

Studien zur Interaktion des pflanzlichen Parasiten *Cuscuta reflexa* mit dem inkompatiblen Wirt *Lycopersicon esculentum*

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt
zur
Erlangung des akademischen Grades
eines Doctor rerum naturalium
angenommene
Dissertation von

Markus Albert
aus
Sternberg

Berichterstatter: Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Thiel

Tag der Einreichung: 29.08.05
Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.05

Darmstadt 2005
D 17

Mein Dank gilt...

...Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff für die Bereitstellung des Themas, sein Vertrauen, seine Hilfe und Unterstützung während der Arbeit, sowie seine konstruktive Kritik.

...Prof. Dr. Gerhard Thiel dafür, dass er sich als Zweitgutachter für meine Arbeit zur Verfügung stellt.

...PD Dr. Sander van der Krol von der Wageningen University für seine Hilfe und Ideen, v.a. während der Ca^{2+} -Versuche.

...Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Kaldenhoff, besonders Beate Otto, Dr. Norbert Uehlein, Matthias Fischer, Dr. Franka Siefritz und Dr. Elisabeth Kruse für die Weitergabe ihrer „Tips und Tricks“ bei der Arbeit im Labor.

...Dr. Gerd Vogg (Uni Würzburg) für seine Zusammenarbeit zwecks der biochemischen Analyse der nekrotischen Läsionen.

...Prof. Dr. Claus Wasternack (IPB Halle), PD Dr. Petra Dietrich (Uni Erlangen) und dem Tomato Genetics Resource Center für die Bereitstellung der Samen sämtlicher verwendeter transgener und mutierter Tomaten- und Tabakpflanzen.

...Dr. Gabriele Gresser (Uni Würzburg) für ihre Unterstützung bei der Bestimmung des JA-Gehaltes in Tomatenpflanzen.

...Allen Praktikantinnen für ihre aktive Mithilfe im Labor

...Allen Korrekturleserinnen und –Lesern

...meinen Eltern, Großeltern und Vorfahren

...Andrea

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1. Der Holoparasit <i>Cuscuta reflexa</i>	1
1.2. Interaktion mit kompatiblen Wirtspflanzen	2
1.3. Inkompatible Wirt - Parasit Interaktion	5
1.4. Die Rolle der Zellwand während der Verteidigung	7
1.5. Arabinogalactan Proteine	8
1.6. Ziele der Arbeit	11
2. Ergebnisse und Diskussion	12
2.1. Untersuchungen am sekundären Abschlussgewebe der Tomate	12
2.1.1. Mikroskopische Untersuchungen am sekundären Abschlussgewebe	12
2.1.2. Das sekundäre Abschlussgewebe fehlt in älteren Tomaten	13
2.1.3. Biochemische Analysen des sekundären Abschlussgewebes	14
2.1.4. Diskussion und mögliches Modell des sekundären Abschlussgewebes	16
2.2. Signale während der <i>Cuscuta</i> - Wirt Interaktion	17
2.2.1. Jasmonat	17
2.2.1.1. Der Jasmonat-Gehalt steigt in der Tomate	18
2.2.1.2. Untersuchung verschiedener Tomatenmutanten	18
2.2.2. Kalzium	19
2.2.2.1. Kalzium-Signale nach <i>Cuscuta</i> -Befall in Tabak und Tomate	20
2.2.2.2. Identifikation möglicher Auslöser für Kalzium-Signale	22
2.2.3. Diskussion	23
2.3. Charakterisierung eines Arabinogalactan Proteins	25
2.3.1. Frühere Vorarbeiten	25
2.3.2. <i>In silico</i> Untersuchungen der attAGP-Sequenz	25
2.3.3. Zelluläre Lokalisation des attAGPs	27
2.3.4. attAGP ist nach <i>Cuscuta</i> -Angriff in der Tomate induziert	29
2.3.5. Lokalisation der Genexpression	30
2.3.5.1. Klonierung des attAGP-Promotors	30
2.3.5.2. Der attAGP-Promotor ist direkt an der Infektionsstelle aktiv	31
2.3.6. Funktionsanalyse von attAGP	32
2.3.6.1. Herabsetzen des attAGP-mRNA-Gehaltes mit Hilfe der RNAi-Technik	33
2.3.6.2. „Silencing“ des attAGP-mRNA-Gehaltes mittels VIGS	34
2.3.6.3. Bestimmen der Anheftungskraft von <i>Cuscuta</i> an der Tomate	36
2.3.7. Diskussion	38
2.4. Untersuchungen am Parasiten <i>Cuscuta reflexa</i>	40
2.4.1. Differentielles Durchmustern einer <i>Cuscuta</i> -cDNA-Bibliothek	40
2.4.2. Diskussion	43
3. Material und Methoden	44
3.1. Kultivierung der Pflanzen und Probennahme	44
3.1.1. <i>Cuscuta</i>	44
3.1.2. Tomate	44
3.1.3. Tabak	44
3.1.4. Infektion der Wirtspflanzen	44
3.1.5. Probennahme an der Wirtspflanze	45
3.1.6. Probennahme an <i>Cuscuta</i>	45
3.2. Vorgehensweise mit Bakterien	45
3.2.1. Verfahren mit <i>Escherichia coli</i>	45
3.2.1.1. Hitzeschock Transformation von <i>E. coli</i>	46
3.2.2. Verfahren mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	47
3.2.2.1. Hitzeschock Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	47
3.3. Verfahren mit Ribonukleinsäuren	48
3.3.1. Isolation von Gesamt-RNA	48
3.3.2. Photometrisches Vermessen von Nukleinsäuren	48
3.3.3. Auftrennen von RNA mittels Gelelektrophorese	48
3.4. Verfahren mit Northernblots	49
3.4.1. Der Transfer von Gesamt-RNA auf eine Membran	49
3.4.2. Herstellen markierter cDNA-Sonden	50

3.4.2.1 Herstellen einer genspezifischen radioaktiv markierten cDNA-Sonde	50
3.4.2.2. Herstellen einer DigUTP-markierten cDNA-Sonde	50
3.4.3. Hybridisierung von Membranen	51
3.4.3.1. „Dot-Hybridisierung“	51
3.4.3.2. Hybridisierung von Northernblots mit DIG-markierter Sonde	52
3.4.3.3. Antikörper-Nachweis und Detektion	53
3.5. Verfahren mit Desoxyribonukleinsäuren	54
3.5.1. Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> mit Plasmid-mini-Präparation	54
3.5.2. Restriktionsabbau von DNA	55
3.5.3. Elektrophoretische Auftrennung von DNA in einem Agarosegel	55
3.5.4. Elution von DNA aus einem Agarosegel	56
3.5.5. Sequenzieren von DNA-Fragmenten	56
3.5.6. Bedingungen für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	57
3.5.7. RACE-PCR	58
3.5.8. T/A-klonieren von PCR-Fragmenten	58
3.5.9. Ligation von cDNA-Fragmenten in binäre Vektoren	59
3.5.10. Aufreinigen von DNA	60
3.5.11. Herstellung einer cDNA-Bank	60
3.5.11.1. Herstellen von Erststrang-cDNA	60
3.5.11.2. Vervielfältigen der cDNA	61
3.5.11.3. Herstellen einer cDNA-Bank	62
3.6. Verfahren mit Microarrays	63
3.6.1. Der Microcaster™	63
3.6.2. Prinzip des Proben-Auftragens	64
3.6.3. Nachbehandlung der aufgetragenen DNA-Proben	67
3.6.4. Herstellen von radioaktiv markierten cDNA-Sonden aus Gesamt-mRNA	67
3.6.5. Hybridisierung von Microarrays	67
3.6.6. Analyse der Daten	68
3.7. Zelluläre Lokalisation des AGPs mittels mGFP4	68
3.7.1. Herstellen eines AGP-mGFP4 Fusionsproteins	68
3.7.2. Beladen der Gold Partikel	69
3.7.3. Transiente Transformation mittels „Particle Bombardment“	70
3.7.3.1. Das Particle Delivery System von BioRad	70
3.7.3.2. Transiente Transformation von Pflanzenteilen	72
3.7.4. Analyse der transformierten Zellen unter einem CLSM	73
3.8. Lokalisation der attAGP-Genexpression	74
3.8.1. Klonierung des attAGP-Promotors	74
3.8.1.1. Herstellen der Adaptoren	74
3.8.1.2. Klonierung des Promotors	74
3.8.2. Fusion des Promotors mit GUS- und Luc-Genen	75
3.8.3. GUS-Test zur Lokalisation der Genexpression	76
3.9. Stabile Transformation der Tomate	76
3.9.1. Präparation von Agrobakterien	76
3.9.2. Transformation von Tomatenkotyledonen	77
3.10. Funktionsanalyse des AGPs durch „knock down“ in der Tomate	79
3.10.1. Knock down mit Hilfe der RNAi-Technik	80
3.10.1.1. Herstellung der attAGP-RNAi-Konstrukte	80
3.10.2. Knock down mittels VIGS	82
3.10.2.1. Herstellung der AGP-VIGS-Konstrukte	83
3.10.2.2. Infektion der Tomatenpflanzen mit den attAGP-VIGS-Konstrukten	84
3.10.2.3. Überprüfen der Funktion des attAGP-VIGS-Konstruktes in den Pflanzen	85
3.10.3. Analyse der parasitären Anheftungskraft	87
3.11. Nachweis von Kalzium-Signalen	88
3.11.1. Nachweis von Kalzium-Signalen in ganzen Pflanzen	88
3.11.2. Blattscheiben Test zur Identifikation möglicher Elicitoren	89
3.12. Biochemische Analyse des Sekundären Abschlussgewebes	89
3.12.1. Analyse aliphatischer Bestandteile mit der Bohr-Trifluorid Methode	90
3.13. Bestimmung des Jasmonsäure-Gehalts	91
4. Zusammenfassung	94
5. Literaturverzeichnis	96

6. Anhang	102
6.1. Liste der Abkürzungen	102
6.2. Verwendete Primer	103
6.3. Verwendete Plasmide	104
6.3.1. Der RNAi Vektor pFGC5941	104
6.3.2. Der TA-Klonierungsvektor pCR2.1	104
6.3.3. Vektor zur transienten Transformation	105

1. Einleitung

1.1. Der Holoparasit *Cuscuta reflexa*

Die Familie der *Cuscutaceae* (manchmal wird diese Familie auch zu den *Convolvulaceae* gezählt) umfasst ca. 150 Spezies der Gattung *Cuscuta*, die alle parasitisch auf anderen Angiospermen leben. Alle *Cuscuta*-Arten bestehen aus einem gewundenen Spross, besitzen keine Wurzeln und nur rudimentäre, schuppenförmige Blätter (Abb.1-1). In hiesigen Breiten ist *Cuscuta europaea*, auch Teufelszwirn oder Springseide genannt, heimisch und vor allem an Flußauen anzutreffen, wobei meist die Brennnessel als Wirtspflanze dient.



Abb. 1-1: Der Parasit *Cuscuta reflexa* auf der kompatiblen Wirtspflanze *Coleus blumei*.

Mit speziellen Organen, den sog. Haustorien, stellen *Cuscuta*-Pflanzen Kontakt zum Gefäßsystem der Wirtspflanzen her und entziehen diesen organische und anorganische Nährstoffe (Jeschke et al., 1994a; Jeschke et al., 1994b). Sie leben

ausschließlich epiphytisch auf oberirdischen Organen, weswegen *Cuscuta* als Sprossparasit bezeichnet wird (Kollmann and Dorr, 1987a). Einige Spezies von *Cuscuta* besitzen kein Chlorophyll, sind also nicht zur Photosynthese fähig und deshalb vollkommen von ihrem Wirt abhängig. Andere Arten wie *Cuscuta reflexa* besitzen Chloroplasten, die zwar nur schwach ausgeprägte Thylakoide besitzen, aber dennoch eine funktionstüchtige und effiziente Lichtreaktion zeigen (Hibberd et al., 1998; Machado and Zetsche, 1990). Auch konnte in *Cuscuta reflexa* geringe Rubisco-Aktivität und $^{14}\text{CO}_2$ -Aufnahme nachgewiesen werden (Machado and Zetsche, 1990; Macleod, 1961). Die CO_2 -Fixierung, die auf nur wenige Zellen zwischen Kortex und Zentralzylinder beschränkt ist, dient *C. reflexa* hauptsächlich zur Refixierung und damit zur Verlustminimierung von CO_2 , das bei der Respiration anfällt (Hibberd et al., 1998). Die extrem geringe Transpirationsrate von *C. reflexa* reduziert zwar den Wasserverlust (Jeschke et al., 1994a; Jeschke et al., 1994b), beschränkt jedoch auch stark die externe CO_2 -Aufnahme. Ob diese geringen Photosyntheseaktivitäten einen Einfluss auf Wachstum und Überleben von *Cuscuta reflexa* haben, ist noch nicht geklärt. Als sicher gilt, dass *Cuscuta reflexa* absolut auf eine Wirtspflanze und deren Assimilate angewiesen ist (WOLSWINK.P, 1974). Schneidet man einen *Cuscuta* Spross ab, und wickelt ihn unter Nachahmung seiner natürlichen Windung um einen Stock, so stirbt die Pflanze nach einigen Tagen ab, auch wenn eine hohe Luftfeuchtigkeit herrscht (eigene Versuche). All diese Befunde legen nahe, dass *Cuscuta reflexa* Roxb. als Holoparasit angesehen werden muss, und die Infektion einer anderen Pflanze für sie überlebensnotwendig ist (Jeschke et al., 1994a; Machado and Zetsche, 1990).

1.2. Interaktion mit kompatiblen Wirtspflanzen

Die erfolgreiche Infektion einer Pflanze durch *Cuscuta* setzt deren Kontakt zum Phloem und Xylem durch Haustorien voraus. Ist die Infektion einer Wirtspflanze möglich, spricht man von einer kompatiblen Pflanze. *Nicotiana tabacum* oder *Coleus blumei* sind z. B. für eine *Cuscuta*-Infektion kompatible Pflanzen.

Die Entwicklung der Haustorien beginnt an der dem Wirt zugewandten Seite von *Cuscuta*, nachdem die Pflanze sich dicht um einen Sprossabschnitt der Wirtspflanze gewickelt hat. Offensichtlich wird die Bildung der Haustorien durch

mechanische Reize ausgelöst, da eine Entwicklung der Haustorien auch erfolgt, wenn *Cuscuta* um einen Holzstab oder Glasstab gewickelt wird.

Die eigentliche Haustorienbildung beginnt mit der Differenzierung von parasitischen Epidermis- und Rindenzellen zu so genannten Prähaustorien. Diese heften sich mittels eines speziellen Epithels aus zylindrischen Zellen, die ein polysaccharidreiches Sekret zur Adhäsion der Prähaustorien sezernieren, am Spross der Wirtspflanze an (Heidejorgensen, 1991). Dieses Sekret besteht hauptsächlich aus Pektinen und verwandten Polysacchariden (Vaughn, 2002). Nahe den Milchröhren entsteht unterdessen in der Rinde des Parasiten ein Meristem, aus dem durch fortgesetzte Teilung später das zapfenförmige Haustorium hervorgeht. Infolge der Teilungsaktivität dieses Meristems entstehen mechanische Drücke, die entscheidend zum Eindringen des Haustoriums durch die Epidermis des Wirtes beitragen. Daneben gilt es als gesichert, dass auch Enzyme, wie z.B. Methylsterasen an der Auflösung von Mittellamellen und Primärwänden der Wirtszellen beteiligt sind (Srivastava et al., 1994). Vaughn konnte zeigen, dass Multienzym-Komplexe mit pektinase- und zellulaseartigen Eigenschaften, sog. „Losening particles“ ein Eindringen des Haustoriums erleichtern bzw. überhaupt erst ermöglichen (Vaughn, 2003b). Nachdem das Haustorium ein Stück in den Wirt vorgedrungen ist (Abb. 1-2, l), differenzieren sich die vordersten Zellen zu sog. Suchhyphen um. Dies sind schlauchförmige Zellen, die inter- und intrazellulär in das umgebende Wirtsgewebe wachsen (Abb.1-2, r).

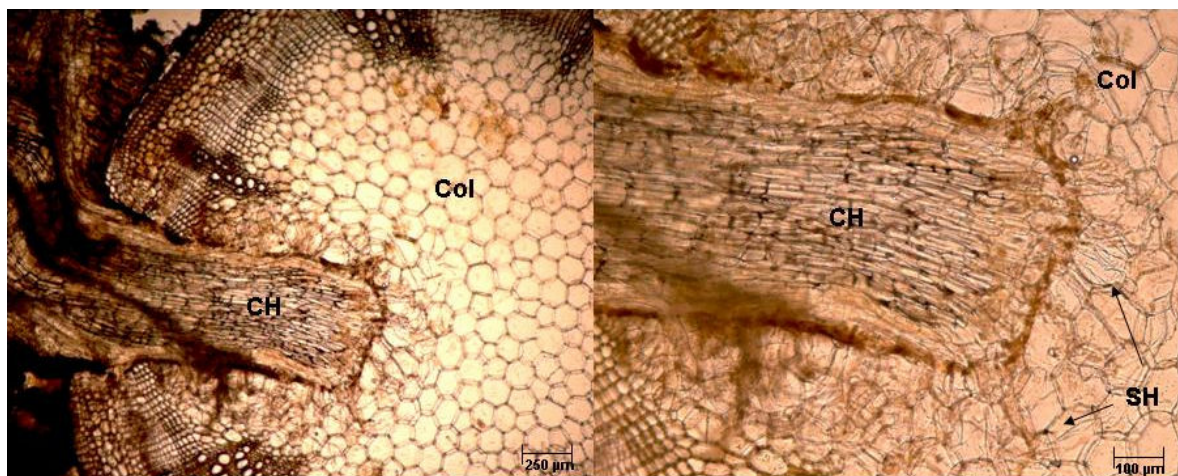


Abb. 1-2: Mikroskopische Querschnitte. links: Ein *Cuscuta*-Haustorium (CH) dringt in die compatible Wirtspflanze *Coleus blumei* (Col) ein. Rechts: Aus den vorderen Haustorienzellen des *Cuscuta*-Haustoriums (CH) wachsen die Suchhyphen (SH) aus, um Zellen des Leitgewebes von *Coleus* zu finden und anzuzapfen.

Über Plasmodesmen stehen die Suchhyphen in symplastischem Kontakt mit den Wirtszellen. Diese plasmatischen Verbindungen bleiben jedoch nur solange bestehen, bis vom Wirt eine sekundäre Wand gegen die Hyphe abgelagert wird. Kommt es zu einem Kontakt zwischen Suchhyphe und der Zelle eines Xylemelements, dann entwickelt sich die parasitische Zelle zu einer Tracheide bzw. zum Tracheenelement. Interessant dabei ist, dass der Anschluss der Parasitenzelle nur an eine Wirtszelle gleichen Differenzierungsstadiums erfolgen kann, die Entwicklung beider Zellen also synchron erfolgt (Schulz, 1987). Trifft die Suchhyphe auf eine Siebröhre des Wirtes, dann legt sich die Hyphenzelle wie die „Finger einer Hand“ (Dorr, 1972) um die Wirtssiebröhre (Abb. 1-3). Es kommt zur Umdifferenzierung der parasitischen Zelle zu einer Zelle, die Eigenschaften von sogenannten Transferzellen besitzt (Gunning, 1977). Im Kontaktbereich zwischen Hyphe und Wirtssiebröhre kommt es zur Ausbildung von Wandprotuberanzen, welche die Oberfläche um das 6 - 20fache vergrößern (Abb. 1-3), was einen intensiveren Stoffaustausch ermöglicht.

Daneben kommt es in der neu differenzierten Parasitenzelle auch zum Verlust von Tonoplasten, Zellkern, Ribosomen und Dictyosomen, welches typische Merkmale einer Siebröhrenzelle sind. Im Haustorium entwickelt sich parasitisches Phloem, das über diese neuen Siebröhrenzellen mit dem Phloem des Wirtes in kontinuierlicher Verbindung steht (Israel et al., 1980; Kollmann and Dorr, 1987b).

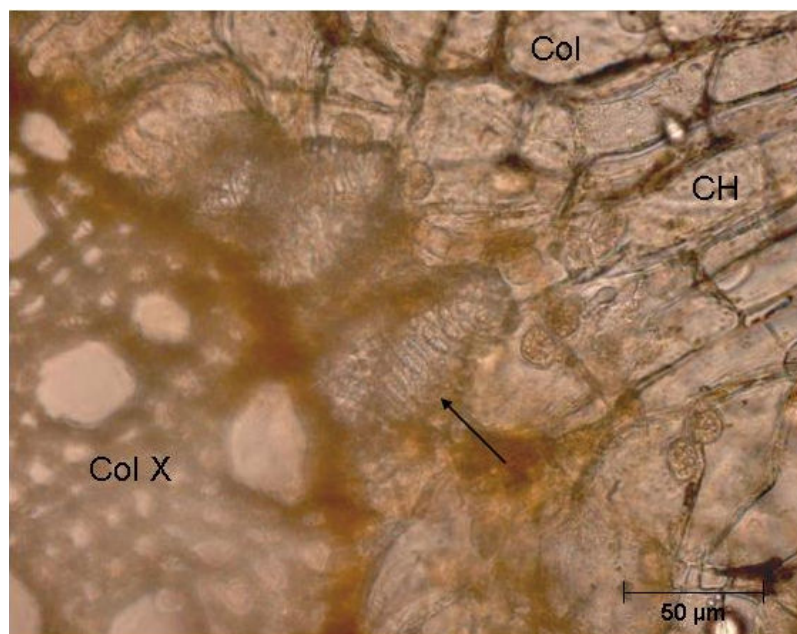


Abb. 1-3: Mikroskopischer Querschnitt: Zellen des *Cuscuta*-Haustoriums (CH) wachsen auf die Siebelemente des Phloems von *Coleus* (Col, Col X = Xylem von *Coleus*) zu, und umwachsen eine Siebröhrenzelle des Wirtes netzförmig (durch Pfeil angezeigt), was zu einer enormen Oberflächenvergrößerung führt.

Trotz intensiver licht- und elektronenmikroskopischer Untersuchungen konnten zwischen Wirtsploem und fertig ausgebildetem Haustorium noch keine plasmatischen Kontakte erkannt werden, ein Stoffaustausch zwischen Wirt und Parasit müsste also autoplastisch (Tsivion, 1978; Wolswinkel, 1978) bzw. über eine Reihe von Membrantransportmechanismen erfolgen.

Xylem und Phloem des Wirtes sind nun über das Haustorium mit dem Xylem und Phloem von *Cuscuta* verbunden, und der Aufnahme von Nährstoffen aus dem Wirt steht nichts mehr im Wege. Durch diese Parasitisierung bildet *Cuscuta* einen stärkeren, attraktiveren Sink, als die wirtseigenen Sinks, wie z. B. junge Blätter, Blüten oder reife Früchte (Jacob et al., 1986; WOLSWINK.P, 1974) und saugt so den Wirt innerhalb einiger Tage aus. Jeschke und Mitarbeiter (Jeschke et al., 1994a; Jeschke et al., 1994b) konnten zeigen, dass *Cuscuta reflexa* dem kompatiblen Wirt *Lupinus albus* auf diese Weise 81 % der Photosyntheseprodukte, und außerdem den vom Wirt fixierten und teilweise auch bereits gespeicherten Stickstoff entzieht, diese Form des Parasitismus scheint also höchst effektiv zu sein.

Doch werden durch diese Haustorien nicht nur Nährstoffe geschleust. *Cuscuta* dient ebenso als effektiver Vektor zur Übertragung von verschiedenen Viren (Bennett, 1940; Roos and Aldrich, 1988; Schmelzer, 1955), und auch die Übertragung von RNAs bzw. RNA-Protein Komplexen kann nicht ausgeschlossen werden. Die Tatsache, dass eine Translokation von phloemmobilem GFP aus gentechnisch verändertem Tabak in die Leitelemente von *Cuscuta* stattfinden kann (Haupt et al., 2001), stützt diese Hypothese. Auch das Übertragen von Cytoplasma des Wirtes auf den Parasiten wurde nachgewiesen (Marcone et al., 1999). All diese Befunde lassen darauf schließen, dass eine symplastische Verbindung zwischen Wirt und Parasit bestehen muss, damit ein solch unspezifisches makromolekulares „trafficking“ überhaupt möglich ist (Oparka et al., 1999).

1.3. Die inkompatible Wirt - Parasit Interaktion

Was geschieht allerdings, wenn der Wirt inkompatibel, also resistent gegen eine *Cuscuta*-Infektion ist? Es liegen bereits Untersuchungen zu mehreren inkompatiblen Wirt - *Cuscuta* Beziehungen vor. So können die *Cuscuta*-

Haustorien in die *Malvaceen Gossypium hirsutum* und *Hibiscus rosa-sinensis* zwar eindringen, werden dann aber durch ein Wundabschlussgewebe vom Wirt ausgegrenzt, womit *Cuscuta* die Möglichkeit genommen wird, der Wirtspflanze Nährstoffe zu entziehen (Capderon et al., 1985). Dabei sterben die parasitären Zellen, insbesondere die Suchhyphen ab.

Im inkompatiblen System von *Lycopersicon esculentum* und *Cuscuta reflexa* finden ähnliche Abwehrmechanismen statt, allerdings reagiert *L. esculentum* früher und schneller auf den Befall von *Cuscuta*. Bereits während der Anheftung des Parasiten wird die Haustorienentwicklung von der Tomate verhindert (Ihl et al., 1988; Sahm et al., 1995). Sehr charakteristisch für die Abwehrreaktion sind Zellstreckungen im hypodermalen Gewebe (Sahm et al., 1995), sowie gesteigerte Zellteilungen im Rindenparenchym. Diese Beobachtungen wurden auch bei fast allen anderen (für *Cuscuta*) inkompatiblen Pflanzen gemacht, und treten nur bei Infektion durch *Cuscuta reflexa* auf, nicht aber bei Verwundung der Pflanze (Ihl et al., 1988). Unterhalb der gestreckten Zellen entsteht in der Tomate ein sekundäres Abschlussgewebe, in dessen Zellwänden Suberin und Lignin eingelagert wird (vgl. Kap. 2.1.). Eine Akkumulation löslicher Phenylpropane im Infektionsbereich, sowie eine Erhöhung der Peroxidaseaktivität, ein Enzym das für die Verknüpfung von phenolischen Gruppen mit Wandproteinen, Pektinen und anderen Wandpolymeren verantwortlich ist, sind Zeichen der beobachteten Lignifizierung (Sahm et al., 1995). Die nach außen abgegrenzten, gestreckten Zellen des hypodermalen Gewebes sowie Teile der Epidermis sterben ab, es kommt zur Hypersensitivitätsreaktion, die sich äußerlich als nekrotische Plaques direkt am Infektionsbereich des Tomatensprosses sichtbar macht (Ihl et al., 1988) (Abb. 1-4). Wenige Zellen werden also zum Überleben der gesamten Pflanze geopfert, eine Barriere wird errichtet und dem Parasiten wird der Zugang in die Pflanze verwehrt, er stirbt ab. Die ersten makroskopischen Veränderungen auf der Wirtssprossachse werden ca. zwei bis drei Tage nach der Infektion von *L. esculentum* beobachtet, nach 10 - 14 Tagen ist *Cuscuta* abgestorben, was wohl auf „Verhungern“ der Parasitenpflanze zurück zu führen ist.

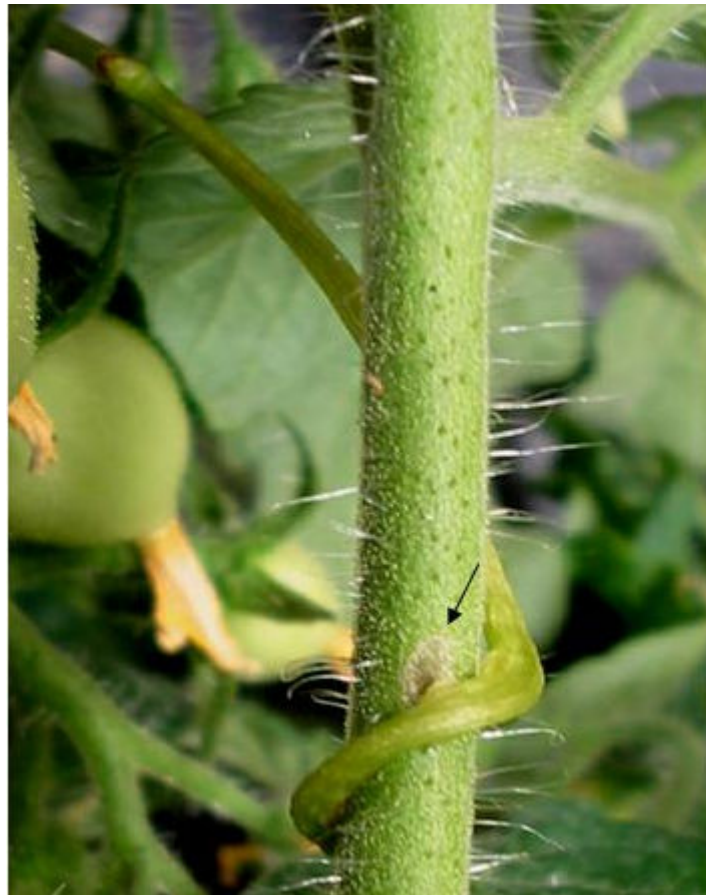


Abb. 1-4: *Cuscuta reflexa* auf dem inkompatiblen Wirt *Lycopersicon esculentum*. Die Tomate reagiert mit einer Hypersensitivitäts-Reaktion (HR), die äußerlich als nekrotische Läsion (Pfeil) sichtbar ist.

1.4. Die Rolle der Zellwand während der Verteidigung

Direkt an der Infektionsstelle scheinen die Zellen des epi- und hypodermalen Gewebes der Tomate und vor allem deren Zellwände die entscheidende Barriere für eindringende parasitäre Haustorien darzustellen. Molekularbiologische Untersuchungen (Werner, 2001; Albert, 2002) haben gezeigt, dass in der Tomate nach *Cuscuta*-Befall mehrere Gene induziert werden, die für Zellwandveränderungen oder Zellstreckung benötigt werden.

Zwei für die Zellstreckung mitverantwortliche Proteine wurden von Werner und Mitarbeiter charakterisiert. Dabei handelt es sich um die beiden Aquaporine LeAQP2 und LeTRAMP (*Lycopersicon esculentum*; tomato ripening associated membrane protein), deren Gene nach sechs Stunden in der Tomate exprimiert werden (Werner et al., 2001). Molekularbiologische Studien von Monika Werner (Werner, 2002) zeigten außerdem, dass ca. zwölf Stunden nach Infektion durch *Cuscuta* in der Tomate u. a. mehrere Gene verstärkt exprimiert werden, die für

Modifikationen der Zellwand verantwortlich sind, wie Expansin, Endo- β -1,4-D-Glucanase, Zellwandproteine der HRGP Familie („Highly hydroxylated Glycoproteins“) und LeXTH1 (XTH = Xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase). Letztere ist vor allem in die Umstrukturierung pflanzlicher Zellwände involviert, wo sie Bindungen zwischen den langkettigen Polygalacturonen öffnet und wieder neu verknüpft. LeXTH1 wurde genau analysiert (Albert et al., 2004). An der Infektionsstelle waren bereits zwölf Stunden nach Infektion ein erhöhter mRNA-Spiegel von LeXTH1, sowie eine gesteigerte Aktivität des Enzyms zu beobachten. Löffler konnte nach zwölfstündiger Infektionsdauer sowohl im direkten Infektionsbereich von *L. esculentum*, als auch im Prähaustorium von *Cuscuta*, einen deutlichen Anstieg von Auxin nachweisen, der nach 24 Stunden sein Maximum erreichte. Es gibt Hinweise, dass das Auxin-Signal von *Cuscuta* ausgeht, und das Gewebe der Tomate darauf u. a. mit Zellstreckung reagiert (Löffler et al., 1999). Dagegen scheint Auxin nicht die Genexpression von LeXTH1 zu steuern und auch nicht für die Resistenz der Tomate verantwortlich zu sein, da die Auxin-Signalweg Mutante *dgt* (*diageotropica*) bezüglich der LeXTH1 Expression sowie im Abwehrverhalten wie der Wildtyp reagiert (Albert et al., 2004).

Oben beschriebene molekularbiologischen Befunde ergänzen die im Mikroskop beobachteten Zellwandveränderungen, die nach *Cuscuta*-Befall in der Tomate auftreten. Deswegen standen Untersuchungen an Zellwand verändernden Prozessen, vor allem an daran beteiligten Proteinen, im Vordergrund dieser Arbeit.

1.5. Arabinogalactan Proteine

Arabinogalactan Proteine (AGPs) sind Zellwandproteine (Gane et al., 1994; Serpe and Nothnagel, 1994) und gehören zur Familie der HRGPs („Highly hydroxylated Glycoproteins“). Je nach Struktur und Eigenheiten werden AGPs in „klassische“ und „nicht klassische“ AGPs unterteilt (Du et al., 1996).

Die klassischen AGPs besitzen eine N- und C-terminale hydrophobe Domäne, wobei erstere als Signalpeptid zur Steuerung in die Plasmamembran, den Ort der AGP Lokalisation (Pennell et al., 1991), fungiert. Die C-terminale Domäne dient zur Fixierung in der Membran (Nothnagel, 1997; Showalter, 1993; Showalter, 2001). Zwischen den beiden hydrophoben Domänen befindet sich ein stark

hydrophiler Bereich, der reich an den Aminosäuren Prolin (wird oft zu Hydroxyprolin umgewandelt), Serin und Threonin ist. Die freien OH-Gruppen dieser Aminosäuren sind mit langen Arabinogalactan Zuckerketten verbunden (Nothnagel, 1997). AGPs sitzen also mit ihrem hydrophoben C-Terminus in der Plasmamembran und ragen mit ihrem hydrophilen glycosylierten Bereich in die Zellwand (Abb. 1-5). Vielen klassischen AGPs ist außerdem noch ein Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI) Anker (Abb. 1-5) angeheftet, was auf eine eventuelle Beteiligung von AGPs an Signalweiterleitung schließen lässt. Die spezifischen Phospholipasen C und D können Signalmoleküle, wie z.B. Inositolphosphat, abspalten (Oxley and Bacic, 1999; Sherrier et al., 1999; Svetek et al., 1999; Youl et al., 1998), die dann eine Reaktion in der Zelle auslösen.

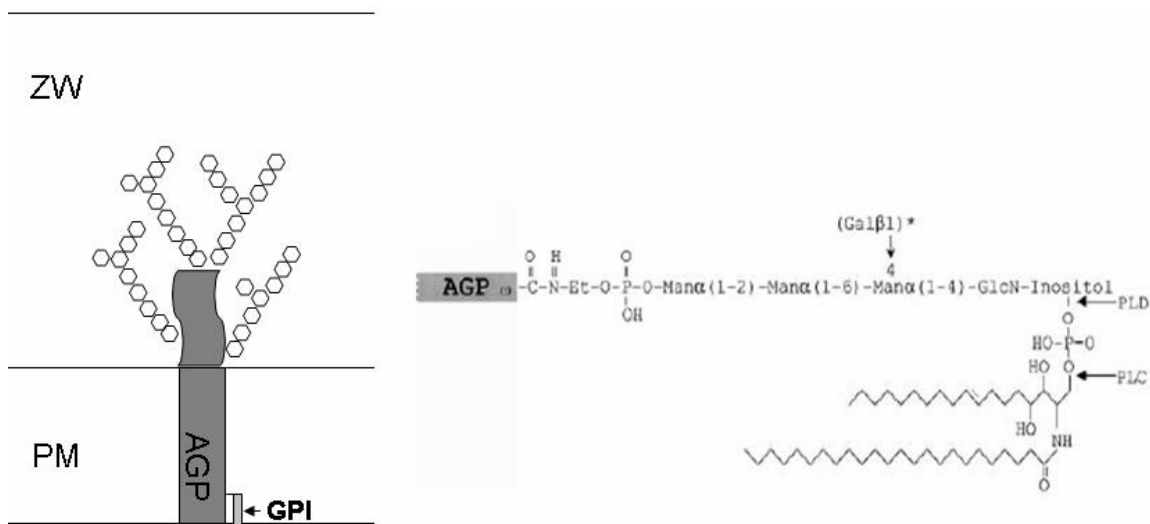


Abb. 1-5: Schema eines AGP und GPI-Anker. Links: Ein klassisches AGP sitzt mit seiner C-terminalen hydrophoben Domäne in der Plasmamembran (PM) und ragt mit seiner glycosylierten hydrophilen Domäne in die Zellwand (ZW). Die N-terminale hydrophobe Zielsequenz wird in der Regel abgespalten. Viele klassische AGPs besitzen einen Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol Anker (GPI). Rechts: Detail eines GPI-Ankers mit den putativen Spaltstellen für Phospholipase C und D (PLC, PLD). Aus Showalter (2001).

Die „nicht klassischen“ AGPs sind den klassischen nur hinsichtlich ihrer Prolin-, Serin- und Threonin-reichen hydrophilen Region und der N-terminalen Signalsequenz ähnlich. Ansonsten können sie sehr unterschiedlich sein. Die C-terminale hydrophobe Domäne und der GPI-Anker können komplett fehlen und auch innerhalb der hydrophilen Domäne können eine Reihe anderer Aminosäuren gehäuft vorkommen, wie z.B. Cystein (Du et al., 1996; Showalter, 2001).

AGPs scheinen in der Pflanze vor allem bei der Zelldifferenzierung und Entwicklungsprozessen in der Pflanze beteiligt zu sein (Knox, 1997; Nothnagel,

1997; Pennell and Roberts, 1990; Pennell et al., 1991; Showalter, 2001; Sun et al., 2004). Im speziellen sind dies z. B. die Entwicklung des Xylems (Gao and Showalter, 2000; Zhang et al., 2003), Wachstum und Musterbildung der Wurzelepidermis (Ding and Zhu, 1997; van Hengel et al., 2004), die Initiation der weiblichen Gametenbildung (Acosta-Garcia and Vielle-Calzada, 2004) und Phytohormon Signaltransduktion (Park et al., 2003; Suzuki et al., 2002; van Hengel et al., 2004). Es konnte außerdem eine Beteiligung von AGPs am programmierten Zelltod nachgewiesen werden. Ein spezielles Reagenz (Yariv-Reagent), das spezifisch nur an AGPs bindet, löste in *Arabidopsis* Zellkulturen in vielen Zellen programmierten Zelltod aus (Gao and Showalter, 1999). Auch bei der interspezifischen Interaktion von Organismen konnte gezeigt werden, dass AGPs involviert sind. Sie treten z. B. direkt an der Kontaktfläche zwischen *Rhizobium spp.* mit Erbsenwurzel auf (Olsson et al., 2002), oder während der Nodulation an der Kontaktfläche zwischen *Alnus spp.* und Knöllchenbakterien (Berry et al., 2002). Dass AGPs wohl maßgeblich für eine erfolgreiche Interaktion von Pflanzen mit Bakterien verantwortlich sind, konnte an der *Arabidopsis* AGP Mutante *atagp17* gezeigt werden. Diese lässt sich nur noch mit stark verminderter Effizienz durch *Agrobacterium tumefaciens* transformieren, was die Autoren auf mangelnde Interaktionsfähigkeit der Pflanze mit den Bakterien zurückführen (Gaspar et al., 2004).

AGPs sind in Interaktionsprozesse von Pflanzen und Bakterien involviert, wobei sie Bausteine der gemeinsamen Zellwände darstellen. Gemeinsame chimäre Zellwände sind auch essentiell während der Interaktion von *Cuscuta reflexa* mit Wirtspflanzen, weshalb eine Beteiligung von AGPs während des Infektionsprozesses wahrscheinlich ist.

1.6. Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten die Reaktion der Tomate, sowie molekularbiologische Vorgänge im Parasiten *Cuscuta reflexa* während der Interaktion dieser beiden Pflanzen näher untersucht werden.

Tomate

1. **Sekundäres Abschlussgewebe:** Nach einer *Cuscuta*-Infektion bildet die Tomate ein sekundäres Abschlussgewebe. Dieses sollte biochemisch analysiert, und seine Zusammensetzung ermittelt werden.
2. **Signale und Phytohormone:** Während der Pathogenabwehr von Pflanzen sind Phytohormone wie Jasmonsäure, Salizylsäure und Ca^{2+} -Signale beteiligt. Es sollte überprüft werden, ob diese Signalstoffe nach einer *Cuscuta*-Infektion in der Tomate induziert werden und ob sie für eine erfolgreiche Abwehrreaktion wichtig sind.
3. **Molekularbiologische Untersuchungen:** Aus eigenen früheren Vorarbeiten stand eine cDNA-Sequenz für ein Arabinogalactan Protein (AGP) zur Verfügung. Dieses AGP sollte molekularbiologisch charakterisiert werden. Die Lokalisation, die Genexpression und vor allem die Funktion des AGPs sollten analysiert werden. Diese Studien am AGP stellen den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit dar.

Cuscuta reflexa

Molekularbiologische Untersuchungen: *Cuscuta reflexa* induziert während der Interaktion mit anderen Pflanzen Gene, deren Proteine für die Infektion wichtig sind. Es sollte eine cDNA-Bibliothek des Parasiten angelegt werden, und diese differentiell nach Sequenzen durchmustert werden, die spezifisch während der Interaktion in den Prähaustorien und Haustorien von *Cuscuta reflexa* angeschaltet werden.

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1. Untersuchungen am sekundären Abschlussgewebe der Tomate

Die Tomate zeigt im Gegensatz zu fast allen anderen Pflanzen eine aktive Abwehrreaktion nach *Cuscuta*-Befall. Rein äußerlich ist diese Abwehrreaktion als Hypersensitive Reaktion (HR) an der direkten Kontaktstelle von parasitären Haustorien und dem Spross der inkompatiblen Wirtspflanze zu erkennen. Dieses von der Tomate gebildete sekundäre Abschlussgewebe wurde neben biochemischen und genetischen Prozessen an der Infektionsstelle ebenfalls untersucht. Es stellt schließlich die Barriere dar, die *Cuscuta* nicht überwinden kann und somit die Tomate vor einer erfolgreichen Infektion bewahrt. Welcher Natur ist dieses Abschlussgewebe und aus welchen Bestandteilen setzt es sich zusammen? Wird es in jedem Fall gebildet oder lässt sich die Tomate unter bestimmten Umständen erfolgreich infizieren?

2.1.1. Mikroskopische Untersuchungen am sekundären Abschlussgewebe

Die Sprosse von fünf bis sechs Wochen alten Tomatenpflanzen wurden mit *Cuscuta* umwickelt und fünf bis sechs Tage danach für mikroskopische Studien verwendet. Es wurden Querschnitte angefertigt, die ein erfolgloses Eindringen des parasitären Haustoriums in die Tomate zeigten, weil sich ein sekundäres Abschlussgewebe gebildet hatte (Abb. 2-1, l). Präparate wurden unter dem Mikroskop mittels UV-Licht angeregt, und ein entsprechender Fluoreszenzfilter verwendet. Das sekundäre Abschlussgewebe emittierte Fluoreszenzlicht, das dem der Xylemelemente ähnlich war (Abb. 2-1, m). Außerdem ließ sich entsprechendes Gewebe durch Phloroglucin/HCl erfolgreich rot anfärben (Abb. 2-1, r), was als klassischer Nachweis für Lignin gilt. Es handelte sich also um lignifiziertes Gewebe, das die Tomate zum Schutz gegen eine erfolgreiche Infektion durch *Cuscuta* bildete.

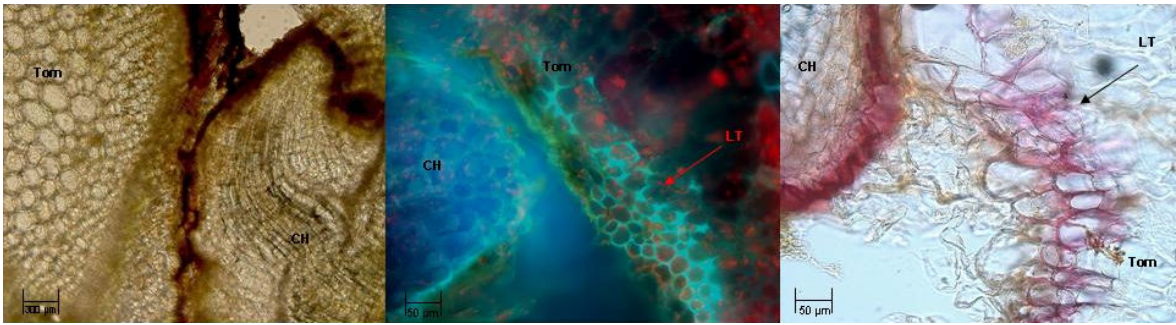


Abb. 2-1: links: Ein *Cuscuta*-Haustorium (CH) versucht in die Tomate (Tom) einzudringen, kann jedoch das hypodermale Gewebe nicht überwinden. Mitte: Eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme zeigt, dass sich die Tomate durch Bildung eines lignifizierten Abschlussgewebes schützt (LT). Rechts: Das sekundäre Abschlussgewebe lässt sich mittels Phloroglucin/HCl rot anfärben, ein Hinweis auf Lignin.

2.1.2. Das sekundäre Abschlussgewebe fehlt in älteren Tomaten

Wurden ältere Tomatenpflanzen (ca. acht Wochen alt), die schon reife Früchte trugen, mit *Cuscuta* umwickelt, so konnten die parasitären Haustorien sehr oft erfolgreich in das Gewebe der Tomate eindringen (Abb. 2-2). Die aktive Abwehrreaktion ist im Alter also stark vermindert, und die Tomate wird zu einer kompatiblen Wirtspflanze. Das sekundäre Abschlussgewebe stellt wohl die essentielle Barriere für ein erfolgreiches Eindringen von *Cuscuta* dar und rückte deshalb ins Interesse weiterer Untersuchungen.

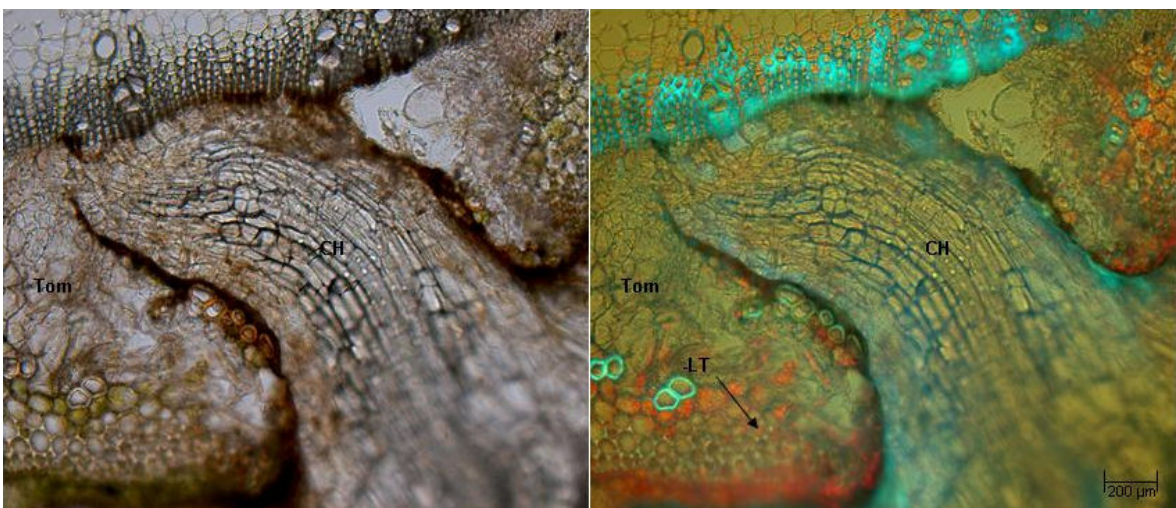


Abb. 2-2: Mikroskopische Querschnitte von Haustorien in der Tomate. Bei älteren Tomaten (nach Einsetzen der Fruchtreife) wird nach *Cuscuta*-Infektion kein schützendes, lignifiziertes Gewebe mehr gebildet (-LT). Das *Cuscuta*-Haustorium (CH) kann in die Tomate (Tom) einwachsen.

2.1.3. Biochemische Analysen des sekundären Abschlussgewebes

Zur Analyse des sekundären Abschlussgewebes wurden vier bis fünf Wochen alte Tomatenpflanzen mit *Cuscuta* umwickelt und die gebildeten Nekrosen sieben Tage nach Infektionsbeginn mit einem Skalpell vom Spross der Tomate abgeschnitten. Diese wurden dann in eine Enzymlösung eingelegt, die Cellulase und Pektinase enthielt, um restliches nicht lignifiziertes oder anders modifiziertes Gewebe (z.B. suberinisiertes) zu entfernen. Nach wenigen Tagen waren nur noch nekrotische Plaques übrig, die aufgrund ihrer modifizierten Zellwände nicht für die Cellulase oder Pektinase abbaubar waren (Abb. 2-3).

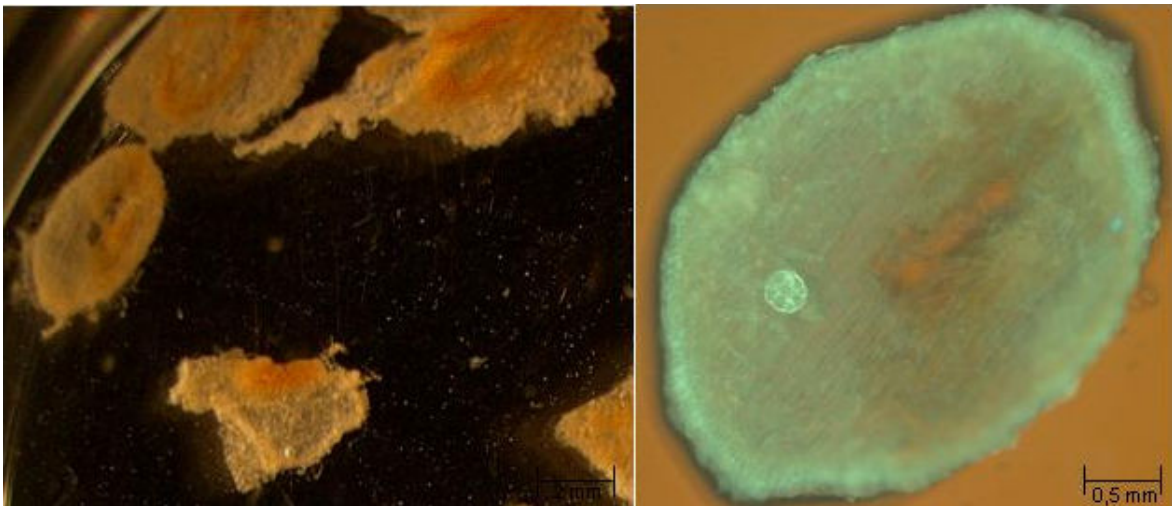


Abb. 2-3: Nekrosen der Tomate. Die nekrotischen Plaques wurden sieben Tage nach der Infektion von der Tomate isoliert. Dies geschah mit Hilfe der Enzyme Pektinase und Cellulase. Lignifizierte Bereiche wurden nicht enzymatisch abgebaut, folglich blieb nur das sekundär gebildete Abschlussgewebe übrig. Links: Isolierte Nekrosen. Rechts: einzelner nekrotischer Plaque unter dem Fluoreszenzmikroskop.

Die so erhaltenen isolierten Nekrosen wurden nach der BF_3 -Methode (Bohr-Trifluorid-Methode) aufgearbeitet und an einem Gaschromatographen mit anschließender Massenspektroskopie die Bestandteile klassifiziert. Bei dieser Methode wurden ausschließlich aliphatische Bestandteile des sekundären Abschlussgewebes untersucht.

Als Kontrollen wurden Gewebe der Tomate analysiert, deren Bestandteile und Zusammensetzung bereits bekannt waren. So wurden Xylemfasern aus Lignin, eine Fruchtkutikula der Tomate aus Kutin und Gewebe von verwundeten Tomaten, aus Wund-Suberin bestehend, ebenfalls nach der oben beschriebenen Methode aufgearbeitet und analysiert. Im Falle der verwundeten Tomatengewebe wurden

die Pflanzen sieben Tage vor der Probenentnahme mit einer Rasierklinge am Spross verletzt.

Nachdem alle vier Proben mittels GC-MS analysiert waren ergab sich ein anderer Sachverhalt als vorher angenommen. Die aliphatischen Bestandteile des sekundären Abschlussgewebes zeigen weder Ähnlichkeit mit Kutin, noch mit Lignin. Es wurden ausschließlich typische Bestandteile von Wund-Suberin der Tomate gefunden (Abb. 2-4). Charakteristisch für suberinisiertes Gewebe sind vor allem langkettige Di-Fettsäuren oder ω -OH-Fettsäuren, die oft zusammen mit Derivaten der Zimtsäure vernetzt werden und so ein festes Netzwerk innerhalb der Zellwände bilden (siehe auch Abb. 2-5 im Diskussionsteil).

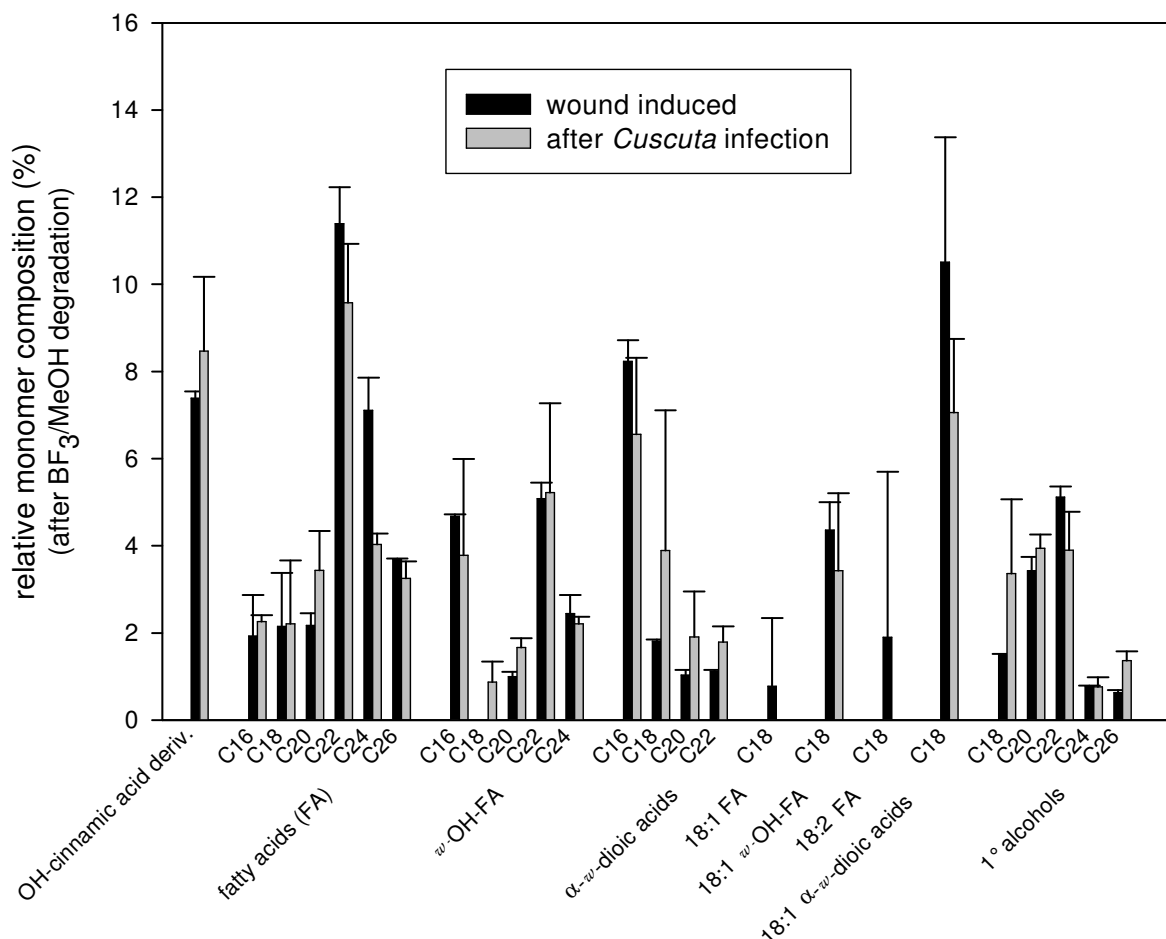


Abb. 21-4: Relative Anteile aliphatischer Bestandteile von Wund-Suberin (schwarz) und des nach *Cuscuta*-Infektion gebildeten Gewebes (grau). Nach GC-MS Analyse der aliphatischen Bestandteile des sekundär gebildeten Abschlussgewebes zeigte sich eine Übereinstimmung mit Bausteinen, die auch Bestand eines nach Verwundung gebildeten Gewebes darstellen. Vor allem waren dies langkettige Mono- und Di-Fettsäuren, ω -OH-Fettsäuren und langkettige Alkohole. Derivate der Zimtsäure wurden ebenfalls in beiden Proben gefunden (Balken ganz links).

2.1.4. Diskussion und mögliches Modell des sekundären Abschlussgewebes

Die Tomate reagiert auf *Cuscuta*-Befall mit der Bildung von Wund-Suberin und nicht mit der Bildung von Lignin, wie die mikroskopischen Befunde zuvor annehmen ließen. Für Wund-Suberin der Tomate oder auch der Kartoffel, einer nah verwandten *Solanaceae*, existieren bereits Modellvorschläge, wie die einzelnen aliphatischen Bausteine über Zimtsäure Derivate miteinander vernetzt sind. Bernards (Bernards, 2002) schlägt ein Modell vor, dem das hier beschriebene sekundär gebildete Abschlussgewebe sehr ähnlich ist (Abb. 21-5).

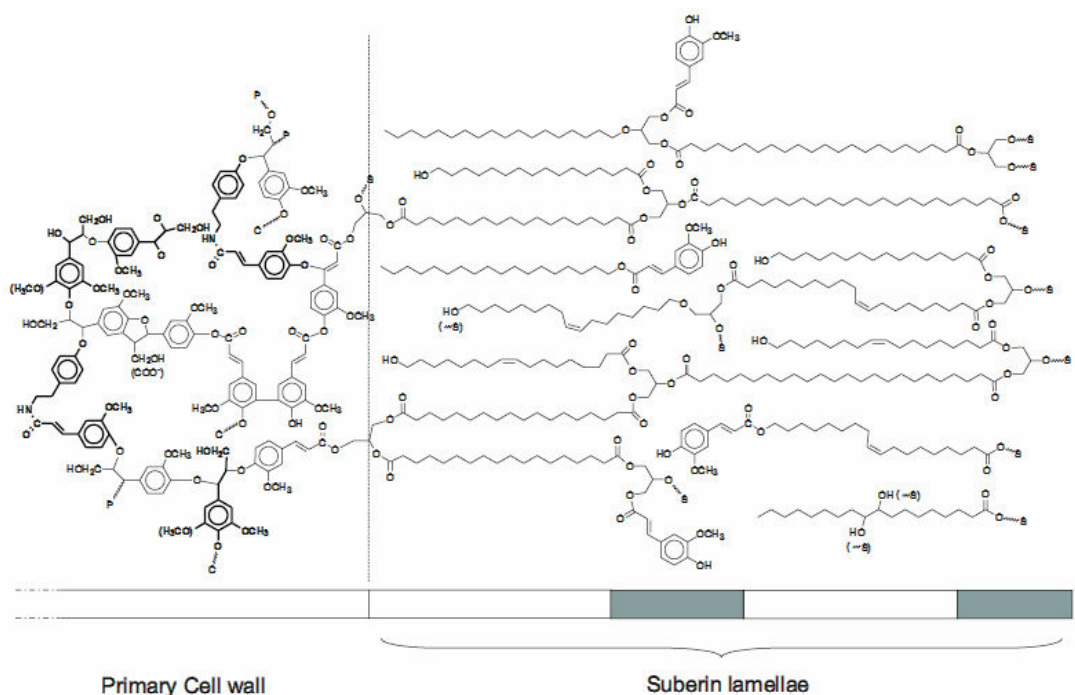


Abb. 21-5: Modell für Wund-Suberin nach Bernards (2002). Im suberinisierten Gewebe (Suberin lamellae) sind die langkettigen aliphatischen Verbindungen mit Derivaten der Zimtsäure über Esterbindungen netzwerkartig verbunden. Ähnlich sieht wahrscheinlich auch das sekundär gebildete Abschlussgewebe aus, das die Tomate während der Abwehrreaktion gegen *Cuscuta* bildet.

Dass dieses Abschlussgewebe der Tomate für eine erfolgreiche Abwehr unerlässlich ist, zeigt die gelungene Infektion durch *Cuscuta reflexa*, wenn dieses Schutzgewebe fehlt. Dies ist in älteren Pflanzen der Fall. Ähnliche Beobachtungen wurden auch schon bei anderen Fällen der Pathogenabwehr gemacht (Dr. Gerd Vogg, Dr. Jürgen Zeier, persönliche Kommunikation). Wenn Pflanzen ein gewisses Alter erreicht haben, fehlt offensichtlich die erforderliche Fitness sich erfolgreich gegen Feinde und Krankheiten zu wehren.

Bleibt noch zu klären, ob die Tomate nach *Cuscuta*-Befall mit einer allgemeinen, unspezifischen Wundantwort reagiert oder aber mit einer sehr spezifischen durch *Cuscuta* ausgelösten Pathogenabwehr. Die Befunde, dass *Cuscuta* die Tomate sowie andere Wirtspflanzen bei der Penetration des Gewebes verwunden, und dass die einzelnen Bestandteile der nekrotischen Läsionen denen des Wund-Suberins ähnlich sind, stützen die Hypothese einer Wundreaktion der Tomate. Allerdings besitzen alle anderen Pflanzen sehr ähnliche bzw. dieselben Mechanismen um auf eine Verwundung zu reagieren, machen jedoch während einer *Cuscuta*-Infektion nicht davon Gebrauch. Die parasitären Haustorien können deshalb ungehindert bis zum vaskulären Gewebe der kompatiblen Wirtspflanzen einwachsen.

Falls eine allgemeine Wundantwort der Tomate für die Resistenz verantwortlich ist, und keine spezifische Abwehrreaktion auf *Cuscuta*-Befall, so lässt sich dies überprüfen. Während einer allgemeinen Wundreaktion von Pflanzen werden übliche bereits gut untersuchte Signalkaskaden induziert, die eine Beteiligung bekannter Phytohormone und Signalmoleküle, wie Salizylsäure, Jasmonat oder Kalzium voraussetzt. In weiteren Studien, die in folgenden Kapiteln beschrieben sind, wurde eine Beteiligung dieser Signalmoleküle während der Interaktion von *Cuscuta* mit Tomate näher untersucht.

2.2. Signale während der *Cuscuta* - Wirt Interaktion

2.2.1. Jasmonat

Jasmonat (JA) ist ein wichtiges Phytohormon, das sofort nach Verwundung gebildet wird, und dann zusammen mit Salizylsäure eine so genannte „Systemic acquired resistance“ in der ganzen Pflanze hervorruft (Ryan and Moura, 2002; McConn et al., 1997). Da nach einer *Cuscuta*-Infektion der Tomate offensichtlich Parallelen zu einer Wundantwort vorliegen, wurde der Jasmonat-Gehalt von infizierten Tomaten bestimmt.

Anschließend folgten verschiedene Versuche mit Tomaten, die im Jasmonsäure-Signalweg eine Mutation aufwiesen, bzw. so gentechnisch manipuliert waren, dass ein konstitutiv stark verminderter oder erhöhter Jasmonat Gehalt in der Pflanze vorlag. Versuche an diesen Pflanzen sollten zeigen, ob Jasmonat für eine

erfolgreiche Abwehr essentiell und für die Resistenz der Tomate gegenüber *Cuscuta* verantwortlich ist.

2.2.1.1. Der Jasmonat-Gehalt steigt in der Tomate

Nachdem vier bis fünf Wochen alte Tomatenpflanzen mit *Cuscuta* umwickelt waren, wurde nach 0 (nicht infizierte Tomate) 12, 36 und 48 Stunden Gewebe von der Infektionsstelle isoliert und mittels GC-MS auf Jasmonat-Gehalt untersucht. Pro Zeitwert wurden je drei Tomatenpflanzen untersucht. Bereits 36 Stunden nach Anheften des Parasiten war ein deutlicher Anstieg des Jasmonsäure Gehalts zu beobachten (Abb. 2-6), die Tomate reagierte auf *Cuscuta*-Befall ähnlich wie auf die Attacke eines Fraßfeindes oder eine Verwundung mit einem JA-Anstieg.

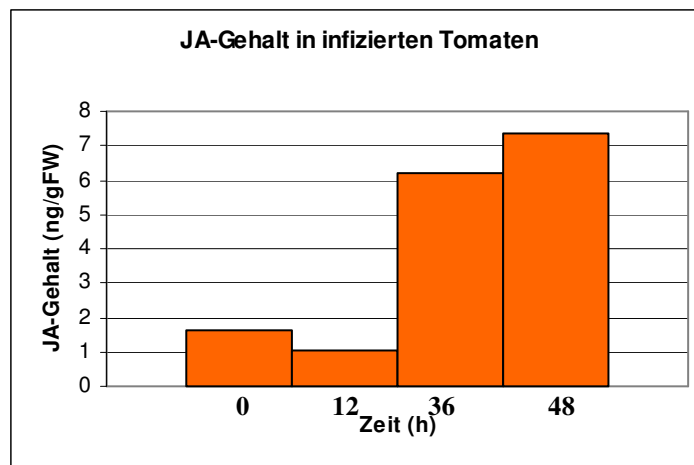


Abb. 2-1: Jasmonat-Gehalt in infizierten Tomatenpflanzen. Die Grafik zeigt einen deutlichen Anstieg (6- bis 7-fach) der Jasmonsäure (JA) in der Tomate 36 und 48 Stunden nach der Infektion mit *Cuscuta*.

2.2.1.2. Untersuchung verschiedener Tomatenmutanten

Es wurden verschiedene Tomatenmutanten mit *Cuscuta* infiziert und auf eine erfolgreiche Abwehrreaktion untersucht. Im Vordergrund standen hier zunächst solche Pflanzen, die eine Veränderung im Jasmonat Signaltransduktionsweg aufweisen. Die Tomaten sig1 und sig2 stellen solche Pflanzen dar (die Pflanzen wurden vom „Tomato Genetics Resource Center“ zur Verfügung gestellt). Sie besitzen eine unbekannte Mutation im JA-Signalweg, die sich phänotypisch in einem stärkeren Pathogenbefall äußert. Außerdem entfällt die Akkumulation von bestimmten Proteinase-Inhibitoren (PI), die oft als Marker für eine

Verwundungsreaktion oder „systemisch aktivierte Resistenz“ (SAR) dienen (Ryan, 1989). Nach Infektion dieser Pflanzen mit *Cuscuta* waren jedoch dieselben Abwehrreaktionen sichtbar, wie an Kontrollpflanzen.

Von Professor Claus Wasternack (IPB Halle) standen gentechnisch veränderte Tomatenpflanzen zur Verfügung, die einen konstitutiv erniedrigten bzw. erhöhten Jasmonat-Gehalt aufwiesen. In die Pflanzen mit erniedrigtem JA-Gehalt war eine cDNA-Sequenz der Allenoxyd-Cyclase, dem Schlüsselenzym der JA-Biosynthese, in Antisense Richtung eingebracht. In die Pflanzen mit erhöhtem JA-Gehalt war diese in richtiger Orientierung unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors zusätzlich in das Pflanzengenom integriert. Es zeigten auch diese Pflanzen keine Veränderung in der Abwehrreaktion auf *Cuscuta*-Befall. Sie reagierten in gleichem Maße mit einer typischen Hypersensitivitäts-Reaktion wie die Wildtyp-Pflanzen.

Neben Jasmonat spielt Salizylsäure (SA) ebenfalls eine zentrale Rolle bei der allgemeinen pflanzlichen Antwort auf Pathogenbefall (Shulaev et al., 1997). Von Sander van der Krol (Wageningen University, Wageningen) standen gentechnisch veränderte Tomatenpflanzen zur Verfügung, die mit der Salizylhydroxylase ein Enzym besaßen, das kontinuierlich SA abbaut und natürlicherweise nicht in Pflanzen vorkommt. Wird aus einem beliebigen Grund, z.B. Fraßfeinde oder Pathogenbefall, der SA-Gehalt in der Pflanze erhöht, dann wird das SA von der Salizylhydroxylase abgebaut und die folgende Signalkaskade mit erfolgreicher Abwehrreaktion verhindert (Gaffney et al., 1993). Jedoch zeigten auch diese Pflanzen nach der Anheftung von *Cuscuta* eine identische Abwehrreaktion wie Wildtyp-Tomaten.

Fazit der Untersuchungen an den Tomatenpflanzen mit gestörtem JA- und SA-Signaltransduktionsweg ist, dass sowohl JA als auch SA nicht an der Abwehrreaktion gegenüber *Cuscuta* beteiligt sind.

2.2.2. Kalzium

Kalzium stellt ein frühes sekundäres Signal bei verschiedenen Abwehr- und Stressreaktionen dar, wie z.B. nach Berührung, Kälteschock oder auch nach Reaktion auf Pathogenbefall (Braam and Davis, 1990). Um Ca^{2+} -Signale während der Interaktion von *Cuscuta* mit Wirtspflanzen zu untersuchen, wurden Tabak- und Tomatenpflanzen verwendet, die mit einem Gen für Aequorin transformiert waren.

Die Tabaksamen wurden von Petra Dietrich (Universität Würzburg) und die Tomatensamen von Sander van der Krol (Wageningen University, NL) zur Verfügung gestellt. Alle Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Sander van der Krol an der Wageningen University in Wageningen (NL) durchgeführt.

2.2.2.1. Kalzium-Signale nach *Cuscuta*-Befall in Tabak und Tomate

Mit Hilfe von transgenen Aequorin-exprimierenden Tabak- und Tomatenpflanzen konnte sowohl für den kompatiblen Wirt Tabak, als auch für die Tomate gezeigt werden, dass im Zeitraum von ca. 12 - 36 Stunden nach Beginn der Infektion Ca^{2+} -Signale für die Dauer von zwei bis sechs Stunden auftraten (Abb. 2-7 und 2-8). Bei diesem Experiment wurden Tomaten- und Tabakpflanzen mit dem für Aequorin benötigten Substrat Coelenterazin behandelt und mit *Cuscuta* umwickelt. Anschließend wurden die Pflanzen bei Dunkelheit mit einer hochempfindlichen ccd-Kamera gefilmt und die Biolumineszenz detektiert, die nur im Falle von Ca^{2+} -Signalen auftrat. Die Filme wurden für 24 oder 48 Stunden aufgenommen.

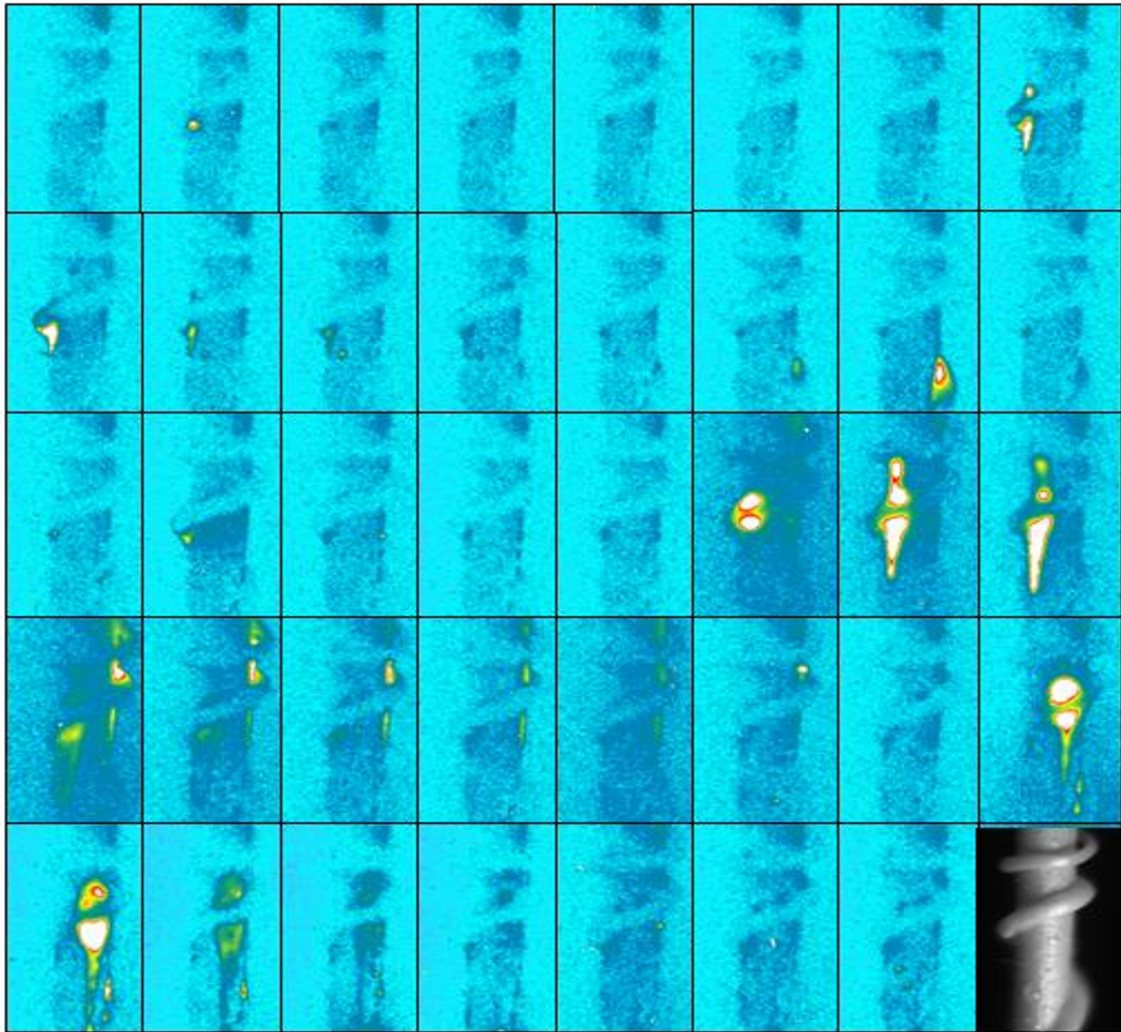


Abb. 2-7: Ca^{2+} -Signale in Tabak. Rechts unten: Hellfeldaufnahme einer mit *Cuscuta* infizierten Aequorin-Tabakpflanze. Die anderen Aufnahmen zeigen den analogen Bildausschnitt Pflanze 30 - 36 h nach Infektionsbeginn (eine Aufnahme entsprechen 10 min Belichtung); deutliche Ca^{2+} -Signale sind für die Dauer von ca. 6 Stunden zu erkennen (Darstellung in Falschfarben).

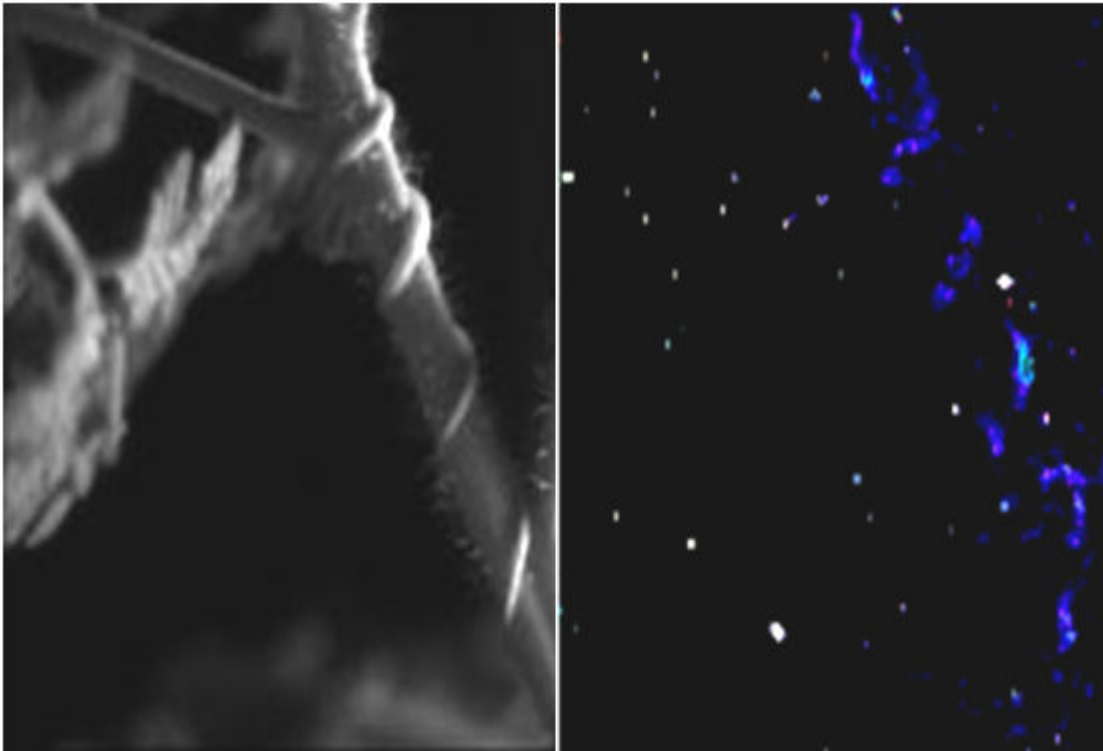


Abb. 2-8: Ca^{2+} -Signale in Tomate. links: Hellfeldaufnahme einer mit *Cuscuta* infizierten Aequorin-Tomatenpflanze. Rechts: analoger Bildausschnitt. Hier traten bereits 22 h nach Infektionsbeginn deutliche Ca^{2+} -Signale auf (Darstellung in Falschfarben).

Die Ca^{2+} -Signale traten sehr deutlich an den Stellen der Wirtspflanzen auf, an denen die parasitischen Haustorien versuchten in das Gewebe einzudringen. Oft waren mehrere Signale über Stunden verteilt zu beobachten (siehe Abb. 2-8). Die Signale waren sowohl am inkompatiblen Wirt Tomate als auch am kompatiblen Wirt Tabak zu beobachten.

2.2.2.2. Identifikation möglicher Auslöser für Kalzium-Signale

Bei Untersuchungen an Blattscheiben von Aequorin-exprimierenden Tomatenpflanzen konnte gezeigt werden, dass wahrscheinlich Proteine des Parasiten *Cuscuta* für diese Signale verantwortlich sind.

Es wurden Blattscheiben von Aequorin-Tomatenpflanzen und mit verschiedenen Extrakten aus *Cuscuta* behandelt: Spross, Haustoriumgewebe, gekochtes Haustoriumgewebe, apoplastische lösliche Bestandteile von Haustorien, sowie Extrakt aus Tomatenblättern als Kontrolle.

Aequorin-Lumineszenz ausgelöst durch Ca^{2+} -Signale trat nur nach Behandlung mit Proteinextrakten aus *Cuscuta*-Haustorien auf. Extrakte aus anderen Pflanzen oder vorher gekochte Proben lösten keine Ca^{2+} -Signale aus (Abb. 2-9).

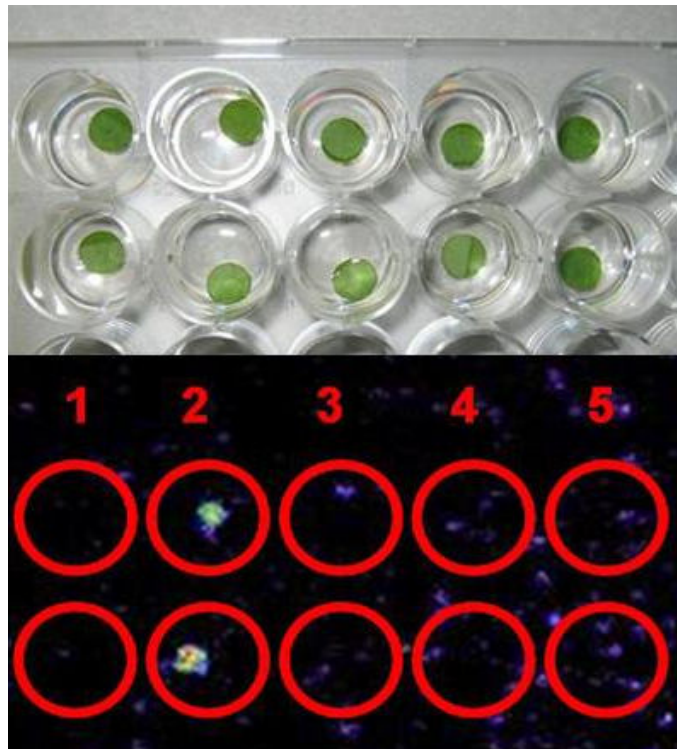


Abb. 2-9: Identifikation Ca^{2+} -Signal auslösender Substanzen. 2 x 5 Blattscheiben von Aequorin-Tomate wurden in einer „24 Well Platte“ (einzelne Vertiefungen in rot angedeutet) mit fünf verschiedenen Extrakten behandelt und die Ca^{2+} -Signale bei Dunkelheit für die Dauer von 2 h mittels einer CCD-Kamera aufgenommen. Oben: Hellfeldaufnahme. Unten: In Reihe 1: Tomaten-Blattscheiben (TB) + *Cuscuta*-Extrakt ohne Haustorien; Reihe 2 TB + *Cuscuta*-Extrakt von Haustorien; TB + *Cuscuta*-Extrakt von Haustorien 10 min abgekocht; Reihe 4: *Cuscuta*-Extrakt von Haustorien, nur lösliche Komponenten; Reihe 5: Extrakt aus Tomate (Kontrolle). Nur der nicht hitzebehandelte *Cuscuta*-Extrakt aus Haustorien ergibt ein deutliches Signal in der Tomate.

2.2.3. Diskussion

Die Ergebnisse der Versuche mit Tomatenpflanzen mit verändertem JA- bzw. SA-Gehalt zeigen, dass für Pflanzen übliche Signalwege zur unspezifischen Pathogenabwehr im Falle der Abwehrreaktion von Tomate gegen *Cuscuta* keine Rolle spielen. Auch die Tomatenmutanten sig1 und sig2 (Mutation im „JA-Signaling-Pathway“), die eine Störung im Signalweg der unspezifischen durch JA induzierten Wundabwehr haben, reagieren mit einer unveränderten Hypersensitivitäts-Reaktion. Es deutet alles auf einen sehr spezifischen Abwehrmechanismus der Tomate hin. Möglicherweise liegt eine Art Gen-für-Gen Interaktion vor, wie im Beispiel der Interaktion von Tomate mit dem pathogenen Pilz *Cladosporium fulvum* (Higgins et al., 1998; Joosten et al., 1994). Bei einem Befall der Tomate durch *C. fulvum* gibt der Pilz AVR-Proteine (Avirulenz-Proteine) ab, die spezifisch von Rezeptorproteinen der Tomate erkannt werden. Bei diesen

Rezeptoren handelt es sich um Proteine mit Leucin-reichen Wiederholungssequenzen (Kruijt et al., 2005). Sie werden von den Cf-Genen (Resistenzgen gegen *C. fulvum*) kodiert. Das AVR-Protein des Pathogens bindet nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip an den Rezeptor der Tomate und löst eine Abwehrreaktion aus, die sich genau wie bei der Abwehr gegen *Cuscuta* in einer Hypersensitivitäts-Reaktion äußert. Der Induktor muss nicht zwangsläufig ein Protein sein, auch andere Moleküle wie Zellwandfragmente, Lipidmoleküle oder Sekundärstoffe wären als spezifische Reizauslöser denkbar.

Nur nach Zugabe von ungekochtem *Cuscuta*-Haustorien-Extrakt wurden Kalzium-Signale in transgenen Aequorin-Tomaten ausgelöst. Ein Auslösen von Signalen durch Zellwandfragmente scheidet aus, da Kontrollextrakte aus der Tomate keine Signale hervorrief. Folglich ist es sehr wahrscheinlich, dass Proteine aus *Cuscuta* die Ca^{2+} -Signale in den Wirtspflanzen verursachen. Allgemein ist bekannt, dass Kalzium-Signale bei spezifischen Resistenzreaktionen vorkommen und wohl auch eine essentielle Rolle spielen (Chandra S, 1998; Chrispeels et al., 1999). Die Rolle von Kalzium während der Interaktion von *Cuscuta* mit Wirtspflanzen ist jedoch noch unklar, weil diese nicht nur in der inkompatiblen Wirtspflanze Tomate auftreten, sondern auch im inkompatiblen Wirt Tabak, und muss nicht zwangsläufig mit einer Abwehrreaktion in Zusammenhang gebracht werden. Im Rahmen anderer Experimente wurde in Tabak nach *Cuscuta*-Befall ein Elicitor-Response-Protein gefunden (eigene Versuche), was ein Hinweis auf eine spezifische Reaktion von Tabak auf *Cuscuta* sein kann, auch wenn eine Abwehrreaktion ausbleibt. Das Auffinden des oder der Auslöser von Ca^{2+} -Signalen würde einen wichtigen Anhaltspunkt zum Mechanismus der Resistenz bzw. der Interaktion erbringen, und soll deshalb weiter untersucht werden.

2.3. Charakterisierung eines Arabinogalactan Proteins

Molekularbiologische Untersuchungen zur Interaktion von *Cuscuta* mit Tomate standen im Vordergrund dieser Arbeit. Diese molekularbiologischen Analysen begannen bereits während früherer Vorarbeiten mit dem Auffinden an der Interaktion beteiligter Gene aus der Tomate (Werner, 2001; Albert, 2002). Es konnte eine cDNA-Sequenz identifiziert werden, die für ein Arabinogalactan Protein (AGP) codiert. Diese Sequenz, bzw. das Protein wurde im Rahmen der Doktorarbeit näher charakterisiert, und seine Rolle in der Tomate während der Interaktion mit *Cuscuta* näher erforscht.

2.3.1. Frühere Vorarbeiten

Im Rahmen der Doktorarbeit von Monika Werner (Werner, 2001) wurde eine subtrahierte cDNA-Bibliothek hergestellt, die 300 cDNA-Klone lieferte. Diese stellten Kandidaten für Gene dar, die nach *Cuscuta*-Befall in der Tomate induziert wurden. Einige dieser Klone wurden sequenziert, weiter untersucht und charakterisiert. Außerdem wurden im Rahmen der eigenen Diplomarbeit (Albert, 2002) alle 300 cDNA-Klone mit Hilfe einer Microarray-Technik differentiell nach cDNAs durchmustert, deren Gene in der Tomate nach *Cuscuta*-Befall induziert waren. Zwölf spezifisch induzierte cDNA-Klone konnten ermittelt werden. Eine dieser Sequenzen kodierte für ein Arabinogalactan Protein (AGP). Dieses AGP wird in den folgenden Kapiteln näher beschrieben und attAGP (att: attachment) genannt.

2.3.2. *In silico* Untersuchungen der attAGP-Sequenz

Die komplette cDNA des attAGPs (Abb. 2-10) wurde auf der Internetseite von NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) mit schon bekannten DNA-Sequenzen in Datenbanken verglichen, allerdings war in keiner Datenbank eine ähnliche DNA-Sequenz vorhanden.

AAAAGACAACCTTCGTGTGTGCACTCTATTCAAAAATTCTCTCAAAAAAACATCCTAAGAGAG
 TCATCAATAATC**ATG**GCTCTCTCACATCCTATGACAATTTTCTCTCTTTTTTCTTACATTTTTAGCC
 CTCACTGCTGCCAATCCCCATGATGGCCCAACAATGCCACCATCCACCATGTCAATGCCA
 CCAACTACTTCCACCACCCTCCTCCACCAATGTCCTCCATGTCACCGCCACCATCCGCCATG
 TCACCAACACCATCCACCATGTACCTCCTCCAATGAGCCCAATGACACCATCCATGAGCCCA
 ATGGGCCCAATGACGCCAACCATGAGCCCAATGGACTCACCACCGGCCCGCAGGCCCTG
 GAATGGCCCCTGGTATGAGTACTCCAGGGCCTGCACCCGGACCTATGGGTGGTGAGTCAATG
 GCTTCTCCACCTCCATCTAGTGGATTTGTTTCATGGAATTAGCATCAGCATGGCTATGGTAGCA
 ATTATTGGAAGTGTAGCACTTTTTTTCT**TAA**AAATTTGAATTTGTGTCATTTTATTTAATTTGCTTT
 CCCTATTGTTGTAGATTACAAATAATTTACTTTTTATTTGTTGTACTATTTTACTTCCAATTTCTTCT
 ATTGTTCTTTTTTTTTTTTTTACTCTCTTATTTTTGTCTCATTGTATTGTTGATTTTGCCTGGGAGG
 ATGAGGAATTTGAAGAGGTCTGATTGGAGATTTTATCAAATGTTACATTCTCTATATGTAACATT
 TTCACACTTTTTAGCTAA

Abb. 2-10: cDNA-Sequenz von attAGP. Das Start-ATG des offenen Leserasters, sowie das Stop Codon TAA sind fett geschrieben und unterstrichen.

Die cDNA-Sequenz wurde *in silico* translatiert (Abb. 2-11a) und ein Hydrophathie-Plot der Aminosäure-Sequenz erstellt (Abb. 2-11b). Dieser Hydrophathie-Plot, sowie die AS-Sequenz von attAGP sind sehr charakteristisch für Arabinogalactan Proteine. attAGP besitzt zwei transmembrane hydrophobe Helices am C- sowie am N-Terminus, die einen stark hydrophilen Bereich einschließen. Die Sequenz am N-Terminus lenkt das AGP mit einer Wahrscheinlichkeit von 99 % aus der Zelle ins Plasmalemma, sie dient als zelluläre Zielsteuerungs-Sequenz für das Protein. Der hohe Anteil von Prolin (23,7% der gesamten Aminosäuren), das in AGPs häufig zu Hydroxy-Prolin modifiziert wird (Showalter, 2001), sowie viel Serin (17,1%) und Threonin (10,5%) innerhalb der Sequenz von attAGP sind typisch für die Klasse der AGPs. Diese Aminosäuren besitzen freie OH-Gruppen, an die lange Zuckerketten aus Arabinose und Galactose angehängt werden. Untypisch für AGPs im Allgemeinen, und deshalb auch für attAGP charakteristisch, ist der hohe Anteil von Methionin (15,8%) in der hydrophilen Region.

In der Literatur ist beschrieben, dass einige AGPs einen Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol Anker (GPI-Anker) besitzen (Oxley and Bacic, 1999; Sherrier et al., 1999; Svetek et al., 1999; Youl et al., 1998). Deshalb wurde im Internet (www.cbs.dtu.dk) nachgeprüft, ob das hier beschriebene attAGP auch eine potentielle Stelle zur Anheftung eines GPI-Ankers besitzt. An der AS-Position 128 - 130 (SSG) befindet sich eine Anheftungssequenz für einen GPI-Anker.

Die *in silico* Untersuchungen bestätigen die in der Literatur beschriebenen Eigenheiten von AGPs: Sie sind in der Plasmamembran verankert, besitzen einen GPI-Anker und ragen mit dem hydrophilen glycosylierten Bereich in die Zellwand.

MALSHPMTIFSLFLTLFLALTAQAQSPMMAPTMPSTMSMPPTTSTTTTP
 PPMSSMSPPPSAMSPTPSTMSPPPMSPMTPSMSPMGPMPTPTMSPM
 DSPAPAGPGMAPGMSTPGPAPGPMGGESMASPPPSSSGFVHGISI
 SMAMVAIIGSVLFF **Stop**

Abb. 2-11a: Aminosäure Sequenz von attAGP. Die putative GPI-Anker-Anheftungsstelle (SSG) ist fett dargestellt. Charakteristisch für AGPs ist der hohe Anteil an Prolin, Serin und Threonin. Außergewöhnlich für attAGP im Gegensatz zu anderen AGPs ist sein hoher Anteil an Methionin.

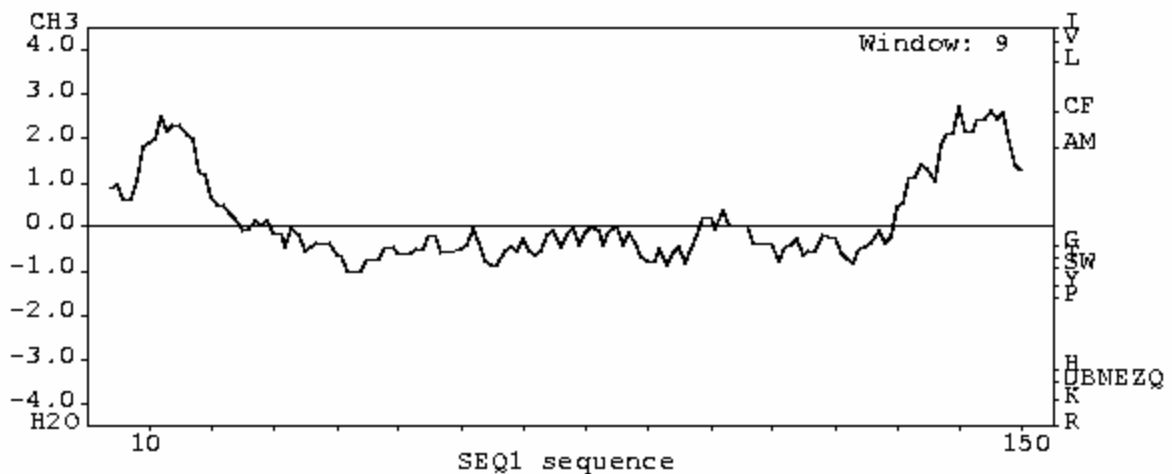


Abb. 2-11b: Hydropathie Plot der AS-Sequenz von attAGP. Typisch sind die hydrophobe N-terminale Domäne, die als Zielsequenz zur Lokalisation in der Plasmamembran dient, sowie die C-terminale hydrophobe transmembrane Domäne und der dazwischen liegende hydrophile Bereich.

2.3.3. Zelluläre Lokalisation des attAGPs

Die N-terminale Zielsequenz des AGPs steuert das Protein mit einer Wahrscheinlichkeit von 99 % zur Plasmamembran. Dieser theoretische Befund sollte experimentell bestätigt werden.

Hierzu wurde das offene Leseraster der attAGP cDNA-Sequenz am 3'-Ende mit einer cDNA für mGFP4 fusioniert. Die fusionierte, chimäre cDNA wurde unter die Kontrolle von zwei konstitutiven CaMV35S Promotoren gebracht (Vektor pPILY), und das ganze Konstrukt transient per Goldpartikel-Beschuss in die Zellen der Zwiebelchuppenepidermis transformiert. Nach zwei bis drei Tagen konnte unter dem confokalen Laser Scannign Mikroskop (CLSM) das Fusionsprotein aus attAGP und mGFP4 in transformierten Zellen lokalisiert werden (Abb. 2-12). Das

Bild zeigt, dass attAGP eindeutig in der Plasmamembran bzw. der Zellwand lokalisiert ist.

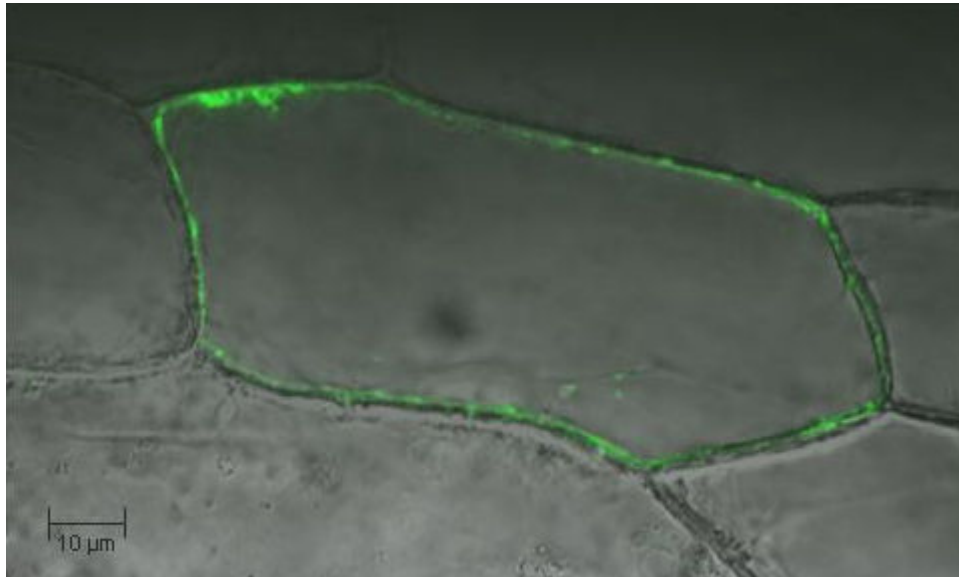


Abb. 2-12: Mikroskopischer Ausschnitt einer transformierten Zwiebelzelle. Ein attAGP-mGFP4-cDNA-Konstrukt wurde transient in Zellen der Zwiebelschuppen-Epidermis transformiert und das attAGP-GFP-Fusionsprotein unter dem CLSM beobachtet. Das attAGP ist in der Plasmamembran lokalisiert.

Neben der Zwiebelschuppe wurden auch Blätter der Tomate mit obigem Konstrukt transformiert, allerdings war es aufgrund der extrem hohen Hintergrundfluoreszenz des Chlorophylls in den Tomatenblättern nicht möglich die GFP-Fluoreszenz zu erkennen. Ein Abziehen der Epidermis war wegen anatomischer Eigenheiten der Tomatenblätter ebenfalls nicht möglich. Auch Sprosssteile von *Cuscuta* wurden mit dem Konstrukt transformiert. In den Zellen von *Cuscuta* ist das attAGP-mGFP4 Protein ebenso in der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 2-13), genau wie in Zellen der Zwiebelschuppenepidermis.

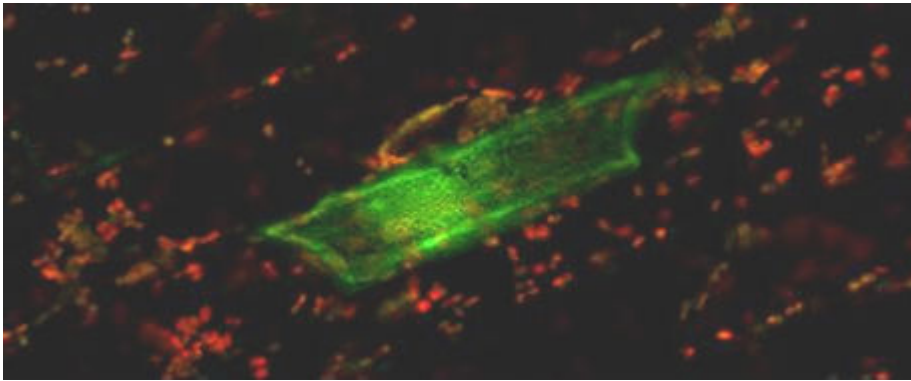


Abb. 2-13: GFP-Fluoreszenz in *Cuscuta*. Das attAGP-mGFP4-Konstrukt wurde auch in *Cuscuta* transformiert. Die CLSM Aufnahme zeigt, dass auch hier das Fusionsprotein in der Plasmamembran lokalisiert ist.

2.3.4. attAGP ist nach *Cuscuta*-Angriff in der Tomate induziert

Eine Induktion der attAGP-Genexpression an der Infektionsstelle wurde mit Hilfe von Northernblots überprüft. Dafür wurden Tomatenpflanzen mit *Cuscuta* infiziert, und 1 d, 3 d und 6 d nach Infektion Gewebeproben entnommen und Gesamt-RNA isoliert. Als Kontrolle diente RNA aus nicht infizierten Tomaten. Die Blots wurden mit einer spezifischen cDNA-Sonde für die attAGP-mRNA hybridisiert, und die Signale mittels Chemilumineszenz detektiert.

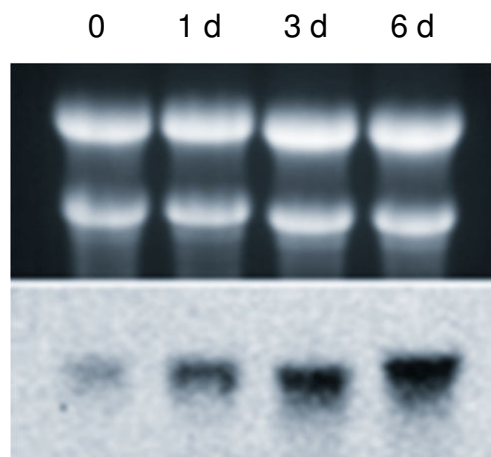


Abb. 2-14: Northernblot. Tomatenpflanzen wurden am Spross mit *Cuscuta* infiziert und (von links) 0 (= Kontrolle), 1d, 3d und 6d nach Infektion RNA isoliert, geblottet und mit einer spezifischen attAGP-cDNA-Sonde hybridisiert (Unten). Oben: Agarosegel; Die Ethidiumbromid-Fluoreszenz der Proben zeigt einen gleichmäßigen Mengenabgleich der geblotteten RNA.

Die Ergebnisse des Northernblots (Abb. 2-14) zeigten, dass die attAGP-mRNA bereits nach 24 Stunden an der Infektionsstelle in der Tomate vorhanden ist. Das attAGP-Gen ist somit nach dem Ansetzen des Parasiten aktiv.

2.3.5. Lokalisation der Genexpression

Um die gewebespezifische Genexpression von attAGP zu untersuchen, wurde der Promotor kloniert und mit dem Reporter gen für Glucuronidase (GUS) gekoppelt. Dieses Konstrukt wurde stabil in Tomatenpflanzen transformiert und nach *Cuscuta*-Infektion dieser Pflanzen die Aktivität der Glucuronidase überprüft.

2.3.5.1. Klonierung des attAGP-Promotors

Der attAGP-Promotor wurde aus dem Genom der Tomate isoliert. Die Länge des genomischen DNA-Fragments betrug in etwa 850 bp (Abb. 2-15).

```

ACTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCGGGCTGGTATTGTATTGTGGAGACATGCCATAATT
CCATCATGGATGATGCTATCAAATTCATATGGTAGAATTTGTTCTCATGTAAATATTCTATTTG
GATCATATATGCTCCAATTAATGGTCTAGTGAAAACCTCATGAGCTCCTCAACCACTTATTTGCC
CAGTCTTGGGACCCATATATATATATATTACATGCAAACCCTTGATTTTTTTGAATTGCATAG
CTATATTATGATAAATGTACCTAGGGTAATAATCCTATCGTTTCATTAATTTATGTGACACTTTTT
CTTTAAGTATCTTTCAAAGAATGTCAACTTTCTATAATAAAATTTAGATTAGTTTTTTTTAATTG
AAATATATAATTTTTAATTACACAAATATCAAACACTTATTCAATGGGGTCAATTGACATTCCTAT
CAATTATCATCCATGAAAAATTGTATATATTATATAGACAAGTCAAAGAATACTATACATTGGA
TTTTCTCGATATTGTAGACGTGTATTTTTATATTTTGATTCTTGTTAGTAAAATTTTAATTCGT
CTTTAAACTAAAGATGTAGTAAAATTGTAGAATTCCTCGACCCCTAAGCAAGACTCTCGAATTCA
AGTCTTGAAAAGTGAACAACCTCTCAATAAGAAGCGCATTAGTTATTGACTTTTTTAATGAAGCT
GCTCGATATGAATCTGAATTAATCGGACCGACTAAATCCAATTATAAGATGCCTCAAGGGAAG
AAAAAATCAAGTCTTTCTACTATACCTTGCTATATATCAGCATAGTCTCAAACCTTTACAATA
CCTACAGAATACAACTTCCTCAAAGACAACCTTCGTGTGTGCACTCTATTCAAAAATTCTC
TCAAAAAAACATCCTAAGAGAGTCATCAATAATCATGGCTCTCTCACATCCTATGACAATT
TTCTCTCTTTTTCTTACATTTTTAGCCCTCACTGCTGCCCAATCC

```

Abb. 2-15: Die genomische DNA-Sequenz des attAGP-Promotors (Länge 850 bp). Außerdem in Fett dargestellt der Start der cDNA (150 bp), sowie der Anfang des offenen Leserasters (kursiv, Start-ATG unterstrichen).

Diese Sequenz wurde mit online verfügbaren Computerprogrammen (Signal Scan; www.dna.affrc.go.jp/sigscan) genauer nach Sequenzabschnitten untersucht, die für eine spezifische Beteiligung von attAGP an der aktiven Abwehrreaktion der Tomate sprechen. Diese Analysen zeigten, dass innerhalb der Promotor-Sequenz eine Reihe regulatorischer Elemente vorhanden sind, die für eine Regulation durch Phytohormone wie Salizylsäure, Auxin, Gibberelin oder ABA sprechen. Daneben waren zahlreiche Elemente für eine lichtabhängige oder circadiane Regulation des attAGP-Gens vorhanden. Auch Elemente, die während einer Reaktion auf Elicitoren aus anderen Organismen aktiv sein können, so genannte „Elicitor Response Elements“ (ERE), waren im Promotor von attAGP zu finden. Dies kann auf eine spezifische Induktion der attAGP-Genexpression durch reizauslösende Substanzen aus *Cuscuta* hindeuten.

2.3.5.2. Der attAGP-Promotor ist direkt an der Infektionsstelle aktiv

Die 850 bp Promotor-Sequenz wurde in einem geeigneten Vektor (pGPTV-Kan) vor das Reporter-gen Glucuronidase kloniert, und das Konstrukt stabil in Tomatenpflanzen transformiert. Wird der native Promotor in der Pflanze aktiviert, z.B. durch *Cuscuta*-Infektion oder ein Phytohormon-Signal, so liegt in den entsprechend reagierenden Zellen das GUS-Protein vor. Diese Zellen können durch Blaufärbung im Gewebe nachgewiesen werden. Der attAGP-Promotor ist in der Tomate direkt an den Kontaktstellen der *Cuscuta*-Haustorien mit dem Tomatenspross aktiv, wie eine deutliche Blaufärbung zwei Tage nach *Cuscuta*-Infektion zu erkennen gibt (Abb. 2-16a und b).

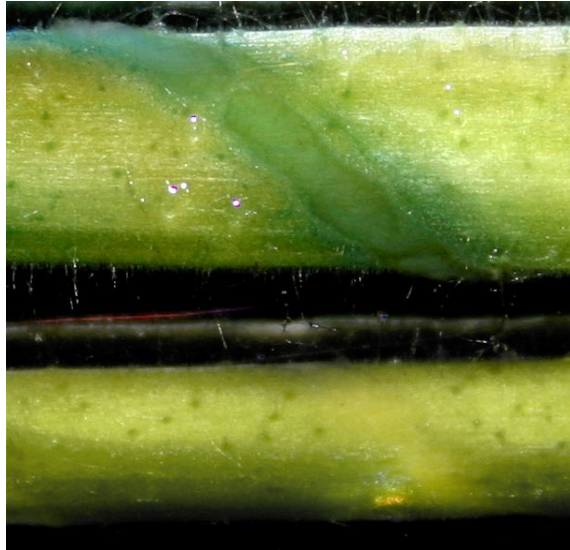


Abb. 2-16a: Nachweis der Aktivität des attAGP-Promotors mittels GUS als Reportergen. Der attAGP-Promotor ist sehr spezifisch nur an der Kontaktstelle des Parasiten in der Tomate aktiv. Oben: GUS-Aktivität drei Tage nach Ansetzen des Parasiten. Unten: (Kontrolle) WT-Tomate zeigt drei Tage nach Anheftung des Parasiten keine Blaufärbung.

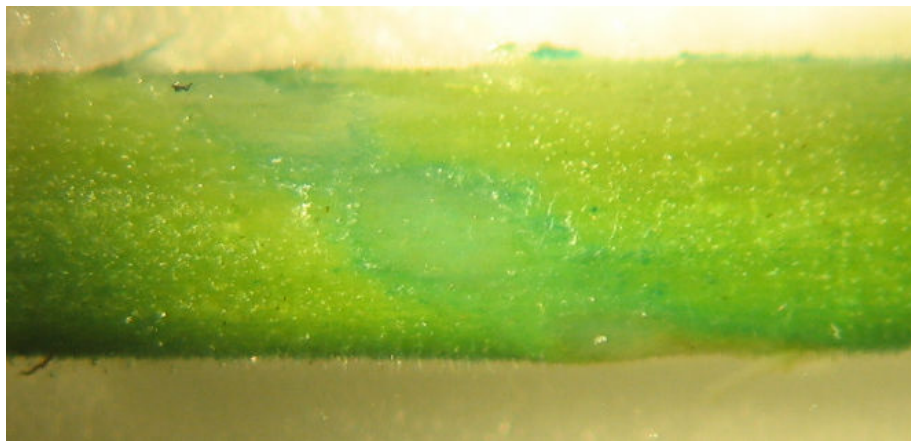


Abb. 2-16b: GUS-Aktivität nach Induktion des attAGP-Promotors direkt an der Stelle an der *Cuscuta*-Haustorien versuchen in die Tomate einzudringen.

2.3.6. Funktionsanalyse von attAGP

Zur Funktionsanalyse wurde attAGP in der Tomatenpflanze ausgeschaltet. Dies geschah auf zwei verschiedene Weisen. Zum einen wurde der mRNA-Gehalt von attAGP dauerhaft mittels RNAi-Technik in der Tomate vermindert, zum anderen wurde eine neue Technik, das „Virus induzierte Gen Silencing“ (VIGS), zur transienten Verringerung der attAGP-mRNA herangezogen. Die manipulierten Tomatenpflanzen wurden mit *Cuscuta* infiziert und hinsichtlich ihrer Reaktion auf *Cuscuta*-Befall untersucht. Die Abwehrreaktion der Tomate (HR-Reaktion) verhielt sich genau wie in unbehandelten Wildtyp-Tomatenpflanzen. Allerdings konnte mit Hilfe eines geeigneten Tests zur Bestimmung der *Cuscuta*-Anheftungskraft

gezeigt werden, dass attAGP maßgeblich am Anheftungsprozess des Parasiten beteiligt ist.

2.3.6.1. Herabsetzen des attAGP-mRNA-Gehaltes mit Hilfe der RNAi-Technik

Es wurden zwei verschiedene RNAi-Konstrukte für das attAGP hergestellt, die im Folgenden RNAiA und RNAiB genannt werden (Abb. 2-17). Das RNAiA-Konstrukt ist ca. 200 bp lang und beinhaltet noch 70 bp der 5'-UTR, es sollte ganz spezifisch nur attAGP ausschalten. RNAiB ist 275 bp lang und sollte möglichst verwandte AGPs mit ausschalten. Es wurde deshalb ein Sequenzbereich gewählt, der den hydrophilen Bereich von attAGP beinhaltet. Dieser Abschnitt ist für AGPs im Allgemeinen charakteristisch.

Es wurden pro Konstrukt ca. 70 Kotyledonen-Teile transformiert und auf Selektionsmedium kultiviert. Für Konstrukt RNAiA konnten neun und für Konstrukt RNAiB vier unabhängige Transformationslinien regeneriert werden. Diese wurden auf ihre Funktion des RNAi-Konstruktes mit Hilfe von Northernblots getestet (Mithilfe von Frauke May) (Abb. 2-17).

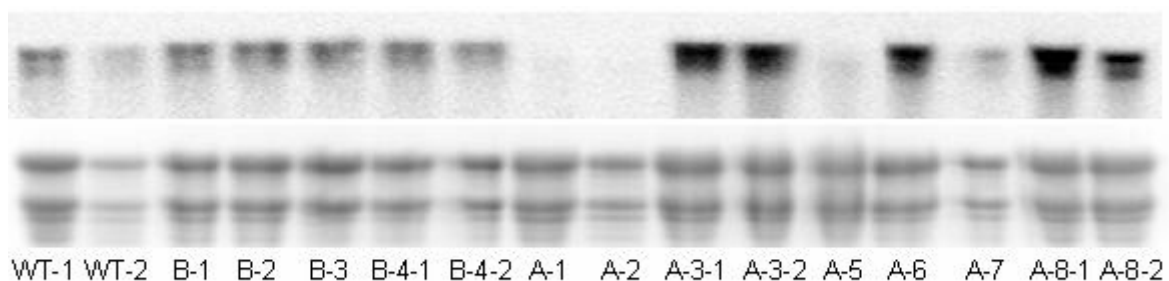


Abb. 2-17: Northernblot der RNAiA- und RNAiB-Tomatenpflanzen. Oben: Hybridisierter Blot. Unten: Abgleichel. Nur die Linien RNAiA-1, RNAiA-2 und RNAiA-5 zeigten einen RNAi-Effekt. Die anderen Linien zeigten einen dem WT vergleichbaren mRNA-Gehalt. Der Northernblot wurde mit einer einzelsträngigen antisense Sonde für attAGP hybridisiert. WT = Wildtyp-Tomaten, B = RNAiB-Linien, A: RNAiA-Linien.

In drei Linien (RNAiA-1, -2, und 5) der transformierten Tomatenpflanzen fand ein erfolgreiches „Post Transkriptionelles Gen Silencing“ (PTGS) von attAGP statt. In RNAiB-Linien war der Effekt in keiner Linie zu beobachten. Außerdem überlebten nur vier Linien der mit RNAiB-Konstrukten transformierten Pflanzen. Das RNAiB-Konstrukt rief aller Wahrscheinlichkeit nach einen letalen Effekt in der Tomate hervor.

Das spezifischere RNAiA-Konstrukt schaltete offensichtlich nur attAGP aus. Hier wurde attAGP in drei (von neun) unabhängigen Tomaten-Linien erfolgreich ausgeschaltet. Für alle weiteren Versuche wurden Nachkommen dieser Linien (RNAiA-1, RNAiA-2 und RNAiA-5) verwendet, wobei eine erfolgreiche Nachzucht der transformierten RNAiA-Pflanzen aus Samen dieser Linien erfolglos verlief.

2.3.6.2. „Silencing“ des attAGP-mRNA-Gehaltes mittels VIGS

Alle für die VIGS-Technik („Virus induced gene silencing“) essentiellen Vektoren wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Dinesh-Kumar entwickelt und von ihm zur Verfügung gestellt. Die Technik ist in Veröffentlichungen von Liu et al. (Liu et al., 2002a; Liu et al., 2002b) beschrieben.

Der VIGS-Technik liegen zwei binäre Vektoren zu Grunde, die Elemente des Ti-Plasmids aus *Agrobacterium tumefaciens*, sowie Gene des Tabak Rauten Virus (TRV) enthalten (vgl. Kap. 3.10.2.). Der Vektor pTRV2 dient hierbei als Zielvektor für eine beliebige cDNA-Sequenz, in diesem Fall die Sequenz RNAiA des attAGPs. Ein zweites Plasmid, pTRV1, dient als „Helferplasmid“ (siehe Kap. 3.10.2., Material und Methoden). Beide Konstrukte wurden in Agrobakterien transformiert, und ein 1:1 Gemisch beider Klone wurde auf vier Wochen alte Tomatenpflanzen aufgesprüht. Kontrollpflanzen wurden identisch, allerdings mit leerem pTRV2-Vektor behandelt (anstelle des attAGP-VIGS-Konstruktes). Nach ca. zehn Tagen kam es zu einem systemischen „knock down“ von attAGP in den Tomaten. Der Zeitpunkt des systemischen „silencing Effekts“ wurde in einem parallel durchgeführten Experiment ermittelt. Mit Hilfe der VIGS-Technik wurde der mRNA-Gehalt einer Phytoen-Desaturase (PDS) beobachtet. Bei erfolgreichem Ausschalten der PDS trat nach zehn Tagen ein gut sichtbarer Bleicheffekt in den Tomaten auf (Mithilfe von Elisabeth Kruse und Marlies Heckwolf) (Abb. 2-18).



Abb. 2-18: Bleicheffekt nach VIGS der PDS (Phytoen-Desaturase) in der Tomate. Rechts: Der Bleicheffekt in Tomatenpflanzen, deren PDS durch VIGS transient ausgeschaltet wurde. Links: Kontrollpflanze, die nur mit leerem Vektor pTRV2 besprüht wurde, der Bleicheffekt bleibt aus. Das Experiment diente als Kontrolle für das Ausbreitungsverhalten des VIGS.

Da nach Behandlung von Tomaten mit dem PDS-Konstrukt nach ca. zehn Tagen ein systemischer „knock down“ Effekt zu beobachten war, wurden die mit dem attAGP-VIGS-Konstrukt behandelten Pflanzen zu diesem Zeitpunkt (zehn Tage nach dem Besprühen) mit *Cuscuta* infiziert, und nach sechs Tagen auf Veränderung in ihrem Abwehrverhalten untersucht. Nachdem die HR-Reaktion analog der Kontrollpflanzen verlief, wurden Versuche durchgeführt, die ein eventuell anders verlaufendes Anheftungsverhalten des Parasiten an der Tomate bestätigen sollten (vgl. folgendes Kapitel 2.3.6.3.).

Unmittelbar nach dem Messen der Anheftungskraft wurde den Tomatenpflanzen direkt an der gemessenen Infektionsstelle Gewebe entnommen, aus diesem RNA isoliert und per RT-PCR in Erststrang-cDNA überschrieben. Diese cDNA diente dann als Ausgangsmaterial für einen semiquantitativen PCR Nachweis des nativen attAGP-mRNA-Gehaltes an der Infektionsstelle. Als Standard diente ein Primerpaar für Aktin (ähnlich dem Tom51-Aktin aus *Solanum lycopersicon*). Nach der PCR wurden die Proben für jede Pflanze in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt (Abb. 2-19). Mit geeigneter Software wurde die Ethidiumbromid-Fluoreszenz jeder Bande quantifiziert und das Verhältnis der Intensitäten von attAGP-Bande zur Intensität der Aktin-Bande berechnet. Die berechneten Werte lagen zwischen null und sechs und waren je nach attAGP-mRNA-Gehalt unterschiedlich hoch, wobei die Zahlen mit dem attAGP-mRNA-Gehalt anstiegen. Für Pflanzen, in denen das VIGS sehr gut funktionierte, wurde auf diese Weise ein niedriger Wert errechnet. Für mit *Cuscuta* infizierte Kontrollpflanzen, z.B. die Pflanze k8 in Abb. 2-20, wurden sehr hohe Werte errechnet, da in diesen Pflanzen

kein VIGS des attAGPs stattfand, aber die attAGP-Genexpression durch *Cuscuta* induziert war. Kontrollpflanzen, die nicht mit *Cuscuta* infiziert wurden, zeigten kaum attAGP-Genexpression, was in einem kleinen Zahlenwert deutlich wurde. Die Zahlen geben also ein Maß für den relativen attAGP-mRNA-Gehalt direkt an den Infektionsstellen der Tomate.

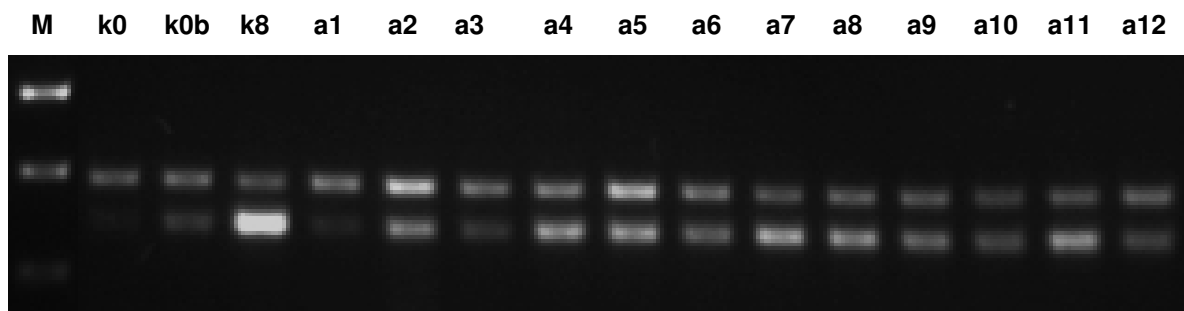


Abb. 2-19: Semiquantitativer RT-PCR Test zum Nachweis des „Silencing“ Effektes von attAGP in VIGS behandelten Tomatenpflanzen. Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel mit den cDNA-Banden des Aktin-Fragmentes (obere Bande) als internen Standard und attAGP (untere Bande). Von links: M: DNA-Marker (von oben 800, 500, 200 bp Fragmente zu sehen); k0: nicht besprühte, nicht mit *Cuscuta* infizierte Tomate; k0b: mit leerem pTRV1/2 besprühte, nicht mit *Cuscuta* infizierte Tomate; k8: mit leerem pTRV1/2 besprühte, mit *Cuscuta* infizierte Tomate; a1-12: attAGP-VIGS behandelte Tomatenpflanzen. Der „knock down“ Effekt ist in jeder Pflanze unterschiedlich ausgeprägt.

2.3.6.3. Bestimmen der Anheftungskraft von *Cuscuta* an der Tomate

Mit VIGS behandelte Tomatenpflanzen wurden vor dem Überprüfen auf den attAGP-mRNA-Gehalt mit *Cuscuta* infiziert und sechs Tage nach Infektion die Anheftungskraft des Parasiten mit einer Federwaage (0 – 1,2 N) bestimmt. Zum Vergleich dienten Kontrollpflanzen, die mit leerem VIGS Vektor besprüht wurden. Zur Bestimmung der Anheftungskraft wurde die Federwaage mit ihrem vorderen Ende zwischen zwei Ansatzstellen von Haustorien eingehakt und anschließend daran gezogen (siehe Kap. 3.10.3.). Die aufgewendete Zugkraft entsprach der Anheftungskraft von *Cuscuta* an der Tomate. Die mittlere Anheftungskraft an Kontroll-Tomatenpflanzen (27 untersuchte Pflanzen) betrug $0,47 \pm 0,12$ N (STABWN). An den mit attAGP-VIGS-Konstrukten behandelten Pflanzen variierte die Anheftungskraft je nach Gehalt der attAGP-mRNA (25 untersuchte Pflanzen). Die Kraft korrelierte hochsignifikant (Spearman Korrelations-Koeffizient $p < 0,0001$) mit dem mRNA-Gehalt von attAGP (Abb. 2-20). Je mehr attAGP-mRNA vorhanden, desto stärker haftet *Cuscuta* an der Tomate an. Es handelt sich bei attAGP also um ein Anheftungsprotein.

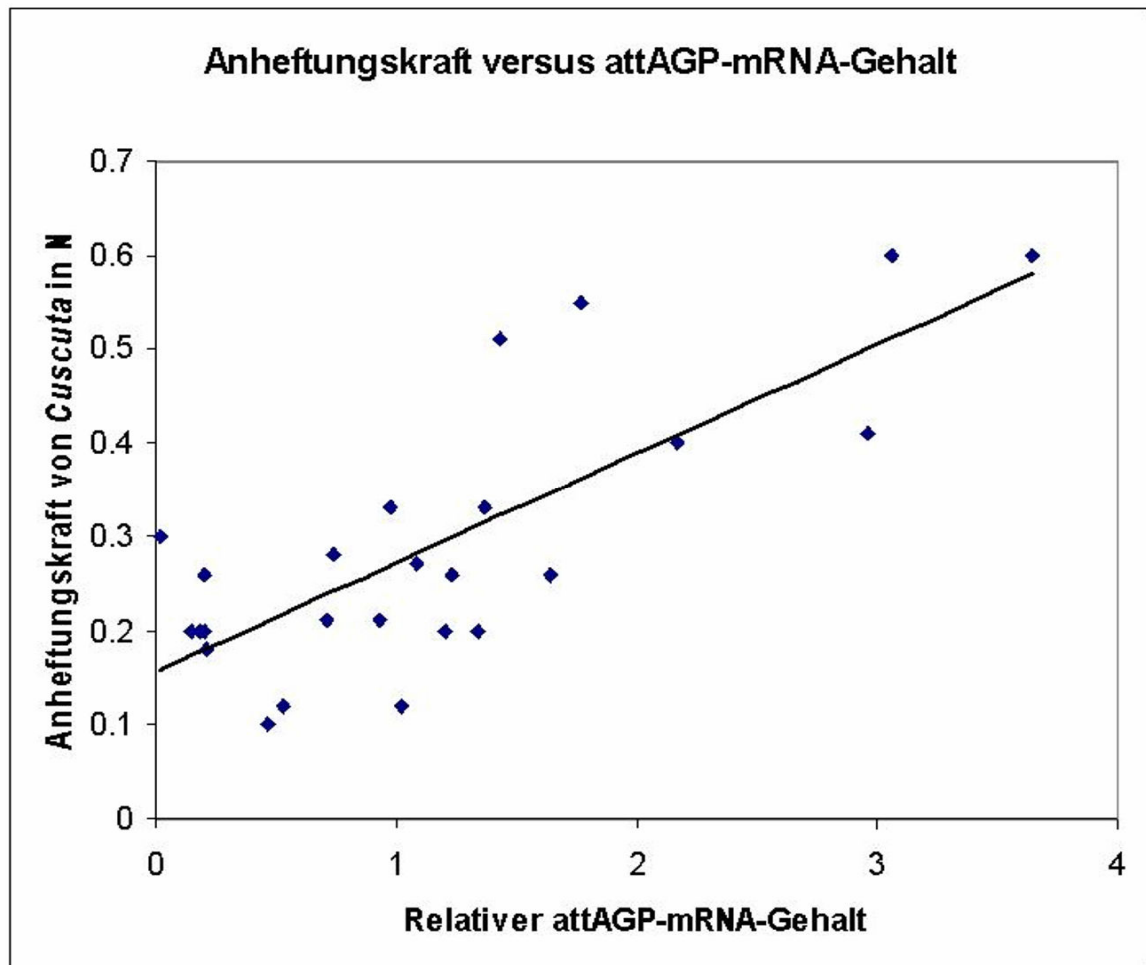


Abb. 2-20: *Cuscuta*-Anheftungskraft versus attAGP-mRNA-Gehalt. Der Graph zeigt die Korrelation von attAGP-mRNA-Gehalt und der Anheftungskraft von *Cuscuta*. Im Graphen sind nur Werte eingetragen, von Tomatenpflanzen deren attAGP-mRNA mittels VIGS herabgesetzt war. Die Anheftungskraft wurde mit einer Federwaage bestimmt (0 – 1,2 N; Genauigkeit 0,01 N).

2.3.7. Diskussion

Das neu identifizierte attAGP ist maßgeblich an der Anheftung des Parasiten *Cuscuta reflexa* an der inkompatiblen Wirtspflanze Tomate beteiligt. Dies zeigen die signifikant erniedrigten Anheftungskräfte nach Ausschalten des attAGPs. Doch wie kann ein einzelnes Protein diese Kräfte beeinflussen? Außerdem stammt attAGP aus der inkompatiblen Wirtspflanze Tomate, inwiefern ist die Wirtspflanze in eine erfolgreiche Anheftung ihres „Feindes“ involviert?

Bei attAGP handelt es sich um ein „klassisches“ AGP, mit zwei hydrophoben Domänen am N- und C-Terminus sowie einem hydrophilen Bereich, der reich an Serin, Threonin und Prolin (oft zu Hydroxyprolin modifiziert) ist. Die freien OH-Gruppen dieser Aminosäuren sind mit Arabinogalactan-Seitenketten versehen. Die Proteine sind in der Zellmembran lokalisiert und ragen mit ihrem stark hydrophilen, glykosylierten Bereich in die Zellwand der Pflanzenzelle (Showalter, 1993; Showalter, 2001). Dies gilt auch für attAGP, wie die Ergebnisse der Lokalisationsstudien mit dem attAGP-mGFP4 Fusionsprotein zeigen. Auch die GPI-Anker-Anheftungsstelle, die an attAGP vorhanden ist, spricht für ein „klassisches AGP“ (Einteilung in „klassische“ und „nicht klassische“ AGPs siehe Du et al., 1996). Aus *in silico* und experimentell gestützten Aussagen über attAGP wurde ein Modell für das Protein erstellt und mit einem Modell für ein anderes klassisches AGP aus der Tomate LeAGP1 verglichen (Abb. 2-21).

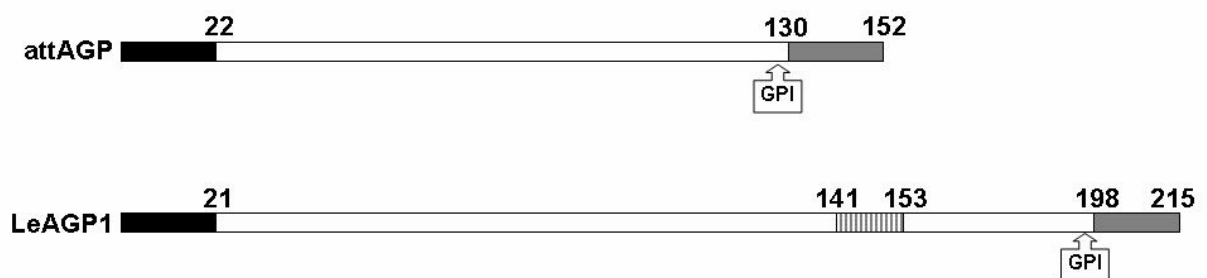


Abb. 2-21: Schematische Darstellung von attAGP im Vergleich mit LeAGP1. Schwarz: N-terminales Signalpeptid; weiß: Hydrophiler Bereich; grau: C-terminale hydrophobe Domäne; GPI: Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker; gestreift: Lys-reiche Domäne. attAGP unterscheidet sich von LeAGP1 lediglich in seiner Länge, und bezüglich der Lys-reichen Domäne, die in einigen klassischen AGPs vorhanden sein kann.

attAGP sitzt wie andere AGPs auch in der Zellmembran. Die seitlichen Zuckerketten ragen in die Zellwand und interagieren dort mit Pektinen (Knox, 1992; Nothnagel, 1997). Es erfüllt also die idealen Voraussetzungen, Reize aller Art früh zu erkennen. Bevor ein Signal zur Plasmamembran vordringt, erreicht es die Zellwand. Dies gilt auch für mechanische Reize. Mit einem GPI-Anker besitzt attAGP die Möglichkeit ein Signal weiterzuleiten. Phospholipase C oder D können Inositolphosphat abspalten (Oxley and Bacic, 1999; Sherrier et al., 1999; Svetek et al., 1999; Youl et al., 1998), das dann als intrazelluläres Signalmolekül fungiert und durch die Öffnung von Kalziumkanälen ein Kalzium-Signal in der Zelle freisetzt. Dass Kalzium auch während der Interaktion von *Cuscuta* mit Wirtspflanzen eine Rolle spielt, wurde in Kapitel 2.2. demonstriert. Nach dieser Signalkaskade könnte die zelluläre Produktion von Pektinen induziert werden. Pektine sind wichtige Bestandteile der primären Zellwand von Pflanzenzellen und sind am Aufbau chimärer Zellwände bei der Interaktion von *Cuscuta* mit Wirtspflanzen maßgeblich beteiligt (Vaughn, 2002; Vaughn, 2003b). attAGP wäre in diesem Fall der Rezeptor eines Signals und würde die Produktion von „Klebstoffen“ regulieren, die für die Anheftung des Parasiten von Bedeutung sind. Es wäre auch eine direkte Beteiligung des attAGPs als „Klebstoff“ denkbar. Wie oben erwähnt, bringen AGPs aufgrund ihres Aufbaus die optimalen Voraussetzungen mit sich, um Brückenmoleküle zwischen der Plasmamembran und der Zellwand darzustellen. Sehr oft werden AGPs an der Zellmembran von spaltenden Enzymen geschnitten und der hydrophile Teil mitsamt seiner langen Arabinogalactan Seitenketten in die Zellwand abgegeben (Gane et al., 1994). AGPs sind also auch Bausteine der Zellwand. Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass AGPs an der Kontaktfläche von symbiotischen Bakterien mit höheren Pflanzen verstärkt zu finden sind (Berry et al., 2002; Olsson et al., 2002). Aufgrund dessen und auch weil sie oft mit Pektinen vernetzt sind, stellen AGPs im Allgemeinen sehr gute adhäsive Moleküle dar. Für eine direkte Beteiligung von attAGP als „Klebmolekül“ spricht ebenso die hohe Expression des attAGP-Gens im Bereich der Anheftungsstelle des Parasiten.

Eine Regulation der attAGP-Genexpression durch Phytohormone wie Jasmonat oder auch Auxin wären denkbar. Für beide Phytohormone konnte gezeigt werden, dass ihr Gehalt in der Tomate an der Infektionsstelle stark ansteigt (vgl. Kap. 2.1.) (Löffler et al., 1999). Es ist außerdem aus der Literatur bekannt, dass

Phytohormone an der Regulation von AGPs beteiligt sind (Sun et al., 2004). Auch Kalzium-Signale oder mechanische Reize wie Berührung könnten die Genexpression von attAGP induzieren. Auslöser für die Kalzium-Signale, bzw. die attAGP-Genexpression könnten auch Elicitor-Proteine von *Cuscuta* sein, die spezifisch von der Tomate erkannt werden.

Zur Aufklärung der Genregulation wurde der attAGP-Promotor kloniert und mit einer cDNA der Luciferase kombiniert. Die mit diesem Konstrukt transformierten Tomatenpflanzen sollten Hinweise zur Regulation der Expression des attAGP-Gens erbringen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit lagen allerdings noch keine Daten zu diesen Experimenten vor.

2.4. Untersuchungen am Parasiten *Cuscuta reflexa*

2.4.1. Differentielles Durchmustern einer *Cuscuta*-cDNA-Bibliothek

Unter Mithilfe von Charlotte Böll und Christina Larisch (Studentinnen und F-Praktikantinnen) wurde eine cDNA-Bibliothek im Umfang von ca. 7000 cDNA-Klonen des Parasiten *Cuscuta* angelegt. Es wurde speziell Gewebe aus Prähaustorien und Haustorien zur Herstellung der cDNA-Bibliothek verwendet. Die parasitären cDNA-Klone wurden in zweifacher Ausführung auf „Microarray chips“ aufgetragen. Zwei identische „Chips“ wurden mit zwei unterschiedlichen cDNA-Sonden hybridisiert, die einmal mit Gesamt-RNA aus prähaustorialem und haustorialem Gewebe als Matrize, und im andern Fall mit Gesamt-RNA aus *Cuscuta*-Spross als Matrize synthetisiert wurden. Auf diese Weise sind bis jetzt 2000 cDNA-Klone differentiell nach cDNAs durchmustert worden, deren Gene bei der Haustorienentwicklung, also während der Infektion im Parasiten *Cuscuta reflexa* induziert sind (Abb. 2-23).

cDNA-Klone deren Gene während der Infektion in *Cuscuta*-Prähaustorien induziert sind, auf dem Chip also deutliche Signale gaben, wurden sequenziert. Deren cDNA, sowie Protein-Sequenzen wurden in Datenbanken (NCBI) mit bekannten Sequenzen verglichen. Eine Tabelle der identifizierten cDNAs ist unten zu sehen (Tab. 2-1). Die cDNA-Sequenzen sind wegen evtl. technischer Anwendungen nicht veröffentlicht und deshalb in dieser Arbeit nicht dargestellt.

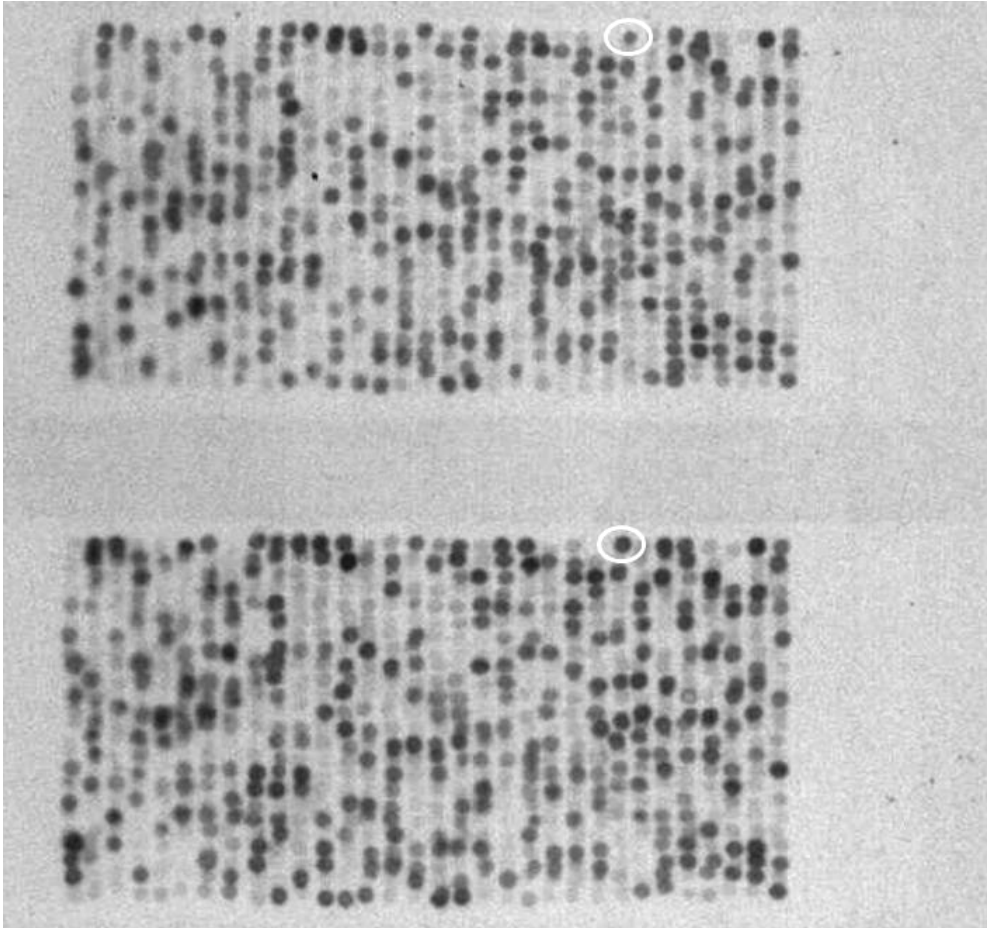


Abb. 2-22: „Microarray“ nach Schleicher&Schüll. Röntgenfilm von zwei identischen „Mikroarray-Chips“, die mit zwei verschiedenen, einzelsträngigen cDNA-Sonden hybridisiert wurden. Oben: Chip hybridisiert mit cDNA-Sonde von Gesamt-RNA aus *Cuscuta*-Spross ohne Haustorien. Unten: Chip hybridisiert mit cDNA-Sonde aus Gesamt-RNA von parasitären Prähaustorien und Haustorien. Weißer Kreis: Als Beispiel wurde ein cDNA-Klon umrandet, dessen Gen bei der Haustorienentwicklung induziert ist.

Klon-Nummer	Länge (bp)	Ähnlichkeit (Nukleotide)	Ähnlichkeit (Protein)
Lytische Enzyme			
8g12	480	86% Cystein-Protease (<i>Ipomoea</i>)	90% Cystein-Protease (<i>Ipomoea</i>)
28E7	400	Pektinase	Pektinase
29E6	500	ATP-abhäng. Protease	Vgl. DNA-Sequenz
6d2	720	88% Aldolase	64-81% (82 as) Aldolase
Genetische Mobilität			
19B10	480	Reverse Transkriptase <i>Ipomoea batas</i>	RT <i>Ipomoea batas</i>
9g4	220	Internal transkribed spacer	Vgl. DNA-Sequenz
9g10	650	Keine Ähnlichkeiten	50-70% put. Reverse Transkriptase
6b4	360	Keine Ähnlichkeiten	62-75% (30 as) Gag/gal Polyprot
23H4	500	Histon H2A	Histon H2A
Signaltransduktion			
29F10	350	30 bp 100% identisch zu CD 30 Ligand	Vgl. DNA-Sequenz
7b5	300	G-Prot SU (32 bps ident.)	G-Prot SU
17F1	450	Shaggy-like Kinase	Vgl. DNA-Sequenz
19D12	300	Nukleotidbindende Domäne	Vgl. DNA-Sequenz
22B12	380	EF-Hand ; Ca ²⁺ -bindende Domäne	Vgl. DNA-Sequenz
Translation			
19B5	400	<i>C. reflexa</i> t-RNA (Val) 100%	Vgl. DNA-Identität
8g10	700	Ribosomales Protein	Ribosomales Protein
11 Sequenzen, die keine Ähnlichkeit mit schon bekannten DNA oder Proteinsequenzen aufwiesen			

Tab. 2-1: Sequenzen aus *C. reflexa*. Identifizierte cDNA-Sequenzen von Genen, die während der Haustorienentwicklung in *Cuscuta* aktiv sind. Die nach der Sequenzierung erhaltenen cDNAs wurden bei NCBI mit schon bekannten Sequenzen sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene verglichen.

Die cDNA-Sequenzen der Cystein-Proteinase, Pektinase und Reversen Transkriptase sollen näher untersucht werden. Sie könnten vor allem für technische Anwendungen genutzt werden, sind aber auch hinsichtlich ihrer biologischen Funktion während des Infektionsprozesses von Interesse.

2.4.2. Diskussion

Der Infektionsprozess stellt für *Cuscuta reflexa* einen überlebenswichtigen Vorgang dar. Für eine infizierte Wirtspflanze bedeutet dies Nährstoffentzug und meist auch Tod. *Cuscuta* fügt auf diese Weise auch Kulturpflanzen erheblichen Schaden zu und verursacht Ernteaufälle (Dawson et al., 1994). Nicht zu letzt deswegen ist es von Bedeutung diese Interaktion zwischen zwei höheren Pflanzen zu verstehen. Molekularbiologische Methoden zur Untersuchung von *Cuscuta* bieten sich an und tragen zu einem besseren Verständnis einer Infektion bei.

Die Beteiligung Zellwand abbauender Enzyme ist bereits beschrieben (Srivastava et al., 1994; Vaughn, 2003a). Die Microarray-Experimente bestätigen eine Aktivierung von lytischen Enzymen wie die Pektinase oder die beiden Proteinase in *Cuscuta reflexa* während der Haustorien-Entwicklung. Die Pektinase ist sehr wahrscheinlich für den Abbau von Zellwandpolymeren der Wirtspflanzen verantwortlich, wobei die Proteasen wohl eher für den Abbau von „Verteidigungsproteinen“ verantwortlich sind, die von der Wirtspflanze abgesondert werden. Solche Proteinase sind auch in Verdauungssekreten von Schädlinginsekten vorhanden und dienen zur Minderung der Pflanzlichen Verteidigung (Tamayo et al., 2000).

Die einem CD-30 Liganden ähnliche Sequenz könnte für einen potentiellen Elicitor kodieren, der an einen Rezeptor der Tomate binden und eine spezifische Pathogenabwehr hervorrufen könnte. Eine genauere Charakterisierung des betreffenden Proteins in einem zukünftigen Projekt sollte Aufschluss darüber geben.

3. Material und Methoden

3.1. Kultivierung der Pflanzen und Probennahme

3.1.1. *Cuscuta*

Cuscuta reflexa wurde auf *Coleus blumei* kultiviert und ausschließlich vegetativ vermehrt. Der Tag- / Nachtrhythmus betrug im Gewächshaus 16/8 h bei Temperaturen von ca. 18 – 22 °C. Es herrschte eine Luftfeuchtigkeit von ca. 60 – 70%.

3.1.2. Tomate

Die Wirtspflanzen *Lycopersicon esculentum* cv. Moneymaker, sowie alle Tomatenmutanten wurden nach der Keimung einzeln verpflanzt und unter den gleichen Gewächshaus-Bedingungen wie die *Cuscuta*-Pflanzen angezogen. Die genetischen Mutanten wurden zur Verfügung gestellt: Vom „Tomato Genetics Resource Center“ (Davis, USA) (sig1 und sig2).

Für die einzelnen Untersuchungen wurden 5 – 7 Wochen alte Pflanzen verwendet.

3.1.3. Tabak

Nicotiana tabacum wurde unter den gleichen Bedingungen wie die oben genannten Pflanzen angezogen, das Alter zur Zeit der Infektion und Probennahme war ca. 7 – 8 Wochen. Die transgenen Aequorin-Tabakpflanzen wurden in Holland an der Wageningen University, Wageningen angezogen und 6 Wochen nach der Keimung für weitere Versuche verwendet.

3.1.4. Infektion der Wirtspflanzen

Zur Infektion der Versuchs-Pflanzen durch *Cuscuta* wurden ca. 20 cm lange *Cuscuta*-Sprosse der Spitze abgeschnitten und, ähnlich einer natürlichen Infektion, um ein Holzstäbchen gewunden. Nach ca. 1 – maximal 2 Tagen waren an der Kontaktstelle deutliche Prähaustorien zu erkennen. In diesem Stadium

wurde *Cuscuta* unter Nachahmung der natürlichen Windung und Berücksichtigung der richtigen Orientierung der Prähaustorien auf die Wirtspflanze übertragen (2. oder 3. ausgewachsenes Internodium von oben). Der Moment des Kontaktes von Parasit und Wirtspflanze gilt als Infektionsbeginn.

3.1.5. Probennahme an der Wirtspflanze

Zwecks RNA-Isolation wurden von den Wirtspflanzen wie folgt Gewebe entnommen. Nach der jeweiligen Infektionsdauer wurde *Cuscuta* vorsichtig von der Wirtspflanze entfernt und das zu untersuchende Gewebe der Wirtspflanze mit einer scharfen Rasierklinge von der Pflanze abgeschnitten, in Alufolie gewickelt und sofort in flüssigem Stickstoff bei -80 °C eingefroren.

3.1.6. Probennahme an *Cuscuta*

Zur Herstellung der cDNA-Bank wurde *Cuscuta* um einen Holzstab gewickelt, und nach 1, 2, 3 und 4 Tagen die Sprossstücke vom direkten Bereich der sich bildenden Haustorien zur Isolation von RNA verwendet. Die Proben der verschiedenen Zeitwerte wurden vereinigt. Aufgrund der unterschiedlichen Zeitwerte war die RNA von Prähaustorien und Haustorien unterschiedlicher Entwicklungsstadien in den Proben zu finden.

3.2. Vorgehensweise mit Bakterien

3.2.1. Verfahren mit *Escherichia coli*

Die *E. coli* Bakterien mit den rekombinanten Plasmiden wurden entweder von einer Agar-Platte oder aus einer Glycerin-Stock-Kultur in ein Kulturröhrchen mit 3 ml LB-Medium überimpft, dem außerdem noch das entsprechende Antibiotikum zur Selektion zugegeben wurde. Die Kulturen wurden bei 37 °C und in einem Schüttler bei ca. 250 rpm über Nacht inkubiert. In einigen Fällen wurde die Kultur am folgenden Tag für eine Glycerinkultur verwendet, zu diesem Zwecke wurden ca. 500 μl Kultur in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt, Glycerin zugegeben

(Endkonzentration 25 %) und die Bakterien-Kulturen bei - 80 °C eingefroren. Über-Nacht-Kulturen wurden in der Regel zum Zweck der Plasmidisolierung verwendet.

LB-Medium nach Luria-Bertani: 10.0 g NaCl
5,0 g Hefe-Extrakt
10,0 g Trypton
ad 1 l bidest. Wasser, pH 7,5

Das Medium wurde vor Verwendung autoklaviert, und nach dem Abkühlen wurden entsprechende Antibiotika zugesetzt. Im Normalfall waren dies 50 µg/ml Ampicillin oder 100 µg/ml Kanamycin.

3.2.1.1. Hitzeschock Transformation von *E. coli*

Zur Transformation wurden die *E. coli* Stämme XL1blue (Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI q ΔM15 Tn10 (Tet^r)]) und DH5α (Genotyp: F⁻ deoR recA1 endA1 hsdR1(r_k⁻ m_k⁺) supE44 1-thi gyrA96 relA1) verwendet. Die kompetenten Zellen waren in der Regel bei -80 °C eingefroren und wurden vor Beginn der Transformation auf Eis aufgetaut. Zur Transformation wurden 50 – 100 ng Plasmid eines Ligationsansatzes mit 100 - 200 µl kompetenter Zellen vorsichtig vermischt und für 30 min auf Eis belassen. 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 rpm geschüttelt, bis sie auf LB-Agar-Platten, die Ampicillin (50 µg/ml) oder ein entsprechend anderes Antibiotikum enthielten ausgestrichen wurden. Für eine Blau-Weiß Selektion nach einer TA-Klonierung wurde den Platten außerdem noch IPTG (60 µg/ml) und X-Gal (40 µg/ml) zugesetzt. Über Nacht wurden die Platten bei 37 °C inkubiert und, transformierte Bakterien durch ihre Ampicillinresistenz bzw. auch durch die Blau-/Weißfärbung selektiert.

SOC-Medium: 2 % Trypton
0,5 % Hefeextrakt
10 mM NaCl

	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄
	20 mM Glucose
	pH 7,0
LB-Nähragar:	1% NaCl
	1% Trypton
	0,5% Hefeextrakt
	1,5% Agar

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

3.2.2. Verfahren mit *Agrobacterium tumefaciens*

Mit Agrobakterien wurde genauso verfahren wie mit *E. coli*, allerdings betrug die Inkubationstemperatur 28 °C und nicht 37 °C wie bei den *E. coli* Bakterien. Es wurde der Agrobakterienstamm GV3101 verwendet (Genotyp: PM90RK, Gm^R, Km^R, Rif^R)

3.2.2.1. Hitzeschock Transformation von *A. tumefaciens*

Zur Transformation wurde ein Ansatz kompetenter Agrobakterien aus der -80 °C Truhe entnommen und ca. 50 – 100 ng Plasmid zupipettiert, vorsichtig gemischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nachdem die Zellen komplett gefroren waren, wurden sie bei 37 °C für 5 min einem Hitzeschock unterzogen. Die Zellen wurden dann mit 1 ml LB Medium versetzt und für 2 – 4 Stunden bei 28 °C geschüttelt. Danach wurden entsprechende Mengen (50 -200 µl) auf LB-Platten mit Antibiotika zur Selektion ausgestrichen und über Nacht bei 28 °C inkubiert.

3.3. Verfahren mit Ribonukleinsäuren

3.3.1. Isolation von Gesamt-RNA

Die RNA-Isolation erfolgte mittels des RNAeasy Plant Mini Kit (Quiagen). Es wurde genau nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen, die RNA wurde im letzten Schritt in 30 µl DEPC-Wasser aufgenommen.

3.3.2. Photometrisches Vermessen von Nukleinsäuren

Von der isolierten RNA wurde ein 100 µl Ansatz einer 1:50 Verdünnung angesetzt, und diese am Photometer vermessen. Das Augenmerk richtete sich dabei nicht nur auf den Absorptionswert bei 260 nm (Absorptionsspektrum von Nukleinsäuren), bzw. die RNA-Konzentration, sondern ebenfalls auf die anderen Absorptionswerte bei 230 und 280 nm, die eine Aussage über die Verunreinigung der Probe durch Zucker und Proteine treffen.

3.3.3. Auftrennen von RNA mittels Gelelektrophorese

Zum Überprüfen der photometrischen Daten der RNA-Proben, wurde die RNA in einem 1%igen, denaturierenden MEN-Agarosegel (Formaldehydhaltig) aufgetrennt. Dazu wurden je Probe 1 µg Gesamt-RNA mit DEPC-Wasser und RNA-Ladungspuffer auf ein gleiches Volumen gebracht und 10 min bei 65°C denaturiert. Nachdem die Proben 2 min auf Eis gekühlt waren, wurden sie auf das Gel aufgetragen und bei 70 V in 1 x MEN-Puffer aufgetrennt. Im RNA-Ladungspuffer befand sich Ethidiumbromid, das in die RNA interkalierte und nach Anregung durch UV-Licht hell gefärbte Banden sichtbar machte. Die Analyse der Daten erfolgte mittels eines ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech).

RNA-Ladungspuffer: 0,72 ml Formamid
 0,16 ml 10 x MEN
 0,26 ml 37 % Formamid
 0,18 ml bidest. Wasser
 0,10 ml 80 % Glycerin

	0,08 ml 2 % Bromphenolblau
	3 µl 1 % Ethidiumbromid-Lösung
10 x MEN-Puffer:	0,2 M Morpholinopropansulfonsäure
	0,01 M EDTA
	0,05 M Natriumacetat
MEN-Agarosegel:	0,5 g Agarose (ICN)
	42,5 ml bidest. Wasser, wurde zusammen in der Mikrowelle aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war; nach Abkühlung auf ca. 50 – 60 °C wurde zugegeben:
	5 ml 10 x MEN
	2,7 ml 37 % Formaldehyd

3.4. Verfahren mit Northernblots

3.4.1. Der Transfer von Gesamt-RNA auf eine Membran

Ein Verfahren zum Transfer von RNA 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 (10 x SSC) 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 30 cm Länge hergestellt. Der Transfer erfolgte über Nacht vertikal von oben nach unten. Die DNA 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 3-Citrat; pH 7,0

3.4.2. Herstellen von markierten cDNA-Sonden

3.4.2.1 Herstellen einer genspezifischen radioaktiv markierten cDNA-Sonde

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-Labeling-System (Amersham Pharmacia Biotech) ist geeignet zur Markierung von geringen Mengen DNA (25-50 ng) mit einer spezifischen Aktivität von mehr als 10⁹ dpm/μg DNA. In einem Reaktionsgefäß wurde das lyophilisierte Sediment aus dATP, dGTP, dTTP, Zufallsprimern, Reaktionspuffer sowie FPLC-pure Klenow Fragment in bidest. Wasser gelöst und auf Eis die zuvor denaturierte zu markierende DNA als auch 50 μCi [α -³²P] dCTP (oder P³³-dCTP) zugefügt. Das Gesamt-Reaktionsvolumen betrug 50 μl. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C wurden nicht eingebaute Nukleotide mit Hilfe von MobiSpin Columns von der markierten Sonde abgetrennt.

Vor Verwendung der Sonde wurde diese durch 10minütiges Kochen bei 99 °C und anschließende Inkubation auf Eis (für 2 min) denaturiert.

3.4.2.2. Herstellen einer DigUTP-markierten cDNA-Sonde

Mit Digoxigenin markiertes Uracil Tri-Phosphat (DigUTP) wurde während einer PCR in die cDNA-Sonde eingebaut. Es wurde dabei exakt nach dem Protokoll der Firma Roche vorgegangen.

PCR-Ansatz zur Markierung von cDNA-Sonden:

- 5 μl 10 x PCR Puffer (BioTherm)
- 1 μl dNTP-Mix (10 mM)
- 5 μl Dig-11-UTP (10 mM)
- 2,5 μl S-Primer
- 2,5 μl AS-Primer
- 50 ng Plasmid (Template)

1 µl Taq-Polymerase (Biotherm)
Ad 50 µl Wasser

Die PCR Ansätze wurden in einem Thermocycler nach dem Standard Protokoll (vgl. Kap. 3.5.f) vervielfältigt. Als Kontrolle wurde außerdem eine identische Reaktion ohne Dig-UTPs angesetzt, und beide in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. War der Einbau von Dig-UTP in die Sonde erfolgreich, so lief die DNA-Bande aufgrund einer sperrigeren Struktur ein kleines Stück oberhalb der Kontroll-Bande.

3.4.3. Hybridisierung von Membranen

3.4.3.1. „Dot-Hybridisierung“

Diese Methode der Hybridisierung wurde ausschließlich bei radioaktiven Blots angewandt.

Es wurde zunächst 30 min bei 50 °C mit 2 x SSC/0,5 % SDS vorgewaschen. Die Vorinkubation erfolgte in einem Schüttelinkubator für mindestens 1 h bei 42 °C mit einer formamidhaltigen Hybridisierungslösung. 15 ml dieser vorgewärmten Hybridisierungslösung wurden dann in ein 50 ml „Falcontube“ überführt, die Membran und die denaturierte Sonde zugegeben, das Ganze dann fest verschraubt, in eine Hybridisierungsröhre gesteckt und die Membran bei 42 °C über Nacht in einem Rotations-Inkubator hybridisiert.

Die Membranen wurden nach folgendem Protokoll gewaschen:

5 min in 2 x SSC bei RT spülen;
30 min in 2 x SSC/1 % SDS bei 60 °C spülen (Wasserbad)
15 min in 2 x SSC/1 % SDS bei 60 °C spülen
15 min in 0,1 x SSC/0,5 % SDS bei 60 °C (1 x wiederholen)
zweimal in 0,1 x SSC bei RT spülen
(ca. 200 ml je Arbeitsgang)

Zwischen den einzelnen Waschschritten wurde mit dem Geigerzähler kontrolliert, ob noch viel Radioaktivität auf der Membran war. Zeigte der Zähler nur noch

geringen Ausschlag (ca. 50 cpm), dann wurde das Waschen unterbrochen. Die noch gut feuchte 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).

Alternativ zum Röntgenfilm wurde die Membran auch einem Imaging-Screen für einen Phosphor-Imager (Fuji, Fuji Basreader) exponiert, und nach bestimmter Zeit mit diesem eingelesen. Die Daten wurden dann meist mit der AIDA-Software analysiert.

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

Hybridisierungs-Lsg.:	50 % Formamid
	5 x Denhardt`s Lsg.
	5 x SSC
	1 % SDS
	100 $\mu\text{g/ml}$ denaturierte Lachssperma DNA
50 x Denhardt`s Lsg.:	5 g Ficoll
	5 g Polyvinylpyrrolidon
	5 g BSA (Pentax Fraktion V)
	mit bidest. Wasser ad 500 ml auffüllen

3.4.3.2. Hybridisierung von Northernblots mit DIG-markierter Sonde

Diese Methode wurde ausschließlich für die Hybridisierung mit nicht radioaktiven, Dig-11-UTP markierten Sonden angewandt. Eine spätere Detektion der Signale erfolgte über Chemilumineszenz. Das Protokoll, sowie alle verwendeten Reagenzien stammen von der Firma Roche.

Vor dem Hybridisieren wurden die Membranen in $2 \times \text{SSC}/0,5\%$ SDS gewaschen. Zwecks Prähybridisierung wurde jede Membran in ein Falconröhrchen (50 ml)

überführt und mit 10 ml „DIG easy hyb“ in einem Rotor bei 42 °C für mindestens zwei Stunden vorhybridisiert.

Für die Hybridisierung wurden 10 – 20 ng pro ml Hybridisierungslösung der jeweiligen Sonde zu 100 µl „DIG easy hyb“ in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben, 10 min bei 95 °C denaturiert, danach für 2 min auf Eis gestellt und anschließend zur Membran in das Falconröhrchen gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht (16 h) bei 42 °C.

Die Membranen wurden unter Schütteln gewaschen, zweimal 15 min in 2 x SSC/0,1 % SDS bei Raumtemperatur und zweimal 15 min in 0,5 x SSC/0,1 % SDS bei 62°C im Wasserbad. Dabei sollte der Waschpuffer schon auf 62 °C vorgewärmt sein. Der letzte Waschschrift erhöhte die Stringenz, d.h. nur die spezifisch gebundenen Sonden blieben an der Membran haften, unspezifisch gebundene Sonden werden abgewaschen.

3.4.3.3. Antikörper-Nachweis und Detektion

Direkt im Anschluss wurden die Membranen für 5 min in Dig-Waschpuffer und bei Raumtemperatur äquilibriert.

Die Membranen wurden 1 h in je 10 ml Dig-Blocking-Puffer (ca. 10 ml auf 10 cm² Membran) bei Raumtemperatur im Rotor geblockt. Vor der Zugabe des Anti-Dig-Antikörpers wurde dieser für 5 min bei 14 000 rpm zentrifugiert, von der Oberfläche 1 µl der Antikörper-Lösung abgenommen und mit 10 ml Dig-Blocking-Puffer in einem Falconröhrchen vermischt. Die Membran wurde zu der Lösung in das Falconröhrchen gegeben und für 1 h im Rotor bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal 15 min in Dig-Waschpuffer auf einem Schüttler gewaschen.

Zur Detektion wurde die Membran 5 min in Dig-Detektionspuffer gewaschen und auf einer ebenen Unterlage auf eine Folie gelegt. Der Anti-Dig-Antikörper ist mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt. Als Substrat für die Alkalische Phosphatase (AP) wurde CDP-Star (Amersham) verwendet. Die AP kann CDP-Star dephosphorylieren, wobei Anionen frei werden, die sofort zerfallen und Licht emittieren. Die so entstandene Chemilumineszenz kann detektiert werden. Das CDP-Star wurde 1:50 mit Dig-Detektionspuffer (1 ml Lösung pro 100 cm² Membran) verdünnt und gleichmäßig auf der Membran verteilt. Nach 5 min wurde

die CDP-Star-Lösung mit einem Filterpapier abgesaugt und die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen. Die auf dem Northernblot vorhandenen Signale wurden mittels eines Chemilumineszenz-Detektionsgeräts der Firma BioRad aufgenommen. Die Einstellungen wurden je nach Situation und Signalstärke angepasst und entsprechend modifiziert.

Zum kurzfristigen Aufbewahren wurde die Membran in Frischhaltefolie eingewickelt und bei 4 °C gelagert.

Für eventuelle spätere Verwendungen wurde die Membran durch 20 minütiges Waschen in 0,1 % SDS bei 95 °C von der Sonde befreit, in Frischhaltefolie eingeschlagen und bei 4 °C gelagert.

Dig-Waschpuffer:	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl 0,3 % Tween (frisch zugeben) → pH 7,5
Dig-Detektionspuffer:	0,1 M Tris-HCl 0,1 M NaCl → pH 9,5
Dig-Blocking-Puffer:	Stammlösung (Roche) wurde 1:10 mit Waschpuffer verdünnt (keine näheren Angaben)

3.5. Verfahren mit Desoxyribonukleinsäuren

3.5.1. Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* mit Plasmid-mini-Präparation

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.

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

3.5.2. Restriktionsabbau von DNA

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. Das Ergebnis der Spaltung wurde durch Elektrophorese überprüft.

3.5.3. Elektrophoretische Auftrennung von DNA in einem Agarosegel

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-interkalierenden 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

3.5.4. Elution von DNA aus einem Agarosegel

Durch einlagern von Ethidiumbromid im UV-Licht (302 nm) sichtbar gemachte DNA-Banden wurden mitsamt der Agarose aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Zur Isolation 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.

3.5.5. Sequenzieren von DNA-Fragmenten

Das Sequenzieren von DNA erfolgte im Rahmen des SFB 567 "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-deazadGTP“ (Amersham) zum Einsatz. Die Sequenzierungen wurden mittels Software des Herstellers LICOR (Base Imagir 4.0) ausgewertet. Zum Vergleich der ermittelten DNA-Sequenzen mit bereits Bekannten, wurde der BLAST-Algorithmus (Altschul et al., 1990) vom NCBI-Server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/-BLAST/>) verwendet.

3.5.6. Bedingungen für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für die 96er-PCR wurde ein Mastermix angesetzt, der zu je 15 µl pro Gefäß vorgelegt wurde. Anschließend wurden mittels eines Replikators Bakterien inklusive rekombinanter Plasmide, aus einer 96er-Bakterien-Platte (Glycerin-Stocks oder ÜN-Kulturen) in eine PCR-Platte überimpft. Die PCR-Platten wurden dann in eine entsprechende PCR-Maschine gestellt, und die Reaktion zu den jeweiligen Bedingungen laufen gelassen (variiert je nach Primer und Vorlage).

Mit einzelnen PCR-Ansätzen wurde ähnlich vorgegangen, nur zum Übertragen der Bakterien in den Reaktionsansatz wurde hier ein Zahnstocher verwendet, der Reaktionsansatz war der Gleiche.

PCR-Ansatz (15 µl):

- 1,5 µl Biotherm PCR-Puffer (10 x)
- 0,75 µl MgCl (→ 2,5 mM)
- 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM)
- 0,1 µl Primer sense (100 pmol/µl)
- 0,1 µl Primer antisense (100 pmol/µl)
- 0,1 µl Biotherm Taq-Polymerase
- 11,95 µl bidest. Wasser (steril)

Dieser Ansatz wurde meist als 100 x Mastermix für die 96er PCRs zusammengegeben. Die Sequenzen und T_m -Werte der verwendeten Primer sind im Anhang zu finden.

Obiger Ansatz wurde bei einzelnen PCRs standardmäßig als 20 µl Reaktionsansatz zusammen pipettiert.

PCR-Ansatz (20 µl):

- 2 µl Biotherm PCR-Puffer (10 x)
- 1 µl MgCl₂ (→ 2,5 µM)
- 1 µl dNTP-Mix (10 mM)
- 1 µl Primer FW (10 µM)
- 1 µl Primer REV (10 µM)
- 0,5 µl Biotherm Taq-Polymerase
- Template
- ad 20 µl mit bidest. Wasser

Das Standard PCR Programm in der Maschine sah in der Regel wie folgt aus:

Startdenaturierung:	95 °C	2 min
<u>Zyklen:</u>		
Denaturierung:	95 °C	20 sec
Primer Anlagerung:	T _m – 4 °C	20 sec
Elongation:	72 °C	1 min pro 1000 bps
Endsynthese:	72 °C	3 min

3.5.7. RACE-PCR

In der *Cuscuta*-cDNA-Bank waren meist nur cDNA-Fragmente enthalten, d.h., es fehlten 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 Adaptorligation unnötig machte. Der SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) arbeitet nach dem Prinzip einer RT-PCR, wobei das SMARTIIA-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.

Es wurde gemäß dem Herstellerprotokoll gearbeitet, die genspezifischen Primer wurden den Empfehlungen des Herstellers gemäß und mittels der Vektor NTI 4.0 bzw. Jellyfish Software konstruiert. Die entsprechenden Primer-Sequenzen finden sich im Anhang.

3.5.8. T/A-klonieren von PCR-Fragmenten

Die *Taq*-DNA-Polymerase weist eine matrizenunabhängige terminale Transferaseaktivität für dATP auf, so dass die meisten bei der Amplifikation entstehenden PCR-Produkte am 3´-Ende ein einzelnes überhängendes Deoxyadenosin (dATP) tragen. Diese Eigenschaft wird von dem Klonierungssystem „TA TOPO Cloning Kit“ (Invitrogen) ausgenutzt, denn der speziell zur Subklonierung von PCR-Produkten entwickelte linearisierte Vektor

pCR2.1 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. Die Ligationsreaktion wurde entsprechend des Herstellerprotokolls angesetzt und nach 5 min abgestoppt. Sie konnte unmittelbar für die Transformation eingesetzt werden. Der Vektor pCR2.1 TOPO trägt in seiner Polylinker-Region den Promotorabschnitt für die T7 RNA-Polymerase. Außerdem enthält er verschiedene Restriktionsschnittstellen, welche die Charakterisierung der Insertion als auch anschließendes Klonieren in andere Vektoren ermöglichen. Die Begrenzung der Polylinker-Region durch unterschiedliche Primersequenzen erlaubt die Sequenzierung der DNA-Insertion nach erfolgtem Klonieren. Zusätzlich besitzt der Vektor die Resistenzgene für Ampicillin und Kanamycin, was der Selektion von Plasmid-tragenden Bakterien dient. Die Unterscheidung von rekombinanten und religierten Plasmiden wird dadurch möglich, dass die Unterbrechung des β -Galaktosidasegens bei Insertion die Umsetzung von X-Gal zu einem blauen Farbstoff verhindert. Deshalb weisen weiße Kolonien auf LB-Agar-Platten auf transformierte Bakterien mit rekombinanten Plasmiden hin, die anderen Kolonien sind hingegen blau gefärbt.

3.5.9. Ligation von cDNA-Fragmenten in binäre Vektoren

Das molare Verhältnis zwischen linearisiertem Vektor und Restriktions-Fragment beeinflusst die Effizienz einer Ligationsreaktion. Für eine optimale Ligation wurde ein Verhältnis von 5:1 von Fragment- zu Vektor-DNA empfohlen. Die Stoffmenge (in pmol) eines beliebigen DNA-Moleküls kann mit folgender Formel berechnet werden.

$$\text{DNA Menge (in pmol)} = \text{DNA Masse (in pg)} / 660 \text{ (g/mol)} * \text{DNA Länge (in bp)}$$

Ligationsreaktion (20 μ l): 2 μ l 10x T4 Ligase Puffer
x μ l DNA-Fragment
0,5 μ g linearisierte Vektor-DNA
2 u T4 DNA Ligase
x μ l bidest. H₂O

Das Reaktionsgemisch wurde kurz gemischt und für ca. 3 - 5 sec. zentrifugiert. Der Ansatz wurde nun für 1 h bei 22 °C oder über Nacht bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz direkt für die Transformation von *E. coli* weiterverwendet.

3.5.10. Aufreinigen von DNA

Wurde eine spezifische cDNA-Sequenz als Sonde benötigt, musste diese vor Verwendung aufgereinigt werden, um Bestandteile wie Enzyme, Primer oder dNTPs aus vorherigen PCR-Reaktionen abzutrennen. Zu diesem Zweck wurde die DNA entweder in einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend eluiert, oder die DNA wurde mittels „MobiSpin columns“ aufgereinigt. In letzterem Fall wurde exakt nach dem Hersteller-Protokoll gearbeitet.

3.5.11. Herstellung einer cDNA-Bank

3.5.11.1. Herstellen von Erststrang-cDNA

Zur Herstellung der Erststrang cDNA aus Gesamt-RNA mittels RT-PCR wurden „Ready-To-Go First-Strand beads“ (Amersham, Pharmacia Biotech) verwendet. Es wurde exakt das Hersteller-Protokoll befolgt. In der Regel wurden 2 µg Gesamt-RNA für die Synthese eingesetzt, als Primer dienten in jedem Fall der 3`CDS- und der SMARTIIA-Oligo-Primer. Der 3`CDS-Primer besteht aus einer Oligo-dT-Sequenz von ca. 30 Basen an seinem 3`-Ende und einer Nukleotidsequenz von 25 Basen an seinem 5`-Ende. Dieser Primer bindet nun zu Beginn der Erststrangsynthese an den polyA-Schwanz der mRNAs, und die Reverse Transkriptase (RT) beginnt mit der Elongation der Erststrang-cDNA (vgl. Abb. 3-1). Gelangt die RT am Ende des Matrizen-Stranges, also der mRNA an, so fügt sie am 3`-Ende des neu synthetisierten ssDNA-Stranges noch einige Cytosin-Basen an. Das SMARTIIA-Oligo-Nukleotid besitzt an seinem 5`-Ende die gleiche Nukleotidsequenz von 25 bps, wie der 3`-CDS-Primer, und an seinem 3`-Ende einige Guanosin-Basen. Mit diesen lagert er sich komplementär an das C-reiche Ende der Erststrang-cDNA an, und dient so als verlängerte Matrize für die RT. Ergebnis der RT-PCR sind also RNA/DNA-Hybride, die an beiden Enden von

identischen Primersequenzen (3'-CDS und SMARTIIA-Oligo) flankiert sind (siehe Abb. 3-1).

3.5.11.2. Vervielfältigen der cDNA

Die ssDNA (s.o.) wurde mit Hilfe der PCR vervielfältigt, und die PCR nach unterschiedlichen Zyklen gestoppt. Die cDNA wurde auf einem Gel kontrolliert, um zu gewährleisten, dass die PCR noch im linearen Bereich abläuft. Als einziger Primer fungierte bei dieser PCR der Nested Universal Primer (NUP). Dieser Primer besteht aus einer mit dem 3'-CDS- bzw. SMARTIIA-Oligo-Primer identischen bzw. komplementären Nukleotidsequenz, und lagert sich dort an. (Vgl. Abb. 3-1)

PCR-Ansatz (60 µl):

- 2,5 µl ssDNA
- 4,0 µl NUP (10 pmol/µl)
- 1,5 µl dNTPs (10mM)
- 6,0 µl Advantage2 Polymerase Puffer (10 x)
(CLONTECH)
- 1,0 µl Advantage2 Polymerase Mix (CLONTECH)
- 45 µl bidest. Wasser (steril)

Die 60 µl wurden zu 3 x 20 µl in PCR-Reaktionsgefäße gegeben, und die cDNA dann laut folgendem Programm in einer PCR-Maschine vervielfältigt.

Startdenaturierung:	95 °C	2 min
<u>Zyklen:</u>		
Denaturierung:	95 °C	5 sec
Primer Anlagerung:	58 °C	10 sec
Elongation:	72 °C	3 min

Ca. 10 sec vor Ende eines PCR-Zyklus, wurde ein 20 µl PCR-Ansatz von den dreien aus der Maschine genommen, und auf Eis gestellt. Mit den beiden übrigen Ansätzen wurde analog verfahren, nur wurden bei diesen die Reaktionen nach einer jeweils anderen Zyklenzahl gestoppt. Von den drei unterschiedlich

vervielfältigten Gesamt-cDNA Ansätzen (z.B. bis zu den Zyklen 20, 22, 24) wurden je 5 µl entnommen und auf einem Gel kontrolliert.

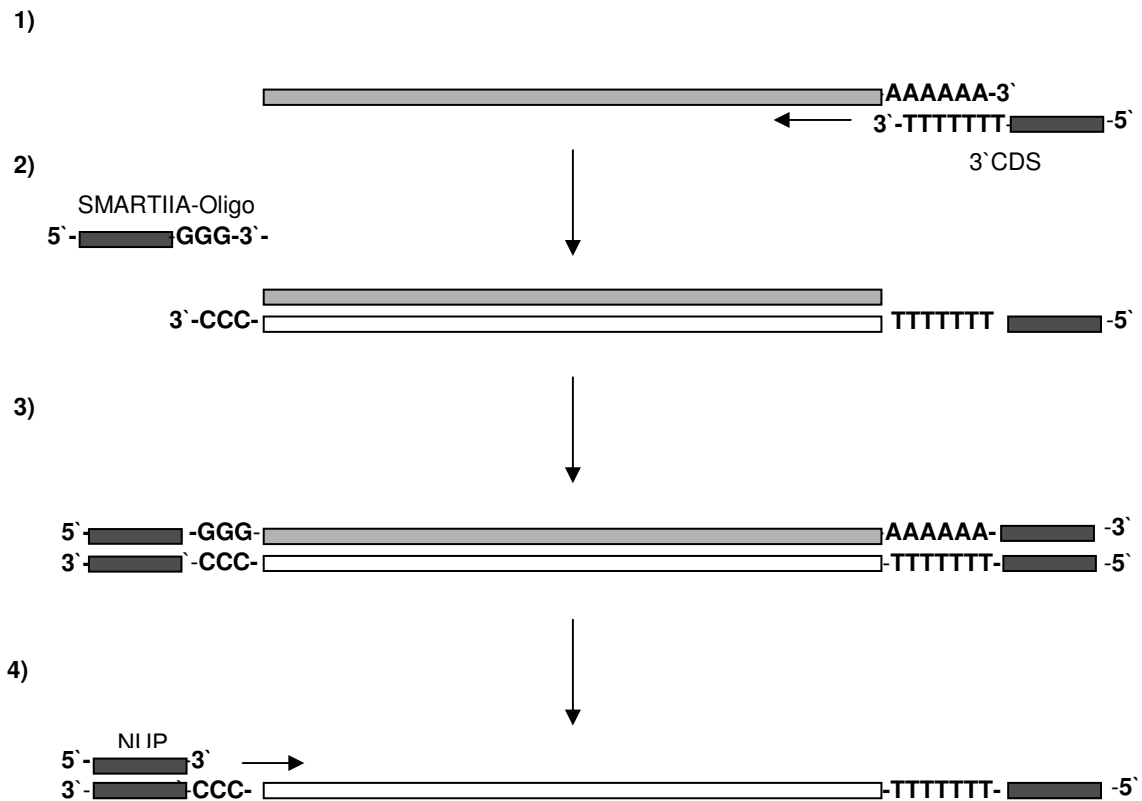


Abb. 3-1: Schematische Darstellung der Erststrang-cDNA-Synthese und deren Vervielfältigung.

1) Der 3`-CDS-Primer (dunkelgrau) bindet mit seiner Oligo-dT-Sequenz an den Poly-A-Schwanz der mRNA (hellgrau), die RT (Reverse Transkriptase) beginnt die Erststrang cDNA-Synthese in 5`-Richtung des RNA-Stranges.

2) Die RT fügt am Ende eines fertig synthetisierten, einzelsträngigen cDNA-Strang (weiß) einige Cs an. An diese Cs lagert der SMARTIIA-Oligo-Primer mit seiner G-reichen Sequenz komplementär an (Dieser Vorgang wird auch als „RT template switching“ bezeichnet). Die RT nutzt diese Verlängerung des Matrizen-Stranges (RNA) und führt die Erststrang cDNA-Synthese zu Ende. 3`-CDS-Primer und SMARTIIA-Oligo-Primer besitzen identische Nukleotidsequenzen (dunkelgrau).

3) Ergebnis der Erststrang cDNA-Synthese ist ein RNA/cDNA-Hybrid, beidseitig flankiert von den identischen Nukleotid-Sequenzen der beiden Primer.

4) Bei der Vervielfältigung der cDNA (weiß) dient der Nested Universal Primer (NUP) als Start-Oligonukleotid für die PCR. Dieser Primer besteht aus einer dem 3`-CDS- und dem SMARTIIA-Oligo-Primer identischen Nukleotid-Sequenz (dunkelgrau).

3.5.11.3. Herstellen einer cDNA-Bank

Nach dem Kontrollieren der vervielfältigten Gesamt-cDNA auf dem Gel wurden die Proben weiterverwendet, bei denen keine Banden, sondern nur ein gleichmäßig verteilter (von 4000 – 500 bps) „Schmier“ im Gel zu sehen war. So konnte gewährleistet sein, dass mRNAs einzelner Haushaltsgene der Zellen auf Grund ihrer höheren Transkription nicht vorzugsweise bei der PCR vervielfältigt werden

konnten. Die so überprüften PCR Ansätze wurden aufgeteilt, und zu je 2 µl TA kloniert. Die Plasmide wurden dann in XL1-blue *E. coli* Zellen transformiert und je 20 µl der Bakterien auf LB-Amp-IPTG-XGal-Platten ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden die weißen Kolonien gepickt und in die einzelnen Vertiefungen einer „96-Well-Platte“ überführt, in denen je 80 µl LB-Amp Medium vorlag. Diese Platten wurden zugedeckt, mit Parafilm verschlossen (Verdunstungsschutz) und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde jede Kultur mit einem Tropfen 90%igem Glycerin überschichtet, die Platten beschriftet, bzw. nummeriert und bei -80 °C eingefroren.

3.6. Verfahren mit Microarrays

3.6.1. Der Microcaster™

Der von der Firma Schleicher & Schüll entwickelte Microcaster™ ist ein kleines handliches Gerät (siehe Abb. 3-2), mit dem sich Microarrays von Hand herstellen lassen, und nicht wie heute normalerweise üblich mit einem Roboter.

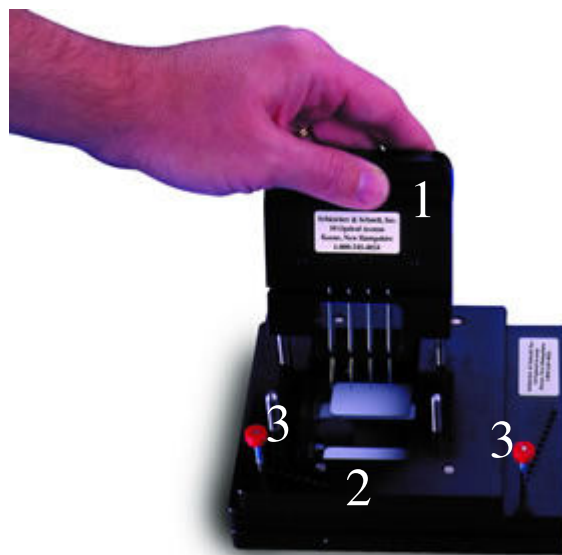


Abb. 3-2: Microcaster™ der Firma Schleicher & Schüll; 1 = Array-tool; 2 = Indexing unit; 3 = Indexing pins (1,2,3 = Originalbezeichnungen nach S & S) unterhalb des „Array-tools“ sind außerdem die beiden Castslides™ (Microarray-Chips) zu sehen.

Im Wesentlichen besteht der Microcaster™ aus zwei Teilen, dem sog. „Indexing unit“ und dem „Array tool“. Das „Array tool“ ist mit einer Art Stempel zu vergleichen, der bei jedem Transfer-Ereignis auf das „Indexing unit“ aufgesteckt

wird, und mit seinen acht Nadeln (Querschnitt 0,42 mm) die aufzutragende cDNA auf einen Membran-Chip aufstempelt. Dabei ist es wichtig, dass diese „Stempel-Bewegung“ kurz erfolgt, und die Nadeln sehr schnell wieder durch die eingebaute Rückfederung von der Membran zurückgezogen werden, damit die DNA-Proben auf der Membran nicht verlaufen. Bei den Microarray-Chips (Castslides™) handelt es sich um Glas-Objektträger, die mit einer 2 x 5 cm großen Nytran Super Charge Nylon Membran beschichtet sind. Von diesen Castslides™ sind zum Auftragen der DNA zwei Stück fest im „Indexing unit“ eingespannt, so dass zwei Membranen gleichzeitig bearbeitet werden können. Das „Indexing unit“ besteht außerdem aus einem verschiebbaren Rahmen, der unter zu Hilfenahme der sog. „Indexing pins“ wie auf einer x- und y-Achse eines 2-D-Koordinatensystems verschoben werden kann. Dabei gibt es auf der „x-Achse“ 8 mögliche Positionen und auf der „y-Achse“ 12 mögliche Positionen. Multipliziert mit der Anzahl der Nadeln des „Array-tools“, die auf der „x-Achse“ gleich 4 ist und auf der „y-Achse“ 2 beträgt, ergibt sich für die Anzahl möglicher Proben-Punkte auf einem Chip: $(4 \times 8) \times (2 \times 12)$, also 768 Punkte. 768 verschiedene Proben lassen sich also auf einen Castslide™ aufstempeln und in einem einzigen Experiment gleichzeitig untersuchen.

3.6.2. Prinzip des Proben-Auftragens

Aufgestempelt wurde ausschließlich cDNA, die zuvor mittels PCR in einer 96er-Platte bis zu einer Konzentration von ca. 70 – 100 ng/μl vervielfältigt wurde. Vor Beginn des eigentlichen DNA-Transfers wurden die Nadeln des „Array-tools“ nach dem „Setup-Protokoll“ des Herstellers konditioniert. Auch das Aufbringen der cDNA-Proben wurde gemäß dem Protokoll von Schleicher & Schüll durchgeführt, und die Nadeln nach jedem DNA-Transfer 2 x abwechselnd in bidest. Wasser (steril) und ca 80 – 90 %igem Ethanol gewaschen, kurz auf Filter-Papier abgetupft und dann an der Luft getrocknet.

Der DNA-Probentransfer mittels des „Array-tools“ aus der 96er-PCR-Platte auf den Membran-Chip erfolgte nach folgendem Prinzip: Im ersten Schritt wurde mit den 8 Nadeln des „Array-tools“ in die Gefäße A und B 1 – 4 einer 96er-Platte eingetaucht, das Teil anschließend auf die spezielle Vorrichtung der „Indexing unit“ aufgesteckt, und die DNA mit einer kurzen Bewegung auf die Membran aufgestempelt. Die „Indexing pins“ standen dabei auf der Position 1/1. Nach oben

beschriebenem Waschen der Nadeln wurde mit dem zweiten Schritt begonnen. Die „Indexing pins“ der „Indexing unit“ wurden in die Position 1/2 gebracht. Mit den Nadeln des „Array tools“ wurde in die Vertiefungen C und D 1 - 4 eingetaucht, und die DNA wie im ersten Schritt auf den Membran-Chip aufgetragen. War die erste 4er-Reihe der 96er Platte (A 1 – 4 bis H 1 – 4; v. oben n. unten) aufgebracht, wurde die zweite 4er-Reihe begonnen (5 – 8). Zur Verdeutlichung bitte auch unten stehende Abbildungen beachten (Abb. 3-3 und Abb. 3-4).

3.6.3. Nachbehandlung der aufgetragenen DNA-Proben

Direkt nach dem punktförmigen Auftragen wurden die DNA-Proben durch 5minütige Inkubation auf einem mit Denaturierungs-Lösung getränkten Filter-Papier denaturiert. Die anschließende Neutralisation erfolgte genauso lange, nach dem gleichen Prinzip: Mit der Membranseite nach unten wurden die Chips auf ein mit Neutralisierungs-Lösung getränktes Filter-Papier gelegt. Nachdem die Membranen luftgetrocknet waren, wurde die DNA auf den Membran-Chips durch 120.000 $\mu\text{Joules}/\text{cm}^2$ UV-Licht (UV Stratalinker 2400, Stratagene) fixiert. Die so behandelten Microarray-Chips konnten entweder sofort hybridisiert werden, oder aber bei 4 °C staubfrei gelagert werden.

Denaturierungs-Lsg.:	0,4 M NaOH
	3 x SSC
	10 mM EDTA
Neutralisier.-Lsg.:	0,5 M Tris-HCl pH 7,0
	1,5 M NaCl

3.6.4. Herstellen von radioaktiv markierten cDNA-Sonden aus Gesamt-mRNA

Für das differentielle Durchmustern der cDNA-Bank von *Cuscuta reflexa* wurde Gesamt-RNA aus *Cuscuta*-Spross ohne bzw. mit Haustorien isoliert. Diese wurde dann mit Hilfe des „Label star Array Kit“ der Firma Quiagen in ^{33}P -dCTP-markierte Erststrang-cDNA überschrieben. Es wurde exakt nach dem Herstellerprotokoll gearbeitet.

3.6.5. Hybridisierung von Microarrays

Die Hybridisierung erfolgte zunächst in den originalen Schleicher & Schüll Einweg-Hybridisierungskammern des CASTTM Slides MicroHybridization Kit. Diese Kammern konnten über der Membran aufgeklebt werden und hatten ein Füllvolumen von 600 μl . Da die Handhabung dieser Kammern jedoch etwas kompliziert war, und sie nicht immer dicht blieben, wurden diese von selbst

entworfenen (Prof. Kaldenhoff), mehrfach verwendbaren Hybridisierungskammern ersetzt. Diese Kammern hatten ein Füllvolumen von 1 ml.

Nach dem Handbuch von Schleicher & Schüll (CAST™ Slides MicroHybridization Kit) erfolgte die Vorinkubation 1 h bei 42 °C mit 1 x PreHyb/Wasch Puffer. Nach der Vorinkubation wurde die denaturierte Sonde einfach zugegeben. Bei Verwendung von genspezifischen Sonden wurden im Falle der originalen S & S Hybridisierungskammern (Volumen von 600 µl) 500 000 cpm zugegeben, im Falle der selbst konstruierten Kammern 1 mio cpm. Wurde eine Gesamt-cDNA als Sonde verwendet, so betrug die eingesetzte Menge 1 Mio cpm. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42 °C. Am nächsten Tag wurden die Chips 3 mal für 30 min bei RT mit 1 x PreHyb/Wasch Puffer gewaschen.

3.6.6. Analyse der Daten

Die hybridisierten Chips wurden noch feucht in Frischhaltefolie luftdicht eingewickelt und dann entweder für 20 – 40 min einem „IP-Screen“ für den Phosphorimager, oder für 5 – 12 h bei -80 °C einem Röntgenfilm exponiert.

Bei Verwendung eines „IP-Screens“ wurde dieser mit dem Phosphorimager eingelesen (Software BasReader) und die Chips dann mittels der AIDA-Software analysiert. Hierbei wurden die einzelnen Intensitäten relativ zum Hintergrund (= leere Membran) quantifiziert und miteinander verglichen.

Wurde ein Röntgenfilm verwendet, dann wurde dieser mit einem normalen Scanner eingelesen, und die Daten nur mit bloßem Auge am Computerbildschirm analysiert.

3.7. Zelluläre Lokalisation des AGPs mittels mGFP4

3.7.1. Herstellen eines AGP-mGFP4 Fusionsproteins

Genspezifischen Primern für den cDNA-Abschnitt des AGP-Leserasters wurden Schnittstellen für Restriktionsenzyme angefügt, um ein gerichtetes Klonieren zu ermöglichen. Beginn des Sense-Primers war das Start-ATG und Ende des Antisense-Primers war das letzte Codon vor dem Stop Signal des AGPs. Aus der PCR resultierte die Sequenz des offenen Leserasters für das AGP, wobei am 5`-

Ende eine Schnittstelle für das Restriktions-Enzym HindIII und am 3`-Ende eine Schnittstelle für Eco47III angefügt wurde. Das PCR-Produkt wurde über TA-Klonieren im Vektor pCR2.1 zwischenkloniert und aus diesem mit den entsprechenden Enzymen ausgeschnitten. Der Ziel-Vektor pPILY, der das mGFP4 Gen unter der Kontrolle von zwei 35S Promotoren enthält, wurde ebenfalls mit Eco47III und HindIII geschnitten. Die AGP-Sequenz wurde so in den Vektor ligiert, dass nach erfolgter Transkription eine durchgehende AGP-mGFP4-mRNA vorlag, die dann in ein chimäres AGP-mGFP4-Protein übersetzt wurde.

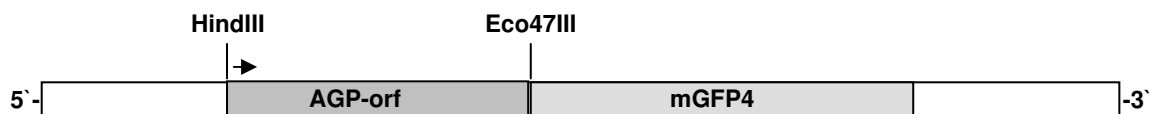


Abb. 3-5: Schematische Darstellung eines Ausschnitts des pPILY-Vektors. Das AGP wurde mit Hilfe der Schnittstellen für HindIII und Eco47III mit mGFP4 fusioniert. Das Fusionsprodukt steht unter der Kontrolle von zwei 35S Promotoren (nicht dargestellt). Eine detaillierte Vektorkarte befindet sich im Anhang.

3.7.2. Beladen der Gold Partikel

Die zu transformierende DNA sollte in einer Konzentration von 1-2 µg/µl vorliegen. Hierzu ist eine Midi-Präparation des Plasmids aus einer 25 ml Über-Nacht-Kultur empfehlenswert.

Die Goldpartikelpräparation erfolgte nach der Vorschrift des „Particle Delivery System“, Biolistic® PDS-1000/HE (BioRad).

Bevor die Goldpartikel mit DNA beladen wurden, mussten sie sterilisiert werden. Für 10 Transformationen wurden 2 - 2.2 mg Goldpartikel (0.6 µm, BioRad) in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß eingewogen, mit 1 ml 70 % Ethanol versetzt und für 5 min sorgfältig gemischt. Nach 15 min Inkubation wurden die Partikel für ca. 5 sec. in einer Mikrozentrifuge präzipitiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Es wurde 1ml autokl. H₂O zugegeben und für 1 min kräftig gemischt. Man ließ die Partikel für 1 min sedimentieren und zentrifugierte anschließend für ca. 5 sec. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt. Nach der zweiten Wiederholung wurden die Goldpartikel in 50 µl sterilem 50 % Glycerol aufgenommen. Die Partikel konnten nun direkt weiterverwendet oder bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert werden.

Um die Partikel gleichmäßig mit DNA zu beladen wurde das Reaktionsgefäß auf einem Thermo-Mixer (Eppendorf) fixiert. Es wurden während des Mischens nacheinander 5 µl DNA (1 µg/µl), 50 µl 2,5 M CaCl₂ und 20 µl 0,1 M Spermidin (freie Base) zugegeben und noch weitere 2 min gemischt. Die Partikel wurden für 1 min sedimentiert und daraufhin für 2 sec in einer Mikrozentrifuge präzipitiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und zum Goldpellet wurden 140 µl 70 % Ethanol zugegeben. Nach einer kurzen Zentrifugation folgte ein zweiter Waschschrift mit 140 µl 100 % Ethanol. Die Partikel wurden in 65 µl 100 % Ethanol aufgenommen und durch vorsichtiges Mischen resuspendiert. Bis zur Transformation wurden die Goldpartikel auf Eis aufbewahrt.

3.7.3. Transiente Transformation mittels „Particle Bombardment“

3.7.3.1. Das Particle Delivery System von BioRad

Das „Particle Delivery System“ ist eine biolistische Transformationsmethode, welche Heliumgas verwendet um DNA-beladene Gold- oder Wolframpartikel unter hohem Druck in verschiedene Zellen zu bringen. Dies ist eine geeignete Methode Zellen jeglicher Art (tierische, pflanzliche, bakterielle, etc.) und Zellkompartimente (z.B. Chloroplasten, Mitochondrien) stabil oder transient zu transformieren. Die Methode ist wesentlich einfacher und unkomplizierter anzuwenden, als z.B. die Transformation über Mikroinjektion.

Die Apparatur besteht aus der Partikel-Beschuss-Kammer mit einer Verbindung zu einer Vakuumpumpe und aus einem Anschluss an eine Helium-Gasflasche, wobei ein Modulator zum Einstellen des Drucks zwischengeschaltet ist.

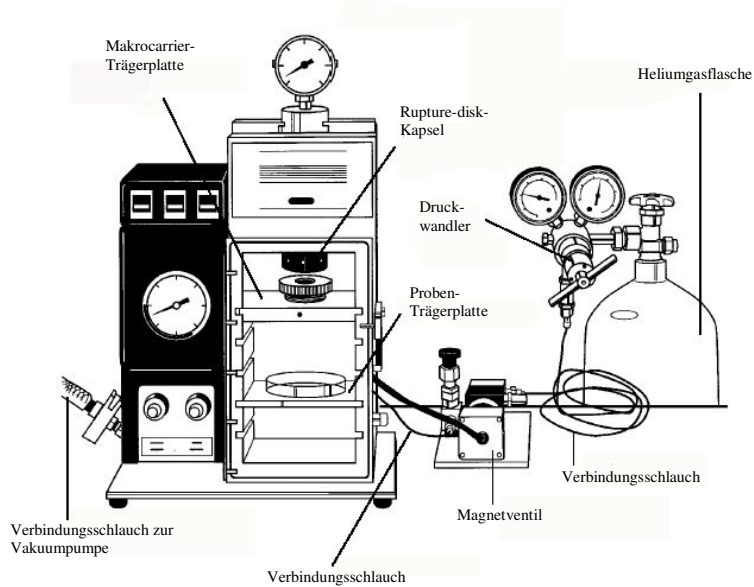


Abb. 3-6: Aufbau des Particle Delivery System, Biolistic®PDS100/He (BioRad)

Der Transformationsprozess begann mit dem Anlegen des Vakuums in der Partikel-Beschuss-Kammer. Daraufhin wurde das Heliumgas appliziert, das durch eine „Rupture-disk“ (BioRad) vor dem Heliumventil zurückgehalten wurde. Es baute sich somit ein hoher Druck in der „Rupture-disk“-Kapsel auf. Die „Rupture-disk“ reißt bei einem definierten Druck und entlässt das Gas auf eine Makrocarrier-Scheibe (BioRad), auf der die mit DNA beladenen Partikel aufgebracht wurden. Die Makrocarrier-Scheibe wurde durch eine Metallgitter-Scheibe aufgehalten, sodass die Partikel mit hoher Geschwindigkeit auf die Zellen entlassen wurden. Die Geschwindigkeit, mit der die Partikel auf die Zellen treffen, ist abhängig von der Höhe des Heliumdruckes (also die Wahl der „Rupture-disk“), der Höhe des angelegten Vakuums in der Kammer, der Distanz zwischen Makrocarrier- und Stopp-Scheibe und der Distanz zwischen Stopp-Scheibe und Zellen. Je nach verwendeten Zellen oder Geweben wurden die verschiedenen Parameter angepasst.

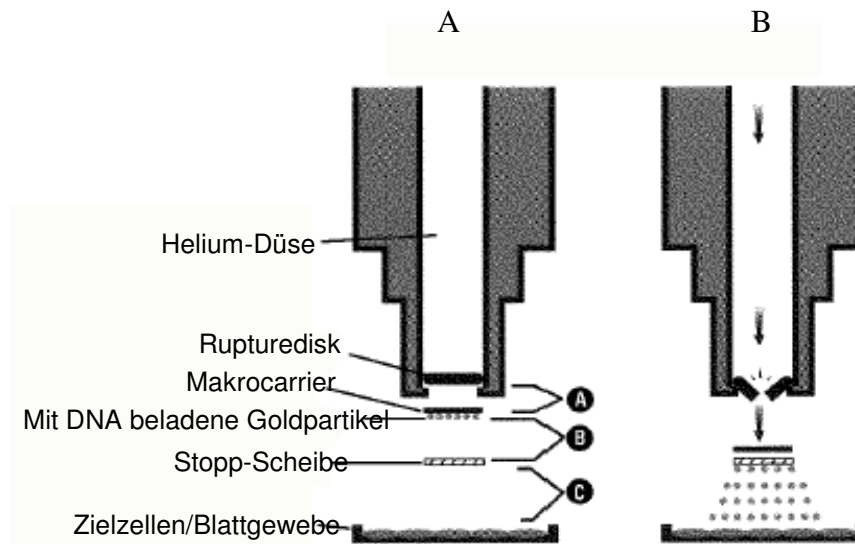


Abb. 3-7: Transformationsprozess vor (A) und nach (B) Applikation des Heliumgases

3.7.3.2. Transiente Transformation von Pflanzenteilen

Bei der transienten Transformation von Pflanzenteilen war es nicht unbedingt wichtig steril zu arbeiten, da die Proben nur drei Tage zur Analyse bereit stehen mussten, es wurde jedoch trotzdem weitestgehend steril gearbeitet. Die Partikel-Beschuss-Kammer wurde in dem sterilen Bereich einer Sterilbank aufgebaut und auch die gesamten Vorbereitungen fanden hier statt.

Die „Rupture-disk“ (900 psi, BioRad) und die Makrocarrier (BioRad) wurden in einer Petrischale in Isopropanol eingelegt und bis zum Beginn der Arbeiten auf einen Wankelschüttler gestellt. Die Partikel-Beschuss-Kammer und ihre internen Bestandteile („Rupture-disk“-Kapsel, Makrocarrier-Platte, Proben-Platte) wurden gründlich mit Isopropanol gewaschen.

Anschließend wurden die Makrocarrier und die „Rupture-disks“ unter der Sterilbank auf einem autoklavierten Papierhandtuch ausgebreitet und luftgetrocknet. Die trockenen Makrocarrier wurden mit einer hitzesterilisierten Pinzette in die entsprechenden Halteschalen gelegt und mit dem beigelegten Werkzeug in die Halteschiene eingedrückt.

Nun wurden die mit DNA beladenen Goldpartikel vorsichtig resuspendiert und pro Transformation 6 µl der Partikel-Suspension in das Zentrum der Makrocarrier gegeben. Das Ethanol der Suspension sollte danach soweit abtrocknen, dass die Partikel eine feste Bindung mit dem Makrocarrier eingehen.

Während das Ethanol abtrocknet, konnten die Zielzellen vorbereitet werden. Es wurden hierbei 5 cm lange Tomatenblätter mit einem Skalpell abgeschnitten und auf eine, mit einem runden Filterpapier ausgelegten, Agar-Platte mit MS Medium mit der Blattunterseite nach oben, abgelegt. Analog wurden auch Schuppen einer Zwiebel auf MS-Platten ausgelegt, sodass die Innenseite der Schuppe nach oben zeigte. Die „Rupture-disk“, Makrocarrier mit Goldpartikel und die Proben können nun in die Beschuss-Kammer eingebaut werden. Hierzu wurde die „Rupture-disk“-Kapsel vor das Heliumventil geschraubt, die Makrocarrier-Platte in die oberste Schiene und die Proben-Platte in die dritte Schiene von oben eingeschoben. Die Kammer wurde mit dem Riegel fest verschlossen und das Vakuum bis zu einem Wert von 27 in Hg aufgebaut. Der Heliumdruck wurde an der Gasflasche mit dem Druckwandler auf 2 - 2.5 bar eingestellt. Ist das Vakuum aufgebaut, wurde der Schalter „fire“ gedrückt und solange festgehalten bis der Zerreißdruck der „Rupture-disk“ erreicht war. Zerreißt die „Rupture-disk“, wurde der Schalter losgelassen und der Transformationsprozess lief innerhalb weniger Millisekunden ab. Anschließend wurde der Schalter des Vakuums auf die Position „vent“ gebracht und die Kammer wieder mit Luft gefüllt. Das transformierte Blatt, bzw. Zwiebelschuppe wurde aus der Kammer genommen und bei RT in eine Schublade gelegt, um ein Ausbleichen des GFPs zu verhindern.

3.7.4. Analyse der transformierten Zellen unter einem CLSM

Die subzelluläre Lokalisation der exprimierten fluoreszierenden Fusionsproteine wurde mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (confocal laser scanning microscope, CLSM; LSM 5 Pascal, Zeiss) analysiert. Dazu wurde die Epidermis der transformierten Zwiebelschuppe vorsichtig mit einer Pinzette von der Innenseite der Schuppe abgezogen und in einen Wassertropfen auf einen Objektträger gelegt. Teile der Tomatenblätter wurden ebenfalls auf einen Objektträger gelegt. Die fluoreszierenden Zellen, bzw. Zellbestandteile wurden mit Hilfe von UV-Licht angeregt und unter dem Mikroskop visualisiert. Wurde eine GFP-fluoreszierende Zelle gefunden, schaltete man das Mikroskop von der visuellen Einstellung in die des Lasers um. Der Laser tastet nun das Gewebe ab und stellt das erhaltene Fluoreszenz-Bild auf dem Bildschirm dar. Das Bild wurde gespeichert und konnte mit Hilfe von Bildbearbeitungssoftware bearbeitet werden.

Zur Erhöhung des Kontrastes und der Helligkeit wurde hier das Programm „Photoshop“ der Fa. Adobe verwendet.

3.8. Lokalisation der attAGP-Genexpression

3.8.1. Klonierung des attAGP-Promotors

3.8.1.1. Herstellen der Adaptoren

Die Klonierung des Promotors erfolgte nach dem „Genome Walker™ Kit User Manual“ der Firma BDBiosciences (Clontech). Allerdings wurden die einzelnen Komponenten des Kits ersetzt, dies waren die Restriktions-Enzyme (alle von MBI-Fermentas) und auch die Adaptoren, die eigenständig hergestellt wurden. Es wurden die original im Hersteller-Protokoll angegebenen Sequenzen für die Adaptoren verwendet. Diese wurden einzelsträngig von der Firma MWG hergestellt und dann wie im Folgenden beschrieben zu doppelsträngigen Adaptoren hybridisiert. Jeweils 20 µl einer 100 pmol/µl konzentrierten Stammlösung der einzelsträngigen Sequenzen wurden nach Zugabe von Wasser und T4-Ligasepuffer (Endvolumen 80 µl) bei 75 °C in einem Heizblock für 10 min erhitzt. Das Reaktionsgefäß wurde dann in ein 1 l Becherglas mit 75 °C heißem Wasser eingetaucht, und das Becherglas voll Wasser unter Rühren abgekühlt (RT). Der Reaktionsansatz wurde dann (nach ca. 2 h) herausgenommen, und die fertigen Adaptoren standen für die Ligation zur Verfügung.

3.8.1.2. Klonierung des Promotors

Als Ausgangsmaterial wurde aus der Tomate genomische DNA mit dem DNAeasy Plant Mini Kit von Quiagen isoliert. Zur Klonierung des Promotors wurde mit der genomischen DNA exakt nach dem Herstellerprotokoll „Genome Walker™ Kit User Manual“ der Firma BDBiosciences (Clontech) verfahren. Einzige Ausnahmen waren die eigene Herstellung der Adaptoren, und dass zur Aufreinigung der DNA nicht die Phenol/Chloroform Methode angewandt wurde, sondern die DNA nach dem Restriktionsabbau mittels des Quiagen „PCR Purification Kit“ aufgereinigt wurde. Nach der PCR (Primer: AGPprom1 u -2)(Genome walking) wurden

mehrere DNA-Fragmente erhalten, die dann über TA-Klonierung in den pCR2.1 Vektor (Invitrogen) eingebracht wurden. Die Fragmente wurden sequenziert und die Sequenzen am Computer miteinander verglichen. Alle Sequenzen waren alle identisch, jedoch waren sie unterschiedlicher Länge. Für alle weiteren Versuche wurde das längste DNA-Fragment von ca. 850 bp Länge verwendet (siehe auch „Genome Walker™ Kit User Manual“).

3.8.2. Fusion des Promotors mit GUS- und Luc-Genen

Es standen Vektoren zur Verfügung, die eine cDNA-Sequenz für eine Glucuronidase bzw. eine Luciferase als Reporter gen enthielten. Es handelte sich hierbei um das binäre Plasmid pGPTV mit Kanamycin Resistenz, wobei die entsprechende cDNA für das jeweilige Reporter gen ursprünglich unter der Kontrolle eines 35S Promotors stand. Dieser Promotor wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme HindIII/XbaI im Falle der Fusion mit GUS, bzw. mit KpnI/XhoI für die Fusion mit der Luciferase aus dem Vektor ausgeschnitten und durch den klonierten attAGP-Promotor ersetzt. Dieser wurde zuvor mittels PCR und mit Hilfe von Primern, denen oben beschriebene Restriktionsschnittstellen angefügt wurden, vervielfältigt. Dabei wurde die Adaptor-Sequenz am 5`-Ende des attAGP-Promotor mit vervielfältigt, so dass die dort bereits vorhandenen Restriktionsschnittstellen erhalten blieben (vgl. Abb. 3-8).

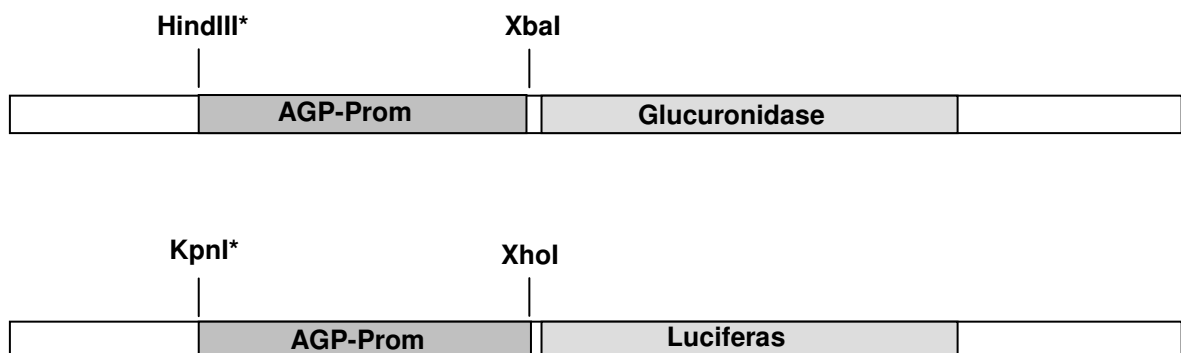


Abb. 3-8: Schematischer Ausschnitt des pGPTV Vektors. Der AGP-Promotor wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme HindIII/XbaI mit GUS und mit KpnI/XbaI mit der Luciferase fusioniert. * = Es sind außerdem noch sämtliche Schnittstellen aus der Adaptor-Sequenz vorhanden: MluI, Sall, SmaI, XmaI und SrfI.

Die Ligationsansätze wurden zunächst in *E. coli* Bakterien transformiert und nach Vermehrung der Transformanden wurden die Plasmide auf Richtigkeit überprüft.

Anschließend wurden die Plasmide in *Agrobacterium tumefaciens* eingebracht, und mit Hilfe dieser die att-AGP-Promotor-GUS-Konstrukte stabil in Tomate transformiert (vgl. Kap 3.9.).

3.8.3. GUS-Test zur Lokalisation der Genexpression

Die mit den AGP-Promotor-GUS Konstrukten transformierten Tomaten wurden mit *Cuscuta* infiziert, entsprechende infizierte Sprossabschnitte nach zwei bzw. drei Tagen mit dem Skalpell abgeschnitten und in ein Falcon-Röhrchen mit X-Gluc-Lösung gegeben, so dass die Probe völlig von der Lösung bedeckt war. Die Gefäße wurden offen in einen Exikator gestellt und für 2 - 5 min Vakuum angelegt (bis kleine Bläschen aus den Pflanzenteilen austreten). Danach wurden die Proben über Nacht bei 37 °C im Dunkel belassen und am nächsten Tag untersucht und fotografiert.

X-Gluc-Lösung:	1 mM 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Glucuronid
	1x Phosphat-Puffer
	500 μ M $K_4[Fe(CN)_6 \times 3H_2O]$
	500 μ M $K_3[Fe(CN)_6]$
	10 mM EDTA
	0,1 % Triton X-100
10x Phosphat-Puffer:	0,5 M NaH_2PO_4
	0,5 M Na_2HPO_4 pH 7.0

3.9. Stabile Transformation der Tomate

3.9.1. Präparation der Agrobakterien

Die Agrobakterien mit den rekombinanten Plasmiden wurden einen Tag vor der Transformation der Tomatenkotyledonen von einer Platte als 3 ml Übernacht Kultur angeimpft. Am folgenden Tag wurde 1 ml der ÜN-Kultur in 50 ml LB-Medium überimpft und die Kultur bei 28 °C und 250 rpm in einem Schüttelinkubator bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,6 angezogen. Die

Bakterien wurden dann in einer Zentrifuge bei 5000 Umdrehungen pro Minute für 5 min abzentrifugiert, in Inokulationsmedium resuspendiert und auf eine OD₆₀₀ von 0,6 eingestellt. In dieser Bakterien-Suspension wurden die Kotyledonen der Tomate zur Transformation inkubiert (vgl. folgendes Kapitel).

Inokulationsmedium: 2,15 g MS Salze
 100 mg Myo Inositol
 20 mg Thiamin
 0,5 mg Pyridoxin HCl
 0,5 mg Nikotin Säure
 10 g Saccharose
 → pH 5,8

3.9.2. Transformation von Tomatenkotyledonen

Die Methode ist von Fillatti (Fillatti et al., 1987) entwickelt, wurde aber noch leicht modifiziert. Zunächst wurden pro Konstrukt 50 Tomatensamen (*Lycopersicon esculentum* cv. Moneymaker) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 3%iger Hypochlorid Lösung sterilisiert und danach 3 x mit sterilem Wasser gewaschen. 25 Samen pro Magenta-Box wurden auf ½ MSO-Medium ausgesät. Die Tomatenkeimlinge wurden bei einem Tag/Nacht Rhythmus von 16/8 h und 25 °C inkubiert. Nach einer Woche wurden die Sämlinge den Magentaboxen entnommen, die Kotyledonen mit einem Skalpell abgeschnitten, deren vordere Blattspitzen entfernt und das Blatt in der Mitte geteilt. Dann wurden die Kotyledonenteile mit der adaxialen (Blatt-Oberseite) Seite nach unten auf KCMS-Medium-Platten (mit sterilem Filterpapier bedeckt) für ca. 20 – 24 h bei 25 °C, 16/8 h Tag/Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurden diese Kotyledonenstückchen in Inokulationsmedium, das die Agrobakterien mit den entsprechenden rekombinanten Plasmiden enthielt, für ca. 5 – 10 min unter ständigem Schütteln inkubiert. Die Pflanzenteile wurden entnommen, auf sterilem Papier kurz abgetupft, mit der adaxialen Seite nach unten wieder auf die KCMS-Platten gelegt und unter oben beschriebenen Bedingungen für ca. 2 – 3 Tage inkubiert. Die Blattstückchen wurden dann entnommen und mit der adaxialen Seite nach oben auf Kallus induzierende 2Z-

Medium-Platten mit entsprechenden Reagenzien zur Selektion (Antibiotika, Basta) gelegt. Im Verlauf der folgenden 2 – 3 Wochen bildeten sich erste Kalli, aus denen einzelne Blattspitzen auswuchsen. Diese Kalli wurden auf 1Z-Medium-Platten (ebenfalls Selektionsmedium) gesetzt, das zur Regeneration der Sprosse diente. Sobald sich die Sprosse zu kleinen Pflanzen mit mindestens einem Internodium entwickelt hatten, wurden sie in Magenta Boxen mit Wurzel-induzierendem Medium transferiert. Nach ca. 2 – 3 Wochen waren die Wurzeln groß genug, um die Pflanzen in Erde zu setzen. Ab diesem Stadium wurden die Pflanzen im Gewächshaus weiter kultiviert.

Die Pflanzen mit den Promotor-GUS oder -LUC Konstrukten wurden mit entsprechenden Tests (siehe folgendes Kapitel) auf ihre Funktion überprüft. Tomaten, die mit RNAi-Konstrukten transformiert waren, wurden mittels Northernblot und einzelsträngigen Antisense cDNA-Sonden für das AGP auf den Silencing-Effekt des AGPs getestet.

Verwendete Medien:

½ MSO Medium (1l): 2,15 g MS Salze
 100 mg Myo Inositol
 20 mg Thiamin
 0,5 mg Pyridoxin HCl
 0,5 mg Nikotin Säure
 10 g Saccharose
 → pH 5,8
 9 g Agar

KCMS Medium (1l): 4,3 g MS Salze
 1,3 mg Thiamin
 0,2 mg 2,4-D
 200 mg KH₂PO₄
 100 µl Kinetin
 100 mg Myo-Inositol
 30 g Saccharose
 → pH 5,5

	9 g Agar
2Z Medium (1l):	4,3 g MS Salze 100 mg Myo-Inositol 1 ml Nitsch Vitamine (1000x) 20 g Saccharose → pH 6,0 9 g Agar
Nach dem Autoklavieren:	2 mg Zeatin 500 mg Carbenicillin (gegen Agrobakterien) 100 mg Kanamycin (oder 2 mg Basta)
1Z Medium (1l):	Analog 2Z Medium, nur 1 mg/l Zeatin statt 2 mg.
MS Wurzelmedium (1l):	4,3 g MS Salze 1 ml Gamborg B5 Vitamine (1000x) 100 mg Myo-Inositol 30 g Saccharose → pH 5,7 8 g Agar
Nach dem Autoklavieren:	2 mg IAA Antibiotika/Basta wie bei 2Z und 1Z Medium

3.10. Funktionsanalyse des AGPs durch „knock down“ in der Tomate

Um die Funktion des AGPs herauszufinden, wurde dieses in der Tomate ausgeschaltet. Dazu dienten zwei verschiedene Ansätze, zum einen wurde die Genexpression des AGPs dauerhaft mittels RNAi-Technik (RNA Interferenz) in der Pflanze herabreguliert. Zum anderen wurde eine neue Technik verwendet, mit deren Hilfe sich die Genexpression in der Tomate vorübergehend vermindern ließ. Dabei handelt es sich um „Virus Induziertes Gen Silencing“, im Folgenden VIGS genannt.

3.10.1. Knock down mit Hilfe der RNAi-Technik

3.10.1.1. Herstellung der attAGP-RNAi-Konstrukte

Die verwendete Methode, sowie der verwendete Vektor pFGC5941, stammen von ChromDB, Details sind auf der Homepage www.chromdb.org einzusehen.

Es wurden zwei verschiedene attAGP-RNAi-Konstrukte hergestellt. Dem einen lag ein cDNA-Fragment von 200 bp zu Grunde, es beinhaltet außerdem 90 bp der 5'-UTR (Untranslatierte Region) um eine hohe Spezifität zu gewährleisten. Diese Sequenz wird im Folgenden als RNAiA-Konstrukt bezeichnet. Die zweite, RNAiB genannt, Sequenz hatte eine Länge von ca. 270 bp und stammte aus dem mittleren Teil des offenen Leserasters der attAGP-cDNA, die auch Ähnlichkeiten mit anderen AGPs aufweist. Dieses Konstrukt sollte verwandte Proteine ebenfalls ausschalten (Abb. 3-9a).

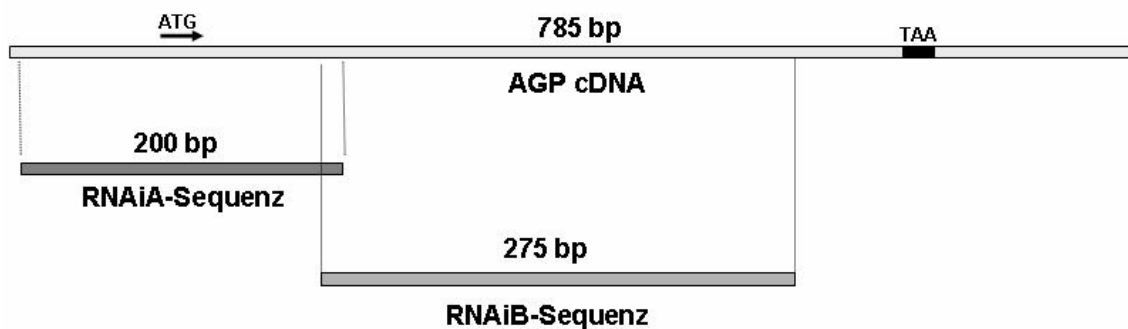


Abb. 3-9a: Schematische Darstellung der kompletten attAGP-cDNA-Sequenz und der beiden Teilsequenzen für die Konstrukte RNAiA und RNAiB. RNAiA besitzt ca. 70 bp der am 5'-Ende liegenden untranslatierten Region und ist deshalb spezifischer zum Ausschalten der attAGP-mRNA geeignet. (ATG und TAA = Start und Ende des offenen Leserasters).

Die Sequenzen RNAiA und RNAiB wurden mit Primern vervielfältigt, denen jeweils zwei Restriktionsschnittstellen angehängt wurden, nämlich XbaI und AscI am Sense-Primer und BamHI und SmaI am Antisense-Primer (Vgl. Abb. 3-9). Dies erlaubte das im Folgenden beschriebene Klonieren in zwei Schritten, vom Hersteller als „Two Step Cloning“ bezeichnet.

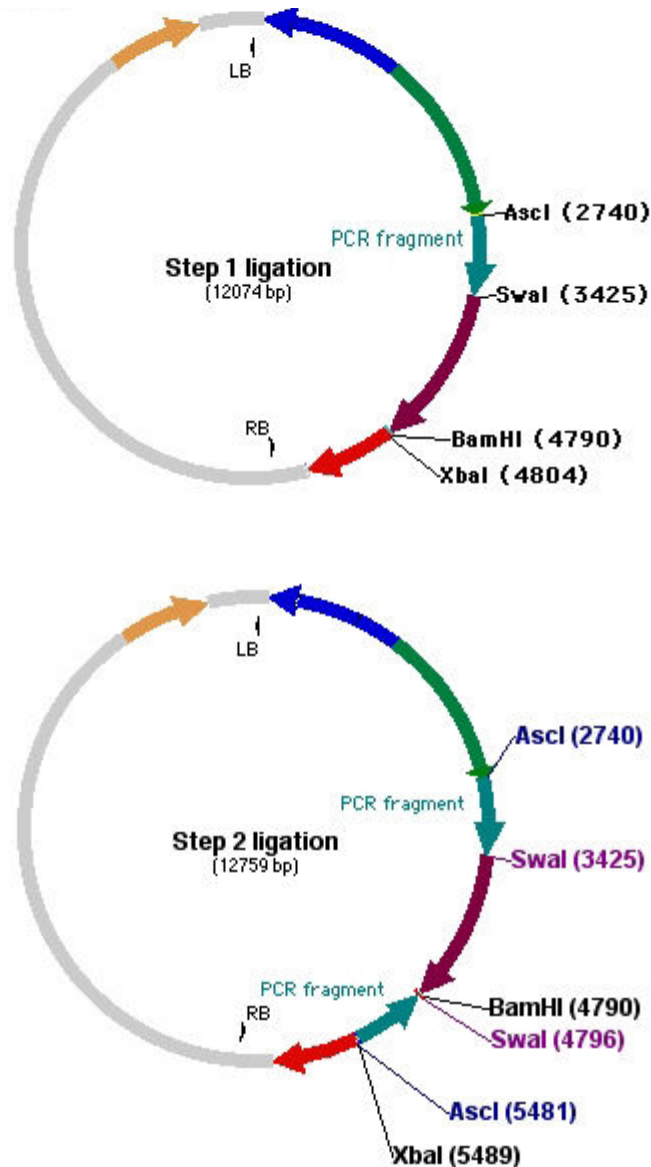


Abb. 3-10: Schema zur Herstellung der RNAi-Konstrukte mit Hilfe des „Two Step Clonings“ nach ChromDB. Oben: 1. Schritt: Das PCR Fragment wird mit den „inneren“ Restriktionsenzymen Ascl/Swal geschnitten und in den RNAi-Vektor pFGC5941 eingebracht. Unten: 2. Schritt: Das PCR Produkt wird diesmal mit den „äußeren“ Enzymen BamHI/Xbal geschnitten und in den RNAi-Vektor einkloniert. Zwischen den beiden gegensätzlich orientierten cDNA-Fragmenten liegt ein Chalkonsynthese Intron (Bordeauxfarben), das später die Schleifen Struktur ausbildet.

3.10.2. Knock down mittels VIGS

Wie eingangs von Kapitel 3.10. erwähnt, stellt das „Virus induzierte Gen silencing“ (VIGS) eine Methode dar, die zu einer transienten Herabsetzung des mRNA-Gehalts für das Ziel-Gen führte. Grundlagen für diese Technik an der Tomate wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Dinesh-Kumar von der Yale University in New Haven (USA) erarbeitet und veröffentlicht (Liu et al., 2002a und b). Von

dieser Arbeitsgruppe stammen auch die Vektoren pTRV1 und pTRV2 die für diese Technik benötigt wurden (Abb. 3-11).

Bei dieser VIGS Methode dient ein Hybridvektor aus dem Tabak-Mauchevirus als Zielvektor (pTRV2) für beliebige cDNAs. Diese werden dann in *Agrobacterium* transformiert und der betreffende cDNA-Klon zusammen mit einem *Agrobacterium*-Klon, der ein Helferplasmid enthält (pTRV1) auf ca. 4 Wochen alte Tomatenpflanzen aufgesprüht. Es kommt zur Infektion durch die Agrobakterien, die beiden Konstrukte werden in das Genom einzelner Zellen integriert, wo es zu deren Transkription und Translation kommt. In Zellen, die sowohl pTRV1 als auch pTRV2 integriert haben, wird der Virus zusammengesetzt und mit der RNA des attAGP-RNAiA-Konstruktes beladen. Der Virus dient als Vehikel zur systemischen Ausbreitung in der Pflanze. Da TRV einen RNA-Virus darstellt, und die RNA abhängige RNA Polymerase (RdRp) ein intermediäres doppelsträngiges RNA-Molekül erzeugt, kann die Pflanze über PTGS („Post Transkriptionelles Gen Silencing“) reagieren. Im Falle der doppelsträngigen attAGP-RNA führt dies zu einem Abbau der nativen attAGP-mRNA. In der freien Natur wird TRV durch Nematoden übertragen, wobei zwei Proteine die von der TRV2-RNA kodiert werden, notwendig sind. Diese beiden Sequenzen wurden in pTRV2 deletiert, die Viren können nicht mehr von Pflanze zu Pflanze übertragen werden.

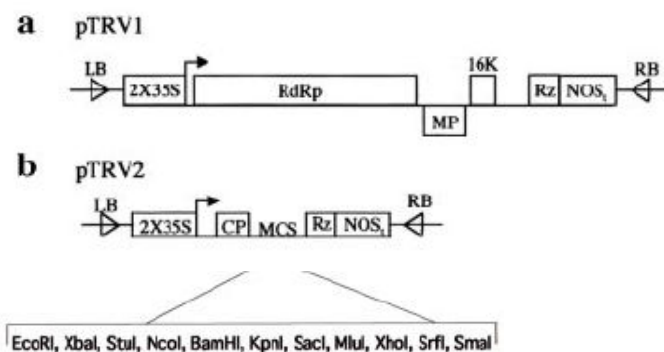


Abb. 3-11: „Helferplasmid“ pTRV1 und der Zielvektor für beliebige cDNAs pTRV2 (aus Liu et al. 2002a); a) **pTRV1**: LB/RB: left und right boarder; RdRp: RNA abhängige RNA Polymerase; MP: Movement protein; 16K: 16 kD Helferprotein; Rz: Ribozym Schnittstelle; NOS: Nopalen Synthase Terminus; b) **pTRV2**: LB/RB: left und right boarder; CP: Coat protein; MCS: Multi cloning site; Rz: Ribozym Schnittstelle; NOS: Nopalen Synthase Terminus; außerdem sind die Schnittstellen für sämtliche Restriktionsenzyme angegeben.

3.10.2.1. Herstellung der AGP-VIGS-Konstrukte

Der Vektor pTRV2 und das im Vektor pCR2.1 vorhandene RNAiA-Konstrukt wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und XbaI geschnitten und anschließend das

RNAiA-cDNA-Fragment in den Vektor eingebracht. Für die Funktion des „Knock down“ Effektes ist dabei völlig unerheblich, ob die cDNA in Sense- oder Antisense-Richtung vorliegt. Die Konstrukte wurden zunächst in *E. coli* transformiert, dann die Plasmide isoliert und auf Richtigkeit überprüft. Anschließend wurden die Konstrukte (pTRV2 mit dem RNAiA-Konstrukt) in *A. tumefaciens* (Stamm GV3101) transformiert.

3.10.2.2. Infektion der Tomatenpflanzen mit den attAGP-VIGS-Konstrukten

Es wurde je 3 ml Übernachtskultur der einzelnen Agrobakterien-Klone angesetzt. Dies waren einmal der Bakterienstamm mit dem pTRV2-attAGP-RNAiA-Konstrukt, außerdem der Stamm mit leerem pTRV2 Vektor als Kontrolle und der Agrobakterien-Klon mit dem pTRV1 Helferplasmid. Je 1 ml dieser ÜN-Kulturen wurde in einen 50 ml Ansatz LB-MES (pH 7,0) mit 20 µM Acetosyringon überimpft und über Nacht bei 28 °C geschüttelt. Am folgenden Tag wurden die Kulturen abzentrifugiert (5000 rpm, 8 min, RT) und in Inokulationsmedium (10 mM MgCl₂, 10mM MES, 200 mM Acetosyringon) resuspendiert. Die Suspensionen wurden auf eine OD₆₀₀ von 1,5 eingestellt und für 4 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Agrobakterien mit dem pTRV2-RNAiA-Konstrukt bzw. dem leeren pTRV2 Vektor im Verhältnis 1:1 mit dem pTRV1 tragenden Agrobakterien-Ansatz gemischt. Das Gemisch wurde in eine mit Druckluft betriebene Sprühpistole eingefüllt und mit ca. 4 bar Druck auf 4 Wochen alte Tomatenpflanzen aufgesprüht (vgl. Abb.3-12). Zur Verbesserung der Infektion der Tomaten, wurden deren Blätter zuvor mit einer Spülbürste ganz leicht (kaum sichtbar) verletzt.

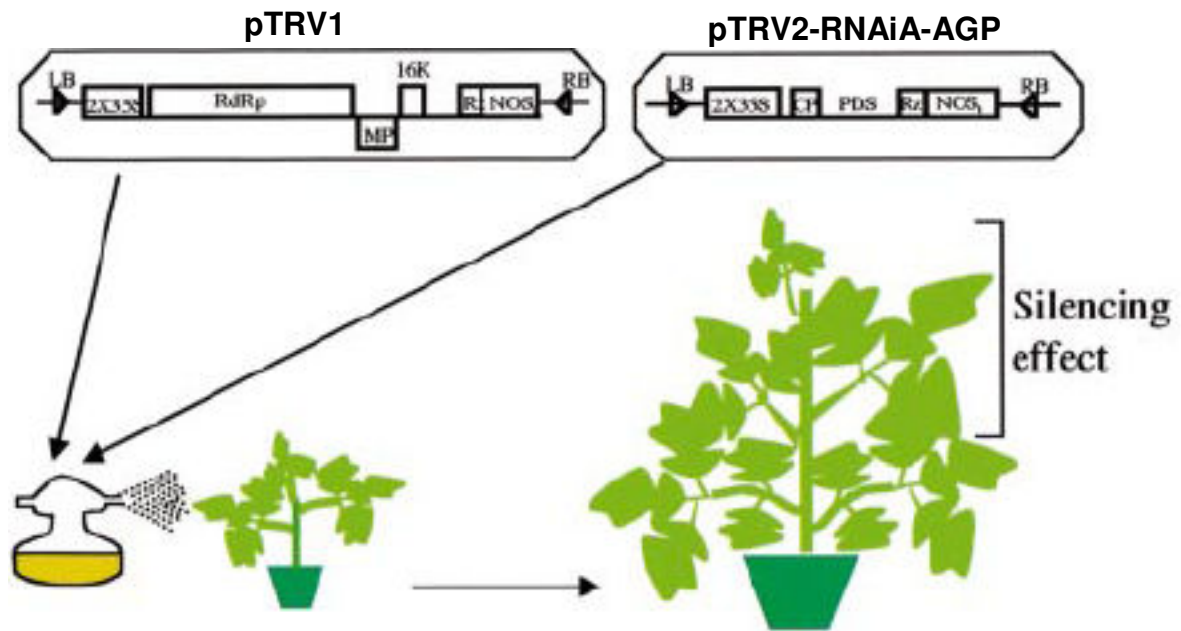


Abb. 3-12: VIGS durch Besprühen (Aus Liu et al., 2002b). Ein 1:1 Gemisch aus Agrobakterien Kulturen mit pTRV1 und pTRV2 wird mit einer „Air-Brush“ und ca. 4 bar Druck auf 4 Wochen alte Tomatenpflanzen aufgesprüht.

Zuerst wurden die Pflanzen mit den Kontrollplasmiden (pTRV1) besprüht, anschließend das Sprühwerkzeug mit 70%igem EtOH gereinigt und mit Wasser nachgespült, dann wurden die nächsten Proben eingefüllt.

Die durch das Besprühen feucht gewordenen Pflanzen wurden mit einer Plastikfolie bedeckt und über Nacht bei RT stehen gelassen. Am folgenden Tag wurden die Pflanzen in einen Klimaschrank gestellt (16/8 h Tag/Nacht; 25 °C). 10 Tage nach dem Besprühen, als der „Silencing Effekt“ über die ganze Pflanze verbreitet war, wurden die Pflanzen mit *Cuscuta* infiziert.

3.10.2.3. Überprüfen der Funktion des attAGP-VIGS-Konstruktes

Die mittels VIGS behandelten Tomatenpflanzen wurden grundsätzlich erst nach dem Messen der parasitären Anheftungskraft (vgl. folgendes Kapitel) auf die Funktion des attAGP-VIGS-Konstruktes überprüft. Unmittelbar nach dem Zugtest mit der Federwaage wurde direkt von der gemessenen Kontaktstelle (*Cuscuta*/Tomate) Gewebe (ohne Markparenchym) isoliert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Aus diesem Gewebe wurde RNA isoliert (Quiagen RNAeasy Plant Mini Kit) und diese mittels OligodT Primern in Erststrang-cDNA überschrieben (Ready-to-Go-you-Prime™ First strand beads, Amersham). Die

Erststrang-cDNA diente als Ausgangsmaterial für einen semiquantitativen PCR Test.

Zum Nachweis der endogenen attAGP-mRNA wurde ein quantitativer PCR-Test durchgeführt. Für eine PCR wurde ein Ansatz pro Pflanze angesetzt und alles bis auf die Primer dazugegeben. Der Ansatz wurde in zwei gleiche Teile geteilt. In einen Ansatz wurden spezifische Primer zum Nachweis des attAGPs zugegeben und in den anderen spezifische Primer für Aktin (ähnlich zu pTom51 Aktin) als Standard pipettiert. Die PCRs zum Nachweis von attAGP und des Aktins wurden in derselben PCR-Maschine (Biometra, T-Gradient) parallel durchgeführt. Allerdings betrug die Zyklen Zahl für Aktin 28 und die für attAGP 30. Diese optimale Anzahl von Zyklen wurde in vorangehenden Tests ermittelt, um zu gewährleisten, dass die PCR noch im linearen Bereich abläuft.

PCR Master Ansatz: 2 µl Einzelstrang-cDNA
 2 µl dNTPs
 4 µl Biotherm 10x PCR Puffer
 2 µl MgCl₂ (→ 2,5 mM Endkonzentration)
 1 µl Biotherm Taq-Polymerase
 Ad 36 µl H₂O

Obiger Ansatz wurde in 2 x 18 µl unterteilt und die jeweiligen Primer (detaillierte Sequenz siehe Anhang; alle Primer lagen als 10 µM Stammlösung vor) zupipettiert:

Ansatz 1	Ansatz 2
+ 1 µl AGP FW-Primer	+ 1 µl Aktin FW-Primer
+ 1 µl AGP REV-Primer	+ 1 µl Aktin REV-Primer

Nach der PCR wurde jeder Probe 2 µl entnommen, von jeweils der selben Pflanze Aktin- und AGP-PCR in einem Eppendorff Reaktionsgefäß gemischt und in einem 1,5%igem Agarosegel aufgetrennt. Auf dem Gel waren zwei Banden zu erkennen: Ein 380 bp langes Aktin-Fragment und ein 275 bp langes AGP-cDNA-Fragment (Siehe Kap. 2.3.6., Abb. 2-20). Die Ethidiumbromid-Fluoreszenz beider Banden wurde mit der Computersoftware Image-J quantifiziert. Für jede Pflanze wurde das

Verhältnis aus Intensität AGP-Bande zu Intensität Aktin-Bande errechnet. Der so errechnete Zahlenwert wurde dann als relative attAGP-Expression definiert.

3.10.3. Analyse der parasitären Anheftungskraft

Die parasitäre Anheftungskraft wurde mit Hilfe einer mechanischen Federwaage (0 – 1,2 N, Genauigkeit: 0,01 N) bestimmt. Hierzu wurde an einer mit *Cuscuta* infizierten Tomatenpflanze das vordere Ende der Federwaage zwischen den Raum von 2 parasitären Haustorien-Ansatzstellen eingehakt und daran gezogen. Damit der Moment des Ablösens genau beobachtet werden konnte, wurde am hinteren Ende der Federwaage ein Schreiber befestigt, der auf einem Blatt Papier eine der Zugkraft proportionale Linie markierte. Die Pflanzen standen auf einem in der Höhe variablen Hocker, so dass die zu messende Stelle an der Pflanze immer auf die Höhe der oberen Tischkante eingestellt werden konnte. Dadurch war es möglich, dass die Federwaage einfach waagrecht auf dem Tisch abgelegt werden konnte und der Schreiber auf dem Papier den entsprechenden Strich schreiben konnte. Es war außerdem wichtig, dass die Pflanze so dicht wie möglich am Tisch war, um ein Nachgeben durch Biegen des Tomatensprosses zu verhindern. Auf diese Weise erhielt man nach dem Ziehen einen Strich pro Pflanze einer bestimmten Länge, wobei 1 mm Wegstrecke der Zugkraft von 0,01 N entsprach.

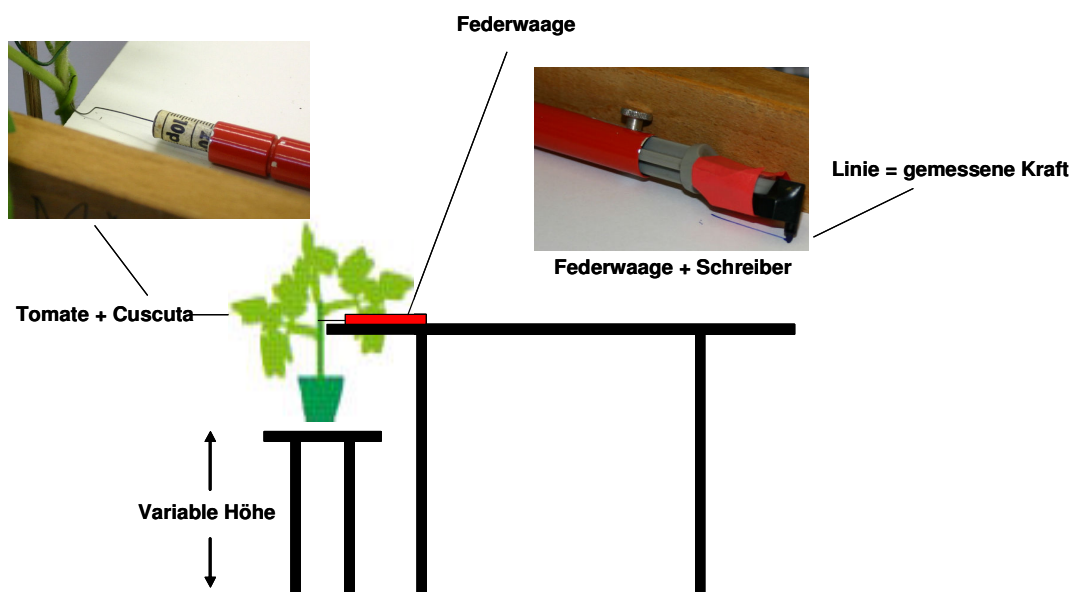


Abb. 3-13: Bestimmung der Anheftungskraft. Die Federwaage wurde am Parasiten zwischen zwei Haustorien-Ansatzstellen eingehakt und auf einem Tisch abgelegt, auf dem ein Blatt Papier mit Klebeband befestigt war. Damit die Zugwaage in eine horizontale Lage auf den Tisch kam, wurde die entsprechende Höhe am Hocker eingestellt. Die Pflanze wurde bis zum Kontakt an die Tischplatte geschoben. Dann wurde bis zum Ablösen des Parasiten an der Federwaage gezogen und gleichzeitig eine Linie auf dem Papier markiert.

3.11. Nachweis von Kalzium-Signalen

Für den Nachweis von Ca^{2+} -Signalen standen der Arbeitsgruppe transgene Tabak (Petra Dietrich, Uni Würzburg) und Tomatenpflanzen (Moyen et al., 1998) (Jonathan Jones/Sander van der Krol, Wageningen University, NL) zur Verfügung, die ein Gen der Qualle *Aequorea victoria*, das sog. Aequorin, konstitutiv exprimieren. Nachdem diese Pflanzen mit dem Substrat „Coelenterazin“ präpariert wurden, ließen sich in vivo Ca^{2+} -Signale nachweisen, die als Biolumineszenz, also Licht, sichtbar waren. Aequorin liegt konstitutiv im Cytosol der pflanzlichen Zellen vor, das Substrat Coelenterazin wird von außen appliziert und wird im Cytosol von Aequorin gebunden. Kommt es zu einem Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle, wird dieses vom Aequorin-Coelenterazin Komplex gebunden, der dann sofort in Apoaequorin und Coelenteramid dissoziiert. Bei der Dissoziation wird Licht als in Form von Biolumineszenz freigesetzt.

3.11.1. Nachweis von Kalzium-Signalen in ganzen Pflanzen

Die im Folgenden beschriebenen Arbeiten fanden ausschließlich unter grünem Licht statt, da Coelenterazin hoch lichtempfindlich ist. Ganze Tabak und Tomatenpflanzen wurden waagrecht gelegt und mit einer isotonischen $2,5 \mu\text{M}$ Coelenterazin Lösung behandelt. Hierbei wurde die Lösung mit Hilfe einer Pipette Tropfenweise auf einem Sprossabschnitt der Pflanze „abgelegt“, so dass eine perlenkettenähnliche Anordnung von Tropfen auf dem Sprossabschnitt vorhanden war. Dieser Vorgang wurde für die Dauer von 8 h stündlich kontrolliert und bei Bedarf, falls die Substratlösung nicht mehr vorhanden war, wiederholt. Während dieser Behandlung nahmen die Pflanzen das Coelenterazin lokal ins Gewebe auf. Dann wurden die Pflanzen mit *Cuscuta* infiziert und für 24 bzw. auch 48 h mit einer hoch sensitiven ccd-Kamera bei völliger Dunkelheit gefilmt. Die Aufnahmen erfolgten für die oben angegebene Dauer in einem Rhythmus von 10 min Belichtung und 2 min Regenerationsphase, also Aufnahmepause (für Kamera erforderlich). Das zu den jeweiligen in Dunkelheit aufgenommenen Filmen gehörende Lichtbild wurde unter Grünlicht vor Beginn der Dunkelaufnahmen angefertigt.

Coelenterazin Lsg.: 2,5 μ M Coelenterazin
in 500 mOsmol Sorbitol-Lsg. (Ca^{2+} frei)

3.11.2. Blattscheiben Test zur Identifikation möglicher Elicitoren

Mit einem Blattscheiben Bohrer (Durchmesser 1 cm) wurden Blattscheiben von Aequorin Tomatenpflanzen ausgestanzt und einzeln in die Gefäße einer 24-Loch-Platte gelegt. In jeder Vertiefung befanden sich bereits 300 μ l isotonische, Ca^{2+} -freie Lösung (500 mM Sorbitol). Dann wurden in völliger Dunkelheit unter laufender Kamera die Extrakte gleichzeitig mit einer Mehrkanalpipette zugegeben und Bilder für insgesamt 2 h mit je 5 min Belichtungszeit aufgenommen. Pro Blattscheibe wurden 50 μ l Extrakt zupipettiert, die Extrakte wurden wie folgt hergestellt.

Cuscuta-Spross, *Cuscuta*-Haustorium-Gewebe, sowie Tomatenblätter wurden frisch gemörsert und der erhaltene Saft 1:1 mit isotonischem Medium gemischt. Extrakt aus gemörserten *Cuscuta*-Haustorien wurde außerdem noch gekocht, um mögliche hitzeinstabile Elicitoren, v. a. Proteine, zu zerstören und zu denaturieren. Außerdem wurden Sprossabschnitte von *Cuscuta* mit Haustorien in isotonischem Medium eingelegt, und lösliche Komponenten mittels Vakuum dem pflanzlichen Gewebe entzogen und in die isotonische Lösung überführt. Es lagen letztendlich 5 verschiedene Extrakte vor, und zwar aus: *Cuscuta*-Spross ohne Haustorien, *Cuscuta*-Haustorien, *Cuscuta*-Haustorien gekocht, lösliche Bestandteile aus *Cuscuta*-Haustorien und als Kontrolle Extrakt aus Tomatenblättern. Jeder dieser Extrakte wurde 1:1 mit isotonischem Medium gemischt, und 50 μ l wurden auf die Blattscheiben pipettiert.

3.12. Biochemische Analyse des Sekundären Abschlussgewebes

Das sekundäre Abschlussgewebe, das die Tomate nach *Cuscuta*-Infektion an der Infektionsstelle bildet, wurde 7 Tage nach dem Ansetzen des Parasiten mit einem Skalpell ausgeschnitten und dann in einer Enzymlösung für mehrere Tage auf einem Schüttler leicht geschwenkt, bis restliches nicht lignifiziertes Gewebe vollständig abgebaut war. Analog wurde mit Gewebe verfahren, das die Tomate 7 Tage nach Verwundung synthetisierte, sowie mit Gewebe der Fruchtkutikula und

Xylemfasern. Anschließend wurden die einzelnen nekrotischen Plaques (oder entsprechend andere Gewebeteile, s.o.) unter einem Binokular von restlich anhaftenden Xylemfasern befreit, da diese aus Lignin bestehen und die Messergebnisse verfälschen würden. Die auf diese Weise isolierten Proben wurden auf einer Teflonmembran an der Luft getrocknet und in einem kleinen Glasgefäß mit Verschluss bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

Enzymlösung: 0,1 % Zellulase
 0,1 % Pektinase
 1 mM Natrium-Azid

3.12.1. Analyse aliphatischer Bestandteile mit der Bohr-Trifluorid Methode

Die erhaltenen Proben wurden zweimal in Chloroform gewaschen und die beiden Chloroform-Extrakte der Waschschriffe vereinigt und als b-Probe mitgeführt. Von den getrockneten Proben wurden 1 - 1,5 mg entnommen und bei 4 °C mit 1,5 ml 10 % BF₃/Methanol Lösung (Fluka; boron trifluoride (ca. 1,3 M in Methanol)) versetzt. Die Reaktionsgefäße wurden fest verschlossen (Gläschen mit Schraubdeckel und Dichtung), und über Nacht bei 70 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde nach dem Abkühlen die Reaktionslösung von der Probe entfernt und diese zweimal mit 1 ml Chloroform gewaschen. Die beiden Chloroform-Extrakte wurden dann mit der Reaktionslösung vereinigt (= a-Probe) und 20 µg Dotriacontan (= C₃₂) als interner Standard zugefügt. Die Ansätze wurden zweimal mit 1 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, die obere wässrige Phase wurde mit einer Pasteur Pipette abgenommen und verworfen. Zur organischen Phase wurde zum Trocknen eine Spatelspitze Na₂SO₄ zugegeben, die Suspension durch einen Faltenfilter filtriert, und das Filtrat auf ein Endvolumen von 100 µl aufkonzentriert (wichtig: Nicht bis zur Trockene eindampfen). 100 µg (= 100 µl) der Probe wurden in Reaktionsgefäße gegeben und für 1 - 2 Stunden bei 60 °C mit Stickstoffgas fast bis zur Trockne eingeblasen. Die Probe wurde mit 10 µl BSTFA und 10 µl Pyridin versetzt, 60 min bei 70 °C derivatisiert und 20 min bei RT abgekühlt. Die Proben wurden in 100 µl Chloroform aufgenommen und gevortext. Je 50 µl der Proben wurden in GC-Gläschen mit Mikroinsert transferiert und waren somit für die

Analyse am Gaschromatographen (GC) mit Flammen-Ionisations-Detektor (FID) und anschließender Massen Spektroskopie (M) bereit.

Programm des Gaschromatographen:

Anfangstemperatur: 50 °C

Anfangszeit: 4 min

Temperaturprog.	Rate (°C/min)	Final Temp (°C)	Final Time (min)
Level 1	10 °C	150	2
Level 2	3	320	30
Level 3	no	no	no

Anfangsdruck: 50 kPa

Anfangszeit: 70 min

Druckprogramm	Rate (kPa/min)	Final Pres. (kPa)	Final Time (min)
Level 1	10	150	30

Die Ergebnisse der MS-Analyse wurden von Dr. Gerd Vogt (Uni Würzburg) ausgewertet.

3.13. Bestimmung des Jasmonsäure-Gehalts

Folgende Methode wurde am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Müller (Uni Würzburg) etabliert. Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Gabriele Gresser durchgeführt.

Tomatenpflanzen wurden mit *Cuscuta* infiziert. Das Gewebe direkt von der Infektionsstelle wurde 12, 24, 36, und 48 Stunden nach Infektion ausgeschnitten und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nicht infizierte Pflanzen dienten als Kontrollen. Es wurde der ganze Sprossquerschnitt einer Anheftungsstelle verwendet, Länge ca. 0,5 cm. Die Proben von 3 Pflanzen wurden unter flüssigem Stickstoff gemörsert. Ca. 1 g des gemörserten Materials wurde abgenommen, das

Gewicht nochmals genau bestimmt und die Proben weiter aufgearbeitet. Die Proben durften auf keinen Fall auftauen.

Zur Extraktion wurden die Proben mit gesättigter NaCl-Lösung ad 25 ml und ad 40 ml mit Ether versetzt. Anschließend wurden 200 µl 1 M Citronensäure und 400 µl BHT 5% (Butylhydroxytoluol), sowie 50 ng Dihydro-Jasmonsäure als interner Standard zugegeben. Zusätzlich zu den Proben wurde auch eine Blindprobe (ohne Pflanzenmaterial) durchgeführt. Das Gemisch wurde 3 min mit dem Ultraturrax behandelt und anschließend 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Die Etherphase wurde abgenommen, die wässrige Phase nochmals mit Ether ausgeschüttelt und zentrifugiert. Die beiden Etherphasen wurden vereinigt und mitextrahiertes Wasser durch die Zugabe von 50 µl Dimethoxypropan entfernt. Der Extrakt wurde unter Druckluft zur Trockene eingeengt.

Zur Derivatisierung und Bildung des PFB-Esters (Pentafluorbenzylbromid) wurden die Proben in 200 µl Chloroform aufgenommen und mit 5 µl DIEPA (Diethylisopropylamin) und unter dem Abzug mit 5 µl Pentafluorbenzylbromid versetzt. Die Reaktionsansätze wurden 45 min bei 40 °C im Wasserbad inkubiert und danach wieder bis zur Trockene eingeblasen.

Bei der anschließenden Aufreinigung mittels VPE („vapor phase extraction“, Dampf-Phasen Extraktion) adsorbieren flüchtige, höhermolekulare Substanzen an eine polymere Matrix. Super Q, das Säulenmaterial der im Folgenden verwendeten Säulen, besteht aus Divinylbenzol und Ethylvinylbenzol und ist somit nur leicht polar. Für die VPE wurden die gewünschten Analyte zunächst so derivatisiert, dass sie bei 200 °C flüchtig sind. Die Säulen (mit Super Q) wurden mit einem Säulenvolumen Methanol und mit einem Säulenvolumen Diethylether gewaschen. Die Probelösung wurde in ein Glasgefäß, das oben mit einem Septum verschlossen werden kann, überführt. Die mit dem Super Q befüllte Glassäule wurde, ebenso wie der Helium-Schlauch, durch das Septum eingestochen. Zuerst wurde bei 70 °C mit dem Helium das Lösungsmittel komplett abgeblasen, dann die trockene Probe auf 250 °C erhitzt und für 3 Minuten weiter Helium durchgeblasen. Es verdampften die Analyten und adsorbierten an das Super Q-Material. Danach konnten die Analyten mit 1ml Diethylether vom Super Q-Material wieder eluiert werden und unter Druckluft trocken geblasen werden. Die Super Q-Säulchen wurden vor dem Aufbewahren nochmals mit 1 Säulenvolumen Methanol gewaschen.

Vor der GC-MS-Analyse wurden die Proben in 20 µl Hexan gelöst, 2 µl wurden injiziert. Außerdem wurde die Molekülmasse von Jasmonsäure berechnet, die für die anschließende Bestimmung wichtig war. Letztendlich wurde die Masse an Jasmonat pro g Frischgewicht berechnet.

Bedingungen:

GC-Säule: Phenomenex ZB-5 (5% Phenyl-, 95% Dimethylpolysiloxan): 30 m x 0,25 mm id 0,25 mm Filmdicke

Injektor: Splitless, 300 °C

Temperaturprogramm:

Zeit	Temperatur	Rate
0	80	0
3	80	10
25	300	0
30	300	0

MS: NCI (Negativ-Chemischer-Ionisationsmodus)

Massenbereich: entsprechend der berechneten Molekülmasse

4. Zusammenfassung

Der pflanzliche Holoparasit *Cuscuta reflexa* wächst ohne Wurzeln und Blätter windenartig an den Sprossen von anderen Pflanzen. Mit Hilfe von Haustorien dringt *Cuscuta* in das Gewebe der Wirtspflanzen ein und entzieht ihnen Nährstoffe, Assimilate und Wasser. Tomate stellt eine der wenigen Pflanzen dar, die für eine *Cuscuta*-Infektion resistent ist. Durch die Bildung eines sekundären Abschlussgewebes im direkten Infektionsbereich schützt sie sich vor einem Eindringen der parasitischen Haustorien.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das sekundäre Abschlussgewebe der Tomate aus Wundsuberin besteht. Ältere Tomatenpflanzen waren meist nicht mehr in der Lage ein solches Schutzgewebe zu produzieren und sind folgedessen für eine *Cuscuta*-Infektion kompatibel. Aufgrund eines möglichen Zusammenhanges einer Abwehrreaktion gegen *Cuscuta* und einer allgemeinen Wundreaktion der Tomate, wurden Signale wie Jasmonsäure (JA), Salizylsäure (SA) und Kalzium, die während einer Wundreaktion auftreten, näher untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass der JA-Gehalt in infizierten Tomatenpflanzen um das fünf- bis sechsfache zunimmt. Versuche mit Pflanzen, die einen konstitutiv stark verminderten SA- bzw. JA-Gehalt aufweisen, offenbaren jedoch dasselbe Abwehrverhalten gegenüber *Cuscuta* wie infizierte Kontrollpflanzen. Die Analyse von Aequorin-exprimierenden Tomaten- und Tabakpflanzen ergab, dass Ca^{2+} -Signale ca. 12 – 16 Stunden nach Ansetzen von *Cuscuta* in einem Zeitraum von mehreren Stunden in Wirtspflanzen erschienen. An Hand eines Tests mit Blattscheiben von Aequorin-exprimierenden Tomatenpflanzen konnte belegt werden, dass nur Protein-Extrakte aus *Cuscuta*-Haustorien Ca^{2+} -Signale auslösen.

Ein neu identifiziertes Arabinogalactan Protein (attAGP) der Tomate wurde molekularbiologisch charakterisiert und seine Funktion während der Abwehr gegenüber *Cuscuta* ermittelt. Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation wurden Zellen einer Zwiebelschuppen-Epidermis transient mit einem attAGP-mGFP4-cDNA-Konstrukt transformiert. Mit Hilfe eines „Confokalen Laser Scanning Mikroskops“ konnte das attAGP-mGFP4 Fusionsprotein ausschließlich in der Plasmamembran lokalisiert werden. Nach dem Klonieren und der Fusion des attAGP-Promotors mit einem Reporter gen konnte gezeigt werden, dass das

attAGP-Gen ca. 24 Stunden nach Ansetzen von *Cuscuta* direkt an der Infektionsstelle aktiv ist, was mit Ergebnissen einer Northernblot-Analyse übereinstimmt. Zur Funktionsanalyse von attAGP wurde dessen mRNA-Gehalt in Tomatenpflanzen transient mittels „Virus Induziertem Gen Silencing“ (VIGS) vermindert. Nach dem Messen der parasitären Anheftungskraft war ein direkter Zusammenhang zwischen attAGP-mRNA-Gehalt und dem Anheftungsverhalten von *Cuscuta* an der Tomate offensichtlich. Je mehr attAGP-mRNA an der *Cuscuta*-Ansatzstelle vorhanden ist, desto größer ist die Anheftungskraft von *Cuscuta*. attAGP stellt ein Anheftungsprotein dar.

Von *Cuscuta reflexa* wurde eine cDNA-Bibliothek angelegt, und diese differentiell nach Sequenzen durchmustert, deren Gene während der Entwicklung von Haustorien induziert sind. Neben mehreren noch unbekannt Sequenzen wurden cDNAs identifiziert, deren Proteine an Vorgängen wie genetische Mobilität, Signaltransduktion oder der Lyse von Zellwänden und Proteinen beteiligt sind.

5. Literaturverzeichnis

- Acosta-Garcia,G. and Vielle-Calzada,J.P. (2004). A classical arabinogalactan protein is essential for the initiation of female gametogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 2614-2628.
- Albert,M., Werner,M., Proksch,P., Fry,S.C., and Kaldenhoff,R. (2004). The cell wall-modifying xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase LeXTH1 is expressed during the defence reaction of tomato against the plant parasite *Cuscuta reflexa*. *Plant Biology* **6**, 402-407.
- Bennett,C. (1940). Acquisition and transmission of viruses by dodder (*Cuscuta subinclusa*). *Phytopathology* **30**, 2-11.
- Bernards,M.A. (2002). Demystifying suberin. *Canadian Journal of Botany- Revue Canadienne de Botanique* **80**, 227-240.
- Berry,A.M., Rasmussen,U., Bateman,K., Huss-Danell,K., Lindwall,S., and Bergman,B. (2002). Arabinogalactan proteins are expressed at the symbiotic interface in root nodules of *Alnus* spp. *New Phytologist* **155**, 469-479.
- Braam,J. and Davis,R.W. (1990). Rain-Induced, Wind-Induced, and Touch-Induced Expression of Calmodulin and Calmodulin-Related Genes in *Arabidopsis*. *Cell* **60**, 357-364.
- Capderon,M., Fer,A., and Ozenda,P. (1985). About An Unreported System Leading to the Expulsion of A Parasite - *Cuscuta* on Cotton-Plant (*Cuscuta-Lupuliformis* Krock on *Gossypium-Hirsutum*-L). *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie Iii-Sciences de la Vie-Life Sciences* **300**, 227-232.
- Chandra S,S.M.L.P.S. (1998). Measurement of Ca²⁺ fluxes during elicitation of the oxidative burst in aequorin-transformed tobacco cells. *J Biol Chem* **16**, 1838.
- Chrispeels,M.J., Holuigue,L., Latorre,R., Luan,S., Orellana,A., Pena-Cortes,H., Raikhel,N.V., Ronald,P.C., and Trewavas,A. (1999). Signal transduction networks and the biology of plant cells. *Biological Research* **32**, 35-60.
- Dawson,J.H., Musselman,L.J., and Wolswinkel,P.D., I (1994). Biology and Control of *Cuscuta*. *Weed Science* **6**, 265-317.
- Ding,L. and Zhu,J.K. (1997). A role for arabinogalactan-proteins in root epidermal cell expansion. *Planta* **203**, 289-294.
- Dorr,I. (1972). Contact of *Cuscuta*-Hyphae with Sieve Tubes of Its Host Plants. *Protoplasma* **75**, 167-&.
- Du,H., Simpson,R.J., Clarke,A.E., and Bacic,A. (1996). Molecular characterization of a stigma-specific gene encoding an arabinogalactan-protein (AGP) from *Nicotiana glauca*. *Plant Journal* **9**, 313-323.

- Fillatti, J.J., Kiser, J., Rose, R., and Comai, L. (1987). Efficient Transfer of A Glyphosate Tolerance Gene Into Tomato Using A Binary Agrobacterium-Tumefaciens Vector. *Bio-Technology* 5, 726-730.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., and Ryals, J. (1993). Requirement of Salicylic-Acid for the Induction of Systemic Acquired-Resistance. *Science* 261, 754-756.
- Gane, A.M., Weinhandl, J.A., Bacic, A., and Harris, P.J. (1994). Histochemistry and Composition of the Cell-Walls of Styles of *Nicotiana-Alata* Link et Otto. *Planta* 195, 217-225.
- Gao, M.G. and Showalter, A.M. (1999). Yariv reagent treatment induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures and implicates arabinogalactan protein involvement. *Plant Journal* 19, 321-331.
- Gao, M.G. and Showalter, A.M. (2000). Immunolocalization of LeAGP-1, a modular arabinogalactan-protein, reveals its developmentally regulated expression in tomato. *Planta* 210, 865-874.
- Gaspar, Y.M., Nam, J., Schultz, C.J., Lee, L.Y., Gilson, P.R., Gelvin, S.B., and Bacic, A. (2004). Characterization of the *Arabidopsis* lysine-rich arabinogalactan-protein AtAGP17 mutant (rat1) that results in a decreased efficiency of agrobacterium transformation. *Plant Physiology* 135, 2162-2171.
- Gunning, B.E.S. (1977). Transfer Cells and Their Roles in Transport of Solutes in Plants. *Science Progress* 64, 539-568.
- Haupt, S., Oparka, K.J., Sauer, N., and Neumann, S. (2001). Macromolecular trafficking between *Nicotiana tabacum* and the holoparasite *Cuscuta reflexa*. *Journal of Experimental Botany* 52, 173-177.
- Heidejorgensen, H.S. (1991). Cuticle Development and Ultrastructure - Evidence for A Procuticle of High Osmium Affinity. *Planta* 183, 511-519.
- Hibberd, J.M., Bungard, R.A., Press, M.C., Jeschke, W.D., Scholes, J.D., and Quick, W.P. (1998). Localization of photosynthetic metabolism in the parasitic angiosperm *Cuscuta reflexa*. *Planta* 205, 506-513.
- Higgins, V.J., Lu, H.G., Xing, T., Gelli, A., and Blumwald, E. (1998). The gene-for-gene concept and beyond: Interactions and signals. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne de Phytopathologie* 20, 150-157.
- Ihl, B., Tutakhil, N., Hagen, A., and Jacob, F. (1988). Studies on *Cuscuta-Reflexa* Roxb .7. Defense-Mechanisms of *Lycopersicon-Esculentum* Mill. *Flora* 181, 383-393.
- Israel, S., Dorr, I., and Kollmann, R. (1980). The Phloem of the Haustoria of *Cuscuta*. *Protoplasma* 103, 309-321.
- Jacob, F., Neumann, D., and Neumann, S. (1986). Studies on *Cuscuta-Reflexa* Roxb .6. Is There An Autoparasitic Withdrawal of Nutrients. *Journal of Plant Physiology* 123, 151-160.

- Jeschke,W.D., Baumel,P., Rath,N., Czygan,F.C., and Proksch,P. (1994a). Modeling of the Flows and Partitioning of Carbon and Nitrogen in the Holoparasite *Cuscuta-Reflexa* Roxb and Its Host *Lupinus-Albus* L .2. Flows Between Host and Parasite and Within the Parasitized Host. *Journal of Experimental Botany* 45, 801-812.
- Jeschke,W.D., Rath,N., Baumel,P., Czygan,F.C., and Proksch,P. (1994b). Modeling the Flow and Partitioning of Carbon and Nitrogen in the Holoparasite *Cuscuta-Reflexa* Roxb and Its Host *Lupinus-Albus* L .1. Methods for Estimating Net Flows. *Journal of Experimental Botany* 45, 791-800.
- Joosten,M.H.A.J., Cozijnsen,T.J., and Dewit,P.J.G.M. (1994). Host-Resistance to A Fungal Tomato Pathogen Lost by A Single Base-Pair Change in An Avirulence Gene. *Nature* 367, 384-386.
- Knox,J.P. (1992). Cell-Adhesion, Cell-Separation and Plant Morphogenesis. *Plant Journal* 2, 137-141.
- Knox,J.P. (1997). The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell walls. *International Review of Cytology - A Survey of Cell Biology*, Vol 171 171, 79-120.
- Kollmann,R. and Dorr,I. (1987b). Parasitic Flowering Plants. *Naturwissenschaften* 74, 12-21.
- Kollmann,R. and Dorr,I. (1987a). Parasitic Flowering Plants. *Naturwissenschaften* 74, 12-21.
- Kruijt,M., De Kock,M.J.D., and De Wit,P.J.G.M. (2005). Receptor-like proteins involved in plant disease resistance - Review. *Molecular Plant Pathology* 6, 85-97.
- Liu,Y.L., Schiff,M., and Dinesh-Kumar,S.P. (2002a). Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant Journal* 31, 777-786.
- Liu,Y.L., Schiff,M., Marathe,R., and Dinesh-Kumar,S.P. (2002b). Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant Journal* 30, 415-429.
- Loffler,C., Czygan,F.C., and Proksch,P. (1999). Role of indole-3-acetic acid in the interaction of the phanerogamic parasite *Cuscuta* and host plants. *Plant Biology* 1, 613-617.
- Machado,M.A. and Zetsche,K. (1990). A Structural, Functional and Molecular Analysis of Plastids of the Holoparasites *Cuscuta-Reflexa* and *Cuscuta-Europaea*. *Planta* 181, 91-96.
- Macleod,D. (1961). Photosynthesis in *Cuscuta*. *Experientia* 17, 542-&.
- Marcone,C., Hergenbahn,F., Ragozzino,A., and Seemuller,E. (1999). Dodder transmission of pear decline, European stone fruit yellows, rubus stunt, *Picris echioides* yellows and cotton phyllody phytoplasmas to periwinkle. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift* 147, 187-192.

- McConn,M., Creelman,R.A., Bell,E., Mullet,J.E., and Browse,J. (1997). Jasmonate is essential for insect defense Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 5473-5477.
- Moyen,C., Hammond-Kosack,K.E., Jones,J., Knight,M.R., and Johannes,E. (1998). Systemin triggers an increase of cytoplasmic calcium in tomato mesophyll cells: Ca²⁺ mobilization from intra- and extracellular compartments. *Plant Cell and Environment* **21**, 1101-1111.
- Nothnagel,E.A. (1997). Proteoglycans and related components in plant cells. *International Review of Cytology - A Survey of Cell Biology, Vol 174* **174**, 195-291.
- Olsson,P.A., Kjellbom,P., and Rosendahl,L. (2002). Rhizobium colonization induced changes in membrane-bound and soluble hydroxyproline-rich glycoprotein composition in pea. *Physiologia Plantarum* **114**, 652-660.
- Oparka,K.J., Roberts,A.G., Boevink,P., Santa Cruz,S., Roberts,L., Pradel,K.S., Imlau,A., Kotlizky,G., Sauer,N., and Epel,B. (1999). Simple, but not branched, plasmodesmata allow the nonspecific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell* **97**, 743-754.
- Oxley,D. and Bacic,A. (1999). Structure of the glycosylphosphatidylinositol anchor of an arabinogalactan protein from *Pyrus communis* suspension-cultured cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 14246-14251.
- Park,M.H., Suzuki,Y., Chono,M., Knox,J.P., and Yamaguchi,I. (2003). CsAGP1, a gibberellin-responsive gene from cucumber hypocotyls, encodes a classical arabinogalactan protein and is involved in stem elongation. *Plant Physiology* **131**, 1450-1459.
- Pennell,R.I., Janniche,L., Kjellbom,P., Scofield,G.N., Peart,J.M., and Roberts,K. (1991). Developmental Regulation of A Plasma-Membrane Arabinogalactan Protein Epitope in Oilseed Rape Flowers. *Plant Cell* **3**, 1317-1326.
- Pennell,R.I. and Roberts,K. (1990). Sexual Development in the Pea Is Presaged by Altered Expression of Arabinogalactan Protein. *Nature* **344**, 547-549.
- Roos,U.P. and Aldrich,H.C. (1988). Intracellular-Localization and Morphology of Rhabdovirus-Like Particles in Dodder (*Cuscuta* Sp). *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* **66**, 2499-2504.
- Ryan,C.A. (1989). Proteinase-Inhibitor Gene Families - Strategies for Transformation to Improve Plant Defenses Against Herbivores. *Bioessays* **10**, 20-24.
- Ryan,C.A. and Moura,D.S. (2002). Systemic wound signaling in plants: A new perception. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 6519-6520.

Sahm,A., Pfanz,H., Grunsfelder,M., Czygan,F.C., and Proksch,P. (1995). Anatomy and Phenylpropanoid Metabolism in the Incompatible Interaction of *Lycopersicon-Esculentum* and *Cuscuta-Reflexa*. *Botanica Acta* 108, 358-364.

Schmelzer,K. (1955). Die Ubertragbarkeit des Tabakmauche-Virus Durch *Cuscuta*-Arten. *Naturwissenschaften* 42, 19.

Schulz,A. (1987). Sieve-Element Differentiation and Fluoresceine Translocation in Wound-Phloem of Pea Roots After Complete Severance of the Stele. *Planta* 170, 289-299.

Serpe,M.D. and Nothnagel,E.A. (1994). Effects of Yariv Phenylglycosides on *Rosa* Cell-Suspensions - Evidence for the Involvement of Arabinogalactan-Proteins in Cell-Proliferation. *Planta* 193, 542-550.

Sherrier,D.J., Prime,T.A., and Dupree,P. (1999). Glycosylphosphatidylinositol-anchored cell-surface proteins from *Arabidopsis*. *Electrophoresis* 20, 2027-2035.

Showalter,A.M. (1993). Structure and Function of Plant-Cell Wall Proteins. *Plant Cell* 5, 9-23.

Showalter,A.M. (2001). Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58, 1399-1417.

Shulaev,V., Silverman,P., and Raskin,I. (1997). Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature* 385, 718-721.

Srivastava,S., Nighojkar,A., and Kumar,A. (1994). Multiple Forms of Pectin Methylesterase from *Cuscuta-Reflexa* Filaments. *Phytochemistry* 37, 1233-1236.

Sun,W.X., Kieliszewski,M.J., and Showalter,A.M. (2004). Overexpression of tomato LeAGP-1 arabinogalactan-protein promotes lateral branching and hampers reproductive development. *Plant Journal* 40, 870-881.

Suzuki,Y., Kitagawa,M., Knox,J.P., and Yamaguchi,I. (2002). A role for arabinogalactan proteins in gibberellin-induced alpha-amylase production in barley aleurone cells. *Plant Journal* 29, 733-741.

Svetek,J., Yadav,M.P., and Nothnagel,E.A. (1999). Presence of a glycosylphosphatidylinositol lipid anchor on rose arabinogalactan proteins. *Journal of Biological Chemistry* 274, 14724-14733.

Tamayo,M.C., Rufat,M., Bravo,J.M., and San Segundo,B. (2000). Accumulation of a maize proteinase inhibitor in response to wounding and insect feeding, and characterization of its activity toward digestive proteinases of *Spodoptera littoralis* larvae. *Planta* 211, 62-71.

Tsivion,Y. (1978). Loading of Assimilates and Some Sugars Into the Translocation System of *Cuscuta*. *Australian Journal of Plant Physiology* 5, 851-857.

van Hengel, A.J., Barber, C., and Roberts, K. (2004). The expression patterns of arabinogalactan-protein AtAGP30 and GLABRA2 reveal a role for abscisic acid in the early stages of root epidermal patterning. *Plant Journal* 39, 70-83.

Vaughn, K.C. (2002). Attachment of the parasitic weed dodder to the host. *Protoplasma* 219, 227-237.

Vaughn, K.C. (2003b). Dodder hyphae invade the host: a structural and immunocytochemical characterization. *Protoplasma* 220, 189-200.

Vaughn, K.C. (2003a). Dodder hyphae invade the host: a structural and immunocytochemical characterization. *Protoplasma* 220, 189-200.

Werner, M., Uehlein, N., Proksch, P., and Kaldenhoff, R. (2001). Characterization of two tomato aquaporins and expression during the incompatible interaction of tomato with the plant parasite *Cuscuta reflexa*. *Planta* 213, 550-555.

WOLSWINK, P. (1974). Enhanced Rate of C-14-Solute Release to Free Space by Phloem of Vicia-Faba Stems Parasitized by *Cuscuta*. *Acta Botanica Neerlandica* 23, 177-188.

Wolswinkel, P. (1978). Phloem Unloading in Stem Parts Parasitized by *Cuscuta* - Release of C-14 and K⁺ to Free Space at 0-Degrees-C and 25-Degrees-C. *Physiologia Plantarum* 42, 167-172.

Youl, J.J., Bacic, A., and Oxley, D. (1998). Arabinogalactan-proteins from *Nicotiana glauca* and *Pyrus communis* contain glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 7921-7926.

Zhang, Y., Brown, G., Whetten, R., Loopstra, C.A., Neale, D., Kieliszewski, M.J., and Sederoff, R.R. (2003). An arabinogalactan protein associated with secondary cell wall formation in differentiating xylem of loblolly pine. *Plant Molecular Biology* 52, 91-102.

Zitierte Diplom-/Doktorarbeiten:

Albert, M. (2002). Molekularbiologische Untersuchungen zur Interaktion des phanerogamen Holoparasiten *Cuscuta reflexa* mit dem inkompatiblen Wirt *Lycopersicon esculentum*. Diplomarbeit

Werner, M. (2000). Molekulare Charakterisierung der Reaktion von *Lycopersicon esculentum* auf den phanerogamen Parasiten *Cuscuta reflexa*. Dissertation

6. Anhang

6.1. Liste der Abkürzungen

ABA	Abscisinsäure
AGP	Arabinogalactan Protein
Amp	Ampicillin
attAGP	attachment AGP
Ca ²⁺	Kalzium
Carb	Carbenicillin
cDNA	Copy-DNA
Cf-Gen	<i>Cladosporium fulvum</i> Resistenzgen
CLSM	Confokales Laser Scanning Mikroskop
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ERE	Elicitor-Response-Element
GC	Gaschromatograph
GFP	Green Fluorescent Protein
GPI	Glycosyl-Phosphatidy-Inositol
GUS	Glucuronidase
HR	Hypersensitivitäts-Reaktion
JA	Jasmonsäure
Kan	Kanamycin
Luc	Luciferase
mGFP4	mutated GFP4
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
MS-Medium	Murashige & Skoog
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PI	Proteinase-Inhibitor
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SA	Salicylsäure
Sig1/2	Signaling (Mutante mit Mutation im JA-Signalweg)
TRV	Tabak Rauten Virus
ÜN-Kultur	Über-Nacht-Kultur
VIGS	Virus Induced Gene Silencing
X-Gluc	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronic acid

6.2. Verwendete Primer

Nr.	Name	Sequenz	Siehe unter
350	AGPtrans-FW	5`-aagcctatggctctctcacatcctatg-3`	AGP-GFP Fusion
351	AGPtrans-REV	5`-agcgctgaaaaaagtgctacactcc-3`	AGP-GFP Fusion
391	AGPprom1	5`-ggggccatcatgggggattgg-3`	AGP Promotor Klonierung
392	AGPprom2	5`-ggattgggcagcagtgagggc-3`	AGP Promotor Klonierung
402	AGPrnaiA-s	5`-attctagaggcgccgacaacctctgtgtgcac-3`	RNAiA - VIGS
403	AGPrnaiA-as	5`-atggatccatttaaatggaagtagttggtggcattg-3`	RNAiA - VIGS
404	AGPrnaiB-s	5`-attctagaggcgcccaatgccaccaactactcc-3`	RNAiB
405	AGPrnaiB-as	5`-atggatccatttaaatgagaagccattgactcaccac-3`	RNAiB
409	AGPluc-rev	5`-ctctcgaggaggaagttgtattctgtagg-3`	AGPprom-Luc Fusion
410	AGPluc-fw	5`-ctggtaccactatagggcacgcgtggtc-3`	AGPprom-Luc Fusion
411	AGPgus-rev	5`-cttctagagaggaagttgtattctgtagg-3`	AGPprom-Gus Fusion
412	AGPgus-fw	5`-ctaagcttactatagggcacgcgtggtc-3`	AGPprom-Gus Fusion
182	SMARTIIA	s. CLONTECH-Manual	SMART TM -RACE cDNA Kit
183	3`CDS	s. CLONTECH-Manual	SMART TM -RACE cDNA Kit
177	NUP	s. CLONTECH-Manual	SMART TM -RACE cDNA Kit

Tab. 6-1: Verwendete Primer; Die Nummer gibt den Standort in der „Primerliste“ der AG Kaldenhoff an.

6.3. Verwendete Plasmide

6.3.1. Der RNAi Vektor pFGC5941

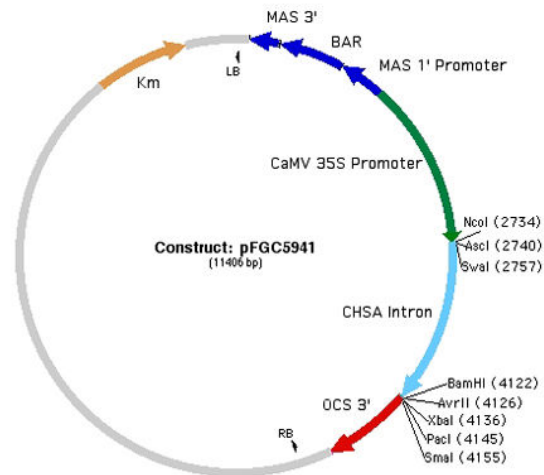


Abb. 6-1: Der RNAi-Vektor pFGC5941 der Firma CHROMdb (www.chromdb.org)

6.3.2. Der TA-Klonierungsvektor pCR2.1

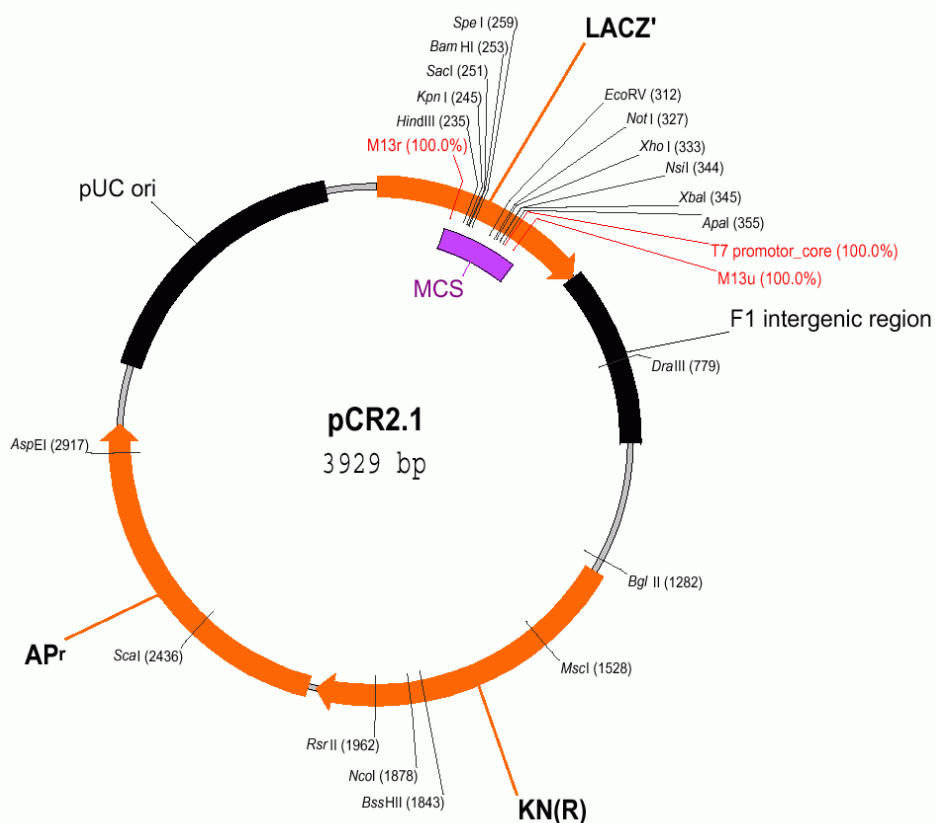


Abb. 6-2: Der TA-Klonierungsvektor pCR2.1 von Invitrogen.

6.3.3. Vektor zur transienten Transformation

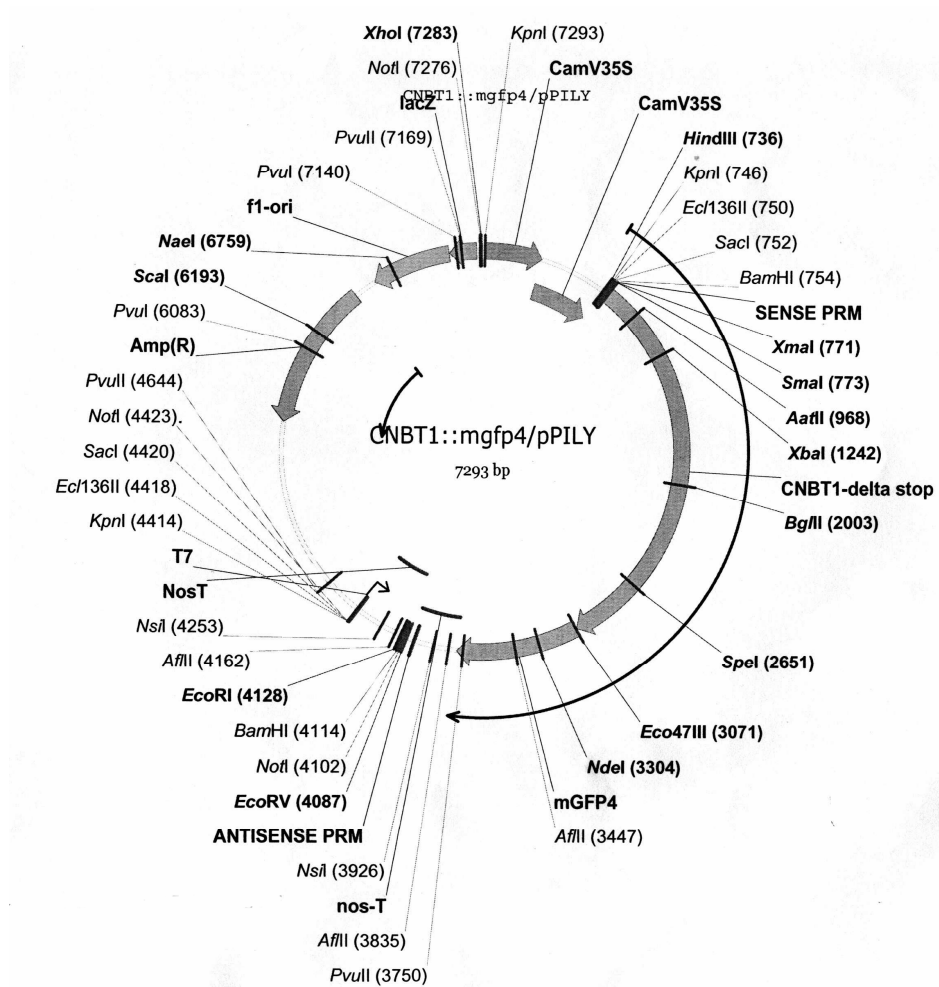


Abb. 6-3: Der Ausgangsvektor pPILY mit der fusionierten cDNA CNBT1:mGFP4; die CNBT1 Sequenz wurde mit HindIII/Eco47III ausgeschnitten und durch das offene Leseraster der attAGP-cDNA ersetzt.

Publikationsliste

Albert M., Werner M., Proksch P., Fry S.C., and Kaldenhoff R. (2004). The cell wall-modifying xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase LeXTH1 is expressed during the defence reaction of tomato against the plant parasite *Cuscuta reflexa*. *Plant Biology* 6, 402-407.

Albert M., van der Krol A., and Kaldenhoff R. (2005). An attack of the plant parasite *Cuscuta reflexa* induces the expression of attAGP, an attachment protein of the host tomato. Zur Begutachtung bei "The Plant Cell"

Präsentationen

Tagung des SFB 567 in Retzbach, 2002. *Cuscuta reflexa* - News about the interaction with hostplants.

GRK 340, Summer school in Riezlern 2003. Reactions to the plant parasite *Cuscuta reflexa*.

Posterpräsentationen

Jahrestagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Freiburg i. Brg., 2002. The LeXTH1 is expressed in tomato during the defence reaction to *Cuscuta reflexa*.

Tagung zur Begutachtung des SFB 567, Würzburg, 2003. Molekulare Mechanismen der Inkompatibilität von Tomaten gegenüber dem Parasiten *Cuscuta reflexa*.

Tagung "Molekularbiologie der Pflanzen", Dabringhausen, 2004. Molekularbiologische Studien zur Interaktion von *C. reflexa* mit Wirtspflanzen. (Ausgezeichnet mit dem „von Sengbusch-Preis“)

Jahrestagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Braunschweig, 2004. An attacking plant and the plant defence.

Tagung "Molekularbiologie der Pflanzen", Dabringhausen, 2005. The function of an Arabinogalactan protein during tomato defence against *Cuscuta*.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Markus Albert
Geburtsdatum	27.01.1977
Geburtsort	Schweinfurt
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulausbildung:

1983 – 1987	Grundschule Interessfeld
1987 – 1996	Gymnasium Bad Königshofen i. Gr.
Juni 1996	Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

1996 – 1997	Sozialwerk Salem, Höchheim
-------------	----------------------------

Hochschulstudium:

1997 – 2001	Studium der Biologie mit Hauptfach „molekulare Pflanzenphysiologie“ an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
2001 – 2002	Diplomarbeit mit dem Thema: „Molekularbiologische Untersuchungen zur Interaktion des Holoparasiten <i>Cuscuta reflexa</i> mit dem inkompatiblen Wirt <i>Lycopersicon esculentum</i> “

Promotion:

2002 – 2003	Promotionsstudium bei Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff am Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik der Universität Würzburg.
September 2003	Wechsel an die Technische Universität Darmstadt. Weiterführung des Promotionsstudiums im Institut für Botanik bei Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff.
Oktober 2005	Abschluss der Promotion

Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

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

Darmstadt, August 2005

.....