

5. Diskussion

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

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

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

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

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

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

Die Akkumulation des spezifischen anti-ABA scFv-Proteins in hohen Konzentrationen im ER der Zellen transgener Pflanzen führte zur Ausbildung eines welkenden Phänotyps (Artsaenko et al., 1995), der umfassend physiologisch charakterisiert wurde. Eine typische Eigenschaft ist die im Vergleich zum Wildtyp höhere stomatäre Leitfähigkeit (Artsaenko et al., 1995; Artsaenko et al., 1999; Tab.2 und 4), die nicht mehr von der Kohlendioxidkonzentration (Artsaenko et al., 1995; Abb.4 A) und der Lichtintensität (Abb.4 B) abhängig ist. Aufgrund eines morphologischen Defektes der Schließzellen (Abb.22 A) sind die transgenen Pflanzen nicht mehr in der Lage, ihre Spaltöffnungen zu schließen. Der Stomataschluß kann weder durch eine kurzfristige ABA-Gabe (Abb.6 A) noch durch hohe CO₂-Konzentrationen (Abb.4 A) oder Verdunkelung (Abb. 4 B) induziert werden.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Kompartimentspezifität

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

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

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

ABA-Synthese und -Metabolismus

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

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

Kurzzeit- und Langzeitbehandlungsexperiment

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

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

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

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

Signaltransduktion in Schließzellen

Spaltöffnungsbewegungen werden als Antwort auf verschiedene Umweltsignale durch Turgoränderungen, ausgelöst durch Ionenflüsse in den Membranen von Schließzellen, hervorgerufen. Abscisinsäure, hohe Kohlendioxidkonzentrationen und Verdunkelung gehören zu den Signalen, die den Stomataschluß induzieren können. In den anti-ABA immunmodulierten Pflanzen kann das Schließen der Spaltöffnungen jedoch weder durch die kurzfristige Gabe von ABA über die Blattstiele (Abb.6 A), noch durch erhöhte CO_2 -Konzentrationen oder Verdunkelung ausgelöst werden (Abb.4 A und B).

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

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

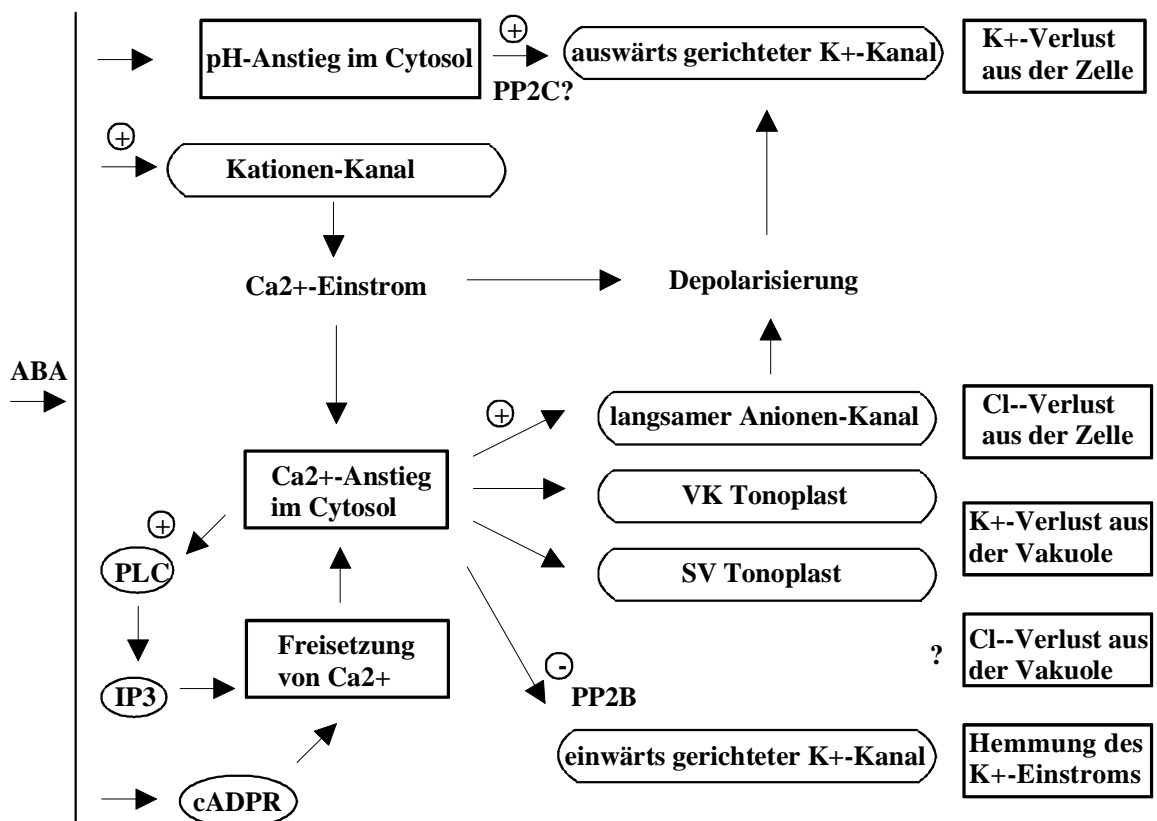


Abb.23: Vermutete Wege der ABA-Signaltransduktion, die zum Stomatenschluß beitragen. PP2B bzw. PP2C: Proteinphosphatase 2B bzw. 2C, PLC: Phospholipase C, IP_3 : Inositol-1,4,5-Triphosphat, cADPR: zyklische ADP-Ribose, VK: spannungsunabhängiger K^+ -Kanal, SK: langsamer Anionenkanal (nach MacRobbie, 1998).

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

Über den Prozeß des Stomataschlusses durch hohe Kohlendioxidkonzentrationen ist bisher noch wenig bekannt. Hohe CO₂-Konzentrationen induzieren ebenfalls die Steigerung der cytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration. Die Effekte auf die Kalium- und Anionenkanäle sind ähnlich wie bei ABA, jedoch nicht identisch. Es ist keine Änderung des cytoplasmatischen pH-Wertes zu beobachten (Übersicht bei MacRobbie, 1998).

Die Effekte von ABA auf die Genexpression speziell in Schließzellen wurden bisher kaum untersucht. Schließzellen sind in der Lage, ein ABA-Signal von seinem Wahrnehmungsort in den Zellkern zu übertragen (Taylor et al., 1995) und somit eine Änderung des Transkriptionsprogrammes auszulösen. Erste Untersuchungen wurden durchgeführt um zu analysieren, ob identische oder unterschiedliche Signaltransduktionsketten die ABA-Regulation der Ionenkanäle und der Genexpression in Schließzellen vermitteln (Hey et al., 1997). Der Übertragungsweg des ABA-Signals ist jedoch noch weitgehend unbekannt, es wird eine Beteiligung von Proteinkinasen und -phosphatasen (Hey et al., 1997), cADPR (Wu et al., 1997) sowie Ca²⁺-Ionen und Calmodulin vermutet (Übersicht bei McAinsh et al., 1997).

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

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

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

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

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

An dieser Stelle ist anzumerken, daß bei Wildtyppflanzen sowohl in den physiologischen Untersuchungen der Transpirationsrate und deren Abhängigkeit von der CO₂-Konzentration und der Lichtintensität (Abb.4; Tab.4), als auch morphologisch kein Einfluß durch die Langzeit-ABA-Gabe zu erkennen war.

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

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

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

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

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

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

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

5.6 Abscisinsäure ist für die Entwicklung funktionsfähiger Schließzellen notwendig

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

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

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

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

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

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

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

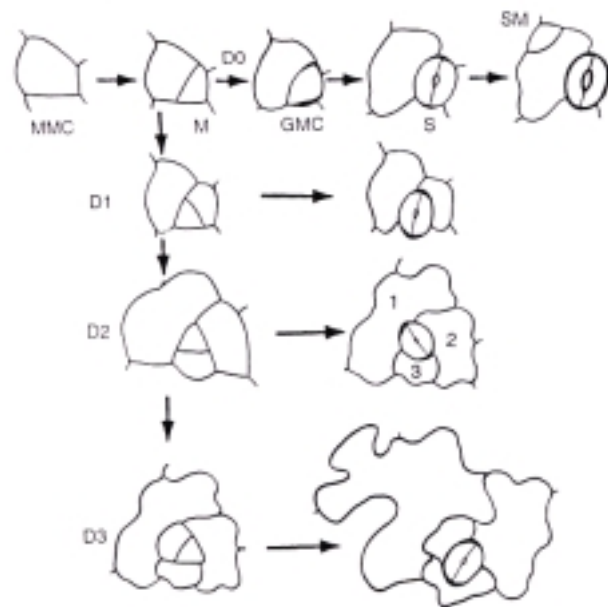


Abb.24: Die Entwicklung des stomatären Komplexes in Blättern von *Arabidopsis* (Zhao und Sack, 1999).

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

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

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

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

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

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

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

6. Zusammenfassung

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

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