis mindestens 48 h nach der Infiltration erhalten. Damit zeigt das Gen *sre 3* eine ähnliche Regulation wie *sre 2* oder auch die *pr*-Gene, die nach Pathogeninokulation in verschiedenen Pflanzen wie Tabak, Tomate, Gurke und auch *Arabidopsis* sowohl lokal als auch systemisch akkumulieren (Überblick: Hunt *et al.*, 1996; Ryals *et al.*, 1996; Kombrink und Somssich, 1997; Klessig *et al.*, 2000).

Der Southern-Blot zeigt bei moderat stringenten Waschbedingungen zwei hybridisierende Banden, sodass von einer geringen Kopienzahl im Genom

ausgegangen werden kann. Die Sequenzierung von genomischen Klonen, die nach der Durchsichtung einer käuflich erworbenen genomischen Bank mit dem DDRT-PCR-Fragment *sre 3* isoliert worden waren, ergab eine komplizierte Struktur von invertierten Regionen. Die Sequenzhomologie zwischen den invertierten Bereichen beträgt bis zu 80 %. Zudem waren der 5'- und 3'-Bereich des DDRT-PCR-Fragmentes durch einen ca. 4 Kb großen Sequenzabschnitt getrennt, der möglicherweise ein Intron ist.

Ähnliche invertierte Strukturen wurden letztlich im Zusammenhang mit der endogenen Regulation mittels *antisense*-RNA diskutiert, bei der durch die Expression von *antisense*-RNA und dem beschleunigten Abbau des hybridisierten Doppelstranges die Translatierbarkeit eines Transkriptes über die RNA-Stabilität reguliert wird (Kuwahara *et al.*, 2000).

Die ungewöhnliche genomische Struktur ließ keine Identifizierung von kodierenden Bereichen zu, sodass auch aus der genomischen Sequenz in einem Bereich von 12 Kb kein offenes Leseraster zugeordnet werden konnte. Ohne Zugriff auf das oder die Transkripte, war daher eine weitere Analyse des Gens *sre 3* nicht möglich.

4.3 Charakterisierung des Gens *sre 4*

4.3.1 Aufklärung der Genstruktur von *sre 4*

Für das Gen *sre 4* war es möglich, durch RACE erste zusätzliche Sequenzinformationen zu erhalten, die schon zeigten, dass es verschiedene, zu dem DDRT-PCR-Fragment *sre 4* korrespondierende Transkripte gibt. Da die 5'-RACE zunächst kein Produkt ergeben hatte, wurde für einen weiteren Versuch ein Primer aus einer putativen Exonregion gewählt, der die Amplifikation von zwei verschiedenen 5'-Enden ermöglichte. Daraus ergibt sich das in Abb. 3.6 dargestellte Modell der cDNA-Struktur von *sre 4*, das sowohl die alternative Nutzung von 5'-Spleißstellen als auch das zusätzliche Spleißen einer im 3'-Bereich gelegenen Region beinhaltet und vier Varianten der *sre 4*-Transkripte umfaßt.

Die Tatsache, dass das DDRT-PCR-Fragment in einem differentiell gespleißten Intronbereich lokalisiert ist und in den cDNAs sehr gering abundant ist, ist eine Erklärung für das zuvor erfolglose Durchsuchen der cDNA-Bibliotheken. Die geringe Ähnlichkeit des zweiten Introns zu konservierten Introns und die nur unvollständig erhaltenen Spleißstellen könnten ein Grund für die geringe Abundanz dieser Transkriptvariante sein (McCullough und Schuler, 1997). Ab einem bestimmten GC-Gehalt werden Introns nicht mehr als solche erkannt und werden nur zu einem geringeren Prozentsatz tatsächlich aus dem Primärtranskript herausgeschnitten (Brown *et al.*, 1996), wie es auch für die *sre 4-c3* cDNA beobachtet wurde. Obwohl auf Grund der Datenlage kein eindeutiger Beweis für alternatives Spleißen in *sre 4*-Transkripten geführt werden kann, muß doch davon ausgegangen werden, dass es sich nicht nur um unvollständig prozessierte RNAs handelt. Das Hauptprodukt von *sre 4* – *sre 4-c1* – ist im Vergleich zu dem kürzeren Klon *sre 4-c3* unvollständig gespleißt, kodiert aber für ein Protein (vgl. Kap. 4.3.4). Ob die unterschiedlichen Spleißprodukte, die durch die alternative Wahl der 5'-Spleißstelle im ersten Intron entstehen, Artefakte sind, kann nicht ausgeschlossen werden. Da es sich um zwei

verschiedene Spleißprodukte handelt, ist dies jedoch nicht sehr wahrscheinlich. Dasselbe Phänomen findet sich auch bei sequenzzhomologen Genen zu *sre 4*, dem humanen *hnRNP A1* (*heterogeneous nuclear Ribonucleoproteins*) (Blanchette und Chabot, 1999) und dem Gen des glyzinreichen Proteins RGP-1 aus Tabak (Hirose *et al.*, 1993), bei denen die alternative Nutzung von 5'-Spleißstellen zu einer Änderung der kodierenden Bereiche und zu verkürzten Genprodukten führt, ebenso wie es auch für *sre 4* beobachtet wurde (vgl. Kap. 4.3.3).

Die Southern-Blot-Analyse hat ergeben, dass mindestens zwei Sequenzzhomologe des Gens *sre 4* im Genom enthalten sein müssen. Neben *sre 4* wurde noch ein weiteres Gen aus *Solanum tuberosum* identifiziert [Acc.-Nr.: S54255], das 68 % Ähnlichkeit zu *sre 4* hat. Mit Hilfe der Methode des *genome walking* wurde ausreichend genomische Sequenzinformation erhalten, um eindeutig sagen zu können, dass alle identifizierten Transkriptvarianten auf ein Gen zurückzuführen sind und dass es sich dabei um unterschiedliche Zusammenstellungen von Exon/Intronbereichen handelt (*exon skipping*). Außerdem wurde auch ein grosser Teil der untranslatierten Bereiche kloniert und ca. 1 Kb stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes gelegene Sequenzen (s. Anhang), die den Promotor umfassen sollten (vgl. Kap. 4.4.4).

4.3.2 Sequenzähnlichkeiten zu anderen Genen/Proteinen

Sowohl auf Nukleinsäure- als auch auf Proteinebene finden sich eine Vielzahl von glyzinreichen RNA-bindenden Proteinen (GRPs) aus verschiedensten Spezies als Sequenzzhomologe zu *sre 4/Sre 4* (Überblick: Sachetto-Martins *et al.*; 2000). Der Grad der Übereinstimmung ist sehr hoch (bis zu 80 % Identität auf AS-Ebene), sodass man daraus schließen kann, dass es sich tatsächlich um ein RNA-bindendes Protein handeln kann, das sich aus einer RNA-bindenden und einer glyzinreichen Domäne zusammensetzt (s. Kap. 3.3.5). Glyzinreiche Domänen spielen eine Rolle bei der Protein-Protein-Interaktion in Säugerzellen beispielsweise in der Interaktion von Keratinen und Loricinen sowie RNA-bindenden Proteinen (hnRNPs), die sich zu Proteinkomplexen zusammenschließen und an der Prozessierung, Stabilisierung und dem Transport von RNA beteiligt sind (Steinert *et al.*, 1991). Darüberhinaus weist *Sre 4* eine RNA-bindende Domäne mit zwei konservierten Boxen auf (Kenan *et al.*, 1991), die zusammen mit den G_XGX¹⁷-Wiederholung in der glyzinreichen Domäne gut in die Struktur der Gruppe der bereits bekannten RNA-bindenden GRPs passen (Sachetto-Martins *et al.*, 2000). Alle notwendigen konservierten Elemente für die Funktionalität sind in der cDNA *sre 4-c1* enthalten und ein 3D-Alignment mit einem RNA-Bindungsprotein bekannter Struktur (hnRNP D0) zeigt, dass die Aminosäuresequenz die nötige räumliche Faltung des Proteins und somit eine solche Funktion zulässt. Die RNA-bindenden GRPs wurden als SA-, ABA-, Zellzyklus-, Tagesrhythmus-, Kälte- oder Trockenstress-induzierte Gene identifiziert (Dunn *et al.*, 1996; Horvath und Olson, 1998a; Staiger und Apel, 1999), ein funktioneller Nachweis ist aber noch für keines dieser Gene geführt worden. Nur für etwas entfernter verwandte RNA-bindende Proteine wie die hnRNPs (Expressionsregulation, Rekombination, Spleißen,

¹⁷ G= Glyzin, X= beliebige Aminosäure inklusive Glyzin

Polyadenylierung, mRNA-Transport, Translationsregulation) (Lambermon *et al.*, 2000; Krecic und Swanson, 1999) oder *Sxl 1 (sex lethal*; Geschlechtsdetermination bei *Drosophila*) (Bopp *et al.*, 1996) konnten regulatorische Funktionen gezeigt werden. Durch Anlagerung an DNA und die Interaktion mit einem zweiten Nukleinsäurebindenden Protein können hnRNPs beispielsweise weit entfernte Aktivatorelemente in Promotoren in räumliche Nähe zum Transkriptionsstartpunkt bringen und so die Expression von Genen aktivieren. Oder sie erleichtern durch Aufspießen der doppelsträngigen DNA und Bindung an die einzelsträngigen Bereiche die Bindung von Transkriptionsfaktoren, die an den Gegenstrang binden können (Krecic und Swanson, 1999). Dabei interagieren die RNA-bindenden Domänen als vierfache antiparallele β -Faltblattstruktur mit der einzelsträngigen DNA und die glyzinreichen Domänen dienen der Protein-Protein-Interaktion (vgl. Kap. 3.3.4.2; Nagata *et al.*, 1999). Den ersten identifizierten GRPs aus Pflanzen, die allerdings dem *sre 4* nicht sehr ähnlich sind, wurde eine Rolle als *PR*-Proteine zugeschrieben (Bowles, 1990; Brady *et al.*, 1993) und zwar als zellwandverstärkende Komponenten (van Kan *et al.*, 1988). In jüngerer Zeit wurden auch GRPs auf Gerste und Tabak als pathogenresponsiv beschrieben, die *sre 4* sehr ähnlich sind (Molina *et al.*, 1997; Naqvi *et al.*, 1998)

4.3.3 Die kodierenden Bereiche

Die verschiedenen Transkriptvarianten des Gens *sre 4* kodieren für verschiedene offene Leseraster, die sich in ihren C-Termini unterscheiden. In den cDNAs *sre 4-c2* und *4* wird durch eine Leserasterverschiebung ein Stopkodon eingeführt, sodass nur noch verkürzte Peptide synthetisiert werden können, die keine vollständigen RNA-Bindungsdomänen mehr enthalten. Da die beiden konservierten RNA-Bindungs-Boxen (vgl. Abb. 3.7) essentiell für die RNA-Bindung sind, ist es wahrscheinlich, dass die verkürzten Peptide nicht funktional sind. Auch die Tatsache, dass zu diesen vom Hauptprodukt abweichenden Bereichen keinerlei Sequenzhomologie gefunden wurde, untermauert die Annahme, dass diese Proteine Nebenprodukte des eigentlichen Proteins sind, ebenso wie für das L6 Resistenzgen aus Flax drei Transkriptvarianten beschrieben sind, die keinen Einfluss auf die Resistenzausprägung haben (Ayliffe *et al.*, 1999). Andererseits könnten die verkürzten Isoformen aber auch eine funktionelle Bedeutung haben wie es beispielsweise für das Tabak Resistenzgen N beschrieben wurde, bei denen beide Isoformen für die Resistenz notwendig sind (Dinesh-Kumar und Baker, 2000).

Allgemein kann Stress Einfluß auf die mRNA-Prozessierung haben. So wurde beispielsweise für Hitzeschock (Yost und Lindquist, 1986; Bond, 1988) gezeigt, dass es zu einer vermehrten Akkumulation ungespleißter Transkripte kommt, die darauf zurückzuführen ist, dass der Spleißapparat unter Stressbedingungen nicht effizient arbeitet (Simpson und Filipowicz, 1996). Im Gegensatz zu alternativ gespleißten Transkripten wird in diesen Fällen jedoch beobachtet, dass die Introns gar nicht mehr prozessiert werden.

Unterstellt man in diesem Fall, dass die Nutzung der verschiedenen Spleißstellen und das Herausspleißen des zweiten Introns einem biologischen Zweck dienen, so könnte man einen Regulationsmechanismus annehmen, der die nichtfunktionalen Peptide als

kompetitive Synthesehemmer einsetzt. Dies ist ein Mechanismus wie er für das hnRNP A1 angenommen wird (Blanchette und Chabot, 1999).

Die cDNA *sre 4-c3* weist beide konservierten Boxen der RNA-Bindungsdomäne auf und diese Domäne ist nur um wenige AS verkürzt, dennoch führt die veränderte AS-Zusammensetzung im C-Terminus dazu, dass laut Computervoraussage eine Membranlokalisierung dieses Peptides angenommen werden muss. Auf Grund der hydrophoben Domäne könnte dieses Protein innerhalb der Zelle anders lokalisiert sein, sodass auch hier ein Regulationsmechanismus für die Aktivität von Sre 4 vorliegen könnte. Diese Art der differentiellen Zielsteuerung wurde auch für die lichtinduzierten Transkripte der Hydroxypyruvatreduktase aus Kürbis beschrieben, die in Abhängigkeit von den Lichtverhältnissen durch alternatives Spleißen eine C-terminale Peroxisomen-Targettingsequenz erhalten und somit lichtabhängig entweder in den Peroxisomen oder im Zytosol lokalisiert sind (Mano *et al.*, 1999). Einen weiteren Anhaltspunkt für eine mögliche Funktion an der Plasmamembran liefert ein ebenfalls SAR-induziertes Sequenzhomologes zu *sre 4* aus *Arabidopsis thaliana*, das *grp3s*, das in einer Transkriptomanalyse mittels *microarrays* als differentiell reguliert identifiziert wurde (Maleck *et al.*, 2000). Es handelt sich dabei auch um eine verkürzte Version des Proteins Grp3, das bei einem *two-hybrid*-Screen als Interaktor einer zellwandassoziierten Rezeptorkinase identifiziert wurde (NCBI¹⁸; Acc.-Nr: AAD11798; nicht publiziert).

4.3.4 Analyse der putativen Proteine

Während das Haupttranskript für ein zytosolisches Protein kodiert, wird für die anderen drei eine membranständige (ER-) Lokalisation vorausgesagt. Eine alternative Zielorientierung könnte ebenfalls ein Regulationsmechanismus sein, der die aktiven Proteine dem Wirkort entziehen würde oder unterschiedliche Funktionen unterschiedlichen Zielorten zuordnen könnte. Aufschluss darüber könnte eine Immunlokalisierung der Genprodukte liefern, die basierend auf den Ergebnissen, die die Western-Analyse ergeben haben, sehr vielversprechend erscheinen. Auf Western-Blots können mit dem Peptidantikörper aus Gesamtblattextrakten zwei Banden nachgewiesen werden, die mit dem Peptid kompetierbar sind. Nach den Größen zu urteilen handelt es sich dabei zum einen um das von *sre 4-c1* kodierte Genprodukt, während das zweite Produkt wahrscheinlich von dem Sequenzhomologen *SGRP-1* kodiert wird. Das Genprodukt von *sre 4-c3* ist mit errechneten 13 kDa nicht detektierbar. Das könnte bedeuten, dass das Haupttranskript für das potentiell aktive und tatsächlich gebildete Protein kodiert und die verkürzten Varianten nicht gebildet werden oder instabil sind. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auf Grund der geringen Transkriptmengen von *sre 4-c3* zu wenig Protein gebildet wird, um auf Western-Blots detektierbar zu sein. Die beide anderen Transkriptvarianten sind mit

¹⁸ http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=Protein&list_uids=4206767&dopt=GenPept

diesem Antikörper nicht nachweisbar, da das Peptid in ihrer abgeleiteten Aminosäuresequenz nicht enthalten ist.

Ausgangspunkt für die weitere Analyse des Proteins Sre 4-p1 war die heterologe Expression in Bakterien in N-terminaler Fusion mit 10 Histidinresten. Mit Hilfe von antiHis 6-Antikörpern konnte in Bakterienlysaten eine einzelne Proteinbande detektiert werden. Dieses Expressionssystem kann nun für die Aufreinigung des Proteins genutzt werden, die eine Proteinanalyse und die Antikörperherstellung gegen das Gesamtprotein erlauben würde.

4.4 Regulation der Genexpression von *sre 4*

4.4.1 Änderungen der *sre 4*-Transkriptmengen nach Bakterieninfiltration

Das Gen *sre 4* wird nach Infiltration von Kartoffelblättern mit dem nichtpathogenen Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* sowohl in lokalem als auch in systemischem Gewebe bereits nach 6 h differentiell exprimiert und akkumuliert bis zu einer vierfach erhöhten Transkriptmenge im Vergleich zur Pufferkontrolle (vgl. Abb. 3.13). Dieses Expressionsmuster ist sehr ähnlich zu bereits beschriebenen *pr*-Genen wie beispielsweise der früh exprimierten β -1,3-Glukanase aus Tabak (Jelitto-Van Dooren *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu wird die saure Chitinase, die in Kartoffel als Markerenzym für die SAR-Ausprägung benutzt wird, erst zu relativ späten Zeitpunkten (24 hpi) in systemischem Gewebe aktiviert (Kombrink *et al.*, 1995; Büchter *et al.*, 1997). Für diese hydrolytischen Enzyme wurde eine direkte antimikrobielle Wirkung nachgewiesen (Überblick: Lamb *et al.*, 1992; Sela-Buurlage *et al.*, 1993; Benhamou *et al.*, 1993; Nakajima *et al.*, 1997) und darüberhinaus führt ihre hydrolytische Aktivität zu Zellwandbruchstücken, die als Elicitoren die Pathogenabwehr verstärken können (Ryan und Farmer, 1991). Die gleichzeitige Genaktivierung in behandeltem wie unbehandeltem Gewebe läßt auf ein sehr schnelles systemisches Signal schließen, das möglicherweise nicht über den Phloemstrom, wie es für Salizylat gezeigt wurde (Draper *et al.*, 1999) oder für NO-Derivate angenommen wird (Durner und Klessig, 1999), sondern als gasförmige Substanz (Ethylen, Methyljasmonat oder Methylsalizylat; Ozawa *et al.*, 2000; van Wees *et al.*, 2000; Leon *et al.*, 2001) oder über elektrische Signaltransduktionswege transportiert werden könnte (Herde *et al.*, 1999). Die schnelle systemische Akkumulation von *sre 4* unterscheidet sich von der klassischen Abwehrgene und kann als Hinweis gedeutet werden, dass *sre 4* zu einem früheren Zeitpunkt in die Regulationsprozesse eingreifen könnte, die zur SAR-Ausprägung führen.

Auch Sequenzhomologe des *sre 4* zeigen eine pathogenresponsive Expression. So wurde ein elicitorinduziertes GRP aus Tabak (Brady *et al.*, 1993), verschiedene pathogeninduzierte GRPs aus Gerste (Molina *et al.*, 1997) und virusinduzierte GRPs aus *Arabidopsis* identifiziert (van Kan *et al.*, 1988; Geri *et al.*, 1999). Das untersuchte Sequenzhomologe *grp8* aus *Arabidopsis* zeigte keine Genaktivierung nach Applikation von virulenten und nichtvirulenten Bakterien, aber für *grp3s* konnte eine leichte Pathogeninduzierbarkeit und SA-Responsivität gezeigt werden (Maleck *et al.*, 2000).

4.4.2 Änderungen der *sre 4*-Transkriptmengen nach Verwundung

Das Gen *sre 4* wird auch nach mechanischer Verwundung stärker exprimiert und akkumuliert auf mRNA-Ebene nach 18 bis 24 h deutlich. Viele pathogeninduzierte Gene werden auch durch Verwundung induziert, was auf eine Beteiligung an der allgemeinen Stressantwort hindeutet und durch verschiedenste Stimuli ebenfalls hervorgerufen werden kann (Brederode *et al.*, 1991; Leon *et al.*, 2001). So werden beispielsweise eine Vielzahl von *pr*-Genen nach Verwundung induziert, wie eine *microarray*-Analyse in *Arabidopsis* ergeben hat. Auch ein GRP-Homologes wurde auf diesen *arrays* als wundinduzierbar identifiziert (Reymond *et al.*, 2000). Lipoxygenasen (Lox) zählen ebenfalls zu den wundinduzierbaren Genen und spielen durch ihre zentrale Position im Oxylinstoffwechsel eine Rolle bei der Jasmonatbiosynthese, in der Wund- und Pathogenantwort (Rosahl, 1996; Göbel *et al.*, 2001). Ihre signifikante Beteiligung an der Pathogenabwehr konnte 1998 von Rance *et al.* belegt werden, die zeigen konnten, dass die Expression von *antisense*-Lox eine inkompatible Tabak/*Phytophthora*-Interaktion in eine kompatible überführen kann. Es gibt also eine Schnittmenge an Genen, die sowohl durch Pathogeninteraktion als auch durch Verwundung aktivierbar sind, wie auch eine *microarray*-Analyse mit *Cladosporium* infizierten Tomaten belegt, bei der eine Reihe von pathogeninduzierbaren Genen gefunden wurde, die auch durch andere Stresstimuli aktiviert werden können unter ihnen eine 13-Lipoxygenase und ein N-Resistenzgenhomologes (Durrant *et al.*, 2000). Es konnte umgekehrt auch gezeigt werden, dass Verwundung zu einer systemischen Aktivierung von Genen führt, die die Resistenz von Reis gegenüber dem Pathogen *Magnaporthe grisea* erhöht (Schweizer *et al.*, 1998).

4.4.3 Änderungen der *sre 4*-Transkriptmengen durch Umwelteinflüsse

Zunächst wurden für lokale und systemische Resistenz ausschließlich Signalwege identifiziert, die SA-abhängig reguliert werden (Delaney *et al.*, 1994; Cao *et al.*, 1997), doch bald wurden auch Jasmonat und Ethylen als Regulatoren nachgewiesen (Penninckx *et al.*, 1998; Pieterse *et al.*, 1998; Thomma *et al.*; 1998, Clarke *et al.*; 1998). Da aber immer nur einzelne Gene betrachtet werden konnten, wurde das Ausmaß der Interaktion zwischen diesen Wegen erst durch die konzertierte Analyse von vielen Genen gleichzeitig offensichtlich. In einer *microarray*-Analyse wurden die Expressionsprofile von über 2000 Genen nach Applikation der verschiedenen Signalmoleküle untersucht und es resultierte eine große Zahl von Genen, die von zwei oder mehr Stimuli aktiviert werden konnten (Schenk *et al.*, 2000)

Um Hinweise zu erhalten, welche Signaltransduktionswege an der Regulation von *sre 4* beteiligt sein könnten, wurden die drei erwähnten Signalmoleküle und Abszissinsäure auf ihre induzierende Wirkung hin getestet. Außerdem wurden abiotische Umweltfaktoren getestet wie Kälte, Trockenheit, Veränderungen des osmotischen Umfeldes durch Zucker oder Sorbitol sowie der Einfluss der circadianen Rhythmik.

Salizylat induziert *sre 4* in geringen Konzentrationen und mit ähnlichem zeitlichen Verlauf wie *pr 1a* in Kartoffel, wenn auch die Intensität der Aktivierung etwas schwächer ist (Abb. 3.18). Obwohl Kartoffel einen sehr hohen endogenen

Salizylatgehalt aufweist, konnte doch gezeigt werden, dass nach Bakterieninfiltration die Konzentrationen lokal ansteigen (Astrid Hunger, IPB Halle, unveröffentlichte Daten) und somit möglicherweise die Änderungen der Salizylatkonzentration und nicht ihr absolutes Niveau Signalcharakter haben. Die Expression von *sre 4* ist außerdem schwach wundresponsiv (Abb. 3.17) und wird nicht durch (Methyl-) Jasmonat oder Ethylen induziert, wobei detaillierte Versuche zur Ethyleninduzierbarkeit nötig wären, um eine exakte Aussage treffen zu können (vgl. Kap. 3.5.5).

Abszisinsäure aktiviert viele der bekannten Sequenzhomologen von *sre 4* und wird außerdem als Induktor für Lipidtransferproteine beschrieben, für die eine antimikrobielle Wirkung gezeigt werden konnte (Molina und Garcia-Olmedo, 1997) und die als mögliche Signalmoleküle für die SAR-Signaltransduktion diskutiert werden (Metraux, 2001). Auch *sre 4* akkumuliert nach Behandlung mit ABA stärker, was möglicherweise mit der Aktivierung nach Verwundung, osmotischem Stress und Kältereiz (Abb. 3.19, 3.17, 3.20) in Zusammenhang steht, da die ABA-Konzentrationen in Pflanzen durch diese Faktoren erhöht werden.

Osmotischer Stress hervorgerufen durch Zucker oder Sorbitol führt ebenfalls zu einer Erhöhung der endogenen ABA- und JA-Mengen und zu einer Aktivierung von Genen zu denen auch *pr*-Gene zählen (Zhu *et al.*, 1995). MAP-Kinasen wie die SIPK aus Tabak, die an der Pathogenantwort beteiligt ist, wurden in osmoregulierten Signaltransduktionswegen identifiziert (Droillard *et al.*, 2000) ebenso wie das Schlüsselenzym der Ethylenbiosynthese, die ACC-Synthase. Das legt eine Beteiligung des Phytohormons Ethylen an der Osmoregulation nahe (Felix *et al.*, 2000). Dabei muss zwischen rein osmotischen Effekten und metabolischen Effekten der Zuckerlösungen unterschieden werden. Saccharoselösungen führen nach 12 h zu einer starken Akkumulation der *sre 4*-Transkripte, die auch nach Bakterieninfiltration verstärkt akkumulieren. Sorbitollösungen führen schon nach 6 h zu einer starken Transkriptakkumulation, nach 12 h ist zudem noch ein weiteres Transkript von 2 Kb Größe detektierbar. Die Aktivierung des Gens *sre 4* scheint somit durch die Änderung des osmotischen Milieus hervorgerufen zu werden.

Viele glyzinreiche RNA-bindende Proteine werden durch Kältebehandlung aktiviert und könnten zu einer erhöhten Kältetoleranz beitragen (Dunn *et al.*, 1996; Horvath und Olson, 1998b). Auch *sre 4* wird durch Reduktion der Anzuchttemperatur auf 15°C stark aktiviert. Dehydrine aus Kartoffel und Gerste, die nach Pilzinfektionen akkumulieren, zeigen ein Expressionsmuster, das sowohl nach Kälte, osmotischem Stress und ABA-Konzentrationssteigerungen als auch durch Trockenheit induziert erscheint (Zhu *et al.*, 2000). Trockenheit führt im Falle des Gens *sre 4* jedoch zu einer Reduktion der Transkripte unter das Kontrollniveau wie es auch für das RNA-bindende Protein PgRNP aus Fichte beschrieben wurde (Richard *et al.*, 1999). Aber der Kältereiz könnte über die Erhöhung der endogenen ABA-Gehalte zur Aktivierung von *sre 4* führen, da ABA eine zentrale Rolle in der Kälteakklimatisierung spielt (Tamminen *et al.*, 2001)

Viele der bekannten *grp*-Gene werden circadian reguliert wie etwa *ccr 1* und *2* (*cell cycle and circadian regulated*) aus *Arabidopsis* (Carpenter *et al.*, 1994). Licht spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von *grps* aus verschiedenen Spezies

(Memelink *et al.*, 1990; Heintzen *et al.*, 1994; Molina *et al.*, 1997; Naqvi *et al.*, 1998). Die Promotoranalyse eines dieser lichtresponsiven Gene ergab, dass Sequenzhomologien zu einem *cis*-aktivierenden Element aus dem Promotor der kleinen RUBISCO-Untereinheit bestehen (van Kan *et al.*, 1988). Für das GRP 7 aus *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, dass es in einer *feed-back*-Schleife autoregulatorisch die circadiane Rhythmik aufrechterhält und außerdem Einfluss auf die tagesrhythmische Expression von Grp 8 ausübt. Es ist jedoch nicht der zentrale Zeitgeber (*master oscillator*), sondern leitet nur die Zeitgebersignale an eine Untergruppe von Genen weiter (*slave oscillator*) (Heintzen *et al.*, 1997). Die Transkriptmengen von *sre 4* nehmen in der Dunkelphase deutlich ab und akkumulieren in der beginnenden Lichtphase erneut. Diese Expressionsschwankungen bewegen sich allerdings in einem sehr viel schwächeren Rahmen als die Akkumulation nach Bakterieninfiltration. Um die circadiane Rhythmik unabhängig von den Lichtverhältnissen eindeutig verifizieren zu können, müssten Dauerlicht bzw. Dauerdunkelexperimente durchgeführt werden, sodass hier eine Differenzierung von licht- und tagesrhythmischen Einflüssen unterbleiben muss.

4.4.4 Analyse der Promotorregion

Die Analyse der stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes gelegenen Sequenzen erfolgte mit unterschiedlichen *online*-Sequenzanalyseprogrammen und stellt nur eine Vorhersage der möglichen Regulationsmechanismen und keine funktionelle Analyse dar.

4.4.4.1 Standardpromotorelemente

Neben dem putativen Transkriptionsstartpunkt wurde 29 Nukleotide stromaufwärts eine TATA-Box gefunden, die mit der Sequenz TATAAA 100 % der Konsensussequenz entspricht. Die exakte Lokalisation im 5'-UTR und die starke Konservierung der Sequenz zeigen, dass es sich bei dieser Region um den Promotorbereich eines Gens handelt. Das Vorhandensein der TATA-Box und das Fehlen einer CAAT-Box, wie sie oftmals in der Position -50 bis -100 gefunden wird, deutet an, dass es sich nicht um ein Gen handelt, das konstitutiv stark exprimiert wird, sondern eher um ein durch Umweltfaktoren reguliertes (Goodrich *et al.*, 1996). Darauf deuten auch verschiedene konservierte *cis*-Elemente hin, die in anderen Promotoren als regulatorische Elemente identifiziert wurden.

4.4.4.2 Putative regulatorische Elemente im 5'-Bereich von *sre 4*

Da mittels Northern-Blot-Analyse nur eine Momentaufnahme der Transkriptmengen betrachtet werden kann, konnte bislang kein direkter Beweis für eine transkriptionelle Aktivierung der *sre 4* Transkripte geführt werden. Deshalb ist die Analyse der putativen regulatorischen Elemente im Promotorbereich sehr interessant, da sie zusammen mit den Expressionsdaten Hinweise auf Regulationsmöglichkeiten geben und ein deutlicheres Bild der Genregulation liefern kann.

Bei der Analyse der Promotorsequenz bis ca. 500 bp stromaufwärts des putativen Transkriptionsstartpunktes fiel die große Anzahl von sogenannten GATA-Elementen auf, für die eine Bedeutung bei der lichtabhängigen Genregulation beschrieben ist (Gilmartin *et al.*, 1990). Es wurde ihnen jedoch auch eine Rolle bei der stickstoffregulierten Expression nachgewiesen und in diesem Zusammenhang sind sie an der Expressionsregulation des Avirulenzgens *avr 9* aus *Cladosporium fulvum* in der Interaktion mit Tomate beteiligt (Snoeijsers *et al.*, 1999). Auf Grund der Vielfältigkeit der Regulationsmöglichkeiten kann aus einem Element allein keine Aussage dazu getroffen werden, wie ein Gen reguliert wird. Neben den GATA-Elementen sind noch weitere lichtabhängige *cis*-regulatorische Elemente (LREs) bekannt wie die G-Box und das GT-1 Element (Lam und Chua, 1990), die oft synergistisch wirken (Chattopadhyay *et al.*, 1998). Im *sre 4*-Promotor befindet sich neben den GATA- auch ein GT-1-Element, das die Hypothese erhärtet, dass Licht eine Rolle bei seiner Expressionsregulation spielen könnte. Betrachtet man die Expression von *sre 4* im Tagesverlauf, so wird deutlich, dass entweder Tagesrhythmus oder Licht/Dunkelwechsel einen Einfluss auf die *sre 4*-Transkriptmengen haben. Diese beiden Faktoren sind eng miteinander verknüpft, da die Lichtverhältnisse immer auch einen Einfluss auf die circadiane Rhythmik haben (Millar *et al.*, 1995). Es ist bekannt, dass lichtabhängige Promotorelemente an der Ausprägung der circadianen Rhythmik beteiligt sind (Millar und Kay, 1996), wie etwa die oben erwähnten GATA-Elemente (Donald und Cashmore, 1990). Darüberhinaus gibt es im *sre 4*-Promotor aber zusätzlich noch ein *circadian core*-Element, das als Auslöser der circadianen Regulation des *lhc*-Gens der Tomate identifiziert wurde (Piechulla *et al.*, 1998). Es gibt somit eine Reihe von Anhaltspunkten dafür, dass *sre 4* licht- bzw. tageszeitabhängig transkriptionell reguliert sein könnte, was mit der tatsächlichen Expressionsänderung im Tagesverlauf korreliert.

Das oben erwähnte GT-1 Element wird nicht nur im Zusammenhang mit der Lichtresponsivität von Genen beschrieben, sondern scheint auch an der SA-abhängigen Expression von *pr 1a* beteiligt zu sein (Buchel *et al.*, 1999). Interessant ist, dass weitere SA-abhängige Elemente, die sogenannten W-Boxen ebenfalls im *sre 4*-Promotor enthalten sind. Auch die Expressionsanalyse des *sre 4* nach Salizylatbehandlung unterstreicht, dass es möglicherweise in diese Gruppe von Genen einzuordnen ist. Die W-Boxen sind Promotorelemente, an die elicitorinduzierte Transkriptionsfaktoren vom WRKY-Typ binden können (Rushton *et al.*, 1996; Eulgem *et al.*, 1999). Dieser Mechanismus wurde in Petersilienzellkulturen entdeckt, doch kürzlich konnte auch aus Kartoffel ein WRKY-Protein isoliert werden, das nach *Erwinia*- und *Phytophthora*-Infektionen stark akkumuliert (Dellagi *et al.*, 2000). Die WRKY-Proteine sind an der transkriptionellen Induktion von SA- und Pathogen-induzierten Genen beteiligt und selbst durch diese Stimuli aktivierbar, wie auch Beispiele aus Tabak zeigen (Yang *et al.*, 1999; Chen und Chen, 2000). Es gibt drei verschiedene Typen von W-Boxen (W 1-3), von denen nur die W 1 und 3 im *sre 4*-Promotor enthalten sind. Es konnte gezeigt werden, dass spezifische Kombinationen der verschiedenen W-Boxen die elicitorinduzierte Aktivierung von PR-1 aus Petersilie vermitteln können (Rushton und Somssich, 1998).

Nicht nur die lokale Reaktion der Pflanzen auf Salizylat, Elicitoren oder Pathogene sondern auch die systemische Antwort scheint über W-Boxen reguliert zu werden. In einer Transkriptomanalyse konnte eine ganze Gruppe von Genen identifiziert werden, die nach SAR-Induktion aktiviert wurden und alle W-Boxen als gemeinsame Promotorelemente teilen (Maleck *et al.*, 2000). Das konsistente Auftreten dieser Boxen in SAR-regulierten Genen legt nahe, dass sie eine Rolle bei der SAR-Regulation spielen (Rowland und Jones, 2001) und macht die Tatsache, dass sie auch im *sre 4*-Promotor enthalten sind, interessant in der Diskussion um eine mögliche Rolle von *sre 4* bei der SAR-Ausprägung.

Außer der Salizylsäure spielen auch Phytohormone wie Abszissinsäure, Jasmonate und Ethylen eine Rolle bei der Regulation der Genexpression und für alle wurden Promotorelemente beschrieben, die diese Regulation vermitteln (JA, MEJA (Rouster *et al.*, 1997) JA, Elicitoren (Menke *et al.*, 1999) Ethylen (Ohme-Takagi *et al.*, 2000)). Im Promotor von *sre 4* finden sich jedoch weder Ethylen- noch (Methyl-)Jasmonat-responsive Elemente, nur zwei konservierte Boxen, die eine ABA-abhängige Regulation vermitteln könnten. ABA hat eine induzierende Wirkung auf die Transkriptmengen von *sre 4*, die möglicherweise über die beiden Boxen, E-Box (Stalberg *et al.*, 1996) und myb-Erkennungsstelle (Luscher und Eisenman, 1990), vermittelt wird. Für die myb-Erkennungssequenz, an die beispielsweise der AtMYB2-Transkriptionsfaktor binden kann, wurde darüberhinaus eine Beteiligung an der Trockenstressreaktion in Pflanzen beschrieben (Urao *et al.*, 1993).

Nicht zuletzt sollten die zuckerresponsiven Elemente (SURE) und die amy-Boxen 1 und 2 erwähnt werden, die im Amylase-Promotor aus Reis nachgewiesen wurden und in die Regulation Zucker-responsiver Gene involviert sind (Hwang *et al.*, 1998). Ein möglicher Zusammenhang zwischen pathogeninduzierten und zuckerabhängig regulierten Genen wird klar, wenn man betrachtet, dass sich Pathogene von der Pflanze ernähren, die infizierten Gewebe in *sink*-Gewebe transformieren und lokal Zucker akkumulieren lassen. Auch konnte in Tabak eine SA-unabhängige *pr*-Genaktivierung – PR-Q (Payne *et al.*, 1990) und PAR-1 (Herbers *et al.*, 1995) - durch Zuckerlösungen (Saccharose, Fruktose und Glukose) hervorgerufen werden, die sich auf *source*-Gewebe beschränkte. Die vergleichende Untersuchung von Pathogen- und Zuckerreaktionen an *Chenopodium rubrum*-Kulturen zeigte, dass elicitor- und *sink*-abhängig regulierte Gene koordinativ reguliert wurden, was mit dem erhöhten Energiebedarf der Pflanzen für die Pathogenabwehr in Zusammenhang stehen könnte (Roitsch, 1999).

Neben diesen aktivierenden Elementen findet sich auch eine dem Suppressor der Chalconsynthase aus Bohnen ähnliche Sequenz im *sre 4*-Promotor. Diese SBF-1 Bindungsstelle wirkt als Sensor für Umweltfaktoren und beeinflusst die gewebespezifische Expression der Chalconsynthase (Hotter *et al.*, 1995), einem Flavonoidstoffwechsellenzym, dass an der Bildung von antimikrobiellen Phytoalexinen beteiligt ist (Ebel *et al.*, 1984).

4.4.5 Mögliche Funktionen von Sre 4 in der SAR-Ausprägung

Sre 4 scheint zu einer Gruppe von Proteinen zu gehören, die in fast allen Spezies bekannt und in ähnlicher Weise reguliert sind. Sie bestehen aus einer N-terminalen RNA-Bindungsdomäne sowie einem glyzinreichen C-Terminus und *in vitro* kann eine Bindungsaffinität zu RNA und einzelsträngiger DNA nachgewiesen werden (Sachetto-Martins *et al.*, 2000). Sequenzhomologe zu Sre 4 wie das GRP aus *Sinapis alba* (Heintzen *et al.*, 1994) und RZ-1 aus Tabak (Hanano *et al.*, 1996) konnten im Nukleus nachgewiesen werden, was die Hypothese unterstützt, dass es sich um genregulatorische Proteine handelt. Ebenso könnten sie aber auch an der RNA-Prozessierung, Reifung oder ihrem Transport beteiligt sein. Die Übereinstimmung in einer Vielzahl von Stimuli, die zu einer Aktivierung der *grps* führt, wie Pathogene, SA, ABA, osmotischer Stress, Verwundung, Kälte und circadiane Rhythmik reflektiert ihre Beteiligung an der Modulation der verschiedenen Signaltransduktionswege, die durch diese Stimuli aktiviert werden (Sachetto-Martins *et al.*, 2000). Sre 4 fügt sich mit seinen Charakteristika bezüglich der Struktur wie der Expression sehr gut in diese Gruppe von RNA-bindenden Proteinen ein. Mit seiner Korrelation zur systemischen Resistenz, die sich auch in einem sequenzhomologen Gen aus *Arabidopsis* (*grp3s*) bestätigt (Maleck *et al.*, 2000), wäre eine solche regulatorische Funktion durchaus denkbar. Ohne die noch ausstehenden Nachweise der RNA-Bindungsaffinität und der subzellulären Lokalisation, kann diese Funktion allerdings nur eine Hypothese sein.

Weitere Versuche müssen zeigen, ob die drei anderen putativen Proteinvarianten tatsächlich gebildet werden und wo sie lokalisiert sind. Unter den bereits beschriebenen *grps* sind eine Reihe von unterschiedlichen Lokalisationen beschrieben. Auch wurde für ein GRP aus *Brassica* alternatives Spleißen gezeigt, dass in der Expression von Proteinen mit unterschiedlichen Molekulargewichten resultierte (Ruiter *et al.*, 1997). Aber es ist auch schon für eine Anzahl von Genen das Auftreten von ungespleißten Introns und daraus resultierend der vorzeitige Abbruch der Translation beschrieben worden, was als Regulationsmechanismus für das Proteinniveau der aktiven Variante interpretiert wurde (Hirose *et al.*, 1993; Carpenter *et al.*, 1994; Heintzen *et al.*, 1994). Ob die verschiedenen Genprodukte unterschiedliche Funktionen oder Lokalisationen haben, muss hier Spekulation bleiben.

4.5 Analyse der Überexpression von *sre 2* in Kartoffeln

Zur funktionellen Analyse des von Kistner (1999) identifizierten, differentiell nach Bakterieninfiltration regulierten Gens *sre 2* wurde eine der kodierten cDNAs, die sowohl das erste offene Leseraster mit 49 AS als auch das zweite offene Leseraster mit 86 AS enthält, unter der Kontrolle eines 35S-Promotors in *sense*- und *antisense*-Orientierung in Kartoffeln transformiert. Diese cDNA wurde ausgewählt, da sie i) differentiell exprimiert wird und ii) beide möglichen ORFs enthält. Da bislang keine Aussage darüber getroffen werden konnte, welches offene Leseraster ein funktionales Peptid kodiert, wurde eine cDNA ausgewählt, die beide ORFs enthält.

Das Gen *sre 2* kodiert für eine Vielzahl von Transkripten, die transient differentiell nach *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*-Infiltration akkumulieren ebenso wie nach Verwundung, aber durch keines der Phytohormone Salizylat, Abszisisäure, (Methyl-)

Jasmonat oder Ethylen aktivierbar sind. Die sehr frühe Induktion nach SAR-Induktion und das transiente Expressionsmuster, sowie die ungewöhnliche Genstruktur lassen eine Beteiligung an der Regulation der SAR vermuten. Mit der Überexpression bzw. der Unterdrückung der Expression in transgenen Pflanzen sollte untersucht werden, ob *sre 2* an der Resistenzausprägung beteiligt sein könnte.

4.5.1 Makroskopische Effekte nach Bakterieninokulation

Die *sre-2* transgenen Kartoffellinien wurde mittels Northern-Blot- und RT-PCR-Analysen auf die Expression der Transgene überprüft und die überexprimierenden Linien as 5-4, as 9-3, s 8-2 und s 10-1 wurden mit nichtpathogenen *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* infiltriert. Makroskopisch zeigte sich in den *sense*-Linien eine Verzögerung der Nekrosenbildung, die erst 24 h nach der Bakterieninfiltration ein dem Wildtyp vergleichbares Ausmaß erreichte. Diese Veränderung kann auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein. Zum einen könnte das Wachstum der Bakterien beeinflusst durch die Überexpression von *sre 2* inhibiert werden, was dazu führt, dass sie langsamer wachsen und die Pflanzen somit langsamer Nekrosen ausbilden. Zum anderen könnte es sein, dass die Reaktionen der Pflanze auf die Bakterien beeinträchtigt sind und deshalb die Nekrosenbildung verlangsamt ist. Das sollte zu einer erhöhten Wachstumsrate der Bakterien *in planta* führen.

Die *antisense*-Linien sollten prinzipiell den gegenteiligen Effekt zeigen. Wird das Bakterienwachstum durch *sre 2* inhibiert, so sollten sie in *antisense*-Pflanzen ein erhöhtes Wachstum zeigen, ist jedoch die Reaktion der Pflanze auf die Bakterien betroffen, so sollten die *antisense*-Pflanzen stärker reagieren und zu einer Reduktion der Bakteriendichte führen. Die *antisense*-Linien 5-4 und 9-3 zeigen nach *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*-Infiltration makroskopisch Reaktionen, die sich nicht signifikant vom Wildtyp unterscheiden.

Da die Expression nur auf Transkriptebene überprüft werden konnte, kann nicht ausgeschlossen werden, dass in den *sense*-Linien kein aktives Protein gebildet wird und dass in den *antisense*-Linien nicht noch Restaktivität enthalten ist. Die Ergebnisse können somit nur mit Vorsicht interpretiert werden.

4.5.2 Einfluss der Expression von *sre 2* auf das Bakterienwachstum *in planta*

Um zu testen, welche der beiden Einflußmöglichkeiten *sre 2* auf die Nekrosenbildung ausübt, wurde eine Kinetik des Bakterienwachstums aufgezeichnet. Es zeigte sich, dass die *sense*-Linien übereinstimmend ein erhöhtes Bakterienwachstum zeigten im Vergleich zu *antisense*-Linien. Zwischen der as 9-3- und der s 8-2-Linie konnte ein Unterschied von einem Faktor 10 detektiert werden. Im Wildtyp ist die Wachstumsrate etwas geringer als in *sense*-Linien, aber stärker als in *antisense*-Linien. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Expression von *sre 2* Einfluss auf die Wachstumsbedingungen der Bakterien in der Pflanze hat. Weitere Wachstumskinetiken sind nötig, um die Signifikanz der Ergebnisse abzusichern.

4.5.3 Mögliche Funktionen von *sre 2* in der SAR-Ausprägung

Da *sre 2* möglicherweise über die Modulation der Pflanzenreaktion auf Bakterien wirkt, könnte es sich um einen negativen Regulator der Pflanzenabwehrreaktionen handeln. Die Überexpression von humanem Lysozym in Tabak bewirkt wie die *sre 2*-Überexpression keine dauerhafte Reduktion der Krankheitssymptome sondern eine Verzögerung ihrer Ausprägung um einen Tag. Dennoch zeigen diese transgenen Pflanzen zunächst eine deutlich erhöhte Resistenz gegenüber dem Pathogen *Erysiphe chicoracearum* (Nakajima *et al.*, 1997). Die zeitliche Entwicklung einer Abwehrreaktion scheint für ihre Effizienz entscheidend zu sein (Nürnberg und Nennstiel, 1998) und auch im Falle der *sre 2*-transgenen Pflanzen lässt sich ein temporaler Effekt beobachten, der den Bakterien die Möglichkeit gibt, stärker zu wachsen, während die Pflanzenabwehrreaktionen reduziert sind.

Im Zusammenhang mit der frühen transkriptionellen Aktivierung von *sre 2* nach Bakterieninfiltration könnte es sich um ein bakterieninduziertes Gen handeln, das den angreifenden Mikroorganismen einen Vorteil verschafft, oder um ein regulatorisches Gen, das an der Modulation der Pathogenantwort beteiligt ist. In den überexprimierenden Pflanzen würde dies dann zu einer zu starken Inhibition der Pflanzenabwehrreaktionen führen. Solche negativen Regulatoren der SAR wurden bereits identifiziert wie etwa das SNI1, das als Suppressor des positiven Regulators NPR1 identifiziert wurde und ein kernlokalisiertes Protein ist (Li *et al.*, 1999). Ebenso konnte für SSI1 eine Funktion als negativer Regulator von salizylatabhängigen Prozessen in der Pathogenantwort gezeigt werden, wobei unklar ist, ob SSI1 direkt oder indirekt auf diese Prozesse wirkt (Greenberg, 2000). Nicht zuletzt wurde das Gerstenresistenzgen *mlo* identifiziert, dass rezessiv zur Ausprägung von Resistenz in Gerste gegen Mehltau führt. Der dominante Wildtyp-Locus *Mlo* kodiert also ebenfalls für einen negativen Regulator der Pflanzenabwehr (Büschges *et al.*, 1997). Die Funktion dieser Regulatoren liegt wahrscheinlich in der Begrenzung energieaufwendiger und zerstörerischer Prozesse der Pathogenabwehr.

Ob *sre 2* tatsächlich eine solche Rolle bei der Regulation der SAR in Kartoffel spielt, müssen weitere Experimente zeigen, die den beobachteten Phänotyp belegen. Besonders interessant wäre, ob die Expression von *sre 2* zu einem veränderten Resistenzphänotyp gegenüber dem virulenten Oomyceten *Phytophthora infestans* führt, was ein funktioneller Nachweis für die Beteiligung von *sre 2* an der induzierbaren Pathogenabwehr wäre.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, Gene zu identifizieren, deren Expression durch die Induktion von systemisch erworbener Resistenz (SAR) in Kartoffelblättern zu frühen Zeitpunkten systemisch reguliert wird. Dazu wurden Kartoffelblätter mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* infiziert und diese und die darüberliegenden Blätter analysiert. Mit der Methode des *Enhanced* bzw. des klassischen *Differential Display* (DDRT-PCR) war es möglich, einige cDNA-Fragmente zu isolieren, die differentiell exprimiert werden, wobei die klassische Methode geeigneter erschien als die Modifikation. Zwei cDNA-Fragmente, *sre 3* und *sre 4* (*systemisch responsiv*), wurden weiterbearbeitet. Die Expression von *sre 3* wird zu frühen Zeitpunkten nach Bakterieninfiltration aktiviert und dauert bis mindestens 48 h an. In systemischem Gewebe wurde eine geringere aber ebenfalls differentiell regulierte Transkriptakkumulation mit Hilfe der RT-PCR festgestellt. Das DDRT-PCR-Fragment *sre 3* hybridisiert mit einer 2,8 Kb-Bande im Northern Blot und mit je zwei Restriktionsfragmenten im Southern Experiment, sodass man von einem Gen mit geringer Kopienzahl im Genom ausgehen kann. Eine Klonierung längerer cDNAs blieb ohne Erfolg und die Analyse des genomischen Bereiches ergab ein ungewöhnlich komplexes Muster an invertierten Wiederholungen, die weder eine kodierende Region noch einen Promotor erkennen ließen.

Das Gen *sre 4* ist bereits 6 h nach der Bakterieninfiltration sowohl lokal als auch systemisch stärker exprimiert und bleibt bis mindestens 48 h auf einem hohen Expressionsniveau. Außerdem wird die Expression von *sre 4* durch die Signalsubstanzen Salizylat und Abszissinsäure, durch Verwundung, osmotischen Stress und Kältereize, sowie tagesverlaufsabhängig aktiviert. In Blüten ist es stärker exprimiert als in alten Blättern und Knollen und dort stärker als in der Sproßachse und in Wurzeln. In sehr jungen Blättern sind keine *sre 4*-Transkripte detektierbar. Die genomische Sequenz des Gens sowie etwa 1 Kb in 5'-Richtung konnten mit Hilfe des *genome walking* isoliert und sequenziert werden. In Übereinstimmung mit der tatsächlich gefundenen Expression enthält der Promotorbereich verschiedene konservierte Boxen, die unter anderem Licht-, Abszissinsäure-, Salizylat-, Trockenstress- und Zucker-abhängige sowie circadiane Genregulation vermitteln können. Außerdem enthält der Promotorbereich zwei sogenannte W-Boxen, die in die Pathogen- und Elicitorresponsivität von Genen involviert sind und als gemeinsames Motiv systemisch aktivierter Gene identifiziert wurden.

Das Gen *sre 4* kodiert für ein Transkript, das durch alternative Nutzung von 5'-Spleißstellen und differentielles Spleißen eines zweiten Introns insgesamt 4 mRNAs hervorbringt. Das Hauptprodukt kodiert für ein 166 AS großes Protein, das starke Sequenzhomologien zu glyzinreichen RNA-bindenden Proteinen zeigt, deren Funktion noch nicht aufgeklärt werden konnte. Die putative Lokalisation im Kern und die berechnete 3D-Struktur, die verifizierten RNA-bindenden Domänen stark gleicht, legen die Vermutung nahe, dass *sre 4* an genregulatorischen Prozessen beteiligt sein könnte.

Die immunologische Analyse von Blattmaterial hat ergeben, dass mit einem Antiserum gegen ein internes Peptid zwei Proteine detektiert werden können, wobei es sich möglicherweise um das *sre 4*-Hauptprodukt Sre-p1 sowie um ein sequenzhomologes Protein aus Kartoffel handeln könnte. Die anderen drei Transkripte kodieren für kürzere Proteine, die die oben genannten Domänen z. T. nicht enthalten, weshalb fraglich ist, ob es sich um funktionelle Proteine handeln kann.

Zur Funktionsanalyse des von Catherine Kistner identifizierten Gens *sre 2*, das schnell und transient nach Bakterieninfiltration akkumuliert, wurde eine der identifizierten cDNAs unter der Kontrolle eines konstitutiv stark exprimierenden Promotors in *sense*- und *antisense*-Orientierung exprimiert. Der transgene Status sowie die Expression des Transgens wurde in den transformierten Pflanzen analysiert und eine Auswahl von Linien wurde in Inokulationsexperimenten untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Nekrosenbildung nach Bakterieninfiltration in *sense*-Linien deutlich verzögert war, während *antisense*-Linien einen Wildtyp-ähnlichen Phänotyp zeigten. Das bakterielle Wachstum war in *sense*-Linien höher als in Wildtyp-Pflanzen und in *antisense*-transgenen Linien, was einen Hinweis darauf gibt, dass es sich bei dem Genprodukt von *sre 2* um einen negativen Regulator der Pflanzenabwehr handeln könnte.

6 Literatur

- Abad, M.S., Hakimi, S.M., Kaniewski, W.K., Rommens, C.M., Shulaev, V., Lam, E., Shah, D.M.** (1997). Characterization of acquired resistance in lesion-mimic transgenic potato expressing bacterio-opsin. *Mol Plant Microbe Interact* **10**: 635-45.
- Allen, R.E., Masak, K.C., McAllister, P.K.** (1980). Staining protein in isoelectric focusing gels with fast green. *Anal Biochem* **104**: 494-98.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-402.
- Alvarez, M.E., Pennell, R.I., Meijer, P.J., Ishikawa, A., Dixon, R.A., Lamb, C.** (1998). Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* **92**: 773-84.
- Alvarez, M.E.** (2000). Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol Biol* **44**: 429-42.
- Ayala, M., Balint, R.F., Fernandez-de-Cossio, L., Canaan-Haden, J.W.** (1995). New primer strategy improves precision of differential display. *Biotechniques* **18**: 844-50.
- Ayliffe, M.A., Frost, D.V., Finnegan, E.J., Lawrence, G.J., Anderson, P.A., Ellis, J.G.** (1999). Analysis of alternative transcripts of the flax L6 rust resistance gene. *Plant J* **17**: 287-92.
- Bachem, C.W., van der Hoeven, R.S., de Bruijn, S.M., Vreugdenhil, D., Zabeau, M., Visser, R.G.** (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**: 745-53.
- Baldwin, D., Crane, V., 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.
- Bauer, D., Muller, H., Reich, J., Riedel, H., Ahrenkiel, V., Warthoe, P., Strauss, M.** (1993). Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acids Res* **21**: 4272-80.
- Baureithel, K., Felix, G., Boller, T.** (1994). Specific, high affinity binding of chitin fragments to tomato cells and membranes. Competitive inhibition of binding by derivatives of chitooligosaccharides and a Nod factor of *Rhizobium*. *J Biol Chem* **269**: 17931-38.
- Beerhues, L., Kombrink, E.** (1994). Primary structure and expression of mRNAs encoding basic chitinase and 1,3-beta-glucanase in potato. *Plant Mol Biol* **24**: 353-67.
- Beffa, R., Szell, M., Meuwly, P., Pay, A., Vogeli-Lange, R., Metraux, J.P., Neuhaus, G., Meins, F., Nagy, F.** (1995). Cholera toxin elevates pathogen resistance and induces pathogenesis-related gene expression in tobacco. *EMBO J* **14**: 5753-61.
- Benhamou, N., Broglie, K., Broglie, R., Chet, I.** (1993). Antifungal effect of bean endochitinase on *Rhizoctonia solani*: ultrastructural changes and cytochemical aspects of chitin breakdown. *Can J Microbiol* **39**: 318-28.
- Bertioli, D.J., Schlichter, U.H., Adams, M.J., Burrows, P.R., Steinbiss, H.H., Antoniw, J.F.** (1995). An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNAs. *Nucleic Acids Res* **23**: 4520-3.
- Birnboom, H.C., Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-23.
- Blanchette, M., Chabot, B.** (1999). Modulation of exon skipping by high-affinity hnRNP A1-binding sites and by intron elements that repress splice site utilization. *EMBO J* **18**: 1939-52.
- Blume, B., Nürnberger, T., Nass, N., Scheel, D.** (2000). Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell* **12**: 1425-40.

- Bonas, U., Van den Ackerveken, G.** (1999). Gene-for-gene interactions: bacterial avirulence proteins specify plant disease resistance. *Curr Opin Microbiol* **2**: 94-98.
- Bond, U.** (1988). Heat shock but not other stress inducers leads to the disruption of a sub-set of snRNPs and inhibition of in vitro splicing in HeLa cells. *EMBO J* **7**: 3509-18.
- Bopp, D., Calhoun, G., Horabin, J.I., Samuels, M., Schedl, P.** (1996). Sex-specific control of Sex-lethal is a conserved mechanism for sex determination in the genus *Drosophila*. *Development* **122**: 971-82.
- Bostock, R.M., Kuc, J., Laine, R.A.** (1981). Eicosapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpenes in the potato. *Science* **212**: 67-69.
- Bostock, R.M., Laine, R.A., Kuc, J.A.** (1982). Factors affecting the elicitation of sesquiterpenoid phytoalexin accumulation by eicosapentaenoic and arachidonic acid in potato. *Plant Physiol* **70**: 1417-24.
- Bostock, R.M., Laine, R.A., Kuc, J.** (1992). Rapid stimulation of 5-lipoxygenase activity in potato by the fungal elicitor arachidonic acid. *Plant Physiol* **100**: 1448-56.
- Bowles, D.J.** (1990). Defense-related proteins in higher plants. *Annu Rev Biochem* **59**: 873-907.
- Bowling, S.A., Clarke, J.D., Liu, Y., Klessig, D.F., Dong, X.** (1997). The cpr5 mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *Plant Cell* **9**: 1573-84.
- Brady, K.P., Darvill, A.G., Albersheim, P.** (1993). Activation of a tobacco glycine-rich protein gene by a fungal glucan preparation. *Plant J* **4**: 517-24.
- Brederode, F.T., Linthorst, H.J., Bol, J.F.** (1991). Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethephon treatment, UV light and wounding. *Plant Mol Biol* **17**: 1117-25.
- Brown, J.W., Smith, P., Simpson, C.G.** (1996). *Arabidopsis* consensus intron sequences. *Plant Mol Biol* **32**: 531-35.
- Bryan, G.T., Wu, K.S., Farrall, L., Jia, Y., Hershey, H.P., McAdams, S.A., Faulk, K.N., Donaldson, G.K., Tarchini, R., Valent, B.** (2000). tA single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene Pi-ta. *Plant Cell* **12**: 2033-46.
- Buchel, A.S., Brederode, F.T., Bol, J.F., Linthorst, H.J.** (1999). Mutation of GT-1 binding sites in the Pr-1A promoter influences the level of inducible gene expression in vivo. *Plant Mol Biol* **40**: 387-96.
- Büchter, R., Stromberg, A., Schmelzer, E., Kombrink, E.** (1997). Primary structure and expression of acidic (class II) chitinase in potato. *Plant Mol Biol* **35**: 749-61.
- Büsches, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G., Wolter, M., Frijters, A., van Daelen, R., van der Lee, T., Diergaarde, P., Groenendijk, J., Topsch, S., Vos, P., Salamini, F., Schulze-Lefert, P.** (1997). The barley Mlo gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* **88**: 695-705.
- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J.D., Volko, S., Dong, X.** (1997). The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* **88**: 57-63.
- Carpenter, C.D., Kreps, J.A., Simon, A.E.** (1994). Genes encoding glycine-rich *Arabidopsis thaliana* proteins with RNA-binding motifs are influenced by cold treatment and an endogenous circadian rhythm. *Plant Physiol* **104**: 1015-25.
- Chang, C., Shockey, J.A.** (1999). The ethylene-response pathway: signal perception to gene regulation. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 352-58.
- Chaqour, B., Howard, P.S., Macarak, E.J.** (1999). Identification of stretch-responsive genes in pulmonary artery smooth muscle cells by a two arbitrary primer-based mRNA differential display approach. *Mol Cell Biochem* **197**: 87-96.

- Chattopadhyay, S., Ang, L.H., Puente, P., Deng, X.W., Wei, N.** (1998). Arabidopsis bZIP protein HY5 directly interacts with light-responsive promoters in mediating light control of gene expression. *Plant Cell* **10**: 673-83.
- Chen, C., Chen, Z.** (2000). Isolation and characterization of two pathogen- and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco. *Plant Mol Biol* **42**: 387-96.
- Chen, Z., Silva, H., Klessig, D.F.** (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* **262**: 1883-6.
- Chester, K.S.** (1933). The problem of acquired physiological immunity in plants. *Q. Rev. Biol.* **8**: 275-324.
- Clarke, J.D., Liu, Y., Klessig, D.F., Dong, X.** (1998). Uncoupling PR gene expression from NPR1 and bacterial resistance: characterization of the dominant Arabidopsis cpr6-1 mutant. *Plant Cell* **10**: 557-69.
- Clos, J., Brandau, S.** (1994). pJC20 and pJC40 - Two high copy-number vectors for T7 RNA-polymerase-dependent expression of recombinant genes in *E. coli*. *Prot Expr & Purific* **5**: 133-37.
- Cohen, Y., Gisi, U., Möisinger, E.** (1991). Systemic resistance of potato plants against *Phytophthora infestans* induced by unsaturated fatty acids. *Physiol Mol Plant Pathol* **88**: 255-63.
- Cohen, Y., Gisi, U., Niderman, T.** (1993). Local and systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and jasmonic acid methyl ester. *Phytopathology* **83**: 1054-62.
- Cohn, J., Sessa, G., Martin, G.B.** (2001). Innate immunity in plants. *Curr Opin Immunol* **13**: 55-62.
- Coquoz, J.L., Buchala, A., Metraux, J.P.** (1998). The biosynthesis of salicylic acid in potato plants. *Plant Physiol* **117**: 1095-101.
- Cornelis, G.R.** (1998). The Yersinia deadly kiss. *J Bacteriol* **180**: 5495-504.
- Cosio, E.G., Frey, T., Ebel, J.** (1992). Identification of a high-affinity binding protein for a hepta-beta-glucoside phytoalexin elicitor in soybean. *Eur J Biochem* **204**: 1115-23.
- Dangl, J.L., Dietrich, R.A., Richberg, M.H.** (1996). Death don't have no merci: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* **8**: 1793-807.
- de Wit, P.J., Lauge, R., Honee, G., Joosten, M.H., Vossen, P., Kooman-Gersmann, M., Vogelsang, R., Vervoort, J.J.** (1997). Molecular and biochemical basis of the interaction between tomato and its fungal pathogen *Cladosporium fulvum*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **71**: 137-41.
- Debener, T., Lehnackers, H., Arnold, M., 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.
- Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L.B., Weymann, K.B., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E., Ryals, J.** (1994). A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* **266**: 1247-50.
- Dellagi, A., Helibronn, J., Avrova, A.O., Montesano, M., Palva, E.T., Stewart, H.E., Toth, I.K., Cooke, D.E., Lyon, G.D., Birch, P.R.** (2000). A potato gene encoding a WRKY-like transcription factor is induced in interactions with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Phytophthora infestans* and is coregulated with class I endochitinase expression. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 1092-101.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A., Lamb, C.** (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**: 585-88.
- Dempsey, D.A., Shah, J., Klessig, D.F.** (1999). Salicylic acid and disease resistance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **18**: 547-75.

- Despres, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E., Fobert, P.R.** (2000). The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell* **12**: 279-90.
- Diachenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D., Siebert, P.D.** (1996a). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 6025-30.
- Diachenko, L.B., Ledesma, J., Chenchik, A.A., Siebert, P.D.** (1996b). Combining the technique of RNA fingerprinting and differential display to obtain differentially expressed mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* **219**: 824-28.
- Dinesh-Kumar, S.P., Baker, B.J.** (2000). Alternatively spliced N resistance gene transcripts: Their possible role in tobacco mosaic virus resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 1908-13.
- Doke, N., Ramirez, A.V., 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**: 232-39.
- Donald, R.G., Cashmore, A.R.** (1990). Mutation of either G box or I box sequences profoundly affects expression from the *Arabidopsis* rbcS-1A promoter. *EMBO J* **9**: 1717-26.
- Doss, R.P.** (1996). Differential display without radioactivity--a modified procedure. *Biotechniques* **21**: 408-10 und 12.
- Draper, J., Luis, M., Darby, R., Maddison, A., Higgins, U.** (1999). The SAR signal and SAR state in tobacco. The Thirteenth John Innes Symposium: Attack & Defense in Plant Disease, Norwich.
- Droillard, M.J., Thibivilliers, S., Cazale, A.C., Barbier-Brygoo, H., Lauriere, C.** (2000). Protein kinases induced by osmotic stresses and elicitor molecules in tobacco cell suspensions: two crossroad MAP kinases and one osmoregulation-specific protein kinase. *FEBS Lett* **474**: 217-22.
- Duggan, D.J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P., Trent, J.M.** (1999). Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* **21**: 10-14.
- Dunn, M.A., Brown, K., Lightowers, R., Hughes, M.A.** (1996). A low-temperature-responsive gene from barley encodes a protein with single-stranded nucleic acid-binding activity which is phosphorylated in vitro. *Plant Mol Biol* **30**: 947-59.
- Durner, J., Klessig, D.F.** (1999). Nitric oxide as a signal in plants. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 369-74.
- Durrant, W.E., Rowland, O., Piedras, P., Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.** (2000). cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *Plant Cell* **12**: 963-77.
- Ebel, J., Schmidt, W.E., Loyal, R.** (1984). Phytoalexin synthesis in soybean cells: elicitor induction of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs and correlation with phytoalexin accumulation. *Arch Biochem Biophys* **232**: 240-48.
- Ebel, J., Scheel, D.** (1992). Elicitor recognition and signal transduction. Genes involved in plant defense. T. Boller und F. Meins. Wien, New York, Springer Verlag: 183-205.
- Ebel, J., Scheel, D.** (1997). Signals in host-parasite interactions. The Mycota; Vol V, Plant Relationships, Part A. G. C. Carroll, Tudzynski, P. Berlin, Springer Verlag: 85-105.
- Ebel, J.** (1998). Oligoglucoside elicitor-mediated activation of plant defense. *Bioessays* **20**: 569-76.
- Ellis, J.G., Lawrence, G.J., Luck, J.E., Dodds, P.N.** (1999). Identification of regions in alleles of the flax rust resistance gene L that determine differences in gene-for-gene specificity. *Plant Cell* **11**: 495-506.
- Elstner, E.F., Oßwald, W., Schneider, I.** (1996). *Phytopathologie: Allgemeine und Biochemische Grundlagen*. Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum, Akademischer Verlag.

- Epple, P., Apel, K., Bohlmann, H.** (1995). An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol* **109**: 813-20.
- Erwin, D.C., Robeiro, O.K.** (1996). *Phytophthora Disease Worldwide*. St. Paul, Minnesota, APS Press.
- Eulgem, T., Rushton, P.J., Schmelzer, E., Hahlbrock, K., I.E., S.** (1999). Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *EMBO J* **18**: 4689-99.
- Feinberg, A.P., Vogelstein, B.** (1984). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **137**: 266-67.
- Felix, G., Regenass, M., Boller, T.** (2000). Sensing of osmotic pressure changes in tomato cells. *Plant Physiol* **124**: 1169-80.
- Feys, B.J., Parker, J.E.** (2000). Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends Genet* **16**: 449-55.
- Fislage, R., Berceanu, M., Humboldt, Y., Wendt, M., Oberender, H.** (1997). Primer design for a prokaryotic differential display RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **25**: 1830-35.
- Flor, H.H.** (1955). Host-parasite interactions in flax rust - its genetics and other implications. *Phytopathology* **45**: 680-85.
- Fry, W.E., Goodwin, S.B.** (1997). Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States. *Plant Dis* **81**: 1349-57.
- Geri, C., Cecchini, E., Giannakou, M.E., Covey, S.N., Milner, J.J.** (1999). Altered patterns of gene expression in *Arabidopsis* elicited by cauliflower mosaic virus (CaMV) infection and by a CaMV gene VI transgene. *Mol Plant Microbe Interact* **12**: 377-84.
- Gilmartin, P.M., Sarokin, L., Memelink, J., Chua, N.H.** (1990). Molecular light switches for plant genes. *Plant Cell* **2**: 369-78.
- Glazebrook, J.** (1999). Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 280-86.
- Göbel, C., Feussner, I., Schmidt, A., Scheel, D., Sanchez-Serrano, J., Hamberg, M., Rosahl, S.** (2001). Oxylipin profiling reveals the preferential stimulation of the 9-lipoxygenase pathway in elicitor-treated potato cells. *J Biol Chem* **276**: 6267-73.
- Goodall, G.J., Filipowicz, W.** (1991). Different effects of intron nucleotide composition and secondary structure on pre-mRNA splicing in monocot and dicot plants. *EMBO J* **10**: 2635-44.
- Goodman, R.N., Novacky, A.J.** (1994). The hypersensitive reaction in plants to pathogens. A resistance phenomenon. *APS Press*. St. Paul, Minnesota.
- Goodrich, J.A., Cutler, G., Tjian, R.** (1996). Contacts in context: promoter specificity and macromolecular interactions in transcription. *Cell* **84**: 825-30.
- Goodwin, S.B., Cohen, B.A., Fry, W.E.** (1994). Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 11591-95.
- Grant, J.J., Loake, G.J.** (2000). Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol* **124**: 21-29.
- Grayer, R.J., Kokubun, T.** (2001). Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry* **56**: 253-63.
- Greenberg, J.T.** (2000). Positive and negative regulation of salicylic acid-dependent cell death and pathogen resistance in *Arabidopsis* lsd6 and ssi1 mutants. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 877-81.
- Gupta, V., Willits, M.G., Glazebrook, J.** (2000). *Arabidopsis thaliana* EDS4 contributes to salicylic acid (SA)-dependent expression of defense responses: evidence for inhibition of jasmonic acid signaling by SA. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 503-11.

- Hammerschmidt, R.** (1999). Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiol Mol Plant Pathol* **55**: 77-84.
- Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.** (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* **8**: 1773-91.
- Hanano, S., Sugita, M., Sugiura, M.** (1996). Isolation of a novel RNA-binding protein and its association with a large ribonucleoprotein particle present in the nucleoplasm of tobacco cells. *Plant Mol Biol* **31**: 57-68.
- Harrak, H., Chamberland, H., Plante, M., Bellemare, G., Lafontaine, J.G., Tabaeizadeh, Z.** (1999). A proline-, threonine-, and glycine-rich protein down-regulated by drought is localized in the cell wall of xylem elements. *Plant Physiol* **121**: 557-64.
- Harrington, C.A., Rosenow, C., Retief, J.** (2000). Monitoring gene expression using DNA microarrays. *Curr Opin Microbiol* **3**: 285-91.
- He, Z., Wang, Z.Y., Li, J., Zhu, Q., Lamb, C., Ronald, P., Chory, J.** (2000). Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1. *Science* **288**: 2360-3.
- Heath, M.C.** (2000). Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol* **44**: 321-34.
- Heintzen, C., Nater, M., Apel, K., Staiger, D.** (1997). AtGRP7, a nuclear RNA-binding protein as a component of a circadian-regulated negative feedback loop in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 8515-20.
- Heintzen, C., Melzer, S., Fischer, R., Kappeler, S., Apel, K., Staiger, D.** (1994). A light and temperature-entrained circadian clock controls expression of transcripts encoding nuclear proteins with homology to RNA-binding proteins in meristematic tissue. *Plant J* **5**: 799-813.
- Herbers, K., Monke, G., Badur, R., Sonnewald, U.** (1995). A simplified procedure for the subtractive cDNA cloning of photoassimilate-responding genes: isolation of cDNAs encoding a new class of pathogenesis-related proteins. *Plant Mol Biol* **29**: 1027-38.
- Herbers, K., Meuwly, P., Metraux, J.P., Sonnewald, U.** (1996). Salicylic acid-independent induction of pathogenesis-related protein transcripts by sugars is dependent on leaf developmental stage. *FEBS Lett* **397**: 239-44.
- Herde, O., Pena Cortes, H., Wasternack, C., Willmitzer, L., Fisahn, J.** (1999). Electric signaling and pin2 gene expression on different abiotic stimuli depend on a distinct threshold level of endogenous abscisic acid in several abscisic acid-deficient tomato mutants. *Plant Physiol* **119**: 213-18.
- Higo, K., Ugawa Y., Iwamoto M. and Korenaga T.** (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database:1999. *Nucleic Acids Res* **27**: 297-300.
- Hirose, T., Sugita, M., Sugiura, M.** (1993). cDNA structure, expression and nucleic acid-binding properties of three RNA-binding proteins in tobacco: occurrence of tissue-specific alternative splicing. *Nucleic Acids Res* **21**: 3981-87.
- Hirt, H.** (1997). Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction. *Trends Plant Sci* **2**: 11-15.
- Horvath, D.P., Olson, P.A.** (1998b). Cloning and characterization of cold-regulated glycine-rich RNA-binding protein genes from leafy spurge (*Euphorbia esula* L.) and comparison to heterologous genomic clones. *Plant Mol Biol* **38**: 531-38.
- Hotter, G.S., Kooter, J., Dubery, I.A., Lamb, C.J., Dixon, R.A., Harrison, M.J.** (1995). Cis elements and potential trans-acting factors for the developmental regulation of the Phaseolus vulgaris CHS15 promoter. *Plant Mol Biol* **28**: 967-81.
- Hubank, M., Schatz, D.G.** (1994). Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res* **22**: 5640-48.
- Hunt, M.D., Neuenschwander, U.H., Delaney, T.P., Weymann, K.B., Friedrich, L.B., Lawton, K.A., Steiner, H.Y., Ryals, J.A.** (1996). Recent advances in systemic acquired resistance research—a review. *Gene* **179**: 89-95.

- Hwang, Y.S., Karrer, E.E., Thomas, B.R., Chen, L., Rodriguez, R.L.** (1998). Three cis-elements required for rice alpha-amylase Amy3D expression during sugar starvation. *Plant Mol Biol* **36**: 331-41.
- Ito, Y., Kaku, H., Shibuya, N.** (1997). Identification of a high-affinity binding protein for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membrane of suspension-cultured rice cells by affinity labeling. *Plant J* **12**: 347-56.
- Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K., Scheel, D.** (1997). Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 4800-05.
- Jelitto-Van Dooren, E.P., Vidal, S., Denecke, J.** (1999). Anticipating endoplasmic reticulum stress. A novel early response before pathogenesis-related gene induction. *Plant Cell* **11**: 1935-44.
- Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P., Valent, B.** (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J* **19**: 4004-14.
- Jirage, D., Tootle, T.L., Reuber, T.L., Frost, L.N., Feys, B.J., Parker, J.E., Ausubel, F.M., Glazebrook, J.** (1999). *Arabidopsis thaliana* PAD4 encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 13583-88.
- Jurecic, R., Nachtman, R.G., Colicos, S.M., Belmont, J.W.** (1998). Identification and cloning of differentially expressed genes by long-distance differential display. *Anal Biochem* **259**: 235-44.
- Kauss, H.** (1985). Callose biosynthesis as a Ca²⁺-regulated process and possible relations to the induction of other metabolic changes. *J Cell Sci Suppl* **2**: 89-103.
- Kawasaki, T., Henmi, K., Ono, E., Hatakeyama, S., Iwano, M., Satoh, H., Shimamoto, K.** (1999). The small GTP-binding protein rac is a regulator of cell death in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 10922-26.
- Keller, B.** (1993). Structural cell wall proteins. *Plant Physiol* **101**: 1127-30.
- Keller, T., Damude, H.G., Werner, D., Doerner, P., Dixon, R.A., Lamb, C.** (1998). A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *Plant Cell* **10**: 255-66.
- Kenan, D.J., Query, C.C., Keene, J.D.** (1991). RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem Sci* **16**: 214-20.
- Kistner, C.** (1999). Isolierung und Charakterisierung eines nach Infektion mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* systemisch responsiven Gens von *Solanum tuberosum* L. *Promotion Martin-Luther-Universität Halle*.
- Klessig, D.F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D.A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J.M., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E., Silva, H.** (2000). Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8849-55.
- Kombrink, E., Somssich, I.E.** (1997). Pathogenesis-related proteins and plant defense. *The Mycota*. G. Carroll, Tudzynski, P. Berlin, Springer Verlag, **5, Part A**: 107-28.
- Kombrink, E., Schmelzer, E.** (2001). The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. *Eur. Jour. Plant Pathol.* **107**: 69-78.
- Kombrink, E., Büchter, R., Wegener, S., Scheel, D.** (1995). Systemic acquired resistance in potato. *Modern Fungicides and Antifungal Compounds*. H. Lyr, Russell, P.E., Sisler, H.D. Intercept, Andover, England, Proc. Int. Symp.11th: 483-91.
- Kozian, D.H., Kirschbaum, B.J.** (1999). Comparative gene-expression analysis. *Trends Biotechnol* **17**: 73-78.
- Krecic, A.M., Swanson, M.S.** (1999). hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 363-71.
- Kuc, J., Rush, J.S.** (1985). Phytoalexins. *Arch Biochem Biophys* **236**: 455-72.

- Kuwahara, A., Kato, A., Komeda, Y.** (2000). Isolation and characterization of copia-type retrotransposons in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **244**: 127-36.
- Kyhse-Anderson, L.** (1984) Electroblothing of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**: 203-09.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-85.
- Lam, E., Chua, N.H.** (1990). GT-1 binding site confers light responsive expression in transgenic tobacco. *Science* **248**: 471-74.
- Lamb, C., Ryals, J.A., Ward, E.R., Dixon, R.A.** (1992). Emerging strategies for enhancing crop resistance to microbial pathogens. *Biotechnology (N Y)* **10**: 1436-45.
- Lamb, C., Dixon, R.A.** (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 251-75.
- Lambermon, M.H., Simpson, G.G., Wiczorek Kirk, D.A., Hemmings-Mieszczak, M., Klahre, U., Filipowicz, W.** (2000). UBP1, a novel hnRNP-like protein that functions at multiple steps of higher plant nuclear pre-mRNA maturation. *EMBO J* **19**: 1638-49.
- Leister, R.T., Katagiri, F.** (2000). A resistance gene product of the nucleotide binding site -- leucine rich repeats class can form a complex with bacterial avirulence proteins in vivo. *Plant J* **22**: 345-54.
- Leon, J., Rojo, E., Sanchez-Serrano, J.J.** (2001). Wound signalling in plants. *J Exp Bot* **52**: 1-9.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., Lamb, C.** (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**: 583-93.
- Li, X., Zhang, Y., Clarke, J.D., Li, Y., Dong, X.** (1999). Identification and cloning of a negative regulator of systemic acquired resistance, SNI1, through a screen for suppressors of npr1-1. *Cell* **98**: 329-39.
- Liang, P., Averboukh, L., Keyomarsi, K., Sager, R., Pardee, A.B.** (1992). Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. *Cancer Res* **52**: 6966-68.
- Liang, P., Pardee, A.B.** (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**: 967-71.
- Liang, P., Averboukh, L., Pardee, A.B.** (1993). Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Res* **21**: 3269-75.
- Liang, P., Zhu, W., Zhang, X., Guo, Z., O'Connell, R.P., Averboukh, L., Wang, F., Pardee, A.B.** (1994). Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. *Nucleic Acids Res* **22**: 5763-64.
- Liang, P., Pardee, A.B.** (1995). Recent advances in differential display. *Curr Opin Immunol* **7**: 274-80.
- Liang, P., Pardee, A.B.** (1997). Differential display. A general protocol. *Methods Mol Biol* **85**: 3-11.
- Liang, P., Pardee, A.B.** (1998). Differential display. A general protocol. *Mol Biotechnol* **10**: 261-67.
- Ligterink, W., Kroj, T., zur Nieden, U., Hirt, H., Scheel, D.** (1997). Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science* **276**: 2054-57.
- Ligterink, W., Hirt, H.** (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways in plants: versatile signaling tools. *Int Rev Cytol* **201**: 209-75.
- Linskens, M.H., Feng, J., Andrews, W.H., Enlow, B.E., Saati, S.M., Tonkin, L.A., Funk, W.D., Villeponteau, B.** (1995). Cataloging altered gene expression in young and senescent cells using enhanced differential display. *Nucleic Acids Res* **23**: 3244-51.

- Lockhart, D.J., Winzeler, E.A.** (2000). Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* **405**: 827-36.
- Logemann, E., Schell, J., Willmitzer, L.** (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissue. *Anal Biochem* **163**: 16-20.
- Logemann, E., Parniske, M., Hahlbrock, K.** (1995). Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 5905-09.
- Luderer, R., Rivas, S., Nürnberger, T., Mattei, B., Van den Hooven, H.W., Van der Hoorn, R.A.L., Romeis, T., Wehrfritz, J.-M., Blume, B., Nennstiel, D., Zuidema, D., Vervoort, J., De Lorenzo, G., Jones, J.D.G., De Wit, P.J.G.M., Joosten, M.H.A.J.** (2001). No evidence for binding between resistance gene product Cf-9 of tomato and avirulence gene product AVR9 of *Cladosporium fulvum*. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 867-76.
- Luscher, B., Eisenman, R.N.** (1990). New light on Myc and Myb. Part II. Myb. *Genes Dev* **4**: 2235-41.
- Madamanchi, N.R., Kuc, J.** (1991). Induced systemic resistance in plants. *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*. G. T. Cole und H. C. Hoch. New York, Plenum Publishing Corporation: 347-62.
- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K.A., Dangl, J.L., Dietrich, R.A.** (2000). The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat Genet* **26**: 403-10.
- Mano, S., Hayashi, M., Nishimura, M.** (1999). Light regulates alternative splicing of hydroxypyruvate reductase in pumpkin. *Plant J* **17**: 309-20.
- Martin, G.B.** (1999). Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 273-79.
- Martini, N., Egen, M., Runtz, I., Strittmatter, G.** (1993). Promoter sequences of a potato pathogenesis-related gene mediate transcriptional activation selectively upon fungal infection. *Mol Gen Genet* **236**: 179-86.
- Martin-Laurent, F., Franken, P., Gianinazzi, S.** (1995). Screening of cDNA fragments generated by differential RNA display. *Anal Biochem* **228**: 182-4.
- McCullough, A.J., Schuler, M.A.** (1997). Intronic and exonic sequences modulate 5' splice site selection in plant nuclei. *Nucleic Acids Res* **25**: 1071-77.
- Memelink, J., Linthorst, H.J., Schilperoort, R.A., Hoge, J.H.** (1990). Tobacco genes encoding acidic and basic isoforms of pathogenesis-related proteins display different expression patterns. *Plant Mol Biol* **14**: 119-26.
- Menke, F.L.H., Champion, A., Kijne, J.W., Memelink, J.** (1999). A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene *Str* interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. *EMBO J*. **18**: 4455-63.
- Metraux, J.P.** (2001). Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. *Eur J Plant Pathol* **107**: 13-18.
- Millar, A.J., Straume, M., Chory, J., Chua, N.H., Kay, S.A.** (1995). The regulation of circadian period by phototransduction pathways in *Arabidopsis*. *Science* **267**: 1163-66.
- Millar, A.J., Kay, S.A.** (1996). Integration of circadian and phototransduction pathways in the network controlling CAB gene transcription in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 15491-96.
- Molina, A., Garcia-Olmedo, F.** (1997). Enhanced tolerance to bacterial pathogens caused by the transgenic expression of barley lipid transfer protein LTP2. *Plant J* **12**: 669-75.
- Molina, A., Mena, M., Carbonero, P., Garcia-Olmedo, F.** (1997). Differential expression of pathogen-responsive genes encoding two types of glycine-rich proteins in barley. *Plant Mol Biol* **33**: 803-10.

- Mudgett, M.B., Chesnokova, O., Dahlbeck, D., Clark, E.T., Rossier, O., Bonas, U., Staskawicz, B.J.** (2000). Molecular signals required for type III secretion and translocation of the *Xanthomonas campestris* AvrBs2 protein to pepper plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13324-29.
- Müller, K.O., Borger, H.** (1940). Experimentelle Untersuchungen über die *Phytophthora*-Resistenz in Kartoffel. *Arbeiten Biologischen Anst. Reichsanstalt Berlin* **23**: 183-231.
- Nagata, T., Kurihara, Y., Matsuda, G., Saeki, J., Kohno, T., Yanagida, Y., Ishikawa, F., Uesugi, S., Katahira, M.** (1999). Structure and interactions with RNA of the N-terminal UUAG-specific RNA-binding domain of hnRNP D0. *J Mol Biol* **287**: 221-37.
- Nakajima, N., Muranaka, T., Ishige, F., Akutsu, K., Oeda, K.** (1997). Fungal and bacterial disease resistance in transgenic plants expressing human lysozyme. *Plant Cell Rep* **16**: 674-79.
- Naqvi, S.M., Park, K.S., Yi, S.Y., Lee, H.W., Bok, S.H., Choi, D.** (1998). A glycine-rich RNA-binding protein gene is differentially expressed during acute hypersensitive response following Tobacco Mosaic Virus infection in tobacco. *Plant Mol Biol* **37**: 571-76.
- Nawrath, C., Metraux, 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**: 1393-404.
- Nennstiel, D., Scheel, D., Nurnberger, T.** (1998). Characterization and partial purification of an oligopeptide elicitor receptor from parsley (*Petroselinum crispum*). *FEBS Lett* **431**: 405-10.
- Neuenschwander, U.H., Vernooij, B., Friedrich, L., Uknes, S., Kessmann, H., Ryals, J.** (1995). Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? *Plant J* **8**: 227-33.
- Niderman, T., Genetet, I., Bruyere, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., Fritig, B., Mössinger, E.** (1995). Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol* **108**: 17-27.
- Nietfeld, W., Mentzel, H., Pieler, T.** (1990). The *Xenopus laevis* poly(A) binding protein is composed of multiple functionally independent RNA binding domains. *EMBO J* **9**: 3699-705.
- Nimchuk, Z., Marois, E., Kjemtrup, S., Leister, R.T., Katagiri, F., Dangl, J.L.** (2000). Eukaryotic fatty acylation drives plasma membrane targeting and enhances function of several type III effector proteins from *Pseudomonas syringae*. *Cell* **101**: 353-63.
- Nishiyama, H., Itoh, K., Kaneko, Y., Kishishita, M., Yoshida, O., Fujita, J.** (1997). A glycine-rich RNA-binding protein mediating cold-inducible suppression of mammalian cell growth. *J Cell Biol* **137**: 899-908.
- Norman-Setterblad, C., Vidal, S., Palva, E.T.** (2000). Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 430-38.
- Nürnberger, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W.R., Hahlbrock, K., Scheel, D.** (1994). High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* **78**: 449-60.
- Nürnberger, T., Nennstiel, D.** (1998). Fungal peptide elicitors: signals mediating pathogen recognition in plants. *Z. Naturforsch* **53c**: 141-50.
- Ohme-Takagi, M., Suzuki, K., Shinshi, H.** (2000). Regulation of ethylene-induced transcription of defense genes. *Plant Cell Physiol* **41**: 1187-92.
- Osbourn, A.E.** (1996). Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* **8**: 1821-31.
- Otte, O., Barz, W.** (2000). Characterization and oxidative in vitro cross-linking of an extensin-like protein and a proline-rich protein purified from chickpea cell walls. *Phytochemistry* **53**: 1-5.

- Ozawa, R., Arimura, G., Takabayashi, J., Shimoda, T., Nishioka, T.** (2000). Involvement of jasmonate- and salicylate-related signaling pathways for the production of specific herbivore-induced volatiles in plants. *Plant Cell Physiol* **41**: 391-98.
- Parker, J.E., Schulte, W., Hahlbrock, K., Scheel, D.** (1991). An extracellular glycoprotein from *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* elicits phytoalexin synthesis in cultured parsley cells and protoplasts. *Mol Plant Microbe Interact* **4**: 19-27.
- Parker, J.E., Coleman, M.J.** (1997). Molecular intimacy between proteins specifying plant-pathogen recognition. *Trends Biochem Sci* **22**: 291-96.
- Payne, G., Ahl, P., Moyer, M., Harper, A., Beck, J., Meins, F., Ryals, J.** (1990). Isolation of complementary DNA clones encoding pathogenesis-related proteins P and Q, two acidic chitinases from tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 98-102.
- Penninckx, I.A., Eggermont, K., Terras, F.R., Thomma, B.P., De Samblanx, G.W., Buchala, A., Metraux, J.P., Manners, J.M., Broekaert, W.F.** (1996). Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* **8**: 2309-23.
- Penninckx, I.A., Thomma, B.P., Buchala, A., Metraux, J.P., Broekaert, W.F.** (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 2103-13.
- Peterhänsel, C., Freialdenhoven, A., Kurth, J., Kolsch, R., Schulze-Lefert, P.** (1997). Interaction analysis of genes required for resistance responses to powdery mildew in barley reveal distinct pathways leading to cell death. *Plant Cell* **9**: 1397-409.
- Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H.B., Lacy, M., Austin, M.J., Parker, J.E., Sharma, S.B., Klessig, D.F., Martienssen, R., Mattsson, O., Jensen, A.B., Mundy, J.** (2000). *Arabidopsis* map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**: 1111-20.
- Piechulla, B., Merforth, N., Rudolph, B.** (1998). Identification of tomato Lhc promoter regions necessary for circadian expression. *Plant Mol Biol* **38**: 655-62.
- Pieterse, C.M., van Wees, S.C., Hoffland, E., van Pelt, J.A., van Loon, L.C.** (1996). Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* **8**: 1225-37.
- Pieterse, C.M., van Wees, S.C., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J., van Loon, L.C.** (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 1571-80.
- Prell, H.H.** (1996). Interaktionen von Pflanzen mit phytopathogenen Pilzen: Parasitierung und Resistenz, Genetik und molekulare Phytopathologie. Jena, Stuttgart, G. Fischer.
- Prell, H.H., Day, P.R.** (2000). Plant-Fungal Pathogen Interaction: A classical and molecular view. Berlin, Springer Verlag.
- Punja, Z.K., Raharjo, S.H.T.** (1996). Response of transgenic cucumber and carrot plants expressing different chitinase enzymes to inoculation with fungal pathogens. *Plant Dis.* **80**: 999-1005.
- Rance, I., Fournier, J., Esquerre-Tugaye, M.T.** (1998). The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 6554-59.
- Reese, M.G., Eeckman, F.H.** (1995). Novel Neural Network Algorithms for Improved Eukaryotic Promoter Site Recognition. The seventh international Genome sequencing and analysis conference, Hyatt Regency, Hilton Head Island, South Carolina.
- Reuber, T.L., Plotnikova, J.M., Dewdney, J., Rogers, E.E., Wood, W., Ausubel, F.M.** (1998). Correlation of defense gene induction defects with powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis* enhanced disease susceptibility mutants. *Plant J* **16**: 473-85.
- Reymond, P., Farmer, E.E.** (1998). Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr Opin Plant Biol* **1**: 404-11.

- Reymond, P., Weber, H., Damond, M., Farmer, E.E.** (2000). Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**: 707-20.
- Richard, S., Drevet, C., Jouanin, L., Seguin, A.** (1999). Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a putative white spruce glycine-rich RNA binding protein. *Gene* **240**: 379-88.
- Roitsch, T.** (1999). Source-sink regulation by sugar and stress. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 198-206.
- Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S., Klessig, D.F., Hirt, H., Jones, J.D.** (1999). Rapid Avr9- and Cf-9 -dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* **11**: 273-87.
- Rosahl, S.** (1996). Lipoxygenases in plants-their role in development and stress response. *Z Naturforsch* **51c**: 123-38.
- Ross, A.F.** (1961a). Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. *Virology* **14**: 329-39.
- Ross, A.F.** (1961b). Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* **14**: 340-58.
- Rothstein, J.L., Johnson, D., Jessee, J., Skowronski, J., DeLoia, J.A., Solter, D., Knowles, B.B.** (1993). Construction of primary and subtracted cDNA libraries from early embryos. *Methods Enzymol* **225**: 587-610.
- Rouster, J., Leah, R., Mundy, J., Cameron-Mills, V.** (1997). Identification of a methyl jasmonate-responsive region in the promoter of a lipoxygenase 1 gene expressed in barley grain. *Plant J* **11**: 513-23.
- Roux, C., Bilang, J., Theunissen, B.H., Perrot-Rechenmann, C.** (1998). Identification of new early auxin markers in tobacco by mRNA differential display. *Plant Mol Biol* **37**: 385-9.
- Rowland, O., Jones, J.D.** (2001). Unraveling regulatory networks in plant defense using microarrays. *Genome Biol* **2**: reviews 1001.1-3.
- Ruiter, R.K., Van Eldik, G.J., Van Herpen, R.M., Schrauwen, J.A., Wullems, G.J.** (1997). Characterization of oleosins in the pollen coat of Brassica oleracea. *Plant Cell* **9**: 1621-31.
- Rushton, P.J., Torres, J.T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K., Somssich, I.E.** (1996). Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *EMBO J* **15**: 5690-700.
- Rushton, P.J., Somssich, I.E.** (1998). Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**: 311-15.
- Ryals, J., Weymann, K., Lawton, K., Friedrich, L., Ellis, D., Steiner, H.Y., Johnson, J., Delaney, T.P., Jesse, T., Vos, P., Uknes, S.** (1997). The *Arabidopsis* NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I kappa B. *Plant Cell* **9**: 425-39.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y., Hunt, M.D.** (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**: 1809-19.
- Ryan, C.A., Farmer, E.E.** (1991). Oligosaccharide signals in plants: A current assessment. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Biol.* **42**: 651-74.
- Ryan, C.A.** (2000). The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim Biophys Acta* **1477**: 112-21.
- Sachetto-Martins, G., Franco, L.O., de Oliveira, D.E.** (2000). Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif? *Biochim Biophys Acta* **1492**: 1-14.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sanchez-Serrano, J.J., Schmidt, R., Schell, J., Willmitzer, L.** (1986). Nucleotide sequence of a proteinase inhibitor II encoding cDNA of potato (*Solanum tuberosum*) and its mode of expression. *Mol Gen Genet* **203**: 15-20.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-67.
- Scheel, D., Parker, J.E.** (1990). Elicitor recognition and signal transduction in plant defense gene activation. *Z Naturforsch* **45c**: 569-75.
- Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C., Manners, J.M.** (2000). Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 11655-60.
- Schwede, T., Diemand, A., Guex, N., Peitsch, M.C.** (2000). Protein structure computing in the genomic era. *Res Microbiol* **151**: 107-12.
- Schweizer, P., Buchala, A., Dudler, R., Metraux, J.P.** (1998). Induced systemic resistance in wounded rice plants. *Plant J* **14**: 475-82.
- Sela-Burlage, M.B., Ponstein, A.S., Bres-Vloemans, S.A., Melchers, L.S., van den Elzen, P.J., Cornelissen, B.J.** (1993). Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and beta-1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiol* **101**: 857-63.
- Sessa, G., Yang, X.Q., Raz, V., Eyal, Y., Fluhr, R.** (1995). Dark induction and subcellular localization of the pathogenesis-related PRB-1b protein. *Plant Mol Biol* **28**: 537-47.
- Shah, J., Tsui, F., Klessig, D.F.** (1997). Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (*sai1*) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the *tms2* gene. *Mol Plant Microbe Interact* **10**: 69-78.
- Shah, J., Kachroo, P., Klessig, D.F.** (1999). The *Arabidopsis* *ssi1* mutation restores pathogenesis-related gene expression in *npr1* plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. *Plant Cell* **11**: 191-206.
- Sharp, J.K., Valent, B., Albersheim, P.** (1984). Purification and partial characterization of a beta-glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. *J Biol Chem* **259**: 11312-20.
- Shiraishi, T., Yamada, T., Saitoh, K., Kato, A., Toyoda, K., Yoshioka, H., Kim, H.M., Ichinose, Y., Tahara, M., Oku, H.** (1994). Suppressors: Determinants of specificity produced by plant pathogens. *Plant Cell Physiol* **35**: 1107-19.
- Shirasu, K., Nakajima, H., Rajasekhar, V.K., Dixon, R.A., Lamb, C.** (1997). Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell* **9**: 261-70.
- Shulaev, V., Leon, J., Raskin, I.** (1995). Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco? *Plant Cell* **7**: 1691-702.
- Shulaev, V., Silverman, P., Raskin, I.** (1997). Airborne signaling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature* **385**: 718-20.
- Simpson, G.G., Filipowicz, W.** (1996). Splicing of precursors to mRNA in higher plants: mechanism, regulation and sub-nuclear organisation of the spliceosomal machinery. *Plant Mol Biol* **32**: 1-41.
- Smith-Becker, J., Marois, E., Huguet, E.J., Midland, S.L., Sims, J.J., Keen, N.T.** (1998). Accumulation of salicylic acid and 4-hydroxybenzoic acid in phloem fluids of cucumber during systemic acquired resistance is preceded by a transient increase in phenylalanine ammonia-lyase activity in petioles and stems. *Plant Physiol* **116**: 231-38.
- Snoeiijers, S.S., Vossen, P., Goosen, T., Van den Broek, H.W., de Wit, P.J.** (1999). Transcription of the avirulence gene *Avr9* of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* is regulated by a GATA-type transcription factor in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* **261**: 653-59.

- Somssich, I.E., Hahlbrock, K.** (1998). Pathogen defense in plants - a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci* **3**: 86-90.
- Song, W.Y., Wang, G.L., Chen, L.L., Kim, H.S., Song, W.Y., Wang, G.-L., Chen, L.-L., Kim, H.-S., Pi, L.-Y., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W.-X., Zhu, L.-H., Fauquet, C., Ronald, P.** (1995). A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science* **270**: 1804-06.
- Staiger, D., Apel, K.** (1999). Circadian clock-regulated expression of an RNA-binding protein in *Arabidopsis*: characterisation of a minimal promoter element. *Mol Gen Genet* **261**: 811-19.
- Stakman, E.C.** (1915). Relation between *Puccinia graminis* and plants highly resistant to its attack. *J. Agric. Res.* **4**: 193-200.
- Stalberg, K., Ellerstrom, M., Ezcurra, I., Ablov, S., Rask, L.** (1996). Disruption of an overlapping E-box/ABRE motif abolished high transcription of the napA storage-protein promoter in transgenic Brassica napus seeds. *Planta* **199**: 515-19.
- Staswick, P.E., Yuen, G.Y., Lehman, C.C.** (1998). Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *Plant J* **15**: 747-54.
- Steinert, P.M., Mack, J.W., Korge, B.P., Gan, S.Q., Haynes, S.R., Steven, A.C.** (1991). Glycine loops in proteins: their occurrence in certain intermediate filament chains, lorincins and single-stranded RNA binding proteins. *Int J Biol Macromol* **13**: 130-39.
- Stevens, C., Bennett, M.A., Athanassopoulos, E., Tsiamis, G., Taylor, J.D., Mansfield, J.W.** (1998). Sequence variations in alleles of the avirulence gene avrPphE.R2 from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* lead to loss of recognition of the AvrPphE protein within bean cells and a gain in cultivar-specific virulence. *Mol Microbiol* **29**: 165-77.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., Metraux, J.P.** (1997). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Plant Pathol.* **35**: 253-70.
- Stout, M.J., Fidantsef, A.L., Duffey, S.S., Bostock, R.M.** (1999). Signal interactions in pathogen and insect attack: systemic plant-mediated interactions between pathogens and herbivores of the tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Physiol Mol Plant Pathol* **54**: 115-30.
- Strömberg, A., Brishammar, S.** (1991). Induction of systemic resistance in potato (*Solanum tuberosum* L.) plants to late blight by local treatment with *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, *Phytophthora cryptogea* Pethyb & Laff., or dipotassium phosphate. *Potato Res.* **34**: 219-25.
- Tamminen, I., Makela, P., Heino, P., Palva, E.T.** (2001). Ectopic expression of ABI3 gene enhances freezing tolerance in response to abscisic acid and low temperature in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **25**: 1-8.
- Tang, X., Frederick, R.D., Zhou, J., Halterman, D.A., Jia, Y., Martin, G.B.** (1996). Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. *Science* **274**: 2060-63.
- Thomma, B., Eggermont, K., Penninckx, I., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P.A., Broekaert, W.F.** (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15107-11.
- Thomma, B.P., Penninckx, I.A., Broekaert, W.F., Cammue, B.P.** (2001). The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr Opin Immunol* **13**: 63-68.
- Ton, J., Davison, S., Van Wees, S.C., Van Loon, L., Pieterse, C.M.** (2001). The *Arabidopsis* isr1 locus controlling rhizobacteria-mediated induced systemic resistance is involved in ethylene signaling. *Plant Physiol* **125**: 652-61.
- Torres, M.A., Onouchi, H., Hamada, S., Machida, C., Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.** (1998). Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91phox). *Plant J* **14**: 365-70.
- Trenkle, T., Welsh, J., Jung, B., Mathieu-Daude, F., McClelland, M.** (1998). Non-stoichiometric reduced complexity probes for cDNA arrays. *Nucleic Acids Res* **26**: 3883-91.

- Tugores, A., Belmonte, J.C.** (1999). Differential display of eukaryotic mRNA. *Methods Mol Biol* **97**: 575-90.
- Uknes, S., Morris, S., Vernooij, B., Ryals, J.** (1996). The role of benzoic acid derivatives in systemic acquired resistance. *Phytochemical diversity and Redundancy in Ecological Interactions*. J. T. Romeo, J. A. Saunders und P. Barbosa. New York, Plenum Press: 253-63.
- Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, S., Shinozaki, K.** (1993). An *Arabidopsis* myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell* **5**: 1529-39.
- Van den Ackerveken, G., Marois, E., Bonas, U.** (1996). Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. *Cell* **87**: 1307-16.
- van Kan, J.A., Cornelissen, B.J., Bol, J.F.** (1988). A virus-inducible tobacco gene encoding a glycine-rich protein shares putative regulatory elements with the ribulose biphosphate carboxylase small subunit gene. *Mol Plant Microbe Interact* **1**: 107-12.
- van Loon, L.C., van Kammen, A.** (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* **40**: 190-211.
- van Loon, L.C.** (1990). The nomenclature of pathogenesis-related proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* **37**: 229-39.
- van Loon, L.C., van Strien, E.A.** (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* **55**: 85-97.
- van Wees, S.C., Luijendijk, M., Smoorenburg, I., van Loon, L.C., Pieterse, C.M.** (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**: 537-49.
- van Wees, S.C., de Swart, E.A., van Pelt, J.A., van Loon, L.C., Pieterse, C.M.** (2000). Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8711-16.
- Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B., Kinzler, K.W.** (1995). Serial analysis of gene expression. *Science* **270**: 484-7.
- Vijayan, P., Shockey, J., Levesque, C.A., Cook, R.J., Browse, J.** (1998). A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7209-14.
- Vleeshouwers, V.G., van Dooijeweert, W., Govers, F., Kamoun, S., Colon, L.T.** (2000). The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta* **210**: 853-64.
- Vögeli-Lange, R., Burckert, N., Boller, T., Wiemken, A.** (1996). Rapid selection and classification of positive clones generated by mRNA differential display. *Nucleic Acids Res* **24**: 1385-6.
- Ward, E., Uknes, S., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Ahl-Goy, P., Mettraux, J.P., Ryals, J.** (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* **3**: 1085-94.
- Wegener, S.** (1996). Untersuchungen zur systemisch erworbenen Resistenz in *Solanum tuberosum* L.: Identifizierung und Charakterisierung des systemisch responsiven Gens *stsrG1*. *Dissertation an der Universität zu Köln*.
- Welsh, J., Chada, K., Dalal, S.S., Cheng, R., Ralph, D., McClelland, M.** (1992). Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Res* **20**: 4965-70.
- Willits, M.G., Ryals, J.** (1998). Determining the relationship between salicylic acid levels and systemic acquired resistance induction in tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* **11**: 795-800.

- Wingender, E., Chen, X., Hehl, R., Karas, H., Liebich, I., Matys, V., Meinhardt, T., Prüß, M., Reuter, I. and Schacherer, F.** (2000). TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Res* **28**: 316-19.
- Wu, G., Shortt, B.J., Lawrence, E.B., Levine, E.B., Fitzsimmons, K.C., Shah, D.M.** (1995). Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell* **7**: 1357-68.
- Xie, D.X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M., Turner, J.G.** (1998). COI1: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* **280**: 1091-94.
- Yanagisawa, S., Schmidt, R.J.** (1999). Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. *Plant J* **17**: 209-14.
- Yang, P., Chen, C., Wang, Z., Fan, B., Chen, Z.** (1999). A pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding activity recognizes the elicitor response element of the tobacco class I chitinase gene promoter. *Plant J* **18**: 141-49.
- Yang, K.Y., Liu, Y., Zhang, S.** (2001). Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 741-46.
- Yost, H.J., Lindquist, S.** (1986). RNA splicing is interrupted by heat shock and is rescued by heat shock protein synthesis. *Cell* **45**: 185-93.
- Yu, D., Liu, Y., Fan, B., Klessig, D.F., Chen, Z.** (1997). Is the high basal level of salicylic acid important for disease resistance in potato? *Plant Physiol* **115**: 343-405.
- Yu, D., Xie, Z., Chen, C., Fan, B., 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**: 477-88.
- Yu, I.C., Parker, J., Bent, A.F.** (1998). Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis* dnd1 mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7819-24.
- Yu, L.M.** (1995). Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 4088-94.
- Zhu, B., Chen, T.H., 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.
- Zhu, B., Choi, D.W., Fenton, R., Close, T.J.** (2000). Expression of the barley dehydrin multigene family and the development of freezing tolerance. *Mol Gen Genet* **264**: 145-53.

7 Anhang

Anhang A Abkürzungen

Tab. 7.1: Abkürzungen der Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuch- stabenkode	Einbuch- stabenkode	Aminosäure	Dreibuch- stabenkode	Einbuch- stabenkode
Alanin	Ala	A	Methionin	Met	M
Cystein	Cys	C	Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D	Prolin	Pro	P
Glutaminsäure	Glu	E	Glutamin	Gln	Q
Phenylalanin	Phe	F	Arginin	Arg	R
Glycin	Gly	G	Serin	Ser	S
Histidin	His	H	Threonin	Thr	T
Isoleucin	Ole	I	Valin	Val	V
Lysin	Lys	K	Tryptophan	Trp	W
Leucin	Leu	L	Tyrosin	Tyr	Y

Tab. 7.2: Symbole der Nukleotide und ihrer Gemische

$$N = A + C + G + T$$

$$V = A + C + G$$

$$H = A + C + T$$

$$M = A + C$$

$$D = A + G + T$$

$$R = A + G$$

$$W = A + T$$

$$B = C + G + T$$

$$Y = C + T$$

$$S = C + G$$

$$K = G + T$$

Anhang B Medienzusätze

Zusätze zu Gewebekulturmedien (Angaben zu Tabellenfußnote 1 Kapitel 2.1.2)

<u>Makroelemente:</u>	NH ₄ NO ₃	41,25 g/l
	KNO ₃	47,50 g/l
	CaCl ₂ * 2 H ₂ O	11,00 g/l
	MgSO ₄ * 7 H ₂ O	9,25 g/l
	KH ₂ PO ₄	4,25 g/l

<u>Mikroelemente:</u>	H ₃ BO ₃	6,20 g/l
	MnSO ₄ * 7 H ₂ O	22,30 g/l
	ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	10,60 g/l
	KI	0,83 g/l
	NaMoO ₄ * 2 H ₂ O	0,25 g/l
	CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0,025 g/l
	CoCl ₂ * 6 H ₂ O	0,025 g/l

<u>FE-EDTA-Lösung:</u>	FeSO ₄ * 7 H ₂ O	5,57 g/l
	Na ₂ -EDTA	7,45 g/l

<u>Vitamine:</u>	Nikotinsäure	500 mg/l
	Pyridoxin-HCl	500 mg/l
	Thiamin-HCl	100 mg/l
	Glyzin	2 g/l

Anhang C Primer

Dargestellt sind die Nukleotidsequenzen der Primer. Unterstreichungen markieren Restriktionsschnittstellen, IRD 700 bzw. 800 bezeichnet Primer, die mit einer Fluoreszenzmarkierung ausgestattet sind, die eine automatische Sequenzierung der Produkte erlaubt.

DD-RT-PCR-Primer

1: 5'-CGA CTC CAA G-3'
 2: GCT AGC ATG G
 3: TAA GAC TAG C
 4: CAG TGT GTG A
 5: GAC CAT TGC A
 6: CTG CTA GGT A
 7: ACG CTA GTG T
 8: GCT AGC AGA C
 9 : TCC ATG ACT C
 10: TAC AAC GAG G
 11: TGG ATT GGT C
 12: CTT TCT ACC C
 13: TTT TGG CTC C
 14: TCG GTC ATA G
 15: GGT ACT AAG G

b: TTT TTT TTT TTT GG
 d: TTT TTT TTT TTT AG
 f: TTT TTT TTT TTT CG

EDD-RT-PCR-Primer

Hind III-Schnittstelle

5' - GCG C AAGCTT ATC GAC TCC AAG -3'
 GCG C AAGCTT TAG CTA GCA TGG
 GCG C AAGCTT GCT AAG ACT AGC
 GCG C AAGCTT TGC AGT GTG TGA
 GCG C AAGCTT GTG ACC ATT GCA
 GCG C AAGCTT GTC TGC TAG GTA
 GCG C AAGCTT AGA CGC TAG TGT
 GCG C AAGCTT TAG CTA GCA GAC
 GCG C AAGCTT ACT CCA TGA CTC
 GCG C AAGCTT ATT ACA ACG AGG
 GCG C AAGCTT ATT GGA TTG GTC
 GCG C AAGCTT ATC TTT CTA CCC
 GCG C AAGCTT ATT TTT GGC TCC
 GCG C AAGCTT TAT CGG TCA TAG
 GCG C AAGCTT TAG GTA CTA AGG
 GCG C AAGCTT TTT TTT TTT TGG
 GCG C AAGCTT TTT TTT TTT TAG
 GCG C AAGCTT TTT TTT TTT TCG

Chitinase spezifische Primer:

CHTADD5: TGG GCA ATG G
 CHTADDT: TTT TTT TTT TTC T

DD-Fragment XIV oder *sre* 3 spezifische Primer:

XIV-83A: CAA CCA TGA ATC CAA GCA AAC CTT ACC
 XIV-83B: CCC ACA AGT TCT ATC ACT AGC ACT ATT C
 XIV-83-2A: GAA TCC AAG CAA ACC TTA CCA TCA A
 XIV-83-2B: CAA CAT TCC AAG AAT ATT AAA AAC TCA
 XIV-R-5-3: GAT AGA ACT TGT GGG AAT AG
 XIV-R-5-5: CCT ACA TAC ATC TCC CAG
 XIV-R-3-5: CCA GAC ATA CAG TAT TAG AGA GTA G
 XIV-RACE-5': TGC TCC ATC CAG ACA TAC AGT ATT AGA GA
 XIV-RACE-3': AAG CCG CCA GTA CCT TAC ACA AAC TTA TC
 XIV-RACE-3'b: GAA TTG GCT GCG GGT GCA ACC ATA TC

gK22B-5: CCA GGA ATG AGG AGC TTT GAC TAT IRD 800
 gK22B-3: AAT TGT GAC GGA AGG GAT GAG GAT IRD 700

DD-Fragment X oder sre 4 spezifische Primer:

X-65A: CTT CAA CGT AAC GTA CCG TAT AAA GGG
 X-65B: CGT TTG TTG CAT AGC AGA GAT CAG ATC
 DDX-RACE5': TAA AGG GAT GGA ATA AGG GTA AGA GTA AC
 DDX-RACE3': GTC CGT TTG TTG CAT AGC AGA GAT
 X-Int 5': CGT TGA AGA TTG ATC GCT TTT AGC
 X-Int 3': CAA ATC GGT AAA TAA AAG GAT CCA C
 ExX-3up: AGG TTC TGG CCA TTC ATT GCT TCA
 X-5'c: AAC ATA TGT CTG TTG AGG TTG AAT AC (Nde I-
 X-3'c: TTC ATA TGC TTA ACC **TAA** TTC CTC CA Schnittstelle)
 cX3'-upEcoEx: TTC AGA ATT CTA ACC **TAA** TTC CTC C (Eco RI-
 cX1gd down: ATG GAA GCT CAA TCA CGC GGA AGC G
 cX1bd up: GCT TCA ATT GCG TTC CTC ATG GAT TTC TC

 gX-3'gW down: GTG CAT CAG AAG GAA GCT GGA GGA
 gX5'-UTR down: AAT CAG CAA AAC CGA TAG CCT IRD 800
 gX5'-UTR up: CGT TTG GTC ATC TGA GAT GAA CT IRD 700
 X5'UTR: TTA ACC AGT GGT AGC CAC GAG

sre 2 spezifische Primer:

B8-NCT: TTC ACT ACA TAA TGA GTT GGC
 B8c3-5p: CAC TTC AAC ACG TCG TCG CTC G
 B8c-3'up: GCG CTT TGC ACA AGC CGA ACT ATC

23S rRNA spezifische Primer:

23S5: GAA TGA GCC GGC GAC TCA TAG GCA
 23S3: CGT TTT CCC TCT CGA CGA TGA AGC

Sequenzierprimer:

M13 universal GTAAAACGACGGCCAGT
 M13 revers CAGGAAACAGCTATGAC
 T7 TAATACGACTCACTATAGGG
 T3 ATTAACCCTCACTAAAG
 Sp6 ATTTAGGTGACACTATAG

(gegebenenfalls mit IRD 700 oder 800 markiert)

Anhang D Genomische Sequenz von sre 4

Der Transkriptionsstart ist mit +1 markiert und fett gedruckt, die TATA-Box ist kursiv und unterstrichen, der Translationsstart unterstrichen und fett gedruckt und das Polyadenylierungssignal im 3'-Bereich ist nur unterstrichen dargestellt. Der farblich invertierte Bereich markiert die Sequenz des *Differential-Display*-Fragmentes. Die Aminosäuresequenz des Proteins Sre 4-p1 ist proportional zur Nukleotidsequenz dargestellt.

```

AAACAATTAA CCTGFAAACA ATTAAAATTC ATCGCITTAAG GTAAATAAAA TATGAAGATA AAAATAAAAT-1072
ATTGCGATGC AAAATAGAGA GAATAAAGGA AGAGATATAA AATGAATAAA TAGGAATAAT GAGAAAGTAG-1002
TTCAGAAAGA AAAATAAAGG AATTGIGTCA GAATCATGAA ATATTGCATT ATTATGTAGT AGAATTTTGA -932
AGTGTTCAT TATCTTTTTT ATTAAAGGAT TGCAATTAAG TGAATATAIT TTTTAAATAA AATTCGIAA -862
CTATTTTTTC CATAATTAAG CACACTAATT ATGGAGAAGT AAATGTTGAT TATGAAAAT CAAATGAGAG -792
TTAAAACATG AGATAAAGA TGCAATTAAG AATCAGCAA ACCGATAGCC TTTTGGGGIT CTTTATTTTA -722
AGAAAGTTAT ATTTGATCAT TAATTAATAA TTAATAATAT AATTGTATAA AAAATAGAGA AAAATGGCT -652
AAATTCTAAG AAAATAGATA AATATCCTTT CTGATCATTG AGGCATGCCA CATCAGTGGG ATGCAGATAC -582
TCCITTTAT ATATATATAT ATATATATGA TATGATIGAT ATATTTTTGA TAGTTTTTAC AACTTATGAG -512
AGTGTAAATA TAAATATACT ACAACTCATG TTCAACTCTA CTTTTTATTA AACTAAAAT GGATCAATAA -442
GTATTGGTAG CTTTGTAAATA GGTATTTTAT ACTTTGTAGT TTTGTTATGA ATTTTTTATTT ATTTGGTATA -372
AAATTATATA ATTTTGATAA TTTTGTAAA ATCTTGAAT GTCACTGAAC TATGAAAAAT TATCTAAAAA -302
AGTTTTTAAA CTTTATTTTG TATCAATAAA ATCACCATA ATTACATATC AAAACCATGA TTTTATATCA -232
TTAGTCCATC TCAGATGACC AAACGGGGTG ATTTCTATTA ACAGTATGTG AAGAAAATGA CTGTTAATCA -162
ACAGTTTTAA GTTTAAACCA GTGGTAGCCA CGAGCAGTTA TCCATTAGCG TCGCGATCGG TAACAAACTA -92
GCGCTTCTAG TGCTCCGTGC ACATAAAAT AAGGGTGAAA GCAAAAAAGT AGTCTCCTTG GCCTATAAAA -22
GGCAGCATTT TGTACCCAGA AAATGCACAT CTCCTCTGTC TATTGAATTA AAATAGAAAA AGAATG TCT +47
                                     +1                                     M S 2
GTT GAG GTT GAA TAC AGA TGC TTC GTG GGT GGG CTC GCA TGG GCT ACC AAC GAT AGA +104
V E V E Y R C F V G G L A W A T N D R 21
ACC TTA GGA GAA GCT TTT TCT CAG TAC GGC AAT GTG GTC GAC TCC AAG GTCCGTTGT +162
T L G E A F S Q Y G N V V D S K 37
TGCATAGCAG AGATCAGATC CGATACCATT TTATTTTGGC TTCGTTGATC ACCTCATCTC TTTACTCTCT +232
CTGTTACTAT GCTACTTTGT TACTCTCTCT ATGTTACTGT TACTATTTGT TACTCTTACC CTTATTCAT +302
TCCTTTATAC GGTACGTTAC GTTGAAGATT GATCGCTTTT AGCTTTTCTT TTCAAAATAA TTTTGTTTTT +372
GATTCATGAA AATCAATTAC TAGATATTAT TTTTGTGTTT ATTCATGATC TATGATGCAT TTTTAAAAA +442
ATTCTGTAAT TGTGGATCCT TTTATTTACC GATTTGTTTT TTTTTTCAG ATT ATC AAC GAT CGC +506
                                     I I N D R 42
GAA ACA GGT AGA TCA AGA GGA TTT GGT TTT GTT ACC TTT ACT GAT GAG AAA TCC ATG +563
E T G R S R G F G F V T F T D E K S M 61
AGG AAC GCA ATT GAA GCA ATG AAT GGC CAG AAC CTT GAT GGT CGT AAC ATC ACT GTT +620
R N A I E A M N G Q N L D G R N I T V 80
AAT GAA GCT CAA TCA CGC GGA AGC GGC GGC GGC GGT GGT GGT TTC GGA GGT GGC CGA +677
N E A Q S R G S G G G G G G F G G G R 99
CGG GGT GGT GGT GGT GGT GGT TTC GGA GGT GGT GGC GGA TAC AAT GGC GGT GGT GGC +734
R G G G G G G F G G G G G Y N G G G G 118
GGC TAC GGT CGA CGT GAG GGT GGC AAT GGT GGT GGT TAT GGA GGT GGC CGT GAC CGC +791
G Y G R R E G G N G G G Y G G G R D R 137
GGA TAT GGT GGT GGT GGT GAT CGT TAT GGT GAT GGT GGA TCC CGT TAC TCA AGA GGT +848
G Y G G G G D R Y G D G G S R Y S R G 156
GGT GGT GCA TCA GAA GGA AGC TGG AGG AAT TAG GTTAGATATA ATAAAAATTCT AAATTGGGTT +911
G G A S E G S W R N . 166
TATAGTCTAA AATATGTCAT AGTTTTGGTT TGGAACTAT GTTCTGTGT GGGTTTTTGG AGAGTGTGGG +981
GGTTCTTTC TATTAACCTG TTATGTTACT GGGAGGAAAA GGTGCAAGGT TCAACCATCA AAGTTTTTAA 1051
TGATCAACCC TTTTTCAT 1069

```

Anhang E Sequenzen der cDNA-Klone *sre 4-c1* bis *c4*

Das Startkodon ist fett dargestellt, die mittels PCR eingeführten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen und für den unvollständigen cDNA-Klon *sre 4-c4* ist der 3'-RACE-Klon angegeben, erweitert durch die putativen Bereiche, die von den anderen Klonen und der genomische Sequenz abgeleitet wurden (grau dargestellt)

sre 4-c1

AAC <u>ATATG</u> TTC	TGTTGAGGTT	GAATACAGAT	GCTTCGTGGG	TGGGCTCGCA	50
TGGGCTACCA	ACGATAGAAC	CTTAGGAGAA	GCTTTTTTCTC	AGTACGGCAA	100
TGTGGTCGAC	TCCAAGATTA	TCAACGATCG	CGAAACAGGT	AGATCAAGAG	150
GATTTGGTTT	TGTTACCTTT	ACTGATGAGA	AATCCATGAG	GAACGCAATT	200
GAAGCAATGA	ATGGCCAGAA	CCTTGATGGT	CGTAACATCA	CTGTTAATGA	250
AGCTCAATCA	CGCGGAAGCG	GCGGCGGCGG	TGGTGGTTTC	GGAGGTGGCC	300
GACGGGGTGG	TGGTGGTGGT	GGTTTCGGAG	GTGGTGGCGG	ATACAATGGC	350
GGTGGTGGCG	GCTACGGTCG	ACGTGAGGGT	GGCAATGGTG	GTGGTTATGG	400
AGGTGGCCGT	GACCGCGGAT	ATGGTGGTGG	TGGTGATCGT	TATGGTGATG	450
GTGGATCCCG	TTACTCAAGA	GGTGGTGGTG	CATCAGAAGG	AAGCTGGAGG	500
AATTAGGTTA	<u>GAATTCTGAA</u>				520

sre 4-c2

AAC <u>ATATG</u> TTC	TGTTGAGGTT	GAATACAGAT	GCTTCGTGGG	TGGGCTCGCA	50
TGGGCTACCA	ACGATAGAAC	CTTAGGAGAA	GCTTTTTTCTC	AGTACGGCAA	100
TGTGGTCGAC	TCCAAGGTTCC	GTTTGTTCGA	CAGCAGAGAT	CAGATCCGAT	150
ACCATTTTAT	TTTGGCTTCG	TTGATCACCT	CATCTCTTTA	CTCTCTCTGT	200
TACTATGCTA	CTTTGTTACT	CTCTCTATGT	TACTGTTACT	ATTTGTTACT	250
CTTACCCTTA	TTCCATTCCCT	TTATACGGTA	CGTTACGTTG	AAGATTGATC	300
GCTTTTAGCT	TTTCTTTTCA	AAATAATTTT	TGTTTTGATT	CATGAAAATC	350
AATTACTAGA	TATTATTTTT	GTGTTTATTC	ATGATCTATG	ATGCATTTTT	400
AAAAAATTCT	GTAATTGTGG	ATCCTTTTAT	TTACCGATTT	GTTTTTTTTT	450
CAGATTATCA	ACGATCGCGA	AACAGGTAGA	TCAAGAGGAT	TTGGTTTTGT	500
TACCTTTACT	GATGAGAAAT	CCATGAGGAA	CGCAATTGAA	GCAATGAATG	550
GCCAGAACCT	TGATGGTCGT	AACATCACTG	TTAATGAAGC	TCAATCACGC	600
GGAAGCGGCG	GCGGCGGTGG	TGGTTTCGGA	GGTGGCCGAC	GGGGTGGTGG	650
TGGTGGTGGT	TTCGGAGGTG	GTGGCGGATA	CAATGGCGGT	GGTGGCGGCT	700
ACGGTGCACG	TGAGGGTGGC	AATGGTGGTG	GTTATGGAGG	TGGCCGTGAC	750
CGCGGATATG	GTGGTGGTGG	TGATCGTTAT	GGTGATGGTG	GATCCCGTTA	800
CTCAAGAGGT	GGTGGTGCAT	CAGAAGGAAG	CTGGAGGAAT	TAGGTTAG <u>AA</u>	850
<u>TTCTGAA</u>					857

sre 4-c3

AACATATGTC	TGTTGAGGTT	GAATACAGAT	GCTTCGTGGG	TGGGCTCGCA	50
TGGGCTACCA	ACGATAGAAC	CcTAGGAGAA	GCTTTTTTCTC	AGTACGGCAA	100
TGTGGTCGAC	TCCAAGATTA	TCAACGATCG	CGAAACAGGT	AGATCAAGAG	150
GATTTGGTTT	TGTTACCTTT	ACTGATGAGA	AATCCATGAG	GAACGCAATT	200
GAAGCAATGA	ATGGCCAGAA	CCTTGATGGT	ACCGCGGATA	TGGTGGTGGT	250
GGTGATCGTT	ATGGTGATGG	TGGATCCCGT	TACTCAAGAG	GTGGTGGTGC	300
ATCAGAAGGA	AGCTGGAGGA	ATTAGTAGGT	<u>TAGAATTCTG</u>	AA	342

sre 4-c4

AACATATGTC	TGTTGAGGTT	GAATACAGAT	GCTTCGTGGG	TGGGCTCGCA	50
TGGGCTACCA	ACGATAGAAC	CTTAGGAGAA	GCTTTTTTCTC	AGTACGGCAA	100
TGTGGTCGAC	TCCAAGGTCC	GTTTGTGCA	TAGCAGAGAT	CAGATCCGAT	150
ACCATTTTAT	TTTGGCTTCG	TTGATCACCT	CATCTCTTTA	CTCTCTCTGT	200
TACTATGCTA	CTTTGTTACT	CTCTCTATGT	TACTGTTACT	ATTTGTTACT	250
CTTACCCTTA	TTCCATTCCCT	TTATACGATT	ATCAACGATC	GCGAAACAGG	300
TAGATCAAGA	GGATTTGGTT	TTGTTACCTT	TACTGATGAG	AAATCCATGA	350
GGAACGCAAT	TGAAGCAATG	AATGGCCAGA	ACCTTGATGG	TCGTAACATC	400
ACTGTTAATG	AAGCTCAATC	ACGCGGAAGC	GGCGGCGGCG	GTGGTGGTTT	450
CGGAGGTGGC	CGACGGGGTG	GTGGTGGTGG	TGGTTTTCGGA	GGTGGTGGCG	500
GATACAATGG	CGGTGGTGGC	GGCTACGGTC	GACGTGAGGG	TGGCAATGGT	550
GGTGGTTATG	GAGGTGGCCG	TGACCGCGGA	TATGGTGGTG	GTGGTGATCG	600
TTATGGTGAT	GGTGGATCCC	GTTACTCAAG	AGGTGGTGGT	GCATCAGAAG	650
GAAGCTGGAG	GAATTAGGTT	AGATATAATA	AAATTCTAAA	TTGGGTTTAT	700
AGTCTAAAAT	ATGTCATAGT	TTTGGTTTGG	AAACTATGTT	TCTGTGTGGG	750
GTTTTGGAGA	GTGTGGGGGT	TTCTTGCTAT	TAACTCGTTA	TGTTACTGGG	800
AGGAAAAGGT	GCAAGGTTCA	ACCATCAAAG	TTTTAAATGA	TCAACCCTTT	850
TTCATAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	900

Anhang F Sequenzen der putativen Proteine Sre 4-p1 bis 4

Dargestellt sind die Sequenzen der kodierten Proteine.

Sre 4-p1

MSVEVEYRCF	VGGLAWATND	RTLGEAFSQY	GNVVDKIIN	DRETGRSRGF	50
GFVTFTDEKS	MRNAIEAMNG	QNLDGRNITV	NEAQRGSGG	GGGGFGGGR	100
GGGGGGFGGG	GGYNGGGGY	GRREGGNGGG	YGGGRDRGYG	GGDRYGDGG	150
SRYSRGGGAS	EGSWRN.				166

Sre 4-p2

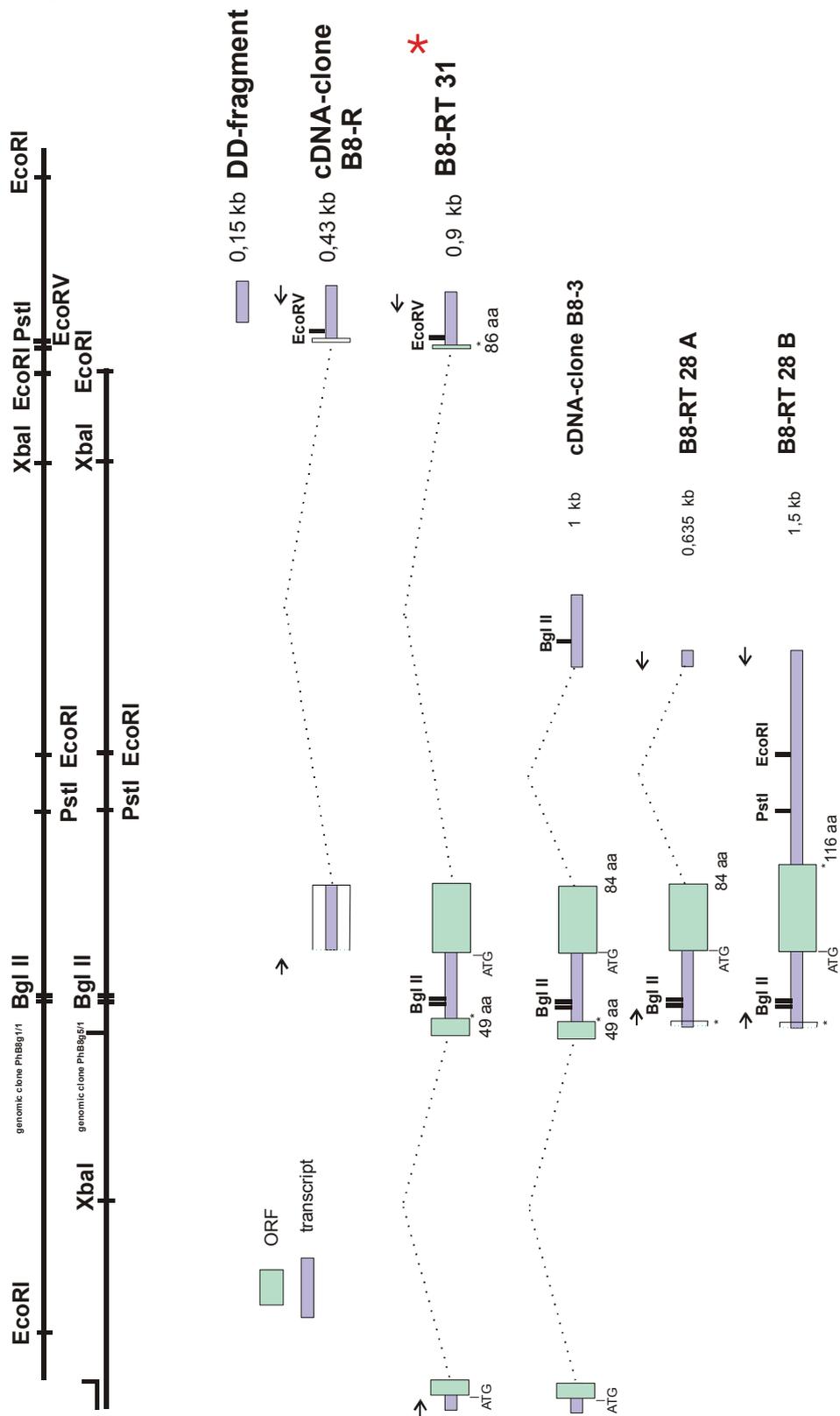
MSVEVEYRCF	VGGLAWATND	RTLGEAFSQY	GNVVDKIVRL	LHSRDQIRYH	50
FILASLITSS	LYSLCYATL	LLSLCYCYL	LLLPLFHSFI	RYVTLKIDRF.	100

Sre 4-p3

MSVEVEYRCF	VGGLAWATND	RTLGEAFSQY	GNVVDKIIN	DRETGRSRGF	50
GFVTFTDEKS	MRNAIEAMNG	QNLDGTADMV	VVIVMVMVD	PVTQEVVHQ	100
KEAGGIRLDI	IKF.				113

Sre 4-p4

MSVEVEYRCF	VGGLAWATND	RTLGEAFSQY	GNVVDKIVRL	LHSRDQIRYH	50
FILASLITSS	LYSLCYATL	LLSLCYCYL	LLLPLFHSFI	RLSTIAKQVD	100
QEDLVLLPLL	MRNP				114

Anhang G Genstruktur von *sre 2*Abb. 7.1: Struktur des Gens *sre 2*

Die Informationen dieser Abbildung sind der Arbeit von Kistner (1999) entnommen. Sie zeigt eine Auswahl der cDNA-Klone in Relation zu den beiden genomischen Klonen. Der mit * markierte cDNA-Klon wurde in Pflanzen in *sense*- und *antisense*-Orientierung exprimiert.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, den 19. April 2001

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dierk Scheel danke ich herzlich für die guten Arbeitsmöglichkeiten am IPB, die Unterstützung und Förderung meiner Arbeit, die mir ein freies und kreatives Arbeiten ermöglicht hat, sowie für seine stete Diskussionsbereitschaft und die Möglichkeit, an Konferenzen teilnehmen zu können.

Dr. Thorsten Nürnberger gilt für die kritische Durchsicht dieses Manuskriptes sowie für seine vielfältige fachliche wie persönliche Unterstützung mein besonderer Dank.

Dr. Norbert Nass und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die Arbeitsmöglichkeiten in seinem Labor, sowie für seine fachliche wie persönliche Diskussionsbereitschaft. Barbara Degner danke ich für die technische Unterstützung bei den Proteinarbeiten und der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die nette Atmosphäre im Labor.

Der Kartoffelarbeiten Arbeitsgruppe danke ich für das anregende Arbeitsklima. Insbesondere Dr. Catherine Kistner möchte ich für die Einweisung in das Thema und ihre stete Hilfsbereitschaft danken. Angelika Weinelt danke ich für die technische Unterstützung und die fürsorgliche Pflege der Gewebekultur und Dr. Peter Landgraf danke ich für sein offenes Ohr, dass nicht nur fachlichen Dingen Gehör geschenkt hat.

Ich möchte allen danken, die dazu beigetragen haben, dass mir auch die Zeit in Halle in netter Erinnerung bleiben wird, insbesondere Astrid, Bettina, Cathi, Dirk, Edda, Frederic, Ingo, Karoline, Kirsten, Norbert, Peter, Thomas, Thorsten, Trixi und Wolfgang.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir mein Studium ermöglicht hat, und mich immer in der Verfolgung meiner Ziele unterstützt hat; ebenso wie meinen Freunden Ingrid, George und Dirk, auf die ich mich auch in schwierigen Zeiten immer verlassen konnte.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Birgit Kemmerling
geboren: 09. März 1970 in Warburg/Westf.
Familienstand: ledig

Ausbildung

1976 bis 1980 Grundschule Hasslinghausen
1980 bis 1981 Städtisches Gymnasium Gevelsberg
1981 bis 1989 Gymnasium Marianum Warburg

WS 1989/ WS 1995 Studium der Biologie an der RWTH-Aachen

11/1994 bis 02/1996 Diplomarbeit am Institut für Pflanzenphysiologie der
RWTH-Aachen bei Herrn Prof. Dr. K.-H. Kogel.

SS 1996 Studium der Umweltwissenschaften an der RWTH-
Aachen

Promotion

06/1996 bis 03/2001 Doktorandin am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in
Halle bei Herrn Prof. Dr. D. Scheel.

seit 4/2001 Wissenschaftliche Angestellte am Leibniz-Institut für
Pflanzenbiochemie in Halle bei Prof. Dr. D. Scheel/ Dr. N.
Naß