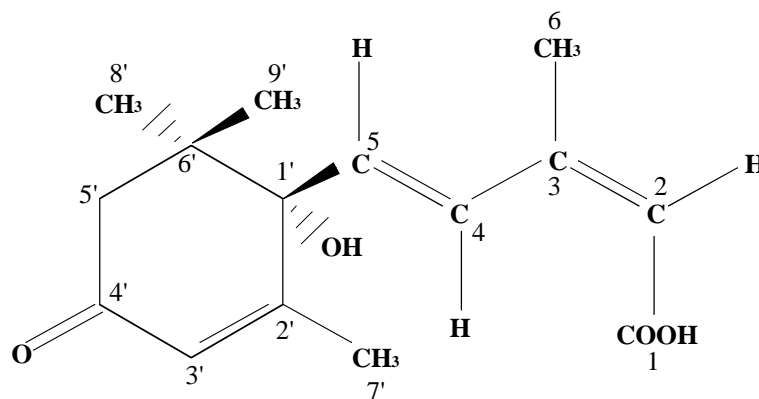


## 1. Einleitung

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

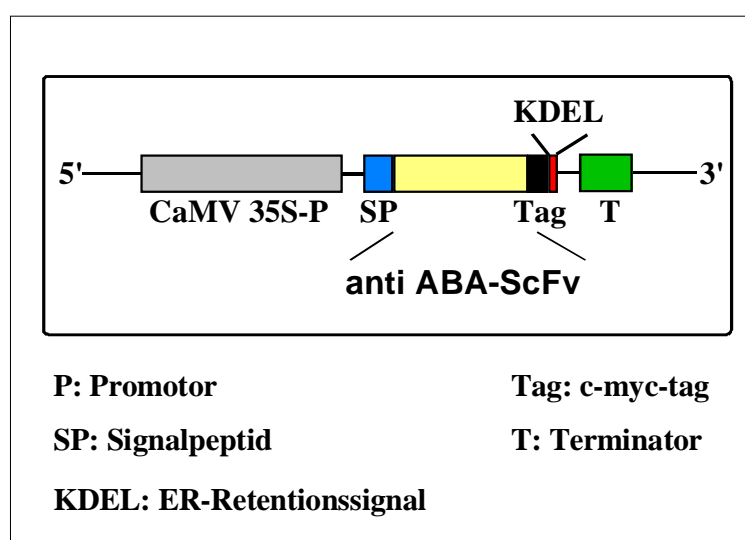
### **1.3 Immunmodulation der Abscisinsäureaktivität in transgenen Tabakpflanzen**

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

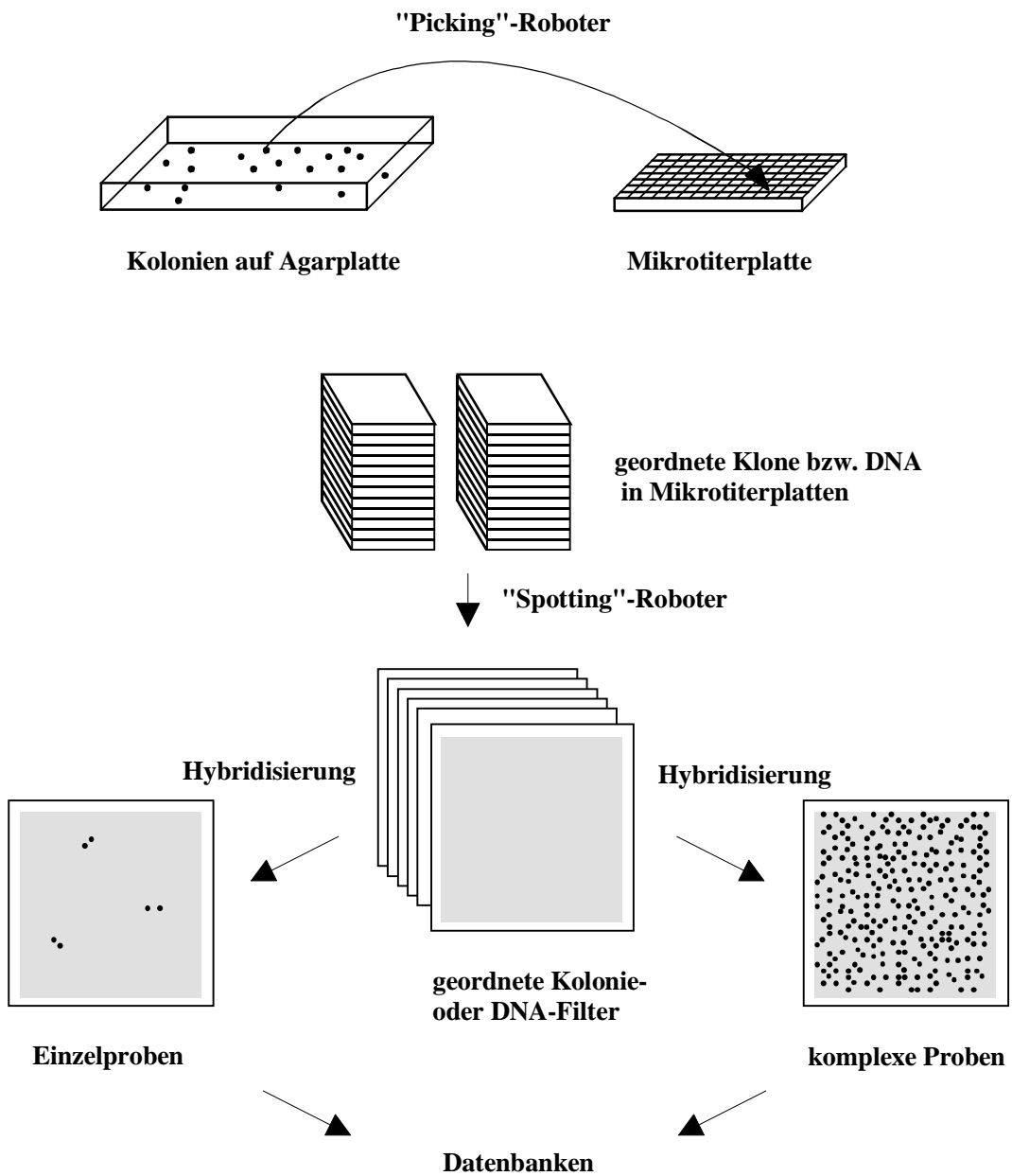
### "Macro-Arraying"

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

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

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

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



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

### "Micro-Arraying"

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

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

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

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

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

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

## 1.5 Zielstellung der Arbeit

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

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

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