

**Die Rolle von Jasmonat, 12-Oxophytodiensäure (OPDA) und  
Salicylat bei der induzierten Resistenz in Kartoffel  
(*Solanum tuberosum* L.)**



**Dissertation**

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

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Fachbereich Biochemie/Biotechnologie)

von Astrid Veß, geb. Hunger,  
geboren am 03. April 1975 in Halle (Saale)

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dierk Scheel
2. Prof. Dr. Ivo Feußner
3. Prof. Dr. Gerd-Joachim Krauß

Halle (Saale), 20.12.2004

**urn:nbn:de:gbv:3-000008029**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008029>]

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Konstitutive Abwehrmechanismen</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2</b>	<b>Pathogenperzeption und Signaltransduktion</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3</b>	<b>Induzierte Systemische Resistenz</b> .....	<b>5</b>
1.3.1	Salicylat-abhängige systemische Resistenz .....	6
1.3.2	Salicylat-unabhängige Abwehrmechanismen .....	9
1.3.2.1	JA-abhängige Abwehrmechanismen .....	9
1.3.2.2	ET-abhängige Abwehrmechanismen .....	12
<b>1.4</b>	<b>Crosstalk der verschiedenen Abwehrmechanismen</b> .....	<b>12</b>
<b>1.5</b>	<b>Systemische Resistenz in Kartoffel</b> .....	<b>14</b>
<b>1.6</b>	<b>Anwendungen von <i>scFv</i>-Antikörpern in Pflanzen</b> .....	<b>16</b>
<b>1.7</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b> .....	<b>19</b>
2.1.1	Medien .....	19
2.1.2	Phagen, Plasmidvektoren und Bakterienstämme .....	19
2.1.3	Pflanzen .....	20
2.1.3.1	Anzucht .....	20
2.1.3.2	Transformation mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	20
2.1.3.3	Behandlung der Blätter mit Pathogenen .....	21
2.1.3.4	Verwundung der Pflanzen und Behandlung mit Methyljasmonat .....	21
2.1.4	Bakterien .....	22
2.1.4.1	Kultivierung von <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> ( <i>Psm</i> M2) .....	22
2.1.4.2	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ) .....	22
2.1.4.2.1	Herstellung kompetenter Zellen .....	22
2.1.4.2.2	Transformation .....	22
2.1.4.3	Kultivierung von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	23
2.1.4.3.1	Herstellung kompetenter Zellen .....	23
2.1.4.3.2	Transformation .....	23
2.1.5	Oomycet <i>Phytophthora infestans</i> - Isolation von Zoosporensuspensionen und Trypanblaufärbung des Mycels .....	23
2.1.6	Oligonukleotide .....	24

<b>2.2</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>24</b>
2.2.1	Nukleinsäureanalytik und Herstellung rekombinanter DNA .....	24
2.2.1.1	RNA-Isolierung .....	24
2.2.1.1.1	Lithiumchlorid-Methode (Logemann <i>et al.</i> , 1987) .....	24
2.2.1.1.2	Trizol-Methode (Chomczynski und Sacchi, 1987) .....	25
2.2.1.2	DNA-Isolierung .....	25
2.2.1.2.1	Präparation von genomischer DNA aus Pflanzen .....	25
2.2.1.2.2	Präparation von Plasmid-DNA .....	25
2.2.1.3	Agarose-Gelelektrophorese .....	26
2.2.1.3.1	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese .....	26
2.2.1.3.2	Nichtdenaturierende Agarose-Gelelektrophorese .....	27
2.2.1.4	Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten .....	27
2.2.1.5	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten .....	27
2.2.1.6	Transfertechniken .....	27
2.2.1.6.1	Northern-Transfer .....	27
2.2.1.6.2	Southern-Transfer .....	28
2.2.1.7	Radioaktive Hybridisierung .....	28
2.2.1.8	<i>Reverse Northern- Blot</i> .....	28
2.2.1.8.1	Herstellung der Sonden .....	28
2.2.1.8.2	Auswertung der Filter mittels „Array Vision“ .....	29
2.2.1.9	<i>Screening</i> von <i>Phage Display</i> -Bibliotheken .....	30
2.2.1.9.1	Eigenschaften der verwendeten Bibliotheken .....	30
2.2.1.9.2	Anzucht der Phagen-Bibliotheken .....	30
2.2.1.9.3	Anzucht der Helferphagen .....	31
2.2.1.9.4	<i>Screening</i> der Phagenbank und Selektion spezifisch bindender Phagen .....	31
2.2.1.9.5	Produktion löslicher <i>scFv</i> -Antikörper .....	32
2.2.1.10	Klonierungstechniken .....	33
2.2.1.10.1	Dephosphorylierung .....	33
2.2.1.10.2	Ligation .....	33
2.2.1.10.3	PCR .....	33
2.2.1.11	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse .....	34
2.2.1.11.1	Automatisierte Sequenzierung .....	34
2.2.1.11.2	Computergestützte Sequenzanalyse .....	34
2.2.2	Proteinanalytik .....	34
2.2.2.1	Proteinisolierung .....	34

2.2.2.1.1	Proteinisolierung aus bakteriellem Überstand von <i>E. coli</i> HB2151 .....	34
2.2.2.1.2	Proteinisolierung aus Pflanzenmaterial .....	34
2.2.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	35
2.2.2.3	Western-Transfer und Immunodetektion .....	35
2.2.2.3.1	Western-Transfer .....	35
2.2.2.3.2	Immunodetektion .....	35
2.2.2.4	Reinigung der <i>scFv</i> -Antikörper mittels ProteinL-Säulen .....	36
2.2.2.5	Enzymimmuntest (ELISA) .....	36
2.2.2.5.1	Phagen-ELISA .....	37
2.2.2.5.2	ELISA mit löslichen, bakteriellen <i>scFv</i> -Antikörpern .....	37
2.2.2.5.3	ELISA mit gereinigten <i>scFv</i> -Antikörpern aus der Pflanze .....	37
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Analyse der Genexpression im Wildtyp <i>S. tuberosum</i> L. cv. Désirée nach Pathogenbehandlung mit <i>Psm</i> M2</b> .....	<b>38</b>
3.1.1	Analyse der Transkriptakkumulation von LOX- und Abwehrgenen mittels Northern-Blot-Hybridisierung .....	38
3.1.2	Analyse der Transkriptakkumulation verschiedener Gene mittels <i>Reverse Northern</i> .....	40
<b>3.2</b>	<b>Analyse der Expression des Gens <i>StPRB-1b</i> im Wildtyp <i>S. tuberosum</i> L. cv. Désirée nach Behandlung mit dem Oligopeptidelicitor Pep13</b> .....	<b>42</b>
<b>3.3</b>	<b>Generierung von <i>nahG</i>-Pflanzen</b> .....	<b>43</b>
<b>3.6</b>	<b>Analyse der Akkumulation des <i>StPRB1b</i>-Transkriptes in den ausgewählten transgenen <i>nahG</i>-Linien nach Behandlung mit Pep13</b> .....	<b>43</b>
<b>3.5</b>	<b>Isolierung von <i>scFv</i>-Antikörpern, die spezifisch an BSA-gekoppelte JA bzw. OPDA binden</b> .....	<b>45</b>
3.5.1	<i>Screening</i> einer menschlichen <i>scFv</i> -Antikörper-Expressionsbibliothek mittels <i>Phage Display</i> .....	45
3.5.2	Isolierung spezifischer <i>scFv</i> -Antikörper mittels ELISA .....	46
3.5.3	Nachweis der <i>scFv</i> -Antikörperexpression in <i>E. coli</i> mittels Western-Blot .....	48
<b>3.6</b>	<b>Konstruktion der zur Pflanzentransformation verwendeten Kassetten</b> .....	<b>48</b>
3.6.1	Klonierungsstrategie zur Akkumulation der <i>scFv</i> -Antikörper im ER .....	49
3.6.2	Klonierungsstrategie zur Akkumulation der <i>scFv</i> -Antikörper im Cytosol .....	49
3.6.3	Klonierungsstrategie zur Akkumulation der <i>scFv</i> -Antikörper in den Chloroplasten .....	49
<b>3.7</b>	<b>Pflanzentransformation</b> .....	<b>50</b>

<b>3.8</b>	<b>Funktionelle Analyse der generierten transgenen Pflanzen nach Verwundung und Behandlung mit Methyljasmonat (MeJA)</b> .....	<b>51</b>
3.8.1	Auswahl transgener Pflanzen mit beeinträchtiger Wundantwort .....	52
3.8.2	Transkriptanalyse von <i>StPIN2</i> nach Behandlung der transgenen Linien mit MeJA .....	53
<b>3.9</b>	<b>Western-Blot-Analyse der ausgewählten transgenen Pflanzen</b> .....	<b>54</b>
<b>3.10</b>	<b>Reinigung verschiedener <i>scFv</i>-Antikörper aus Blattgewebe der transgenen Pflanzen und Analyse der gereinigten <i>scFv</i>-Antikörper mittels ELISA</b> .....	<b>55</b>
<b>3.11</b>	<b>Immunlokalisation der <i>scFv</i>-Antikörper <i>in planta</i></b> .....	<b>57</b>
<b>3.12</b>	<b>Analyse der Genexpression der ausgewählten transgenen <i>scFv</i>-Antikörper-Pflanzen nach der Behandlung mit <i>Psm M2</i></b> .....	<b>58</b>
3.12.1	Analyse der Transkriptakkumulation von <i>StCHTA</i> mittels Northern-Blot-Hybridisierung im <i>Psm M2</i> -behandelten Blattgewebe der transgenen Linien ...	58
3.12.2	Analyse der Transkriptakkumulation verschiedener Gene mittels <i>Reverse Northern</i> im <i>Psm M2</i> -behandelten Blattgewebe der transgenen Linien .....	60
3.12.3	Analyse der Transkriptakkumulation verschiedener Gene im systemischen Blattgewebe der transgenen Linien #57 und #98 nach der Behandlung mit <i>Psm M2</i> .....	63
<b>3.13</b>	<b>Analyse der Genexpression in den transgenen <i>scFv</i>-Antikörper-Pflanzen nach der Behandlung mit dem Oligopeptidelicitor Pep13</b> .....	<b>65</b>
3.13.1	Analyse der Transkriptakkumulation von <i>StPRB1b</i> mittels Northern-Blot-Hybridisierung im Pep13-behandelten Blattgewebe der transgenen Linien .....	65
3.13.2	Analyse der Transkriptakkumulation von <i>StPRB1b</i> mittels Northern-Blot-Hybridisierung im systemischen Blattgewebe Pep13-behandelter transgener Linien .....	67
3.13.3	Analyse der Transkriptakkumulation verschiedener Gene mittels <i>Reverse Northern</i> im systemischen Blattgewebe Pep13-behandelter transgener Linien ..	68
<b>3.14</b>	<b>Analyse der Interaktion <i>Phytophthora infestans</i> und der transgenen <i>scFv</i>-Antikörper-Pflanzen</b> .....	<b>69</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>72</b>
4.1	Analyse der lokalen und systemischen Resistenzinduktion in WT-Pflanzen nach der Behandlung mit <i>Psm M2</i> .....	72
4.2	Analyse der lokalen und systemischen Resistenzinduktion in WT-Pflanzen nach der Behandlung mit dem Oligopeptidelicitor Pep13 .....	74
4.3	Einfluss von SA auf die Induktion der Abwehrgenexpression in Kartoffel .....	75
4.4	Immunmodulation als Methode zur Analyse der Funktion von Phytohormonen	76

4.5	Isolierung von spezifischen JA bzw. OPDA bindenden <i>scFv</i> -Antikörpern mittels <i>Phage Display</i> .....	77
4.6	Herstellung transgener <i>scFv</i> -Antikörper-Pflanzen .....	79
4.7	Analyse der verwendeten <i>scFv</i> -Fragmente <i>in planta</i> und Auswahl transgener <i>scFv</i> -Antikörper-Pflanzen .....	82
4.8	Einfluss von JA/OPDA auf die Induktion der Abwehrgenexpression nach der Behandlung mit <i>Psm</i> M2 und Pep13 in Kartoffel .....	84
4.9	Einfluss von JA/OPDA auf die Induktion der Expression verschiedener Gene nach der Behandlung mit <i>Psm</i> M2 und Pep13 in Kartoffel .....	86
4.10	Einfluss von JA/OPDA auf die Interaktion der <i>scFv</i> -Antikörper-Pflanzen mit <i>Phytophthora infestans</i> .....	88
4.11	Waren die beobachteten Unterschiede in den transgenen <i>scFv</i> -Antikörper-Pflanzen nach Pathogenbehandlung kompartiment- oder sequenzspezifisch? ...	90
4.12	Ausblick .....	91
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>93</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>95</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>121</b>
	Anhang 1: Phagen-ELISA .....	121
	Anhang 2: ELISA mit bakteriellen, löslichen <i>scFv</i> -Antikörpern .....	122
	Anhang 3: pIT1-Vektorkarte .....	123

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Adenin
<i>A. solani</i>	<i>Alternaria solani</i>
AA	Arachidonsäure
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AOC	Allenoxidcyclase
AOS	Allenoxidsynthase
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
Avr	Avirulenz
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
BTH	Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-carbothiosäure-S-methylester
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C4H	Zimtsäure-4 Hydroxylase
ca.	circa
CA	Colnellsäure
CaMV	Blumenkohl-Mosaik-Virus
cDNA	komplementäre DNA
cfu	<i>colony forming units</i>
4-CL	4-Cumarat:CoA-Ligase
CnA	Colnelensäure
cv.	Kultivar
d	Tag(e)
d. h.	das heißt
DH	Dehydrogenase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Enzymimmuntest)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	und andere
ET	Ethylen
Fab	<i>fragment antigen binding</i>

FG	Frischgewicht
Fv	variable Domäne des Antikörpermoleküls
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanin
GA	Gibberellinsäure
13-HPOT	(9Z, 11E, 13S, 15Z)-13-Hydroperoxy-9,11,15-octadecatriensäure
h	Stunde(n)
HR	Hypersensitive Reaktion
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Peroxidase aus Meerrettich)
IgG	Immunglobulin G
INA	2,6-Dichlorisonicotinsäure
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid
ISR	Induzierte systemische Resistenz
JA	Jasmonsäure
JMT	Jasmonsäurecarboxylmethyltransferase
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LegB4	Legumin B4
LOX	Lipoxygenase
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>leucinrich repeats</i>
M	mol/l
mA	Milliampère
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MeJA	Methyljasmonat
MES	Morpholinoethansulfonsäure
min	Minute
mRNA	messenger RNA
N-Terminus	Aminoterminus, aminoendständiger AS-Rest
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduziert)
<i>nahG</i>	Salicylathydroxylasegen aus <i>Pseudomonas putida</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
OPDA	(10Z,15Z)-12-Oxo-10,15-phytodiensäure
OPR3	12-Oxo-PDA-Reduktase



<i>P. infestans</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
<i>P. parasitica</i>	<i>Phytophthora parasitica</i>
<i>P.p.</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Psp</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAL	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCD	<i>programmed cell death</i>
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pers.	persönliche
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
PR	<i>pathogenesis related</i>
Psm	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>
pv.	Pathovar
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	Resistenz
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
<i>S. tuberosum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
SA	Salicylsäure
SAR	„systemic acquired resistance“, systemisch erworbene Resistenz
<i>scFv</i>	<i>single-chain Fv</i> (Einketten-Antikörper)
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
THT	Hydroxyzimtsäure-CoA-Transferase
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TMV	Tabakmosaikvirus
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer RNA
TSP	<i>total soluble protein</i>

UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
VH	variabler Teil der schweren Antikörperkette
VL	variabler Teil der leichten Antikörperkette
Vol.	Volumenanteile
w/v	Gewicht/Volumen
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

Ein- und Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren:

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

## 1 Einleitung

Aufgrund ihrer sessilen Lebensweise ist es für Pflanzen von entscheidender Bedeutung, sich den gegebenen Umweltbedingungen anzupassen. Neben der Adaptation an bestehende Klima- und Bodenverhältnisse müssen sie sich auch gegenüber Angriffen von Bakterien, Viren, Pilzen, Insekten und anderer Feinde schützen.

Die Grundvoraussetzung, diesen Angriff verschiedenster Pathogene zu überleben, ist die Fähigkeit, zwischen *eigen* und *fremd* zu unterscheiden, die eine wesentliche Eigenschaft aller lebenden Organismen ist. Sie bildet die Grundlage der Aktivierung von Abwehrmechanismen der sogenannten angeborenen Immunität (*innate immunity*) (Nürnberger und Brunner, 2002; Nürnberger und Scheel, 2001).

In Pflanzen unterscheidet man generell zwei Typen der pflanzlichen Pathogenresistenz. Die vorherrschende Form der pflanzlichen Krankheitsresistenz bezeichnet man auch als Spezies-, Nichtwirts- oder Basisresistenz (Heath, 2000). Sie beruht neben den konstitutiven Barrieren auch auf induzierbaren Abwehrmechanismen. Da die Pflanzen nicht über ein spezielles Immunsystem wie z. B. das der Wirbeltiere verfügen, ist jede Pflanzenzelle mit diesen Abwehrmechanismen ausgestattet (Ebel und Mithöfer, 1998; Lam *et al.*, 2001). Ist das Pathogen in der Lage, die Basisresistenz zu überwinden, wird die Pflanze zu einer Wirtspflanze, und man spricht in diesem Zusammenhang von einer kompatiblen Interaktion (Basiskompatibilität). Dieses Phänomen stellt aber eher die Ausnahme als die Regel dar (Heath, 2000).

Die sorten- oder kultivarspezifische Form der Wirtsresistenz tritt auf, wenn Wirtspflanzen (Kultivare einer Pflanzenspezies) gegenüber einzelnen Rassen eines Pathogens Resistenzen ausprägen und damit eine inkompatible Wechselbeziehung vorliegt (Heath, 2000; Cohn *et al.*, 2001; Dangl und Jones, 2001) Diese Inkompatibilität von Wirt und Pathogen ist von den Genotypen der Wirtspflanzensorte sowie der Pathogenrasse abhängig und wird durch die von Flor (1971) aufgestellte „Gen-für-Gen“-Hypothese beschrieben. Dabei kommt es nur in Anwesenheit eines dominanten, pflanzlichen Resistenzgens (R-Gen) und des dazu komplementären, dominanten, mikrobiellen Avirulenzgens (Avr-Gen) zur inkompatiblen Pflanze-Pathogen-Interaktion. Die direkte oder indirekte Interaktion dieser Genprodukte führt zur Auslösung von Abwehrreaktionen und somit letztlich zur Resistenzausprägung (van der Biezen und Jones, 1998; Takken und Joosten, 2000; Dangl und Jones, 2001; Schneider, 2002). Bisher sind mehr als 40 R-Gene identifiziert worden (Hammond-Kosack und Parker, 2003). Als häufige Strukturmerkmale wurden leuzinreiche Sequenzwiederholungen (LRRs, leucine rich repeats) und „coiled-coil“-Domänen beschrieben, die in der Lage sind, Protein/Protein-Wechselwirkungen einzugehen (Kobe und Kajava, 2001).

Nach der Erkennung des Pathogens kann es, unabhängig ob es sich um eine Nichtwirts- oder rassenspezifische Erkennung handelt, zur Ausprägung lokaler (Kap. 1.2) bzw. systemischer (SAR) (Kap. 1.3) Resistenzen kommen, die einen Schutz der ganzen Pflanze gegen Pathogene gewährleisten (Dong, 2001).

## 1.1 Konstitutive Abwehrmechanismen

Zu den konstitutiven Abwehrstrategien zählen strukturelle Barrieren an der Zelloberfläche, wie z. B. durch Lignineinlagerungen verstärkte Zellwände. Zusätzlich können lipophile Blattüberzüge, die Anzahl und Beschaffenheit der Stomata und in der Zellwand gespeicherte antimikrobielle Substanzen (z. B. Phenolderivate, Saponine, cyanogene Glycoside, Acetophenone) das Eindringen und das Wachstum der Pathogene hemmen. Antibiotisch wirkende Substanzen finden sich auch als Glycosidderivate in der Vakuole und können nach dem Eindringen des Pathogens in die Zelle durch Abspaltung des Zuckerrestes aktiviert werden (Osbourn, 1996).

## 1.2 Pathogenperzeption und Signaltransduktion

Gelingt es dem Pathogen diese konstitutiven Barrieren zu überwinden, ist für die Initiation der aktiven Pathogenabwehr die Wahrnehmung pathogenspezifischer Strukturen durch pflanzliche Perzeptionssysteme erforderlich. Diese Pathogen-assoziierten Oberflächenstrukturen, sogenannte „generelle Elicitoren“, sind als Auslöser von sorten- oder nichtkultivarspezifischen Abwehrreaktionen in Pflanzen beschrieben worden (Boller, 1995; Ebel und Scheel, 1997; Nürnberger, 1999).

Ursprünglich wurden unter dem Begriff Elicitor Moleküle zusammengefasst, die über die Fähigkeit zur Bildung und Akkumulation von Phytoalexinen, niedermolekularen, antimikrobiell wirkenden Substanzen, verfügten (Keen, 1975; Darvill und Albersheim, 1984). Inzwischen bezeichnet man alle Signalsubstanzen, die in Pflanzen Abwehrreaktionen auslösen, als Elicitoren (Boller, 1995; Ebel und Scheel, 1997; Nürnberger, 1999).

Pflanzen sind also in der Lage, spezielle Strukturen auf Pathogenoberflächen zu erkennen und diese zur Aktivierung ihres Abwehrsystems zu nutzen. Dabei scheint der Mechanismus der *fremd*-Erkennung und der anschließenden Aktivierung angeborener Immunreaktionen (*innate immunity*) evolutionär stark konserviert zu sein (Medzhitov und Janeway, 1997; Aderem und Ulevitch, 2000; Khush und Lemaitre, 2000; Imler und Hoffmann, 2001; Underhill und Ozinsky, 2002). Für die Aktivierung der angeborenen Abwehrmechanismen sind im tierischen System charakteristische mikrobielle Strukturen auf der Pathogenoberfläche, die sogenannten PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), von entscheidender Bedeutung. PAMPs zeichnen sich durch ihre stark konservierte Struktur aus, die in potentiellen Wirtsorganismen nicht vorkommen. Außerdem sind sie für bestimmte Lebensfunktionen des Pathogens wichtig und deshalb evolutionär stark konserviert (Medzhitov und Janeway, 1997; Aderem und Ulevitch, 2000). Zu den PAMPs, die in verschiedenen Vertebraten und Invertebraten die entsprechenden angeborenen Abwehrmechanismen auslösen, zählt man die Lipopolysaccharidhülle (LPS) gramnegativer Bakterien, Peptidoglykane der grampositiven Bakterien, eubakterielles Flagellin,

unmethylierte bakterielle DNA-Fragmente sowie Glucane, Chitine, Mannane und Proteine, die aus der pilzlichen Zellwand stammen (Nürnberger und Brunner, 2002).

Interessanterweise sind viele dieser Moleküle ((Glyko)Proteine, Peptide, Oligosaccharide und Lipide) schon sehr lange als generelle Elicitoren von Abwehrmechanismen in Pflanzen beschrieben (Boller, 1995; Ebel und Scheel, 1997; Nürnberger, 1999; Dow *et al.*, 2000). Die molekularen und physiologischen Funktionen dieser Elicitoren sind häufig noch ungeklärt. Für einige Elicitoren konnte gezeigt werden, dass sie als Toxine wirken bzw. über Enzymaktivität verfügen (van't Sloot und Knogge, 2002). Beispiele für Enzyme mit Elicitoraktivität sind Transglutaminasen aus *Phytophthora* (Brunner *et al.*, 2002), Xylanasen aus *Trichoderma* (Enkerli *et al.*, 1999; Furman-Matarasso *et al.*, 1999) und Endopolygalakturonasen von *Erwinia carotovora* (Davis *et al.*, 1984; Davis und Hahlbrock, 1987). Für verschiedene generelle Elicitoren, wie z. B. Pep-13, bakterielles Flagellin, aber auch Glucane und Chitine sowie ein RNA-Bindungsprotein, konnte gezeigt werden, dass sie über die bereits erwähnten Charakteristika von PAMPs verfügen und deshalb als solche bezeichnet werden können (Brunner *et al.*, 2002; Nürnberger und Brunner, 2002; Gómez-Gómez und Boller, 2002; Felix und Boller, 2003).

Aufgrund der hohen strukturellen Diversität der bisher untersuchten Elicitoren (Oligosaccharide, Peptide, Proteine, Lipide) kann die Existenz eines universellen strukturellen Motivs zur Auslösung der pflanzlichen Pathogenabwehr ausgeschlossen werden (Montesano *et al.*, 2003). Vielmehr ist davon auszugehen, dass strukturell charakteristische Elicitoren durch entsprechende Rezeptoren erkannt werden und damit Auslöser der pflanzlichen Abwehr sind. Man nimmt an, dass die Effizienz der Pathogenabwehr von der Fähigkeit der Pflanze abhängt, komplexe statt einfache Pathogenstrukturen wahrzunehmen (Boller, 1995; Ebel und Scheel, 1997; Nürnberger und Brunner, 2002). Dabei sind die Muster der durch generelle Elicitoren bzw. durch AVR-Proteine (spezielle Elicitoren) ausgelösten Abwehrmechanismen in Pflanzen sehr ähnlich (Yang *et al.*, 1997; Nürnberger und Scheel, 2001).

Obwohl die Mechanismen der Signalwandlung vergleichbar sind, werden nach der Erkennung des Pathogens durch die Pflanze nur für diese Interaktion spezifische Signaltransduktionskomponenten sowie entsprechende sekundäre Botenstoffe aktiviert. So werden in einer sehr schnellen Reaktion Ionenkanäle der Plasmamembran aktiviert, so dass es zum Efflux von  $\text{Cl}^-$  und  $\text{K}^+$  sowie dem Influx von  $\text{H}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  kommt (Atkinson *et al.*, 1996; Gelli *et al.*, 1997; Jabs *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 1997; Blatt *et al.*, 1999; Klüsener und Weiler, 1999). Dabei deuten verschiedene Inhibitor- und Effektorstudien daraufhin, dass heterotrimere G-Proteine als Bindeglied zwischen Elicitorperzeption und den Ionenflüssen fungieren könnten (Beffa *et al.*, 1995; Kawasaki *et al.*, 1999). Durch den Anstieg der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen und die Depolarisierung der Plasmamembran wird die Bildung von extrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wie Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Superoxidationen ( $\text{O}_2^-$ ) und Hydroxylradikalen ( $\cdot\text{OH}$ ), dem *oxidative burst*, induziert (Grant und Loake, 2000; Blume *et al.*, 2000). Dabei wirken die durch membranständige NADPH-Oxidasen und/oder apoplastische Peroxidasen gebildeten ROS nicht nur toxisch auf

eindringende Pathogene (Lamb und Dixon, 1997), sondern katalysieren außerdem die oxidative Vernetzung der Zellwand und sind an Signaltransduktionskaskaden beteiligt (Bradley *et al.*, 1992). Neben der ROS-vermittelten oxidativen Vernetzung der Zellwand wird die Penetrationsstelle zusätzlich durch die Auflagerung von Kallose auf die Plasmamembran (Kauss *et al.*, 1989), die Einlagerung von Lignin sowie durch die Einlagerung und Vernetzung der im Verlauf der Pathogenese neusynthetisierten hydroxyprolin- und prolinreichen Glykoproteine verstärkt (Bowles 1990, Bradley *et al.*, 1992).

Um eine Ausbreitung des Pathogens in nichtinfiziertes Gewebe zu verhindern, kommt es zur Auslösung der Hypersensitiven Reaktion (HR) und damit zum Absterben der pflanzlichen Zellen am Infektionsort durch die Aktivierung des programmierten Zelltods (PCD). Dabei steht die HR in direktem Zusammenhang mit der massiven Produktion von ROS. Das Absterben der Zellen führt zu makroskopisch sichtbaren Nekrosen. Obwohl die HR Bestandteil sowohl der Nichtwirts- als auch der Wirtsresistenz ist, konnte ein kausaler Zusammenhang zwischen der Ausprägung der HR und der Induktion anderer Abwehrmechanismen bzw. von Resistenz nicht nachgewiesen werden (Kombrink und Schmelzer, 2001). Im Zusammenspiel mit ROS konnte auch für Stickstoffmonoxid (NO) die Beteiligung an der transkriptionellen Aktivierung pflanzlicher Abwehrgene beschrieben werden (Durner *et al.*, 1998; Klessig *et al.*, 2000; Wendehenne *et al.*, 2001).

Einen wesentlichen Teil der Signaltransduktionskaskade bildet die *de novo*-Synthese zahlreicher Proteine, die durch eine transkriptionelle Aktivierung der korrespondierenden Gene ausgelöst wird. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass MAP (*mitogen activated protein*)-Kinasekaskaden wesentlicher Bestandteil der Signaltransduktion sind (Zhang und Klessig, 2001; Jonak *et al.*, 2002). So konnte in Petersilie die Beteiligung einer nach Behandlung mit Pep13 in den Zellkern translozierten MAPK an der Aktivierung der Abwehrgenexpression, die von Transkriptionsfaktoren des WRKY-Typs abhängig ist, gezeigt werden (Ligterink *et al.*, 1997; Kroj *et al.*, 2003). Die aktivierten Gene kodieren u.a. für Enzyme des generellen Phenylpropanstoffwechsels, wie z. B. Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL), die Zimtsäure-4-Hydroxylase (C4H) und die 4-Cumarat:CoA-Ligase (4CL), die die Akkumulation von Phytoalexinen und die Synthese von Ligninvorstufen katalysieren (Weisshaar und Jenkins, 1998).

Außerdem akkumulieren die Transkripte der sogenannten *pathogenesis related proteins* (PR-Proteine) und anderer *defense related proteins*. PR-Proteine sind durch ihre Abwesenheit in gesunden Pflanzen charakterisiert. Sie wurden bislang in mehr als 40 Spezies gefunden und werden in mindestens 14 Klassen eingeteilt. Zu ihnen zählt man die  $\beta$ -1,3-Glucanasen (PR-2), Chitinasen (PR-3, 4, 8, 11), Proteinase-Inhibitoren (PR-6), Endoproteinasen (PR-7), Peroxidasen (PR-9), Proteine mit Ähnlichkeiten zu Ribonukleasen (PR-10) sowie Proteine mit antifugalen Eigenschaften (Hammond-Kosack und Jones, 2000). Neben den klassischen PR-Proteinen akkumulieren nach Pathogenbefall auch glycinreiche Proteine (Bowles, 1990), Defensine (Penninckx *et al.*, 1996), Thionine (Epple *et al.*, 1995) und Lipoxygenasen (Rosahl, 1996). Lipoxygenasen sind an der Synthese von Signalmolekülen wie der Jasmonsäure (JA)

und der Bildung antimikrobieller Verbindungen wie z. B. C<sub>6</sub>-Aldehyden beteiligt (Blee, 1998).

Im Zuge der Signaltransduktion und der damit einhergehenden Signalverstärkung werden neben JA auch andere sekundäre Signalmoleküle gebildet. Zu diesen sekundären Signalmolekülen gehören Salicylsäure (SA) und Ethylen (ET). Untersuchungen an *Arabidopsis*-Mutanten legen die Vermutung nahe, dass biotrophe Pathogene SA-abhängige Abwehrreaktionen induzieren, während JA und Ethylen zur Abwehr nekrotropher Pathogene und Herbivore von entscheidender Bedeutung sind (Thomma *et al.*, 2001; Howe *et al.*, 1996; McConn *et al.*, 1997). Neben der lokalen Abwehr sind die sekundären Signalmoleküle auch Bestandteil der induzierten Resistenz.

### 1.3 Induzierte Systemische Resistenz

Bei vielen Pflanzen kann durch eine lokal begrenzte Infektion eine systemische Resistenz ausgelöst werden, die zu einer Reduktion der Krankheitssymptome nach erneutem Pathogenbefall im nicht-infizierten Gewebe führt.

Man unterscheidet zwei Formen der systemischen Resistenz. Die systemisch erworbene Resistenz (SAR, *systemic acquired resistance*) ist durch ihre langanhaltende Wirkung (Wochen bis Monate) gegenüber einer Vielzahl von Pathogenen gekennzeichnet (Ryals *et al.*, 1996; Sticher *et al.*, 1997). Daneben wurde die durch nicht-pathogene Wurzelbakterien hervorgerufene induzierte systemische Resistenz (ISR) beschrieben (Pieterse *et al.*, 1998).

Bisher ist SAR am besten in *Arabidopsis* (Uknes *et al.*, 1992; 1993; Cameron *et al.*, 1994; Kunkel und Brooks, 2002), Tabak und Gurke (Métraux *et al.*, 1991; Ward *et al.*, 1991; Vernooij *et al.*, 1995; Friedrich *et al.*, 1996) untersucht. Sie konnte aber auch in Tomate (Cohen *et al.*, 1993; 1994, Cohen, 1994), Kartoffel (Strömberg und Brishammar, 1991; 1993; Cohen *et al.*, 1993; Coquoz *et al.*, 1995; Kombrink *et al.*, 1995) und anderen dikotelydonen Pflanzen beschrieben werden (Madamanchi und Kuc, 1991; Kessmann *et al.*, 1994a; b). Auch für die monokotelydonen Pflanzen Reis und Gerste ist die SA-abhängige systemische Resistenz bekannt (Smith und Métraux, 1991; Reimann *et al.*, 1995; Görlach *et al.*, 1996).

Die Ausprägung der SAR korreliert mit der Akkumulation von SA sowohl am Infektionsort als auch im systemischen Gewebe. Ebenso führt die exogene Applikation von SA oder ihrer biologisch aktiven Analoga wie INA (2,6-Dichlorisonikotinsäure) und BTH (Benzo(1,2,3)thiadiazole-7-carbothiosäure-S-Methylester) zur Aktivierung von SAR. Im Gegensatz dazu wird die Ausprägung der SAR durch die Expression des bakteriellen Salicylathydroxylasegens (*nahG*), welches SA durch Umwandlung in Catechol inaktiviert, verhindert (Gaffney *et al.*, 1993). Damit konnte SA als notwendiges und hinreichendes Signalmolekül zur SAR-Induktion bestätigt werden (Ryals *et al.*, 1996).

Dagegen benötigt die durch nicht-pathogene Wurzelbakterien hervorgerufene induzierte systemische Resistenz (ISR) eine funktionelle JA- und Ethylen-Signaltransduktion

(Penninckx *et al.*, 1998; Pieterse *et al.*, 2001). Diese Form der systemischen Resistenz ist im Gegensatz zur SAR unabhängig von der Akkumulation von SA.

In diesem Zusammenhang lassen sich verschiedene Signaltransduktionswege definieren (Abb. 1-2). So kommt es SA-abhängig zur Aktivierung von *PR1*, *PR2* und *PR5* und somit zur Ausprägung der SAR. Daneben wurden zwei verschiedene JA/Ethylen-abhängige Signalwege beschrieben, von denen einer zur Aktivierung von pflanzlichen Defensinen (wie z. B. *PDF1.2*) und der andere zur Ausprägung der ISR führt (Penninckx *et al.*, 1996; Penninckx *et al.*, 1998; Pieterse *et al.*, 1998). In Abhängigkeit vom Pathogen kann die Zusammensetzung der von der Pflanze gebildeten SA- bzw. JA/Ethylenabhängigen Abwehrkomponenten variieren. Die Pflanze nutzt diese Möglichkeit zur Signalvernetzung, dem sogenannten *crosstalk*, zwischen SA- bzw. JA/ET-abhängigen Signalwegen zur Feinabstimmung der Abwehrmechanismen entsprechend dem eindringenden Pathogen (Kunkel und Brooks, 2002; Glazebrook *et al.*, 2003; siehe 1.4).

### 1.3.1 Salicylat-abhängige systemische Resistenz

Die Ausprägung der SAR korreliert mit der Akkumulation von SA und der systemischen Aktivierung verschiedener PR-Gene. Zu diesen Genen zählen u. a. 1,3- $\beta$ -Glukanasen, Chitinasen und PR1-Proteine, die gleichzeitig als Marker für SAR genutzt werden (Ryals *et al.*, 1996).

Inzwischen geben eine Vielzahl von *Arabidopsis*-Mutanten einen näheren Einblick in den SAR-Signalweg. So zeigen *A. thaliana*-Mutanten, die in der Synthese von SA beeinträchtigt sind, eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber verschiedenen Pathogenen (Kunkel und Brooks, 2002).

SA wird in Pflanzen aus Phenylalanin und alternativ aus Chorismat synthetisiert (Übersicht in Shah, 2003). Dabei scheinen die Proteine SID2 und EDS5 direkt beteiligt zu sein (Kunkel und Brooks, 2002; Wildermuth *et al.*, 2001; Nawrath und Métraux, 1999). *SID2* (*salicylic-acid-induction deficient2*) kodiert für eine putative chloroplastenlokalisierte Ischorismatsynthase, welche vermutlich SA über den alternativen Weg synthetisiert (Shah, 2003). *EDS5* (*enhanced disease susceptibility 5*) zeigt Homologien zu Proteinen der Familie der MATE (*multidrug and toxin extrusion*)-Typ-Transporter und könnte am Transport phenolischer Vorstufen von SA beteiligt sein (Nawrath *et al.*, 2002). Die Expression von *EDS5* ist von *EDS1*, *EDS4* und *PAD4* (*phytoalexindeficient 4*) abhängig (Nawrath *et al.*, 2002). Diese Proteine zeigen Homologien zu Lipasen und sind wahrscheinlich an der Regulation der SA-Synthese beteiligt (Feys *et al.*, 2001; Glazebrook, 2001, Jirage *et al.*, 1999).

Pfropfungsexperimente mit *nahG*-Pflanzen bestätigten zwar die Notwendigkeit der Akkumulation von SA zur Ausprägung der SAR, zeigten aber gleichzeitig, dass SA nicht selbst als systemisches Signal fungiert (Vernooij *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1997). Bisher gelang es jedoch nicht, das mobile Signal, welches zur *de novo*-Synthese von SA in den nicht-infizierten Pflanzenteilen führt, zu isolieren.



Ein wesentlicher Aspekt hinsichtlich der Rolle von SA bei der Induktion von SAR war die Identifizierung von Faktoren, die das SA-Signal mit der Expression von PR-Genen verbinden. Interessanterweise konnten bis jetzt nur *A. thaliana*-Mutanten eines genetischen Locus, *npr1* (*nonexpressor of PR genes*, auch als *nim1* und *sail* bekannt), die die SA-Signalkaskade in *A. thaliana* unterbrechen, isoliert werden (Cao *et al.*, 1994; Delaney *et al.*, 1995; Glazebrook *et al.*, 1996; Shah *et al.*, 1997). Das lässt darauf schliessen, dass NPR1 entweder die einzige Proteinkomponente zwischen SA-Akkumulation und der Ausprägung der SAR ist oder dass andere Signalkomponenten entweder redundant oder lebensnotwendig für Pflanzenwachstum und Entwicklung sind (Mou *et al.*, 2003). Die *npr1*-Mutanten sind nicht mehr in der Lage, auf verschiedene SAR-induzierende Agenzien zu antworten, Transkripte verschiedene PR-Gene zu akkumulieren und zeigen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber einer Vielzahl von Pathogenen. Das legt die Vermutung nahe, dass es sich bei NPR1 um einen positiven SAR-Regulator handelt, der für die Weiterleitung des SA-Signals bis zur Aktivierung der PR-Genexpression verantwortlich ist (Mou *et al.*, 2003). NPR1 kodiert für ein Protein, welches über ein Kernlokalisierungssignal (NLS) sowie zwei potentielle Protein-Protein-Interaktionsdomänen: eine Ankyrinwiederholungsdomäne und eine BTB/POZ (*broad-complex*, *tramtrack*, and *brica-brac/poxvirus*, *zinc finger*)-Domäne verfügt (Aravind und Koonin, 1999; Cao *et al.*, 1997; Kinkema *et al.*, 2000). Im *Two-Hybrid*-System von Hefe konnte die Interaktion von NPR1 mit bZIP-Transkriptionsfaktoren gezeigt werden (Després *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2000). Jedoch führte die Überexpression von NPR1 nur unter SAR-induzierenden Bedingungen zur Aktivierung der PR1-Expression und zur Resistenz. Das deutet daraufhin, dass NPR1 erst durch die Aktivierung mittels SA funktional wird (Cao *et al.*, 1998). Da eine direkte Interaktion von SA und NPR1 ausgeschlossen werden kann (Mou *et al.*, 2003), muss ein zusätzliches Bindeglied zwischen SA und NPR1 existieren. Tatsächlich beobachteten Mou *et al.* 2003, dass Veränderungen im Redoxstatus der Zelle nach Pathogenbefall oder nach Behandlung mit SA bzw. INA an der Umwandlung der oligomeren Form von NPR1 in seine monomere Form beteiligt sind. Da nur die monomere Form von NPR1 in den Zellkern transportiert wird, gilt sie als die aktive Form, die letztlich auf Proteinebene mit der TGA-Unterklasse der bZIP (*basic leucine zipper*)-Transkriptionsfaktoren interagiert und nachfolgend zur Aktivierung der PR-Genexpression führt (Després *et al.*, 2000; Fan und Dong, 2002; Després *et al.*, 2003; Mou *et al.*, 2003). Dabei bleibt die Frage, wie SA an der Veränderung des Redoxstatus bzw. der Redoxhomöostase der Zelle beteiligt ist.

Trotz der zentralen Rolle von NPR1 in der Pathogenabwehr konnte PR-Genexpression auch in *npr1*-Mutanten nach Behandlung mit Pathogenen beobachtet werden (Bowling *et al.*, 1997; Clarke *et al.*, 1998; Shah *et al.*, 1999, 2001; Kachroo *et al.*, 2000; Shirano *et al.*, 2002). Dabei repräsentiert die *npr1*-Suppressormutante *ssi2* (*suppressor of salicylic acid-insensitivity2*) eine dieser Komponenten des NPR1-unabhängigen Signalwegs (Shah *et al.*, 2001). Der *ssi2*-Phänotyp ist durch die konstitutive Aktivierung der PR-Genexpression, die Bildung von Läsionen und durch die Resistenz gegenüber verschiedenen Pathogenen gekennzeichnet. Mit

Hilfe von *ssi2 nahG*-Pflanzen konnte gezeigt werden, dass dieser Phänotyp von erhöhten SA-Gehalten abhängig ist (Shah *et al.*, 2001). Parallel dazu ist die Induktion einiger, aber nicht aller JA-abhängiger Abwehrreaktionen in *ssi2*-Pflanzen beeinträchtigt (Shah *et al.*, 2001; Kachroo *et al.*, 2001). *SSI2* kodiert für eine Stearoyl-ACP-Desaturase, welche den ersten Schritt der Umwandlung von Stearinsäure (18:0) zu Linolensäure (18:3), dem Vorläufermolekül von JA, katalysiert. Das Wildtyp-*SSI2*-Gen reprimiert somit die Pathogenabwehr, indem es Einfluss auf die Bildung eines Lipidmoleküls hat, das für die Aktivierung sowohl der SA-Synthese als auch des NPR1-unabhängigen Signalwegs benötigt wird (Kachroo *et al.*, 2001). Einen weiteren Hinweis, dass Lipide an der NPR1-unabhängigen Ausprägung des *ssi2*-Phänotyps beteiligt sind, liefern die *sfd* (*suppressor of fatty acid desaturase deficiency*)-Mutanten. Sie wurden als Suppressormutanten von *ssi2* identifiziert, d. h. sie verhindern in diesen Mutanten die konstitutive Aktivierung der PR-Genexpression sowie die verstärkte Resistenz gegenüber Pathogenen (Nandi *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu *npr1*- bzw. SA-Biosynthesedefizienten Mutanten (wie z. B. *eds5*) ist in *sfd1* nur die Ausprägung der SAR nicht aber die lokale Resistenz gegenüber verschiedenen Pathogenen beeinträchtigt, was auf eine fehlende Akkumulation von SA in den distalen Blättern zurückzuführen ist (Nandi *et al.*, 2004). *SFD1* kodiert für eine DHAP-Reduktase, die die Bildung von Glycerin-3-Phosphat aus Dihydroxyacetonphosphat katalysiert (Nandi *et al.*, 2004). Man vermutet, dass *SFD1* direkt oder indirekt an der Bildung oder Weiterleitung eines mobilen Signals im Zuge der Ausprägung der SAR beteiligt ist (Nandi *et al.*, 2004). Da die Applikation von SA nicht zur konstitutiven PR-Genexpression in den *sfd ssi2 npr1*-Mutanten führt, lässt darauf schliessen, dass das gebildete mobile Signal von SA verschieden sein muss (Nandi *et al.*, 2003).

Auch die Arabidopsis-Mutanten *ssi1*, *cpr5* und *cpr6* (*constitutive expressor of PR-genes 5* und *6*) sowie *hrl1* (*hypersensitive response-like lesions1*) sind in der Lage, den *npr1*-Phänotyp zumindest teilweise zu unterdrücken und sind damit an der Aktivierung eines NPR1-unabhängigen, SA-abhängigen Abwehrmechanismus beteiligt (Shah *et al.*, 1999; Clarke *et al.*, 2000; Devadas *et al.*, 2002; Shah *et al.*, 2003). Dabei kommt es in der *ssi1*-Mutante SA-abhängig zur konstitutiven Expression des JA-abhängigen Markergens *PDF1.2*, was darauf schliessen lässt, dass das *SSI1*-Protein zusammen mit *CPR5* und *CPR6* an der Signalkommunikation zwischen SA- und JA-abhängigen Signalwegen teilnimmt (Shah *et al.*, 1999). So ist Aktivierung des NPR1-unabhängigen, SA-abhängigen Abwehrmechanismus von einem funktionellen JA- und/oder- ET-Signalweg abhängig (Clarke *et al.*, 2000; Devadas *et al.*, 2002).

Um der Frage der Verknüpfung von SA und NPR1 näherzukommen, wurde nach putativen SA-bindenden Effektorproteinen gesucht. Dabei zeigten die bisher untersuchten SA-bindenden Proteine wie z. B. Katalase, Ascorbat-Peroxidase und Carboanhydrase nur eine niedrige Bindungsaffinität zu SA ( $K_d$  von 14-3,7  $\mu$ M) (Chen *et al.*, 1993a; Chen *et al.*, 1993b; Durner und Klessig, 1995; Slaymaker *et al.*, 2002). Inzwischen konnte jedoch ein lösliches SA-bindendes Protein 2 (*SABP2*) identifiziert werden, welches nur sehr gering abundant ist

(10 fmol/mg) und über eine hohe Affinität zu SA verfügt. Diese Bindung ist reversibel und für SA und die SAR-induzierenden Analoga spezifisch (Kumar und Klessig, 2003). SABP2 ist ein Mitglied der  $\alpha/\beta$  fold Hydrolase-Superfamilie, die aus Proteinen mit verschiedenen Enzymaktivitäten besteht. Es konnte für das rekombinante SABP2-Protein eine Lipaseaktivität, die in Gegenwart von SA verstärkt wird, gezeigt werden. Pflanzen, in denen SABP2 nicht mehr gebildet wird, sind unfähig, lokale Resistenz bzw. SAR zu aktivieren, und zeigen den vollständigen Verlust der Fähigkeit auf SA zu antworten, was dem *npr1*-Phänotyp sehr ähnlich ist. Diese Eigenschaften könnten dafür sprechen, dass SABP2 als SA-Rezeptor fungiert (Kumar und Klessig, 2003).

### 1.3.2 Salicylat-unabhängige Abwehrmechanismen

Mit Hilfe von *nahG*-Pflanzen konnten Abwehrmechanismen beobachtet werden, die nicht durch die Abwesenheit von SA beeinträchtigt sind. So konnte eine SA-unabhängige PR-Genexpression in verschiedenen Pflanze-Pathogen-Interaktionen gezeigt werden (Vidal *et al.*, 1997; Zoubenko *et al.*, 1997; Penninckx *et al.*, 1996). Daneben sind auch nichtpathogene Wurzelbakterien in der Lage, eine Form der induzierten Resistenz zu erzeugen. Diese Form wird als ISR (induzierte systemische Resistenz) bezeichnet. Im Gegensatz zu den beschriebenen Abwehrmechanismen geht die ISR weder mit der Bildung von Läsionen noch mit der Aktivierung bisher bekannter Abwehrgene einher. Interessanterweise ist die ISR jedoch von NPR1 abhängig (Pieterse *et al.*, 1998) und unterscheidet sich auch in diesem Punkt grundsätzlich von der pathogeninduzierten SA-unabhängigen Aktivierung von Abwehrgenen.

An allen bisher untersuchten SA-unabhängigen Signalwegen sind JA und/oder ET beteiligt (Pieterse und van Loon, 1999).

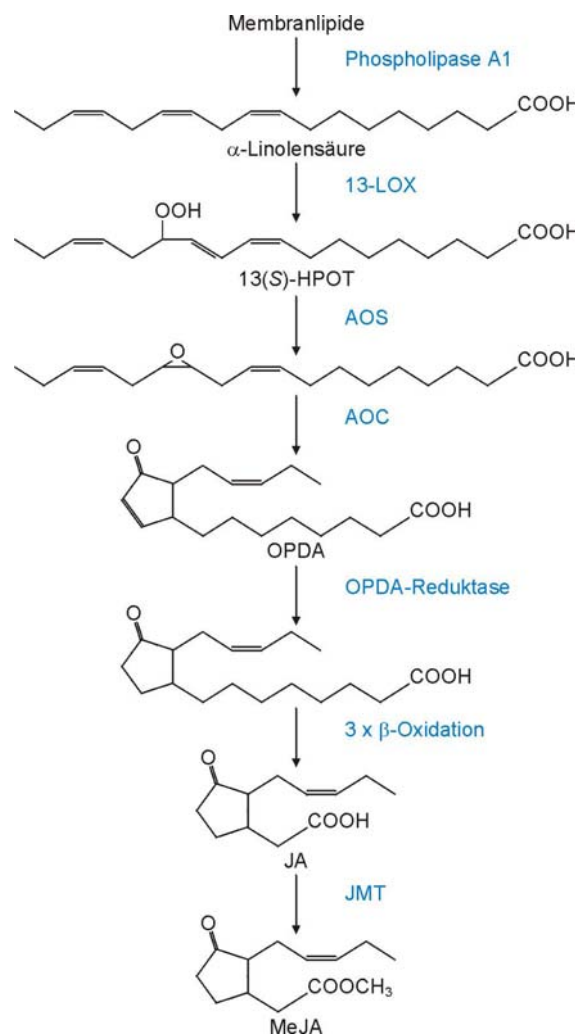
#### 1.3.2.1 JA-abhängige Abwehrmechanismen

Der Jasmonsäure und ihrer cyclopentanonischen Derivate, die man zusammenfassend auch als Octadecanoide bezeichnet, kommen neben der bereits erwähnten Abwehr von Pathogenen auch wesentliche Funktionen in der pflanzlichen Entwicklung, wie z. B. in der Samen-, Blüten- und Fruchtentwicklung sowie in der Wundantwort, zu. Darüberhinaus wirkt JA wachstumshemmend, seneszenzfördernd und ist an der Mechanotransduktion beteiligt (Feussner und Wasternack, 2002; Reymond und Farmer, 1998; Creelman und Mullet, 1997; Wasternack und Parthier, 1997).

Die Biosynthese von JA beginnt mit der Freisetzung von Linolensäure mittels einer Phospholipase A1 (Ishiguro *et al.*, 2001) aus der Chloroplastenmembran, die anschließend durch die Aktivitäten der Allenoxydsynthase (AOS) und der Allenoxydcyclase (AOC) in 12-oxo-Phytodiensäure (OPDA) umgewandelt wird.

OPDA ist in den Blättern von *Arabidopsis* zu über 90 % als sn1-O-(12-oxophytodienoyl)-sn2-O(hexadecatrienoyl)-monogalactosyldiglycerid in der Chloroplastenmembran gespeichert. Es gibt Hinweise, dass die Freisetzung von OPDA mittels spezifischer sn1-Lipasen erfolgt, was den sehr schnellen Anstieg von freier OPDA und JA nach Verwundung begründen könnte (Stelmach *et al.*, 2001, Turner *et al.*, 2002).

Im weiteren Verlauf erfolgt die vermutlich in den Peroxisomen stattfindende Umwandlung von OPDA zu JA durch die Reduktion mittels OPR3 und anschließender  $\beta$ -Oxidation (Übersicht in Feussner und Wasternack, 2002). Anschließend kann JA im Cytosol durch die Aktivität der Jasmonsäure-Carboxymethyltransferase (JMT) zu seinem flüchtigen Derivat Methyljasmonat (MeJA) umgewandelt werden (Seo *et al.*, 2001).



#### Abb. 1-1. Hauptweg der Jasmonat-Biosynthese

Die Abbildung wurde aus Cheong und Choi (2003) entnommen. Die Abkürzungen sind im Text erläutert.

Transgene, *JMT*-überexprimierende Pflanzen zeigen bei gleichem JA-Gehalt einen 3fach erhöhten Gehalt an MeJA, die konstitutive Expression von JA-responsiven Genen (*VSP*, *PDF1.2*) und eine erhöhte Resistenz gegenüber dem virulenten Pilz *Botrytis cinerea*, was die Bedeutung von MeJA in der Pathogenabwehr unterstreicht (Seo *et al.*, 2001).

Auch *A. thaliana*-Mutanten, die in der JA-Biosynthese (wie z. B. *fad3/fad7/fad8*-Tripelmutanten, *fatty acid desaturase; opr3, 12-oxophytodienoic acid reductase3*) oder der JA-Perzeption (wie z.B. *coi1, coronative insensitive 1* und *jar1, jasmonic acid resistant1*) beeinträchtigt sind, zeigen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber einer Vielzahl von Pathogenen einschließlich *Alternaria brassicicola*, *Botrytis cinerea*, *Pythium* sp. und *Erwinia carotovora* (Turner *et al.*, 2002). Diese erhöhte Anfälligkeit gegenüber verschiedenen Pathogenen ist verbunden mit der verminderten Transkriptakkumulation verschiedener Jasmonat-abhängiger Abwehrgene, wie z. B. *PDF1.2 (Plant Defensin1.2)*, *THI2.1 (Thionin2.1)*, *HEL (Hevein-like Protein)* und *CHIB (ChitinaseB)* (Turner *et al.*, 2002).

*COI1* kodiert für ein Protein, welches eine N-terminale F-Boxdomäne und 16 LRR-Domänen enthält (Xie *et al.*, 1998). F-Box-Proteine fungieren als Rezeptoren, die selektiv regulatorische Proteine als Substrate der Ubiquitinierung zuführen (Cheong und Choi, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass *COI1* an der Bildung eines funktionalen E3-Ubiquitin-Ligasekomplexes (*SCF<sup>COI1</sup>*) beteiligt ist. *SCF*-Komplexe bilden die größte Gruppe der E3-Ubiquitin-Ligasen und bestehen aus 4 Untereinheiten: *SKP1*; einem Protein der Cullin-Familie; einem kleinen RING-Fingerprotein (*RBX1/ROC1/HRT1*) und einem F-Box-Protein, das direkt an das Substrat über Protein-Protein-Interaktionsdomänen bindet. Man vermutet, dass *SCF<sup>COI1</sup>* Regulatoren des JA-Signalweges der Ubiquitinierung und dem anschließenden Abbau durch das 26S-Proteosom zuführt (Feng *et al.*, 2003).

*JAR1* kodiert für ein Adenylat-bildendes Enzym, das Ähnlichkeiten zur Luziferase aus dem Glühwürmchen hat. Möglicherweise aktiviert *JAR1* verschiedene Cyclopentanone durch Adenylierung ihrer Carboxylgruppen und führt damit zur Regulation der Hormonaktivität der Jasmonate (Staswick *et al.*, 2002).

Die JA-Biosynthesemutante *opr3* enthält einen Defekt im OPDA-Reduktase-Gen und kann JA in nur sehr geringen Konzentrationen (nach Verwundung ca. 4 % des WT-Gehaltes) bilden (Stintzi *et al.*, 2001). Mit Hilfe dieser Mutante konnte gezeigt werden, dass OPDA als eigenständiges Signalmolekül angesehen werden kann und für die Resistenz von *A. thaliana* gegen das nekrotrophe Pathogen *Alternaria brassicicola* und gegen das Schadinsekt *Bradysia* ausreichend ist (Stintzi *et al.*, 2001).

Im Gegensatz dazu existieren verschiedene Mutanten, die eine erhöhte oder konstitutive JA-Antwort zeigen. Dazu zählt man die Mutanten *cev1 (constitutive expression of VSP1)*, *cex1 (constant expression of JA-inducible genes)* und verschiedene *cet-* (*constitutive expressor of thionin*) und *joe-* (*jasmonate overexpressing*) Mutanten (Ellis und Turner, 2001; Xu *et al.*, 2001; Hilpert *et al.*, 2001; Jensen *et al.*, 2002). Bisher ist die Ursache für die konstitutive JA-Antwort in diesen Mutanten noch nicht gefunden. Lediglich für *cev1* konnte man zeigen, dass der Phänotyp auf einer Mutation im Cellulosesynthasegen *CeSA3* beruht, welche möglicherweise zur Freisetzung von Oligosacchariden und anderen Zellwand-abstammenden Komponenten und damit zur Aktivierung der JA-Synthese führt (Ellis *et al.*, 2002). *CEV1* konnte im Gegensatz zu *CEX1* oberhalb von *COI1* in die Signalkaskade eingeordnet werden, *CEX1* unterhalb von *COI1*. Charakteristisch für die *cet*-Mutanten ist die spontane Bildung

von Nekrosen. Dabei verfügen die Mutanten *cet1* und *cet3* über konstitutiv hohe Konzentrationen an JA und OPDA (Weber, 2002)

### 1.3.2.2 ET-abhängige Abwehrmechanismen

Die Rolle von Ethylen in der Pathogenabwehr ist umstritten. So trägt ET einerseits zur Resistenz in einigen Pflanze-Pathogen-Interaktionen bei, andererseits fördert ET in einigen Fällen auch die Erkrankung der Pflanze (Kunkel und Brooks, 2002). So zeigt die *A. thaliana*-Mutante *ein2* (*ethylene insensitive2*) eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber *B. cinerea* (Thomma *et al.*, 1999) und *E. carotovora* (Norman-Setterblad *et al.*, 2000), aber schwächere Symptome nach Infektion mit *P. syringae* bzw. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Bent *et al.*, 1992).

Im Folgenden soll der ET-Signalweg kurz skizziert werden (Übersicht in Gou und Ecker, 2004). ET bindet an seine Rezeptoren (ETR1/ETR2, *ethylene receptor*; ERS1/2, *ethylene response sensor*; EIN4, *ethylene insensitive4*) mit Hilfe eines Cu-Cofaktors und inaktiviert den Rezeptor, der konstitutiv CTR1 (*constitutive triple response1*) aktiviert. CTR1 kodiert für eine Ser/Thr-Kinase, die als negativer Regulator der ET-Signaltransduktion fungiert. EIN2, EIN3, EIN5 und EIN6 sind positive Regulatoren der ET-Antwort und befinden sich unterhalb von CTR1 in der Signalkaskade. EIN2 ist ein integrales Membranprotein, dessen Funktion noch nicht aufgeklärt ist. Bei EIN3 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor (TF), der die Expression von entsprechenden Zielgenen, wie z. B. *ERF1* (*ethylene response factor1*), reguliert. ERF1 gehört zur Familie der TF, die über eine APETALA2-Domäne verfügen und damit an GCC-Boxen verschiedener ET-induzierbarer Abwehrgene bindet (Hao *et al.*, 1998; Guo und Ecker, 2004).

Die veränderte Pathogenabwehr von *ein2*-Mutanten ist generell mit der beobachteten Pathogenabwehr der *coil* und *jar1* JA-Signalmutanten vergleichbar. So erfordert die Expression verschiedener JA-abhängiger Abwehrgene, wie z. B. *PDF1.2* auch EIN2 (Penninckx *et al.*, 1998).

ET ist zusammen mit JA auch an der Ausprägung der ISR, der systemischen, durch nicht-pathogene Bakterien induzierten Resistenz, beteiligt (Kunkel und Brooks, 2002).

## 1.4 Crosstalk der verschiedenen Abwehrmechanismen

Anhand der bisher hauptsächlich in *A. thaliana* untersuchten Pflanze-Pathogen-Interaktionen konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Abwehrmechanismen sich gegenseitig durch positive und negative regulatorische Interaktionen beeinflussen (Kunkel und Brooks, 2002).

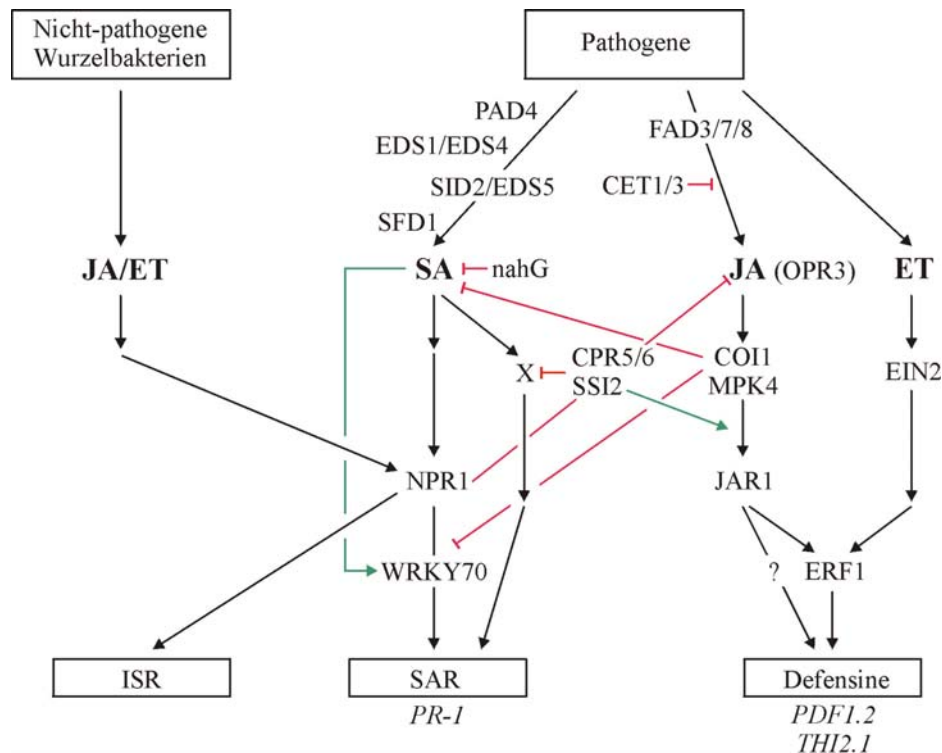
Für den Crosstalk zwischen dem SA- und dem JA-Signalweg gibt es Hinweise sowohl für positive als auch negative Interaktionen. Dennoch ist die Mehrzahl der Interaktionen von antagonistischer Art (Kunkel und Brooks, 2002). So konnte für die *A. thaliana*-Mutanten *eds4*, *pad4* und *npr1*, die über eine beeinträchtigte SA-Signaltransduktion verfügen, eine

erhöhte Induktion von JA-responsiven Genen beobachtet werden. Neuere Untersuchungen deuten daraufhin, dass die zelluläre Lokalisierung von NPR1 eine entscheidende Rolle bei der SA-vermittelten Unterdrückung von JA-responsiven Genen spielen könnte (Spoel *et al.*, 2003). Umgekehrt deutet die Analyse der *A.thaliana* JA-Signalmutanten *mpk4* und *coi1* auch auf eine negative Regulation von SA-vermittelten Abwehrmechanismen durch JA hin (Petersen, *et al.*, 2000; Kachroo *et al.*, 2001; Kloek *et al.*, 2001).

Nach Pathogenerkennung kommt es zur Veränderung der endogenen SA- und JA-Konzentrationen. Dieser zelluläre Konzentrationsunterschied von SA und JA bestimmt die Expression des Transkriptionsfaktors WRKY70. So führt der Anstieg der SA-Konzentration zu einer Aktivierung der WRKY70-Genexpression, während JA reprimierend wirkt. Damit konnte WRKY70 als ein wesentlicher Knotenpunkt der SA- und der JA-Signalkette identifiziert werden (Li *et al.*, 2004).

Die überwiegende Mehrzahl der Interaktionen zwischen dem JA- und dem ET-Signalweg sind von synergistischer Natur. So sind in *A. thaliana* sowohl JA als auch ET an der Expression von *PDF1.2* nach Infektion mit *A. brassicicola* (Penninckx *et al.*, 1996) und an der Expression von *PDF1.2*, *HEL* und *CHIB* nach Behandlung mit *E. carotovora*-Kulturfiltrat beteiligt (Norman-Setterblad *et al.*, 2000). Mit dem TF ERF1 konnte ein Knotenpunkt der JA- und ET-Signalkaskade identifiziert werden. So ist die Expression von *ERF1* sowohl von JA als auch von ET abhängig und ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass beide Signalwege für die Ausbildung der Resistenz gegenüber verschiedenen nekrotrophen Pathogene benötigt werden (Thomma *et al.*, 2001; Lorenzo *et al.*, 2003). Damit ist ERF1 für die Aktivierung von JA/ET-abhängigen Genen verantwortlich (Lorenzo *et al.*, 2003). Daneben konnten mittels Mikroarray-Analysen auch die JA bzw. ET unabhängige Regulation verschiedener Gengruppen gezeigt werden (Schenk *et al.*, 2000).

Hinsichtlich der Vernetzung des SA-Signalwegs mit dem ET-Signalweg steht nur eine begrenzte Anzahl an Daten zur Verfügung. In den bereits erwähnten Mikroarray-Analysen konnte eine synergistische Wirkung von SA und ET hinsichtlich der Expression verschiedener Abwehrgene beobachtet werden (Schenk *et al.*, 2000). Dabei erfordert die SA-abhängige Genexpression keine intakte ET-Signaltransduktion. In anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Applikation von ET die SA-vermittelte Induktion von PR1 verstärkt (Lawton *et al.*, 1994). Im Gegensatz dazu beobachtete man in *ein2*-Mutanten eine erhöhte *PR1*-Grundexpression, wodurch die Komplexität im *Crosstalk* zwischen SA und ET unterstrichen wird (Lawton *et al.* 1994; Kunkel und Brooks, 2002).



**Abb. 1-2. Modell der systemischen Signaltransduktion in *A. thaliana***

Dargestellt sind die systemischen Signaltransduktionswege, die nach Pathogenbefall bzw. durch nicht-pathogene Wurzelbakterien induziert werden. Man unterscheidet grundsätzlich SA-abhängige Abwehrmechanismen (SAR) sowie SA-unabhängige, JA/ET-abhängige Signalwege (ISR; Aktivierung der Defense). Die Proteine, die Teil der Signalkette sind bzw. induzierend (grün) oder reprimierend (rot) wirken, wurden durch Mutanten in *A. thaliana* identifiziert und sind im Kapitel 1.3 und 1.4 näher erläutert. Die Übersicht wurde leicht verändert aus Kunkel und Brooks (2002) entnommen.

## 1.5 Systemische Resistenz in Kartoffel

Systemische Resistenz in Kartoffel kann durch Infektion mit Pathogenen wie *Phytophthora infestans* (*P. infestans*) (Strömberg und Brishammar, 1991; Strömberg, 1995; Kombrink *et al.*, 1996), aber auch durch Behandlung mit Arachidonsäure (AA), als Bestandteil pilzlicher Membranen, und anderen mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Cohen *et al.*, 1991; Coquoz *et al.*, 1995) sowie durch Behandlung mit JA und MeJA (Cohen *et al.*, 1993) erreicht werden. Die lokale Inokulation mit dem *Brassica*-Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* M2 (*Psm* M2), für das Kartoffel kein Wirt ist, führt ebenfalls zur Etablierung der SAR (Kombrink *et al.*, 1995; Wegener, 1996). Dabei korreliert die Bildung der Nekrosen sowohl mit der systemischen Aktivierung von Abwehrgenen als auch mit der Reduktion der Krankheitssymptome nach anschließender Infektion mit *P. infestans* (Kombrink *et al.*, 1996; Kombrink und Schmelzer, 2001).

Im Gegensatz zu anderen Pflanzen ist über mögliche Signalmoleküle, die an der Ausbildung der SAR in Kartoffel beteiligt sein könnten, nur wenig bekannt.

In Analogie zur SAR in *Arabidopsis* und Tabak wurde zunächst SA als mögliches Signalmolekül betrachtet. Im Gegensatz zu diesen Systemen verfügt die Kartoffel jedoch über



sehr hohe SA-Konzentrationen (Coquoz *et al.*, 1995). Untersuchungen zur exogenen Applikation von SA zeigten unterschiedliche Effekte. So führt die exogene Applikation von SA zwar zu einer verstärkten *PR1*-Expression, aber nicht zu einer erhöhten Resistenz in Kartoffel (Coquoz *et al.*, 1995). Weiterhin konnte durch Behandlung mit SA eine erhöhte Resistenz nur in resistenten Kartoffelsorten erreicht werden, während susceptible Sorten sogar verstärkte Krankheitssymptome aufwiesen (Quintanilla und Brishammar, 1998). Auch das SA-Analoga BTH ist in Kartoffel in der Lage, Resistenz gegen *Alternaria solani* und *Erysiphe cichoracearum* zu induzieren (Bokshi *et al.*, 2003). Die Behandlung mit Arachidonsäure führt in Kartoffel zur Ausprägung von SAR gegen *P. infestans* und *A. solani*, obwohl SA nur lokal aber nicht systemisch akkumuliert (Coquoz *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1997). Interessanterweise war die SAR in SA-defizienten *nahG*-Pflanzen nicht mehr durch AA induzierbar (Yu *et al.*, 1997). Für eine Funktion von SA in der Ausprägung der SAR spricht, dass der endogene SA-Gehalt verschiedener Kartoffelsorten zumindest teilweise mit verringerter Anfälligkeit gegenüber *P. infestans* korreliert. Das gleiche trifft auf SA-Konzentrationsgradienten innerhalb der Pflanze zu, d. h. junge Blätter mit höheren SA-Mengen sind weniger anfällig gegen eine Infektion mit *P. infestans* (Coquoz *et al.*, 1995). Durch die Expression von Bacterio-Opsin, einer Protonenpumpe aus *Halobacterium halobium*, kommt es in Kartoffel zur Bildung von Läsionen und damit zur Erhöhung der SA-Gehalte, die wiederum mit einer erhöhten systemischen PR-Genexpression korrelieren (Abad *et al.*, 1997). Diese erhöhten SA-Gehalte korrelierten zwar mit einer verstärkten Resistenz gegen ein spezifisches *P. infestans*-Isolat, führten aber gleichzeitig zu einer erhöhten Anfälligkeit gegen weitere Isolate bzw. Pathogene (Abad *et al.*, 1997). Diese Untersuchungen lassen auf eine besondere Rolle von SA als Signalmolekül bei der Ausprägung der induzierten Resistenz in Kartoffel schliessen.

Als potentielle Signalmoleküle bei der Etablierung der induzierten Resistenz in Kartoffel könnten aber auch JA und ET fungieren. Hinsichtlich der Beteiligung der Jasmonate an der Aktivierung von Abwehrmechanismen nach Pathogenbefall in Kartoffel ist nur wenig bekannt. Erste Hinweise auf eine Beteiligung von JA an der Ausprägung der induzierten Resistenz in Kartoffel ergaben Untersuchungen der Pflanzen nach Behandlung mit JA bzw. MeJA, die zu einem lokalen und systemischen Schutz vor einer Infektion mit *P. infestans* führten (Cohen *et al.*, 1993). Inzwischen konnte eine systemische Akkumulation von OPDA nach Behandlung der Pflanzen mit dem avirulenten Bakterienstamm *Psm* gezeigt werden, während JA nur im lokalen Blattgewebe akkumuliert (Landgraf *et al.*, 2002).

Im Gegensatz dazu ist der Einfluss von JA auf die Wundantwort in Kartoffel und Tomate gut untersucht. So kommt es nach mechanischer Verwundung und Insektenfraß zur lokalen und systemischen Aktivierung von Abwehrgenen, wie den Proteinaseinhibitor-Genen (PI), die als Marker zur Identifizierung des systemischen Signals genutzt werden (Peña-Cortés *et al.*, 1995; Ryan, 1990; León *et al.*, 2001; Ryan, 2000).

In Tomate konnte gezeigt werden, dass die transkriptionelle Aktivierung der *PI*-Gene von einem funktionellen Systemin/JA-Signalweg abhängig ist (Doares *et al.*, 1995; Farmer und

Ryan, 1992; Ryan, 2000; Li *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003). Der Systemin/JA-Signalweg beginnt mit der Bindung von Systemin an einen 160 kDa plasmamembrangebundenen Rezeptor (SR160), der der Familie der LRR-Rezeptorkinasen zugeordnet wird (Scheer und Ryan, 2002). Dabei lässt sich die Signalkaskade, die zur *PI*-Expression im verwundeten Blatt führt, klar vom systemischen Signalweg unterscheiden (Li *et al.*, 2002). Mit Hilfe von Pfropfungsexperimenten mit verschiedenen Mutanten (u. a. *spr2*, *suppressed in prosystemin-mediated responses2*) konnte gezeigt werden, dass die systemische Expression wundinduzierter Gene eine funktionelle JA-Biosynthese im verwundeten, aber nicht im unverwundeten Blatt erfordert. Gleichzeitig spricht die Notwendigkeit der systemischen JA-Perzeption, die aber nicht lokal notwendig war, für JA als systemisches Signal (Li *et al.* 2002).

Inzwischen konnte gezeigt werden, dass *SPR2* für eine chloroplastidäre  $\omega$ 3-Desaturase kodiert, die an der Synthese von chloroplastidären 18:3 Fettsäuren (dem JA-Vorläufer) beteiligt ist (Li *et al.*, 2003). Die Lokalisierung von *SPR2* im Chloroplasten setzt die Verknüpfung des plasmamembranständigen Systeminrezeptors mit der Aktivierung der JA-Biosynthese im Chloroplasten voraus.

Dabei könnte *SPR1* an der Weiterleitung des Systemin-Signals von der Plasmamembran zum Chloroplasten beteiligt sein. So konnte gezeigt werden, dass *SPR1* eher an der Bildung des systemischen Signals als an der Erkennung und Prozessierung des Signals im systemischen, unverwundeten Blatt beteiligt ist (Lee und Howe, 2003). Damit existieren zwei verschiedene Hypothesen, die die Verknüpfung von Systemin mit JA bei der systemischen *PI*-Expression erklären können. So könnte Systemin die Synthese von JA aktivieren, das als mobiles Signal zur Aktivierung der systemischen *PI*-Expression führt. Alternativ dazu könnten sowohl JA als auch Systemin als mobiles Signal wirken. Systemin könnte im Phloem an der weiteren Aktivierung der JA-Biosynthese beteiligt sein, was durch gleichzeitige positive Rückkopplung zur Auslösung einer Amplifikationskaskade von Systemin und Oxylipinen entlang des Leitbündelsystems und damit zur Expression wund-responsiver Gene führen könnte (Ryan und Moura, 2002; Lee und Howe, 2003).

## 1.6 Anwendungen von *scFv*-Antikörpern in Pflanzen

*ScFv* (*Single chain variable fragment*)-Antikörper sind chimäre Polypeptide, die aus den variablen Domänen der schweren (VH) und der leichten Kette (VL) eines Immunoglobulins zusammengesetzt sind (Clackson *et al.*, 1991). Beide Domänen sind durch ein kurzes, flexibles Linkerpeptid kovalent miteinander verbunden (Bird *et al.*, 1988; Huston *et al.*, 1988). Sie stellen neben den einzelnen VH-Ketten (Fd) die kleinsten antigenbindenden Moleküle dar.

*ScFv*-Antikörper können durch Fusions-PCR mit den aus Hybridomazellen oder direkt aus Lymphozyten immunisierter Tiere isolierten Genen hergestellt, in Bakterien exprimiert und

anschließend auf ihre antigenbindenden Eigenschaften hin untersucht werden (Chaudhary *et al.*, 1990; Winter und Milstein, 1991; Dreher *et al.*, 1991; Hoogenboom *et al.*, 1991; Hoogenboom und Winter, 1992).

Ein alternativer Weg zur Isolierung spezifischer *scFv*-Antikörper stellt das *Phage Display*-System dar (Winter und Milstein, 1991; Chiswell und McCafferty, 1992). Dabei werden die *scFv*-Polypeptide mit dem Hüllprotein eines Bakteriophagen fusioniert und auf der Oberfläche des Virus präsentiert (McCafferty *et al.*, 1990). Auf diese Weise können mittels selektiver Bedingungen die gewünschten rekombinanten Antikörperfragmente angereichert werden. Als Quelle für die Antikörpergene dienen Hybridomazellen oder Lymphozyten immunisierter oder nicht-immunisierter Tiere oder des Menschen. Daneben gibt es die Möglichkeit, mittels PCR gewonnene Gensegmente mit synthetischen Nukleotidsequenzen zu kombinieren oder nur synthetisch hergestellte Sequenzen zu verwenden. Die Verwendung von *Phage Display*-Vektoren ermöglicht die Herstellung sehr umfangreicher einfacher, semi-synthetischer oder synthetischer Antikörper-Phagenbibliotheken mit einer bisher maximal erreichten Komplexität von  $10^{10}$  (Dower und Cwirla, 1992). Das erlaubt eine sehr schnelle und effiziente Isolierung antigenspezifischer, hochaffiner Antikörperfragmente ohne vorherige Immunisierung (Vaughan *et al.*, 1996; Liddell und Weeks, 1996; Sheets *et al.*, 1998; Desiderio, 2001).

Die Vorteile des *Phage Display* sind zum einen die schnelle Affinitätsanreicherung spezifischer Antikörperfragmente aus einem großen Antikörperrepertoire. Daneben sind die strukturellen und funktionellen Informationen des selektierten, auf der Phagenoberfläche präsentierten Antikörperproteins direkt mit den im Phagengenom enthaltenen, entsprechenden genetischen Informationen verbunden.

Seit Hiatt und Mitarbeiter 1989 zum ersten Mal die erfolgreiche Expression von Antikörpern in Pflanzen zeigen konnten, wurde eine Vielzahl von rekombinanten Antikörpern in den verschiedensten Pflanzen unter verschiedenen Gesichtspunkten hinsichtlich ihrer Anwendung produziert (De Jaeger *et al.*, 2000a; Fischer *et al.*, 2001; Ziegler und Torrance, 2002). So konnte Antikörper-vermittelte Resistenz in Pflanzen gegenüber verschiedenen Viren und Bakterien gezeigt werden (Tavladoraki *et al.* 1993; Voss *et al.*, 1995; Zimmermann *et al.*, 1998, Fecker *et al.*, 1997; Le Gall *et al.*, 1998). Die als Immunmodulation bezeichnete Technik kann jedoch nicht nur zur Resistenz gegenüber Pathogenen führen, sondern auch zu einer gezielten Veränderung des zellulären Metabolismus oder zur Modifikation von Signaltransduktionswegen eingesetzt werden (De Jaeger *et al.*, 2000a; Conrad und Manteuffel, 2001). Andererseits kann auch die Produktion von *ex planta* angewendeten Antikörperfragmenten, auch als *molecular farming* bezeichnet, von wirtschaftlichen Interesse sein. So finden in Pflanzen produzierte Antikörper Anwendung u. a. in der menschlichen Immuntherapie sowie in der Diagnostik (Bouquin *et al.*, 2002; Perrin *et al.*, 2000; Khoudi *et al.*, 1999; Ma und Hein, 1995a; Ma und Hein, 1995b; McCormick *et al.*, 2003).

Als Voraussetzung für eine erfolgreiche Immunmodulation zählt nicht nur die Isolierung und Gewinnung spezifischer hochaffiner Antikörperfragmente, wobei sich die Verwendung von

*scFv*-Antikörpern als besonders geeignet erwiesen hat (De Jaeger *et al.*, 1999; De Jaeger *et al.*, 2000a), vielmehr ist die dem Antigen-entsprechende Lokalisierung des Antikörperfragmentes innerhalb der Pflanzenzelle von entscheidender Bedeutung.

Zur Immunmodulation eingesetzte Antikörper wurden bislang im Cytosol, im Endoplasmatischen Retikulum (ER) oder dem Apoplasten angereichert (De Jaeger *et al.* 2000). Dabei konnten im Vergleich signifikant höhere Antikörperkonzentrationen im ER als im Cytosol erreicht werden (Conrad und Fiedler, 1998). Für die Translokation in das ER wurde das Antikörperfragment mit einem N-terminalen spezifischen Signalpeptid fusioniert. Nach erfolgreicher Translokation in das ER sichert das C-terminale fusionierte KDEL-Retentionssignal den Verbleib des Antikörperfragmentes im ER (Denecke *et al.*, 1992; Artsaenko *et al.*, 1995).

Die Aktivität eines Phytohormons wurde erstmals mittels Anreicherung spezifischer anti-Abscisinsäure (ABA) *scFv*-Antikörper im ER von Tabakpflanzen verändert (Artsaenko *et al.*, 1995). Dabei zeigten die transgenen, anti-ABA *scFv*-Antikörper exprimierenden Pflanzen im Vergleich zu anderen ABA-defizienten Mutanten ähnliche Symptome wie z. B. welkende Blätter und die Störung der Schließzellfunktion (Artsaenko *et al.*, 1995; Artsaenko, 1996). Im Folgenden wurde die Technik der Immunmodulation zur Untersuchung weiterer Phytohormone, d. h. von Gibberellinen (Shimada *et al.*, 1999) und Brassinosteroiden (Conrad und Manteuffel, 1998) genutzt.

## **1.7 Zielsetzung der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von JA, deren Vorstufe OPDA sowie von SA als potenzielle Signale für die Ausprägung der induzierten Resistenz von Kartoffel zu untersuchen. Dazu sollten transgene Pflanzen hergestellt werden, deren Gehalte an SA sowie JA bzw. OPDA reduziert sind bzw. verändert werden können.

Zur Untersuchung des Einflusses von SA sollten transgene *nahG*-Pflanzen erzeugt und diese auf ihre möglicherweise veränderte Pathogenabwehr nach Behandlung mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* M2 (*PsmM2*) und dem Oligopeptidelicitor Pep13 untersucht werden. Parallel dazu sollten unter Verwendung der Methode des *Phage Display* für JA bzw. OPDA spezifische *scFv*-Antikörperfragmente isoliert und die korrespondierenden Gene in Kartoffelpflanzen exprimiert werden. Die anschließende Selektion auf funktionelle *scFv*-Antikörper in Pflanzen sollte mit Hilfe der Analyse der Wundantwort, d. h. der Analyse der *PIN2*-Expression nach Verwundung der Pflanzen, erfolgen. Anschließend sollten die ausgewählten Kartoffelpflanzen ebenfalls auf eine möglicherweise veränderte Pathogenantwort nach Inokulation mit *PsmM2* und dem Oligopeptidelicitor Pep13 bzw. nach Behandlung mit *P. infestans* untersucht werden. Zur Analyse der Abwehrmechanismen in den transgenen Pflanzen sollten die Expressionsmuster verschiedener PR-Gene näher untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Medien

**Tab. 2-1. Herstellung häufig verwendeter Medien**

Alle Angaben beziehen sich auf 1 Liter Gesamtvolumen.

Medium	Zusammensetzung/ Herstellung
LB-Medium	10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 5 g NaCl pH 7,0
SOB-Medium	20 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 0,5 g NaCl pH 7,5
TYE-Medium	10 g Tryptone, 5 g Hefe-Extrakt, 8g NaCl
2x TY	16 g Trypton, 10 g Hefe-Extrakt, 5 g NaCl
King`s B-Medium (King <i>et al.</i> , 1954)	20 g Glycerin, 40 g Proteose Pepton, nach Autoklavieren Zugabe von 10 ml 10 % K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (steril), 10 ml 10 % MgSO <sub>4</sub> (steril), 50 µg/ml Rifampicin
3 (2) MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962)	30 g (20 g) Saccharose, 0,5 g MES, Salze und Vitamine (DUCHEFA, Haarlem, NL) pH 5,8
GMS-Medium	16 g Glucose, 0,5 g MES, Salze und Vitamine des MS-Mediums pH 5,8
YEB-Medium	0,5 g <i>beef extract</i> , 0,1 g Hefeextrakt, 0,5 g Pepton, 0,5 g Saccharose, nach Autoklavieren Zugabe von 2 mM MgSO <sub>4</sub>
Topagar	10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 5 g NaCl, 7 g Bacto-Agar, 2,5 g MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O

Für LB-, TYE-, YEB-Platten und King`s B-Platten wurden dem entsprechenden Medium 15 g Agar/Liter zugesetzt. Die Pflanzenanzuchtmedien MS und GMS wurden mit 7,5 g *plant agar* versetzt. Für Selektionsmedien und –platten wurde das entsprechende Antibiotikum nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 50°C zugegeben (100 mg/l Ampicillin; 50 mg/l Kanamycin).

#### 2.1.2 Phagen, Plasmidvektoren und Bakterienstämme

Folgende Phagen, Klonierungsvektoren und Bakterienstämme wurden für die Arbeit verwendet (Tab. 2-2).

**Tab. 2-2. Verwendete Plasmide, Phagen und Bakterienstämme**

Plasmide und Vektoren	Referenz
pRTRA 7/3 (Amp <sup>r</sup> )	Artsaenko <i>et al.</i> , 1995
pBin19 (Kan <sup>r</sup> )	Bevan, 1984; Frisch <i>et al.</i> , 1995
Phagen	
VCS-M13 helper phage	Stratagene (Heidelberg)
Bakterienstämme	
<i>E. coli</i> HB2151	Hoogenboom <i>et al.</i> , 1991
<i>E. coli</i> TG1	Gibson, 1984
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Hanahan, 1983
<i>A. tumefaciens</i> pGV 2260 in C58C1	Deblaere <i>et al.</i> , 1985
<i>A. tumefaciens</i> LBA4404	Hoekema <i>et al.</i> , 1983
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> M2	Debener <i>et al.</i> , 1991

### 2.1.3 Pflanzen

Alle Experimente wurden mit der Sorte *Solanum tuberosum* L. cv. Désirée durchgeführt.

#### 2.1.3.1 Anzucht

Die Pflanzen wurden als sterile Gewebekulturen auf MS-Medium in der Phytokammer bei 23°C mit einem Licht/Dunkel-Wechsel von 16 und 8 h und einer Lichtmenge von 100  $\mu$ E angezogen.

#### 2.1.3.2 Transformation mittels *Agrobacterium tumefaciens*

Die Transformation erfolgte mittels Blattscheiben-Transformationsmethode (modifiziert nach Feltkamp *et al.*, 1995) durch den *A. tumefaciens* vermittelten T-DNA-Transfer.

Dazu wurden die entsprechenden *A. tumefaciens*-Klone in 20 ml YEB-Medium mit 50  $\mu$ g/ml Kanamycin angeimpft und über Nacht bei 28°C kultiviert. Die Bakterien wurden 10 min bei 2700 x g abzentrifugiert, in 20 ml 10 mM MgSO<sub>4</sub> gewaschen und in 2 ml GMS-Medium resuspendiert.

Blätter von etwa 4 Wochen alten Gewebekulturpflanzen wurden an der Unterseite mehrmals eingeritzt, die Petiolen entfernt und mit der Oberseite auf 10 ml GMS-Medium gelegt. Nach Zugabe von 100  $\mu$ l der entsprechenden Agrobaktériensuspension wurden die Blätter bei 23°C für 1 d im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Blätter in frisches MS-Medium überführt und erneut für 1d im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Blätter mit der Unterseite auf GMS-Kallusinduktionsmedium (GMS-Medium mit 5  $\mu$ g/ml Naphthylelessigsäure, 0,1  $\mu$ g/ml Benzylaminopurin, 250  $\mu$ g/ml Cefotaxim, 50  $\mu$ g/ml Kanamycin) ausgelegt und in der Phytokammer inkubiert. Nach einer Woche wurden die Blätter auf GMS-Sprossinduktions-

medium (GMS-Medium mit 2 µg/ml Zeatinriboside, 0,02 µg/ml Naphthylelessigsäure, 0,02 mg/ml Gibberellin A<sub>3</sub>, 250 µg/ml Cefotaxim, 50 µg/ml Kanamycin) transferiert. Bis zur Entstehung von Sprossen wurden die Blätter regelmäßig nach 1 Woche auf frische GMS-Sprossinduktionsplatten gelegt. Entstandene Sprosse wurden abgetrennt und auf 3MS-Medium mit 250 µg/ml Cefotaxime und 50 µg/ml Kanamycin umgesetzt. Nach der Wurzelbildung wurden die transgenen Pflanzen weiter auf 3 MS-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin gehalten und regeneriert.

#### 2.1.3.3 Behandlung der Blätter mit Pathogenen

Für Infektionsexperimente wurden etwa 4 Wochen alte Gewebekulturpflanzen in Töpfe (Ø 14 cm) mit einem Erde/Sand-Gemisch (1:1) überführt und in der Phytokammer unter folgenden Bedingungen angezogen: 22°C (Lichtphase)/18°C (Dunkelphase), 60 % Luftfeuchtigkeit und einem Licht/Dunkelwechsel von 16h/8h.

Die Infiltration der Suspension von *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* M2 bzw. mit 100 µM Pep13 erfolgte mit einer 1 ml-Spritze durch die Stomata der Blattunterseite. Es wurden etwa  $\frac{2}{3}$  der Blattfläche eines Fiederblattes infiltriert. Pro Pflanze wurden 2 mittelalte Blätter behandelt. Kontrollpflanzen wurden mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> infiltriert.

Für die Inokulation mit *Phytophthora infestans* wurden auf Blättern von etwa 3 Wochen alten Gewebekulturpflanzen 4 Tropfen á 5 µl verteilt. Die Inkubation erfolgte in den Gewebekulturgefäßen (Luftfeuchtigkeit etwa 100 %) in der Phytokammer.

Die behandelten Blätter wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten geerntet und entweder direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren oder sofort weiterverarbeitet.

#### 2.1.3.4 Verwundung der Pflanzen und Behandlung mit Methyljasmonat

Die Gewebekulturpflanzen wurden in Erde/Sand überführt (Kap. 2.1.3.3). Nach etwa 4 Wochen erfolgte die Verwundung durch Quetschen von 2 Blättern mit einer geriffelten Pinzette (4 fach pro Blatt) sowie durch das Anbringen einer Dialyseklammer.

Die Blätter wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten geerntet und in flüssigen Stickstoff eingefroren.

Zur Behandlung mit Methyljasmonat (MeJA) wurden von den Kartoffelblättern abgetrennte Fiederblätter in großen Petrischalen auf 20 ml 45 µM MeJA in 0,1 % [v/v] Ethanol bzw. zur Kontrolle auf 0,1 % [v/v] Ethanol flottiert. Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen und in der Phytokammer inkubiert.

## 2.1.4 Bakterien

### 2.1.4.1 Kultivierung von *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* M2 (*Psm*M2)

Der verwendete Bakterienstamm *Psm* M2 (Debener *et al.*, 1991) wurde von J. Dangl (Univ. of North Carolina, Chapel Hill, USA) zur Verfügung gestellt.

Für die Infektionsexperimente wurden die Bakterien aus der Glycerinkultur auf King's B-Medium ausgestrichen und für 2 d bei 28°C inkubiert. Eine Einzelkolonie wurde in King's B-Medium über Nacht bei 28°C angezogen. Diese Übernachtskultur wurde für 5 min bei 2700 x g zentrifugiert, mit 20 ml 10 mM MgCl<sub>2</sub> gewaschen, in 2 ml 10 mM MgCl<sub>2</sub> resuspendiert und anschließend auf eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,2 eingestellt, was einer Bakteriendichte von 10<sup>8</sup> cfu/ml entspricht.

### 2.1.4.2 Kultivierung von *Escherichia coli* (*E. coli*)

Es wurden verschiedene *E. coli*-Stämme verwendet. Als Wirtsbakterienstamm für Transformationsexperimente diente der Bakterienstamm *E. coli* DH5α (Hanahan, 1983). Als Phagenwirtsstämme kamen die Bakterienstämme *E. coli* TG1 und *E. coli* HB2151 zum Einsatz. Die Kultivierung des Stammes DH5α erfolgte in LB-Medium bzw. auf LB-Platten. Die Stämme TG1 und HB2151 wurden in 2x TY Medium angezogen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

#### 2.1.4.2.1 Herstellung kompetenter Zellen

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden mit Hilfe der CaCl<sub>2</sub>-Methode (Mandel und Higa, 1970) hergestellt, aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Zur Herstellung kompetenter Zellen des *E. coli*-Stammes HB2151 wurde eine 100 ml Kultur nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 für 10 min bei 2700 x g und 4°C abzentrifugiert und anschließend nacheinander mit 100 ml H<sub>2</sub>O sowie 2 x 30 ml 10 % Glycerin gewaschen, in 250 µl 10 % Glycerin resuspendiert und 40 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren (Dower *et al.*, 1988).

#### 2.1.4.2.2 Transformation

100 µl kompetente Zellen wurden mit der zu transformierenden DNA versetzt, gut gemischt und 30 min auf Eis gelagert. Nach einem Hitzeschock von 90 s bei 42°C wurden die Zellen erneut für 5 min auf Eis gelagert. Anschließend wurden 900 µl LB-Medium zugegeben und die Zellen bei 37°C für mindestens 30 min geschüttelt. 100-200 µl der transformierten Zellen wurden auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen.



#### 2.1.4.3. Kultivierung von *Agrobacterium tumefaciens*

Für die Pflanzentransformation wurden die *A. tumefaciens*-Stämme (Tab. 2-2) in YEB-Medium bei 28°C angezogen.

##### 2.1.4.3.1 Herstellung kompetenter Zellen

Eine Kolonie wurde in 2 ml YEB-Medium über Nacht bei 28°C angezogen. Von dieser Übernachtskultur wurden 2 ml in 100 ml YEB-Medium überimpft und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 30 min bei RT und 2700 x g zentrifugiert, in 2 ml YEB-Medium resuspendiert, aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren (Höfgen und Willmitzer, 1988).

##### 2.1.4.3.2 Transformation

200 µl kompetente Zellen wurden mit Plasmid-DNA versetzt und jeweils 5 min auf Eis, in flüssigem Stickstoff und bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml YEB-Medium wurde der Transformationsansatz für 2 h bei 28°C geschüttelt und anschließend 200 µl auf YEB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und für 2 d bei 28°C inkubiert.

#### 2.1.5 Oomycet *Phytophthora infestans* - Isolation von Zoosporensuspension und Trypanblaufärbung des Mycels

Die Präparation der Zoosporensuspension erfolgte aus entsprechenden Kulturen von *P. infestans*, die von F. Govers zur Verfügung gestellt wurden. Die Kultivierung erfolgte auf Hafer-Bohne-Medium (3,4 % [w/v] Bohnenmehl, 1,7 % [w/v] Hafermehl, 0,85 % [w/v] Saccharose, 1,5 % [w/v] Agar) bei 18°C im Dunkeln.

Zur Isolation der Zoosporen wurde das 10 bis 12 d alte Mycel mit 10 ml Wasser überschichtet und 4 h bei 4°C inkubiert. Die Sporenkonzentration im Überstand wurde mittels einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ermittelt. Für die Inokulationsexperimente wurden Konzentrationen von 1 - 5 x 10<sup>5</sup> Sporen/ml eingesetzt.

Zur Trypanblaufärbung wurden die mit *P. infestans* inokulierten Blätter in 1:2 [v/v] Lactophenol (10 g Phenol, 10 ml D-Laktat, 10 ml Glycerin, 10 ml Wasser, 0,1 % Trypanblau)-Ethanol-Lösung 1-3 min gekocht, anschließend mit Wasser gewaschen und mit Chloralhydrat (2,5 g/ml) entfärbt. Die Einbettung der Blätter erfolgte in 1:1 [v/v] Glycerin/Wasser-Gemisch.

## 2.1.6 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert (Tab. 2-3).

**Tab. 2-3. Verwendete Oligonukleotidprimer**

Primer	Sequenz in 5'-3' Richtung	Funktion
pRTRA/ncol1	GAC GCA CAA TCC CAC TAT CC	Sequenzierung der <i>NcoI/NotI</i> klonierten <i>scFv</i> -cDNAs in pRTRA7/3
pRTRA/not1	ACT CTA TCG ACG GAT CGG GC	
BacklegT	ACA CGT <u>GGA TCC</u> GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG G	PCR-Amplifikation der <i>scFv</i> -Antikörper codierenden cDNAs aus dem pIT1-Vektor, <i>BamHI</i> -Klonierung in den Vektor pRTRA7/3
ForTom1	GTC ACG <u>GGA TCC</u> ATT CAG ATC CTC TTC TGAGAT GAG GAG TT	
M13 universal	GTAAAACGACGGCCAGT	Sequenzierung der <i>BamHI</i> klonierten <i>scFv</i> -cDNAs in pRTRA7/3
M13 reverse	AACAGCTATGACCATG	

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Nukleinsäureanalytik und Herstellung rekombinanter DNA

#### 2.2.1.1 RNA-Isolierung

##### 2.2.1.1.1 Lithiumchlorid-Methode (Logemann *et al.*, 1987)

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurden 300 mg gefrorenes Blattmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert, mit 500 µl Extraktionspuffer (0,2 M Tris-HCl pH 7,5, 0,1 M LiCl, 5mM EDTA, 1 % [w/v] SDS) homogenisiert und mit 500 µl PCI (Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol 25:24:1, v/v/v) versetzt. Nach der Zentrifugation (5 min, 12000 x g, 4°C) wurde die RNA aus der oberen, wässrigen Phase unter Zugabe von 1 Vol. 6 M LiCl für mind. 4 h auf Eis gefällt und anschließend zentrifugiert (10 min, 15000 x g, 4°C). Das Präzipitat wurde mit 3 M LiCl gewaschen und in 150 µl Wasser gelöst. Nach Zugabe von 2 Vol. Ethanol und 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat pH 5,2 erfolgte eine erneute Fällung der RNA über Nacht bei -20°C. Anschließend wurde zentrifugiert, das Präzipitat mit 70 %igem [v/v] Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl Wasser aufgenommen.

#### 2.2.1.1.2 Trizol-Methode (Chomczynski und Sacchi, 1987)

Gesamt-RNA aus etwa 100 mg Blattmaterial wurde mit der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) isoliert. Das gefrorene und gemörserte Blattmaterial wurde mit 1 ml „TRIzol™“-Reagenz (0,8 M Guanidinthiocyanat, 0,4 M Ammoniumacetat, 0,1 M Natriumacetat pH 5,0, 5 % [v/v] Glycerin, 38 % [v/v] Phenol) homogenisiert und mit 200 µl Chloroform versetzt. Nach der Zentrifugation (15 min, 12000 x g, 4°C) wurde die RNA aus der oberen, wässrigen Phase mit 0,8 Vol. Isopropanol für 10 min bei RT gefällt und anschließend zentrifugiert (10 min, 12000 x g, 4°C). Das Präzipitat wurde mit 70 %igem [v/v] Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 µl Wasser gelöst.

#### 2.2.1.2 DNA-Isolierung

##### 2.2.1.2.1 Präparation von genomischer DNA aus Pflanzen

Etwa 500 mg gefrorenes und gemörsertes Blattmaterial wurde mit 1 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris pH 8,0, 50 mM EDTA pH 8,0, 500 mM NaCl, 1,5 % [w/v] SDS) homogenisiert und 10 min bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 3M Kaliumacetat pH 4,8 (29,4 g Kaliumacetat und 11,5 ml Essigsäure auf 100 ml) wurde vorsichtig geschwenkt, mind. 10 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (10 min, 12000 x g, 4°C). Die wässrige Phase wurde mit 0,5 Vol. PCI versetzt und erneut zentrifugiert. Die genomische DNA wurde aus der wässrigen Phase durch Zugabe von 0,5 Vol. Isopropanol gefällt, zentrifugiert (5 min, 12000 x g, 4°C), mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 ml Wasser gelöst.

##### 2.2.1.2.2 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse aus Flüssigkulturen (Birnboim und Doly, 1979).

#### *Mini-Präparation*

Eine 3 ml Übernachtskultur von *E. coli* DH5α wurde zentrifugiert (1 min, 12000 x g, RT), in 100 µl Lösung I (50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA) resuspendiert und mit frisch angesetzter Lösung II (0,2 M NaOH, 1 % [w/v] SDS) versetzt. Das Lysat wurde mit 150 µl 3 M Kaliumacetat pH 4,8 versetzt und kräftig geschüttelt. Nach der Zentrifugation (15 min, 12000 x g, 4°C) wurde die Nukleinsäuren aus dem Überstand mit 0,7 Vol. Isopropanol für 30 min bei RT gefällt und anschließend zentrifugiert (15 min, 12000 x g, 4°C). Das Präzipitat wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl Wasser (mit 100 µg/ml RNase) aufgenommen.

Zur Präparation von Plasmid-DNA für die Sequenzierung wurde der „QIAprep® Spin Miniprep Kit“ (QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet.

### *Midi-Präparation*

Für die Präparation größerer Mengen an Plasmid-DNA wurde eine 50 ml Übernachtskultur von *E. coli* DH5 $\alpha$  angezogen und der „QIAfilter™ Plasmid Midi Kit“ (QIAGEN, Hilden) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

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

Eine Kultur von *A. tumefaciens* wurde in 3 ml YEB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum für 2 d bei 28°C geschüttelt. Nach der Zentrifugation (5 min, 12000 x g, 4°C) wurde das Präzipitat in 100  $\mu$ l Lysozym-Lösung I (Lösung I siehe Mini-Präparation, versetzt mit 4 mg/ml Lysozym) resuspendiert und für mind. 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 200  $\mu$ l Lösung II versetzt und erneut 30 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 30  $\mu$ l alkalischem Phenol (250  $\mu$ l Phenol mit 15  $\mu$ l 1 N NaOH) und 150  $\mu$ l 3 M Kaliumacetat erfolgte eine Zentrifugation (5 min, 12000 x g, 4°C). Der Überstand wurde mit 1 Vol. PCI versetzt, zentrifugiert (5 min, 12000 x g, 4°C) und erneut mit 1 Vol. Chloroform versetzt. Die DNA wurde aus dem Überstand mit 0,6 Vol. Isopropanol für 5 min bei RT gefällt, zentrifugiert (5 min, 12000 x g, 4°C) und mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Das Präzipitat wurde getrocknet und in 30  $\mu$ l Wasser aufgenommen.

#### 2.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

##### 2.2.1.3.1 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von RNA wurden denaturierende 1 %-ige [w/v] Agarose-Gele verwendet. Dazu wurde die Agarose im Laufpuffer (20 mM MOPS, 5 mM Natriumacetat, 0,5 mM EDTA, pH 7.0) geschmolzen und nach Abkühlen mit Formaldehyd (6 % [v/v]) versetzt. Jeweils 20  $\mu$ g Gesamt-RNA wurden mit 15  $\mu$ l RNA-Probenpuffer (50 % [v/v] Formamid, 6 % [v/v] Formaldehyd, 6 % [v/v] Glycerin, 10 % 10x MOPS, 0,04 % [w/v] Bromphenolblau) versetzt, 10 min bei 65°C erhitzt, 5 min auf Eis abgekühlt, mit 1  $\mu$ l Ethidiumbromidlösung (1 mg/ml) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 70 V mit Laufpuffer durchgeführt.

#### 2.2.1.3.2 Nichtdenaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Es wurden Agarose-Gele einer Konzentration von 1 % - 2 % [w/v] in 1x TAE (40 mM Tris-HCl, 20 mM Natriumacetat, 2 mM EDTA, pH 8,0) verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 0,2 Vol. Probenladungspuffer (30 % [v/v] Glycerin, 2 % [v/v] 50x TAE, 0,25 % [w/v] Bromphenolblau) versetzt, auf das nichtdenaturierende Agarose-Gel aufgetragen und bei 70-100 V elektrophoretisch mit 1x TAE als Laufpuffer aufgetrennt. Als Größenstandard diente  $\lambda$ -DNA, die mit *Pst*I geschnitten war. Anschließend wurde das Agarose-Gel 10-15 min in der Ethidiumbromid-Färbelösung (0,5  $\mu$ g/ml) inkubiert und auf einem UV-Transilluminator mit einer Kamera dokumentiert.

#### 2.2.1.4 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und unter UV-Licht das DNA-Fragment erwarteter Größe mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Reinigung erfolgte mit dem „QIAquick Gel Extraktion Kit“ (QIAGEN, Hilden) entsprechend dem Protokoll des Herstellers.

#### 2.2.1.5 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten erfolgte nach der *random prime*-Methode (Feinberg und Vogelstein, 1984) mittels des „Megaprime-DNA labelling kits“ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) entsprechend der Herstellerangaben. Es wurden etwa 50-100 ng gereinigte DNA-Fragmente (Kap. 2.2.1.4) und 50  $\mu$ Ci  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dATP verwendet. Die nichteingebauten Nukleotide wurden über „ProbeQuant™ G-50 Micro Columns“ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) abgetrennt.

#### 2.2.1.6 Transfertechniken

##### 2.2.1.6.1 Northern-Transfer

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurde die RNA mittels Kapillarblot unter Verwendung von Saugpapier (Filtrak, Niederschlag) und 20x SSC (3 M Natriumacetat, 0,3 M Natriumacetat, pH 7,0) auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche, Mannheim) überführt. Nach dem Transfer von ca. 16 h wurde die RNA durch UV-Bestrahlung bei 302 nm im „UV Stratalinker™ 1800“ (Stratagene, Heidelberg) kovalent an die Membran gebunden.

#### 2.2.1.6.2 Southern-Transfer

Ca. 30 µg genomische DNA wurden mit einer Restriktionsendonuklease unter Zusatz von RNase A über Nacht bei 37°C gespalten und im nichtdenaturierenden Agarose-Gel für ca. 16 h bei 18 V aufgetrennt. Das Agarosegel wurde anschließend für 15 min in 0,25 N HCl, 45 min in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) und nachfolgend 2 x 15 min in Neutralisierungslösung (0,5 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl, pH 7,0) geschwenkt. Der Transfer der DNA erfolgte wie für den Northern-Transfer (Kap. 2.2.1.6.1) beschrieben.

#### 2.2.1.7 Radioaktive Hybridisierung

Die Membran wurde mit 20 ml Prähybridisierungslösung (0,2 % [w/v] Polyvinylpyrrolidon-40, 0,2 % [w/v] Ficoll 400 (Pharmacia), 0,2 % [w/v] BSA Fraktion V (Roche, Mannheim), 48 % [v/v] Lösung N (1,8 M NaCl, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM EDTA, 0,2 % [w/v] SDS, pH 7,0), 48 % [v/v] Formamid, 100 µg/ml hitzedenaturierte Heringssperma-DNA (Sigma)) für mind. 1 h bei 42°C in einem Hybridisierungsofen vorbehandelt. Zur Hybridisierung wurde die Prähybridisierungslösung mit einem radioaktiv markiertem, für 10 min bei 95°C denaturiertem und auf Eis rasch abgekühltem DNA-Fragment versetzt und die Membran für ca. 16 h bei 42°C inkubiert.

Nach Entfernen der Hybridisierungslösung wurde die Membran bei 60°C dreimal für 20 min mit der Waschlösung (3x SSC, 0,1 % [w/v] SDS) inkubiert und anschließend mit Folie abgedeckt. Der Nachweis der radioaktiv markierten Nukleinsäuren erfolgte unter Verwendung eines „Phosphor-Screens“ (Molecular Dynamics, Krefeld), der nachfolgend mit Hilfe eines Laserstrahls am „Phosphor-Imager“ (Molecular Dynamics, Krefeld) ausgelesen wurde.

Zum Entfernen der radioaktiv markierten DNA-Fragmente wurden die Nylonmembranen dreimal für mindestens 15 min in 0,1x SSC, 0,1 % [w/v] SDS bei 60°C gewaschen.

#### 2.2.1.8 Reverse Northern- Blot

Die verwendeten *Reverse Northern*-Blots wurden von der AG Conrad, IPK Gatersleben zur Verfügung gestellt.

##### 2.2.1.8.1 Herstellung der Sonden

Die Isolierung von mRNA erfolgte aus 30 µg Gesamt-RNA mittels „Dynabeads® mRNA Purification Kit“ (Dynal, Norwegen) laut den Herstellerangaben. Anschließend wurde die Erststrang-cDNA-Synthese durchgeführt. Dabei diente die oligo (dT)<sub>25</sub> -Sequenz nicht nur zur Bindung der mRNA sondern gleichzeitig auch als Primer für die Reverse Transkriptase (Superscript II RNase H<sup>-</sup>, Invitrogen, Karlsruhe). Dadurch erfolgte eine kovalente Bindung der

Erststrang-cDNA an die Oligo (dT)<sub>25</sub> Dynabeads®. Dazu wurde die an die Dynabeads gebundene mRNA dreimal mit 250 µl 1 x RT-Puffer (50 mM Tris, 50 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,3) gewaschen und anschließend mit 10 µl 5 x Erststrangpuffer (Invitrogen, Karlsruhe), 0,5 µl 100 mM DTT, 2,5 µl 10 mM dNTPs, 1,25 µl RNasin® Ribonuclease Inhibitor (Promega, Madison, USA) und 34,75 µl Wasser versetzt. Nach einer Inkubation von 2 min bei 42°C erfolgte die Zugabe von 1 µl Reverser Transkriptase. Der Ansatz wurde für 1h bei 42°C inkubiert und dabei in regelmäßigen Abständen geschüttelt. Danach wurden die Dynabeads zweimal mit 1 x RT-Puffer gewaschen und anschließend die mRNA durch Zugabe von 50 µl Elutionspuffer (2 mM EDTA, pH 8,0) und Erhitzen der Probe für 2 min auf 95°C eluiert. Nach wiederholter Elution wurden die Dynabeads zweimal mit 250 µl Wasser gewaschen und an der kovalent gebundenen Erststrang-cDNA die radioaktiv markierte Sonde mit 50 µCi α-[<sup>33</sup>P] dATP hergestellt (Kap. 2.2.1.5). Die Elution der radioaktiv markierten Sonde erfolgte mittels Zugabe von 50 µl Elutionspuffer und Inkubation für 2 min bei 95°C. Anschließend wurden eventuelle Verunreinigungen der Sonde mit den Dynabeads mittels einer VectaSpin Micro™-Säule [0,02 µm] (Whatman, England) entfernt. Vor der Zugabe der markierten Sonde zu den Filtern wurde diese für 2 min bei 95°C erhitzt. Die Hybridisierung der Filter erfolgte bei 42°C über Nacht. Anschließend wurden die Filter bei 60°C je 10 min mit 1) 2x SSC, 0,1 % [w/v] SDS; 2) 1x SSC, 0,1 % [w/v] SDS; 3) 0,2x SSC, 0,1 % [w/v] SDS gewaschen und anschließend über Nacht auf einem Phosphorscreen exponiert.

Zum Entfernen der radioaktiv markierten DNA-Fragmente wurden die Filter 1x für 5 min mit 2x SSC bei 90°C, 1x für 15 min mit 0,4 M NaOH, 0,1 % [w/v] SDS bei 65°C und 2x für 15 min mit 0,1 M Tris pH 7,5, 2x SSC, 0,1 % [w/v] SDS bei RT gewaschen.

#### 2.2.1.8.2 Auswertung der Filter mittels „Array Vision“

Zur Auswertung der Signale diente eine von der AG Altschmied, IPK Gatersleben zur Verfügung gestellte Maske, die eine schnelle Zuordnung der Signale ermöglichte. Die absoluten Signalintensitäten wurden mittels der Software „Array Vision“ (Amersham Bioscience, Freiburg) nach einer entsprechenden Hintergrundkorrektur angegeben. Da die Markierungsintensität für jede Probe unterschiedlich ist, müssen die erhaltenen absoluten Intensitäten normalisiert werden. Es wurde die Möglichkeit der Normalisierung gewählt, die bei Filtern mit überwiegend differentiell exprimierten Genen angewendet wird (Winzeler *et al.*, 1999). Dazu wurden die erhaltenen absoluten Intensitäten durch den Mittelwert der Intensitäten von mindestens zwei Kontrollgenen, die keine Änderung im Expressionsmuster erwarten lassen, dividiert.

### 2.2.1.9 Screening von *Phage Display*-Bibliotheken

#### 2.2.1.9.1 Eigenschaften der verwendeten Bibliotheken

Die verwendeten *Phage Display*-Bibliotheken wurden von Ian M. Tomlinson (MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK) zur Verfügung gestellt. Beide Bibliotheken basieren auf humanen, *in vitro* hergestellten Antikörpersequenzen, wobei Bibliothek A genomische DNA (Keimbahn) und Bibliothek B polyA<sup>+</sup>-mRNA (somatische Mutationen) zu Grunde liegt. Diese Antikörpersequenzen wurden über einen *linker* im pIT1-Vektor (Anhang) so kloniert, dass funktionale c-myc verknüpfte *scFv*-Antikörper gebildet wurden. Ein weiteres Merkmal des pIT1-Vektors ist das vom c-myc-Tag 3' gelegene *amber*-Codon. Es ermöglicht im *E. coli*-Suppressorstamm TG1 die Bildung von *scFv*-Antikörperfusionen mit dem gIII-Hüllprotein der Phagen. Dadurch werden die *scFv*-Antikörper auf der Phagenoberfläche präsentiert und können entsprechend ihrer Bindungseigenschaften an bestimmte Epitope selektiert werden. Im Gegensatz dazu werden im *E. coli*-Nonsuppressorstamm HB2151 lösliche *scFv*-Antikörper gebildet, da es am *amber*-Codon zum Kettenabbruch kommt.

#### 2.2.1.9.2 Anzucht der Phagen-Bibliotheken

Nach Zusatz der Phagemid-Bibliothek zu 500 ml 2x TY-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 1 % [w/v] Glucose wurde der Ansatz bei 37°C bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,4 inkubiert. Anschließend wurden 50 ml des Ansatzes mit 2,5 x 10<sup>11</sup> Helferphagen versetzt.

Der Rest des Ansatzes wurde genutzt, um eine zweite Stocklösung der Phagemid-Bibliothek zu erhalten. Dazu wurde die Kultur für weitere 2 h bei 37°C geschüttelt, zentrifugiert (10800 x g, 10 min) und in 10 ml 2x TY mit 15 % [v/v] Glycerin resuspendiert. 500 µl Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Der mit Helferphagen versetzte Teil des Ansatzes wurde für 2 h bei 37°C (ohne Schütteln) inkubiert, zentrifugiert (3300 x g, 10 min) und in 500 ml 2x TY-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin resuspendiert und über Nacht bei 30°C schüttelnd inkubiert. Die Übernachtskultur wurde zentrifugiert (10800 x g, 15 min) und 400 ml des Überstandes mit 100 ml PEG/NaCl (20 % Polyethylenglykol 6000, 2,5 M NaCl) versetzt, gut geschüttelt und für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde zentrifugiert (10800 x g, 30 min) und das Präzipitat in 8 ml TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,4) gelöst, erneut mit 2 ml PEG/NaCl versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (3300 x g, 30 min) wurde das Präzipitat in 5 ml PBS (5,84 g NaCl, 4,72 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,64 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, pH 7,2 auf 1 l) resuspendiert und zentrifugiert (11600 x g, 10 min). Die sich im Überstand befindlichen Phagen wurden für kurze Zeit bei 4°C bzw. für längere Zeiträume mit 15 % Glycerin versetzt bei -80°C gelagert.



#### *Titerbestimmung der Phagenbank:*

Die hergestellten Phagen wurden 1:1000 in PBS verdünnt. 1 µl dieser Verdünnung diente der Infektion von 1 ml *E. coli* TG1 (OD<sub>600</sub> von 0,4). Anschließend wurden jeweils 50 µl der unverdünnten, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-4</sup> und 10<sup>-6</sup> verdünnten Lösung auf TYE-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin und 1 % [w/v] Glucose ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Titer der genutzten Phagenbank sollte zwischen 10<sup>12</sup> und 10<sup>13</sup>/ml betragen.

#### 2.2.1.9.3 Anzucht der Helferphagen

200 µl *E. coli* TG1 (OD<sub>600</sub> von 0,2) wurden mit 10 µl Helferphagen folgender Verdünnung (10<sup>-2</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-6</sup>) 30 min bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Dieser Ansatz wurde zu 3 ml 42°C warmen Topagar gegeben, auf TYE-Platten verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Ein Phagenplaque wurde in 5 ml *E. coli* TG1 (OD<sub>600</sub> von 0,2) überimpft und für 2 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Dieser Ansatz wurde zu 500 ml 2x TY-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin gegeben und über Nacht bei 30°C schüttelnd inkubiert. Die Phagenpräzipitation und Titerbestimmung erfolgte wie unter 2.2.1.9.2 beschrieben.

#### 2.2.1.9.4 *Screening* der Phagenbank und Selektion spezifisch bindender Phagen

Pro durchmusterter Phagenbank wurden 6 Vertiefungen einer MaxiSorb™-Platte (Nunc-Immuno™ Plate MaxiSorb™ Surface, Nunc, Wiesbaden) mit 50 µg/ml Antigen ((-)/(-) JA-BSA-Konjugat bzw. OPDA-BSA-Konjugat) in Karbonatpuffer (50 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6) über Nacht bei RT beschichtet. Anschließend wurden die Vertiefungen dreimal mit PBS gewaschen und 300 µl 2 % BSA/PBS (2 % BSA in PBS) für 2 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden 10<sup>12</sup> bis 10<sup>13</sup> Phagen (Kap. 2.2.1.9.2) in 2 % BSA/PBS (150 µl pro Vertiefung) gegeben, bei RT für 30 min geschüttelt und anschließend ohne Schütteln bei RT für 90 min inkubiert. Danach wurde 20 x mit PBS mit 0,1 % Tween-20 gewaschen und die Phagen mit 100 µl frisch hergestelltem 100 mM Triethylamin pro Vertiefung durch Schütteln für 10 min bei RT eluiert. Die eluierten Phagen (Vereinigung der 6 x 100 µl pro Vertiefung) wurden in 300 µl 1 M Tris-HCl pH 7,4 neutralisiert und 600 µl dieses Ansatzes zu 7,2 ml *E. coli* TG1 (OD<sub>600</sub> von 0,4) gegeben. Um noch gebundene Phagen zu eluieren, wurden in die leeren Vertiefungen 4,5 µl 1 M Tris pH 7,4 und 90 µl *E. coli* TG1 (OD<sub>600</sub> von 0,4) gegeben. Beide Ansätze wurden für 30 min bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Nach der Vereinigung der Ansätze wurde die Zellsuspension zur Titerbestimmung 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-4</sup> und 10<sup>-6</sup> in PBS verdünnt, 50 µl von jeder Verdünnung auf TYE-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin und 1 % [w/v] Glucose ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Der restliche Ansatz wurde zentrifugiert (3300 x g, 10 min), das Präzipitat in 1ml 2x TY-Medium resuspendiert, auf TYE-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin und 1 % [w/v] Glucose (Nunclon™ Δ Zellkulturschalen 500 cm<sup>2</sup>, Nunc, Wiesbaden) verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Nach Zugabe von 5 ml 2x TY-Medium mit 15 % [v/v] Glycerin zu den TYE-Platten wurden die *E. coli* TG1-Kolonien mit einem Spatel von der Oberfläche getrennt. 50 µl dieser Suspension wurden zu 50 ml 2x TY-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 1 % Glucose gegeben und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bei 37°C geschüttelt. 10 ml dieser Kultur wurden mit 5 x 10<sup>10</sup> Helferphagen versetzt, für 30 min bei 37°C ohne Schütteln inkubiert, anschließend zentrifugiert (3300 x g, 10 min), in 50 ml 2x TY-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin resuspendiert und über Nacht bei 30°C geschüttelt. Die Übernachtskultur wurde zentrifugiert (3300 x g, 15 min), 40 ml des Überstandes mit 10 ml PEG/NaCl versetzt und für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde zentrifugiert (3300 x g, 30 min), das Präzipitat in 1,6 ml TE resuspendiert, mit 400 µl PEG/NaCl versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurde erneut zentrifugiert und das Präzipitat in 1,2 ml PBS resuspendiert. Zur vollständigen Abtrennung aller Zelltrümmer wurde abschließend erneut zentrifugiert (11600 x g, 10 min). Der Phagenüberstand diente einer neuen *Screening*-Runde. Nach der dritten Runde wurden pro Phagenbank 96 Klone in eine Mikrotiterplatte (Nunclon™ Δ Surface [96 well], Nunc, Wiesbaden) zu 100 µl 2x TY-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 1 % [w/v] Glucose pro Vertiefung überimpft und bei 37°C über Nacht geschüttelt. 2 µl jedes Klons wurden in eine frische Mikrotiterplatte mit 200 µl 2x TY-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 1 % [w/v] Glucose überführt und für 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die restliche Übernachtskultur wurde mit 50 µl 60 % [v/v] Glycerin pro Vertiefung versetzt und bei -80°C gelagert (TG1-Glycerinkultur).

Die frisch angeimpften Kulturen dienten als Ausgangspunkt für die Produktion von Phagen. Dazu wurden pro Vertiefung 25 µl 2x TY-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 1 % [w/v] Glucose und 10<sup>9</sup> Helferphagen zugesetzt und der Ansatz für 30 min bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Danach wurde die Mikrotiterplatte für 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert, zentrifugiert (1800 x g, 10 min), das Präzipitat in 200 µl 2x TY-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin resuspendiert und bei 30°C über Nacht geschüttelt. Anschließend wurde zentrifugiert (1800 x g, 10 min) und der Phagenüberstand in eine frische Mikrotiterplatte abgehoben. Die Phagen wurden zuerst im monoklonalen Phagen-ELISA auf spezifische Bindung zu den eingesetzten Konjugaten überprüft (Kap. 2.2.2.5.1) und dienten anschließend mittels *E. coli* HB2151 der Produktion von löslichen *scFv*-Antikörpern (Kap. 2.2.1.9.5).

#### 2.2.1.9.5 Produktion löslicher *scFv*-Antikörper

10 µl der hergestellten Phagen (Kap 2.2.1.9.4) wurden zu 200 µl *E. coli* HB2151 (OD<sub>600</sub> von 0,4) pro Vertiefung gegeben und zur Anheftung der Phagen für 30 min bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. In eine neue Mikrotiterplatte wurden 100 µl 2x TY-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 1 % [w/v] Glucose pro Vertiefung vorgelegt, anschließend 2 µl der Phagen/*E. coli* HB2151-Suspension überführt und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Übernachtskultur wurde in eine frische Mikrotiterplatte mit 200 µl 2x TY-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 0,1 % [w/v] Glucose pro Vertiefung überimpft und für 3 h bei 37°C schüttelnd inkubiert (OD<sub>600</sub> ~ 0,9).

Von der restlichen Übernachtskultur wurden durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  45 % [v/v] Glycerin pro Vertiefung Glycerinkulturen (HB2151-Glycerinkulturen) angelegt. Die Induktion der Produktion löslicher *scFv*-Antikörper erfolgte mittels Zugabe von 25  $\mu\text{l}$  2x TY-Medium mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin und 9 mM IPTG. Der Ansatz wurde bei 30°C über Nacht geschüttelt und anschließend zentrifugiert (1800 x g, 10 min) und der Überstand im ELISA getestet (Kap. 2.2.2.5.2).

#### 2.2.1.10 Klonierungstechniken

Zur Konstruktion und Klonierung von Plasmiden wurden die Restriktionsendonukleasen der Firma ROCHE (Mannheim) verwendet. Die Standardmethoden erfolgten wie in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben.

##### 2.2.1.10.1 Dephosphorylierung

Um die Selbstligation der linearisierten Vektor-DNA zu verhindern, wurde diese direkt nach der Restriktionsspaltung mit alkalischer Phosphatase aus *Palaemon borealis* (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben behandelt.

##### 2.2.1.10.2 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit dem „Rapid DNA Ligation Kit“ (Roche, Mannheim) laut der Herstellerangaben.

##### 2.2.1.10.3 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion diente der Amplifikation von Nukleotidsequenzen. PCR-Ansätze wurden entsprechend Tab. 2-4 angesetzt.

In Thermocyclern (Perkin Elmer) wurde die PCR-Amplifikation unter Verwendung des folgenden Programms durchgeführt: 2 min Denaturierung bei 94°C, 28 Zyklen mit 30 s 94°C, 30 s 63°C, 1 min 72°C, 7 min 72°C.

**Tab. 2-4. PCR-Ansatz für 50  $\mu\text{l}$**

Reagenz	Volumen [ $\mu\text{l}$ ]	Endkonzentration
steriles Wasser	variabel	
10 x <i>Taq</i> -Reaktionspuffer	5	1 x
dNTP-Mix	5	200 $\mu\text{M}$
<i>Forward</i> Primer	1	0,5 $\mu\text{M}$
<i>Reverse</i> Primer	1	0,5 $\mu\text{M}$
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	1	5 U
Template-DNA	variabel	10-100 ng
Gesamtvolumen	50	

## 2.2.1.11 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

### 2.2.1.11.1 Automatisierte Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA-Fragmente erfolgte mittels eines automatischen Sequenzierers (LiCor, Modell 4000L bzw. LONGREADIR 4200, MWG-Biotech, Ebersberg). Die Sequenzierreaktion wurde mit dem „SequiTherm EXCE™ Long-Read™ Sequencing Kit“ (BIOzym Diagnostik GmbH, Oldendorf) durchgeführt, wobei die verwendeten Primer 5'-Fluoreszenzmarkierungen („IRD700“ bzw. „IRD800“, MWG-Biotech, Ebersberg) besaßen.

### 2.2.1.11.2 Computergestützte Sequenzanalyse

Sequenzvergleiche wurden mit Hilfe von Programmen durchgeführt, die den BLAST-Algorithmus verwendeten (Altschul *et al.*, 1997). Dazu wurde der vom *National Centre for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>) und vom *ExpASY Molecular Biology Server* (<http://www.expasy.ch>) angebotene Service genutzt.

## 2.2.2 Proteinanalytik

### 2.2.2.1 Proteinisolierung

#### 2.2.2.1.1 Proteinisolierung aus bakteriellem Überstand von *E. coli* HB2151

100 µl induzierter Überstand (Kap. 2.2.1.9.5) wurde mit 20 µl StrataClean™-Resin (Stratagene, Heidelberg) vermischt und 15 min geschüttelt. Anschließend wurde zentrifugiert (2 min, 12000 x g, RT), der Überstand abgehoben, das Pellet mit 40 µl Probenpuffer (1 ml 10 % [v/v] Glycerin, 1,4 ml *stacking* Puffer (0,8 % [w/v] SDS, 0,5 M Tris-HCl pH 6,8) versetzt und für 5 min gekocht. Davon wurden 40 µl in einem 12,5 %igen, denaturierenden Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970) aufgetragen (Kap. 2.2.2.2).

#### 2.2.2.1.2 Proteinisolierung aus Pflanzenmaterial

Gemörsertes Blattmaterial wurde mit 3 Vol. Extraktionspuffer (50 mM Tris, 5 mM EDTA, 0,1 % [v/v] β-Mercapto-Ethanol, 1 % [v/v] Protease Inhibitor Cocktail (Sigma, Deisenhofen)) versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde zentrifugiert (5 min, 12000 x g, 4°C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinbestimmung erfolgte mittels Bradford-Assay (Biorad, München).

### 2.2.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Es wurde die SDS-Gel-Apparatur „Sturdiel SE 400“ (Hofer Scientific Instruments, San Francisco, USA) verwendet.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 12,5 %igen, denaturierenden Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970). Zur Herstellung des Trenngels wurden 8,3 ml Acrylamid (30 % [w/v] Acrylamid, 0,8 % [w/v] N,N'-Methylenbisacrylamid), 5 ml Trenngelpuffer (3M Tris pH 8,8), 0,2 ml 10 % [w/v] SDS, 6,3 ml Wasser, 30 µl TEMED und 150 µl 10 % [w/v] APS eingesetzt; pro Sammelgel 1,2 ml Acrylamid (30 % Acrylamid, 0,8 % [w/v] N,N'-Methylenbisacrylamid), 2,5 ml Sammelgelpuffer (0,5 M Tris pH 6,8), 0,1 ml 10 % [w/v] SDS, 5,9 ml Wasser, 20 µl TEMED und 50 µl 10 % [w/v] APS.

40 µg Gesamt-Protein aus Pflanzenmaterial wurde mit 1 Vol. SDS-Probenpuffer (1 ml 10 % [v/v] Glycerin, 1,4 ml *stacking* Puffer (0,8 % [w/v] SDS, 0,5 M Tris-HCl pH 6,8), 2 ml 10 % [w/v] SDS, 5,1 ml Wasser, 0,5 ml β-Mercapto-Ethanol, 2 Kristalle Bromphenolblau) versetzt und für 10 min bei 95°C denaturiert.

Die Auftrennung erfolgte bei 120 V in Elektrophoresepuffer (25 mM Tris, 0,25 M Glycin, 0,1 % [w/v] SDS, pH 8,3). Als Molekulargewichtsstandard wurden 8 µl *prestained protein marker* (New England Biolabs, Frankfurt/M.) verwendet.

Die Gele wurden nach der Gel-Elektrophorese in Coomassie-Blue G-250-Färbelösung gefärbt bzw. für Western-Transfer verwendet.

### 2.2.2.3 Western-Transfer und Immunodetektion

#### 2.2.2.3.1 Western-Transfer

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mittels Nassblot-Verfahren in Transferpuffer (0,025 M Tris, 0,25 M Glycin, 0,1 % [w/v] SDS, pH 8,3, 20 % Methanol) auf eine Nitrocellulose-Membran (Schleicher & Schuell) über Nacht bei 18 V (Trans-Blot® Cell Apparatur, Biorad, München) bzw. für 1 h bei 100 V (Mini Trans-Blot® Cell Apparatur, Biorad, München) transferiert.

Zur Kontrolle des Transfers und zur Abschätzung der aufgetragenen Proteinmenge erfolgte die Anfärbung der Proteine auf der Nitrocellulose-Membran mit Ponceau nach einer Methode von Steffen und Link (1989).

#### 2.2.2.3.2 Immunodetektion

Nach Absättigen der Membran für 2h mit Blockierungslösung aus 5 % Trockenmilch in Marvelpuffer (20 mM Tris-HCl, 180 mM NaCl, pH 8,0) wurde die Membran mit dem monoklonalen 9E10 anti-c-myc-Antikörper (Munroe und Pelham, 1986; von Dr. U. Conrad zur Verfügung gestellt), der gegen das c-myc-Tag-Peptid gerichtet ist, in einer Verdünnung von 1:50

in der Blockierungslösung für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min bei RT mit 1:10 verdünnter Blockierungslösung und einmal mit 1x PBS (8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7,5) gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper „Anti-Mouse IgG Peroxidase Conjugate“ (Sigma, Deisenhofen) erfolgte für 1 h bei RT bei einer Verdünnung von 1:2000 in der Blockierungslösung. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/0,05 % [v/v] Tween-20 von jeweils 10 min erfolgte der Nachweis des *scFv*-c-myc-Tag-Proteins durch Chemolumineszenz mit dem „ECL+Plus-System“ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) entsprechend den Herstellerangaben. Dazu wurde die Membran zusammen mit einem Röntgenfilm in einer Filmkassette für 30 s bis 20 min bei RT inkubiert.

#### 2.2.2.4 Reinigung der *scFv*-Antikörper mittels ProteinL-Säulen

3-5 g gemörserteres Blattmaterial wurden mit 3 Vol. PBS (10 mM Natriumphosphatpuffer, 0,12 M NaCl, pH 7,2) mit 0,1 % Triton-100 versetzt, für 10 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (2700 x g, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde anschließend erneut zentrifugiert (12000 x g, 10 min, 4°C). 1 ml rProteinL™-Agarose-Säule (Actigen/Affitech, Oslo, Norwegen; Björck, 1988) wurde mit 20-50 ml PBS äquilibriert und danach der Pflanzenextrakt dreimal auf die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule mit 100 ml PBS gewaschen und die *scFv*-Antikörper mit 10 ml 0,1 M Glycin pH 2,5 eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden sofort mit 1 M Tris neutralisiert und mittels Western-Analyse auf das Vorhandensein von *scFv*-Antikörpern hin untersucht. Die entsprechenden Fraktionen wurden durch Dialyse mit PEG-8000 auf 1-2 ml Endvolumen eingengt. Aliquots wurden sofort bei -20°C eingefroren, da die *scFv*-Antikörper in wässriger Lösung bei 4°C nicht stabil sind.

#### 2.2.2.5 Enzymimmuntest (ELISA)

Mikrotiterplatten (Nunc-Immuno™ Plate Maxisorb™ Surface, Nunc, Wiesbaden) wurden mit 100 µl pro Vertiefung 50 µg/ml Konjugat in Karbonatpuffer beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit PBS gewaschen und nicht besetzte Bindungsstellen mit 100 µl 3 % BSA/PBS für 2 h bei RT abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS mit 0,1 % [v/v] Tween-20 wurden 100 µl pro Vertiefung des zu testenden Extraktes (Kap. 2.2.1.9.4, 2.2.1.9.5, 2.2.2.4) zugesetzt und für 2 h bei RT inkubiert. Danach wurde erneut 5 x mit PBS mit 0,1 % [v/v] Tween-20 gewaschen, 100 µl pro Vertiefung des monoklonalen 9E10 anti-c-myc-Antikörpers (Munroe und Pelham, 1986; von Dr. U. Conrad zur Verfügung gestellt) 1:100 in 3 % BSA/PBS (lösliche, bakterielle und gereinigte, pflanzliche *scFv*-Antikörper) bzw. anti-M13-Peroxidase gekoppelte Antikörper (Phagenüberstand) 1:5000 in 3 % BSA/PBS und für 2 h bei RT inkubiert. Die Vertiefungen wurden mit PBS mit 0,1 % Tween-20 gewaschen.

Im Fall der löslichen *scFv*-Antikörper erfolgte die Zugabe von 100 µl pro Vertiefung des sekundären Antikörpers „anti-mouse-IgG-AP“ (Sigma, Deisenhofen) 1:2000 in 3 % BSA/PBS.

Nach einer Inkubation von 1 h bei RT wurde erneut 5 x mit PBS mit 0,1 % Tween-20 gewaschen, 100 µl des Substrates p-Nitrophenyl-phosphat (1 mg/ml in 1 M Diethanolaminpuffer pH 9,8 [Sigma, Deisenhofen]) pro Vertiefung zugegeben und bei 37°C inkubiert. Die Absorption bei 405 nm wurde mittels eines Mikrotiterplatten-Lesegerätes bestimmt.

Der Nachweis der gebundenen Phagen erfolgte durch Zugabe von 100 µl Substratlösung (100 µg/ml TMB in 100 mM Na-Acetat pH 6,0; direkt vor dem Gebrauch 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf 50 ml Lösung zusetzen). Zum Abstoppen der Reaktion wurden nach ca. 10 min 50 µl 1 M Schwefelsäure zugegeben. Die Differenz der Absorption bei 650 nm und 450 nm wurde mittels eines Mikrotiterplatten-Lesegerätes bestimmt.

#### 2.2.2.5.1 Phagen-ELISA

Als zu testende Extrakte dienten die unter 2.2.1.9.4 hergestellten Phagen. Dazu wurden 50 µl Phagenüberstand mit 50 µl 6 % BSA/PBS pro Vertiefung zusammen inkubiert. Der Enzymimmuntest wurde, wie in Kap. 2.2.2.5 beschrieben, durchgeführt.

#### 2.2.2.5.2 ELISA mit löslichen, bakteriellen *scFv*-Antikörpern

Es dienten als zu testende Extrakte die unter 2.2.1.9.5 hergestellten löslichen bakteriellen Überstände. Pro Vertiefung wurden 50 µl dieser Überstände mit 50 µl 6 % BSA/PBS gemischt und für 2 h bei RT inkubiert. Der Enzymimmuntest wurde, wie unter 2.2.2.5 beschrieben, durchgeführt.

#### 2.2.2.5.3 ELISA mit gereinigten *scFv*-Antikörpern aus der Pflanze

Die unter 2.2.2.4 erhaltenen gereinigten *scFv*-Antikörper wurden unverdünnt, 1:2 und 1:4 verdünnt eingesetzt. Dazu wurden 50 µl der entsprechenden Verdünnung mit 50 µl 6 % BSA/PBS inkubiert und in die Vertiefung der Mikrotiterplatte gegeben. Der Enzymimmuntest wurde, wie unter 2.2.2.5 beschrieben, durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

Systemische Resistenz kann in Kartoffel grundsätzlich durch die Infektion mit Pathogenen, aber auch durch die Behandlung mit Arachidonsäure (AA) und anderen mehrfach ungesättigten Fettsäuren erreicht werden (Strömberg und Brishammar, 1991; Kombrink *et al.*, 1996; Cohen *et al.*, 1991; Coquoz *et al.*, 1995). Im Gegensatz zu anderen pflanzlichen Systemen wie *Arabidopsis*, Tabak oder Gurke scheinen jedoch die Mechanismen der Induktion der systemischen Resistenz in Kartoffel in wesentlichen Punkten von den dort beschriebenen Signalwegen abzuweichen. So wurde nach Behandlung mit AA nur eine lokale, aber keine systemische Erhöhung der SA-Mengen beobachtet (Coquoz *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu war die Ausprägung der SAR in SA-defizienten *nahG*-Pflanzen nicht mehr durch AA induzierbar (Yu *et al.*, 1997). Zusätzlich führte die exogene Applikation von SA zwar zu einer verstärkten *PRI*-Expression, aber nicht zu einer erhöhten Resistenz in Kartoffel (Coquoz *et al.*, 1995). Diese unterschiedlichen Effekte tragen nur sehr unzureichend zur Klärung des Einflusses von SA bei der Ausprägung der induzierten Resistenz in Kartoffel bei.

Als weiteres potentiell Signal-molekül könnte JA fungieren. Erste Hinweise auf eine Beteiligung von JA an der Ausprägung der induzierten Resistenz geben Versuche, in denen durch Behandlung mit JA und MeJA ein lokaler und systemischer Schutz vor einer *P. i.*-Infektion erreicht wurde (Cohen *et al.*, 1993). Außerdem konnte nach Induktion der Resistenz in Kartoffel durch Behandlung mit *Psm* M2 eine systemische Akkumulation von 12-Oxo-Phytodiensäure (OPDA), der biosynthetischen Vorstufe von JA, beobachtet werden, während JA nur im lokalen Blattmaterial akkumulierte (Landgraf *et al.*, 2002). Die Untersuchungen zur Wundantwort in Tomate und Kartoffel unterstreichen dagegen die Bedeutung von JA, als mögliches Signalmolekül zu fungieren (Peña-Cortés *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2002).

Ziel dieser Arbeit war es, durch transgene Ansätze den Einfluss von JA, dessen Vorstufe OPDA sowie von SA als potenzielle Signalmoleküle auf die Ausprägung der induzierten Resistenz in Kartoffel zu untersuchen. Dazu wurde zunächst die Genexpression in den Kontrollpflanzen nach Behandlung mit *Psm* M2 und dem Oligopeptidelicitor Pep13 genauer analysiert.

#### 3.1 Analyse der Genexpression im Wildtyp *S. tuberosum* L. cv. Désirée nach Pathogenbehandlung mit *Psm* M2

##### 3.1.1 Analyse der Transkriptakkumulation von LOX- und Abwehrgenen mittels Northern-Blot-Hybridisierung

Nach Behandlung der WT-Pflanzen mit *Psm* M2 wurde Gesamt-RNA zu den angegebenen Zeitpunkten aus dem lokalen sowie dem systemischen Blattgewebe isoliert und anhand von Northern-Blot-Hybridisierungen analysiert. Als Sonden dienten u. a. die Abwehrgene



*StCHTA* und *StPR1a*, die bereits in vorangegangenen Untersuchungen als geeignete molekulare Marker für eine systemische Genaktivierung und die damit korrelierende Ausprägung von SAR beschrieben wurden (Kombrink und Somssich, 1997; Kistner, 1999; Göbel, 2001). Durch die Analyse der Akkumulation der *StLOX3*-Transkripte sollten außerdem Anhaltspunkte auf transkriptionelle Veränderungen innerhalb des LOX-Reaktionsweges erhalten werden. Als Kontrollen diente Blattmaterial von Pflanzen, das mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> infiltriert wurden.

Für die Transkripte der *StCHTA* und von *StPR1a* konnte nach Behandlung der WT-Pflanzen mit *Psm* M2 eine Akkumulation im lokalen sowie im systemischen Blattgewebe gezeigt werden (Abb. 3-1). Dabei wurde bereits nach 6 h eine Zunahme der Transkriptmenge im lokalen Blattgewebe beobachtet. Das Maximum der Transkriptakkumulation dieser Gene wurde nach 36 h erreicht (Abb. 3-1A). Die Akkumulation der Transkripte im systemischen Blattgewebe konnte erstmals zwischen 12 h und 18 h nach der Behandlung der Pflanzen beobachtet werden und war bis zu 72 h detektierbar (Abb. 3-1B). Eine erhöhte Transkriptmenge der *StLOX3* konnte nur im lokalen Blattgewebe gezeigt werden (Abb. 3-1).

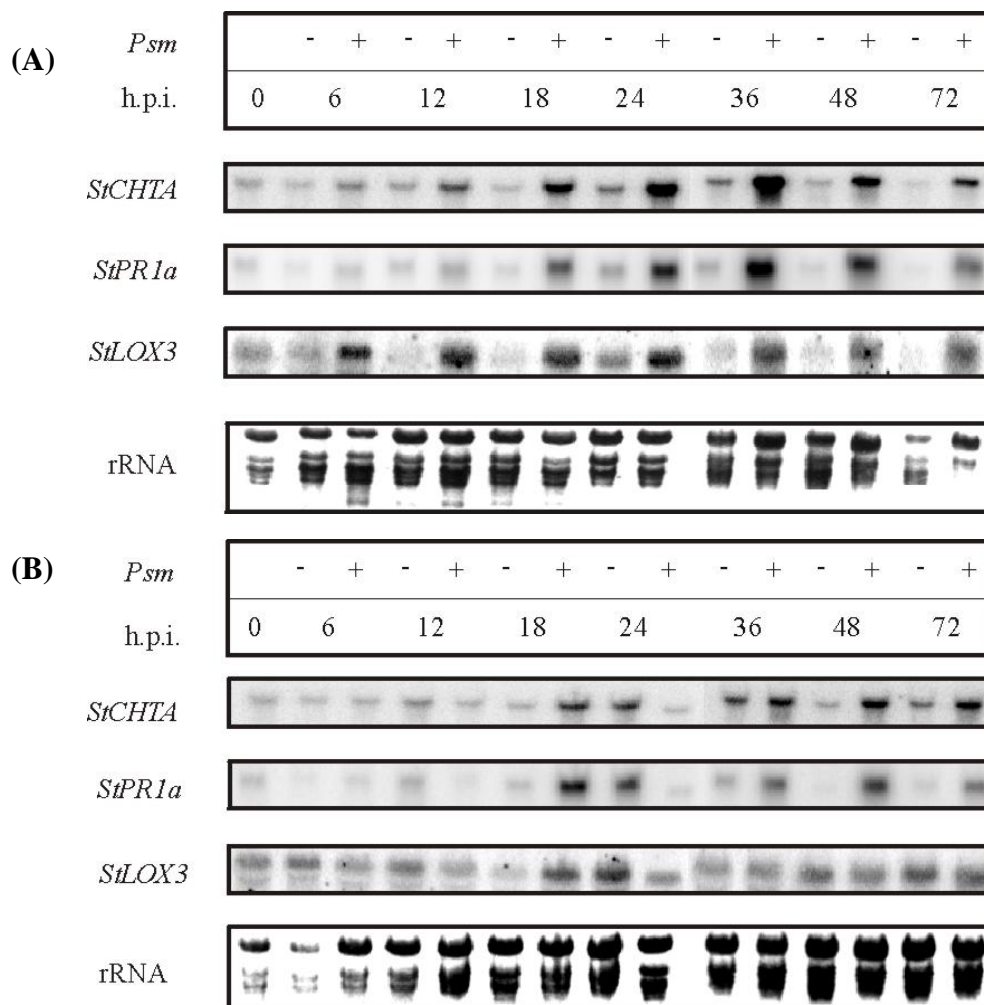


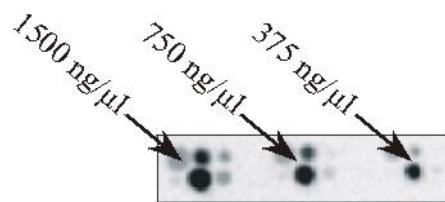
Abb. 3-1. Northern-Blot-Analyse verschiedener Gene nach Behandlung mit *Psm* M2 im lokalen und systemischen Blattgewebe von *S. tuberosum* L. cv. Désirée

Je zwei Fiederblätter der Kartoffelpflanzen wurden mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> (-) bzw. *Psm* (+) infiltriert. Gesamt-RNA wurde aus diesen („lokal“, **A**) und den darüberliegenden, nichtbehandelten („systemisch“, **B**) Blättern zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Behandlung isoliert. Je 20 µg Gesamt-RNA wurden in denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten von *StCHTA*, *StPR1a* und *StLOX3* hybridisiert. Die im Agarosegel aufgetragenen RNA-Mengen wurden durch Färbung mit Ethidiumbromid überprüft (rRNA).

### 3.1.2 Analyse der Transkriptakkumulation verschiedener Gene mittels *Reverse Northern*

Um eine komplexe Analyse der Transkriptakkumulation verschiedener Gene zu erhalten, wurde die Methode des *Reverse Northern* herangezogen. Dazu wurde die Plasmid-DNA von 247 Genen in drei verschiedenen Konzentrationen punktförmig auf eine Nylonmembran aufgebracht (von Dr. P. ten Hoopen durchgeführt).

Gesamt-RNA wurde 18 h nach der Behandlung der WT-Pflanzen mit *Psm* M2 bzw. 10 mM MgCl<sub>2</sub> extrahiert und daraus polyA<sup>+</sup>-mRNA isoliert. Die polyA<sup>+</sup>-mRNA diente zur Synthese <sup>33</sup>P markierter cDNA, die als Sonden zur Hybridisierung der Membranen eingesetzt wurde. Ein Ausschnitt einer hybridisierten Membran ist in Abb. 3-2 dargestellt.



**Abb. 3-2. Ausschnitt einer hybridisierten *Reverse Northern*-Membran**

Die cDNA von jedem Gen wurde punktförmig in 3 verschiedenen Konzentrationen an den entsprechenden Positionen auf die Nylonmembran geladen. Beispielfhaft wurde das Gen *StCHTA* markiert.

Die Klassifizierung der auf die Membran aufgebrachten cDNAs erfolgte hinsichtlich ihrer bekannten Funktion bzw. der beschriebenen Regulation ihrer Expression (Tab. 3-1).

**Tab. 3-1. Einteilung der untersuchten Gene je nach Funktion bzw. Expression in 8 verschiedene Gruppen**

Gruppe	Beispiele
1) Gene des LOX-Reaktionsweges	AOS2, OPR3, LOX3, Desaturase
2) Gene des Phenylpropanoidstoffwechsels	PAL, 4-CL, THT
3) Oxidat. Stress/Apoptose korrelierte Gene	DAD1
4) PR-Gene	PRP1, PR1a, PRB1b, PR2
5) Wundinduzierte Gene	PIN2, Cathepsin Inhibitor
6) Gene mit allg. Signalerkennungs- und Signaltransduktionsfunktion	PP2C, Kaliumkanäle, Proteinkinasen, TF
7) Allg. stressrelevante Gene	RBP, CYSP homolog, HMG-CoA-Reduktase
8) Gene des Primärstoffwechsels	ATP-Citratlyase, RUBISCO UE bindendes Protein,

Die Behandlung der WT-Pflanzen mit *Psm* M2 führte im Vergleich mit kontrollinfiltrierten Pflanzen zu einer verringerten Transkriptakkumulation verschiedener Gene des Primärstoffwechsels (Gruppe 8, Tab. 3-1). Dagegen waren die Transkriptmengen von Abwehrgenen (Gruppe 4), verschiedenen wundinduzierten Genen (Gruppe 5) sowie einigen Genen des LOX-Reaktionsweges im mit *Psm* M2 behandelten Blattgewebe erhöht (Tab. 3-2). In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis konnte nach Behandlung mit JA die Reprimierung von kern- bzw. plastidär-kodierten Genen, die hauptsächlich an photosynthetische Prozesse gekoppelt sind sowie die verstärkte Transkriptakkumulation von JA-responsiven Genen gezeigt werden (Wasternack und Hause, 2002).

**Tab. 3-2. Genexpressionsprofil der WT-Pflanzen nach Behandlung mit *Psm* M2**

Je zwei Fiederblätter der Kartoffelpflanzen wurden mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> bzw. *Psm* M2 infiltriert. Aus diesem Blattmaterial wurde nach 18 h Gesamt-RNA isoliert. Je 30 µg Gesamt-RNA wurden für die reverse Transkription verwendet und die Filter mit der erhaltenen, <sup>33</sup>P markierten cDNA hybridisiert. Verglichen wurde die Expression verschiedener Gene im mit *Psm* M2- und MgCl<sub>2</sub>-behandelten Blattgewebe von WT-Pflanzen (Ratio). Es wurden die Gene dargestellt, deren Transkriptmengen signifikante Unterschiede von mindestens zweifach aufwiesen. Die Einteilung der Gene erfolgte wie in Tab. 3-1 aufgeführt. Expressionsunterschiede von  $\geq 2$  deuten auf eine Induktion der Genexpression in den mit *Psm* M2 behandelten Pflanzen im Vergleich mit den kontrollinfiltrierten Pflanzen hin. Dagegen zeigt ein Faktor von  $\leq 0,5$  die Reprimierung der Genexpression in den mit *Psm* M2 behandelten Pflanzen an.

Gen/Funktion	Ratio	Gen/Funktion	Ratio
<b>Gene des LOX-Reaktionsweges</b>		<b>Signaltransduktionsgene</b>	
LeAOS2	3,3	"salicylic acid responsive"	3,9
StLOX3	2,2	Proteinkinase	0,4
StLOX2	0,2	NtSAR8.2	5,9
<b>Gene des Phenylpropanoid-SW</b>		<b>Allg. stressrelevante Gene</b>	
StTHT (Hydroxyzimtsäure-CoA-Transferase)	5,9	StSRE1 (Sre = systemisch responsive Gene)	0,5
<b>PR-Gene</b>		StCystein PI	2,2
StPRP1 ("pathogenesis-related protein",)	18,6	NtPAR-1b	10,8
StPRB1b (antifugal)	4,2	NtPAR-1c	8
StPR2 ( $\beta$ -1,3 Glucanase)	6	Austrocknungsstressprotein	0,3
PR3 (Chitinase PR-Q)	7,2	StPatatin	0,2
PR5 (Osmotin)	49,3	HMG-CoA-Reduktase	3,6
PR10 (Ribonuklease-ähnlich)	2,3	<b>Gene des Primärstoffwechsels</b>	
StPR1a (antifugal)	3,3	CP12	0,2
StCHTA (Chitinase A)	7,1	FBPase	0,2
Chitinase C	10,3	Enolase	2,7
<b>Wundinduzierte Gene</b>		RUBISCO Aktivase	0,04
StCathepsin Inhibitor	2,9	Protochlorophyllid Oxidoreduktase	0,08
StPIN2	5	PsaL UE Photosystem I	0,4
StPI II	4,1	ATP-Synthase UE IX (atpG)	0,09

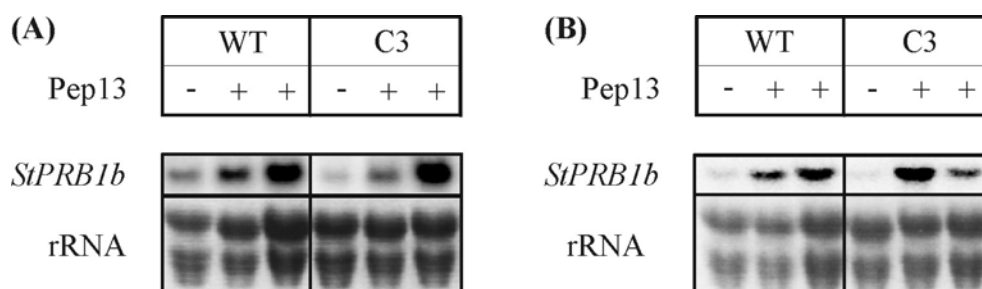
### 3.2 Analyse der Expression des Gens *StPRB-1b* im Wildtyp *S. tuberosum* L. cv. Désirée nach Behandlung mit dem Oligopeptidelicitor Pep13

In Petersilie aktiviert ein 13 AS umfassendes Peptidfragment (Pep13) aus *Phytophthora sojae* verschiedene Abwehrreaktionen, u.a. die Expression von Abwehrgenen und die Bildung von Phytoalexinen (Nürnberg *et al.*, 1994). Auch in Kartoffel konnte die Expression von Abwehrgenen (*LOX*, *4-CL*, *PR1*) nach Behandlung mit Pep13 gezeigt werden (Brunner *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu Petersilie korrelierte in Kartoffel diese Abwehrgenexpression mit der Bildung von Nekrosen (Geiler, 2001).

Als Voraussetzung für die spätere Analyse der Genexpression in den transgenen Pflanzen wurde die Akkumulation des *StPRB1b*-Transkriptes nach Behandlung von WT- und Vektorkontroll-Pflanzen (C3-Pflanzen) mit Pep13 untersucht. Die C3-Pflanzen wurden als zusätzliche Kontrollen verwendet, da sie ebenfalls über einen binären Pflanzentransformationsvektor verfügten und deshalb bis zum Auspflanzen auf Erde wie die zu untersuchenden transgenen Linien auf Kanamycin-haltigem Medium angezogen wurden (von Dr. C. Göbel zur Verfügung gestellt). Damit sollte der mögliche Einfluss von Kanamycin auf die Genexpression in den transgenen Pflanzen ausgeschlossen werden.

Es wurde Gesamt-RNA aus mit 100  $\mu$ M Pep13 behandeltem Blattgewebe nach 24 h isoliert und mittels Northern-Blot-Hybridisierung analysiert. Parallel dazu wurde auch die Akkumulation des *StPRB1b*-Transkriptes in den unbehandelten (systemischen) Blättern derselben Pflanze untersucht. Als Kontrollen dienten mit Wasser infiltrierte Pflanzen.

Sowohl im lokalen als auch im systemischen Blattgewebe der WT- und C3-Pflanzen konnten erhöhte *StPRB1b*-Transkriptmengen gezeigt werden. Dabei war die Induktion der Expression von *StPRB1b* in den WT-Pflanzen mit der Induktion in den C3-Pflanzen vergleichbar (Abb. 3-3).



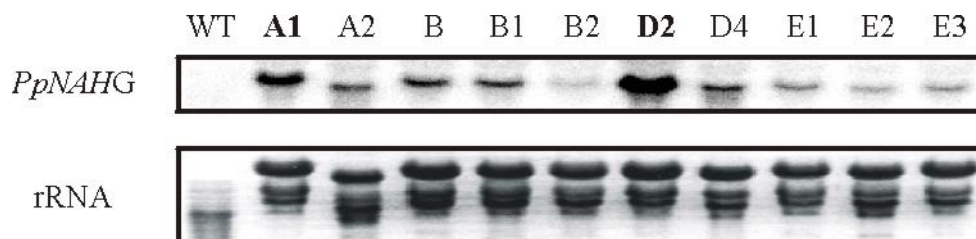
**Abb. 3-3. Northern-Blot-Analyse von *StPRB-1b* nach Behandlung mit Pep13 im lokalen und systemischen Blattgewebe von *S. tuberosum* L. cv. Désirée**

Je zwei Fiederblätter der Kartoffelpflanzen wurden mit Wasser (-) bzw. 100  $\mu$ M Pep13 (+) infiltrierte. Gesamt-RNA wurde aus diesen („lokal“, **A**) und den unbehandelten („systemisch“, **B**) Blättern 24 h nach Behandlung isoliert. Je 20  $\mu$ g Gesamt-RNA wurden in denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit dem radioaktiv markierten cDNA-Fragment von *StPRB1b* hybridisiert. Die im Agarosegel aufgetragenen RNA-Mengen wurden durch Färbung mit Ethidiumbromid überprüft (rRNA). Dargestellt sind jeweils zwei unabhängige mit Pep13 behandelte Pflanzen (+).

### 3.3 Generierung von *nahG*-Pflanzen

Wie oben erwähnt, kommt SA in Kartoffel eine von anderen Pflanzen wie Arabidopsis und Tabak abweichende Rolle in der Pathogenabwehr zu (Coquoz *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1997). Um den Einfluss von SA auf die Abwehrgenexpression in Kartoffel besser analysieren zu können, wurde der Wildtyp *S. tuberosum* L. cv. Désirée Agrobakterium-vermittelt mit dem *NahG*/pCIB200-Konstrukt (von Leslie Friedrich, Novartis Crop Protection, Inc. zur Verfügung gestellt) transformiert. Das *NahG*-Gen aus *Pseudomonas putida* kodiert für eine Salicylathydroxylase, welche SA in Catechol umwandelt (Yamamoto *et al.*, 1965). Die transgenen Pflanzen sollten deshalb über sehr geringe Mengen an SA verfügen (Gaffney *et al.*, 1993; Delaney *et al.*, 1994).

Es erfolgte zunächst die Analyse der Akkumulation von *NahG*-Transkripten in den generierten transgenen Linien (Abb. 3-4). Dabei konnte gezeigt werden, dass, im Vergleich mit den anderen getesteten transgenen Linien, die Linien A1 und D2 über sehr hohe Transkriptgehalte verfügten (Abb. 3-4). Anschließende SA-Messungen dieser Linien ergaben SA-Gehalte unterhalb des Detektionslimits (von Dr. P. Landgraf durchgeführt, Daten nicht gezeigt). Sie wurden deshalb für weitere Untersuchungen ausgewählt.



**Abb. 3-4. Northern-Blot-Analyse der Akkumulation des *NahG*-Transkriptes nach Transformation von Kartoffelpflanzen mit dem *NahG*/pCIB200-Konstrukt**

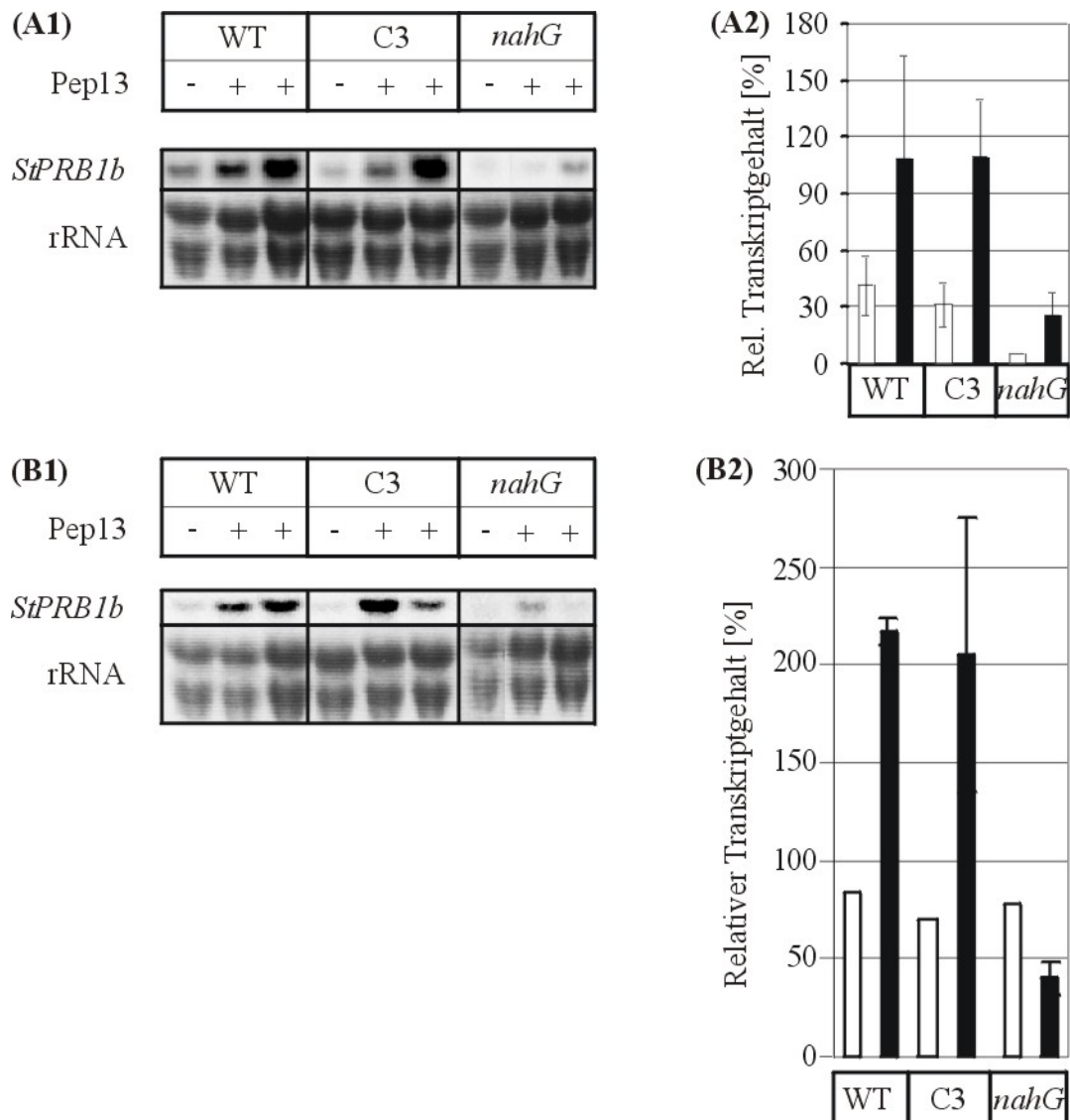
Je 20 µg Gesamt-RNA wurde in denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit dem radioaktiv markierten cDNA-Fragment von *NahG* hybridisiert. Die im Agarosegel aufgetragenen RNA-Mengen wurden durch Färbung mit Ethidiumbromid überprüft (rRNA). Dargestellt sind 10 unabhängige transgene Linien. Die Linien A2 und D2 sind fettgedruckt dargestellt.

### 3.4 Analyse der Akkumulation des *StPRB1b*-Transkriptes in den ausgewählten transgenen *nahG*-Linien nach Behandlung mit Pep13

Die transgenen *nahG*-Linien wurden mit 100 µM Pep13 bzw. zur Kontrolle mit Wasser infiltriert. Gesamt-RNA wurde 24 h nach der Behandlung aus dem behandelten sowie dem unbehandelten (systemischen) Blattgewebe isoliert und für Northern-Blot-Analysen eingesetzt. Eine Unterscheidung in Linie A2 und D2 fand dabei nicht statt.

Wie bereits in früheren Untersuchungen beschrieben (Geiler, 2001), kam es nach Behandlung der WT- und C3-Pflanzen mit Pep13 zur Ausbildung von Nekrosen (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu konnte nach der Behandlung der transgenen *nahG*-Pflanzen mit Pep13 keine Bildung von Nekrosen mehr beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Im Vergleich mit den WT- bzw. C3-Pflanzen war auch die Akkumulation des *StPRB1b*-Transkriptes in den transgenen *nahG*-Pflanzen reduziert (Abb. 3-5). Sie betrug sowohl im lokalen (Abb. 3-5, A1, A2) als auch im systemischen (Abb. 3-5, B1, B2) Blattgewebe nur noch ca. 25 % der in den Kontrollpflanzen beobachteten Transkriptmenge.



**Abb. 3-5. Northern-Blot-Analyse von *StPRB-1b* im lokalen und systemischen Blattgewebe der transgenen *nahG*-Pflanzen nach Behandlung mit Pep13**

Je zwei Fiederblätter der Kartoffelpflanzen wurden mit Wasser (-) bzw. 100  $\mu$ M Pep13 (+) infiltriert und Gesamt-RNA 24 h nach Behandlung isoliert. Je 20  $\mu$ g Gesamt-RNA wurde in denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit dem radioaktiv markierten cDNA-Fragment von *StPRB1b* hybridisiert. Die im Agarosegel aufgetragenen RNA-Mengen wurden durch Färbung mit Ethidiumbromid überprüft (rRNA).

(A) Dargestellt ist die Transkriptakkumulation von *StPRB1b* im lokalen Blattgewebe. Eine Northern-Blot-Analyse ist in (A1) exemplarisch dargestellt. Zur Berechnung des rel. Transkriptgehaltes von *StPRB1b* dienen zwei unabhängige Northern-Blot-Analysen mit je 2 unabhängigen, mit Pep13 behandelten Pflanzen (A2).

(B) Dargestellt ist die Transkriptakkumulation von *StPRB1b* im systemischen Blattgewebe. Die zur Berechnung des rel. Transkriptgehaltes von *StPRB1b* (B2) herangezogene Northern-Blot-Analyse ist in (B1) dargestellt.

Jeweils unabhängige, mit Pep13 behandelte Linien wurden durch (+) symbolisiert

### 3.5 Isolierung von *scFv*-Antikörpern, die spezifisch an BSA-gekoppelte JA bzw. OPDA binden

Die für Kartoffel gezeigte deutliche Korrelation zwischen der Akkumulation der Jasmonate und der Transkriptakkumulation von Abwehrgenen nach Behandlung mit *Psm* M2 (Landgraf *et al.*, 2002) sollte unter Verwendung transgener Pflanzen gezielter untersucht werden. Dazu sollten *scFv*-Antikörper, die spezifisch JA bzw. OPDA binden, isoliert und die korrespondierenden Gene in verschiedenen Zellkompartimenten der Kartoffel exprimiert werden. Auf diese Weise sollten die zu exprimierenden *scFv*-Antikörper in den entsprechenden Kompartimenten zu einem *sink* der betroffenen Phytohormone führen und damit die physiologisch aktiven Konzentrationen an JA bzw. OPDA reduziert werden.

#### 3.5.1 *Screening* einer menschlichen *scFv*-Antikörper-Expressionsbibliothek mittels *Phage Display*

Die synthetischen *scFv*-Phagemid-Expressionsbibliotheken A und B wurden von Ian M. Tomlinson (MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK) zur Verfügung gestellt. Beide Bibliotheken basieren auf menschlichen V-Gensegmenten, die mittels Oligonukleotidprimern vervielfältigt wurden (De Wildt *et al.*, 2000). Sie unterscheiden sich nur in ihrer Seitenkettendiversität.

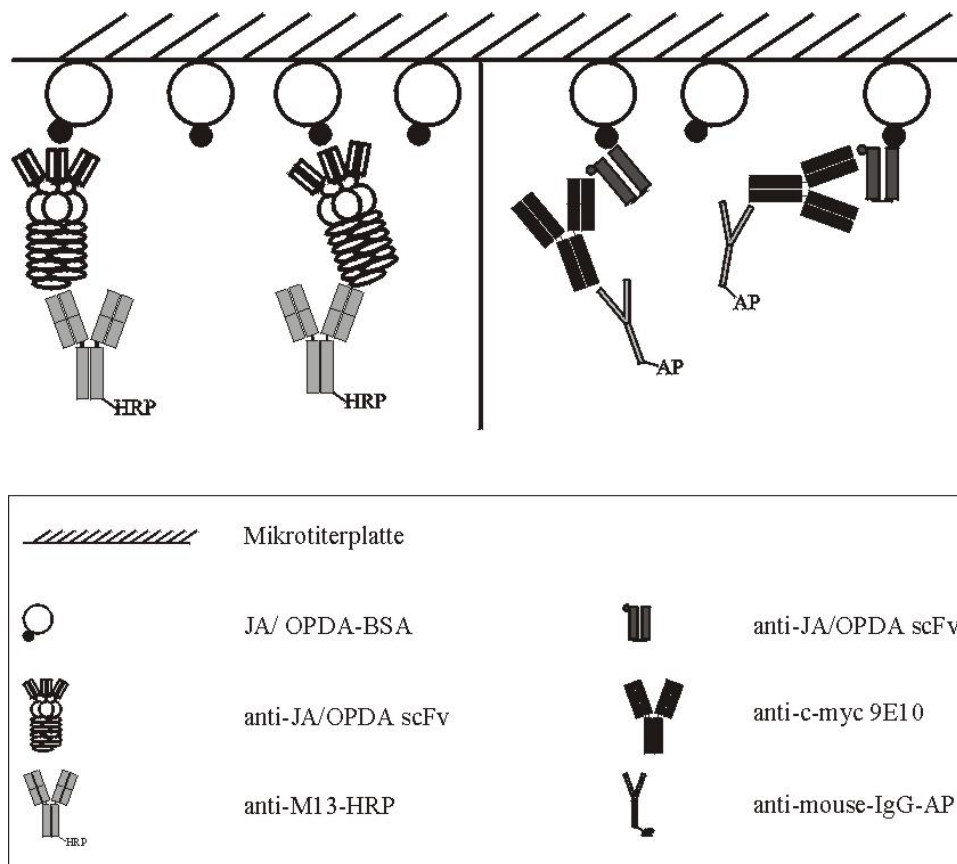
In Bibliothek A wurden hauptsächlich Seitenketten amplifiziert, die eine hohe Diversität im natürlich vorhandenen Repertoire aufwiesen. Hingegen wurden in Bibliothek B hauptsächlich Seitenketten berücksichtigt, die eine hohe natürliche somatische Mutationsrate aufwiesen oder durch zufällige Kombination verschiedener V-, D- und J-Gene entstanden sind (De Wildt *et al.*, 2000).

Die *scFv*-Antikörper kodierenden cDNAs lagen in dem Vektor pIT1 (Anhang 3) kloniert vor. Die Expression der myc-tag fusionierten *scFv*-Antikörper erfolgte im *E. coli* Stamm TG1 und HB2151. Der *E. coli* Stamm TG1 ist in der Lage, das im Linkerbereich enthaltene *amber*-Codon (Stop-Codon) zu unterdrücken. Dadurch wurden die *scFv*-Antikörper an das Phagen-Hüllprotein GIII fusioniert, womit das *Screening* der Bibliotheken durch Exposition der einzelnen *scFv*-Antikörper auf der Phagenoberfläche ermöglicht wurde. Die lösliche Expression der *scFv*-Antikörper erfolgte im *E. coli* Stamm HB2151. Bei diesem Stamm handelt es sich um einen sogenannten Nonsuppressorstamm, der nicht über die Fähigkeit verfügt, das *amber*-Codon durch Einbau der entsprechend veränderten tRNA zu unterdrücken. Deshalb kam es in diesem *E. coli*-Stamm am *amber*-Codon zum Kettenabbruch, so dass die *scFv*-Antikörper nicht an das Phagen-Hüllprotein GIII fusioniert und somit als lösliche Antikörper in den periplasmatischen Raum abgegeben wurden.

3.5.2 Isolierung spezifischer *scFv*-Antikörper mittels ELISA

Zur Isolierung spezifischer *scFv*-Antikörper wurden die Antigene JA und OPDA an BSA über deren Carboxylfunktion gekoppelt (von Dr. R. Kramell durchgeführt). Durch diese Kopplung war es möglich, die Antigene stabil an die Oberfläche von Mikrotiterplatten zu binden und somit einzelne, spezifisch bindende Phagenklone zu isolieren. Nach drei *Screening*-Runden wurden pro Bibliothek 96 Phagenklone vereinzelt und deren Bindung an das JA- bzw. OPDA-BSA-Konjugat bestimmt.

Dabei wurde zunächst die Bindungsaffinität der an die Phagenoberfläche gekoppelten *scFv*-Antikörper im Festphasen-ELISA analysiert. Anschließend wurden von allen getesteten Klonen lösliche *scFv*-Antikörper hergestellt und diese ebenfalls im Festphasen-ELISA getestet. Beide Festphasen-ELISA sind in Abb. 3-6 schematisch dargestellt. Als Kontrolle dienten jeweils BSA-beschichtete Mikrotiterplatten.



**Abb. 3-6. Festphasen-ELISA zum Nachweis der Bindung von phagegebundenen *scFv*-Antikörper (linke Seite) bzw. der Bindung von bakteriell exprimierten Antikörperfragmenten (rechte Seite) an JA bzw. OPDA als BSA gekoppeltes Konjugat**

Die Platten wurden mit dem entsprechenden BSA-Konjugat beschichtet und anschließend mit dem Phagenüberstand bzw. bakteriellen Überstand inkubiert. Der Nachweis erfolgte im Falle der Phagenüberstände mittels anti-M13-Peroxidase-gekoppelten Antikörpern. Die löslichen *scFv*-Antikörper aus dem bakteriellen Überstand wurden zunächst mit monoklonalen 9E10 anti-c-myc-Antikörpern (von Dr. U. Conrad zur Verfügung gestellt) und anschließend mit anti-mouse-AP-Antikörpern detektiert.

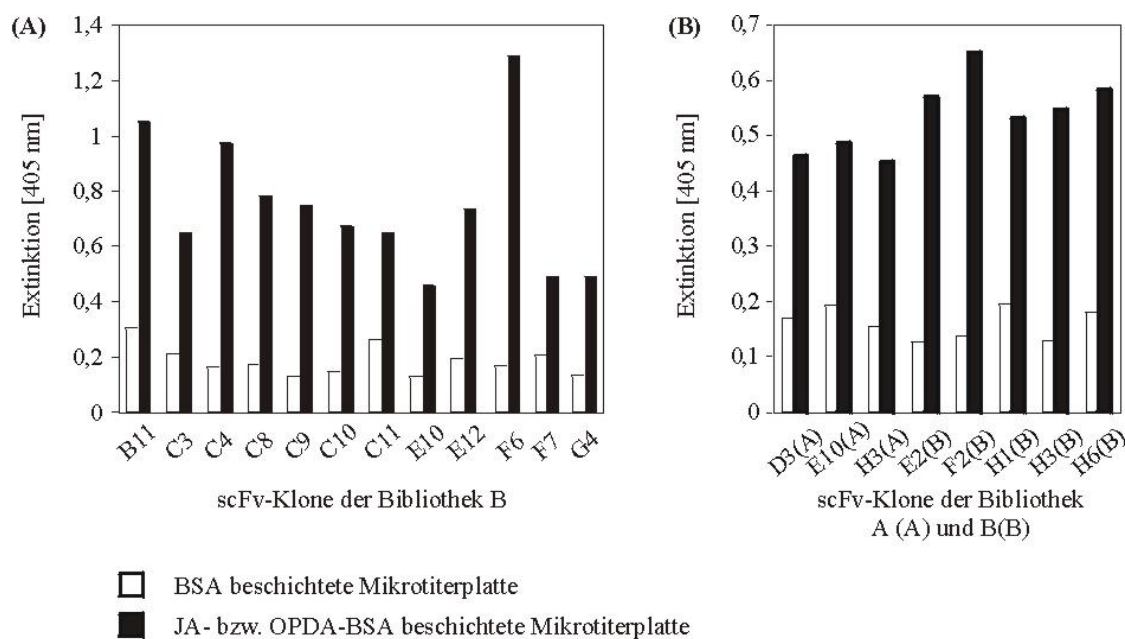


Von den 96 vereinzelt Klonen konnten aus Bibliothek A zehn (9,6 %) und aus Bibliothek B 37 (35,5 %) phagengebundene *scFv*-Klone isoliert werden, die spezifisch an das JA-BSA-Konjugat banden. Weiterhin konnte für 23 Klone (22,1 %) aus Bibliothek A und 19 Klone (18,2 %) aus Bibliothek B eine spezifische Bindung an das OPDA-BSA-Konjugat gezeigt werden (Anhang 1).

Da positive Phagenklone nicht zwangsläufig auch über gute Bindungseigenschaften als lösliche *scFv*-Antikörper verfügen, wurden von den bereits getesteten Phagenklonen lösliche Antikörperüberstände hergestellt und deren spezifische Bindungseigenschaften ebenfalls im ELISA analysiert (Anhang 2).

So konnten aus Bibliothek B 12 Klone mit spezifischen Bindungseigenschaften für das JA-BSA-Konjugat isoliert werden. Alle Phagenklone aus Bibliothek A zeigten im ELISA mit den löslichen Antikörperfragmenten keine Bindungseigenschaften mehr an das JA-BSA-Konjugat. Die Selektion von OPDA-BSA bindenden Antikörpern ergab drei Klone aus Bibliothek A und fünf Klone aus Bibliothek B.

In Abb. 3-7 sind alle löslichen *scFv*-Antikörper mit spezifischen Bindungseigenschaften an JA bzw. OPDA im Vergleich zur Bindung an BSA dargestellt.

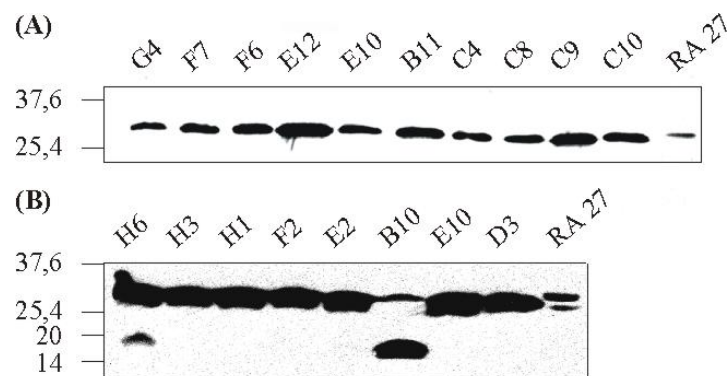


**Abb. 3-7. Bestimmung der spezifischen Bindung löslicher *scFv*-Antikörper an das JA-BSA-Konjugat (A) bzw. OPDA-BSA-Konjugat (B) mittels Festphasen-ELISA (Abb. 3-6)**

Dargestellt ist die maximale Extinktion bei  $\lambda=405$  nm, die sich aus dem Umsatz des hinzugefügten Substrates p-Nitrophenylphosphat (pnPP) ergab. Um eine Kreuzreaktivität mit BSA auszuschließen, wurde die Bindung an BSA als Negativkontrolle verwendet.

### 3.5.3 Nachweis der *scFv*-Antikörperexpression in *E. coli* mittels Western-Blot

Die molekulare Masse der Antikörperfragmente mit spezifischen Bindungseigenschaften wurde mittels Western-Blot bestimmt (Abb. 3-8). Vollständige Antikörper, die über beide variablen Domänen verfügen, sollten eine molekulare Masse von 29 kDa aufweisen. Alle im ELISA positiv getesteten Antikörper zeigten die entsprechende Größe (Abb. 3-8 A und B; *scFv*-Klon H3(A) nicht gezeigt). Dagegen verfügte der Klon B10 nur über eine variable Domäne und wurde nicht weiterverwendet (Abb. 3-8B)



**Abb. 3-8. Western-Blot-Analyse der Expression der *scFv*-Antikörper im bakteriellen Überstand der selektierten Phagen-Klone**

Die aus dem bakteriellen Überstand der *E. coli*-Klone extrahierten Proteine wurden in einem 12,5 %igem SDS-PAA-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit 9E10 anti-c-myc-Antikörpern (von Dr. U. Conrad zur Verfügung gestellt) detektiert. Dargestellt sind *scFv*-Antikörper mit einer spezifischen Bindung an das JA-BSA-Konjugat (A) bzw. OPDA-BSA-Konjugat (B). Als Postivkontrolle wurde der aufgereinigte anti-ABA-*scFv*-Antikörper (RA27, von Dr. U. Conrad zur Verfügung gestellt) eingesetzt.

### 3.6 Konstruktion der zur Pflanzentransformation verwendeten Kassetten

Die Auswahl der zur Pflanzentransformation verwendeten *scFv*-Klone erfolgte aufgrund ihrer erhaltenen spezifischen Bindung an das JA- bzw. OPDA-BSA-Konjugat (Abb. 3-7).

So wurden nach dem *Screening* der Phagenbibliotheken mit dem JA-BSA-Konjugat als Antigen die *scFv*-Klone B11, C4 und F6 ausgewählt. Die cDNAs der Klone D3, E10 und F2, die aus dem *Screening* der Phagenbibliotheken mit dem OPDA-BSA-Konjugat als Antigen stammten, wurden ebenfalls selektiert. Die sechs korrespondierenden cDNA-Sequenzen wurden in entsprechende Expressionskassetten kloniert, die die Akkumulation der *scFv*-Antikörper im ER bzw. im Cytosol ermöglichen sollten (Abb. 3-9A, B).

Da ein Teil der Biosynthese von JA einschließlich der Bildung von OPDA im Chloroplasten verläuft (Stelmach *et al.*, 2001), wurde die cDNA von Klon F2 zusätzlich in drei verschiedene chloroplastidäre Expressionskassetten kloniert (Abb. 3-9C, von P. ten Hoopen durchgeführt). Insgesamt standen somit 15 verschiedene Konstrukte für die Agrobakterium-vermittelte Pflanzentransformation zur Verfügung.

### 3.6.1 Klonierungsstrategie zur Akkumulation der *scFv*-Antikörper im ER

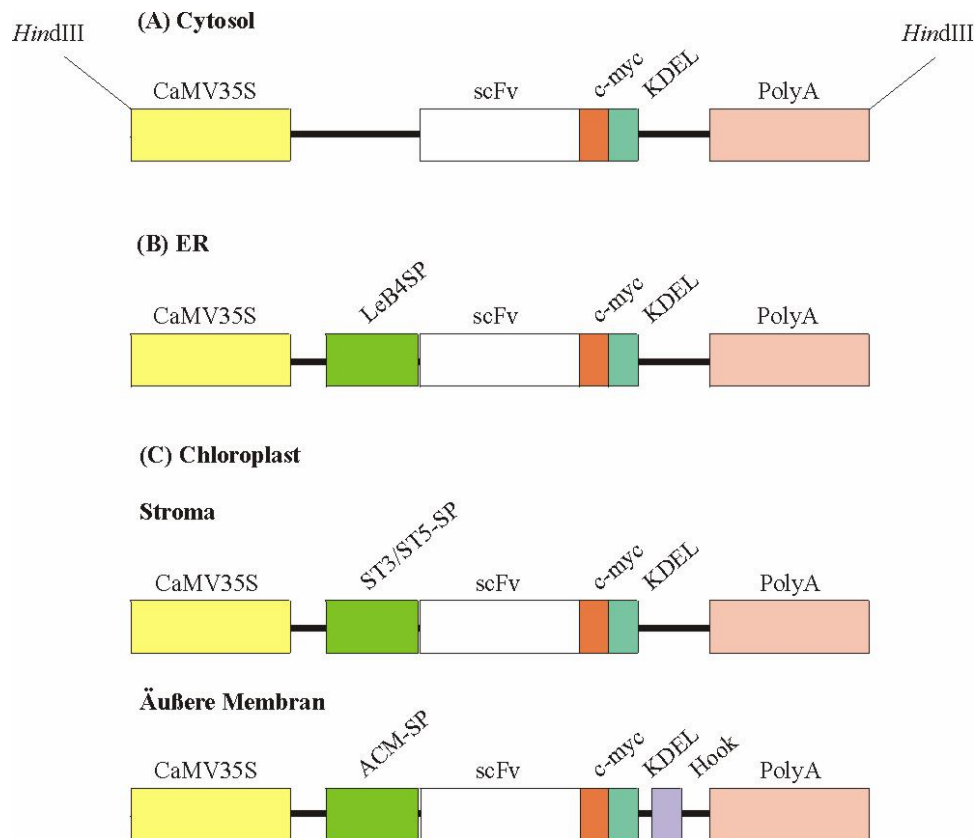
Zur Akkumulation der *scFv*-Antikörper im ER wurden die ausgewählten cDNAs, die aus dem Phagemid-Vektor pIT1 (Anhang) stammten, mittels PCR unter Verwendung der Primer ForTom1 und BacklegT1 (Tab. 2-3) mit *Bam*HI-Restriktionsschnittstellen versehen. Die erhaltenen Fragmente wurden mit *Bam*HI gespalten und anschließend in den ebenfalls mit *Bam*HI gespaltenen Vektor pRTRA7/3 (Artsaenko *et al.*, 1995) ligiert. Dieser Vektor enthält eine Pflanzentransformationskassette, bestehend aus dem 35S CaMV-Promotor, dem LeguminB4-Signalpeptid (Eintritt in das ER; Bäumlein *et al.* 1991), der KDEL-Sequenz (Retention der *scFv*-Antikörper im ER; Munroe und Pelham, 1987) und dem PolyA-Signal. Die Expression der Antikörper erfolgte als N-terminale myc-tag Fusion. Durch Restriktion mit *Hind*III wurde diese Expressionskassette in den binären Pflanzentransformationsvektor pBin19 kloniert (Abb. 3-9B).

### 3.6.2 Klonierungsstrategie zur Akkumulation der *scFv*-Antikörper im Cytosol

Zur Akkumulation der *scFv*-Antikörper im Cytosol wurden die ausgewählten cDNAs mittels *Nco*I/*Not*I aus dem Phagemid-Vektor pIT1 gespalten und anschließend in den ebenfalls *Nco*I/*Not*I gespaltenen Vektor pRTRA7/3 (Artsaenko *et al.*, 1995) ligiert. Dabei kam es zum Verlust des LeguminB4-Signalpeptids und somit nicht mehr zum Transport der *scFv*-Antikörper in das ER. Sie verbleiben im Cytosol. Durch Restriktion mit *Hind*III erfolgte die Klonierung der Expressionskassette in den binären Pflanzentransformationsvektor pBin19 (Abb. 3-9A).

### 3.6.3 Klonierungsstrategie zur Akkumulation der *scFv*-Antikörper in den Chloroplasten

Zur Akkumulation der *scFv*-Antikörper in den Chloroplasten wurde die LeguminB4-Signalsequenz durch drei verschiedene Chloroplasten-Transitsequenzen (ST3, ST5, ACM) ersetzt. Die Transitsequenzen ST3 und ST5 wurden verwendet, um eine Akkumulation der *scFv*-Antikörper im Stroma der Chloroplasten zu ermöglichen (Abb. 3-9C). Sie stammen von den Vorläuferproteinen der kleinen UE der Ribulosebisphosphatcarboxylase bzw. des Ferredoxins (Waegemann und Soll, 1996; Van't Hoff und De Kruijff, 1995). Als dritte eingefügte Transitsequenz (ACM) wurde die Transitsequenz des Membranproteins OEP14, welches in der äußeren Chloroplastenmembran lokalisiert ist, verwendet (Li und Chen, 1997). In Verbindung mit der C-terminal eingeführten Transmembrandomäne (Hook-Domäne) sollten sie die *scFv*-Antikörper in der äußeren Chloroplastenmembran verankert werden. Die Klonierung wurde von Petra ten Hoopen durchgeführt (ten Hoopen, 2002).



**Abb. 3-9. Übersicht über die für die Pflanzentransformation verwendeten Expressionskassetten**  
 Durch die Verwendung verschiedener Signal-/Transitpeptide bzw. Retentionssignale sollte die Akkumulation der gebildeten *scFv*-Antikörper im Cytosol (A), ER (B) bzw. in den Chloroplasten (C) gewährleistet werden.

### 3.7 Pflanzentransformation

Zur Pflanzentransformation wurden die 1,5 kb großen *HindIII*-Expressionskassetten (Abb. 3-9) in den binären Vektor pBIN19 kloniert. Anschließend wurden die erhaltenen binären Vektoren für die *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation von *S. tuberosum* L. cv. Désirée verwendet. Die Selektion der transformierten Pflanzen erfolgte auf Kanamycin-haltigem Medium.

Aus 15 unabhängigen Transformationsansätzen konnten insgesamt 247 unabhängige Pflanzen generiert werden. Nach dem Einbau der T-DNA in das Genom der Pflanzen wurde die Expression der *scFv*-Antikörper in den transgenen Pflanzen mit Hilfe von Western-Blot-Analysen untersucht. Dabei konnten in 92 der 247 getesteten, transgenen Pflanzen *scFv*-Antikörper detektiert werden (Tab. 3-3). Diese unterschieden sich sehr stark in ihren Expressionsraten.

Dabei zeigten transgene Pflanzen, in denen die Akkumulation der *scFv*-Antikörper im ER erfolgen sollte, eine im Vergleich mit den cytosolisch exprimierten *scFv*-Antikörperpflanzen höhere *scFv*-Expressionsrate (Daten nicht gezeigt).

In den transgenen Pflanzen, die *scFv*-Antikörper mit chloroplastidären Transitpeptiden exprimierten, wurden neben den *scFv*-Antikörpern mit einer molekularen Masse von 29 kDa auch Proteine mit einer molekularen Masse von ca. 17 kDa mit den 9E10 anti-c-myc-Antikörpern detektiert (Abb. 3-12C). Dabei konnte beobachtet werden, dass das Verhältnis dieser beiden Proteine Veränderungen unterlag (Daten nicht gezeigt). So konnten in unabhängigen Western-Blot-Analysen einer transgenen Pflanze unterschiedliche Expressionsraten sowohl für den *scFv*-Antikörper als auch für das Protein mit einer molekularen Masse von ca. 17 kDa gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Ob es sich bei dem Protein von ca. 17 kDa um ein im Zuge des Transports in die Chloroplasten prozessiertes Produkt oder um ein unspezifisches Abbauprodukt handelte, konnte nicht geklärt werden. Alle folgenden Experimenten wurden mit der jeweiligen F0-Generation der transgenen Pflanzen durchgeführt.

**Tab. 3-3. Anzahl unabhängiger transgener Linien pro verwendetem cDNA-Klon**

cDNA-Klon	Antigen	Expressionsort	erhaltene Anzahl transgener Linien
B11	JA-BSA	ER	5
C4	JA-BSA	ER	5
F6	JA-BSA	ER	11
B11	JA-BSA	Cytosol	-
C4	JA-BSA	Cytosol	11
F6	JA-BSA	Cytosol	5
D3	OPDA-BSA	ER	8
E10	OPDA-BSA	ER	5
F2	OPDA-BSA	ER	6
D3	OPDA-BSA	Cytosol	1
E10	OPDA-BSA	Cytosol	3
F2	OPDA-BSA	Cytosol	3
F2	OPDA-BSA	Chloroplast (ST3)	11
F2	OPDA-BSA	Chloroplast (ST5)	13
F2	OPDA-BSA	Chloroplast (ACM)	5

### 3.8 Funktionelle Analyse der generierten transgenen Pflanzen nach Verwundung und Behandlung mit Methyljasmonat (MeJA)

Da die Auswahl der weiter zu untersuchenden transgenen Pflanzen nicht allein auf der Expressionsrate der *scFv*-Antikörper in den einzelnen Pflanzen basieren sollte, wurde die Wundantwort in den transgenen Pflanzen im Vergleich mit den WT-Pflanzen untersucht.

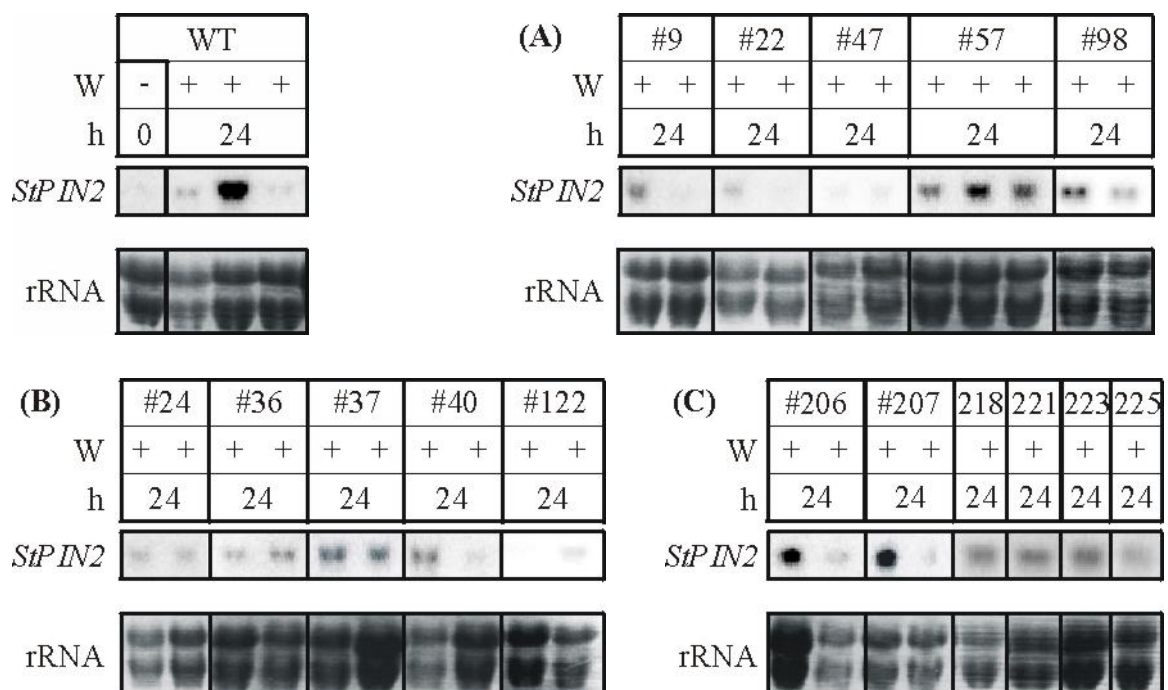
In Kartoffel konnte gezeigt werden, dass es nach mechanischer Verwundung oder Insektenfraß zum Anstieg der Jasmonat-Gehalte sowie zur lokalen und systemischen Aktivierung von Abwehrgenen, wie z. B. für Proteinaseinhibitoren kodierende Gene (*StPIN2*), kommt (Peña-Cortés *et al.*, 1995).

So sollten die physiologisch aktiven Gehalte an JA bzw. OPDA in den transgenen *scFv*-Antikörper-Pflanzen nach Verwundung durch die Bindung der anti-JA- bzw. anti-OPDA-*scFv*-Antikörper an die entsprechenden Phytohormone verringert sein, was sich in reduzierten *StPIN2*-Transkriptmengen ausdrücken müsste. Diese verringerte *StPIN2*-Transkriptakkumulation sollte durch Behandlung der transgenen Pflanzen mit Methyljasmonat (MeJA) vollständig wieder aufgehoben werden können.

### 3.8.1 Auswahl transgener Pflanzen mit beeinträchtigter Wundantwort

Die erhaltenen 92 unabhängigen, transgenen Linien (Tab. 3-3) wurden mit einer Pinzette fünffach gequetscht bzw. unter Verwendung einer Dialyseklammer verletzt. Gesamt-RNA wurde nach 24 h isoliert, da zu diesem Zeitpunkt die Transkriptakkumulation von *StPIN2* maximal sein sollte (Royo *et al.*, 1999), und für Northern-Blot-Analysen eingesetzt. Als Kontrollen dienten verwundete bzw. unverwundete WT-Pflanzen.

Trotz der relativ gleichmäßigen Verwundungsprozedur mittels Pinzette wurde bereits in den WT-Pflanzen eine große Variationsbreite hinsichtlich der Akkumulation des *StPIN2*-Transkriptes sichtbar (Abb. 3-10). Dennoch wurden transgene Pflanzen, die in mehreren unabhängigen Experimenten eine stets geringe Transkriptakkumulation von *StPIN2* aufwiesen, ausgewählt (Abb. 3-10).



**Abb. 3-10. Northern-Blot-Analyse der Transkriptakkumulation von *StPIN2* nach Verwundung in den ausgewählten transgenen Pflanzen**

Je ein Fiederblatt einer Pflanze wurde mit einer Pinzette fünffach gequetscht (+) und nach 24 h Gesamt-RNA isoliert. Je 20 µg Gesamt-RNA wurden in denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit dem radioaktiv markierten cDNA-Fragment von *StPIN2* hybridisiert.

Dargestellt sind die Transkriptmengen von *StPIN2* nach Verwundung (W) in unabhängigen Pflanzen (+) der ausgewählten, transgenen Linien der Gruppe A (A, Tab. 3-4), Gruppe B (B) und Gruppe C (C). Zur Kontrolle

wurde exemplarisch die Transkriptakkumulation von *StPIN2* nach Verwundung (W) in drei unabhängigen WT-Pflanzen dargestellt. Die im Agarosegel aufgetragenen RNA-Mengen wurden durch Färbung mit Ethidiumbromid überprüft (rRNA).

Die ausgewählten, transgenen Linien ließen sich entsprechend ihrer exprimierten *scFv*-Konstrukte in die folgenden Gruppen einteilen (Tab. 3-4). Jede Gruppe verfügte über mindestens 5 unabhängige, transgene Linien dieses Konstrukts. So umfassten die Gruppen A und B anti-OPDA bzw. anti-JA *scFv*-Antikörperpflanzen, in denen die Akkumulation der *scFv*-Antikörper im ER erfolgen sollte. Dagegen verfügten die *scFv*-Antikörper der transgenen Linien der Gruppe C über das ST3-Transitpeptid, welches an der Translokation der *scFv*-Antikörper in das Stroma der Chloroplasten beteiligt sein sollte (Waegemann und Soll, 1996). Die Bezeichnung der Gruppen wurde zur besseren Übersicht in der gesamten Arbeit verwendet.

**Tab. 3-4. Einteilung der ausgewählten transgenen Linien**

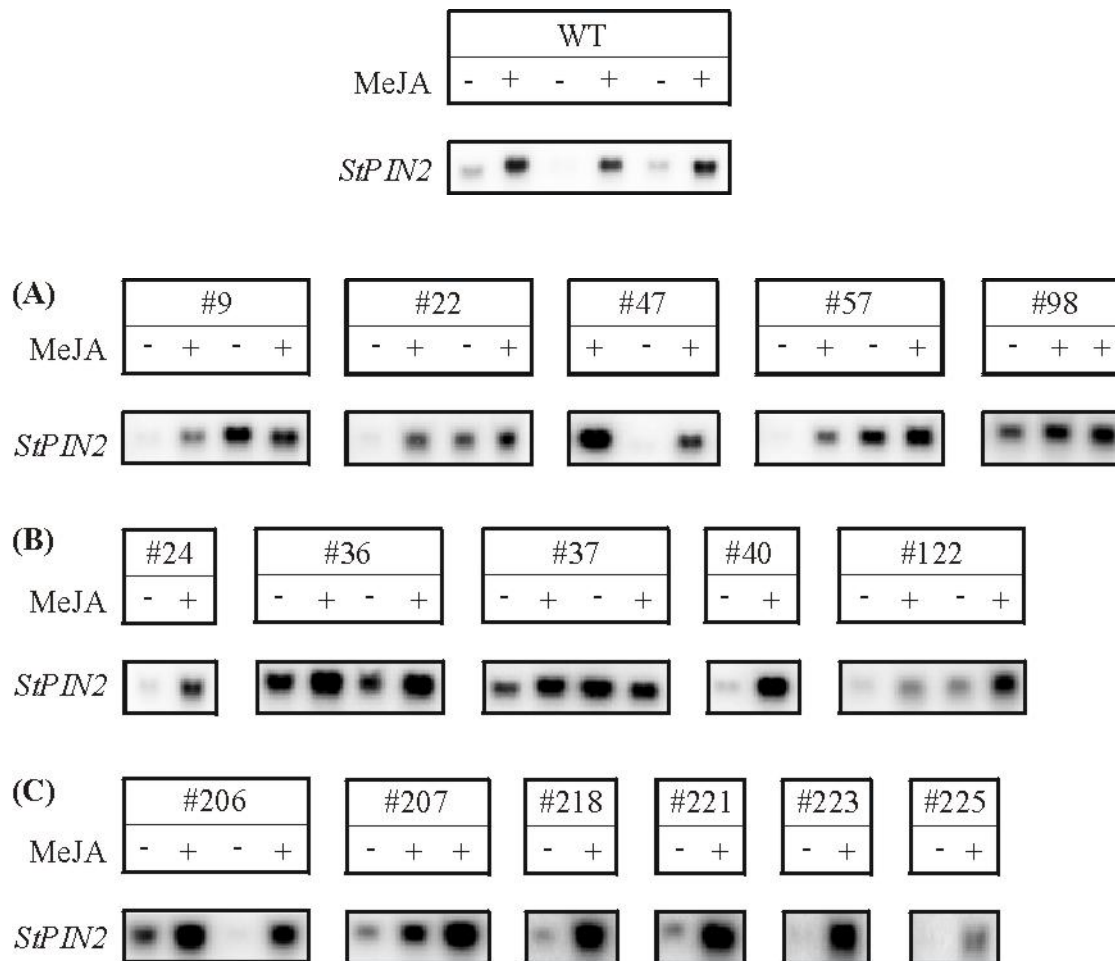
Gruppe	Antigen	cDNA-Klon	Kompartiment	Transgene Linie
A	OPDA-BSA	D3	ER	#9, 22, 47 57 98
B	JA-BSA	F8	ER	#24, 36, 37, 40, 122
C	OPDA-BSA	F2	Chloroplast	#206, 207, 218, 221, 223, 225

Phänotypische Veränderungen konnten in den transgenen Linien der Gruppen A und B beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). So waren die Fiederblätter der transgenen Linien der Gruppe A unterschiedlich stark verwachsen. Außerdem waren die Pflanzen durch ein starkes Streckungswachstum gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu wirkten die transgenen Linien der Gruppe B stark gestaucht, was auf ein reduziertes Streckungswachstum zurückzuführen war.

### 3.8.2 Transkriptanalyse von *StPIN2* nach Behandlung der transgenen Linien mit MeJA

Als Anhaltspunkt, ob die verminderte Transkriptakkumulation von *StPIN2* tatsächlich auf physiologisch geringere Gehalte an JA bzw. OPDA zurückzuführen ist, wurden abgeschnittene Blätter mit Methyljasmonat (47  $\mu$ M MeJA in 0,1% Ethanol) behandelt. Als Kontrolle dienten abgeschnittene Blätter, die auf 0,1 %igem Ethanol flottiert wurden. Gesamt-RNA wurde 24 h nach der Behandlung isoliert und für Northern-Blot-Analysen eingesetzt. Als Kontrollen dienten entsprechend behandelte WT-Pflanzen.

In allen transgenen Linien konnte nach Behandlung mit MeJA eine mit dem WT vergleichbare Transkriptakkumulation von *StPIN2* beobachtet werden (Abb. 3-11). Einige kontrollbehandelte Blätter der transgenen Linien zeigten ebenfalls erhöhte *StPIN2*-Transkriptmengen, was auf eine Kontamination mit MeJA zurückzuführen sein könnte. Eine mit dem WT vergleichbare Variationsbreite der *StPIN2*-Transkriptakkumulation (Abb. 3-10) nach Verwundung kann auch in den transgenen Linien nicht ausgeschlossen werden.



**Abb. 3-11. Northern-Blot-Analyse der Transkriptakkumulation von *StPIN2* in den ausgewählten transgenen Pflanzen nach Behandlung mit MeJA**

Abgeschnittene Fiederblätter wurden für 24 h auf MeJA flottiert, geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Je 20 µg Gesamt-RNA wurde in denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit dem radioaktiv markierten cDNA-Fragment von *StPIN2* hybridisiert. Als Kontrolle wurden abgeschnittene Blätter der entsprechenden Linie mit 0,1 %igem Ethanol behandelt (-).

Dargestellt sind die Transkriptmengen von *StPIN2* nach Behandlung mit MeJA in unabhängigen Pflanzen (+) der ausgewählten, transgenen Linien der Gruppe A (A, Tab. 3-4), Gruppe B (B) und Gruppe C (C). Zur Kontrolle wurde die Transkriptakkumulation von *StPIN2* exemplarisch in drei unabhängigen WT-Pflanzen nach Behandlung mit MeJA dargestellt. Die im Agarosegel aufgetragenen RNA-Mengen wurden durch Färbung mit Ethidiumbromid überprüft (Daten nicht gezeigt).

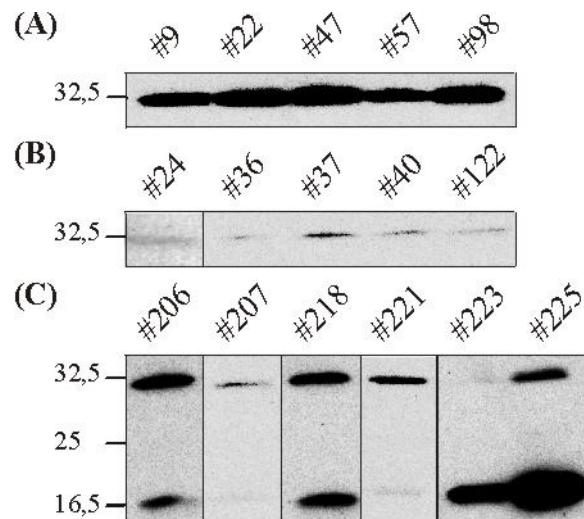
### 3.9 Western-Blot-Analyse der ausgewählten transgenen Pflanzen

Zur Bestimmung der Expressionsrate der *scFv*-Antikörper in den ausgewählten transgenen Pflanzen wurde Gesamtprotein aus mit *Psm* M2 behandeltem Blattgewebe nach 18 h isoliert und für Western-Blot-Analysen verwendet. Die Detektion der *scFv*-Antikörper erfolgte mit Hilfe der 9E10 anti-c-myc-Antikörpern (von Dr. U. Conrad zur Verfügung gestellt).

Für die transgenen Linien der Gruppen A und C (Tab. 3-4) konnten Expressionsraten von bis zu 0,05 % *scFv*-Protein des gesamtlöslichen Proteins (TSP) nachgewiesen werden (Abb. 3-12A, C; Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu zeigten die transgenen Linien der Gruppe B (Tab. 3-4) nur sehr geringe *scFv*-Expressionsraten (Abb. 3-12B). Dabei konnten in



unabhängigen Western-Blot-Analysen einer transgenen Linie leichte Unterschiede in den ermittelten Expressionsraten der *scFv*-Antikörper beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). In allen transgenen Linien der Gruppe C konnten, wie bereits in Kap. 3-7 beschrieben, neben dem *scFv*-Antikörper zusätzlich ein Protein mit einer molekularen Masse von ca. 17 kDa detektiert werden (Abb. 3-12C).



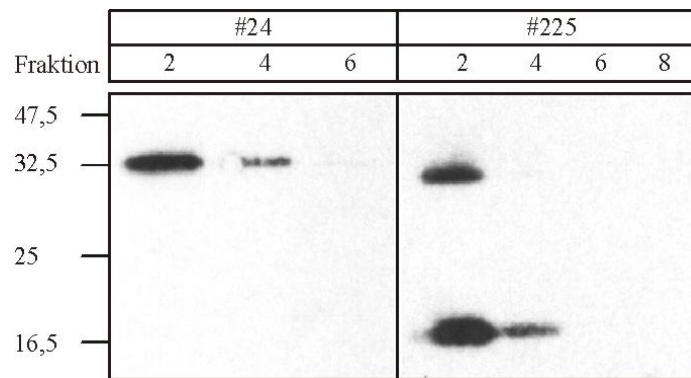
**Abb. 3-12. Western-Blot-Analyse der Expression der *scFv*-Antikörper im Blattgewebe der ausgewählten transgenen Pflanzen**

Gesamt-Protein wurde aus mit *Psm* M2 behandeltem Blattgewebe nach 18 h isoliert, in einem 12,5 %igem SDS-PAA-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit 9E10 anti-c-myc-Antikörpern (von Dr. U. Conrad zur Verfügung gestellt) detektiert. Dargestellt sind die *scFv*-Antikörper der ausgewählten transgenen Linien der Gruppe A (A), Gruppe B (B) und Gruppe C (C) (Tab. 3-4).

### 3.10 Reinigung verschiedener *scFv*-Antikörper aus Blattgewebe der transgenen Pflanzen und Analyse der gereinigten *scFv*-Antikörper mittels ELISA

Zur Analyse der in der Pflanze produzierten *scFv*-Antikörper mittels ELISA wurden die *scFv*-Antikörper der transgenen Linien #24, #207 und #225 durch Bindung an Protein L gereinigt. Der anschließende Nachweis der *scFv*-Antikörper in den Elutionsfraktionen erfolgte anhand von Western-Blot-Analysen unter Verwendung von 9E10 anti-c-myc-Antikörpern (von Dr. U. Conrad zur Verfügung gestellt). In Abb. 3-13 ist die Reinigung der *scFv*-Antikörper der transgenen Linien #24 und #225 exemplarisch dargestellt. Es konnte die Anreicherung der *scFv*-Antikörper für beide transgene Linien gezeigt werden.

In den Elutionsprofilen der transgenen Linie #207 (Daten nicht gezeigt) und #225 (Abb. 3-13) konnte auch die Anreicherung eines Proteins mit einer molekularen Masse von ca. 17 kDa beobachtet werden (Abb. 3-13). Da die Bindung der Antikörper an Protein L über ihre leichte  $\kappa$ -Untereinheit erfolgt, muss dieses Protein auch über eine leichte  $\kappa$ -Untereinheit verfügen. Es handelt sich deshalb vermutlich um ein prozessiertes *scFv*-Antikörperprodukt, welches auch schon in vorangegangenen Western-Blot-Analysen zu detektieren war (Kap. 3.9, Abb. 3-12).

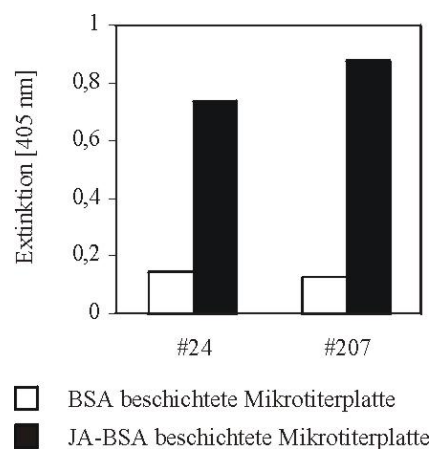


**Abb. 3-13. Western-Blot-Analyse der Reinigung der *scFv*-Antikörper aus dem Blattgewebe der transgenen Linien #24 und #225 durch Bindung an Protein L-Sepharose**

Die an Protein L gebundenen *scFv*-Antikörper wurden durch die Zugabe von 0,1 M Glycin pH 2,5 von der Säule eluiert. Die eluierten Proteine wurden in einem 12,5 %igem SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Detektion der angereicherten *scFv*-Antikörper erfolgte unter Verwendung der 9E10 anti-c-myc-Antikörper (von Dr. U. Conrad zur Verfügung gestellt).

Die gereinigten *scFv*-Antikörper der transgenen Linien #24 und #207 wurden anschließend im ELISA getestet. Da die bis dahin verwendeten JA- bzw. OPDA-BSA-Konjugate im ELISA keine Aktivität mehr zeigten, wurden neusynthetisierte JA- bzw. OPDA-BSA-Konjugate (von Dr. R. Kramell hergestellt) verwendet.

Für beide *scFv*-Antikörper konnte im Vergleich mit BSA eine vier- bis fünffach stärkere Bindung an das JA-BSA-Konjugat im ELISA beobachtet werden (Abb. 3-14). Dagegen war an das OPDA-BSA-Konjugat keine signifikante Bindung der *scFv*-Antikörper nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Da auch die anti-OPDA *scFv*-Antikörper der transgenen Linie #207 über eine spezifische Bindung an das JA-BSA-Konjugat verfügten (Kreuzreaktivität), ist die fehlende Bindung dieser *scFv*-Antikörper an das OPDA-BSA-Konjugat vermutlich auf zu geringe Kopplungsraten von OPDA an BSA zurückzuführen. Die Kopplungsraten von OPDA an BSA konnten nicht bestimmt werden, da entsprechende monoklonale Antikörper nicht zur Verfügung standen.



**Abb. 3-14. Bestimmung der spezifischen Bindung der gereinigten *scFv*-Antikörper an das JA-BSA-Konjugat mittels Festphasen-ELISA (Abb. 3-7)**

Dargestellt ist die maximale Extinktion bei  $\lambda=405$  nm, die sich aus dem Umsatz des hinzugefügten Substrates pnPP ergab. Um eine Kreuzreaktivität mit BSA auszuschließen, diente BSA als Negativkontrolle

### 3.11 Immunolokalisation der *scFv*-Antikörper *in planta*

Um die erwartete Akkumulation der *scFv*-Antikörper im ER bzw. in den Chloroplasten zu bestätigen, wurden jeweils drei unabhängige transgene Linien immunhistochemisch untersucht. Als Kontrolle dienten WT-Pflanzen, die unter gleichen Bedingungen angezogen wurden. In Abb.3-12 ist die Immunofluoreszenz in den beiden transgenen Linien #57 und #207 exemplarisch dargestellt. So konnte für die transgene Linie #57 die erwartete Akkumulation der *scFv*-Antikörper im ER bestätigt werden (Abb. 3-15 A2, von Dr. U. zur Nieden durchgeführt). Auch die *scFv*-Antikörper der transgenen Linie #207 zeigten die erwartete chloroplastidäre Lokalisierung. (Abb. 3-15 B2 und B3, von Dr. B. Hause durchgeführt). In beiden Untersuchungen konnte keine Immunofluoreszenz in den WT-Pflanzen detektiert werden (Abb. 3-15 A1 und B1).

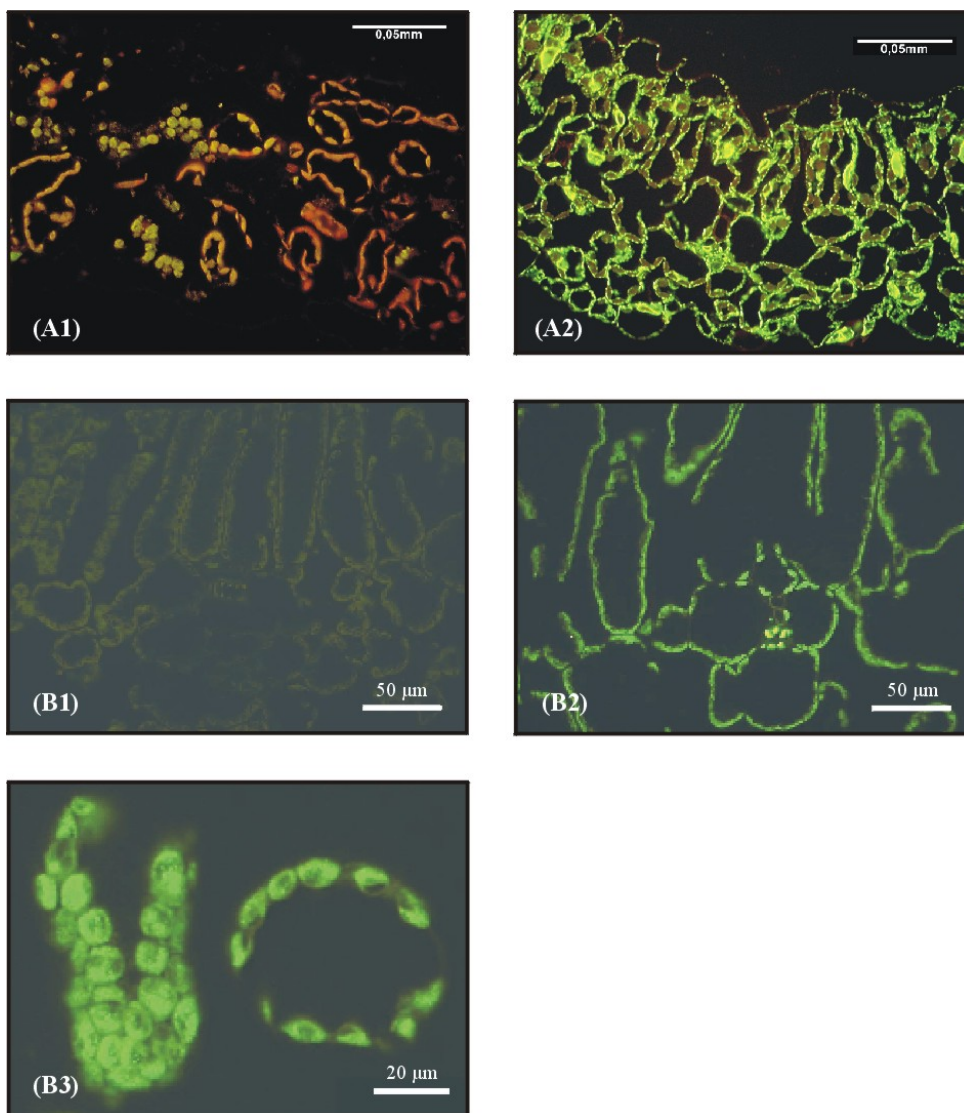


Abb. 3-15. Immunolokalisation der *scFv*-Antikörper im ER (A2) bzw. im Chloroplasten (B2; B3) der transgenen Linien #57 bzw. #207

Die histochemische Analyse wurde mit Blättern von ca. 4 Wochen alten Pflanzen durchgeführt. Der Nachweis der *scFv*-Antikörpern erfolgte mittels anti-c-myc AK. Als Kontrolle dienten entsprechend behandelte WT-Pflanzen (A1; B1).

### 3.12. Analyse der Genexpression der ausgewählten transgenen *scFv*-Antikörper-Pflanzen nach der Behandlung mit *Psm* M2

#### 3.12.1 Analyse der Transkriptakkumulation von *StCHTA* mittels Northern-Blot-Hybridisierung im *Psm* M2-behandelten Blattgewebe der transgenen Linien

Nach der Behandlung der transgenen Linien mit *Psm* M2 wurde das Blattmaterial zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und mittels Northern-Blot-Hybridisierung analysiert. Als Kontrollpflanzen dienten transgene C3-Pflanzen (Kap. 3-2), die in vorhergehenden Untersuchungen nach der Behandlung mit *Psm* M2 eine dem WT vergleichbare PR-Genexpression aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Zur Kontrolle wurden alle Pflanzen mit 10 mM  $MgCl_2$  infiltriert.

Die transgenen Linien der Gruppe A (Tab. 3-4, anti-OPDA *scFv* im ER) zeigten nach Behandlung mit *Psm* M2 im Vergleich mit den C3-Pflanzen keine bzw. nur sehr leichte Veränderungen hinsichtlich der Transkriptakkumulation von *StCHTA* (Abb. 3-16). Die deutlichste Reduktion der Transkriptakkumulation von *StCHTA* konnte in der transgenen Linie #57 beobachtet werden, die auch über den ausgeprägtesten Phänotyp verfügte (Kap. 3.8.1).

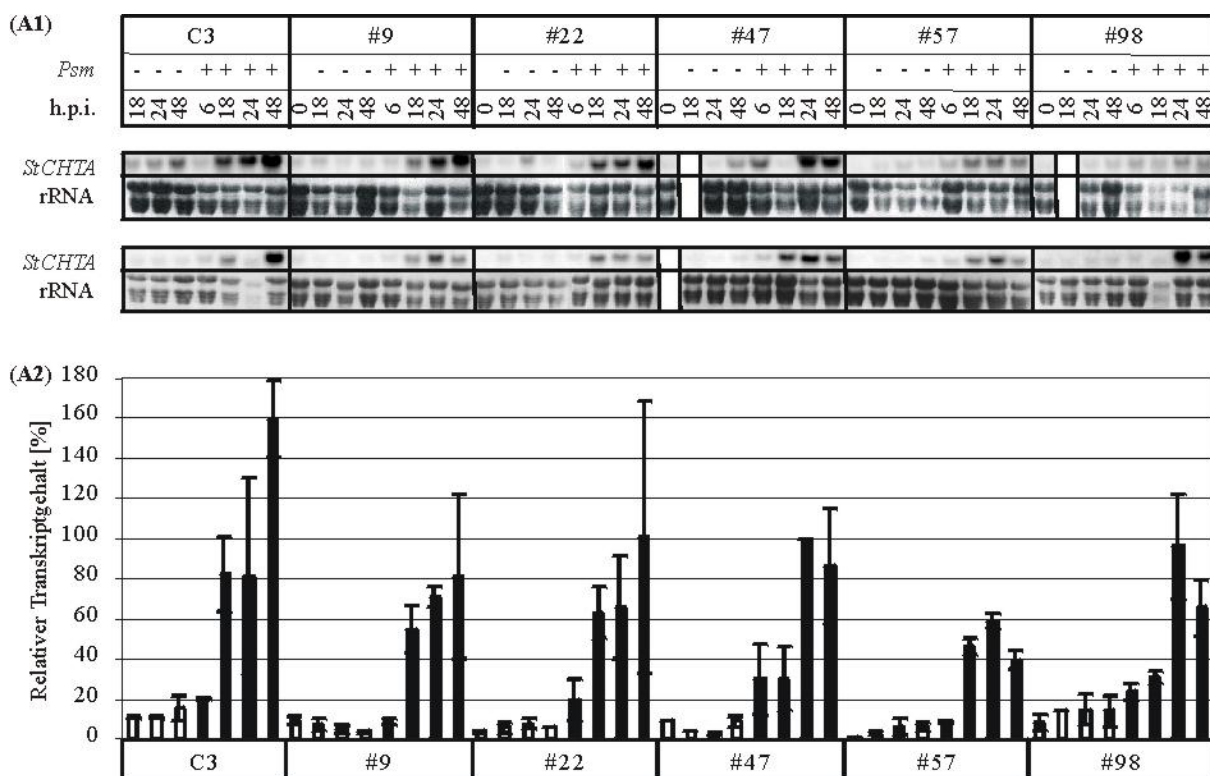
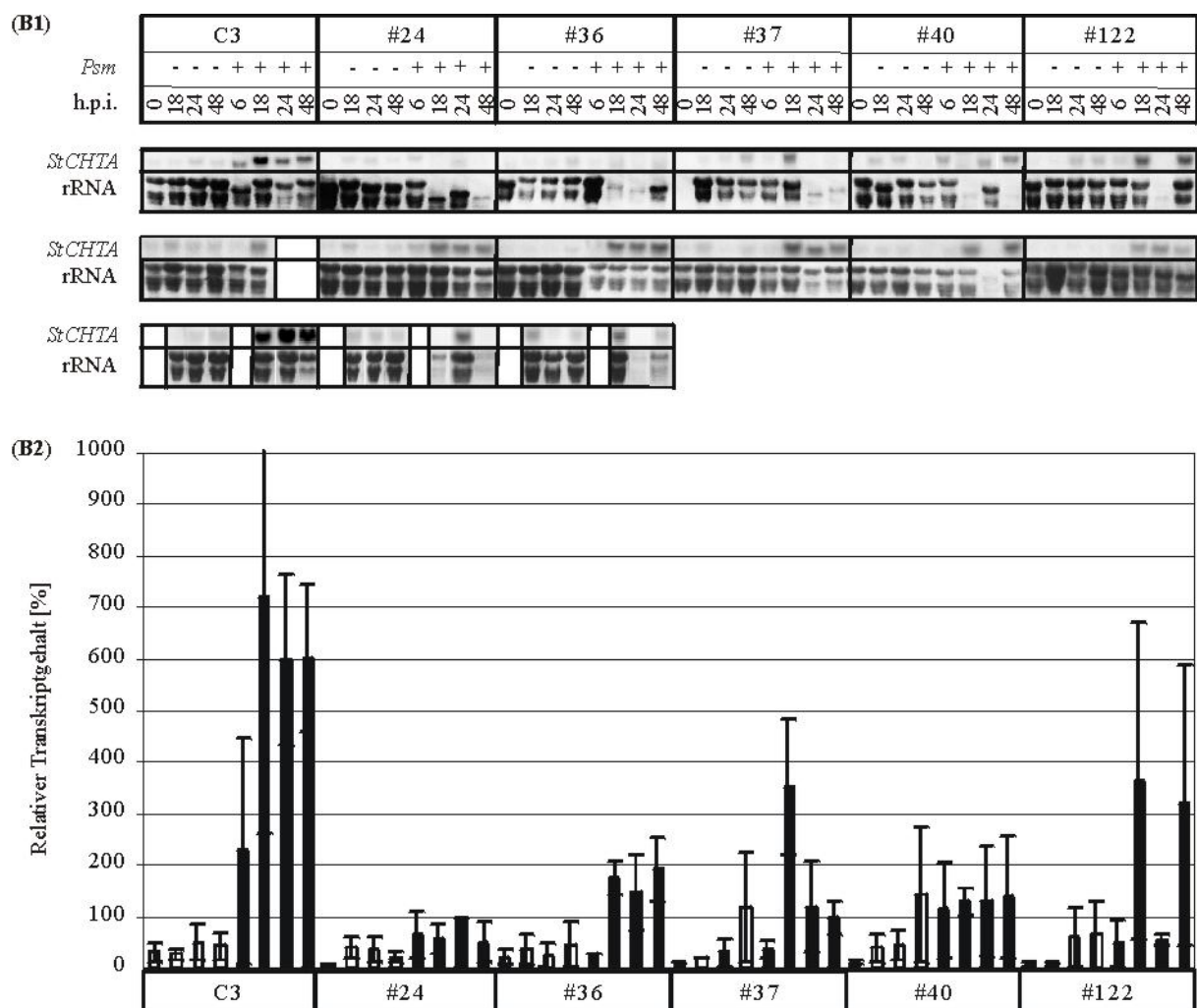


Abb. 3-16. Northern-Blot-Analyse der Transkriptakkumulation von *StCHTA* in den transgenen Linien der Gruppe A (Tab. 3-4, anti-OPDA *scFv* im ER) nach Behandlung mit *Psm* M2

Je zwei Fiederblätter der Kartoffelpflanzen wurden mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> (-) bzw. *Psm* M2 (+) infiltriert. Gesamt-RNA wurde aus den behandelten Blättern zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert. Je 20 µg Gesamt-RNA wurden in denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit dem radioaktiv markierten cDNA-Fragment von *StCHTA* hybridisiert. Die im Agarosegel aufgetragenen RNA-Mengen wurden durch Färbung mit Ethidiumbromid überprüft (rRNA). Exemplarisch dargestellt sind 2 unabhängige Northern-Blot-Analysen. Für die Berechnung des relativen Transkriptgehaltes wurden 3 unabhängige Northern-Blot-Analysen herangezogen.

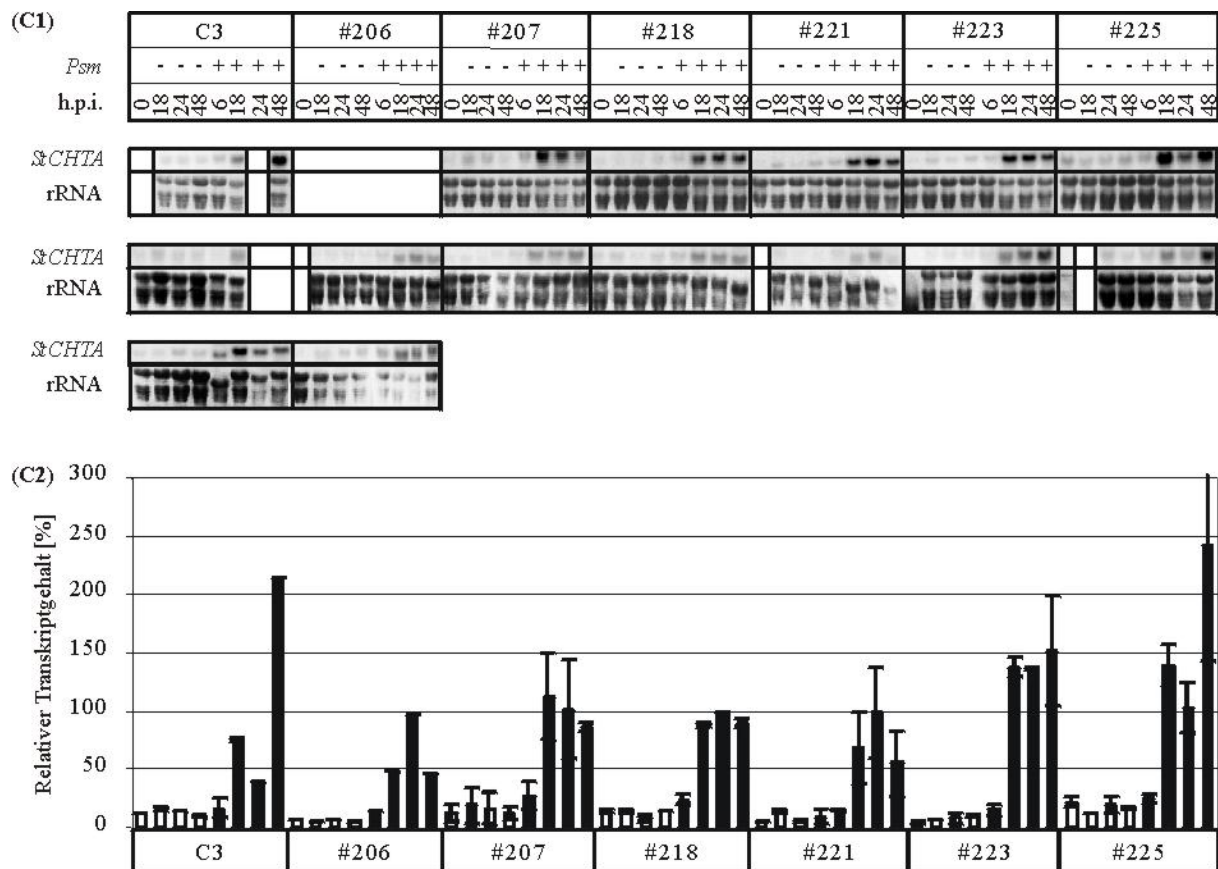
Die transgenen Linien der Gruppe B (Tab. 3-4, anti-JA *scFv* im ER) zeigten die deutlichsten Effekte hinsichtlich der untersuchten Transkriptakkumulation (Abb. 3-17). Im Vergleich mit den C3-Pflanzen war die Akkumulation des *StCHTA*-Transkriptes in vier der fünf untersuchten unabhängigen transgenen Linien reduziert (Abb. 3-17). Sie betrug nur noch ca. 25 % der in den Kontrollpflanzen beobachteten Transkriptmenge (Abb. 3-17 B2).



**Abb. 3-17. Northern-Blot-Analyse der Transkriptakkumulation von *StCHTA* in den transgenen Linien der Gruppe B (anti-JA *scFv* im ER) nach Behandlung mit *Psm* M2**

Je zwei Fiederblätter der Kartoffelpflanzen wurden mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> (-) bzw. *Psm* M2 (+) infiltriert. Gesamt-RNA wurde aus den behandelten Blättern zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert. Je 20 µg Gesamt-RNA wurden in denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit dem radioaktiv markierten cDNA-Fragment von *StCHTA* hybridisiert. Die im Agarosegel aufgetragenen RNA-Mengen wurden durch Färbung mit Ethidiumbromid überprüft (rRNA). Exemplarisch dargestellt sind 2 unabhängige Northern-Blot-Analysen (bzw. 3 unabhängige Analysen für die Linien #24 und #36). Für die Berechnung des relativen Transkriptgehaltes wurden 2 bzw. 3 unabhängige Northern-Blot-Analysen herangezogen. Fehlende Zeitpunkte sind auf eine zu geringe RNA-Beladung zurückzuführen.

Eine im Vergleich zu den Kontrollpflanzen ähnliche bzw. eher verstärkte Transkriptakkumulation von *StCHTA* (Abb. 3-18) zeigten die transgenen Linien der Gruppe C (Tab. 3-4, anti-OPDA *scFv* in den Chloroplasten).



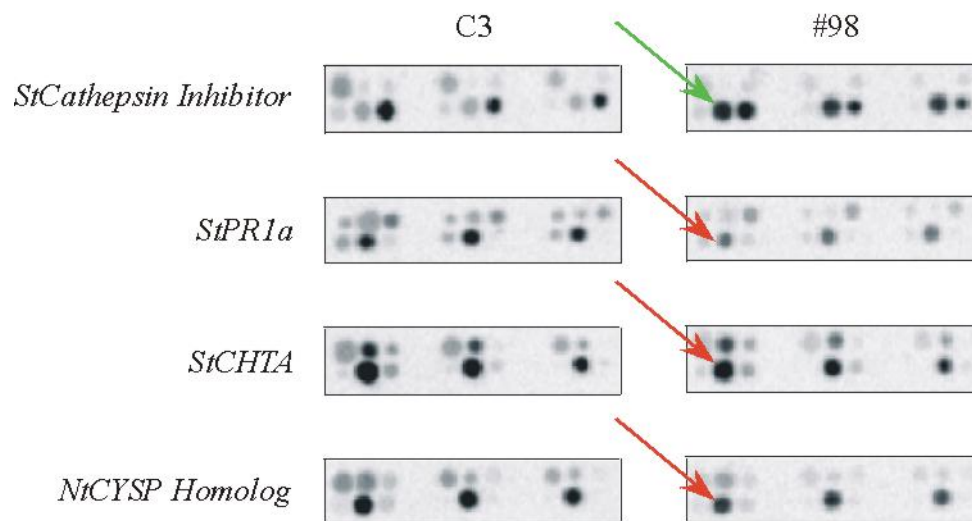
**Abb. 3-18. Northern-Blot-Analyse der Transkriptakkumulation von *StCHTA* in den transgenen Linien der Gruppe C (anti-JA *scFv* in den Chloroplasten) nach Behandlung mit *Psm* M2**

Je zwei Fiederblätter der Kartoffelpflanzen wurden mit 10 mM  $MgCl_2$  (-) bzw. *Psm* M2 (+) infiltrierte. Gesamt-RNA wurde aus den behandelten Blättern zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert. Je 20  $\mu$ g Gesamt-RNA wurden in denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit dem radioaktiv markierten cDNA-Fragment von *StCHTA* hybridisiert. Die im Agarosegel aufgetragenen RNA-Mengen wurden durch Färbung mit Ethidiumbromid überprüft (rRNA). Die beiden dargestellten Northern-Blot-Analysen wurden für die Berechnung des relativen Transkriptgehaltes herangezogen. Fehlende Zeitpunkte sind auf eine zu geringe RNA-Beladung zurückzuführen.

### 3.12.2 Analyse der Transkriptakkumulation verschiedener Gene mittels *Reverse Northern* im *Psm* M2-behandelten Blattgewebe der transgenen Linien

Die *Reverse Northern*-Analysen wurden mit jeweils zwei unabhängigen transgenen Linien einer Gruppe (Tab. 3-4) durchgeführt. Folgende transgene Linien wurden verwendet: #57 und #98 (Gruppe A), #24 und #36 (Gruppe B), #207 und #225 (Gruppe C). Als Kontrollpflanzen dienten die C3-Pflanzen. Gesamt-RNA wurde 18 h (Gruppe B) bzw. 24 h nach Behandlung mit *Psm* M2 isoliert und daraus polyA<sup>+</sup>-mRNA isoliert. Die polyA<sup>+</sup>-mRNA diente zur Synthese <sup>33</sup>P-markierter cDNA, die als Sonde zur Hybridisierung der Membranen

eingesetzt wurde. In einigen Fällen konnten bereits visuelle Signalunterschiede erhalten werden (Abb. 3-19).



**Abb. 3-19. Ausschnitt aus einer Reverse Northern-Membran nach Hybridisierung mit cDNA aus *Psm* M2-behandelten Blattgewebe einer C3-Pflanze und der transgenen Linie #98**

Die cDNA jedes Gens wurde punktförmig in 3 verschiedenen Konzentrationen an den entsprechenden Positionen auf die Membran geladen (Abb. 3-2). Beispielhaft dargestellt sind die Hybridisierungssignale der Gene *StCathepsin Inhibitor*, *StPRIa*, *StCHTA* und des *NtCYSP* Homologs. Grüne Pfeile markieren Gene, die in der transgenen Linie im Vergleich zur Kontrolle induziert waren. Gene, die in der transgenen Linie im Vergleich zur C3-Pflanze reprimiert waren, sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet.

Zur quantitativen Auswertung der erhaltenen Signale diente das Programm „Array Vision“ (Kap. 2.2.1.8.2). Dabei ergab der Vergleich der normalisierten Signalintensitäten der untersuchten Gene der transgenen Linien mit den C3-Pflanzen die in Tab. 3-5 zusammengefassten Expressionsunterschiede der untersuchten Gene. Nur wenn beide unabhängigen Experimente ähnliche Expressionsdaten ergaben, wurden sie in die Betrachtung mit einbezogen (grau unterlegt).

Die Mehrzahl der differentiell exprimierten Gene war im Vergleich mit den C3-Pflanzen in den transgenen Linien reprimiert. Diese Gene gehörten zum überwiegenden Teil zu den stressrelevanten Genen (Tab. 3-1, Gruppe 7), Genen des LOX-Weges (Gruppe 1) sowie Signaltransduktionsgenen (Gruppe 6) und Genen des Primärstoffwechsels (Gruppe 8) (Tab. 3-5). Dagegen waren nur die Transkriptmengen der beiden Gene, die für den *StCathepsin Inhibitor* sowie den *StCystein PI* kodieren, in den transgenen Pflanzen im Vergleich mit den C3-Pflanzen nach Behandlung mit *Psm* M2 erhöht (Tab. 3-5). Unverändert blieben vor allem verschiedene stomataspezifische bzw. ABA-beeinflusste Gene (Daten nicht gezeigt).

Die größte Anzahl an differentiell exprimierten Genen wurde im Vergleich der transgenen Linie #98 mit den C3-Pflanzen beobachtet. In dieser Linie zeigten nach der Behandlung mit *Psm* M2 48 von 247 Transkripten (~20 %) signifikante Expressionsunterschiede (von mindestens zweifach). Dabei konnten die in den Northern-Blot-Analysen erhaltenen reduzierten Transkriptmengen von *StCHTA* bestätigt werden (Abb. 3-16).

**Tab. 3-5. Analyse der Genexpression der transgenen Pflanzen und C3-Pflanzen nach Behandlung mit *Psm M2* mittels *Reverse Northern***

Je zwei Fiederblätter der Kartoffelpflanzen wurden mit *Psm M2* infiltriert. Gesamt-RNA wurde aus den behandelten Blättern zu den angegebenen Zeitpunkten (siehe oben) isoliert. Je 30 µg Gesamt-RNA wurde für die reverse Transkription verwendet und die Membran mit der erhaltenen, <sup>33</sup>P-markierten cDNA hybridisiert.

Dargestellt sind jeweils (außer Linie #24 und #36) zwei unabhängige Experimente.

Es wurde die Expression verschiedener Gene im mit *Psm M2* behandelten Blattgewebe der C3-Pflanzen und der transgenen Linien verglichen. Dargestellt wurden die Gene, deren Transkriptmengen signifikante Unterschiede von mindestens zweifach aufwiesen. Die Einteilung der Gene erfolgte wie in Tab. 3-1 aufgeführt. Expressionsunterschiede von  $\geq 2$  deuten auf eine Reprimierung der Genexpression in der transgenen Pflanze im Vergleich mit der C3-Pflanze hin. Dagegen zeigt ein Faktor von  $\leq 0,5$  die Induktion der Genexpression in der transgenen Linie im Vergleich mit der C3-Pflanze an.

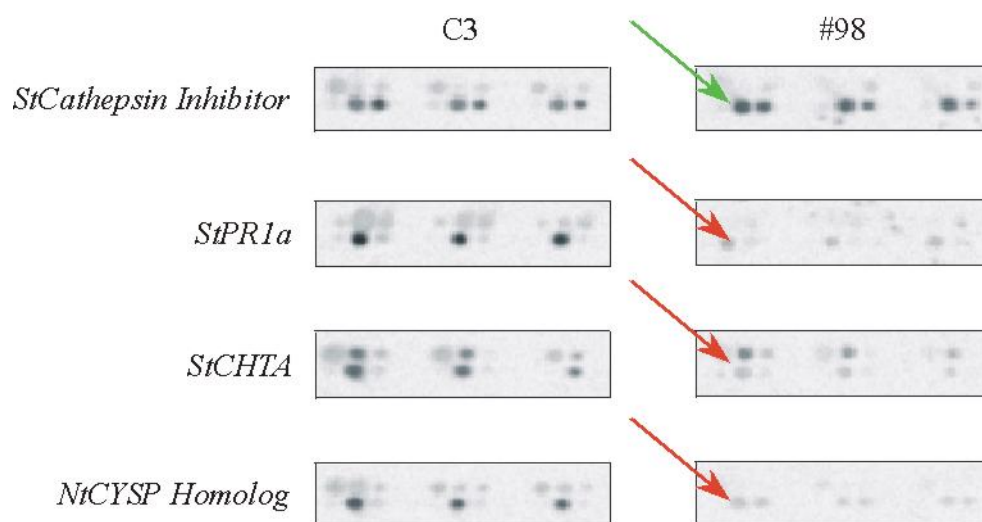
Gen/Funktion	C3/#57		C3/#98		C3/#207		C3/#225		C3/#24	C3/#36
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	I
<b>Gene des LOX-Reaktionsweges</b>										
LeAOS2									2,6	4,3
LeLOX2	2,5	3,9	5,2	2,3	0,67	4,3	1,4	3,2		
LeOPR3	1,6	3,1	4,3	2,4	0,32	2,8	2,2	2,4	1,5	3,2
StLOX3	1,5	2,3	5,4	2,4	2,3	4,8	2,4	9,1		
StDesaturase	2,6	4,1	7,9	4,1	5,6	4,9	5,6	2	7,3	2,8
<b>Gene des Phenylpropanoid-SW</b>										
StPAL	1,8	2,6	4,7	2,4	0,71	8,2	1,8	5,8	4,3	2,3
St4CL (4-Cumarat:CoA-Ligase)	1,5	2,4	2,7	2,8	0,67	4,6	2	3,7		
StTHT (Hydroxyzimtsäure-Transf.)	1,3	2,2	3,8	2,6	1,7	4,4	1,5	2,7		
<b>PR-Gene</b>										
StPRP1		2,7	2,1	2,2					0,7	2,7
StPR1a (antifugal)	1,1	1,7	3,5	2,8	0,38	1,5	0,91	2,7	100,9	2,4
StPRB1b (antifugal)	1,2	3,4	1,5	3,4	1,1	1,6	2,1	2,7		
PR10 (Ribonuklease-ähnlich)	1,7	7	5,9	11,1	0,9	4,5	2,5	3,4		
StCHTA (Chitinase A)	1,2	3,4	3	2,7	0,47	1,5	0,71	1,5	6,9	1,2
<b>Wundinduzierte Gene</b>										
StCathepsin Inhibitor	0,28	0,18	0,37	0,16	1,5	0,38	0,03	0,29		
StPIN2	4,1	2	3,6	0,67	10,5	1,9	0,48	20,6		
StCystein PI	0,15	0,13	0,38	0,23	7,3	0,09	0,08	0,10		
Ntmyb	19,9	4,6	10,8	16,6	9,1	5,4	13,8	9,1	4,6	7,9
<b>Signaltransduktionsgene</b>										
StPP2C (Proteinphosphatase)	2,4	6,6	4,4	4,6	1,5	5,4	4,3	3,3	2,6	3,1
Calcitonin ähnlicher Rezeptor (Ratte)	2	8,1	4,9	14,2	1,6	9,6	5,5	3,4	35,4	1,9
Kaliumkanal ST KCO1	2,4	7,6	12,7	10,2	2,4	9,7	9,1	7,7		
„salicylic acid responsive“	1,7	6,3	7,8	9,5	1,3	5,3	4,8	5,5		4,9
Proteinkinase	2,2	4,2	3,7	5,6	1,3	3,3	3,6	2,4	2,2	5,4
TF	2,9	10,2	7,2	4,8	1,8	7,8	5,4	4,8	2,7	6,4
Zn-Fingerprotein					8,8	2	6,8	4,5	7,3	5,6
<b>Allg. stressrelevante Gene</b>										
StSRE2	2,9	3,5	10,2	7,6	1,8	7,7	4,1	4,3	2,9	7,7
HMG-CoA-Reductase	2,1	5	6,6	7,9	8,1	2,6	4	5	1,8	6,0
NtPAR-1b	2,8	5,5	5	6,2	4,6	0,77	4	3,7	2,8	4,2
NtPAR-1c	3,6	8	2,8	2,4	3,2	3,5	1,5	9,8		
Prolin-reiches Protein	1,3	2,9	4,7	3,2	3,4		2,8	6,4	4,6	4,3
HSP80	1,6	2,6	5,1	2,6	3,9	1	1,5	2,6	1,7	4,6
Thioredoxin	1,6	2,9	3,8	3,5	3,8	1,1	1,8	2,5	1,4	3,3



Gen/Funktion	C3/#57		C3/#98		C3/#207		C3/#225		C3/#24	C3/#36
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	I
<b>Gene des Primärstoffwechsels</b>										
CP12	2,4	6,7	12,5	9,7	1,6	5,7	3,5	3,6	2,6	6,4
FBPase	1,4	5,5	9,6	7,9	1,8	7,5	8,2	3,1	3,3	6,7
Indolglycosyltransferase	2,5	7,1	16,1	10	1,3	7,6	5,6	5,2	3,5	6,9
Ornithinaminotransferase	1,6	3,7	4,4	5,5	1,1	5	2	4,6	1,2	2,6
RUBISCO UE bindendes Protein	2,3	4,2	8,5	3,1	4	5,5	3,2	3,5	1,9	4,7
ATP-Citratlyase	1,4	5,7	6,1	4,9	7,3	1,1	5,9	4	3,2	6,1
RUBISCO Aktivase	2,4	5,3	6	6,3	4	1,4	3,5	2,6	1,7	4,0
Protochlorophyllid Oxidoreduktase	2,7	9,6	12,5	14	8,5	1,5	4,3	4,9	2,8	5,0
PsaL UE Photosystem I	2	5,7	4,7	8,5	5	1,4	6,5	3	2,2	4,0
ATP-Synthase UE IX	2,7	5,5	7,9	10,6	6	2	5,3	4,7	13,6	5,9
<b>Andere... u.a. Speicherproteine</b>										
Legumin	3,1	7,6	4,7	12,2	1,7	10,6	4,1	8,3	3,2	4,5

### 3.12.3 Analyse der Transkriptakkumulation verschiedener Gene im systemischen Blattgewebe der transgenen Linien #57 und #98 nach der Behandlung mit *Psm* M2

Neben dem mit *Psm* M2-behandelten Blattmaterial wurde auch das unbehandelte (systemische) Blattmaterial der behandelten transgenen Linien #57 und #98 auf mögliche Unterschiede in der Genexpression im Vergleich mit den C3-Pflanzen untersucht. Auch im systemischen Blattgewebe ergab die vergleichende Betrachtung der Autoradiografien bereits visuelle Unterschiede in der Transkriptakkumulation einiger Gene (Abb. 3-20).



**Abb. 3-20. Ausschnitt aus einer Reverse Northern-Membran nach Hybridisierung mit cDNA aus systemischen Blattgewebe einer mit *Psm* M2-behandelten C3-Pflanze und der transgenen Linie #98**

Die cDNA jedes Gens wurde punktförmig in 3 verschiedenen Konzentrationen an den entsprechenden Positionen auf die Membran geladen (Abb. 3-2). Beispielhaft dargestellt sind die Hybridisierungssignale der Gene *StCathepsin Inhibitor*, *StPR1a*, *StCHTA* und des *NiCYSP* Homologs. Grüne Pfeile markieren Gene, die in der transgenen Linie im Vergleich zur Kontrolle induziert waren. Gene, die in der transgenen Linie im Vergleich zur C3-Pflanze reprimiert waren, sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet.

Im Vergleich mit den Ergebnissen des *Reverse Northern* der *Psm M2*-behandelten Blätter wurden insgesamt weniger differentiell exprimierte Gene identifiziert (Tab. 3-5, Tab. 3-6). Die Mehrzahl der differentiell exprimierten Gene (Gene des LOX-Reaktionsweges, Abwehrgene und andere stressrelevante Gene, Gene des Primärstoffwechsels) zeigte eine erhöhte Transkriptakkumulation in den C3-Pflanzen verglichen mit den transgenen Linien (Tab. 3-6). Nur 3 bzw. 4 Gene waren im Vergleich mit den C3-Pflanzen in den transgenen Linien deutlich induziert. Dazu zählten wundinduzierte Gene (Tab. 3-1, Gruppe 3) sowie das Gen, welches für den StCystein PI kodiert (Gruppe 7). Es konnten für beide untersuchten transgenen Linien vergleichbare Expressionsunterschiede gezeigt werden (Tab. 3-6).

**Tab. 3-6. Analyse der Genexpression im systemischen Blattgewebe der transgenen Pflanzen und C3-Pflanzen nach Behandlung mit *Psm M2* mittels *Reverse Northern***

Gesamt-RNA wurde aus den systemischen Blättern 24 h nach Behandlung der Pflanzen mit *Psm M2* isoliert. Je 30 µg Gesamt-RNA wurden für die reverse Transkription verwendet und die Membran mit der erhaltenen, <sup>33</sup>P-markierten cDNA hybridisiert. Dargestellt sind zwei unabhängige Experimente.

Verglichen wurde die Expression verschiedener Gene im systemischen Blattgewebe der mit *Psm M2* behandelten C3-Pflanzen und transgenen Linien. Es wurden die Gene dargestellt, deren Transkriptmengen signifikante Unterschiede von mindestens zweifach aufwiesen. Die Einteilung der Gene erfolgte wie in Tab. 3-1 aufgeführt. Expressionsunterschiede von  $\geq 2$  deuten auf eine Reprimierung der Genexpression in der transgenen Pflanze im Vergleich mit der C3-Pflanze hin. Dagegen zeigt ein Faktor von  $\leq 0,5$  die Induktion der Genexpression in der transgenen Linie im Vergleich mit der C3-Pflanze an.

Gen/Funktion	C3/#57		C3/#98	
	I	II	I	II
<b>Gene des LOX-Reaktionsweges</b>				
LeAOS2	3	3	12	1
LeOPR3	3	2,3	4,7	1,9
StDesaturase	3	2,4	9	3,8
<b>Oxidativer Stress/Apoptose korrelierte Gene</b>				
„Defender against apoptotic death“ DAD1	-	2,9	-	2,7
StKatalase	2,1	3,1	1,8	2,6
<b>PR-Gene</b>				
StPRP1 („pathogenesis-related protein“)	-	7,1	-	8,3
StPR1a (antifugal)	4,2	20	4,9	9,5
StPRB1b (antifugal)	-	7,4	2,7	5,7
StPR2 (β-1,3 Glucanase)	-	5,9	-	9,4
PR3 (Chitinase PR-Q)	2,2	3,5	1,5	5,5
PR5 (Osmotin)	3,8	11,6	2,5	8,7
PR10 (Ribonuklease-ähnlich)	3,7	4,9	2,8	8
StCHTA (Chitinase A)	1,2	5	1,2	5,2
<b>Wundinduzierte Gene</b>				
StCathepsin Inhibitor	0,11	0,14	0,07	0,48
StCystein PI	0,07	0,05	0,09	0,26
StPIN2	0,22	0,14	0,03	0,3
<b>Signaltransduktionsgene</b>				
StPP2C (Proteinphosphatase)	2	2,9	-	4,6
Kaliumkanal ST KCO1	9,9	5,9	9,2	5,1
„salicylic acid responsive“	6,2	7,1	8,1	12,6
TF	7,3	8,3	7,9	13,1
Zn-Fingerprotein	7,3	5,6	30,9	9,5

Gen/Funktion	C3/#57		C3/#98	
	I	II	I	II
<b>Allg. stressrelevante Gene</b>				
PAR-1b (photoassimilat-responsives protein)	24,3	5,1	27	9,1
Al, Pi starvation induced protein	2,8	2,7	3,3	4
HMG-CoA-Reduktase	10,4	5	13,1	8,4
<b>Gene des Primärmetabolismus</b>				
CP12	3,9	2	2,5	1,9
FBPase	2,6	2,2	4	2,6
Indolglycosyltransferase	11,2	4,2	21,1	4,8
Ornithinaminotransferase	13,6	3,9	26,3	6,2
RUBISCO UE bindendes Protein	6,1	2,4	12,4	2,8
ATP-Citratlyase	5,1	3,5	7,4	4,7
Ubichinon-abh. NADH-Dehydrogenase	3,3	2,7	6,6	3,1
<b>Andere... u. a. Speicherproteine</b>				
Legumin	2,8	9,4	2	6,1

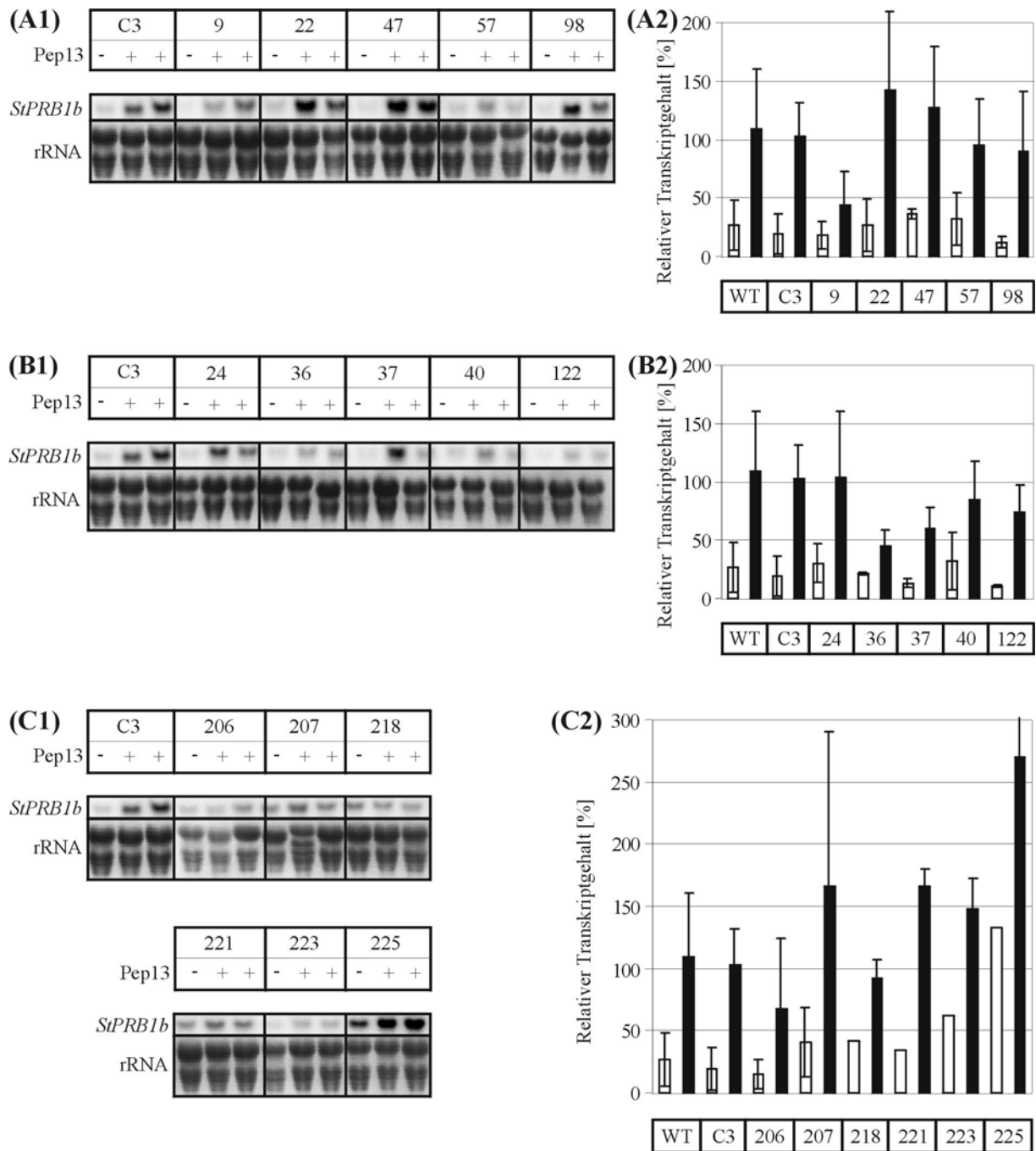
### 3.13 Analyse der Genexpression in den transgenen *scFv*-Antikörper-Pflanzen nach der Behandlung mit dem Oligopeptidelicitor Pep13

In vorangegangenen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass der Oligopeptidelicitor Pep13 im behandelten Blattgewebe von *S. tuberosum* die Bildung von Nekrosen und die Induktion der Abwehrgenexpression induziert (Geiler, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals auch im unbehandelten Blatt der mit Pep13-behandelten Pflanze eine deutliche Induktion der Abwehrgenexpression beobachtet werden (Abb. 3.2). Es war daher von Interesse, die Genexpression der C3-Pflanzen mit der Genexpression der transgenen Linien nach Behandlung mit Pep13 zu vergleichen.

#### 3.13.1 Analyse der Transkriptakkumulation von *StPRB1b* mittels Northern-Blot-Hybridisierung im Pep13-behandelten Blattgewebe der transgenen Linien

Die zu untersuchenden Pflanzen wurden mit 100  $\mu$ M Pep13 behandelt und nach 24 h sowohl die behandelten als auch die darüberliegenden, unbehandelten (systemischen) Fiederblätter einer Pflanze geerntet. Zur Kontrolle wurden die Pflanzen mit Wasser infiltriert. Die isolierte Gesamt-RNA wurde mit der Sonde *StPRB1b* hybridisiert.

Im behandelten Blattgewebe der transgenen Linien waren im Vergleich mit den C3-Pflanzen nur sehr geringe Unterschiede in der Transkriptakkumulation von *StPRB1b* erkennbar (Abb. 3-21). Am deutlichsten waren diese Unterschiede bei den transgenen Linien der Gruppe B (Tab. 3-4). Hier zeigten vier der fünf unabhängigen transgenen Linien im Vergleich mit den WT- bzw. C3-Pflanzen eine Reduktion der Transkriptakkumulation von *StPRB1b* von bis zu 50 % (Abb. 3-21B). Dagegen wurde bei den transgenen Linien der Gruppe C (Tab. 3-4) im Vergleich mit den WT- bzw. C3-Pflanzen eine vergleichbare bzw. erhöhte Transkriptakkumulation von *StPRB1b* festgestellt (Abb. 3-21C).



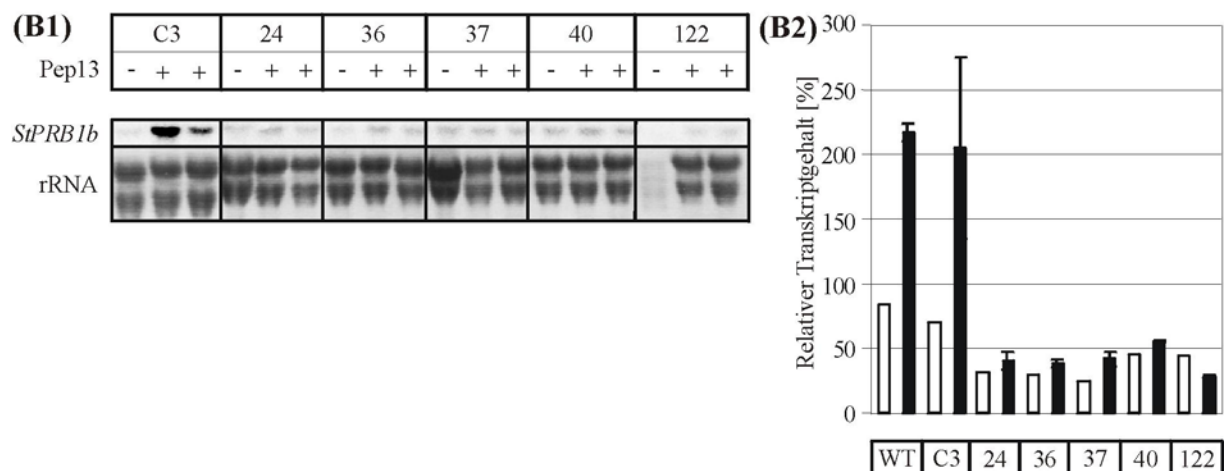
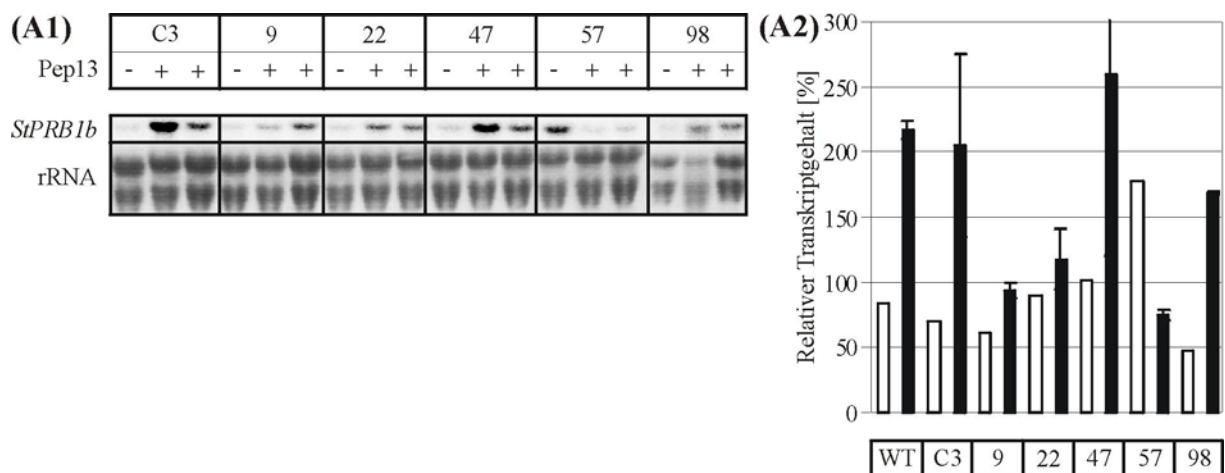
**Abb. 3-21. Northern-Blot-Analyse der lokalen Transkriptakkumulation von *StPRB-1b* in den transgenen Linien nach Behandlung mit Pep13**

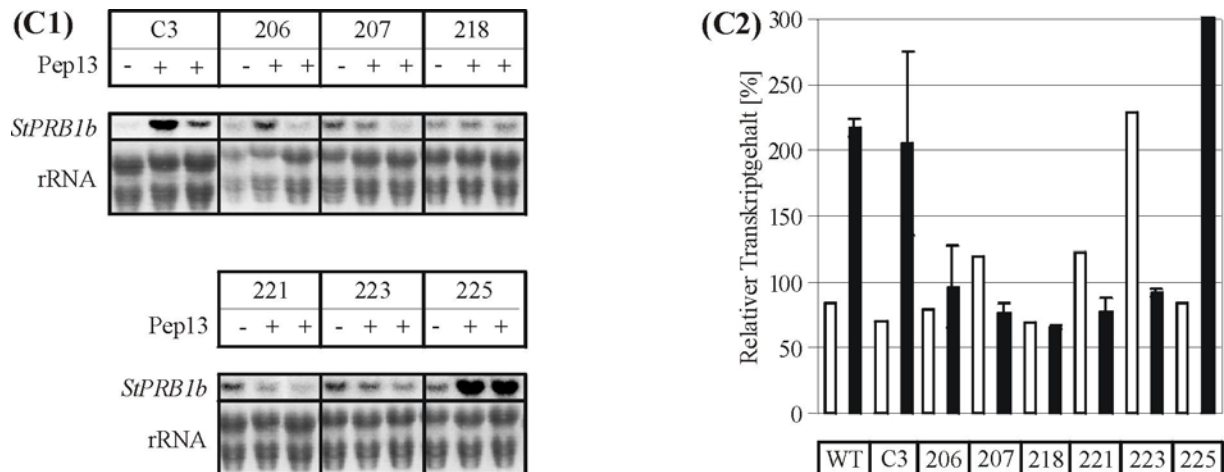
Je zwei Fiederblätter der Kartoffelpflanzen wurden mit Wasser (-) bzw. 100  $\mu$ M Pep13 (+) infiltriert und Gesamt-RNA 24 h nach Behandlung isoliert. Je 20  $\mu$ g RNA wurden in denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit dem radioaktiv markierten cDNA-Fragment von *StPRB1b* hybridisiert. Die im Agarosegel aufgetragenen RNA-Mengen wurden durch Färbung mit Ethidiumbromid überprüft (rRNA). Für die Berechnung des relativen Transkriptgehaltes wurden 2 unabhängige Northern-Blot-Analysen mit jeweils 2 unabhängigen mit Pep13 behandelten Pflanzen herangezogen (A2, B2, C2). Exemplarisch dargestellt ist jeweils eine der unabhängigen Northern-Blot-Analyse (A1, B1, C1).

3.13.2 Analyse der Transkriptakkumulation von *StPRB1b* mittels Northern-Blot-Hybridisierung im systemischen Blattgewebe Pep13-behandelter transgener Linien

Gesamt-RNA wurde nach 24 h aus dem systemischen Blattgewebe der mit 100  $\mu$ M Pep13 behandelten transgenen Pflanzen isoliert und mittels Northern-Blot-Hybridisierung analysiert. Zur Kontrolle wurde das systemische Blattgewebe der mit Wasser infiltrierten Pflanzen verwendet. Die isolierte Gesamt-RNA wurde mit der Sonde *StPRB1b* hybridisiert.

Die Mehrzahl der untersuchten transgenen Linien (außer #47, #98 und #225) zeigte im Vergleich mit den WT- bzw. C3-Pflanzen eine deutliche Reduktion der Transkriptakkumulation von *StPRB1b* (Abb. 3-22). Die maximale Reduktion der Transkriptakkumulation konnte für die transgenen Linien der Gruppe B (Tab. 3-4) im Vergleich mit den WT- bzw. C3-Pflanzen beobachtet werden. In diesen Pflanzen wurden nur noch ca. 75 % der in den WT- bzw. C3-Pflanzen bestimmten Transkriptmengen von *StPRB1b* detektiert (Abb. 3-22 B2).





**Abb. 3-22. Northern-Blot-Analyse der systemischen Transkriptakkumulation des Gens *StPRB-1b* in den transgenen Linien nach Behandlung mit Pep13**

Je zwei Fiederblätter der Kartoffelpflanzen wurden mit Wasser (-) bzw. 100  $\mu$ M Pep13 (+) infiltriert und aus dem systemischen Blattgewebe nach 24 h Gesamt-RNA isoliert. Je 20  $\mu$ g Gesamt-RNA wurden in denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit dem radioaktiv markierten cDNA-Fragment von *StPRB1b* hybridisiert. Die im Agarosegel aufgetragenen RNA-Mengen wurden durch Färbung mit Ethidiumbromid überprüft (rRNA). Für die Berechnung des relativen Transkriptgehaltes wurden die beiden unabhängigen mit Pep13-behandelten Pflanzen des gezeigten Experimentes (A1, B1, C1) herangezogen.

### 3.13.3 Analyse der Transkriptakkumulation verschiedener Gene mittels *Reverse Northern* im systemischen Blattgewebe Pep13-behandelter transgener Linien

Die Genexpression der transgenen Linien #24 und #36 wurde zusätzlich mittels *Reverse Northern* im Vergleich mit den entsprechend behandelten C3-Pflanzen untersucht. Verwendung fand die bereits für die Northern-Blot-Analysen eingesetzte Gesamt-RNA, die nach 24 h aus den systemischen Blättern der mit 100  $\mu$ M Pep13 behandelten Pflanzen isoliert wurde.

Wie bereits für die *Psm* M2-behandelten Pflanzen beschrieben (Kap. 3.12.3), war auch nach der Behandlung mit Pep13 die Mehrzahl der differentiell exprimierten Gene in den transgenen Linien im Vergleich mit den C3-Pflanzen reprimiert. Davon gehörten die meisten Gene zu den Gruppen stressrelevanter Gene (Gruppe 7, Tab. 3-1), PR-Gene (Gruppe 4) sowie zu den Signaltransduktionsgenen (Gruppe 6) und Genen des Primärstoffwechsels (Gruppe 8) (Tab. 3-7). Nur die beiden Gene, die für einen StCathepsin Inhibitor und StCystein PI kodieren, zeigten in den transgenen Linien im Vergleich mit den C3-Pflanzen eine erhöhte Transkriptakkumulation (Tab. 3-7).

**Tab. 3-7. Analyse der Genexpression im unbehandelten (systemischen) Blattgewebe der transgenen Linien und C3-Pflanzen nach der Behandlung mit Pep13 mittels *Reverse Northern***

Je zwei Fiederblätter der Kartoffelpflanzen wurden mit Pep13 infiltiert und nach 24 h Gesamt-RNA aus den systemischen Blättern isoliert. Je 30 µg Gesamt-RNA wurden für die reverse Transkription verwendet und die Membran mit der erhaltenen, <sup>33</sup>P-markierten cDNA hybridisiert.

Verglichen wurde die Expression verschiedener Gene im systemischen Blattgewebe der mit Pep13-behandelten C3-Pflanzen und transgenen Linien. Es wurden die Gene dargestellt, deren Transkriptmengen signifikante Unterschiede von mindestens zweifach aufwiesen. Die Einteilung der Gene erfolgte wie in Tab. 3-1 aufgeführt. Expressionsunterschiede von  $\geq 2$  deuten auf eine Reprimierung der Genexpression in der transgenen Pflanze im Vergleich mit der C3-Pflanze hin. Dagegen zeigt ein Faktor von  $\leq 0,5$  die Induktion der Genexpression in der transgenen Linie im Vergleich mit der C3-Pflanze an.

Gen/Funktion	C3/#24	C3/#36
<b>Gene des LOX-Reaktionsweges</b>		
LeAOS2	3,1	1,3
LeOPR3	5,1	2,6
StDesaturase	4,0	2,4
<b>Oxidativer Stress/Apoptose</b>		
StKatalase	3,9	4,4
<b>PR-Gene</b>		
StPRP1	6,7	9,5
StPR1a (antifugal)	5,7	4,8
StPRB1b (antifugal)	5,5	1,3
StPR2 (β-1,3 Glucanase)	4,9	3,0
PR5 (Osmotin)	11,5	2,8
StCHTA (Chitinase A)	3,1	1,3
<b>Wundinduzierte Gene</b>		
StCystein PI	0,3	0,1
Ntmyb	4,3	4,8
StCathepsin Inhibitor	0,3	0,14
<b>Signaltransduktionsgene</b>		
Kaliumkanal ST KCO1	7,7	2,9
"salicylic acid responsive"	5,4	2,1

Gen/Funktion	C3/#24	C3/#36
<b>Forts. Signaltransduktionsgene</b>		
Zn-Fingerprotein	5,7	2,1
TF	3,7	2,9
<b>Allg. stressrelevante Gene</b>		
StSre1 (Sre=systemisch responsiv)	3,0	2,4
StSre2	4,7	2,6
PPP (putative potato phosphatase)	3,2	2,5
PAR-1b	7,1	2,3
Thioredoxin	3,3	1,3
Al, Pi starvation induced protein	2,9	2,3
HSP 70	2,8	1,8
HSP 80	3,7	2,1
HMG-CoA-Reduktase	4,8	2,2
<b>Gene des Primärstoffwechsels</b>		
FBPase	3,8	1,3
Indolglycosyltransferase	4,7	1,8
Ornithinaminotransferase	6,1	2,5
ATP-Citratlyase	7,4	1,6
Ubichinon-abhängige NADH-DH	3,9	1,6

### 3.14 Analyse der Interaktion *Phytophthora infestans* und der transgenen *scFv*-Antikörper-Pflanzen

Nachdem die Nichtwirt-Pathogen-Interaktion mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* M2 (*Psm* M2) hinsichtlich ihrer Ausprägung von Abwehrreaktionen untersucht wurde, war es auch von großem Interesse, die Wirt-Pathogen-Interaktion des Wildtyps bzw. der transgenen Linien mit dem Oomyceten *Phytophthora infestans* auf Unterschiede in der Ausbildung der Abwehrreaktionen zu prüfen.

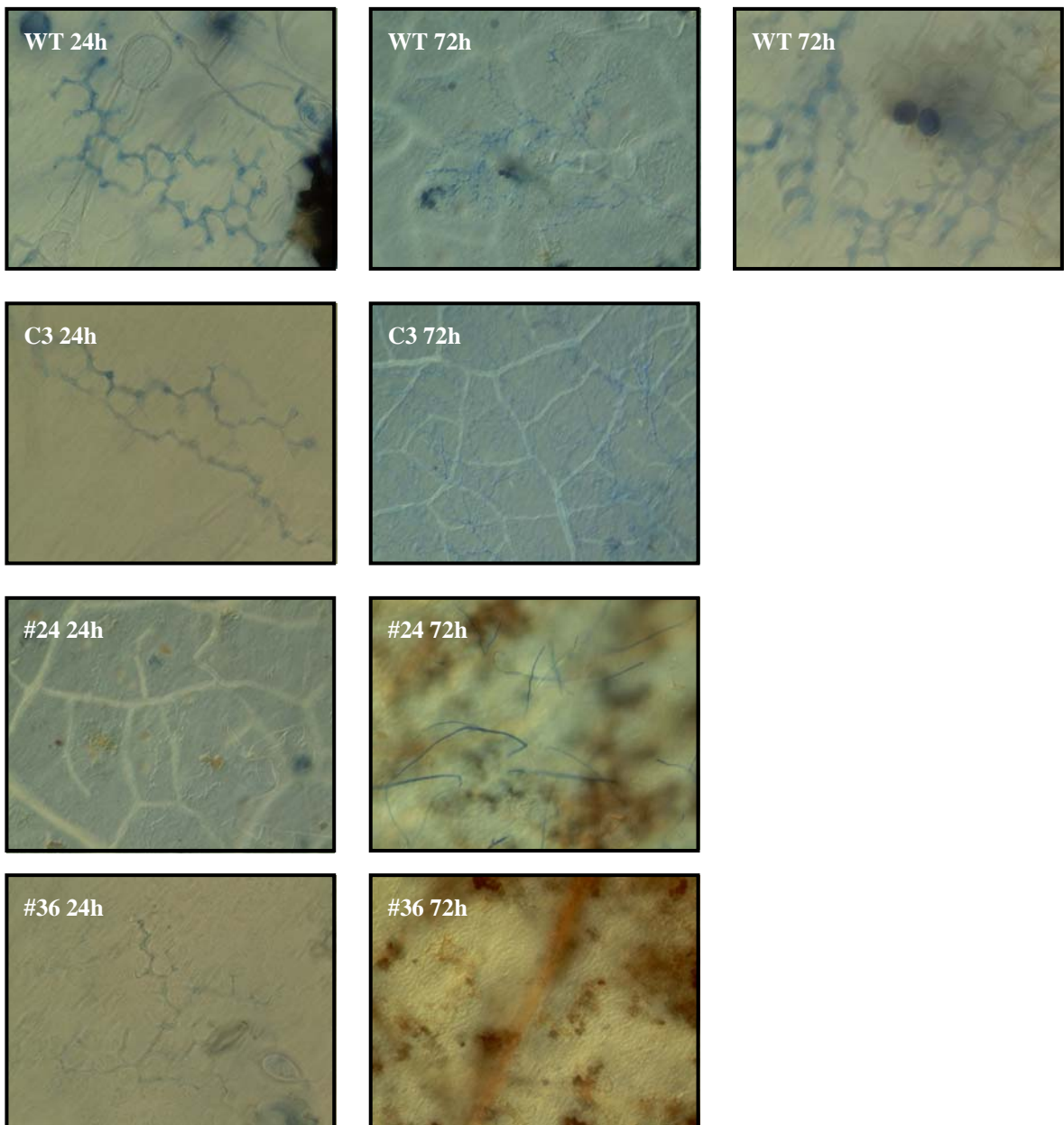
Dazu wurden die in Erde gepflanzten transgenen Linien nach ca. vier Wochen mit *P. infestans* inokuliert und der Krankheitsverlauf über fünf Tage beobachtet. Dabei zeigten mehrere unabhängige Untersuchungen eine tendenziell weniger stark ausgeprägte Symptombildung in den *scFv*-Antikörper-Pflanzen verglichen mit den WT-Pflanzen (Daten nicht gezeigt). So kam es bei einigen transgenen Linien nicht zur Mycelbildung auf der Blattoberfläche sondern eher zu einer Nekrotisierung des infizierten Gewebes. Um diese Beobachtungen genauer zu analysieren, wurden mehrere unabhängige Pflanzen einiger transgener Linien (#9 und #57, sowie alle transgenen Linien der Gruppe B) mit *P. infestans* behandelt und anschließend die

gebildeten Hyphen von *P. infestans* mittels Trypanblaufärbung sichtbar gemacht (von Jörn Landtag durchgeführt). Dazu wurden jeweils zwei Blätter der ca. drei Wochen alten Gewebekulturpflanzen mit einer Sporensuspension von *P. infestans* inokuliert und nach 24 h bzw. 72 h die gebildeten Hyphen mikroskopisch analysiert.

In den Blattgeweben der WT- bzw. C3-Pflanzen waren die Hyphen bereits nach 24 h nachweisbar und durchzogen nach 72 h deutlich größere Bereiche des inokulierten Blattes (Abb. 3-23). Die Bildung der Hyphen der transgenen Linien verlief zunächst bis zu 24 h nach Behandlung mit *P. infestans* vergleichbar. Dagegen konnte in einigen transgenen Linien (#57; #24, #36, #122) nach 72 h keine Hyphenbildung mehr nachgewiesen werden. Exemplarisch sind die transgenen Linien #24 und #36 im Vergleich mit den WT- bzw. C3-Pflanzen dargestellt (Abb. 3-23). Die nach 24 h deutlich sichtbare Mycelbildung wurde scheinbar gestoppt. Diese Beobachtung korrelierte mit phänotypisch sichtbaren, stark nekrotisierten Blattbereichen (Daten nicht gezeigt).

Da die Bedingungen der Infektion durch die Verwendung von ca. 3 Wochen alten Gewebekulturpflanzen in abgeschlossenen Kulturgefäßen nahezu identisch waren und unabhängige Pflanzen einer transgenen Linie identische Ergebnisse lieferten, wurden diese Beobachtungen obwohl es sich nur um ein Experiment handelte, in die Betrachtungen der *scFv*-Antikörper-Pflanzen einbezogen. Die Allgemeingültigkeit dieser Analyse müsste deshalb durch weitere Untersuchungen abgesichert werden.





**Abb. 3-23. Trypanblau-Färbung der *P. infestans*-Hyphen nach Inokulation der transgenen Linien und der WT- und C3-Pflanzen**

Es wurden zwei Blätter von ca. drei Wochen alten Gewebekulturpflanzen mit einer Sporensuspension von *P. infestans* inokuliert und nach den angegebenen Zeitpunkten einer Trypanblaufärbung unterzogen. Die gebildeten Hyphen lassen sich anhand der Blaufärbung erkennen.

## 4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der möglichen Signalmoleküle SA, JA und OPDA auf die lokale und systemische Resistenzinduktion in Kartoffel näher untersucht. Dazu wurden transgene Pflanzen erzeugt, in denen die endogenen Gehalte an SA und JA/OPDA verändert sind bzw. moduliert werden können. Die Analyse der transgenen Pflanzen erfolgte anschließend durch die vergleichende Betrachtung ihrer Abwehrreaktionen mit den WT- bzw. C3-Pflanzen (Kap. 3-2) nach Behandlung mit dem *Brassica*-Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* M2 (*Psm* M2) sowie dem Oligopeptidelicitor Pep13. Deshalb wurde zunächst die WT- bzw. C3-Situation nach Behandlung mit *Psm* M2 bzw. Pep13 genauer untersucht.

### 4.1 Analyse der lokalen und systemischen Resistenzinduktion in WT-Pflanzen nach der Behandlung mit *Psm* M2

SAR kann in Kartoffel durch eine lokal begrenzte Infektion mit dem pathogenen Oomyceten *Phytophthora infestans* (Strömberg und Brishammar, 1991) oder durch Inokulation mit dem nichtpathogenen Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (*Psm* M2) induziert werden (Kombrink *et al.*, 1996). Dabei kommt es zur reproduzierbaren Induktion lokaler Nekrosen sowie zur Aktivierung einer Reihe von Abwehrgenen wie *PR-1*,  $\beta$ -1,3-Glukanasen und Chitinasen (Martini *et al.*, 1993; Beerhues und Kombrink, 1994; Büchter *et al.*, 1997; Kombrink *et al.*, 1996; Kistner, 1999). In Zusammenarbeit mit Dr. Peter Landgraf konnte gezeigt werden, dass der erstmalig in einem pflanzlichen System beobachtete, systemische Anstieg von 12-Oxo-Phytodiensäure (OPDA), der biosynthetischen Vorstufe von Jasmonsäure (JA), mit erhöhten Transkriptmengen der PR-Gene *StCHTA* (Kombrink *et al.*, 1996) und *StPRIa* (Kistner, 1999) korreliert (Landgraf *et al.*, 2002; Abb. 3-1). Auch die Akkumulation von JA, die auf die nekrotisierten Bereiche eines Blattes beschränkt war, ging mit der Transkriptakkumulation dieser Gene im lokalen Blattgewebe einher (Landgraf *et al.*, 2002; Abb. 3-1). Die gezeigte Korrelation der Akkumulation von JA bzw. OPDA mit der PR-Genexpression im lokalen bzw. systemischen Blattgewebe könnte auf eine JA bzw. OPDA-vermittelte Induktion der PR-Genexpression nach Behandlung mit *Psm* M2 hindeuten (Landgraf *et al.*, 2002; Abb. 3-1).

In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass der Anstieg von OPDA nicht von der transkriptionellen Aktivierung der *StLOX3* im systemischen Blattgewebe abhängig ist (Abb. 3-1B). Das Gen der *StLOX3* kodiert für eine 13-Lipoxygenase (13-LOX), die durch Einführung von molekularem Sauerstoff an Position 13 der  $\alpha$ -Linolensäure zur Bildung von 13-Hydroperoxiden führt. Diese 13-Hydroperoxide sind Substrate von mindestens sieben unterschiedlichen Enzymen des sogenannten LOX-Reaktionsweges (Feussner und Wasternack, 2002). Einer dieser Wege führt über die Allenoxidsynthese (AOS) letztlich zur Bildung von OPDA und JA (Feussner und Wasternack, 2002). Neben der lokalen Transkriptakkumulation von *StLOX3* nach der Behandlung von Kartoffel mit *Psm* M2 bzw. *P.*

*infestans* (Göbel, 2001, Abb. 3-1A) wurde bereits 30 min nach Verwundung eine maximale Expression dieses Transkriptes in Kartoffel beobachtet (Royo *et al.*, 1996). In *antisense*-Linien dieser 13-LOX konnte eine Reduktion der Akkumulation des JA-responsiven Proteinaseinhibitors II gezeigt werden, was auf eine spezifische Rolle dieser LOX-Form in der frühen JA-Biosynthese hindeutet (Royo *et al.*, 1999). Die erhöhten JA-Konzentrationen in diesen transgenen Pflanzen im Vergleich mit den WT-Pflanzen lassen darauf schließen, dass die Funktion dieser 13-LOX zumindest teilweise durch andere LOX-Formen kompensiert werden kann (Royo *et al.*, 1999). Diese Beobachtung könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Synthese von OPDA im systemischen Blattgewebe nach Behandlung mit *Psm* M2 nicht von dieser 13-LOX abhängig ist. Denkbar wäre auch, dass OPDA im systemischen Gewebe nicht neu gebildet wird. Die letztere Vermutung wird dabei durch Pfropfungsexperimente mit verschiedenen Mutanten unterstützt, die zeigten, dass die systemische Expression wundinduzierter Gene von einer funktionellen JA-Biosynthese im verwundeten, aber nicht im unverwundeten Blatt abhängig ist (Li *et al.*, 2002).

Mit Hilfe von *Reverse Northern*-Analysen wurden im lokalen Blattgewebe nach Behandlung mit *Psm* M2 weitere transkriptionell veränderte Gene identifiziert (Tab. 3-2). So konnte eine verringerte Transkriptakkumulation verschiedener Gene, die für Proteine des Primärstoffwechsels (wie z. B. an photosynthetische Prozesse gekoppelte Proteine u. a. RUBISCO-Aktivase, Protochlorophyllid-Oxidoreduktase) kodieren, beobachtet werden. Dagegen waren die Transkriptmengen von anderen Genen, u. a. PR-Gene, Gene, die für Enzyme des Jasmonat-Biosyntheseweges (*AOS*, *StLOX3*) kodieren bzw. Jasmonat-responsive Proteinase-Inhibitoren in diesem Blattgewebe erhöht (Tab. 3-2). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Untersuchungen, in denen es nach Applikation von JA zu einer Verminderung der Genexpression von kern- und plastidärlokalisierten Proteinen, die hauptsächlich an photosynthetische Prozesse gekoppelt sind, und zu einer Zunahme der Expression von JA-responsiven Genen kommt (Übersicht in Wasternack und Hause, 2002). Die Transkriptmengen der untersuchten Gene korrelierten damit mit den gemessenen JA/OPDA-Gehalten im lokalen Blattgewebe nach Behandlung mit *Psm* M2 (Landgraf *et al.*, 2002, Tab. 3-2).

Analog zu den JA- und OPDA-Messungen wurden nach Behandlung mit *Psm* M2 auch die Konzentrationen an freier Salicylsäure (SA) sowie deren Glycoside bestimmt (von P. Landgraf durchgeführt). So konnte im lokalen Blattgewebe nach Behandlung mit *Psm* M2 ein sehr starker Anstieg von SA (bis zu 10 µg/g FW) gezeigt werden (Dr. P. Landgraf, pers. Mitteilung), der ebenfalls mit der lokalen Abwehrgenexpression korreliert (Abb. 3-1A). In Tabak und Arabidopsis ist die Ausprägung der SAR nicht nur durch die Akkumulation von SA am Infektionsort, sondern auch durch erhöhte SA-Konzentrationen im systemischen Blattgewebe gekennzeichnet (Ryals *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu korreliert die induzierte Resistenz in Kartoffel nicht mit einem systemischen Anstieg der Salicylsäure (Dr. P. Landgraf, pers. Mitteilung). Diese Beobachtung deutet auf einen von diesen Pflanzen verschiedenen Mechanismus der SAR-Induktion in Kartoffel hin.

#### 4.2 Analyse der lokalen und systemischen Resistenzinduktion in WT-Pflanzen nach der Behandlung mit dem Oligopeptidelicitor Pep13

Anhand von Untersuchung der Nichtwirtsinteraktion von Petersilie mit *Phytophthora sojae* gelang es, ein Peptid von 13 AS (Pep13) als hinreichend und notwendig für die Elicitoraktivität des 42 kDa-Proteins gegenüber Petersilie zu charakterisieren (Nürnberger *et al.*, 1994). Dieses Oligopeptid ist in gleicher Weise wie das Glykoprotein als auch die Rohelicitorpräparation aus der Zellwand von *P. sojae* in der Lage, umfangreiche Abwehrreaktionen, wie die Bildung von Phytoalexinen und die Aktivierung von Abwehrgenen auszulösen (Nürnberger *et al.*, 1994; Zimmermann *et al.*, 1997; Jabs *et al.*, 1997; Ligterink *et al.*, 1997; Kroj *et al.*, 2003). Das Glycoprotein von *P. sojae* wurde als Transglutaminase (TGase) identifiziert. In den Transglutaminasen der Gattung *Phytophthora*, einschließlich *P. infestans*, ist das Pep13-Motiv nahezu vollständig konserviert (Brunner *et al.*, 2002).

In diesem Zusammenhang war es interessant, zu zeigen, dass Pep13 auch in Kartoffel komplexe Abwehrreaktionen (u. a. Bildung von antimikrobiell wirkenden Substanzen, Induktion der Abwehrgenexpression) auslöst, die, im Gegensatz zu allen bisher untersuchten Pflanzenarten, mit der Bildung von Nekrosen einhergehen (Geiler, 2001; Rohwer *et al.*, 1987; Göbel *et al.*, 2001; Brunner *et al.*, 2002; Abb. 3-3A). Dieser HR-ähnliche Zelltod ist durch verschiedene Merkmale des programmierten Zelltods (PCD), u. a. durch die Fragmentierung kernlokalisierter DNA, gekennzeichnet (Brunner *et al.*, 2002; Halim *et al.*, z. Veröff. eingereicht). Neben der Nekrosenbildung und der Induktion der Abwehrgenexpression ist Pep13 in Kartoffel außerdem in der Lage, die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sowie die Akkumulation der Signalmoleküle SA und JA zu induzieren (Halim *et al.*, z. Veröff. eingereicht). Erstmals konnte auch die systemische Transkriptakkumulation eines PR-Gens (*StPR1b*) nach Behandlung mit Pep13 gezeigt werden (Abb. 3-3B; Halim *et al.*, z. Veröff. eingereicht).

Die Tatsache, dass Kartoffel zwar zur Erkennung von *P. infestans* fähig ist, eine Resistenzinduktion jedoch ausbleibt, könnte verschiedene Ursachen haben. So könnte das Pathogen entweder die Abwehr der Pflanze oder die Expression der durch das Pep13-Motiv gekennzeichneten Transglutaminase, vergleichbar mit der Reprimierung der Elicitine in virulenten *P. infestans*-Rassen, aktiv unterdrücken (Kamoun *et al.*, 1997). Alternativ dazu könnten im Laufe der Evolution vom Pathogen gebildete Virulenzfaktoren zur Unterdrückung der Pflanzenabwehr geführt haben (Kamoun, 2001; Brunner *et al.*, 2002).

### 4.3 Einfluss von SA auf die Induktion der Abwehrgenexpression in Kartoffel

SA ist ein bedeutendes Signalmolekül, das an der Aktivierung von Abwehrreaktionen und der Resistenzinduktion gegenüber einer Vielzahl von Pathogenen in verschiedenen Wirtspflanzen beteiligt ist (Dempsey *et al.*, 1999; Shah, 2003). Pathogenbefall führt in verschiedenen Pflanzen zur Erhöhung der SA-Mengen sowohl im infizierten als auch im nicht-infizierten, systemischen Blattgewebe (Malamy *et al.*, 1990; Métraux *et al.*, 1990). Der Anstieg der SA-Gehalte korreliert dabei mit der lokalen und systemischen Induktion der Abwehrgenexpression (van Loon, 1997). Die Bedeutung von SA in der Pflanzenabwehr wurde durch die Analyse von Signaltransduktionsmutanten bzw. transgenen Pflanzen mit veränderten SA-Konzentrationen bestätigt (Kunkel und Brooks, 2002; Mou *et al.*, 2003). Durch die Expression des *NahG*-Gens in Arabidopsis bzw. Tabak, welches durch die Umwandlung von SA zu Catechol die Akkumulation von SA in der Pflanze verhindert, wurde eine erhöhte Anfälligkeit dieser Pflanzen gegenüber einer Vielzahl von Pathogenen, wie z. B. Bakterien, Oomyceten, Pilzen und Viren beobachtet (Delaney *et al.*, 1994; Gaffney *et al.*, 1993; Kachroo *et al.*, 2000). Parallel dazu war die PR-Genexpression in den transgenen *nahG*-Pflanzen stark reduziert (Delaney *et al.*, 1994).

Die Mechanismen der Resistenzinduktion in Kartoffel unterscheiden sich hinsichtlich der hohen SA-Grundgehalte und der fehlenden Akkumulation von SA im systemischen Blattgewebe grundsätzlich von anderen pflanzlichen Systemen. Deshalb war es zunächst Anliegen dieser Arbeit, den Einfluss von SA bei der Pathogenabwehr in Kartoffel näher zu untersuchen. Dazu wurden transgene *nahG*-Pflanzen hergestellt (Kap. 3-3). Zur Analyse der Abwehrgenexpression wurden die transgenen Linien A1 und D2 ausgewählt (Abb. 3-4), da sie über nicht mehr messbare SA-Konzentrationen verfügten (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich mit den WT-Pflanzen konnte sowohl im lokalen als auch im systemischen Blattgewebe der mit Pep13-behandelten, transgenen *nahG*-Linien eine Reduktion der Expression des PR-Gens *StPRB1b* um 75 % gezeigt werden (Abb. 3-5). In diesen Pflanzen war die Bildung der Nekrosen vollständig unterdrückt, was den Einfluss von SA bei der Nekrosenbildung in Kartoffel verdeutlicht (Daten nicht gezeigt). Bereits in früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass SA zur Nekrosenbildung benötigt wird, auch wenn es selbst nicht zur Induktion von Zelltod fähig ist (Yu *et al.*, 1997; Alvarez, 2000).

Als Ursache für die veränderten Abwehrreaktionen in den *nahG*-Pflanzen kommt jedoch nicht nur das fehlende SA, sondern auch die gebildeten Abbauprodukte von SA, wie z. B. Catechol, in Frage. So konnte in *A. thaliana* nach Behandlung mit Catechol der Verlust der Resistenz gegenüber *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (*Psp*) gezeigt werden, wie er in gleicher Weise in den *nahG*-Pflanzen zu beobachten war (van Wees und Glazebrook, 2003). Da die Behandlung der *nahG*-Pflanzen mit Katalase zum reduzierten Wachstum von *Psp* führte, vermuten die Autoren, dass Catechol durch die Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die erhöhte Suszeptibilität gegenüber *Psp* verursachen könnte. Ob die Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in den *nahG*-Pflanzen sich

tatsächlich von der WT-Situation nach Behandlung mit *Psp* unterscheidet, müsste z. B. mit Hilfe von DAB-Färbungen genauer analysiert werden.

In den transgenen *nahG*-Kartoffelpflanzen konnte Catechol nicht detektiert werden, was auf einen weiteren Abbau durch die Pflanzen hindeutet (Halim *et al.*, z. Veröff. eingereicht). Die Akkumulation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde in den *nahG*-Pflanzen erst zu späteren Zeitpunkten (24 h) beobachtet. Interessanterweise waren die *nahG*-Zellkulturen wie der Wildtyp in der Lage, bereits eine Stunde nach der Behandlung mit Pep13 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> maximal zu akkumulieren (Halim *et al.*, z. Veröff. eingereicht). Diese Unterschiede bezüglich der Notwendigkeit von SA zur Aktivierung der Abwehrreaktionen in den *nahG*-Pflanzen und *nahG*-Zellkulturen legen die Vermutung nahe, dass die *nahG*-Pflanzen sich hinsichtlich der Sekretion oder des Metabolismus von aktiven Komponenten von den Zellkulturen unterscheiden.

Obwohl nach der Behandlung der *nahG*-Pflanzen mit Pep13 die Mehrzahl der Abwehrreaktionen ausbleiben, werden auch die Transkripte einiger Abwehrgene (*4-CL*, *THT*) induziert. Diese Beobachtung deutet daraufhin, dass die Pep13-induzierten Abwehrmechanismen in Kartoffel einerseits SA-abhängig, andererseits unabhängig von SA aktiviert werden (Halim *et al.*, z. Veröff. eingereicht).

#### **4.4 Immunmodulation als Methode zur Analyse der Funktion von Phytohormonen**

Um den Einfluss von JA als Signalmolekül in der Pathogenabwehr bzw. Wundantwort aufzuklären, wurden verschiedene Mutanten analysiert. Dazu zählten JA-Perzeptionsmutanten (Staswick *et al.*, 1992; Staswick *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 1998; Berger *et al.*, 1996), Mutanten mit Defekten in der JA-Biosynthese und dem JA-Metabolismus (McConn *et al.*, 1997; von Malek *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2002; Stintzi und Browse, 2000; Sanders *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002) sowie Mutanten mit konstitutiv erhöhten JA-Gehalten (Ellis und Turner, 2001; Ellis *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2001; Nibbe *et al.*, 2002). Parallel dazu dienten transgene Ansätze der Manipulation der JA-Biosynthese. So konnte durch die Überexpression der AOS in Tabak (Laudert *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1999) bzw. der AOC in Tomate (Stenzel *et al.*, 2003a) gezeigt werden, dass die JA-Biosynthese vermutlich durch die Substratverfügbarkeit reguliert wird. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die Enzyme der JA-Biosynthese (LOX, AOS, AOC) in den Blättern von *A. thaliana* zwar über eine hohe Abundanz verfügen, es jedoch erst im Zuge der Verwundung (Stenzel *et al.*, 2003b) bzw. der Pathogenabwehr (Stintzi *et al.*, 2001) zur Bereitstellung der Substrate und damit zur Bildung von JA bzw. OPDA kommt. Dagegen konnten in AOS-überexprimierenden Kartoffelpflanzen erhöhte JA-Gehalte beobachtet werden, die jedoch nicht mit einer konstitutiven Expression von JA-responsiven Genen korrelierten (Harms *et al.*, 1995).

Ein wesentlicher Nachteil dieser *gain/loss-of-function*-Experimente besteht darin, dass eine kompartimentspezifische Modulation der untersuchten Hormone nicht möglich ist. Außerdem ist in jedem Fall die Kenntnis der zu verändernden Gensequenz des entsprechenden Enzyms

erforderlich, was hinsichtlich des JA-Biosyntheseweges zu Beginn dieser Arbeit nicht der Fall war. Zusätzlich können durch die Blockierung des entsprechenden Biosyntheseweges unerwünschte Nebeneffekte, wie z. B. die fehlende Synthese anderer Produkte dieses Biosyntheseweges oder die Akkumulation von Vorläufermolekülen, eintreten. Im Gegensatz dazu kommt es bei der Immunmodulation durch Bindung von rekombinanten Antikörpern zur direkten, kompartimentspezifischen Blockierung der entsprechenden Zielmoleküle (Conrad und Manteuffel, 2001). Sie wurde ursprünglich für menschliche Zellen entwickelt und bereits erfolgreich für ABA und GA angewendet (Artsaenko *et al.*, 1995; Shimada *et al.*, 1999; Conrad und Manteuffel, 2001).

In Pflanzen wurden bereits verschiedene rekombinante Antikörper (u. a. *Fab*, *Fv*, *scFv*, vollständige Antikörper) exprimiert (Daniell *et al.*, 2001). Dabei erwiesen sich die *scFv*-Antikörper als besonders gut geeignet, da sie nur aus zwei kovalent miteinander verbundenen, variablen Domänen bestehen, die keine *in vivo* Assemblierung bzw. komplexe Faltung mehr benötigen (Conrad und Manteuffel, 2001; Schillberg *et al.*, 2001; Bird *et al.*, 1988). Daneben sind *scFv*-Antikörper aufgrund ihrer geringen Größe und ihrer, meist mit einem parentalen Antikörper, vergleichbaren Antigenbindungsaktivität sowie der Möglichkeit der Fusion mit Effektorproteinen vielseitig einsetzbar (Hudson, 1998).

#### **4.5 Isolierung von spezifischen JA bzw. OPDA bindenden *scFv*-Antikörpern mittels *Phage Display***

Zur Herstellung bzw. Isolierung spezifischer *scFv*-Antikörper stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. So können *scFv*-Antikörper durch Fusions-PCR mit entsprechenden, aus Hybridomazellen bzw. direkt aus Lymphozyten immunisierter Tiere isolierten Genen hergestellt werden. Durch die Einführung der *Phage Display*-Technologie war es möglich, dass tierische Immunsystem zu umgehen und damit, unabhängig von zeitaufwendigen Tierimmunisierungen, spezifische Antikörper herzustellen (McCafferty *et al.*, 1990; Winter *et al.*, 1994; Hoogenboom *et al.*, 2000; De Wildt *et al.*, 2000). So können aus einer Vielzahl von Quellen, die für ein Antikörperfragment kodierenden Antikörpersegmente mittels PCR isoliert, amplifiziert und mit anderen Fragmenten oder synthetischen Nukleotidsequenzen rekombiniert werden. Nach der Klonierung der Antikörpergene in entsprechende Plasmide können diese in geeigneten Expressionssystemen zur Produktion von rekombinanten Antikörperfragmenten verwendet werden. So werden beim *Phage Display* die im Phagengenom kodierten *scFv*-Antikörper mit dem Hüllprotein des Bakteriophagen fusioniert und anschließend auf der Oberfläche des Phagen präsentiert (McCafferty *et al.*, 1990). Diese Verbindung des Genotyps (DNA-Sequenz) mit einem entsprechenden Phänotyp (Protein) ist die Grundvoraussetzung für die anschließende Selektion spezifischer, an das immobilisierte Antigen bindender Antikörperfragmente und ein entscheidender Vorteil des *Phage Display* (Schaffitzel *et al.*, 1999). In den letzten Jahren konnten auf der Grundlage solcher Phagenbibliotheken eine Vielzahl rekombinanter Antikörperfragmente isoliert werden

(Winter *et al.*, 1994; Vaughan *et al.*, 1996; Aujame *et al.*, 1997; Hoogenboom *et al.*, 1998; Abler und Sheets, 2002). Obwohl die oben beschriebenen Vorteile des *Phage Display* gegenüber der Hybridomatechnik überwiegen, sind auch einige Nachteile dieser Technik zu berücksichtigen. So limitieren die zur Herstellung der Phagenbibliothek notwendigen Transformationsschritte die Größe der Phagenbibliothek von maximal  $10^{10}$  (Dower und Cwirla, 1992). Außerdem kann eine natürliche Selektion bestimmter Phagenklone, deren Genprodukte toxisch für *E. coli* sind bzw. zu Wachstumseinschränkungen des Wirtes führen, nicht ausgeschlossen werden (Schaffitzel *et al.*, 1999). Die Elution von Phagen, deren präsentierte Antikörper über sehr hohe Affinitäten verfügen, kann aufgrund der zu verwendenden milden Elutionsbedingungen ein zusätzliches Problem darstellen (Schier und Marks, 1996).

Eine weitere Möglichkeit zur *in vitro* Produktion von Antikörpern und Antikörperfragmenten stellt die Methode des Ribosomen-Display dar (Mattheakis *et al.*, 1994; Hanes und Plückthun, 1997; He und Taussig, 1997). Grundlage für die Produktion von *scFv*-Antikörpern mittels Ribosomen-Display ist eine *scFv*-kodierende DNA-Bibliothek, die zur zellfreien Transkription und Translation genutzt wird. Durch das Fehlen eines Stopcodons am Ende der verwendeten mRNA kommt es im Anschluss an die Translation zur Bildung eines ternären Komplexes, bestehend aus Ribosom, mRNA und funktionalem *scFv*-Protein, der anschließend direkt zur Selektion eingesetzt wird. Die folgende *Screening*-Runde erfolgt dann mit der mRNA aus den selektierten Komplexen, die in cDNA umgeschrieben und mittels PCR amplifiziert wurde (Hanes und Plückthun, 1997; He und Taussig, 1997; Schaffitzel *et al.*, 1999). Im Gegensatz zum *Phage Display* ist diese Methode nicht auf Transformationsschritte angewiesen und keine Ablösung des Antigens vom ternären Komplex nötig. So war es möglich, sehr große Bibliotheken ( $\geq 10^{11}$ ) zu erhalten und Antikörper mit Dissoziationskonstanten von  $10^{-11}$  anzureichern (Hanes *et al.*, 1998; Schaffitzel *et al.*, 1999). Ein entscheidender Nachteil des Ribosomen-Display ist die relativ störanfällige *in vitro* Transkription (Schaffitzel *et al.*, 1999). So kann es zum Abbau der mRNA, zum vorzeitigen Abbruch der Translation und zur vorzeitigen Ablösung der Polypeptidkette vom ribosomalen Komplex bzw. zur Dissoziation des Ribosoms von der mRNA kommen (Hanes und Plückthun, 1997; Fedorov und Baldwin, 1998; Schaffitzel *et al.*, 1999). Zusammenfassend besteht der Vorteil des Ribosomen-Display in der Kombination von großen Bibliotheken und der Möglichkeit zur einfachen Mutagenese bereits während der Selektion. Dagegen findet die Translation der *scFv*-Antikörper im *Phage Display in vivo* statt, wodurch die Antikörperdiversität der verwendeten Phagenbibliotheken voll ausgeschöpft werden kann. Dieses verlässlichere System der auf menschlichen V-Gensegmenten basierenden, synthetischen *scFv*-Phagenbibliotheken (De Wildt *et al.*, 2000) wurde von Dr. Udo Conrad (IPK Gatersleben) zur Verfügung gestellt und diente im Folgenden der Isolierung von spezifischen JA bzw. OPDA bindenden *scFv*-Antikörpern. Da weder JA noch OPDA Bestandteil des bakteriellen Metabolismus sind, sollten die gebildeten *scFv*-Antikörper nicht



zu Wachstumseinschränkungen oder zu toxischen Effekten in den selektierten bakteriellen Klonen führen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden aus den verwendeten Phagenbibliotheken monoklonale Phagen angereichert, die über eine spezifische Bindung an BSA gebundenes JA bzw. OPDA verfügten (Kap. 3.5.2; Anhang). Ein wesentlicher Vorteil der verwendeten Phagenbibliotheken bestand darin, dass der für die Herstellung der Bibliotheken genutzte Phagemidvektor pIT unter Verwendung der entsprechenden Bakterienstämme entweder die Expression der *scFv*-Antikörper als Fusionsproteine mit dem Phagenhüllprotein oder die Expression der rekombinanten Antikörperfragmente als lösliche periplasmatische Proteine ermöglichte. Eine zusätzliche Subklonierung der isolierten Plasmid-DNA in entsprechende Expressionsvektoren war deshalb nicht notwendig. So konnten nach der Infektion des *E. coli*-Stammes HB2151 mit den angereicherten Phagenklonen die entsprechenden *scFv*-Antikörper in löslicher Form gebildet werden. Dabei verfügten nur ca. 25 % der an das Phagenhüllprotein gekoppelten *scFv*-Antikörper auch in löslicher Form über spezifische Bindungseigenschaften an BSA-gekoppeltes JA bzw. OPDA (Kap. 3.5.2). Diese Unterschiede in der Bindungsaktivität lassen sich wahrscheinlich auf, durch die Fusion des *scFv*-Antikörpers an das Phagenhüllprotein bedingte, Konformationsänderungen zurückführen.

Da eine korrekte Faltung der löslichen *scFv*-Antikörper im periplasmatischen Raum von *E. coli* durch die dort herrschenden reduzierenden Bedingungen nicht garantiert werden kann, sollten die Eigenschaften der *scFv*-Antikörper zunächst in der Pflanze untersucht werden. Unter diesen Gesichtspunkten wurde auf eine Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte der im bakteriellen System erhaltenen *scFv*-Antikörper verzichtet. Die Auswahl der für die Pflanzentransformation zu verwendenden *scFv*-Klone erfolgte deshalb auf der Grundlage der erhaltenen ELISA-Daten und der Western-Blot-Analysen der löslichen *scFv*-Antikörper (Abb. 3-7; Abb. 3-8). Es wurden die *scFv*-Klone B11, C4 und F6 bzw. D3, E10 und F2, die über eine hohe Bindungsaktivität für an BSA gekoppeltes JA bzw. OPDA verfügten und beide variablen Domänen (VH und VL) exprimierten, in die entsprechenden Transformationskassetten (Abb. 3-9) kloniert.

#### 4.6 Herstellung transgener *scFv*-Antikörper-Pflanzen

Grundsätzlich sind für eine erfolgreiche Immunmodulation nicht nur die Verwendung hochaffiner Antikörper mit definierter Spezifität, sondern auch die Akkumulation der Antikörperfragmente in geeigneten Organen, Geweben und Kompartimenten der Pflanzenzelle von Bedeutung (Conrad und Fiedler, 1998; Conrad und Manteuffel, 2001). Dabei kann die Expression der *scFv*-Antikörper in der Pflanze durch die Wahl geeigneter Promotoren sowie entsprechender Signal- und Translokationssequenzen reguliert werden (Fiedler *et al.*, 1997; Conrad und Fiedler, 1998). So konnte eine Akkumulation von *scFv*-Antikörpern im Cytoplasma (Owen *et al.*, 1992; Tavladoraki *et al.*, 1993; Bruyns *et al.*, 1996; Zimmermann *et al.*, 1998), im ER (Artsaenko *et al.*, 1995; Schouten *et al.*, 1996; Fiedler *et*

*al.*, 1997) sowie im extrazellulären Raum (Firek *et al.*, 1993; Fecker *et al.*, 1996) erreicht werden.

Die ausgewählten *scFv*-cDNA-Sequenzen wurden unter Verwendung des 35S CaMV-Promotors ubiquitär in der Pflanze exprimiert und anschließend mittels spezifischer Signal- bzw. Targetingsequenzen in unterschiedliche Kompartimente (Cytosol, ER, Chloroplast) der pflanzlichen Zelle transportiert (Abb. 3-9). Parallel zu dieser Arbeit wurden die isolierten anti-JA/OPDA *scFv*-Antikörper auch in Tabak untersucht (ten Hoopen, 2002).

Die reduzierenden Bedingungen im Cytosol und die Abwesenheit von entsprechenden Chaperonen führen häufig zu sehr geringen cytosolischen *scFv*-Antikörper-Konzentrationen, da für eine korrekte Faltung die Bildung zweier intramolekularer Disulfidbrücken unabdingbar ist (De Jaeger *et al.*, 2000). Dennoch konnten für einzelne *scFv*-Antikörper hohe Konzentrationen im Cytoplasma beobachtet werden, was den Einfluss von sequenzspezifischen Eigenschaften auf die Stabilität der *scFv*-Antikörper verdeutlicht (Owen *et al.*, 1992; Tavladoraki *et al.*, 1993; Bruyns *et al.*, 1996; Zimmermann *et al.*, 1998). Da in früheren Untersuchungen die Stabilität der *scFv*-Antikörper im Cytosol durch deren Fusion mit dem KDEL-Peptid wesentlich erhöht werden konnte (Schouten *et al.*, 1996; 1997), wurden die im Cytosol anzureichernden anti-JA/OPDA *scFv*-Antikörper C-terminal mit der KDEL-Sequenz fusioniert (Abb. 3-9). Es wird vermutet, dass die eingeführte KDEL-Sequenz die Stabilität der *scFv*-Antikörper erhöht oder den C-terminalen Proteinabbau verhindert (Schouten *et al.*, 1997).

Für die Akkumulation der *scFv*-Antikörper im Chloroplasten wurde die *scFv*-cDNA von Klon F2 ausgewählt, der über die stärkste Bindung an BSA-gekoppeltes OPDA verfügte (Abb. 3-7B). Durch den Transport der *scFv*-Antikörper in die Chloroplasten sollte OPDA direkt am Ort ihrer Biosynthese gebunden und funktional inaktiviert werden (Feussner und Wasternack, 2002). Zur Anreicherung der *scFv*-Antikörper im Stroma der Chloroplasten wurden die Transitsequenzen der Vorläuferproteine der kleinen Untereinheiten der Ribulosebiphosphatcarboxylase (ST3) bzw. des Ferredoxin (ST5) (Waegemann und Soll, 1996; Van't Hoff und De Kruijff, 1995) verwendet (Abb. 3-15B, Daten nicht gezeigt). In diesen transgenen Pflanzen konnte neben dem eigentlichen *scFv*-Antikörper zusätzlich ein myc-fusioniertes Protein mit einer molekularen Masse von ca. 17 kDa nachgewiesen werden (Abb. 3-12C). Dieses Protein wurde bei der Reinigung der *scFv*-Antikörper durch Bindung an Protein L angereichert (Abb. 3-13). Da die Bindung an Protein L das Vorhandensein einer leichten  $\kappa$ -Untereinheit im Protein voraussetzt, muss es sich bei diesem Protein um ein Produkt der gebildeten *scFv*-Antikörper handeln. Das Fehlen eines solchen Produktes in transgenen Tabakpflanzen, die das identische *scFv*-Konstrukt exprimieren (ten Hoopen, 2002), deutet auf eine für Kartoffel spezifische Spaltung der importierten *scFv*-Antikörper hin. Die Abspaltung der Transitsequenzen wird durch metallabhängige Endopeptidasen SPP (*stromal processing peptidase*) katalysiert und findet entweder während des Translokationsprozesses oder direkt danach im Stroma der Chloroplasten statt (Bruce *et al.*, 2001). Bisher gelang es nur, zwei verschiedene Endopeptidasen (CPE; SPP<sub>80</sub>) der Erbse zu

analysieren (VanderVere *et al.*, 1995; Koussevitzky *et al.*, 1998). Auf welche Weise die stroma-lokalisierten Endopeptidasen die Erkennung und Spaltung von mehreren tausend verschiedenen Vorläufermolekülen, die Transitpeptide mit verschiedener Länge und Sequenz beinhalten, bewerkstelligen, ist bislang nicht geklärt (Bruce *et al.*, 2001). Deshalb kann über die Erkennung einer Sekundärstruktur innerhalb des verwendeten *scFv*-Antikörpers durch eine kartoffelspezifische Endopeptidase nur spekuliert werden.

Neben den verwendeten ST3/ST5-Transitsequenzen wurden die *scFv*-Antikörper auch mit der Transitsequenz des chloroplastidären Membranproteins OEP14 und zusätzlich mit einer C-terminalen Transmembrandomäne (Hook-Domäne) fusioniert, wodurch eine Verankerung der *scFv*-Antikörper in der äußeren Chloroplastenmembran erreicht werden sollte (Li und Chen, 1997). Für dieses Konstrukt konnten zwar transgene Pflanzen erhalten werden (Tab. 3-3), diese exprimierten die *scFv*-Antikörper jedoch nicht stabil und konnten deshalb nicht analysiert werden (Daten nicht gezeigt). Wahrscheinlich konnten nur transgene Pflanzen regeneriert werden, die die *scFv*-Antikörper nicht exprimierten.

Zusätzlich zur Lokalisierung der *scFv*-Antikörper im Cytosol bzw. in den Chloroplasten wurden die ausgewählten *scFv*-Antikörpern durch N-terminale Fusion mit der LegB4-Signalpeptidsequenz (Bäumlein *et al.*, 1986) in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert (Abb. 3-15A). Die Lokalisierung von *scFv*-Antikörpern im ER führte bereits bei der Immunmodulation von ABA zu wesentlich höheren Antikörperkonzentrationen in der Pflanzenzelle (Fiedler *et al.*, 1997). Durch die Bindung von ABA an entsprechende ER-lokalisierte *scFv*-Antikörper kam es vermutlich zur Bildung eines artifiziellen *sink*, was sich im beobachteten ABA-defizienten Phänotyp widerspiegelte (Artsaenko *et al.*, 1995; Artsaenko, 1996). In Analogie dazu sollten JA bzw. OPDA ebenfalls im ER physiologisch inaktiviert werden. Für diese transgenen Pflanzen konnten die höchsten *scFv*-Antikörperkonzentrationen von bis zu 0,05 % des gesamtlöslichen Proteins nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt wurden, unabhängig vom Kompartiment, höhere Konzentrationen für die anti-OPDA *scFv*-Antikörper im Vergleich mit den anti-JA *scFv*-Antikörpern erreicht (Daten nicht gezeigt). Bereits für andere Immunmodulationen konnte gezeigt werden, dass die erfolgreiche Akkumulation der rekombinanten Antikörper nicht nur von deren Lokalisierung in der Zelle, sondern auch maßgeblich von der Sequenz des jeweiligen *scFv*-Antikörpers abhängig ist (De Jaeger *et al.*, 2000a). Damit bestimmt die Sequenz eines *scFv*-Antikörpers auch dessen Stabilität in den untersuchten Kompartimenten, was besonders im reduzierenden Milieu des Cytosols deutlich wird (Steipe *et al.*, 1994; Knappik und Plückthun, 1995).

#### 4.7 Analyse der verwendeten *scFv*-Fragmente *in planta* und Auswahl transgener *scFv*-Antikörper-Pflanzen

Die sequenzspezifischen Eigenschaften der *scFv*-Antikörper spielen nicht nur hinsichtlich ihrer Stabilität, sondern auch hinsichtlich ihrer Funktionalität, d. h. ihrer Bindungsaktivität, eine entscheidende Rolle (De Jaeger *et al.*, 1999; De Jaeger *et al.*, 2000a). So konnte gezeigt werden, dass nicht alle *scFv*-Antikörper, die in hohen Konzentrationen in der Pflanzenzelle akkumulieren, auch gleichzeitig funktional sind (De Jaeger *et al.*, 2000a). Zur Auswahl von transgenen Pflanzen ist es deshalb notwendig, zunächst die Funktionalität der in der Pflanzenzelle gebildeten *scFv*-Antikörper zu analysieren. Eine Möglichkeit stellt dabei die Bestimmung der Bindungsaktivität der in der Pflanze gebildeten *scFv*-Antikörper mittels ELISA dar. Ein weiterer *in vitro*-Test könnte, sofern es sich bei dem Antigen um ein Peptid/Protein handelt, ein *Two-Hybrid-Screen* in Hefe sein. Auf diese Weise könnte die Interaktionsstärke der *scFv*-Antikörper mit dem Antigen direkt nachgewiesen werden (De Jaeger *et al.*, 2000b). Idealerweise sollten die *scFv*-Antikörper jedoch in einem einfachen *in vivo*-Test auf ihre Bindungsaktivität gegenüber dem Antigen überprüft werden, da nur so artifizielle, auf dem verwendeten *in vitro*-System beruhende *scFv*-Antikörpereigenschaften ausgeschlossen werden können.

In Kartoffel bietet sich dafür die Antwort der Pflanzen auf Verwundung an. Nach mechanischer Verwundung kommt es zur Akkumulation von JA sowie zur lokalen und systemischen Aktivierung von Abwehrgenen, wie z. B. *StPIN2* (Peña-Cortés *et al.*, 1995). Durch die Expression von funktionalen *scFv*-Antikörper in den transgenen Pflanzen sollte es deshalb zu einer verringerten Akkumulation von JA kommen und damit die Transkriptakkumulation von *StPIN2* reduziert sein. Durch den Vergleich der *StPIN2*-Transkriptakkumulation der verwundeten transgenen Pflanzen mit den ebenfalls verwundeten WT-Pflanzen sollte ein funktionaler Test der Bindungsaktivität der *scFv*-Antikörper in der Pflanze möglich sein.

Zu diesem Zweck wurde die *StPIN2*-Transkriptakkumulation 24 h nach Verwundung untersucht, da sie zu diesem Zeitpunkt maximal ist (Royo *et al.*, 1996). Trotz der mittels Pinzette durchgeführten gleichmäßigen Verwundungsprozedur waren die erhaltenen Transkriptmengen von *StPIN2* bereits in den WT-Pflanzen nach Verwundung sehr unterschiedlich (Abb. 3-10). Verschiedene andere getestete Verwundungsmöglichkeiten, wie Verwendung von Dialyseklammern oder Verletzen des Blattes durch Einritzen, erbrachten keine verbesserte Reproduzierbarkeit der *StPIN2*-Transkriptakkumulation (Daten nicht gezeigt). Dennoch wurden transgene Pflanzen eines *scFv*-Konstrukts, von denen mindestens fünf unabhängige Linien in mindestens zwei unabhängigen Untersuchungen überwiegend verringerte *StPIN2*-Transkriptakkumulation zeigten, ausgewählt (Abb. 3-10).

Die Einteilung der transgenen Pflanzen erfolgte in drei Gruppen. Dabei umfasst jede Gruppe unabhängige transgene Linien, die ein spezielles *scFv*-Konstrukt exprimierten (Tab. 3-4). So exprimierten die transgenen Linien der Gruppe A und C die anti-OPDA *scFv*-Klone D3 bzw.

F2, während die transgenen Linien der Gruppe C den anti-JA *scFv*-Klon F6 bildeten. Die *scFv*-Antikörper der Gruppe A und B wurden in das ER transportiert (Abb. 3-15A; Daten nicht gezeigt). Dagegen erfolgte der Transport der *scFv*-Antikörper der transgenen Linien der Gruppe C in die Chloroplasten (Abb. 3-15B; Daten nicht gezeigt).

Wie in Abb. 3-10 für die Linie #57, #206 und #207 gezeigt, war auch in den transgenen Pflanzen die erhaltene *StPIN2*-Transkriptakkumulation nicht in jedem Fall eindeutig. Im Anschluss an diese Arbeit wurde die Wundantwort einiger transgener Pflanzen erneut überprüft und mit dem Wildtyp vergleichbare *StPIN2*-Transkriptmengen detektiert, wobei die *StPIN2*-Transkriptakkumulation der WT-Pflanzen in diesem Experiment nicht so starken Schwankungen unterworfen war (von V. Halim durchgeführt). Um eine inzwischen veränderte Bindungsaktivität der *scFv*-Antikörper in den untersuchten transgenen Linien auszuschließen, müssten die Bindungsaktivitäten der *scFv*-Antikörper erneut mittels ELISA bestimmt und mit den bereits erhaltenen Daten verglichen werden. Nur auf diese Weise ist es möglich, die beobachteten *StPIN2*-Transkriptmengen in den transgenen Pflanzen zu dem jetzigen Zeitpunkt zu beurteilen.

Als Anhaltspunkt, ob die verminderte Transkriptakkumulation von *StPIN2* tatsächlich auf physiologisch geringere Gehalte an JA bzw. OPDA zurückzuführen ist, wurden abgeschnittene Blättern der transgenen Pflanzen mit Methyljasmonat (MeJA) behandelt (Abb. 3-11). In der Annahme, dass die *scFv*-Antikörper nicht in der Lage sind, sämtliche MeJA-Moleküle zu binden, sollte die *StPIN2*-Transkriptakkumulation der transgenen Pflanzen mit den WT-Pflanzen vergleichbare Werte liefern. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Transkriptakkumulation von *StPIN2* in den transgenen Pflanzen mit dem WT-Expressionsniveau vergleichbar war (Abb. 3-11). Dabei könnte die erhöhte Transkriptakkumulation von *StPIN2* in einigen kontrollbehandelten Blättern der transgenen Pflanzen auf eine Kontamination der Proben mit MeJA hindeuten.

In Analogie zu diesen Experimenten wurde die Keimung der Samen von verschiedenen transgenen *scFv*-Antikörper-Tabakpflanzen, die mit den identischen *scFv*-Konstrukten ausgestattet waren, untersucht (ten Hoopen, 2002). Während in den Samen der Kontrollpflanzen die Inhibierung der Samenkeimung durch Methyljasmonat eindeutig nachweisbar war, konnte bei der Keimung der Samen der transgenen Pflanzen keine Beeinträchtigung durch die Behandlung mit Methyljasmonat beobachtet werden (ten Hoopen, 2002; Wasternack und Hause, 2002). Diese Ergebnisse geben zusätzliche Hinweise darauf, dass die in der Pflanze gebildeten anti-JA *scFv*-Antikörper funktional sind und damit zu geringeren Mengen an physiologisch aktiven JA führen (ten Hoopen, 2002).

Zur Bestimmung der Bindungsaktivität der in der Pflanze gebildeten *scFv*-Antikörper wurden die *scFv*-Antikörper einiger transgener Pflanzen durch Bindung an Protein L gereinigt und anschließend im ELISA analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten *scFv*-Antikörper über spezifische Bindungseigenschaften an BSA gekoppeltes JA verfügten (Abb. 3-14; Daten nicht gezeigt), wobei die ermittelten Bindungsaktivitäten mit den Bindungsaktivitäten der bakteriell exprimierten *scFv*-Antikörper vergleichbar waren (Abb. 3-

7). Die spezifische Bindung der anti-OPDA *scFv*-Antikörper der transgenen Linien der Gruppe C (Abb. 3-14; Daten nicht gezeigt) an BSA gekoppeltes JA deutet daraufhin, dass die *scFv*-Antikörper nicht die für JA bzw. OPDA spezifische Seitenkette erkennen, sondern den für beide Moleküle charakteristischen Cyclopentanon-Ring. Diese Kreuzreaktivität der untersuchten *scFv*-Antikörper konnte in Tabak bestätigt werden (ten Hoopen, 2002).

Die spezifische Bindungsaktivität der *scFv*-Antikörper an BSA gekoppeltes OPDA konnte nicht bestimmt werden, da das bis dahin verwendete OPDA-BSA-Konjugat nicht mehr zur Verfügung stand und keine Bindung der *scFv*-Antikörper an neu synthetisiertes Konjugat (von R. Kramell hergestellt) nachweisbar war (Daten nicht gezeigt). Diese fehlende Bindungsaktivität der *scFv*-Antikörper an BSA gekoppeltes OPDA deutet auf zu geringe Kopplungsraten von OPDA an BSA hin, da alle getesteten *scFv*-Antikörper spezifisch an BSA gekoppeltes JA binden konnten (Abb. 3-14). Durch Bindungsstudien mit neusynthetisiertem OPDA-BSA-Konjugat bzw. Kompetitionsanalysen mit freier OPDA sollte die Bestimmung der Bindungsaktivitäten dieser *scFv*-Antikörper möglich sein.

#### **4.8 Einfluss von JA/OPDA auf die Induktion der Abwehrgenexpression nach der Behandlung mit *Psm* M2 und Pep13 in Kartoffel**

Neben SA werden auch JA und OPDA als potentielle Signalmoleküle bei der Etablierung der induzierten Resistenz in Kartoffel diskutiert. Erste Hinweise auf eine Beteiligung von JA an der Ausprägung der induzierten Resistenz ergaben Versuche, in denen durch Behandlung der Pflanzen mit JA bzw. MeJA ein lokaler und systemischer Schutz vor einer Infektion mit *P. infestans* erreicht wurde (Cohen *et al.*, 1993). Außerdem konnte nach Behandlung der Kartoffelpflanzen mit dem *Brassica*-Pathogen *Psm* M2 die systemische Akkumulation von OPDA beobachtet werden. Die Akkumulation von JA beschränkte sich auf das lokale Blattgewebe (Landgraf *et al.*, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Anstieg von JA bzw. OPDA mit der Induktion der Transkriptakkumulation verschiedener PR-Gene korreliert (Landgraf *et al.*, 2002). Der Oligopeptidelicitor Pep13 ist in Kartoffel in der Lage, die Akkumulation der Signalmoleküle SA und JA sowie eine sowohl lokale als auch systemische Abwehrgenexpression zu induzieren (Geiler, 2001; Brunner *et al.*, 2002; Halim *et al.*, z. Veröff. eingereicht; Abb. 3-3).

Von Interesse war es nun, die ausgewählten transgenen *scFv*-Antikörper-Pflanzen auf eine möglicherweise veränderte Abwehrgenexpression zu untersuchen. Dazu wurde die Transkriptakkumulation verschiedener Gene der *scFv*-Antikörper-Pflanzen nach Infiltration mit *Psm* M2 bzw. Pep13 zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Northern-Blot-Hybridisierung analysiert. In der Annahme, dass der Anstieg der JA/OPDA-Konzentrationen nach der Behandlung der Pflanzen mit *Psm* M2 bzw. Pep13 in direkten Zusammenhang mit der beobachteten Abwehrgenexpression steht, erwartet man durch die Bindung der *scFv*-Antikörper an JA bzw. OPDA physiologisch geringere JA/OPDA-Gehalte und damit eine verminderte Expression dieser Abwehrgene im Vergleich mit den WT- bzw. C3-Pflanzen.

Im lokalen Blattgewebe konnten nur für die transgenen Linien der Gruppe B (anti-JA *scFv* im ER, Tab. 3-4) signifikant verminderte Transkriptmengen nachgewiesen werden (Abb. 3-17; Abb. 3-21B). Dagegen zeigten die transgenen Linien der Gruppe A (anti-OPDA *scFv* im ER, Tab. 3-4) nur leichte bzw. keine Veränderungen hinsichtlich der untersuchten Transkriptakkumulationen nach Behandlung mit *Psm* M2 bzw. Pep13 (Abb. 3-16; Abb. 3-21A). Die beobachtete, eher verstärkte Transkriptakkumulation in den transgenen Linien der Gruppe C (anti-OPDA *scFv* in den Chloroplasten, Tab. 3-4) im Vergleich mit den C3-Pflanzen nach Behandlung mit *Psm* M2 bzw. Pep13 (Abb. 3-18; Abb. 3-21C) war mit den Transkriptmengen JA-abhängiger Gene nach Verwundung von transgenen Tabakpflanzen, die das identische *scFv*-Konstrukt exprimierten, vergleichbar (ten Hoopen, 2002).

Die beobachteten Unterschiede in der Abwehrgenexpression der transgenen Linien der einzelnen Gruppen im lokalen Blattgewebe können durch unterschiedliche Bindungsaktivitäten der *scFv*-Antikörper oder durch die Lokalisierung der *scFv*-Antikörper in unterschiedlichen Kompartimenten verursacht sein und werden in Kap. 4-11 ausführlich diskutiert. Zusätzlich dazu kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Einfluss von JA oder OPDA auf die untersuchte Abwehrgenexpression im lokalen Blattgewebe nach Behandlung mit *Psm* M2 bzw. Pep13 eher gering ist. Dagegen deutet die stark reduzierte Abwehrgenexpression im lokalen Blattgewebe der *nahG*-Pflanzen nach Behandlung mit Pep13 auf eine SA-abhängige Induktion der Abwehrgenexpression hin (Abb. 3-5A).

Die deutlichste Reduktion der Transkriptakkumulation war nach Behandlung der transgenen Linien mit Pep13 im systemischen Blattgewebe zu beobachten (Abb. 3-22B). Hierbei zeigten alle fünf unabhängigen transgenen Linien der Gruppe B eine um 75 % verminderte Transkriptakkumulation von *StPRB1b* (Abb. 3-22B). Dabei war die Höhe der Reduktion der Transkriptakkumulation von *StPRB1b* im systemischen Blattgewebe der *scFv*-Antikörper-Pflanzen mit der Reduktion der Transkriptakkumulation von *StPRB1b* im systemischen Blattgewebe der *nahG*-Pflanzen vergleichbar (Abb. 3-5B). Auch in drei von fünf transgenen Linien der Gruppe A sowie fünf von sechs Linien der Gruppe C war die *StPRB1b*-Transkriptakkumulation im systemischen Blattgewebe nach Behandlung mit Pep13 um ca. 50 % reduziert (Abb. 3-22A, C). Diese Beobachtungen könnten auf eine SA-, JA und/oder OPDA-abhängige Induktion der Abwehrgenexpression im systemischen Blattgewebe nach der Behandlung mit Pep13 hindeuten.

Zur Bestätigung des Einflusses von JA oder OPDA ist zunächst die Bestimmung der physiologisch aktiven JA/OPDA-Konzentrationen in den transgenen Pflanzen erforderlich. Außerdem sollten die WT-Pflanzen auf eine mögliche Akkumulation dieser Signalmoleküle nach der Behandlung mit Pep13 im systemischen Blattgewebe hin überprüft werden. Bislang wurde nur für das lokale Blattgewebe nach Behandlung der WT-Pflanzen mit Pep13 die Akkumulation von SA und JA gezeigt (Halim *et al.*, z. Veröff. eingereicht).

#### 4.9 Einfluss von JA/OPDA auf die Induktion der Expression verschiedener Gene nach der Behandlung mit *Psm* M2 und Pep13 in Kartoffel

Neben den Northern-Blot-Analysen wurde die lokale und systemische Transkriptakkumulation weiterer Gene (u. a. der Gene des LOX-Reaktionsweges, PR-Gene und anderer stressrelevanter Gene, Signaltransduktionsgene, Gene des Primärstoffwechsels) nach Behandlung mit *Psm* M2 bzw. Pep13 mittels *Reverse Northern* untersucht.

Wie bereits in Kap. 4-1 beschrieben, führt die Behandlung mit Jasmonat bzw. Pathogenen in den meisten Pflanzen zu dramatischen Veränderungen in der Genexpression (Wasternack und Hause, 2002; Kombrink und Schmelzer, 2001). So wurde nach der Behandlung mit Jasmonat eine verminderte Expression von kern- und plastidärkodierte Genen, deren Genprodukte hauptsächlich an photosynthetische Prozesse gekoppelt sind, beobachtet (Übersicht in Wasternack und Hause, 2002). Dagegen kommt es nach Behandlung mit JA bzw. Pathogenen zur Transkriptakkumulation von Genen, die für Enzyme der JA-Biosynthese bzw. Metabolismus, Enzyme des Sekundärstoffwechsels und der Phytoalexinsynthese, Proteinaseinhibitoren, PR-Proteine, Abwehrgene (z. B. Defensine, Thionine), Proteinasen, Proteine der Zellwandbildung, Stressabwehrproteine (z. B. Osmotin), Speicherproteine und verschiedene an der Signaltransduktion beteiligte Proteine kodieren (Wasternack und Hause, 2002). Funktionale *scFv*-Antikörper-Pflanzen sollten durch die Bindung der *scFv*-Antikörper an JA bzw. OPDA deshalb nach der Behandlung mit *Psm* M2 bzw. Pep13 eine verminderte Expression von Abwehrgenen bzw. anderer JA-induzierter Gene und eine erhöhte Expression der Gene des Primärstoffwechsels im Vergleich mit den C3-Pflanzen zeigen.

Tatsächlich konnte für die Mehrzahl der differentiell exprimierten Gene im lokalen als auch systemischen Blattgewebe der untersuchten transgenen Linien (außer #207) eine geringere Transkriptakkumulation im Vergleich mit den C3-Pflanzen gezeigt werden (Tab. 3-5,6,7). Zu diesen Genen zählten Gene des LOX-Reaktionsweges (z. B. *StLOX3*), wundinduzierte Gene (z. B. *Ntmyb*, *StPIN2*) stressrelevante und PR-Gene (z. B. HMG-CoA-Reduktase, *StCHTA*) sowie eine Reihe von Signaltransduktionsgenen.

Die Expression der Mehrzahl der Gene, die für Enzyme des Primärstoffwechsels kodieren, war in den transgenen Pflanzen mit der Genexpression in den C3-Pflanzen vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Für einige dieser Gene (z. B. ATP-Citratlyase, RUBISCO Aktivase, Protochlorophyllid Oxidoreduktase) konnte jedoch auch eine geringere Transkriptakkumulation in den transgenen Pflanzen im Vergleich mit den C3-Pflanzen detektiert werden (Tab. 3-5,6,7). Obwohl laut Literatur die überwiegende Zahl von Genen, die für Enzyme des Primärstoffwechsels kodieren, nach Jasmonat- bzw. Pathogenbehandlung reprimiert ist, gibt es auch Hinweise auf eine erhöhte Transkriptakkumulation von einigen Genen des Primärstoffwechsels. So konnte nach Etablierung des SAR-Phänotypes in Kartoffel neben der Akkumulation von Genen, die für klassische PR-Proteine bzw. Proteine mit Abwehrpotential kodieren, auch eine erhöhte Transkriptakkumulation für eine Reihe von Genen, deren Genprodukte Enzyme des Primärstoffwechsels darstellen bzw. an der



Photosynthese beteiligt sind, gezeigt werden (Kombrink und Schmelzer, 2001). Dazu zählten die Transkripte der Aldolase, GA3P-DH, RUBISCO, dem Chlorophyll-a,b-bindenden Protein und des Ferredoxin (Kombrink und Schmelzer, 2001). Die Autoren vermuten in diesem Zusammenhang, dass die erhöhte Transkriptakkumulation dieser Gene dem gesteigerten Energiebedarf der Pflanzen durch die Behandlung mit Pathogenen Rechnung trägt. So könnte im Zuge der Etablierung der SAR ein erhöhter Bedarf an Vorstufen von verschiedenen Reaktionen wie z. B. der Biosynthese der Phytoalexine oder der Phenylpropanoide bestehen (Kombrink und Schmelzer, 2001). Ähnliche Beobachtungen konnten auch nach der Elicitorbehandlung bzw. Infektion von Petersilie und *Medicago sativa* erhalten werden, wonach es zur erhöhten Transkriptakkumulation einiger Gene, die für Enzyme des Primärstoffwechsels kodieren, kam (Kombrink und Hahlbrock, 1986; Fahrendorf *et al.*, 1995; Batz *et al.*, 1998). Suh *et al.*, 2001 konnten außerdem die Pathogen-abhängige Expression des Gens, welches für die ATP-Citratlyase kodiert, zeigen.

Interessanterweise zeigten sowohl im lokalen als auch systemischen Blattgewebe nach der Behandlung mit *Psm* M2 bzw. *Pep13* nur zwei Gene eine erhöhte Transkriptmenge in den transgenen Pflanzen im Vergleich mit den C3-Pflanzen (Tab. 3-5,6,7). Es handelte sich dabei um die beiden wundinduzierten Proteinaseinhibitoren *StCathepsin Inhibitor* sowie *StCystein PI* (Tab. 3-5,6,7). Proteinaseinhibitoren werden von Pflanzen u. a. im Zuge des Angriffs von Herbivoren aktiviert, um die von den Herbivoren abgegebenen Proteasen zu inhibieren und damit den Nährwert der aufgenommenen Proteine zu reduzieren (Ryan, 1990). Die gebildeten pflanzlichen Proteinaseinhibitoren verfügen über Spezifitäten gegenüber Serin- (*StPIN2*), Cystein- oder Aspartatproteinasen (u. a. *StCathepsin Inhibitor*) (Ryan, 2000; Kreft *et al.*, 1997). Sie wurden ursprünglich als Speicherproteine von Kartoffelknollen identifiziert (Ryan und Balls, 1962; Melville und Ryan, 1972; Bryant *et al.*, 1976). Für diese wundinduzierten Abwehrgene konnte eine lokale und systemische Induktion nach Behandlung mit MeJA gezeigt werden (Ishikawa *et al.*, 1994; Peña-Cortés *et al.*, 1995; Dammann *et al.*, 1997; Ryan, 2000). Vor diesem Hintergrund sollte die Transkriptakkumulation dieser Gene deshalb in den *scFv*-Antikörper-Pflanzen im Vergleich mit den C3-Pflanzen reduziert sein. Die beobachtete erhöhte Transkriptakkumulation der beiden Gene in den transgenen Pflanzen im Vergleich mit dem WT erscheint ungewöhnlich. Bereits in AOC-*sense*-Tomatenpflanzen wurden geringere Transkriptmengen des wundinduzierten *Cathepsin-Inhibitors* im Vergleich mit dem WT detektiert, obwohl man in diesem Fall eine Induktion erwartet hätte (Kutter, 2001). Denkbar wäre, dass es aufgrund der Bindung der *scFv*-Antikörper an JA/OPDA zu einer positiven Rückkopplung mit der JA-Biosynthese kommt und deshalb die JA-Konzentrationen in den *scFv*-Antikörper-Pflanzen im Vergleich mit den WT-Pflanzen erhöht sind. Ähnliche Beobachtungen konnten im Zuge der Immunmodulation von ABA gemacht werden. So kam es durch die Bindung von ABA an ER-lokalisierte *scFv*-Antikörper zu einem dramatischen Anstieg der ABA-Konzentration in den Blättern der transgenen Pflanzen im Vergleich mit den WT-Pflanzen (Phillips *et al.*, 1997; Wigger *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu deuten jedoch die *Reverse Northern*-Ergebnisse der anti-JA/OPDA-*scFv*-Antikörper-Pflanzen nicht

auf einen vergleichbaren sekundären Effekt der *scFv*-Antikörper hin (Tab. 3-5,6,7). Unveränderte JA- bzw. OPDA-Gehalte in den transgenen anti-JA *scFv*-Antikörper exprimierenden Tabakpflanzen unter nicht induzierenden Bedingungen unterstützen diese Beobachtung (ten Hoopen, 2002). Dennoch müssen die erhaltenen *Reverse Northern*-Daten, da sie nur eine „Momentaufnahme“ der Geschehnisse in der Pflanze darstellen, durch geeignete Northern-Blot-Analysen verifiziert werden.

In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass es nach Verwundung der transgenen *scFv*-Antikörper-Tabakpflanzen im Vergleich mit den WT-Pflanzen zu einem drastischen transienten Anstieg der JA-Gehalte kommt. Die Untersuchungen dieser transgenen Pflanzen (u. a. Keimungsexperimente) deuten daraufhin, dass die *scFv*-Antikörper auch diese JA-Gehalte physiologisch effektiv inaktivieren können (ten Hoopen, 2002).

#### **4.10 Einfluss von JA/OPDA auf die Interaktion der *scFv*-Antikörper- Pflanzen mit *Phytophthora infestans***

Die Kraut- und Knollenfäule ist die weltweit schwerwiegendste Krankheit der Kartoffel. Sie wird durch den Oomyceten *Phytophthora infestans* (gr. *Phyto* = Pflanze, *phthora* = Zerstörer) hervorgerufen, manifestiert sich in braunen Flecken und weißlichem Mycel auf den Blättern und Knollen und führt letztlich zum Tod der gesamten Pflanze. Die landwirtschaftliche Produktion von Kartoffeln wird derzeit hauptsächlich durch Einkreuzungen von Resistenzen aus Wildkartoffeln in die angebauten Kartoffelsorten und durch Fungizide vor dem Einfluss des Schaderregers geschützt. Da beide Methoden weder einen vollständigen noch einen dauerhaften Schutz bieten, ist es von großem Interesse, alternative Methoden zur Bekämpfung der Kraut- und Knollenfäule zu entwickeln. Dazu könnte man pflanzeneigene Abwehrmechanismen nutzen, die nicht auf den oben genannten Resistenzgenen beruhen.

Trotz der Erkennung des Oomyceten durch Kartoffel wächst dieser zunächst biotroph und wird mit zunehmender Biomasse zu einem nekrotrophen Pathogen, was auch als hemibiotrophes Wachstum bezeichnet wird. Eine Resistenzausprägung bleibt also in der untersuchten suszeptiblen Kartoffelsorte aus.

Untersuchungen an *Arabidopsis*-Mutanten legen die Vermutung nahe, dass biotrophe Pathogene SA-abhängige Abwehrreaktionen induzieren, während JA und Ethylen zur Abwehr nekrotropher Pathogene und Herbivore von entscheidender Bedeutung sind (Thomma *et al.*, 2001; Howe *et al.*, 1996; McConn *et al.*, 1997). Da *P. infestans* sich zunächst biotroph ernährt, sollte es deshalb in dieser Wachstumsphase zur Induktion SA-abhängiger Abwehrreaktionen kommen, was durch eine transiente Transkriptakkumulation verschiedener SA-abhängiger Abwehrgene (*StPRI*, *StPRI0*) unterstützt wird (Göbel *et al.*, 2002). Jedoch kann auch der Einfluss von JA auf den Infektionsverlauf von *P. infestans* während der ersten beiden Tage nicht ausgeschlossen werden (Weber *et al.*, 2002). So deuten Untersuchungen von WT-Pflanzen 24 h bzw. 48 h nach Behandlung mit Pep13 auf signifikant erhöhte JA-Konzentrationen im behandelten Blattgewebe hin (Halim *et al.*, z. Veröff. eingereicht). Im

Gegensatz dazu konnte drei Tage nach der Infektion mit *P. infestans* kein JA-Anstieg detektiert werden (Weber *et al.*, 2002; Göbel *et al.*, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb auch der Einfluss von JA bzw. OPDA auf den Krankheitsverlauf nach der Infektion von Kartoffel mit *P. infestans* untersucht werden. Dazu wurden einige transgene Linien mit *P. infestans* inokuliert und nach 24 bzw. 72 h die gebildeten Hyphen mittels Trypanblau sichtbar gemacht (von J. Landtag durchgeführt).

Bis zu einem Zeitpunkt von 24 h waren die gebildeten Hyphen in allen untersuchten transgenen Linien mit den WT- bzw. C3-Pflanzen vergleichbar (Abb. 3-23). Während in den WT-Pflanzen die gebildeten Hyphen nach 72 h deutlich größere Bereiche des inokulierten Blattes durchzogen (Abb. 3-23), konnten in den transgenen Linien #57, #24, #36, #122 zu diesem Zeitpunkt keine Hyphen mehr im Blatt nachgewiesen werden (Abb. 3-23; Daten nicht gezeigt). Dagegen waren die inokulierten Blattbereiche dieser transgenen Pflanzen stark nekrotisiert (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den beobachteten Nekrotisierungen von einer Reihe vier Wochen alter transgener Pflanzen nach Behandlung mit *P. infestans* (Daten nicht gezeigt). Damit konnte für drei der fünf unabhängigen transgenen Linien der Gruppe B (Tab. 3-4), die bereits nach der Behandlung mit Pep13 über die stärksten Effekte hinsichtlich der untersuchten PR-Genexpression verfügten (Abb. 3-21B; 3-22B), die deutlichsten Unterschiede bezüglich des Wachstums von *P. infestans* beobachtet werden. Inzwischen sollte mit Hilfe der Methode der *Real Time* PCR eine genaue Quantifizierung des Wachstums von *P. infestans* möglich sein.

Für die *A. thaliana* JA-Perzeptionsmutante *coi1* konnte eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber dem nekrotrophen Pathogen *Botrytis cinerea*, aber nicht gegenüber dem biotrophen Pathogen *P. parasitica* gezeigt werden (Thomma *et al.*, 1998). Parallel dazu untersuchte *nahG*-Pflanzen zeigten den gegenteiligen Effekt, was auf eine negative Interaktion zwischen dem JA- und SA-Signalweg hindeutet (Thomma *et al.*, 1998). Untersuchungen mit weiteren *Arabidopsis*-Mutanten belegen zusätzlich, dass die Mehrzahl der Interaktionen zwischen dem SA- und JA-Signalweg von antagonistischer Art sind (Spoel *et al.*, 2003; Petersen *et al.*, 2000; Kachroo *et al.*, 2001; Kloeck *et al.*, 2001; Kap. 1-4).

Im Hinblick auf die *scFv*-Antikörper-Pflanzen wäre es denkbar, dass die antagonistische Wirkung von JA durch deren Bindung an die *scFv*-Antikörper reduziert wird. Dadurch würden die SA-abhängigen Abwehrmechanismen der biotrophen Wachstumsphase verstärkt, was zur Unterdrückung des Mycelwachstums führen könnte. Tatsächlich zeigten einige transgene Pflanzen einen solchen Phänotyp (Abb. 3-23). Wenn der Einfluss von SA-abhängigen Abwehrreaktionen auf das Wachstum von *P. infestans* entscheidend ist, sollten *nahG*-Pflanzen über ein im Vergleich mit den WT-Pflanzen verstärktes Mycelwachstum verfügen. Die Beobachtungen an *nahG*-Pflanzen, wonach das Wachstum von *P. infestans* tatsächlich verstärkt ist, erhärten diese Vermutungen (Halim *et al.*, z. Veröff. eingereicht). Versuche, in denen durch Behandlung der Pflanzen mit JA bzw. MeJA ein lokaler und systemischer Schutz vor einer Infektion mit *P. infestans* erreicht wurde (Cohen *et al.*, 1993), scheinen dagegen im Widerspruch zu den beobachteten Effekten in den transgenen *scFv*-

Antikörper-Pflanzen zu stehen. Die Autoren vermuten, dass der Schutz gegenüber einer Infektion mit *P. infestans* zumindest in der Anfangsphase der Infektion auf der inhibierenden Wirkung von JA und MeJA auf die Sporenkeimung sowie das Mycelwachstum von *P. infestans* beruht und es sich damit vermutlich um einen sekundären Effekt der exogen applizierten JA handelt (Cohen *et al.*, 1993). Um den Infektionsverlauf in den *scFv*-Antikörper-Pflanzen mit den WT-Pflanzen bzw. JA/MeJA-behandelten Pflanzen besser vergleichen zu können, sollte die Abwehrgenexpression in diesen Pflanzen analysiert werden. Zur genauen Aufklärung des Wirkungsmechanismus von JA müssen jedoch weitere transgene Ansätze, den JA-Biosyntheseweg bzw. die JA-Perzeption betreffend, herangezogen werden (in unserer Arbeitsgruppe bereits geplant).

Gesichert scheint dagegen der Einfluss von 9-LOX-Produkten (u. a. der Divinylether Colnensäure (CA) und Colnelensäure (CnA)) auf die Pathogenantwort von Kartoffel auf *P. infestans* (Göbel *et al.*, 2001; Göbel *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 1999). Es wird vermutet, dass die Akkumulation dieser antifugal wirkenden Produkte in Kartoffel nach der Behandlung von *P. infestans* zu spät erfolgt und deshalb eine effektive Resistenz nicht erreicht werden kann. Tatsächlich konnte für resistenteren Kultivare von Kartoffel eine frühere und gleichzeitig erhöhte Akkumulation der Divinylether CA und CnA im Vergleich mit dem suszeptiblen Kartoffelkultivar beobachtet werden (Weber *et al.*, 1999).

#### **4.11 Waren die beobachteten Unterschiede in den transgenen *scFv*-Antikörper-Pflanzen nach Pathogenbehandlung kompartiment- oder sequenzspezifisch?**

Nach Behandlung der transgenen *scFv*-Antikörper-Pflanzen mit *Psm* M2 bzw. Pep13 wurden lokale Unterschiede in der untersuchten Abwehrgenexpression zwischen den einzelnen Gruppen deutlich. In diesem Blattgewebe konnten nur für die transgenen Linien der Gruppe B (Tab. 3-4) signifikant verminderte Transkriptmengen nachgewiesen werden (Abb. 3-17; Abb. 3-21B). Dagegen zeigten die transgenen Linien der Gruppe A und C (Tab. 3-4) im Vergleich mit den C3-Pflanzen nur leichte bzw. keine Veränderungen hinsichtlich der untersuchten Transkriptakkumulationen nach Behandlung mit *Psm* M2 bzw. Pep13 (Abb. 3-16; Abb. 3-18; Abb. 3-21A,C). Die Ursachen für diese Unterschiede könnten in den spezifischen Bindungsaktivitäten der einzelnen *scFv*-Antikörper und/oder in der Lokalisierung der *scFv*-Antikörper innerhalb der Zelle zu suchen sein.

Einen Hinweis auf den Einfluss des verwendeten Kompartimentes liefern die transgenen Linien der Gruppe B und C (Tab. 3-4). In beiden Gruppen sind die spezifischen Bindungsaktivitäten der *scFv*-Antikörper an JA vergleichbar (Abb. 3-14). Aufgrund der auftretenden Kreuzreaktivität der *scFv*-Antikörper kann man davon ausgehen, dass OPDA in gleicher Weise wie JA gebunden wird, auch wenn die Bindung der *scFv*-Antikörper an OPDA *in planta* nicht bestimmt werden konnte (Kap. 4-7). Die mit den WT-Pflanzen vergleichbare Abwehrgenexpression der transgenen Linien der Gruppe C (Tab. 3-4) legen deshalb die

Vermutung nahe, dass die Lokalisierung der *scFv*-Antikörper im Stroma der Chloroplasten nicht zur physiologischen Inaktivierung von OPDA führen kann.

Für die Enzyme der 13-LOX, AOS und AOC konnte eine Lokalisierung im Chloroplasten eindeutig nachgewiesen werden, womit die Chloroplasten als Ort der Biosynthese von OPDA bestimmt wurden (Bell *et al.*, 1995; Fröhlich *et al.*, 2001; Harms *et al.*, 1995; Feussner *et al.*, 1995; Ziegler *et al.*, 2000). In Analogie zu anderen Multienzymkomplexen wie der Fettsäuresynthese wird eine direkte Interaktion der AOS mit der AOC vermutet, die bislang jedoch nicht gezeigt werden konnte (Fröhlich *et al.*, 2001; Stenzel *et al.*, 2003). So könnte die AOS das sehr instabile Epoxidprodukt durch die innere Chloroplastenmembran schleusen und anschließend direkt an die im Intermembranraum der Chloroplasten lokalisierte AOC weitergeben (Fröhlich *et al.*, 2001). Zusammen mit der Tatsache, dass 90 % der OPDA in den Chloroplasten lipidgebunden vorliegt (Stelmach *et al.*, 2001), wäre es deshalb denkbar, dass die im Stroma der Chloroplasten lokalisierten *scFv*-Antikörper physikalisch nicht mit der gebildeten OPDA interagieren können und deshalb keine Änderungen hinsichtlich der untersuchten Transkriptakkumulationen in diesen transgenen Pflanzen nach Pathogenbehandlung zu beobachten waren. Ähnliche Ergebnisse lieferten transgene Tabakpflanzen, die das identische *scFv*-Konstrukt exprimieren (ten Hoopen, 2002).

Inwieweit kompartimentspezifische Effekte tatsächlich eine Rolle spielen, kann nur durch die Analyse transgener *scFv*-Antikörper-Pflanzen, die ein und denselben *scFv*-Antikörper in verschiedene Kompartimente transportieren, untersucht werden. Nur auf diese Weise kann ein sequenzspezifischer Einfluss der verwendeten *scFv*-Antikörper auf die untersuchte Abwehrgenexpression sicher ausgeschlossen werden, was mit den in dieser Arbeit verwendeten *scFv*-Konstrukten nicht eindeutig möglich war.

Der sequenzspezifische Einfluss der *scFv*-Antikörper wird im Vergleich der transgenen Pflanzen der Gruppe A und B (Tab. 3-4) deutlich. Die transgenen Pflanzen beider Gruppen transportieren die gebildeten *scFv*-Antikörper in das ER. Damit deuten die Unterschiede in der Abwehrgenexpression nach Behandlung mit *Psm* M2 bzw. Pep13 auf einen sequenzspezifischen Einfluss, sowohl auf die Bindungsaktivität, als auch auf die Stabilität der verwendeten *scFv*-Antikörper hin.

#### 4.12 Ausblick

Der Einfluss von SA auf die Induktion verschiedener Abwehrreaktionen nach der Behandlung mit Pep13 ist bereits sehr deutlich demonstriert worden (Göbel, 2001; Halim *et al.*, z. Veröff. eingereicht, Abb. 3-5). In diesem Zusammenhang wäre es nun von Interesse, transgene *nahG*-Pflanzen zusätzlich entweder mit den anti-JA bzw. -OPDA *scFv*-Antikörper-Konstrukten zu transformieren oder transgene *nahG/opr3*-Mutanten herzustellen und deren Pathogenantwort zu analysieren.

Um den Einflusses von JA bzw. OPDA auf die Abwehrgenexpression in Kartoffel nach Behandlung mit den entsprechenden Pathogenen zu bestätigen, sollten die physiologisch

aktiven JA/OPDA-Konzentrationen in den transgenen *scFv*-Antikörper-Pflanzen bestimmt werden, was mit Hilfe der Dissoziationskonstanten der einzelnen *scFv*-Antikörper und den tatsächlich gemessenen JA/OPDA-Konzentrationen möglich sein sollte.

Parallel dazu sollte die Analyse transgener Pflanzen, die in der JA-Biosynthese und/oder der JA-Perzeption beeinträchtigt sind, sehr vielversprechend sein (in unserer Arbeitsgruppe bereits geplant).

## 5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, durch transgene Ansätze den Einfluss von JA, dessen Vorstufe OPDA sowie von SA als potenzielle Signalmoleküle auf die Ausprägung der induzierten Resistenz in Kartoffel zu untersuchen.

SAR kann in Kartoffel durch eine lokal begrenzte Infektion mit *Phytophthora infestans* (Strömberg und Brishammar, 1991) oder durch Inokulation mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (*Psm* M2) induziert werden (Kombrink *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu Tabak oder Arabidopsis ist die Ausprägung der SAR in Kartoffel nicht von einem systemischen Anstieg von SA abhängig (Ryals *et al.*, 1996; Dr. P. Landgraf, pers. Mitteilung). Zusätzlich verfügt Kartoffel über sehr hohe SA-Grundgehalte und unterscheidet sich auch in dieser Hinsicht von anderen pflanzlichen Systemen (Coqouze *et al.*, 1995; Dr. P. Landgraf, pers. Mitteilung). Der Einfluss von SA auf die Pathogenabwehr in Kartoffel wurden mittels transgener *nahG*-Pflanzen analysiert. In diesen Pflanzen betrug die Genexpression von *StPRB1b* nach Behandlung mit Pep13 im lokalen und systemischen Blattgewebe nur noch 25 % der im Wildtyp detektierten PR-Genexpression. Außerdem war die Bildung der Nekrosen in den *nahG*-Pflanzen vollständig unterdrückt. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die untersuchten Pep13-induzierten Abwehrmechanismen in Kartoffel von SA abhängig sind.

Nach Behandlung der WT-Pflanzen mit *Psm* M2 konnte eine Korrelation der Akkumulation von JA bzw. OPDA mit der PR-Genexpression im lokalen bzw. systemischen Blattgewebe gezeigt werden (Landgraf *et al.*, 2002). Um den Einfluss von JA bzw. OPDA auf die induzierte Resistenz in Kartoffel zu untersuchen, wurden *scFv*-Antikörper, die über eine hohe Bindungsaktivität für an BSA gekoppeltes JA bzw. OPDA verfügten, mittels *Phage Display* isoliert. Diese *scFv*-Antikörper dienen der Immunmodulation der JA- bzw. OPDA-Funktion im Cytosol, dem ER bzw. den Chloroplasten. Die Funktionalität der in der Pflanzenzelle gebildeten *scFv*-Antikörper wurde anhand der Wundantwort der transgenen Pflanzen und nach Behandlung mit MeJA analysiert. Für weitere Untersuchungen wurden transgene Pflanzen eines *scFv*-Konstrukts, von denen mindestens fünf unabhängige Linien in mindestens zwei unabhängigen Untersuchungen überwiegend verringerte *StPIN2*-Transkriptakkumulation zeigten, ausgewählt. Alle *in planta* untersuchten *scFv*-Antikörper verfügten über spezifische Bindungseigenschaften an BSA gekoppeltes JA. Die Kreuzreaktivität der untersuchten *scFv*-Antikörper deutet auf die Erkennung des für beide Moleküle charakteristischen Cyclopentanon-Rings.

Anhand der Transkriptakkumulation verschiedener Gene wurden die transgenen *scFv*-Antikörper-Pflanzen auf eine möglicherweise veränderte Pathogenantwort hin überprüft. So konnte im lokalen Blattgewebe nach Behandlung mit *Psm* M2 bzw. Pep13 für die transgenen Linien der Gruppe B (anti-JA *scFv* im ER) signifikant verminderte Transkriptmengen der untersuchten PR-Gene nachgewiesen werden. Dagegen zeigten die transgenen Linien der Gruppe A (anti-OPDA *scFv* im ER) und C (anti-OPDA *scFv* in den Chloroplasten) nur leichte bzw. keine Veränderungen hinsichtlich der untersuchten Transkriptakkumulationen nach

Behandlung mit *Psm* M2 bzw. Pep13. Die deutlichste Reduktion der Transkriptakkumulation war nach Behandlung der transgenen Linien mit Pep13 im systemischen Blattgewebe zu beobachten. Dabei war die Höhe der Reduktion der Transkriptakkumulation von *StPRB1b* der transgenen Linien der Gruppe B (anti-JA *scFv* im ER) mit der der *nahG*-Pflanzen vergleichbar. Diese Beobachtungen deuten auf einen Einfluss von JA und/oder OPDA auf die Induktion der Abwehrgenexpression nach Behandlung mit Pep13 hin. Die erhaltenen *Reverse Northern*-Daten stützen diese Vermutung. Für einige transgene *scFv*-Antikörperpflanzen konnte zusätzlich ein reduziertes Wachstum von *P. infestans* und eine verstärkte Nekrosenbildung nach 72 h gezeigt werden. Inwieweit JA und/oder OPDA einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf von *P. infestans* haben, müsste mit weiteren transgenen Ansätzen, die JA-Biosynthese bzw. -perzeption betreffend, abgesichert werden.



**6 Literaturverzeichnis**

- Abad, M.S., Hakimi, S.M., Kaniewski, W.K., Rommens, C.M., Shulaev, V., Lam, E. und Shah, D.M.** (1997). Characterization of acquired resistance in lesion-mimic transgenic potato expressing bacterio-opsin. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**, 635-645.
- Abler, L.L. und Sheets, M.D.** (2003). Expression of scFv antibodies in *Xenopus* embryos to disrupt protein function: implications for large-scale evaluation of the embryonic proteome. *Genesis* **35**, 107-113.
- Aderem, A. und Ulevitch, R.J.** (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**, 782-787.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D.J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- Alvarez, M.E.** (2000). Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol. Biol.* **44**, 429-442.
- Aravind, L. und Koonin, E.V.** (1999). Fold prediction and evolutionary analysis of the POZ domain: structural and evolutionary relationship with the potassium channel tetramerization domain. *J. Mol. Biol.* **285**, 1353-1361.
- Artsaenko, O.** (1996). Immunomodulation of ABA activity in transgenic tobacco plants. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Artsaenko, O., Peisker, M., zur Nieden, U., Fiedler, U., Weiler, E.W., Muntz, K. und Conrad, U.** (1995). Expression of a single-chain Fv antibody against abscisic acid creates a wilted phenotype in transgenic tobacco. *Plant J.* **8**, 745-750.
- Atkinson, M.M., Midland, S.L., Sims, J.J. und Keen, N.T.** (1996). Syringolide 1 triggers  $Ca^{2+}$  influx,  $K^{+}$  efflux, and extracellular alkalization in soybean cells carrying the disease resistance gene *Rpg4*. *Plant Physiol.* **112**, 297-302.
- Aujame, L., Geoffroy, F. und Sodoyer, R.** (1997). High affinity human antibodies by phage display. *Hum. Antibodies* **8**, 155-168.
- Bäumlein, H., Wobus, U., Pustell, J. und Kafatos, F.C.** (1986). The legumin gene family: structure of a B type gene of *Vicia faba* and a possible legumin gene specific regulatory element. *Nucl. Acids Res.* **14**, 2707-2720.
- Batz, O., Logemann, E., Reinold, S. und Hahlbrock, K.** (1998). Extensive reprogramming of primary and secondary metabolism by fungal elicitor or infection in parsley cells. *Biol. Chem.* **379**, 1127-1135.

- Beerhues, L. und Kombrink, E.** (1994). Primary structure and expression of mRNAs encoding basic chitinase and 1,3-beta-glucanase in potato. *Plant Mol. Biol.* **24**, 353-367.
- Beffa, R., Szell, M., Meuwly, P., Pay, A., Vogeli-Lange, R., Métraux, J.P., Neuhaus, G., Meins, F., Jr. und Nagy, F.** (1995). Cholera toxin elevates pathogen resistance and induces pathogenesis-related gene expression in tobacco. *Embo J.* **14**, 5753-5761.
- Bell, E., Creelman, R.A. und Mullet, J.E.** (1995). A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**, 8675-8679.
- Bent, A.F., Innes, R.W., Ecker, J.R. und Staskawicz, B.J.** (1992). Disease development in ethylene-insensitive *Arabidopsis thaliana* infected with virulent and avirulent *Pseudomonas* and *Xanthomonas* pathogens. *Mol. Plant Microbe Interact.* **5**, 372-378.
- Berger, S., Bell, E. und Mullet, J.E.** (1996). Two Methyl Jasmonate-Insensitive Mutants Show Altered Expression of *AtVsp* in Response to Methyl Jasmonate and Wounding. *Plant Physiol.* **111**, 525-531.
- Bevan, M.** (1984). Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucl. Acids Res.* **12**, 8711-8721.
- Bird, R.E., Hardman, K.D., Jacobson, J.W., Johnson, S., Kaufman, B.M., Lee, S.M., Lee, T., Pope, S.H., Riordan, G.S. und Whitlow, M.** (1988). Single-chain antigen-binding proteins. *Science* **242**, 423-426.
- Birnboim, H.C. und Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Björck, L.** (1988). Protein L. A novel bacterial cell wall protein with affinity for IgL chains. *J. Immunol* **140**, 1194-1197.
- Blatt, M.R., Grabov, A., Brearley, J., Hammond-Kosack, K. und Jones, J.D.** (1999). K<sup>+</sup> channels of *Cf-9* transgenic tobacco guard cells as targets for *Cladosporium fulvum* *Avr9* elicitor-dependent signal transduction. *Plant J.* **19**, 453-462.
- Blee, E.** (1998). Phytooxylipins and plant defense reactions. *Prog. Lipid Res.* **37**, 33-72.
- Blume, B., Nürnberger, T., Nass, N. und Scheel, D.** (2000). Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell* **12**, 1425-1440.
- Bokshi, A.I., Morris, S.C. und Deverall, B.J.** (2003). Effects of benzothiadiazole and acetylsalicylic acid on beta-1,3-glucanase activity and disease resistance in potato. *Plant Pathol.* **52**, 22-27.
- Boller, T.** (1995). Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 189-214.

- Bouquin, T., Thomsen, M., Nielsen, L.K., Green, T.H., Mundy, J. und Hanefeld Dziegiel, M.** (2002). Human anti-rhesus D IgG1 antibody produced in transgenic plants. *Transgenic Res.* **11**, 115-122.
- 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., und Dong, X.** (1997). The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expresses both *NPRI*-dependent and *NPRI*-independent resistance. *Plant Cell* **9**, 1573-1584
- Bradley, D.J., Kjellbom, P. und Lamb, C.J.** (1992). Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* **70**, 21-30.
- Bruce, B.D.** (2001). The paradox of plastid transit peptides: conservation of function despite divergence in primary structure. *Biochim. Biophys. Acta* **1541**, 2-21.
- Brunner, F., Rosahl, S., Lee, J., Rudd, J.J., Geiler, C., Kauppinen, S., Rasmussen, G., Scheel, D. und Nürnberger, T.** (2002). Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases. *Embo J.* **21**, 6681-6688.
- Bruyns, A.M., De Jaeger, G., De Neve, M., De Wilde, C., Van Montagu, M. und Depicker, A.** (1996). Bacterial and plant-produced scFv proteins have similar antigen-binding properties. *FEBS Lett.* **386**, 5-10.
- Bryant, J., Green, T.R., Gurusaddaiah, T. und Ryan, C.A.** (1976). Proteinase inhibitor II from potatoes: isolation and characterization of its promoter components. *Biochemistry* **15**, 3418-3424.
- Buchter, R., Stromberg, A., Schmelzer, E. und Kombrink, E.** (1997). Primary structure and expression of acidic (class II) chitinase in potato. *Plant Mol. Biol.* **35**, 749-761.
- Cameron, R.K., Dixon, R.A. und Lamb, C.J.** (1994). Biologically induced systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **5**, 715-726.
- Cao, H., Li, X. und Dong, X.** (1998). Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**, 6531-6536.
- Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, A.S. und Dong, X.** (1994). Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell* **6**, 1583-1592.
- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J.D., Volko, S. und Dong, X.** (1997). The *Arabidopsis NPRI* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* **88**, 57-63.

- Chaudhary, V.K., Batra, J.K., Gallo, M.G., Willingham, M.C., FitzGerald, D.J. und Pastan, I.** (1990). A rapid method of cloning functional variable-region antibody genes in *Escherichia coli* as single-chain immunotoxins. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **87**, 1066-1070.
- Chen, Z., Ricigliano, J.W. und Klessig, D.F.** (1993a). Purification and characterization of a soluble salicylic acid-binding protein from tobacco. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **90**, 9533-9537.
- Chen, Z., Silva, H. und Klessig, D.F.** (1993b). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. Science **262**, 1883-1886.
- Cheong, J.-J. und Choi, Y.D.** (2003). Methyl jasmonate as a vital substance in plants. Trends Genetics **19**, 409-413.
- Chiswell, D.J. und McCafferty, J.** (1992). Phage antibodies: will new 'coliclonal' antibodies replace monoclonal antibodies? Trends Biotechnol. **10**, 80-84.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. **162**, 156-159.
- Clackson, T., Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D. und Winter, G.** (1991). Making antibody fragments using phage display libraries. Nature **352**, 624-628.
- Clarke, J.D., Volko, S.M., Ledford, H., Ausubel, F.M. und Dong, X.** (2000). Roles of salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene in *cpr*-induced resistance in *Arabidopsis*. Plant Cell **12**, 2175-2190.
- Clarke, J.D., Liu, Y., Klessig, D.F. und Dong, X.** (1998). Uncoupling *PR* gene expression from *NPR1* and bacterial resistance: characterization of the dominant *Arabidopsis cpr6-1* mutant. Plant Cell **10**, 557-569
- Cohen, Y.** (1994). Local and systemic control of *Phytophthora infestans* in tomato plants by DL-3-Amino-n-butanoic acids. Phytopathology **84**, 55-59.
- Cohen, Y., Gisi, U. und Möisinger, E.** (1991). Systemic resistance of potato plants against *Phytophthora infestans* induced by unsaturated fatty acids. Physiol. Mol. Plant Pathol. **38**, 255-273.
- Cohen, Y., Gisi, U. und Niderman, T.** (1993). Local and systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato and tomato by jasmonic acid and jasmonic methyl ester. Phytopathology **83**, 1054-1062.
- Cohen, Y., Niderman, T., Moesinger, E. und Fluhr, R.** (1994).  $\beta$ -Aminobutyric acid induces the accumulation of pathogenesis-related proteins in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants and resistance to late blight infection caused by *Phytophthora infestans*. Plant Physiol. **104**, 59-66.

- Cohn, J., Sessa, G. und Martin, G.B.** (2001). Innate immunity in plants. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 55-62.
- Conrad, U. und Fiedler, U.** (1998). Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity. *Plant Mol. Biol.* **38**, 101-109.
- Conrad, U. und Manteuffel, R.** (2001). Immunomodulation of phytohormones and functional proteins in plant cells. *Trends Plant Sci.* **6**, 399-402.
- Coquoz, J.-L., Buchala, A.J., Meuwly, P. und Métraux, J.-P.** (1995). Arachidonic acid induces local but not systemic synthesis of salicylic acid and confers systemic resistance in potato plants to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. *Phytopathology* **85**, 1219-1224.
- Creelman, R.A. und Mullet, J.E.** (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 355-381.
- Dammann, C., Rojo, E. und Sanchez-Serrano, J.J.** (1997). Abscisic acid and jasmonic acid activate wound-inducible genes in potato through separate, organ-specific signal transduction pathways. *Plant J.* **11**, 773-782.
- Dangl, J.L. und Jones, J.D.G.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826-833.
- Daniell, H., Streatfield, S.J. und Wycoff, K.** (2001). Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci.* **6**, 219-226.
- Darvill, A.G. und Albersheim, P.** (1984). Phytoalexins and their elicitors-a defense against microbial infection in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **35**, 243-275.
- Davis, K.R. und Hahlbrock, K.** (1987). Induction of defense responses in cultured parsley cells by plant cell wall fragments. *Plant Physiol.* **85**, 1286-1290.
- Davis, K.R., Lyon, G.D., Darvill, A.G. und Albersheim, P.** (1984). Host-pathogen interactions. XXV. Endopolygalacturonic acid lyase from *Erwinia carotovora* elicits phytoalexin accumulation by releasing plant cell wall fragments. *Plant Physiol.* **74**, 52-60.
- De Jaeger, G., De Wilde, C., Eeckhout, D., Fiers, E. und Depicker, A.** (2000a). The plantibody approach: expression of antibody genes in plants to modulate plant metabolism or to obtain pathogen resistance. *Plant Mol. Biol.* **43**, 419-428.
- De Jaeger, G., Fiers, E., Eeckhout, D. und Depicker, A.** (2000b). Analysis of the interaction between single-chain variable fragments and their antigen in a reducing intracellular environment using the two-hybrid system. *FEBS Lett.* **467**, 316-320.
- De Jaeger, G., Buys, E., Eeckhout, D., De Wilde, C., Jacobs, A., Kapila, J., Angenon, G., Van Montagu, M., Gerats, T. und Depicker, A.** (1999). High level accumulation of single-

- chain variable fragments in the cytosol of transgenic *Petunia hybrida*. Eur. J. Biochem. **259**, 426-434.
- de Wildt, R.M., Mundy, C.R., Gorick, B.D. und Tomlinson, I.M.** (2000). Antibody arrays for high-throughput screening of antibody-antigen interactions. Nat. Biotechnol. **18**, 989-994.
- De Wit, P.J.G.M.** (1996). Unraveling the gene for gene hypothesis and its relevance to phytopathology. Phytoparasitica **24**, 183-187.
- Debener, T., Lehnackers, H., Arnold, M. und Dangl, J.L.** (1991). Identification and molecular mapping of a single *Arabidopsis thaliana* locus determining resistance to a phytopathogenic *Pseudomonas syringae* isolate. Plant J. **1**, 289-302.
- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M. und Leemans, J.** (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. Nucl. Acids Res. **13**, 4777-4788.
- Delaney, T.P., Friedrich, L. und Ryals, J.A.** (1995). *Arabidopsis* signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **92**, 6602-6606.
- Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L.B., Weymann, K.B., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E. und Ryals, J.** (1994). A central role of salicylic acid in plant disease resistance. Science **266**, 1247-1250.
- Dempsey, D.A., Shah, J. und Klessig, D.F.** (1999). Salicylic acid and disease resistance in plants. Crit. Rev. Plant Sci. **18**, 547-575.
- Denecke, J., de Rycke, R. und Botterman, L.** (1992). Mammalian- and plant-sorting signals for protein retention in the endoplasmic reticulum from a closely related epitope. EMBO J. **11**, 2345-2355.
- Desiderio, A., Franconi, R., Lopez, M., Villani, M.E., Viti, F., Chiaraluca, R., Consalvi, V., Neri, D. und Benvenuto, E.** (2001). A semi-synthetic repertoire of intrinsically stable antibody fragments derived from a single-framework scaffold. J. Mol. Biol. **310**, 603-615.
- Després, C., Chubak, C., Rochon, A., Clark, R., Bethune, T. Desveaux, D. und Fobert, P.R.** (2003). The *Arabidopsis* NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. Plant Cell **15**, 2181-2191
- Després, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E. und 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**, 279-290.
- Devadas, S.K., Enyedi, A. und Raina, R.** (2002). The *Arabidopsis hrl1* mutation reveals novel overlapping roles for salicylic acid, jasmonic acid and ethylene signalling in cell death and defence against pathogens. Plant J. **30**, 467-480.

- Doares, S.H., Syrovets, T., Weiler, E.W. und Ryan, C.A.** (1995). Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**, 4095-4098.
- Dong, X.** (2001). Genetic dissection of systemic acquired resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 309-314
- Dow, M., Newman, M.-A. und Roepenack, E.** (2000). The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *Annu. Rev. Phytopathol.* **38**, 241-261.
- Dower, W.J. und Cwirla, S.E.** (1992). In *Guide to Electroporation and Electrofusion.*, D.C. Chang, B.M. Chassy, J.A. Saunders und A.E. Sowers, eds. (San Diego: Academic Press), 291-301.
- Dower, W.J., Miller, J.F. und Ragsdale, C.W.** (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* **16**, 6127-6145.
- Dreher, M.L., Gherardi, E., Skerra, A. und Milstein, C.** (1991). Colony assays for antibody fragments expressed in bacteria. *J. Immunol. Methods* **139**, 197-205.
- Durner, J. und Klessig, D.F.** (1995). Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**, 11312-11316.
- Durner, J., Wendehenne, D. und Klessig, D.F.** (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**, 10328-10333.
- Ebel, J. und Scheel, D.** (1997). Signals in host-parasite interactions. In *The Mycota. Plant Relationships, Part A*, G.C. Carroll und P. Tudzynski, eds. (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag), 85-105.
- Ebel, J. und Mithöfer, A.** (1998). Early events in the elicitation of plant defence. *Planta* **206**, 335-348.
- Ellis, C. und Turner, J.G.** (2001). The *Arabidopsis* mutant *cevl* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *Plant Cell* **13**, 1025-1033.
- Ellis, C., Karafyllidis, I., Wasternack, C. und Turner, J.G.** (2002). The *Arabidopsis* mutant *cevl* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *Plant Cell* **14**, 1557-1566.
- Enkerli, J., Felix, G. und Boller, T.** (1999). The enzymatic activity of fungal xylanase is not necessary for its elicitor activity. *Plant Physiol.* **121**, 391-397.

- Epple, P., Apel, K. und 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**, 813-820.
- Fahrendorf, T., Ni, W., Shorrosh, B.S. und Dixon, R.A.** (1995). Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) XIX. Transcriptional activation of oxidative pentose phosphate pathway genes at the onset of the isoflavonoid phytoalexin response. *Plant Mol. Biol.* **28**, 885-900.
- Fan, W. und Dong, X.** (2002). In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 1377-1389.
- Farmer, E.E. und Ryan, C.A.** (1992). Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* **4**, 129-134.
- Fecker, L.F., Kaufmann, A., Commandeur, U., Commandeur, J., Koenig, R. und Burgermeister, W.** (1996). Expression of single-chain antibody fragments (scFv) specific for beet necrotic yellow vein virus coat protein or 25 kDa protein in *Escherichia coli* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Mol. Biol.* **32**, 979-986.
- Fedorov, A.N. und Baldwin, T.O.** (1998). Protein folding and assembly in a cell-free expression system. *Methods Enzymol.* **290**, 1-17.
- Felix, G. und Boller, T.** (2003). Molecular sensing of bacteria in plants. The highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *J. Biol. Chem.* **278**, 6201-6208.
- Feltkamp, D., Baumann, E., Schmalenbach, W., Masterson, R. und Rosahl, S.** (1995). Expression of the mannopine synthase promoter in roots is dependent on the *mas* elements and correlates with high transcript levels of *mas*-binding factor. *Plant Sci.* **109**, 57-65.
- Feng, S., Ma, L., Wang, X., Xie, D., Dinesh-Kumar, S.P., Wei, N. und Deng, X.W.** (2003). The COP9 signalosome interacts physically with SCF<sup>COI1</sup> and modulates jasmonate responses. *Plant Cell* **15**, 1083-1094.
- Feussner, I. und Wasternack, C.** (2002). The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 275-297.
- Feussner, I., Hause, B., Vörös, K., Parthier, B. und Wasternack, C.** (1995). Jasmonate-induced lipoxygenase forms are localized in chloroplasts of barley leaves (*Hordeum vulgare* cv. Salome). *Plant J.* **7**, 949-957.
- Feys, B.J., Moisan, L.J., Newman, M.A. und Parker, J.E.** (2001). Direct interaction between the *Arabidopsis* disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *Embo J.* **20**, 5400-5411.
- Fiedler, U., Phillips, J., Artsaenko, O. und Conrad, U.** (1997). Optimization of scFv antibody production in transgenic plants. *Immunotechnology* **3**, 205-216.



- Firek, S., Draper, J., Owen, M.R., Gandecha, A., Cockburn, B. und Whitelam, G.C.** (1993). Secretion of a functional single-chain Fv protein in transgenic tobacco plants and cell suspension cultures. *Plant Mol. Biol.* **23**, 861-870.
- Fischer, R., Emans, N. und Schillberg, S.** (2001). Achieving plant disease resistance by antibody expression. *Canad. J. Plant Pathol.* **23**, 236-245.
- Flor, H.H.** (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**, 275-296.
- Friedrich, L., Lawton, K.A., Ruess, W., Masner, P., Specker, N., Gut Rella, M., Meier, B., Dincher, S. und Staub, T.** (1996). A benzothiadiazole derivate induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant J.* **10**, 61-70
- Frisch, D.A., Harris-Haller, L.W., Yokubaitis, N.T., Thomas, T.L., Hardin, S.H. und Hall, T.C.** (1995). Complete sequence of the binary vector Bin19. *Plant Mol. Biol.* **27**, 405-409.
- Fröhlich, J.E., Itoh, A. und Howe, G.A.** (2001). Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelope. *Plant Physiol.* **125**, 306-317.
- Furman-Matarasso, N., Cohen, E., Du, Q., Chejanovsky, N., Hanania, U. und Avni, A.** (1999). A point mutation in the ethylene-inducing xylanase elicitor inhibits the beta-1-4-endoxylanase activity but not the elicitation activity. *Plant Physiol.* **121**, 345-351.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H. und Ryals, J.** (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* **261**, 754-755.
- Geiler, C.** (2001). Induktion von Abwehrreaktionen in *Solanum tuberosum* L. durch den Oligopeptid-Elicitor Pep-13 aus *Phytophthora sojae*. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Gelli, A., Higgins, V.J. und Blumwald, E.** (1997). Activation of plant plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-permeable channels by race-specific fungal elicitors. *Plant Physiol.* **113**, 269-279.
- Gibson, T.J.** (1984). Studies on the Epstein-Barr virus genome. PhD thesis. Cambridge University, England.
- Glazebrook, J.** (2001). Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*-2001 status. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 301-308.
- Glazebrook, J., Rogers, E.E. und Ausubel, F.M.** (1996). Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics* **143**, 973-982.

- Glazebrook, J., Chen, W., Estes, B., Chang, H.S., Nawrath, C., Métraux, J.P., Zhu, T. und Katagiri, F.** (2003). Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant J.* **34**, 217-228.
- Göbel, C., Feussner, I., Hamberg, M. und Rosahl, S.** (2002). Oxylin profiling in pathogen-infected potato leaves. *Biochim. Biophys. Acta* **1584**, 55-64.
- Göbel, C.** (2001). Untersuchungen zur Funktion von Oxylinen bei der Pathogenantwort in *Solanum tuberosum* L.. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Goméz-Goméz, L. und Boller, T.** (2002). Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.* **7**, 251-256.
- Görlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K.H., Oostendorp, M., Staub, T., Ward, E., Kessmann, H. und Ryals, J.** (1996). Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* **8**, 629-643.
- Grant, J.J. und Loake, G.J.** (2000). Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol.* **124**, 21-29.
- Guo, H. und Ecker, J.R.** (2004). The ethylene signaling pathway: new insights. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 40-49.
- Halim, V.A., Hunger, A., Macioszek, V., Landgraf, P., Nürnberger, T., Scheel, D. und Rosahl, S.** (z. Veröff. eingereicht). The oligopeptide elicitor Pep13 induces salicylic acid-dependent and -independent defense reactions in potato. *Mol. Plant Microbe Interact.*
- Hammond-Kosack, K.E. und Jones, J.D.G.** (2000). Responses to plant pathogens. In *Biochemistry and molecular biology of plants*, B. Buchanan, W. Gruissem und R. Jones, eds. (Rockville, Maryland: American Society of Plant Physiologists), 1102-1156.
- Hammond-Kosack, K.E. und Parker, J.E.** (2003). Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 177-193.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hanes, J. und Plückthun, A.** (1997). In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**, 4937-4942.
- Hanes, J., Jermutus, L., Weber-Bornhauser, S., Bosshard, H.R. und Plückthun, A.** (1998). Ribosome display efficiently selects and evolves high-affinity antibodies in vitro from immune libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**, 14130-14135.

- Hao, D., Ohme-Takagi, M. und Sarai, A.** (1998). Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plant. *J. Biol. Chem.* **273**, 26857-26861.
- Harms, K., Atzorn, R., Brash, A., Kuhn, H., Wasternack, C., Willmitzer, L. und Pena-Cortes, H.** (1995). Expression of a flax allene oxide synthase cDNA leads to increased endogenous jasmonic acid (JA) levels in transgenic potato plants but not to a corresponding activation of JA-responding genes. *Plant Cell* **7**, 1645-1654.
- He, M. und Taussig, M.J.** (1997). Antibody-ribosome-mRNA (ARM) complexes as efficient selection particles for in vitro display and evolution of antibody combining sites. *Nucl. Acids Res.* **25**, 5132-5134.
- Heath, M.C.** (2000). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 315-319.
- Hiatt, A., Cafferkey, R. und Bowdish, K.** (1989). Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* **342**, 76-78.
- Hilpert, B., Bohlmann, H., op den Camp, R.O., Przybyla, D., Miersch, O., Buchala, A. und Apel, K.** (2001). Isolation and characterization of signal transduction mutants of *Arabidopsis thaliana* that constitutively activate the octadecanoid pathway and form necrotic microlesions. *Plant J.* **26**, 435-446.
- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J. und Schilperoort, R.A.** (1983). A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* **303**, 179-180.
- Höfgen, R. und Willmitzer, L.** (1988). Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucl. Acids Res.* **16**, 9877.
- Hoogenboom, H.R. und Winter, G.** (1992). By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro. *J. Mol. Biol.* **227**, 381-388.
- Hoogenboom, H.R. und Chames, P.** (2000). Natural and designer binding sites made by phage display technology. *Immunol. Today* **21**, 371-378.
- Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., Johnson, K.S., Chiswell, D.J., Hudson, P. und Winter, G.** (1991). Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucl. Acids Res.* **19**, 4133-4137.
- Hoogenboom, H.R., de Bruine, A.P., Hufton, S.E., Hoet, R.M., Arends, J.W. und Roovers, R.C.** (1998). Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* **4**, 1-20.

- Howe, G.A., Lightner, J., Browse, J. und Ryan, C.A.** (1996). An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. *Plant Cell* **8**, 2067-2077.
- Hudson, P.J.** (1998). Recombinant antibody fragments. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 395-402.
- Huston, J.S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.S., Novotny, J., Margolies, M.N., Ridge, R.J., Bruccoleri, R.E., Haber, E., Crea, R. und Oppermann, H.** (1988). Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **85**, 5879-5883.
- Imler, J.L. und Hoffmann, J.A.** (2001). Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell Biol.* **11**, 304-311.
- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I. und Okada, K.** (2001). The DEFECTIVE IN ANTHET DEHISCENCE gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 2191-2209.
- Ishikawa, A., Yoshihara, T. und Nakamura, K.** (1994). Jasmonate-inducible expression of a potato cathepsin D inhibitor-GUS gene fusion in tobacco cells. *Plant Mol. Biol.* **26**, 403-414.
- Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K. und Scheel, D.** (1997). Elicitor-stimulated ion fluxes and  $O_2^-$  from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**, 4800-4805.
- Jensen, A.B., Raventos, D. und Mundy, J.** (2002). Fusion genetic analysis of jasmonate-signalling mutants in *Arabidopsis*. *Plant J.* **29**, 595-606.
- Jirage, D., Tootle, T.L., Reuber, T.L., Frost, L.N., Feys, B.J., Parker, J.E., Ausubel, F.M. und Glazebrook, J.** (1999). *Arabidopsis thaliana* PAD4 encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**, 13583-13588.
- Jonak, C., Okresz, L., Bogre, L. und Hirt, H.** (2002). Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 415-424.
- Kachroo, P., Yoshioka, K., Shah, J., Dooner, H.K. und Klessig, D.F.** (2000). Resistance to turnip crinkle virus in *Arabidopsis* is regulated by two host genes and is salicylic acid dependent but NPR1, ethylene, and jasmonate independent. *Plant Cell* **12**, 677-690.
- Kachroo, P., Shanklin, J., Shah, J., Whittle, E.J. und Klessig, D.F.** (2001). A fatty acid desaturase modulates the activation of defense signaling pathways in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**, 9448-9453.

- Kamoun, S.** (2001). Nonhost resistance to *Phytophthora*: novel prospects for a classical problem. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 295-300.
- Kamoun, S., van West, P., de Jong, A.J., de Groot, K.E., Vleeshouwers, V.G. und Govers, F.** (1997). A gene encoding a protein elicitor of *Phytophthora infestans* is down-regulated during infection of potato. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**, 13-20.
- Kauss, H., Jeblick, W. und Domard, A.** (1989). Degree of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*. *Planta* **178**, 385-392.
- Kawasaki, T., Henmi, K., Ono, E., Hatakeyama, S., Iwano, M., Satoh, H. und 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**, 10922-10926.
- Keen, N.T.** (1975). Specific elicitors of plant phytoalexin production: Determinants of race specificity in plants? *Science* **187**, 74-75.
- Kessmann, H., Staub, T., Hofmann, H., Maetzke, T., Herzog, J., Ward, E., Uknes, S. und Ryals, J.** (1994a). Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**, 439-460.
- Kessmann, H., Staub, T., Ligon, J., Oostendorp, M. und Ryals, J.** (1994b). Activation of systemic acquired disease resistance in plants. *Eur. J. Plant Pathol.* **100**, 359-370.
- Khoudi, H., Laberge, S., Ferullo, J.M., Bazin, R., Darveau, A., Castonguay, Y., Allard, G., Lemieux, R. und Vezina, L.P.** (1999). Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants. *Biotechnol. Bioeng.* **64**, 135-143.
- Khush, R.S. und Lemaitre, B.** (2000). Genes that fight infection: what the *Drosophila* genome says about animal immunity. *Trends Genet.* **16**, 442-449.
- King, E.O., Ward, M.K. und Raney, D.E.** (1954). Two simple media for the demonstration of phycocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* **44**, 301-307.
- Kinkema, M., Fan, W. und Dong, X.** (2000). Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *Plant Cell* **12**, 2339-2350.
- Kistner, C.** (1999). Isolierung und Charakterisierung eines nach Infektion mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* systemisch responsiven Gens von *Solanum tuberosum* L.. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- 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. und Silva, H.** (2000). Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**, 8849-8855.

- Kloek, A.P., Verbsky, M.L., Sharma, S.B., Schoelz, J.E., Vogel, J., Klessig, D.F. d Kunkel, B.N.** (2001). Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (*coi1*) mutation occurs through two distinct mechanisms. *Plant J.* **26**, 509-522.
- Klüsener, B. und Weiler, E.W.** (1999). Pore-forming properties of elicitors of plant defense reactions and cellulolytic enzymes. *FEBS Lett.* **459**, 263-266.
- Knappik, A. und Plückthun, A.** (1995). Engineered turns of a recombinant antibody improve its in vivo folding. *Protein Eng.* **8**, 81-89.
- Kobe, B. und Kajava, A.V.** (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 725-732.
- Kombrink, E. und Hahlbrock, K.** (1986). Responses of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi. Timing and dose dependency of elicitor-induced reactions. *Plant Physiol.* **81**, 216-221.
- Kombrink, E. und Schmelzer, E.** (2001). The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. *Eur. J. Plant. Pathol.* **107**, 69-78.
- Kombrink, E. und Somssich, I.E.** (199/). Pathogenesis-related proteins and plant defense. In: *Plant Relationships* (Carroll, G. und Tudzynski, P., eds.), *The Mycota*, Vol. 5, Part A. Berlin: Springer-Verlag: 107-128.
- Kombrink, E., Büchter, R., Wegener, S. und Scheel, D.** (1996). Systemic acquired resistance in potato. In *Modern Fungicides and Antifungal Compounds*, H. Lyr, P.E. Russel und H.D. Sisler, eds. (Andover: Intercept), 483-491.
- Koussevitzky, S., Ne'eman, E., Sommer, A., Steffens, J.C. und Harel, E.** (1998). Purification and properties of a novel chloroplast stromal peptidase. Processing of polyphenol oxidase and other imported precursors. *J. Biol. Chem.* **273**, 27064-27069.
- Kreft, S., Ravnkar, M., Meško, P., Pungerčar, J., Umek, A., Kregar, I. und Štrukelj, B.** (1997). Jasmonic acid inducible aspartic proteinase inhibitors from potato. *Phytochemistry* **44**, 1001-1006.
- Kroj, T., Rudd, J.J., Nürnberger, T., Gäbler, Y., Lee, J. und Scheel, D.** (2003). Mitogen-activated protein kinases play an essential role in oxidative burst-independent expression of pathogenesis-related genes in parsley. *J. Biol. Chem.* **278**, 2256-2264.
- Kumar, D. und Klessig, D.F.** (2003). High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **100**, 16101-16106.
- Kunkel, B.N. und Brooks, D.M.** (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 325-331.

- Kutter, C.** (2001). Diplomarbeit Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Laemmlli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lam, E., Kato, N. und Lawton, M.** (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* **411**, 848-853.
- Lamb, C. und Dixon, R.A.** (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 251-275.
- Landgraf, P., Feussner, I., Hunger, A., Scheel, D. und Rosahl, S.** (2002). Systemic accumulation of 12-oxo-phytodienoic acid in SAR-induced potato plants. *Eur. J. Plant Pathol.* **108**, 279-283.
- Laudert, D., Schaller, F. und Weiler, E.W.** (2000). Transgenic *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing allene oxide synthase. *Planta* **211**, 163-165.
- Lawton, K.A., Potter, S.L., Uknes, S. und Ryals, J.** (1994). Acquired resistance signal transduction in *Arabidopsis* is ethylene independent. *Plant Cell* **6**, 581-588.
- Le Gall, F., Bove, J.M. und Garnier, M.** (1998). Engineering of a single-chain variable-fragment (scFv) antibody specific for the stolbur phytoplasma (Mollicute) and its expression in *Escherichia coli* and tobacco plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4566-4572.
- Lee, G.I. und Howe, G.A.** (2003). The tomato mutant *spr1* is defective in systemin perception and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. *Plant J.* **33**, 567-576.
- Léon, J., Rojo, E. und Sánchez-Serrano, J.J.** (2001). Wound signalling in plants. *J. Exp. Bot.* **52**, 1-9.
- Li, C., Liu, G., Xu, C., Lee, G.I., Bauer, P., Ling, H.Q., Ganai, M.W. und Howe, G.A.** (2003). The tomato suppressor of prosystemin-mediated responses2 gene encodes a fatty acid desaturase required for the biosynthesis of jasmonic acid and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. *Plant Cell* **15**, 1646-1661.
- Li, H. und Chen, L.J.** (1997). A novel chloroplastic outer membrane-targeting signal that functions at both termini of passenger polypeptides. *J. Biol. Chem.* **272**, 10968-10974.
- Li, J., Brader, G. und Palva, E.T.** (2004). The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* **16**, 319-331.
- Li, L., Li, C., Lee, G.I. und Howe, G.A.** (2002). Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**, 6416-6421.
- Liddell, E. und Weeks, I.** (1996). Antikörper-Techniken. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.

- Ligterink, W., Kroj, T., zur Nieden, U., Hirt, H. und Scheel, D.** (1997). Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science* **276**, 2054-2057.
- Logemann, J., Schell, J. und Willmitzer, L.** (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* **163**, 16-20.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J.J. und Solano, R.** (2003). ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* **15**, 165-178.
- Ma, J.K. und Hein, M.B.** (1995a). Immunotherapeutic potential of antibodies produced in plants. *Trends Biotechnol.* **13**, 522-527.
- Ma, J.K. und Hein, M.B.** (1995b). Plant antibodies for immunotherapy. *Plant Physiol.* **109**, 341-346.
- Madamanchi, N.R. und Kuc, J.** (1991). Induced systemic resistance in plants. In *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*, G.T. Cole und H.C. Hoch, eds. (New York: Plenum Publishing Corporation), 347-362.
- Malamy, J., Carr, J.P., Klessig, D.F. und Raskin, I.** (1990). Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* **250**, 1002-1004.
- Mandel, M. und Higa, A.** (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**, 159-162.
- Martini, N., Egen, M., Runtz, I. und Strittmatter, G.** (1993). Promoter sequences of a potato pathogenesis-related gene mediate transcriptional activation selectively upon fungal infection. *Mol. Gen. Genet.* **236**, 179-186.
- Mattheakis, L.C., Bhatt, R.R. und Dower, W.J.** (1994). An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**, 9022-9026.
- McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G. und Chiswell, D.J.** (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**, 552-554.
- McConn, M., Creelman, R.A., Bell, E., Mullet, J.E. und Browse, J.** (1997). Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**, 5473-5477.
- McCormick, A.A., Reinl, S.J., Cameron, T.I., Vojdani, F., Fronfield, M., Levy, R. und Tuse, D.** (2003). Individualized human scFv vaccines produced in plants: humoral anti-idiotypic responses in vaccinated mice confirm relevance to the tumor Ig. *J. Immunol. Methods* **278**, 95-104.
- Medzhitov, R. und Janeway, C.A., Jr.** (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 4-9.



- Melville, J.C. und Ryan, C.A.** (1972). Chymotrypsin inhibitor I from potatoes. Large scale preparation and characterization of its subunit components. *J. Biol. Chem.* **247**, 3445-3453.
- Métraux, J.P., Ahl Goy, P., Staub, T., Speich, J., Steinemann, A., Ryals, J. und Ward, E.** (1991). Induced systemic resistance in cucumber in response to 2,6-dichloro-isonicotinic acid and pathogens. In *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. 1, H. Hennecke und D.P.S. Verma, eds. (Dordrecht: Kuwer Academic Publishers), 432-439.
- Métraux, J.-P., Singer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W. und Inverardi, B.** (1990). Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* **250**, 1004-1006.
- Montesano, M., Brader, G. und Palva, E.T.** (2003). Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Mol. Plant Pathol.* **4**, 73-79
- Mou, Z., Fan, W. und Dong, X.** (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* **113**, 935-944.
- Munroe, S. und Pelham, H.R.** (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**, 899-907.
- Murashige, T. und Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Nandi, A., Krothapalli, K., Buseman, C.M., Li, M., Welti, R., Enyedi, A. und Shah, J.** (2003). *Arabidopsis sfd* mutants affect plastidic lipid composition and suppress dwarfing, cell death, and the enhanced disease resistance phenotypes resulting from the deficiency of a fatty acid desaturase. *Plant Cell* **15**, 2383-2398
- Nandi, A., Welti, R. und Shah, J.** (2004). The *Arabidopsis thaliana* dihydroxyacetone phosphate reductase gene *SUPPRESSOR OF FATTY ACID DESATURASE DEFICIENCY 1* is required for glycerolipid metabolism and for the activation of systemic acquired resistance. *Plant Cell* **16**, 465-477
- Nawrath, C. und Métraux, J.P.** (1999). Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell* **11**, 1393-1404.
- Nawrath, C., Heck, S., Parinthewong, N. und Métraux, J.P.** (2002). EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in *Arabidopsis*, is a member of the MATE transporter family. *Plant Cell* **14**, 275-286.
- Nibbe, M., Hilpert, B., Wasternack, C., Miersch, O. und Apel, K.** (2002). Cell death and salicylate- and jasmonate-dependent stress responses in *Arabidopsis* are controlled by single *cet* genes. *Planta* **216**, 120-128.

- Norman-Setterblad, C., Vidal, S. und 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**, 430-438.
- Nürnberg, T. und Scheel, D.** (2001). Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci.* **6**, 372-379.
- Nürnberg, T. und Brunner, F.** (2002). Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 318-324.
- Nürnberg, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W.R., Hahlbrock, K. und Scheel, D.** (1994). High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* **78**, 449-460.
- Nürnberg, T.** (1999). Signal perception in plant pathogen defense. *Cell. Mol. Life Sci* **55**, 167-182.
- Osbourn, A.E.** (1996). Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* **8**, 1821-1831.
- Owen, M., Gandecha, A., Cockburn, B. und Whitelam, G.** (1992). Synthesis of a functional anti-phytochrome single-chain Fv protein in transgenic tobacco. *Biotechnology (N Y)* **10**, 790-794.
- Park, J.H., Halitschke, R., Kim, H.B., Baldwin, I.T., Feldmann, K.A. und Feyereisen, R.** (2002). A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *Plant J.* **31**, 1-12.
- Peña-Cortes, H., Fisahn, J. und Willmitzer, L.** (1995). Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**, 4106-4113.
- Penninckx, I.A., Thomma, B.P., Buchala, A., Métraux, J.P. und 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**, 2103-2113.
- Penninckx, I.A., Eggermont, K., Terras, F.R., Thomma, B.P., De Samblanx, G.W., Buchala, A., Métraux, J.P., Manners, J.M. und Broekaert, W.F.** (1996). Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* **8**, 2309-2323.
- Perrin, Y., Vaquero, C., Gerrard, I., Sack, M., Drossard, J., Stoger, E., Christou, P. und Fischer, R.** (2000). Transgenic pea seeds as bioreactors for the production of a single-chain Fv fragment (scFv) antibody used in cancer diagnosis and therapy. *Mol. Breeding* **6**, 345-352.

- 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. und Mundy, J.** (2000). *Arabidopsis* map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**, 1111-1120.
- Phillips, J., Artsaenko, O., Fiedler, U., Horstmann, C., Mock, H.P., Müntz, K. und Conrad, U.** (1997). Seed-specific immunomodulation of abscisic acid activity induces a developmental switch. *Embo J.* **16**, 4489-4496.
- Pieterse, C.M. und van Loon, L.C.** (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* **4**, 52-58.
- Pieterse, C.M., van Wees, S.C., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J. und van Loon, L.C.** (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1571-1580.
- Pieterse, C.M.J., Van Pelt, J.A., Van Wees, S.C.M., Ton, J., Léon-Kloosterziel, K.M., Keurentjes, J.J.B., Verhagen, B.W.M., Knoester, M., Van der Sluis, I., Bakker, P.A.H.M. und Van Loon, L.C.** (2001). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signalling and expression. *Eur. J. Plant Pathol.* **107**, 51-61.
- Quintanilla, P. und Brishammar, S.** (1998). Systemic induced resistance to late blight in potato by treatment with salicylic acid and *Phytophthora cryptogea*. *Potato Research* **41**, 135-142.
- Reimann, C., Hofmann, C., Mauch, F. und Dudler, R.** (1995). Characterization of a rice gene induced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: requirement for the bacterial *lemA* gene function. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **46**, 71-81.
- Reymond, P. und Farmer, E.E.** (1998). Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 404-411.
- Rohwer, F., Fritzemeier, K.H., Scheel, D. und Hahlbrock, K.** (1987). Biochemical reactions in different tissue of potato (*Solanum tuberosum*) to zoospores or elicitors from *Phytophthora infestans*. *Planta* **170**, 556-561.
- Rosahl, S.** (1996). Lipoxygenases in plants-their role in development and stress response. *Z. Naturforsch. [C]* **51**, 123-138.
- Royo, J., Vancanneyt, G., Perez, A.G., Sanz, C., Stormann, K., Rosahl, S. und Sánchez-Serrano, J.J.** (1996). Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. *J. Biol. Chem.* **271**, 21012-21019.
- Royo, J., Léon, J., Vancanneyt, G., Albar, J.P., Rosahl, S., Ortego, F., Castanera, P. und Sánchez-Serrano, J.J.** (1999). Antisense-mediated depletion of a potato lipoxygenase

reduces wound induction of proteinase inhibitors and increases weight gain of insect pests. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **96**, 1146-1151.

**Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y. und Hunt, M.D.** (1996). Systemic acquired resistance. Plant Cell **8**, 1809-1819.

**Ryan, C.A.** (1990). Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. **28**, 425-449.

**Ryan, C.A.** (2000). The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. Biochim. Biophys. Acta **1477**, 112-121.

**Ryan, C.A. und Balls, A.K.** (1962). An inhibitor of chymotrypsin from *Solanum tuberosum* and its behavior toward trypsin. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **48**, 1839-1844.

**Ryan, C.A. und Moura, D.S.** (2002). Systemic wound signaling in plants: a new perception. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **99**, 6519-6520.

**Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

**Sanders, P.M., Lee, P.Y., Biesgen, C., Boone, J.D., Beals, T.P., Weiler, E.W. und Goldberg, R.B.** (2000). The *Arabidopsis* DELAYED DEHISCENCE1 gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. Plant Cell **12**, 1041-1061.

**Schaffitzel, C., Hanes, J., Jermutus, L. und Plückthun, A.** (1999). Ribosome display: an in vitro method for selection and evolution of antibodies from libraries. J. Immunol. Methods **231**, 119-135.

**Scheer, J.M. und Ryan, C.A., Jr.** (2002). The systemin receptor SR160 from *Lycopersicon peruvianum* is a member of the LRR receptor kinase family. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **99**, 9585-9590.

**Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C. und Manners, J.M.** (2000). Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **97**, 11655-11660.

**Schier, R. und Marks, J.D.** (1996). Efficient in vitro affinity maturation of phage antibodies using BIAcore guided selections. Hum. Antibodies Hybridomas **7**, 97-105.

**Schillberg, S., Zimmermann, S., Zhang, M.Y. und Fischer, R.** (2001). Antibody-based resistance to plant pathogens. Transgenic Res. **10**, 1-12.

**Schneider, D.S.** (2002). Plant immunity and film Noir: what gumshoe detectives can teach us about plant-pathogen interactions. Cell **109**, 537-540.

**Schouten, A., Roosien, J., de Boer, J.M., Wilmink, A., Rosso, M.N., Bosch, D., Stiekema, W.J., Gommers, F.J., Bakker, J. und Schots, A.** (1997). Improving scFv antibody expression levels in the plant cytosol. FEBS Lett. **415**, 235-241.

- Schouten, A., Roosien, J., van Engelen, F.A., de Jong, G.A., Borst-Vrenszen, A.W., Zilverentant, J.F., Bosch, D., Stiekema, W.J., Gommers, F.J., Schots, A. und Bakker, J.** (1996). The C-terminal KDEL sequence increases the expression level of a single-chain antibody designed to be targeted to both the cytosol and the secretory pathway in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* **30**, 781-793.
- Seo, H.S., Song, J.T., Cheong, J.J., Lee, Y.H., Lee, Y.W., Hwang, I., Lee, J.S. und Choi, Y.D.** (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**, 4788-4793.
- Shah, J.** (2003). The salicylic acid loop in plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 365-371.
- Shah, J., Tsui, F. und Klessig, D.F.** (1997). Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (*sail*) 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. und 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.
- Shah, J., Kachroo, P., Nandi, A. und Klessig, D.F.** (2001). A recessive mutation in the *Arabidopsis* SSI2 gene confers SA- and NPR1-independent expression of PR genes and resistance against bacterial and oomycete pathogens. *Plant J.* **25**, 563-574.
- Sheets, M.D., Amersdorfer, P., Finnern, R., Sargent, P., Lindquist, E., Schier, R., Hemingsen, G., Wong, C., Gerhart, J.C., Marks, J.D. und Lindqvist, E.** (1998). Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**, 6157-6162.
- Shimada, N., Suzuki, Y., Nakajima, M., Conrad, U., Murofushi, N. und Yamaguchi, I.** (1999). Expression of a functional single-chain antibody against GA24/19 in transgenic tobacco. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**, 779-783.
- Shirano, Y., Kachroo, P., Shah, J. und Klessig, D.F.** (2002). A gain-of-function mutation in an *Arabidopsis* toll interleukin1 receptor-nucleotide binding site-leucine-rich repeat type R gene triggers defense responses and results in enhanced disease resistance. *Plant Cell* **14**, 3149-3162
- Slaymaker, D.H., Navarre, D.A., Clark, D., del Pozo, O., Martin, G.B. und Klessig, D.F.** (2002). The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**, 11640-11645.
- Smith, J. und Métraux, J.P.** (1991). *Pseudomonas syringae* induces systemic resistance to *Pyricularia oryzae* in rice. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **39**, 451-461.

- Spoel, S.H., Koornneef, A., Claessens, S.M., Korzelius, J.P., Van Pelt, J.A., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Métraux, J.P., Brown, R., Kazan, K., Van Loon, L.C., Dong, X. und Pieterse, C.M.** (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* **15**, 760-770.
- Staswick, P.E., Su, W. und Howell, S.H.** (1992). Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89**, 6837-6840.
- Staswick, P.E., Tiriyaki, I. und Rowe, M.L.** (2002). Jasmonate response locus JAR1 and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *Plant Cell* **14**, 1405-1415.
- Steffen, W. und Linck, R.W.** (1989). Multiple immunoblot: a sensitive technique to stain proteins and detect multiple antigens on a single two-dimensional replica. *Electrophoresis* **10**, 714-718.
- Steipe, B., Schiller, B., Plückthun, A. und Steinbacher, S.** (1994). Sequence statistics reliably predict stabilizing mutations in a protein domain. *J. Mol. Biol.* **240**, 188-192.
- Stelmach, B.A., Müller, A., Hennig, P., Gebhardt, S., Schubert-Zsilavec, M. und Weiler, E.W.** (2001). A novel class of oxylipins, sn1-O-(12-oxophytodienoyl)-sn2-O-(hexadecatrienoyl)-monogalactosyl Diglyceride, from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **276**, 12832-12838.
- Stenzel, I., Hause, B., Maucher, H., Pitzschke, A., Miersch, O., Ziegler, J., Ryan, C.A. und Wasternack, C.** (2003a). Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle-specific generation of jasmonates in tomato - amplification in wound signalling. *Plant J.* **33**, 577-589.
- Stenzel, I., Hause, B., Miersch, O., Kurz, T., Maucher, H., Weichert, H., Ziegler, J., Feussner, I. und Wasternack, C.** (2003b). Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **51**, 895-911.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B. und Métraux, J.P.** (1997). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Plant Pathol.* **35**, 253-270.
- Stintzi, A. und Browse, J.** (2000). The *Arabidopsis* male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**, 10625-10630.
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J. und Farmer, E.E.** (2001). Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**, 12837-12842.

- Strömberg, A. und 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**, 219-225.
- Strömberg, A. und Brishammar, S.** (1993). A histological evaluation of induced resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in potato leaves. *J. Phytopathology* **137**, 15-25.
- Suh, M.C., Yi, S.Y., Lee, S., Sim, W.S., Pai, H.S. und Choi, D.** (2001). Pathogen-induced expression of plant ATP: citrate lyase. *FEBS Lett.* **488**, 211-212.
- Takken, F.L.W. und Joosten, M.H.A.J.** (2000). Plant resistance genes: their structure, function and evolution. *Eur. J. Plant Pathol.* **106**, 699-713.
- Tavladoraki, P., Benvenuto, E., Trinca, S., De Martinis, D., Cattaneo, A. und Galeffi, P.** (1993). Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. *Nature* **366**, 469-472.
- ten Hoopen, P.** (2002). Immunomodulation of jasmonate function. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Thomma, B.P., Eggermont, K., Penninckx, I., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P.A. und 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**, 15107-15111.
- Thomma, B.P., Eggermont, K., Tierens, K.F. und Broekaert, W.F.** (1999). Requirement of functional ethylene-insensitive 2 gene for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* **121**, 1093-1102.
- Thomma, B.P., Penninckx, I.A., Broekaert, W.F. und Cammue, B.P.** (2001). The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 63-68.
- Ton, J., Davison, S., Van Wees, S.C., Van Loon, L. und Pieterse, C.M.** (2001). The *Arabidopsis* ISR1 locus controlling rhizobacteria-mediated induced systemic resistance is involved in ethylene signaling. *Plant Physiol.* **125**, 652-661.
- Turner, J.G., Ellis, C. und Devoto, A.** (2002). The jasmonate signal pathway. *Plant Cell* **14 Suppl**, S153-164.
- Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E. und Ryals, J.** (1992). Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **4**, 645-656.
- Underhill, D.M. und Ozinsky, A.** (2002). Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 825-852.

- van der Biezen, E.A. und Jones, J.D.G.** (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 454-456.
- van Loon, L.C.** (1997). Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *Eur. J. Plant Pathol.* **103**, 753-766.
- van 't Hof, R. und de Kruijff, B.** (1995). Characterization of the import process of a transit peptide into chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **270**, 22368-22373.
- van Wees, S.C. und Glazebrook, J.** (2003). Loss of non-host resistance of *Arabidopsis NahG* to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* is due to degradation products of salicylic acid. *Plant J.* **33**, 733-742.
- VanderVere, P.S., Bennett, T.M., Oblong, J.E. und Lamppa, G.K.** (1995). A chloroplast processing enzyme involved in precursor maturation shares a zinc-binding motif with a recently recognized family of metalloendopeptidases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**, 7177-7181.
- van't Slot, K.A.E. und Knogge, W.** (2002). A dual role for microbial pathogen-derived effector proteins in plant disease and resistance. *Crit. Rev. Plant Sci.* **21**, 229-271.
- Vaughan, T.J., Williams, A.J., Pritchard, K., Osbourn, J.K., Pope, A.R., Earnshaw, J.C., McCafferty, J., Hodits, R.A., Wilton, J. und Johnson, K.S.** (1996). Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat. Biotechnol* **14**, 309-314.
- Vernooij, B., Friedrich, L., Ahl Goy, P., Staub, T., Kessmann, H. und Ryals, J.** (1995). 2,6-dichloroisonicotinic acid-induced resistance to pathogens without the accumulation of salicylic acid. *Mol. Plant Microbe Interact.* **8**: 228-234
- Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz-Jawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessmann, H. und Ryals, J.** (1994). Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell* **6**, 959-965.
- Vidal, S., Ponce de León, I., Denecke, J. und Palva, E.T.** (1997). Salicylic acid and the plant pathogen *Erwinia carotovora* induce defense genes via antagonistic pathways. *Plant J.* **11**, 115-124.
- von Malek, B., van der Graaff, E., Schneitz, K. und Keller, B.** (2002). The *Arabidopsis* male-sterile mutant *dde2-2* is defective in the ALLENE OXIDE SYNTHASE gene encoding one of the key enzymes of the jasmonic acid biosynthesis pathway. *Planta* **216**, 187-192.
- Voss, A., Niersbach, M., Hain, R., Hirsch, H., Liao, Y., Kreuzaler, F. und Fischer, R.** (1995). Reduced virus infectivity in *N. tabacum* secreting a TMV-specific full size antibody. *Mol. Breeding* **1**, 39-50.



- Waegemann, K. und Soll, J.** (1996). Phosphorylation of the transit sequence of chloroplast precursor proteins. *J. Biol. Chem.* **271**, 6545-6554.
- Wang, C., Avdiushko, S. und Hildebrand, D.F.** (1999). Overexpression of a cytoplasmalocalized allene oxide synthase promotes the wound-induced accumulation of jasmonic acid in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* **40**, 783-793.
- Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Ahl-Goy, P., Métraux, J.P. und Ryals, J.A.** (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* **3**, 1085-1094.
- Wasternack, C. und Parthier, B.** (1997). Jasmonate-signaled plant gene expression. *Trends Plant Sci.* **2**, 302-307.
- Wasternack, C. und Hause, B.** (2002). Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **72**, 165-221.
- Weber, H.** (2002). Fatty acid-derived signals in plants. *Trends Plant Sci.* **7**, 217-224.
- Weber, H., Chetelat, A., Caldelari, D. und Farmer, E.E.** (1999). Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves. *Plant Cell* **11**, 485-494.
- Weisshaar, B. und Jenkins, G.I.** (1998). Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 251-257.
- Wendehenne, D., Pugin, A., Klessig, D.F. und Durner, J.** (2001). Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci.* **6**, 177-183.
- Wigger, J., Phillips, J., Peisker, M., Hartung, W., zur Nieden, U., Artsaenko, O., Fiedler, U. und Conrad, U.** (2002). Prevention of stomatal closure by immunomodulation of endogenous abscisic acid and its reversion by abscisic acid treatment: physiological behaviour and morphological features of tobacco stomata. *Planta* **215**, 413-423.
- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G. und Ausubel, F.M.** (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**, 562-565.
- Winter, G. und Milstein, C.** (1991). Man-made antibodies. *Nature* **349**, 293-299.
- Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E. und Hoogenboom, H.R.** (1994). Making antibodies by phage display technology. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 433-455.
- Winzeler, E.A., Schena, M. und Davis, R.W.** (1999). Fluorescence-based expression monitoring using microarrays. *Methods Enzymol.* **306**, 3-18.
- Xie, D.X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M. und Turner, J.G.** (1998). *COII*: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* **280**, 1091-1094.

- Xu, L., Liu, F., Wang, Z., Peng, W., Huang, R., Huang, D. und Xie, D.** (2001). An *Arabidopsis* mutant *cex1* exhibits constant accumulation of jasmonate-regulated *AtVSP*, *Thi2.1* and *PDF1.2*. *FEBS Lett.* **494**, 161-164.
- Yamamoto, S., Katagiri, M., Maeno, H. und Hayaishi, O.** (1965). Salicylate hydroxylase, a monooxygenase requiring flavin adenine dinucleotide. *J. Biol. Chem.* **240**, 3408-3413.
- Yang, Y., Shah, J. und Klessig, D.F.** (1997). Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.* **11**, 1621-1639.
- Yu, D., Liu, Y., Fan, B., Klessig, D.F. und Chen, Z.** (1997). Is the high basal level of salicylic acid important for disease resistance in potato? *Plant Physiol.* **115**, 343-349.
- Zhang, Y. L., Fan, W.H., Kinkema, M., Li, X. und Dong, X.** (1999). Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 6523-6528.
- Zhang, S. und Klessig, D.F.** (2001). MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci.* **6**, 520-527.
- Zhou, J.M., Trifa, Y., Silva, H., Pontier, D., Lam, E., Shah, J. und Klessig, D.F.** (2000). NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the *PR-1* gene required for induction by salicylic acid. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**, 191-202.
- Ziegler, A. und Torrance, L.** (2002). Applications of recombinant antibodies in plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* **3**, 401-407.
- Ziegler, J., Stenzel, I., Hause, B., Maucher, H., Hamberg, M., Grimm, R., Ganal, M. und Wasternack, C.** (2000). Molecular cloning of allene oxide cyclase. The enzyme establishing the stereochemistry of octadecanoids and jasmonates. *J. Biol. Chem.* **275**, 19132-19138.
- Zimmermann, S., Schillberg, S., Liao, Y.C. und Fischer, R.** (1998). Intracellular expression of TMV-specific single-chain Fv fragments leads to improved virus resistance in *Nicotiana tabacum*. *Mol. Breeding* **4**, 369-379.
- Zimmermann, S., Nürnberger, T., Frachisse, J.M., Wirtz, W., Guern, J., Hedrich, R. und Scheel, D.** (1997). Receptor-mediated activation of a plant  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**, 2751-2755.
- Zoubenko, O., Uckun, F., Hur, Y., Chet, I. und Tumer, N.** (1997). Plant resistance to fungal infection induced by nontoxic pokeweed antiviral protein mutants. *Nat. Biotechnol.* **15**, 992-996.

**Anhang 1: Phagen-ELISA**

Alle Extinktionsangaben stellen die Differenz der Bindung an das JA/OPDA-BSA-Konjugat und BSA dar.

**(a) Bibliothek A**

JA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	0	0,005	0,001	0,052	0,101	0,007	0,117	0,003	0,005	0,102	0	0
<b>B</b>	0,005	0,003	<b>0,164</b>	0,097	0,005	0,022	<b>0,196</b>	0,006	0,002	0	<b>0,151</b>	-0,065
<b>C</b>	0,008	0,002	0,005	0,004	0,07	0,003	0	-0,014	0,045	0,005	0	-0,028
<b>D</b>	0	0,005	0,022	0,113	0	0,002	0	0	0,008	0,142	0,121	-0,068
<b>E</b>	0,107	0,002	0,072	0,107	0,012	0,002	0,007	0,02	0,002	0,034	0,012	0,133
<b>F</b>	0,012	-0,013	<b>0,202</b>	<b>0,181</b>	0,003	0,088	<b>0,15</b>	0,006	0,064	0,036	<b>0,164</b>	0,079
<b>G</b>	0,134	0,017	<b>0,222</b>	0,121	0,007	0	<b>0,177</b>	0,035	0,011	0,026	0	0
<b>H</b>	0,013	0,098	0,043	0,095	<b>0,174</b>	0,011	0,041	0,003	0,006	0,003	0,119	0,108

OPDA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	0,06	<b>0,187</b>	0,135	0,139	<b>0,158</b>	0,092	0,106	0,147	0,003	0,002	0,087	0,086
<b>B</b>	<b>0,208</b>	<b>0,2</b>	0,005	0,007	0,007	0,042	0,103	0,133	0,006	0,02	0,123	0,112
<b>C</b>	<b>0,23</b>	<b>0,23</b>	<b>0,216</b>	0,064	<b>0,482</b>	0,072	0,144	0,029	-0,013	-0,005	0,068	-0,072
<b>D</b>	0,075	<b>0,23</b>	0,138	<b>0,162</b>	0,17	<b>0,18</b>	0,127	0,029	0,074	-0,004	0,143	0,028
<b>E</b>	<b>0,173</b>	0,019	0,135	<b>0,189</b>	0,145	<b>0,192</b>	0,072	0,028	<b>0,156</b>	<b>0,288</b>	0,144	<b>0,161</b>
<b>F</b>	<b>0,182</b>	0,111	0,143	<b>0,196</b>	<b>0,168</b>	0,132	0,143	0,005	0,005	<b>0,153</b>	0,05	0,14
<b>G</b>	0,117	0	0,17	<b>0,163</b>	0,132	0,123	0,003	0,002	<b>0,183</b>	0,063	<b>0,211</b>	0,01
<b>H</b>	0,122	-0,022	0,136	0,035	0,093	0,047	0,012	0,134	0,035	0,129	0,091	0,075

**(b) Bibliothek B**

JA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	0,011	<b>0,21</b>	0,014	0,022	<b>0,27</b>	<b>0,267</b>	<b>0,255</b>	<b>0,263</b>	0,01	0,015	<b>0,219</b>	0,017
<b>B</b>	0,019	<b>0,159</b>	0,016	<b>0,218</b>	0,072	0,05	0,118	0,007	0,018	0,004	<b>0,24</b>	0,005
<b>C</b>	0	0,017	<b>0,229</b>	<b>0,234</b>	0,006	0,005	<b>0,202</b>	<b>0,234</b>	<b>0,208</b>	<b>0,163</b>	0,138	0,034
<b>D</b>	<b>0,239</b>	0,011	0,008	0,014	0,01	<b>0,217</b>	<b>0,194</b>	<b>0,247</b>	0,003	0,003	0,001	0,057
<b>E</b>	<b>0,174</b>	0,082	<b>0,213</b>	0,01	0,046	0,017	0,006	<b>0,183</b>	0,008	<b>0,232</b>	0,058	<b>0,241</b>
<b>F</b>	0,008	0,017	0,022	<b>0,157</b>	<b>0,267</b>	<b>0,209</b>	<b>0,163</b>	0,007	0,022	0,022	0,001	0
<b>G</b>	0,009	<b>0,164</b>	0,033	<b>0,241</b>	<b>0,229</b>	0,011	0,007	<b>0,223</b>	<b>0,227</b>	0,001	0,006	0
<b>H</b>	<b>0,223</b>	0,049	<b>0,214</b>	<b>0,244</b>	0,039	<b>0,178</b>	0,022	0,136	0,041	<b>0,227</b>	0,018	0,015

OPDA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,031	0,014	0,027	0,005	0,156	0,19	0,042	0,152	0,039	0,117	0	0,125
B	0	0,006	0,01	0,063	0,329	0,004	0,042	0,157	0,205	0,059	0,042	0,011
C	0,008	0,019	0,068	0,111	0,147	0,174	0,103	0,018	0,018	0,116	0,059	0,18
D	0,127	-0,032	0,028	0,095	0,017	0	-0,01	0,179	0,03	0	0	0,004
E	0,058	0,102	0,019	-0,03	0	0,147	-0,03	0,01	0,139	0,051	0,118	0,138
F	0,025	0,165	0,015	0,083	0,003	-0,03	0,006	0,754	0,026	0,026	0,174	0
G	0,006	0,129	0,176	0,099	0,112	-0,02	0,208	0	0,125	0,086	0,058	0,034
H	0,152	0,026	0,193	0,159	0,201	0,141	0,137	0,057	0,005	0,23	0,053	0,047

## Anhang 2: ELISA mit bakteriellen, löslichen *scFv*-Antikörpern

### (a) Bibliothek A

OPDA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,063	0,132	0,191	0,205	0,201	0,484	0,236	0,219	0,01	0,018	0,365	0,027
B	0,1	0,088	0,028	0,03	0,03	0,18	0,193	0,541	0,018	0,218	0,128	0,145
C	0,135	0,219	0,184	0,018	0,166	0,376	0,233	0,027	0,032	0	0,267	0,02
D	0,252	0,182	0,292	0,152	0,183	0,195	0,196	0,027	0,029	0,028	0,175	0,387
E	0,134	0,028	0,025	0,171	0,189	0,167	0,034	0,046	0,124	0,295	0,048	0,208
F	0,204	0,186	0,04	0,162	0,21	0,06	0,203	0,034	0,055	0,194	0,309	0,187
G	0,16	0,257	0,028	0,146	0,069	0,069	0,04	0,044	0,159	0,044	0,19	0,028
H	0,202	0,079	0,297	0,089	0,05	0,029	0,066	0,112	0,016	0,204	0,151	0,066

### (b) Bibliothek B

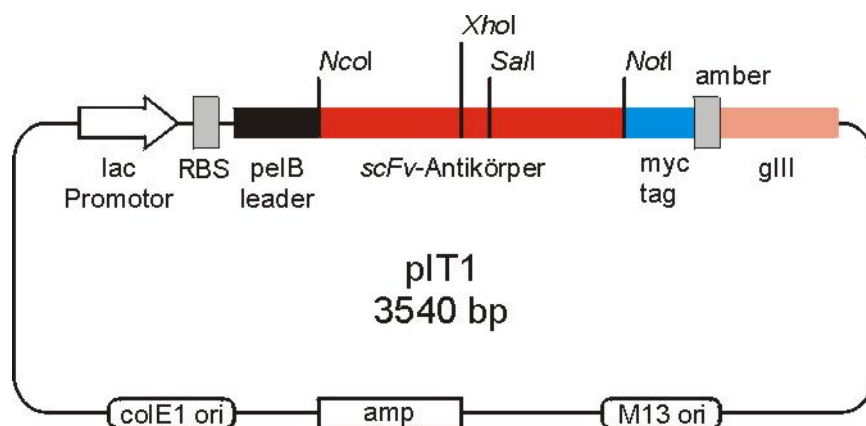
JA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,005	0,133	0,008	0,026	0,028	0,081	0,077	-0,02	0,079	0,044	0,032	0,026
B	0,053	0,113	0,14	0,063	0,024	0,069	0,221	0,018	0,091	0,037	0,748	0,049
C	0,096	0,226	0,438	0,81	0,038	0,062	0,108	0,612	0,622	0,528	0,385	0,046
D	0,128	0,16	0,113	0,105	0,077	0,082	0,163	0,044	0,088	0,079	0,067	0,104
E	0,012	0,156	0,13	0,017	0,074	0,1	0,111	0,112	0,105	0,332	0,057	0,539
F	0,056	0,049	0,047	0,138	0,285	1,123	0,437	0,056	0,102	0,003	0,002	0,095
G	0,004	0,019	0,002	0,356	0,031	0,08	0,156	0,038	0,13	0,024	0,026	0,076
H	0,126	-0,035	0,107	0,028	0,026	0,088	0,1	0,031	0,107	0,096	0,063	0,071

OPDA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,011	0,01	0,01	0	0,174	0,019	0,004	0,011	0	0,006	0,005	0,09
B	0	0,024	0,016	0,016	0,092	0,032	0,024	0	0,022	0,396	0,019	0
C	0	0,074	0,068	0,047	0,035	0,033	0,043	0,012	0,018	0,058	0,038	0,118
D	0,219	0,099	0,032	0,012	0,012	0,026	0,022	0,134	0,014	0,048	0,023	0,042
E	0,062	0,442	0,084	0,017	0,016	0,201	0,019	0	0,183	0,007	0,004	0,04
F	0,054	0,515	0,056	0,042	0,042	0,028	0,033	0,023	0,019	0,021	0,077	0,017
G	0,056	0,06	0,06	0,192	0,085	0,043	0,083	0,044	0	0,056	0,029	0,008
H	0,337	0,061	0,419	0,074	0,151	0,402	0,045	0,012	0	0,234	0,007	0,019

\*Klone, die nicht mit in die Arbeit einbezogen wurden, da deren Bindung an BSA im Vergleich mit anderen *scFv*-Klonen relativ hoch war

\*Ausgewählte Klone

### Anhang 3: pIT1-Vektorkarte



---

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Diese Dissertation wurde an keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung eingereicht.

Halle (Saale), Juni 2004

Astrid Veß

---

## Lebenslauf

Name Astrid Veß  
Geburtsdatum 03.04.1975  
Geburtsort Halle (Saale)  
Familienstand verheiratet, ein Kind

## Schulbildung

09/1981-08/1990 Besuch der Polytechnischen Oberschule in Halle (Saale)  
09/1990-08/1993 Besuch des Albert-Schweitzer-Gymnasiums in Halle (Saale) - Abitur

## Studium

10/1993-08/1998 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg  
Abschlüsse: Vordiplom 1995  
Diplom 1998  
  
Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Titel: Überexpression und Reinigung von CzcB und CzcS aus *Alcaligenes eutrophus*  
Betreuer: Prof. Dr. D. H. Nies

## Beruf

11/1998-06/2002 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pflanzenbiochemie in Halle (Saale) im Rahmen des DFG-Schwerpunktprogramms „Molekulare Analyse der Phytohormonwirkung“  
Betreuer: Prof. Dr. D. Scheel, Dr. S. Rosahl  
07/2002-08/2003 Mutterschutz und Erziehungsjahr  
09/2003-06/2004 Beendigung der Doktorarbeit  
01/2004-09/2004 Teilnahme am Projekt zur beruflichen Eingliederung von Frauen mit naturwissenschaftlich-technischen Studienabschlüssen „be.it-be.Ing.“ (Bildungsträger: BBI-Bildungs- und Beratungsinstitut GmbH Halle, Ankerstraße 2, 06108 Halle)  
Seit 10/2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Nachwuchsforschergruppe für Allergologie und Pulmonologie unter der Leitung von Prof. Dr. med.

---

Gesine Hansen im Zentrum für Kinderheilkunde an der  
Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder und Jugendmedizin der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



---

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die die Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dierk Scheel für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe arbeiten zu dürfen, für seine konstruktive Kritik, die Möglichkeit an Konferenzen teilnehmen zu können und vor allem für sein stets offenes Ohr.

Frau Dr. Sabine Rosahl danke ich für Ihre freundschaftliche Unterstützung während meiner gesamten Doktorandenzeit vor allem in der „heißen“ Endphase und als die Infiltrationsexperimente mal wieder ohne Ende schienen.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Dr. Peter Landgraf bedanken, der mir den Anfang am Institut für Pflanzenbiochemie sehr leicht gemacht hat und mir stets mit Rat und Tat in vielen Belangen zur Seite stand.

Diese Arbeit war nur möglich durch eine sehr gute und konstruktive Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Udo Conrad (IPK, Gatersleben). Deshalb gilt mein besonderer Dank vor allem Dr. Udo Conrad für die Möglichkeit, sein *Know-how* bezüglich dem *Screening* der *Phage Display* Bibliotheken uneingeschränkt nutzen zu können. Zusammen mit Frau Dr. Petra ten Hoopen, Frau Isolde Tillack und Frau Dr. Gudrun Mönke waren die kleineren und größeren Probleme rasch behoben. Vielen Dank für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre. Ich habe mich dort sehr wohl gefühlt.

Herrn Dr. Robert Kramell gilt mein besonderer Dank für die Herstellung der JA/OPDA-BSA-Konjugate.

Für die durchgeführten Immunolokalisationen der *scFv*-Antikörper *in planta* danke ich Frau Dr. Bettina Hause und Frau Dr. Uta zur Nieden.

Oft sind es die kleinen Tipps und Tricks, die über das Gelingen einer Arbeit entscheiden. Deshalb möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Stress- und Entwicklungsbiologie für das sehr angenehme Arbeitsklima bedanken, insbesondere bei Conny, Julia, Annette, Bettina, Cathi, Edda, Frédéric, Guido, Ingo, Justin, Magda, Norbert, Thorsten, Trixi und Udo.

Hervorheben möchte ich in diesem Zusammenhang Frau Angelika Weinel, die nie vor meinem „süßen Brei“ kapituliert und tapfer alle Pflänzchen durch die Jahre gebracht hat. Für Ihr Engagement bezüglich meiner Arbeit und den täglich anfallenden Laborarbeiten („Huppertuttel“) gebührt Ihr mein vollster Respekt und meine Dankbarkeit.

Zu guter Letzt haben meine Eltern und Christoph den größten Anteil daran, dass ich es bis hierher geschafft habe. Sie haben mich immer unterstützt und mir die Kraft gegeben weiterzumachen. Danke!