

**Molekulare Charakterisierung  
der Reaktion von *Lycopersicon esculentum*  
auf den phanerogamen Parasiten *Cuscuta reflexa***

Dissertation zur Erlangung des  
Naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Monika Werner  
aus  
Neustrelitz

Würzburg, 2000

Eingereicht am: 19. Oktober 2000

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. W. Goebel

Gutachter: Prof. Dr. R. Kaldenhoff

Gutachter: Prof. Dr. P. Proksch

Tag des Promotionskolloquiums: 31. Januar 2001

Doktorurkunde ausgehändigt am:

## **DANKSAGUNG**

Mein Dank gilt all denjenigen, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. P. Proksch für die Vergabe des interessanten Themas und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn Prof. Dr. R. Kaldenhoff, der mir die Möglichkeit gab, in seiner Arbeitsgruppe das molekularbiologische Handwerk zu erlernen, für seine Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. F.-C. Czygan für sein Interesse an meiner Arbeit und seine Gesprächsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. S. Fry (University of Edinburgh, UK) für die Bereitstellung des Enzymassays.

Herrn Prof. Dr. C. A. Ryan (Washington State University, Pullman, USA) für die Überlassung von Plasmiden und Saatgut.

Dem Tomato Genetics Resource Center (Davis, CA, USA) für die Überlassung von Saatgut.

Norbert Uehlein für die Untersuchungen an den Aquaporinen und seinen Humor.

Susanne Michel für die zahlreichen Sequenzierungen.

Den Gärtnern für die Aufzucht und Pflege der Pflanzen.

Der Deutschen Forschungsgesellschaft für die Gewährung eines Promotionsstipendiums.

Der gesamten Arbeitsgruppe Kaldenhoff, die für jedes Problem offene Ohren hatte und das Arbeiten im Labor zum Vergnügen machte. Vor allem Beate Otto für ihre wertvollen Tips zu sämtlichen Proteinfragen, Franka Siefritz für ihre Geduld bei meinen Versuchen der Tabaktransformation und Martina Wein für ihren Humor und ihre ermunternden Worte bei den vielfältigen Problemen der Proteinexpression. Ebenso Martin Eckert und Alexander Biela, die mich in die Geheimnisse der Molekularbiologie einweihten.

Den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie für ihr entgegengebrachtes Interesse und ihre Kommunikationsbereitschaft. Besonders Frau Dr. Christiane Löffler für ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft in sämtlichen Parasitenfragen.

Den Arbeitsgruppen des Lehrstuhls Botanik I für den wissenschaftlichen Gedankenaustausch.

Ganz besonders meinen Eltern, die durch ihre Hilfe diese Arbeit erst ermöglicht haben.

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Parasitische Blütenpflanzen	1
1.2	<i>Cuscuta</i>	2
1.3	Entstehung einer Funktionsfähigen Wirt-Parasit-Beziehung	4
1.4	Inkompatible Wirt- <i>Cuscuta</i> -Interaktionen	5
1.5	Molekulare Mechanismen der Resistenz	8
1.6	Struktur der Zellwand & Mechanismen der Zellexpansion	10
1.7	Inhalt der vorliegenden Arbeit	13
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>14</b>
2.1	Pflanzenmaterial, Anzucht und Probennahme	14
2.2	Verfahren mit Ribonukleinsäuren (RNA)	15
2.3	Verfahren mit Desoxyribonukleinsäuren	20
2.4	Klonierung von cDNA	23
2.5	Sequenzierung	26
2.6	Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren	26
2.7	Hybridisierung von Nukleinsäuren	29
2.8	Suppressive Subtraktionshybridisierung	29
2.9	„RACE“-PCR	35
2.10	Heterologe Proteinexpression in <i>Escherichia coli</i>	39
2.11	Analyse von Proteinen	42
2.12	Bestimmung der XET-Aktivität	47
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>50</b>
3.1	Translationsaktivität von Poly(A <sup>+</sup> )-RNA nach Infektion mit <i>Cuscuta reflexa</i>	50
3.2	Erfassung von infektionsinduzierten Genen mittels Supressiver Subtraktionshybridisierung (SSH)	51
3.3	Selektion relevanter cDNA-Klone	52
3.4	Streßinduzierte Genexpression	54

3.5	Genexpression von Signalstoffwechsel-assoziierten Proteinen	62
3.6	Genexpression von Zellstreckung-assoziierten Proteinen	64
3.7	Genexpression von Zellwand-assoziierten Proteinen	80
3.8	Phytohormone in der Interaktion von Parasit und Wirtspflanze	100
<b>4</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG &amp; SUMMARY</b>	<b>107</b>
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>114</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG</b>	<b>126</b>
6.1	Sequenzen	126
6.2	Oligonukleotide	135
6.3	Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren	135

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 PARASITISCHE BLÜTENPFLANZEN

Parasitisch lebende höhere Pflanzen, vor allem die mitteleuropäische Mistel (*Viscum spec.*), haben seit jeher die Aufmerksamkeit der Menschen auf sich gezogen. Die ersten chlorophyllosen Pflanzen (*Lathraea squamaria* - Schuppenwurz, *Orobanche spec.* - Sommerwurz) wurden aber vermutlich erst vor einigen Jahrhunderten entdeckt. Sie wurden als „Auswüchse des Teufels“ angesehen, was volkstümliche Bezeichnungen wie Teufelszwirn oder Hexenkraut für Vertreter der Gattung *Cuscuta* widerspiegeln. Wann die parasitische Lebensweise bei Pflanzen allerdings erstmals erkannt wurde, ist unklar.

Die Formenvielfalt und die mitunter recht ungewöhnlichen Wuchsformen der Pflanzen erschwerten die Beschreibung des Parasitismus. Trotzdem liegen schon bemerkenswerte wissenschaftliche Arbeiten aus dem 19. Jahrhundert zu diesem Thema vor. In den vergangenen 50 Jahren zeigte sich ein zunehmendes Interesse an parasitischen Pflanzen, auch wegen der zum Teil verheerenden Ernteverluste durch Arten der Gattung *Striga* und *Orobanche* aus der Familie der Scrophulariaceae. Daneben stellt die im Pflanzenreich einzigartige Interaktion zwischen verschiedenen Organismen und Zellen ein ausgezeichnetes Modell dar, um die Kommunikationsstrukturen zwischen den Pflanzen näher zu beleuchten.

Alle der bis heute bekannten etwa 4000 parasitisch lebenden Arten gehören der Klasse der Dicotyledonen an. Ihre Einteilung in 11 voneinander unabhängige phylogenetische Klassen belegt, daß sich pflanzlicher Parasitismus mehrmals während der Evolution entwickelt haben muß (NICKRENT *et al.*, 1998). Zwar existieren Hinweise auf eine parasitische Gymnospermae (*Podocarpus ustus*, Podocarpaceae), doch bisher konnte die parasitische Lebensweise nicht eindeutig belegt werden (WEBER, 1993). Die vorwiegend krautigen pflanzlichen Parasiten sind in tropischen und subtropischen Gebieten, aber auch in gemäßigten Klimaten verbreitet. In der heimischen Flora finden sich hauptsächlich Vertreter der Scrophulariaceen, Orobanchaceen und Viscaceen.

Die Cuscutaceen (Seidengewächse) mit der ca. 170 Arten umfassenden Gattung *Cuscuta* können als Kosmopoliten angesehen werden, sind aber vor allem auf dem amerikanischen Kontinent und im Nahen Osten anzutreffen, wo sie in der Vergangenheit schwerwiegende Schäden anrichteten. Deshalb ist man hier verstärkt auf der Suche nach geeigneten Bekämpfungsmaßnahmen. In Deutschland kommen 9 Arten vor.

Eine allgemeine Charakterisierung der parasitischen Lebensweise von Blütenpflanzen erweist sich angesichts der Vielgestaltigkeit der einzelnen Organisationsformen als schwierig. Nach KUIJT (1969) sind parasitische Pflanzen durch den Besitz spezieller Organe, den Haustorien, gekennzeichnet. Da jedoch mit dieser Beschreibung keine ausreichende Abgrenzung von ähnlichen Lebensweisen gegeben ist, definiert (WEBER, 1993) parasitische Blütenpflanzen als Organismen, die mittels Haustorien zum Zwecke des Nahrungserwerbs in lebendes Wirtsgewebe eindringen. Über die Haustorien werden die Leitgewebe (Xylem und/oder Phloem) des Parasiten mit denen der jeweiligen Wirtspflanze verknüpft, wodurch der Entzug von Wasser und Nährsalzen als auch von Assimilaten ermöglicht wird. Die weitere Unterscheidung in Hemiparasiten (Halbparasiten) und Holoparasiten (Vollparasiten) ist aufgrund der tatsächlichen anatomischen Befunde nicht gerechtfertigt. Geeigneter scheint die Einteilung nach Wurzel- und Sproßparasiten, die auf der ontogenetischen Abstammung der Haustorien beruht (WEBER, 1993).

## 1.2 *CUSCUTA*

Trotz ihres relativ unauffälligen Erscheinungsbildes sind die Cuscutaceen eine recht intensiv untersuchte Pflanzenfamilie. Es liegen zahlreiche Arbeiten zur Struktur und Physiologie des Parasiten selbst, aber auch zu Verbindungen mit kompatiblen Wirtspflanzen vor.

Die Cuscutaceen sind zumeist einjährige, obligate Sproßparasiten, deren Haustorien sekundär an bereits ausgebildeten Sproßachsen entstehen. Sie weisen mit einigen Ausnahmen ein recht breites Wirtsspektrum auf. Die Arten der Gattung *Cuscuta* zählen zu den epiphytisch lebenden Parasiten, da sie ohne eigenen Bodenkontakt ausschließlich oberirdische Organe ihrer Wirtspflanzen besiedeln. Angepaßt an ihre parasitische Lebensweise sind sie durch eine starke Reduktion ihrer vegetativen Organe charakterisiert (Abbildung 1-1).



Abbildung 1-1: *Cuscuta reflexa* auf *Coleus blumei*

Die Laubblätter sind zu Schüppchen zurückgebildet, ein Wurzelsystem fehlt völlig. Die Cuscutaceen entwickeln windende, oft verzweigte Sprosse, die entsprechend ihres noch vorhandenen Chlorophyll- und Carotinoidgehaltes unterschiedlich gefärbt sein können (DAWSON *et al.*, 1994). Zum Teil sind sogar noch intakte Chloroplasten vorhanden (*Cuscuta reflexa*), anderen Arten fehlen die für die Photosynthese notwendigen Gene oder sie sind stark verändert (VAN DER KOOIJ *et al.*, 2000). Die 4-5 zähligen radiären Blüten stehen in Knäueln oder Rispen (Abbildung 1-2). Sie enthalten unterhalb der Staubblätter sogenannte Schlundschuppen (Staminodien), die bei der taxonomischen Einordnung der einzelnen Arten hilfreich sind (ROTHMALER, 1994).



Abbildung 1-2: *Cuscuta australis* (Foto: J.-M. Hu, Taiwan)

### 1.3 ENTSTEHUNG EINER FUNKTIONSFÄHIGEN WIRT-PARASIT-BEZIEHUNG

Grundsätzlich läßt sich die Herstellung einer erfolgreichen strukturellen und physiologischen Verbindung zwischen Parasit und Wirt in drei Phasen unterteilen. Nach der ersten Kontaktaufnahme zwischen beiden Organismen dringen die Parasitenzellen in das Wirtsgewebe ein. Anschließend kommt es zur Verknüpfung der Leitsysteme von Parasit und Wirt (KOLLMANN UND DÖRR, 1987).

Die erste Anheftung der sich eng um den Wirtssproß windenden *Cuscuta* erfolgt über lokale Differenzierungen des Kortex. Die Epidermiszellen in der Kontaktzone entwickeln sich durch antiklinale Teilungen und enormes Streckungswachstum zu papillenartigen Zellen. Von den Zellen dieses sogenannten adhesiv-sekretorischen Epithels wird ein pektinreiches Sekret ausgeschieden, das Parasit und Wirt miteinander verklebt (HEIDE-JØRGENSEN, 1987).

Im Innern der diskusförmigen Verdickungen (Prähaustorien) entsteht das eigentliche Haustorium, welches aus parenchymatischen, länglichen Zellen besteht (FORSTREUTER UND WEBER, 1983). Es dringt gleich einem Keil in das Wirtsgewebe ein. Im folgenden bilden sich im apikalen Haustorialbereich einzelne hyphenartige Zellstränge aus, die sich im Wirtsgewebe sowohl inter- als auch intrazellulär ausbreiten. Auf der „Suche“ nach Leitelementen des Wirtes kommt es zeitweise über Außenwandplasmodesmen zu direkten Verbindungen der „Suchhyphen“ mit den Protoplasten der Wirtszellen (DÖRR, 1969). Die Funktion dieser Plasmabrücken ist bislang unklar. Für das Vordringen der Parasitenzellen in das Wirtsgewebe werden neben einfachen mechanischen Vorgängen auch enzymatische Prozesse verantwortlich gemacht (NAGAR *et al.*, 1984; SINGH UND SINGH, 1997).

Treffen nun die Suchhyphen auf funktionsfähige Leitelemente des Wirtes, werden sie zu sogenannten „Kontakthyphen“ umdifferenziert. Handelt es sich um einen Xylemkontakt, entwickeln sich aus den Kontakthyphen Zellen mit den für Tracheen und Tracheiden typischen Sekundärverdickungen der Zellwand. Die Verbindung zwischen Kontaktzelle und basal im Haustorium differenzierten Xylemleitbahnen garantiert einen kontinuierlichen Transpirationsstrom vom Wirt zum Parasit (Abbildung 1-3).

Im Gegensatz zum Xylem treten im Falle eines Phloemkontaktes keine offenen symplastischen Verbindungen zwischen Wirts- und Parasitenzellen auf. Vielmehr umschließt die Kontaktzelle ähnlich einer Hand das Siebelement des Wirtes. Wie bei der normalen Entwicklung von Siebzellen kommt es zur Auflösung von Zellkern, Tonoplast und Ribosomen. Gleichzeitig wird das glatte Endoplasmatische Retikulum in der „Absorptionshyphen“ zum dominierenden Strukturmerkmal. Der Absorptionsfluß erfolgt über die durch Wandprotuberanzen stark vergrößerte Oberfläche an der Grenze zum Siebelement des Wirtes (DÖRR, 1972; DÖRR, 1990).

Solche Protuberanzensysteme wurden vielfach in Zusammenhang mit bestimmten Stofftransportprozessen in pflanzlichen Organen beschrieben (GUNNING UND PATE, 1969). Die Kontakthyphe ist schließlich über parallel zu den Xylembahnen verlaufenden haustorialen Siebelementen mit dem Phloem des Parasiten verbunden.

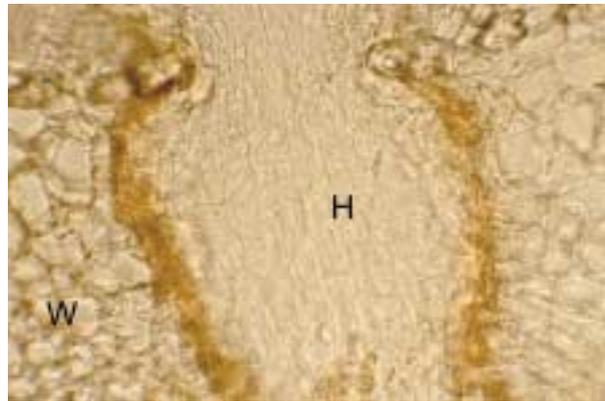


Abbildung 1-3: Mikroskopische Aufnahme eines Haustorialbereiches (H) von *C. reflexa* in der Wirtspflanze (W) *N. tabacum*. Vergrößerung 150 x.

Bislang sind die einzelnen Regulationsmechanismen und Signaltransduktionswege, die von der Interaktion zwischen Parasit und Wirtspflanze betroffen sind, nur unzureichend verstanden. Die Untersuchung von inkompatiblen *Cuscuta*-Wirt-Beziehungen, in denen der Parasit also von der Wirtspflanze abgewehrt wird, bietet eine Möglichkeit, mehr über diese Regulation zu erfahren.

#### 1.4 INKOMPATIBLE WIRT-*CUSCUTA*-INTERAKTIONEN

Wie bereits dargestellt, ist die Voraussetzung einer kompatiblen Beziehung zwischen Wirt und Parasit das Vorhandensein eines funktionsfähigen Haustoriums. Bei inkompatiblen Pflanzen kommt es zu einer Störung der Haustorienentwicklung, mit der Folge, daß der Parasit letztendlich abgestoßen wird. Allerdings treten bei allen Wirt-Parasit-Wechselwirkungen mehr oder weniger Abwehrreaktionen auf. Nur sind diese bei inkompatiblen („resistenten“) Wirtspflanzen wesentlich früher und stärker ausgeprägt. Die Abwehr des Parasiten kann in allen drei Phasen der Haustorienentwicklung erfolgen. Dabei kann die Resistenz einer Pflanze einerseits auf schon konstitutiv vorhandenen Strukturen begründet sein, andererseits aber erst im Laufe der Infektion induziert werden. So stellen beispielsweise Bastzellen oder sukkulentes Gewebe (Euphorbiaceen, Cactaceen) eine natürliche Barriere für die eindringenden Haustorien dar (KINDERMANN, 1928; FORSTREUTER UND WEBER, 1983). Weiterhin werden verschiedene

Inhaltsstoffe als Resistenzfaktoren, wie z.B. Alkaloide, recht widersprüchlich diskutiert (GERTZ, 1915; BÄUMEL *et al.*, 1993; BRINGMANN *et al.*, 1999).

Während die obigen Abwehrmechanismen bereits vor einer eventuellen Infektion bestehen, werden in einigen Pflanzen, erst nachdem sie vom Parasiten attackiert wurden, verschiedene Prozesse chemischer und/oder physikalischer Art induziert. Bei den Malvaceen *Gossypium hirsutum* und *Hibiscus rosa-sinensis* können *Cuscuta*-Haustorien zwar in das Wirtsgewebe eindringen, werden dann jedoch durch ein Wundabschlußgewebe vom gesunden Wirtsgewebe abgegrenzt und wieder nach außen gedrängt (CAPDEPON *et al.*, 1985; SCHLENZKA, 1992). Dabei sterben die Suchhyphen sowie andere parasitäre Zellen ab.

Wesentlich früher, nämlich schon während der Anheftung des Parasiten wird die Haustorienentwicklung bei *Lycopersicon esculentum* verhindert (IHL *et al.*, 1988; SAHM *et al.*, 1995). Das System *Lycopersicon esculentum*/*Cuscuta reflexa* ist durch eine sehr schnell einsetzende Inkompatibilitätsreaktion mit charakteristischen Gewebeeränderungen gekennzeichnet und wurde deshalb schon sehr eingehend untersucht (SAHM *et al.*, 1995; LÖFFLER, 1999). Bereits nach 3 Tagen sind erste makroskopische Veränderungen auf der Wirtssproßachse zu erkennen. Nach etwa 10 Tagen ist der Parasit vollständig abgestorben (Abbildung 1-4).



Abbildung 1-4: *C. reflexa* auf *L. esculentum* 3 bzw. 10 Tage nach Befall (links und Mitte); *C. reflexa* auf *N. tabacum* 10 Tage nach Befall.

Zunächst kommt es im Rindenbereich zu deutlichen Zellstreckungen in Richtung der Sproßoberfläche, die auf den unmittelbaren Infektionsbereich begrenzt sind. Diese anatomischen Reaktionen werden mit einem Anstieg an Auxin in Wirts- und prähaustorialem Gewebe in Zusammenhang gebracht. Untersuchungen von LÖFFLER *et al.* (1999) sprechen für einen Transport des Phytohormons vom Parasiten in die Wirtszellen bzw. eine Induktion der

Hormonsynthese in der Wirtspflanze selbst. Im weiteren Verlauf der Infektion kollabieren die gestreckten Zellen und bilden die auf der Stengeloberfläche gut sichtbaren nekrotischen Plaques, die als auffälligstes Merkmal der inkompatiblen Reaktion schon von IHL *et al.* (1988) beschrieben wurden. Die abgestorbenen Zellbereiche werden anschließend durch die Ausbildung eines sekundären Abschlußgewebes von den umliegenden Zellen abgetrennt, welche Suberin und Lignin in ihre Zellwände einlagern. Eine nachgewiesene Akkumulation löslicher Phenylpropane sowie eine Erhöhung der Peroxidaseaktivität im Infektionsbereich sind Zeichen der beobachteten Lignifizierung (SAHM *et al.*, 1995).

Insgesamt können die auf den Parasitenbefall folgenden Reaktionen in spezifische durch *Cuscuta* hervorgerufene und andere allgemeine Abwehrreaktionen, die z.B. auch durch pathogene Pilze, Insektenfraß oder Verwundung ausgelöst werden, unterteilt werden. Zu den ersteren zählen die Zellstreckungen, während die Induktion des Phenylpropanstoffwechsels und der Peroxidaseaktivität eher an die Hypersensitivitätsreaktion auf Pilzinfektion erinnern.

Trotz intensiver Suche nach den für die Resistenz der Tomate gegenüber *C. reflexa* verantwortlichen Faktoren, ist es bis heute nicht gelungen, sie vollständig zu identifizieren. Arbeiten von LÖFFLER (1999) konnten die Wirtskutikula als wesentliche Ursache der Inkompatibilität einstufen, da zum einen vom Wachs befreite Tomatensproßachsen eine kompatible Reaktion zeigten und zum anderen vorher kompatible Wirte durch das Auftragen des Kutikularwachses inkompatibel gemacht werden konnten. Es wurden einige für *Cuscuta* toxische Fraktionen isoliert, die aber einzeln nicht die gleichen Effekte erzielten wie das Gesamtwachs. Neben den Wachskomponenten existieren in der Tomate vermutlich noch weitere Mechanismen, die in ihrer Gesamtheit zum Absterben des Parasiten führen. So ist es u.a. vorstellbar, daß *Cuscuta* über das adhesiv-sekretorische Epithel eine Substanz abgibt, die von der Tomate durch einen „Rezeptor“ erkannt wird. Dadurch könnte ähnlich der Resistenz der Tomate gegenüber *Pseudomonas syringae*, die auf der Wechselwirkung eines speziellen bakteriellen und einem Wirtsprotein beruht, eine Signalkaskade ausgelöst werden. Diese resultiert möglicherweise in einer Aktivierung allgemeiner Abwehrgene, deren Produkte letztendlich den Parasiten schädigen. Dabei könnte es sich zum einen um Enzyme, die das parasitäre Gewebe angreifen, handeln. Andererseits wären aber auch pflanzliche Sekundärstoffe, die aufgrund der Expression bestimmter Gene gebildet werden, denkbar.

## 1.5 MOLEKULARE MECHANISMEN DER RESISTENZ

Aufgrund der durch pflanzliche Parasiten weltweit angerichteten Schäden in der Landwirtschaft wurde in den vergangenen Jahren verstärkt nach resistenten Pflanzen gesucht. Die am meisten gefürchteten Wurzelparasiten *Striga* und *Orobancha* stehen dabei im Mittelpunkt der Forschung. Von der Identifizierung der Resistenzfaktoren und deren Übertragung auf kompatible Wirte verspricht man sich einen wirksamen Schutz vor Ernteverlusten. Bis auf wenige Ausnahmen waren diese Versuche aber bislang eher enttäuschend.

Als Ursachen einer Resistenz wird ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren diskutiert. Zum einen zählen dazu das Fehlen chemischer Signale, die für die Entwicklung des Haustoriums bzw. des gesamten Parasiten notwendig sind, zum anderen aber auch konstitutive und induzierte generelle Resistenzmechanismen. Während über die Resistenzmechanismen in Hinsicht auf parasitäre Pflanzen noch recht wenige Kenntnisse vorliegen, sind sie für phytopathogene Bakterien, Pilze und Viren wesentlich besser untersucht.

Die Abwehrreaktion beinhaltet unter anderem den durch Interaktion eines Avirulenzgens *avr* des Pathogens mit einem entsprechenden Resistenzgen *R* seitens des Wirtes ausgelösten programmierten Zelltod im Infektionsbereich. Dieser Mechanismus ist auch als Hypersensitivitätsreaktion (HR) bekannt (HAMMOND-KOSACK UND JONES, 1996). Infolge der Induktion einer HR werden über die Signalsubstanz Salicylsäure verschiedene Abwehrgene („pathogenesis related genes“, PR-Gene) aktiviert, wodurch letztendlich eine systemische Resistenz der Pflanze gegenüber dem Pathogen hervorgerufen wird („systemic acquired resistance“, SAR). Die Expression von Abwehrgenen kann aber auch über den Jasmonat- und Ethylen-Signalweg erfolgen, wobei beide Signaltransduktionswege, zum Teil auf antagonistische Weise, eng miteinander verknüpft sind (DONG, 1998; GLAZEBROOK, 1999).

Die bisher bekannten Resistenzgene können aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften in fünf verschiedene Klassen unterteilt werden. Dabei stellen die Proteine mit leucinreichen Bereichen (LRR-„leucine rich repeats“) und einer Nukleotidbindungsstelle (NBS) die bei weitem größte Gruppe dar. Zusätzlich enthalten diese Proteine oft einen dem TOLL-Rezeptor aus *Drosophila* bzw. dem humanen Interleukin-1-Rezeptor ähnlichen Bereich (TIR-Domäne) (BENT, 1996). Es wird angenommen, daß die LRR-Motive die strukturelle Information zur spezifischen Bindung eines Liganden besitzen, also eventuell in der Pathogenerkennung von Bedeutung sind. Ebenso gibt es aber auch Hinweise für eine Funktion der LRR-Proteine in der Signaltransduktion (MARTIN, 1999). Die TIR-Domäne der Resistenzgene wird für die Signalweiterleitung nach Pathogenerkennung verantwortlich gemacht. Kürzlich konnte erstmals ein spezifisch mit der Resistenz gegenüber einer parasitischen Blütenpflanze assoziiertes Gen charakterisiert werden

(GOWDA *et al.*, 1999). Die inkompatible Interaktion von *Tagetes erecta* / *Striga asiatica* ist in gleicher Weise wie *Lycopersicon esculentum* / *Cuscuta reflexa* durch eine Hypersensitivitätsreaktion gekennzeichnet. Nach *Striga*-Infektion wird in *T. erecta* die Expression von *NRSA-1* induziert und zwar sowohl im unmittelbaren Infektionsbereich als auch systemisch. *NRSA-1* weist N-terminal eine TIR-homologe Domäne auf, jedoch fehlen sowohl die für Resistenzgene typischen LRR-Motive als auch eine Nukleotidbindungsstelle. Deshalb scheint das Protein nicht direkt an der Pathogenerkennung beteiligt zu sein, sondern eher an der Regulation sich anschließender Abwehrmechanismen. Für eine Funktion innerhalb der Signaltransduktionskette spricht auch die systemische Akkumulation sowie die Expression nach Jasmonat-Behandlung (GOWDA *et al.*, 1999).

Wie bereits ausgeführt hat die Hypersensitivitätsreaktion eine Aktivierung von PR-Proteinen zur Folge. Untersuchungen von JOEL UND PORTNOY (1998) zeigen, daß eine Infektion kompatibler Tabakpflanzen mit dem Wurzelparasiten *Orobancha* ebenfalls zu einer Induktion von PR-Genen führt. Allerdings ist die Expression von Abwehrgenen in diesem Fall nicht für eine Resistenz ausreichend.

Die Verknüpfung von spezifisch durch den Parasiten induzierten Promotoren mit Abwehrgenen stellt eine exzellente Möglichkeit dar, gegenüber phanerogamen Parasiten resistente Pflanzen zu erzeugen. Erste Erfolge in der Identifizierung solcher Promotoren liegen bereits vor (WESTWOOD *et al.*, 1998).

Neben den oben erwähnten Mechanismen ist die Abwehr von Pathogenen zusätzlich durch auf den Infektionsbereich begrenzte Zellwandveränderungen gekennzeichnet. Die niedermolekularen phenolischen Vorstufen des Lignins sowie durch Polymerisationsprozesse in der Zellwand freigesetzte Radikale können die eindringenden Pathogene schädigen (HAMMOND-KOSACK UND JONES, 1996). Zusätzlich entstehen durch enzymatischen Abbau der Zellwandpolymere Oligomere, die ebenfalls Abwehrreaktionen auslösen können (FARMER UND RYAN, 1992). Weitere Mechanismen zur Pathogenabwehr umfassen die Expression von Polygalacturonase-hemmenden Proteinen, die Einlagerung von Kallose in die Zellwände sowie deren verstärkte Lignifizierung. Eng verbunden mit der ausgelösten Ligninpolymerisierung infolge einer Infektion ist die Expression von hydroxyprolinreichen Glycoproteinen der Zellwand (SHOWALTER, 1993).

## 1.6 STRUKTUR DER ZELLWAND & MECHANISMEN DER ZELLEXPANSION

Die pflanzliche Zellwand ist für die verschiedensten physiologischen Prozesse von grundlegender Bedeutung. Sie gibt der Zelle nicht nur ihre äußere Form und hält den Turgordruck aufrecht, sondern ist gleichzeitig ein wesentlicher Bestandteil des pflanzlichen Abwehrsystems. Die vielfältigen Funktionen können nur aufgrund einer sehr komplexen Zellwandstruktur erfüllt werden.

Aus physiologischer Sicht werden Zellwände nach ihrem Entwicklungszustand als primär bzw. sekundär eingestuft. Dabei nehmen die Wände der epidermalen Zellen eine Sonderstellung ein, da sie trotz einem eher für sekundäre Zellwände charakteristischen hohen Gehalt an Cellulose ihre Fähigkeit zur Ausdehnung behalten haben. Grundsätzlich bestehen Zellwände vor allem aus Cellulosemikrofibrillen, die in eine komplexe, stark hydratisierte Matrix aus Polysacchariden (Hemicellulosen und Pektin) eingebettet sind. Daneben ist noch ein geringerer Anteil an Strukturproteinen enthalten. Die strukturbestimmenden Cellulosemikrofibrillen liegen in einem Netzwerk mit verschiedenen Hemicellulosen (Xyloglucane, Rhamnogalacturonane und Glucuronoarabinoxylane) vor, wobei die Xyloglucane den Hauptanteil ausmachen. Für die Verknüpfung zwischen Xyloglucanen und Cellulose werden hauptsächlich Wasserstoffbrücken und andere nichtkovalente Bindungen verantwortlich gemacht. Die heterogen zusammengesetzte Gruppe der Pektine bildet eine gelartige Phase um das Cellulose-Hemicellulose-Netzwerk aus. Untersuchungen von THOMPSON UND FRY (2000) und anderen Arbeitsgruppen an Suspensionskulturen konnten zeigen, daß neben nichtkovalenten Bindungen zwischen Xyloglucanen und Pektinen auch kovalente existieren. An Strukturproteinen der Zellwand sind mehrere Klassen bekannt, die sich durch ihre ungewöhnliche Primärstruktur (u.a. hydroxyprolinreiche Glycoproteine-HRGP, glycinreiche Proteine-GRP, prolinreiche Proteine-PRP) unterscheiden (SHOWALTER, 1993). Viele dieser Proteine sind stark glycosyliert. Obwohl die genaue Funktion der Strukturproteine noch nicht ausreichend geklärt ist, scheinen sie in Prozesse der Pathogenabwehr involviert zu sein.

Neben den Strukturproteinen sind weiterhin zahlreiche Enzyme mit der pflanzlichen Zellwand assoziiert. Sie sind u.a. an der Modifikation der eigenen Zellwandpolysaccharide, aber auch der von pathogenen Bakterien und Pilzen beteiligt. Von vielen Enzymen ist allerdings die Funktion noch unklar (COSGROVE, 1997a).

Da die Interaktion von *L. esculentum* mit *C. reflexa* durch auffällige Zellstreckungen in der Kontaktzone beider Pflanzen gekennzeichnet ist, sollen im folgenden die Mechanismen der Zellexpansion näher betrachtet werden. Bei der Zellstreckung können zwei in Wechselbeziehung stehende Teilprozesse unterschieden werden. Zunächst kommt es zu einer Wasseraufnahme in

die Zelle, verursacht durch eine Wasserpotentialdifferenz  $\Delta\psi_w$  zwischen der Zelle und ihrer äußeren Umgebung. Die Erhöhung des Turgors bedingt einen Wandstreß, der letztendlich zu einer Dehnung der Zellwand führt. Der Prozeß der Zellexpansion kann durch folgende Gleichung beschrieben werden (CLELAND, 1995):

$$dV / dt = \frac{m * Lp}{m + Lp} (\psi_a - \pi - Y) \quad \text{[Gleichung 1-1]}$$

$dV/dt$  ...Wasseraufnahme

$m$  ...Extensibilität der Zellwand

$Lp$  ...hydraulische Leitfähigkeit der Plasmamembran

$\psi_a$  ...apoplastisches Wasserpotential

$\pi$  ...osmotisches Potential der Zelle

$Y$  ...Dehnungsschwellenwert

Ab einem bestimmten Turgordruck, dem Dehnungsschwellenwert  $Y$  besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Zellwachstumsrate und dem Turgordruck. Erst nach Erreichen von  $Y$  ist eine irreversible Dehnung der Zellwand möglich. Dabei wird das Ausmaß der Zellstreckung durch die Extensibilität  $m$ , also durch die Dehnungsfähigkeit der Zellwand bestimmt. Sowohl  $Y$  als auch  $m$  können durch den Einfluß von Hormonen verändert werden.

Eine Dehnung der Wand ist nur aufgrund ihrer viskoelastischen Eigenschaften möglich. Dabei müssen die Bindungen zwischen den einzelnen Zellwandpolymeren aufgebrochen werden, so daß durch das Auseinandergleiten der Moleküle eine Vergrößerung der Wandoberfläche erzielt werden kann. Gleichzeitig werden neue Moleküle in die Wand integriert, um die ursprüngliche Rigidity der Zellwand wiederherzustellen (COSGROVE, 1997b; COSGROVE, 1999). Der viskoelastische Charakter der Zellwand allein erklärt nicht ausreichend das Verhalten wachsender Zellen. Vielmehr ermöglicht erst die Wirkung verschiedener Zellwand-assoziiertes Proteine den Prozeß der Wandlockerung und der nachfolgenden Dehnung. So müssen nichtkovalente Bindungen zwischen den Polysacchariden ebenso gelöst werden wie kovalente Bindungen innerhalb einzelner bzw. mehrerer Matrixpolymere. Diese vielfältigen Aufgaben machen deutlich, daß an der Zellwanddehnung eine Vielzahl von Enzymen beteiligt sein muß. Während für zahlreiche Enzyme der Wirkmechanismus gut untersucht ist, bleibt dieser für das einzige bislang bekannte Protein, das tatsächlich zu einer Dehnung der Wand führt, ein Rätsel. Die Expansine sind im Gegensatz zu Enzymen wie Endoglucanasen selbst *in vitro* in der Lage, eine

Wanddehnung hervorzurufen. Die Bedeutung einzelner Zellwand-assoziiierter Enzyme wird in Kapitel 3 ausführlicher diskutiert.

Natürlich ist die Zellstreckung ein nicht nur auf die Zellwand beschränkter Prozeß, sondern kommt erst durch das komplexe Zusammenspiel verschiedener physiologischer Prozesse zustande. In Abbildung 1-5 sind die grundlegenden Zusammenhänge der an der Zellstreckung beteiligten Prozesse dargestellt.

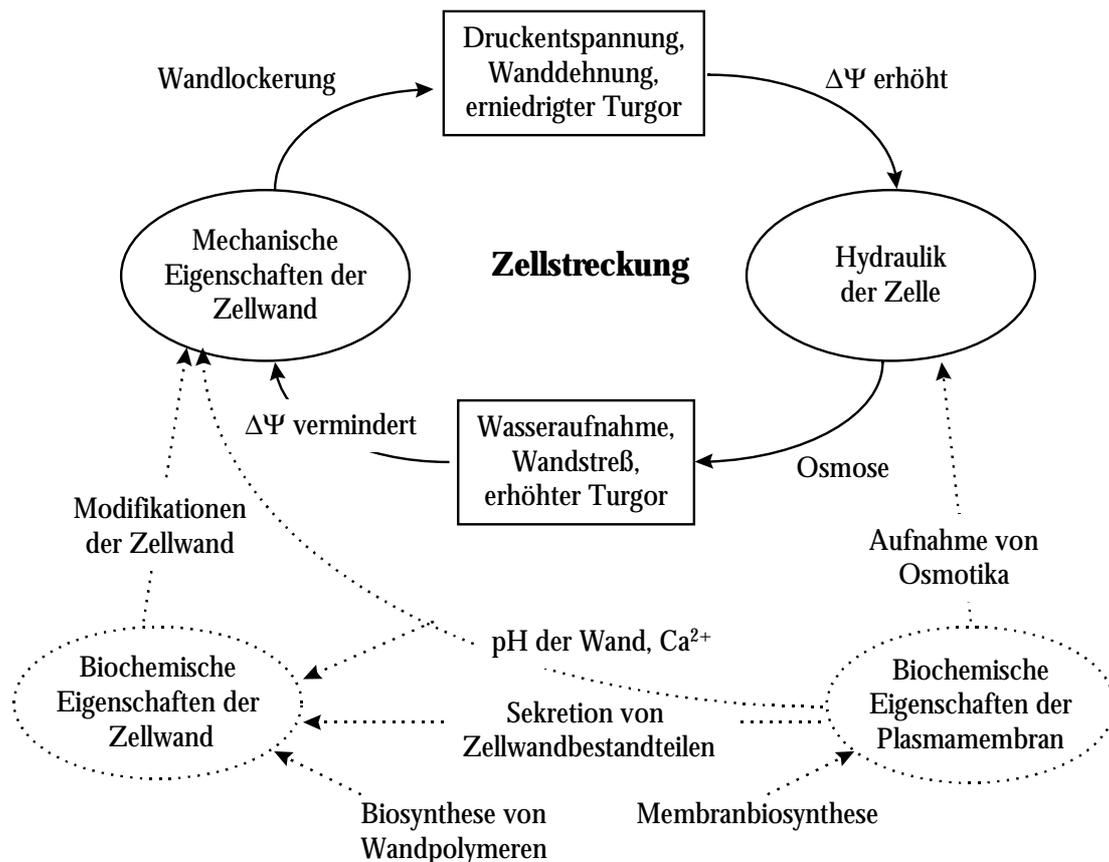


Abbildung 1-5: Schematische Darstellung der mit der Zellstreckung verbundenen Prozesse (modifiziert nach COSGROVE, 1997b).

Die biophysikalischen Prozesse, die unmittelbar zu einer Zellstreckung führen, sind durch durchgehende Linien gekennzeichnet. Die biochemischen Prozesse, die einer Zellstreckung vorausgehen, sind an den durchbrochenen Linien zu erkennen.

## 1.7 INHALT DER VORLIEGENDEN ARBEIT

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das inkompatible System *Lycopersicon esculentum/Cuscuta reflexa* näher untersucht. Wegen der sehr raschen und stark ausgeprägten Unverträglichkeitsreaktion stand es schon zuvor im Mittelpunkt verschiedener Arbeiten (SAHM *et al.*, 1995; LÖFFLER, 1999). Es wurden jedoch bisher vorwiegend die morphologischen und biochemischen Antworten der Wirtspflanze auf den Parasitenbefall charakterisiert. Die molekularen Grundlagen, die zu den beobachteten Veränderungen im Wirtsgewebe führen, sollten Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Ausgehend von der Annahme, daß die *Cuscuta*-Infektion die Expression verschiedener Gene beeinflußt, sollten diese identifiziert und hinsichtlich ihrer Bedeutung im Infektionsgeschehen charakterisiert werden.

Die bislang beschriebenen Wirtsreaktionen nach *Cuscuta*-Befall, spezifisch oder unspezifisch, scheinen keinen entscheidenden Beitrag zur Resistenz der Tomate gegenüber *Cuscuta* zu leisten. Eine Ausnahme bildet die Wirtskutikula, die als ein wesentlicher Resistenzfaktor nachgewiesen werden konnte. Letztendlich beruht die Inkompatibilität der Tomate vermutlich auf einem komplexen Zusammenspiel mehrerer Mechanismen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb auch, mögliche Resistenzfaktoren auf molekularer Ebene zu identifizieren.

Um ein besseres Verständnis darüber zu erlangen, welche Signaltransduktionswege in der Wirtspflanze von der Interaktion betroffen sind, interessierten natürlich auch die Gene, die darin involviert sind. Schon von mehreren Seiten wurde ein Einfluß von Phytohormonen diskutiert, wobei hauptsächlich Auxine und Cytokinine im Blickfeld standen. LÖFFLER *et al.* (1999) untersuchten z. B. die Rolle von Auxinen in kompatiblen und inkompatiblen Beziehungen und konnten einen Zusammenhang zwischen Auxingehalt und den charakteristischen Zellstreckungen im infizierten Gewebe der Tomate feststellen. Es wird vermutet, daß Auxine und Cytokinine an der Herstellung der Xylemverbindung zwischen Wirt und Parasit beteiligt sind (YODER, 1999), da sie auch in Wundgewebe die Xylemdifferenzierung auslösen (ALONI, 1995). Neben Expressionsstudien unter dem Einfluß von Auxin wurde die Bedeutung der Phytohormone Auxin und Brassinolid zusätzlich an hormoninsensitiven Mutanten untersucht.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 PFLANZENMATERIAL, ANZUCHT UND PROBENNAHME

#### 2.1.1 CUSCUTA

*Cuscuta reflexa* Roxb., in den 60er Jahren aus Pakistan eingeführt, wurde auf *Coleus blumei* Benth. im Gewächshaus bei Temperaturen zwischen 16 und 22°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60-70% kultiviert. Der Tag-/Nachtrhythmus betrug 16:8 h. Die Vermehrung der *Cuscuta*-Sprosse erfolgte vegetativ.

#### 2.1.2 TOMATE

Als Wirtspflanzen wurden *Lycopersicon esculentum* cv. Hellfrucht, die Mutanten *diageotropica* (*dgt*), die als auxininsensitiv beschrieben wird (ZOBEL, 1993; KELLY UND BRADFORD, 1986), sowie die brassinosteroidinsensitive *curl-3* verwendet. Erstere stammt von *L. esculentum* ab, die zweite von *L. pimpinellifolium*. Die Samen der Mutanten wurden vom Tomato Genetics Resource Center (Davis, USA) zur Verfügung gestellt.

Nach der Keimung der Samen wurden die Pflanzen einzeln getopft und unter den gleichen Gewächshausbedingungen wie die *Cuscuta*-Kultur angezogen. Für die einzelnen Untersuchungen wurden 7-8 Wochen alte Pflanzen verwendet.

#### 2.1.3 TABAK

Neben Tomatenpflanzen wurden auch Infektionsversuche mit *Nicotiana tabacum* cv. Samsun durchgeführt. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte in der gleichen Weise wie oben beschrieben. Aufgrund des langsameren Wachstums wurden allerdings Pflanzen verwendet, die älter als 8 Wochen waren.

#### 2.1.4 PROBENNAHME

Für Infektionsversuche sowohl an Tomaten als auch an Tabak wurden von der *Cuscuta*-Kultur Sprosse einer durchschnittlichen Länge von 15 –20 cm abgetrennt und auf Holzstäbchen in Nachahmung ihrer natürlichen Windung gewickelt. Innerhalb von 2-3 Tagen zeigten sich an der Kontaktfläche zwischen *Cuscuta*-Sproß und Holz diskusförmige Verdickungen, die Prähaustorien. In diesem Stadium wurden die Sprosse auf das drittjüngste Internodium der jeweiligen Wirtspflanze übertragen und im Gewächshaus weiterkultiviert. Dieser Zeitpunkt wurde als Infektionsbeginn definiert.

Zum Vergleich dienten mechanisch verwundete Pflanzen, die durch Einstiche mit einem Zahnstocher in das dritte Internodium verletzt wurden.

Weiterhin wurde der Einfluß des Phytohormons Auxin auf die Expression bestimmter Gene untersucht. Dazu wurde eine Paste aus Lanolin bereitet, die 10 µM Indolessigsäure (IES) enthielt. Diese Paste wurde punktförmig (Fläche 7-10 mm<sup>2</sup>) auf die Stengeloberfläche aufgetragen, um die Kontaktfläche zwischen Prähaustorium und Wirtssproß zu imitieren.

Nach einer bestimmten Infektionsdauer wurden die parasitischen Sprosse vorsichtig entfernt, damit eine Verunreinigung des Wirtsgewebes vermieden wurde. Zuvor mußte die Lage der Haustorialbereiche gekennzeichnet werden. Diese Bereiche wurden von umgebendem, nicht infiziertem Gewebe abgetrennt. Als systemische Kontrollen dienten Sproßabschnitte, die aus dem gleichen Internodium stammten, sich aber oberhalb der Infektionsstelle ohne Kontakt zum Parasiten befanden. In gleicher Weise wurde mit artifiziell verwundeten und auxinbehandelten Pflanzen verfahren (Abbildung 2-1). Zur Isolierung von RNA wurden Infektionsbereiche von mindestens 10 Wirtspflanzen vereinigt. Für die Bestimmung der XET-Aktivität wurden jeweils Infektionsstellen von 4 Internodien verwendet. Die Proben wurden sofort in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und bis zu ihrer Aufarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

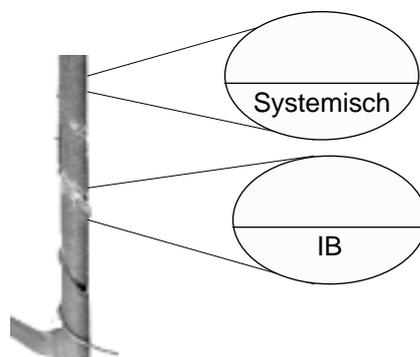


Abbildung 2-1: Probennahme nach *Cuscuta*-Befall. Infektionsbereich (IB), Gewebe ohne *Cuscuta*-Kontakt aus gleichem Internodium (Systemisch).

## 2.2 VERFAHREN MIT RIBONUKLEINSÄUREN (RNA)

### 2.2.1 ISOLIERUNG VON GESAMT-RNA

#### 2.2.1.1 GUANIDINISOTHIOCYANAT/PHENOL - METHODE

(modifiziert nach CHOMCZYNSKI UND SACCHI, 1987)

Zunächst wurde das Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff homogenisiert und anschließend 1ml Lysepuffer je 15 mg Gewebe zugegeben. Nach intensiver Durchmischung wurde die Suspension in einem SS34-Zentrifugenbecher für 10 min bei Raumtemperatur und 15.000 Upm (SS34-Rotor, Sorvall) zentrifugiert, um unlösliche Zell- und Gewebetrümmer abzutrennen. Der

Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit 0,2 ml Chloroform pro ml Lysepuffer versetzt. Durch kräftiges Schütteln und anschließende Zentrifugation (10 min, 4°C, 15.000 Upm) reicherte sich die RNA in der oberen, wäßrigen Phase an, aus der sie durch Zugabe von Isopropanol (0,5 ml pro ml Lysepuffer) und Zentrifugation (s.o.) ausgefällt werden konnte. Das RNA-Präzipitat wurde in DEPC-Wasser aufgenommen. Die gelöste RNA wurde durch 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen Ethanol erneut gefällt und das Sediment in eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen, kurz an der Luft getrocknet und in DEPC-Wasser gelöst.

Lysepuffer:           20% Phenol  
                          4M Guanidinisothiocyanat  
DEPC-Wasser:       100 µl DEPC (Sigma) in 1,0 l bidest. Wasser

Zur Isolierung von RNA aus geringen Gewebemengen wurde der Rneasy Plant Total RNA Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

### **2.2.1.2 SELEKTIVE PRÄZIPITATION DURCH 2-BUTOXYETHANOL (2-BE)**

(nach MANNING, 1991)

Die RNA-Extraktion aus einigen pflanzlichen Geweben ist durch einen hohen Gehalt an Kohlenhydraten erschwert. Mittels dieser Methode werden die meisten Polysaccharide entfernt. Sie wurde für die Isolation von RNA aus der Tomatenfrucht angewandt.

Das gefrorene Pflanzengewebe wurde in flüssigem Stickstoff fein gemörsert und in Extraktionspuffer suspendiert. Zu dieser Mischung wurden 1/50 Volumen 25% (w/v) SDS sowie 1/50 Volumen 2-Mercaptoethanol (2,5-10 ml/g Gewebe) zugegeben. Nachdem sich die Suspension auf Raumtemperatur erwärmt hatte, wurde sie mit dem gleichen Volumen der unteren Phase einer Phenol/Chloroform-Mischung ausgeschüttelt. Durch 10 min Zentrifugation bei 20.000g (RT) wurden die Phasen voneinander getrennt. Die untere und Interphase wurden nochmals mit Extraktionspuffer extrahiert. Nach dem Zentrifugieren wurden beide wäßrige Phasen, die die Nukleinsäuren enthalten, vereinigt. RNA und DNA wurden aus diesem Extrakt durch Zugabe von 2-BE in zwei Schritten gefällt. Zunächst wurde die Lösung mit Wasser auf das 2,5 fache Volumen verdünnt und dann mit 1M Natriumacetat (pH 4,5) auf eine Natriumkonzentration von 80 mM eingestellt. Anschließend wurden 0,4 Volumen 2-BE zugesetzt, wodurch die Polysaccharide abgetrennt wurden. Die Mischung wurde nach 30 min Inkubation auf Eis zentrifugiert (20.000g x 10min, 0°C). Zum Überstand wurden weitere 0,6 Volumen 2-BE zugegeben und mit dieser Mischung in der gleichen Weise verfahren wie

zuvor. Das Präzipitat wurde nacheinander mit Waschpuffer, 70% Ethanol/0,1 M Kaliumacetat (pH 6,0) und absolutem Ethanol gewaschen. Die RNA wurde durch Lithiumchloridfällung von der DNA abgetrennt. Hierzu wurden die Nukleinsäuren in einer Konzentration von mindestens 1 mg/ml in Wasser gelöst und der LiCl-Gehalt mit 12 M LiCl auf 3 M eingestellt. Anschließend wurde die RNA durch einstündige Inkubation auf Eis und nachfolgende Zentrifugation (11.600 g x 10 min) präzipitiert. Das Pellet wurde zweimal mit 3 M LiCl und anschließend mit 70% Ethanol/0,1 M Kaliumacetat (pH 6,0) und absolutem Ethanol gewaschen.

Extraktionspuffer:	0,2 M Borsäure/ Tris 10 mM Na <sub>2</sub> EDTA, pH 7,6
Phenol/Chloroform - Mischung:	gleiche Volumina wassergesättigtes Phenol, equilibriert mit Extraktionspuffer, und Chloroform
Waschpuffer:	Extraktionspuffer : 2-BE (1:1 (v/v))

### 2.2.2 ISOLIERUNG POLY(A)<sup>+</sup>-REICHER RNA

(nach LOGEMANN *et al.*, 1987; OTTO *et al.*, 1988)

Die Extraktion von polyadenylierter RNA beruhte auf der selektiven Bindung des Poly(A)<sup>+</sup>-Anhangs eukaryotischer mRNA an Thymidin-Oligomere (30-mer), welche kovalent an Cellulose (Oligo(dT)-Cellulose, Boehringer-Mannheim) geknüpft waren.

In einem Ansatz wurden mindestens 2 g Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gründlich zerkleinert und in 10 ml Aufschlußpuffer pro g Gewebe suspendiert. Diese Mischung wurde für 30 min kräftig geschüttelt. Die Abtrennung der nicht löslichen Bestandteile erfolgte mittels Zentrifugation für 20 min bei Raumtemperatur und 10.000 Upm (Sorvall RC 5B). Der Überstand wurde vorsichtig in einen Erlenmeyerkolben dekantiert und mit 0,1 Volumen 4 M NaCl-Lösung versetzt. In den folgenden 30 min wurde die Lösung mit in Bindungspuffer suspendierter Oligo-dT-Cellulose unter langsamem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Oligo-dT-Cellulose gebundene Poly(A)<sup>+</sup>-reiche RNA bei 2.500 Upm sedimentiert und nachfolgend 3-4 mal mit 20-30 ml Bindungs- bzw. Säulenpuffer gewaschen. Die Elution der RNA erfolgte bei 60°C mit 1,4 ml Puffer pro g Ausgangsmaterial. Aus dem Eluat wurde die Poly(A)<sup>+</sup>-RNA durch Zugabe von 0,2 Volumen 4 M NaCl-Lösung und 2,5 Volumen absolutem Ethanol bei -20°C über Nacht in SS34-Zentrifugenröhrchen präzipitiert. Das nach Zentrifugation (18.000 Upm x 30 min, 4°C) erhaltene Präzipitat wurde in eiskaltem 70% Ethanol/0,2M Natriumacetat gelöst und in Eppendorfgefäße überführt. Die RNA wurde nochmals gefällt und das Sediment mit 70%

Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Sie wurde in DEPC-Wasser gelöst bei -80°C aufbewahrt.

Aufschlußpuffer:	50 mM Tris-HCl; pH 9,0 0,1 M NaCl 3 % SDS 0,01 M EDTA
Bindungspuffer:	10 mM Tris-HCl; pH 7,5 0,4 M NaCl 0,2 % SDS
Säulenpuffer:	10 mM Tris-HCl; pH 7,5 0,1 M NaCl 0,2 % SDS
Elutionspuffer:	10 mM Tris-HCl; pH 7,5

Die Konzentration und Reinheit der isolierten RNA wurde photometrisch bestimmt. Eine 1:100 verdünnte Lösung wurde in einem Photometer (GeneQuantII, Pharmacia Biotech) vermessen und der Gehalt an RNA berechnet sich aus der Extinktion [E] bei 260 nm nach folgender Beziehung:

$$RNA[\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \frac{E_{260} * \text{Verdünnungsfaktor} * 40}{10^3} \quad [\text{Gleichung 2-1}]$$

Aus dem Verhältnis von  $E_{260}/E_{230}$  und  $E_{260}/E_{280}$  läßt sich eine Aussage über die Verunreinigung mit Polysacchariden bzw. Proteinen treffen. Ausreichend reine RNA-Präparationen weisen Werte von 1,8-2 auf.

### 2.2.3 ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON RNA

Die Qualität einer Präparation läßt sich weiterhin nach einer elektrophoretischen Auftrennung der RNA beurteilen (evtl. Degradation). Die Gelelektrophorese erfolgte unter denaturierenden Bedingungen. Es wurden je Probe ca. 5-10 µg Gesamt-RNA in gleichem Volumen DEPC-Wasser aufgenommen und nach Zugabe von RNA-Geladungspuffer 10 min bei 65°C denaturiert. Nach 2 min Inkubation auf Eis wurden die Proben im formaldehydhaltigen 1%igen Agarosegel bei einer Spannung von 80 V aufgetrennt. Die RNA konnte nach der Elektrophorese im Gel durch die Fluoreszenz des eingelagerten Ethidiumbromids unter UV-Licht nachgewiesen werden (ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech).

---

RNA-Ladungspuffer:	0,72 ml Formamid 0,16 ml 10 x MEN 0,26 ml 37 % Formaldehyd 0,18 ml bidest. Wasser 0,10 ml 80 % Glycerin 0,08 ml 2 % Bromphenolblau-Lösung 3 µl 1 % Ethidiumbromid-Lösung
MEN-Agarosegel:	0,5 g Agarose (ICN) 5 ml 10 x MEN 42,5 ml bidest. Wasser, in der Mikrowelle lösen 2,7 ml 37 % Formaldehyd nach Abkühlung auf 50°C zugeben
10 x MEN-Puffer:	0,2 M Morpholinopropansulfonsäure 0,01 M EDTA 0,05 M Natriumacetat

#### 2.2.4 TRANSFER VON RNA

Ein Verfahren zur Übertragung von RNA-Molekülen aus einem Agarosegel auf eine Membran wird als „Northern Blot“ bezeichnet.

Über Kapillarkräfte wurde die RNA vom Gel auf eine Nylonmembran (Nytran, Schleicher und Schüll oder Hybond-N, Amersham Life Science) transferiert. Nach Abschluß der Elektrophorese wurde das Gel luftblasenfrei auf einer mit Transferpuffer getränkten Membran (von der Größe des Gels) und einem Stapel saugfähigen Papiers (ca.15 cm) so angeordnet, daß die Unterseite des Gels die Oberfläche der Membran berührt. Die Verbindung zwischen Gel und Pufferreservoir wurde durch das Auflegen eines Streifens Filterpapier (Whatman 3MM) von der Breite des Gels und etwa 20 cm Länge hergestellt. Der Transfer erfolgte über Nacht vertikal von oben nach unten. Die RNA wurde anschließend auf der Membran durch 120.000 µJoules UV-Licht (UV Stratalinker 2400, Stratagene) fixiert.

10 x SSC-Puffer:	1,5 M NaCl 0,15 M Na <sub>3</sub> -Citrat; pH 7,0
------------------	--

### 2.2.5 IN-VITRO - TRANSLATION POLY(A)<sup>+</sup>-REICHER RNA

(nach ANDERSON *et al.*, 1983)

Zur Translation eukaryotischer Poly(A)<sup>+</sup>-RNA wurde das Weizenkeimextrakt-System (Boehringer Mannheim Biochemica) verwendet, das in Gegenwart einer radioaktiv-markierten Aminosäure mRNA in Protein übersetzt. Die Bedingungen wurden zunächst mit verschiedenen Mengen an Poly(A)<sup>+</sup>-RNA (0,1- 1,5 µg) optimiert. Die Reaktionsansätze, die jeweils 15 µCi L-[35S]-Methionin (ICN) enthielten, waren folgendermaßen zusammengesetzt:

5 µl mRNA  
7,5 µl Weizenkeimextrakt  
5 µl Translations- Reaktionsmischung (ohne Methionin)  
1 µl Kaliumacetat  
1 µl Magnesiumacetat  
1,5 µl L-[35S]-Methionin (10 µCi/ µl)  
4 µl bidest. Wasser

Nach 1 h Inkubation bei 30°C wurde die Translation durch Abkühlen auf Eis beendet. Von jedem Ansatz wurden 3 µl auf ein Stück Whatman-Papier gegeben und mit 10% Trichloressigsäure (TCA) fixiert. Der Filter wurde im Wasserbad hitzedenaturiert, mehrmals mit Ethanol gewaschen und getrocknet. Anschließend wurde die Aktivität der Probe und somit der Einbau an markierter Aminosäure im Szintillator (TRI-CARB Liquid Szintillation Analyzer, Packard) bestimmt.

## 2.3 VERFAHREN MIT DESOXYRIBONUKLEINSÄUREN

### 2.3.1 ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA AUS *ESCHERICHIA COLI*

Dem verwendeten Verfahren zur Gewinnung von Plasmid-DNA liegt ein alkalischer Aufschluß der Bakterien zugrunde. Aus dem Lysat läßt sich die bakterielle genomische DNA selektiv durch Erniedrigung des pH-Wertes ausfällen, so daß im Überstand nur die Plasmid-DNA verbleibt. Proteine werden auf diese Weise ebenfalls entfernt.

Von einer Bakterienkultur, die über Nacht in LB-Nährmedium unter Schütteln (150-200 Upm) bei 37°C gewachsen war, wurden 1,5 ml entnommen und in einem Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur 30 sec zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Bakterien- Pellet in 300 µl Puffer P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 300 µl Puffer P2 und unter leichtem

Schwenken wurden die Zellen innerhalb von 5 min lysiert. Nach Hinzufügen von 300 µl Puffer P3 und 10 min Inkubation auf Eis wurden genomische DNA und Proteine durch Zentrifugation abgetrennt und die Plasmid - DNA anschließend aus dem Überstand mit 500 µl Isopropanol sedimentiert. Um störende Salze zu entfernen, wurde das Präzipitat mit 500 µl eiskaltem 70% Ethanol gewaschen. Das luftgetrocknete Pellet wurde entweder in bidest. Wasser oder TE-Puffer gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

Die Konzentration und Reinheit läßt sich photometrisch bestimmen (s. 2.2.2). Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$DNA[\mu g/\mu l]=\frac{E_{260} * 50 * \text{Verdünnungsfaktor}}{10^3} \quad \text{[Gleichung 2-2]}$$

LB (Luria - Bertani) - Nährmedium: 1% Trypton  
0,5% Hefeextrakt  
1% NaCl, pH 7,0

P1 (Resuspensionspuffer): 50 mM Tris/HCl pH8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA

P2 (Lysepuffer): 200 mM NaOH, 1% SDS

P3 (Neutralisationspuffer): 3 M Kaliumacetat pH 5.5

### 2.3.2 SPALTUNG VON PLASMID-DNA DURCH RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN

Zur Charakterisierung als auch für weitere Manipulationen der DNA, z.B. der Präparation von radioaktiv-markierten Sonden oder das Einbringen der cDNA in einen anderen Vektor, war es notwendig, die Plasmid-DNA mittels spezifischer Restriktionsenzyme zu spalten. Die Reaktionsbedingungen wurden entsprechend der Empfehlungen der Hersteller (Gibco BRL, MBI Fermentas) gewählt. In einem Reaktionsansatz wurden pro µg DNA 2 Einheiten (U) Enzym eingesetzt, um einen vollständigen Abbau der DNA zu gewährleisten. Die Reaktion wurde in den meisten Fällen für mindestens 1 h in einem Heizblock bei 37°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 1/6 Volumen Stoppuffer (50 % Glycerin, 7,5 mM EDTA, 0,4 % Xylenyanol, 0,4% Bromphenolblau) beendet. Das Ergebnis der Spaltung wurde durch Elektrophorese überprüft.

### 2.3.3 ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON DNA

Die Auftrennung der DNA - Fragmente nach ihrer Größe erfolgte in Abhängigkeit von der zu erwartenden Fragmentlänge in Agarosegelen (ICN) unterschiedlicher Konzentration. Für Standardgele betrug diese 1%. Als Puffersystem fungierte 1 x TAE. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 5-10 Volt/cm durchgeführt. Zum Vergleich der Molekülgrößen wurde parallel ein Standard mit Fragmenten definierter Größe (1 kb DNA-Leiter, Gibco BRL) aufgetrennt. Der Nachweis der DNA war durch die Fluoreszenz des im Gel enthaltenen DNA-bindenden Ethidiumbromids (0,05 µg/ml) unter UV-Licht möglich (ImageMaster, Pharmacia Biotech).

50 x TAE-Puffer: 242 g Tris, pH 8,0  
57,1 ml Essigsäure (99 %)  
100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0

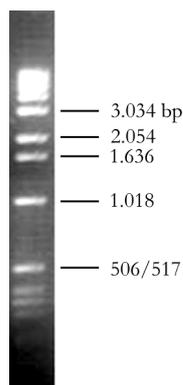


Abbildung 2-2: Verwendeter Größenstandard: 1 kb DNA-Leiter. Die Längen ausgewählter DNA-Fragmente sind angegeben.

### 2.3.4 ELUTION VON DNA AUS DEM AGAROSEGEL

Die durch die Einlagerung von Ethidiumbromid im UV-Licht (302 nm) sichtbar gemachte DNA-Bande wurde mitsamt der umgebenen Agarose ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Zur Isolierung der DNA aus dem Gel wurde das QIAEX II System (QIAGEN, Hilden) verwendet und die einzelnen Schritte entsprechend der Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Effizienz der Elution wurde durch erneute Auftrennung eines Anteils der gewonnenen DNA überprüft.

## 2.4 KLONIERUNG VON CDNA

### 2.4.1 T/A-KLONIERUNG VON PCR-FRAGMENTEN

Die *Taq* DNA-Polymerase weist eine matrizenunabhängige terminale Transferaseaktivität für dATP auf, so daß die meisten bei der Amplifizierung entstehenden Produkte am 3'-Ende ein einzelnes überhängendes Deoxyadenosin (A) tragen. Diese Eigenschaft wird von dem Klonierungssystem „TA TOPO Cloning Kit<sup>®</sup>“ (Invitrogen) ausgenutzt, denn der speziell zur Subklonierung von PCR-Produkten entwickelte linearisierte Vektor pCR<sup>®</sup>2.1 TOPO besitzt an den 3'-Enden jeweils ein einzelnes überhängendes dTTP, welches eine effiziente Ligation von PCR-Produkten begünstigt. Durch die Konjugation einer Topoisomerase an die Enden des Vektors ist die Ligation innerhalb von 5 min bei Raumtemperatur möglich. Das Prinzip der T/A-Klonierung ist in der folgenden Abbildung dargestellt:

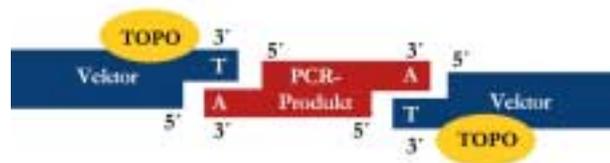


Abbildung 2-3: Schematische Darstellung der Polylinker-Region des Vektors pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO zur Verdeutlichung des Klonierungsprinzips. Die Topoisomerase ist gelb dargestellt.

Die Ligationsreaktion wurde entsprechend des Herstellerprotokolls angesetzt und nach 5 min abgestoppt. Sie konnte unmittelbar für die Transformation (s. 2.4.3) eingesetzt werden.

Der Vektor pCR<sup>®</sup>2.1 TOPO trägt in seiner Polylinker-Region, dargestellt in Abbildung 2-4, den Promotorabschnitt für die T7 RNA-Polymerase. Außerdem enthält er verschiedene Restriktionsschnittstellen, die die Charakterisierung der Insertion als auch anschließendes Umklonieren in andere Vektoren ermöglichen. Die Begrenzung der Polylinker-Region durch unterschiedliche Primersequenzen erlaubt die Sequenzierung der DNA-Insertion (s. 2.5) nach erfolgter Klonierung. Zusätzlich besitzt der Vektor die Resistenzgene für Ampicillin und Kanamycin, was der Selektion von plasmidtragenden Bakterien dient. Die Unterscheidung von rekombinanten und religierten Plasmiden wird dadurch möglich, da die Unterbrechung des  $\beta$ -Galaktosidasegens bei Insertion die Umsetzung von X-Gal zu einem blauen Farbstoff verhindert. Deshalb weisen weiße Kolonien auf LB-Agarplatten auf transformierte Bakterien mit rekombinanten Plasmiden hin, die anderen Kolonien sind hingegen blau gefärbt.

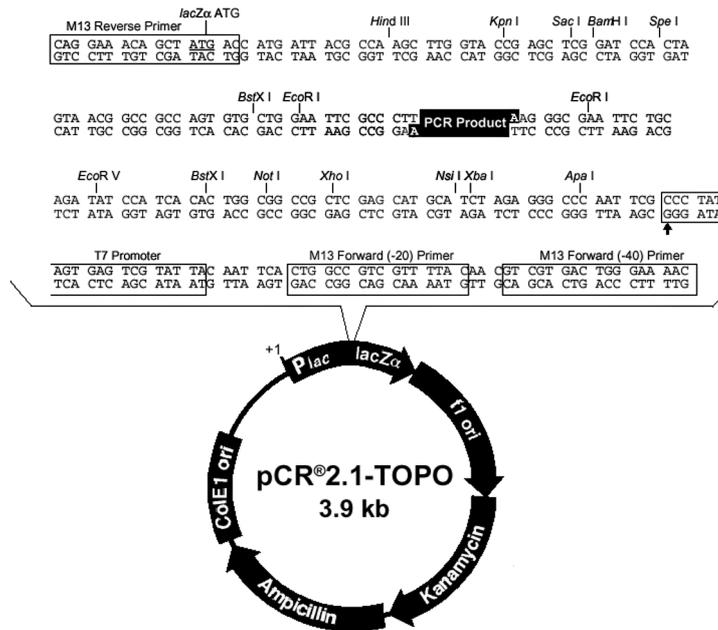


Abbildung 2-4: Aufbau des Vektors pCR® 2.1-TOPO. Die Bereiche der beiden Resistenzgene, das Lactose Operon (Plac und lacZa), der Startpunkt für die Infektion mit einem Helferphagen (F1 ori), sowie der Replikationsstartpunkt für das Plasmid (ColE1 ori) sind gekennzeichnet. Außerdem ist die Sequenz des Polylinkers mit den Positionen der Primer „M13 Reverse“, „M13-(20 und 40) Forward“ und die des T7-Promotors angegeben. Restriktionsschnittstellen und der Bereich für die Insertion des PCR-Produktes sind gekennzeichnet.

#### 2.4.2 STANDARDVERFAHREN ZUR KLONIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN

Die Effizienz einer Ligationreaktion von linearisiertem Vektor und cDNA wird von deren molarem Verhältnis beeinflusst, wobei Religation des Vektors mit der erwünschten Reaktion konkurriert. Für eine optimale Ligation sollte ein Konzentrationsverhältnis  $V$  von 3:1 (Insertion/Vektor-DNA) vorliegen. Die zur Ligation benötigte Menge an cDNA in Bezug zur eingesetzten Menge an linearisierte Vektor-DNA wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$x \text{ ng cDNA} = \frac{V * \text{Länge der cDNA} [bp] * \text{ng Vektor}}{\text{Länge des Vektors} [bp]} \quad \text{[Gleichung 2-3]}$$

In einem Ligationsansatz waren folgende Komponenten enthalten:

- 2 µl 10 x Ligationspuffer (MBI Fermentas)
- x µl cDNA
- 500 ng modifizierter Vektor
- mit bidest. Wasser auf 20 µl auffüllen
- 4 µl T4 DNA Ligase (1 Weiss U/µl, MBI Fermentas)
- 10 x Ligationspuffer: 400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 5 mM ATP; pH7,8

Die Reaktion wurde bei 16°C über Nacht inkubiert, die T4 DNA Ligase anschließend 5 min bei 75°C inaktiviert. In der nachfolgenden Transformation wurden maximal 5 µl der Ligation eingesetzt.

### 2.4.3 TRANSFORMATION

In den überwiegenden Fällen wurde zur Transformation der *E. coli* Stamm TOP10F', der ebenfalls als kompetente Zellen im TOPO T/A-Klonierungssystem enthalten war, verwendet. Er hat folgenden Genotyp: F'*lad*<sup>q</sup> Tn10 (Tet<sup>R</sup>)} *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 recA1 ara*Δ139 Δ(*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1 nupG*.

Die einzelnen Transformationsschritte richteten sich nach dem Herstellerprotokoll, wobei 1 µl des Ligationsansatzes (s. 2.4.1) mit 50 µl kompetenter Zellen vorsichtig vermischt und für 30 min auf Eis belassen wurde. Nach einer kurzzeitigen Hitzeschockbehandlung der Zellen (30 sec, 42°C) wurden sie erneut auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen mit 300 µl SOC-Medium bei 37°C für 1 h mit 225 Upm geschüttelt, bis sie auf LB-Agarplatten, die Ampicillin (50 µg/ml), IPTG (60 µg/ml) und X-Gal (40 µg/ml) enthielten, ausgestrichen wurden. Über Nacht wurden die Platten bei 37°C inkubiert und transformierte Bakterien durch ihre Ampicillinresistenz und Blau-/Weißfärbung selektiert.

- SOC-Medium (pH 7,0):
- 2 % Trypton
  - 0,5 % Hefeextrakt
  - 10 mM NaCl
  - 2,5 mM KCl
  - 10 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 10 mM MgSO<sub>4</sub>
  - 20 mM Glucose

---

LB-Nähragar (pH 7,0):	1% NaCl
	1% Trypton
	0,5% Hefeextrakt
	1,5% Agar

Die weißen Kolonien dienten zur Plasmidisolierung, indem jeweils eine Übernachtskultur angezogen und diese wie unter 2.3.1 beschrieben behandelt wurde. Nachfolgend wurde das Plasmid durch Restriktionsspaltung und elektrophoretische Auftrennung charakterisiert.

## 2.5 SEQUENZIERUNG

Die Sequenzierung von DNA erfolgte im Rahmen des SFB 251 "Ökologie, Physiologie und Biochemie pflanzlicher und tierischer Leistung unter Streß" Zur Ermittlung der Sequenzen wurde die Kettenabbruchmethode, auch als Sanger-Coulson-Methode bekannt, verwendet. Dabei kam der „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ (Amersham) zum Einsatz.

Die Sequenzierungen wurden mittels Software des Herstellers LI-COR (Base Imagir 4.0) ausgewertet. Zum Vergleich der ermittelten DNA-Sequenzen mit bereits bekannten wurde der BLAST-Algorithmus (ALTSCHUL *et al.*, 1990) vom NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/-BLAST/>) verwendet.

## 2.6 RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON NUKLEINSÄUREN

### 2.6.1 SYNTHESE RADIOAKTIV- MARKIERTER GESAMT-CDNA

(nach SAMBROOK *et al.*, 1989)

Eine zur mRNA komplementäre <sup>32</sup>P-markierte cDNA-Sonde wurde unter Verwendung einer Reversen Transkriptase, wobei die für eukaryotische mRNAs charakteristische Poly(A)<sup>+</sup>-Sequenz am 3'-Ende für die Bindung des Oligo-dT-Primers genutzt wurde, synthetisiert.

---

Reaktionsansatz (50 µl):	10 µg Gesamt-RNA
	10 µl 5 x Puffer (GibcoBRL)
	1 µg Oligo-dT-Primer
	5 µl 0,1 M DTT
	40 nmol dATP, dGTP, dTTP (MBI Fermentas, Litauen)
	120 pmol dCTP
	10 µl [ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] dCTP (spez.Aktivität > 3.000 Ci/mmol, 10 µCi/µl)
	2 µl RT Superscript II (200 units/µl; GibcoBRL)

Nach zehnmütiger Denaturierung von RNA und Primer bei 70°C wurden die anderen Reagenzien dem Ansatz zugesetzt und die cDNA-Synthese für eine Stunde bei 42°C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) und 2 µl 10% SDS abgestoppt. Eine anschließende Inkubation (30 min, 68°C) im alkalischen Milieu (6 µl 3 N NaOH) diente dem Abbau der RNA. Der Reaktionsansatz wurde nach Abkühlung auf Raumtemperatur mit 20 µl 1 M Tris/HCl (pH 7,4) vermischt, 6 µl 2 N HCl hinzugefügt und nachfolgend einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterworfen. Die Abtrennung markierter cDNA von nicht eingebauten Nukleotiden wurde durch selektive Präzipitation mit 3 M Natriumacetat und Ethanol bei -80°C erreicht.

### 2.6.2 SYNTHESE EINER SPEZIFISCHEN EINZELSTRANGSONDE

(modifiziert nach STÜRZL UND ROTH, 1990)

Die Herstellung einer spezifischen Einzelstrangsonde beruht auf einer linearen PCR-Reaktion, bei der jeweils nur ein genspezifischer Primer verwendet wird. Als Matrize diente ein zuvor aus dem entsprechenden rekombinanten Vektor mittels geeigneter Restriktionsenzyme erhaltenes cDNA-Fragment.

Reaktionsansatz (100 µl):	100 pmol genspezifischer Primer
	10 µl 10 x Taq Reaktionspuffer
	5 µl 5 mM MgCl <sub>2</sub>
	200 µM dATP, dGTP, dTTP
	6,25 µM dCTP
	50 µCi [ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] dCTP (spez.Aktivität > 3.000 Ci/mmol)
	2,5 u Taq DNA Polymerase (AGS, Biotherm)
	10 <sup>9-10</sup> Kopien der zu markierenden DNA

Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler der Firma Hybaid unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Denaturierung	Anlagerung der Primer	Synthese	Anzahl der Zyklen
94°C/ 5 min			1
94°C/ 30 sec	T <sub>A</sub> / 30 sec	72°C/ 1 min	40
	T <sub>A</sub> / 30 sec	72°C/ 2 min	1

T<sub>A</sub> entspricht der für den jeweiligen genspezifischen Primer optimalen Anlagerungstemperatur (Anhang). Über eine Sephadex G-50-Säule wurden nicht eingebaute Nukleotide durch Zentrifugation (2 min, 3.000 Upm) abgetrennt und der Einbau an [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP durch Szintillationsmessung bestimmt. Die Aktivität einer spezifischen Einzelstrangsonde für Northern Hybridisierungen betrug mindestens 10<sup>7</sup> cpm.

### 2.6.3 SYNTHESE MARKIERTER DNA MIT „RANDOM“-PRIMERN

Dieser zur Markierung von DNA verwendeten Methode liegt ein von FEINBERG UND VOGELSTEIN (1983) entwickeltes Verfahren zugrunde. Eine Mischung aus Oligonukleotiden, die alle statistisch möglichen Nukleotidsequenzen abdecken, dient als Primer für eine DNA-Polymerase („Klenow-Fragment“). Das nach dem beschriebenen Prinzip arbeitende „ready-to-go“ DNA Labelling System (Amersham Pharmacia Biotech) ist geeignet zur Markierung von geringen Mengen DNA (25-50 ng) mit einer spezifischen Aktivität von mehr als 10<sup>9</sup> dpm/ $\mu$ g DNA. In einem Reaktionsgefäß wurde das lyophilisierte Sediment aus dATP, dGTP, dTTP, Zufallsprimern, Reaktionspuffer sowie FPLC*pure*<sup>TM</sup> Klenow Fragment in bidest. Wasser gelöst und auf Eis die zuvor denaturierte zu markierende DNA als auch 50  $\mu$ Ci [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP zugefügt. Das Gesamt-Reaktionsvolumen betrug 50  $\mu$ l. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurden nicht eingebaute Nukleotide durch Säulenchromatographie an Sephadex G-50 abgetrennt.

## 2.7 HYBRIDISIERUNG VON NUKLEINSÄUREN

Nach der Fixierung der RNA bzw. DNA auf der Membran wurde diese in eine Hybridisierungsröhre überführt und zunächst für 30 min bei Raumtemperatur in 5 x SSC, 0,5% SDS gewaschen. In einem Hybridisierungskubator (Biometra) wurde die Membran anschließend bei 68°C mindestens eine halbe Stunde mit Hybridisierungslösung (Roth) vorhybridisiert. Die eigentliche Hybridisierung erfolgte nach Zugabe der zuvor denaturierten radioaktiv-markierten Sonde (s. 2.6) über Nacht. Um unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen, wurde die Membran in mehreren Schritten bei 68°C mit zunehmender Stringenz gewaschen:

30 min	Hybridisierungslösung
30 min	1 x SSC, 0,1% SDS
30-90 min	0,1 x SSC, 0,1% SDS
30 min	0,1 x SSC, 0,1% SDS

Die an der Luft getrocknete Membran wurde in Folie eingeschweißt und in einer lichtdichten Kassette auf einen Röntgenfilm (X-ray Retina, Fotochemische Werke Berlin) aufgelegt, der für eine angemessene Zeit bei -80°C exponiert wurde. Die Entwicklung des Filmes erfolgte in speziellen Entwicklungs- und Fixierlösungen (Kodak).

Eine Membran kann für mehrmalige Hybridisierungen verwendet werden. Dazu muß die bereits gebundene Radioaktivität durch wiederholtes Waschen in 0,1 x SSC, 0,1% SDS bei 95°C entfernt werden. So behandelte Membranen können bis zu ihrer Wiederverwendung bei 4°C aufbewahrt werden.

Mit Hilfe der Image Master VDS Software (Pharmacia Biotech) wurden die durch Hybridisierung erhaltenen Signale quantifiziert. Die Meßwerte stehen in Relation zur Stärke des jeweiligen Signals in der RNA von unbehandelten Tomaten, die auf 1 festgelegt wurde.

## 2.8 SUPPRESSIVE SUBTRAKTIONSHYBRIDISIERUNG

Die subtraktive Hybridisierung stellt eine effiziente Methode zur Isolierung von cDNAs unterschiedlich exprimierter Gene dar und findet Anwendung in der Untersuchung von biologischen Prozessen, die mit einer veränderten Genexpression verbunden sind. Der verwendete PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech) basiert auf einem von DIATCHENKO *et al.* (1996) entwickelten Verfahren, das durch Kombination von subtraktiver Hybridisierung und anschließender PCR zur Anreicherung von cDNAs führt, die nur in einer der

zu vergleichenden RNA-Populationen vertreten ist. In der Abbildung 2-5 ist der Ablauf der subtraktiven Hybridisierung schematisch dargestellt.

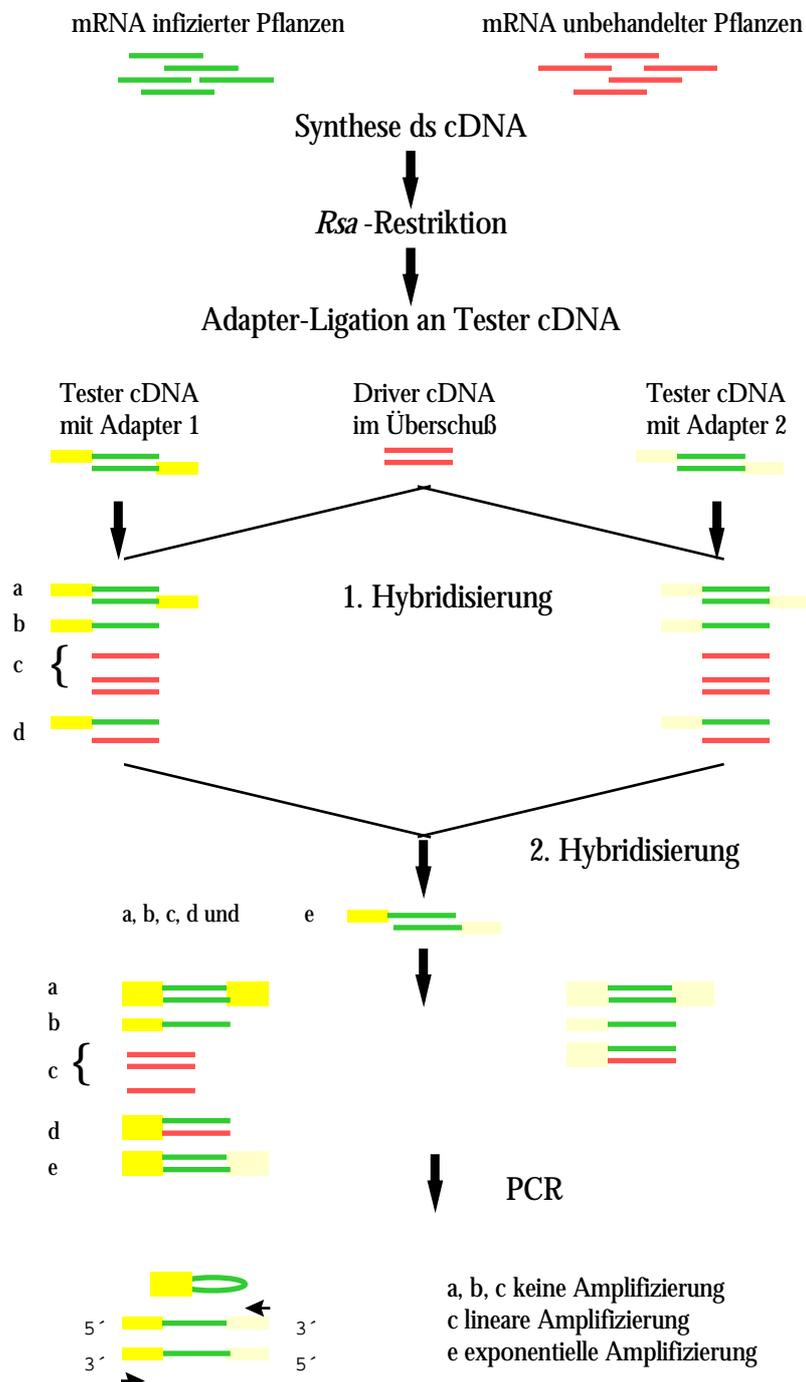


Abbildung 2-5: Darstellung des grundlegenden Ablaufs der suppressiven Subtraktionshybridisierung. Die mRNA bzw. cDNA ist grün (aus infizierten Pflanzen stammend) bzw. rot (aus unbehandelten Pflanzen) gekennzeichnet. Die Adaptoren sind gelb dargestellt.

### 2.8.1 cDNA-SYNTHESE

Die Durchführung der einzelnen Schritte entsprach dem Herstellerprotokoll. Zunächst wurde von jeweils 1 µg Poly(A)<sup>+</sup>-RNA unbehandelter Tomaten, der sogenannten „Driver“-Population, als auch der infizierter Pflanzen (12 h nach Infektionsbeginn, „Tester“-Population) die entsprechende doppelsträngige cDNA hergestellt.

Erststrangsynthese: 1 µg Poly(A)<sup>+</sup>-RNA in 4 µl  
10 pmol cDNA Synthese Primer (5'-TTTTGTACAAGCTT<sub>30</sub>-3')

Nach zweiminütiger Inkubation des Ansatzes bei 70°C und anschließendem Abkühlen auf Eis wurden folgende Reagenzien zugesetzt:

2 µl 5 x Erststrangpuffer  
1 µl dNTP Mix (10 mM)  
1 µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (1 µCi, 3.000 Ci/mmol)  
1 µl MMLV Reverse Transkriptase (200 u/µl)

Die Reaktion wurde für 1,5 h bei 42°C inkubiert und die Erststrangsynthese durch Setzen auf Eis beendet. Im zweiten Schritt der cDNA-Synthese wurden zum obigen Reaktionsansatz weitere Komponenten hinzugefügt:

48,4 µl steriles Wasser  
16,0 µl 5 x Zweitstrangpuffer  
1,6 µl dNTP Mix (10 mM)  
4 µl 20 x Zweitstrang - Enzymcocktail

Die Synthese erfolgte innerhalb von 2 h bei 16°C. Im Anschluß wurden 2 µl (6 u) T4 DNA-Polymerase zugegeben und die Reaktion weitere 30 min bei 16°C inkubiert. Mit 4 µl 20 x EDTA/Glycogen Mix wurde die Zweitstrangsynthese abgestoppt und mit 100 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Aus der wäßrigen Phase wurde die cDNA mit 0,5 Volumen 4 M NH<sub>4</sub>OAc und 2,5 Volumen 95% Ethanol ausgefällt und mit 500 µl 80% Ethanol gewaschen. Das an der Luft getrocknete Präzipitat wurde in 50 µl Wasser wieder aufgelöst und 43,5 µl für die folgende Restriktionsspaltung eingesetzt, die zur Bildung kürzerer cDNA-Fragmente mit glatten Enden führt, eine Voraussetzung für Adapter-Ligation und Subtraktionshybridisierung.

In einem Reaktionsgefäß wurden 43,5 µl ds cDNA, 5 µl 10 x *Rsa* I Restriktionspuffer und 1,5 µl *Rsa* I (10 u/µl) miteinander gemischt und für 1,5 h bei 37°C belassen. Bevor die Reaktion

durch Zugabe von 2,5 µl 20 x EDTA/Glycogen Mix beendet wurde, wurden 5 µl des Ansatzes zur Analyse der Effizienz der Spaltung abgenommen. Die fragmentierte cDNA wurde wie oben beschrieben extrahiert und präzipitiert, das cDNA-Pellet in 5,5 µl Wasser aufgenommen. Von der „Tester“- cDNA wurden 1,5 µl mit 7,5 µl Wasser verdünnt und für die Adapter-Ligation eingesetzt:

2 µl „Tester“-cDNA  
 2 µl Adapter 1 bzw. Adapter 2 (10 µM)  
 3 µl H<sub>2</sub>O  
 2 µl 5 x Ligasepuffer  
 1 µl T4 DNA Ligase (400 u/µl)

Adapter 1: 5'- CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT -3'  
 3'-GGCCCGTCCA -5'

Adapter 2: 5'- GTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTTCGCGGCCGAGGT -3'  
 3'- CGGCTCCA -5'

In einem dritten Reaktionsgefäß wurden zur Kontrolle [c] für die spätere Subtraktion jeweils 2 µl der Ansätze 1 und 2 miteinander gemischt. Alle Reaktionen wurden bei 16°C über Nacht inkubiert und die Ligation durch 1 µl 20 x EDTA/Glycogen Mix beendet. Die Ligase wurde durch Erhitzen auf 72°C für 5 min inaktiviert.

### 2.8.2 SUBTRAKTIONSHYBRIDISIERUNG

In der nun folgenden ersten Hybridisierung wurden beide „Tester“- cDNAs (verschiedene Adapter tragend) in getrennten Reaktionen mit einem Überschuß an „Driver“-cDNA versetzt, und nach der Denaturierung der Proben kam es zur Bildung von Hybriden zwischen „Tester“- und „Driver“-cDNA. Auf diese Weise sollte ein Ausgleich zwischen häufig und selten vertretenen cDNAs erreicht werden. Weiterhin kam es zur Anreicherung von einzelsträngigen cDNAs, die in den zu vergleichenden Populationen unterschiedlich exprimiert sind. Die Hybridisierungsreaktionen setzten sich wie folgt zusammen:

#### Reaktion 1

1,5 µl „Driver“- cDNA  
 1,5 µl „Tester“- cDNA 1 (mit Adapter 1)  
 1 µl 4 x Hybridisierungspuffer

#### Reaktion 2

1,5 µl „Driver“- cDNA  
 1,5 µl „Tester“- cDNA 2 (mit Adapter 2)  
 1 µl 4 x Hybridisierungspuffer

Nach 1,5 min Denaturierung bei 98°C wurden die Reaktionen für 8 h bei 68°C belassen. Die beiden Proben wurden daraufhin vereinigt und frisch denaturierter „Driver“ zugefügt. Dafür wurden zuvor 1 µl „Driver“-cDNA, 1 µl 4 x Hybridisierungspuffer und 2 µl steriles H<sub>2</sub>O vermischt und 1 µl davon 1,5 min bei 98°C denaturiert. Der zweite Hybridisierungsschritt erfolgte über Nacht bei 68°C und wurde durch die Zugabe von 200 µl Verdünnungspuffer und 7 min Erhitzen auf 75°C abgeschlossen.

### 2.8.3 AMPLIFIKATION DER SUBTRAHIERTEN cDNAs

Die PCR-Reaktion ermöglichte die selektive Amplifikation der unterschiedlich exprimierten cDNAs. Es wurden parallel zwei Reaktionen durchgeführt, eine mit subtrahierter cDNA, die andere mit unsubtrahierter cDNA [c] (s. 2.8.1), die zuvor 1:1000 verdünnt wurde. Ein Reaktionsansatz enthielt folgende Komponenten:

- 1 µl cDNA (subtrahiert oder Kontrolle)
- 2,5 µl 10 x PCR Reaktionspuffer
- 0,5 µl dNTP Mix (10 mM)
- 1 µl PCR - Primer 1 (10 µM, 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3')
- 0,5 µl 50 x Advantage KlenTaq Polymerase Mix (Clontech)
- 19,5 µl H<sub>2</sub>O

Zunächst wurden die Adapter durch 5 min Inkubation bei 75°C aufgefüllt, um Bindungsstellen für den PCR-Primer zu schaffen. Die sich anschließende erste PCR-Reaktion verlief in 30 Zyklen unter den angegebenen Bedingungen:

Denaturierung	Primer Anlagerung	Extension
94°C - 30 sec	66°C - 30 sec	72°C - 1,5 min

Für die zweite PCR-Reaktion wurden 3 µl der ersten 1:10 verdünnt und davon 1 µl verwendet. In einem Reaktionsgefäß wurden

- 1 µl PCR - Produkt (aus der ersten PCR)
- 2,5 µl 10 x PCR - Reaktionspuffer
- 1 µl Nested Primer 1 (10 µM, 5´ - TCGAGCGGCCGCCCCGGGCAGGT- 3´)
- 1 µl Nested Primer 2 (10 µM, 5´ - AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT- 3´)
- 0,5 µl dNTP Mix (10 mM)
- 0,5 µl 50 x Advantage KlenTaq Polymerase Mix
- 18,5 µl H<sub>2</sub>O

gemischt und in 15 Zyklen amplifiziert:

Denaturierung	Primer Anlagerung	Extension
94°C - 30 sec	68°C - 30 sec	72°C - 1,5 min

Die PCR-Reaktion wurde mit einem weiteren Extensionsschritt für 5 min abgeschlossen.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden für eine T/A-Klonierung (s. 2.4) eingesetzt.

#### 2.8.4 DURCHMUSTERN DER SUBTRAHIERTEN cDNA-BIBLIOTHEK

Alle Klone, die aus der subtraktiven Hybridisierung hervorgegangen sind, wurden daraufhin untersucht, ob sie tatsächlich in unterschiedlicher Häufigkeit in den Ausgangspopulationen („Tester“, „Driver“) vorliegen. Hierfür wurden sämtliche Klone in einer PCR-Reaktion so eingesetzt, daß das im jeweiligen Plasmid inserierte cDNA-Fragment amplifiziert wurde.

- Reaktionsansatz (20 µl):
- 2 µl 10 x PCR - Reaktionspuffer
  - 1 µl dNTP Mix (5 mM)
  - 1 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM)
  - 0,5 µl T7 Primer (10 µM)
  - 0,5 µl M13 reverse Primer (10 µM)
  - 0,2 µl Taq Polymerase (1 u)
  - 14,8 µl bidest. H<sub>2</sub>O

Mit einem sterilen Zahnstocher wurde eine geringe Menge an Bakterien aus der Glycerinkultur des entsprechenden Klones in das Reaktionsgefäß eingebracht und lieferte so die Matrize für die PCR. Die Reaktionen wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt.

Anzahl der Zyklen	Denaturierung	Primer Anlagerung	Extension
1	94°C - 5 min		
25	94°C - 30 sec	54°C - 30 sec	72°C - 1 min
1			72°C - 5 min

Im Anschluß wurden jeweils 1,5 µl der einzelnen Reaktionen auf eine Nylonmembran punktförmig aufgebracht. Nach dem Trocknen wurde durch die Membranen 5 min lang Denaturierungspuffer (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH), gefolgt von 5 min Neutralisierungspuffer (1,5 M NaCl, 1 M Tris/HCl, pH 7,5) und abschließend 4 x SET Puffer (0,6 M NaCl, 4 mM EDTA, 80 mM Tris/HCl, pH 7,8) gesaugt. Die Filter wurden bei Raumtemperatur luftgetrocknet und die DNA anschließend durch UV-Strahlung fixiert. Für das Screening wurden Sonden, die „Tester“- und „Driver“-Population repräsentieren, synthetisiert (s. 2.6.1) und diese für die Hybridisierung der Membranen (s. 2.7) verwendet. Da die Filter jeweils in doppelter Ausführung zur Verfügung standen, konnte einer mit der „Tester“- , der andere mit der „Driver“-Sonde hybridisiert werden. Ein Vergleich der erhaltenen Signale nach Autoradiographie ergab Aufschluß über die differentielle Expression des zugehörigen Gens.

## 2.9 „RACE“-PCR

Durch die subtraktive Hybridisierung wurden nur cDNA-Fragmente erhalten, d.h., es fehlen in den meisten Fällen sowohl 5'- als auch 3'-Ende der vollständigen cDNA-Sequenz. Um diese zu isolieren, stand ein sehr effizientes „RACE“-System ( Rapid Amplification of cDNA Ends) zur Verfügung, das die oft problematische Adapterligation unnötig macht. Der SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) arbeitet nach dem Prinzip einer RT-PCR, wobei das SMART II™ Oligonukleotid ( Switching Mechanism At 5'end of RNA Transcript) in der Erststrangsynthese an das dC-reiche Ende der cDNA bindet und auf diese Weise als verlängerte Matrize für die Reverse Transkriptase fungiert. Der generelle Ablauf dieses Verfahrens ist aus Abbildung 2-6 ersichtlich.

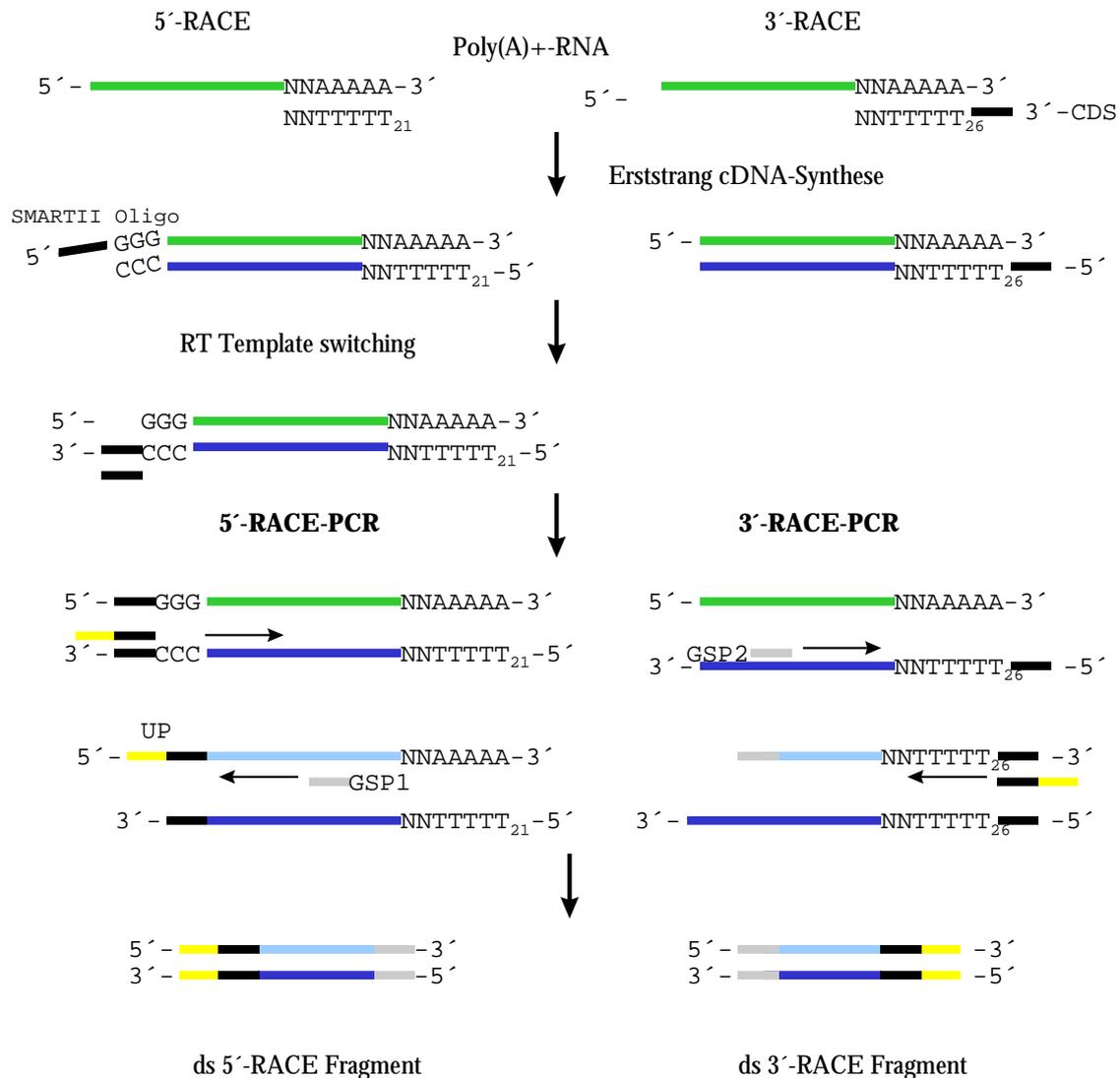


Abbildung 2-6: Schematische Darstellung des Ablaufs von 5'- und 3'-RACE. Die mRNA ist grün gekennzeichnet, die cDNA blau. Die SMART-Sequenz entspricht dem schwarzen Balken. Der an diesen Bereich bindende Primer ist gelb-schwarz.

### 2.9.1 ERSTSTRANGSYNTHESE

Die Durchführung der „RACE“-PCR erfolgte nach den Angaben im Herstellerprotokoll. Getrennt für die spätere Amplifizierung der cDNA - Enden wurden ausgehend von 1 µg Poly(A)+-RNA die komplementäre 5'-cDNA bzw. 3'- cDNA synthetisiert.

5'- RACE cDNA

3 µl RNA (1 µg)

1 µl 5'-CDS Primer (10 µM)

1 µl SMART II Oligo (10 µM)

3'- RACE cDNA

3 µl RNA (1 µg)

1 µl 3'-CDS Primer (10 µM)

SMART II Oligo: 5'- AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG- 3'

5'-CDS: 5'-(T)<sub>25</sub>N<sub>1</sub>N- 3'3'-CDS: 5'- AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTAC/T)<sub>30</sub>N<sub>1</sub>N- 3'(N = A, C, G, T; N<sub>1</sub> = A, G, C)

Zu beiden Reaktionsansätzen wurden nach 2 min Inkubation bei 70°C und Abkühlen auf Eis folgende Komponenten hinzugefügt:

2 µl 5 x Erststrangpuffer

1 µl DTT (20 mM)

1 µl dNTP Mix (10 mM)

1 µl MMLV Reverse Transkriptase (200 u/µl)

und bei 42°C für 1,5 h der Synthese überlassen. Die Erststrang-cDNA wurde für die weiteren Schritte mit 250 µl Tricin-EDTA Puffer verdünnt und für 7 min auf 72°C erhitzt, um die mRNA zu zerstören.

**2.9.2 5'- UND 3'-RACE**

Zur Amplifizierung der 5'- und 3'-cDNA-Enden wurde zusätzlich der Advantage® 2 Polymerase Mix (Clontech) verwendet. Die Konstruktion der genspezifischen Primer erfolgte unter Berücksichtigung der Herstellerempfehlungen mit Hilfe der Vector NTI 4.0 Deluxe Software. Generell unterscheiden sich die PCR-Reaktionen nur durch die Verwendung der jeweiligen genspezifischen Primer, so daß die einzelnen Ansätze immer wie folgt zusammengesetzt waren:

	<u>5'-RACE</u>	<u>3'-RACE</u>
5'-RACE-cDNA	2,5 µl	
3'-RACE-cDNA		2,5 µl
UPM (10 x)	5 µl	5 µl
GSP1 (10 µM)	1 µl	
GSP2 (10 µM)		1 µl
10 x PCR-Reaktionspuffer	5 µl	5 µl
dNTP Mix (10 mM)	1 µl	1 µl
50 x Advantage 2 Polymerase Mix	1 µl	1 µl
bidest. H <sub>2</sub> O	34,5 µl	34,5 µl

UPM: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT-3'  
 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

Da die Primer so ausgewählt wurden, daß deren T<sub>M</sub> (Schmelztemperatur) über 70°C liegt, konnten alle Reaktionen nach dem gleichen Protokoll durchgeführt werden:

Anzahl der Zyklen	Denaturierung	Primer Anlagerung	Extension
5	94°C - 5 sec	72°C - 3 min	
5	94°C - 5 sec	70°C - 10 sec	72°C - 3 min
20	94°C - 5 sec	68°C - 10 sec	72°C - 3 min

Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel analysiert und 0,5 µl des Ansatzes für die Klonierung in einen T/A-Vektor eingesetzt. Aus den Sequenzdaten für das 5'- bzw. 3'-Ende wurden genspezifische Primer für die Isolierung der Volllänge der cDNA abgeleitet. Abhängig von der Sequenz der verschiedenen cDNAs unterschieden sich die folgenden PCR-Reaktionen hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und der gewählten Parameter:

1 µl cDNA  
 1 µl genspezifischer Primer (10 µM)  
 2,5 µl UPM  
 2,5 µl 10 x PCR - Reaktionspuffer  
 0,5 µl dNTP Mix (10 mM)  
 0,5 µl 50 x Advantage 2 Polymerase Mix  
 17 µl bidest. H<sub>2</sub>O

	cDNA	Primer				
<i>LeEXT1</i>	3'- cDNA	<i>LeEXT</i> sense <sup>1</sup>	22x	94°C, 15 sec	50°C, 15 sec	72°C, 1,5 min
			1x			72°C, 5 min
<i>TRAMP</i>	3'- cDNA	<i>LeAqp</i> sense <sup>2</sup>	30x	94°C, 15 sec	60°C, 15 sec	72°C, 1,5 min
			1x			72°C, 5 min
<i>LeAqp2</i>	5'- cDNA	<i>LeAqp</i> as <sup>3</sup>	35x	94°C, 15 sec	57°C, 15 sec	72°C, 1 min
						72°C, 5 min

<sup>1</sup> 5'- GGATCCACAAACACTGGTCTCTGATTGG- 3'

<sup>2</sup> 5'- GTTCTTGCACTGACCACTCAGCAC- 3'

<sup>3</sup> 5'- CCAATAGGCCAAGGTGTTCC- 3'

Die Produkte der Amplifizierung wurden kloniert und sequenziert.

## 2.10 HETEROLOGE PROTEINEXPRESSION IN *ESCHERICHIA COLI*

Zur Gewinnung von größeren Mengen eines bestimmten Proteins wurden verschiedene prokaryotische und eukaryotische Expressionssysteme entwickelt. Dabei zeichnet sich die Expression von rekombinanten Proteinen in *Escherichia coli* durch die relativ einfache Handhabung aus. Allerdings ist dieses System auch mit einigen Problemen behaftet, da in Eukaryoten synthetisierte Proteine häufig noch verschiedenen Modifizierungen unterworfen sind, die so in Bakterien nicht vorkommen. Inwieweit die posttranslationalen Veränderungen für die Funktion des Proteins essentiell sind, hängt von dem jeweiligen Protein ab.

Es wurde ein Expressionssystem der Firma Amersham Pharmacia Biotech verwendet, bei dem ein Fusionsprotein aus Glutathion-S-Transferase und dem gewünschten Protein gebildet wird. Auf diese Weise ist die immunologische Detektion des Fusionsproteins als auch dessen Aufreinigung über Affinitätschromatographie möglich.

### 2.10.1 HERSTELLUNG DES EXPRESSIONSVEKTORS

Mittels PCR wurde die cDNA von *LeEXT1* amplifiziert und in den T/A-Vektor pCR®2.1 TOPO kloniert. Hierfür wurden die Primer so gewählt, daß die für das Signalpeptid kodierende Sequenz am 5´-Ende fehlt.

Reaktionsansatz:     1 µl cDNA (*LeEXT1*)  
                           2,5 µl 10 x Reaktionspuffer  
                           1 µl dNTP Mix (5 mM)  
                           10 pmol Primer 1<sup>a</sup>  
                           10 pmol Primer 2<sup>b</sup>  
                           0,5 µl Polymerase Mix (Clontech)  
                           18 µl H<sub>2</sub>O

<sup>a</sup>*LeXET1-BamHI*-sense:     5´ - GGATCCGGGTATCCTAGAAGGCCAGTA - 3´

<sup>b</sup>*LeXET1-PstI*-as:         5´ - CTGCAGCCTCATGACTCCACCAATAATGATACACTC - 3´

Anzahl der Zyklen	Denaturierung	Primer Anlagerung	Extension
1	94°C - 5 min		
25	94°C - 15 sec	58°C - 30 sec	72°C - 1 min
1			72°C - 5 min

Die isolierte Plasmid-DNA sowie der Expressionsvektor pGEX-4T2 (Abbildung 2-7) wurden mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *NotI* gespalten. Anschließend erfolgte die Ligation von cDNA und Vektor. Gemeinsam mit dem Plasmid PSB161, das die Information für die tRNAs der Aminosäure Arginin trägt, wurde der rekombinante Vektor in *E. coli* BL21 Zellen (Genotyp: F<sup>-</sup>, *ompT*, *hsdS* (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>), *gal*) transformiert und auf LB-Nähragar mit 100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin selektiert. Der verwendete *E.coli* Stamm ist in seiner Proteaseaktivität reduziert, so daß die rekombinant gebildeten Proteine nicht durch endogene Proteasen angegriffen werden.

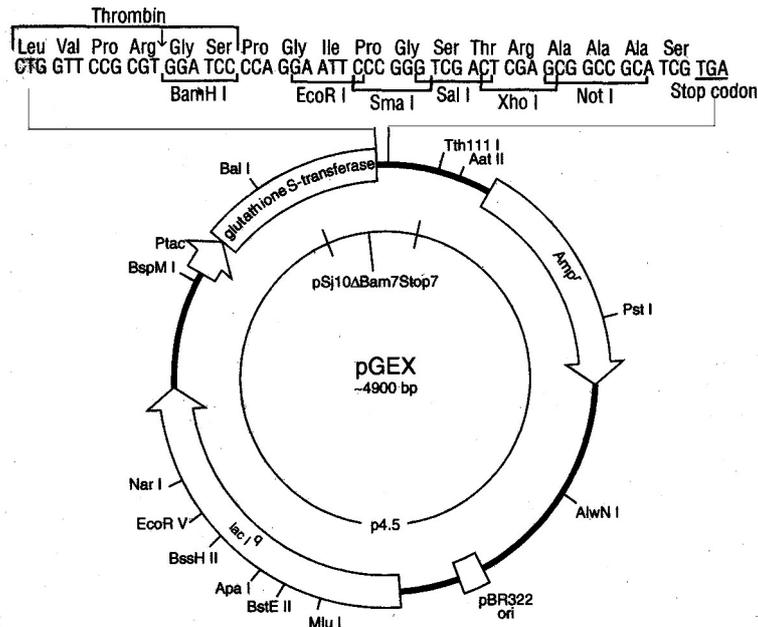


Abbildung 2-7: GST-Fusionsvektor pGEX-4T-2. Enthält *tac* Promoter für Induktion der Expression durch IPTG, die kodierende Region der Glutathione-S-Transferase sowie das Ampicillin-Resistenzgen. Es ist die Polylinkerregion mit Restriktionsschnittstellen und Thrombinschnittstelle dargestellt.

### 2.10.2 PROTEINEXPRESSION

Die Expressionsbedingungen für *GST-LeXET1* wurden zunächst hinsichtlich Temperatur und Expressionsdauer optimiert. Alle Versuche wurden in LB-Nährmedium (100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin) vorgenommen. Ein Teil einer Übernachtskultur wurde 1:40 mit Medium verdünnt und diese bei 37°C im Schüttler inkubiert, bis die Bakterienkultur eine OD 600 von 0,6-0,9 zeigte. Mit 0,3 mM IPTG (Isopropylthiogalactosid) wurde die Expression des Fusionsproteins induziert. Die Zellen wurden anschließend bei 4°C durch Zentrifugation (7.700 x g, 10 min) abgetrennt und in 0,12 Volumen 1 x PBS, 1mM DTT resuspendiert. Durch Ultraschall (6 x 5 sec mit 5 sec Unterbrechung zwischen den einzelnen Zyklen) wurden die Zellen aufgebrochen. Dabei war darauf zu achten, daß die Probe ständig im Eisbad gekühlt wurde. Eine übermäßige Sonifizierung kann zur Denaturierung und somit Funktionsverlust des Proteins führen. Die lösliche Fraktion der Proteine wurde durch Zentrifugieren (15.000 Upm, 10 min, 4°C) gewonnen.

1 x PBS-Puffer:	140 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

### 2.10.3 AUFREINIGUNG DES GST-FUSIONSPROTEINS

Die Verknüpfung von Glutathion-*S*-Transferase und rekombinantes Protein bietet die Möglichkeit das gewünschte Produkt von den bakteriellen Proteinen über Affinitätschromatographie zu reinigen und gleichzeitig zu konzentrieren. Die Bindung des Fusionsproteins an das Säulenmaterial (GST-Affinity Resin, Stratagene) erfolgte zwischen dem an Sepharose gebundenen Glutathion und der GST.

Auf die durch dreimaliges Waschen mit 5 Volumen 1 x PBS-Puffer equilibrierte Glutathion-Sepharose wurde der Proteinextrakt (200 µl Sepharose : 6 ml Extrakt) gegeben und 30 min – 2h langsam bei Raumtemperatur bewegt, um die Bindung des Fusionsproteins zu ermöglichen. Die Sepharose wurde anschließend sedimentiert und nachfolgend noch fünfmal mit 1 x PBS gewaschen. Alle Zentrifugationsschritte wurden 5 min bei 4°C, 500 g ausgeführt. Das rekombinante Protein wurde durch Glutathion (15 mM Glutathion, 100 mM Tris pH 8,5, 1% N-Octylglycoside) vom Säulenmaterial verdrängt, wobei zwei Elutionsschritte (2h und über Nacht, 4°C) notwendig waren. Die Sepharose wurde anschließend regeneriert und konnte somit mehrmals verwendet werden.

Die Expression und Aufreinigung wurde durch Elektrophorese und Immunoblot dokumentiert.

## 2.11 ANALYSE VON PROTEINEN

### 2.11.1 EINDIMENSIONALE GELELEKTROPHORESE

Die Auftrennung der Proteine erfolgte im diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE) nach DAVID (1971).

Oberpuffer (pH 8,64):	0,04 M Borsäure
	0,041 M Tris
	0,1 % SDS
Unterpuffer (pH 9,18):	0,0308 M HCl
	0,4244 M Tris
Sammelgelpuffer (pH 6,1):	0,0267 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	0,0541 M Tris

## Zusammensetzung der Gele:

	<u>Trenngel (10%)</u>	<u>Sammelgel (6%)</u>
Acrylamid-Lösung 40% (Roth)	3,75 ml	1,5 ml
Tris/ HCl-Stammlösung (5x)	3 ml	-
Tris/ H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Stammlösung (4x)	-	2,5 ml
10 % SDS	150 µl	100 µl
H <sub>2</sub> O	8,1 ml	5,9 ml
TEMED	6,75 µl	10 µl
APS 40%	22,5 µl	25 µl

Die Proben wurden mit 0,5 Volumen 20% SDS versetzt und 10 min bei 95°C denaturiert. Nach Zugabe von 0,5 Volumen 4 x Ladungspuffer (Roth) wurden die Proteine auf das Gel aufgetragen und bei konstanter Stromstärke (30 mA) aufgetrennt. Zur Detektion der Proteine im Gel wurden die Coomassie-Färbung, die Silberfärbung nach BLUM *et al.* (1987) bzw. die immunobiochemische Detektion verwendet. In Abhängigkeit von der gewählten Detektionsmethode wurden jeweils Mischungen von Proteinen bekannter Molekülgröße mitaufgetrennt (Abbildung 2-8).

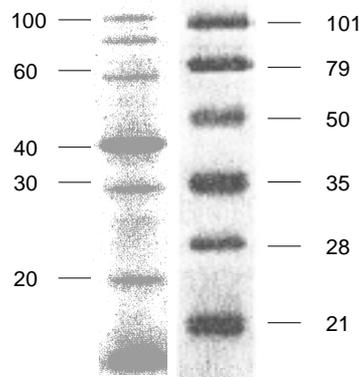


Abbildung 2-8: Verwendete Größenstandards. Roti®-Mark 10-100 (links) und Prestained Marker für die Immunodetektion (rechts) mit angegebenen Molekulargewichten in kDa.

Für die Coomassie-Färbung wurde das Gel zunächst mindestens 1 h in Färbelösung langsam geschüttelt, wobei die Proteine gleichzeitig im Gel fixiert wurden. Überschüssiger Farbstoff wurde durch Bewegung des Geles in Entfärberlösung entfernt. Die Gele wurden mittels Vakuumtrocknung haltbar gemacht.

---

Färbe- und Fixierlösung:	120 ml Methanol
	24 ml Essigsäure
	0,33 g Coomassie Brilliant Blue
	120 ml H <sub>2</sub> O
Entfärber:	10 % Methanol
	7 % Essigsäure

### 2.11.2 ZWEIDIMENSIONALE GELELEKTROPHORESE

Die Charakterisierung von Proteinen sowohl nach ihrem isoelektrischen Punkt (IEP) als auch nach ihrer Molekülgröße durch 2D-Elektrophorese basiert auf einem von O'FARRELL (1975) entwickelten Verfahren. Es wurde für die Auftrennung der *in-vitro*-translatierten Proteine (s. 2.2.5) genutzt. Hierzu wurde jeweils soviel Protein durch Zugabe von 0,1 Volumen 100% TCA gefällt, daß in jedem Präzipitat die gleiche Menge an Radioaktivität enthalten war. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Proben zentrifugiert (10 min, 13.000 Upm) und das Pellet mehrmals mit 98% Ethanol gewaschen.

In der ersten Dimension wurden die Proteine bei ihrem IEP in einem Rundgel fokussiert.

Zusammensetzung der Fokussiergele:	1,4 g Harnstoff (Roth)
	0,248 ml 40% Acrylamidlösung
	0,125 ml 40% Ampholine pH3,5-10 (BIO-RAD)
	0,5 ml 10% Triton-X 100
	0,5 ml H <sub>2</sub> O
	2,5 µl TEMED
	3 µl 40% APS

Im Anschluß an die Polymerisation mußten die Gele mit Lysepuffer vorfokussiert werden, um einen pH-Gradienten innerhalb des Geles aufzubauen. Die Vorfokussierung erfolgte in drei Schritten (15 min → 200V; 30 min → 300V; 30 min → 400V). Nachdem die Auftragsfläche der Gele gründlich mit Wasser gespült worden war, wurden die in Lysepuffer gelösten Proben aufgetragen und bei 4.500 Vh fokussiert.

Lysepuffer: 9,5 M Harnstoff  
2% Triton X-100  
2% Ampholine 3,5-10 (40%ige Stammlösung, Biorad)  
5%  $\beta$ -Mercaptoethanol  
Oberpuffer: 0.02M NaOH  
Unterpuffer: 0.1M  $H_3PO_4$

Bevor die Proteine in der zweiten Dimension nach ihrer Größe aufgetrennt werden konnten, mußten die Fokussiergele equilibriert werden (2 x 15 min). Anschließend wurden die Gele auf das Sammelgel aufgelegt und in Agarose eingebettet. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Stromstärke (20 mA) durchgeführt.

Equilibrierpuffer: 6M Harnstoff  
0.05M Tris pH 8.8  
2% SDS  
1% DTT (erst vor dem Equilibrieren zugeben)  
30% Glycerin  
Bromphenolblau  
0.26M Iodacetamid

#### Trenngel 12,5%

52,8 ml Acrylamid 40%  
33,6,6 ml Tris/HCl pH 9.18  
1,68 ml SDS 10%  
61,2 ml  $H_2O$   
56,1  $\mu$ l TEMED  
262,8  $\mu$ l APS 40%

#### Sammelgel

10 ml Acrylamid 40%  
12,5 ml Tris/ $SO_4$  pH 6.18  
0,5 ml SDS 10%  
26,5 ml  $H_2O$   
0,05 ml TEMED  
0,125 ml APS 40%

Die Proteine wurden mit 10% TCA fixiert und mit DMSO entwässert (3 x 30 min). Zum Abschluß wurde das Gel mit dem Szintillator Diphenyloxazol (PPO, 22% in DMSO) 3 h bei 37°C behandelt, das Gel getrocknet und für mindestens 14 d ein Röntgenfilm exponiert.

### 2.11.3 TRANSFERVERFAHREN FÜR PROTEINE UND IMMUNODETEKTION

Die im Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine wurden mit einer „semi-dry-electro-blot“-Apparatur (Biometra) auf Nitrocellulose-Membranen (Schleicher und Schüll) übertragen. Auf die Kathodenplatte wurden zunächst 3 mit Kathodenpuffer (0,04 M 6-Aminocapronsäure, 20% Methanol) getränkte Filterpapiere von der Größe des Gels gelegt. Anschließend wurden darauf das Gel, die mit Anodenpuffer 2 (0,025 M Tris pH 8,8; 20% Methanol) gesättigte Membran, 3 weitere mit diesem Puffer angefeuchtete Filter und 3 Filter, die mit Anodenpuffer 1 (0,3 M Tris pH 8,8; 20% Methanol) getränkt waren, in der aufgeführten Reihenfolge plaziert. Nachdem die Anodenplatte installiert war, erfolgte der Transfer bei 0,8 mA/ cm<sup>2</sup> über 60 min. Die Proteine wurden auf der Membran mit Ponceau-Lösung (Ponceau S in Essigsäure, ICN) angefärbt und fixiert. Der Farbstoff ließ sich durch Waschen mit Wasser wieder entfernen.

Für den immunobiochemischen Nachweis von GST-Fusionsproteinen wurde die Membran mit den gebundenen Proteinen mindestens 1 h in Blocklösung inkubiert. Nach einstündiger Inkubation mit dem primären Antikörper (Anti-GST aus Ziege gewonnen, Amersham Pharmacia, 1:1.000 in Blockpuffer verdünnt) wurde ungebundener Antikörper mit 1 x PBS/Tween (3 x 5 min) entfernt. Die Bindung des sekundären Antikörpers (Anti-Ziege-IgG, Sigma, 1:30.000 verdünnt in Blockpuffer) erfolgte über 1 h und abschließend wurde die Membran mit 1 x PBS/Tween (3 x 5 min) und 1 x TBS (2 x 5 min) gewaschen. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase setzt die Farbstoffe NBT (Nitroblau-Tetrazolium) und BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyphosphat) zu einem tiefblauen unlöslichen Indigo-Farbstoff und einem purpurn gefärbten Diformazan um. Auf diese Weise konnten die GST-Fusionsproteine auf der Membran detektiert werden. Die Enzymreaktion verläuft im Dunkeln und wird durch Zugabe von 0,5 M EDTA abgestoppt.

10 x PBS (pH 7,3-7,4):	82,3 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	BCIP/ NBT:	33 µl NBT
	23,5 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		16,5 µl BCIP
	40 g NaCl		5 ml TMN-Puffer
1 x PBS/ Tween:	1 l 1 x PBS	TMN-Puffer:	100 mM NaCl
	1 ml Tween 20		100 mM Tris/ HCl pH 9,5
Blockpuffer:	5% Milchpulver		5 mM MgCl <sub>2</sub>
	1 x PBS/ Tween	BCIP:	100 mg in 1,9 ml DMF
10 x TBS:	1,5 M NaCl	NBT:	100 mg in 1,9 ml 70% DMF
	0,5 M Tris/ HCl pH 7,5		

## 2.12 BESTIMMUNG DER XET-AKTIVITÄT

Das Enzym XET (Xyloglucan-Endotransglycosylase) vermittelt die Spaltung von  $\beta$ -1,4- verknüpften Glucose-Resten innerhalb einer Xyloglucan- Kette und überträgt das dadurch entstandene Xyloglucan- Fragment mit seinem reduzierenden Ende auf die 4-O-Position eines Glucose- Restes am nichtreduzierenden Ende eines anderen Xyloglucan-Moleküls (Abbildung 2-9).

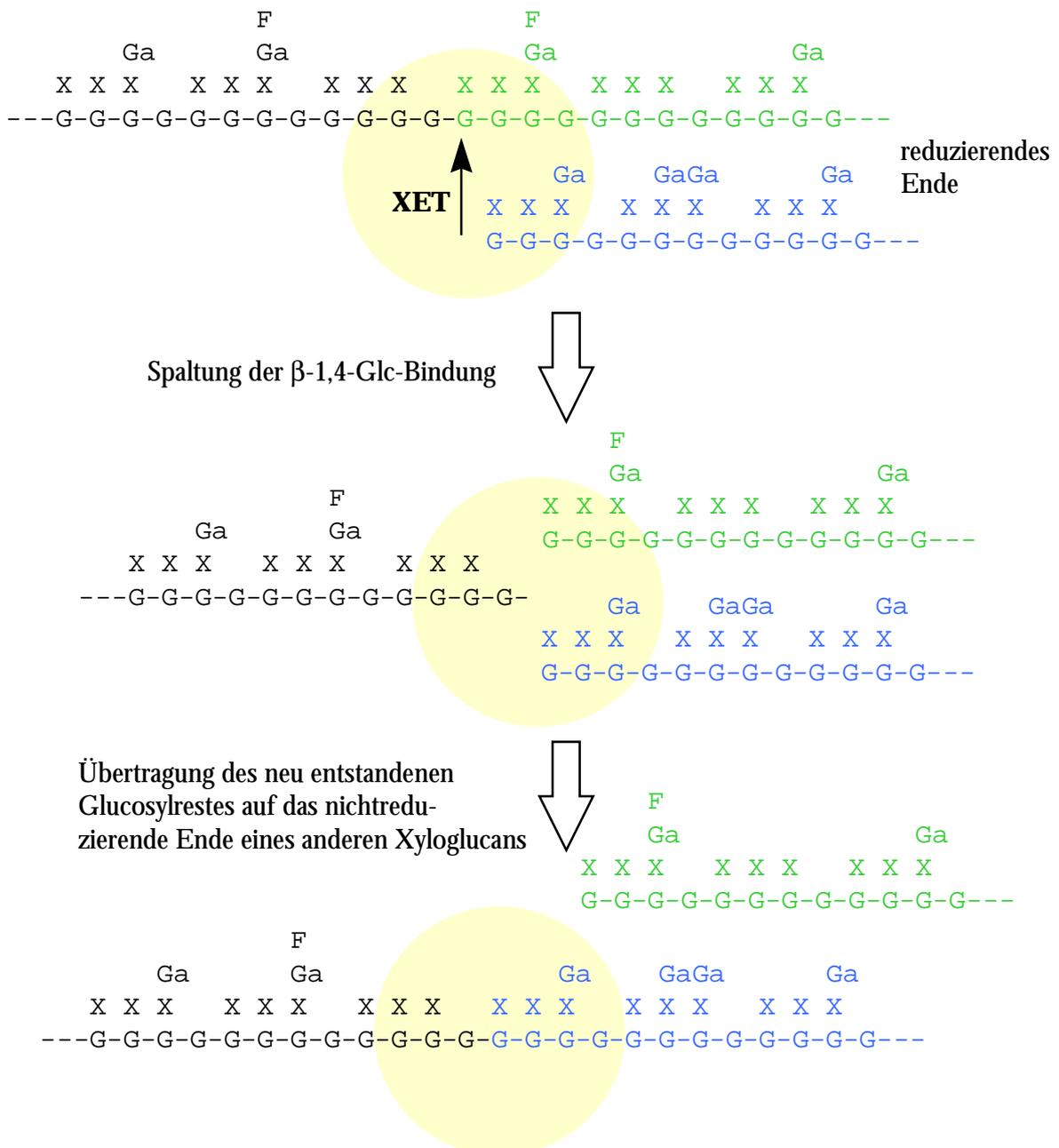


Abbildung 2-9: Schematische Darstellung der XET-katalysierten Übertragung von Xyloglucan-Fragmenten auf andere Xyloglucanmoleküle.

Das benutzte Verfahren zur Messung der XET-Aktivität wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Fry (Edinburgh, UK) entwickelt und beruht auf der Übertragung von radioaktiven Xyloglucan-Oligosacchariden auf ein polymeres Xyloglucan als Akzeptormolekül (FRY *et al.*, 1992). Das aus der Tamarinde stammende Xyloglucan als Akzeptor- Molekül als auch das markierte Oligosaccharid [1-<sup>3</sup>H]XLLGol (Abbildung 2-10) wurden von Prof. Fry zur Verfügung gestellt.

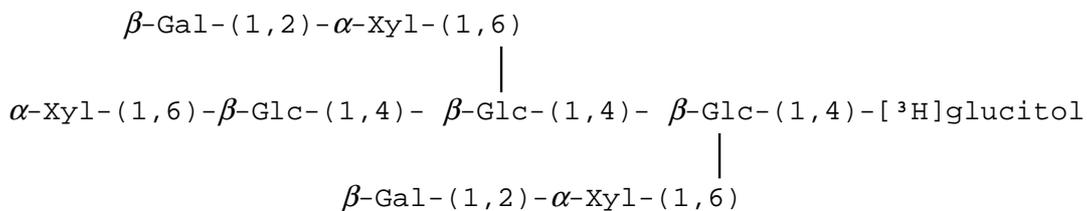


Abbildung 2-101: Struktur des Xyloglucanfragmentes [1-<sup>3</sup>H]XLLGol

Zur Extraktion der Enzymaktivität wurde das tiefgefrorene Gewebe 2 min in einer Kugelmühle sehr fein zerkleinert und anschließend in eiskaltem Puffer A suspendiert, wobei jeweils 1 g Gewebe mit 2 ml Puffer versetzt wurden. Die erschöpfende Extraktion wurde dadurch gewährleistet, daß das Homogenat für 2 h unter gelegentlichem kräftigem Mischen auf Eis belassen wurde. Im Überstand der nachfolgenden Zentrifugation (2.000 g, 4°C, 5 min) war das Enzym enthalten. Für alle Extrakte wurde der Proteingehalt nach der Bradford-Methode bestimmt (BRADFORD, 1976). In einem Reaktionsgefäß wurden 20 µl der Lösung C, die sowohl das Akzeptormolekül als auch das Oligosaccharid enthielt mit 10 µl der Extraktes vermischt und bei Raumtemperatur 1 h inkubiert. Ein Reaktionsansatz beinhaltete 1,4 kBq [1-<sup>3</sup>H]XLLGol und 0,2% Xyloglucan. Die Reaktion wurde mit 100 µl 20% Ameisensäure abgestoppt. Als Kontrollen dienten Ansätze, in denen die Enzym-Präparation durch Puffer A ersetzt war bzw. die Stopplösung vor dem Extrakt zugegeben wurde.

Die Reaktionen wurden auf Rechtecke (4 x 5 cm) Whatman 3MM Papier aufgetragen und 1 h an der Luft getrocknet. Zur Entfernung von nicht umgesetztem [1-<sup>3</sup>H]XLLGol wurde das Papier mindestens 1 h unter laufendem Wasser gespült (das Polymer bleibt am Papier haften) und entweder über Nacht bei Umgebungstemperatur oder durch einstündiges Backen bei 70°C getrocknet. Jedes einzelne Rechteck wurde in einem Szintillationsröhrchen mit ca. 2 ml Emulsifier-Safe™ (Packard Bioscience, Groningen) durchtränkt und die Menge an gebildetem Produkt über Szintillation vermessen. Die Enzymaktivität wurde in CPM/mg Frischgewicht angegeben.

- 
- Lösung A: 50 mM Bernsteinsäure, pH 5,5 (mit NaOH einstellen)  
10 mM CaCl<sub>2</sub>  
1 mM DTT (ICN)
- Lösung B: 0,3% Xyloglucan ( 1 d Rühren bei RT zum Auflösen notwendig)  
0,5% (w/v) Chlorobutanol [= 1,1,1-Trichloro-2-methylpropan-2-ol]  
in Lösung A
- Lösung C: 140 kBq [1-<sup>3</sup>H]XLLGol (80 MBq/μmol) in Lösung B

Die Lösung A sollte jeweils frisch angesetzt werden, die anderen können bei -20°C aufbewahrt werden.

### 3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

#### 3.1 TRANSLATIONSAKTIVITÄT VON POLY(A<sup>+</sup>)-RNA NACH INFEKTION MIT *CUSCUTA REFLEXA*

Durch den Befall einer Pflanze mit dem Parasiten *Cuscuta* werden in der Wirtspflanze unterschiedliche Reaktionen ausgelöst. Im Fall des inkompatiblen Systems *Lycopersicon esculentum*/*Cuscuta reflexa* können mehrere Elemente der Wirtsantwort unterschieden werden.

Die Veränderungen, die im Wirtsgewebe nach Kontakt mit dem Parasiten beobachtet werden können, sollten sich auch in einer veränderten Expression bestimmter Gene in den betroffenen Bereichen widerspiegeln. Besonders interessant scheinen dabei jene zu sein, die schon in frühen Phasen der Infektion im Vergleich zu nicht infizierten Pflanzen unterschiedlich exprimiert werden, da sie für die Regulation der Wirtsantwort von Bedeutung sein können. Um eine Veränderung im Expressionsmuster in den infizierten Zellen festzustellen, wurden Poly(A<sup>+</sup>)-RNAs von Kontroll-, infizierten (12 h nach Infektionsbeginn) und mechanisch verletzten Pflanzen (4 h nach Verletzung) im zellfreien System (Weizenkeimextrakt) unter Einbau von radioaktiv-markiertem L-Methionin translatiert und die Produkte anschließend durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt und nach Autoradiographie analysiert. Der Vergleich von Verwundung und Parasitenbefall diente der Abgrenzung spezifisch bei Infektion gebildeter Produkte von denen, die auch bei einer anderen Streßreaktion, wie sie eine Verletzung darstellt, in der Pflanze auftreten. Auf der Autoradiographie waren nur geringe Unterschiede zwischen Kontroll- und infizierten Pflanzen zu erkennen. Somit war eine qualitative als auch quantitative Erfassung von Proteinen aus den entsprechenden mRNAs, deren Häufigkeit in den verglichenen Populationen unterschiedlich waren, nicht möglich. Zudem waren aufgrund von technischen Problemen nur relativ wenige Proteine erkennbar, weshalb die Proteinflecken keine repräsentative Auswahl der zum jeweiligen Zeitpunkt vorliegenden mRNAs darstellen. Die Ursache dafür kann eventuell darin liegen, daß die Transkripte, die infolge der Infektion akkumuliert werden, in der Zelle nur in sehr geringer Anzahl vorliegen und deshalb mit der gewählten Technik nicht detektiert werden können.

### 3.2 ERFASSUNG VON INFEKTIONSINDUZIERTEN GENEN MITTELS SUPPRESSIVER SUBTRAKTIONSHYBRIDISIERUNG (SSH)

Aufgrund der nicht aussagekräftigen Ergebnisse aus der 2D-Elektrophorese mußte zur Identifizierung von Genen, die durch die *Cuscuta*-Infektion verstärkt transkribiert werden, eine andere Strategie gewählt werden. Aus diesem Grund kam die suppressive Subtraktionshybridisierung, eine Methode, mit der auch sehr seltene mRNA-Spezies erfaßt werden, zur Anwendung.

#### 3.2.1 HERSTELLEN DER „TESTER“- UND „DRIVER“-CDNA

Zunächst wurden ausgehend von den „Tester“- und „Driver“-Poly(A<sup>+</sup>)-RNAs die cDNAs in Gegenwart von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP synthetisiert. Die folgende Restriktionsspaltung mit *RsaI* führte zu kürzeren cDNA-Fragmenten mit glatten Enden. In der Autoradiographie (Abbildung 3-1) ist die Größenverteilung der cDNAs vor und nach der Restriktion dargestellt.



Abbildung 3-1: Autoradiographie der geelektrophoretischen Auftrennung der ds cDNA vor (1) und nach (2) *RsaI*-Restriktion

Jeweils ein Aliquot der „Tester“-Population wurde mit einem Adapter (entweder Adapter 1 oder Adapter 2) versehen und die Effizienz der Adapter-Ligation durch PCR überprüft.

#### 3.2.2 ERFASSUNG RELEVANTER CDNA-KLONE DURCH SUBTRAKTIONSHYBRIDISIERUNG

In einer zweistufigen Subtraktionshybridisierung wurden diejenigen cDNAs entfernt, die sowohl infizierten als auch Kontrollpflanzen entstammen. Durch Zugabe von „Driver“-cDNA zu beiden „Tester“-cDNAs (Adapter 1 bzw. 2 tragend) im Überschuß bildeten sich Hybride aus cDNA-Sequenzen, die in beiden Populationen vertreten waren und folglich nicht auf eine Infektion zurückgehen. Erneute Hybridisierung von überschüssigem „Driver“ mit den inzwischen vereinten Ansätzen aus der ersten Hybridisierung führte zu doppelsträngigen cDNA-Fragmenten, die sich einzig aus der „Tester“-cDNA generieren. Aufgrund ihrer Struktur, sie besitzen an ihren Enden zwei unterschiedliche Adapter, konnten sie in einer PCR-Reaktion amplifiziert werden (Abbildung 3-2). Die PCR-Produkte wurden kloniert und stellen die „subtrahierte“ cDNA-Bibliothek dar.

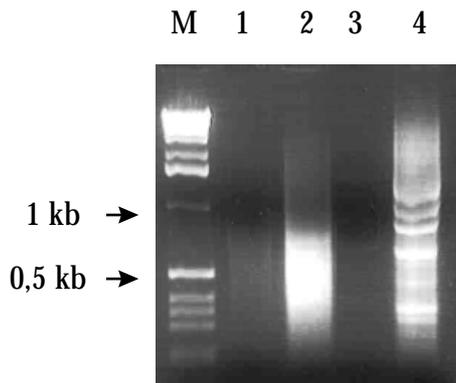


Abbildung 3-2: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte im 2% Agarosegel. Erste und zweite PCR der subtrahierten cDNA. (1;2), der Kontroll-cDNA (3;4).

Auf diese Weise konnten ca. 300 Klone isoliert werden, wobei sich erst durch weitere Charakterisierung herausstellte, inwieweit diese Sequenzen tatsächlich Gene repräsentieren, die infolge des Parasitenbefalls aktiviert werden.

### 3.3 SELEKTION RELEVANTER cDNA-KLONE

Um zu prüfen, welche der Klone eine infolge der Infektion verstärkt akkumulierte mRNA darstellen, wurde eine „umgekehrte“ Northern-Hybridisierung durchgeführt. Die cDNA-Insertionen sämtlicher Klone wurden amplifiziert und die resultierenden Produkte auf eine Membran aufgetragen und fixiert. Als Sonden dienten  $^{32}\text{P}$ -markierte cDNAs von Kontrollen und infizierten Pflanzen. Unterschiedlich starke Signale für einen bestimmten Klon in beiden Hybridisierungen bestätigten, daß die Transkription des entsprechenden Gens durch die Infektion beeinflusst ist.

Aus der „subtrahierten“ cDNA-Bibliothek konnten 20 in diesem Sinne positive Klone erfaßt werden. Ihre Sequenzdaten wurden sowohl auf Basis der Nukleotid- als auch der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit bereits in Datenbanken veröffentlichten verglichen (nach BLAST-Algorithmus, NCBI). Bestehende Homologien zu bekannten Sequenzen können Rückschlüsse auf mögliche Funktionen der codierten Proteine geben. In der Tabelle 3-1 sind die einzelnen Klone, die Fragmentlänge sowie die gefundenen Übereinstimmungen aufgeführt. Die einzelnen Sequenzen finden sich im Anhang. Ausgehend von diesen Daten wurden einzelne Gene hinsichtlich ihrer Expression im Verlauf der Infektion näher charakterisiert. Die verwendeten Klonbezeichnungen stammen aus dem hier beschriebenen Ausleseverfahren.

Tabelle 3-1: Homologien der durch Subtraktionshybridisierung erhaltenen cDNA-Klone. Die Klone sind nach ihrer möglichen Funktion geordnet, neu entdeckte Sequenzen sind hervorgehoben.

	Klon	cDNA Fragment (bp)	Homologie
Allgemeine Streßantwort	E4	237	Übereinstimmung mit Cyclophilin von <i>L. esculentum</i>
	<b>56</b>	270	85% Übereinstimmung mit <i>ADR11-2</i> Protein von <i>G. max</i>
	D6	504	Übereinstimmung mit Glyoxalase-I von <i>L. esculentum</i>
	<b>E5</b>	693	78% Übereinstimmung mit Elongationsfaktor 2 von <i>A. thaliana</i>
Signaltransduktion	<b>57</b>	594	87% Übereinstimmung mit <i>RUB1</i> konjugierendes Enzym von <i>A. thaliana</i>
	<b>63</b>	494	95% Übereinstimmung mit myo-Inositol-1-phosphat Synthase von <i>N. tabacum</i>
Zellstreckung	<b>24</b>	406	79% Übereinstimmung mit V-H <sup>+</sup> ATPase Untereinheit E von <i>C. limon</i>
	<b>E6</b>	712	89% Übereinstimmung zu einem Wasserkanalprotein von <i>N. excelsior</i>
	<b>44</b>	883	98% Übereinstimmung mit $\alpha$ -Tubulin von <i>P. dulcis</i>
	<b>B9</b>	718	Übereinstimmung mit $\beta$ -Tubulin von <i>L. albus</i>
	<b>79</b>	439	89% Übereinstimmung mit <i>qp-wap13</i> , codiert ein Golgi-assoziiertes Protein von <i>V. unguiculata</i>
Zellwand assoziiert	80	528	Übereinstimmung mit <i>LeXET1</i> von <i>L. esculentum</i>
	B11	333	Übereinstimmung mit <i>AROGP3</i> von <i>L. esculentum</i>
	<b>29</b>	250	90% Übereinstimmung mit $\alpha$ -Expansin Präcursor von <i>N. tabacum</i> ( <i>Nt-EXP2</i> )
	<b>69</b>	392	80% Übereinstimmung mit dem C-Terminus einer Endo- $\beta$ -1,4-D-Glucanase von <i>L. esculentum</i>
unbekannte Funktion	<b>4</b>	366	Keine signifikanten Sequenzhomologien gefunden
	<b>53</b>	392	Keine signifikanten Sequenzhomologien gefunden
	<b>55</b>	186	Keine signifikanten Sequenzhomologien gefunden
	<b>72</b>	528	Keine signifikanten Sequenzhomologien gefunden
	<b>E7</b>	214	54% Übereinstimmung mit einem hypothetischen Protein von <i>A. thaliana</i>

Die im Zusammenhang mit der durch *C.reflexa* in der Tomate hervorgerufenen Reaktion isolierten cDNA-Fragmente, lassen sich entsprechend ihrer möglichen Proteinfunktion in verschiedene Gruppen unterteilen. Zum einen handelt es sich um Proteine, die mit dem Auf- und Abbau sowie der Modifizierung der Zellwand assoziiert sind (cDNAs 29, 69, 80 und B11). Diese spielen auch eine Rolle bei der Zellstreckung, ein Phänomen, das nach der Anheftung des Parasiten an den Wirtssproß zu beobachten ist. In den Prozeß der Zellexpansion, der u.a. durch eine erhöhte Stoffwechselaktivität gekennzeichnet ist, können die Produkte der cDNA-Klone 24, E6, 44, B9 und 79 involviert sein. Weiterhin codieren einige cDNAs Proteine, die infolge verschiedenster Streßreaktionen in der Pflanze vermehrt exprimiert werden (cDNAs 56, E4, E5, D6). Das entsprechende Protein des cDNA-Klons 57 ist vermutlich an der Signaltransduktion in der Interaktion zwischen Parasit und Wirt beteiligt. Trotz der getroffenen Zuordnung der einzelnen Proteine zu bestimmten physiologischen Prozessen sind ihre Auswirkungen auf das Zellgeschehen nicht getrennt voneinander zu betrachten, sondern stehen in gegenseitiger Wechselbeziehung.

Aus den isolierten cDNA-Klonen wurden für die weiteren Versuche einige ausgewählt, die nicht nur hinsichtlich ihrer Expression im Infektionsverlauf sondern auch ihrer möglichen Funktion näher charakterisiert werden sollten. Allerdings konnten für manche mRNAs im Northern Blot keine Signale festgestellt werden, was durch die geringe Anzahl der entsprechenden Transkripte in der Gesamt-RNA-Population begründet sein kann. In diesen Fällen beschränkt sich die Diskussion auf die ermittelten Sequenzen. In den folgenden Kapiteln sind die einzelnen cDNAs nach der putativen Proteinfunktion der vollständigen Genprodukte geordnet.

### **3.4 STREßINDUZIERTER GENEXPRESSION**

#### **3.4.1 CHARAKTERISIERUNG DES CYCLOPHILINS (KLON E4)**

##### **3.4.1.1 CYCLOPHILINE**

Cyclophiline (*CyP*) stellen eine ubiquitär in allen Organismen vorhandene, stark konservierte Proteinfamilie dar, die erstmals als intrazellulärer Rezeptor für das Immunsuppressivum Cyclosporin A beschrieben wurde (HANDSCHUMACHER *et al.*, 1984). Neben der Komplexbildung mit Cyclosporin A katalysiert *CyP* auch die *cis-trans*-Isomerisierung von Peptidyl-Prolyl-Bindungen von Proteinen (FRESKARD *et al.*, 1992). Dadurch wird die richtige Faltung einiger Proteine erst ermöglicht.

In der Zelle liegen aufgrund deren Kompartimentierung unterschiedliche Formen der Cyclophiline vor, so sind sowohl cytoplasmatische als auch mitochondriale, mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) assoziierte, und im Chloroplasten lokalisierte *CyPs* bekannt. Sie unterscheiden sich hauptsächlich in ihrem N-terminalen Bereich, der für die Lokalisation verantwortlich ist.

### 3.4.1.2 ISOLIERUNG DER VOLLÄNGEN-CDNA

Das cDNA-Fragment E4, das in der „subtrahierten“ cDNA-Bibliothek enthalten war, zeigte vollständige Übereinstimmung mit dem schon bekannten Cyclophilin aus der Tomate (#M55019). Über „RACE“-PCR wurde die Volllänge der cDNA bestimmt. Dabei wurden folgende genspezifische Primer eingesetzt:

GSP1 (5'-antisense Primer): 5'-GAGGATTCCAGGGCCGGTGTGCT-3'

GSP2 (3'-sense Primer): 5'-CCTTCCACCGTGTGATCCCAGGGTT-3'

Die PCR wie unter 2.9 beschrieben ergab in der Gelelektrophorese ein 5'-cDNA-Fragment von ca. 300 bp und ein 3'-cDNA-Fragment von 500 bp Länge. Die sich in ihrer Sequenz überlappenden Produkte wurden in den T/A-Vektor pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO kloniert und anschließend durch Sequenzierung charakterisiert.

Die Abbildung 3-3 zeigt die Struktur der vollständigen 720 kb langen cDNA mit der codierenden Region.

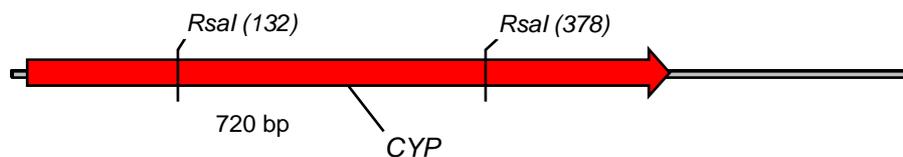


Abbildung 3-3: Darstellung der Cyclophilin mRNA mit der codierenden Region (rot) und den nichttranslatierten Bereichen (grau). Die angegebenen Restriktionsschnittstellen zeigen das Fragment, das durch Subtraktion isoliert wurde.

### 3.4.1.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR EXPRESSION

Untersuchungen zur Expression der Cyclophilin-mRNA in den frühen Phasen der Infektion sollten Auskunft darüber geben, wie schnell die Wirtspflanze auf den äußeren Reiz reagiert. Deshalb wurden Tomaten entweder mit *Cuscuta*-Sprossen infiziert oder mechanisch verwundet. Zu unterschiedlichen Zeitintervallen (6, 12 und 24 h nach Infektionsbeginn bzw. 1, 4, 8, 24 h nach Verwundung) wurden Proben wie im Methodenteil beschrieben entnommen. Nachfolgend ist der „steady state level“ der Cyclophilin-mRNA über den Zeitraum von 24 h in verwundeten sowie infizierten Tomaten im Northern Blot dargestellt (Abbildung 3-4). Für die Quantifizierung der Transkriptmengen wurde die Stärke des Signals in der Kontrolle als 1 angenommen. Die anderen Expressionsdaten ergaben sich in Relation zur Kontrolle.

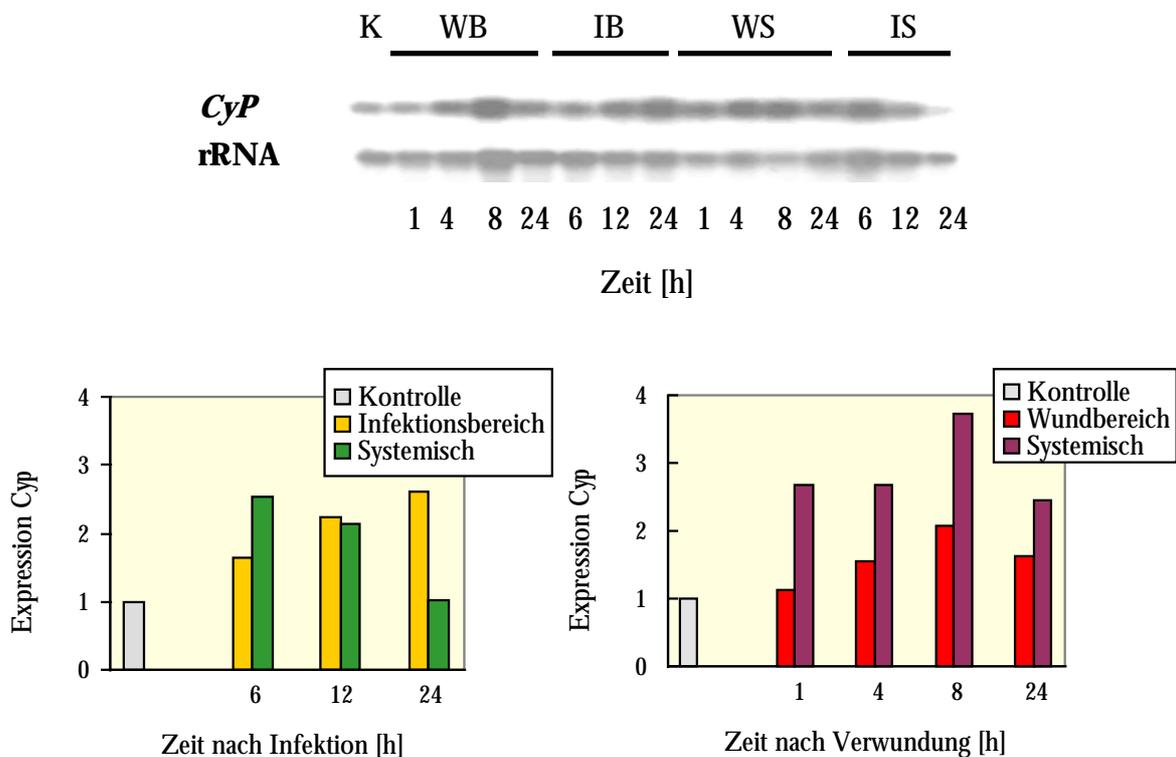


Abbildung 3-4: Expressionsanalyse von Cyclophilin-mRNA in Sprossen von *Lycopersicon esculentum* nach *Cuscuta reflexa*-Infektion bzw. Verwundung über einen Zeitraum von 24 h. Northern Blot (oben) mit Gesamt-RNA aus unbehandeltem Sproß (K), dem Wundbereich (WB), dem Infektionsbereich (IB), einem Sproßabschnitt oberhalb der Verwundung (WS), einem Sproßabschnitt oberhalb des Infektionsbereiches (IS). Die Hybridisierung mit 28S rRNA diente als Mengenabgleich. Quantifizierung der Expression in Relation zu unbehandelten Sproßachsen (Kontrolle, Expression = 1)

Innerhalb der ersten 24 h stieg die Konzentration an *CyP*-mRNA im Infektionsbereich stark an. Die Akkumulation von *CyP*-Transkripten ist nicht nur auf die Kontaktstelle zum Parasiten beschränkt, sondern auch in anderen Sproßbereichen zu beobachten. Allerdings ist die Zunahme der Transkriptmenge in der systemischen Kontrolle nur transient, wobei überrascht, daß das Maximum schon nach 6 h erreicht ist und die mRNA Konzentration anschließend wieder auf der unbehandelten Kontrolle vergleichbare Spiegel abfällt, was auf eine kurze Aktivierung des Cyclophilin-Gens hinweist. Nach mechanischer Verletzung des Gewebes wurde ebenfalls ein Anstieg an *CyP*-mRNA nachgewiesen, und zwar war dieser im Wundbereich vorübergehend mit maximalen Konzentrationen nach 8 h. Die systemische Reaktion fiel über den Untersuchungszeitraum weitaus stärker aus, denn zu jedem der untersuchten Zeitpunkte war in den Proben aus den oberen Sproßabschnitten eine höhere Transkriptmenge festzustellen als im direkt von der Verletzung betroffenen Gewebe. Die Ursache für die auffälligen Unterschiede zwischen lokaler und systemischer Reaktion könnte zum einen darin liegen, daß im verletzten Gewebe während des Untersuchungszeitraumes sehr viele Zellen absterben und somit nicht mehr zur Transkription fähig sind. Andererseits stellt das Cyclophilin ein möglicherweise eher für die systemische Antwort des Organismus verantwortliches Protein dar.

Natürlich stellt sich die Frage, ob auch ein kompatibler Wirt wie der Tabak auf die Infektion mit *C.reflexa* mit einer Akkumulation des Cyclophilin-Transkripts reagiert. Deshalb wurde die Expression von *CyP-mRNA* in infizierten Tabakpflanzen nach dem gleichen Zeitschema wie oben untersucht, wobei für die Northern-Hybridisierung die gleiche Sonde wie zuvor benutzt wurde, denn aufgrund der konservierten Struktur der Cyclophiline sind die aus Tomate und Tabak stammenden nahezu identisch. Die Abbildung 3-5 zeigt, daß in der kompatiblen Wirtspflanze die Transkriptmengen schon innerhalb der ersten 6 h im Infektionsbereich sehr stark ansteigen und nach Erreichen eines Maximums zwar wieder sinken.

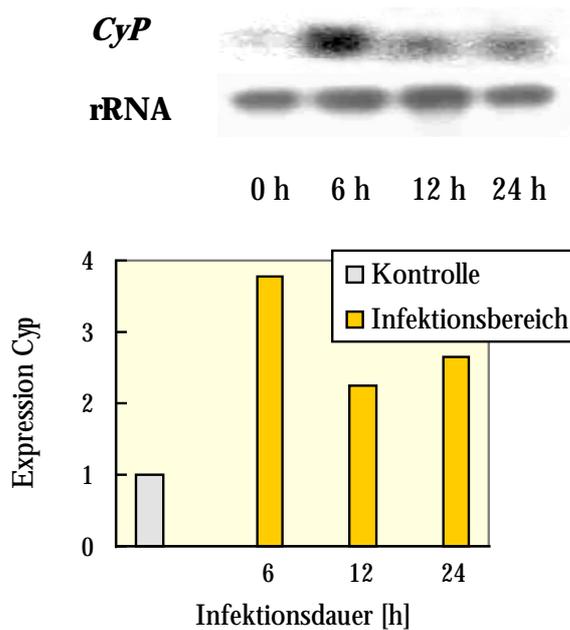


Abbildung 3-5: mRNA-Expression eines Homologes zu *Cyp* im Infektionsbereich von *Nicotiana tabacum* nach *Cuscuta reflexa*-Infektion über einen Zeitraum von 24 h. Als Mengenabgleich diente Hybridisierung mit 28S rRNA.

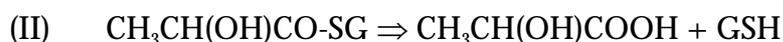
Daß die Transkripte des Cyclophilins sowohl in verwundeten als auch in infizierten Pflanzen im untersuchten Zeitraum akkumulieren, weist auf eine Rolle dieses Proteins in der Antwort auf eine allgemeine Streßsituation, der die Pflanze in beiden Fällen ausgesetzt ist, hin. Auch in anderen Spezies wurde eine Anhäufung dieser mRNA bei Einwirkung verschiedener Streß auslösender Faktoren wie z.B. Kälte, Salz, Hitzeschock, Verwundung (MARIVET *et al.*, 1994; MEZA-ZEPEDA UND BAUDO, 1998) oder Behandlung mit den Signalsubstanzen Ethephon und Salicylsäure beobachtet. Außerdem wurde eine erhöhte Expression des Cyclophilins mit Zellen, die eine hohe Stoffwechselaktivität durch Zellteilung und -wachstum zeigen, in Zusammenhang gebracht (GASSER *et al.*, 1990). Die in Bezug zum Infektionsbereich zeitlich verschobene systemische Akkumulation von *CyP* Transkripten spricht für die Aktivierung einer Signalkette durch den Kontakt Parasit-Wirtspflanze. Obwohl die anatomischen und morphologischen Veränderungen nur auf die unmittelbare Kontaktstelle beschränkt sind, ist trotzdem die gesamte Pflanze von der Streßsituation betroffen. Im Gegensatz zur inkompatiblen Tomate bleibt die *CyP* mRNA Konzentration im Tabak erhöht, möglicherweise weil der Infektionsprozeß noch andauert und der Parasit nicht durch Abwehrmechanismen seitens der Wirtspflanze schon geschwächt ist.



Die Expression von PR-proteincodierenden Genen wurde in Zusammenhang mit verschiedenen Prozessen der pflanzlichen Entwicklung beobachtet, wird aber auch durch Verwundung, endogene und exogene Elicitoren ausgelöst (SHENG *et al.*, 1991). Infolge einer Besiedlung einer Pflanze mit pathogenen Pilzen werden die PR-Proteine in der Zellwand in eine unlösliche Form überführt, wobei die genauen Prozesse ungeklärt sind. Da phenolische Verbindungen eine hohe Affinität zu Prolinresten innerhalb von Proteinstrukturen besitzen (LUCK *et al.*, 1991), könnten PR-Proteine in den Prozeß der Lignifizierung involviert sein. Aufgrund dieser Studien kann die Expression eines PR-Proteins in der Tomate als allgemeine Streßantwort auf den Parasitenbefall gedeutet werden.

### 3.4.3 MÖGLICHE BEDEUTUNG EINER GLYOXALASE I (KLON D6)

Die subtraktive Hybridisierung führte zur Isolierung eines cDNA-Fragmentes, daß identisch mit der Sequenz einer bereits beschriebenen Glyoxalase I aus *Lycopersicon esculentum* (Z48183) ist. Die Funktion des Glyoxalase-Systems, bestehend aus den beiden Enzymen Glyoxalase I und II, ist bisher nur teilweise geklärt. Es wird vor allem mit einer schnellen Zellteilung aber auch Streßsituationen in Verbindung gebracht. In Zellen mit einer hohen metabolischen Aktivität, wie z.B. sich teilende oder gestreßte Zellen, werden vermehrt reaktive Aldehyde wie gebildet, die für die Zelle hochtoxisch sind und deshalb in weniger schädliche Verbindungen umgewandelt werden müssen. Im Fall des Methylglyoxals wird zunächst ein Hemithioacetalderivat gebildet, das unter Wirken der Glyoxalase I in das *S*-Lactoylglutathion umgewandelt und anschließend durch die Glyoxalase II zu Milchsäure und Glutathion hydrolysiert wird.



Es wurde gezeigt, daß die Glyoxalase I in allen Zelltypen exprimiert wird, aber vor allem in den Elementen des Phloems. Des weiteren wurde beobachtet, daß in Tomaten, die mit NaCl, Mannitol sowie Abscisinsäure behandelt wurden, Transkripte der Glyoxalase I akkumulieren (ESPARTERO *et al.*, 1995). Über die Mechanismen, die die Transkriptlevel der Glyoxalase regulieren, ist relativ wenig bekannt. Aufgrund von Experimenten wird angenommen, daß die Induktion dieses Enzyms über den Inositol-Signalweg und die Aktivierung von Calmodulin abläuft. Möglicherweise spielen auch Phytohormone eine Rolle (PAULUS *et al.*, 1993).

Die Akkumulation von Transkripten der Glyoxalase I infolge der *Cuscuta*-Infektion könnte einerseits auf die erhöhte Stoffwechselaktivität in den betroffenen Zellen als Ausdruck einer

Streßreaktion zurückzuführen sein, aber andererseits auch in Bezug zum auffallenden Streckungswachstum im Infektionsbereich stehen.

#### **3.4.4 MÖGLICHE BEDEUTUNG EINER ELONGATIONSFAKTOR 2 HOMOLOGEN SEQUENZ (KLON E7)**

Die abgeleitete Aminosäuresequenz eines cDNA-Fragmentes war in weiten Teilen homolog zum Elongationsfaktor 2 (EF2) aus *Arabidopsis thaliana*. An der Translation von Proteinen sind verschiedenste Faktoren beteiligt. Dabei katalysiert der EF2 die GTP-abhängige Translokation der Peptidyl-tRNA von der A-Bindungsstelle auf die P-Bindungsstelle des Ribosoms. Währenddessen wird die deacylierte tRNA von der P-Bindungsstelle freigesetzt. Der EF2 unterliegt einer bisher nur bei diesem Protein gefundenen posttranslationalen Modifizierung, ein bestimmter Histidinrest im C-terminalen Bereich des Proteins liegt in der ungewöhnlichen Diphthamid-Form vor. Aufgrund dieses konservierten Strukturmerkmals ist EF2 empfindlich gegenüber dem Diphtherie-Toxin, denn das bakterielle Toxin hemmt die Translokationsaktivität von EF2 durch Bindung von ADP-Ribose an die modifizierte Aminosäure, was letztendlich zum Zelltod führt. Es existieren gegensätzliche Studien darüber, inwieweit das Diphthamid für die Aktivität des EF2 verantwortlich ist (OMURA *et al.*, 1989; KIMATU *et al.*, 1993). Außerdem wurden über die mögliche Bedeutung der Konservierung der ADP-Ribosylierung und der entsprechenden Bindungsstelle bisher nur Vermutungen angestellt (IGLIEWSKI, 1994).

Im Gegensatz zu einer verminderten Translationsaktivität als Streßreaktion auf Hitzeschock, Verwundung oder Nährstoffmangel (DAVIES *et al.*, 1986; VOGEL *et al.*, 1999, ruft der Kontakt zwischen *Cuscuta* und Tomate wahrscheinlich eine verstärkte Proteinsynthese in der Wirtspflanze hervor.

### 3.5 GENEXPRESSION VON SIGNALSTOFFWECHSEL-ASSOZIIERTEN PROTEINEN

#### 3.5.1 MÖGLICHE BEDEUTUNG EINES *RCE1*-HOMOLOGEN PROTEINS (57)

Das Wachstum und die Entwicklung einer Pflanze wird in vielfältiger Weise durch das Wirken des Phytohormones Auxin reguliert. Trotz dessen Bedeutung sind über die Signaltransduktionswege, die durch das Phytohormon Auxin ausgelöst werden, noch relativ wenig bekannt. Mutanten, die in ihrer Antwort auf Auxin gestört sind, stellen eine gute Möglichkeit dar, die Prozesse, die an der Signalvermittlung beteiligt sind, näher zu untersuchen. Durch die Charakterisierung des Genes *AXR1* aus *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, daß die Auxinantwort die posttranslationelle Konjugation von Proteinen mit Ubiquitin oder ähnlichen Proteinen beinhaltet. Es wurden bisher zwei dem Ubiquitin sehr ähnliche Proteinfamilien (*RUB* „related to ubiquitin“ und *SUMO* – „small ubiquitin-related modifier“) identifiziert, die auf gleiche Weise andere Proteine modifizieren. Die Verknüpfung von Ubiquitin mit einem anderen Protein erfordert drei unterschiedliche Enzyme bzw. -komplexe, und zwar ein Ubiquitin aktivierendes (E1), ein konjugierendes Enzym (E2) und eine Ubiquitin-Ligase (E3). In den meisten Fällen werden ubiquitinierte Proteine anschließend durch das 26S Proteosom abgebaut. Da hingegen *axr1* Pflanzen eine verminderte Auxinantwort zeigen, scheint in diesem Fall die Modifizierung von Proteinen entweder durch Ubiquitin oder RUB für die Signalweiterleitung notwendig zu sein. Kürzlich wurde eine weitere Komponente des für die RUB - Konjugation notwendigen Enzymkomplexes aus *Arabidopsis* identifiziert. *RCE1* stellt das RUB konjugierende Enzym E2 dar. Es bindet spezifisch über einen Thiolester an das *RUB1* Protein (DEL POZO UND ESTELLE, 1999). In welcher Weise die Modifizierung von Proteinen, sei es durch Ubiquitin oder RUB, mit den Auxin-vermittelten Veränderungen auf zellulärer Ebene verbunden sein könnte, wird in GRAY UND ESTELLE (2000) dargestellt.

Durch die subtraktive Hybridisierung wurde eine cDNA isoliert, deren abgeleitete Proteinsequenz sehr große Homologie zu *RCE1* (Abbildung 3-7) aufweist. Wie biochemische Studien zeigen, ist die Interaktion von Tomate und dem Parasiten *Cuscuta* durch eine erhöhte Auxinkonzentration im Infektionsbereich gekennzeichnet. Außerdem wurden in dieser Arbeit bisher mehrere Proteine beschrieben, deren Expression durch das Phytohormon beeinflusst werden können. In diesem Zusammenhang könnte es sich bei dem *RCE1* Homologen um ein Protein handeln, das relativ früh in den Infektionsprozess eingreift und an der Signalvermittlung, die letztendlich zur veränderten Expression einiger Proteine und den beobachteten anatomischen Gegebenheiten führt. Dafür spricht auch, daß das oben beschriebene *AXR1* vor allem in Zellen, die einem starken Wachstum unterliegen vorzufinden ist (DEL POZO *et al.*, 1998).

LeRCE1	1	-----GELRLHKDISELNLPKTCISFPNG----
AthRCE1	1	MIGLFKVKKEKQREQAQN-ATRGGASVKKQSAGELRLHKDISELNLPSSCSISFPNG----
AthUBCE2	1	MIGLFKVKKEKQREESQSNNGRGASTVKKQSAGELRLHKDISELNLPKSCKISFPNG----
Hs-UBC12	1	MIKLFSLKQKKEEESAGGKTKGSSKK--ASAAQLRIQKDINELNLPKTCDISFSD----
Sc-UBC12	1	MLKLRQLQKKKQKENEN---SSSIQPNLSAARIRLKRDLDSLDPPTVTLNIVITSPDSA
LeRCE1	26	-KDDL MNFEV TIRPDEGYMGGTFTFSFSISPIYPHEAPKVKCKTKVYHPNIDLEGNVCL
AthRCE1	56	-KDDL MNFEVSIKPD DGYHNGTFVFTFQVSPVYPHEAPKVKCKTKVYHPNIDLEGNVCL
AthUBCE2	57	-KNDL MNFEVTIKPD EGYLLSGNFVFSFQVSNMYPHEAPKVKCKTKVYHPNIDLEGNVCL
Hs-UBC12	54	-PDDL LNFKLVICPD EGFYKSGKFVFSFKVVGQGYPHDPKVKCETMVYHPNIDLEGNVCL
Sc-UBC12	57	DRSQSPKLEVIVRPDEGYNYGSINFNLDNFVYPIEPPKVVCLKKIFHPNIDLKGNVCL
LeRCE1	85	NILREDWKPVLNINTIIYGLYHLFTEPNHEDPLNHDAAAVLRDNPKMFESNVRRAMHGGY
AthRCE1	115	NILREDWKPVLNINTVIYGLFHLFTEPNSEDPLNHDAAAVLRDNPKLFETNVRRAMTGGY
AthUBCE2	116	NILREDWKPVLNINTVIYGLFHLFTEPNYEDPLNHEAAA VLRDNPKTFEYNVRRAMGGQ
Hs-UBC12	113	NILREDWKPVL TINSIIYGLQYLFLEPNPEDPLNKEAAEVLQNNRRLFEQNVQRSMRGGY
Sc-UBC12	117	NILREDWSPALDLQSIITGLLFLFLEPNPNDFLNKDAAKLLCEGEKEFAEAVRLTMSGGS
LeRCE1	145	VGQTFTRCM--
AthRCE1	175	VGQTFPRCI--
AthUBCE2	176	VGQTSFPRCM--
Hs-UBC12	173	IGSTYFERCLK-
Sc-UBC12	177	IEHVKYDNIVSP

Abbildung 3-7: Sequenzvergleich von *RUB1*-konjugierendem Enzym aus *A. thaliana*, verschiedenen Ubiquitin-konjugierenden Enzymen mit *LeRCE1* aus *L. esculentum*. Homologien sind hervorgehoben. Über das markierte Cystein wird die Thioesterbindung zu RUB bzw. Ubiquitin gebildet.

### 3.5.2 MÖGLICHE BEDEUTUNG EINES *MYO*-INOSITOL 1-PHOSPHAT-SYNTASE HOMOLOGS (KLON 63)

Die cDNA-Sequenz des Klons 63 (in der Datenbank als *LeINS-P1* unter **AY004246** veröffentlicht) zeigt große Ähnlichkeit mit einer *myo*-Inositol 1-Phosphat-Synthase aus *N. tabacum*. Dieses Enzym katalysiert im Rahmen der Inositol-Biosynthese die Reaktion von Glucose-6-Phosphat zu *myo*-Inositol-1-Phosphat, das notwendig ist für die Bildung von Phospholipiden, den Bestandteilen von Biomembranen, und als Substrat für die Biosynthese der Signalstoffe Inositol-1,4,5-triphosphat und Inositol 4,5-diphosphat dient.

Daß die Akkumulation von *LeINS-P1* durch den Kontakt mit dem pflanzlichen Parasiten *Cuscuta* beeinflusst wird, steht im Einklang mit Beobachtungen, daß die Transkriptmengen von INS-P1 infolge von ABA-Behandlung in *Spirodela polyrrhiza*, Salzstreß in *Mesembryanthemum crystallinum* oder auch Verwundung in *Nicotiana tabacum* ansteigen (SMART UND FLEMING, 1993; ISHITANI *et al.*, 1996; HARA *et al.*, 2000). In allen diesen Fällen ist die Pflanze einer Streßsituation ausgesetzt, so daß vermutet werden kann, daß die Expression von INS-P1 in die Regulation der Streßantwort eingebunden ist. So liegt es nahe, daß aus einer verstärkten Akkumulation entsprechender Transkripte eine vermehrte Biosynthese von Botenstoffen resultiert, die im weiteren Verlauf eine Signalkaskade auslösen.

### 3.6 GENEXPRESSION VON ZELLSTRECKUNG-ASSOZIIERTEN PROTEINEN

#### 3.6.1 CHARAKTERISIERUNG EINER PUTATIVEN UNTEREINHEIT EINER VAKUOLAREN H<sup>+</sup>-ATPASE ( KLON 24)

##### 3.6.1.1 ISOLIERUNG DER VOLLÄNGEN-cDNA

Ausgehend von der Sequenz, die für den Klon 24 ermittelt wurde, erfolgte die Konstruktion zweier genspezifischer Primer, die in der „RACE“-PCR zur Erfassung der vollständigen cDNA eingesetzt wurde.

GSP1 (5'-antisense Primer): 5'-GAATCCACACAGCGATGAACCAAGAGG-3'

GSP2 (3'-sense Primer): 5'-GGAAGAATACGCAGAGAAGGCAAGCGTC-3'

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden im Gel aufgetrennt, wobei das 3'-cDNA-Fragment eine Länge von ungefähr 500 bp, das 5'-cDNA-Fragment von 800 bp zeigte.

Die Sequenzanalyse ergab, daß die codierende Region sehr große Übereinstimmung mit der Untereinheit E einer vakuolaren H<sup>+</sup>-ATPase von *Citrus limon* aufweist. Die Abbildung 3-8 zeigt die von der cDNA-Sequenz, in der Datenbank unter **AF282970** registriert, abgeleitete Primärstruktur der putativen V-H<sup>+</sup>-ATPase Untereinheit E aus *L. esculentum* in einem Homologievergleich mit entsprechenden Proteinen anderer Spezies.

AF282970	1	---	ADVSKQIQQMVRFILQEAEEKANEISVSAEEEFNIEKLQQLVEAEKKKIRQFYERKEK
AAD49706	1	MND	ADVSKQIQQMVRFIRQEAEEKANEISVSAEEEFNIEKLQQLVEAEKKKIRQFYERKEK
AAB72177	1	MSD	ADVSKQIQQMVRFIRQEAEEKANEISVSAEEEFNIEKLQQLVEAEKKKIRQFYERKEK
AF282970	61		QVDVRRKKIEYSMQLNASRIKVLQAQDDLVNNTMKEAFAAKELLNVSHEHGIIDSILHHHHG
AAD49706	61		QVEIRKKIEYSMQLNASRIKVLQAQDDLVSNNMEEAASKEVNLNVSRDHN-----
AAB72177	61		QVEIRKKIEYSMQLNASRIKVLQAQDDVVNAMKESASKDFLNVSHDHH-----
AF282970	121		GYKLLHDLIVQSLRLKEPCVLLRCRKHVDVHLVEHVLEGVKEEYAEKASVHOPEIIVDD
AAD49706	109		SYKLLKDLIVQSLRLKEPAVLLRCRKHDDHHLVESVLESAAKEEYAKLQVHPPEIIVDH
AAB72177	109		VYKRLKDLIVQSLVRLKEPGVLLRCRKEEDLHLVESVLDASAKEEYASKVNVHPPEIIVDD
AF282970	181		EIHLPPAPSHHN-----MHGSPSCSGGVVLAASRDGKIVCENTLDARLEVVFRKKLPEI
AAD49706	169		HIYLPPEGPGHHN-----AHGSPSCSGGVVVASRDGKIVCENTLDARLDVVFRKKLPEI
AAB72177	169		-VHLPPGPGSHHHGFFHHHAEAHGFPCSGGVVLAASRDGKIVFENTLDARLDVAFNKKLPEI
AF282970	233		RKCLFGQVAA
AAD49706	221		RKQLVSGVAA
AAB72177	228		RKWLFGQVAA

Abbildung 3-8: Sequenzvergleich der V-H<sup>+</sup>-ATPase Untereinheit E aus *Lycopersicon esculentum* (AF282970), *Citrus limon* (AAD49706) und *Gossypium hirsutum* (AAB72177). Bereiche mit hoher Identität sind schwarz, die mit hoher Ähnlichkeit grau hinterlegt.

### 3.6.1.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR mRNA-EXPRESSION

Wie für das Cyclophilin beschrieben wurde auch die Expression der V-H<sup>+</sup>-ATPase Untereinheit im Verlauf des ersten Tages nach Parasitenkontakt sowohl in inkompatiblen als auch kompatiblen Wirtspflanzen untersucht. Bei Infektion ist die Expression der spezifischen mRNA in der Tomate leicht erhöht, wohingegen eine mechanische Verletzung keinen Einfluß auf die Transkript-Akkumulation zeigt. Im Infektionsbereich kommt es zu einem transienten Anstieg der mRNA-Konzentration, die nach 24 h schon wieder auf den Ausgangswert abgefallen ist. Die höhere Anzahl an spezifischen Transkripten ist auf den Kontaktbereich zum Parasiten beschränkt, in benachbarten Sproßabschnitten wurde keine Veränderung der Expression festgestellt. Im Gegensatz zur inkompatiblen Tomate konnte in der Tabaksproßachse nach Infektion kein Anstieg der mRNA-Spiegel beobachtet werden, d.h., die Akkumulation der V-H<sup>+</sup>-ATPase mRNA stellt möglicherweise eine spezifische Reaktion der Tomate auf den Befall mit *C.reflexa* dar, da weder in der untersuchten kompatiblen Wirtspflanze noch durch Verwundung ein ähnliches Expressionsverhalten ausgelöst werden konnte. Jedoch sind zur Bestätigung dieses Ergebnisses Studien an weiteren Wirten, die erfolgreich von dem Parasiten besiedelt werden können, notwendig.

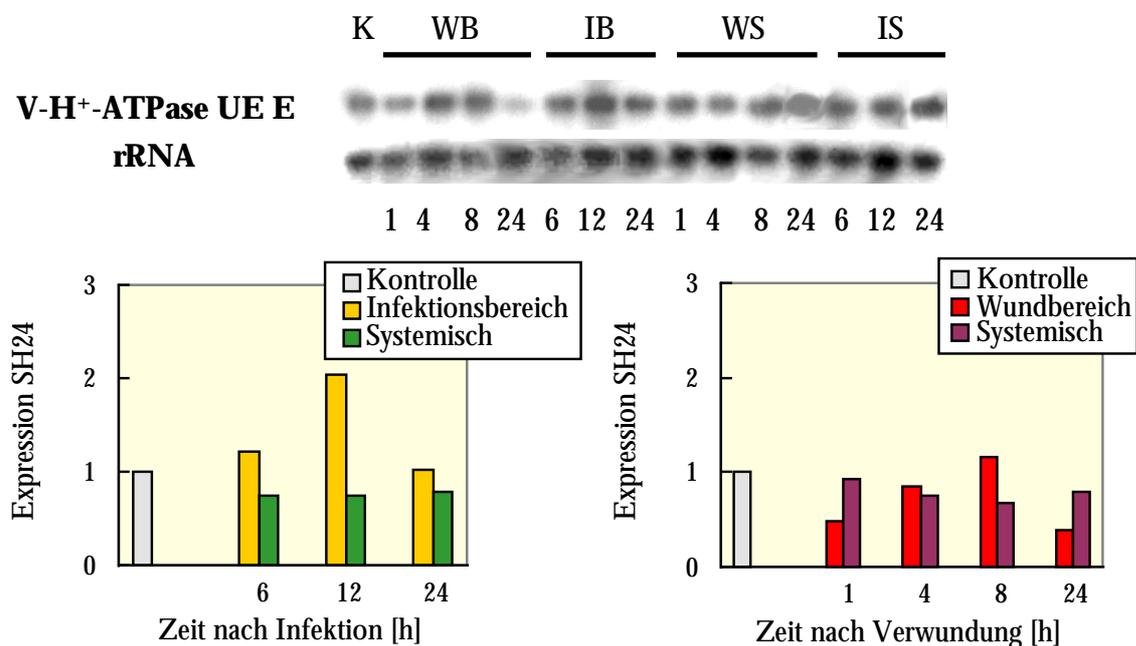


Abbildung 3-9: Expressionsanalyse für die mRNA einer putativen Untereinheit E der V-H<sup>+</sup>-ATPase in Sprossen von *Lycopersicon esculentum* nach *Cuscuta reflexa*-Infektion bzw. Verwundung über einen Zeitraum von 24 h. Northern Blot (oben) mit Gesamt-RNA aus unbehandeltem Sproß (K), dem Wundbereich (WB), dem Infektionsbereich (IB), einem Sproßabschnitt oberhalb der Verwundung (WS), einem Sproßabschnitt oberhalb des Infektionsbereiches (IS). Die Hybridisierung mit 28S rRNA diente als Mengenabgleich. Quantifizierung der Expression in Relation zu unbehandelten Sproßachsen (Kontrolle, Expression = 1)

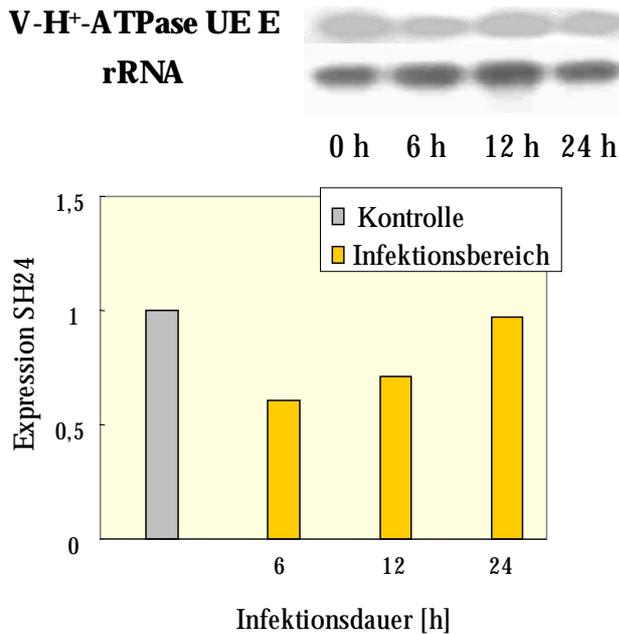


Abbildung 3-10: mRNA-Expression von SH24 im Infektionsbereich von *Nicotiana tabacum* nach *Cuscuta reflexa*-Infektion über einen Zeitraum von 24 h. Als Mengengleich diente Hybridisierung mit 28S rRNA.

Sicherlich läßt sich aufgrund des komplexen Aufbaus der V-H<sup>+</sup>-ATPase (SZE *et al.*, 1992) keine Vorhersage über den Einfluß einer verstärkten Akkumulation der Untereinheit E auf die Aktivität dieser Protonenpumpe treffen. Gemeinsam mit den Untereinheiten C und D ist sie vermutlich an der Verknüpfung der peripheren nukleotidbindenden Einheiten A und B (V<sub>1</sub>) mit dem membranintegrierten V<sub>0</sub>-Komplex beteiligt (ADACHI *et al.*, 1990). Einen Hinweis auf die Bedeutung der Untereinheit E gaben Versuche von PENG *et al.* (1994), die zeigten, daß die Supplementierung einer verarmten V<sub>1</sub>-Präparation mit rekombinanter Untereinheit E zu einer starken CaATPase-Aktivierung führte.

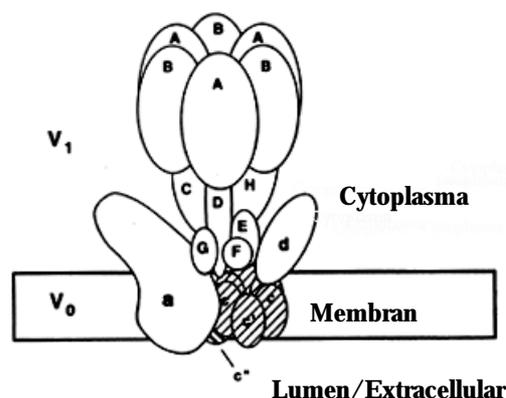


Abbildung 3-11: Strukturmodell der vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase. Die V-H<sup>+</sup>-ATPase unterteilt sich in eine periphere Domäne V<sub>1</sub> und einen in die Membran integrierten Teil V<sub>0</sub>. Die Untereinheiten von V<sub>1</sub> enthalten den katalytischen Bereich, während die Untereinheiten von V<sub>0</sub> für die Protonentranslokation verantwortlich sind (STEVENS UND FORGAC, 1997).

Die Erhöhung der mRNA-Konzentration könnte eine veränderte Zusammensetzung der ATPase hervorrufen und dadurch die ATPase-Aktivität beeinflussen. Eine damit verbundene Veränderung des pH-Wertes würde beispielsweise eine Freisetzung sekundärer Pflanzenstoffe, die in der Vakuole gespeichert und für die Lignifizierung benötigt werden, ermöglichen.

Die erhöhte Expression der V-H<sup>+</sup>-ATPase Untereinheit E kann aber auch mit der beobachteten Zellstreckung nach Parasitenbefall im Zusammenhang stehen. So geht in Zellen, die eine sehr starke Ausdehnung während ihrer Entwicklung erfahren, dieses Wachstum mit einer verstärkten Akkumulation der V-H<sup>+</sup>-ATPase einher (SMART *et al.*, 1998). Ebenso können erhöhte Transkriptkonzentrationen der Untereinheit E durch Salz- oder Kältestreß hervorgerufen werden (DIETZ UND ARBINGER, 1996). Deshalb ist der Anstieg an spezifischer mRNA möglicherweise auch als eine Antwort der Pflanze auf den Streß, dem sie durch den Parasitenbefall ausgesetzt ist, anzusehen.

Die Isolierung und Charakterisierung weiterer V-H<sup>+</sup>-ATPase-Untereinheiten sowie Untersuchungen zur ATPase-Aktivität während des Infektionsprozesses könnten einen Einblick in die Bedeutung dieser Protonenpumpe in der Interaktion von Tomate und *C. reflexa* geben.

### 3.6.2 CHARAKTERISIERUNG VON AQUAPORINHOMOLOGEN SEQUENZEN

#### 3.6.2.1 AQUAPORINE

Pflanzen bestehen zu 70-90% ihres Frischgewichts aus Wasser. Deshalb ist ihre Existenz vom Wasser und dessen Transport abhängig. Die einzelnen Zellen des pflanzlichen Organismus sind durch Zellwände und Doppellipidmembranen abgegrenzt, die eine selektive Barriere für ein- und austretende Substanzen darstellen. Aufgrund der physikochemischen Eigenschaften des Wassermoleküls kann es mittels Diffusion durch die Membran hindurchtreten. Neben Diffusionsprozessen sind des weiteren Co-Transporter und Wasserkanalproteine am Transport beteiligt, denn der Wasserfluß ausschließlich durch Diffusion ist für manche physiologische Prozesse unzureichend. Die Entdeckung der Aquaporine ist zurückzuführen auf Beobachtungen, daß bestimmte Zellen eine wesentlich höhere Wasserpermeabilität aufweisen, die sich nicht einzig durch Diffusionsprozesse erklären läßt (SIDEL UND SALOMON, 1957). Anfang der 90er Jahre gelang die Identifizierung der ersten pflanzlichen Aquaporine (CONKLING *et al.*, 1990; WAYNE UND TAZAWA, 1990). Sie gehören einer Gruppe von membranständigen Proteinen an, die als MIP-homologe Proteine („Major Intrinsic Proteins“) bezeichnet werden.

Die Expression von Aquaporinen ist eng mit bestimmten Entwicklungsstadien und physiologischen Prozessen verbunden, was auf spezifische Aufgaben der jeweiligen Proteine hinweist. So werden einige eher in vaskulärem Gewebe exprimiert (YAMAMOTO *et al.*, 1991; DANIELS *et al.*, 1996), während andere hauptsächlich in sich steckenden oder differenzierenden Zellen gefunden werden können (LUDEVID *et al.*, 1992; KALDENHOFF *et al.*, 1995). Weiterhin wurde nachgewiesen, daß neben der entwicklungspezifischen Expression auch verschiedene endo- und exogene Faktoren wie Phytohormone und Streß Einfluß auf die Expression haben (GUERRERO *et al.*, 1990; KALDENHOFF *et al.*, 1993; PHILLIPS UND HUTTLYM, 1994; YAMADA *et al.*, 1995; YAMADA *et al.*, 1997). Die Regulation der Aquaporine kann nicht nur auf der transkriptionellen Ebene erfolgen, sondern auch durch posttranslationelle Modifikationen. Bisher wurden Phosphorylierung, Glycosylierung und Proteolyse als Regulationsmechanismen auf Proteinebene nachgewiesen (JOHNSON UND CHRISPEELS, 1992; JOHANSSON *et al.*, 1998).

### 3.6.2.2 AQUAPORINHOMOLOGE cDNA-KLONE

In der „subtrahierten“ cDNA-Bibliothek war ein Klon enthalten, dessen Sequenz große Ähnlichkeit zu Proteinen der MIP-Familie („Major Intrinsic Protein“) aufwies. Ausgehend von der Sequenz des Fragmentes wurden für die 5′- und 3′-RACE-PCR Primer konstruiert, um die Gesamtlänge der cDNA zu isolieren:

GSP1 (5′-sense Primer): 5′-CTCAGCACCAAGGCCATCTCCCTTGG-3′

GSP2 (3′-antisense Primer): 5′-CCCTGCTAGAAGCCTAGGCGCTGCC-3′

Nach Klonierung und Sequenzierung der 5′- und 3′-RACE-Produkte stellte sich heraus, daß das erhaltene 5′-Ende mit einem bereits bekannten Membranprotein aus *Lycopersicon esculentum* übereinstimmte, und zwar wurde dieses Protein im Zusammenhang mit der Fruchtreifung und Trockenstreß beschrieben (FRAY *et al.*, 1994). Dahingegen wurden für das 3′-Produkt eher Homologien zu Aquaporinen aus *Nicotiana tabacum* und *Nicotiana excelsior* gefunden. Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, daß es sich hier um zwei unterschiedliche Proteine handelt. Deswegen wurden nochmals RACE-PCRs durchgeführt, bei denen Primer verwendet wurden, von denen der eine vom 5′-Ende des vorigen 5′-RACE-Produktes und der andere vom 3′-Ende des 3′-RACE-Produktes abgeleitet waren. Es konnten somit zwei verschiedene cDNA-Klone isoliert werden, die jeweils die vollständige codierende Sequenz eines Proteins beinhalteten.

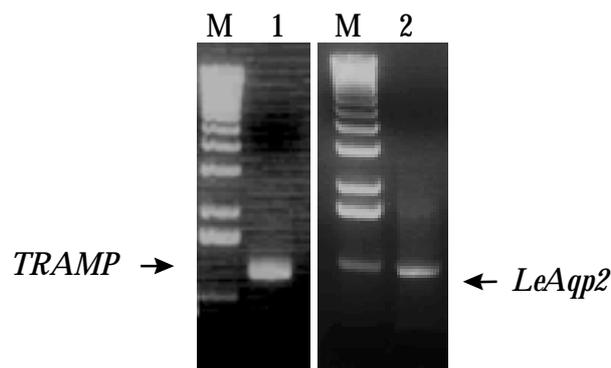


Abbildung 3-12 : Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte im 1% Agarosegel. Als Größenstandard (M) wurde die 1 kb-DNA-Leiter verwendet. 1: *TRAMP*-PCR-Produkt (ca. 1,2 kb). 2: *LeAqp2*-PCR-Produkt (ca. 0,9 kb).

Anhand von Datenbankanalysen wurde die Ähnlichkeit beider cDNAs zu pflanzlichen Aquaporinen bestätigt. Die ein „Tomato Ripening Associated Membrane Protein“ codierende Sequenz von ca. 1,1 kb Länge wird im weiteren als *TRAMP*, die andere, kürzere als *LeAqp2* bezeichnet. Sie sind in der GenBank vom NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) unter den Identifikationsnummern **X73848** und **AF218774** veröffentlicht. Es wurde in beiden Fällen das offene Leseraster bestimmt und die Proteinsequenz abgeleitet.

Durch computergestützte Analyse ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)) war es möglich, eine Vorhersage über die mögliche Membrantopologie der beiden Proteine zu treffen. Aus dem Hydrophobizitätsprofil der Proteine nach dem Kyte & Doolittle-Algorithmus (Abbildung 3-13) wurden 6 transmembrane Helices ermittelt, die wegen ihrer starken Hydrophobizität in die Membran inserieren können. Sowohl der N-terminale als auch der C-terminale Bereich sind auf der cytoplasmatischen Seite lokalisiert.

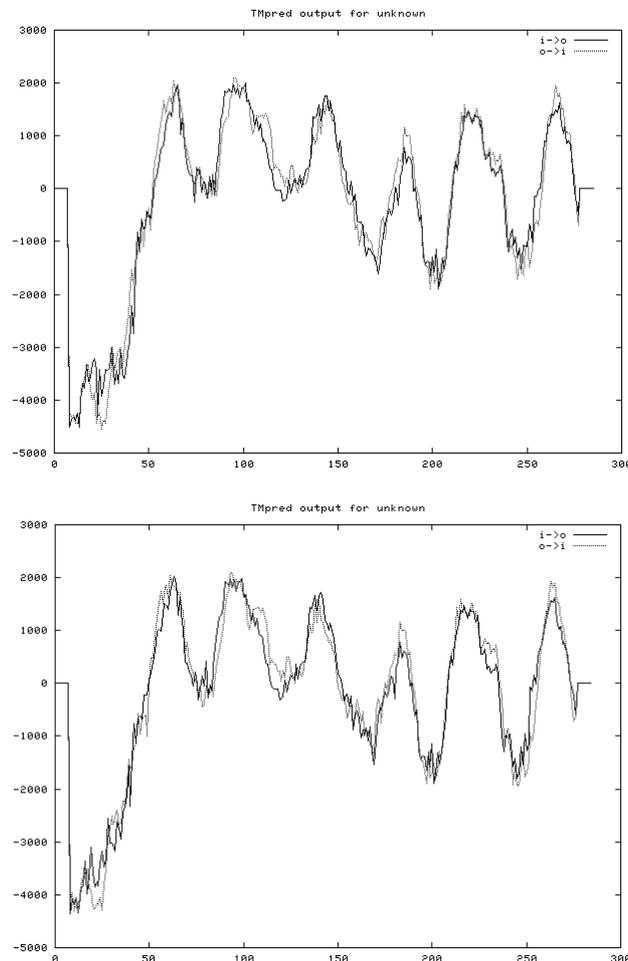


Abbildung 3-13 : Hydrophobizitätsprofil von *TRAMP* (oben) und *LeAqp2* (unten) nach dem Kyte & Doolittle-Algorithmus. Positive Bereiche deuten auf stark hydrophobe Abschnitte in der Proteinsequenz hin, die möglicherweise in die Membran inserieren. Auf dem X-Achsenabschnitt sind die Aminosäuren numeriert. Sowohl N- als auch C-Terminus sind cytoplasmatisch lokalisiert.

Aufgrund eines Sequenzvergleiches auf Proteinebene (Abbildung 3-14) mit Vertretern der drei pflanzlichen Aquaporinfamilien (*PIP1b*, *PIP2b*,  $\alpha$ *TIP*) konnten *TRAMP* und *LeAqp2* der PIP1-Unterfamilie zugeordnet werden. Beide Proteine zeigen die größte Ähnlichkeit zum Vertreter der PIP1-Unterfamilie. Zur PIP2-Unterfamilie und den TIPs bestanden geringere Homologien. Die Zugehörigkeit zur PIP-Familie wird weiterhin durch die auffallend langen N-Termini (56 bzw. 54 Aminosäuren) als auch das Molekulargewicht (30,7 bzw. 30,4 kDa) und den hohen isoelektrischen Punkt (8,3 bzw. 9,0) unterstützt. Vertreter der TIP-Unterfamilie sind im allgemeinen kleiner und saurer als die anderen Aquaporine und zeichnen sich eher durch kürzere N-Termini aus (JOHANSSON *et al.*, 2000).

TRAMP	1	MAENKEEDVKL	GANKFRETQPI	GTAAQT	DKDYKEPPPAPLFE	PGELSSWSFY	RAGIAEFM
<i>LeAqp2</i>	1	-MEGKEEDVKV	GANKYSERQPI	GTSAQS	-KDYKEAPPAPLFE	AGELHSSWSFY	RAGIAEFM
TRAMP	61	ATFLFLYITILTVMGL	LKRSDS	-----	LCS	VGIQGVAWAFGGMIFALVY	CTAGISGGH
<i>LeAqp2</i>	59	ATFLFLYITVLTVMG	YSRANS	-----	KCS	VGVQGIAWAFGGMIFALVY	CTAGISGGH
TRAMP	114	INPAVTFGLFLARKLSL	TRAVFYVMQCLGAI	CGAGVVKGF	MVGPYQR	GGGANV	INPGY
<i>LeAqp2</i>	112	INPAVTFGLFLARKLSL	TRAVFYIVMQCLGAI	CGAGVVKGF	QPSL	GTKGGANV	AHGY
TRAMP	174	TKGDGLGAEIIGTFVLVY	TVFSATDAKRNARD	SHVPILAPLP	IGFAVFLVHLATIPITGT		
<i>LeAqp2</i>	172	TKGDGLGAEIIGTFVLVY	TVFSATDAKRNARD	SHVPILAPLP	IGFAVFLVHLATIPITGT		
TRAMP	234	GINPARSLGAAI	IYND	EHAWNDHWIFVW	GP	MIGAALAAIYHQ	ITIRAMPF
<i>LeAqp2</i>	232	GINPARSLGAAI	VYNKE	EHAWDDHWIFVW	GP	FIGAALAAIYHQ	VIIRAMPFKSGN

Abbildung 3-14: Sequenzvergleich von *TRAMP* und *LeAqp2* (Aminosäuren sind im 1-Buchstabencode dargestellt.) Bereiche mit hoher Identität sind fett gedruckt, solche mit hoher Identität grau hinterlegt. Die ermittelten transmembranen Helices von *TRAMP* und *LeAqp2* sind gelb gekennzeichnet. Weiterhin sind die konservierten NPA-Motive grün, mögliche Phosphorylierungsstellen blau sowie konservierte Cysteine rot dargestellt.

### 3.6.2.3 UNTERSUCHUNGEN ZUR MRNA-EXPRESSION

Zunächst wurde zur Charakterisierung der beiden cDNAs die gewebsspezifische Expression der mRNA anhand von Northern-Hybridisierungen analysiert. Es wurde jeweils RNA aus Blättern, der Sproßachse, der Wurzel sowie von grünen und reifen roten Früchten verwendet. Als Sonde diente die gesamte cDNA-Sequenz von *TRAMP* bzw. *LeAqp2*. Obwohl die beiden Sequenzen zu 84% übereinstimmen, waren die Signale im Northern Blot spezifisch für die jeweils untersuchte mRNA. Aus der Abbildung 3-15 ist ersichtlich, daß *TRAMP* vor allem in Blättern und im Wurzelbereich exprimiert wird, während sowohl der Sproß als auch die beiden untersuchten Fruchtstadien wesentlich weniger des spezifischen Transkripts enthalten. Die Expression von *LeAqp2* unterscheidet sich von dem anderen Aquaporin hinsichtlich der Lokalisation grundlegend, denn hier finden sich die meisten Transkripte im Sproß gefolgt von der Wurzel. In

den Blättern ist die Expression geringer und in der Frucht konnte keine Akkumulation spezifischer mRNA detektiert werden.

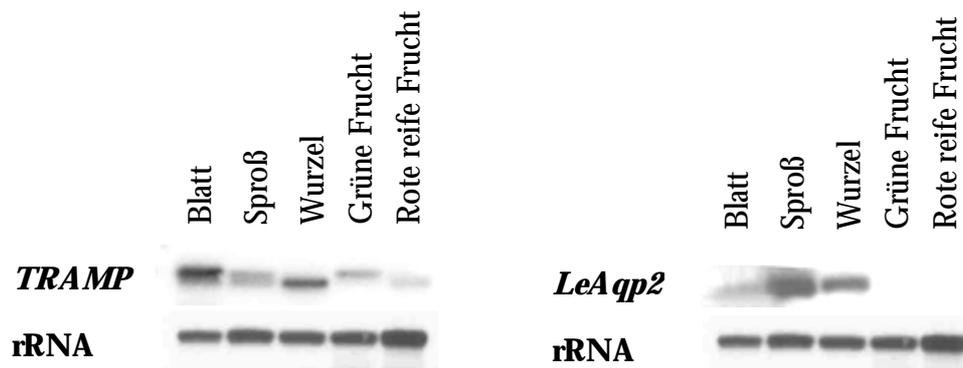


Abbildung 3-15: Gewebsspezifische Expression von *TRAMP* und *LeAqp2*. Jede Spur enthält ca. 5 µg Gesamt-RNA aus Blättern, der Sproßachse, der Wurzel sowie aus grünen und roten Früchten. Als Kontrolle diente die Hybridisierung mit 28S rRNA.

Die Unterschiede in der Expression der beiden mRNAs in den einzelnen Organen deutet darauf hin, daß die entsprechenden Proteine in verschiedene Entwicklungsprozesse involviert sind. Das Expressionsmuster für *TRAMP* bestätigt frühere Ergebnisse, die zeigten, daß die mRNA in Wurzeln sowie während der Fruchtreifung und in älteren Blättern exprimiert wird. Die Expression von *TRAMP* scheint durch das Phytohormon Ethylen beeinflusst zu sein (MAUNDERS *et al.*, 1987; DAVIES UND GRIERSON, 1989). Weiterhin wird die Expression dieses Proteins durch Trockenstreß induziert (FRAY *et al.*, 1994). Im Gegensatz zu *TRAMP* wird *LeAqp2* vor allem in der Sproßachse exprimiert. Möglicherweise steht die Expression von *LeAqp2* in Verbindung mit der Zellstreckung während des Sproßwachstums.

Inwieweit die Expression der beiden Gene von der Infektion der Tomate durch den Parasiten *Cuscuta* beeinflusst wird, wurde durch Northern-Analysen festgestellt. Der Vergleich von infizierten mit mechanisch verwundeten Pflanzen sollte zeigen, ob eine Akkumulation der Transkripte eine auf die Infektion spezifische Antwort darstellt (Abbildung 3-16).

Während das Expressionsmuster von *TRAMP* nach Infektion und Verwundung relativ unverändert ist, führt der Kontakt mit dem Parasiten in der Tomatensproßachse zu einer Akkumulation der Transkripte von *LeAqp2*. Infolge einer Verletzung sinken hingegen die Transkriptmengen sogar. Auffallend ist, daß der Anstieg an *LeAqp2* mRNA im infizierten Gewebe nur transient ist, und zwar mit einem Maximum schon 6 h nach Infektion, jedoch in Sproßabschnitten ohne Parasitenkontakt die mRNA-Konzentration stetig anwächst. Dabei werden sogar höhere Spiegel erreicht als im direkten Infektionsbereich.

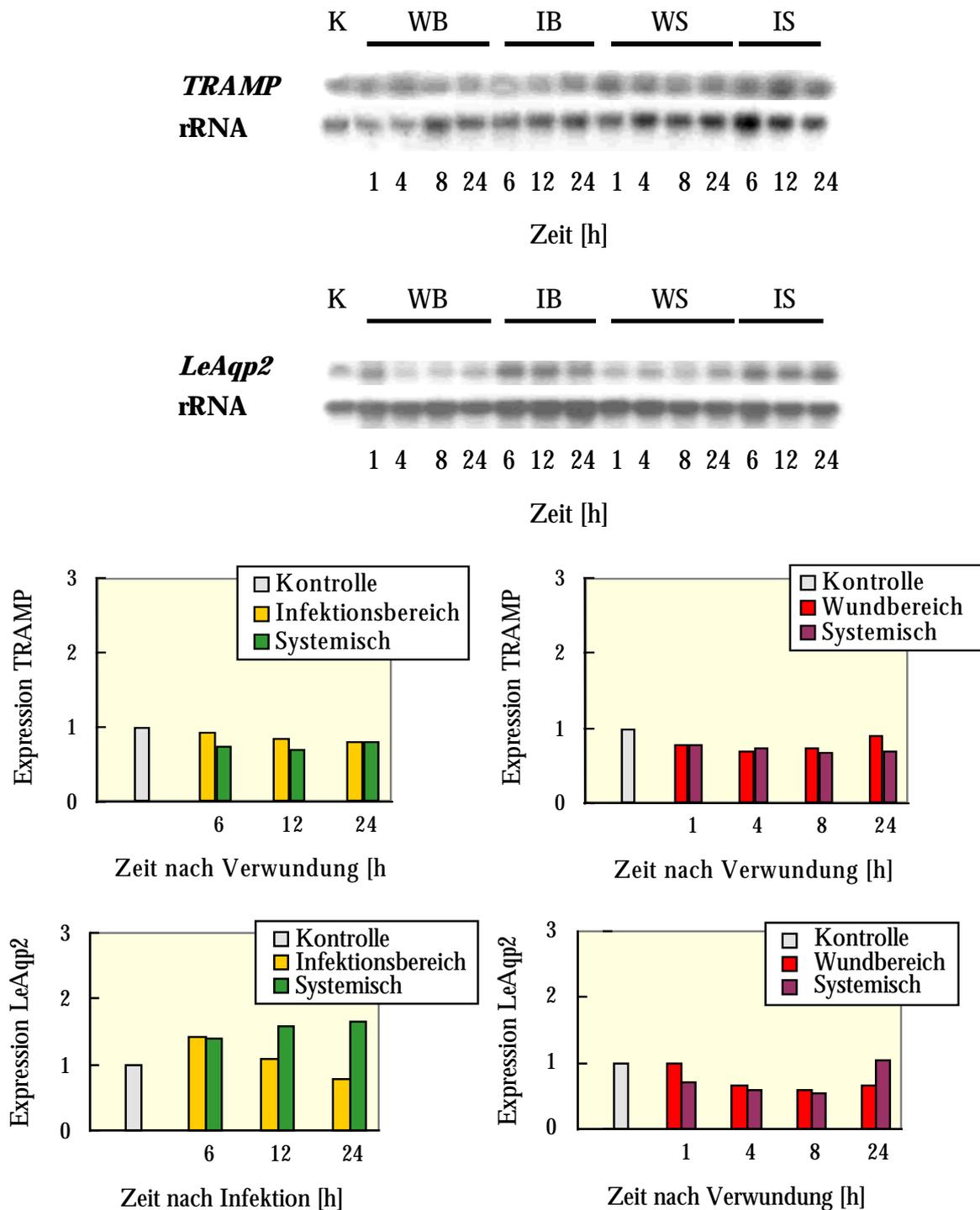


Abbildung 3-16: Expressionsanalyse von *TRAMP*- und *LeAqp2*-mRNA in Sprossen von *Lycopersicon esculentum* nach *Cuscuta reflexa*-Infektion bzw. Verwundung über einen Zeitraum von 24 h. Northern Blot (oben) mit Gesamt-RNA aus unbehandeltem Sproß (K), dem Wundbereich (WB), dem Infektionsbereich (IB), einem Sproßabschnitt oberhalb der Verwundung (WS), einem Sproßabschnitt oberhalb des Infektionsbereiches (IS). Die Hybridisierung mit 28S rRNA diente als Mengenabgleich. Quantifizierung der Expression in Relation zu unbehandelten Sproßachsen (Kontrolle, Expression = 1)

Unter der Annahme, daß in der kompatiblen Wirtspflanze *Nicotiana tabacum* eine zu *LeAqp2* homologe mRNA exprimiert wird, wurde in dem System Tabak-*Cuscuta reflexa* ebenfalls die Expression einer aquaporinhomologen mRNA nach Infektion untersucht. Vergleicht man die Expression im kompatiblen Wirt mit der in der inkompatiblen Pflanze wird deutlich, daß in der kompatiblen Pflanze die Expression einer aquaporinhomologen Sequenz sehr viel stärker induziert wurde. Die Konzentration an mRNA war innerhalb der ersten 24 h mindestens 4-5 mal so hoch als in den unbehandelten Kontrollen. Es ist sogar möglich, daß die mRNA-Konzentration im weiteren Infektionsverlauf noch weiter ansteigt.

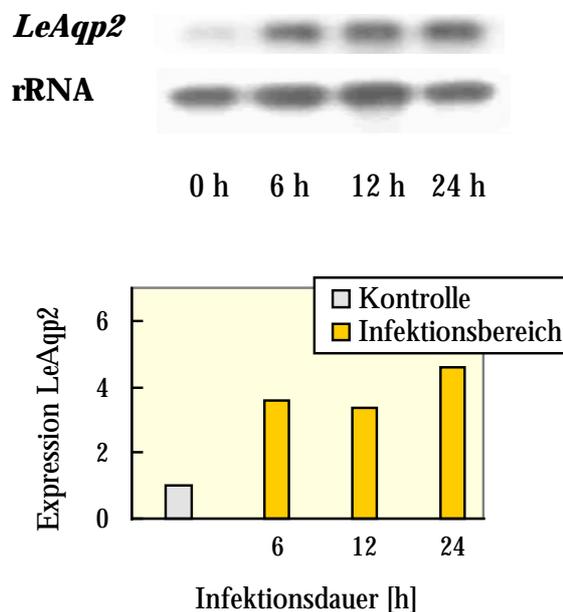


Abbildung 3-17: Expression einer homologen mRNA zu *LeAqp2* im Infektionsbereich von *Nicotiana tabacum* nach *Cuscuta reflexa*-Infektion über einen Zeitraum von 24 h. Als Mengenabgleich diente Hybridisierung mit 28S rRNA.

Die Expressionsstudien zeigen, daß die Interaktion von Parasit und Wirtspflanze, sei sie kompatibel oder inkompatibel, von einer Akkumulation einer aquaporinhomologen mRNA begleitet wird. Diese verstärkte Expression wird spezifisch durch die Infektion ausgelöst und stellt keine allgemeine Streßreaktion dar, da durch eine künstliche Verletzung als Modell eines exogenen Stresses keine veränderte Expression hervorgerufen werden konnte. Wenngleich in der inkompatiblen Tomate eine verstärkte Akkumulation beobachtet werden kann, ist offensichtlich, daß dieses nicht ein Teil der Abwehrreaktion darstellt, denn im kompatiblen Tabak fällt die Reaktion bei weitem stärker aus. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die Herstellung einer

funktionsfähigen Verbindung zwischen Parasit und Wirt die vermehrte Expression von Aquaporinen erfordert. Nach den Ergebnissen der Northern-Analysen gibt es keinen Zusammenhang zwischen der Expression von *TRAMP-RNA* und der Infektion durch *C. reflexa*.

### 3.8.2 FUNKTIONSANALYSE VON TRAMP & LEAQP2 IM OOZYTENSYSTEM

Die funktionelle Charakterisierung erfolgte durch Expression der cRNA von *TRAMP* und *LeAqp2* in Oozyten des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus leavis*, da es sich um relativ große Einzelzellen handelt. Allerdings spiegelt die gemessene Wasserpermeabilität die tatsächlichen Vorgängen in der Pflanze nicht korrekt wider. Über Schwellungsexperimente an Oozyten sollte gezeigt werden, ob die beiden mRNAs funktionelle Aquaporine codieren. Die Untersuchungen wurden im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt, in der die verwendete Methode ausführlich dargestellt ist (UEHLEIN, 2000, Diplomarbeit).

Die Oozyten wurden mit *TRAMP*- bzw. *LeAqp2*-cRNA transformiert und anschließend in hypotonischem Medium inkubiert. Aus der folgenden Volumenzunahme konnten die Wasserpermeabilitätskoeffizienten  $P_f$  ermittelt werden. Dieser Wert gilt als Maß für die Transportgeschwindigkeit von Wassermolekülen über eine Membran.

Während die Wasserpermeabilität von *TRAMP*-transformierten Oozyten sich in gleichem Maße wie die der Kontrollen (Injektion von Wasser) veränderte, zeigten Zellen, in die *LeAqp2*-cRNA injiziert worden war, eine etwa 1,5fach höhere Durchlässigkeit für Wasser als die Kontrollzellen (Abbildung 3-18).

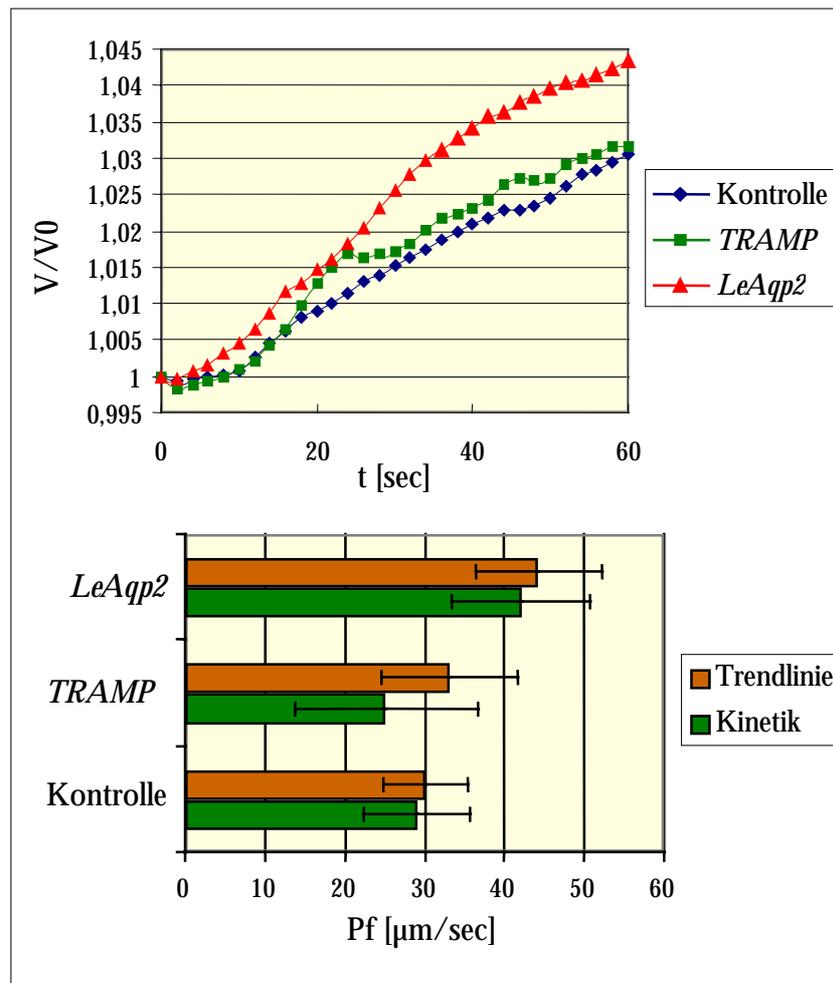


Abbildung 3-18: Relative Volumenzunahme in hypotonischem Medium (oben) und daraus ermittelte mittlere  $P_f$ -Werte (UEHLEIN, 2000)

Weiterhin wurde der Einfluß von Quecksilber-Ionen auf die Wasserpermeabilität von *TRAMP* und *LeAqp2* untersucht. Dabei sank die *LeAqp2*-vermittelte Permeabilität um ca. 20%. In *TRAMP*-transformierten Zellen und Kontrollen führte die Behandlung mit  $\text{HgCl}_2$  dagegen zu einer verstärkten Wasseraufnahme.

Einige der bisher bekannten Aquaporine zeigen nicht nur eine erhöhte Permeabilität für Wasser, sondern vermitteln ebenso einen Transport von kleinen, neutralen Substanzen wie Glycerin oder Harnstoff (ISHIBASHI *et al.*, 1997). Die physiologische Bedeutung eines gemeinsamen Transportprozesses ist allerdings bis heute noch unklar.

Weder für *TRAMP* noch für *LeAqp2* konnte in den Untersuchungen zur Selektivität eine gegenüber der Kontrolle veränderte Glycerinpermeabilität nachgewiesen werden. Als Vergleich dienten Oozyten, die mit dem bakteriellen Glycerintransporter *GlpF* aus *E. coli* (MAUREL *et al.*, 1994) transformiert waren.

Auf der Grundlage der vorliegenden Daten kann *LeAqp2* als funktionelles Aquaporin angesehen werden. Jedoch sind die im Oozytensystem erreichten Wasserpermeabilitäten vergleichsweise gering. Während andere als funktionell charakterisierte Aquaporine aus *Nicotiana tabacum* oder *Samanea saman* 10-20fache Wasserpermeabilitätssteigerungen aufweisen (BIELA, 2000), liegt die Zuwachsrate für *LeAqp2* nur bei etwa 45%. Die verhältnismäßig geringe Permeabilitätssteigerung durch *LeAqp2*-Expression ist eventuell durch *in vivo* vorhandene posttranslationelle Regulation des Proteins, wie sie für einige Aquaporine berichtet wurde, begründet. Aus der Sequenzanalyse von *LeAqp2* ergab sich z.B. eine mögliche Phosphorylierungsstelle in der extrazellulären Schleife B. Kürzlich wurden zwei funktionelle Aquaporine der PIP1-Unterfamilie aus *Zea mays* beschrieben (CHAUMONT *et al.*, 2000), die ebenfalls nur geringfügig die Wasserpermeabilität der Oozytenmembran erhöhen.

Verschiedene Aquaporine pflanzlicher und tierischer Herkunft zeigen unter dem Einfluß von Quecksilberionen eine verminderte Wasserpermeabilität (MAUREL, 1997; BORGNIA *et al.*, 1999). Als Ursache für den inhibitorischen Effekt des Schwermetalls werden Cysteine angesehen, was PRESTON *et al.* (1993) durch Austausch des Cysteins 189 in AQP1 gegen ein Serin nachweisen konnten. Trotz nachfolgender Studien, die die Cystein-vermittelte Quecksilbersensitivität bestätigten (DANIELS *et al.*, 1994, 1996) ist der Mechanismus noch ungeklärt. Naheliegend ist eine Bindung der  $Hg^{2+}$ -Ionen an die SH-Gruppe des Cysteins, wodurch eine Konformationsänderung des Aquaporinproteins ausgelöst werden kann (BARONE *et al.*, 1997), die letztendlich zur Blockierung des Wassertransportes über die Pore führt. In der Proteinsequenz von *LeAqp2* sind mehrere Cysteine enthalten, die Ursache der beobachteten Quecksilbersensitivität (bei 0,2 mM  $HgCl_2$ ) sein könnten.

In den Untersuchungen zur Selektivität von *LeAqp2* konnte keine Glycerinpermeabilität festgestellt werden. Als mögliche strukturelle Voraussetzungen für eine erhöhte Permeabilität gegenüber Glycerin werden verschiedene Sequenzmotive diskutiert (BORGNIA *et al.*, 1999). Entsprechende Proteine sind durch ein [GLYY]-Motiv in der Schleife C sowie ein [NPARD]-Motiv in der Schleife E anstelle von [NPARS] charakterisiert. Beide Motive sind in dem Aquaporin aus *L. esculentum* nicht enthalten, wodurch sich die Impermeabilität für Glycerin erklären läßt.

Obwohl *TRAMP* die wesentlichen Strukturmerkmale eines Aquaporins beinhaltet, konnte es im Rahmen dieser Arbeit nicht als funktionelles Aquaporin identifiziert werden. Einerseits können diese Ergebnisse darauf beruhen, daß *TRAMP* zwar ein transmembranes Protein darstellt, das aber eine Permeabilität für andere Substanzen als Wasser aufweist. Weitere Gründe können wie im Fall von *LeAqp2* posttranslationelle Modifikationen sein, die das Membranprotein erst in die für den Transport notwendige Konformation überführen. Auch sind aus der Literatur einige

Beispiele von Vertretern der PIP1-Unterfamilie bekannt, deren Aktivität in Oozyten eher gering war bzw. gar nicht erst nachgewiesen werden konnte.

Letztendlich sind die im Oozytensystem gewonnenen Kenntnisse nur bedingt auf den pflanzlichen Organismus übertragbar, so daß die funktionelle Charakterisierung *in planta* notwendig bleibt.

### **3.6.3 MÖGLICHE BEDEUTUNG VON CYTOSKELETT-KOMPONENTEN (B9 UND 44)**

Zwei der isolierten Klone entsprechen Teilen von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, den beiden Polypeptiden aus denen die Mikrotubuli zusammengesetzt sind. Die Bestandteile des Cytoskelettes erfüllen in der pflanzlichen Entwicklung sehr vielfältige, bisher nur teilweise verstandene Aufgaben. So sind die Mikrotubuli nicht nur an Zellteilungs- und Differenzierungsprozessen beteiligt, sondern bewirken auch ein koordiniertes Zellwachstum. Dabei wird die Richtung der Zellstreckung durch die Orientierung der kortikalen Mikrotubuli bestimmt. Die Zellwand wachsender Zellen enthält miteinander vernetzte Cellulosemikrofibrillen, die parallel zueinander und quer zur Ausrichtung der Zellstreckung angeordnet sind. Es wird weithin angenommen, daß die in der Membran integrierte Cellulosesynthase sich entlang der kortikalen Mikrotubuli bewegt und auf diese Weise eine geordnete Einlagerung neu gebildeter Mikrofibrillen ermöglicht wird (GIDDINGS UND STAEHELIN, 1991). Experimente, die zeigten, daß die Zerstörung der Mikrotubuli zu einem ungerichteten Zellwachstum führen, unterstützen diese Theorie (BASKIN *et al.*, 1994). Betrachtet man die anatomischen Veränderungen in der Wirtspflanze, ist es also nicht verwunderlich, daß die Interaktion von *C. reflexa* und *L. esculentum* mit einer Akkumulation von Transkripten des Tubulins einhergeht.

### **3.6.4 MÖGLICHE BEDEUTUNG EINES PUTATIVEN REVERSIBEL GLYCOSYLIERTEN POLYPEPTIDS (KLON 79)**

Die Sequenzanalyse für den Klon 79 (Identifikationsnummer **AF286271**, *LeRGP1*) ergab, daß Homologien zu den C-Termini bereits bekannter reversibel glycosylierter Polypeptide (RGP) bestehen. Die RGPs sind lösliche Proteine, die mit dem Golgi-Apparat assoziiert vorliegen. Aufgrund ihrer Struktur wird vermutet, daß RGPs  $\beta$ -Glycosyltransferasen sind, die einzelne Zucker aus einer nukleosidischen Bindung auf ein Akzeptormolekül übertragen, das ein Intermediärprodukt in der Biosynthese von Polysacchariden sein könnte (SAXENA UND BROWN, 1999). Es wird angenommen, daß diese Proteine an der Synthese von Xyloglucanen beteiligt sind.

---

Die Biosynthese der Zellwandpolysaccharide erfolgt zum einen an der Plasmamembran, wo der Komplex der Cellulose-Synthase lokalisiert ist, und andererseits im Golgi-Apparat. Diejenigen Polysaccharide, die nicht nur aus Glucose aufgebaut sind, werden im Golgi synthetisiert. Bei der Suche nach den Enzymen, die an der Biosynthese der Zellwandpolysaccharide beteiligt sind, zeigte sich, daß bestimmte Polypeptide reversibel UDP-Glucose, UDP-Xylose und UDP-Galactose binden (DHUGGA *et al.*, 1991, 1997; DELGADO *et al.*, 1998). Diese Zucker stellen die Hauptbestandteile der Xyloglucane dar. Der Mechanismus der Glycosylierung ist bisher noch nicht vollständig geklärt, doch besitzen alle bisher bekannten RGPs eine Bindungsregion für nukleosidische Zucker (SAXENA UND BROWN, 1999).

Falls sich die Funktion des vollständigen Proteins *LeRGP1* als reversibel glycosyliertes Polypeptid bestätigt, sind nicht nur unmittelbar mit der Zellwand assoziierte Proteine von einer verstärkten Expression im Zuge der Infektion mit *C. reflexa* betroffen, sondern auch Proteine, welche die für eine Zellstreckung notwendigen Vorstufen von Polysacchariden liefern.

### 3.7 GENEXPRESSION VON ZELLWAND-ASSOZIIERTEN PROTEINEN

#### 3.7.1 CHARAKTERISIERUNG EINER XYLOGLUCAN-ENDOTRANSGLYCOSYLASE (XET)

##### 3.7.1.1 XYLOGLUCAN-ENDOTRANSGLYCOSYLASEN

Xyloglucane sind ein wesentlicher Bestandteil der pflanzlichen Zellwand. Sie besitzen, wie die Cellulose, ein Rückgrat aus  $\beta$ -1,4-verknüpften Glucoseresen. Diese sind durch unterschiedlich zusammengesetzte Mono-, Di- und Trisaccharidseitenketten modifiziert. Zunächst wurde angenommen, daß Cellulose und Xyloglucane nicht-kovalent über Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind. Jedoch zeigten Berechnungen zusammen mit biochemischen Studien, daß die Interaktion zwischen den beiden Polysacchariden weitaus komplexer sind. Die Struktur der Xyloglucane ermöglicht es, mehrere Cellulosemikrofibrillen miteinander zu vernetzen. Mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen der Zellwand konnte nachgewiesen werden, daß zwischen Cellulosemikrofibrillen und Xyloglucanen echte Verbindungen bestehen. Neueste Modelle gehen davon aus, daß die Mikrofibrillen durch Xyloglucane zum einen bedeckt, aber andererseits auch untereinander verknüpft werden, wodurch eine dreidimensionale, sehr starre Struktur gebildet wird (ROSE UND BENNETT, 1999).

In wachsenden Zellen unterliegen die Xyloglucane einer regen Stoffwechselaktivität. Aus der Struktur der Zellwand ist ersichtlich, daß zunächst eine Auflockerung der Wand erfolgen muß, um überhaupt eine Ausdehnung zu ermöglichen. Damit die ursprüngliche Festigkeit wiederhergestellt werden kann, ist der nachfolgende Einbau neuer Polysaccharide notwendig. An der Spaltung und Modifizierung der Xyloglucane sind unterschiedliche Enzyme beteiligt, die Endo-1,4- $\beta$ -glucanasen (EGasen), die Xyloglucan-Endotransglycosylasen (XETs) und die Exo-Glycosylhydrolasen (Glycosidasen).

XET-Aktivität wurde erstmals in den frühen 90ern beschrieben (FRY *et al.*, 1992). Xyloglucan-Endotransglycosylasen katalysieren die Spaltung und Religation von Xyloglucanmolekülen (s. 2.12). Abhängig von dem jeweiligen Donor- und Akzeptormolekül sind sie für die Depolymerisierung, die Modifizierung bzw. den Einbau neu synthetisierter Xyloglucane in die pflanzliche Zellwand verantwortlich. Im Gegensatz zu EGasen und Glycosidasen besitzen XETs keine hydrolytische Aktivität, das bedeutet, das Wasser kein Akzeptor für das abgespaltene Xyloglucanfragment darstellt.

### 3.7.1.2 ISOLIERUNG DER VOLLÄNGEN-CDNA UND SEQUENZANALYSE

Ausgehend von der Sequenz des cDNA-Fragmentes aus der subtraktiven Hybridisierung wurden Primer für die 5'- und 3'-„RACE“-PCR entwickelt und wie im Methodenteil beschrieben zur Synthese der 5'- und 3'-Enden der cDNA eingesetzt:

GSP1 (5'-antisense Primer): 5'-TTCTTGTGGVGTGGCAGCTTCAC-3'

GSP2 (3'-sense Primer): 5'-GTTTGATCCAACCAAGGGCTACC-3'

Nach Klonierung und Sequenzierung der Produkte erfolgte die Isolierung der gesamten cDNA mittels PCR unter Verwendung von Primern, die sich aus dem 5'- bzw. 3'-Ende ableiteten (s. 2.9.2). Die PCR ergab ein Produkt von etwa 1,2 kb. In Abbildung 3-19 sind sowohl das PCR-Produkt als auch die Struktur der cDNA mit dem codierenden Bereich dargestellt. Die ermittelte Sequenz ist identisch mit der von (OKAZAWA *et al.*, 1993) aus *L. esculentum* isolierten Xyloglucan-Endotransglycosylase.

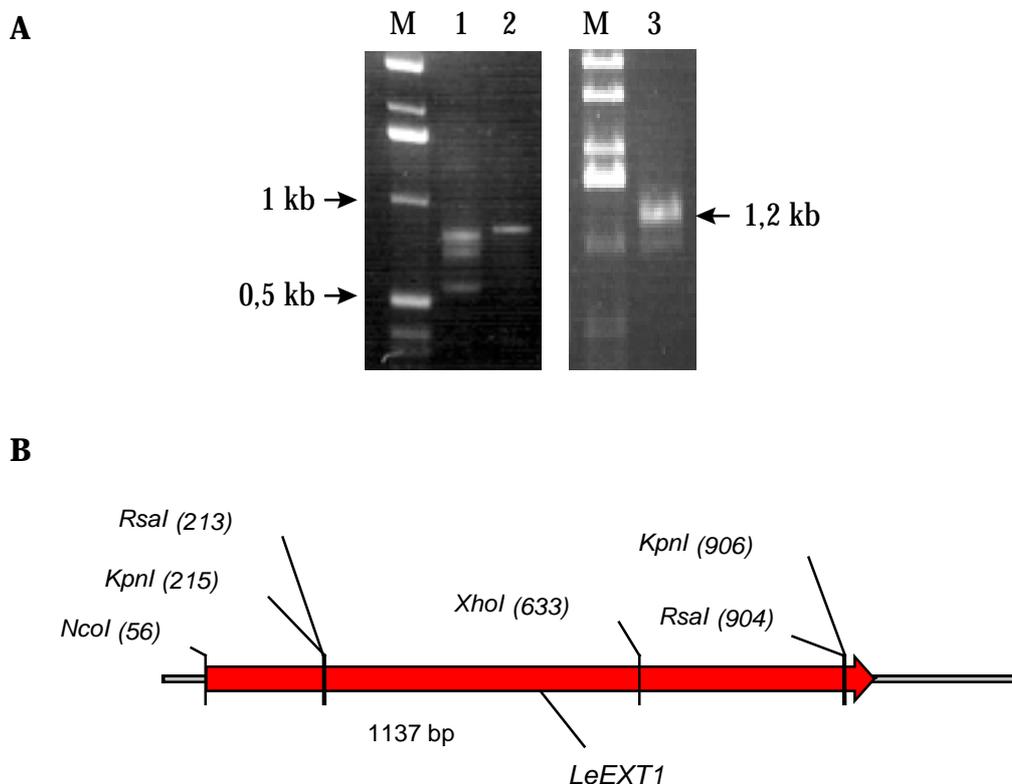


Abbildung 3-19: **A** Gelelektrophoretische Auftrennung der 5'- und 3'-RACE-Produkte (1,2) sowie der vollständigen cDNA von *LeEXT1* (3). **B** Struktur der cDNA mit codierender Region (rot), untranslatierten Bereichen sowie einigen Restriktionsschnittstellen.

Aufgrund der Primärstruktur und enzymatischen Aktivität werden die XETs in 3 Subfamilien eingeteilt. Die *LeEXT1* gehört der Subfamilie I an (NISHITANI, 1997). Alle bisher bekannten XETs besitzen N-terminal ein Signalpeptid, das sich typischerweise durch einen hohen Gehalt an hydrophoben Aminosäuren auszeichnet (Abbildung 3-20). Die Signalsequenz dient der Sekretion des Enzyms in den extrazellulären Raum und wird später abgespalten, um ein funktionsfähiges Protein zu erhalten. Nach Heijne (NIELSEN *et al.*, 1997) wurde die Schnittstelle für das Signalpeptid bei Glycin (23) ermittelt. Im C-terminalen Abschnitt sind mehrere Cysteine zu finden, die die Bildung von di- oder oligomeren Formen des Enzyms ermöglichen. Es wird vermutet, daß solche Strukturen die XET-Aktivität regulieren könnten (NISHITANI, 1997).

Sämtliche Mitglieder der der XET-Genfamilie enthalten die konservierte Aminosäuresequenz **DEIDI/FEFLG**, die auch in verschiedenen bakteriellen Endo- $\beta$ -1,3-1,4-glucanasen als katalytische Domäne konserviert vorliegt (BORRISS *et al.*, 1990). Diese Enzyme spalten ebenfalls  $\beta$ -1,4-Glycosylbindungen. Durch Mutagenese des ersten Glutamats zu Glutamin in der Xyloglucan-Endotransglycosylase TCH4 aus *A. thaliana* geht die enzymatische Aktivität verloren (CAMPBELL UND BRAAM, 1998). Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, daß es sich in diesem Motiv um die katalytische Domäne der XETs handelt.

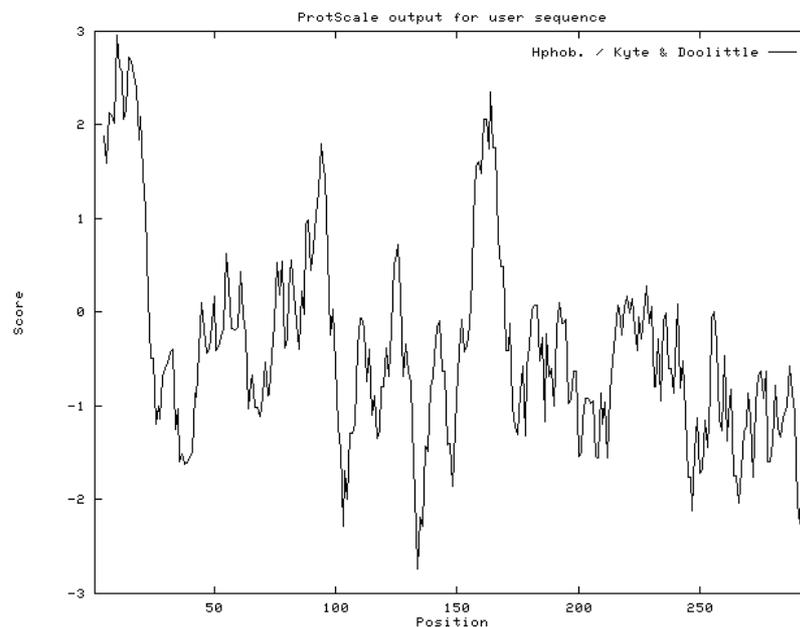


Abbildung 3-20: Hydrophobizitätsprofil von *LeEXT1* nach dem Kyte & Doolittle-Algorithmus. Positive Bereiche zeigen relativ hydrophobe Abschnitte im Protein an. Auf dem X-Achsenabschnitt sind die Aminosäuren nach ihrer Reihenfolge nummeriert. Innerhalb der ersten ca. 25 Aminosäuren zeichnet sich das Protein durch besondere Hydrophobie aus.

```

1  MGI I K G V L F S I V L I N L S L V V F C G Y P R R P V D V P F W K N Y E P S W A S H H I K F L N G G T T T D L I L D
61  R S S G A G F Q S K K S Y L F G H F S M K M R L V G G D S A G V V T A F Y L S S N N A E H D E I D F E F L G N R T G Q P
121 Y I L Q T N V F T G G K G N R E Q R I Y L W F D P T K G Y H S Y S V L W N T Y L I V I F V D D V P I R A F K N S K D L G
181 V K F P F N Q P M K I Y S S L W D A D D W A T R G G L E K T N W A N A P F T A S Y T S F H V D G C E A A T P Q E V Q V C
241 N T K G M K W W D Q K A F Q D L D A L Q Y R R L R W R V R Q K Y T V Y N Y C T D K A R Y P V P P P E C T K D R D I

```

Abbildung 3-21: Aminosäuresequenz von *LeEXT1* im 1-Buchstabencode. Das Signalpeptid ist blau hervorgehoben, die katalytische Domäne [DEIDFEFLGN] gelb. Es schließt sich eine Phosphorylierungsstelle unmittelbar an. Im C-terminalen Bereich sind mehrere Cysteine enthalten, die die Ausbildung von Oligomeren begünstigen.

### 3.7.1.3 UNTERSUCHUNGEN ZUR MRNA-EXPRESSION

Zur Charakterisierung von *LeEXT1* wurde die gewebsspezifische Expression dieser mRNA untersucht. Dazu wurde RNA aus Geweben verschiedener Organe isoliert und über Northern-Hybridisierung analysiert. Während im Sproß die meisten Transkripte nachgewiesen werden konnten, wird *LeEXT1* in der Wurzel nur sehr schwach exprimiert. Im Blatt und den untersuchten Fruchtstadien wurden keine Hybridisierungssignale detektiert.

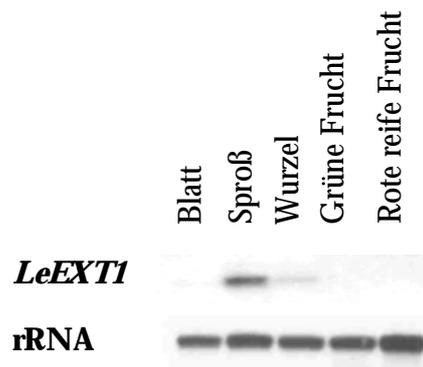


Abbildung 3-22: Gewebsspezifische Expression von *LeEXT1*-mRNA. Hybridisierung von RNA aus Blättern, der Sproßachse, der Wurzel sowie zwei Fruchtstadien mit genspezifischer Sonde. Als Mengenabgleich diente die Hybridisierung mit 28S rRNA.

In früheren Studien wurde gezeigt, daß *LeEXT1* in sich streckenden Hypocotylabschnitten und während der Fruchtentwicklung akkumuliert wird (CATALÁ *et al.*, 1997, 2000), d.h., in Geweben mit starkem Zellwachstum. Dagegen ist die Expression in der reifenden Frucht nicht mehr nachweisbar. Somit scheinen die untersuchten Früchte Entwicklungsstadien anzugehören, in denen die maximale Größe schon erreicht ist. Allerdings ist aus dem Northern Blot ersichtlich, daß *LeEXT1* vorwiegend im Sproß Funktionen zu erfüllen hat. Aus der Tomate sind noch weitere XETs bekannt, die jedoch fruchtspezifisch exprimiert werden (DE SILVA *et al.*, 1994).

Die Analyse des Expressionsmusters für *LeEXT1* im Verlauf des ersten Infektionstages sollte Aufschluß darüber geben, wie stark und wie schnell die Expression von *LeEXT1* nach *Cuscuta*-Befall beeinflusst wird. Es wurde erneut die Infektion mit einer mechanischen Verwundung verglichen.

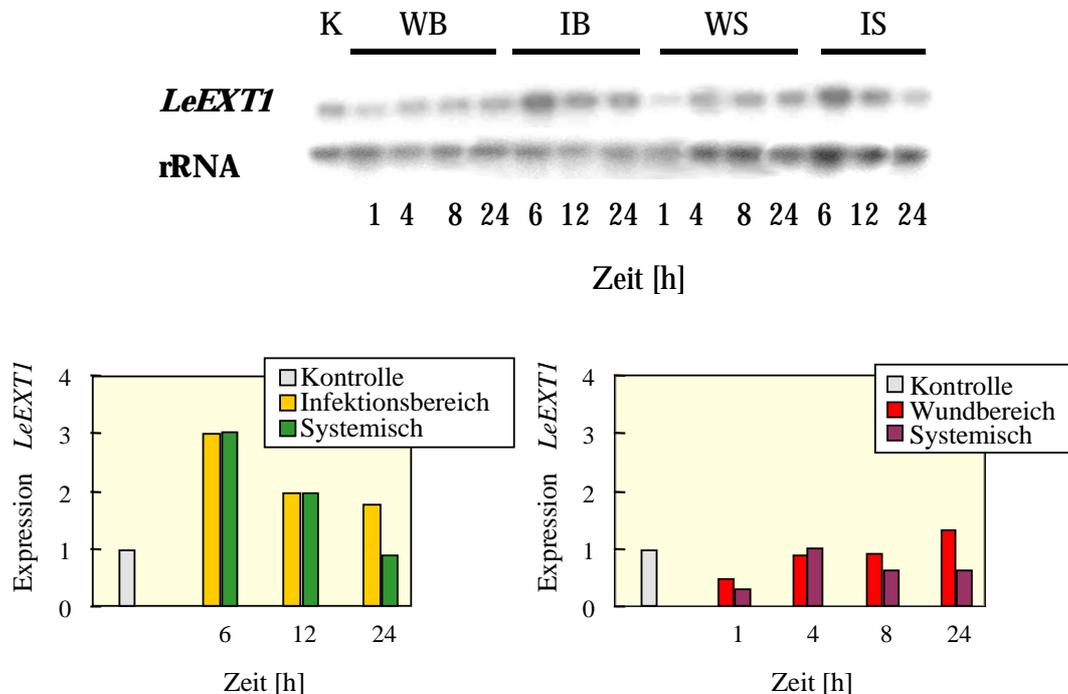


Abbildung 3-23: Expressionsanalyse von *LeEXT1*-mRNA in Sprossen von *Lycopersicon esculentum* nach *Cuscuta reflexa*-Infektion bzw. Verwundung über einen Zeitraum von 24 h. Northern Blot (oben) mit Gesamt-RNA aus unbehandeltem Sproß (K), dem Wundbereich (WB), dem Infektionsbereich (IB), einem Sproßabschnitt oberhalb der Verwundung (WS), einem Sproßabschnitt oberhalb des Infektionsbereiches (IS). Die Hybridisierung mit 28S rRNA diente als Mengenabgleich. Quantifizierung der Expression in Relation zu unbehandelten Sproßachsen (Kontrolle, Expression = 1)

Wie die Northern-Hybridisierung zeigt, handelt es sich bei *LeEXT1* um ein spezifisch auf die parasitische Infektion zurückzuführende Akkumulation des Transkripts. In verwundeten Pflanzen vermindert sich der Gehalt an spezifischer mRNA sogar kurz nach der Verletzung. Da die Konzentration an *LeEXT1* mRNA schon 6 h nach Infektionsbeginn sehr stark erhöht ist, muß davon ausgegangen werden, daß das entsprechende Gen relativ früh aktiviert wird. Andererseits werden möglicherweise in der Tomate Reaktionen ausgelöst, wenn Parasit und Wirtspflanze nur in sehr losem Kontakt miteinander verbunden sind. Innerhalb der ersten 6 h ist kaum eine echte Anheftung des Parasiten an den Wirtssproß erkennbar. Das schnelle Absinken des Transkriptkonzentration im weiteren Verlauf der Infektion spricht für die Instabilität der

mRNA, auch wenn die Unterschiede in der Transkriptmenge zwischen 12 und 24 h nicht bedeutend sind. Von der Akkumulation an *LeEXT1* mRNA scheint nicht nur der unmittelbare Infektionsbereich betroffen zu sein, denn auch in einem Sproßabschnitt ohne Kontakt zum Parasiten ist die Konzentration erhöht.

Auch in einer kompatiblen Wirtspflanze, wie dem Tabak, akkumulieren im gleichen Zeitraum die Transkripte für eine zu *LeEXT1* homologen XET. Auffallend ist, daß der Anstieg an spezifischer mRNA nicht transient ist, wie im Fall der inkompatiblen Tomate, sondern während der untersuchten 24 h relativ konstant bleibt. Außerdem scheint die Konzentration des entsprechenden Transkripts, insgesamt höher zu sein.

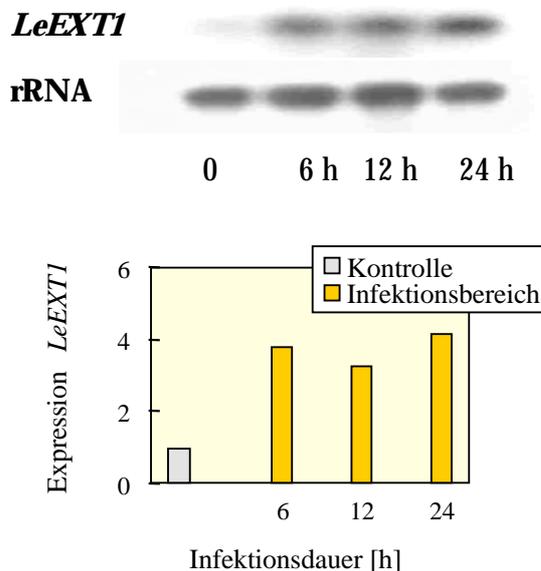


Abbildung 3-24: Expression einer zu *LeEXT1* homologen mRNA aus *Nicotiana tabacum* nach *Cuscuta reflexa*-Infektion über einen Zeitraum von 24 h. Als Mengenabgleich diente die Hybridisierung mit 28S rRNA.

#### 3.7.1.4 HETEROLOGE EXPRESSION IN *E. COLI*

Zur Expression des *LeEXT1*-Proteins in Bakterien wurde die cDNA ohne Signalsequenz amplifiziert und kloniert. Nachdem die Sequenz des PCR-Produktes überprüft worden war, wurden sowohl der Expressionsvektor pGEX-4T2 als auch das Plasmid mit der *LeEXT1*-Insertion mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Not*I behandelt. Anschließend wurden die Fragmente aufgereinigt und *LeEXT1* in den Expressionsvektor ligiert. Die von pGEX-4T2 codierte Glutathion-S-Transferase liegt mit *LeEXT1* in einem Leseraster, so daß bei der Expression ein Fusionsprotein aus GST und der XET entsteht. Zunächst wurde das Konstrukt in den *E. coli*-Stamm TOP 10F', für die Expressionsversuche allerdings in BL21-Zellen

transformiert. Diese Zellen zeichnen sich durch eine verminderte Proteaseaktivität aus, so daß rekombinante Proteine nicht abgebaut werden.

Die Rekombinanten wurden wie im Methodenteil beschrieben kultiviert und die Produktion von Fusionsprotein durch Zugabe von IPTG induziert. Bei der Optimierung von Expressionstemperatur und -dauer zeigte sich, daß, wenn überhaupt, das gewünschte Protein von einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa erst bei Temperaturen zwischen 20 und 25°C gebildet wird und zwar erst nach 5-7 h (Abbildungen 3-25 und 3-26). Außerdem war der Anteil an Fusionsprotein im Vergleich zur reinen GST sehr gering, was auf einen Abbruch der Translation zu Beginn des gewünschten Proteins hinweist. Die Hauptmenge an rekombinantem Protein lag in Form von Einschußkörpern vor, denn der Aufschluß des unlöslichen Rückstandes nach der Lyse der Bakterien enthielt wesentlich mehr Fusionsprotein als das Lysat. Allerdings war das Verhältnis zwischen GST und Fusionsprotein unverändert. Auch eine andere Medienzusammensetzung hatte keinen positiven Einfluß auf die Expression.

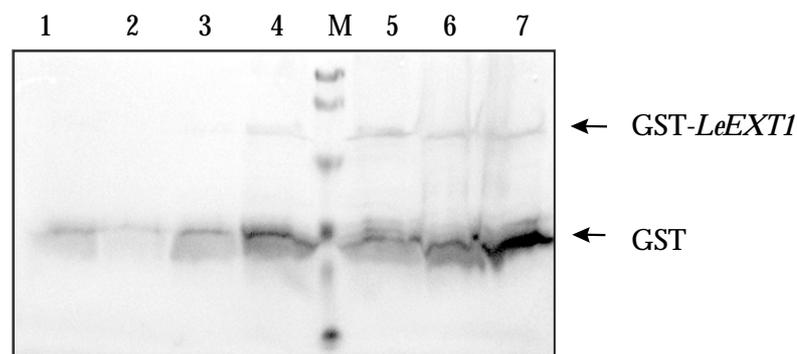


Abbildung 3-25: Expression von *GST-LeEXT1* in *E. coli*. 1-4 Lösliche Fraktion nach 2-5 h Expression bei 25°C. 5-7 Unlöslicher Rückstand nach Zellyse nach 2-4 h Expression. Es wurden jeweils gleiche Anteile an Gesamtprotein aufgetragen.

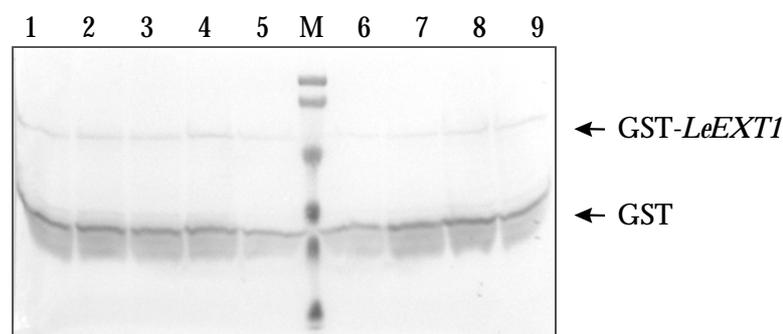


Abbildung 3-26: Expression von *GST-LeEXT1* in *E. coli* unter Verwendung verschiedener Medien. 1-5 LB-Medium mit 1% NaCl (4, 5, 6, 7 und 24 h Expression). 6-9 LB-Medium mit 0,5% NaCl (4, 5, 6 und 7 h Expression).

Wie sich nach Analyse der *LeEXT1*-Sequenz herausstellte, kann die Ursache für den Abbruch der Translation in der Codon-Struktur des Tomatenproteins liegen, da diese von der in *E. coli* verwendeten zum Teil stark abweicht. Besonders auffallend sind die Unterschiede in der Codonbenutzung für die Aminosäure Arginin. Während von allen in *E. coli* vorkommenden Codons nur 0,27% für AGA bzw. 0,16% für AGG stehen, die beide ein Arginin codieren, kommen, treten diese Codons bei *L. esculentum* fast zehnmal häufiger auf (1,52 bzw. 1,12). Ähnliches gilt für die Codons der Aminosäuren Leucin (CTA) und Isoleucin (ATA). Im Falle der *LeEXT1*-Sequenz liegt der Anteil an diesen Codons sogar noch höher (4,7% Arginin). Da schon in den ersten Aminosäuren des Proteins zwei Arginine enthalten sind, läßt sich der Abbruch direkt nach der GST erklären. Eine Möglichkeit, das Problem der unterschiedlichen Codonbenutzung zu umgehen, besteht im gezielten Austausch der entsprechenden Nukleotide. Allerdings wäre das in diesem Fall sehr aufwendig gewesen, denn es hätten mindestens 13 Basen verändert werden müssen. Deshalb wurde gemeinsam mit dem Expressionvektor ein Plasmid in *E. coli* eingebracht, das die Information für die tRNAs der Arginin-Codons enthält. AGA und AGG werden von der gleichen tRNA erkannt. Auf diese Weise konnte das Gleichgewicht zwischen Fusionsprotein und GST sehr in Richtung des ersteren verschoben werden (Abbildung 3-27). Die Expressionsbedingungen wurden erneut optimiert, wobei die größte Ausbeute bei einer Temperatur von 30°C über 2 h erzielt wurde.

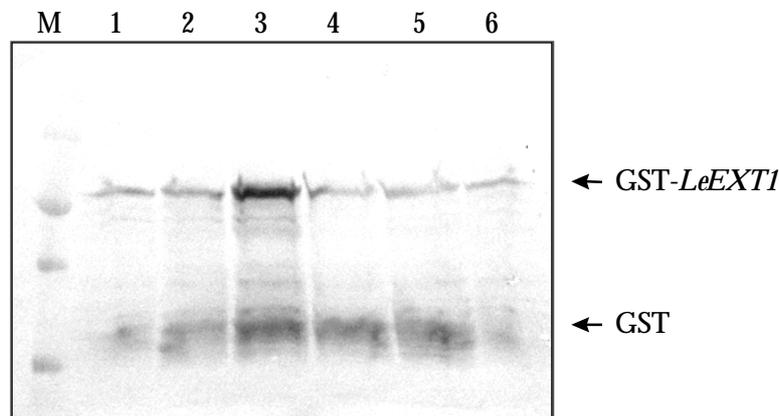


Abbildung 3-27: Expression von *GST-LeEXT1* in BL21-Zellen, die zusätzlich ein Plasmid für tRNAs der Arginincodons AGA und AGG enthalten. 1, 3 und 5 Expression bei 30°C (1, 2 und 3 h); 2, 4, 6 Expression bei 37°C (1, 2 und 3 h)

Nach Beendigung der Expression wurde das Fusionsprotein über Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Unter den Bedingungen des Herstellerprotokolls konnte jedoch nur ein geringer Anteil des Proteins gebunden als auch später wieder eluiert werden. Deshalb mußte der Elutionspuffer dahingehend geändert werden, daß der pH-Wert auf 9 erhöht

und außerdem ein nichtionisches Tensid zugesetzt wurde. Somit sollten unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Protein und Matrix vermindert werden. Obwohl diese Versuche letztendlich erfolgreich verliefen, stand nach der Elution nicht ausreichend Protein für einen Enzymtest zur Verfügung (Abbildung 3-28).

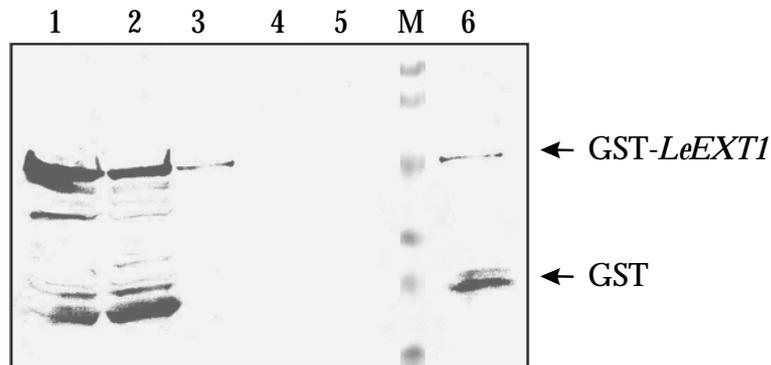


Abbildung 3-28: Aufreinigung des Fusionsproteins *GST-LeEXT1* über Glutathion-Sepharose. 1 Rohextrakt; 2 Nicht gebundener Überstand; 3-5 Waschfraktionen; 6 Eluat. Es wurden jeweils 10 µl aufgetragen.

Die Bindung des Fusionsproteins aus dem Lysat an die Sepharose konnte auch durch Zusatz von n-Octylglycosid nicht verbessert werden. Im Gegenteil, in den Waschfraktionen war sogar mehr Fusionsprotein als zuvor enthalten. Worauf diese Schwierigkeiten beruhen ist allerdings unklar. Möglicherweise liegt das Fusionsprotein in einer Tertiärstruktur vor, die eine effiziente Bindung der GST an das Glutathion verhindert und durch das Tensid nicht aufgehoben werden kann.

### 3.7.1.5 XET-AKTIVITÄT

Zur Bestimmung der XET-Aktivität wurden unterschiedliche Verfahren entwickelt. Sie beruhen alle auf der Übertragung eines Xyloglucanfragmentes auf ein Akzeptoroligosaccharid. Die Detektion der Produkte erfolgt entweder durch Radiometrie, Fluorometrie oder aufgrund einer Viskositätsänderung. Eine Übersicht der Methoden bietet FRY (1997). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Enzymaktivität nach einem radiometrischen Verfahren bestimmt.

Für die enzymatischen Analysen wurden Tomatenpflanzen mit *Cuscuta reflexa*-Sprossen infiziert und nach unterschiedlichen Zeitintervallen (6-60 h nach Infektionsbeginn) Gewebeproben aus den Infektionsbereichen als auch aus darüberliegenden Sproßabschnitten der Wirtspflanze entnommen. Nach der Aufarbeitung der Proben wurde ein Enzymassay angesetzt und die Produktmenge durch Szintillation vermessen.

In der Tomatensproßachse steigt die XET-Aktivität nach *Cuscuta*-Kontakt an, und zwar im unmittelbaren Infektionsbereich und im Gewebe, das keinen direkten Kontakt zum Parasiten hatte. Es scheint, daß schon nach 6 h die Enzymaktivität erhöht ist, allerdings sind die Unterschiede zur Kontrolle noch nicht auffällig. Im weiteren Verlauf der Infektion nimmt die Aktivität weiter zu, bis sie nach 24 h ein Maximum erreicht. Anschließend fällt sie wieder leicht ab, bleibt aber über den untersuchten Zeitraum stets höher als in den Kontrollpflanzen. Erstaunlich ist, daß systemisch, d.h., in darüberliegenden Sproßabschnitten, annähernd gleiche Werte gemessen wurden wie in der Kontaktzone Wirt/Parasit. Hingegen sind die anatomischen Veränderungen nach der Anheftung des Parasiten auf einen sehr kleinen Bereich begrenzt (SAHM *et al.*, 1995).

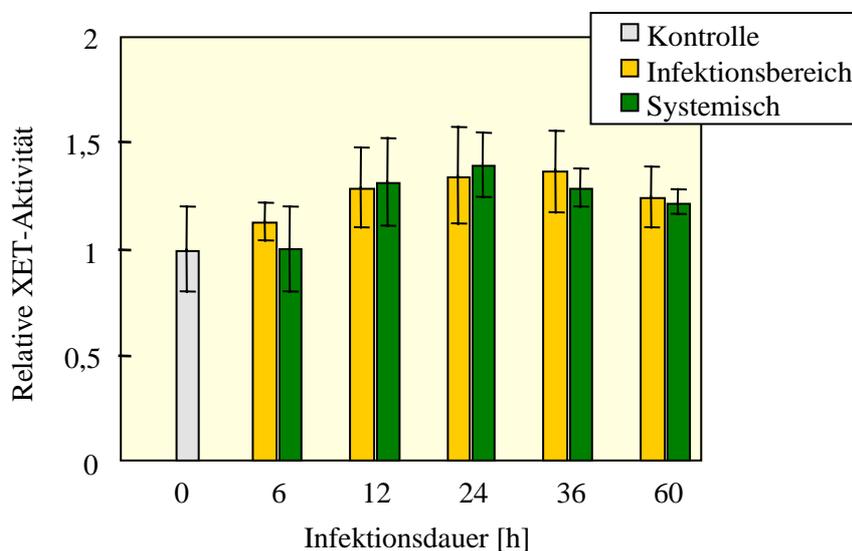


Abbildung 3-29: XET-Aktivität in *Lycopersicon esculentum* nach *Cuscuta reflexa*-Infektion im Infektionsbereich und in Gewebe oberhalb des Infektionsbereiches (Systemisch). n = 3-7.

Obwohl die Enzymassays für das rekombinante Protein über einen Zeitraum von 4-8 h durchgeführt wurden, konnte keine Enzymaktivität nachgewiesen werden. Einer der Hauptgründe für die fehlende Aktivität lag wahrscheinlich in der zu geringen Menge an Protein. In dem gewählten Expressionssystem war es nicht möglich, Protein im Maßstab von mehreren  $\mu\text{g}$  zu produzieren und zu reinigen, so daß in einem Reaktionsansatz maximal einige ng des gewünschten Enzyms enthalten waren. In der Literatur finden sich Angaben, daß rekombinantes *TCH4*, eine XET aus *A. thaliana*, nur eine sehr geringe spezifische Aktivität besitzt und in einem Assay deshalb bis zu 2  $\mu\text{g}$  reines Protein eingesetzt werden mußten (PURUGGANAN *et al.*, 1997). Außerdem war auch die Konzentration an markiertem Oligosaccharid in den Versuchen bis zu

dreimal höher. Dennoch betrug die Aktivität nur 5% der des natürlich vorkommenden Enzyms. Hier wurden als Gründe unter anderem die denaturierende Aufreinigung aus Einschlußkörpern und anschließende Renaturierung angeführt, die einen negativen Einfluß auf die Aktivität haben können. Aus diesem Grund wurde für die Enzymtests nur mit Protein aus der löslichen Fraktion gearbeitet. Trotzdem ist nicht sicher, daß das Enzym in der für die Aktivität optimalen Struktur vorliegt, da in *E. coli* das Protein möglicherweise anders gefaltet wird.

Disulfidbrücken können zur Stabilisierung der aktiven Konformation des Enzyms beitragen. Durch die Verwendung von reduzierenden Agenzien während der Aufreinigung kann die Ausbildung dieser Brücken vermindert sein, wodurch die Aktivität des Proteins ebenfalls beeinflußt wird. In ihrer Sequenz enthalten die XETs eine mögliche N-Glycosylierungsstelle in Nachbarschaft zur katalytischen Domäne. Für einige XETs wurde auch schon gezeigt, daß sie glycosyliert vorliegen (NISHITANI UND TOMINAGA, 1992; SCHRÖDER *et al.*, 1998). Diese posttranslationelle Modifizierung könnte wesentliche Voraussetzung für eine Enzymaktivität sein. Schließlich verliert in Insektenzellen produziertes *TCH4* nach N-Glycosidase-Behandlung jegliche Aktivität, was diese These unterstützt (CAMPBELL UND BRAAM, 1998). Allerdings existieren hierzu widersprüchliche Ergebnisse, denn die Überexpression einer XET aus *Actinidia chinensis* in *E. coli* scheint ohne Glycosylierung zu einem funktionellen Enzym zu führen (SCHRÖDER *et al.*, 1998). Die Aktivität ist aber auch in diesem Fall eher gering.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, daß die fehlende Aktivität der rekombinanten *LeEXT1* zum einen durch die geringe Proteinmenge, die eingesetzt wurde, zum anderen aber auch durch die Eigenschaften des prokaryotischen Expressionssystems bedingt sein kann. Vielmehr scheint ein eukaryotisches System wie die Insektenzellkultur geeignet, da sowohl Faltung als auch Glycosylierungsmuster dem natürlichen sehr nahe kommen. Außerdem kann eine weit bessere Ausbeute erzielt werden.

### 3.7.2 CHARAKTERISIERUNG EINER MÖGLICHEN POLYGALACTURONASE UNTEREINHEIT (KLON B11)

Aus der Datenbankanalyse ergab sich, daß die abgeleitete Proteinsequenz dieses cDNA-Fragmentes vollkommen identisch mit dem C-Terminus eines Proteins aus *L. esculentum*, das durch das *ARO GP3*-Gen (Aromatic Rich Amino Acid Glycoprotein) codiert wird, war (Abbildung 3-30). Dieses Protein weist hohe Ähnlichkeit zur  $\beta$ -Untereinheit der fruchtspezifischen Polygalacturonase 1 ( $\beta$ -UE) auf, ein Enzym, das zu Beginn der Fruchtreifung verstärkt gebildet wird und aus ein oder zwei katalytischen Polypeptiden PG2 besteht, die vermutlich durch das Glycoprotein der  $\beta$ -Untereinheit miteinander verknüpft vorliegen. Ob es sich in diesem Fall tatsächlich um eine  $\beta$ -UE einer PG handelt, muß erst durch Isolierung der Vollängen-cDNA und Funktionsanalyse geklärt werden. Polygalacturonasen sind an der Modifizierung und dem Abbau von Pektin, eines der Hauptkomponenten der pflanzlichen Zellwand, beteiligt. Die  $\beta$ -Untereinheit stellt ein hitzestabiles, saures, stark glycosyliertes Protein dar, allerdings selbst ohne enzymatische Aktivität. Biochemische Studien sprechen dafür, daß die Untereinheit eher eine regulatorische Funktion auf die PG-Aktivität ausübt. Anhand der DNA-Sequenz der  $\beta$ -Untereinheit cDNA (#M98468) wurde die Struktur des Präcursorproteins postuliert, dargestellt in Abbildung 3-30 (ZHENG *et al.*, 1992). Es besteht aus 4 verschiedenen Domänen, einer N-terminalen Signalsequenz, einem N-terminalen Propeptid, dem eigentlichen Protein und einer relativ großen C-terminalen Komponente. Wie viele Zellwand-assoziierte Proteine unterliegt das Präcursorprotein, bevor es aus der Zelle geschleust wird, im ER zahlreichen posttranslationalen Veränderungen wie Proteolyse und Glycosylierung. Für die Lokalisierung des reifen Proteins in der Zellwand ist möglicherweise der C-Terminus zuständig. Auch andere Funktionen werden noch diskutiert.

AROGP3	1	MHTKILLPSCILLLLLLFTLSSLDVVAKDGDSEGNPFTPKGYLIRYWNKHVSNDLPKPWF
β-UE LePG1	1	<u>MHTKIHLPPCILLLLLLFSLPSFNVVVGGDG-ESGNPFTPKGYLIRYWKQISNDLPKPWF</u>
AROGP3	61	LLNKASPLNAAQYATYTKLVADQNAFTTHLQSFCSANLMCALDLLPSLEKHKGDVHFVS
β-UE LePG1	60	<u>LLNKASPLNAAQYATYTKLVADQNALTTQLHTFCSSANLMCAPDLSPSLEKHSGLDIHFAT</u>
AROGP3	121	YGDKNFTNYGTKESEGLGFNSFKNYTEEENFPVNSFRRYGRDSP-HDNQFDNYGAPGGNTP
β-UE LePG1	120	YSDKNFTNYGTNEPGIGVNTFKNYS <sup>1</sup> EGENIPVNSFRRYGRGSP-RDNKFDNYASDG-NVI
AROGP3	180	VQSFNSYSTNTPGGSGQFTNYAPGSNVPDLHFTSYSDHGTGGEQDFKSYGNDGNAGQ-QS
β-UE LePG1	178	<u>DQSFNSYSTSTAGGSGKFTNYAANANDPNLHFTSYSDQGTGGVQKFTIYSQEANAGD-QY</u>
AROGP3	239	FKSYGKDGNGADSQFTTYGNNTNVDGSDFTNYGEAANGENQNFTSYGFNGNPPASSFNNT
β-UE LePG1	237	FKSYGKNGNGANGEFVSYGNDT <sup>2</sup> NVIGSTFTNYGQTANGGDQKFTSYGFNGNVPENHFTNY
AROGP3	299	GVGNGNPSEAFNSYRDQSNVGGDDFTTYVKDANGGEANFTNYGQSFNEGTDVFTTYGKGG
β-UE LePG1	297	GAGGNGPSETFNSYRDQSNVGGDDFTTYVKDANGGEANFTNYGQSFNEGTDVFTTYGKGG
AROGP3	359	NDPHINFKTYGVNNTFKDYVKDTATFSNYHNKTSQDLASLSEVNGGKKVNNRWIEPGKFF
β-UE LePG1	357	NDPHINFKTYGVNNTFKDYVKDTATFSNYHNKTSQVLA <sup>3</sup> SLMEVNGGKKVNNRWIEPGKFF
AROGP3	419	REKMLKSGTIMPMPDIKDKMPKRSFLPRAIAAKLPFSTSKIDELKKIFHAANDSQVAKMI
β-UE LePG1	417	<u>REKMLKSGTIMPMPDIKDKMPKRSFLPRVIAASKLPFSTSKIAELKKIFHAGDESQVEKMI</u>
AROGP3	479	GDALSECERAPSPGETKQCVNSAEDMIDFATSVLGRNVVVRTTENTNGSKGNIMIGSIKG
β-UE LePG1	477	<u>GDALSECERAPSAGETKRCVNSAEDMIDFATSVLGRNVVVRTTEDTKGSNGNIMIGSVKG</u>
AROGP3	539	INGGKVTKSVSCHQTLYP <sup>4</sup> SLLYYCHSVPKVRVYEADILDPNSKAKINHGVAICHVDTSSW
β-UE LePG1	537	<u>INGGKVTKSVSCHQTLYPYLLYYCHSVPKVRVYEADILDPNSKVKINHGVAICHVDTSSW</u>
AROGP3	599	<u>GPRHGAFVALGSGPGKIEVCHWIFENDMTWATAD</u>
β-UE LePG1	597	<u>GPSHGAFVALGSGPGKIEVCHWIFENDMTWAIAD</u>

Abbildung 3-30: Sequenzvergleich von *AROGP3* aus *Lycopersicon esculentum* mit der β-Untereinheit der Polygalacturonase 1 aus *L. esculentum*. Der blau unterlegte Bereich entspricht der durch Subtraktion erhaltenen Sequenz. In der β-UE der PG1 aus Tomate ist die Signalsequenz durch Wellenlinie gekennzeichnet, das N-terminale Propeptid durch eine einfache Linie. Der C-Terminus ist grau unterlegt. Gelb markierte Motive stellen mögliche Glycosylierungsstellen dar.

In der Hybridisierung mit der <sup>32</sup>P-markierten cDNA-Sequenz aus der Subtraktion (Abbildung 3-31) zeigte sich, daß in infiziertem Gewebe die mRNA Konzentration für die putative β-Untereinheit einer Polygalacturonase ansteigt und schon 6 h nach Infektionsbeginn ein Maximum erreicht, um anschließend wieder auf einen der Kontrolle vergleichbaren Wert zu fallen. In benachbarten Sproßabschnitten bleibt die Expression annähernd unverändert. Auch in diesem Fall hatte die mechanische Verwundung keinen Einfluß auf die Expression, d.h., in der Akkumulation der β-UE der PG ist eine spezifische Antwort der Tomate auf den Befall mit *C.reflexa* zu sehen. Eine transiente Expression der β-UE wurde auch in der reifenden Frucht beobachtet und mit der späteren Assoziation der eigentlich enzymatisch aktiven PG2, die erst nachfolgend sekretiert wird, erklärt (ZHENG *et al.*, 1992). Inwieweit sie eine Abwehrreaktion darstellt, läßt sich

allerdings nicht sagen, da eine erhöhte PG-Aktivität, die durch die  $\beta$ -UE reguliert zu sein scheint, zum einen in Zusammenhang gebracht wird mit Prozessen wie Reifung, Organabszission, zum anderen aber auch mit Zellstreckung (PRESSEY UND AVANTS, 1977; SITRIT *et al.*, 1999).

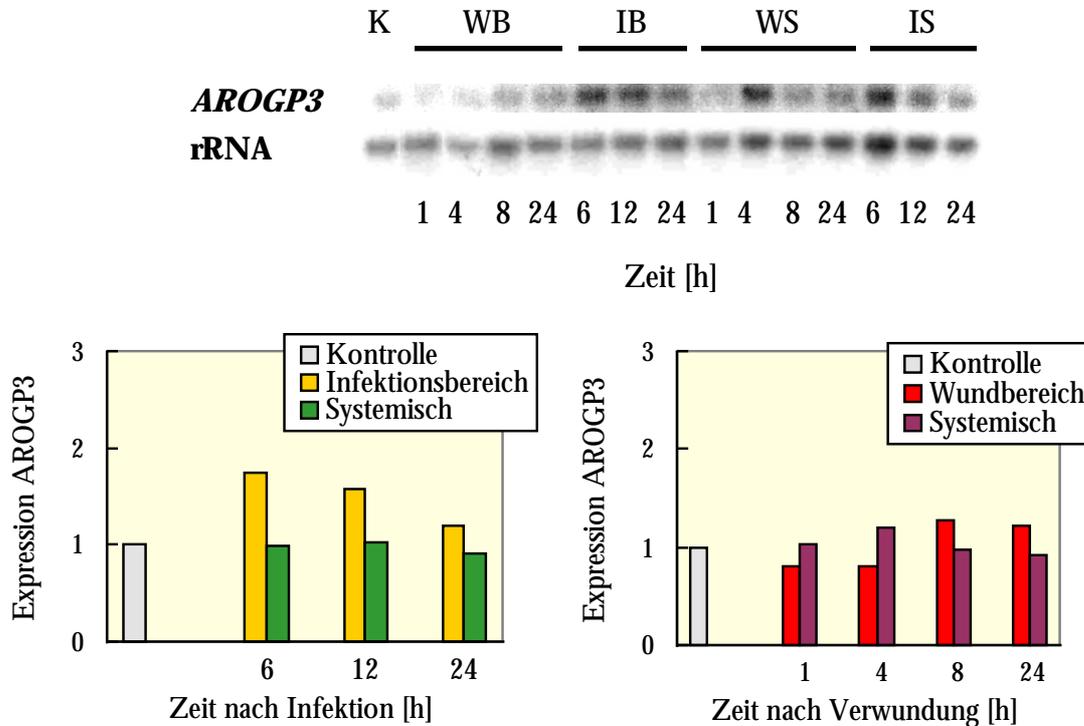


Abbildung 3-31: Expressionsanalyse von *AROGP3*-mRNA in Sprossen von *Lycopersicon esculentum* nach *Cuscuta reflexa*-Infektion bzw. Verwundung über einen Zeitraum von 24 h. Northern Blot (oben) mit Gesamt-RNA aus unbehandeltem Sproß (K), dem Wundbereich (WB), dem Infektionsbereich (IB), einem Sproßabschnitt oberhalb der Verwundung (WS), einem Sproßabschnitt oberhalb des Infektionsbereiches (IS). Die Hybridisierung mit 28S rRNA diente als Mengenabgleich. Quantifizierung der Expression in Relation zu unbehandelten Sproßachsen (Kontrolle, Expression = 1)

In der Northern-Analyse einer zu *AROGP3* homologen mRNA in der kompatiblen Wirtspflanze *N. tabacum* wurden keine Signale erhalten, was eventuell auf den geringen Anteil einer entsprechenden mRNA in der Gesamt-RNA zurückzuführen ist.

### 3.7.3 CHARAKTERISIERUNG EINER EXPANSINHOMOLOGEN SEQUENZ (KLON 29)

Das cDNA-Fragment 29 codiert für einen Teil eines Proteins, das große Homologie zu einem  $\alpha$ -Expansin aus *N.tabacum* (LINK UND COSGROVE, 1998) aufweist. In der Genbank des NCBI ist die Nukleotidsequenz unter der Nummer **AF218775** veröffentlicht und wurde mit *LeExp11* bezeichnet.

#### 3.7.3.1 EXPANSINE

Expansine wurden als eine Gruppe von Proteinen identifiziert, denen die Vermittlung des pH-abhängigen Zellwachstums zugeschrieben wird. Die Theorie der säurevermittelten Expansion besagt, daß lebende Zellen oder isolierte Zellwände im sauren Milieu ein verstärktes Wachstum zeigen. Daß dieser Prozess nicht auf einen unmittelbaren Einfluß des pH-Wertes zurückzuführen ist, sondern auf der Wirkung von Proteinen beruht, konnte durch denaturierende Behandlung von Zellwänden nachgewiesen werden, da auf diese Weise die beschriebene Eigenschaft verloren ging (COSGROVE, 1989). Eine hohe Expansinaktivität findet sich vor allem in schnell wachsendem Gewebe (COSGROVE UND LI, 1993; CATALÁ *et al.*, 2000). Obwohl Expansine keine enzymatische Aktivität besitzen, wirken sie nur in katalytisch geringen Mengen. Inzwischen lassen sich die Expansine in zwei unterschiedliche Familien unterteilen, die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Expansine, wobei das im Zusammenhang mit der *Cuscuta*-Infektion isolierte den  $\alpha$ -Expansinen zuzurechnen ist. Die Abbildung 3-32 stellt die Einordnung von *LeExp11* in den Stammbaum der bereits bekannten  $\alpha$ -Expansine dar.

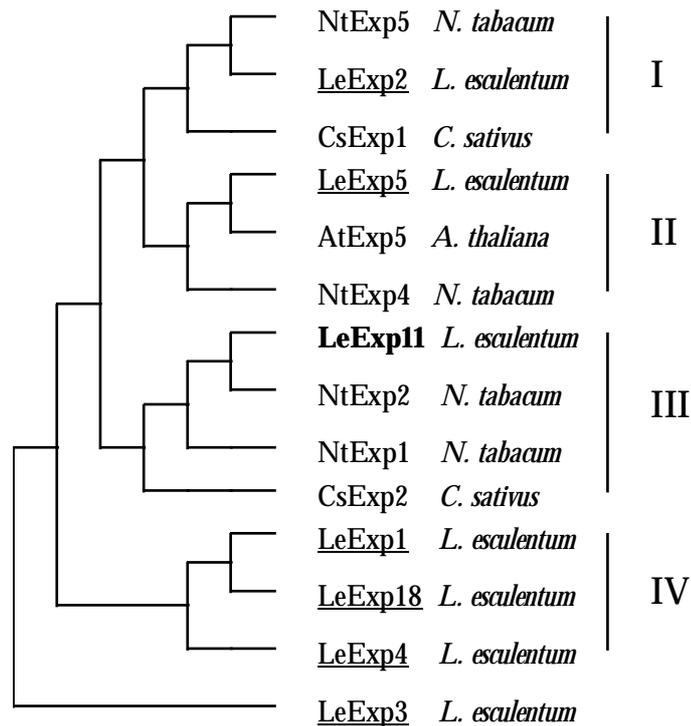


Abbildung 3-32: Einordnung von *LeExp11* innerhalb der bereits bekannten Unterfamilien der Expansine aufgrund von Homologievergleichen (modifiziert nach CATALÁ *et al.*, 2000).

### 3.7.3.2 SEQUENZANALYSE UND UNTERSUCHUNGEN ZUR MRNA-EXPRESSION

Aufgrund von Vergleichen mit bekannten Expansinen konnte festgestellt werden, daß die von der teilweise identifizierten Sequenz *LeExp11* abgeleitete Aminosäuresequenz der katalytischen Domäne des Proteins angehört. Ähnlich wie andere in der Zellwand lokalisierte Proteine sind auch Expansine aus mehreren Teilen aufgebaut. So trägt der N-Terminus ein für die Sekretion verantwortliches Signalpeptid, ihm schließt sich der katalytische Bereich an, während der C-Terminus durch eine Reihe konservierter Tryptophane an die Cellulose-bindende Domäne von Cellulasen erinnert (Abbildung 3-33). Der wahrscheinlich katalytische Teil beinhaltet mehrere konservierte Cysteine, die möglicherweise der Disulfidbrückenbildung dienen, sowie ein „HFD“ Motiv. Auch im möglichen Protein *LeExp11* lassen sich diese Merkmale finden. In der Familie der 45-Glycosylhydrolasen gilt diese Sequenz als Schlüssel für die katalytische Aktivität. Allerdings konnte für Expansine eine solche Aktivität nicht nachgewiesen werden.

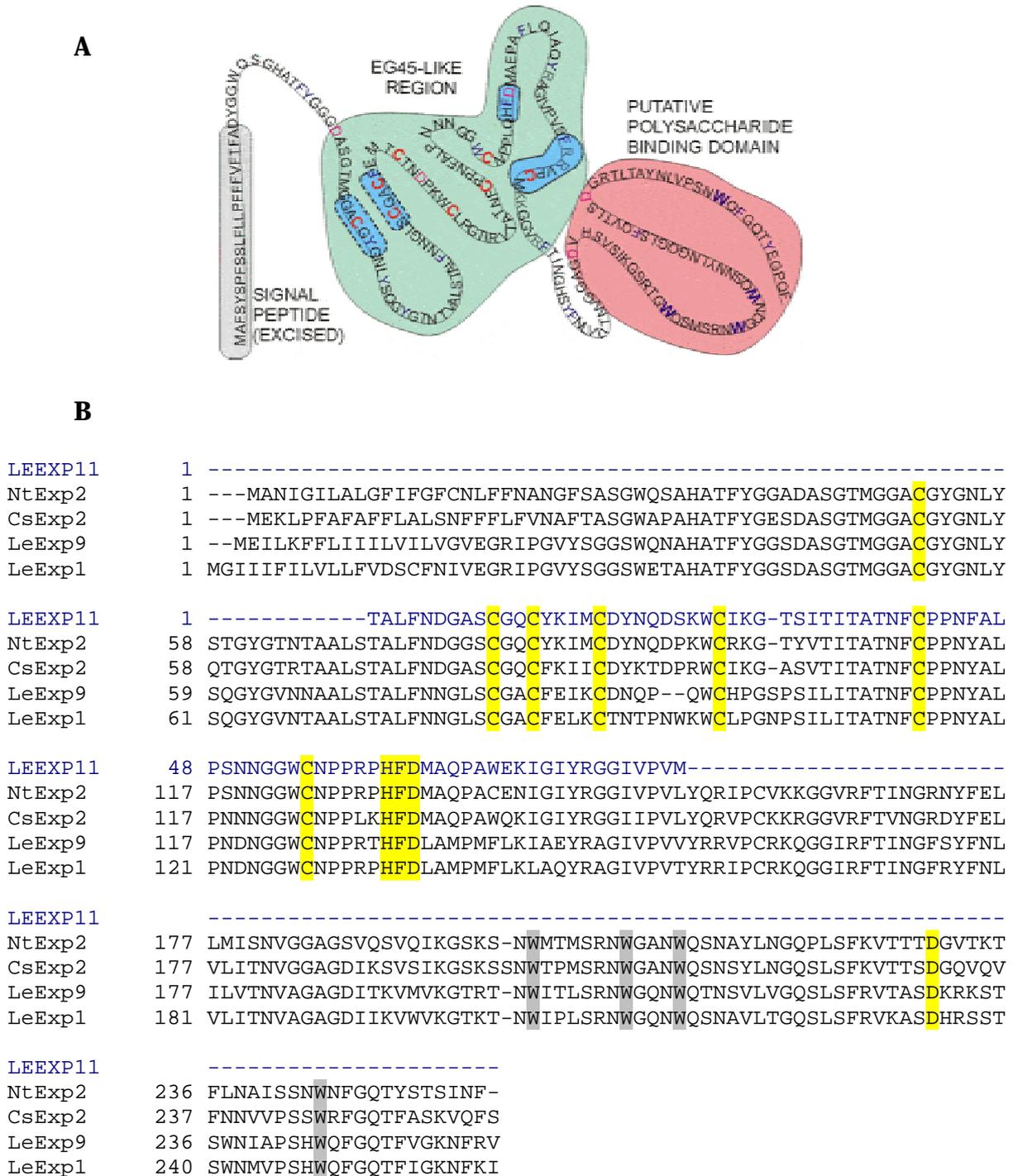


Abbildung 3-33: **A** Struktur eines Expansins anhand von *CsExp1* (COSGROVE, 1997b). N-terminales Signalpeptid, die zentrale katalytische Region mit konservierten Motiven sowie der C-Terminus sind hervorgehoben. **B** Sequenzvergleich verschiedener  $\beta$ -Expansine. Aufgrund der Homologie von *LeExp11* zu *NtExp2* und *CsExp2* erfolgte die Einordnung in Klasse III. Konservierte Cysteine sowie das HFD-Motiv aus bakteriellen EGasen im katalytischen Bereich sind gelb gekennzeichnet. Die Tryptophane (W) innerhalb des C-Terminus erinnern an Cellulose-bindende Domänen.

Wie in Abbildung 3-34 zu sehen ist, sind sowohl Infektion als auch mechanische Verwundung mit einer Akkumulation von *LeExp* mRNA verbunden, wobei die Reaktion infolge des Parasitenbefalls wesentlich deutlicher ausfällt. Eine Erhöhung der Transkriptmenge ist nicht nur auf den direkten Infektionsbereich beschränkt, sondern zeigt sich in gleicher Weise auch in darüberliegenden Bereichen des gleichen Internodiums mit einem Maximum nach 6 h und einem im weiteren Verlauf allmählich absinkenden Spiegel. Die Expression eines Expansins legt eine Assoziation mit der im Infektionsbereich beobachteten Zellstreckung nahe, da diese Proteine vermehrt in wachsendem Gewebe nachgewiesen wurden und sie u.a. für die Auflockerung der Zellwand, die erst den Einbau neuer Strukturkomponenten wie Xyloglucane oder Cellulose ermöglicht, verantwortlich gemacht wird. Wie die Expression in verwundeten Pflanzen erklärt werden kann, ist allerdings unklar. Im Northern Blot von Tabak-RNA konnte keine Veränderung der Transkriptmengen einer *LeExp11* homologen mRNA nach *Cuscuta*-Befall festgestellt werden.

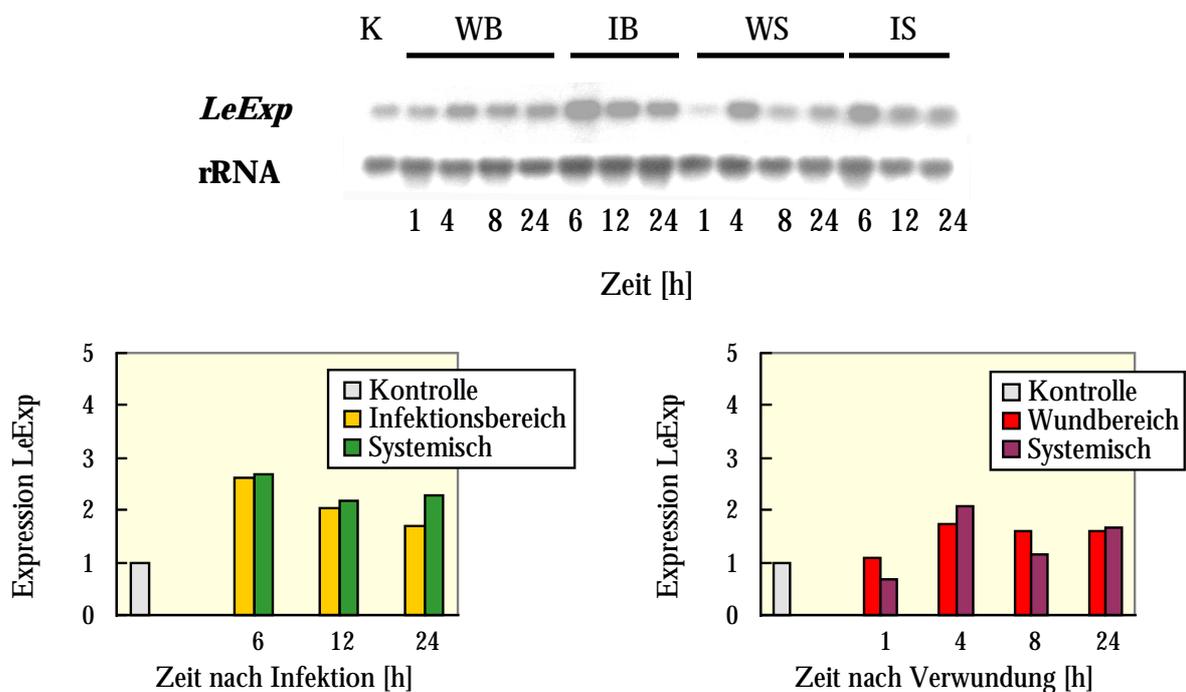


Abbildung 3-34: Expressionsanalyse von *LeExp11*-mRNA in Sprossen von *Lycopersicon esculentum* nach *Cuscuta reflexa*-Infektion bzw. Verwundung über einen Zeitraum von 24 h. Northern Blot (oben) mit Gesamt-RNA aus unbehandeltem Sproß (K), dem Wundbereich (WB), dem Infektionsbereich (IB), einem Sproßabschnitt oberhalb der Verwundung (WS), einem Sproßabschnitt oberhalb des Infektionsbereiches (IS). Die Hybridisierung mit 28S rRNA diente als Mengenabgleich. Quantifizierung der Expression in Relation zu unbehandelten Sproßachsen (Kontrolle, Expression = 1)

### 3.7.4 MÖGLICHE BEDEUTUNG EINES CELLULASE-HOMOLOGEN PROTEINS

Aufgrund von Datenbankanalysen stellte sich heraus, daß ein Klon aus der Subtraktionsbibliothek mit der Cellulose-bindenden Domäne (CBD) einiger Endo- $\beta$ -1,4-Glucanasen in weiten Teilen übereinstimmt.

```

LeEG      491 HSGYNQLLPVVPDPKPTPKPAPRTKVTPAP-----RPRVLPVPANAH---VTIQQRATS
FaEG3     494 QSSYNQLLPVVTSQ---PKQTPVPKLTP-----AAPASTSGP---IAIAQKVTS
DdCelB    391 --SSSEIETPTPTETDTPTPTPSSSSSESGSSSETQPPITPPPTTGTSCLAQVQQKVIN

sh69      1  -----RYG-DSYVFPWINSLPT
LeEG      542 SWALNGKTYRYRSVAVVTNKSgKTVKNLkLSIVKLYGpLWGLTKYg-NSFIFPAWLNSLPA
FaEG3     537 SWVSKGVTYYRYSTTVTNKSGKTLNnLkLTISKLYGpLWGLTKTg-DSYVFPSWLNSLPA
DdCelB    449 SWINGEVDHYIQVEATIVNqGStP-ISSFNfYSDAEQIWSVEKTGTNTYkLpSWFSTIPV

sh69      18 GKSLEFVYIHTANSPAVVSVSSYTLD
LeEG      601 GKSLEFVYIHTA-SPAIVSVSSYTLV
FaEG3     596 GKSLEFVYIHAA-SAANVLVSSYSLA
DdCelB    508 GGSHTFGYIVKSAELSDLEGVQYTC-

```

Abbildung 3-35: Sequenzvergleich von Endo- $\beta$ -1,4-glucanase-CBDs aus *Lycopersicon esculentum*, *Fragaria x ananassa* und *Dyctostelium discoideum* mit der cDNA-Sequenz 69. Bereiche mit starker Homologie sind fett gedruckt. Die Tryptophane (W) werden für die Cellulosebindung verantwortlich gemacht.

Endoglucanasen (EGasen) sind Enzyme, die 1,4- $\beta$ -D-Glucanbindungen von Polysacchariden, wie Cellulose und Xyloglucane, spalten. Sie kommen in Bakterien, Pilzen und Pflanzen vor und bestehen aus mehreren hinsichtlich ihrer Struktur und Funktion sehr unterschiedlichen Einheiten. Entsprechend ihrer katalytischen Domäne werden mindestens 6 verschiedene Familien unterschieden, wobei alle bisher beschriebenen pflanzlichen EGasen der Familie E zugerechnet werden. Mikrobielle EGasen des Typs E besitzen im Gegensatz zu den meisten pflanzlichen eine Cellulose-bindende Domäne, die es ihnen ermöglicht kristalline Cellulose abzubauen (BEGUIN, 1990). Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Klons SH69 weist wie einige andere kürzlich isolierte EGasen aus der Erdbeere (TRAINOTTI *et al.*, 1999) sowie der Tomate (CATALÁ UND BENNETT, 1998). Ähnlichkeit zu solch einer CBD aus dem Mikroorganismus *Dyctostelium discoideum* auf. Es wurde vermutet, daß dieses für Pflanzen ungewöhnliche Strukturmerkmal auf das Substrat des Enzyms zurückzuführen ist. So könnten in diesem Fall Xyloglucane gespalten werden, die die Cellulosemikrofibrillen der Zellwand vernetzen und deren Rückgrat ebenfalls aus 1,4- $\beta$ -verknüpften Glucoseresen aufgebaut ist (TRAINOTTI *et al.*, 1999). Inwieweit es sich bei der in Zusammenhang mit dem Parasitenbefall isolierte cDNA um eine Endoglucanase handelt, kann nur durch Charakterisierung der vollständigen cDNA und einen entsprechenden Funktionsnachweis geklärt werden, da das Vorhandensein einer putativen CBD noch keinen Rückschluß auf die tatsächliche Funktion des Proteins zuläßt.

EGase mRNA wird bei allen physiologischen Prozessen, die von einer Veränderung der Zellwandstruktur betroffen sind, verstärkt akkumuliert. So wurde ein Anstieg an spezifischer mRNA und eine erhöhte Enzymaktivität in wachsenden Zellen und während der Fruchtreifung beobachtet (CATALÁ *et al.*, 1997, 2000). Bestätigt sich also, daß die mRNA eine Endoglucanase codiert, könnte die verstärkte Expression zusammen mit anderen bereits beschriebenen Proteinen die charakteristischen Zellstreckungen in den Infektionsbereichen der Tomatensproßachse verursachen.

\*

Die vorgenommene funktionelle Einordnung der diskutierten mRNAs in den Infektionsprozeß beruht zum großen Teil auf Vermutungen. Aufgrund des zeitlichen Aufwands sowie der Tatsache, daß nicht alle spezifischen mRNAs mit der gewählten Technik der Northern-Analyse erfaßt werden konnten, wurden nur einige Gene in ihrem Expressionsmuster näher untersucht. Deshalb beziehen sich viele Aussagen über die Genexpression auf die zunächst durchgeführte Durchmusterung der subtrahierten cDNA-Bibliothek. Diese Ergebnisse lassen aber keine quantitativen Aussagen zu und sind eher als Hinweis auf eine differentielle Genexpression anzusehen. Weiterhin stellen die meisten der erhaltenen Klone nur Teile der codierenden Region dar, so daß sich die Vergleiche mit bereits bekannten Sequenzen auf diesen Bereich beschränken, für eine Funktionszuordnung jedoch die vollständige Sequenz betrachtet werden sollte. Um letztendlich die Bedeutung einer Akkumulation bestimmter Transkripte im Infektionsverlauf klären zu können, ist bei Enzymen beispielsweise ein Nachweis der entsprechenden Proteinfunktion *in vitro* notwendig. Anschließend muß diese Funktion und deren Rolle in der Pflanze bestätigt werden, was u.a. durch die Ausschaltung des jeweiligen Gens durch *antisense*-Konstrukte möglich sein könnte. Für Proteine, die vermutlich in die Signaltransduktion involviert sind, sollten Wechselwirkungen mit anderen Proteinen untersucht werden, damit die betroffenen Signalketten weiter charakterisiert werden können.

### 3.8 PHYTOHORMONE IN DER INTERAKTION VON PARASIT UND WIRTS-PFLANZE

Um eine funktionsfähige parasitische Beziehung herstellen zu können, müssen Wirt und phanerogamer Parasit miteinander kommunizieren. In allen Phasen der Interaktion, angefangen vom Erkennen der Wirtspflanze bis zur Steuerung der für die Haustorienbildung notwendigen physiologischen Prozesse, ist ein Austausch von Signalen zwischen beiden Pflanzen erforderlich. Dabei stellen Phytohormone mit ihren vielfältigen Wirkungen im pflanzlichen Stoffwechsel geeignete Signalstoffe dar.

Die Rolle von Auxinen in der Wechselwirkung des Parasiten *Cuscuta* mit kompatiblen als auch inkompatiblen Wirtspflanzen wurde schon mehrfach untersucht (GUSTAVSON, 1946; LIBBERT UND URBAN, 1967; IHL *et al.*, 1981; LÖFFLER *et al.*, 1999). In *Impatiens balsamea* und *Helianthus annuus* ruft eine Infektion mit *Cuscuta polygonorum* sowohl ein intensives Zellwachstum als auch eine vermehrte Zellteilung hervor. GUSTAVSON konnte zeigen, daß diese Gewebeveränderungen mit einem erhöhten Auxingehalt in der Wirtspflanze und dem Parasiten einhergehen. Die durch *Cuscuta lupuliformis* induzierte Adventivwurzelbildung an *Coleus blumei* ließ sich ebenfalls auf die Wirkung von Indolelessigsäure zurückführen (LIBBERT UND URBAN, 1967).

Da die inkompatible Interaktion zwischen *Cuscuta reflexa* und *Lycopersicon esculentum* u.a. durch auffällige Zellstreckungen im Wirtsgewebe charakterisiert ist (SAHM *et al.*, 1995), stellte sich natürlich auch hier die Frage nach der Beteiligung von Phytohormonen. Untersuchungen von LÖFFLER *et al.* (1999) konzentrierten sich dabei auf die Auxine, da diese Hormonklasse als wesentlicher Vermittler der Zellstreckung bekannt ist (RAYLE UND CLELAND, 1992; CLELAND, 1995). Im Infektionsbereich konnte ein Anstieg an freier Indolelessigsäure (IES) festgestellt werden, der zeitlich mit dem Zellstreckungswachstum korrelierte. Außerdem konnten die gleichen anatomischen Veränderungen auch durch Injektion von IES-Lösungen bestimmter Konzentration hervorgerufen werden. Die Ergebnisse von LÖFFLER führten zur Hypothese eines Auxintransports vom Parasiten zum Wirt.

### 3.8.1 EINFLUß VON AUXIN AUF DIE GENEXPRESSION

Wegen der augenscheinlichen Bedeutung der Indol-3-essigsäure im Infektionsverlauf wurde der Einfluß von IES auf die Genexpression einiger mRNAs im Rahmen der vorliegenden Arbeit näher untersucht. Dazu wurde auf Tomatensprosse in Lanolin suspendierte IES aufgetragen und nach unterschiedlichen Zeitintervallen (1,5; 3 und 6 h) Gewebeproben für Northern-Analysen entnommen. Als Kontrolle wurden Pflanzen verwendet, die nur mit Lanolin behandelt worden waren. Da bei einer IES-Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  noch keine Veränderung im Expressionsmuster der untersuchten Gene feststellbar war, wurde die Konzentration auf 10  $\mu\text{M}$  erhöht. Die aufgetragene Menge wurde an die durchschnittliche Kontaktfläche zwischen Parasit und Wirtssproß angepaßt.

Die Untersuchung der Genexpression nach IES-Behandlung beschränkte sich auf Gene, deren Aktivität vermutlich mit den beobachteten Zellstreckungen im Wirtsgewebe in Zusammenhang stehen. Zum einen handelte es sich um die Xyloglucanendotransglycosylase *LeEXT1* sowie das putative Aquaporin *LeAqp2*.

Wie die Abbildung 3-36 zeigt, steigt die Transkriptmenge von *LeEXT1* im Vergleich zur Kontrolle innerhalb der ersten drei Stunden nach Auxin-Applikation, bleibt dann aber im weiteren Verlauf auf diesem leicht erhöhten Spiegel. Dieses Ergebnis stimmt mit Arbeiten von CATALÁ *et al.* (1997) überein, die den Einfluß von 2,4-D, einem synthetischen Auxin, auf die Expression von *LeEXT1* im Hypocotyl von Tomaten untersuchten. In den Auxin-behandelten Hypocotylsegmenten konnte eine allmähliche Akkumulation an *LeEXT1* mRNA festgestellt werden, die nach 6 h in einem mit den hier gezeigten Ergebnissen vergleichbaren Bereich liegt. Erst nach 12 h wurde ein Maximum erreicht. Vermutlich steigt also auch nach Auftragen von Auxin auf den Sproß die spezifische mRNA-Konzentration weiter an. Da jedoch der Befall durch *C. reflexa* schon nach 6 h zu einer deutlichen Erhöhung der Transkriptmengen im Wirtsgewebe führt (siehe 3.9.3), kann die veränderte Genexpression nicht allein durch eine Auxin-vermittelte Reaktion erklärt werden. Für *LeEXT1* ist bekannt, daß die Expression nicht nur durch Auxine, sondern auch durch Brassinolide reguliert werden kann (CATALÁ *et al.*, 1997). Somit könnten neben der IES auch diese Phytohormone für die verstärkte Expression infolge der Infektion verantwortlich sein. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde allerdings nur untersucht, ob Brassinolide generell an den Veränderungen im Wirtssproß beteiligt sind (s.u.).

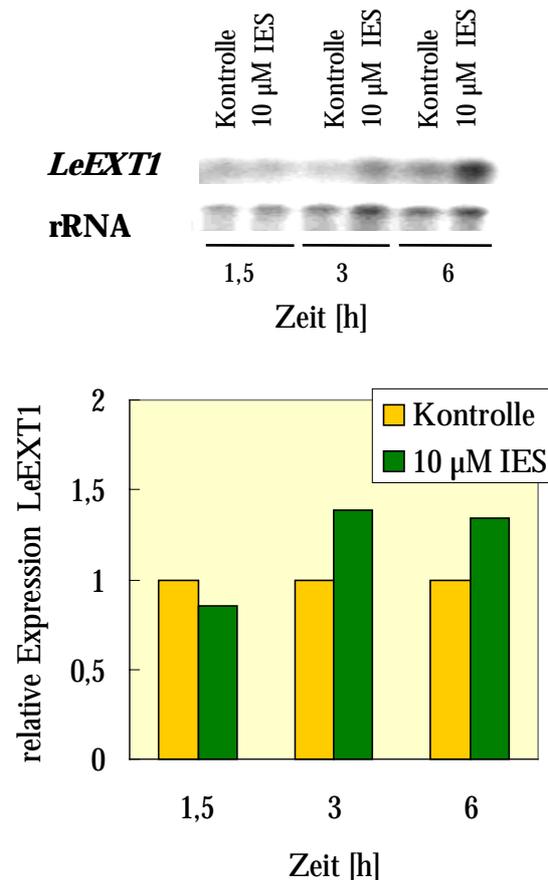


Abbildung 3-36: Einfluß von Auxin (IES) auf die *LeEXT1* Genexpression in Sprossen von *Lycopersicon esculentum* über einen Zeitraum von 6 h. Northern Blot (oben). Sproßbereiche wurden mit Lanolin allein (Kontrolle) bzw. Lanolin mit 10 µM IES behandelt. Die Hybridisierung mit 28S rRNA diente als Mengenabgleich. Quantifizierung der Expression (unten; Kontrolle, Expression = 1).

Auch die Expression von *LeAqp2* ist nach Auxin-Behandlung der Tomate verstärkt (Abbildung 3-37). Während nach 90 Minuten noch keine Veränderung hinsichtlich der spezifischen mRNA-Konzentration festzustellen ist, zeigt sich nach 3 h ein Maximum mit einer Verdopplung der Transkriptmenge gegenüber den Kontrollen. Nach weiteren 3 h ist die *LeAqp2*-Konzentration wieder stark abgefallen, und zwar auf einen niedrigeren als den Kontrollwert.

Die Regulation der *LeAqp2*-Expression durch IES korreliert mit der nach *Cuscuta*-Befall gefundenen Akkumulation der mRNA. In beiden Fällen kommt es zu einem transienten Anstieg der mRNA im Infektionsbereich bzw. behandelten Gewebe. Der Einfluß des Auxins auf die Transkription von *LeAqp2* kann als ein Hinweis auf die Funktion des entsprechenden Proteins im Zellstreckungsprozeß gedeutet werden. Natürlich muß die scheinbare transkriptionelle Kontrolle durch Auxine noch durch Promoterstudien überprüft werden.

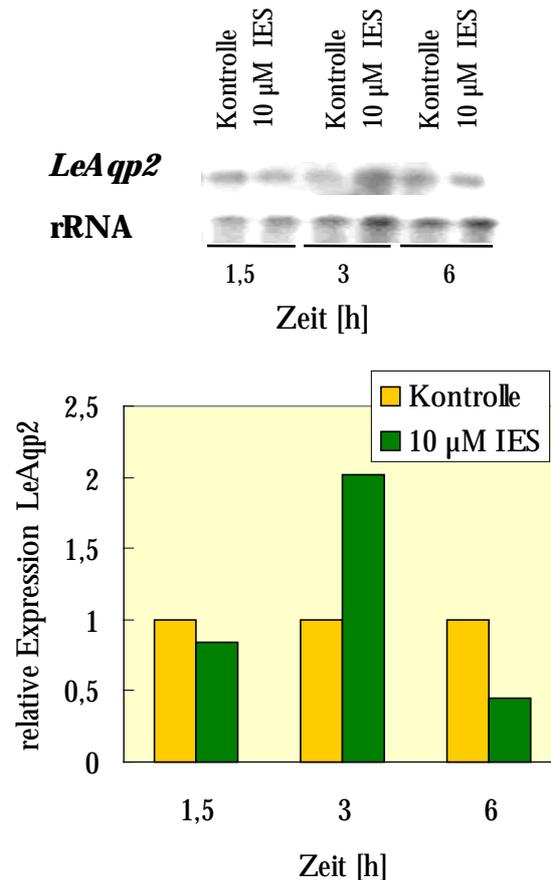


Abbildung 3-37: Einfluß von Auxin (IES) auf die *LeAqp2* Genexpression in Sprossen von *Lycopersicon esculentum* über einen Zeitraum von 6 h. Northern Blot (oben). Sproßbereiche wurden mit Lanolin allein (Kontrolle) bzw. Lanolin mit 10 µM IES behandelt. Die Hybridisierung mit 28S rRNA diente als Mengenabgleich. Quantifizierung der Expression (unten; Kontrolle, Expression = 1).

### 3.8.2 INTERAKTION DES PARASITEN *CUSCUTA REFLEXA* MIT HORMON-INSENSITIVEN MUTANTEN DER GATTUNG *LYCOPERSICON*

Wie die Arbeiten von LÖFFLER *et al.* (1999) und die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, spielen Auxine in der Wechselwirkung zwischen Parasit und Wirtspflanze eine bedeutende Rolle. Um zu klären, inwieweit diese Phytohormone für die Abwehr der Tomate gegenüber *C. reflexa* relevant sind, sollte das Verhalten von hormoninsensitiven Mutanten nach Parasitenbefall näher betrachtet werden. Wenn Auxine einen Beitrag zur Inkompatibilität der Tomate leisten, müßten die Mutanten zumindest eine abgeschwächte Abwehrreaktion zeigen.

Die erstmals von ZOBEL (1972; 1973, 1974) beschriebene Mutante *diageotropica* (dgt) von *Lycopersicon esculentum* MILL. zeigt aufgrund ihrer verminderten Empfindlichkeit für Auxin vielfältige Phänotypen wie horizontales Sproß- und Wurzelwachstum, abnormales vaskuläres Gewebe, veränderte Blattmorphologie und fehlende laterale Wurzeln. Diese charakteristischen Merkmale beruhen nicht auf einem verminderten Transport oder einem veränderten Meta-

bolismus (KELLY UND BRADFORD, 1986; DANIEL *et al.*, 1989), sondern vielmehr auf dem Eingriff in Signaltransduktionsmechanismen (MITO UND BENNETT, 1995; COENEN UND LOMAX, 1998). Bislang ist jedoch das von der *dgt* Mutation betroffene Gen noch nicht identifiziert.

Neben der *diageotropica* Mutante wurde weiterhin eine brassinosteroid-insensitive Mutante von *Lycopersicon pimpinellifolium* (*curl-3*) in die Untersuchungen miteinbezogen. Brassinosteroide sind Phytohormone, die wie die Auxine auf das Zellstreckungswachstum wirken (CLOUSE UND SASSE, 1998). Im Wurzelinhibitionsassay zeigte sich, daß die *curl-3* Mutante nicht auf eine Behandlung mit 24-Epibrassinolid reagiert. Der Phänotyp ist durch zwerghaften Wuchs, wellige Blätter und eine verlangsamte Entwicklung charakterisiert (KOKA *et al.*, 2000).

Die Interaktion von *C. reflexa* und *diageotropica* bzw. *curl-3* wurde sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch untersucht und mit dem Wildtyp verglichen. In der mikroskopischen Aufnahme der Infektionsbereiche (Abbildung 3-38) sind die charakteristischen Zellstreckungen in der Hypodermis sowohl beim Wildtyp (links) als auch bei der Mutante *curl-3* (rechts) deutlich zu erkennen. Dagegen lassen sich bei *dgt* (Mitte) keine bzw. nur geringfügige anatomische Veränderungen im Rindenbereich feststellen.

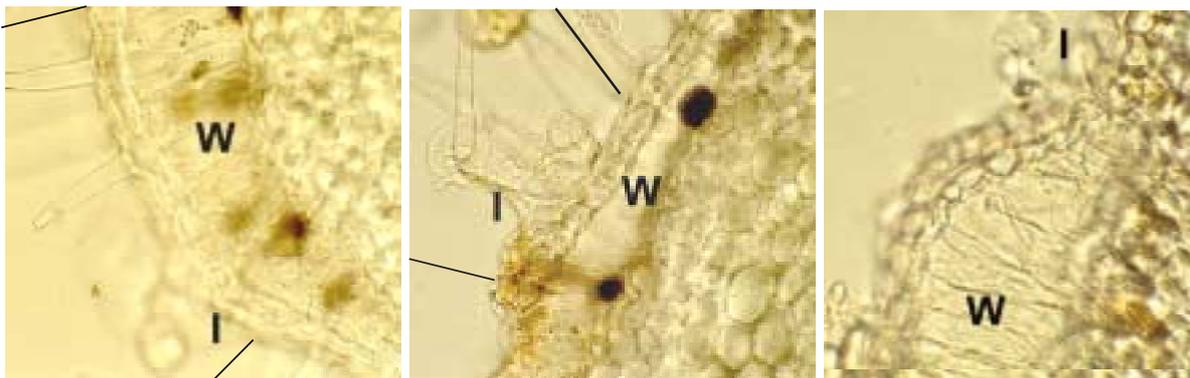


Abbildung 3-38: Stengelquerschnitt von *Lycopersicon esculentum* cv. Hellfrucht (rechts), der Mutante *diageotropica* (Mitte) und der *L. pimpinellifolium* Mutante *curl-3* (links) 3 Tage nach Infektion mit *Cuscuta reflexa*. Zellstreckungen im infizierten Bereich (I) des Wirtsgewebes (W). Es ist jeweils der Beginn der Kontaktzone zwischen Parasit und Wirt gekennzeichnet. Vergrößerung 150 x.

Da in der Kontaktzone von *curl-3* zum Parasiten Zellverlängerungen wie beim Wildtyp auftreten, kann dieses Phänomen nicht der Wirkung von Brassinosteroiden zugeschrieben werden. Die Beobachtungen stützen vielmehr die Ergebnisse von LÖFFLER *et al.* (1999), die Auxine für das Streckungswachstum verantwortlich machten.

Im Anschluß an die mikroskopischen Analysen wurde der Verlauf der Infektion bei der Mutante *dgt* und dem Wildtyp über einen Zeitraum von 12 Tagen verfolgt.



Abbildung 3-39: *Cuscuta reflexa* auf *diageotropica* (oben) und *L. esculentum* wt (unten). 6, 9 und 11 Tage nach Infektionsbeginn (von links).

Wie in der obigen Abbildung zu erkennen, erfolgen erste sichtbare Veränderungen der Wirtssprossachse schon 3-4 Tage nach Befall mit *Cuscuta*. Im weiteren Verlauf bilden sich auf der Oberfläche nekrotische Bereiche aus und nach 9-11 Tagen ist der Parasit vollständig abgestorben. Dabei unterscheidet sich die Reaktion der Mutante nur unwesentlich von der des Wildtyps.

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann geschlossen werden, daß das Phytohormon Auxin eine wesentliche Rolle in der Interaktion der beiden Pflanzen einnimmt. Hingegen stellt es keinen für die Inkompatibilität der Tomate verantwortlichen Faktor dar. Trotz vieler Hinweise einer Beteiligung von Auxinen an der Herausbildung einer parasitischen Beziehung zwischen zwei Pflanzen sind jedoch die Funktionen einer derartigen Phytohormonwirkung im Infektionsverlauf nur unzureichend untersucht.

Wie schon LÖFFLER (1999) vermutete, könnte *Cuscuta* über das adhesiv-sekretorische Epithel Indolelessigsäure an die Wirtspflanze abgeben, die sowohl in kompatiblen als auch inkompatiblen Wirten zu Gewebeveränderungen führen. Dabei sind Gewebewucherungen oder Zellstreckungen möglicherweise nur eine Begleiterscheinung der vom Parasiten beabsichtigten Auxinwirkung. Vielmehr scheinen einzelne Phasen der Haustorienentwicklung von diesem Phytohormon beeinflusst zu sein. So machen die Ausbildung der Hyphenstränge oder deren anschließende Umbildung zu Xylemelementen die Beteiligung von Auxinen wahrscheinlich. Wenn also für die Ausbildung eines Haustoriums Auxine notwendig sein sollten, könnte die Herstellung einer funktionsfähigen Verbindung zwischen Parasit und Wirt in auxininsensitiven Mutanten von

kompatiblen Wirtspflanzen entweder erschwert oder gar nicht möglich sein. Um diese Frage zu klären, wären Untersuchungen zur Interaktion von *Cuscuta* und den genannten Mutanten sehr hilfreich. Weiterhin wäre die Charakterisierung von *LeRCE1* von großem Interesse, da es sich hier eventuell um ein Glied in der Signalstoffkette des Auxins handelt.

## 4 ZUSAMMENFASSUNG

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit standen Untersuchungen zur molekularen Charakterisierung der Interaktion von *C. reflexa* und *L. esculentum*. Es sollten Gene identifiziert werden, die als Reaktion auf den Parasitenbefall exprimiert werden. Dabei interessierten besonders diejenigen, die Ausdruck der Abwehrreaktion der Tomate sind.

Die Wechselwirkung zwischen dem phanerogamen Parasiten *C. reflexa* und der resistenten Wirtspflanze *L. esculentum* führt in frühen Stadien der Infektion zu einer veränderten Genexpression im Wirtsgewebe. Durch suppressive Subtraktionshybridisierung konnten aus der mRNA infizierter Tomatenpflanzen 20 Fragmente isoliert werden, die gegenüber unbehandelten Pflanzen verstärkt exprimiert wurden. Datenbankanalysen der ermittelten Nukleotidsequenzen lassen Vermutungen über mögliche Funktionen der entsprechenden Proteine im Infektionsgeschehen zu. Diese müssen jedoch durch die weitere Charakterisierung sowohl der Gene als auch deren Produkte bestätigt werden. Ausgehend von den vorliegenden Daten, scheint die durch den Parasitenkontakt hervorgerufene Genexpression in Prozesse der allgemeinen Stressantwort, der Signaltransduktion und der Zellexpansion, die mit Zellwandmodifizierungen verbunden ist, involviert zu sein. Weiterhin konnten cDNA-Fragmente isoliert werden, die keine Homologien zu bisher bekannten Sequenzen zeigen.

Wie die mit dem Parasitenbefall verbundenen anatomischen, morphologischen und biochemischen Reaktionen können auch die akkumulierten mRNAs in zwei Gruppen unterteilt werden. Einige Gene werden spezifisch nach Parasitenkontakt exprimiert, andere zeigen auch in anderen Stresssituationen, wie z.B. einer mechanischen Verletzung des Gewebes, eine verstärkte Expression. In der Tabelle 4-1 sind die Ergebnisse der Northern-Analysen einiger mRNAs zusammenfassend dargestellt. Für alle näher untersuchten Gene ist auffällig, daß ein Anstieg der Expression sehr früh einsetzt, oft mit einem Maximum schon 6 h nach Infektionsbeginn.

Tabelle 4-1: Erhöhte Expression ausgewählter mRNAs nach *Cuscuta*-Infektion bzw. mechanischer Verwundung

mRNA	<i>Cuscuta</i> -Infektion		Mechanische Verwundung	
	Infektionsbereich	systemisch	Wundbereich	systemisch
Cyclophilin	x	x	x	x
<i>LeExp11</i>	x	x	x	x
<i>LeAqp2</i>	x	x		
<i>LeEXT1</i>	x	x		
V-H <sup>+</sup> -ATPase UE E	x			
<i>AROGP3</i>	x			

Zur Gruppe der Proteine, die infolge einer allgemeinen Streßreaktion gebildet werden, gehört das Cyclophilin. Die Konzentration der zugehörigen mRNA ist sowohl nach *Cuscuta*-Befall als auch nach mechanischer Verletzung erhöht. Für die *myo*-Inositol-1-Phosphat-Synthase und die Glyoxalase I ergibt sich vermutlich ein ähnliches Expressionsmuster, da von beiden Enzymen über eine verstärkte Transkriptakkumulation in Streßsituationen berichtet wurde. An diesem Beispiel wird deutlich, daß die Proteine nicht nur in einen bestimmten Prozeß involviert sind, sondern vielfältige Funktionen in der Physiologie der Pflanze einnehmen. So stellt *myo*-Inositol-1-Phosphat eine wichtige Vorstufe im Signalstoffwechsel dar. Die Genexpression könnte durch eine erhöhte Stoffwechselaktivität in den betroffenen Wirtszellen verursacht werden. In diesem Zusammenhang ist auch eine verstärkte Expression einer Elongationsfaktor 2 homologen RNA-Sequenz nach *Cuscuta*-Kontakt zu sehen. Ein Beispiel für ein mögliches streßinduziertes Protein könnte das prolinreiche Produkt einer der isolierten mRNAs sein. Aufgrund der strukturellen Eigenschaften prolinreicher Proteine und deren Lokalisation in der Zellwand liegt die Vermutung nahe, daß das Protein zur Vernetzung der vermehrt gebildeten löslichen phenolischen Verbindungen führt und dadurch letztendlich an der beobachteten Lignifizierung mitwirkt.

Anhand der auxininsensitiven Mutante *diageotropica* konnte die Bedeutung des Phytohormons Auxin für die spezifischen Zellstreckungen, die in der Hypodermis der Tomate nach *Cuscuta*-Befall auftreten, bestätigt werden. Deshalb sind Proteine, die in die Regulation der Auxinantwort eingreifen, auch von besonderem Interesse. Mit der Akkumulation einer mRNA, die hohe

Ähnlichkeit zum *RUB-1* konjugierenden Enzym aus *A. thaliana* aufweist, könnte ein sehr frühes Element dieser Signalkette betroffen sein.

Die Auxin-vermittelte Zellexpansion beinhaltet zwei ineinandergreifende Prozesse: Eine verstärkte Wasseraufnahme bedingt einen erhöhten Wandstreß, was letztendlich zu einer Lockerung und Dehnung der Zellwand führt. Im Rahmen dieser Arbeit konnten verschiedene, teilweise vollständige mRNAs identifiziert werden, die für Proteine kodieren, die zum Streckungswachstum beitragen. Dabei können Proteine unterschieden werden, die ihre Wirkung direkt an Zellwandstrukturen entfalten oder durch Veränderung des pH-Wertes und Steigerung der Wasseraufnahmerate eine Zellstreckung ermöglichen.

Zur ersteren Gruppe zählt das Expansinohomolog *LeExp11*, das infolge der Infektion im Tomatengewebe verstärkt akkumuliert wird. Erst die „Aufweichung“ der Zellwand durch Expansine erlaubt ein Verschieben der einzelnen Polymere gegeneinander und folglich eine Wanddehnung. Weiterhin konnten cDNA-Fragmente einer Polygalacturonase  $\beta$ -Untereinheit (*AROGP3*) sowie einer putativen Cellulase isoliert werden. Diese Enzyme würden durch den Abbau bestimmter Polysaccharide die Voraussetzung für die notwendige Modifizierung der Zellwandstruktur schaffen.

Genauer charakterisiert wurde die Expression und Aktivität einer Xyloglucanendotransglycosylase (*LeEXT1*) im Infektionsverlauf. Erstaunlicherweise wird die mRNA nicht nur lokal begrenzt stärker exprimiert, sondern ist im Gegensatz zum Auxingehalt oder den morphologischen und anatomischen Reaktionen systemisch erhöht. Ebenso ist die Enzymaktivität im Infektionsbereich und in Gewebe ohne Parasitenkontakt erhöht, wobei die maximale Aktivität bereits nach 24 h erreicht ist. Durch exogene Applikation von Indol-3-essigsäure konnte die Expression von *LeEXT1* in der Tomate induziert werden. Die mRNA-Konzentrationen lagen jedoch unter denen nach Infektion festgestellten Werten. Weiterhin wurde durch Northern-Analysen die Lokalisation der *LeEXT1*-Transkripte in verschiedenen Organen untersucht. Dabei konnte die stärkste Genexpression in der Sproßachse festgestellt werden. Neben den Untersuchungen zur Expression und Aktivität in der Pflanze wurde *LeEXT1* als Fusionsprotein mit der Glutathion-S-Transferase in *E. coli* überexprimiert.

Voraussetzung für eine Integration neuer Moleküle in die bestehende Zellwandstruktur ist die Biosynthese dieser Komponenten in der Zelle. Die mRNA von *LeRGPI* kodiert vermutlich ein an der Synthese von Xyloglucanvorstufen beteiligtes Enzym.

Während die oben aufgeführten Proteine eine Modifizierung der Zellwand bewirken, könnte durch das als Aquaporin charakterisierte *LeAqp2* die Wasseraufnahme in die Zelle erleichtert werden. Die *LeAqp2*-Expression zeigt ein ähnliches Muster wie *LeEXT1* nach *Cuscuta*-Kontakt. Sequenzanalysen ergaben für *LeAqp2* eine Zuordnung zur PIP1-Unterfamilie der MIP-Proteine. Die im Oozytensystem gemessene relativ geringe Erhöhung der Wasserpermeabilität gegenüber Kontrollen machen eine posttranslationelle Regulierung des Proteins in der Pflanze wahrscheinlich. Außerdem scheint die Transkription wie die von *LeEXT1* durch das Phytohormon Auxin kontrolliert zu sein. Zusätzlich zu *LeAqp2* konnte ein weiterer PIP1-Vertreter aus der Tomate isoliert werden, dessen Expression aber weder durch Infektion noch durch Verwundung beeinflussbar war.

Die Expression von Cytoskelett-Bestandteilen sowie einer vakuolaren H<sup>+</sup>-ATPase Untereinheit hängt vermutlich ebenfalls mit den Zellstreckungen nach Parasitenbefall zusammen.

\*

Mit vorliegender Arbeit ist es gelungen, einen kleinen Einblick in die molekularen Vorgänge, die während der Infektion ablaufen, zu bekommen. Dabei repräsentieren die identifizierten Transkripte zum großen Teil Proteine, die in den Prozeß der Zellexpansion involviert sind. Dieser ist aber vermutlich für eine Abwehr des Parasiten kaum von Bedeutung. Es stellt sich deshalb die Frage, warum es zu den morphologischen Veränderungen kommt und vor allem welche Rolle das Phytohormon Auxin in der Beziehung zwischen Parasit und Wirt einnimmt. Von besonderem Interesse ist weiterhin die Charakterisierung derjenigen Gene, deren Expression ebenfalls durch die Wechselwirkung von Parasit und Wirt ausgelöst wird, deren Funktion aber noch vollständig ungeklärt ist.

## SUMMARY

The present studies have been focused on the molecular characterisation of the interaction between the plant parasite *Cuscuta reflexa* and its incompatible host *Lycopersicon esculentum*. In order to identify genes expressed after parasitic attachment a suppressive subtractive hybridisation of cDNA populations derived from tomato mRNA of uninfected versus infected plants was performed. The 20 clones obtained represent mRNAs encoding proteins of several functions during the infection process: (a) defence-related proteins, (b) proteins involved in signal transduction processes, (c) cell expansion-associated proteins, and (d) proteins with so far unknown functions.

While northern experiments of several mRNAs showed transcript accumulation in tomato tissue after both *Cuscuta* contact and artificial injury the level of some transcripts is enhanced only after infection. The results of expression analysis are summarised in table 4-1. It is noticeable, that the transcript levels are already increased six hours after onset of infection.

The transcript level of the stress-responsive cyclophilin increased after parasitic contact and mechanical wounding whereby the response to injury was stronger. It was reported that cyclophilin as well as *myo*-inositol-1-phosphate synthase and glyoxalase I gene transcripts accumulate under several stress conditions. Therefore, it can be assumed that their expression pattern is similar to cyclophilin. The encoded proteins are involved in various physiological processes. So the *myo*-inositol-1-phosphate represents for example an important component in signal transduction. The gene expression may be caused by an increased metabolism in the affected host cells. It is likely, that the accumulation of a mRNA with high homology to elongation factor 2 is also correlated to the enhanced metabolic activity. One of the cDNA clones represents a proline-rich protein. Due to the structural characteristics of proline-rich proteins and their localisation in the cell wall the encoded protein may be considered to as a stress-induced protein which contributes to the observed lignification of cell walls.

The specific cell elongation in the hypodermis of tomato cells during the infection process is assumed to be a result of an increased auxin concentration in host cells. Studies with the auxin-insensitive tomato mutant *diageotropica* confirmed the role of this phytohormone triggering the striking anatomical characteristics. Although cell elongations did not occur in the mutant, the infection was not influenced. One transcript accumulated after parasitic attachment showed high

similarity to the *RUB-1* conjugating enzyme of *A. thaliana*. It probably encodes a protein involved in the signal transduction of auxin.

Auxin-mediated cell elongation consists of interrelated processes: The uptake of water causes an enhanced wall stress leading to wall relaxation and extension. Several mRNAs encoding proteins which may be involved in these processes could be identified. The gene products can be distinguished in proteins having an effect on cell wall structures and proteins which enable cell elongation by water uptake facilitation.

A cDNA clone designated *LeExp11* with high homology to expansins showed enhanced transcript levels in tomato cells after *Cuscuta* contact. Expansin action results in weakening of cell walls which is required for cell elongation. Furthermore, the partial cDNAs of a polygalacturonase  $\beta$ -subunit and a putative cellulase could be isolated. The corresponding enzymes are capable of modifying the cell wall structure by disassembling certain polysaccharides.

The expression pattern and enzymatic activity of a xyloglucan endotransglycosylase (*LeEXT1*) was studied in detail during the infection process. In contrast to enhanced IAA levels and anatomical reactions, the mRNA accumulation is not only restricted to the attachment site but is also elevated in tissue without parasitic contact. External auxin application on tomato stems can effect the accumulation of *LeEXT1* transcripts. The XET activity is likewise increased to a maximum 24 h after *Cuscuta* onset. Northern experiments showed that the *LeEXT1* mRNA is highly abundant in stems and rare in roots. Moreover, *LeEXT1* was overexpressed in *E. coli* as a Glutathion-S-transferase fusion protein.

The deduced amino acid sequence of one cDNA-clone showed high similarity to a reversibly glycosylated polypeptide which may be involved in the synthesis of xyloglucan precursors.

The above mentioned proteins provoke a modification of the cell wall, however the *LeAqp2* protein characterised as aquaporin could facilitate the uptake of water into the cell. The expression pattern of *LeAqp2* mRNA is similar to *LeEXT1* after *Cuscuta* contact. Because of the predicted protein sequence, *LeAqp2* can be classified as a member of the PIP1 family. Concerning the relative low water permeability, it can be assumed that *LeAqp2* activity is regulated by posttranslational modifications. In addition, specific gene activity could be induced by external application of the phytohormone auxin. The mRNA concentration of another member of the PIP1 family identified by RACE could be influenced neither by infection nor by wounding.

The transcript accumulation of cytoskeleton components and a subunit of a vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase may also be associated with cell elongations after *Cuscuta* attachment.

\*

The present work gives an insight in molecular processes in the host during *Cuscuta* infection. It will be interesting for future studies to elucidate the role of auxin for the establishment of a successful interaction and to characterise the genes with so far unknown functions.

## 5 LITERATURVERZEICHNIS

- ADACHI, I., ARAI, H., PIMENTAL, R. UND FORGAC, M. (1990) Proteolysis and orientation on reconstitution of the coated vesicle proton pump. *J. Biol. Chem.*, 265, 960-966.
- ALONI, R. (1995) The induction of vascular tissues by auxin and cytokinin. In DAVIES, P.J.(ed), *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 531-546.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. UND LIPMAN, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215, 403-410.
- ANDERSON, C.W., STRAUS, J.W. UND DUDOCK, B.S. (1983) Preparation of a cell-free protein-synthesizing system from wheat germ. *Methods Enzymol.*, 101, 635-644.
- BARONE, L.M., SHIH, C. UND WASSERMAN, B.P. (1997) Mercury-induced conformational changes and identification of conserved surface loops in plasma membrane aquaporins from higher plants: Topology of PMIP31 from *Beta vulgaris* L. *J. Biol. Chem.*, 272, 30672-30677.
- BASKIN, T.I., WILSON, J.E., CORK, A. UND WILLIAMSON, R.E. (1994) Morphology and microtubule organization in *Arabidopsis* roots exposed to oryzalin or taxol. *Plant Cell Physiol.*, 35, 935-942.
- BÄUMEL, P., JESCHKE, W.D., WITTE, L., CZYGAN, F.-C. UND PROKSCH, P. (1993) Uptake and transport of quinolizidine alkaloids in *Cuscuta reflexa* parasitizing on *Lupinus angustifolius*. *Z. Naturforsch.*, 48c, 436-443.
- BEGUIN, P. (1990) Molecular biology of cellulose degradation. *Annu. Rev. Microbiol.*, 44, 219-248.
- BENT, A.F. (1996) Plant disease resistance genes: Function meets structure. *Plant Cell*, 8, 1757-1771.
- BIELA, A. (2000) Molekulare und funktionelle Charakterisierung von pflanzlichen Aquaporinen. *Ph. D. Thesis*. Julius-Maximilian-Universität, Würzburg.
- BLUM, H., BEIER, H. UND GROSS, H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis*, 8, 93-99.
- BORGNIA, M., NIELSEN, S., ENGEL, A. UND AGRE, P. (1999) Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Annu. Rev. Biochem.*, 68, 425-458.
- BORRIS, R., BUETTNER, K. UND MAENTSAELAE, P. (1990) Structure of the beta-1,3-1,4-glucanase gene of *Bacillus macerans*. Homologies to other beta-glucanases. *Mol. Gen. Genet.*, 222, 278-283.
- BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.

- BRINGMANN, G., SCHLAUER, J., RÜCKERT, M., WIESEN, B., EHRENFELD, K., PROKSCH, P. UND CZYGAN, F.-C. (1999) Host-derived acetogenins involved in the incompatible parasitic relationship between *Cuscuta reflexa* (Convolvulaceae) and *Ancistrocladus heyneanus* (Ancistrocladaceae). *Plant Biol.*, 1, 581-584.
- CAMPBELL, P. UND BRAAM, J. (1998) Co- and/or post-translational modifications are critical for TCH4 XET activity. *Plant J.*, 15, 553-561.
- CAPDEPON, M., FER, A. UND OZENDA, P. (1985) Sur un système inédit de rejet d'un parasite: exemple de la Cuscute sur Cotonnier (*C. lupuliformis* Krock. sur *Gossypium hirsutum* L.). *C. R. Acad. Sc. Paris*, 300 (III), 227-232.
- CATALÁ, C., ROSE, J. K. UND BENNETT, A. B. (1997) Auxin regulation and spatial localization of an endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase and a xyloglucan endotransglycosylase in expanding tomato hypocotyls. *Plant J.*, 12, 417-426.
- CATALÁ, C. UND BENNETT, A.B. (1998) Cloning and sequence analysis of TomCel8; a new plant endo-beta-1,4-D-glucanase gene, encoding a protein with a putative carbohydrate binding domain (Accession No. AF098292), *Plant Physiol.*, 118, 1535.
- CATALÁ, C., ROSE, J. K. UND BENNETT, A. B. (2000) Auxin-regulated genes encoding cell wall-modifying proteins are expressed during early tomato fruit growth. *Plant Physiol.*, 122, 527-34.
- CHAUMONT, F., BARRIEU, F., JUNG, R. UND CHRISPEELS, M.J. (2000) Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity. *Plant Physiol.*, 122, 1025-1034.
- CHOMCZYNSKI, P. UND SACCHI, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162, 156-159.
- CLELAND, R.E. (1995) Auxin and Cell Elongation. In DAVIES, P.J.(ed), *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 214-227.
- CLOUSE, S.D. UND SASSE, J.M. (1998) Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49, 427-451.
- COENEN, C. UND LOMAX, T.L. (1998) The *diageotropica* gene differentially affects auxin and cytokinin responses throughout development in tomato. *Plant Physiol.*, 117, 63-72.
- CONKLING, M.A., CHENG, C.L., YAMAMOTO, Y.T. UND GOODMAN, H.M. (1990) Isolation of transcriptionally regulated root-specific genes from tobacco. *Plant Physiol.*, 93, 1203-1211.
- COSGROVE, D.J. (1989) Characterization of long-term extension of isolated cell walls from growing cucumber hypocotyls. *Planta*, 177, 121-130.
- COSGROVE, D.J. (1997a) Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 13, 171-201.

- COSGROVE, D.J. (1997b) Relaxation in a high-stress environment: The molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *Plant Cell*, 9, 1031-1041.
- COSGROVE, D.J. (1999) Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50, 391-417.
- COSGROVE, D.J. UND LI, Z.C. (1993) Role of expansin in developmental and light control of growth and wall extension in oat coleoptiles. *Plant Physiol.*, 103, 1321-1328.
- DANIEL, S.G., RAYLE, D.L. UND CLELAND, R.E. (1989) Auxin physiology of the tomato mutant *diageotropica*. *Plant Physiol.*, 91, 804-807.
- DANIELS, M.J., MIRKOV, T.E. UND CHRISPEELS, M.J. (1994) The plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* contains a mercury-insensitive aquaporin that is a homolog of the tonoplast water channel protein TIP. *Plant Physiol.*, 106, 1325-1333.
- DANIELS, M.J., CHAUMONT, F., MIRKOV, T.E. UND CHRISPEELS, M.J. (1996) Characterization of a new vacuolar membrane aquaporin sensitive to mercury at a unique site. *Plant Cell*, 8, 587-599.
- DAVID, M. UND NEVILLE, JR. (1971) Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. *J. Biol. Chem.*, 246, 6328-6334.
- DAVIES, E., RAMAIAH, K.V.A. UND ABE, S. (1986) Wounding inhibits protein synthesis yet stimulates polysome formation in aged, excised pea epicotyls. *Plant Cell Physiol.*, 27, 1377-1386.
- DAVIES, K.M. UND GRIERSON, D. (1989) Identification of cDNA clones for tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) mRNAs that accumulate during fruit ripening and leaf senescence in response to ethylene. *Planta*, 179, 73-80.
- DAWSON, J.H., MUSSELMAN, L.J., WOLSWINKEL, P. UND DÖRR, I. (1994) Biology and control of *Cuscuta*. *Rev. Weed Sci.*, 6, 265-317.
- DELGADO, I.J., WANG, Z., DE ROCHER, A., KEEGSTR, K. UND RAIKHEL, N.V. (1998) Cloning and characterization of *AtRGPI*. *Plant Physiol.*, 116, 1339-1349.
- DHUGGA, K.S., ULVSKOV, P., GALLAGHER, S.R. UND RAY, P.M. (1991) Plant polypeptides reversibly glycosylated by UDP-glucose: possibly components of Golgi  $\beta$ -glucan synthase in pea cells. *J. Biol. Chem.*, 266, 21977-21984.
- DHUGGA, K.S., TIWARI, S.C. UND RAY, P.M. (1997) A reversibly glycosylated polypeptide (RGP1) possibly involved in plant cell wall synthesis: Purification, gene cloning, and trans-Golgi localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 7679-7684.

- DIATCHENKO, L., LAU, Y.-F., CAMPBELL, A.P., CHENCHIK, A., MOQADAM, F., HUANG, B., LUKYANOV, S., LUKYANOV, K., GURSKAYA, N., SVERDLOV, E.D. UND SIEBERT, P.D. (1996) Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 6025-6030.
- DIETZ, K.J. UND ARBINGER, B. (1996) cDNA sequence and expression of subunit E of the vacuolar H(+)-ATPase in the inducible Crassulacean acid metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1281, 134-138.
- DONG, X. (1998) SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 1, 316-323.
- DÖRR, I. (1969) Feinstruktur intrazellulär wachsender *Cuscuta*-Hyphen. *Protoplasma*, 67, 123-137.
- DÖRR, I. (1972) Der Anschluß der *Cuscuta*-Hyphen an die Siebröhren ihrer Wirtspflanzen. *Protoplasma*, 75, 167-184.
- DÖRR, I. (1990) Sieve elements in haustoria of parasitic angiosperms. In BEHNKE, H.D. UND SJOLUND, R.D. (eds.). Sieve Elements – Comparative Structure, Induction and Development. Springer Verlag, Berlin, 239-256.
- DÖRR, I., VISSER, J.H. UND ALBERS, F. (1977) On the parasitism of *Alectra vogelii* BENTH. (Scrophulariaceae). II. Origin of lateral roots in the contact area of the haustorium. *Z. Pflanzenphysiol.*, 85, 349-359.
- ESPARTERO, J., SÁNCHEZ-AGUAYO, I. UND PARDO, J.M. (1995) Molecular characterization of glyoxalase-I from a higher plant; upregulation by stress. *Plant Mol. Biol.*, 29, 1223-1233.
- 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.
- FEINBERG, P.A. UND VOGELSTEIN, B. (1983) A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, 132, 6-13.
- FORSTREUTER, W. UND WEBER, H.C. (1983) Zum Parasitismus von *Cuscuta* auf Euphorbia-Wirten. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*, 59, 31-54.
- FRAY, R.G., WALLACE, A., GRIERSON, D. UND LYCETT, G.W. (1994) Nucleotide sequence and expression of a ripening and water stress-related cDNA from tomato with homology to the MIP class of membrane channel proteins. *Plant Mol. Biol.*, 24, 539-543.
- FRESKGARD, P.-O., BERGENHEM, N., JONSSON, B.-H., SVENSSON, M. UND CARLSSON, U. (1992) Isomerase and chaperone activity of prolyl isomerase in the folding of carbonic anhydrase. *Science*, 258, 466-468.
- FRY, S.C. (1997) Novel 'dot-blot' assays for glycosyltransferases and glycosylhydrolases: optimization for xyloglucan endotransglycosylase (XET) activity. *Plant J.*, 11, 1141-1150.

- FRY, S. C., SMITH, R. C., RENWICK, K. F., MARTIN, D. J., HODGE, S. K. UND MATTHEWS, K. J. (1992) Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochem. J.*, 282, 821-828.
- GASSER, C.S., GUNNING, D.A., BUDELIER, K.A. UND BROWN, S.M. (1990) Structure and expression of cytosolic cyclophilin/peptidyl-prolyl cis-trans isomerase of higher plants and production of active tomato cyclophilin in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 9519-9523.
- GERTZ, O. (1915) Über die Schutzmittel einiger Pflanzen gegen schmarotzende *Cuscuta*. *Jb. Wiss. Bot.*, 56, 123-154.
- GIDDINGS, T.H. UND STAEHELIN, L.A. (1991) Microtubule-mediated control of microfibril deposition: A re-examination of the hypothesis. In LLOYD, C.W. (ed.), *The cytoskeletal basis of plant growth and form*. Academic Press, London, 85-99.
- GLAZEBROOK, J. (1999) Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2, 280-286.
- GOWDA, B.S., RIOPEL, J.L. UND TIMKO, M.P. (1999) NRSA-1: a resistance gene homolog expressed in roots of non-host plants following parasitism by *Striga asiatica* (witchweed). *Plant J.*, 20, 217-230.
- GRAY, W.M. UND ESTELLE, M. (2000) Function of the ubiquitin-proteasome pathway in auxin response. *Trends Biochem Sci.*, 25, 133-138.
- GUERRERO, F.D., JONES, J.T. UND MULLET, J.E. (1990) Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes. *Plant Mol. Biol.*, 15, 11-26.
- GUNNING, B.S.E. UND PATE, J.S. (1969) „Transfer cells“. Plant cells with wall ingrowth specialized in relation to short distance transport of solutes. Their occurrence, structure, and development. *Protoplasma*, 68, 107-133.
- GUSTAVSON, F.G. (1946) Influence of external and internal factors on growth hormones in green plants. *Plant Physiol.*, 21, 49-62.
- HAMMOND-KOSACK, K.E. UND JONES, J.D. (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, 8, 1773-1791.
- HANDSCHUMACHER, R.E., HARDING, M.W., RICE, J., DRUGGE, R.J. UND SPEICHER, D.W. (1984) Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science*, 226, 544-547.
- HARA, K., YAGI, M., KOIZUMI, N., KUSANO, T. UND SANO, H. (2000) Screening of wound-responsive genes identifies an immediate-early expressed gene encoding a highly charged protein in mechanically wounded tobacco plants. *Plant Cell Physiol.*, 41, 684-691.

- HEIDE-JØRGENSEN, H.S. (1987) Changes in cuticle structure during development and attachment of the upper haustorium of *Cuscuta* L., *Cassytha* L., and *Viscum* L. In WEBER, H.C. UND FORSTREUTER, W. (eds.) Parasitic flowering plants. Philipps-Universität, Marburg, Germany, 319-334.
- IGLIEWSKI, W.J. (1994) Cellular ADP-ribosylation of elongation factor 2. *Mol. Cell Biochem.*, 138, 131-133.
- IHL, B., JACOB, F., SEMBDNER, G. (1981) Endogenous hormones of the angiospermous parasite *Cuscuta reflexa* ROXB. and its host *Vicia faba* L. 3<sup>rd</sup> International Symposium on Plant Growth Regulators, Varna, *Proceedings*, 352-360.
- IHL, B., TUTAKHIL, N., HAGEN, A. UND JACOB, F. (1988) Studien an *Cuscuta reflexa* Roxb. VII. Zum Abwehrmechanismus von *Lycopersicon esculentum* Mill. *Flora*, 181, 383-393.
- ISHIBASHI, K., KUWAHARA, M., KAGEYAMA, Y., TOHSAKA, A., MARUMO, F. UND SASAKI, S. (1997) Cloning and functional expression of a new aquaporin abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol and urea. *J. Biol. Chem.*, 272, 20782-20786.
- ISHITANI, M., MAJUMDER, A.L., BORNHAUSER, A., MICHALOWSKI, C.B., JENSEN, R.G. UND BOHNERT, H.J. (1996) Coordinate transcriptional induction of *myo*-inositol metabolism during environmental stress. *Plant J.*, 9, 537-548.
- JOEL, D.M. UND PORTNOY, V.H. (1998) The angiospermous root parasite *Orobancha* L. (Orobanchaceae) induces expression of a pathogenesis related (PR) gene in susceptible tobacco roots. *Ann. Bot.*, 81, 779-781.
- JOHANSSON, I., KARLSSON, M., SHUKLA, V.K., CHRISPEELS, M.J., LARSSON, C. UND KJELLBOM, P. (1998) Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell*, 10, 451-459.
- JOHANSSON, I., KARLSSON, M., JOHANSON, U., LARSSON, C. UND KJELLBOM, P. (2000) The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochim. Biophys. Acta*, 1465, 324-342.
- JOHNSON, K.D. UND CHRISPEELS, M.J. (1992) Tonoplast-bound protein kinase phosphorylates tonoplast intrinsic protein. *Plant Physiol.*, 100, 1787-95.
- KALDENHOFF, R., KÖLLING, A., RICHTER, G. (1993) A novel blue light- and abscisic acid-inducible gene of *Arabidopsis thaliana* encoding an intrinsic membrane protein. *Plant Mol. Biol.*, 23, 1187-98
- KALDENHOFF, R., KÖLLING, A., MEYERS, A., KARMAN, U., RUPPEL, G. UND RICHTER, G. (1995) The blue light-responsive AthH2 gene of *Arabidopsis thaliana* is primarily expressed in expanding as well as in differentiating cells and encodes a putative channel protein. *Plant J.*, 7, 87-95.

- KELLY, M.O. UND BRADFORD, K.J. (1986) Insensitivity of the diageotropica tomato mutant to auxin. *Plant Physiol.*, 82, 713-717.
- KIELISZEWSKI, M.J. UND LAMPORT, D.T.A. (1994) Extensin: repetitive motifs, functional sites, post-translational codes, and phylogeny. *Plant J.*, 5, 157-172.
- KIMATU, Y., HARASHIMA, S. UND KOHNO, K. (1993) Expression of non-ADP-ribosylatable, diphtheria toxin-resistant elongation factor 2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 191, 1145-1151.
- KINDERMANN, A. (1928) Haustorialstudien an *Cuscuta*-Arten. *Planta*, 5, 769-783.
- VAN DER KOOIJ, T.A., KRAUSE, K., DÖRR, I. UND KRUPINSKA K. (2000) Molecular, functional and ultrastructural characterisation of plastids from six species of the parasitic flowering plant genus *Cuscuta*. *Planta*, 210, 701-707.
- KOKA, C.V., CERNY, R.E., GARDNER, R.G., NOGUCHI, T., FUJIOKA, S., TAKATSUTO, S., YOSHIDA, S. UND CLOUSE, S.D. (2000) A putative role for the tomato genes *dumpy* and *curl-3* in brassinosteroid biosynthesis and response. *Plant Physiol.*, 122, 85-98.
- KOLLMANN, R. UND DÖRR, I. (1987) Parasitische Blütenpflanzen. *Naturwissenschaften*, 74, 12-21.
- KUIJT, J. (1969) The biology of parasitic flowering plants. University of California Press, Berkeley/Los Angeles, California.
- LIBBERT, E. UND URBAN, I. (1967) Morphologische und anatomische Effekte der Indol-3-essigsäure auf parasitierende und *in vitro* kultivierte *Cuscuta lupuliformis* KROCK. *Flora, Abt. A*, 454-466.
- LINK, B.M. UND COSGROVE, D.J. (1998) Acid-growth response and  $\alpha$ -expansins in suspension cultures of Bright Yellow 2 Tobacco. *Plant Physiol.*, 118, 907-916.
- LIU, S.T. UND KADO, C.I. (1979) Indolacetic acid production: a plasmid function of *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 90, 171-178.
- LÖFFLER, C. (1999) Der phanerogame Parasit *Cuscuta*. Untersuchungen zur Wirt-Parasit-Interaktion und Chemotaxonomie der Gattung *Cuscuta*. *Ph. D. Thesis*. Julius-Maximilian-Universität, Würzburg.
- LÖFFLER, C., CZYGAN, F.-C. UND PROKSCH, P. (1999) Role of indole-3-acetic acid in the interaction of the phanerogamic parasite *Cuscuta* and host plants. *Plant Biol.*, 1, 613-617.
- LOGEMANN, J., SCHELL, J. UND WILLMITZER, L. (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.*, 163, 16-20.
- LUCK, G., LIAO, H., MURRAY, N.J., GRIMMER, H.R., WARMINSKI, E.E., WILLIAMSON, M.P., LILLEY, T.H., HASLAM, E. (1994) Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. *Phytochemistry*, 37, 357-71.

- LUDEVID, D., HÖFTE, H., HIMMELBLAU, E. UND CHRISPEELS, M.J. (1992) The expression pattern of the tonoplast intrinsic protein gTIP in *Arabidopsis thaliana* is correlated with cell enlargement. *Plant Physiol.*, 100, 1633-1639.
- MANNING, K. (1991) Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation. *Anal. Biochem.*, 195, 45-50.
- MARIVET, J., MARGIS-PINHEIRO, M., FRENO, P. UND BURKARD, G. (1994) Bean cyclophilin gene expression during plant development and stress conditions. *Plant Mol. Biol.*, 26, 1181-1189.
- MARTIN, G.B. (1999) Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2, 273-279.
- MAUNDERS, M.J., HOLDSWORTH, M.J., SLATER, A., KNAPP, J.E., BIRD, C.R., SCHUCH, W. UND GRIERSON, D. (1987) Ethylene stimulates the accumulation of ripening-related mRNAs in tomatoes. *Plant Cell Environ.*, 10, 177-184.
- MAUREL, C. (1997) Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48, 399-429.
- MAUREL, C., REIZER, J., SCHROEDER, J.I., CHRISPEELS, M.J. UND SAIER, M.H.JR. (1994) Functional characterization of the *Escherichia coli* glycerol facilitator, GlpF, in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.*, 269, 11869-11872.
- MEZA-ZEPEDA, L.A., BAUDO, M.M., PALVA, E.T. UND HEINO, P. (1998) Isolation and characterization of a cDNA corresponding to a stress-activated cyclophilin gene in *Solanum commersonii*. *J. Exp. Bot.*, 49, 1451-1452.
- MITO, N. UND BENNETT, A.B. (1995) The *diageotropica* mutation and synthetic auxins differentially affect the expression of auxin-regulated genes in tomato. *Plant Physiol.*, 109, 293-297.
- NAGAR, R., SINGH, M. UND SANWAL, G. G. (1984) Cell-wall degrading enzymes in *Cuscuta reflexa* and its hosts. *J. Exp. Bot.*, 35, 1104-1112.
- NIELSEN, H., ENGELBRECHT, J., BRUNAK, S. UND VON HEIJNE, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.*, 10, 1-6.
- NICKRENT, D.L., DUFF, R.J., COLWELL, A.E., WOLFE, A.D., YOUNG, N.D., STEINER, K.E. UND DE PAMPHILIS, C.W. (1998) Molecular phylogenetic and evolutionary studies of parasitic plants. In SOLTIS, D.E., SOLTIS, P.S. UND DOYLE, J.J. (eds.), Kluwer Academic Publishers, Boston, 211-241.
- NISHITANI, K. (1997) The role of endoxyloglucan transferase in the organization of plant cell walls. *Int. Rev. Cyt.*, 173, 157-206.

- NISHITANI, K. UND TOMINAGA, R. (1992) Endo-xyloglucan transferase, a novel class of glycosyl transferase that catalyzes transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule. *J. Biol. Chem.*, 267, 1-7.
- O'FARRELL, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 250, 4007-4021.
- OKAZAWA, K., SATO, Y., NAKAGAWA, T., ASADA, K., KATO, I., TOMITA, E. UND NISHITANI, K. (1993) Molecular cloning and cDNA sequencing of endoxyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferases that mediates molecular grafting between matrix polysaccharides in plant cell walls. *J. Biol. Chem.*, 268, 25364-25368.
- OMURA, F., KOHNO, K. UND UCHIDA, T. (1989) The histidine residue of codon 715 is essential for function of elongation factor 2. *Eur. J. Biochem.*, 180, 1-8.
- OTTO, B., GRIMM, B., OTTERSBUCH, P. UND KLOPPSTECH, K. (1988) Circadian control of the accumulation of mRNA for light- and heat-inducible chloroplast proteins in pea. *Plant Physiol.*, 88, 21-25.
- PAULUS, C., KÖLLNER, B. UND JACOBSEN, H.-J. (1993) Physiological and biochemical characterization of glyoxalase I, a general marker for cell proliferation, from a soybean cell suspension. *Planta*, 189, 561-566.
- PENG, S.-B., ZHANG, Y., TSAI, S.J., XIE, X.-S. UND STONE, D.K. (1994) Reconstitution of recombinant 33-kDa subunit of the clathrin-coated vesicle H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.*, 269, 11356-11360.
- PHILIPPS, A. L., HUTTLY, A. K. (1994) Cloning of two gibberellin-regulated cDNAs from *Arabidopsis thaliana* by subtractive hybridisation: expression of the tonoplast water channel g-TIP is increased by GA3. *Plant Mol. Biol.*, 24, 603-615
- POTTER, I. UND FRY, S.C. (1993) Xyloglucan endotransglycosylase activity in pea internodes. Effects of applied gibberellic acid. *Plant Physiol.*, 103, 235-241.
- DEL POZO, J.C., TIMPTE, C., TAN, S., CALLIS, J. UND ESTELLE, M. (1998) Protein modification by the ubiquitin-related protein RUB1 mediates auxin response in *Arabidopsis*. *Science*, 280, 1760-1763.
- DEL POZO, J.C. UND ESTELLE, M. (1999) The *Arabidopsis* cullin AtCUL1 is modified by the ubiquitin-related protein RUB1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 15342-15347.
- PRESSEY, R. UND AVANTS, J.K. (1977) Occurrence and properties of polygalacturonase in *Avena* and other plants. *Plant Physiol.*, 60, 548-553.
- PRESTON, G.M., JUNG, G.S., GUGGINO, W.B. UND AGRE, P. (1993) The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel. *J. Biol. Chem.*, 268, 17-20.

- PURUGGANAN, M.M., BRAAM, J. UND FRY, S.C. (1997) The Arabidopsis TCH4 xyloglucan endotransglycosylase. *Plant Physiol.*, 115, 181-190.
- RAYLE, D.L. UND CLELAND, R.E. (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol.*, 99, 1271-1274.
- ROSE, J.K.C. UND BENNETT, A.B. (1999) Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. *Trends Plant Sci.*, 4, 176-183.
- ROTHMALER, W. (1994) Exkursionsflora von Deutschland. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- SAHM, A., PFANZ, H., GRÜNSFELDER, M., CZYGAN, F.-C. UND PROKSCH, P. (1995) Anatomy and phenylpropanoid metabolism in the incompatible interaction of *Lycopersicon esculentum* and *Cuscuta reflexa*. *Bot. Acta*, 108, 358-364.
- SAMBROOK, J., MANIATIS, T. UND FRITSCH, E.F. (1989) Molecular cloning. A Laboratory Manual. Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- SAXENA, I.M. UND BROWN, R.M. (1999) Are the reversibly glycosylated polypeptides implicated in plant cell wall biosynthesis non-processive  $\beta$ -glycosyltransferases? *Trends Plant Sci.*, 4, 5-7.
- SCHLENZKA, B. (1992) *Hibiscus rosa-sinensis/Cuscuta odorata*: Beispiel einer inkompatiblen Wirts-Parasiten-Beziehung. *Ph. D. Thesis*, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.
- SCHRÖDER, R., ATKINSON, R.G., LANGENKÄMPER, G. UND REDGWELL, R.J. (1998) Biochemical and molecular characterization of xyloglucan endotransglycosylase from ripe kiwifruit. *Planta*, 204, 242-251.
- SEQUEIRA, C. (1973) Hormone metabolism in diseased plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 24, 353-380.
- SHENG, J., D'OVIDIO, R. UND MEHDY, M.C. (1991) Negative and positive regulation of a novel proline-rich protein mRNA by fungal elicitor and wounding. *Plant J.*, 1, 345-354.
- SHOWALTER, A.M. (1993) Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell*, 5, 9-23.
- SIDEL, V.W. UND SALOMON, A.K. (1957) Entrance of water into human red cells under an osmotic pressure gradient, *J. Gen. Physiol.*, 41, 243-257.
- DE SILVA, J., ARROWSMITH, D., HELLYER, A., WHITEMAN, S. UND ROBINSON, S. (1994) Xyloglucan endotransglycosylase and plant growth. *J. Exp. Bot.*, 45, 1693-1701.
- SINGH, A. UND SINGH, M. (1997) Incompatibility of *Cuscuta* haustoria with the resistant hosts – *Ipomea batatas* L. and *Lycopersicon esculentum* Mill. *J. Plant Physiol.*, 150, 592-596.
- SITRIT, Y., HADFIELD, K.A., BENNETT, A.B., BRADFORD, K.J. UND DOWNIE, A.B. (1999) Expression of a polygalacturonase associated with tomato seed germination. *Plant Physiol.*, 121, 419-428.

- SMART, C.C. UND FLEMING, A.J. (1993) A plant gene with homology to D-*myo*-inositol phosphate synthase is rapidly and spatially upregulated during an abscisic-acid-induced response in *Spirodela polyrrhiza*. *Plant J.*, 4, 279-293.
- SMART, L.B., VOJDANI, F., MAESHIMA, M. UND WILKINS, T.A. (1998) Genes involved in osmoregulation during turgor-driven cell expansion of developing cotton fibers are differentially regulated. *Plant Physiol.*, 116, 1539-1549.
- STEVENS, T.H. UND FORGAC, M. (1997) Structure, function and regulation of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPase. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 13, 779-808.
- STÜRZL, M. AND ROTH, K. (1990) "Run off" synthesis and application of defined single-stranded DNA hybridization probes. *Anal. Biochem.*, 185, 164-169.
- SZE, H., WARD, J.M., LAI, S. UND PERERA, I. (1992) Vacuolar-type H<sup>+</sup>-translocating ATPases in plant endomembranes: Subunit organization and multigene families. *J. Exp. Biol.*, 172, 123-135.
- THOMPSON, J.E. UND FRY, S.C. (2000) Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells. *Planta*, 211, 275-286.
- TRAINOTTI, L., SPOLAORE, S., PAVANELLO, A., BALDAN, B. UND CASADORO, F. (1999) A novel E-type ando- $\beta$ -1,4-endoglucanase with a putative cellulose-binding domain is highly expressed in ripening strawberry fruits. *Plant Mol. Biol.*, 40, 323-332.
- UEHLEIN, N. (2000) Funktionelle Charakterisierung pflanzlicher Aquaporine. *Diplomarbeit*. Julius-Maximilian-Universität, Würzburg.
- VOGEL, R., VIERECK, R., MURMANN, A. UND RAUSCH, T. (1999) Cloning of a higher plant elongation factor 2 cDNA: Expression of eEF2 and  $\alpha$  subunit of eEF1B in sugar beet cells during phosphate and carbohydrate starvation. *J. Plant Physiol.*, 154, 192-196.
- WAYNE, R. UND TAZAWA, M. (1990) Nature of the water channels in the internodal cells of *Nitellopsis*. *J. Membr. Biol.*, 116, 31-39.
- WEBER, H.-C., (1993) Parasitismus von Blütenpflanzen. Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt.
- WEILER, E.W. und SPANIER, K. (1981) Phytohormones in the formation of crown gall tumors. *Planta*, 153, 326-337.
- WESTWOOD, J.H., YU, X., FOY, C.L. UND CRAMER, C.L. (1998) Expression of a defense-related 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase gene in response to parasitization by *Orobanch* spp. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 11, 530-536.
- YAMADA, S., KATSAHURA, M., KELLY, W.B., MICHALOWSKI, C.B. UND BOHNERT, H.J. (1995) A family of transcripts encoding water channel proteins: tissue-specific expression in the common ice plant. *Plant Cell*, 7, 1129-1142.

- 
- YAMADA, S., KOMORI, T., MYERS, P.N., KUWATA, S., KUBO, T. UND IMASEKI, H. (1997) Expression of Plasma Membrane Water Channel Genes under Water Stress in *Nicotiana excelsior*. *Plant Cell Physiol.*, 38, 1226-1231.
- YAMAMOTO, Y.T., TAYLOR, C.G., ACEDO, G.N., CHENG, C.L. UND CONKLING, M.A. (1991) Characterization of *cis*-acting sequences regulating root-specific gene expression in tobacco. *Plant Cell*, 3, 371-382.
- YODER, J. I. (1999) Parasitic plant responses to host plant signals: a model for subterranean plant-plant interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2, 65-70.
- ZHENG, L., HEUPEL, R.C. UND DELLAPENNA, D. (1992) The  $\beta$  subunit of tomato fruit polygalacturonase isoenzyme 1: Isolation, characterization, and identification of unique structural features. *Plant Cell*, 4, 1147-1156.
- ZOBEL, R.W. (1972) Genetics of the *diageotropica* mutant in the tomato. *J. Hered.*, 63, 91-97.
- ZOBEL, R.W. (1973) Some physiological characteristics of the ethylene-requiring tomato mutant *diageotropica*. *Plant Physiol.*, 52, 385-389.
- ZOBEL, R.W. (1974) Control of morphogenesis in the ethylene-requiring tomato mutant, *diageotropica*. *Can. J. Bot.*, 52, 8735-8741.

## 6 ANHANG

### 6.1 SEQUENZEN

Es sind die Nukleotidsequenzen sowie das offene Leseraster mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode dargestellt. Start- und Stopcodons sind hervorgehoben.

#### LeSH24 (putative vakuolare H<sup>+</sup>-ATPase Untereinheit E, #AF282970)

```

ccgatgtatccaagcagatccagcaaatgggtccgattcatccttcaggaagcgggaagaaaa
  D V S K Q I Q Q M V R F I L Q E A E E K
gctaatagagatttccgtttctgctgaagaagaattcaacatcgagaagttgcagctagtg
  A N E I S V S A E E E F N I E K L Q L V
gaagcagagaagaagaagatcagacaagagtacgaacgcaaagagaaacaagtggatggt
  E A E K K K I R Q E Y E R K E K Q V D V
cgcaagaagattgagtactccatgcaactcaatgcctctcgaatcaaagttcttcaagct
  R K K I E Y S M Q L N A S R I K V L Q A
caggacgacttgggttaacacccatgaaggaggcagcagcaaaggagctcttaaagttagc
  Q D D L V N T M K E A A A K E L L N V S
catcatgagcacggcatcatagattctattcttcaccaccaccacggcgggtataagaag
  H H E H G I I D S I L H H H H G G Y K K
cttctgcatgatcttattgttcagagtttgcttaggcttaaagagccttgtgtccttctg
  L L H D L I V Q S L L R L K E P C V L L
cgttgtcggaaacatgatgtacatctgggttgaacatgtactggagggagtaaaggaagaa
  R C R K H D V H L V E H V L E G V K E E
tacgcagagaaggcaagcgtccatcaacctgagatcatagttgatgaaatccaccttct
  Y A E K A S V H Q P E I I V D E I H L P
cctgctccatcacatcataatatgcatgggtccatcttgctccggaggagtggtggtggct
  P A P S H H N M H G P S C S G G V V L A
tctcgagatgggaaaattgtgtgtgaaaacactcttgatgccagattggaagttgtgttc
  S R D G K I V C E N T L D A R L E V V F
cgtaagaaactaccagagatccgcaagtgcctattcgggtcaggttgctgcttgagcagtt
  R K K L P E I R K C L F G Q V A A -
ggaaccttttctctattttatccctcttgggttcacgctgtgtggattctgaaatcggcga
atgactgaattcaaatcatcatccatcgctttgcttgtgtactattattttattttctc
ca

```

#### LeExp11 (putatives $\alpha$ -Expansin, #AF218775)

```

actgcattgttcaatgatggagcatcatgtggtcaatgttacaaaattatgtgtgattat
  T A L F N D G A S C G Q C Y K I M C D Y
aatcaagattctaaatgggtgcataaagggaaacatctattacaattacagccactaatttt
  N Q D S K W C I K G T S I T I T A T N F
tgtccaccaaattttgcacttccctagcaataatgggtggatgggtgcaaccacccaaggcca
  C P P N F A L P S N N G G W C N P P R P
cattttgacatgggtcaacctgcttgggaaaaaattgggtatctacagaggtggcattggt
  H F D M A Q P A W E K I G I Y R G G I V
cccgatcatgt
  P V M

```

**LeSH44 ( $\alpha$ -Tubulin)**

tctctgagctctctctgtgactatgaaagaatcaaaacttgttcaccatttatccatcac  
 S L S S L C D Y E R I K T C S P F I H H  
 acagtctcaacctctgtgggtggaaccttacaacagtgctcctgtcaacccactcccttctt  
 T V S T S V V E P Y N S V L S T H S L L  
 gagcacactgatggtgcaattcttcttgacaatgaggctatctatgacatctgcaggcgc  
 E H T D V A I L L D N E A I Y D I C R R  
 tcattggacattgagcgtccccacatacaccaatcttaaccgtcttattttcacagggtatc  
 S L D I E R P T Y T N L N R L I S Q V I  
 tcttcacttactgcttctttgaggtttgatggagccctgaatggttgatgtcaatgaattc  
 S S L T A S L R F D G A L N V D V N E F  
 cagaccaaccttgttccctaccccagaattcattttatgctttcatcctatgctcctgtc  
 Q T N L V P Y P R I H F M L S S Y A P V  
 atttcagctgagaaagcctaccatgagcagctgtcagttgcagagatcaccaacagtgct  
 I S A E K A Y H E Q L S V A E I T N S A  
 tttgagccatcttccatgatggtcaagtgtgatcctcgccacggcaagtatatggcttgc  
 F E P S S M M V K C D P R H G K Y M A C  
 tgccttatgttccgtgggtgatggttggtgccaaggatgtgaatgctgctgtggctaccatc  
 C L M F R G D V V P K D V N A A V A T I  
 aagactaagcgcaccatccaatttggtgactggtgacctactggattcaagtgtggtatc  
 K T K R T I Q F V D W C P T G F K C G I  
 aactatcagccaccaactggttctcctggaggatgcttgcgaagggtgcaagggtgta  
 N Y Q P P T V V P G G D L A K V Q R A V  
 tgtatgatttccaactcaaccagtggtgctgaggctcttctcacgcattgaccacaagttc  
 C M I S N S T S V A E V F S R I D H K F  
 gatctcatgtatgcaaagcgtgcttttgtccactggtatggttggtgagggtatggaagaa  
 D L M Y A K R A F V H W Y V G E G M E E  
 ggcgagttcagtgaaagcagtgaaagatttagctgctttggagaaggattacgaggaggtt  
 G E F S E A R E D L A A L E K D Y E E V  
 ggtgctgaattggaagaaggagaggatgatgatcacgaggagt  
 G A E L E E G E D D D H E E

**LeSH53**

acgatcttgtccatgcagaccatctcttctccaagattaaaacaaagtgtggtttaccggca  
 D L V H A D H L F S K I K T K C G L P A  
 atagttgctgaagttgaccgcattttgagaccaggaggaagctcattgtgcgtgacaaa  
 I V A E V D R I L R P G G K L I V R D K  
 gaggagactataactgagttagaaagtatgctcaagtctatgcaatatgaaatcaatatg  
 E E T I T E L E S M L K S M Q Y E I N M  
 acctattccaaggacaaggaaggattggttattgcccagaaaacaatgtggcgaccaag  
 T Y S K D K E G L L Y C Q K T M W R P K  
 gacgttgagacactaacttatgccattgcttagctgccttgcattgtgaaggatgctgggt  
 D V E T L T Y A I A -  
 gtgttccgttcaagaggctttcatgccacgggtgactagataatcttctgaattaaattct  
 tgaactttattcttgtcaggctatcgct

**LeSH55**

aactgtcaaaaccaccacatgtaaaacacgccataactatcagattaacccaaaacctgaat  
 T V K T T T C K T R H N Y Q I N Q N L N  
 cctaataatttaagtgcgtggagcagcagggggctcctccagcggggcgtggagcttgtcc  
 P N N L S A W S S R G S S S G A W S L S  
 tgtctttggaagatcatcccttgggcgcctgaaacgctgtggaggctcgcgaactctcct  
 C L W K I I P W A P E T L W R L A N S P  
 atcagt  
 I S

**LeSH56 (prolinreiches Protein, #AF308937)**

gccacctatcgggaattccaccaatcgtaaaaccgcccgtcatattgccacctgtcgggaatt  
 P P I G I P P I V K P P V I L P P V G I  
 ccaccaatcgtaaaaccacctgtcaaatgccacctgtcgggaattccaccaatcgtaaaa  
 P P I V K P P V K L P P V G I P P I V K  
 ccacctgttgatttgccacctgttgggattccaccggtcacagttccaccaattgtaaaa  
 P P V D L P P V G I P P V T V P P I V K  
 cctccagttgatttgccacctattggaattccaccagtcacagttccaccagtaattaa  
 P P V D L P P I G I P P V T V P P V I K  
 ccatcacctaaagggaacaccttgtccaccaacaacaaaggcaacatgcccaattgac  
 P S P K G K K P C P P T T K A T C P I D  
 acattgaaacttggggccttgtgtggatcttttaggtgggcttgttcatattggccttggg  
 T L K L G A C V D L L G G L V H I G L G  
 gatccagctgttaaatgaatgttgtccaataacttagtgggcttgttgaacttgaagctgct  
 D P A V N E C C P I L S G L V E L E A A  
 gcttgcctttgcacaacacttaagtgcaattacttaacctacaaaatctatgt  
 A C L C T T L K V K L L N L Q N L C

**LeRCE1 (#AY004247)**

ggagagttgcgtcttcataaagatataagtgagctaaatctacccaaaacatgtagcata  
 G E L R L H K D I S E L N L P K T C S I  
 tcatttcccaatggaaaagatgacctcatgaactttgaagtcaccattcggcctgatgaa  
 S F P N G K D D L M N F E V T I R P D E  
 ggatattatatgggtggcacatttacgttctcttttcagtatttctccaatatatcctcac  
 G Y Y M G G T F T F S F S I S P I Y P H  
 gaggcaccaaagggttaagtgcaagacaaagggtttaccacccaaatatcgacttgggaagga  
 E A P K V K C K T K V Y H P N I D L E G  
 aatgtgtgtctcaacattcttcgagaagactggaagcctgtgctcaacattaacaccatt  
 N V C L N I L R E D W K P V L N I N T I  
 atctatggcttatatcatctgttcacggagccgaatcatgaggatcccctcaatcacgat  
 I Y G L Y H L F T E P N H E D P L N H D  
 gcagctgctgtattgagagacaacccgaagatgtttgaatccaatgtcagaagggcaatg  
 A A A V L R D N P K M F E S N V R R A M  
 catgggggctatgtcgggcaaacgttcttcaccggttgcagttagcatcttcaaggctga  
 H G G Y V G Q T F F T R C M -  
 aagaatagagagagtctgtaaagtttggatgcaaaattatctcaggtgatctttctgcct  
 cagattggattcaaatgtctttaaatttaagtcgaaccagaaaaaattcctgt

**LeINS-1P (#AY004246)**

acagtaatgtgggttgttggccttaatgacaccatggaaaaccttttagctgctgtggataga  
 S N V V V G L N D T M E N L L A A V D R  
 tatgaggctgaaatatctccttctacattgcatgctattgcttgtattatggaaaatgtg  
 Y E A E I S P S T L H A I A C I M E N V  
 cctttcatcaacggaagccctcaaaacacttttgttccaggtcttattgatttggccata  
 P F I N G S P Q N T F V P G L I D L A I  
 aagagaaacactttaattgggtggtgatgactttaagagtgggtcaaaccaagatgaagtcc  
 K R N T L I G G D D F K S G Q T K M K S  
 gtgttgggtgatttccttgttggagccggtattaagccaacgtcaatagtgagctacaat  
 V L V D F L V G A G I K P T S I V S Y N  
 cacttgggtaacaatgatggaatgagtctttctgctcctcaaaccctccgggtctaaggag  
 H L G N N D G M S L S A P Q T F R S K E  
 atctcaaaaagtaatggttgttggatgacatgggttgcctagcaacgccattctctatgaatct  
 I S K S N V V D D M V A S N A I L Y E S  
 ggcgagcaccctgaccatggttgcgtgatcaagtatgttccatagttggagacagcaag  
 G E H P D H V V V I K Y V P Y V G D S K  
 agggcaatggat  
 R A M D

**LeSH69 (#AF308936)**

caggtacgggtgactcctacgtgtttccagcctggatcaactcgttaccactggaaaaagc  
 R Y G D S Y V F P A W I N S L P T G K S  
 ctcgagtttgtttacattcacactgctaattctcctgcagtggtctcagtatcaagctac  
 L E F V Y I H T A N S P A V V S V S S Y  
 actcttgact**taa**aacgagagaatattcacttttccgaggggtttaaagtaagatttgtgc  
 T L D -  
 agcttgtttgtaatttttcaacttctagttgctttgtagtttgggttattacttatcagtg  
 ttttagttgatgaagtaaggcggatatttggacgaagaaaggagcgaagagacgaattaa  
 aacaagtgctcatcctctttcttctccacttcattttgtcacaagatccatagtcagta  
 tttgaaagaaagttgcttctccacagagagt

**LeSH72**

gatcccccaacacactggcaacagacattggtttacttctatgacccttagacgtggag  
 D P P T H W Q Q T L V Y F Y D P L D V E  
 caagatcagggttattgaaggctctctaacggtgtcacagagcaaagaaaatgctcgattc  
 Q D Q V I E G S L T L S Q S K E N A R F  
 atgaacatacatcttgcataattcatctggcggacgttcatttgtcaaagagtcgggtgatg  
 M N I H L A Y S S G G R S F V K E S V M  
 cgt**taa**atcaacatatgaagtctttgtcagctgaaccactgtgatgggtcggtcatacacg  
 R -  
 gtttctgataattctgcttgtcatttaggtagggaaacgaaggtgagttcagggcatttg  
 cactgcctcaaaacttaaaagcattgagtgtgtcaatttctactgcatattcacgtagcat  
 attatgtgaaaacttgaacatgtttccgcgagaacatgggtttctcattagctgtattt  
 tatagagtagatgtagggttgggtgatctggattgtgttagaatttttaattagttta  
 attcatttggatagaaaaagataaaaaaaaaaatctaattgtttcttcaaaaaaaaaaaaa  
 aaaaaaaaaaaaaaaaaaagcttg

**LeRGP1 (#AF286271)**

ggtacaaaggcatctactggcaagaagagatcatcccatttttccagtctgcaactcttcca  
 Y K G I Y W Q E E I I P F F Q S A T L P  
 aaagattgcacaagtgttcaacagtgctatctcgagctgtcgaacagggtcaaggagaaa  
 K D C T S V Q Q C Y L E L S K Q V K E K  
 ctttccgctatagacccgattttcaccaagctggctgatgccatggtgacatggattgaa  
 L S A I D P Y F T K L A D A M V T W I E  
 gcctgggatgagctcaaccctaaaccttccatctcaaacggccccggaaagt**tagggattt**  
 A W D E L N P K P S I S N G P G K -  
 cgttgggcttatggttcttgcctttttgagtttgagtttgaggatgagttgagttgagct  
 tggatacactatttatctatcttacttgttgtctaagatttacttatattgtagactatta  
 tttacttgttgtctaagttttactttttttgtagactattatattaatttttcgaattta  
 tccaaacctttgagttc

**LeEXT1 (#D16456)**

aattcaagcgaaaaatacacaaacactgggtctctgattggatttgtttttctcaccat**gggt**  
 M G  
 atcataaaaggagttttatattagtagtattgttttgattaatattgtcacttgttgtattttgt  
 I I K G V L F S I V L I N L S L V V F C  
 gggatcctagaaggccagtagatgtgcccttttgaaaaactatgagccaagttgggct  
 G Y P R R P V D V P F W K N Y E P S W A  
 agtcaccatattaagttcctcaatgggtgggtaccactactgatcttattctcgacagatct  
 S H H I K F L N G G T T T D L I L D R S  
 tcaggagctggatttcagtcacaagaaatcatatctgtttgggcatttcagtatgaaaatg  
 S G A G F Q S K K S Y L F G H F S M K M  
 aggcttgttgggtggagactcagctgggtgttgtcactgcattttacctgtcatcgaataat  
 R L V G G D S A G V V T A F Y L S S N N  
 gcagagcacgatgagatagattttgaatttttggggaacagaactgggcagccatacata  
 A E H D E I D F E F L G N R T G Q P Y I  
 ttgcagacaaatgtattcacaggaggaaaaggaacagagaacagagaatataatctttgg  
 L Q T N V F T G G K G N R E Q R I Y L W  
 tttgatccaaccaagggtaccattcttattctgttctttggaatacatacctcattgtg  
 F D P T K G Y H S Y S V L W N T Y L I V  
 atctttgtggacgacgttccaattagagcattcaaaaattcgaaagatcttgggtgtgaaa  
 I F V D D V P I R A F K N S K D L G V K  
 tttcattcaatcagcccatgaagatatactcgagctctatgggacgcagatgattgggccc  
 F P F N Q P M K I Y S S L W D A D D W A  
 acaagaggtgggcttgagaaaaccaattgggccaacgccccattcaccgctcatacaca  
 T R G G L E K T N W A N A P F T A S Y T  
 tcgttccacgtggatggatgtgaagctgccacgccacaagaagtccaagtttgtaacact  
 S F H V D G C E A A T P Q E V Q V C N T  
 aaaggcatgaaatgggtgggatcaaaaggccttccaagatttagatgcattacagtatagg  
 K G M K W W D Q K A F Q D L D A L Q Y R  
 agacttcgttgggttcgctcaaaaatacactgtttataactattgcactgataaagcgagg  
 R L R W V R Q K Y T V Y N Y C T D K A R  
 taccctgttccaccaccagagtgactaaggacagagatatt**taaa**atcataatcaaat  
 Y P V P P P E C T K D R D I -  
 taagagggactttatgaagaaaaaaaaacttaatatgctttatgtgtgagatttttaatga  
 tccttaaaacaaagtgccttttaattgagctgtatctccctaattctttttgagtgatca  
 ttattgggtggagtcagaggatattatgtatctcatgccaggcctttcatgtctc

**LeSH-B9 ( $\beta$ -Tubulin)**

actcagatagaatgatgcttactttctctgtattcccttcccccaaagtttcagacacagtt  
 S D R M M L T F S V F P S P K V S D T V  
 gttgagccctataatgctactctttctgttcaccagcttggtgagaatgcagatgagtgt  
 V E P Y N A T L S V H Q L V E N A D E C  
 atggttttggataatgaagctctttatgacatttgcttccgaactctcaaacttactact  
 M V L D N E A L Y D I C F R T L K L T T  
 ccgagctttggggacctaaccatttgatttctgccaccatgagtggtgtaacttgctgt  
 P S F G D L N H L I S A T M S G V T C C  
 ctccgtttccctgggtcaactcaactctgatctccgcaagcttgctgttaacctcatcca  
 L R F P G Q L N S D L R K L A V N L I P  
 ttccctcggttgcatttcttcatgggttgatttgctccgctcacttctcgtgggtcgcag  
 F P R L H F F M V G F A P L T S R G S Q  
 caatatcgagcattgactggtcctgagctaacacagcagatgtgggatgcaaagaatatg  
 Q Y R A L T V P E L T Q Q M W D A K N M  
 atgtgtgctgctgatccctcgtcatgggtcgatatttgactgcttcagctatggtccgtgga  
 M C A A D P R H G R Y L T A S A M F R G  
 aagatgagcaccaaggaagtcgatgaacagatgattaatgtgcagaacaagaactcttcc  
 K M S T K E V D E Q M I N V Q N K N S S  
 tattttggtgagtggtatccctaacaatgtaagtcaacagctctgtgacatccctcctact  
 Y F V E W I P N N V K S T V C D I P P T  
 ggtctgaagatggcctcaactttcattggtaactccacttcgattcaggagatggtccgt  
 G L K M A S T F I G N S T S I Q E M F R  
 agggtcagtgagcagtttacagctatgttccgaagaaaggctttcttgcatgggt  
 R V S E Q F T A M F R R K A F L H W

**LeSH-B11 (AROGP3; #U64790)**

acccttccttattgtattactgtcattcggttcctaaaatccgagtctacgaagcggatatt  
 P S L L Y Y C H S V P K I R V Y E A D I  
 ttgggtcccgaattcaaaggctaagatcaaccatgggtggtgcgatttgccacgtggataact  
 L V P N S K A K I N H G V A I C H V D T  
 tcttcatggggaccgaggcacggagcctangttgcactcgggtcaggacccgggaaaata  
 S S W G P R H G A X V A L G S G P G K I  
 gaggtttgtcactggatctttgagaatgacatgacttgggcaactgctgat**tg**agacaat  
 E V C H W I F E N D M T W A T A D -  
 tgctgatcttaacgggtgtgttacaatatgcggaaaatataagtttgaatggctattagtt  
 tatgtattgtctattggttctctctgt

**LeSH-D6 (Glyoxalase-I; #Z48183)**

accctaattttacagggtaccacaatggaaattcagaaccacgtggcctttggacacataggt  
 P N F T G Y H N G N S E P R G F G H I G  
 gttactgttgatgatgtctacaaggcttgtgaganatttgaaagtctgggagtagagttt  
 V T V D D V Y K A C E X F E S L G V E F  
 gtaaagaaacctcttgacggaaaaatgaaaggatttgcatttattaaagatcctgatggc  
 V K K P L D G K M K G I A F I K D P D G  
 tattggatcgagatctttgacacgaaaattatcaaagacgctgctggttctgcttcttag  
 Y W I E I F D T K I I K D A A G S A S -  
 ttcaggagcactcgaggcttctatcacgagcttgatcaactcagagatcgatttgaaga  
 gagtgttttccagaaatgaacattttcgcgctgtgtttaaactctgctagtgaatgaatttt  
 gcgccatgttttaggccgaaaagttttttatctgtctaatagtaaaaacaagagatgtata  
 ctgtgttcaaaaataatagattggatgtaacttctgtgattgagaaataaaaattgaatta  
 gaaaaacttcaacaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

**Cyp (#M55019)**

tctagagagaaaatggcaaatccaaaggttttctttgaccttaccatcggtggtgcaccagct  
 M A N P K V F F D L T I G G A P A  
 ggtcgtgtggtgatggagctcttcgccgataccactcccaaaaccgctgagaacttccga  
 G R V V M E L F A D T T P K T A E N F R  
 gctctttgtaccggtgagaaagggtgttgaaagatggggaagcctttgcactacaagggc  
 A L C T G E K G V G K M G K P L H Y K G  
 tcaaccttccaccgtgtgatcccagggttcatgtgtcaaggaggtgatttcaccgccgga  
 S T F H R V I P G F M C Q G G D F T A G  
 aacgggaccggaggagagtcgatctatggagccaaattcaacgatgagaacttctgtaag  
 N G T G G E S I Y G A K F N D E N F V K  
 aagcacaccggccctggaatcctctccatggctaatactgctggacctggaaccaacggttct  
 K H T G P G I L S M A N A G P G T N G S  
 cagtttttcatctgtaccgctaagactgagtggtcaacggaaagcacgctcgtggttgga  
 Q F F I C T A K T E W L N G K H V V F G  
 caagttggtgaaggcatggatgtgattaagaaggcagaggctggttgatctagctctgga  
 Q V V E G M D V I K K A E A V G S S S G  
 aggtgctccaagcctgtggttattgctgactgcggtcaactctagatctgatgatgatga  
 R C S K P V V I A D C G Q L -  
 tgatctagttttatcagtcctttatgtatgtgagtcgccgttttaggctttgttttaaat  
 ttcaaactatctctactgctttggctcgggtcgtgtcgggtcaggttctagggttaaccgt  
 aattgggtggtgtgttgcttctaccagtttatgtttaatcttaagactacaattaa

**LeEF-2 (#AF308938)**

actgctcttcttgaaatgatgatatatcatctcccatcaccgtccacagctcaaaaatac  
T A L L E M M I Y H L P S P S T A Q K Y  
cgtgtggagaacttgtatgagggacccttgatgatgcttatgctaatacaggaac  
R V E N L Y E G P L D D A Y A N A I R N  
tgtgaccagaaggccgcttatgctttatgtatcaaagatgattccagcatctgacaag  
C D P E G P L M L Y V S K M I P A S D K  
ggtagattctttgcttttggtcgtgtatttgctgggaaggtttctactggtatgaaggtt  
G R F F A F G R V F A G K V S T G M K V  
agaatcatgggtcctaactatgttcctggtgaaaagaaggatttatatgtcaagaatatac  
R I M G P N Y V P G E K K D L Y V K N I  
cagcgaactgttatttggtggtaagaggcaaaaactgttgaggatgttcccgatggt  
Q R T V I W M G K R Q E T V E D V P D G  
aacactggtgccatgggttggttgatcagtttattaccaagaatgcaacattgaccaat  
N T V A M V G L D Q F I T K N A T L T N  
gaaaaggaagtcgatgctcaccctatcagagcaatgaagttttctgtctcaccagttgtg  
E K E V D A H P I R A M K F S V S P V V  
cgtgtagctgttcagtgcaaggctcgcatctgaccttcccaagcttggtgaagggtgaaa  
R V A V Q C K V A S D L P K L V E G L K  
cgtctggctaagtctgatcctatgggttggttctattgaagagtctggagagcatatt  
R L A K S D P M V V C S I E E S G E H I  
attgctggtgctggagaactccaccttgagatctgtctgaaggatttgcaggatgacttt  
I A G A G E L H L E I C L K D L Q D D F  
atggggggtgctgaaattataaaatctgatcccgttggtccttccgtgagacggtctcg  
M G G A E I I K S D P V G S F R E T V S  
agaatc  
R I

**LeAqp2 (#AF218774)**

gacacacaaagcaaaaagctggttttctttggcataattttgaagaaatttttgtaaaaaatg  
 M  
 gaggggaaagaagaggatgtgaagggttgagcaacaagtattcagaaaggcagccatta  
 E G K E E D V K V G A N K Y S E R Q P L  
 gggacttcagcacagagcaaggactacaaggaggcaccaccagcaccattatgtgaggct  
 G T S A Q S K D Y K E A P P A P L F E A  
 ggtgagctacattcttgggtctttttggagagctgggattgcagagttcatggctactttt  
 G E L H S W S F W R A G I A E F M A T F  
 ttgttcctttacataactgtattgactggttatgggttattcaagggctaacagcaaatgt  
 L F L Y I T V L T V M G Y S R A N S K C  
 agtactggttggtgttcaaggcattgcttgggcttttgggggtatgatttttgccttgtt  
 S T V G V Q G I A W A F G G M I F A L V  
 tactgcactgctggcatatcaggtggacacattaaccctgctgtgacatttggtttattt  
 Y C T A G I S G G H I N P A V T F G L F  
 ctggcaaggaaattgtccttaaccagggcagtggttctacattgtgatgcagtgcccttgg  
 L A R K L S L T R A V F Y I V M Q C L G  
 gcaatctgtgggtgctgggtgttgtcaagggttccagccatctttgtttgggactaagggt  
 A I C G A G V V K G F Q P S L F G T K G  
 ggaggtgccaatggttgggtgcccattggttacaccaaggagatggccttgggtgctgagatt  
 G G A N V V A H G Y T K G D G L G A E I  
 attggcacttttgttcttgtctacactgtcttctctgctactgatgccaagagaaatgct  
 I G T F V L V Y T V F S A T D A K R N A  
 agagactcccattgtccctattctggctcctctcccaattggatttgcagtggttcttgggt  
 R D S H V P I L A P L P I G F A V F L V  
 catttggctacaatccctattacaggcaccggcattaaccctgctagaagcctagggcgt  
 H L A T I P I T G T G I N P A R S L G A  
 gccattgtctacaacaagaacatgcatgggatgatcattggatttttctgggtgggacca  
 A I V Y N K E H A W D D H W I F W V G P  
 ttcatggagctgcacttgccttataaccaccaagttatcataagagccattccattc  
 F I G A A L A A L Y H Q V I I R A I P F  
 aagagtggaaactgaggaacaccttggcctattgga  
 K S G N -

**LeSH-E7**

acatcaaccaaggcctttttgcnnggggttgaaacgtggaagaaagagactatcctgaaa  
 T S T K A F L X G V E T W K K E T I L K  
 anggagactgaggctgcaaaaaagtcaggcgcaaatgacgcagagtataagctccttctt  
 X E T E A A K K S G A N D A E Y K L L P  
 ggtgatgccaacgatgctgaaaagaaaaaacagaagtttccgaacctgaggtgcctatc  
 G D A N D A E K K K T E V S E P E V P I  
 atggagaatgtttgctggaaggaaactggactcctgtcttttgtttgggttgcatttcta  
 M E N V C W K E T G L L S F V W V A F L  
 ggactgcaaatcggcaagaattatacagacaattgt  
 G L Q I G K N Y T D N C

**6.2 OLIGONUKLEOTIDE**

	Oligonukleotidsequenz	T <sub>M</sub> [°C]
<i>Cyp</i> GSP1	5'-GAG GAT TCC AGG GCC GGT GTG CT-3'	67,8
<i>Cyp</i> GSP2	5'-CCT TCC ACC GTG TGA TCC CAG GGT T-3'	67,9
SH24 GSP1	5'-GAA TCC ACA CAG CGA TGA ACC AAG AGG G-3'	68,0
SH24 GSP2	5'-GGA AGA ATA CGC AGA GAA GGC AAG CGT C-3'	68,0
<i>LeAqp</i> GSP1	5'-CTC AGC ACC AAG GCC ATC TCC CTT GG-3'	69,5
<i>LeAqp</i> GSP2	5'-CCC TGC TAG AAG CCT AGG CGC TGC C-3'	71,2
<i>LeEXT1</i> GSP1	5'-TTC TTG TGG CGT GGC AGC TTC AC-3'	72,0
<i>LeEXT1</i> GSP2	5'-GTT TGA TCC AAC CAA GGG CTA CC-3'	70,0
<i>LeEXT1</i> -Xba-sense	5'-TCT AGA CTC ACC ATG GGT ATC ATA AAA GGA G-3'	65,5
<i>LeEXT1</i> -Pst1-as	5'-CTG CAG CCT CAT GAC TCC ACC AAT GAT ACA CTC-3'	70,6
<i>LeEXT1</i> -BamHI-sense	5'-GGA TTC GGG TAT CCT AGA AGG CCA GTA G-3'	69,5
<i>LeAqp</i> sense	5'-GTT CTT GCA CTG ACC ACT CAG CAC-3'	64,4
<i>LeAqp</i> as	5'-CCA ATA GGC CAA GGT GTT CC-3'	59,4
T7	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'	53,2
M13 reverse	5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3'	

**6.3 EIN- UND DREIBUCHSTABENCODE DER AMINOSÄUREN**

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

## **LEBENS LAUF**

### Angaben zur Person:

Name: Werner, Monika  
Geburtsdatum: 22.10.1973  
Geburtsort: Neustrelitz  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulische Ausbildung:

1980-1990 Polytechnische Oberschule in Roßlau  
1990-1992 Gymnasium in Roßlau  
1992 Abitur

### Hochschulstudium:

1992-1996 Studium der Pharmazie an der Universität Greifswald  
11/1996-04/1997 Diplomarbeit in Pharmazeutischer Analytik an der Universität Greifswald  
05/1997-10/1997 Pharmaziepraktikum in Frankfurt/Main  
12/1997 Approbation als Apothekerin  
  
seit 01/1998 Promotion am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg  
Mitglied im Graduiertenkolleg „Pflanze im Spannungsfeld zwischen Nährstoffangebot, Klimastreß und Schadstoffbelastung“

## **ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Ich erkläre ferner, daß ich bislang noch keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, Oktober 2000