

Botanik

Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen
zur Rolle Glycin-reicher Proteine in der Interaktion
der Kichererbse (*Cicer arietinum* L.) mit
dem phytopathogenen Pilz *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Holger Cornels
aus Marl

2001

Dekan: Prof. Dr. W. Lange

Erster Gutachter: Prof. Dr. W. Barz

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. B. Moerschbacher

Tag der mündlichen Prüfung:

Tag der Promotion:

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht:

Kongreßbeiträge

Cornels, H.; Ichinose, Y.; Barz, W. (1999) Accumulation of mRNAs encoding two novel glycine-rich proteins (GRPs) in chickpea (*Cicer arietinum* L.) plants after infection with *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr., 9th International Congress Molecular Plant-Microbe Interactions, Amsterdam, Abstract Book, S. 130.

Veröffentlichungen

Ichinose, Y.; Tiemann, K.; Schwenger-Erger, C.; Toyoda, K.; Hein, F.; Hanselle, T.; Cornels, H.; Barz, W. (2000) Genes expressed in *Ascochyta rabiei*-inoculated chickpea plants and elicited cell cultures as detected by differential cDNA-hybridization. Z.Naturforsch. **55c**:44-54

Cornels, H.; Ichinose, Y.; Barz, W. (2000) Characterization of cDNAs encoding two glycine-rich proteins in chickpea (*Cicer arietinum* L.): accumulation in response to fungal infection and other stress factors. Plant Science **154(1)**:83-88

Inhaltsverzeichnis

Veröffentlichungen	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungen	VII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 GRUNDLAGEN DER PHYTOPATHOLOGIE	1
1.1.1 Einführung.....	1
1.1.2 Wirt-Parasit-Interaktionen.....	2
1.1.3 Pflanzliche Resistenzmechanismen.....	3
1.1.4 Induzierbare Abwehrreaktionen.....	5
1.1.5 Systeme zur Erforschung von Wirt-Pathogen-Interaktionen.....	8
1.2 DAS INTERAKTIONSSYSTEM KICHERERBSE/<i>ASCOCHYTA RABIEI</i>	9
1.2.1 Die Kichererbse (<i>Cicer arietinum</i> L.).....	9
1.2.2 Der Schadpilz <i>Ascochyta rabiei</i> (Pass.) Labr.....	11
1.2.3 Stand der Forschung I: Molekulare Grundlagen der Interaktion.....	13
1.3 STRUKTURPROTEINE DER PFLANZLICHEN ZELLWAND.....	16
1.3.1 Aufbau der pflanzlichen Zellwand	16
1.3.2 Einteilung der Zellwandstrukturproteine	18
1.3.3 Die mögliche Rolle von Zellwandstrukturproteinen in der Pathogenabwehr	20
1.4 GLYCIN-REICHE PROTEINE.....	21
1.4.1 Einführung.....	21
1.4.2 Eigenschaften und mögliche Funktionen pflanzlicher GRPs	21
1.4.2.1 Strukturelle Merkmale	21
1.4.2.2 Induktion von GRPs.....	23
1.4.2.3 Lokalisation und mögliche Funktionen.....	24
1.4.2.4 Glycin-reiche Proteine in Wirt-Pathogen-Interaktionen.....	26
1.4.3 Stand der Forschung II: Glycin-reiche Proteine der Kichererbse	27
1.5 ZIELSETZUNG.....	28

2	MATERIAL UND METHODEN	29
2.1	MATERIALIEN	29
2.1.1	Chemikalien	29
2.1.2	Organismen	30
2.1.2.1	Pflanzenkultivare.....	30
2.1.2.2	Pilzstämme	30
2.1.2.3	Bakterien.....	30
2.2	ANZUCHT und INFEKTION	31
2.2.1	Anzucht der Kichererbsen	31
2.2.2	Herstellung einer Sporensuspension von <i>Ascochyta rabiei</i>	31
2.2.3	Infektion	31
2.2.4	Verwundung von Blättern	31
2.2.5	Ernte und Lagerung von Pflanzenmaterial	32
2.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	33
2.3.1	Sequenzierung	33
2.3.1.1	Anzucht von <i>E. coli</i>	33
2.3.1.2	Plasmidisolierung.....	33
2.3.1.3	Sequenzierung	33
2.3.2	Northern-Analysen	34
2.3.2.1	Isolation von Gesamt-RNA aus Pflanzen.....	34
2.3.2.2	Isolation von Gesamt-RNA aus Bakterien.....	35
2.3.2.3	Herstellung von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden.....	35
2.3.2.4	Gelelektrophorese und Northern-Blot	35
2.3.2.5	Hybridisierung.....	37
2.3.2.6	Immunologischer Nachweis und Visualisierung	38
2.3.3	PCR zur Amplifizierung des 5`-Endes des Leserahmens von GRP1 und GRP2 ... 39	
2.3.3.1	Ausgangsmaterial.....	39
2.3.3.2	PCR-Reaktion.....	39
2.3.4	Herstellung eines Expressionskonstruktes zur heterologen Expression von GRP1 in <i>E. coli</i>	40
2.3.4.1	PCR zur Addition von Restriktionsschnittstellen.....	41
2.3.4.2	Restriktion.....	41
2.3.4.3	Agarose-Gelelektrophorese und Elution von DNA aus Agarosegelen.....	42
2.3.4.4	Ligation.....	43
2.3.4.5	Transformation von <i>E. coli</i> und Selektion von Tranformanten.....	44

2.4	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	45
2.4.1	Heterologe Expression	45
2.4.1.1	Selektion von Expressionsklonen (Colony-Blot)	45
2.4.1.2	Wachstumsbedingungen und Induktion	46
2.4.1.3	Kontrolle des Wachstumsverlaufes	46
2.4.1.4	Proteinextraktion aus Bakterien und Aufreinigung über den His-tag.....	46
2.4.1.5	Nachweis des exprimierten Proteins über den His-tag.....	47
2.4.2	Proteinextraktion aus Kichererbsen.....	47
2.4.2.1	Gesamtextrakt	48
2.4.2.2	Cytosolischer Extrakt und Extraktion ionisch gebundener Zellwandproteine	48
2.4.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	49
2.4.3	Western-Analysen.....	49
2.4.3.1	Gewinnung eines Antiserums gegen das repetitive Element der GRPs.....	49
2.4.3.2	Benutzte Antikörper.....	50
2.4.3.3	SDS-PAGE und Western-Blot	50
2.4.3.4	Färbung von Acrylamidgelen.....	51
2.4.3.5	Western-Analyse und Nachweisreaktionen	52
2.4.4	<i>In vitro</i>-Quervernetzung von Proteinen.....	54
2.5	IMMUNOHISTOLOGIE/<i>IN SITU</i>-NACHWEIS	54
2.5.1	Mikroskopische Untersuchungen.....	54
2.5.1.1	Färbung von mikroskopischen Präparaten mit Toluidinblau.....	54
2.5.2	<i>In situ</i>-Nachweis des heterolog exprimierten GRP in unlöslichen Bestandteilen von Bakterienzellen.....	54
2.5.3	Herstellung von Gewebeabdrücken (Tissue-Blots).....	56
2.6	COMPUTERUNTERSTÜTZTE METHODEN	56
2.6.1	Programme zur Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen.....	56
2.6.1.1	Bearbeitung von Sequenzrohdaten	56
2.6.1.2	Datenbankrecherche	57
2.6.1.3	Sequenzvergleich.....	57
2.6.2	Programme zur Ableitung und Charakterisierung von Proteinsequenzen.....	57
2.6.2.1	Ableitung von Aminosäuresequenzen und Bestimmung von pI und MW	57
2.6.2.2	Erkennung von Signalsequenzen und Sekundärstrukturen.....	57
2.6.2.3	Phylogenetische Analyse.....	58
2.6.3	Elektronische Dokumentation von Gelen, Blots und mikroskopischen Aufnahmen.....	58

3	ERGEBNISSE.....	59
3.1	COMPUTERUNTERSTÜTZTE UNTERSUCHUNGEN	59
3.1.1	Neue Erkenntnisse zur Vollständigkeit der GRP-Sequenzen.....	59
3.1.2	Signalsequenzen und Zielsteuerung der GRP-Genprodukte	61
3.1.3	Weitere Charakteristika der GRP1-Sequenz	63
3.1.4	Verwandtschaftliche Stellung der Kichererbsen-GRPs im Pflanzenreich	65
3.2	AMPLIFIZIERUNG DES 5`-ENDES DES LESERAHMENS VON GRP2.....	67
3.3	ANALYSE DES EXPRESSIONSVERLAUFES DER GRP-MRNA.....	68
3.3.1	Expressionsverlauf nach Infektion mit <i>Ascochyta rabiei</i>.....	68
3.3.2	Induktion der Expression durch andere Streßfaktoren: Verwundung und „Manipulationsstreß“	69
3.3.3	Organspezifische Expression und Vergleich des resistenten mit dem suszeptiblen Kultivar	71
3.4	HETEROLOGE EXPRESSION	72
3.4.1	Herstellung des Expressionskonstruktes	73
3.4.1.1	Das His-tag-System	73
3.4.1.2	Ablauf der Konstruktion	74
3.4.1.3	Übersicht über das fertige Expressionskonstrukt.....	78
3.4.2	Selektion von Expressionsklonen mittels Colony-Blot.....	79
3.4.3	Heterologe Expression von GRP1exp und damit in Zusammenhang stehende Beobachtungen.....	80
3.4.3.1	Erste Versuche zur heterologen Expression.....	80
3.4.3.2	Nachweis des GRP1exp-Transkriptes.....	81
3.4.3.3	Wachstumsverlauf der Expressionskulturen.....	82
3.4.3.4	Nachweis des heterolog exprimierten Proteins	84
3.4.3.5	Detektion des exprimierten Proteins in unlöslichen Zellbruchstücken.....	85
3.5	IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	87
3.5.1	Western-Analysen.....	87
3.5.1.1	Voruntersuchungen.....	87
3.5.1.2	Vergleich zwischen cytosolischen Proteinen und ionisch gebundenen Zellwandproteinen	88
3.5.1.3	Vergleich der Proteinextrakte aus unterschiedlichen Organen der Kichererbse	91
3.5.2	Versuche zur <i>in vitro</i>-Quervernetzung	93
3.5.3	Tissue-Blots	94

4	DISKUSSION	97
4.1	SEQUENZANALYSEN.....	97
4.1.1	Untersuchungen zur Vollständigkeit der Sequenz von GRP1	97
4.1.2	Zielsteuerung der GRPs: Vakuole oder Apoplast?.....	98
4.1.3	Verwandschaftliche Beziehungen der GRPs	99
4.2	VERSUCHE ZUR AMPLIFIZIERUNG DES 5´-ENDES DER NUKLEOTIDSEQUENZ VON GRP2.....	101
4.3	EXPRESSIONSSTUDIEN	102
4.3.1	Infektion und Verwundung.....	102
4.3.2	Manipulationsstreß.....	103
4.3.3	Organspezifische Expression und Unterschiede im Expressionsverhalten zwischen suszeptiblem und resistentem Kultivar	104
4.4	HETEROLOGE EXPRESSION	105
4.4.1	Fehlersuche: Warum stellen die Bakterien das Wachstum ein?	105
4.4.2	Toxische GRPs?.....	106
4.5	WESTERN-ANALYSEN	108
4.5.1	Detektion von GRPs in Extrakten löslicher Proteine und ionisch gebundener Zellwandproteine – Hinweise auf eine mögliche Polymerisierung?	109
4.5.2	Peroxidative Quervernetzung des heterolog exprimierten GRPs	111
4.6	LOKALISATION DER GRPs MITTELS TISSUE-BLOTS	113
4.6.1	Vorteile und Schwächen des „Tissue-blot“	113
4.6.2	Korreliert die Lokalisation der GRP-Expression mit der Lignifizierung oberirdischer Leitgewebelemente?	113
4.7	FAZIT: WELCHE ROLLE SPIELEN GRPs IN DER INTERAKTION DER KICHERERBSE MIT <i>ASCOCHYTA RABIEI</i> ?	115
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	117
6	LITERATUR	119
	Danksagung	140
	Lebenslauf	141

Abkürzungen

<i>A. rabiei</i>	<i>Ascochyta rabiei</i>
AGP	Arabinogalaktanprotein
AP	alkalische Phosphatase
<i>Aqua bidest</i>	Aqua bidestillata
<i>Aqua dest</i>	Aqua destillata
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin (engl.: <i>bovine serum albumin</i>)
<i>C. arietinum</i>	<i>Cicer arietinum</i>
cDNA	komplementäre DNA (engl.: <i>complementary DNA</i>)
Cyt	Cytochrom
d	Tag(e)
DIG	Digoxigenin
dNTP	Desoxyribonukleotid-Gemisch (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBI	European Bioinformatics Institute

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMBL	European Molecular Biological Laboratory
et al.	et altera (lat.: und andere)
FAO	Food and Agricultural Organization of the United Nations
GRP	Glycin-reiches Protein
h	Stunde(n)
ha	Hektar
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl]-ethansulfonsäure
HRGP	Hydroxyprolin-reiches Glykoprotein
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl.: <i>horse raddish peroxidase</i>)
ICARDA	International Center for Agricultural Research in the Dry Areas
ICRISAT	International Crops Research Institute for the Semi-arid Tropics
ILC	International Line of Chickpea
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasen (1000 Basenpaare)
kDa	Kilodalton
M	molar (mol/Liter)
min	Minute(n)
mol	Mol (6,022045 x 10 ²³ Atome oder Moleküle)
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure

mRNA	Boten-RNA (engl.: <i>messenger-RNA</i>)
MW	Molekulargewicht
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NMR	engl.: <i>nuclear magnetic resonance</i>
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (engl.: <i>open reading frame</i>)
P	Wahrscheinlichkeit
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
pers.	persönlich
pI	Isoelektrischer Punkt
<i>Pmg</i>	<i>Phytophthora megasperma</i>
PRP	Prolin-reiches Protein
PR-Protein	Pathogenese-begleitendes Protein (engl.: <i>pathogenesis-related protein</i>)
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RE	repetitives Element
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute (engl.: <i>rotations per minute</i>)
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion
SAR	systemisch erworbene Resistenz (engl.: <i>systemic acquired resistance</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>sodiumdodecylsulphate</i>)
SSC	Natriumcitratpuffer mit NaCl
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-NaCl-Puffer (engl.: <i>Tris-buffered saline</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid

Erweiterter IUPAC Nukleinsäure-Code:

A	Adenin		
C	Cytosin		
G	Guanin		
T	Thymin (Uracil)		
R	A oder G	K	G oder T (U)
Y	C oder T	W	A oder T
M	C oder A	S	C oder G
B	C oder G oder T (U)	N	A oder C oder G oder T (U)
D	G oder A oder T (U)		
H	A oder C oder T (U)		
V	A oder C oder G		

Aminosäuren (Ein- und Drei-Buchstaben-Code):

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

* Die Aminosäure Hydroxyprolin wird nicht durch den genetischen Standardcode determiniert; sie entsteht durch Hydroxylierung von Prolin

Der genetische Code (Aminosäuren im Ein- und Drei-Buchstaben-Code):

1. Base	2. Base											3. Base	
	U			C			A			G			
U	UUU	F	Phe	UCU	S	Ser	UAU	Y	Tyr	UGU	C	Cys	U
	UUC	F	Phe	UCC	S	Ser	UAC	Y	Tyr	UGC	C	Cys	C
	UUA	L	Leu	UCA	S	Ser	UAA	*	Ter	UGA	*	Ter	A
	UUG	L	Leu	UCG	S	Ser	UAG	*	Ter	UGG	W	Trp	G
C	CUU	L	Leu	CCU	P	Pro	CAU	H	His	CGU	R	Arg	U
	CUC	L	Leu	CCC	P	Pro	CAC	H	His	CGC	R	Arg	C
	CUA	L	Leu	CCA	P	Pro	CAA	Q	Gln	CGA	R	Arg	A
	CUG	L	Leu	CCG	P	Pro	CAG	Q	Gln	CGG	R	Arg	G
A	AUU	I	Ile	ACU	T	Thr	AAU	N	Asn	AGU	S	Ser	U
	AUC	I	Ile	ACC	T	Thr	AAC	N	Asn	AGC	S	Ser	C
	AUA	I	Ile	ACA	T	Thr	AAA	K	Lys	AGA	R	Arg	A
	AUG	+M	Met	ACG	T	Thr	AAG	K	Lys	AGG	R	Arg	G
G	GUU	V	Val	GCU	A	Ala	GAU	D	Asp	GGU	G	Gly	U
	GUC	V	Val	GCC	A	Ala	GAC	D	Asp	GGC	G	Gly	C
	GUA	V	Val	GCA	A	Ala	GAA	E	Glu	GGA	G	Gly	A
	GUG	V	Val	GCG	A	Ala	GAG	E	Glu	GGG	G	Gly	G

+ = Startcodon; * = Stoppcodon; Ter = Terminationssignal

Uracil (U) in mRNA-Sequenzen entspricht Thymin (T) in DNA-Sequenzen

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der Phytopathologie

1.1.1 Einführung

Seit dem Beginn des organisierten Ackerbaus im Neolithikum bis hin zur heutigen industrialisierten Landwirtschaft, bei der oft riesige Monokulturen das Bild der Agrarlandschaften prägen, hat das Auftreten von epidemischen Pflanzenkrankheiten immer mehr an Bedeutung gewonnen. Als Beispiel hierfür sei die durch den Pilz *Phytophthora infestans* (Erreger der Kraut- und Knollenfäule der Kartoffel) ausgelöste, von etwa 1835 bis 1850 in Irland herrschende Hungersnot genannt, die zum Tode von über einer Million Menschen führte und etwa ebenso viele Iren zur Auswanderung in die USA zwang (BOYLE und GRADA 1986; MCPARTLIN 1997; PORTER 1998). Auch heute noch wird schätzungsweise ein Drittel der möglichen Weltnahrungsmittelproduktion durch Krankheitsbefall vernichtet. Die Wissenschaft versucht seit langem, diesem Ertragsverlust entgegenzuwirken, etwa durch die Züchtung ertragreicher, aber gleichzeitig besonders resistenter Sorten der Kulturpflanzen. Grundlage für solche Pflanzenschutzmaßnahmen ist das Arbeitsgebiet der Phytopathologie.

Die Phytopathologie, die Wissenschaft von den Krankheiten der höheren Pflanzen, beschäftigt sich als Teilgebiet der Phytomedizin mit der Interaktion zwischen dem Krankheitserreger (Pathogen) und der befallenen Pflanze (Wirt) (FRÖHLICH 1991; HOFFMANN et al. 1994). Zu diesen Pathogenen gehören vor allem Mikroorganismen aber auch Insekten und parasitische Blütenpflanzen. Bei den mikrobiellen Krankheitserregern spielen phytopathogene Pilze die bedeutendste Rolle, erst mit großem Abstand folgen bakterielle Erreger und Viren (HOFFMANN et al. 1994; SCHLÖSSER 1997).

Die Voraussetzung für den gezielten Pflanzenschutz ist das genaue Verständnis der Vorgänge während der Interaktion zwischen Pathogen und Wirt, z.B. der gegenseitigen Erkennung der beiden Organismen, der Besiedlungsstrategien des Pathogens oder der Auslösung von Abwehrreaktionen auf Seiten der Pflanze. Heute gehen die Erkenntnisse über einige dieser Interaktionen bis hinunter auf die Kenntnis von den beteiligten Signalmolekülen und aktivierten Genen. Basis für dieses Verständnis auf molekularem

Niveau ist die phytopathologische Grundlagenforschung, zu der auch die hier dargestellten Untersuchungen zählen.

1.1.2 Wirt-Parasit-Interaktionen

Obwohl Pflanzen ständig einer Vielzahl von potentiell pathogenen Mikroorganismen ausgesetzt sind, ist nur ein verschwindend geringer Teil der Erreger dazu in der Lage, eventuell vorhandene Abwehrmechanismen der Pflanze zu überwinden und sich auf oder in ihr anzusiedeln, zu wachsen und zu vermehren, was meist die Auslösung von Krankheitssymptomen zur Folge hat. Ein solches Pathogen wird als virulent, die Pflanze als suszeptibel (anfällig) und die Interaktion als kompatibel bezeichnet. Der weitaus überwiegende Teil der potentiellen Pathogene vermag es nicht, die Pflanze zu besiedeln und nennenswerte Krankheitssymptome hervorzurufen. Der Erreger wird dann als avirulent, die Pflanze als resistent bezeichnet. Eine solche Interaktion wird inkompatibel genannt. Die Resistenz von Pflanzen gegenüber den allermeisten Pathogenen ist daher die Regel, das Überwinden dieser Resistenz und das Auftreten einer Krankheit die Ausnahme (SCHLÖSSER 1997; AGRIOS 1997).

Pflanzen sind als ortsgebundene Lebewesen nahezu ständig externen Streßfaktoren ausgesetzt. Dazu zählen neben den bereits erwähnten kontinuierlichen Attacken durch potentielle Krankheitserreger („biotische Faktoren“) auch eine Reihe von abiotischen Einflüssen, wie z.B. extreme Temperaturen, Trockenheit oder Strahlung (BÖRNER 1990; SCHLÖSSER 1997). Gegen viele dieser schädigenden Einflüsse, vor allem aber gegen den Befall mit potentiellen Krankheitserregern, haben die Pflanzen im Laufe der Evolution ein breites Spektrum von konstitutiv vorhandenen Abwehr- bzw. Anpassungsmechanismen entwickelt. Außerdem sind Pflanzen dazu in der Lage, auf einen Befall rasch und mit einem großen Arsenal von induzierbaren Abwehrreaktionen zu reagieren. Die Pathogene haben sich dabei immer wieder an die Abwehrmechanismen der Wirtspflanzen angepaßt, und die Pflanzen haben ihrerseits immer raffiniertere Abwehrreaktionen gegen den Befall mit Pathogenen entwickelt, so daß man in vielen Fällen von einer Art Co-Evolution von Pflanzen und Pflanzenpathogen sprechen kann (FRANK 1992; RAUSHER 2001).

Die Resistenz von Pflanzen, d.h. die Fähigkeit des potentiellen Wirts, die Ausbildung einer Krankheit zu verhindern, ist immer auch abhängig vom jeweiligen Pathogen. Eine generelle Resistenz gegenüber allen Pathogenen existiert nicht. Ausschlaggebend für

den Verlauf einer Wirt-Pathogen-Interaktion ist die genetische Konstitution beider Interaktionspartner (SCHLÖSSER 1997). Die Faktoren sowohl für Virulenz bzw. Avirulenz auf der Seite des Pathogens, als auch für Suszeptibilität bzw. Resistenz auf Seiten der Wirtspflanze sind an die Nachkommen vererbbar. Diese Vererbbarkeit der Resistenz stellt einen grundsätzlichen Unterschied zur Situation z.B. beim Menschen dar, der die Resistenz gegenüber bestimmten Pathogenen zwar in jeder Generation über sein Immunsystem neu erwerben muß, damit aber auch die Möglichkeit einer flexiblen Anpassung an neue Krankheitserreger hat.

1.1.3 Pflanzliche Resistenzmechanismen

Der aktiven, induzierbaren Resistenzantwort einer Pflanze geht immer die Erkennung eines vom Pathogen stammenden oder durch das Pathogen verursachten Signals voraus. Dieses Signal wird nach der Erkennung über bestimmte Mechanismen innerhalb der Pflanzenzelle weitergeleitet und führt schließlich zur Einleitung von Abwehrmaßnahmen (YANG et al. 1997; NÜRNBERGER et al. 1997; GRANT und MANSFIELD 1999; MCDOWELL und DANGL 2000; HOLT et al. 2000). Bei den o.g. Signalen handelt es sich in den meisten Fällen um unspezifische Signalmoleküle. Solche unspezifischen Elicitoren können exogenen Ursprungs sein (d.h. vom Pathogen stammen) oder aber auch in der Wirtspflanze selbst freigesetzt werden (endogene Elicitoren). Es handelt sich meist um Abbauprodukte der Zellwand des Pathogens (z.B. Oligochitin) bzw. der Wirtszelle (z.B. Oligogalakturonide), die von Rezeptoren der Pflanze erkannt werden können (FRY et al. 1993; ETZLER 1998; EBEL 1998). Klar abzugrenzen sind diese unspezifischen Elicitoren und Rezeptoren von den hochspezifischen Elicitoren (Avirulenzgenprodukte) und Rezeptoren (Resistenzgenprodukte), die an einer der Gen-für-Gen-Hypothese entsprechenden Interaktion beteiligt sind (s.u.).

Prinzipiell werden drei Formen der pflanzlichen Resistenz gegenüber Pathogenen unterschieden (VAN DER PLANK 1968; SCHLÖSSER 1997):

In den meisten Fällen, bei denen ein potentieller Erreger auf eine Pflanze trifft, kommt die sog. „**Nicht-Wirt-Resistenz**“ (HEATH 2000; KAMOUN 2001) zur Ausprägung. Die Pflanze ist dabei nicht Bestandteil des Wirtsspektrums des Pathogens. Bei einer solchen Interaktion besteht eine genetische „Basisinkompatibilität“ zwischen den beiden Organismen. Eine Infektion der Pflanze durch das Pathogen kann nicht stattfinden.

Die Mechanismen der polygenetisch determinierten „**horizontalen Resistenz**“ (SIMMONDS 1991) werden meist schon vor dem eigentlichen Kontakt mit einem potentiellen Pathogen ausgeprägt (konstitutive Abwehrmechanismen). Die horizontale Resistenz ist rassenunspezifisch, d.h. sie wirkt sich auf alle Genotypen eines potentiellen Pathogens aus, wobei die Schutzwirkung meist permanent, aber dabei oft nur unvollständig ist. Mechanische Barrieren, die das Eindringen eines Pathogens in die Pflanze erschweren, wie z.B. eine dicke Cuticula oder in die epidermalen Zellwände eingelagerte Sekundärstoffe (z.B. Lignin, Kieselsäure), sind Beispiele für Mechanismen der horizontalen Resistenz. Ebenso zählt die konstitutive Bildung von antimikrobiell wirksamen chemischen Substanzen zu den präformierten horizontalen Resistenzmechanismen (BENNET und WALLSGROVE 1994; DIXON 2001). Zu diesen als Phytoanticipine bezeichneten Substanzen mit hohem antimikrobiellem Wirkungsgrad gehören unter anderem bestimmte Phenole, sowie cyanogene Glukoside und Senföle (Ester der Isothiocyansäure). Die größte Gruppe sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe mit fungizider Wirkung sind die Saponine (OSBOURN 1996a; OSBOURN 1996b). Dabei handelt es sich um steroidartige Substanzen (Triterpene, Spirostanole, Alkaloide u.a.), welche die selektive Permeabilität von biologischen Membranen stören können, indem sie durch Interaktion mit membraneigenen Sterinen (z.B. Ergosterin in Pilzzellen) Poren in der Membran bilden. Neben den Phytoanticipinen besitzen viele Pflanzen präformierte Inhibitoren für Enzyme des Pathogens, meist gegen die für die Penetration der Wirtszelle wichtigen Hydrolasen, wie z.B. die Polygalakturonase. Bei diesen Inhibitoren handelt es sich meist um Proteine, Glykoproteine oder Gerbstoffe.

Bei der dritten Möglichkeit der Resistenzausprägung in einer Wirt-Pathogen-Interaktion, der sog. „**vertikalen Resistenz**“ handelt es sich um die Resistenz eines bestimmten Kultivars einer Pflanzenart gegen eine bestimmte Rasse des Pathogens, d.h. die vertikale Resistenz ist im Gegensatz zur o.g. horizontalen Resistenz rassenspezifisch. Die Merkmale der vertikalen Resistenz werden mono- oder oligogen vererbt, d.h. nur ein Gen oder wenige Gene bestimmen den Resistenzzustand der Pflanze. Die Mechanismen der vertikalen Resistenz werden meist erst nach dem Kontakt mit dem Pathogen induziert und bieten eine vollständige, aber oft nur temporäre Schutzwirkung gegenüber der Pathogenrasse. Grundlage der vertikalen Resistenz ist meist eine Wechselwirkung eines Resistenzgenproduktes der Pflanze mit dem Produkt eines Avirulenzgens des Pathogens, wie sie durch die sogenannte „Gen-für-

Gen-Hypothese“ nach FLOR beschrieben wird. Sie besagt, daß jedem Gen im Erreger, das für Avirulenz codiert, im Wirt ein korrespondierendes Gen für Resistenz gegenübersteht (FLOR 1942; FLOR 1955; FLOR 1971). Demnach kommt es immer dann zu einer inkompatiblen Interaktion und nicht zum Auftreten von Krankheitserscheinungen, wenn ein Pathogen mit dominantem Avirulenzgen auf eine Pflanze mit korrespondierendem dominanten Resistenzgen trifft. Alle anderen denkbaren Kombinationen dominanter und rezessiver Gene für Avirulenz bzw. Resistenz führen zu einer kompatiblen Interaktion und zur Ausprägung von Krankheitssymptomen (KEEN 1990; INNES 1995; VAN DER BIEZEN und JONES 1998; COOK 1998; BONAS und VAN DEN ACKERVEKEN 1999).

Die Vermutung, daß es sich bei den Produkten von Resistenzgenen um spezifische Rezeptoren bzw. Teile einer intrazellulären Signalkaskade handelt, wurde in den letzten Jahren durch die Isolierung und Charakterisierung einer Reihe von Resistenzgenen bestätigt (LAMB 1994; DANGL 1995; STASKAWICZ et al. 1995; MARTIN 1999; RIGDEN et al. 2000; RICHTER und RONALD 2000; ELLIS et al. 2000a; ELLIS et al. 2000b).

1.1.4 Induzierbare Abwehrreaktionen

Neben den bereits bei der Charakterisierung der horizontalen Resistenz aufgeführten konstitutiven Abwehrreaktionen können Pflanzen auch mit einem breiten Spektrum von induzierbaren Abwehrmechanismen auf einen Pathogenbefall reagieren. Einer solchen Induktion geht immer eine Signalperzeption und -transduktion voraus (vgl. Kapitel 1.1.3), die entweder direkt vorhandene Stoffwechselprozesse der Pflanze beeinflusst oder über Genaktivierung die Neusynthese von für die Abwehr benötigten Proteinen induziert.

Die induzierbaren Abwehrmechanismen lassen sich grob in „schnelle“ und „langsame“ Reaktionen einteilen, wobei die Übergänge aber oft fließend sind. Zu den schnellen Abwehrreaktionen, deren Auswirkungen im Zellkultursystem bereits nach wenigen Minuten nachweisbar sind, gehört an erster Stelle die rasche Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (H_2O_2 , $\text{O}_2^- \cdot$, $\text{OH}\cdot$). Dieser als „oxidative burst“ bezeichnete Prozeß ist eine der ersten meßbaren Reaktionen der Pflanzenzelle auf eine Elicitierung. Für die während des „oxidative burst“ freigesetzten reaktiven Sauerstoffspezies wird neben der Beteiligung an der Signaltransduktion (LEVINE et al. 1994; BOLWELL 1999; OTTE et al. 2001) auch eine direkte Schädigung des Pathogens diskutiert. Die Freisetzung von

Wasserstoffperoxid ist außerdem Voraussetzung für eine Quervernetzung von Zellwandstrukturproteinen über in der Zellwand lokalisierte Peroxidasen (FRY 1986; BRADLEY et al. 1992; OTTE und BARZ 1996; OTTE und BARZ 2000). Dieser Aspekt der „schnellen“ Abwehrreaktionen ist in den hier dargestellten Arbeiten von zentraler Bedeutung (vgl. Kapitel 1.5 und 3.5.2).

Der „oxidative burst“ ist einer der einleitenden Prozesse der sogenannten Hypersensitiven Reaktion (HR) (MOERSCHBACHER und REISENER 1997). Die HR ist das rasche Absterben von Zellen um den Infektionsort und die Abgrenzung des abgestorbenen Gewebes z.B. durch Einlagerung von phenolischen Substanzen in die Zellwände benachbarter Zellen („nekrotische Demarkation“), was sich äußerlich meist durch das Auftreten von kleinen Nekrosen auf den befallenen Pflanzenteilen bemerkbar macht. Dieser „programmierte Zelltod“ ist ein aktiver, energieverbrauchender und genetisch determinierter Prozeß und keine Folge von eventuellen Schädwirkungen des Pathogens (PONTIER et al. 1998; LAM et al. 2001). Für obligat biotrophe Pathogene bedeutet dieser lokale „Selbstmord“ den Entzug der Nahrungsgrundlage. In elicitierten Zellkulturen läßt sich oft eine auf die HR zurückgeführte Verbräunung der Zellen beobachten (VOGELSANG et al. 1994).

Zu den „langsamen“ induzierbaren Abwehrreaktionen, die mit der HR einhergehen, gehören Prozesse, bei denen komplexe Umsteuerungen des Stoffwechsels oder sogar die Aktivierung von Genen notwendig sind. Ein Beispiel hierfür ist die lokale Akkumulation von sogenannten Phytoalexinen. Bei Phytoalexinen handelt es sich um niedermolekulare antimikrobielle Abwehrstoffe, vergleichbar mit „pflanzlichen Antibiotika“, welche, im Gegensatz zu den oben beschriebenen Phytoanticipinen, *de novo* bei einer Infektion oder ähnlichen Streßsituation synthetisiert werden (OSBOURN 1999). Sie werden meist lokal um die Infektionsstelle gebildet und in den Apoplasten ausgeschüttet. Es handelt sich bei diesen Abwehrstoffen meist um zyklische, teils aromatische Verbindungen, die sich, ähnlich wie die Phytoanticipine, in die Membranen des Pathogens einlagern und deren selektive Permeabilität stören können. Unter den Phytoalexinen finden sich eine Vielzahl von Stoffklassen, z.B. Isoflavone, Pterocarpane, Sesquiterpene und Stilbene (BELL 1981; EBEL 1986; BARZ et al. 1990; BENNET und WALLSGROVE 1994; BARZ 1997). Die im Rahmen der hier beschriebenen Arbeiten untersuchte Kichererbse *Cicer arietinum* beispielsweise produziert nach Infektion die beiden Pterocarpane Medicarpin und Maackiain. Der vom Phenylpropanstoffwechsel

ausgehende Syntheseweg der beiden Phytoalexine ist vollständig aufgeklärt (TIEMANN et al. 1991; OVERKAMP 2000).

Die an der Bildung von Phytoalexinen beteiligten Enzyme sind teilweise konstitutiv im normalen Sekundärstoffwechsel der Pflanze vorhanden, werden aber auch in großen Mengen neu synthetisiert. Einer solchen *de novo*-Synthese geht eine durch die Signaltransduktion ausgelöste Aktivierung der entsprechenden Gene voraus. Neben den Genen für die Phytoalexinproduktion werden eine Vielzahl von Genen im Rahmen einer massiven Umsteuerung des Stoffwechsels aktiviert. Hierzu zählen beispielsweise die Gene der sogenannten „PR-Proteine“ (engl.: *pathogenesis related* = Pathogenesebegleitend). Dabei handelt es sich um meist kleine Proteine, die sich durch eine relativ hohe Stabilität gegenüber pH-Wert-Schwankungen und gegenüber enzymatischem Abbau durch Proteasen des Pathogens auszeichnen. Sie werden entweder in der Vakuole gespeichert oder in den Apoplasten sezerniert (VAN LOON 1999). Zu den PR-Proteinen zählt unter anderem eine große Gruppe von (endo-) Hydrolasen, wie z.B. Chitinasen und β -1,3-Glucanasen (LAWRENCE et al. 1996; EGEA et al. 1996), welche die Zellwand des Pathogens angreifen und schädigen können und dabei zusätzliche exogene Elicitoren (z.B. Oligochitin) freisetzen. Desweiteren gehören zu den Pathogenesebegleitenden Proteinen eine Reihe von Protein-Proteaseinhibitoren, die Proteasen des Pathogens durch Blockierung der katalytische Zentren hemmen können (RYAN 1989; VAN LOON 1999). Eine weitere Gruppe innerhalb der PR-Proteine stellen die Thaumatin-ähnlichen Proteine (TLPs, engl.: *thaumatin-like proteins*) dar, die in ihrer Aminosäuresequenz dem pflanzlichen Proteinsüßstoff Thaumatin aus *Thaumatococcus danielli* ähneln (VELAZHAHAN et al. 1999). Über ihre Funktion ist bisher wenig bekannt, für einige TLPs ist aber eine antifungale Wirkung nachgewiesen (HEJGAARD et al. 1991; BATALIA et al. 1996; KOIWA et al. 1997; YE et al. 1999). Einige Vertreter dieser Gruppe sind auch durch Salz- und osmotischen Streß induzierbar („Osmotine“). In der interzellulären Waschflüssigkeit von mit *Ascochyta rabiei* infizierten Kichererbsen wurde bisher die Induktion von β -1,3-Glucanasen, Chitinasen und eines Thaumatin-ähnlichen Proteins nachgewiesen (HANSELLE und BARZ 1995; ICHINOSE et al. 2000; HANSELLE 2000).

Zu den nach Genaktivierung neusynthetisierten Proteinen (d.h. PR-Proteinen „im weiteren Sinne“) zählen auch verschiedene Zellwandstrukturproteine, welche Hauptaspekt der vorliegenden Arbeit sind. Die Neusynthese dieser Strukturproteine

dient vermutlich der Verstärkung von Zellwänden im gesunden Gewebe um den Infektionsort, um ein Ausbreiten des Pathogens zu erschweren. Diesem Zweck dient wahrscheinlich auch die Einlagerung von Lignin oder anderen phenolischen Substanzen in die Zellwandstruktur (WALLACE und FRY 1994), welche nach Infektion beobachtet wurde und ebenfalls den „langsamen“ Abwehrmechanismen zuzuordnen ist.

1.1.5 Systeme zur Erforschung von Wirt-Pathogen-Interaktionen

Während sich für genetische Fragestellungen der Ackerschmalwand *Arabidopsis thaliana* als Modellsystem für die botanische Grundlagenforschung durchgesetzt hat, dessen Genom mittlerweile vollständig sequenziert wurde, beschäftigt sich die Phytopathologie größtenteils mit wirtschaftlich relevanten Pflanzen und ihren Pathogenen, wobei aber auch auf die mit *Arabidopsis* erzielten Erkenntnisse zurückgegriffen wird. Intensiv untersuchte Systeme finden sich bei der Familie der Solanaceen. So wurde z.B. das erste Beispiel eines der Gen-für-Gen-Hypothese folgenden Genpaares (vgl. Kapitel 1.1.3) im Interaktionssystem von Tomate und dem Tomatenpathogen *Cladosporium fulvum* charakterisiert (JONES et al. 1994; DE WIT 1995; JONES et al. 1998). Hier ist es gelungen, das Gen Cf-9 zu isolieren, das Resistenz gegenüber den Rassen des Pathogens bewirkt, welche das korrespondierende Avirulenzgen Avr9 exprimieren. Auch der Tabak (*Nicotiana tabacum*) und seine Krankheitserreger (z.B. das Tabakmosaikvirus) sowie die Kartoffel (*Solanum tuberosum*) und der Schadpilz *Phytophthora infestans* sind Gegenstand intensiver Forschung (JUDELSON 1997; OKADA 1999; ERICKSON et al. 1999). Die Interaktionen der Sojabohne (*Glycine max*), dem wirtschaftlich bedeutendsten Vertreter der Leguminosen, mit ihren Krankheitserregern, wie z.B. *Phytophthora megasperma*, sind ebenfalls gut untersucht (EBEL und GRISEBACH 1988). Bei den monokotylen Pflanzen stehen die Pilzkrankungen der wirtschaftlich bedeutenden Getreidepflanzen (Weizen, Mais, Reis, etc.) im Vordergrund.

Ein vereinfachtes Modellsystem zur Erforschung der molekularen Grundlagen von Wirt-Pathogen-Interaktionen stellen Zellkulturen dar, bei denen durch Zugabe von Elicitoren (z.B. Glukanpräparationen aus pilzlichen Zellwänden) der Pathogenbefall „simuliert“ und die damit einhergehenden Abwehrreaktionen der Pflanzenzelle induziert werden können. Besonders Zellsuspensionskulturen (Submerskulturen von

Einzelzellen oder lockeren Zellverbänden) bieten die Möglichkeit, durch Elicitorapplikation in das Kulturmedium eine im Vergleich zum *in planta*-System um ein Vielfaches gesteigerte Abwehrreaktion hervorzurufen, da hier der Elicitor die Oberfläche jeder einzelnen Zelle erreicht. In ganzen Pflanzen hingegen ist diese Resistenzantwort oft ein lokal eng begrenztes Phänomen, welches schwierig experimentell zu erfassen ist. In Zellkulturen lassen sich beispielsweise in den Apoplasten sezernierte Substanzen durch einfaches Aufarbeiten des Kulturmediums untersuchen, wohingegen in intakten Geweben apoplastidäre Komponenten mühsam durch Flüssigkeitsinfiltration („interzelluläre Waschflüssigkeit“) gewonnen werden müssen (HANSELLE 2000). Zusätzlich bieten Zellkulturen die Möglichkeit, die Zellwand durch enzymatischen Abbau zu entfernen, ohne dabei die Zellen in ihrer Funktion wesentlich zu beeinträchtigen. An den so gewonnenen Protoplasten lassen sich dann z.B. Messungen von Ionenströmen an der Plasmamembran durchführen, die durch die Pufferwirkung der Zellwand an „normalen“ Zellen nicht möglich wären. Bei der Interpretation der anhand von Zellkulturen gewonnenen Ergebnisse muß allerdings immer in Betracht gezogen werden, daß es sich hierbei um ein vom natürlichen Zustand weit entferntes Modellsystem handelt und die Ergebnisse nicht ohne weiteres auf die Situation in der ganzen Pflanze übertragen werden können.

1.2 Das Interaktionssystem Kichererbse/*Ascochyta rabiei*

1.2.1 Die Kichererbse (*Cicer arietinum* L.)

Archäologische Funde aus dem Neolithikum belegen, daß die Kichererbse (*Cicer arietinum* L.) wahrscheinlich vor mehr als 8000 Jahren im vorderen Orient, möglicherweise im heutigen türkisch-syrischen Grenzgebiet, in Kultur genommen wurde. Ihr Vorläufer ist vermutlich die rezente Wildform *Cicer reticulatum* (LADIZINSKY et al. 1988; HAWTIN 1989). Seit Beginn der Bronzezeit gehören Kichererbsen zu den angebauten Hülsenfrüchten. Im klassischen Altertum werden sie in allen landwirtschaftlichen Schriften als Nutzpflanzen beschrieben. Im Mittelalter berichten u.a. HILDEGARD VON BINGEN (1098 bis 1179) und ALBERTUS MAGNUS (1200 bis 1280) von ihr. Aus Mitteleuropa liegt ein Fund von verkohlten Kichererbsen aus einem römischen Lager bei Neuss am Rhein vor (KÖRBER-GROHNE 1987).

Die Kichererbse ist eine einjährige, krautige Pflanze mit guter Trockenresistenz, jedoch relativ hohen Wärmeansprüchen. Sie gedeiht am besten auf leichten Böden, wie sandigem Lehm und Mergelböden sowie auf kalkhaltigen Schotterböden, dagegen nicht auf schweren Lehmböden. So hat sie ihre Anbaubedeutung in trockenen, wärmeren Gebieten. Sie bildet, wie andere Leguminosen auch, Wurzelknöllchen aus, in denen mit Hilfe von Bakterien (z.B. *Rhizobium spec.*) molekularer Stickstoff fixiert wird (SCHOPFER und BRENNICKE 1999). Der Stengel der Pflanze wird ca. 30 bis 70 cm hoch und ist je nach Standort mehr oder weniger verzweigt (vgl. Abbildung 1-1 A). Die gefiederten Laubblätter werden 7 bis 10 cm lang und tragen ein Endblättchen. Die verkehrt-eiförmigen Fiederblättchen sind ca. 5 bis 15 mm lang, im oberen Teil stark gesägt und mit klebrigen Drüsenhaaren besetzt, die Oxal- und Äpfelsäure absondern (vgl. auch Abbildung 1-2 B). Sie stehen in 3 bis 8 Paaren. Die ganze Pflanze ist blaugrün bis graugrün gefärbt. Die Blüten stehen einzeln in den Blattachseln, sind 10 bis 12 mm groß und purpurrot, violett oder weiß gefärbt (Abbildung 1-1 B). Es herrscht Selbstbefruchtung vor, wobei vereinzelt durch Insektenflug auch Fremdbefruchtung vorkommt. Die Hülsen (Abbildung 1-1 C) werden 2 bis 3 cm lang und 1,5 cm breit und enthalten ein oder zwei, selten drei pyramidenförmige Samen (Abbildung 1-1 D). Diese sind unregelmäßig runzlig und ähneln mit aufgebogenem Würzelchen entfernt einem Widder- oder Vogelkopf (daher die engl. Bezeichnung „chickpea“). Die Farbe der Samen ist je nach Varietät schwarz, braun, rötlichorange oder gelblichweiß, wie beim weit verbreiteten „Kabuli“-Typ (CUBERO 1987).

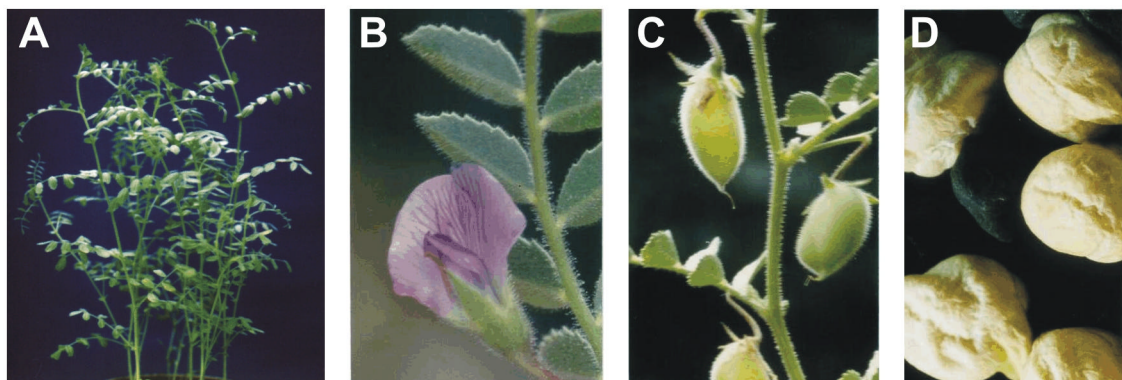


Abbildung 1-1: Die Kichererbse (*Cicer arietinum* L.)

A: Gesamthabitus einer 20 Tage alten Pflanze des Kultivars ILC3279

B: Blüte einer violett blühenden Varietät

C: reife Hülsen

D: getrocknete Samen des „Kabuli“-Typs (z.B. Kultivare ILC1929 und ILC3279)

Wie die Sojabohne (*Glycine max*), die Bohne (*Phaseolus spec.*) und die Erbse (*Pisum sativum*) zählt auch die Kichererbse zur Familie der Fabaceen und nach den genannten Pflanzen zu den wirtschaftlich bedeutendsten Leguminosen. Vor allem in den Entwicklungsländern stellt die Kichererbse eine wichtige Nahrungsquelle dar. Hauptsächlich dient sie der menschlichen Ernährung, wobei größtenteils die proteinreichen Samen, teilweise aber auch die grünen Pflanzenteile gegessen werden. In geringerem Umfang wird die Kichererbse auch als Viehfutter eingesetzt (BECKER-DILLINGEN 1929; STÄHLIN 1957; SINGH und VAN DER MAESEN 1977; DUKE 1981; SINGH et al. 1984). Heute wird die Kichererbse in mehr als 40 Ländern angebaut, wobei der Schwerpunkt der Produktion (>80%) auf dem indischen Subkontinent liegt. 1938 wurden in der Welt auf einer Fläche von 8,7 Mio. ha Kichererbsen angebaut. Diese Fläche ist in den letzten 60 Jahren nur leicht auf ca. 10 Mio. ha im Jahre 1999 angewachsen. Der Ertrag allerdings hat sich im gleichen Zeitraum von ca. 4,7 Mio. Tonnen auf über 9 Mio. Tonnen nahezu verdoppelt (Quelle: Jahrbücher der „Food and Agricultural Organisation“ (FAO) der UNO).

In verschiedenen Genbanken existieren heute mehr als 15000 unterschiedliche Varietäten und Kultivare der Kichererbse. Im Bezug auf den Befall mit dem Pathogen *Ascochyta rabiei* sind sowohl überwiegend suszeptible als auch hochgradig resistente Linien bekannt. Die am Institut für Biochemie und Biotechnologie der Pflanzen für Untersuchungen eingesetzten Kultivare ILC 1929 (suszeptibel) und ILC 3279 (resistent gegen viele Rassen von *Ascochyta rabiei*) stammen vom ICARDA (International Center for Agricultural Research in the Dry Areas) in Aleppo, Syrien.

1.2.2 Der Schadpilz *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.

Die ökonomisch bedeutsamste Krankheit der Kichererbse ist die sogenannte Blattflecken- oder Bleichekrankheit („*Ascochyta blight*“). Sie wird verursacht durch den nekrotrophen Pilz *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. (perfekte Form: *Mycosphaerella rabiei* Kovachevski, vgl. Abbildung 1-2 A) und wurde im Jahre 1911 im heutigen Pakistan zum ersten mal wissenschaftlich beschrieben (BUTLER 1911). Sie ist aber wahrscheinlich ebenso alt wie die Kichererbse selbst. Formen dieser Krankheit treten, ausgelöst durch andere Arten der Gattung *Ascochyta*, auch bei vielen weiteren Leguminosen und anderen Kulturpflanzen auf.

Nach Befall der Pflanze äußert sich die Krankheit zuerst durch das Auftreten von rundlichen nekrotischen Flecken auf der Blattoberfläche und den Hülsen sowie länglichen Nekrosen an den Stengeln, später durch dunkelbraune bis helle, teilweise eingesunkene Läsionen auf allen Pflanzenteilen, aus denen sich Pyknidiosporenlager entwickeln. Im weiteren Verlauf der Krankheit treten als Symptome u.a. das Abknicken von Stengeln, das Verwelken der Blätter oberhalb von Läsionen und das Ausbleichen der oberirdischen Pflanzenteile auf (vgl. Abbildung 1-2 B und C). Unter für den Pilz günstigen Bedingungen können sich in einem suszeptiblen Kultivar der Kichererbse die nekrotischen Flecken über die ganze Pflanze ausbreiten und diese letztendlich zum Absterben bringen. In einer solchen Situation kann bei einem epidemischen Befall ein Ernteausfall bis zu 100% die Folge sein. Bei resistenten Kultivaren der Kichererbse (z.B. ILC3279) kann man nach Infektion mit *Ascochyta rabiei* das rasche Auftreten von HR-bedingten kleinen Nekrosen um die Infektionsstellen beobachten. Der Pilz wird so in seinem Wachstum gehemmt und kann die Pflanze nicht nennenswert schädigen. Makroskopisch erkennbare Krankheitssymptome treten nur vereinzelt und in schwacher Ausprägung auf.

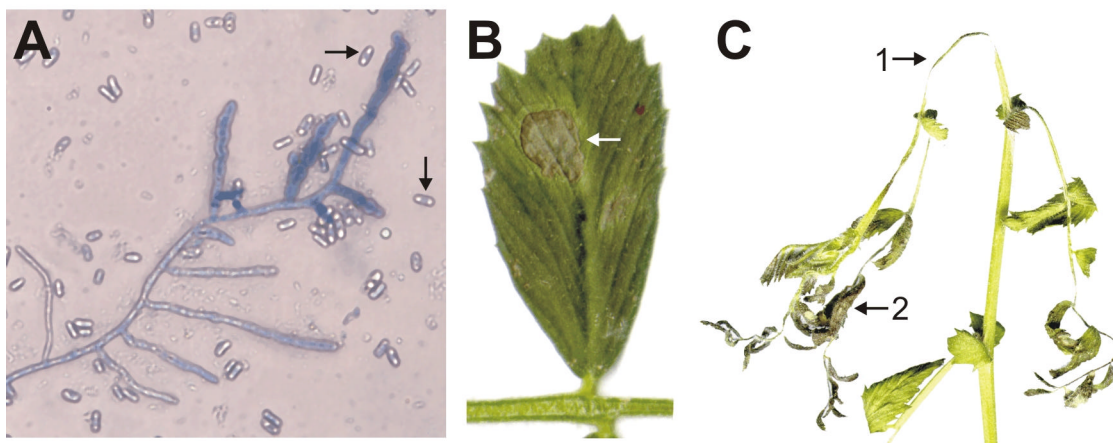


Abbildung 1-2: Die Bleichekrankheit („Ascochyta blight“) der Kichererbse

A: Mikroskopische Aufnahme von Hyphen und Sporen des Pilzes *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. Kultivar XXI (Vergrößerung 400x); Deutlich sind in einigen Sporen (Pfeile) zwei Zellkerne zu erkennen.

B: Nekrose (Pfeil) auf einem Fiederblättchen der Kichererbse (Kultivar ILC1929) 6 Tage nach Infektion mit einer *A. rabiei*-Sporensuspension

C: Symptome von „Ascochyta blight“ an Stengeln und Blättern einer Pflanze des Kultivars ILC1929 am 8. Tag nach Infektion: Abknicken von Stengeln und Blattstielen (1), Verwelken und Austrocknung von Blättern (2) und Ausbleichen der oberirdischen Pflanzenteile

Die Infektion der Pflanze beginnt mit dem Quellen und Auskeimen einer je nach Isolat ein- oder zweizelligen Pyknidiospore (BRUNS und BARZ 2001) auf der Oberfläche eines Blattes oder anderer oberirdischer Pflanzenteile. Von einer polaren Keimhyphie ausgehend bildet der Pilz eine vom Keimschlauch durch ein Septum getrennte Appressorium-ähnliche Struktur aus, mit deren Hilfe er die Cuticula der Wirtspflanze direkt penetriert. Seltener wurde ein Eindringen über Stomata und Hyathoden (Drüsenhaare) beobachtet. Im Inneren der Pflanze breitet sich der Pilz dann subepidermal aus, wobei die Hyphen parallel zu den Epidermis- und Parenchymzellen wachsen. Später (4-7 Tage nach Infektion) breiten sich die Hyphen im ganzen Gewebe aus. Sie wachsen vornehmlich interzellulär, dringen aber auch in einzelne Zellen ein. Die Epidermiszellen kollabieren und die Zellen des Schwamm- und Palisadenparenchyms verlieren ihren Zusammenhalt. Der Pilz breitet sich in der ganzen Pflanze aus, indem er sein apoplastisches Wachstum im Leitgewebe fortsetzt. Dabei wächst er hauptsächlich im Bereich des Phloems und des fasciculären Kambiums, das Xylem ist meist nicht betroffen. Nach 6-8 Tagen kann man die typischen Läsionen beobachten (vgl. Abbildung 1-2 B), die große Teile des Blattes umfassen und in denen sich zum Ende des Infektionszyklusses Pyknidiosporenlager bilden, welche ihre Sporen durch das zerstörte epidermale Gewebe nach außen freisetzen (HÖHL et al. 1990; KÖHLER und BARZ 1995).

Eine Reihe anderer Pilze, Viren und Nematoden sind als Krankheitserreger der Kichererbse beschrieben worden, z.B. das durch den Pilz *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr.f.sp. *ciceris* ausgelöste vorzeitige Welken. Die wirtschaftliche Schadwirkung dieser Pathogene ist aber in keinem Fall mit den durch *Ascochyta rabiei* verursachten Ertragseinbußen vergleichbar.

1.2.3 Stand der Forschung I: Molekulare Grundlagen der Interaktion

Wie in allen Wirt-Pathogen-Interaktionssystemen geht der Auslösung von Abwehrreaktionen in der Kichererbse nach Befall mit *Ascochyta rabiei* eine Erkennung des Pathogens durch die Pflanze voraus. Durch Experimente mit Zellkulturen und Protoplasten konnten eine Reihe der an der Erkennungsreaktion und der nachfolgenden Signaltransduktionskaskade beteiligten Komponenten identifiziert werden. Durch den gezielten Einsatz von Inhibitoren von bekannten Elementen der Signaltransduktion

konnten von F. HEIN, O. OTTE und A. PACHTEN unter anderem Hinweise auf die Beteiligung eines Protein-Kinase/Protein-Phosphatase-Regelkreislaufes, einer Protonen-ATPase und einer vermutlich membranständigen NADPH-Oxidase als $\cdot\text{O}_2^-$ -generierenden Komplex gefunden werden (OTTE 1998; ICHINOSE et al. 2000; OTTE et al. 2001). Ebenso konnte die Umwandlung des während des „oxidative burst“ freigesetzten $\cdot\text{O}_2^-$ zu H_2O_2 mittels einer Superoxiddismutase (SOD) nachgewiesen werden. OTTE konnte zeigen, daß ein Teil dieses Wasserstoffperoxids als Cosubstrat für die peroxidative Quervernetzung von zwei Zellwandstrukturproteinen (eines HRGPs und eines PRPs) über in der Zellwand lokalisierte Peroxidasen verwendet wird (vgl. Kapitel 1.3.2 und Abbildung 1-4). Das restliche H_2O_2 konnte wenige Minuten nach Elicitierung mit *Pmg*-Elicitor (Zellwandpräparation aus *Phytophthora megasperma*) extrazellulär als transienter „oxidative burst“ gemessen werden (OTTE 1998; OTTE und BARZ 2000; OTTE et al. 2001). PACHTEN konnte außerdem bei Untersuchungen an Protoplasten teilweise nur wenige Sekunden nach Elicitierung mehrere Ionenströme an der Plasmamembran messen (Chlorid- und Kalium-Efflux, Calcium- und Protonen-Influx), denen vermutlich ebenfalls eine aktivierende oder verstärkende Wirkung in der Signaltransduktion zuzurechnen ist. Mit diesen Ionenströmen einher geht eine rasche extrazelluläre Alkalisierung, gefolgt von einer langsameren Ansäuerung des Mediums.

Neben der Signaltransduktion und den schnellen Abwehrmechanismen wurden auch die von der Infektion bzw. Elicitierung beeinflussten Gene der Kichererbse untersucht. Y. ICHINOSE konnte durch einen differentiellen Vergleich von cDNA-Banken aus infizierten Pflanzen bzw. elicitierten Zellsuspensionskulturen mit Banken aus entsprechenden Kontrollansätzen eine große Zahl von mRNAs identifizieren, deren Menge nach Infektion oder Elicitierung zunimmt. Ebenso konnte eine Reihe von Genen identifiziert werden, deren Transkriptmenge nach Infektion bzw. Elicitierung herunterreguliert wird (ICHINOSE et al. 2000). Abbildung 1-3 gibt einen stark vereinfachten Überblick über die heutige Vorstellung von der Signaltransduktion in Zellen der Kichererbse und die von ihr beeinflussten Gene.

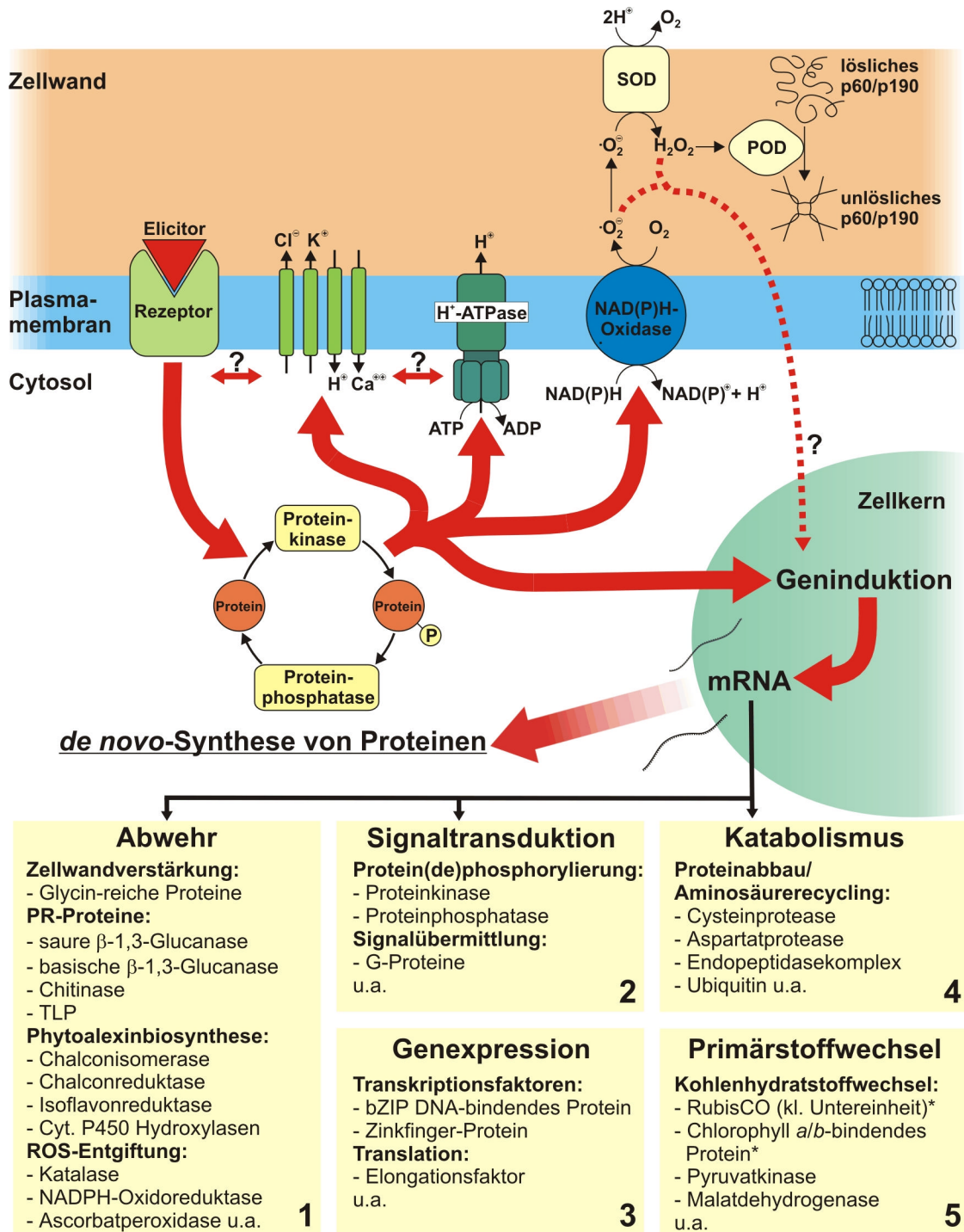


Abbildung 1-3: Übersicht über die an der Signaltransduktion in der Kichererbse beteiligten Elemente und Beispiele der nach Infektion mit *Ascochyta rabiei* in ihrer Menge veränderten mRNAs

oben: SOD = Superoxiddismutase; POD = Peroxidase; p60 = Prolin-reiches Protein (MW \gg 60 kDa); p190 = Hydroxyprolinreiches Glykoprotein (MW \gg 190 kDa); Die roten Pfeile geben die vermutete Richtung der Signalwirkung an; verändert nach OTTE 1998, PACHTEN 2001
 unten: 1-5: Beispiele der nach Infektion in ihrer Menge veränderten mRNAs (nach ICHINOSE et al. 2000); TLP = Thaumatin-ähnliches Protein; ROS = reaktive Sauerstoffspezies; * = Für diese mRNAs wurde eine Reprimierung nach Infektion nachgewiesen.

Aus Abbildung 1-3 wird deutlich, daß neben den direkt mit der Pathogenabwehr in Zusammenhang zu bringenden Genen (z.B. für PR-Proteine oder Enzyme der Phytoalexinbiosynthese) auch viele der sog. „housekeeping genes“, d.h. Gene für zentrale Proteine des Primärstoffwechsels von der Infektion in ihrer Transkriptionsrate beeinflußt werden. Es kommt demnach zu einer massiven Umsteuerung des grundlegenden Stoffwechsels der Pflanze.

Zellwandstrukturproteine spielen möglicherweise eine Rolle auf mehreren Ebenen der Abwehrreaktionen der Kichererbse. Zunächst werden einige Spezies von Strukturproteinen unmittelbar nach Perzeption des Elicitorsignals peroxidativ quervernetzt, später werden die Gene für Zellwandstrukturproteine verstärkt transkribiert. Besonders bei der Genaktivierung scheint Glycin-reichen Proteinen eine zentrale Bedeutung zuzukommen. Von den über 100 cDNA-Klonen, die nach ICHINOSE den am vierten Tag nach einer Infektion mit *Ascochyta rabiei* verstärkt gebildeten mRNAs entsprachen, repräsentierten 14 Klone die mRNAs der in dieser Arbeit behandelten Glycin-reichen Proteine (vgl. Kapitel 1.4.3). Sie stellten damit die dominanteste Gruppe von nach Infektion vermehrt vorkommenden Transkripten dar (CORNELS 1998; ICHINOSE et al. 2000).

1.3 Strukturproteine der pflanzlichen Zellwand

1.3.1 Aufbau der pflanzlichen Zellwand

Die Vorstellung vom molekularen Aufbau pflanzlicher Zellwände hat sich in den letzten Jahrzehnten grundlegend gewandelt. Früher hielt man die Zellwand für eine unnachgiebige, starre Struktur. Neuere Untersuchungen belegen jedoch, daß es sich bei der Primärwand der Pflanzenzelle vielmehr um ein flexibles und ständigen Veränderungen unterworfenen hochkomplexes makromolekulares Netzwerk handelt. Die sog. „Multi-Netzwerk-Gel“-Modelle basieren auf der Vorstellung, daß die Zellwand aus einem System von miteinander interagierenden Netzwerken in einer gelartigen Matrix besteht, wobei die einzelnen Makromoleküle nur zu einem geringen Teil kovalent miteinander verknüpft sind (SCHINDLER 1993; ALBERSHEIM et al. 1994; BRAAM 1999). Nach MCCANN und ROBERTS existieren in Zellwänden der Zwiebel mindestens zwei voneinander unabhängige Polymernetzwerke nebeneinander (MCCANN und ROBERTS

1991): Das Grundgerüst bildet das Netzwerk der Cellulosefibrillen, welche den Hauptbestandteil der Primärwand ausmachen, und der sie stabilisierenden Hemicellulosen, wobei z.B. Xyloglucane verhindern, daß die Cellulosefibrillen in Längsrichtung assoziieren. Dieses Cellulosegerüst ist eingebettet in ein Netzwerk aus Pektinstoffen, welches die gelartige Grundsubstanz der Zellwand bildet. Bei den Pektinstoffen handelt es sich um eine große Gruppe von verzweigten und stark hydratisierten Derivaten der aus α -Galakturonsäure-Einheiten aufgebauten Polygalakturonsäure. Untereinander können die Galakturonsäureketten reversibel verknüpft werden, indem sie über ihre Carboxylgruppen zweiwertige Kationen (z.B. Ca^{2+}) binden.

Einen weiteren Bestandteil der Zellwand bilden die Proteine. Neben verschiedenen Enzymen (z.B. Peroxidasen, Phosphatasen, Glucanasen, Polygalakturonasen, Pektin-Methylesterasen, Arabinosidasen, Proteasen) stellen die Strukturproteine den Hauptproteinbestandteil der Zellwände dar. Inwieweit diese mit den oben beschriebenen Polymernetzwerken interagieren bzw. mit ihnen oder den in späteren Entwicklungsstadien der Zellwand vorhandenen eingelagerten Sekundärstoffen (z.B. Lignin) verknüpft sind, wird noch erforscht. Eine Peroxidase-vermittelte oxidative Quervernetzung (engl. „oxidative cross-linking“) ist jedoch für die meisten Klassen der Strukturproteine nachgewiesen (FRY 1986; MCCANN et al. 1990; BRADLEY et al. 1992; BRADY et al. 1996; KJELLBOM et al. 1997; OTTE und BARZ 2000; RINGLI et al. 2001). Die Verknüpfung der Proteine erfolgt dabei in den meisten Fällen vermutlich über die Aminosäure Tyrosin. Das Tyrosin-Dimer Isodityrosin und das Tetramer Di-Isodityrosin konnten aus pflanzlichen Zellwänden isoliert werden (FRY 1986; BRADY et al. 1996). Abbildung 1-4 gibt einen Überblick über den vermuteten Ablauf der oxidativen Verknüpfung von Tyrosinresten in Pflanzen, wie er z.B. für die Quervernetzung von Extensinen (vgl. Kapitel 1.3.2) postuliert wurde.

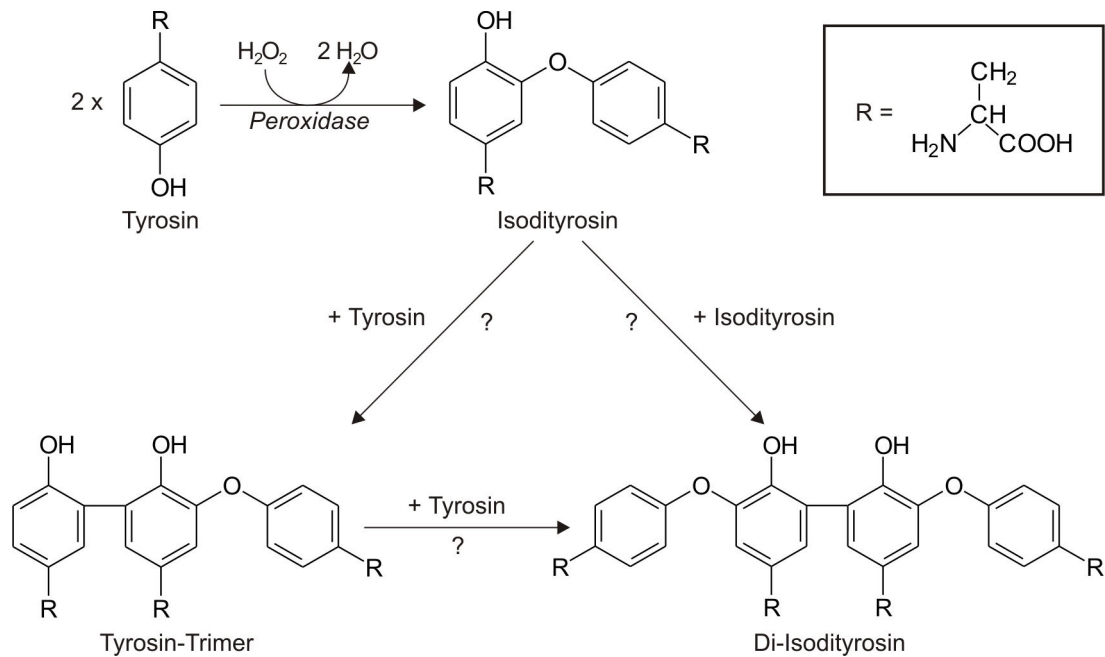


Abbildung 1-4: Oxidative Quervernetzung von zwei Tyrosinresten zu Isodityrosin und mögliche Synthesewege des Tetramers Di-Isodityrosin

verändert nach: FRY 1986, BRADY et al. 1996

1.3.2 Einteilung der Zellwandstrukturproteine

Die pflanzlichen Zellwandproteine werden in vier Gruppen eingeteilt (SHOWALTER 1993; CASSAB und VARNER 1998): Die **Hydroxyprolinreichen Glykoproteine** (HRGPs) dikotyler Pflanzen („Extensine“) sind gekennzeichnet durch einen hohen Gehalt an den Aminosäuren Hydroxyprolin (posttranslational hydroxyliertes Prolin) und Serin. Meist enthalten sie das Pentapeptid-Motiv Ser-Hyp₄ (Hyp = Hydroxyprolin), oft innerhalb von größeren repetitiven Strukturelementen (CASSAB und VARNER 1998). Solche repetitiven Elemente sind Kennzeichen vieler Zellwandstrukturproteine (JOSÈ und PUIGDOMÈNECH 1993). Bei den Extensinen sind die meisten Hydroxyprolinreste mit ein bis vier Arabinoseresten glykosidisch verknüpft, einige der Serinreste tragen ein einzelnes Galaktosemolekül. Eine Interaktion dieser Zuckerreste mit den Kohlenhydratpolymeren der Zellwand wird angenommen. Die HRGPs monokotyler Pflanzen können in ihrer Aminosäurezusammensetzung und der Form der repetitiven Strukturelemente einige Unterschiede zu den Extensinen der Dikotylen aufweisen (SHOWALTER 1993). Für mehrere HRGPs wurde eine Polymerisation in Form einer peroxidativen Querver-

netzung (vgl. Abbildung 1-4) u.a. als Antwort auf Pathogenbefall nachgewiesen (FRY 1986; BRADLEY et al. 1992; OTTE und BARZ 2000).

Prolin-reiche Proteine (PRPs) unterscheiden sich von den HRGPs hauptsächlich durch das Fehlen des charakteristischen Ser-Hyp₄-Motives und in den Regulationsmechanismen ihrer Gene (JOSÈ und PUIGDOMÈNECH 1993; CASSAB und VARNER 1998). Auch Hydroxyprolin tritt bei vielen PRPs auf, doch ist die Anzahl der hydroxylierten Prolinreste und auch der Grad der Glykosylierung meist deutlich geringer als bei den HRGPs. Durch immunologische Untersuchungen an Stengeln der Sojabohne konnten Prolin-reiche Proteine, ebenso wie die HRGPs, hauptsächlich im Bereich der Leitgewebe lokalisiert werden, dort vor allem im Protoxylem und Xylem (YE et al. 1991). Es wird ein Zusammenhang der PRP-Lokalisation mit der Lignifizierung der betroffenen Zellen vermutet (RYSER et al. 1997).

Die **Arabinogalaktanproteine** (AGPs) stellen einen Sonderfall der Zellwandproteine dar. Sie sind wahrscheinlich nicht kovalent mit der Zellwand verbunden und haben daher vermutlich keine strukturelle Funktion (FINCHER et al. 1983; CASSAB und VARNER 1998). Ihnen wird eine Rolle in der Wundheilung und der Morphogenese der Pflanzen zugesprochen (KREUGER und VAN HOLST 1996; BACIC et al. 1996; MAJEWSKA-SAWKA und NOTHNAGEL 2000). Eine mögliche Funktion der löslichen AGPs bei Zell-Zell-Interaktionen wird diskutiert. Ein bekannter Vertreter der AGPs ist Gummi arabicum, welches von *Acacia senegal* bei Verwundung in großen Mengen ausgeschieden wird und in der Lebensmittelindustrie z.B. als Geliermittel Anwendung findet (PHILLIPS 1998). Die meisten AGPs haben nur einen Proteingehalt von etwa 10%, die übrigen 90% sind Kohlenhydrate. Dieser Kohlenhydratanteil besteht hauptsächlich aus O-glykosidisch verknüpften, teilweise über 50 Zuckereinheiten langen und sehr heterogenen Seitenketten (CASSAB und VARNER 1998). Eine oxidative Quervernetzung wurde auch für AGPs beschrieben (KJELLBOM et al. 1997).

Die **Glycin-reichen Proteine** (GRPs) sind als einzige Vertreter der Zellwandproteine nicht glykosyliert (CASSAB und VARNER 1998). Sie werden in Kapitel 1.4 eingehend beschrieben.

Neben diesen vier Hauptgruppen der Zellwandproteine und den oben erwähnten Enzymen finden sich noch einige kleinere Gruppen von möglichen Strukturproteinen im

Proteinanteil der Zellwand. Dies sind unter anderem verschiedene Cystein-reiche Thionine, Histidin/Tryptophan-reiche Proteine und Lectine (SHOWALTER 1993). Oft finden sich auch Proteine, welche die Charakteristika mehrerer Klassen von Strukturproteinen in sich vereinen, wie z.B. die Glycin- und Prolin-reichen Proteine (GPRPs), bei denen eine Interaktion mit der Zellmembran vermutet wird (MARTY et al. 1996).

1.3.3 Die mögliche Rolle von Zellwandstrukturproteinen in der Pathogenabwehr

Für nahezu alle Gruppen von Zellwandstrukturproteinen ist eine Akkumulation nach Pathogenbefall beschrieben. Eine verstärkte Expression beispielsweise von HRGPs konnte in vielen Systemen nach pilzlicher oder bakterieller Infektion bzw. Elicitierung von Zellkulturen beobachtet werden (LAWTON und LAMB 1987; BENHAMOU et al. 1991a; BENHAMOU et al. 1991b; MOULY et al. 1992; GARCIA-MUNIZ et al. 1998). Die oxidative Quervernetzung dieser Proteine scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen. Sie dient vermutlich der lokalen Verstärkung der Zellwand, was ein Eindringen des Pathogens in die Zelle erschweren würde (BRADLEY et al. 1992; OTTE und BARZ 2000). Die oxidative Vernetzung wird dabei vermutlich über zellwandständige Peroxidasen katalysiert (BROWNLEADER et al. 2000; JACKSON et al. 2001). Für andere HRGPs wird eine Interaktion mit der Oberfläche des Pathogens vermutet (MELLON und HELGESON 1982). Auch die Produktion Prolin-reicher Proteine wird durch Infektion bzw. Elicitierung beeinflusst (KLEIS-SAN FRANCISCO und TIERNEY 1990; SHENG et al. 1991; MARCUS et al. 1991). Ähnlich wie HRGPs dienen auch sie vermutlich der Zellwandverstärkung oder der Wundheilung bei durch das Pathogen verursachten Verletzungen (CASSAB und VARNER 1998). Die Rolle von GRPs in der Pathogenabwehr scheint vielschichtiger zu sein und ist u.a. Thema des nächsten Kapitels. Ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung der Rolle von Zellwandstrukturproteinen in pflanzlichen Abwehrreaktionen ist die Tatsache, daß kaum ein Zellwandprotein spezifisch nur als Folge eines Pathogenbefalls exprimiert wird. Die meisten Strukturproteine sind durch eine Reihe von Streßfaktoren (z.B. Verwundung, Trockenheit, Kälte, etc.) induzierbar und werden auch im Rahmen der „normalen“ Entwicklung der Pflanze teilweise in erheblichen Mengen synthetisiert (CASSAB und VARNER 1988; SHOWALTER 1993; CASSAB und VARNER 1998).

1.4 Glycin-reiche Proteine

1.4.1 Einführung

Glycin-reiche Proteine sind nicht nur aus Pflanzen bekannt, vielmehr wurden Proteine mit ähnlichen Charakteristika in tierischen Organismen lange vor der Entdeckung pflanzlicher GRPs beschrieben. Beispiele hierfür sind u.a. Keratin, Kollagen, die Haftproteine, mit deren Hilfe sich manche Muscheln auf dem Substrat festkleben (QIN et al. 1997; COYNE et al. 1997; WAITE et al. 1998; BURZIO et al. 2000) und das Seidenfibronin der Spinnenseide. Bei diesen Proteingruppen handelt es sich um GRPs „im weiteren Sinne“, die erstaunliche mechanische Eigenschaften aufweisen. Die Haftproteine bestimmter Muscheln gelten beispielsweise als die stärksten natürlich vorkommenden Klebstoffe. Die Haltefäden von Spinnennetzen sind bis zu zehnmal reißfester als ein vergleichbarer Stahlfaden, dabei aber dehnbarer als viele Kunstfasern (FUKUSHIMA 1998; VOLLRATH 1999). Diese hohe mechanische Belastbarkeit ist neben dem hohen Glycingehalt eines der auffälligsten gemeinsamen Merkmale von tierischen GRPs. Die Aminosäure Glycin ist in diesen Proteinen meist nicht „zufällig“ in der Proteinsequenz verteilt, sondern liegt oft in Form von geordneten, repetitiven Mustern vor. Ein Beispiel für diese regelmäßige Anordnung findet sich auch beim menschlichen Bindegewebsprotein Kollagen. Hier ist jede dritte Aminosäure in der Sequenzfolge ein Glycin, was die Proteine zur Ausbildung einer Kollagenhelix aus je drei Einzelsträngen befähigt. Die resultierenden Kollagenfasern weisen wiederum eine bemerkenswerte mechanische Belastbarkeit auf (STRYER 1994).

Glycin-reiche Proteine in Pflanzen wurden erstmals 1986 in der Petunie (*Petunia hybrida*) beschrieben (VARNER und CASSAB 1986; CONDIT und MEAGHER 1986). Bis heute (Stand: Oktober 2001) wurden über 100 Protein- bzw. Nukleinsäuresequenzen von pflanzlichen GRPs veröffentlicht.

1.4.2 Eigenschaften und mögliche Funktionen pflanzlicher GRPs

1.4.2.1 Strukturelle Merkmale

Die grundlegendste Gemeinsamkeit von GRPs aus Pflanzen ist ihr hoher Gehalt an der Aminosäure Glycin (teilweise über 70%) und die Anordnung dieses Glycins in sich wiederholenden Motiven. Diese repetitiven, Glycin-reichen Abschnitte machen meist den größten Teil des Proteins aus. Häufig vorkommende Motive sind z.B. GGGx, GGx,

GxGx und GGxxxGG (x = andere Aminosäure: oft Tyrosin, Histidin, Aspartat oder Serin), aber auch komplexere Variationen kommen vor (SHOWALTER 1993; CASSAB und VARNER 1998; SACHETTO-MARTINS et al. 2000).

Viele GRPs besitzen ein N-terminales Signalpeptid, welches für die Zielsteuerung dieser Proteine in den Apoplasten verantwortlich sein soll. Das Vorhandensein dieser Signalsequenz war lange das einzige Ordnungskriterium für GRP-Sequenzen (CHENG et al. 1996). Viele GRPs, die kein solches Signalpeptid haben, besitzen N-terminal ein oder zwei RNA-Bindungsmotive (CRÉTIN und PUIGDOMÈNECH 1990; GUILTINAN und NIU 1996; HEINTZEN et al. 1997; NAQVI et al. 1998; HORVATH und OLSON 1998). Zusätzlich treten noch einige andere strukturelle Besonderheiten auf, wie z.B. Zinkfinger-Domänen (OBOKATA et al. 1991; HANANO et al. 1996). Bestimmte Domänen einiger GRPs besitzen außerdem Homologien zu Oleosinen, d.h. Proteinen, die Fetttröpfchen (Oleosomen) im Cytosol stabilisieren sollen (FRANDSEN et al. 2001). Anhand dieser strukturellen Merkmale (repetitives Motiv, Signalpeptid, RNA-Bindungsdomäne u.ä.) unterscheidet SACHETTO-MARTINS im ersten Übersichtsartikel über pflanzliche GRPs acht Typen von GRPs (SACHETTO-MARTINS et al. 2000). Abbildung 1-5 zeigt eine schematische Darstellung der verschiedenen GRPs.

Die Vorhersage von Sekundärstrukturen innerhalb der Glycin-reichen Proteine beruht aufgrund des Mangels an aus Pflanzen gereinigten GRPs hauptsächlich auf computergestützten Analysen. Es werden zwei Modelle vorgeschlagen (SACHETTO-MARTINS et al. 2000): Zum einen wird basierend auf NMR-Untersuchungen an Keratin ein sogenanntes *velcro* (engl.: Klettverschluss)-Modell postuliert, bei dem die Glycin-reichen Elemente Schlaufen ausbilden, was zu einer hochflexiblen, leicht aufzulösenden Konformation des Proteins führt, die multiple Interaktionen mit anderen Proteinen zulassen würde (STEINERT et al. 1991). Zum anderen wird in mehreren Veröffentlichungen eine antiparallele β -Faltblatt-Struktur für GRPs vorgeschlagen, z.B. für GRP1 aus der Petunie (CONDIT und MEAGHER 1986) und GRP1.8 aus *Phaseolus vulgaris* (RINGLI et al. 2001). Hierbei würden die Seitenketten der nicht-Glycin-Aminosäuren zu einer Seite der planaren Struktur orientiert sein und dort eine Oberfläche mit spezifischen, möglicherweise hydrophoben Eigenschaften bilden. Die Wasserstoffgruppen der Glycinreste bilden die andere, hydrophile Oberfläche des Faltblattes. Aus dieser Konformation wird eine mögliche Funktion bei der Bildung hydrophober Oberflächen im Apoplasten abgeleitet (vgl. Kapitel 1.4.2.3).

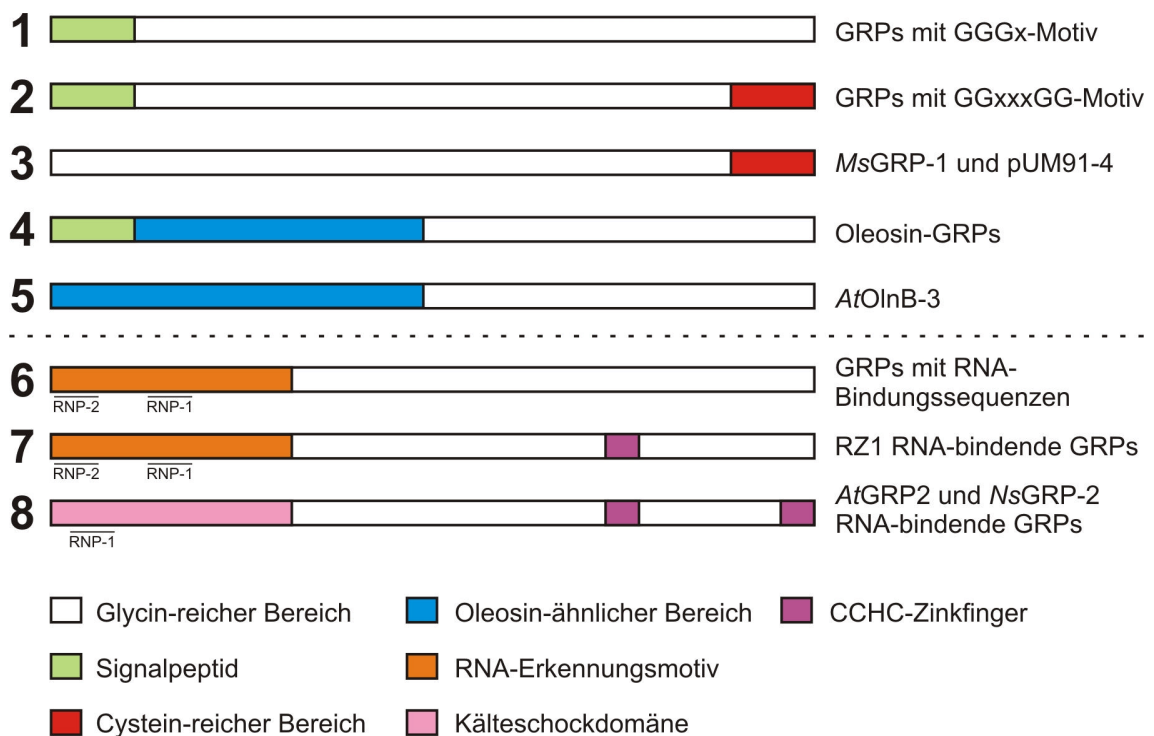


Abbildung 1-5: Schematische Darstellung der Typen pflanzlicher GRPs

verändert nach: SACHETTO-MARTINS et al. 2000

RNP-1, RNP-2 = RNA-Bindungsmotive; Ms = *Medicago sativa*, At = *Arabidopsis thaliana*,

Nt = *Nicotiana tabacum*

1.4.2.2 Induktion von GRPs

Die Induktion oder Suprimierung von GRPs ist als Antwort auf eine Vielzahl von endogenen und exogenen Faktoren beschrieben worden (SHOWALTER 1993; CASSAB und VARNER 1998; SACHETTO-MARTINS et al. 2000). Zu den endogenen Faktoren, welche die Menge an exprimierten GRPs beeinflussen, gehören unter anderem die **Phytohormone** Auxin (REDDY und POOVAIAH 1987) und Abscisinsäure (GOMEZ et al. 1988; MUNDY und CHUA 1988; DE OLIVEIRA et al. 1990; LUO et al. 1991; LUO et al. 1992; DUNN et al. 1996; FURUMOTO et al. 2000). Ebenso wurde eine **circadiane Rythmik** bei der Expression bestimmter GRPs beobachtet (CARPENTER et al. 1994; HEINTZEN et al. 1994a; HEINTZEN et al. 1994b; HEINTZEN et al. 1997). Häufiger kommt jedoch die Induktion der GRP-Produktion durch äußere Faktoren vor. Unter anderem wurde die Beeinflussung der GRP-Expression durch **Wasserstreß** (GOMEZ et al. 1988; MUNDY und CHUA 1988; SHOWALTER et al. 1992; LUO et al. 1992; LABERGE et al. 1993; DIDIERJEAN et al. 1996), **Kälte** (DIDIERJEAN et al. 1992; CARPENTER et al. 1994; DUNN et al. 1996; MOLINA et al. 1997; HORVATH und OLSON 1998), **Verwundung** (CONDIT und MEAGHER 1987; KELLER et al. 1988; SHOWALTER et al. 1991; LUO et al. 1992;

DIDIERJEAN et al. 1996; YASUDA et al. 1997) und bestimmte **Lichtverhältnisse** (VAN KAN et al. 1988; KALDENHOFF und RICHTER 1989; MOLINA et al. 1997) beschrieben. Neben diesen abiotischen Faktoren scheinen aber auch bestimmte Interaktionen der Pflanzen mit der belebten Umwelt einen Einfluß auf die Synthese Glycin-reicher Proteine zu haben. Beschrieben wurde beispielsweise die Expression von GRPs in frühen Phasen der **Nodulation**, d.h. der beginnenden Symbiose von Leguminosen mit N₂-fixierenden Bakterien in Wurzelknöllchen (KÜSTER et al. 1995; SCHRÖDER et al. 1997; PAWLOWSKI et al. 1997). Auch bei parasitischen Interaktionen, d.h. in Folge eines **Pathogenbefalls**, ist die Bildung von GRPs beschrieben worden (vgl. auch Kapitel 1.4.2.4). Dabei finden sich vor allem Beschreibungen der Induktion nach viraler Infektion in der Literatur (VAN KAN et al. 1988; LINTHORST et al. 1990; FANG et al. 1991; NAQVI et al. 1998), seltener wurde die GRP-Synthese nach Befall mit phytopathogenen Pilzen dokumentiert (MOLINA et al. 1997; CORNELS et al. 2000). Da die Expression vieler GRPs durch mehrere, unterschiedliche Streßfaktoren gleichermaßen induziert werden kann, scheinen diese GRPs Teil einer unspezifischen Streßantwort der Pflanze zu sein. Bestimmte GRPs können daher als Markerproteine für den Streßzustand der Pflanze angesehen werden.

1.4.2.3 Lokalisation und mögliche Funktionen

Es existieren nur wenige direkte experimentelle Hinweise auf die Funktion von GRPs in Pflanzen. Die meisten Theorien zur Funktion der Proteine beruhen daher auf Beobachtungen des Expressionsverhaltens und der oft sehr spezifischen Lokalisation der GRPs in der Pflanze. Am besten untersucht ist in dieser Beziehung GRP1.8 aus *Phaseolus vulgaris*. In ersten Versuchen konnte das Protein im **Leitgewebe** der Bohne lokalisiert werden (KELLER et al. 1988). Spätere Studien zeigten, daß das GRP dort auf die **Zellwände** des sich entwickelnden Protoxylems beschränkt ist (KELLER et al. 1989; RYSER und KELLER 1992). Diese gewebespezifische Expression wird durch ein koordiniertes Zusammenspiel eines spezifischen Promotors mit verschiedenen anderen regulatorischen Elementen erreicht (KELLER und BAUMGARTNER 1991; KELLER und HEIERLI 1994). Es wird angenommen, daß das Protein ein elementarer Bestandteil eines Reparaturmechanismus ist, welcher im Laufe des Wachstumsprozesses der Gefäße wirksam wird (RYSER et al. 1997). GRPs könnten dabei die sich auflösenden ursprünglichen Primärwände der Gefäße funktionell ersetzen und die Zellen so vor Wasserverlust und dem Kollabieren schützen. Eine oxidative Vernetzung und eine hydrophobe Interaktion des Proteins mit anderen Elementen der Zellwand könnte

hierbei eine Rolle spielen (RINGLI et al. 2001). Eine Lokalisation von GRPs in Leitgewebselementen konnte auch in anderen Pflanzen gezeigt werden (CONDIT et al. 1990; CONDIT 1993; MARTY et al. 1996; CHENG et al. 1996; RYSER et al. 1997; SAKUTA und SATOH 2000). Die Lokalisation von GRPs in der Zellwand wurde bisher nur für wenige Pflanzen explizit nachgewiesen (RYSER et al. 1997; SAKUTA und SATOH 2000), wird aber für einen großen Teil der beschriebenen GRPs angenommen.

Neben der vaskulären Lokalisation wurden GRPs auch in anderen pflanzlichen Geweben nachgewiesen. GRPs finden sich demnach unter anderem in **epidermalen Zellen** (GOMEZ et al. 1988; HEINTZEN et al. 1994a; MARTY et al. 1996) und meristematischen oder wachsenden Geweben (HEINTZEN et al. 1994b). Außerdem wurde die spezifische Lokalisation von GRPs in Blütenbestandteilen beschrieben. Für einige Oleosin-ähnliche GRPs aus *Arabidopsis* und *Brassica* wurde die exklusive Lokalisation in den männlichen Reproduktionsorganen gezeigt, vor allem in der Tapetum-Zellschicht der **Antheren** (DE OLIVEIRA et al. 1993; ROBERT et al. 1994; ROSS und MURPHY 1996; HONG et al. 1997; RUITER et al. 1997; RUBINELLI et al. 1998). Die Funktion dieser Gruppe von GRPs ist unklar, eine Membranassoziation einiger solcher Oleosin-ähnlicher GRPs konnte jedoch gezeigt werden (RUITER et al. 1997; WANG et al. 1997; MURPHY und ROSS 1998; TING et al. 1998). Einige GRPs zeigen ein spezifisches Expressionsmuster während der Fruchtreife (SANTINO et al. 1997) und der somatischen Embryogenese (ALEITH und RICHTER 1990; SATO et al. 1995). Auch die **wurzelspezifische** Expression von GRPs kommt vor (BERGERON et al. 1994; GODDEMEIER et al. 1998; SAKUTA et al. 1998; MATSUYAMA et al. 1999).

Auf subzellulärer Ebene wurden neben den oben beschriebenen zellwandständigen GRPs einige weitere Lokalisationen vor allem für RNA-bindende GRPs ohne Signalpeptid beschrieben. Den ersten experimentellen Hinweis auf ein nicht-Zellwand-GRP lieferten Untersuchungen mit dem Protein *OsRAB21* aus Reis, einem GRP, welches ausschließlich in **cytosolischen** Fraktionen nachweisbar ist (MUNDY und CHUA 1988). Später wurde für mehrere GRPs mit RNA-Bindungsmotiven eine Lokalisation im **Zellkern** nachgewiesen (HEINTZEN et al. 1994b; HANANO et al. 1996).

Im Hinblick auf ihre Funktionen lassen sich aufgrund des momentanen Wissensstandes zwei Hauptgruppen von GRPs unterscheiden. Zur ersten Gruppe gehören die Proteine, die eine Signalsequenz aufweisen und bei denen eine Lokalisation in der Zellwand nachgewiesen oder zumindest wahrscheinlich ist. Diese Proteine dienen möglicherweise der Verstärkung der Zellwände im Bedarfsfall, z.B. als Antwort auf eine mechanische

Streßsituation. Die Beobachtung der Insolubilisierung von GRPs im Wachstumsverlauf der Pflanze und die zumindest in einem Fall beschriebene peroxidative Quervernetzung eines GRPs unterstützen diese Vermutung (KELLER et al. 1989; MATSUYAMA et al. 1999; RINGLI et al. 2001). Eine weitere mögliche Funktion ist die bereits erwähnte Bildung hydrophober Oberflächen innerhalb der extrazellulären Matrix, besonders im Übergangsbereich von Plasmamembran und Zellwand, die der Verankerung z.B. von Lignin dienen könnte. Die zeitliche und räumliche Korrelation der Expression einzelner GRPs mit der Lignifizierung sprechen für diese Theorie (CONDIT 1993), konkrete Beweise existieren bisher allerdings nicht. Für ein Zellwand-GRP aus *Arabidopsis thaliana* (AtGRP-3) wurde die Interaktion mit einer membranständigen Rezeptor-Kinase nachgewiesen (PARK et al. 2001). Ebenso wird eine Rolle von GRPs als Bindeglieder im Cytoskelett-Zellwand-Kontinuum diskutiert (MARTY et al. 1996; SACHETTO-MARTINS et al. 2000). Für die GRPs mit Oleosin-ähnlichen Domänen wird eine Funktion in der Stabilisierung lipidreicher Strukturen vermutet (DE OLIVEIRA et al. 1993; ROSS und MURPHY 1996; RUITER et al. 1997).

Die zweite große Gruppe innerhalb der GRPs bilden die mit Nukleinsäuren interagierenden Proteine ohne Signalpeptid. Die genaue Funktion dieser Proteine mit RNA-Bindungsdomänen ist nicht bekannt, eine mögliche Beteiligung an Regulationsprozessen der Genexpression und an der Prozessierung von RNAs wird diskutiert (HEINTZEN et al. 1994b; FREIRE und PAGES 1995; HANANO et al. 1996; SACHETTO-MARTINS et al. 2000).

1.4.2.4 Glycin-reiche Proteine in Wirt-Pathogen-Interaktionen

Zwar ist die Induktion von GRPs nach Pathogenbefall in mehreren Systemen beschrieben worden (vgl. Kapitel 1.4.2.2), über mögliche Funktionen in der Pathogenabwehr wird allerdings nur spekuliert. Eine Quervernetzung von GRPs in der extrazellulären Matrix zur Verstärkung der Zellwände wird in einigen Fällen für wahrscheinlich gehalten (LEI und WU 1991; CORNELS et al. 2000; RINGLI et al. 2001). Eine solche Zellwandverstärkung könnte z.B. das mechanische Eindringen von pilzlichen Haustorien in die Pflanzenzelle erschweren. Auch der enzymatische Abbau der Zellwände durch das Pathogen könnte behindert werden; so wurde z.B. die Erschwerung der Protoplastierung von Suspensionszellen der Kichererbse nach Elicitierung auf eine oxidative Quervernetzung von anderen Zellwandstrukturproteinen (HRGPs, PRPs) zurückgeführt (MÜHLENBECK 1993).

Inwieweit GRPs als Resistenzmechanismen wirken können ist unklar. Eine erhöhte konstitutive Expression von GRP-Genen in transgenen Tabakpflanzen hat keinen signifikanten Einfluß auf die Infektionsrate der Pflanzen mit Tabak- und Alfalfa-Mosaik-Viren (LINTHORST et al. 1989).

Neben dem System Kichererbse/*Ascochyta rabiei* ist eines der wenigen bisher beschriebenen Interaktionssysteme, bei denen die Menge der GRP-mRNA durch Befall mit pilzlichen Pathogenen zunimmt, das der Gerste (*Hordeum vulgare*) mit den Schadpilzen *Erysiphe graminis* und *Rhynchosporium secalis* (MOLINA et al. 1997). Sowohl in kompatiblen als auch in inkompatiblen Interaktionen wird der Gehalt an GRP-mRNA durch Infektion deutlich erhöht, während eine bakterielle Infektion keinen Einfluß auf die GRP-Expression zu haben scheint. Eine Funktion der GRPs ist aber auch in diesen Systemen noch nicht bekannt.

Eine unerwartete Entdeckung im Bezug auf GRPs wurde von einer koreanischen Arbeitsgruppe veröffentlicht: Auf der Suche nach antimikrobiell wirksamen Substanzen in den Wurzeln des Hirtentäschelkrauts *Capsella bursa-pastoris*, einer in der asiatischen Medizin traditionell zur Behandlung von Infektionen angewandten Pflanze, wurden zwei Glycin-reiche Polypeptide isoliert. Erst später wurde entdeckt, daß diese Polypeptide (Sheperin I und II) ursprünglich Teile eines einzigen GRPs sind, aus dem sie durch enzymatische Spaltung freigesetzt werden. Dieses GRP zeigt alle Charakteristika eines „typischen“ Zellwand-GRPs, inklusive eines Signalpeptids, wobei Computeranalysen allerdings eher eine Lokalisation des Proteins in der Vakuole als im Apoplasten vorher-sagen. Erstaunlich ist, daß für die beiden Polypeptide eine deutliche wachstumshemmende Wirkung bei gramnegativen Bakterien und bestimmten humanpathogenen Pilzen in Konzentrationen von 1 mM und geringer gezeigt werden konnte (PARK et al. 2000). Zwar sind eine Reihe von antimikrobiell wirksamen Polypeptiden aus Pflanzen beschrieben worden, z.B. die schwefelhaltigen Thionine (FLORACK und STIEKEMA 1994), für die Proteinklasse der Zellwand-GRPs oder ihrer Abbauprodukte stellt eine antimikrobielle Wirkung aber eine bisher völlig unbekannt mögliche Funktion dar.

1.4.3 Stand der Forschung II: Glycin-reiche Proteine der Kichererbse

Im Rahmen eines differentiellen cDNA-Bank-Screenings mit cDNAs aus infizierten und wasserbehandelten Kichererbsenpflanzen wurde eine große Gruppe von Klonen identifiziert, deren entsprechende mRNAs Homologien zu Glycin-reichen Proteinen

aufwiesen (ICHINOSE et al. 2000). GRP-Transkripte stellen demnach die dominanteste Gruppe von mRNAs dar, die zum Zeitpunkt der Herstellung der cDNA-Banken (4 Tage nach Infektion) in Kichererbsenpflanzen in Folge der Infektion neu gebildet werden (vgl. Kapitel 1.2.3). Im Rahmen meiner Diplomarbeit konnten aus den cDNA-Klonen die Sequenzen zweier GRPs abgeleitet und charakterisiert werden, die das gemeinsame repetitive Aminosäuremotiv „GGGNYGx“ (vgl. Kapitel 1.4.2.1) enthielten. Das kleinere Protein GRP1 (ca. 15 kDa) besitzt 10 Wiederholungen dieses Elements (vgl. hierzu Abbildung 3-2), in der Sequenz des größeren GRP2 (> 20 kDa) finden sich 16 Wiederholungen des repetitiven Motivs. Aufgrund von Sequenzvergleichen wurde davon ausgegangen, daß es sich bei der Sequenz von GRP1 um die vollständige Aminosäureabfolge dieses Proteins handelt (vgl. Kapitel 3.1.1). Es konnte eine Induktion der Expression der GRPs durch Infektion mit *Ascochyta rabiei* in Blättchen und Stengeln der Kichererbse nachgewiesen werden. Die Elicitierung von Zellsuspensionskulturen führte hingegen zu einer Abnahme der Transkriptmenge (CORNELS 1998).

1.5 Zielsetzung

Kernaspekt der hier dargestellten Arbeiten war die Frage, ob und inwieweit die beiden in der Diplomarbeit über ihre Sequenzen identifizierten Glycin-reichen Proteine an der Resistenzantwort der Kichererbse nach Infektion mit *Ascochyta rabiei* beteiligt sind. Hierzu sollten zunächst die Ergebnisse der Diplomarbeit bestätigt werden. Weiter sollte versucht werden, die Sequenzinformation der beiden GRPs zu vervollständigen und die Sequenzen über computerunterstützte Methoden weiter zu charakterisieren. Ein weiterer Ansatzpunkt war die Lokalisierung der GRPs innerhalb der Pflanze. Dies sollte zum einen auf der Ebene der Expression der GRP-Gene untersucht werden, zum anderen sollte aber auch eine Möglichkeit gefunden werden, einen GRP-spezifischen Antikörper zu gewinnen, mit dem die beiden Proteine dann in Western-Untersuchungen und *in situ*-Immunolokalisationsversuchen („Tissue-blots“) direkt detektiert werden könnten. Diese Methoden sollten auch bei einem Vergleich des resistenten und des suszeptiblen Kichererbsenkultivars Anwendung finden. Ferner sollte die Frage geklärt werden, ob eine peroxidative Quervernetzung der GRPs der Kichererbse möglich ist. Abschließend sollte eine Einordnung der GRPs in die bereits bekannten Abläufe bei der Pathogenabwehr der Kichererbse und eine Bewertung ihrer Relevanz in diesen Prozessen erfolgen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Bei den für Puffer und Medien eingesetzten Chemikalien und Reagenzien handelte es sich, sofern nicht anders angegeben, um Produkte der Firmen MERCK KGaA (Darmstadt) oder SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH (Steinheim).

Guanidinthiocyanat und MOPS (3-(N-Morpholino) propane sulfonic acid) wurden von der Firma SERVA GmbH (Heidelberg) bezogen.

Das zur Isolation von Plasmiden aus *Escherichia coli* eingesetzte „Plasmid Mini Kit“, das „RNeasy™ Mini Kit“ zur Isolation von Gesamt-RNA aus Bakterien, das zur Isolation von Gesamt-RNA aus Pflanzen im kleinen Maßstab verwendete „RNeasy™ Plant Mini Kit“ sowie das „DNeasy Plant Mini Kit“ sind Produkte der Firma QIAGEN GmbH (Hilden). Ebenso wurden der für die Herstellung des Expressionskonstruktes verwendete Vektor pQE31, das „Anti-His Antibody Selector Kit“, der RGS-His™-Antikörper und die zur Aufreinigung von His-markierten Proteinen benötigten „Ni-NTA Spin Columns“ von QIAGEN bezogen.

Das „RNAqueous Midi Kit“ zur Gewinnung von größeren Mengen an Gesamt-RNA aus Pflanzen ist ein Produkt der Firma AMBION, Inc. (Austin, Texas, USA).

Das Chemilumineszenzsubstrat CDP-Star, „Anti-DIG-AP Fab Fragments“ (an alkalische Phosphatase gekoppelter Antikörper gegen Digoxigenin) und das „DIG RNA Labelling Mix, 10x“ wurden von der Firma ROCHE DIAGNOSTICS GmbH (ehemals BOEHRINGER GmbH, Mannheim) bezogen.

Das „RNA Transkription Kit“ (zur Herstellung von antisense-RNA-Sonden) und der Plasmid-Vektor pBluescript II SK (-) sind Produkte der Firma STRATAGENE CLONING SYSTEMS (La Jolla, Kalifornien, USA).

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das EasyPure® DNA Purification-Kit der Firma BIOZYMDIAGNOSTIK GmbH (Hess. Oldendorf) verwendet.

Die eingesetzten Restriktionsenzyme sowie der Restriktionspuffer „one-phor-all-buffer+“ stammen von der Firma AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH (Freiburg).

„RedTaq“-DNA-Polymerase ist ein Produkt der Firma SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH (Steinheim).

2.1.2 Organismen

2.1.2.1 Pflanzenkultivare

Es wurden zwei Kultivare der Kichererbse (*Cicer arietinum* L.) in den Versuchen eingesetzt. Hierbei handelte es sich um das gegen Infektion mit *Ascochyta rabiei* Kultivar XXI (vgl. Kapitel 2.1.2.2) hochgradig resistente Kultivar ILC 3279 und das in der gleichen Interaktion suszeptible Kultivar ILC 1929. Getrocknete Samen beider Kultivare wurden vom ICARDA (International Center for Agricultural Research in the Dry Areas) in Aleppo, Syrien, bezogen.

2.1.2.2 Pilzstämme

Zur Infektion der Pflanzen wurde das ursprünglich von W. J. KAISER (Washington, USA) isolierte Kultivar XXI von *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. (ATCC 76502, mating type 2) eingesetzt. Zur Stammhaltung wurde sporulierendes Myzel von *Ascochyta rabiei* in Kartoffel-Dextrose-Medium mit 15% Glycerin in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.1.2.3 Bakterien

Zur Vermehrung von Klonierungsvektoren (z.B. pBluescript, pDATA) wurde der *Escherichia coli*-Sicherheitsstamm XL1 Blue (Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F ϕ proAB lacI^qZDM15 Tn10 (Tet^r)]) eingesetzt. Zur heterologen Expression von His-markierten Proteinen (vgl. Kapitel 2.4.1) wurde der *E. coli*-Sicherheitsstamm M15 der Firma QIAGEN (Hilden) benutzt, welcher den Vektor pREP-4 enthielt.

2.2 Anzucht und Infektion

2.2.1 Anzucht der Kichererbsen

Die Anzucht von *Cicer arietinum* erfolgte wie bei CORNELS beschrieben (CORNELS 1998). Nach einer Wachstumsdauer von 14 d bei 20 °C und einer Lichtintensität von ca. 170-190 μ Einstein \cdot m⁻² \cdot s⁻¹ erfolgten Infektion oder Verwundung bzw. Kontrollbehandlung.

2.2.2 Herstellung einer Sporensuspension von *Ascochyta rabiei*

Die zur Infektion benötigte Sporensuspension des Pathogens *Ascochyta rabiei* wurde wie bei CORNELS beschrieben gewonnen (CORNELS 1998). Es wurde eine Endkonzentration von ca. 10⁶ Sporen/ml eingestellt.

2.2.3 Infektion

Die Kichererbsen wurden wie bei CORNELS beschrieben mit der Sporensuspension infiziert bzw. mit einer entsprechenden Menge an sterilem Wasser behandelt. Danach wurden die Pflanzen in einen Inkubator mit geringerer Lichtstärke (ca. 140 μ Einstein \cdot m⁻² \cdot s⁻¹) überführt. Unterschiedlich behandelte Pflanzen wurden dabei getrennt voneinander in zuvor mit 70% Ethanol desinfizierte Glasaquarien gesetzt und diese mit Frischhaltefolie verschlossen. Nach zwei Tagen wurde die Frischhaltefolie nur noch locker aufgelegt (CORNELS 1998). In allen Versuchsansätzen wurden zur Überprüfung der Keim- und Infektionsfähigkeit der Sporen auch Pflanzen des suszeptiblen Kultivars ILC1929 infiziert und die Symptomausprägung beobachtet.

2.2.4 Verwundung von Blättern

Die Verwundung von Blättern der Kichererbsenpflanzen erfolgte durch zweimaliges Einschneiden der einzelnen Blattfiedern mit einer zuvor mit 70% Ethanol desinfizierten Präparationsschere. Dabei wurde darauf geachtet, die Mittelrippe der Blattfiedern und die Rhachis des Fiederblattes nicht zu verletzen. Abbildung 2-1 verdeutlicht die Schnittführung.

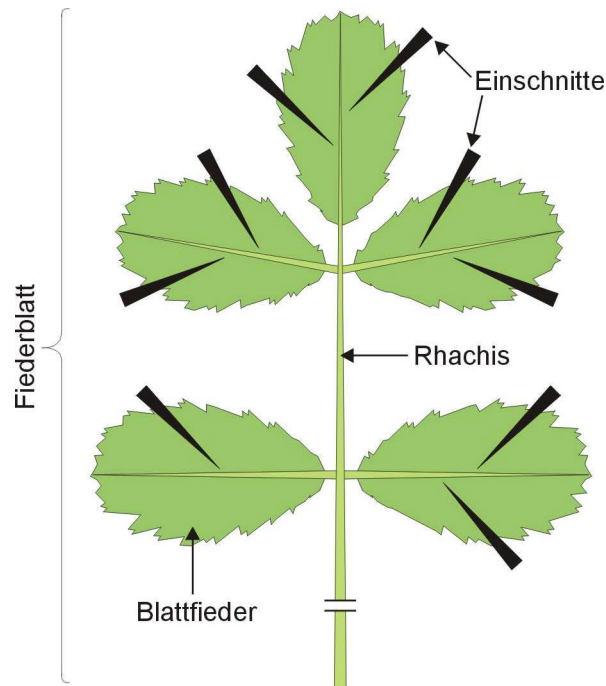


Abbildung 2-1: Verwundung von Blättern der Kichererbse

Die Abbildung veranschaulicht die Schnittführung bei der Verwundung der Blattfiedern. Die Einschnitte erfolgten mit einer zuvor mit 70% Ethanol desinfizierten Präparationsschere.

2.2.5 Ernte und Lagerung von Pflanzenmaterial

In einem Zeitraum von 0 bis 6 d nach Infektion, Verwundung bzw. Kontrollbehandlung wurden täglich Proben von Blättchen, Stengeln und Wurzeln der Kichererbsepflanzen geerntet. Es wurden die kompletten Fiederblätter (mit Blattstiel) der Hauptsproßachse mit einer Schere abgeschnitten, wobei auf die Verwendung des jeweils ältesten und des jüngsten Blatttriebes verzichtet wurde. Als Stengelmaterial wurden nur die Bereiche der Sproßachse geerntet, die zwischen den Nodien (Blattstielansätzen) lagen. Die unterirdischen Pflanzenteile wurden zunächst unter fließendem Leitungswasser gründlich von Erde und Humus befreit. Die Wurzeln wurden dann ca. 0,5 cm unterhalb der Ansatzstelle der Cotyledonen abgeschnitten. Das Pflanzenmaterial wurde vor der Einwaage zur Portionierung vorsichtig trockengetupft, in Portionen zu jeweils 500 mg in 10 ml-Kunststoffzentrifugenröhrchen mit Deckel (GREINER) eingewogen und in flüssigem N₂ schockgefroren. Die so gewonnenen Proben wurden für zwei Tage bei -50 °C gefriergetrocknet (Lyophyllisator, CHRIST) und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Sequenzierung

2.3.1.1 Anzucht von *E. coli*

Zur Plasmidisolierung aus Bakterien, welche die Vektoren pBluescript, pDATA oder pQE-31 enthielten, wurden unter sterilen Bedingungen 5 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin in ein steriles 15 ml Kunststoff-Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluß („Falcontube“) überführt. Diese Nährlösung wurde mit einer einzelnen Kolonie des Bakteriums inokuliert. Das Wachstum der Bakterien erfolgte für 12 bis 14 h bei 37 °C unter heftigem Schütteln, wobei die Zentrifugenröhrchen horizontal in den Schüttler eingespannt wurden.

Puffer und Lösungen:

LB-(LURIA-BERTANI-)Medium: 10 g bacto-tryptone
5 g bacto-yeast-extract
10 g NaCl
ad *Aqua bidest* 1000 ml
pH 7,0

2.3.1.2 Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe des „Plasmid Mini Kit“ der Firma QIAGEN nach Angaben des Herstellers. Je nach Wachstumsdauer und -rate der Bakterien wurden 1 bis 4 ml Bakteriensuspension als Ausgangsmaterial eingesetzt.

Der DNA-Gehalt der Plasmid-Präparationen wurde durch photometrische Messung bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm bestimmt (EPPENDORF Biophotometer). Die DNA-Konzentration wurde vom Photometer nach folgender Formel berechnet:

$$OD_{260\text{nm}} \cdot 50 \cdot \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Konzentration}_{\text{DNA}} [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

2.3.1.3 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von D. AHLERT durchgeführt und erfolgte mittels der Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach SANGER (SANGER et al. 1977). Zur Sichtbarmachung der Banden im Sequenziergel wurden mit dem fluoreszierenden Farbstoff IRD 800 5'-endmarkierte Oligonukleotide als Primer eingesetzt. Die Sequenzierreaktion erfolgte in einem PCR-Thermoblock (GeneAmp® PCR System

2400, PERKIN ELMER CETUS), Gellauf und automatische Auswertung des Fluoreszenz-Bandenmusters erfolgten mit Hilfe eines computergestützten Sequenators (LI-COR 4000, MWG-BIOTECH) im Institut für Botanik der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster. Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte mit dem Programmpaket DNASTar™ (vgl. Kapitel 2.6.1).

2.3.2 Northern-Analysen

Die für die Isolation von RNA und die Northern-Analysen benötigten Geräte (Mörser, Spatel, Reaktionsgefäße etc.) wurden zur Deaktivierung eventuell vorhandener RNasen autoklaviert und anschließend über Nacht bei 120 °C ausgebacken. Für diese Behandlung nicht geeignete Geräte (z.B. Kunststoffschalen oder die „TurboBlotter™“-Apparatur (vgl. Kapitel 2.3.2.4)) wurden mit „RNase Erase“ Lösung (Bio 101, Inc., Carlsbad, Kalifornien, USA) nach Angaben des Herstellers behandelt und abschließend mit DEPC-Wasser gespült. Zusätzlich wurden alle Arbeitsschritte mit Handschuhen ausgeführt und die benötigten Lösungen entweder mit DEPC-H₂O oder frischem *Aqua bidest* angesetzt und autoklaviert.

Puffer und Lösungen:

DEPC-H₂O: 0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat in *Aqua bidest*
über Nacht stehen lassen, dann autoklavieren

2.3.2.1 Isolation von Gesamt-RNA aus Pflanzen

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial erfolgte mit Hilfe des „RNAqueous Midi Kit“ der Firma AMBION, Inc. (Austin, Texas, USA). Als Ausgangsmaterial wurde das lyophyllisierte Material aus ursprünglich 0,5 g Frischgewicht eingesetzt (≈ 70 – 100 mg Trockengewicht). Das gefriergetrocknete Pflanzenmaterial wurde unter flüssigem N₂ gemörsert und das erhaltene feine Pulver nach Angaben des Herstellers zur RNA-Isolation eingesetzt. Die Bindungskapazität der Filter des RNAqueous Midi Kit betrug ca. 1 mg RNA.

Zur Isolation von Gesamt-RNA in kleinerem Maßstab mit Hilfe des „RNeasy Plant Mini Kit“ (QIAGEN, Hilden) wurden ca. 20 mg lyophyllisiertes Pflanzenmaterial wie oben beschrieben gemörsert und nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Die maximale Bindungskapazität der eingesetzten „RNeasy Mini Spin Columns“ betrug 100 µg RNA.

Die erhaltene RNA wurde bei beiden Methoden in RNase-freiem Wasser aufgenommen und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Ausbeute der RNA-Isolation wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda=260\text{ nm}$ bestimmt (EPPENDORF Biophotometer) und die Verhältnisse $\frac{\text{OD } 260\text{ nm}}{\text{OD } 230\text{ nm}}$ und $\frac{\text{OD } 260\text{ nm}}{\text{OD } 280\text{ nm}}$ berechnet, welche bedingt eine Aussage über die Qualität der Isolation zulassen (CORNELS 1998). Die RNA-Konzentration wurde vom Photometer nach folgender Formel errechnet:

$$\text{OD}_{260\text{nm}} \cdot 40 \cdot \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Konzentration}_{\text{RNA}} [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

2.3.2.2 Isolation von Gesamt-RNA aus Bakterien

Die Extraktion von Gesamt-RNA aus *E. coli* wurde mit Hilfe des „RNeasy Mini Kit“ (QIAGEN, Hilden) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die erhaltene RNA wurde wie in Kapitel 2.3.2.1 beschrieben photometrisch quantifiziert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.3.2.3 Herstellung von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden

Die Markierung von antisense-RNA-Sonden mit Digoxigenin erfolgte mit Hilfe des „RNA Transcription Kit“ der Firma STRATAGENE (La Jolla, Kalifornien, USA) unter Verwendung des „DIG RNA Labelling Mix, 10x“ der Firma ROCHE DIAGNOSTICS GmbH (Mannheim) unter den bei CORNELS beschriebenen Bedingungen (CORNELS 1998). Die Markierung der Sonden wurde mittels Dot-Blot-Analysen überprüft. Hierzu wurden Verdünnungen der Sondenpräparation in DEPC-Wasser (1:100 bis 1:10000) hergestellt. Jeweils $1\text{ }\mu\text{l}$ dieser Verdünnungen wurde auf eine Nylonmembran aufgetropft und diese wie die eigentlichen RNA-Blots hitzefixiert und der immunologischen Nachweisreaktion (vgl. Kapitel 2.3.2.6) unterzogen.

2.3.2.4 Gelelektrophorese und Northern-Blot

Die gelelektrophoretische Auftrennung von RNA erfolgte in denaturierenden MOPS-Gelen (1% Agarose in 1 x MOPS-Puffer, 12,5 % (v/v) Formalin (37% Formaldehyd)) bei einer Spannung von 50 V. Als Laufpuffer diente 1 x MOPS.

Für Northern-Analysen wurden pro Gelbahn 1 – 5 μg Gesamt-RNA aus Bakterien bzw. 5 – 20 μg Gesamt-RNA aus Pflanzen eingesetzt. Die RNA-Proben wurden mit DEPC- H_2O auf das gleiche Volumen aufgefüllt, mit einem Volumen Probenpuffer (RNAqueous Midi Kit, AMBION) versetzt, bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min denaturiert und schnell

auf Eis heruntergekühlt, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Je nach Größe des Gels und der gewünschten Trennschärfe erfolgte die Auftrennung für 3 – 5 h.

Zur visuellen Überprüfung der aufgetragenen RNA-Mengen wurden zwei identische Gele angefertigt, wobei das eine Gel zum Northern-Blot eingesetzt wurde und das andere mit Ethidiumbromid gefärbt wurde (ca. 10 min in 1 x MOPS mit 1 µg/ml Ethidiumbromid). Anschließend wurde das Gel für mindestens 2 h in DEPC-Wasser entfärbt und dann unter ultraviolettem Licht betrachtet und fotografiert (UV-Transilluminator, BACHHOFER, $\lambda=302$ nm).

Die aufgetrennte RNA wurde mittels kapillarischem Transfer aus dem Gel auf eine ungeladene Nylonmembran (Nytran N, MILLIPORE Corp., Bedford, Massachusetts, USA) „geblottet“. Hierfür wurde ein alkalischer „downward“-Transfer gewählt (CHOMCZYNSKI 1992). Eingesetzt wurde das „TurboBlotter™“-System der Firma SCHLEICHER & SCHUELL (Dassel). Als Blotpapier diente „Gel-Blotting-Paper GB 02“ (SCHLEICHER & SCHUELL). Der schematische Aufbau eines Northern-Blots ist in Abbildung 2-2 dargestellt.

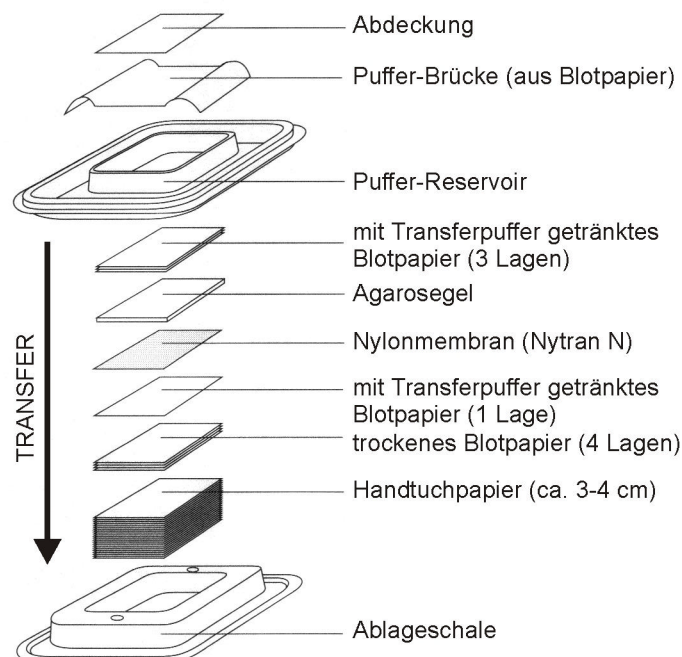


Abbildung 2-2: Schematischer Aufbau eines Northern-Blots

Alkalischer downward-Transfer mit Hilfe des „TurboBlotter™“-Systems verändert nach: „TurboBlotter™ - Rapid Downward Transfer Systems“ (Gebrauchsanweisung, SCHLEICHER & SCHUELL, 1999)

Der Transfer erfolgte für 2 h, anschließend wurde der Blot abgebaut und die RNA auf der Nylonmembran durch Anbacken bei 80 °C für 30 min fixiert. Die Blotmembran wurde entweder sofort zur Hybridisierung eingesetzt oder in Folie eingeschweißt bei 4 °C gelagert.

Puffer und Lösungen:

10 x MOPS:	0,2 M MOPS (3-(N-Morpholino) propane sulfonic acid) 0,05 M Na-Acetat 0,01 M EDTA pH 7,0
Transferpuffer:	3 M NaCl 8 mM NaOH 2 mM Laurylsarcosin pH 11,4

2.3.2.5 Hybridisierung

Die Prähybridisierung und Hybridisierung wurden weitestgehend wie im „DIG Application Manual for Filter Hybridization“ (ROCHE DIAGNOSTICS GmbH, 2000) beschrieben durchgeführt. Hierbei wurde die Membran mit der hitzefixierten RNA bei 68 °C in einem Rotationsofen (HERAEUS) mit 10 - 20 ml Prähybridisierungslösung in einem Hybridisierungsröhrchen geeigneter Größe prähybridisiert. Nach 2-3 h wurde die Prähybridisierungslösung gegen die Sondenlösung ausgetauscht. Die Sonde wurde dazu im Verhältnis von 1:1000 bis 1:10.000 mit frischer Prähybridisierungslösung verdünnt und für 10 min bei 100 °C denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68 °C.

Puffer und Lösungen:

20 x SSC:	3 M NaCl 300 mM Na - Citrat pH 7,0
Prähybridisierungslösung:	5 x SSC 50% (v/v) Formamid 0,02% (w/v) SDS (aus 10%iger Stammlösung) 0,1% (w/v) Laurylsarcosin (aus 10%iger Stammlösung) 2% (w/v) Blocking-Reagenz (aus 10%iger Stammlösung)

2.3.2.6 Immunologischer Nachweis und Visualisierung

In Anlehnung an die im „DIG Application Manual for Filter Hybridization“ (ROCHE DIAGNOSTICS GmbH, 2000) beschriebene Methode wurden nicht oder unspezifisch gebundene Sondenmoleküle in mehreren Waschschrritten entfernt. Die Waschschrritte erfolgten unter kontinuierlichem Schütteln bei ca. 150 rpm. Zunächst wurde die Membran für 1 min in Waschpuffer gespült, anschließend zweimal für 15 min mit 2 x SSC, 0,1% SDS bei Raumtemperatur gewaschen. Es folgten zwei Waschschrritte für je 20 min bei 68 °C in vorgewärmten Puffer mit niedriger Ionenstärke (0,1 x SSC, 0,1% SDS; Schüttler im Wärmeschrank).

Die Membran wurde für 30 min in Blocklösung inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Dann wurde sie für weitere 30 min in Blocklösung mit 0,2 µl/ml Anti-Digoxigenin-AP leicht geschüttelt. Nicht gebundener Antikörper wurde durch 2 x 15 min Waschen bei Raumtemperatur mit Waschpuffer entfernt. Abschließend wurde die Membran für 2 min in Detektionspuffer äquilibriert.

Die feuchte Membran wurde zwischen zwei stabile Plastikfolien gelegt und mit ca. 5 µl/cm² CDP-Star in Detektionspuffer (1:100) beträufelt, wobei die Plastikfolien sofort nach Zugabe des Chemilumineszenzsubstrats wieder geschlossen wurden, um ein Antrocknen des Blots zu vermeiden. Durch vorsichtiges Wischen mit einem feuchten Labortuch wurde das Substrat gleichmäßig auf der Membran verteilt und eventuell vorhandene Luftblasen zwischen den Folien herausgedrückt. Nach einer Inkubation von 5 min wurde die Membran in Haushaltsfolie eingeschweißt und in einer Röntgenfilmkassette mit Verstärkerfolien des Typs „universal“ (OMNILAB) fixiert.

Die Visualisierung der freigesetzten Chemilumineszenz erfolgte durch Auflegen eines Röntgenfilms (KODAK Biomax) für 5 s bis 30 min (je nach Markierung der Sonde bzw. Intensität der Signale). Die lichtemittierende Reaktion ist laut Hersteller für mindestens 24 h stabil, was das Auflegen mehrerer Röntgenfilme nacheinander zur Optimierung der Belichtungszeit ermöglichte.

Puffer und Lösungen:

Maleinsäurepuffer: 0,1 M Maleinsäure
 150 mM NaCl
 pH 7,5

Waschpuffer:	Maleinsäurepuffer + 0,3% (v/v) Tween 20
Blockpuffer:	Maleinsäurepuffer + 1% (w/v) Blocking-Reagenz (ROCHE)
Detektionspuffer:	0,1 M Tris-HCl 0,1 M NaCl pH 9,5

2.3.3 PCR zur Amplifizierung des 5`-Endes des Leserahmens von GRP1 und GRP2

2.3.3.1 Ausgangsmaterial

Als zu amplifizierende Ausgangs-DNA (engl.: *template*) wurde mit Hilfe des „DNeasy Plant Mini Kit“ (QIAGEN) genomische DNA aus der Kichererbse (unbehandelte Pflanzen, 16 d alt) aus ca. 20 mg Trockengewicht nach Angaben des Herstellers isoliert.

Zusätzlich wurde DNA aus einer Zellkultur-cDNA-Bank der Kichererbse (OVERKAMP 2000) und einer cDNA-Bank aus infizierten Pflanzen (ICHINOSE et al. 2000) isoliert. Dazu wurde 1 ml der jeweiligen Bank für 10 min bei 70 °C denaturiert und anschließend viermal mit Phenol, pH 8,0/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert (SAMBROOK et al. 1989). Die DNA-Konzentration der wäßrigen Phase wurde photometrisch bestimmt (vgl. Kapitel 2.3.1.2).

Als Kontrollreaktionen wurden außerdem die cDNA-Klone INR20 bzw. INR51 (CORNELS 1998; ICHINOSE et al. 2000; CORNELS et al. 2000) eingesetzt.

2.3.3.2 PCR-Reaktion

Zur Amplifizierung des unvollständigen 5`-Endes der GRP-cDNA-Klone mittels „touchdown“-PCR (SAIKI et al. 1985; MULLIS und FALOONA 1987) wurden folgende Primeroligonukleotide (MWG-BIOTECH, Ebersberg) eingesetzt:

INR20forward:	5` - TTGGCCTTTTGGCTATGG- 3`
INR23reverse:	5` - GTCTTGTCCTCTCTTTGC - 3`

Zusätzlich wurden die käuflichen Primer „universal“ und „reverse“ gegen spezifische Bindungsstellen auf dem Vektor pBluescript verwendet (vgl. Abbildung 2-5).

Als „template“ wurde jeweils 2 ng der cDNA-Klone INR20 bzw. INR51, 50 ng genomische Kichererbse-DNA oder 100 ng cDNA (aus cDNA-Banken) eingesetzt. Ein

Ansatz (V=25 µl) enthielt 10 – 50 pmol der jeweiligen Primer, 2,5 µl 10fach konzentrierten „RedTaq“-Reaktionspuffer und 2,5 µl „RedTaq“-DNA-Polymerase-Mix (SIGMA-ALDRICH). Die PCR-Reaktion wurde in einem „GeneAmp® PCR System 2400“-Thermoblock der Firma PERKIN ELMER CETUS mit dem in Abbildung 2-3 dargestellten Temperaturprofil durchgeführt.

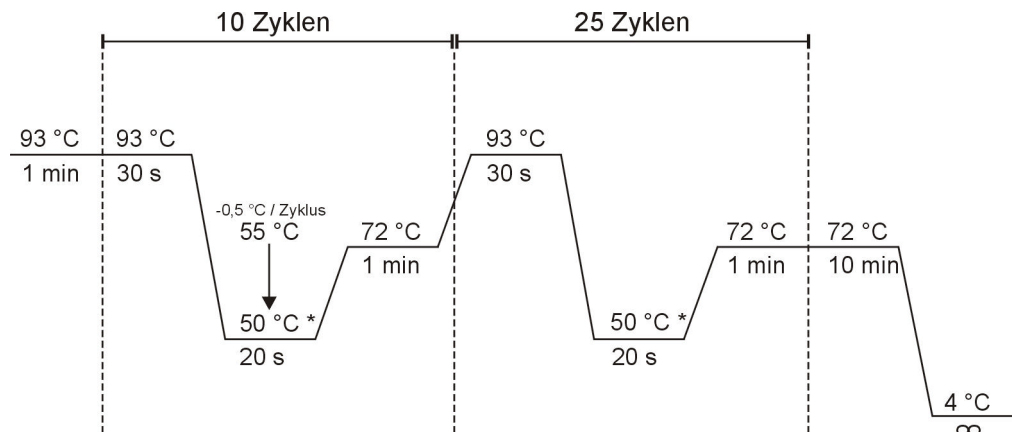


Abbildung 2-3: PCR-Temperaturprofil zur Amplifizierung des 5'-Endes der GRP-Klone

Reaktionsvolumen = 25 µl; GeneAmp® PCR System 2400 (PERKIN ELMER CETUS)

*) Die Anlagerungs- (engl.: annealing-) Temperatur und das touchdown-Profil wurden mehrfach variiert (48 - 54 °C); die Abbildung zeigt die für die dargestellten Ergebnisse verwendete annealing-Temperatur von 50 °C.

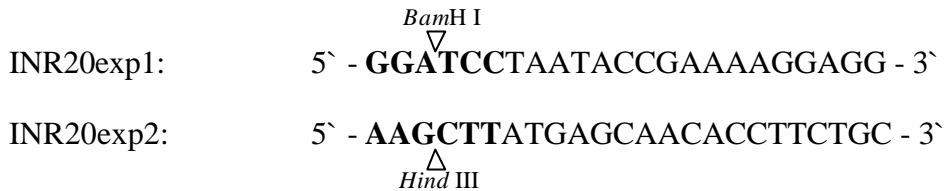
2.3.4 Herstellung eines Expressionskonstruktes zur heterologen Expression von GRP1 in *E. coli*

Zur heterologen Expression des größten Teils des GRP1-Proteins in *E. coli* wurde mittels molekularbiologischer Techniken ein Vektor konstruiert, der für ein His-markiertes Fusionsprotein codiert, dessen Transkription über den *lacZ*-Promotor gesteuert wird. Die Methodik der Herstellung des Konstruktes, der heterologen Expression und der anschließenden Aufreinigung des exprimierten Proteins wurde in Anlehnung an die im Handbuch für das His-tag-System („The QIAexpressionist™“, 4. Ausgabe Januar 2000, QIAGEN) empfohlene Vorgehensweise gewählt. Eine Übersicht über den Ablauf der Konstruktion des Expressionsvektors ist in Kapitel 3.4.1 wiedergegeben.

Die Anzucht von *E. coli* und die Plasmidisolierung für die PCR bzw. Restriktion wurden wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben durchgeführt.

2.3.4.1 PCR zur Addition von Restriktionsschnittstellen

Zur Addition von Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bam*H I und *Hind* III an den zur Expression bestimmten Sequenzabschnitt von GRP1 mittels „touchdown“-PCR wurden folgende Primeroligonukleotide (MWG-BIOTECH, Ebersberg) verwendet:



Als *template* wurde der cDNA-Klon INR20 (CORNELS 1998; ICHINOSE et al. 2000; CORNELS et al. 2000) eingesetzt. Ein Ansatz (V=25 µl) enthielt 2 ng template-DNA, 10 – 100 pmol der jeweiligen Primer, 2,5 µl 10fach konzentrierten „RedTaq“-Reaktionspuffer und 2,5 µl „RedTaq“-DNA-Polymerase-Mix (SIGMA-ALDRICH). Die PCR-Reaktion wurde wie in Kapitel 2.3.3.2 beschrieben unter Verwendung des in Abbildung 2-4 dargestellten Temperaturprofils durchgeführt.

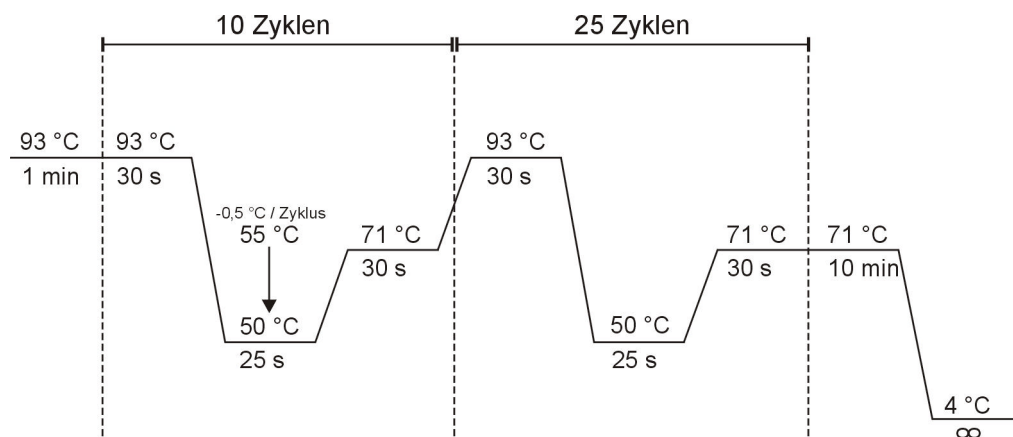


Abbildung 2-4: PCR-Temperaturprofil zur Addition von *Bam* HI und *Hind* III -Schnittstellen

Reaktionsvolumen = 25 µl; template: cDNA-Klon INR20; Primer: INR20exp1 + INR20exp2; GeneAmp® PCR System 2400 (PERKIN ELMER CETUS)

2.3.4.2 Restriktion

Der Verdau der verschiedenen Vektoren (vgl. Kapitel 2.3.4.4 und 3.4.1.2) mit den Restriktionsenzymen *Bam*H I und *Hind* III erfolgte in 20 µl-Ansätzen bei 37 °C für 3 h. Es wurden ca. 1,5 – 2 µg zu schneidendes Plasmid eingesetzt und mit jeweils 10 U der

beiden Endonukleasen verdaut. Hierzu wurde mit 10fach konzentriertem „one-phor-all-buffer+“ (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, Freiburg) eine Endkonzentration von 1,5 x Restriktionspuffer eingestellt und mit der entsprechenden Menge *Aqua bidest* aufgefüllt.

Die Restriktion mit anderen Enzymen erfolgte wie oben beschrieben, nur wurde die jeweilige Pufferkonzentration entsprechend den Angaben des Herstellers den optimalen Bedingungen für das jeweilige Restriktionsenzym angepaßt (Endkonzentration meist 1 x bis 2 x).

2.3.4.3 Agarose-Gelelektrophorese und Elution von DNA aus Agarosegelen

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten (z.B. nach der Restriktion) wurden 0,8-1,5%ige Agarosegele (w/v in 0,5 x TBE-Puffer) verwendet (SAMBROOK et al. 1989). Die eingesetzte Agarosekonzentration richtete sich dabei nach der erwarteten Größe der zu trennenden DNA-Fragmente.

Pro Gelbahn wurden - je nach beabsichtigter Verwendung des Gels - ca. 0,5 – 2 µg DNA eingesetzt. Die einzelnen Proben wurden dazu mit *Aqua bidest* auf ein einheitliches Volumen gebracht, mit 1/5 Volumen an Probenpuffer (Bromphenolblau in 30% (v/v) Glycerin) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard wurde mit *EcoR* I und *Hind* III verdaute λ-Phagen-DNA und/oder eine „100 bp-Leiter“ (beides PROMEGA, Madison, Wisconsin, USA) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in Abhängigkeit von Gelgröße, Agarosekonzentration und erwarteter Fragmentgröße für 1 - 3 h bei 80 – 100 V. Als Laufpuffer diente 0,5 x TBE.

Die aufgetrennten DNA-Banden wurden durch Färben des Gels mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht (ca. 10 min in 0,5 x TBE mit 1 µg/ml Ethidiumbromid) und anschließend unter UV-Licht betrachtet und fotografiert (UV-Transilluminator, BACHHOFER, λ=302 nm).

Zur spezifischen Elution der DNA aus Agarosegelen wurden gewünschte Banden (z.B. PCR-Fragmente oder restringierte Vektoren) mit einer Skalpellklinge möglichst exakt aus dem Gel ausgeschnitten und in vorher ausgewogene Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach Auswiegen und Errechnung des Gewichtes der Gelbanden konnten diese zur DNA-Elution mittels des EasyPure[®] DNA Purification-Kit (BIOZYM) nach Angaben des Herstellers eingesetzt werden.

Puffer und Lösungen:

10 x TBE-Puffer: 90 mM Tris-HCl
 90 mM Borsäure
 2 mM EDTA
 pH 8,0

2.3.4.4 Ligation

Isolierte PCR-Fragmente wurden mittels T4-DNA-Ligase in den Vektor pDATA kloniert. Bei diesem Vektor handelt es sich um eine von D. AHLERT und T. HANSELLE erzeugte, mit *EcoR* V linearisierte Variante des pBlueskript-Vektors (ALTING-MEES et al. 1992), dem an den durch Restriktion erzeugten „stumpfen“ Enden des DNA-Doppelstranges jeweils ein überhängendes Thyminnukleotid in 5' → 3'-Richtung angefügt wurde (HANSELLE, pers. Mitteilung). Mit *Taq*-Polymerase hergestellte PCR-Produkte enthalten durch eine unspezifische Aktivität dieses Enzyms meist ein überhängendes Adennukleotid in 5' → 3'-Richtung, was eine Ligation in pDATA ermöglicht. Abbildung 2-5 zeigt eine Vektorkarte des Vektors pBluescript und des pDATA-Konstruktes sowie eine Übersicht über die Modifikationen in der *Multiple Cloning Site* (MCS).

Ein Ligationsansatz (V=10 µl) setzte sich folgendermaßen zusammen:

5 µl eluiertes PCR-Fragment (vgl. Kapitel 2.3.4.3; ≈ 100-300 ng DNA)
0,5 µl pDATA (= 50 ng)
1 µl 10 x Ligase Puffer
1 µl T4-Ligase (PROMEGA, Madison, Wisconsin, USA)
0,5 µl dATP
2 µl *Aqua bidest*

Der Ansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert. Die Ligation von spezifisch geschnittenen Restriktionsfragmenten in die Vektoren pBluescript und pQE-31 erfolgte analog zur oben beschriebenen Methode.

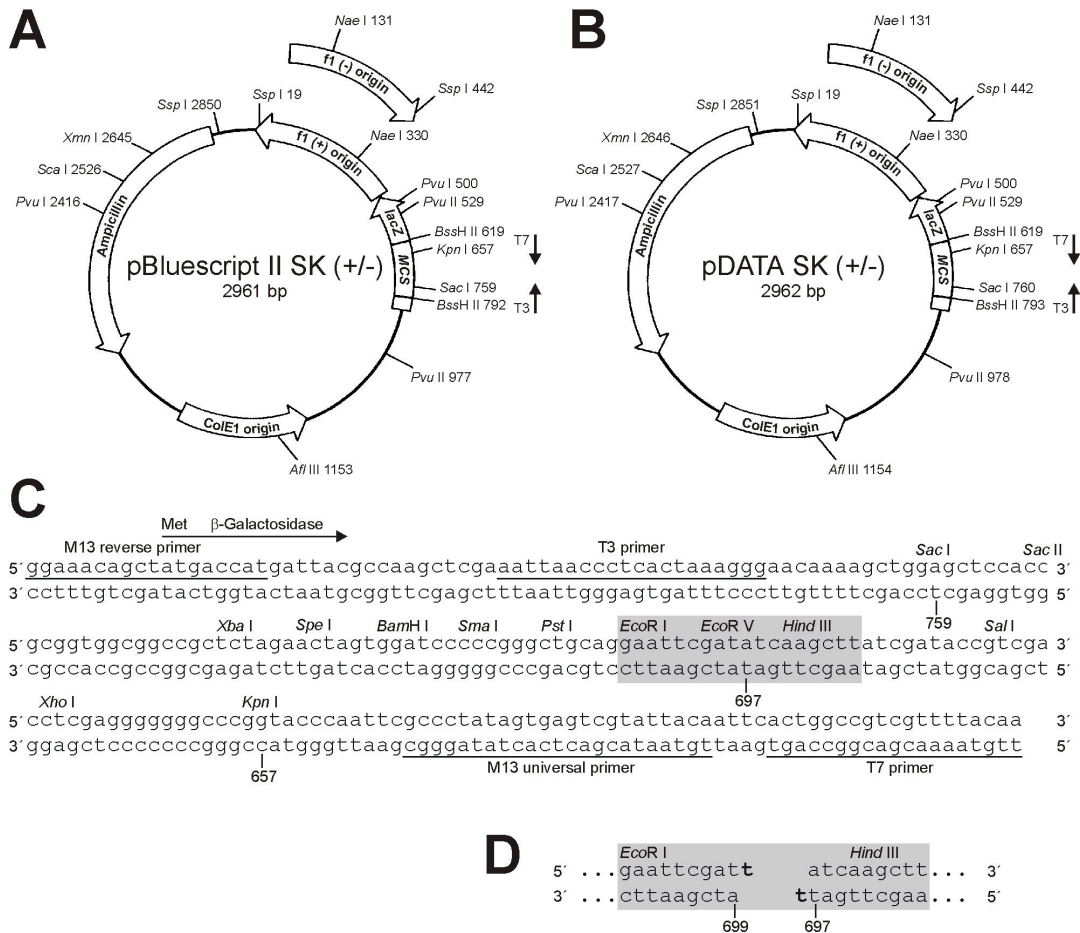


Abbildung 2-5: Übersicht über die Vektoren pBluescript und pDATA

A: Vektorkarte des Vektors pBluescript II SK (+/-) (STRATAGENE)

B: Vektorkarte des Vektors pDATA SK (+/-); Die Darstellung erfolgt hier als Ringform, zur Einklonierung von PCR-Fragmenten liegt der Vektor jedoch linearisiert vor (EcoR V-Schnittstelle zwischen bp-Position 697 und 698, vgl. Abbildungsteil D).

C: „Multiple Cloning Site“ (MCS) des Vektors pBluescript II mit den wichtigsten Restriktionschnittstellen und Primerbindungsstellen

D: Modifikation des in C grau unterlegten Bereichs im Vektor pDATA

2.3.4.5 Transformation von *E. coli* und Selektion von Transformanten

Zur Transformation von *Escherichia coli* (Stämme XL1 Blue und M15) mit auf den Vektoren pBluescript, pDATA oder pQE-31 basierenden Konstrukten wurden 40 μ l kompetente Bakterienzellen in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen auf Eis aufgetaut und unter sterilen Bedingungen mit 5 μ l des Ligationsansatzes (vgl. Kapitel 2.3.4.3) versetzt. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock im Wasserbad bei 42 °C für 40 s. Danach wurden die Bakterien erneut auf Eis heruntergekühlt (5 min) und anschließend mit 355 μ l antibiotikafreiem LB-Medium versetzt. Es folgte eine mindestens einstündige Wachstumsphase zur Ausprägung der aufgenommenen

Antibiotikaresistenz bei 37 °C unter heftigem Schütteln. Anschließend wurden 25, 50 und 100 µl der Bakteriensuspension auf Ampicillin-haltigen Agarplatten (100 µg/ml) ausplattiert. Die Platten enthielten zum sog. *blue-white-screening* im Fall geeigneter Vektoren (pBluescript, pDATA) zur gezielten Selektion inserthaltiger Transformanten den *lacZ*-Induktor IPTG (20 µl einer 100 mM-Stammlösung pro Platte) und das β-Galaktosidase-Substrat X-GAL (35 µl einer 50 mg/ml-Stammlösung pro Platte). Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden Transformanten mit Insert (= weiße Kolonien) zur weiteren Untersuchung auf frischen Ampicillin-Platten vereinzelt und/oder direkt in Flüssigkultur genommen.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Heterologe Expression

Die heterologe Expression des GRP1exp-Proteins in *E. coli* wurde in Anlehnung an das Handbuch für das „His-tag“-System („The QIAexpressionist™“, 4. Ausgabe Januar 2000, QIAGEN) durchgeführt. Eine kurze Beschreibung des eingesetzten Systems, besonders über die Natur und Funktion des His-tags, ist in Kapitel 3.4.1.1 wiedergegeben.

Parallel zur Expression des GRPs wurde nach dem gleichen Verfahren ein Thaumatin-ähnliches Protein aus der Kichererbse (HANSELLE 2000) erfolgreich heterolog exprimiert, was die Überprüfung der Methodik und einen Vergleich der Ausbeuten ermöglichte.

2.4.1.1 Selektion von Expressionsklonen (Colony-Blot)

Die Selektion von Bakterien, welche das gewünschte Protein exprimieren, wurde mittels Colony-Blot nach den Angaben in „The QIAexpressionist™“ (4. Ausgabe Januar 2000, QIAGEN) durchgeführt. Die Kolonien wurden dabei auf „Protran“-Nitrocellulosemembranen (SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel) übertragen, die Expression induziert und die Bakterien direkt auf der Membran lysiert. Der Nachweis erfolgte mit dem RGS-His™-Antikörper (QIAGEN; 1:2000) als primärem und „goat-anti-mouse-AP“ (SIGMA-ALDRICH, 1:30000) als sekundärem Antikörper nach Protokoll 3 im oben angeführten Handbuch. Als Substrat diente NBT/BCIP (SIGMA-ALDRICH).

2.4.1.2 Wachstumsbedingungen und Induktion

Die wie in Kapitel 2.4.1.1 beschrieben selektierten *E. coli* M15-Stämme, die das GRP1-Expressionskonstrukt trugen, wurden zur heterologen Expression in größerem Maßstab (in Anlehnung an Protokoll 6 des oben genannten Handbuchs) eingesetzt. Dazu wurde zunächst über Nacht eine Starterkultur des entsprechenden Klons in 10 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin bei 37 °C angezogen. Diese wurde im Verhältnis 1:50 mit frischem Medium (je nach gewünschter Größe des Expressionsansatzes 100 – 500 ml) mit identischer Antibiotikakonzentration verdünnt und so lange bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, bis die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm im Bereich von 0,5 bis 0,7 lag (erfahrungsgemäß ca. 2 h). Dann erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG. Nach einer Wachstumsphase von weiteren 4 h wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 4000 g für 20 min geerntet (SORVALL RC-5b, SS34-Rotor) und das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –20 °C gelagert.

2.4.1.3 Kontrolle des Wachstumsverlaufes

Während der gesamten Expression wurde das Wachstumsverhalten der Expressionskulturen und nicht induzierter bzw. nicht transformierter Kontrollkulturen überwacht. Hierzu wurde alle 30 min unter sterilen Bedingungen eine 100 µl-Probe der Bakterien suspension entnommen, diese 1:10 verdünnt und die Extinktion in Kunststoff-Einwegküvetten am Photometer (UVIKON 810 Spektralphotometer) bestimmt.

Zusätzlich wurden ebenfalls halbstündlich Proben von 1 ml zur RNA-Isolation (vgl. Kapitel 2.3.2.2) entnommen. Zu ausgewählten Zeitpunkten wurden zudem 2 ml-Proben für eine anschließende Proteinextraktion (vgl. Kapitel 2.4.1.4) abgenommen. Diese Proben wurden in einer Tischzentrifuge (HERAEUS) für 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und die so pelletierten Bakterien bei –20 °C gelagert.

2.4.1.4 Proteinextraktion aus Bakterien und Aufreinigung über den His-tag

Die Aufreinigung von heterolog exprimierten Proteinen mit „His-tag“ erfolgte mittels Nickel-NTA-Säulen wie im „Ni-NTA Spin Handbook“ (März 1998, QIAGEN) beschrieben. Dabei wurden für die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen sowohl Puffer mit 8 M Harnstoff als auch mit 6 M Guanidinhydrochlorid als denaturierendes Agens verwendet.

Guanidinhydrochlorid enthaltende Proben wurden vor dem Einsatz in der SDS-PAGE mit Trichloressigsäure gefällt. Dazu wurden die Proben mit *Aqua bidest* auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt, mit einem Volumen 10% TCA versetzt und für 20 min auf Eis gefällt. Nach einer 15 minütigen Zentrifugation (HERAEUS-Tischzentrifuge, 13.000 rpm) wurde das Pellet mit 100 µl eisgekühltem 100%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (5 min) und für 30 min bei 4 °C getrocknet. Das Proteinpellet wurde direkt in 1 x SDS-PAGE-Probenpuffer (vgl. Kapitel 2.4.3.3) aufgenommen.

2.4.1.5 Nachweis des exprimierten Proteins über den His-tag

Zur Selektion eines Antikörpers gegen den His-tag wurde das „Anti-His Antibody Selector Kit“ (QIAGEN) verwendet. Hierbei wurden Dot-Blots entsprechend den Anweisungen im „QIAexpress™ Detection and Assay Handbook“ (2. Ausgabe April 1999, QIAGEN) angefertigt und diese nach Protokoll 7 des o.g. Handbuches in der Immunodetektion eingesetzt. Der Nachweis erfolgte mit den anti-His-Antikörpern des Kits in einer Verdünnung von 1:2000 und „goat-anti-mouse-AP“ (SIGMA, 1:30.000) als sekundärem Antikörper. Als Substrat diente das Chemilumineszenzsubstrat CDP-Star (ROCHE). Die Detektionsreaktion erfolgte analog zu der in Kapitel 2.3.2.6 für Northern-Blots beschriebenen Methode.

Der Nachweis des heterolog exprimierten Proteins über Western-Analysen erfolgte mit dem RGS-His™-Antikörper (QIAGEN). SDS-PAGE und Western-Blot wurden wie in Kapitel 2.4.3.1 beschrieben durchgeführt, nur wurden die Proteine auf zuvor für 10 s mit Methanol aktivierte Immobilon P-Membranen (MILLIPORE) geblottet. Die Membranen wurden anschließend entweder in eine Immunodetektion mit CDP-Star („chemiluminescent method“, Protokoll 7, s.o.) oder in eine leicht abgewandelte Detektionsmethode mit NBT/BCIP als Farbsubstrat („chromogenic method“, Protokoll 8) eingesetzt.

2.4.2 Proteinextraktion aus Kichererbsen

Die Extraktion von Proteinen aus verschiedenen Organen (Blätter, Stengel, Wurzeln) der Kichererbsenpflanze wurde nach ursprünglich von O. OTTE für Zellkulturen etablierten Protokollen durchgeführt (OTTE 1998), die für die Verwendung von Pflanzenmaterial leicht abgewandelt wurden. Alle Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt.

2.4.2.1 Gesamtextrakt

Zur Herstellung eines Gesamtzellproteinextraktes wurde das lyophilisierte Pflanzenmaterial aus ursprünglich 0,5 g Frischgewicht (\approx 70 – 100 mg Trockengewicht, vgl. Kapitel 2.2.5) mit 1 ml Kaliumphosphatpuffer unter Zugabe von 50 mg Polyvinylpyrrolidon (PVP) und einer Spatelspitze Quarzsand im Mörser homogenisiert. Das Homogenat wurde in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 13.000 rpm (HERAEUS-Tischzentrifuge) zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde über NAP-5-Säulchen (PHARMACIA, Upsala, Schweden) nach Angaben des Herstellers entsalzt und bei -20°C gelagert.

Puffer und Lösungen:

Kaliumphosphatpuffer: 100 mM Kaliumphosphat
 pH 7,5
 + 5 mM Dithiothreitol (DTT)

2.4.2.2 Cytosolischer Extrakt und Extraktion ionisch gebundener Zellwandproteine

Für eine „fraktionierte“ Extraktion von cytosolischen Proteinen einerseits und ionisch gebundenen Zellwandproteinen andererseits wurde das Pflanzenmaterial zunächst mehrfach mit HEPES-Puffer extrahiert. Die zwitterionische Puffersubstanz HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl]-Ethansulfonsäure) vermag keine ionisch gebundenen Zellwandproteine zu solubilisieren, löst aber den Großteil der cytosolischen Proteine (OTTE 1998).

Das gefriergetrocknete Pflanzenmaterial (vgl. Kapitel 2.4.2.1) wurde mit 1 ml HEPES-Puffer ohne Zugabe von Quarzsand im Mörser homogenisiert. Das Homogenat wurde in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 13.000 rpm (HERAEUS-Tischzentrifuge) zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde über NAP-5-Säulchen (PHARMACIA, Upsala, Schweden) nach Angaben des Herstellers entsalzt und bei -20°C gelagert. Diese Fraktion wird im folgenden als cytosolischer Extrakt bezeichnet.

Das aus der Zentrifugation resultierende Pellet wurde mit 1 ml HEPES-Puffer versetzt, resuspendiert und 10 min bei 4°C gerührt. Es folgte eine erneute Zentrifugation (s.o.). Der resultierende Überstand wurde verworfen. Diese Extraktion wurde noch zweimal wiederholt. Die Solubilisierung ionisch gebundener Zellwandproteine erfolgte mittels

einer Salzextraktion durch Zugabe von 500 µl Solubilisierungspuffer. Der Ansatz wurde für 1 h bei 4 °C gerührt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde über NAP-5-Säulchen entsalzt und bei -20 °C gelagert. Diese Fraktion wird im folgenden als Zellwandextrakt bezeichnet.

Puffer und Lösungen:

HEPES-Puffer:	50 mM HEPES pH 7,5 mit KOH + 5 mM DTT
Solubilisierungspuffer:	200 mM CaCl ₂ in HEPES-Puffer

2.4.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der einzelnen Extrakte wurde mittels der Methode nach BRADFORD bestimmt (BRADFORD 1976). Vor den eigentlichen Messungen am Biophotometer der Firma EPPENDORF wurde nach Angaben des Herstellers eine Eichgerade mit BSA als Proteinstandard aufgenommen. Von dieser Eichung ausgehend errechnete das Gerät selbsttätig die Proteinkonzentration in den zu messenden Proben.

2.4.3 Western-Analysen

2.4.3.1 Gewinnung eines Antiserums gegen das repetitive Element der GRPs

Zur Gewinnung eines polyklonalen Antikörpers gegen das repetitive Element der Kichererbsen-GRPs wurde zunächst von der Firma EUROGENTEC (Seraing, Belgien) ein dem repetitiven Element entsprechendes Polypeptid synthetisiert (vgl. Kapitel 2.4.3.2 und 3.5.1). 5 mg dieses Polypeptids wurden C-terminal an ein Trägerprotein (KLH, engl.: *keyhole limpet hemocyanin*, aus *Megathura crenulata*) gekoppelt. Es folgte die Immunisierung von zwei Kaninchen entsprechend dem Standardprotokoll (3 Monate) der Firma EUROGENTEC. Die Antigeninjektion erfolgte dabei an den Tagen 0, 14, 28 und 56. Die Serumproben wurden am 0. (Präimmunserum), 38. (1. Probe), 66. (2. Probe) und 87. Tag (Antiserum) entnommen. Das Antiserum wurde mit „anti-GRP-RE“ (RE = repetitives Element) bezeichnet. Die Funktionalität und Spezifität der Antiseren wurde mit Dot-Blot-Untersuchungen überprüft (vgl. Kapitel 3.5.1.1).

2.4.3.2 Benutzte Antikörper

Tabelle 2-1 gibt eine Übersicht über die entweder nach dem in Kapitel 2.4.3.5 beschriebenen Protokoll bzw. nach der in Kapitel 2.4.1.5 dargestellten Methodik in Western-Analysen eingesetzten Antikörper/Antisera und ihre Antigene.

Tabelle 2-1: Übersicht über die eingesetzten Antikörper

Bezeichnung	Antigen*	gewonnen aus	Hersteller
primäre Antikörper:			
Tetra·His™ Antibody	HHHH	Maus (monoklonal)	QIAGEN
Penta·His™ Antibody	HHHHH	Maus (monoklonal)	QIAGEN
RGS·His™ Antibody	RGSHHHH	Maus (monoklonal)	QIAGEN
anti-GRP-RE 5/6 (vgl. Kapitel 2.4.3.1)	GGGNYGNGGGNYGQ	Kaninchen (polyklonal)	EUROGENTEC
sekundäre Antikörper:			
goat-anti-mouse-AP	Maus-IgG (ganzes Molekül)	Ziege	SIGMA-ALDRICH
goat-anti-rabbit-AP	Kaninchen-IgG (ganzes Molekül)	Ziege	SIGMA-ALDRICH

*) Angaben im Ein-Buchstaben-Aminosäurecode

2.4.3.3 SDS-PAGE und Western-Blot

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte in diskontinuierlichen Mini-Gelen (ca. 9 x 9 cm) nach der bei LAEMMLI beschriebenen Methode (LAEMMLI 1970). Es wurden 10 - 15%ige Trenngele mit 5%igen Sammelgelen hergestellt. Die Auftrennung erfolgte zunächst bei 15 mA pro Gel, nach der Fokussierung der Proben an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel wurde die Stromstärke auf 25 mA pro Gel erhöht.

Die zu trennenden Proteinproben wurden mit ¼ Volumen 5 x SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt, bei 100 °C für 10 min denaturiert und auf Eis heruntergekühlt, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Als Größenstandards wurden gefärbte und ungefärbte „broad-range“- und „low-range“-Marker der Firma BIO-RAD LABORATORIES GmbH (Hercules, Kalifornien, USA) nach Angaben des Herstellers aufgetragen. In einigen Experimenten wurde den Markern zur besseren Visualisierung der Wanderungstrecke

kleiner Proteine während des Gellaufs zusätzlich ca. 0,5 µg/µl Cytochrom C (ca. 12,5 kDa, SIGMA-ALDRICH) zugefügt.

Nach erfolgter Auftrennung wurden die Proteine entweder im Gel angefärbt (vgl. Kapitel 2.4.3.4) oder zur immunologischen Analyse auf Nitrocellulosemembranen (Protran, SCHLEICHER & SCHUELL) transferiert. Dieser „Western-Blot“ erfolgte mittels einer Elektroblo-Apparatur („Multiphor II Nova Blot“, PHARMACIA, Upsala, Schweden) mit einem diskontinuierlichen Puffersystem nach Angaben des Herstellers. Der Transfer erfolgte bei einer Spannung von ca. 0,8 –1,0 V pro cm² Gelfläche für 2 h. Die Membran wurde nach erfolgtem Transfer entweder direkt zur Immunodetektion (vgl. Kapitel 2.4.3.5) eingesetzt oder für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet und bei 4 °C gelagert.

Bei sogenannten „Dot-Blot“-Untersuchungen wurden die Proteinlösungen in kleinen, identischen Volumina (1 – 5 µl) mit einer feinen Pipette direkt auf die Nitrocellulosemembran aufgetropft. Die weitere Behandlung der Membranen erfolgte wie oben beschrieben.

Puffer und Lösungen:

5 x SDS-PAGE-Probenpuffer: 15% (v/v) β-Mercaptoethanol
15% (w/v) SDS
1,5% (w/v) Bromphenolblau
50% (v/v) Glycerin

2.4.3.4 Färbung von Acrylamidgelen

Proteinbanden in Polyacrylamidgelen wurden entweder durch Coomassie-Färbung (s.u.) oder Silberfärbung (verändertes Protokoll nach MORRISSEY (MORRISSEY 1981)) sichtbar gemacht.

Zur Coomassie-Färbung wurden die Gele zunächst für mindestens 30 min in *Aqua bidest*/Methanol/Essigsäure (50:40:10) unter leichtem Schütteln fixiert. Anschließend wurde die Fixierlösung gegen Färbelösung (0,1% (w/v) SERVA Blue R (entspricht Coomassie[®] Brilliant Blue R-250) in Fixierlösung) ausgetauscht und das Gel für 20 – 30 min gefärbt. Abschließend wurde das Gel so lange in *Aqua bidest*/Methanol/Essigsäure (50:40:10) geschüttelt, bis die Proteinbanden klar hervortraten und der Gelhintergrund wieder durchsichtig wurde.

Auch bei der Silberfärbung wurde das Gel zunächst in einer Fixierlösung für mindestens 30 min fixiert. Es folgten zwei Waschschrte für 10 min in 10% (v/v) Ethanol und drei Waschschrte á 3 min in *Aqua bidest*. Zur Färbung wurde das Gel für 30 min in 0,1% AgNO₃ inkubiert und anschließend kurz in *Aqua bidest* gewaschen. Durch Inkubation des Gels in Entwicklungslösung wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht. Dieser Prozeß wurde bei gewünschter Bandenintensität durch Austausch der Entwicklungslösung gegen Stopplösung (Inkubationszeit mindestens 5 min) abgestoppt. Bei unzureichender Intensität der Banden konnte das Gel ein zweites mal gefärbt werden. Dazu wurden zunächst durch Schütteln des Gels in Farmer`schem Abschwächer die Proteinbanden wieder vollständig entfärbt (ca. 5 - 10 min). Anschließend wurde das nun durch den Farmer`schen Abschwächer gelblich gefärbte Gel so lange in *Aqua bidest* gewaschen, bis es wieder komplett farblos war (ca. 1 h). Es folgte eine zweite Inkubation in Silbernitrat und die daran anschließende Entwicklung (s.o.).

Die wesentlich sensitivere Silberfärbung konnte auch nach bereits erfolgter Coomassie-Färbung durchgeführt werden.

Puffer und Lösungen:

Fixierlösung (Silberfärbung): 30% (v/v) Ethanol
10% (v/v) Essigsäure
in *Aqua bidest*

Entwicklungslösung: 2,5% (w/v) Na₂CO₃
1% (v/v) Formalin (Formaldehyd 37%)
pH 11,5 (bei Bedarf mit Na₂CO₃ einstellen)

Stopplösung: 1% (w/v) Glycin
2% (v/v) Essigsäure
in *Aqua bidest*

Farmer`scher Abschwächer: 250 mg K₃[Fe(CN)₆]
400 mg Na₂S₂O₃ · 5 H₂O
ad 50 ml *Aqua bidest*

2.4.3.5 Western-Analyse und Nachweisreaktionen

Die Immunodetektion wurde in Anlehnung an ein Protokoll der Firma EUROGENTEC (Seraing, Belgien) durchgeführt. Alle beschriebenen Schritte fanden unter

kontinuierlichem Schütteln bei Raumtemperatur statt. Zunächst wurde die Membran für ca. 2 min in TTBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde der Blot für 20 min in Blockpuffer inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen der Membran mit TTBS-Puffer für jeweils ca. 1 min. Dann wurde der Blot für 1 h mit dem primären Antikörper (Antiserum 1:50 bis 1:20 in Antikörperpuffer) bei nur leichtem Schütteln inkubiert. Es folgten erneut drei kurze Waschschrte (1 min) mit TTBS-Puffer. Im Anschluß daran erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (goat-anti-rabbit-AP 1:10.000 in Antikörperpuffer) für 30 min. Abschließend wurde der Blot dreimal für 5 min und einmal für 10 min in großen Volumina TTBS-Puffer gewaschen.

Der Nachweis der an den sekundären Antikörper gekoppelten alkalischen Phosphatase erfolgte entweder wie in Kapitel 2.3.2.6 für Northern-Blots beschrieben mittels des Chemilumineszenzsubstrates CDP-Star (ROCHE) oder über das Farbsubstrat NBT/BCIP. Hierzu wurde die Membran kurz in Detektionspuffer äquilibriert und dann ohne Schütteln in NBT/BCIP-Färbelösung inkubiert. Die Farbentwicklung wurde beobachtet und die Reaktion bei gewünschter Intensität durch mehrfaches Spülen der Membran mit *Aqua bidest* abgestoppt.

Puffer und Lösungen:

TTBS-Puffer:	10 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 0,1% (v/v) Tween 20 (SERVA) pH 7,5
Blockpuffer:	10% (w/v) Milchpulver (Skim Milk Powder, SERVA) in TTBS-Puffer (üN bei 4 °C rühren)
Antikörperpuffer:	1% (w/v) Milchpulver in TTBS-Puffer
Detektionspuffer:	0,1 M Tris-HCl 0,1 M NaCl 0,05 M MgCl ₂ pH 9,5
NBT-Stammlösung:	5% (w/v) Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) in 70% Dimethylformamid
BCIP-Stammlösung:	5% (w/v) 5-Bromo-4-chloro-3-indolyphosphat (BCIP) in 100% Dimethylformamid

NBT/BCIP-Färbelösung: 66 µl NBT-Stammlösung + 33 µl BCIP-Stammlösung in 10 ml Detektionspuffer (entspricht 0,33 mg/ml NBT, 0,165 mg/ml BCIP)

NBT/BCIP-Färbelösung wurde alternativ auch aus SIGMAFAST™ NBT/BCIP-Tabletten (SIGMA-ALDRICH) nach Angaben des Herstellers angesetzt.

2.4.4 *In vitro*-Quervernetzung von Proteinen

Versuche zur *in vitro*-Quervernetzung des heterolog exprimierten GRPs wurden wie bei OTTE für zwei Zellwandstrukturproteine der Kichererbse (ein PRP und ein HRGP) beschrieben durchgeführt (OTTE 1998). Die Quervernetzung erfolgte mit 1 U Meerrettich-Peroxidase (HRP, „horse raddish peroxidase“) in Gegenwart von 10 mM H₂O₂ in 10 µl-Ansätzen. Gellauf, Western-Blot und Nachweisreaktion mit dem RGS·His™ Antikörper erfolgten wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben.

2.5 Immunohistologie/*in situ*-Nachweis

2.5.1 Mikroskopische Untersuchungen

Mikroskopische Beobachtungen wurden an einem „Forschungsmikroskop Universal“ (ZEISS, Oberkochen) mit Fotoaufsatz (ZEISS C35) durchgeführt. Die Dokumentation erfolgte auf AGFA CT 100i-Diafilmen.

2.5.1.1 Färbung von mikroskopischen Präparaten mit Toluidinblau

Handschnitte von Organen der Kichererbse und Präparate von *Ascochyta rabiei*-Mycel wurden zur Kontrastierung mit Toluidinblau gefärbt (SAKAI 1973). Die Schnitte wurden dazu für 1 bis 2 min in die Färbelösung (0,05% Toluidinblau O in *Aqua bidest*) eingelegt, mit einer Präpariernadel auf einen Objektträger überführt und dort durch mehrmaliges vorsichtiges Pipettieren und Aufsaugen mit *Aqua bidest* gewaschen. Anschließend wurden die Präparate mit Entellan® (MERCK) unter einem Deckgläschen eingebettet.

2.5.2 *In situ*-Nachweis des heterolog exprimierten GRP in unlöslichen Bestandteilen von Bakterienzellen

Die nach der in Kapitel 2.4.1.4 beschriebenen Lyse und Extraktion von *E. coli*-Zellen zurückbleibenden unlöslichen Zellbestandteile wurden erneut in 1 ml 6 M

Guanidinhydrochlorid-Puffer resuspendiert, für 30 min gerührt und anschließend bei 10.000 g für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Extraktion noch ein weiteres mal durchgeführt. Die resultierenden Zellbruchstücke wurden in 1 ml *Aqua bidest* aufgeschwemmt, erneut pelletiert (s.o.) und der Überstand verworfen. Das resultierende Pellet wurde mit 1 Volumen *Aqua bidest* resuspendiert. Die Zellbruchstücke wurden auf silanisierte Objektträger überführt und dort für ca. 30 – 60 s bei 60 °C „angebacken“.

Der immunologische *in situ*-Nachweis erfolgte in Abwandlung der Protokolle 7 und 10 im „QIAexpress™ Detection and Assay Handbook“ (2. Ausgabe April 1999, QIAGEN). Dazu wurden die Objektträger in einer lichtundurchlässigen feuchten Kammer plaziert und die jeweiligen Puffer und Lösungen in ausreichend großen Tropfen direkt auf die Zellbruchstücke appliziert. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten (s.u.) wurden die Flüssigkeiten durch vorsichtiges seitliches Absaugen mit einer feinen Pipette entfernt. Die *in situ*-Immunolokalisation verlief nach folgendem Schema:

5 min	TBS-Puffer
1 h	Blockpuffer
2 x 5 min	TBS-TT-Puffer
1 h	RGS-His™ Antibody 1:50 in Antikörperpuffer
2 x 5 min	TBS-TT-Puffer
1 h	goat-anti-mouse-AP 1:100 in Antikörperpuffer
4 x 5 min	TBS-TT-Puffer
x min	Substratlösung (bis zur gewünschten Farbintensität)
1 min	<i>Aqua bidest</i> (Abstoppen der Farbreaktion)

Puffer und Lösungen:

TBS-Puffer:	10 mM Tris/HCl 150 mM NaCl pH 7,5
Blockpuffer:	3% (w/v) BSA in TBS-Puffer
TBS-TT-Puffer:	20 mM Tris/HCl 500 mM NaCl pH 7,5 0,05% (v/v) Tween 20 (SERVA) 0,2% (v/v) Triton X-100 (SIGMA-ALDRICH)

Antikörperpuffer:	1% (w/v) BSA in TBS-Puffer
Substratlösung:	1,0 mg/ml Fast Red TR 0,4 mg/ml Naphthol AS-MX 0,15 mg/ml Levamisol 0,1 M Tris-Puffer (aus SIGMAFAST™ Fast Red TR/Naphthol AS-MX Tabletten nach Angaben des Herstellers (SIGMA-ALDRICH) angesetzt)

2.5.3 Herstellung von Gewebeabdrücken (Tissue-Blots)

Gewebeabdrücke (engl.: *tissue-blots*) von Stengeln und Wurzeln der Kichererbse wurden in Anlehnung an die bei CASSAB und SCHOPFER beschriebenen Methoden durchgeführt (CASSAB und VARNER 1987; SCHOPFER 1994). Frisch geerntete Stengel und Wurzeln von infizierten und wasserbehandelten Pflanzen (5 d nach Infektion/Kontrollbehandlung) wurden dazu mit einer angefeuchteten Rasierklinge möglichst gerade abgeschnitten und die entstandene Schnittfläche sofort für ca. 1 s auf Nitrocellulosemembranen (Protran, SCHLEICHER & SCHUELL) unter leichtem Druck aufgesetzt. Die Membranen wurden luftgetrocknet und bei 4 °C gelagert.

Die so gewonnenen Tissue-Blots wurden wie für Western-Blots in Kapitel 2.4.3.5 beschrieben zur Immunodetektion eingesetzt. Ein Teil der Gewebeabdrücke wurde entsprechend dem Protokoll für Acrylamidgele (vgl. Kapitel 2.4.3.4) mit Coomassie gefärbt. Auswertung und Dokumentation der Tissue-Blots erfolgten an einem LEICA „MZ Apo“-Binokular mit Fotoaufsatz (LEICA MPS 30) im Institut für Ökologie der Pflanzen der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster.

2.6 In silicio-Methoden

2.6.1 Programme zur Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen

2.6.1.1 Bearbeitung von Sequenzrohdaten

Die von der Sequenzieranlage erhaltenen Daten wurden mittels des Programmpaketes „DNASTAR™“ (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin, USA) ausgewertet. Das Teilprogramm „SeqMan“ diente dabei zur Analyse der vom Sequenator ausgegebenen Sequenzkurven, zum Kombinieren verschiedener Sequenzierungen einer DNA-Sequenz und zur manuellen Korrektur der Sequenzen. Das Teilprogramm „EditSeq“ enthielt eine

Reihe von Funktionen zur Bearbeitung von Sequenzmaterial, z.B. Umdrehen von Sequenzen oder Umschreiben in die komplementäre Sequenz.

2.6.1.2 Datenbankrecherche

Zum Vergleich von Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenzen mit den Datenbanken am European Bioinformatics Institute (EBI) wurden die Programme „FASTA“ (PEARSON und LIPMAN 1988; PEARSON 1990) und „BLAST“ (Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUL et al. 1990; ALTSCHUL et al. 1994) eingesetzt. Zur gezielten Suche nach Sequenzen in den Datenbanken wurde das „Sequence Retrieval System“ (SRS) genutzt. Eingabemasken und Dokumentationen für die o.g. Programme sind über die Internetseite des EBI (<http://www.ebi.ac.uk>) zu erreichen.

2.6.1.3 Sequenzvergleich

Zur Berechnung und optimalen Darstellung der Homologien ausgewählter DNA- und Proteinsequenzen untereinander („alignment“) wurde das Programm „Clustal“ entweder als Internetapplikation „ClustalW“ (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) (THOMPSON et al. 1994) oder als lokal installierte Version „ClustalX“ (THOMPSON et al. 1997) genutzt. Ähnliche Funktionen erfüllte auch das Internetprogramm „ALIGN“ (<http://vega.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi>) bei zwei gegebenen Ausgangssequenzen.

2.6.2 Programme zur Ableitung und Charakterisierung von Proteinsequenzen

2.6.2.1 Ableitung von Aminosäuresequenzen und Bestimmung von pI und MW

Von Nukleotidsequenzen wurde entweder mittels des Programms „EditSeq“ (vgl. Kapitel 2.6.1.1) oder mit Hilfe der Internetapplikation „TRANSLATE“ (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>) die entsprechende Aminosäuresequenz abgeleitet. Das theoretische Molekulargewicht (MW) und der theoretische isoelektrische Punkt (pI) eines Proteins auf der Basis seiner Aminosäuresequenz wurden mit dem Programm „Compute pI/MW“ (http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html) berechnet (BJELLQVIST et al. 1993; BJELLQVIST et al. 1994).

2.6.2.2 Erkennung von Signalsequenzen und Sekundärstrukturen

Die Erkennung von möglichen Signalsequenzen für die Zielsteuerung von Proteinen in einer gegebenen Aminosäuresequenz wurde mittels der Internetanwendung „SignalP“

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (NIELSEN et al. 1997) durchgeführt. Mit dem Programm „PSORT“ (<http://psort.nibb.ac.jp/>) wurde außerdem die Wahrscheinlichkeit errechnet, mit der ein Protein bei vorhandenem Signalpeptid in ein bestimmtes Zellkompartiment transportiert wird (NAKAI und KANEHISA 1992).

Die theoretische Wahrscheinlichkeit, mit der eine gegebene Aminosäuresequenz eine bestimmte Sekundärstruktur annimmt, wurde mittels der Programme „Predict-Protein“ (<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html>), „TMPred“ (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) (HOFFMANN und STOFFEL 1993) und „nnPREDICT“ (<http://www.cmpharm.ucsf.edu/~nomi/nnpredict.html>) berechnet (NAKAI 2000).

2.6.2.3 Phylogenetische Analyse

Zur Erstellung von phylogenetischen Dendrogrammen wurde mit dem Programm „Clustal“ (vgl. Kapitel 2.6.1.3) ein Vergleich ausgewählter Proteinsequenzen („alignment“) durchgeführt und die Daten über die verwandtschaftlichen Beziehungen der einzelnen Sequenzen in das lokal installierte Programm „TreeView 1.6.1“ (Download und Dokumentation: <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk>) exportiert. Mit diesem Programm konnten die Daten als phylogenetisches Baumdiagramm dargestellt und bearbeitet werden.

2.6.3 Elektronische Dokumentation von Gelen, Blots und mikroskopischen Aufnahmen

SDS-PAGE-Gele, Western-Blots, Röntgenfilme, Polaroid®-Fotos von DNA-Gelen und vergleichbare Materialien wurden mit einem Scanner (HEWLETT-PACKARD DeskScan 4c/T mit Durchlichtaufsatz) eingelesen. Zum Scannen von Diafilmen z.B. aus der mikroskopischen Dokumentation wurde ein Diascanner der Firma NIKON (Typ LS 2000) eingesetzt.

Die so gewonnenen und in dieser Arbeit dargestellten Bilder wurden teilweise mit Hilfe verschiedener Computerprogramme (Corel PHOTO-PAINT 10, CorelDRAW 10 u.a.) bearbeitet. Dabei wurden aber lediglich Bearbeitungsmethoden angewandt, die der Verbesserung der Darstellungsqualität im Druckbild dienen (z.B. Kontrasterhöhung, Vergrößerung, Wegschneiden von irrelevanten Bildteilen). Die ergebnisrelevante Aussage der Bilder wurde dabei nicht beeinflusst.

3 Ergebnisse

3.1 Computerunterstützte Untersuchungen

3.1.1 Neue Erkenntnisse zur Vollständigkeit der GRP-Sequenzen

Zu Beginn der hier dokumentierten Arbeiten war davon auszugehen, daß es sich bei dem cDNA-Klon INR20 um einen „full-length“-Klon handelt, d.h. daß der von INR20 abgeleitete ORF (offener Leserahmen, „open reading frame“) der kompletten Sequenz des vollständigen GRP1 entspricht (CORNELS 1998; CORNELS et al. 2000). Diese Annahme begründete sich hauptsächlich auf dem Vergleich der Aminosäuresequenz von GRP1 mit dem Glycin-reichen Protein MFSTRESS, einem streßinduzierten Protein aus dem der Kichererbse nah verwandten Sichelklee *Medicago falcata*. Das Protein MFSTRESS war als vollständig veröffentlicht worden (LUO et al. 1991). Die nahezu vollständige Übereinstimmung der beiden Proteine im N-terminalen Bereich, dargestellt in Abbildung 3-1A, führte zu der Annahme, daß es sich auch bei der Sequenz von GRP1 um die vollständige Aminosäureabfolge des Proteins handelt.

Neuere Datenbankrecherchen (Stand 08/2001) mit den Programmen FASTA und BLAST (vgl. Kapitel 2.6.1.2) zeigten jedoch Homologien des aminoterminalen Bereichs von GRP1 zu einer Reihe von neu veröffentlichten GRPs, besonders mit abgeleiteten Aminosäuresequenzen aus dem nahezu vollständig sequenzierten Genom von *Arabidopsis thaliana*. Das Start-Methionin dieser Proteine befindet sich ca. 15 Aminosäuren vor der für GRP1 angenommenen Position. Die Übersetzung der Nukleinsäuresequenzen am 5`-Ende der Klone INR5 und INR20, von denen bisher angenommen wurde, sie wären nicht Bestandteil des codierenden Bereichs, führte zu der Einsicht, daß das vermutete Start-Methionin von GRP1 mit großer Sicherheit falsch gewählt wurde. Beim Vergleich des N-terminal um 11 Aminosäuren erweiterten ORF mit den Datenbanken zeigten sich eindeutige Homologien auch im „neuen“ Sequenzabschnitt. Abbildung 3-1 zeigt eine mit dem Programm ClustalX (vgl. Kapitel 2.6.1.3) erstellte Übersicht der Sequenzvergleiche.



Abbildung 3-1: ClustalX-Vergleich der N-terminalen Region von GRP1 mit anderen GRPs

A: Vergleich der GRP1-Sequenz mit dem Protein MFSTRESS aus *Medicago falcata*; Dieser Vergleich (Stand 12/1997) führte zur vermutlichen Fehleinschätzung über die Vollständigkeit von GRP1.

B: Vergleich der GRP-Sequenzen der Kichererbse mit den Sequenzen anderer GRPs (Stand 08/2001); rot dargestellt ist die N-terminal um 11 Aminosäuren erweiterte Sequenz von GRP1; Punkte über den Sequenzpositionen zeigen den Grad der Konservierung dieser Positionen an; * = in allen Sequenzen identische Aminosäure; Gleiche Farben markieren Aminosäuren mit ähnlichen chemischen Eigenschaften; Der Pfeil markiert die Position des ursprünglich für den Sequenzanfang gehaltenen Methionins.

Der dargestellte Vergleich der N-terminalen Regionen der GRPs läßt die Schlußfolgerung zu, daß es sich auch bei der auf der Basis der Sequenzdaten des cDNA-Klons INR5 erweiterten Aminosäuresequenz von GRP1 nicht um ein vollständiges Protein handelt. Es ist allerdings sehr wahrscheinlich, daß aminoterminal nur drei Aminosäuren fehlen. Diese Aminosäuren sind das Start-Methionin (M) und mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Asparaginsäure (D), da sich diese Aminosäure auch an Position zwei in den Sequenzen aus *Medicago sativa* und *Pisum sativum* befindet, zwei Arten, die wie die Kichererbse zur Familie der Fabaceen gehören. Das Serin (S) an Position drei ist in allen dargestellten GRPs konserviert.

Die Nukleotidsequenzen von INR5/INR20 und INR51 sind in der EMBL-Datenbank unter den Zugangsnummern AJ007556 (GRP1) und AJ012829 (GRP2) eingetragen. Die aus diesen Klonen abgeleiteten, korrigierten Aminosäuresequenzen finden sich in der SWISS-PROT-Datenbank unter den Zugangsnummern O81929 (GRP1, Fragment) und Q9ZRV2 (GRP2, Fragment). Zum besseren Verständnis, besonders in Hinblick auf die heterologe Expression (vgl. Kapitel 3.4), sollen an dieser Stelle die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von GRP1 noch einmal in korrigierter Form dargestellt werden.

Abbildung 3-2 gibt eine Übersicht über die Sequenz des cDNA-Klon INR 5 und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz von GRP1.

1	g	
2	aaa aaa aca acc ctc atc ctt ggc ctt ttg gct atg gtt ctt ttg att	49
1	K K T T L I L G L L A M V L L I	16
50	tcg ttt gaa gtc tca gct aga gac tta act gag act tcc tct aat acc	97
17	S F E V S A R D L T E T S S N T	32
98	gaa aag gag gtt gct gaa caa aaa aat gaa gta aat gat gtc aaa tat	145
33	E K E V A E Q K N E V N D V K Y	48
146	ggg ggt ggt aat tac ggc aat ggt ggt ggt aat tac ggt cac ggc ggt	193
49	<u>G G G N Y G N</u> <u>G G G N Y G H</u> <u>G G</u>	64
194	ggg aat tac ggc aat ggt ggt ggc aat tat ggt cac ggc ggt ggt aat	241
65	<u>G N Y G N</u> <u>G G G N Y G H</u> <u>G G G N</u>	80
242	tat ggc aat ggt ggt ggt aat tac ggt cac ggc ggt ggt aat tac ggc	289
81	<u>Y G N G G G N Y G H</u> <u>G G G N Y G</u>	96
290	aat ggt ggt ggc aat tat ggt cac ggc ggt ggt aat tat gga cac ggt	337
97	<u>N G G G N Y G H</u> <u>G G G N Y G H</u> <u>G</u>	112
338	ggg ggt aat tac gga aat ggt ggg cac ggt gga cat gga gga gga tat	385
113	<u>G G N Y G N</u> G G H G G H G G G Y	128
386	tgt gga aat ggt tgt tgt ggt ggt tac tat tct ggg agt tgc aga agg	433
129	C G N G C C G G Y Y S G S C R R	144
434	tgt tgc tca tat gtt ggt gaa gct att gat gtc aac act ctt aac tga	481
145	C C S Y V G E A I D V N T L N *	160
482	tcaacatcatcatcattatgcacttttcttactacttttcataaaataaaatttcatcaataaag	544
545	aatggttgagtaagagaggtataaatagatagacaacaatctttggttgctgtgatctatggtgc	607
608	cactatatgtgtaactcgtgtattgtataaatacatctttatgtgtattatatttcaaataac	670
671	aaaaaaaaaaaaaaaa	687

Abbildung 3-2: Sequenz des cDNA-Klons INR5 und die abgeleitete Aminosäuresequenz von GRP1

Der ORF von GRP1 ist grau unterlegt, das Stoppcodon (Position bp 479-481) ist fett gedruckt.

Die 10 Wiederholungen des repetitiven Hauptmotivs in der Aminosäuresequenz (GGGNYGx) sind unterstrichen.

3.1.2 Signalsequenzen und Zielsteuerung der GRP-Genprodukte

Ausgehend von der in Kapitel 3.1.1 formulierten Prämisse, daß der Sequenz von GRP1 nur drei Aminosäuren (M, D, S) am N-terminalen Ende zur Vollständigkeit fehlen, wurde mit computerunterstützten Methoden nach einer möglichen Signalsequenz zur Zielsteuerung in der korrigierten GRP-Sequenz gesucht. Eingesetzt wurde hierzu das Programm „SignalP“, welches basierend auf dem Vergleich mit bekannten Signalsequenzen sowie chemischer und physikalischer Eigenschaften der Aminosäuren die Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein eines Signalpeptids berechnet (NIELSEN et al. 1997). Dieses Programm liefert drei Kenngrößen für jede Aminosäure der gegebenen

Sequenz: Der Wert C („raw cleavage site score“) gibt die Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein einer spezifischen Protease-Schnittstelle an. Er ist direkt hinter der möglichen Schnittstelle am größten. Der Wert S („signal peptide score“) beschreibt die Wahrscheinlichkeit, daß die Aminosäure Teil einer Signalsequenz ist. Er fällt an der Position einer möglichen Schnittstelle steil ab. Der Wert Y („combined cleavage site score“) ist eine mathematische Kombination von C- und S-Wert, der die wahrscheinlichste Position einer Schnittstelle angibt. In Abbildung 3-3 sind diese Kenngrößen für die aminoterminalen Region von GRP1 graphisch dargestellt.

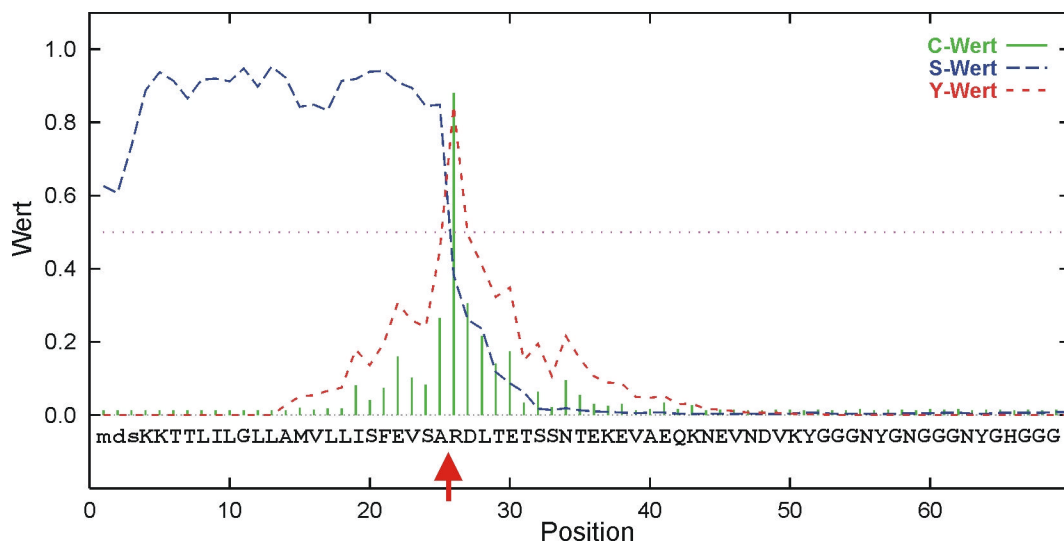


Abbildung 3-3: Wahrscheinlichkeiten für ein Signalpeptid und eine Schnittstelle in der N-terminalen Region von GRP1

Erstellt mit „SignalP“; grün: „C-Wert“ = Wahrscheinlichkeit für eine Schnittstelle; blau: „S-Wert“ = Wahrscheinlichkeit für ein Signalpeptid; rot: „Y-Wert“ = Kombination von C- und S-Wert, gibt die wahrscheinlichste Position einer Schnittstelle für das Signalpeptid an (Pfeil)

Nach den in Abbildung 3-3 dargestellten Ergebnissen handelt es sich bei den ersten 25 Aminosäuren von GRP1 mit einer Wahrscheinlichkeit von über 90% um ein Signalpeptid. Mit großer Sicherheit handelt es sich um eine Signalsequenz, die während der Prozessierung des Proteins abgespalten wird. Die wahrscheinlichste Schnittstelle ($P > 90\%$) liegt zwischen Position 25 und 26, d.h. zwischen den Aminosäuren Alanin und Arginin.

Mit Hilfe des Programms „PSORT“ (vgl. Kapitel 2.6.2.2) wurde die erkannte Signalsequenz dahingehend untersucht, in welches Zellkompartiment sie das GRP möglicherweise steuert. Das Programm vergleicht dabei die gegebene Sequenz mit bekannten Motiven aus Signalpeptiden, für die eine Funktion beschrieben ist.

Außerdem werden physikalische und chemische Eigenschaften des reifen Proteins, wie z.B. die Hydrophobizität, in die Berechnungen miteinbezogen (NAKAI und KANEHISA 1992). Die Untersuchung ergab die in Tabelle 3-1 dargestellten Wahrscheinlichkeitswerte für die einzelnen Kompartimente:

Tabelle 3-1: Ergebnisse der Zielortvorhersage des Programms „PSORT“ für die Sequenz von GRP1

Zielort	Wahrscheinlichkeit	Zielort	Wahrscheinlichkeit
Vakuole	90%	Peroxisom	nicht eindeutig
Sekretion	82%	Chloroplast	negativ
ER(Membran)	10%	Mitochondrium	negativ
ER (Lumen)	10%	Nucleus	negativ

Das Programm fand keine RNA-Bindungsdomäne in der Sequenz von GRP1, was für eine mögliche cytoplasmatische Lokalisation des Proteins gesprochen hätte. Ein Transport des Proteins über den vesikulären Weg ist wahrscheinlich.

3.1.3 Weitere Charakteristika der GRP1-Sequenz

Die Programme zur Berechnung von Sekundärstrukturen (vgl. Kapitel 2.6.2.2) sagen übereinstimmend mindestens einen helikalen Bereich in der Sequenz von GRP1 voraus, welcher den größten Teil des N-terminalen Signalpeptids darstellt. Für den repetitiven Hauptteil des Proteins konnte durch keines der Programme eine regelmäßige Sekundärstruktur vorausgesagt werden. Das Programm „TMPred“ fand noch eine weitere möglicherweise helikale Struktur, die sich im C-terminalen Bereich des Proteins befindet. Das Programm errechnet die Wahrscheinlichkeit, mit der eine Aminosäure innerhalb einer gegebenen Sequenz Teil einer Transmembranhelix ist. Diese Wahrscheinlichkeit wird in einem numerischen Wert („score“) ausgedrückt. Nur Werte größer als 500 werden als signifikant angenommen (HOFFMANN und STOFFEL 1993). Abbildung 3-4 zeigt eine graphische Darstellung dieses Wertes für die einzelnen Aminosäuren innerhalb der Sequenz von GRP1.

Das vom Programm TMPred vorgeschlagenen Modell für GRP1 sieht den N-Terminus des Proteins innerhalb des Cytosols, gefolgt von einer Transmembranhelix der

Orientierung innen → außen (Position 6 bis 25, Wert: 1716). Eine zweite Transmembranregion umgekehrter Orientierung wird durch das Programm von Position 125 bis 145 (Wert: 731) vorhergesagt.

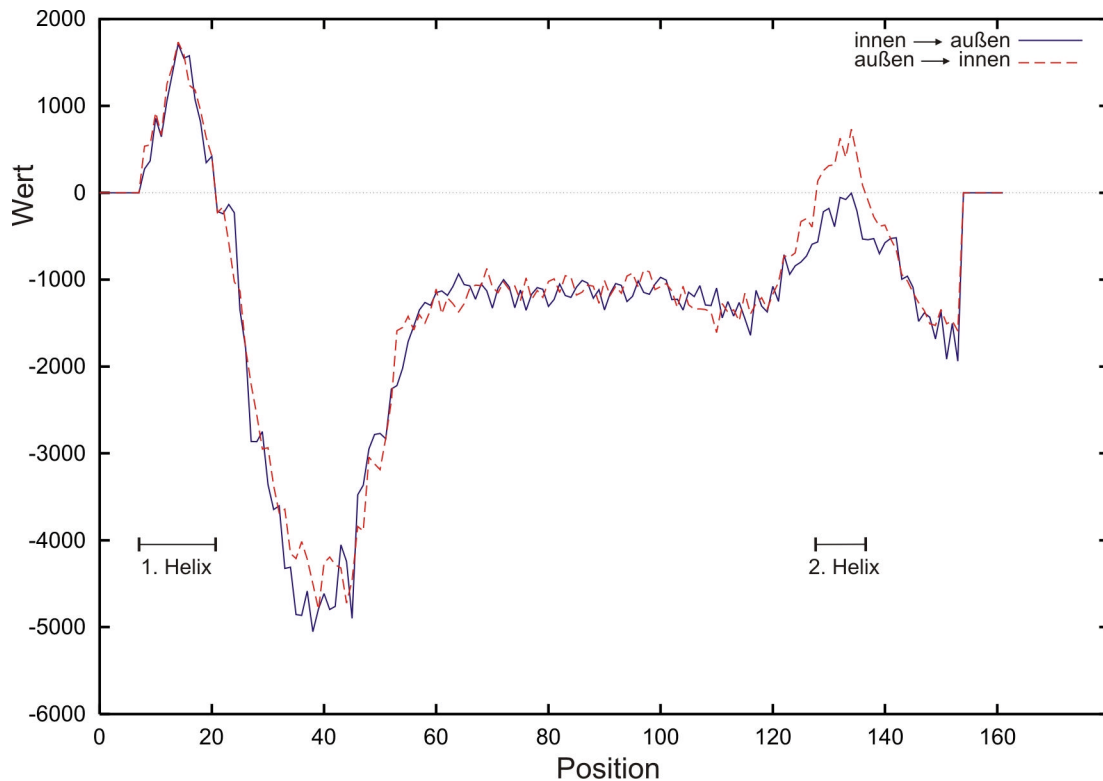


Abbildung 3-4: TMPred-Voraussage über Transmembranhelices in der Sequenz von GRP1

Der angegebene Wert ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, daß die jeweilige Aminosäure Teil einer Transmembranregion ist.

*Blau: Wahrscheinlichkeit für eine Transmembranhelix der Orientierung innen → außen
Rot: Wahrscheinlichkeit für eine Transmembranhelix der Orientierung außen → innen*

Neben den oben beschriebenen Aussagen über Signalpeptid und Sekundärstrukturen wurden mit Hilfe des Computers noch weitere Parameter von GRP1 bestimmt: Das Programm „Compute pI/MW“ berechnete für die komplette Sequenz von GRP1 (162 AS) einen theoretischen isoelektrischen Punkt von pH 6,02 und ein Molekulargewicht von 16050 Da. Für das reife Protein nach Abspaltung des Signalpeptids (137 AS) konnte ein Molekulargewicht von 13374 Da bestimmt werden. Der errechnete pI lag unverändert bei pH 6,02 (BJELLQVIST et al. 1993; BJELLQVIST et al. 1994).

Von der Annahme ausgehend, daß die N-Termini und damit die Signalpeptide von GRP1 und GRP2 höchstwahrscheinlich sehr ähnlich, wenn nicht sogar identisch sind

(CORNELS 1998; CORNELS et al. 2000), wurde die Sequenz von GRP2 um 21 Aminosäuren aminoterminal erweitert. Es ergibt sich ein Protein einer Länge von 229 AS mit einem Molekulargewicht von 21779 Da und einem theoretischen pI von pH 6,06. Nach Abspaltung des Signalpeptids beträgt das Molekulargewicht 19103 Da bei einer Länge von 204 AS. Der isoelektrische Punkt liegt nahezu unverändert bei pH 6,07.

3.1.4 Verwandtschaftliche Stellung der Kichererbsen-GRPs im Pflanzenreich

Um mögliche Hinweise darauf zu erhalten, inwieweit die Sequenzen der Glycin-reichen Proteine im Pflanzenreich konserviert sind und ob sich aus den Ähnlichkeiten der GRPs untereinander eine verwandtschaftliche Beziehung ableiten läßt, wurde ein Vergleich von 25 ausgesuchten GRPs durchgeführt (Programm „ClustalX“, vgl. Kapitel 2.6.1.3). Zu den in die Analyse einbezogenen Proteinen gehören neben den beiden erweiterten Aminosäuresequenzen der Kichererbsen-GRPs die bereits in Abschnitt 3.1.1 angesprochenen Proteine mit ähnlicher N-terminaler Struktur sowie eine Reihe weiterer GRPs mit Homologien zu den hier beschriebenen Proteinen aus der Kichererbse. Zusätzlich wurden noch einige besonders „prominente“, d.h. intensiv untersuchte GRPs wie z.B. GRP1.0 und GRP1.8 aus *Phaseolus vulgaris* (KELLER et al. 1988) oder GRP1 aus der Petunie (VARNER und CASSAB 1986) in den Vergleich miteinbezogen.

Die vom Programm „ClustalX“ berechneten Daten über die verwandtschaftlichen Beziehungen der GRPs wurden mit Hilfe des Programms „TreeView“ (vgl. Kapitel 2.6.2.3) in ein phylogenetisches Stammbaumdiagramm umgewandelt. Der Vergleich wurde nicht nur mit den gesamten Sequenzen durchgeführt (Abbildung 3-5 A), sondern auch nur mit den jeweils ersten 35 Aminosäuren, welche die möglicherweise vorhandenen Signalpeptide enthalten (Abbildung 3-5 B). Zusätzlich wurden noch die Glycin-reichen Abschnitte der Proteine verglichen, d.h. zum Vergleich wurden N-terminal alle Aminosäuren bis zum Beginn des repetitiven Glycin-reichen Bereichs entfernt (Abbildung 3-5 C).

Deutlich zu erkennen ist, daß unabhängig von der Methode des Vergleichs die Proteine aus den Fabaceen *Medicago sativa*, *Medicago falcata*, *Pisum sativum* und *Cicer arietinum* immer eine enge verwandtschaftliche Beziehung aufweisen. Die GRPs

aus der ebenfalls zur Familie der Fabaceae gehörende Bohne (*Phaseolus vulgaris* L.) zeigen in keinem Stammbaum größere Verwandtschaft zu den GRPs aus der Kichererbse und den anderen Fabaceen.

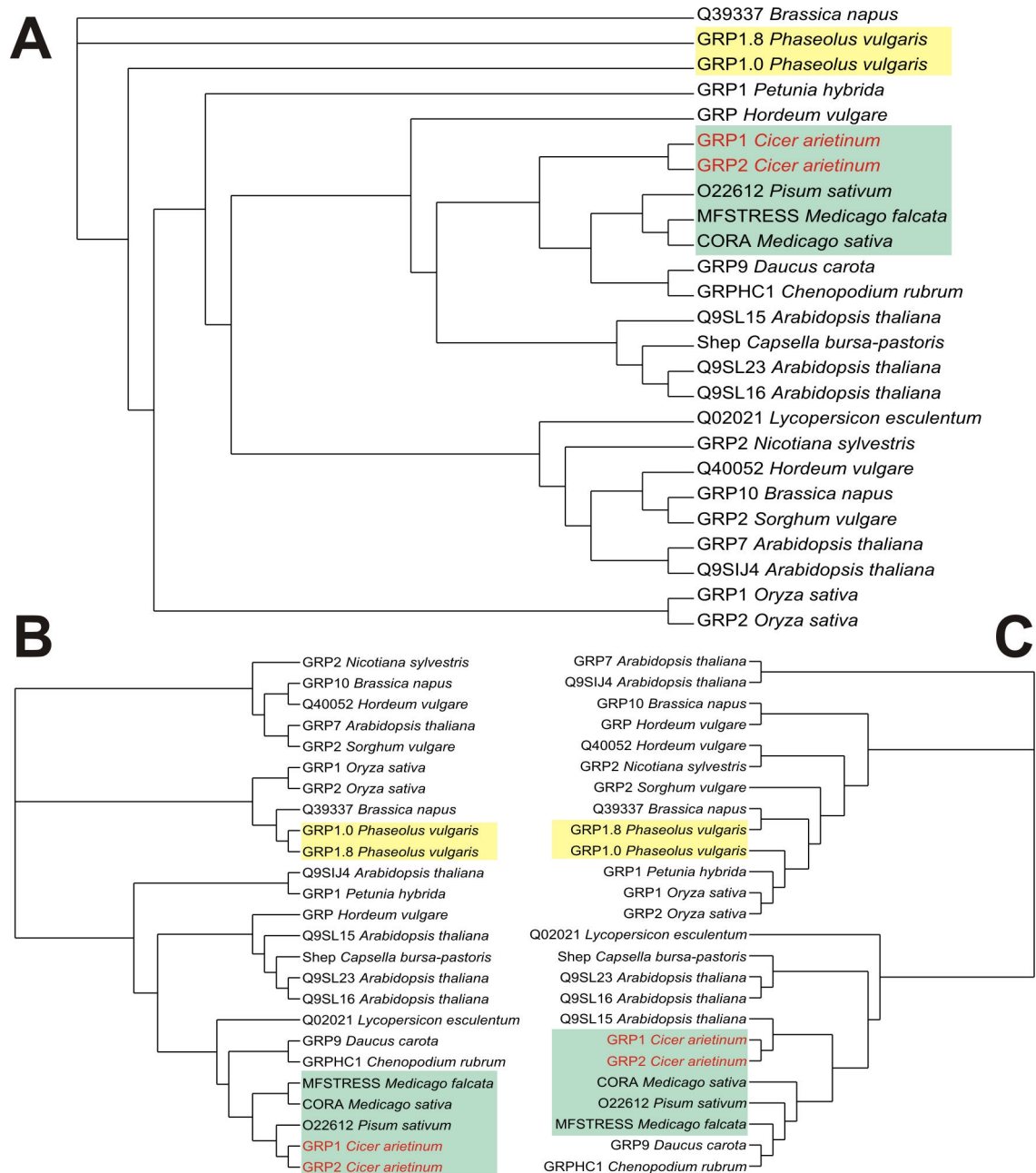


Abbildung 3-5: Stammbäume der Sequenzen von 25 ausgewählten GRPs

A: Vergleich der kompletten Sequenzen

B: Vergleich der jeweils ersten 35 Aminosäuren (enthalten mögliche Signalpeptide)

C: Vergleich der Glycin-reichen Sequenzabschnitte

Erstellt mit „ClustalX“ und „TreeView“; Die GRPs der Kichererbse sind rot dargestellt; Die grün unterlegten Bereiche kennzeichnen den in allen drei Vergleichen zusammenhängenden Block der Fabaceen *Cicer*, *Medicago* und *Pisum*. Die GRPs aus der Bohne wurden gelb unterlegt.

3.2 Amplifizierung des 5'-Endes des Leserrahmens von GRP2

Von der Annahme ausgehend, daß die beiden GRPs der Kichererbse sehr ähnliche oder identische N-Termini besitzen, wurde vom 5'-Ende des für GRP1 kodierenden cDNA-Klons INR20 ein Primer (INR20forward) abgeleitet. In Kombination mit einem spezifischen Primer für das 3'-Ende des für GRP2 codierenden Klons INR23 (INR23reverse) sollte mittels PCR ein Produkt amplifiziert werden, daß einer am 5'-Ende verlängerten DNA-Sequenz von GRP2 entspricht (vgl. Kapitel 2.3.3). Als „template“ (Ausgangs-DNA) dienten dabei genomische Kichererbsen-DNA und zwei cDNA-Banken aus elicitierten Zellsuspensionskulturen bzw. infizierten Pflanzen (ICHINOSE et al. 2000; OVERKAMP 2000). Abbildung 3-6 zeigt exemplarisch das Ergebnis eines Versuchs der oben beschriebenen Amplifizierung.

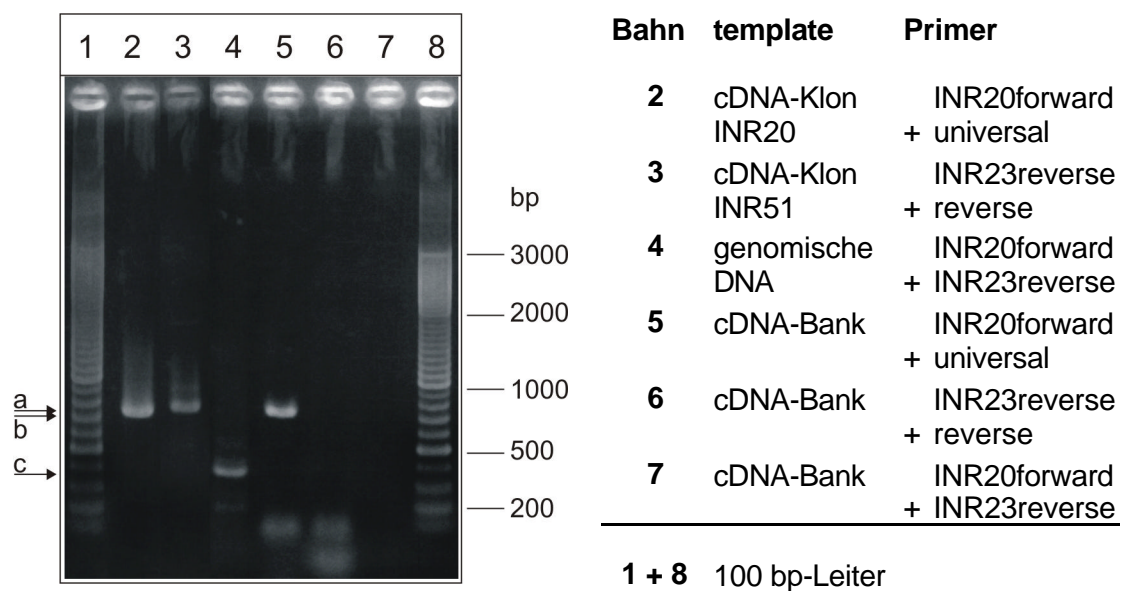


Abbildung 3-6: Agarosegelelektrophorese der Produkte der PCR zur Amplifizierung des 5'-Endes des Leserrahmens von GRP2

Die in den Reaktionen 5 bis 7 eingesetzte cDNA stammt aus einer cDNA-Bank aus elicitierten Kichererbsen-Zellsuspensionskulturen; Gel: 1% (w/v) Agarose in 0,5 x TBE; EtBr-Färbung

In den Kontrollreaktionen, bei denen die jeweiligen cDNA-Klone als template eingesetzt wurden, zeigen sich die den theoretischen Erwartungen entsprechenden Banden. Dies sind für den cDNA-Klon INR51 eine Bande einer Größe von 744 bp (Bande a in Abbildung 3-6) und für INR20 eine Bande, deren erwartungsgemäße Größe 708 bp beträgt (Bande b). Aus genomischer DNA läßt sich mit der gewählten Primerkombination nur ein etwa 400 bp großes Fragment amplifizieren (Bande c), welches

nach Klonierung und Sequenzierung keine signifikante Homologie zu DNA-Sequenzen aus Datenbanken aufwies. Mit der cDNA-Bank aus Zellkulturen als template konnte zwar das der INR20-Kontrollreaktion entsprechende Fragment amplifiziert werden (Bahn 5 in Abbildung 3-6), ein für GRP2 codierendes Amplikon konnte aber mit keiner Primerkombination erhalten werden. Ähnliches gilt auch für die cDNA-Bank aus infizierten Kichererbsenpflanzen (Ergebnisse nicht dargestellt): Die Amplifizierung eines GRP2-homologen Produktes konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden. Auch die Variierung der PCR-Parameter (z.B. Erniedrigung der „annealing“- (Anlagerungs-) Temperatur) brachte kein positives Resultat. Lediglich Fragmente ohne Homologie zu GRP-DNA konnten unspezifisch amplifiziert werden.

3.3 Analyse des Expressionsverlaufes der GRP-mRNA

Zur Untersuchung des Expressionsverlaufes der GRP-Transkripte nach Infektion oder Verwundung von Kicherebsenpflanzen wurden Northern-Analysen mit Gesamt-RNA durchgeführt. Zum Einsatz kamen Digoxigenin-markierte antisense-RNA-Sonden, die mit Hilfe eines an eine alkalische Phosphatase gekoppelten Antikörpers und des Chemilumineszenzsubstrates CDP-Star™ detektiert wurden (vgl. Kapitel 2.3.2). Auf die gleiche Weise wurden auch die Expressionslevel in verschiedenen Organen und im resistenten und suszeptiblen Kultivar der Kichererbse miteinander verglichen. Zur Kontrolle der aufgetragenen RNA-Mengen wurde die RNA durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht und die Gele fotografiert. Diese Kontrolle wurde für alle Northern-Analysen durchgeführt, hier aber nur exemplarisch in Abbildung 3-9 dargestellt.

3.3.1 Expressionsverlauf nach Infektion mit *Ascochyta rabiei*

Zur Überprüfung der Ergebnisse der Diplomarbeit (CORNELS 1998) wurden Northern-Untersuchungen einer Kinetik von infizierten Pflanzen (vgl. Kapitel 2.2.3) des resistenten Kultivars ILC 3279 durchgeführt. Eingesetzt wurden sowohl eine aus dem cDNA-Klon INR20 hergestellte Sonde, welche das Transkript von GRP1 nachweisen müßte, als auch eine Sonde, die an die GRP2-mRNA hybridisieren sollte (hergestellt

aus cDNA-Klon INR51). Die Ergebnisse sind zusammenfassend in Abbildung 3-7 dargestellt.

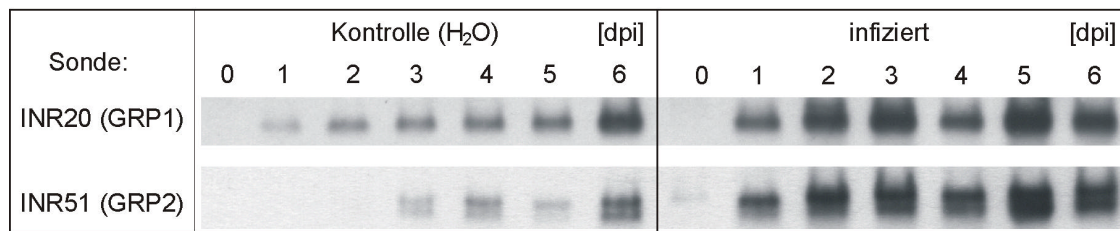


Abbildung 3-7: Expressionsverlauf der GRP-Transkripte nach Infektion mit *Ascochyta rabiei* (Northern-Analyse)

Die Kontrollpflanzen wurden analog zur Infektion mit sterilem Aqua bidest behandelt. 20 µg RNA/Gelbahn; Nachweis: Digoxigenin-markierte antisense-RNA-Sonden + anti-DIG-AP; Substrat: CDP-StarTM; dpi = Tage nach Infektion bzw. Kontrollbehandlung

Die aus INR51 hergestellte Sonde gegen die GRP2-mRNA zeigt eine Kreuzreaktion mit dem Transkript von GRP1 (unteres Signal). Trotzdem läßt sich eine starke, transiente Induktion beider GRP-mRNAs mit einem Maximum fünf Tage nach der Infektion (5 dpi) erkennen. Auffallend ist der relativ starke Anstieg in der Signalintensität auch in den wasserbehandelten Kontrollpflanzen. Hierbei scheint vor allem die GRP1-RNA rasch transkribiert zu werden, wohingegen das GRP2-Transkript verzögert gebildet wird. Diese Ergebnisse sind mit anderen Kinetiken qualitativ reproduzierbar (nicht dargestellt).

3.3.2 Induktion der Expression durch andere Streßfaktoren: Verwundung und „Manipulationsstreß“

Um Hinweise darauf zu erhalten, ob der in Abbildung 3-7 dargestellte Anstieg in der Signalstärke in den wasserbehandelten Kontrollkulturen auf eine entwicklungsbedingte Erhöhung des Niveaus an GRP-mRNA zurückzuführen ist oder ob es sich dabei um eine Folge der Kontrollbehandlung (vgl. Kapitel 2.2) handelt, wurden vergleichende Northern-Analysen mit vollständig unbehandelten Pflanzen durchgeführt. Zusätzlich wurden Pflanzen, deren Blätter wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben verwundet worden waren, in den Vergleich miteinbezogen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-8 zusammengefaßt. Auch diese Ergebnisse wurden in anderen Kinetiken qualitativ reproduziert (nicht dargestellt).

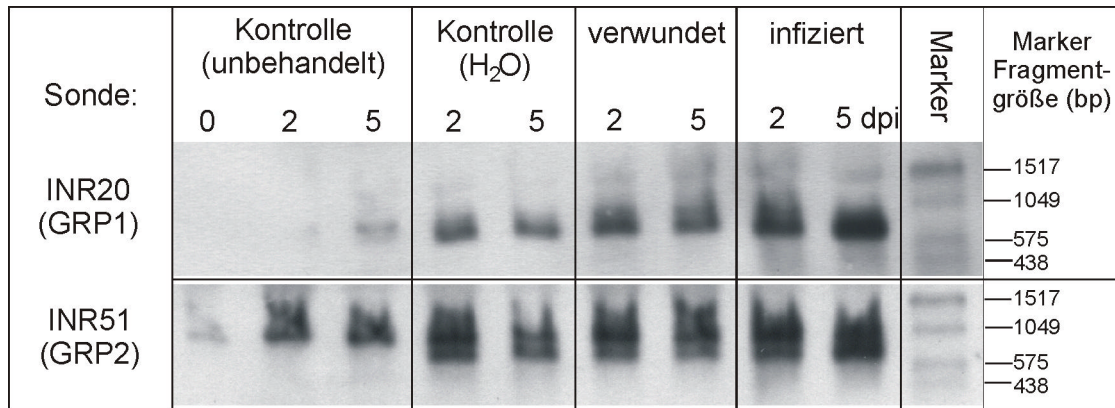


Abbildung 3-8: Vergleich des Expressionsverlaufs der GRP-mRNAs nach Kontrollbehandlung, Verwundung und Infektion (Northern-Analyse)

*Kontrolle (unbehandelt): Die Kontrollpflanzen wurden nicht bewegt oder anderweitig behandelt; Kontrolle (H₂O): Die Kontrollpflanzen wurden analog zur Infektion mit sterilem Aqua bidest behandelt; verwundet: Die Blattpfiedern der Pflanzen wurden zweimal bis zur Mittelrippe eingeschnitten; infiziert: Die Pflanzen wurden mit einer Sporensuspension von *Ascochyta rabiei* inokuliert; 20 µg RNA/Gelbahn; Nachweis: Digoxigenin-markierte antisense-RNA-Sonden + anti-DIG-AP; Substrat: CDP-StarTM; Marker: DIG-markierter RNA-Marker (BOEHRINGER); dpi = Tage nach Infektion, Verwundung bzw. Kontrollbehandlung*

Wie in Abbildung 3-7 ist eine Kreuzreaktion der GRP2-Sonde mit der GRP1-mRNA zu erkennen. Auffallend ist das nahezu vollständige Fehlen eines Signals des GRP1-Transkriptes in den unbehandelten Kontrollpflanzen, während in den wasserbehandelten Pflanzen die GRP1-mRNA deutlich detektierbar ist. Durch die Verwundung erhöht sich die Intensität des mit der GRP1-Sonde erhaltenen Signals im Vergleich mit den wasserbehandelten Pflanzen nur in geringem Maße, bei einer Infektion ist sie jedoch deutlich stärker, analog zu dem in Abbildung 3-7 dargestellten Experiment. Ein ähnliches Bild liefert die GRP2-Sonde, nur daß hier der Level an GRP2-mRNA auch in den völlig unbehandelten Pflanzen deutlich ansteigt, jedoch ohne daß eine der Verwundung oder der Infektion entsprechende Signalintensität erreicht wird. Deutlich zu erkennen ist, daß das kleinere Transkript von GRP1 erst bei den wasserbehandelten Pflanzen durch die oben beschriebene Kreuzreaktion detektiert wird. In den unbehandelten Pflanzen ist es mit dieser Sonde nicht nachweisbar.

Die Auftragung eines Digoxigenin-markierten RNA-Markers (BOEHRINGER) auf das Gel ermöglichte eine Größenbestimmung der GRP-Transkripte direkt auf dem Röntgenfilm. Die ermittelten Größen lagen bei ca. 800 bp für die GRP1-mRNA und bei etwa 1 kb für das GRP2-Transkript.

3.3.3 Organspezifische Expression und Vergleich des resistenten mit dem suszeptiblen Kultivar

Nachdem bereits gezeigt worden war, daß auch in Stengeln, wenn auch in deutlich geringerem Maße als in Blättern, die GRP-Transkripte gebildet werden (CORNELS 1998), sollte hier untersucht werden, inwieweit die Wurzeln der Kichererbse GRP-mRNA produzieren. Da bisher kaum ein Unterschied im Expressionsverhalten der beiden GRPs zu beobachten war, wurde in diesem Experiment auf den Nachweis des GRP2-Transkriptes verzichtet. Außerdem wurde untersucht, ob sich das resistente Kichererbsenkultivar ILC 3279 in der Expression von GRP1 in Blättern von dem suszeptiblen Kultivar ILC 1929 unterscheidet. Die Resultate dieses Northern-Vergleichs sind in Abbildung 3-9 dargestellt. In dieser Abbildung sind außerdem exemplarisch eine Positivkontrolle für die Spezifität der Sonde (ein dem größten Teil des ORF von INR20 entsprechendes PCR-Fragment, vgl. Kapitel 3.4.1) und die Kontrolle der aufgetragenen RNA-Mengen mittels Ethidiumbromidfärbung dargestellt.

Deutlich ist die RNA-DNA-Hybridisierung der Sonde aus INR20 an das PCR-Fragment zu erkennen. In Abbildungsteil B lassen sich klar die Banden der ribosomalen RNA (12S und 18S) erkennen. Durch den Vergleich der Intensität dieser Banden ist eine bedingte Aussage über die für vergleichende Northern-Analysen notwendige identische Menge an RNA pro Gelbahn möglich. Hierbei sind aber auch andere Faktoren zu berücksichtigen, wie z.B. das Fehlen von plastidärer rRNA in Gesamt-RNA aus Wurzeln, was in Abbildung 3-9 B zu erkennen ist. Während bei der RNA aus Wurzeln die eukaryotischen rRNA-Banden ein wenig intensiver sind, als bei den Proben aus Blättern, fehlt in den Gelbahnen der für plastidäre rRNA typische „Schmier“, der bei der Gesamt-RNA aus Blättern unterhalb der beiden Hauptbanden zu erkennen ist.

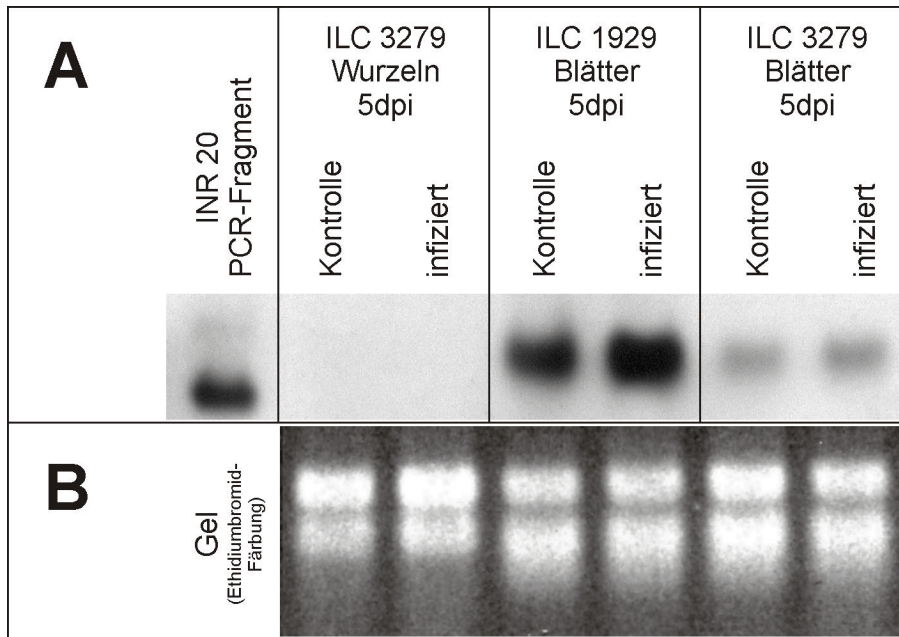


Abbildung 3-9: Vergleich der Expression des Transkriptes von GRP1 in Wurzeln und Blättern und in den unterschiedlichen Kultivaren der Kichererbse (Northern-Analyse)

A: Röntgenfilm; B: Gel (Ethidiumbromidfärbung); Die Kontrollpflanzen wurden analog zur Infektion mit sterilem Aqua bidest behandelt; 10 µg RNA/Gelbahn; Nachweis: Digoxigenin-markierte antisense-RNA-Sonde INR20 (GRP1) + anti-DIG-AP; Substrat: CDP-StarTM; Positivkontrolle: PCR-Fragment aus INR20, ca. 10 ng; ILC 3279 = resistentes Kultivar; ILC 1929 = suszeptibles Kultivar; dpi = Tage nach Infektion

Als Ergebnis der in Abbildung 3-9 dargestellten Northern-Untersuchung läßt sich festhalten, daß in Wurzeln kein GRP1-Transkript nachweisbar ist, weder in den Kontrollpflanzen noch in infizierten Pflanzen. Weiter ist klar zu erkennen, daß in den Blättern des suszeptiblen Kultivars ILC 1929 deutlich höhere Mengen an GRP1-mRNA gebildet werden, als in Blättern des resistenten Kultivars. Auffällig ist, daß in der dieser Northern-Untersuchung zugrundeliegenden Pflanzenkinetik die Induktion der GRP1-Expression durch die Wasserbehandlung fast den Level der Induktion durch Infektion erreicht (vgl. Kapitel 3.3.2).

3.4 Heterologe Expression

Um nun nicht nur die RNA, sondern auch die translatierten Proteine in der Pflanze nachweisen zu können, war das nächste Ziel, einen spezifischen Antikörper gegen die GRPs herzustellen. Ein solcher Antikörper sollte dann in einer Reihe von immunologischen Methoden Anwendung finden (z.B. Western-Blot, *in situ*-Immunolokalisation). Um an einen solchen Antikörper zu gelangen, war es

zunächst erforderlich, das entsprechende Antigen (= GRP) in möglichst reiner Form zu isolieren. Da die GRPs der Kichererbse höchstwahrscheinlich aber keine Enzymaktivität oder andere Charakteristika besitzen, mit denen man die Proteine im Zuge einer Aufreinigung aus der Pflanze oder aus Zellkulturen nachweisen könnte, wurde eine andere Methode der „Herstellung“ des Antigens gewählt: die heterologe Expression eines der beiden GRPs in *E. coli*.

3.4.1 Herstellung des Expressionskonstruktes

Zunächst wurde ein *E. coli*-Expressionsvektor konstruiert, der die Eigenschaft besitzt, daß er am N-Terminus des zu exprimierenden Proteins eine Folge von 6 Histidinen hinzufügt, den sogenannten „His-tag“. Zum besseren Verständnis der Ergebnisse sollen an dieser Stelle kurz die Vorteile des His-tag-Systems und der Ablauf der Herstellung des Expressionskonstruktes beschrieben werden.

3.4.1.1 Das His-tag-System

Kernstück des u.a. von der Firma QIAGEN (Hilden) unter dem Namen „QIAexpress“ angebotenen His-tag-Systems ist ein Promotor-gesteuerter Expressionsvektor, der dem zu exprimierenden Protein durch Fortführung des Leserasters eine Reihe von Aminosäuren hinzufügt, d.h. quasi ein Fusionsprotein erzeugt. Das angefügte kurze Polypeptid besteht hauptsächlich aus einer in der Natur seltenen Folge von 6 Histidinen („His-tag“) und kann sowohl am Aminoende als auch C-terminal an das gewünschte Protein fusioniert werden. Es existieren eine Reihe von Vektoren zur Expression in *E. coli*, die sich in der Position des His-tags und dem offenen Leseraster unterscheiden.

Der nur ca. 2 kDa große His-tag stört in den meisten Fällen nicht die Funktion nativer Proteine und besitzt auch keine große Antigenizität, was ein Entfernen des His-tags vor dem Einsatz des heterolog exprimierten Proteins zur Antikörperproduktion meist überflüssig macht. Einer der größten Vorteile des His-tags ist aber die mögliche Aufreinigung des heterolog exprimierten Proteins über Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Metallaffinitätschromatographie. Dabei bilden die Histidinreste des His-tag mit einer Ni-NTA-Matrix einen Chelat-ähnlichen Komplex, was zu einer Bindung der entsprechenden Proteine an das Säulenmaterial führt. Diese Bindung ist reversibel und kann z.B. durch Zugabe von Imidazol wieder gelöst werden kann. Abbildung 3-10

veranschaulicht das Bindungsprinzip. Theoretisch ist so eine Isolierung des Proteins in einem akzeptablen Reinheitsgrad in nur einem einzigen Schritt möglich.

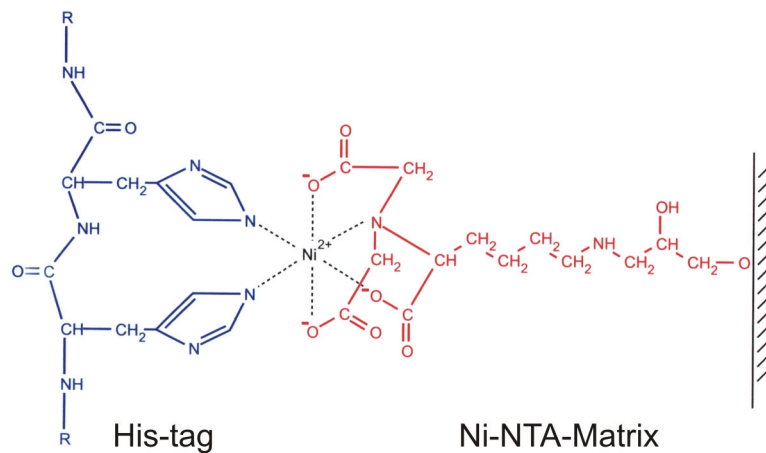


Abbildung 3-10: Prinzip der Komplexierung von Proteinen mit His-tag an eine Ni-NTA-Matrix

(verändert nach: „The QIAexpressionist™“, 4. Ausgabe Januar 2000, QIAGEN)

Ein weiterer Vorteil des His-tags ist die Möglichkeit, diesen als Ziel eines käuflichen Antikörpers zu benutzen und so das heterolog exprimierte Protein auch in geringen Mengen nachweisen zu können. Eine Reihe solcher gegen den His-tag gerichteten Antikörper ist im Handel erhältlich.

3.4.1.2 Ablauf der Konstruktion

Da die N-terminale Signalsequenz bei der Prozessierung von GRP1 vermutlich abgespalten wird (vgl. Kapitel 3.1.2), wurde für die heterologe Expression nicht das vollständige GRP1, sondern nur ein Teil des Proteins ausgewählt, der den kompletten Glycin-reichen, repetitiven Sequenzabschnitt umfaßt (vgl. Abbildung 3-2 und Abbildung 3-13). Als Vektor wurde das pQE-31-Plasmid (QIAGEN) verwendet. Dieser Expressionsvektor enthält den starken Promotor des Phagen T5 unter der Kontrolle von zwei *lac*-Operatorsequenzen, die eine effiziente Unterdrückung des T5-Promotors unter Einfluß des *lac*-Repressors gewährleisten. Der MCS des Vektors folgen Stoppcodons zum Abbruch der Translation in allen drei Leserahmen. Außerdem enthält der Vektor das Ampicillin-Resistenz vermittelnde β -Lactamasegen und einen ColE1 Replikationsstartpunkt zur autonomen Replikation in *E. coli*. Eine Übersicht über den Expressionsvektor pQE-31 gibt Abbildung 3-11.

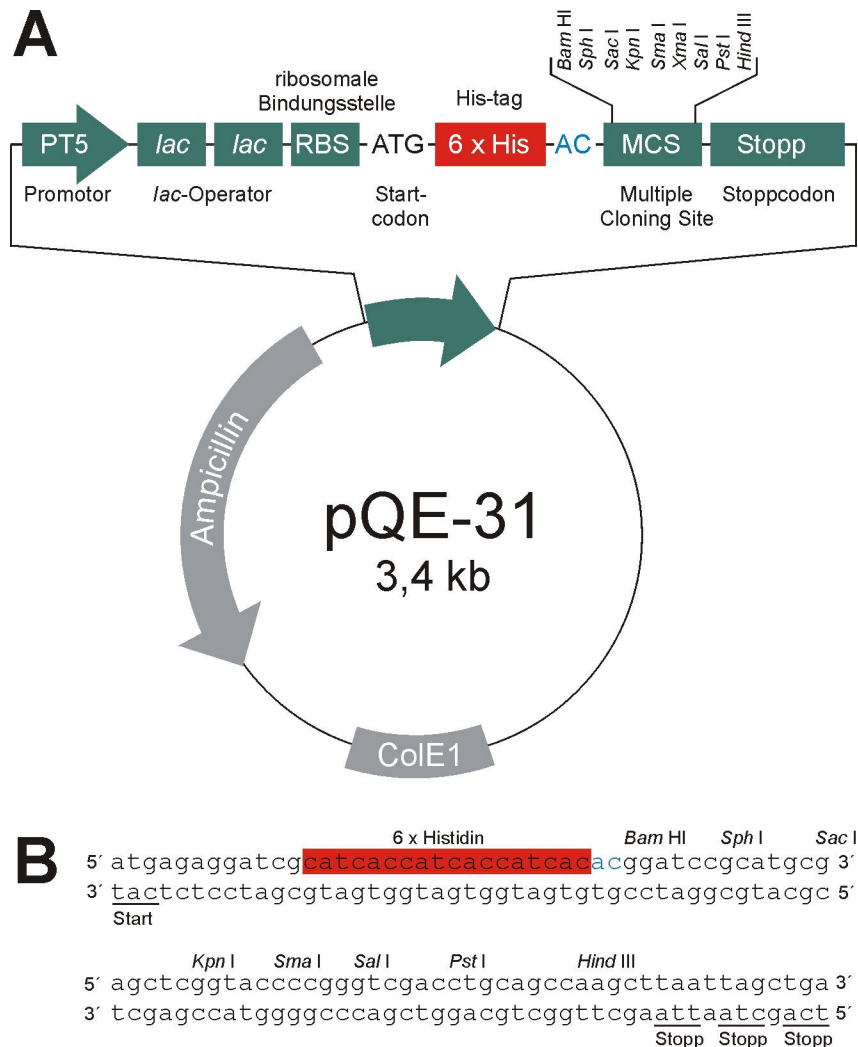


Abbildung 3-11: Übersicht über den Vektor pQE-31

A: Vektorkarte (verändert nach: „The QIAexpressionist™“, 4. Ausgabe Januar 2000, QIAGEN)

ColE1=Replikationsursprung in *E. coli*

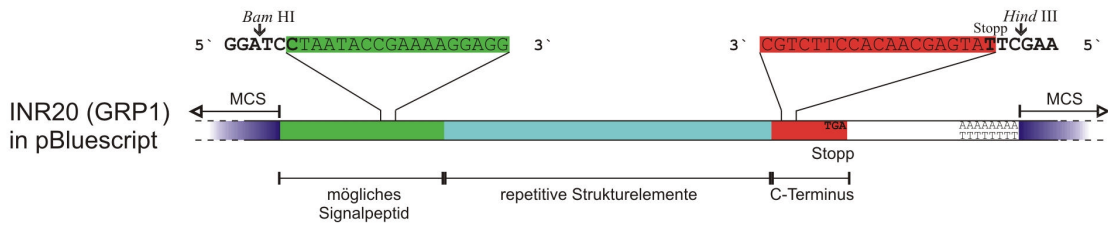
B: Sequenz des His-Tag und der Multiple Cloning Site

Zur eigentlichen Konstruktion wurde zunächst mittels PCR der gewünschte Teil der GRP1-Sequenz aus dem cDNA-Klon INR20 amplifiziert. Die Primer wurden dabei so gewählt, daß sie jeweils in 5`- und in 3`-Richtung von der für den repetitiven Aminosäurebereich codierenden Sequenz binden. Eine Amplifizierung ausschließlich der repetitiven Region war aufgrund des Fehlens geeigneter spezifischer Primerbindungsstellen nicht möglich. Über die gewählten Primer wurden zusätzlich Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *BamH I* und *Hind III* an die Enden der zu amplifizierenden Sequenz eingefügt. Am C-terminalen Ende der Sequenz bildete der gewählte Primer mit

der *Hind* III-Schnittstelle außerdem noch ein zusätzliches Stoppcodon im Leserahmen des fertigen Konstruktes (vgl. Kapitel 2.3.4.1).

Das Amplikon wurde zunächst in den Vektor pDATA kloniert, da ein direktes Schneiden von terminalen Restriktionsschnittstellen nur sehr schwer möglich ist. Das Konstrukt wurde in *E. coli*-XL1 Blue-Zellen transformiert, die Bakterien kultiviert und das vervielfältigte Plasmid reisoliert. Der das Amplikon enthaltende Vektor pDATA und der Expressionsvektor pQE-31 wurden anschließend mit den Endonukleasen *Bam*HI und *Hind* III verdaut. Der Restriktionsansatz wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, und das Insert aus dem pDATA-Vektor und der nun lineare Expressionsvektor wurden aus dem Gel eluiert und aufgereinigt. Es folgte die Ligation des Inserts in den pQE-31-Expressionsvektor über die „sticky ends“ der *Bam*H I- und *Hind* III-Schnittstellen. Das als „pQE-31:GRP1“ bezeichnete fertige Expressionskonstrukt wurde in Zellen des *E. coli*-Stamms M15 transformiert, die zusätzlich das Plasmid pREP4 trugen, welches die interne Konzentration an *lac*-Repressor auf einem hohen Niveau hält und somit eine gezielte Steuerung der Expression ermöglicht. Das Plasmid pREP4 vermittelt außerdem eine Resistenz gegenüber Kanamycin, so daß bei einer Anzucht der Transformanten in Ampicillin- und Kanamycin-haltigen Medien ein Selektionsdruck zur Erhaltung beider Plasmide gewährleistet war. Abbildung 3-12 gibt eine Übersicht über den Ablauf der Herstellung des Expressionskonstruktes (vgl. hierzu auch Kapitel 2.3.4). Der Erfolg der Konstruktion wurde durch Sequenzierung bestätigt.

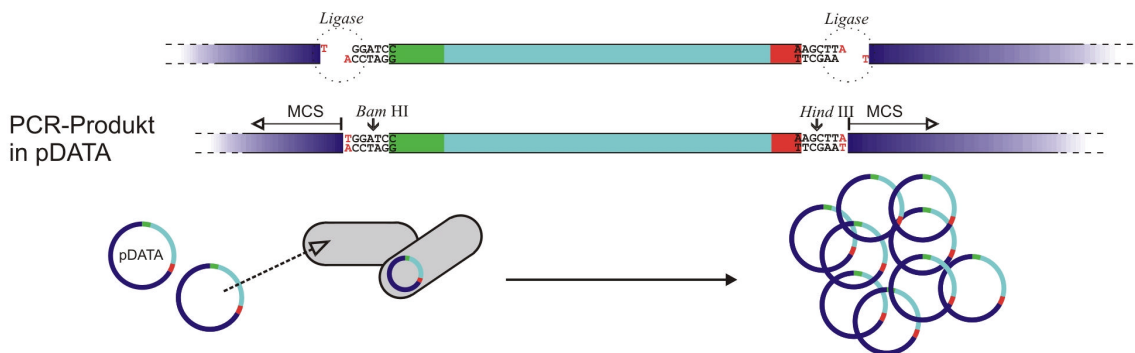
1. Primer-Ableitung (Einfügen von Schnittstellen und zusätzlichem Stoppcodon):



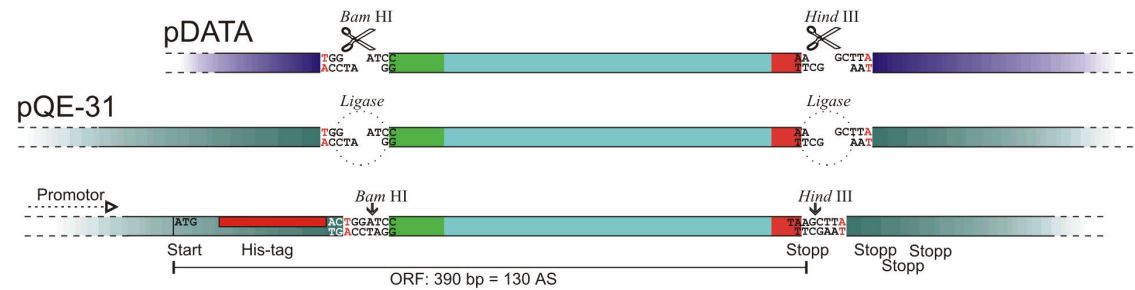
2. PCR mit den abgeleiteten Primern und INR20 als Template:



3. Ligation des PCR-Produktes in pDATA und Transformation in *E. coli* XL1 Blue:



4. Restriktion mit *Bam* HI / *Hind* III und Ligation in pQE-31:



5. Transformation in *E. coli* M15:

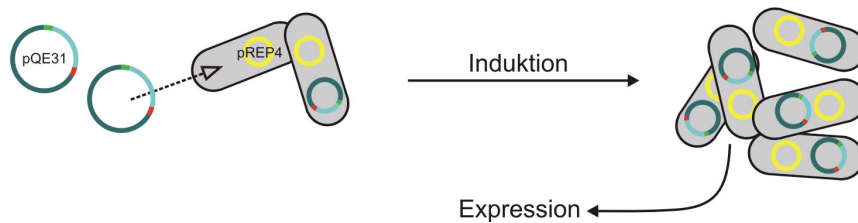


Abbildung 3-12: Herstellung des Expressionskonstruktes

Übersicht über die einzelnen Schritte bei der Konstruktion des Expressionsvektors pQE-31:GRP1. Erläuterungen siehe Text.

3.4.1.3 Übersicht über das fertige Expressionskonstrukt

Nach Reisolation des Expressionskonstruktes aus mehreren willkürlich ausgewählten Transformanten und Sequenzierung der relevanten Sequenzabschnitte ergab sich das den Erwartungen entsprechende in Abbildung 3-13 dargestellte Bild. Das als GRP1exp bezeichnete heterolog exprimierte Protein sollte demnach aus 130 Aminosäuren bestehen und ein Molekulargewicht von 12762 Da bei einem theoretischen pI von pH 7,18 haben.

1		<i>atg</i>	<i>aga</i>	<i>gga</i>	<i>tcg</i>	<i>cat</i>	<i>cac</i>	<i>cat</i>	<i>cac</i>	<i>cat</i>	<i>cac</i>	<i>acg</i>	<i>gat</i>	33	
	1	M	R	G	S	H	H	H	H	H	H	T	D	12	
						<i>His-tag</i>									
						<i>BamH I</i>									
34		cct	aat	acc	gaa	aag	gag	g	<i>ttt</i>	<i>gct</i>	<i>gaa</i>	<i>caa</i>	<i>aaa</i>	<i>aat</i>	66
	13	P	N	T	E	K	E	V	A	E	Q	K	N	24	
									<i>Primer INR20exp1</i>						
67		<i>gaa</i>	<i>gta</i>	<i>aat</i>	<i>gat</i>	<i>gtc</i>	<i>aaa</i>	<i>tat</i>	<i>ggt</i>	<i>ggt</i>	<i>ggt</i>	<i>aat</i>	<i>tac</i>	99	
	25	E	V	N	D	V	K	Y	G	G	G	N	Y	36	
100		<i>ggc</i>	<i>aat</i>	<i>ggt</i>	<i>ggt</i>	<i>ggt</i>	<i>aat</i>	<i>tac</i>	<i>gga</i>	<i>caa</i>	<i>ggc</i>	<i>ggt</i>	<i>ggt</i>	132	
	37	G	N	G	G	G	N	Y	G	Q	G	G	G	48	
133		<i>aat</i>	<i>tat</i>	<i>ggc</i>	<i>aat</i>	<i>ggt</i>	<i>ggt</i>	<i>ggt</i>	<i>aat</i>	<i>tac</i>	<i>ggt</i>	<i>cac</i>	<i>ggc</i>	165	
	49	N	Y	G	N	G	G	G	N	Y	G	H	G	60	
166		<i>ggt</i>	<i>ggt</i>	<i>aat</i>	<i>tat</i>	<i>ggc</i>	<i>aat</i>	<i>ggt</i>	<i>ggt</i>	<i>ggt</i>	<i>aat</i>	<i>tac</i>	<i>ggt</i>	198	
	61	G	G	N	Y	G	N	G	G	G	N	Y	G	72	
199		<i>cac</i>	<i>ggc</i>	<i>ggt</i>	<i>ggt</i>	<i>aat</i>	<i>tac</i>	<i>ggc</i>	<i>aat</i>	<i>ggt</i>	<i>ggt</i>	<i>ggc</i>	<i>aat</i>	231	
	73	H	G	G	G	N	Y	G	N	G	G	G	N	84	
232		<i>tat</i>	<i>ggt</i>	<i>cac</i>	<i>ggc</i>	<i>ggt</i>	<i>ggt</i>	<i>aat</i>	<i>tat</i>	<i>gga</i>	<i>cac</i>	<i>ggt</i>	<i>ggt</i>	264	
	85	Y	G	H	G	G	G	N	Y	G	H	G	G	96	
265		<i>ggt</i>	<i>aat</i>	<i>tac</i>	<i>gga</i>	<i>aat</i>	<i>ggt</i>	<i>ggg</i>	<i>cac</i>	<i>ggt</i>	<i>gga</i>	<i>cat</i>	<i>gga</i>	297	
	97	G	N	Y	G	N	G	G	H	G	G	H	G	108	
298		<i>gga</i>	<i>gga</i>	<i>tat</i>	<i>tgt</i>	<i>gga</i>	<i>aat</i>	<i>ggt</i>	<i>tgt</i>	<i>tgt</i>	<i>ggt</i>	<i>ggt</i>	<i>tac</i>	330	
	109	G	G	Y	C	G	N	G	C	C	G	G	Y	120	
									<i>Primer INR20exp2</i>						
331		<i>tat</i>	<i>tct</i>	<i>ggg</i>	<i>agt</i>	<i>tgc</i>	<i>aga</i>	<i>agg</i>	<i>tgt</i>	<i>tgc</i>	<i>tca</i>	<i>taa</i>	<i>gct</i>	363	
	121	Y	S	G	S	C	R	R	C	C	S	Stop	*	132	
364		<i>taa</i>	<i>tta</i>	<i>gct</i>	<i>gag</i>									375	
	133	Stop	*	*	*										

Abbildung 3-13: Übersicht über das fertige Expressionskonstrukt pQE-31:GRP1

Dargestellt ist der zu exprimierende offene Leserahmen bestehend aus dem repetitiven Sequenzabschnitt aus INR20 (rot) und den flankierenden Regionen des Vektors pQE-31 (kursiv). Die Primersequenzen sind farbig unterlegt und die Schnittstellen zur Klonierung des Inserts sind fett gedruckt; * = Sequenz wird nicht translatiert.

3.4.2 Selektion von Expressionsklonen mittels Colony-Blot

Der sog. Colony-Blot ermöglicht eine rasche Identifikation von Klonen, die ein His-tag-Protein exprimieren. Bei dieser Prozedur wird ein Abdruck einer Agarplatte mit darauf wachsenden Kolonien von Transformanten auf einer Nitrocellulosemembran hergestellt. Direkt auf dieser Membran wird dann die heterologe Expression induziert. Anschließend werden die Zellen auf der Membran lysiert und die Proteine somit einer Western-Blot-ähnlichen Detektion zugänglich. In diesem Fall wird der His-tag als Antikörper-Epitop ausgenutzt und so ein eventuell vorhandenes heterolog exprimiertes Protein detektiert (vgl. Kapitel 2.4.1.1).

Nach verschiedenen Dot-Blot-Voruntersuchungen (vgl. Kapitel 2.4.3.3) mit den Lysaten von zur Expression induzierten Transformanten und Kontrollzellen wurde der „RGS·His™ Antibody“ aus dem „Anti-His Antibody Selector Kit“ (QIAGEN) als am geeignetsten für die Colony-Blots ausgewählt (siehe Kapitel 2.4.3.2), da mit diesem die stärksten Signale erzielt wurden. Die Colony-Blots wurden mit Transformanten und mit untransformierten M15-Zellen als Kontrolle durchgeführt. Die Ergebnisse sind exemplarisch in Abbildung 3-14 dargestellt.

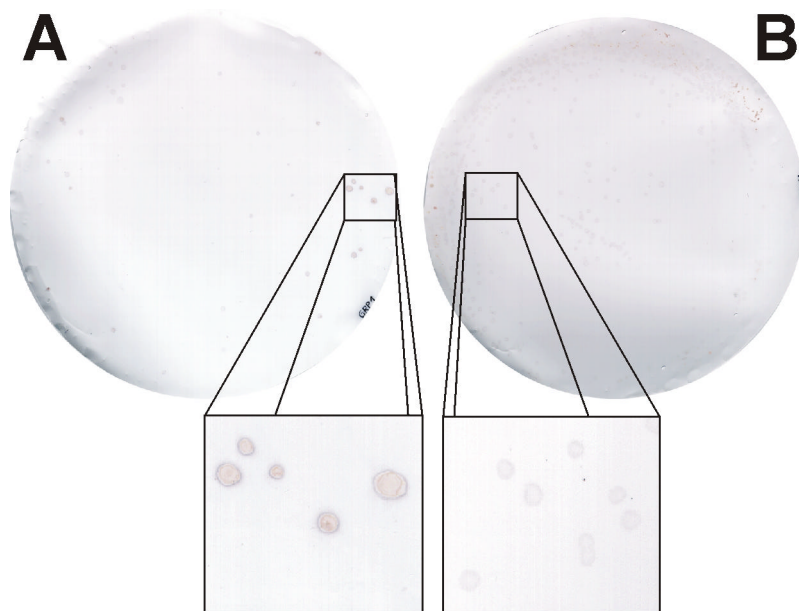


Abbildung 3-14: Ergebnisse des Colony-Blot

*A: Colony-Blot (Nitrocellulosemembran) von mit pQE-31:GRP1 transformierten M15-Zellen
B: Colony-Blot (Nitrocellulosemembran) von untransformierten E. coli-M15-Zellen
Antikörper: RGS·His™ Antibody; Substrat: NBT/BCIP; Die Kästen unten zeigen jeweils eine Ausschnittsvergrößerung der Nitrocellulosemembranen.*

Deutlich lassen sich bei den Transformanten die violetten Signale des Substrats NBT/BCIP erkennen, wohingegen bei den untransformierten Kontrollzellen nur eine schwache unspezifische Färbung zu erkennen ist. Kolonien, die besonders starke Farbsignale lieferten, wurden auf der Agarplatte identifiziert und für die weitere Verwendung zur heterologen Expression im größeren Maßstab eingesetzt.

3.4.3 Heterologe Expression von GRP1_{exp} und damit in Zusammenhang stehende Beobachtungen

3.4.3.1 Erste Versuche zur heterologen Expression

Die mittels Colony-Blot selektierten Bakterienklone wurden wie in Kapitel 2.4.1.2 beschrieben zur heterologen Expression in 50 ml-Kulturen eingesetzt. Die Bakterien wurden lysiert und die Proteine über Ni-NTA-Mini-Säulchen (QIAGEN) aufgereinigt (vgl. Kapitel 2.4.1.4). Dabei wurden Proben des geklärten Lysats (L), des Durchflusses (D), welcher alle Proteine enthält, die nicht an die Säule binden, des ersten Waschschruttes (W) und des Eluats (E) in einer SDS-PAGE analysiert. Abbildung 3-15 zeigt ein Beispiel eines solchen analytischen Gels. Zur Kontrolle wurden hier Proben aus analog behandelten untransformierten M15- Zellen mitaufgetragen.

Die Proben aus untransformierten Kontrollzellen und den transformierten *E. coli*- Zellen zeigen in der Silberfärbung ein identisches Bandenmuster. In dem für das heterolog exprimierte GRP1_{exp} zu erwartenden Größenbereich von ca. 13 kDa läßt sich auch im Eluat keine neue Bande erkennen. Als Aufreinigungspuffer wurde hier bereits anstelle von 8 M Harnstoff das stärker denaturierende Agens Guanidinhydrochlorid verwendet. Auch verschiedene Änderungen im Lysierungsprozeß (z.B. Inkubation mit Lysozym, zusätzliches Erhitzen oder Ultraschallbehandlung) beeinflussten nicht das Ergebnis: Im SDS-PAGE-Gel konnte in keinem der Ansätze eine neue Bande identifiziert werden (nicht dargestellt).

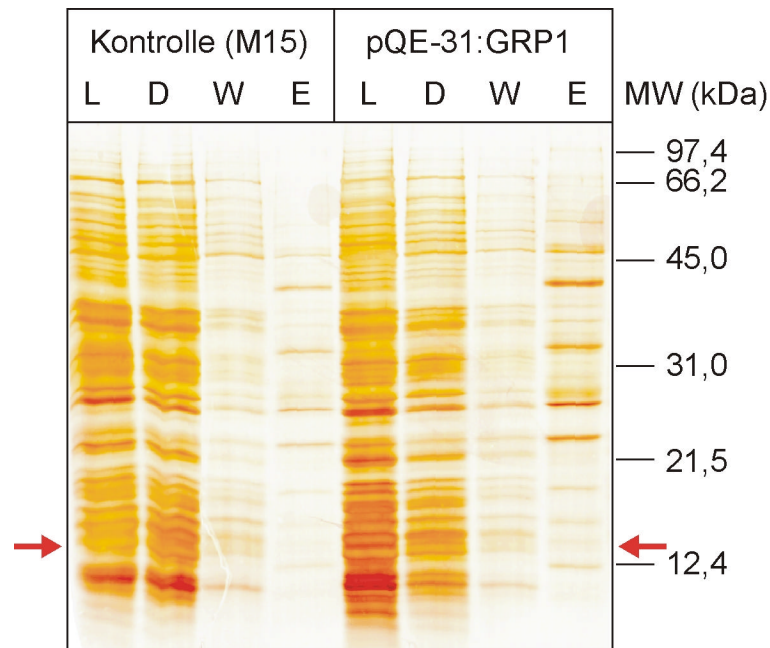


Abbildung 3-15: SDS-PAGE-Gel (Silberfärbung) der Proteinfraktionen der Aufreinigung über Ni-NTA-Säulchen (erste Expressionsversuche)

*Links: Proben von untransformierten *E. coli* M15-Zellen (Kontrolle);*

Rechts: Proben von mit dem pQE-31:GRP1-Konstrukt transformierten M15-Zellen;

L = geklärtes Lysat; D = Durchfluß durch die Säule; W = 1. Waschfraktion; E = Eluat;

Gel: 15%ig; Pfeile = erwarteter Größenbereich des heterolog exprimierten GRP1exp (ca. 13 kDa)

Da heterolog exprimierte Proteine in *E. coli* im Idealfall bis zu 80% des Gesamtproteins ausmachen können und bei einer parallel nach der selben Methode durchgeführten Expression eines Thaumatin-ähnlichen Proteins (TLP) deutlich eine neue Bande im Proteingel zu erkennen war (HANSELLE, pers. Mitteilung), wurde zunächst ein Fehler im Expressionskonstrukt vermutet. Um zu überprüfen, ob das Konstrukt überhaupt transkribiert wird, wurden Versuche zum Nachweis der GRP1exp-mRNA durchgeführt. Zusätzlich wurde der Wachstumsverlauf der Expressionskulturen untersucht und versucht, eventuell durch Silberfärbung nicht nachweisbare Mengen des heterolog exprimierten Proteins mit Hilfe von Antikörpern gegen den His-tag zu detektieren.

3.4.3.2 Nachweis des GRP1exp-Transkriptes

Zum Nachweis der Transkription des GRP1exp-Konstruktes wurden aus einer zur Expression induzierten Kultur von transformierten M15-Zellen und einer nicht-induzierten Kontrollkultur (V = 200 ml) halbstündlich Proben entnommen (vgl. Kapitel 2.4.1.3) und daraus die Gesamt-RNA isoliert (vgl. Kapitel 2.3.2.2). Entsprechend der für pflanzliche RNA angewandten Methodik wurden Northern-Untersuchungen

durchgeführt. Zum Nachweis der GRP1exp-mRNA wurde die aus dem cDNA-Klon INR20 hergestellte Sonde eingesetzt (vgl. Kapitel 3.3). Diese Sonde sollte zu dem zu erwartenden GRP1exp-Transkript auf eine Länge von über 300 bp eine 100%ige Homologie haben. Eine Kreuzreaktion der in der GRP1exp-mRNA nicht vorhandenen Randbereiche der Sonde aus INR20 mit der bakteriellen mRNA ist höchst unwahrscheinlich. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-16 dargestellt.

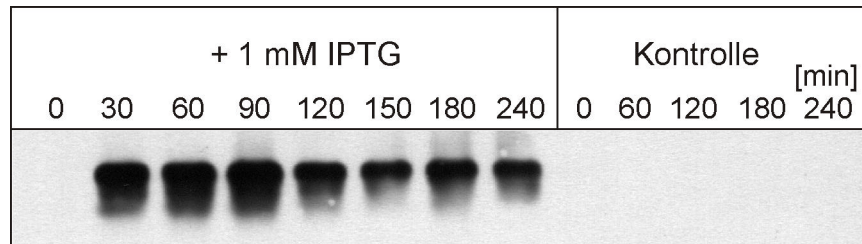


Abbildung 3-16: Northern-Untersuchung der Transkription des Expressionskonstruktes nach Induktion mit IPTG

1 µg RNA/Gelbahn; Nachweis: Digoxigenin-markierte antisense-RNA-Sonde INR20 (GRP1) + anti-DIG-AP; Substrat: CDP-StarTM; Die Kontrollkultur wurde nicht induziert.

Abbildung 3-16 zeigt eine eindeutige IPTG-bedingte Induktion der Transkription der GRP1exp-mRNA bereits nach 30 min. Ohne die Zugabe des Induktors scheint die Transkription des Expressionskonstruktes vollständig inhibiert zu sein. Auffallend sind die extrem starken Signale bei der induzierten Kultur. Der in Abbildung 3-16 dargestellte Röntgenfilm wurde für nur 5 s auf den Blot aufgelegt. Bei Northern-Analysen mit Pflanzenmaterial mußten die Röntgenfilme bei Einsatz der identischen Sonde teilweise 30 s bis hin zu mehreren Minuten aufgelegt werden, um eine vergleichbare Signalintensität zu erreichen. Zieht man außerdem in Betracht, das für Northern-Untersuchungen mit bakterieller RNA nur 1 µg Gesamt-RNA pro Gelbahn eingesetzt wurden (5-20 µg bei pflanzlicher RNA), läßt sich schlußfolgern, daß die Menge an produzierter GRP1exp-mRNA extrem groß sein muß, deutlich höher (Faktor >100) als die Menge an GRP-mRNA in infizierten Kichererbsen.

3.4.3.3 Wachstumsverlauf der Expressionskulturen

Das Wachstum von Expressionskulturen und Kontrollkulturen wurde nach der in Kapitel 2.4.1.3 beschriebenen Methode überwacht. Die Kulturen wurden zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase (nach 2 h Vorinkubation; OD ≈ 0,5) mit IPTG bzw.

mit einer entsprechenden Menge sterilem Wasser behandelt. Es ergaben sich die in Abbildung 3-17 dargestellten Wachstumskurven.

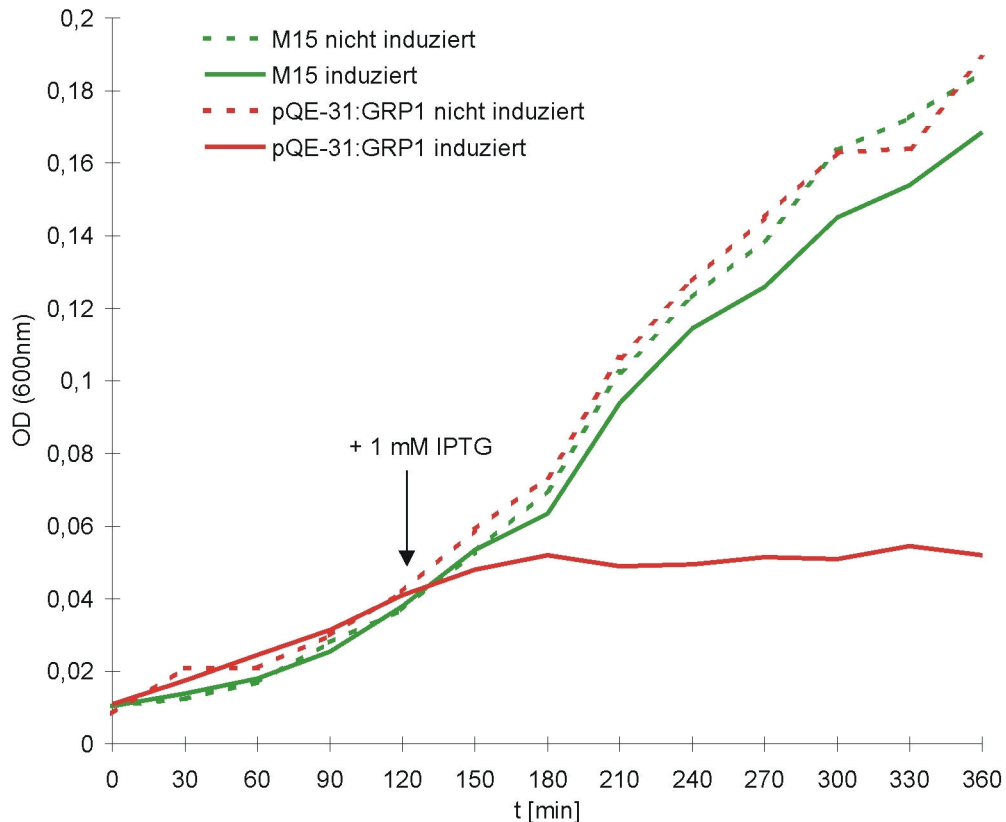


Abbildung 3-17: Wachstumsverlauf induzierter und nicht-induzierter Expressions- und Kontrollkulturen

Die Messungen erfolgten alle 30 min. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils zwei Messungen von je 4 Ansätzen.

Während die untransformierten Kontrollkulturen (mit und ohne Zugabe von IPTG) und die nicht-induzierte Expressionskultur ein nahezu identisches bakterientypisches Wachstum zeigen, ist bei der Expressionskultur nach Zugabe des Induktors IPTG eine rasche und vollständige Wachstumseinstellung zu erkennen. Auch 4 h nach Induktion der Expression ist die Zelldichte noch fast auf dem Niveau, zu dem sie bei Zugabe des Induktors war. In den anderen Kulturen hat sich in dieser Zeit die Zellzahl nahezu vervierfacht.

3.4.3.4 Nachweis des heterolog exprimierten Proteins

Um zu überprüfen, ob das GRP1exp-Protein in so kleinen Mengen gebildet wird, daß es über die Silberfärbung von SDS-PAGE-Gelen nicht zu detektieren ist, wurden Western-Blots mit den Proteinproben aus den verschiedenen Aufreinigungsschritten durchgeführt. Zum Nachweis des eventuell vorhandenen heterolog exprimierten Proteins wurde wie im Colony-Blot der „RGS·His™ Antibody“ gegen den His-Tag eingesetzt. Als Substrat zur Visualisierung diente diesmal nicht NBT/BCIP, sondern das sensitivere Chemilumineszenzsubstrat CDP-Star™. Die Ergebnisse sind exemplarisch in Abbildung 3-18 dargestellt. Es wurde zusätzlich versucht, das möglicherweise im Eluat vorhandene heterolog exprimierte GRP1exp anzukonzentrieren. Dazu wurden die Eluate mehrerer Aufreinigungsversuche vereinigt und durch ein Molekularsieb der Ausschlußgröße 50 kDa (Centricon™, MILLIPORE) zentrifugiert. Eine Probe des Filtrats wurde ebenfalls auf das Gel aufgetragen.

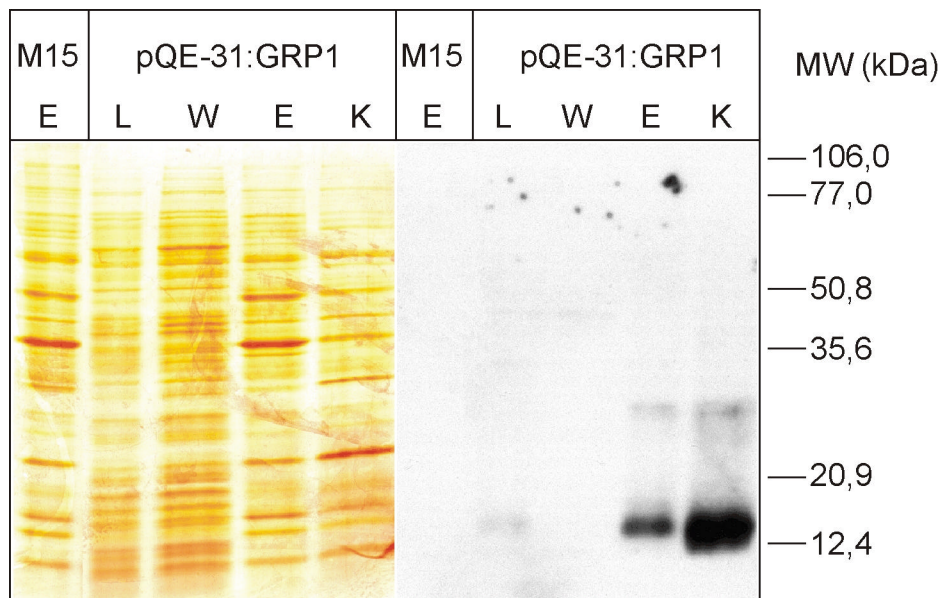


Abbildung 3-18: Nachweis des heterolog exprimierten GRP1exp mittels Western-Untersuchung der Proteinfraktionen der Aufreinigung über Ni-NTA-Säulchen

Links: SDS-PAGE-Gel (Silberfärbung)

Rechts: Röntgenfilm

M15 = Proben von nicht-transformierten Kontrollkulturen;

pQE-31:GRP1 = Proben von mit dem pQE-31:GRP1-Konstrukt transformierten M15-Zellen;

L = geklärtes Lysat; W = 1. Waschfraktion; E = Eluat; K = ankonzentriertes Eluat;

20 µg Protein/Gelbahn; Gel: 15%ig; Nachweis mit RGS·His™ Antikörper (QIAGEN)

Abbildung 3-18 zeigt im Eluat aus mit dem pQE-31:GRP1-Konstrukt transformierten Bakterienzellen ein deutliches Signal in dem für GRP1exp zu erwartenden Größen-

bereich (ca. 13 kDa). Ein schwaches Signal ist bereits im geklärten Lysat zu erkennen (vgl. auch Abbildung 3-19), wohingegen das Eluat aus ansonsten identisch behandelten untransformierten Kontrollkulturen keine Antikörperreaktion zeigt. Die Silberfärbung zeigt, daß die Größenfraktionierung über den Centricon-Filter nur bedingt erfolgreich war. Nur wenige höhermolekulare Proteine wurden abgetrennt. Trotzdem läßt sich bei gleicher aufgetragener Proteinmenge eine deutliche Intensivierung des Antikörpersignals im Röntgenfilm erkennen. Auch diesem verhältnismäßig starken Signal läßt sich keine Proteinbande im Gel zuordnen, die im Eluat aus dem Kontrollansatz nicht vorhanden wäre.

Vergleicht man die Signalintensität des heterolog exprimierten GRPs mit der eines nach der gleichen Methode mit einem His-tag versehenen und heterolog exprimierten Thaumtin-ähnlichen Proteins aus der Kichererbse (HANSELLE 2000), so wird die verhältnismäßig geringe Menge an exprimiertem GRP1exp deutlich. Abbildung 3-19 zeigt den Vergleich der Intensitäten der durch den RGS·HisTM Antikörper hervorgerufenen Signale in den geklärten Lysaten der beiden Expressionsansätze.

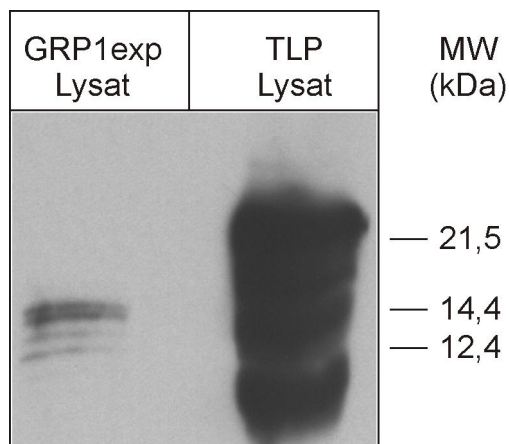


Abbildung 3-19: Vergleich der Signalintensitäten des RGS·HisTM Antikörpers bei GRP1exp und einem heterolog exprimierten TLP

20 µg Protein/Gelbahn; Nachweis mit RGS·HisTM Antikörper (QIAGEN)

Das Signal des heterolog exprimierten TLP ist bei gleicher aufgetragener Proteinmenge um mehrere Größenordnungen intensiver als das Signal in der Bahn des Lysats aus GRP1exp-exprimierenden Bakterien. Deutlich zu erkennen ist außerdem, daß sich bei beiden Ansätzen die Signale aus mehreren Banden zusammensetzen.

3.4.3.5 Detektion des exprimierten Proteins in unlöslichen Zellbruchstücken

Um zu überprüfen, ob eventuell exprimiertes GRP1exp-Protein in der Fraktion der unlöslichen Rückstände der Bakterienlyse zurückbleibt, wurden die mehrfach

extrahierten Zellbruchstücke mit einer Art *in situ*-Immunolokalisationsmethode auf silanisierten Objektträgern untersucht (vgl. Kapitel 2.5.2). Wiederum wurde hierbei der His-tag als Antikörperepitop ausgenutzt. Als Kontrolle dienten dabei untransformierte Zellen des Stammes M15. In Abbildung 3-20 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen exemplarisch dargestellt.

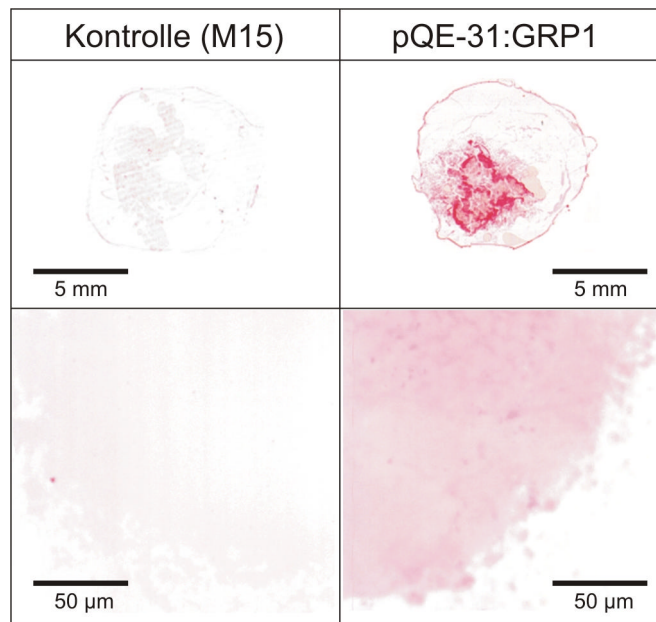


Abbildung 3-20: Detektion von GRP1exp in unlöslichen Rückständen der Bakterienlyse

*Oben: Übersicht über das Präparat; Unten: mikroskopische Ausschnittsvergrößerung;
Der Nachweis erfolgte mit dem RGS-His™ Antikörper, als Farbsubstrat diente SIGMAFAST™
Fast Red TR / Naphthol AS-MX.*

Deutlich zeigt sich eine intensive Färbung der unlöslichen Zellbestandteile aus den mit pQE-31:GRP1 transformierten und zur Expression induzierten Bakterienzellen. Die Zellbruchstücke von untransformierten Kontrollzellen hingegen zeigen nur eine schwache Reaktion auf den Antikörper. Demnach scheint bei der heterologen Expression und der nachfolgenden Aufreinigung eine erhebliche Menge an heterolog exprimiertem Protein in einer der Isolationsmethode nicht zugänglichen Form in den unlöslichen Bestandteilen der Bakterienzellen zurückzubleiben.

3.5 Immunologische Untersuchungen

3.5.1 Western-Analysen

Nach dem Auftreten der in Kapitel 3.4.3 beschriebenen Schwierigkeiten bei der Gewinnung des heterolog exprimierten GRP1_{exp} in für die Antikörperproduktion geeigneten Mengen wurde eine andere Methode gewählt, um einen Antikörper gegen die GRPs der Kichererbse zu erhalten. Dazu wurde ein dem repetitiven Glycin-reichen Hauptelement der GRPs entsprechendes 14 AS-Polypeptid synthetisiert (vgl. Kapitel 2.4.3.2), welches dann als Antigen eingesetzt wurde. Das Antiserum der so immunisierten Kaninchen wurde dann in Western-Analysen eingesetzt (vgl. Kapitel 2.4.3.1). Hierbei konnte das heterolog exprimierte GRP1_{exp} als Positivkontrolle dienen.

3.5.1.1 Voruntersuchungen

Vor dem Einsatz der Antiseren in Western-Untersuchungen von Proteinextrakten der Kichererbse wurden Dot-Blot-Voruntersuchungen durchgeführt. Diese Analysen sollten die Funktionalität und Spezifität der Antiseren aufzeigen. Auf die Dot-Blot-Membranen wurden neben unterschiedlichen Mengen des Antigens (synthetisches Polypeptid, das dem repetitiven Hauptmotiv der Kichererbsen-GRPs entspricht) auch Eluate aus Expressionsexperimenten (pQE-31:GRP1-Transformanten und M15-Kontrollzellen) und ein Rohextrakt aus Blättern unbehandelter Kichererbsenpflanzen aufgetropft. Zusätzlich wurden verschiedene Konzentrationen an BSA aufgetragen, um eventuelle Mengeneffekte auszuschließen. Abbildung 3-21 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse der Dot-Blot-Untersuchungen mit den verschiedenen Antikörpern in unterschiedlichen Konzentrationen. Um auszuschließen, daß eventuell vorhandene Signale auf eine Kreuzreaktion des sekundären Antikörpers zurückzuführen sind, wurde in einer Analyse ausschließlich der sekundäre Antikörper verwendet.

In Abbildung 3-21 ist zu erkennen, daß sowohl das Präimmunserum als auch der sekundäre Antikörper allein kaum Kreuzreaktionen mit den aufgetropften Proteinspezies zeigen. Lediglich der Rohextrakt aus Kichererbsenpflanzen zeigt nennenswerte Signale. Bereits die erste Serumprobe zeigt deutliche Reaktionen mit allen aufgetropften Antigenkonzentrationen, wobei starke Kreuzreaktionen mit dem Kichererbsenextrakt und den Eluatfraktionen aus der heterologen Expression auftreten. Diese Kreuzreaktionen sind bei den endgültigen Antiseren wesentlich schwächer

ausgeprägt. Das für die meisten weiteren Untersuchungen eingesetzte Antiserum aus Kaninchen 6 (Endziffer der internen Bezeichnung von EUROGENTEC, im weiteren als anti-GRP-RE 6 bezeichnet) zeigt eine deutliche Reaktion mit dem Eluat aus transformierten Expressionskulturen, wohingegen die Kreuzreaktion mit dem Eluat aus nicht-transformierten Kontrollkulturen und dem Rohextrakt aus Kichererbsenblättern nur noch relativ gering ist. BSA zeigt keine Reaktion mit den eingesetzten Antikörpern. Das anti-GRP-RE 6-Antiserum zeichnete sich demnach durch eine zufriedenstellende Spezifität und Sensitivität aus und konnte für die weiteren Arbeiten eingesetzt werden.

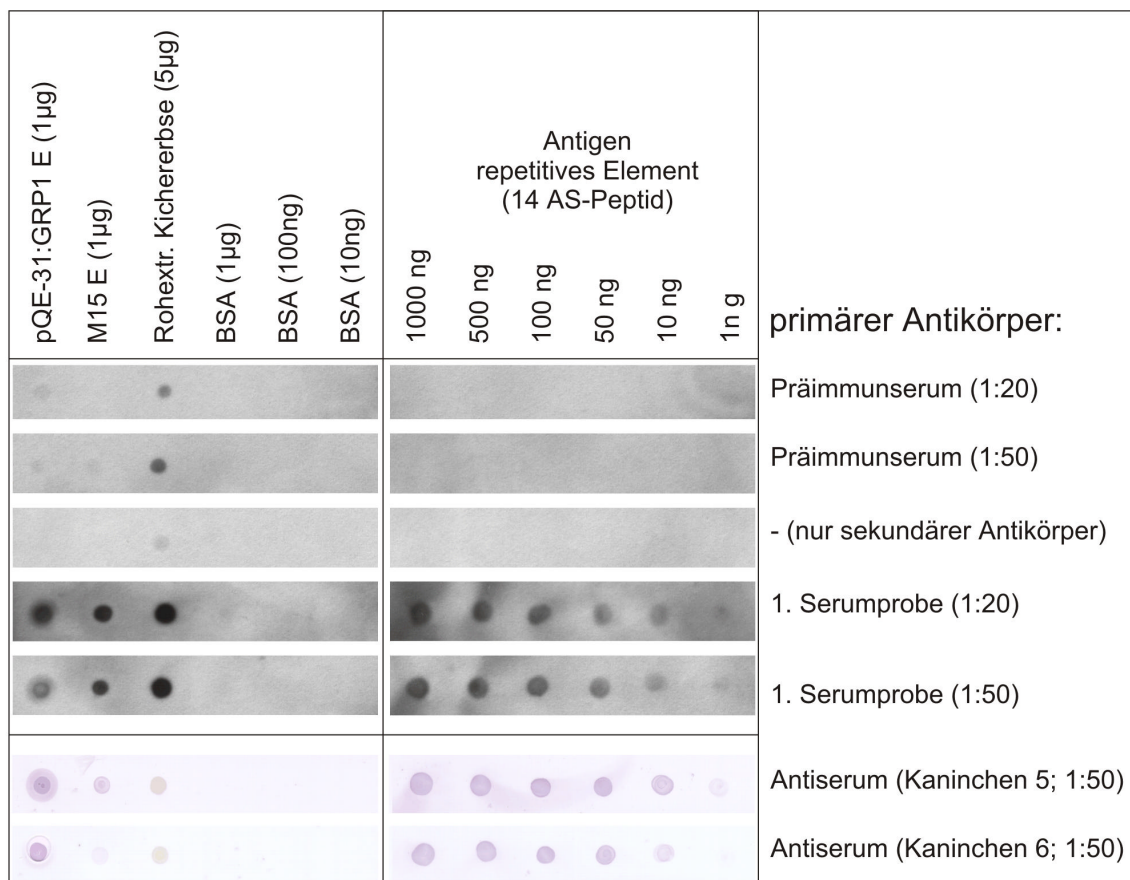


Abbildung 3-21: Dot-Blot-Voruntersuchungen mit den Antiseren gegen das repetitive Element

*Oben (Präimmunserum, sek. Antikörper, 1. Serumprobe): Nachweis mit CDP-Star[®] (Röntgenfilm)
Unten (Antiseren): Nachweis mit NBT/BCIP (Blot); Der Rohextrakt aus Kichererbsenblättern weist eine gewisse Eigenfärbung auf.*

3.5.1.2 Vergleich zwischen cytosolischen Proteinen und ionisch gebundenen Zellwandproteinen

Der Vergleich von löslichen cytosolischen Proteinen und ionisch gebundenen Zellwandproteinen mittels Western-Blots sollte Aufschluß darüber geben, ob die GRPs

aus der Kichererbse tatsächlich vom Cytosol in den Apoplasten abgegeben werden. Die Extraktion erfolgte nach der in Kapitel 2.4.2.2 beschriebenen Methode. Zunächst wurde die cytosolische Fraktion aus Blättern infizierter, verwundeter und unbehandelter Kontrollpflanzen untersucht. Neben den tatsächlich cytosolisch lokalisierten Proteinen enthalten diese Extrakte natürlich auch lösliche Proteine aus anderen Kompartimenten, z.B. den Chloroplasten. In Abbildung 3-22 ist ein Beispiel eines SDS-PAGE-Gels und des entsprechenden Blots wiedergegeben. Der Nachweis erfolgte mit dem „anti-GRP-RE 6“ Antiserum nach der in Kapitel 2.4.3.3 beschriebenen Methode.

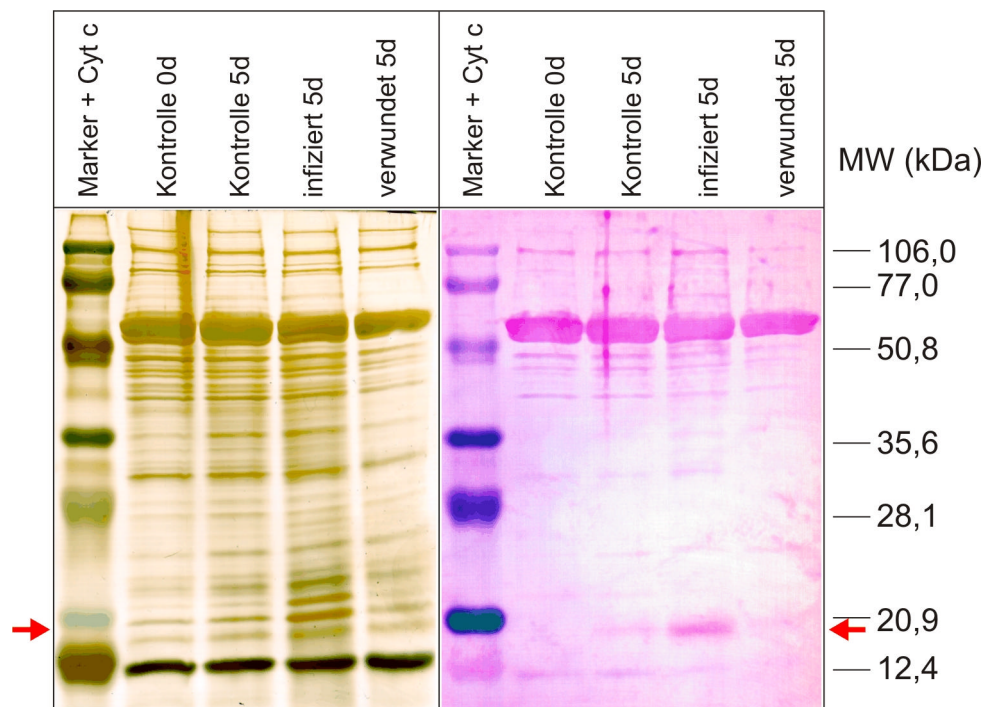


Abbildung 3-22: Western-Analyse der cytosolischen Fraktion aus Blättern infizierter und verwundeter Pflanzen

Links: SDS-PAGE-Gel (Silberfärbung); Rechts: Blot (Antikörperdetektion); 20 µg Protein/Gelbahn; Gel: 15%ig; Nachweis mit anti-GRP-RE 6-Antiserum; Substrat: NBT/BCIP; Pfeil: Position des Signals in der Bahn „infiziert 5d“

Deutlich zu erkennen ist ein Signal bei einem Molekulargewicht von knapp unterhalb 20 kDa in der Bahn mit löslichen Proteinen aus infizierten Pflanzen (5 dpi). Dieses Signal findet sich auch schwächer bei den verwundeten Pflanzen und den Kontrollpflanzen am 5. Tag nach der Wasserbehandlung. Am Tag der Kontrollbehandlung („Kontrolle 0d“) ist das Signal in der Fraktion cytosolischer Proteine nicht zu erkennen. Die starken Signale, die in allen Bahnen bei einer Größe von ca. 55 kDa auftreten, sind höchstwahrscheinlich auf eine unspezifische Bindung der Antikörper an die auch im

Gel deutlich zu erkennende große Untereinheit der Ribulosebisphosphat-Carboxylase/Oxygenase („RubisCO“) zurückzuführen, welche den mengenmäßig weitaus größten Anteil an löslichem Protein in Blättern ausmacht.

Dem oben beschriebenen Signal unterhalb einer Größe von 20 kDa lassen sich im Gel zwei Banden zuordnen, deren Intensität in ähnlichem Maße zunimmt (Pfeil in Abbildung 3-22). Welche dieser beiden Banden dem Signal entspricht, ist nicht mit Sicherheit zu bestimmen, aufgrund der eher diffusen Signalstruktur scheint aber die untere, im Gel olivfarben erscheinende Bande wahrscheinlicher. Auszuschließen ist wohl die über den beiden in Frage kommenden Banden liegende Bande, deren Intensität im Extrakt aus infizierten Pflanzen stark ansteigt.

Analog zur oben beschriebenen Vorgehensweise wurden die salzextrahierten Fraktionen ionisch gebundener Zellwandproteine untersucht. Abbildung 3-23 zeigt exemplarisch ein Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel und den entsprechenden Western-Blot mit den Extrakten aus infizierten und verwundeten Blättern im Vergleich mit wasserbehandelten Kontrollpflanzen.

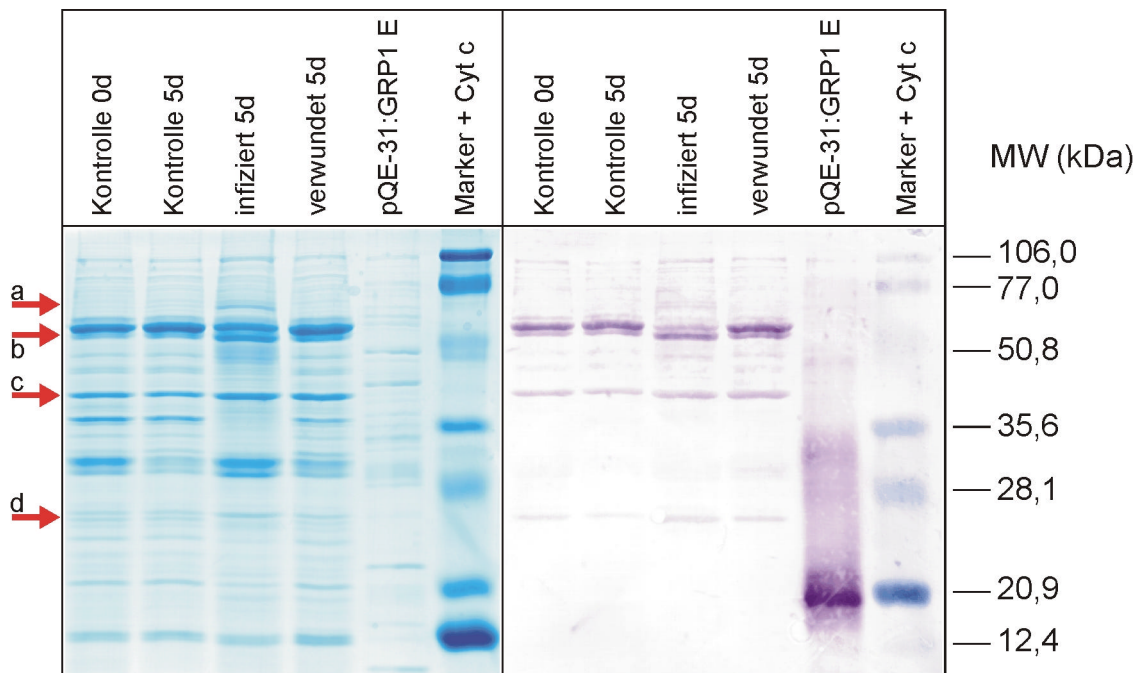


Abbildung 3-23: Western-Analyse der Fraktion ionisch gebundener Zellwandproteine aus Blättern infizierter und verwundeter Pflanzen

Links: SDS-PAGE-Gel (Coomassie-Färbung); Rechts: Blot (Antikörperdetektion); 20 µg Protein/Gelbahn; Gel: 15%ig; Nachweis mit anti-GRP-RE 6-Antiserum; Substrat: NBT/BCIP; Positivkontrolle (pQE31:GRP1 E): heterolog exprimiertes GRP1exp (Eluat aus Guanidin-HCl-Aufreinigung, 5 µg Protein); Pfeile: Position der Signale im Blot

Im gefärbten Gel fällt zunächst auf, daß trotz mehrfacher HEPES-Extraktion (vgl. Kapitel 2.4.2.2) noch immer gewisse Mengen der 55 kDa-Untereinheit der RubisCO im Zellwandextrakt vorhanden sind, welcher daher nicht als frei von cytosolischen Proteinen angesehen werden kann. Durch eine Erhöhung der Anzahl der HEPES-Extraktionsschritte konnte diese „Kontamination“ in späteren Experimenten weiter minimiert werden (nicht dargestellt). Deutlich zu erkennen ist das starke Signal des hier als Positivkontrolle verwendeten heterolog exprimierten GRP1exp unterhalb von 20 kDa, was einen weiteren Hinweis auf die Spezifität und Qualität des Antiserums gibt.

Neben der Kreuzreaktion mit der RubisCO-Bande fallen vier weitere Antikörpersignale in den Zellwandextrakten auf: Eine Signalbande bei ca. 26 kDa (d in Abbildung 3-23) und eine Bande bei etwa 40 kDa (c), die in allen Extrakten vorhanden sind, in den Extrakten aus Blättern infizierter und verwundeter Pflanzen jedoch leicht intensiver erscheinen. Auffällig ist auch eine ebenfalls in allen Extrakten vorhandene Bande (b) direkt unter der mutmaßlichen RubisCO-Bande (ca. 55 kDa), die auch schon in den cytosolischen Extrakten zu erkennen war. Die Signalintensität dieser Bande nimmt in den Extrakten aus infizierten Pflanzen stark zu, wohingegen die RubisCO-Kreuzreaktion schwächer erscheint. Diese zuerst für ein Artefakt des Gellaufs gehaltene Beobachtung wurde in mehreren unabhängigen Western-Analysen mit unterschiedlichen Kinetiken bestätigt (nicht dargestellt). Im Extrakt aus Blättern infizierter Pflanzen zeigt sich außerdem eine schwache Reaktion mit dem eingesetzten Antiserum bei ca. 70 kDa (a). Dieses Signal korreliert mit einer Bande, die im Gel ausschließlich in diesem Extrakt zu erkennen ist.

3.5.1.3 Vergleich der Proteinextrakte aus unterschiedlichen Organen der Kichererbse

Um Hinweise darauf zu erhalten, ob GRPs in allen Pflanzenteilen gleichermaßen exprimiert werden oder ob sie spezifisch in bestimmten Organen gebildet werden, wurden neben den oben beschriebene Untersuchungen an Proteinextrakten aus Blättern vergleichende Western-Analysen mit cytosolischen Extrakten aus Stengeln und Wurzeln durchgeführt. Eine Analyse von Zellwandextrakten war aufgrund zu geringer Proteinausbeuten und begrenztem Ausgangsmaterial nicht möglich. Die Ergebnisse der Untersuchung der Fraktion löslicher Proteine sind in Abbildung 3-24 dargestellt.

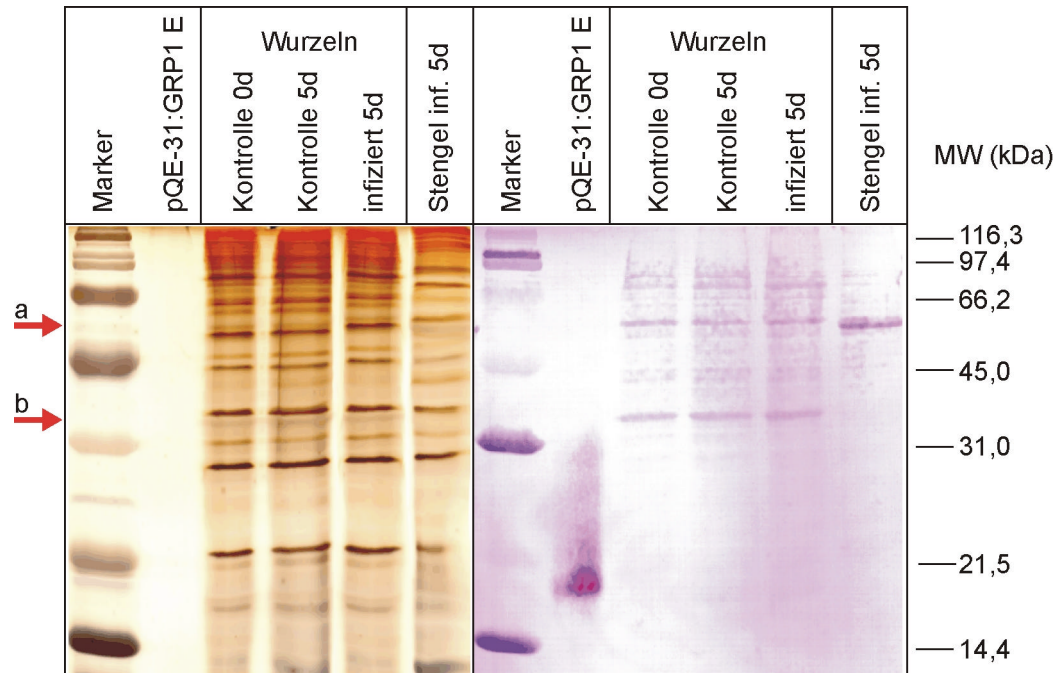


Abbildung 3-24: Western-Analyse der Fraktion löslicher cytosolischer Proteine aus Wurzeln und Stengeln infizierter Kichererbsen

Links: SDS-PAGE-Gel (Silberfärbung); Rechts: Blot (Antikörperdetektion); 20 μ g Protein/Gelbahn; Gel: 15%ig; Nachweis mit anti-GRP-RE 6-Antiserum; Substrat: NBT/BCIP; Positivkontrolle (pQE31:GRP1 E): heterolog exprimiertes GRP1exp (Eluat aus GuHCl-Aufreinigung, 1 μ g Protein); Pfeile: Position der Signale im Blot

Obwohl in der Silberfärbung bei einer aufgetragenen Proteinmenge von ca. 1 μ g Protein in der Bahn der Positivkontrolle keine Banden angefärbt werden können, zeigt sich dennoch ein deutliches Antikörpersignal im Blot, welches dem heterolog exprimierten GRP1exp entspricht. Der cytosolische Extrakt aus Stengeln weist lediglich ein Signal bei ca. 55 kDa auf, welches wie in Blättern auf eine Kreuzreaktion mit der großen RubisCO-Untereinheit zurückzuführen sein könnte. In Extrakten aus Wurzeln zeigen sich zwei deutlich mit dem Antikörper reagierende Banden bei ca. 60 kDa (a in Abbildung 3-24) und bei etwa 36 kDa (b) sowie einige schwächere Signale in höheren Molekulargewichtsbereichen. Die Intensität der Signale wird vom Infektionszustand der Pflanzen nicht beeinflusst. Es bietet sich also ein deutlich anderes Bild als in Extrakten aus Blättern: Die in Blattextrakten detektierbare Bande unterhalb von 20 kDa (vgl. Abbildung 3-22) ist in Wurzeln nicht nachweisbar, es lassen sich jedoch mehrere Proteine detektieren, bei denen es sich aufgrund ihrer Größe und ihrer konstanten Signalintensität wahrscheinlich nicht um die hier untersuchten GRPs (d.h. GRP1 oder GRP2) handelt.

3.5.2 Versuche zur *in vitro*-Quervernetzung

Zur Überprüfung der Hypothese, daß die GRPs der Kichererbse peroxidativ quervernetzt werden können (vgl. Kapitel 1.4.2.4), wurden *in vitro*-Untersuchungen durchgeführt, bei denen versucht wurde, das zumindest über Antikörper nachweisbare heterolog exprimierte GRP1exp durch exogene Applikation von Meerrettichperoxidase und Wasserstoffperoxid zu polymerisieren. Das Resultat wurde mittels SDS-PAGE und Western-Blot überprüft. Abbildung 3-25 zeigt die Ergebnisse eines Versuchsansatzes.

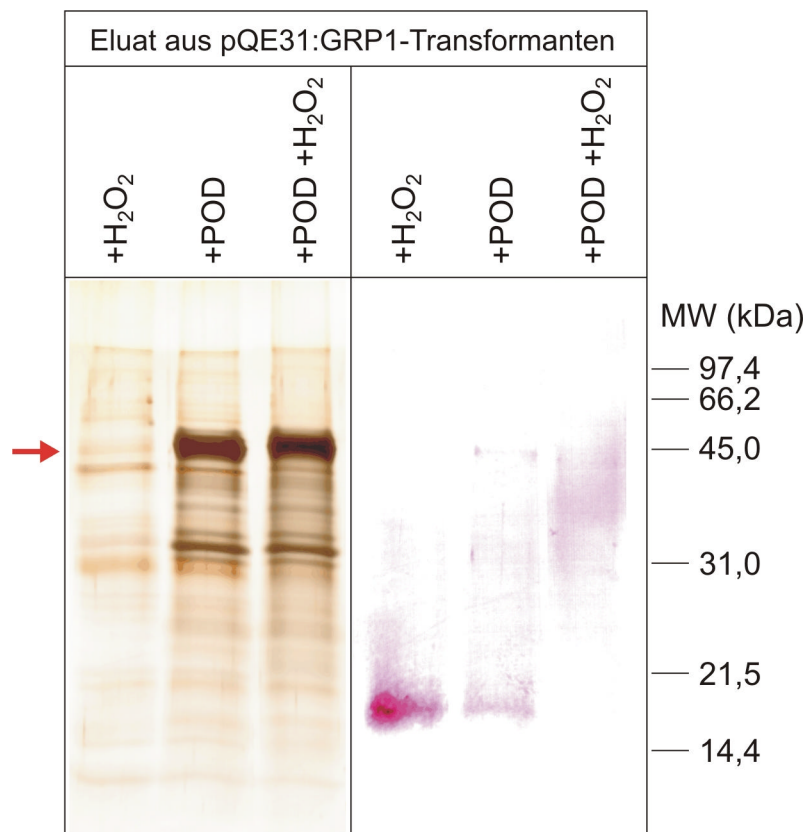


Abbildung 3-25: Versuch des Nachweises der *in vitro*-Quervernetzung des heterolog exprimierten GRP1exp

Links: SDS-PAGE-Gel (Silberfärbung); Rechts: Blot (Antikörperdetektion); Eingesetzt wurde das entsalzte Eluat aus Aufreinigungsversuchen mit pQE-31:GRP1 transformierten Bakterienzellen (enthält GRP1exp); POD = Meerrettichperoxidase; 10 µg Protein/Gelbahn; Gel: 15%ig; Nachweis mit anti-GRP-RE 6-Antiserum; Substrat: NBT/BCIP; Der Pfeil kennzeichnet die Bande der POD im Gel (MW »44 kDa); Es wurden 10 mM Wasserstoffperoxid und/oder 1U Peroxidase zugesetzt.

Im Gel ist deutlich die Hauptbande der Peroxidase bei ca. 44 kDa zu erkennen (Pfeil in Abbildung 3-25). Die ausschließliche Zugabe von Wasserstoffperoxid zeigt keinen Effekt auf die Bande des heterolog exprimierten GRP (~16 kDa) im Western-Blot. Auch bei Zugabe von Peroxidase ist die Bande noch klar zu erkennen. Bei gemeinsamer

Applikation von Peroxidase und H_2O_2 verschwindet die Bande jedoch vollständig. Es erscheint ein mit dem Antikörper reagierender diffuser „Schmier“ mit einem Zentrum bei einem Molekulargewicht von etwa 35 kDa. Diese Ergebnisse konnten qualitativ reproduziert werden.

3.5.3 Tissue-Blots

Zur Lokalisation der GRPs auf histologischer Ebene wurden Gewebeabdrücke („tissue-blots“) nach der in Kapitel 2.5.3 beschriebenen Methode angefertigt. Da für diese Methode eine gewisse mechanische Stabilität des Pflanzenmaterials notwendig ist, wurden nur Abdrücke von Stengel- und Wurzelsegmenten angefertigt, wobei Stengelmaterial zu weitaus besseren Ergebnisse führte. Querschnitte von Fiederblättchen lieferten auch nach Zuhilfenahme von Styropor und Holundermark zum Schneiden keine verwertbaren Abdrücke. Ein Teil der so angefertigten Blots wurde mit Coomassie gefärbt (vgl. Kapitel 2.4.3.4), der Rest zur Immunodetektion eingesetzt. Um auszuschließen, daß eventuell vorhandene Signale auf eine Kreuzreaktion des sekundären Antikörpers zurückzuführen sind, wurde in einer Analyse wiederum ausschließlich der sekundäre Antikörper verwendet. Für den eigentlichen Nachweis wurde das anti-GRP-RE 6-Antiserum eingesetzt. Abbildung 3-26 zeigt an ausgewählten Beispielen die Ergebnisse der Tissue-Blots von Stengeln und Wurzeln, wobei die zur Immunodetektion eingesetzten Blots nicht den dargestellten mit Coomassie gefärbten Abdrücken entsprechen.

Tissue-Blot-Analysen, bei denen nur der sekundäre Antikörper eingesetzt wurde, zeigten bei Stengeln und Wurzeln eine leichte Kreuzreaktion, deren Verteilung in etwa der aus der Coomassie-Färbung ersichtlichen Proteinverteilung entsprach (nicht dargestellt). Im Vergleich mit den in Abbildung 3-26 dargestellten Blots waren die Signale aber deutlich schwächer.

Die Abbildung zeigt, das sich in der Coomassie-Färbung zumindest im Abdruck des Stengels relativ deutlich einzelne Gewebe unterscheiden lassen. Man erkennt die Epidermis, parenchymatisches Gewebe und die Leitbündel mit Xylem, Phloem und Kambiumring. In der Wurzel ist lediglich der Zentralzylinder mit den dort befindlichen Leitbündeln als proteinreicher und daher intensiver gefärbter Bereich zu erkennen.

Untersuchungen mit dem anti-GRP-RE 6-Antiserum zeigen im Stengel eine Anfärbung der dem Leitgewebering entsprechenden Bereiche. Dies zeigte sich in den Untersuchungen in unterschiedlicher Ausprägung, war jedoch qualitativ reproduzierbar. Ein tendentieller quantitativer Unterschied zwischen den einzelnen Kultivaren und Infektionszuständen war nicht zu erkennen (nicht dargestellt). Wurzelabdrücke zeigen eine relativ homogene Signalverteilung mit einer leichten Intensivierung in den äußeren Gewebebereichen und im Zentralzylinder. Unterschiede zwischen den Pflanzenkultivaren und infizierten bzw. Kontrollpflanzen waren auch hier nicht zu erkennen.

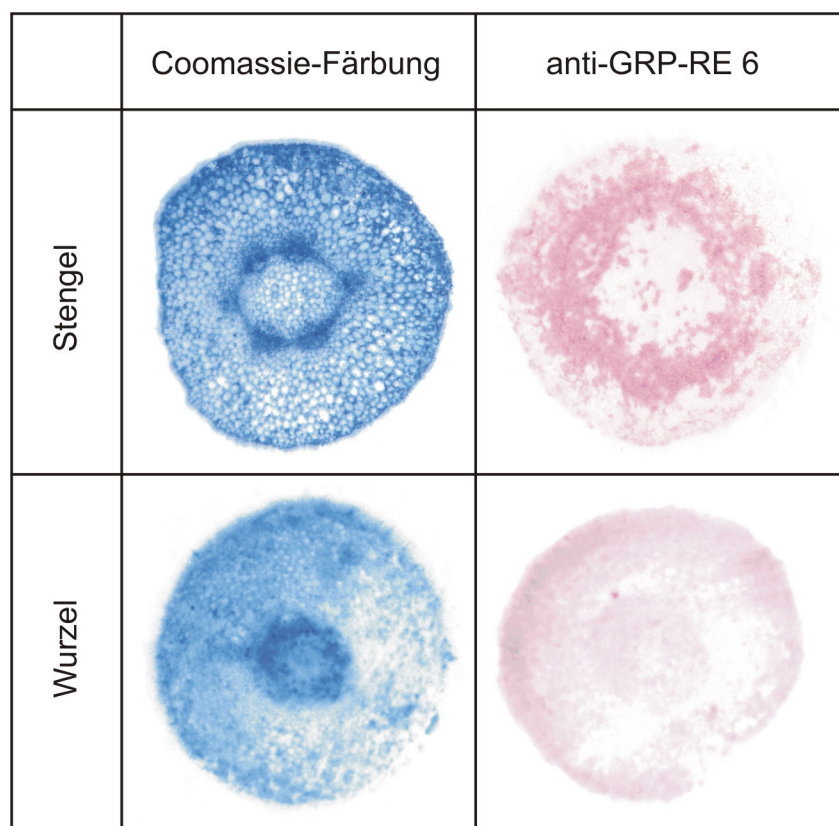


Abbildung 3-26: Tissue-Blots mit Stengel- und Wurzelsegmenten der Kichererbse

Dargestellt sind Beispiele von infizierten Pflanzen des Kultivars ILC3279 (5 dpi). Die gefärbten Abdrücke entsprechen nicht den für die Antikörperdetektion eingesetzten Tissue-Blots. Die Visualisierung erfolgte mit NBT/BCIP.

Auffällig war, daß bei einigen Untersuchungen von Stengelabdrücken das Signal hauptsächlich auf das Xylem und den Bereich der sklerenchymatischen Bündelscheide beschränkt war. Das Phloem und/oder der meristematische Kambiumbereich zeigten kein oder ein deutlich schwächeres Signal. Abbildung 3-27 zeigt ein Beispiel dieses

Sachverhaltes im Vergleich mit einem mikroskopischen Präparat eines entsprechenden Bereiches. GRPs werden demnach - die Spezifität der Nachweisreaktion vorausgesetzt - zumindest in Stengeln hauptsächlich in den lignifizierten Teilen der Leitbündel exprimiert.

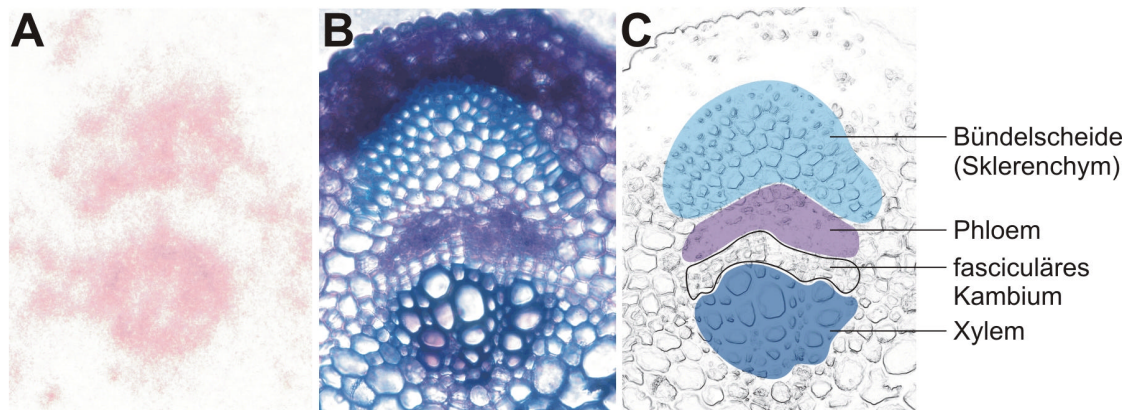


Abbildung 3-27: Tissue-Blot eines Leitbündels im Stengel im Vergleich mit einem mikroskopischen Präparat eines entsprechenden Bereichs

*Dargestellt sind Beispiele von infizierten Pflanzen des Kultivars ILC3279 (5 dpi).
 A: Tissue-Blot (Nachweis mit anti-GRP-RE 6-Antiserum; Farbsubstrat NBT/BCIP)
 B: Querschnitt durch ein Leitbündel (Färbung mit Toluidinblau)
 C: Schema des Querschnitts aus B mit Bezeichnung der Gewebe*

4 Diskussion

4.1 Sequenzanalysen

4.1.1 Untersuchungen zur Vollständigkeit der Sequenz von GRP1

Die in Kapitel 3.1.1 dargestellten Ergebnisse des computerunterstützten Vergleichs der Kichererbsen-GRPs mit Glycin-reichen Proteinen aus Datenbanken zeigen, daß es sich bei der Sequenz von GRP1 höchstwahrscheinlich nicht um den vollständigen Leserahmen des Proteins handelt. Dies war ursprünglich aufgrund eines früheren Vergleiches mit dem als vollständig veröffentlichten Protein MFSTRESS (LUO et al. 1991) aus *Medicago sativa* ssp. *falcata* (früher: *Medicago falcata*) angenommen worden (CORNELS 1998; CORNELS et al. 2000). Besonders im N-terminalen Bereich zeigten sich hierbei hohe Homologien zwischen den beiden Proteinen (vgl. Abbildung 3-1 A). Zwar wurden schon in der Diplomarbeit gewisse Strukturähnlichkeiten mit längeren Signalpeptiden festgestellt (CORNELS 1998), es wurde allerdings nicht erkannt, daß das Start-Methionin falsch gewählt wurde. Bei Vergleich mit dem heute im wesentlich größeren Umfang zu Verfügung stehenden Datenmaterial wird die damalige Fehleinschätzung ersichtlich (vgl. Abbildung 3-1 B). Auch die heute deutlich verbesserte Software zur Darstellung von Sequenzvergleichen trug zu dieser Erkenntnis bei. Es drängt sich die Frage auf, inwieweit das als Vergleich herangezogene Protein MFSTRESS tatsächlich vollständig ist. Der EMBL-Datenbankeintrag für dieses Protein (Zugangsnummer X59930) zeigt, daß die Nukleinsäuresequenz, aus der das Protein ursprünglich abgeleitet wurde („Klon pSM2075“), in 5'-Richtung vor dem angenommenen offenen Leserahmen nur noch zwei weitere Nukleotide enthält. Diese Tatsache und der Vergleich des N-Terminus der Sequenz aus *Medicago falcata* mit den GRPs aus anderen Fabaceen (vgl. Abbildung 3-1 B), besonders mit dem Protein CORA (Synonym: *MsACIA*) aus *Medicago sativa* (LABERGE et al. 1993), legen die Vermutung nahe, daß es sich bei MFSTRESS tatsächlich um ein nicht vollständiges Protein handeln könnte. Dieses wäre insofern „brisant“, da MFSTRESS nicht nur für den Vergleich mit den Kichererbsen-GRPs herangezogen wurde, sondern auch SACHETTO-MARTINS et al. (2000) von diesem vermeintlichen GRP ohne Signalpeptid einen der acht Typen von

pflanzlichen GRPs herleiten (Bezeichnung des Proteins in diesem Artikel: *MsGRP-1*; vgl. auch Abbildung 1-5, Typ 3). Besäße MFSTRESS doch ein Signalpeptid, wäre das Protein mit hoher Wahrscheinlichkeit den Typ 2-GRPs zuzuordnen.

Der Sequenzvergleich in Abbildung 3-1 B zeigt außerdem, daß mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden kann, daß dem Leserahmen von GRP1 nur drei Aminosäuren zur Vollständigkeit fehlen. Nach dem Start-Methionin sind dies vermutlich Asparaginsäure und Serin, da diese Aminosäuren auch in den anderen dargestellten GRP-Sequenzen aus Fabaceen konserviert sind. Versuche zur Vervollständigung von GRP2 mittels PCR orientierten sich an der vorhandenen, vom cDNA-Klon INR20 abgeleiteten Sequenz von GRP1. Möglicherweise wäre eine Ableitung von degenerierten Primern gegen den vermuteten N-Terminus erfolgversprechender (vgl. Kapitel 4.2).

4.1.2 Zielsteuerung der GRPs: Vakuole oder Apoplast?

Die in Abbildung 3-3 dargestellten Ergebnisse des Programms „SignalP“ zur Vorhersage eines Signalpeptids in der Sequenz von GRP1 lassen den relativ eindeutigen Schluß zu, daß das Protein eine N-terminale Signalsequenz von Aminosäure 1 bis 25 besitzt. Eine Abspaltung dieses Signalpeptids nach der Aminosäure Alanin an Position 25 durch eine spezifische Protease (Signalpeptidase) ist sehr wahrscheinlich. Diese Lokalisation einer möglichen Schnittstelle wird durch die Tatsache unterstützt, daß das o.g. Alanin in den N-Termini von GRPs mit Homologien zu den Kichererbsen-GRPs hochgradig konserviert ist (vgl. hierzu Abbildung 3-1). Auch die dem Alanin vorausgehenden Aminosäuren, die vermutlich ebenfalls zur Spezifität einer Erkennung durch eine Endoprotease während der Prozessierung von GRP1 beitragen, sind zu einem gewissen Grade konserviert.

Nach Ergebnissen des Programms „TMPred“, welches auf Grundlage von Hydropathiewerten eine Vorhersage über Transmembranhelices innerhalb einer Sequenz berechnet, bildet der größte Teil des Signalpeptids von GRP1 (AS 6-25) eine membrandurchspannende Region. Dies deckt sich mit der heutigen Vorstellung von der Prozessierung von Proteinen, die über das endoplasmatische Retikulum dem vesikulären Transport- und Sekretionsweg zugeführt werden. Die Abspaltung der Signalsequenz erfolgt demnach nach der Synthese des Proteins durch eine

Signalpeptidase im Lumen des ER (ALBERTS et al. 1990). Die komplette Sequenz von GRP1 stellt somit ein Präprotein dar, das reife Protein beginnt an Aminosäureposition 26.

Als wahrscheinlichsten Zielort für GRP1 gibt das Programm „PSORT“ die Vakuole an, erst an zweiter Stelle folgt mit etwas geringerer Wahrscheinlichkeit die Sekretion in den Apoplasten, wie man sie für ein Strukturprotein der Zellwand fordern würde (vgl. Kapitel 3.1.2). Dies kann als erster Hinweis darauf ausgelegt werden, daß GRP1 möglicherweise nicht in der Zellwand lokalisiert ist. Allerdings beruht die Vorhersage der Wahrscheinlichkeit, mit der die Vakuole als Zielort für ein Protein in Frage kommt, hauptsächlich auf der Aminosäurezusammensetzung und der damit verbundenen physikalischen und biochemischen Eigenschaften des reifen Proteins. Die repetitive Struktur und der hohe Glycinanteil des reifen GRP1 könnten sich daher verfälschend auf dieses Teilergebnis ausgewirkt haben. Insgesamt liegt die Erfolgsquote des Programms bei der Vorhersage der Lokalisation bekannter Proteine je nach Organismus bei ca. 60-80%. Nähere Informationen über diese Untersuchungen und die Berechnung der Wahrscheinlichkeiten finden sich in der Dokumentation des Programms „PSORT“ (<http://psort.nibb.ac.jp/helpwww.html>). Ähnliche Signalpeptide für die Sekretion und die vakuoläre Speicherung von Proteinen kommen vor. In solchen Fällen wird der letztendliche Zielort oft über C-terminale Sequenzabschnitte mit Signalfunktion bestimmt. Der C-Terminus von GRP1 weist lediglich eine Signalwahrscheinlichkeit von ca. 20% auf (Programm „SignalP“, s.o.; Ergebnisse nicht dargestellt), so daß eine Aussage über eine mögliche Relevanz dieses Sequenzabschnittes bei der Zielsteuerung schwierig ist. Obwohl viele Faktoren (Signalpeptid, Sequenzhomologie u.a.) für eine Lokalisation des reifen GRP1 im Apoplasten sprechen, sollte die Möglichkeit einer vakuolären Speicherung der Proteine nicht ausgeschlossen werden, besonders im Hinblick auf eine mögliche antimikrobielle Wirkung der GRPs (vgl. Kapitel 4.4.2).

4.1.3 Verwandtschaftliche Beziehungen der GRPs

Insgesamt sind die Homologien Glycin-reicher Proteine untereinander vergleichsweise gering (SHOWALTER 1993; CASSAB und VARNER 1998; SACHETTO-MARTINS et al. 2000). Ihre Ähnlichkeit spiegelt sich eher in ihrer Gesamtstruktur, z.B. dem Aufbau aus repetitiven Elementen wider, auf Sequenzebene finden sich teilweise große Unter-

schiede. Trotzdem läßt der in Abbildung 3-5 dargestellte phylogenetische Vergleich ausgewählter GRPs zumindest einige verwandtschaftliche Beziehungen erahnen, die sich mit den realen taxonomischen Stellungen der entsprechenden Pflanzen decken. Der dargestellte Vergleich wird in geringem Maße durch einige GRPs verfälscht, die nur aufgrund des über sie verfügbaren Datenmaterials und nicht wegen hoher Homologien zu den Kichererbsen-GRPs in die Untersuchung miteinbezogen wurden (GRP1 aus *Petunia hybrida* und GRP1.0/GRP1.8 aus *Phaseolus vulgaris*). Es zeigt sich, daß diese GRPs besonders im Vergleich der kompletten Sequenzen relativ isoliert stehen. Es läßt sich jedoch erkennen, daß die GRPs aus der Kichererbse, der Erbse und den *Medicago*-Arten einen zusammenhängenden „Block“ im Stammbaum der Sequenzen bilden, der auf eine relativ hohe Ähnlichkeit dieser GRPs untereinander hindeutet. Die Gattungen *Cicer*, *Pisum* und *Medicago* stehen als Mitglieder der Familie der Fabaceen auch taxonomisch in einer engen verwandtschaftlichen Beziehung zueinander. Erstaunlich ist, daß sich diese verwandtschaftliche Stellung der Fabaceen nicht nur beim Vergleich der Gesamtsequenzen zeigt, sondern auch in den separaten Stammbäumen der N-Termini (Abbildung 3-5 B) und der repetitiven Sequenzabschnitte (Abbildung 3-5 C) erkennbar ist. Dies läßt die Vermutung zu, daß sich möglicherweise sowohl in den Signalpeptiden, als auch in den repetitiven Glycin-reichen Sequenzbereichen für Fabaceen typische Strukturen erhalten haben. Eine Ausnahme bilden hierbei die Sequenzen aus *Phaseolus vulgaris*, die nur moderate Homologien zu den anderen GRPs aus Fabaceen aufweisen. Aufgrund der oben erwähnten geringen Gesamthomologien und der Unvollständigkeit der dargestellten Stammbäume ist eine Aussage über die verwandtschaftliche Beziehung der Fabaceen-GRPs zu den Glycin-reichen Proteinen anderer Pflanzen schwierig. Eine gewisse Verwandtschaft scheint aber zu den Proteinen GRP9 aus *Daucus carota* (ALEITH und RICHTER 1990) und GRPHC1 aus *Chenopodium rubrum* (KALDENHOFF und RICHTER 1989) zu bestehen, da diese in allen Stammbäumen eine Gruppe mit dem Block der Gattungen *Cicer*, *Pisum* und *Medicago* bilden.

4.2 Versuche zur Amplifizierung des 5'-Endes der Nukleotidsequenz von GRP2

Die Versuche, den zum „full-length“-Klon fehlenden Bereich am 5'-Ende der Sequenz von GRP2 (repräsentiert durch die cDNA-Klone INR23 und INR51) mittels der Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu amplifizieren, führten trotz zahlreicher Variationen bei den Reaktionsbedingungen nicht zu den gewünschten Resultaten. Hierfür sind zwei Erklärungen denkbar: Die Versuche gingen von der Prämisse aus, daß die N-Termini von GRP1 und GRP2 und damit auch die entsprechenden 5'-Enden der Nukleinsäuresequenzen einander sehr ähnlich sind. Sollte diese Vorüberlegung falsch sein oder die Konservierung der Sequenz auf Nukleinsäureebene nicht hoch genug sein, wäre eine Amplifizierung des gewünschten Sequenzabschnittes mit den gewählten Primern nicht möglich. Der Einsatz eines aus der N-terminalen Aminosäuresequenz von GRP1 abgeleiteten degenerierten Primers in Kombination mit der Amplifizierung in einem Temperaturgradienten-PCR-Cycler wäre eine Möglichkeit, die fehlende Sequenzinformation doch noch zu erhalten. Eine zweite denkbare Fehlerquelle ist die möglicherweise unzureichende Qualität der eingesetzten „template“ (Ausgangs-) DNA. Die von Y. ICHINOSE hergestellten cDNA-Banken aus infizierten Pflanzen enthielten schon zum Zeitpunkt des cDNA-Bank-Screenings nur wenige Klone mit einer Größe von über 1000 Basenpaaren. Die lange Lagerungszeit hat unter Umständen diesen Zustand noch weiter negativ beeinflusst, so daß möglicherweise keine amplifizierungsfähigen, vollständigen cDNAs des GRP2-Transkriptes in diesen Banken vorhanden waren. Die von S. OVERKAMP hergestellte cDNA-Bank aus elicitierten Zellkulturen enthält zwar deutlich größere cDNAs, allerdings wird gerade die Expression von GRP2 in Zellkulturen supprimiert (CORNELS 1998), was ebenfalls ein Fehlen geeigneter „template“ cDNAs erklären würde. Eine Möglichkeit, die Probleme mit cDNA-Banken als Ausgangsmaterial zu umgehen, wäre die Methode der RT-PCR. Als „template“ für die reverse Transkription könnte hierbei mRNA aus infizierten Pflanzen dienen, welche zum Zeitpunkt der maximalen Expression von GRP2 (3-5 dpi) geerntet wurden.

4.3 Expressionsstudien

4.3.1 Infektion und Verwundung

Da die im Rahmen der Diplomarbeit durchgeführten Northern-Analysen zur Expression der GRPs in infizierten Kichererbsen mit einer wenig sensitiven Methode durchgeführt wurden, sollten sie im Rahmen der hier dargestellten Arbeiten reproduziert und qualitativ verbessert werden. Abbildung 3-7 zeigt eine rasche, transiente Induktion der Expression beider GRP-mRNAs nach Infektion mit *Ascochyta rabiei* mit einem Maximum fünf Tage nach Inokulation. In einigen Kinetiken war dieses Maximum, entsprechend den Ergebnissen der Diplomarbeit, bereits vier Tage nach Behandlung mit Sporensuspension zu erkennen (Ergebnisse nicht dargestellt). In der in dieser Abbildung dargestellten Kinetik war zum Zeitpunkt der Inokulation (0 d) nahezu kein GRP-Transkript nachweisbar. In anderen Versuchsreihen konnten jedoch mehrfach gewisse Mengen der GRP-mRNAs, besonders des GRP2-Transkriptes, auch konstitutiv nachgewiesen werden (vgl. z.B. Abbildung 3-8 unten). Diese kaum reproduzierbare konstitutive Expression erreichte zwar nie das Niveau der Expression nach Infektion, könnte aber auf einen bestimmten Streßzustand der Pflanze bereits zum Zeitpunkt der Inokulation hindeuten (vgl. Kapitel 4.3.2). Sie zeigt aber auch, daß es nahezu unmöglich ist, bei der Arbeit mit relativ alten Pflanzen die Wachstumsbedingungen so exakt zu reproduzieren und konstant zu halten, daß sich die resultierenden Kinetiken absolut identisch verhalten. Möglicherweise ist auch eine entwicklungspezifische, d.h. endogen ausgelöste Expression der GRP-Gene Ursache der Schwankungen in der Menge der konstitutiv exprimierten GRPs. Solche endogenen Modulationen der GRP-Expression, welche teilweise einer circadianen Rythmik unterliegen, wurden in anderen Systemen beobachtet (CARPENTER et al. 1994; HEINTZEN et al. 1994b).

Da das Expressionsmaximum der GRP-Transkripte relativ spät erreicht wird, erscheint es zunächst unwahrscheinlich, eine Beteiligung der GRPs an der direkten Abwehr der Penetration des pflanzlichen Gewebes durch *Ascochyta rabiei* anzunehmen (vgl. Kapitel 1.2.2). Es fällt allerdings auf, daß die Induktion der Expression bereits 24 Stunden nach Behandlung mit Sporensuspension deutlich zu erkennen ist, d.h. zu einem Zeitpunkt, an dem die Pilzsporen gerade erst auskeimen. Möglicherweise reagieren zu diesem frühen Zeitpunkt erst einige wenige Zellen im Bereich der Spore auf das vom Pilz stammende

Signal mit der Expression der GRP-Gene. Später wäre eine großflächigere Induktion denkbar, möglicherweise ausgelöst durch beim apoplastidären Wachstum des Pilzes enzymatisch freigesetzte Elicitoren. Das Expressionsmaximum der GRP-Transkripte (4-5 dpi) korreliert zeitlich mit der beginnenden Ausbreitung von *Ascochyta rabiei* in der ganzen Pflanze durch das Wachstum in den unverholzten Elementen der Leitbündel (KÖHLER und BARZ 1995). Möglicherweise dient die maximale GRP-Produktion zu diesem Zeitpunkt der Abdichtung der angrenzenden Gewebe zur Verhinderung einer weiteren Ausbreitung des Pilzes.

Die aus Abbildung 3-8 ersichtliche leichte Induktion der GRP-Expression durch Verwundung des Blattgewebes deutet darauf hin, daß die Synthese Glycin-reicher Proteine wohl kein ausschließlich durch Pathogenbefall auslösbarer Prozeß ist. Die Produktion von GRPs als Wundantwort wurde mehrfach beschrieben (CONDIT und MEAGHER 1987), eine Beteiligung von GRPs an Reparaturmechanismen wird vermutet (YASUDA et al. 1997; RYSER et al. 1997). Möglicherweise dienen auch hier die GRPs der Abdichtung von Geweben, nur daß hier vermutlich nicht die Abgrenzung von Pathogenen im Vordergrund steht, sondern die Versiegelung des verletzten Gewebes gegenüber der Außenwelt zum Schutz vor Wasser- und Nährstoffverlust als primäre Funktion wahrscheinlich ist.

4.3.2 Manipulationsstreß

Bei Betrachtung von Abbildung 3-7 fällt auf, daß auch in den wasserbehandelten Kontrollpflanzen eine relativ starke Induktion der GRP-Expression zu beobachten ist. Die nachweisbare Menge an GRP-Transkripten bleibt dabei zwar deutlich unter der in infizierten Pflanzen detektierbaren Menge, und die Expression erfolgt zumindest beim GRP2-Transkript zeitverzögert, dennoch handelt es sich um eine deutliche Induktion, die in mehreren Kinetiken beobachtet wurde. Vergleiche mit vollständig unbehandelten Pflanzen zeigen, daß anscheinend die Kontrollbehandlung ausreichend ist, um die Produktion von GRPs in Blättchen zu induzieren (vgl. Abbildung 3-8). In Wurzeln hingegen ist keine GRP-Expression detektierbar. Es ist wahrscheinlich, daß die Kontrollbehandlung, die u.a. das Besprühen der Pflanzen mit sterilem Wasser und einen Wechsel des Inkubators beinhaltet, einen Streßzustand auslöst, auf den die Pflanze mit der Produktion von GRPs in den oberirdischen Pflanzenteilen reagiert. Den auslösenden

Reiz innerhalb dieses als „Manipulationsstreß“ bezeichneten Phänomens genau zu bestimmen, wäre experimentell sehr aufwendig. Mögliche Ursachen für die GRP-Expression könnten der mechanische Streß während der Wasserbehandlung, die vorübergehende Klimaänderung oder Änderungen in der Lichtintensität oder -qualität beim Standortwechsel sein. Zumindest für die beiden letztgenannten Faktoren finden sich Beispiele in der Literatur (vgl. Kapitel 1.4.2.2).

4.3.3 Organspezifische Expression und Unterschiede im Expressionsverhalten zwischen suszeptiblem und resistentem Kultivar

Abbildung 3-9 zeigt das vollständige Fehlen eines dem GRP1-Transkript entsprechenden Signals im Northern-Blot in RNA-Proben aus Wurzeln der Kichererbse. Frühere Untersuchungen zeigten eine qualitativ der Situation in Blättern entsprechende Expression der GRP-mRNAs in Stengeln mit insgesamt geringerer Intensität (CORNELS 1998). Zusammengenommen läßt sich demnach sagen, daß sich die Expression der Pathogenese-begleitenden GRPs der Kichererbse in der Interaktion mit *Ascochyta rabiei* auf die oberirdischen Pflanzenteile beschränkt. Diese Tatsache unterstützt die Vermutung, daß die Expression der GRP-Gene mit dem Pathogenbefall in Zusammenhang stehen. Die Menge an nachweisbarem Transkript korreliert mit den „Angriffsorten“ des Pathogens: *Ascochyta rabiei* penetriert die Pflanze hauptsächlich über die Blattoberflächen und seltener über die Stengel. Ein Befall der Wurzeln wurde bisher nicht beobachtet.

Die deutlich stärkere Signalintensität in den Proben aus infizierten Pflanzen des suszeptiblen Kultivars ILC1929 wäre dadurch zu erklären, daß in dieser kompatiblen Interaktion der Pilz wesentlich größere Bereiche der Pflanze durchwachsen kann und somit auch deutlich mehr pflanzliche Zellen auf den Befall mit der Produktion von GRPs reagieren. In Pflanzen des resistenten Kultivars ILC3279 wird das Pilzwachstum durch die pflanzliche Abwehr stark eingeschränkt, so daß nur eine relativ geringe Anzahl von Zellen direkt mit dem Pilz interagiert. Diese Theorie erklärt allerdings nicht den ähnlich starken Anstieg auch in wasserbehandelten Kontrollpflanzen. Da die Unterschiede zwischen den Signalintensitäten bei Kontrollpflanzen und infizierten Pflanzen in den beiden Kultivaren qualitativ vergleichbar sind (vgl. Abbildung 3-9), wäre es denkbar, daß das suszeptible Kultivar lediglich eine höhere konstitutive Expression von

GRPs aufweist. Weiterführende Untersuchungen mit zum Zeitpunkt der Infektion bzw. Wasserbehandlung (0 d) genommenen Proben könnten diese Vermutung unterstützen. Ein Vergleich der konstitutiven Expression der GRPs in den beiden Kultivaren über den kompletten Wachstumszeitraum wäre ebenfalls interessant. Eine verstärkte konstitutive GRP-Expression könnte als Hinweis auf eine möglicherweise erhöhte Streßsensitivität des suszeptiblen Kultivars gewertet werden, ein Einfluß auf die Verhinderung des Befalls mit *Ascochyta rabiei* besteht augenscheinlich nicht.

4.4 Heterologe Expression

4.4.1 Fehlersuche: Warum stellen die Bakterien das Wachstum ein?

Die unerwarteten Schwierigkeiten bei der heterologen Expression des Hauptteils von GRP1 in *E. coli* waren zunächst kaum erklärbar: Obwohl die Sequenzierung des Expressionskonstruktes vollständig den Erwartungen entsprach (vgl. Kapitel 3.4.1.3), große Mengen der GRP1exp-mRNA nach Induktion nachweisbar waren (vgl. Abbildung 3-16) und im Colony-Blot die Expression eines His-tag-Proteins in den selektierten Bakterienkolonien gezeigt werden konnte (vgl. Kapitel 3.4.2), ließ sich kein heterolog exprimiertes Protein mittels SDS-PAGE nachweisen (vgl. Abbildung 3-15). Erste Vermutungen, daß das heterolog exprimierte Protein möglicherweise in sogenannten „inclusion bodies“ eingeschlossen wird, und somit in einer unlöslichen, dem Aufreinigungsprozeß nicht zugänglichen Form vorliegt, wurden nach Einsatz von stark denaturierenden Reagenzien (z.B. 6 M Guanidinhydrochlorid) zur Aufreinigung bei gleichbleibend negativem Ergebnis verworfen. Erst die Untersuchung des Wachstumsverlaufes der Transformanten nach Induktion der Expression lieferte erste Hinweise auf eine möglich Ursache für dieses Phänomen (vgl. Kapitel 3.4.3.3).

Ein leichter Wachstumsrückgang der Bakterien bei einer extrem hohen Produktionsrate des Proteins wäre aufgrund von möglicherweise auftretenden Ungleichgewichten im Stoffwechsel vorstellbar gewesen. Ein vollständiges Einstellen des Wachstums, wie es im Fall der heterologen Expression von GRP1 beobachtet wurde, ist jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine toxische oder sonstwie zellschädigende Wirkung des exprimierten Proteins zurückzuführen. Die heterologe Expression einer

funktionsfähigen unspezifischen Protease oder Nuklease wären Beispiele für Ansätze, bei denen ein ähnliches Resultat erwartet werden könnte.

4.4.2 Toxische GRPs?

Die Vorstellung, daß die Expression eines GRPs, d.h. eines vermutlichen Strukturproteins ohne jede enzymatische Aktivität, zu einer für die Bakterien in diesem Maße schädlichen Wirkung führen könnte, war zunächst schwierig. Erst die Veröffentlichung der Beobachtungen einer koreanischen Arbeitsgruppe, daß zwei Polypeptide eines GRPs aus den Wurzeln des Hirtentäschelkrauts *Capsella bursa-pastoris* eine antimikrobielle Wirkung aufweisen (vgl. Kapitel 1.4.2.4), unterstützte diese Vermutung (PARK et al. 2000). Die Gesamtähnlichkeit dieses Proteins (Shep-GRP) zu den GRPs der Kichererbse ist eher moderat (vgl. Abbildung 3-5), die isolierten Polypeptide zeigen jedoch auffallende Ähnlichkeiten zu den repetitiven Glycin-reichen Motiven in der Sequenz von GRP1 und GRP2. Auffallend ist außerdem, daß die computerunterstützte Vorhersage der Lokalisation des GRPs aus *Capsella bursa-pastoris* im Wahrscheinlichkeitswert exakt mit der Vorhersage für GRP1 aus der Kichererbse übereinstimmt (90% Wahrscheinlichkeit für eine Lokalisation in der Vakuole, vgl. Kapitel 3.1.2). Die antimikrobielle Wirkung der beiden Polypeptide (Sheperin I und II) wurde in Biotests an verschiedenen, meist humanpathogenen Bakterien und Pilzen nachgewiesen. Für das gramnegative Bakterium *E. coli* liegt dabei der LD₅₀-Wert bei beiden Polypeptiden bei einer Konzentration von unter 1 mM. Da bei der heterologen Expression eines Proteins mit hoher Wahrscheinlichkeit auch Bruchstücke und Abbauprodukte des Fremdproteins im exprimierenden Organismus anfallen, ist es vorstellbar, daß bei der heterologen Expression von GRP1 in *E. coli* Fragmente des Proteins entstehen, die sehr große Ähnlichkeiten mit den beiden antimikrobiell wirksamen Polypeptiden aus *Capsella bursa-pastoris* haben. Die toxisch wirkende Konzentration könnte aufgrund der endogenen Entstehung dieser Polypeptide weit unter dem für die exogene Applikation bestimmten LD₅₀-Wert liegen. Über die Wirkungsweise der beiden Polypeptide aus dem Hirtentäschelkraut ist nichts bekannt, ihre Struktur ähnelt aber keiner bekannten Klasse von antimikrobiell wirksamen Peptiden aus Pflanzen (GARCIA-OLMEDO et al. 1998; PARK et al. 2000). Eine mögliche antimikrobielle Wirkung von GRPs eröffnet völlig neue Ansätze zur Erklärung der möglichen Rolle

dieser Proteinklasse in der Pathogenabwehr. Es ist vorstellbar, daß auch beim enzymatischen Abbau der pflanzlichen Zellwände durch Pathogene Fragmente von GRPs entstehen, die zumindest lokal für das Pathogen schädliche Konzentrationen erreichen. Auch die Speicherung von GRPs in der Vakuole und die Freisetzung ihrer antimikrobiell wirksamen Bestandteile im Bedarfsfall, wie sie für das GRP aus *Capsella bursa-pastoris* postuliert wird, ist vorstellbar. Ähnliche Mechanismen treffen für eine Reihe von Phytoanticipinen zu (vgl. Kapitel 1.1.3). Biotests mit synthetischen GRP-Peptiden an phytopathogenen Organismen wären ein möglicher experimenteller Ansatz, eventuell vorhandene antimikrobielle Wirkungen zumindest *in vitro* zu untersuchen.

Über den Mechanismus, mit dem die heterologe Expression von GRP1 die exprimierenden Bakterien in ihrem Wachstum beeinflusst, kann nur spekuliert werden. Der Nachweis erheblicher Mengen von His-markiertem Protein in den unlöslichen Bestandteilen der Bakterienlyse (vgl. Kapitel 3.4.3.5 und Abbildung 3-20), führt zu der Annahme, daß das Protein zwar gebildet wird, dann aber sehr schnell zu einem hochmolekularen, unlöslichen Aggregat umgewandelt wird, welches selbst durch extreme Methoden (z.B. Extraktion mit Guanidinhydrochlorid, Ultraschallbehandlung, usw.) nicht in eine für die Aufreinigung geeignete lösliche Form überführt werden kann. Sollten doch Teile dieser Komplexe in Lösung gehen, so sind sie in SDS-PAGE und Western-Blot nicht zu detektieren. Unter Umständen wandern sie aufgrund ihrer hohen molekularen Masse bei der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese erst gar nicht in das Sammelgel ein. Eine kovalente Verknüpfung der heterolog exprimierten Proteinmoleküle untereinander oder mit anderen Elementen innerhalb der unlöslichen Bakterienrückstände, z.B. mit Komponenten der bakteriellen Zellwand oder der Plasmamembran, ist wahrscheinlich. Möglicherweise liegt dieser Aggregatbildung ein Quervernetzungsprozeß zugrunde, wie er für einige GRPs beschrieben wurde (RINGLI et al. 2001 und diese Arbeit; vgl. Kapitel 3.5.2). Ähnliche Effekte wurden auch bei einigen Versuchen beobachtet, bestimmte Keratin-ähnliche Seidenfibronine aus der Spinnenseide heterolog in Bakterien zu exprimieren, andere Ansätze waren jedoch erfolgreich (HESLOT 1998).

Zwar konnte durch Einsatz eines Antikörpers gegen den His-tag letztendlich auch die lösliche Form des heterolog exprimierten Protein im Western-Blot detektiert werden, die Menge war aber so gering, daß selbst nach Aufreinigung und Ankonzentrierung das

Protein nicht über Silberfärbung nachgewiesen werden konnte (vgl. Abbildung 3-18). Abbildung 3-19 zeigt, daß die Menge an detektierbarem Protein um mehrere Größenordnungen geringer ist, als für eine typische heterologe Expression nach der angewandten Methode zu erwarten gewesen wäre. Nicht ganz auszuschließen ist jedoch auch, daß das heterolog exprimierte GRP sich in der Silberfärbung nur unzureichend anfärben läßt, um als Bande zu erkennen zu sein. Die weniger sensitive Anfärbung mit Coomassie zeigt allerdings ebenfalls keine dem Signal im Western-Blot zuzuordnende Bande (vgl. z.B. Abbildung 3-23). Da die Gewinnung des Proteins in einer für den Einsatz als Antigen ausreichenden Menge unter den gegebenen Umständen äußerst aufwendig erschien, wurde eine andere Methode der Antigen- bzw. Antikörperherstellung gewählt. Eine heterologe Expression des GRPs in Hefen oder Insektenzellen wurde erwogen, jedoch aufgrund des relativ hohen Aufwandes und der Möglichkeit, auf ähnliche Effekte wie bei der Expression in Bakterien zu stoßen, nicht durchgeführt. Es wurde sich dafür entschieden, ein an ein Trägerprotein gekoppeltes synthetisches Polypeptid, das dem repetitiven Hauptmotiv der Kichererbsen-GRPs entspricht, als Antigen zu verwenden (vgl. Kapitel 2.4.3.1 und 3.5.1).

4.5 Western-Analysen

Das nach der in Kapitel 2.4.3.1 beschriebenen Methode gewonnene Antiserum gegen das repetitive GRP-Element zeigte in Vorversuchen eine hohe Spezifität für das zur Produktion des polyklonalen Antikörpers eingesetzte Polypeptid (vgl. Abbildung 3-21). Im Eluat aus Versuchen zur Aufreinigung des heterolog exprimierten GRPs konnte mit diesem Antiserum eine Signalbande detektiert werden, die vermutlich der mit dem Antikörper gegen den His-tag nachweisbaren Bande entspricht. Die Größe des dieser Bande entsprechenden Proteins konnte durch Vergleich mit Markerproteinen auf ca. 16 kDa geschätzt werden (vgl. Abbildung 3-18 und Abbildung 3-25) und ist damit geringfügig größer als das für das heterolog exprimierte GRP theoretisch berechnete Molekulargewicht von ca. 13 kDa. Aufgrund der intensiven Reaktion der Bande mit beiden Antikörpern kann trotzdem mit großer Sicherheit davon ausgegangen werden, daß es sich bei dem detektierten Protein um das heterolog exprimierte GRP handelt. Auch die Versuche zur peroxidativen Quervernetzung des Proteins unterstützen diese Annahme (vgl. Kapitel 3.5.2 und 4.5.2). Die Diskrepanz zwischen der theoretisch

berechneten und beobachteten Größe könnte z.B. auf ein leicht verändertes Laufverhalten des heterolog exprimierten GRPs durch Rückstände von Guanidiniumhydrochlorid in den Eluatproben erklärt werden. Beobachtungen der Lauffront während der SDS-PAGE unterstützen diese Vermutung (nicht dargestellt). Auch verdünnte Guanidiniumhydrochlorid-haltige Proben bildeten beim Kontakt mit SDS ein Präzipitat und drangen nur verzögert in das Sammelgel ein. Die Fällung der Proben mit Trichloressigsäure (vgl. Kapitel 2.4.1.4) konnte den Effekt zwar minimieren aber nicht ganz aufheben.

4.5.1 Detektion von GRPs in Extrakten löslicher Proteine und ionisch gebundener Zellwandproteine – Hinweise auf eine mögliche Polymerisierung?

Abbildung 3-22 zeigt die Detektion eines Signals im Western-Blot in Extrakten von löslichen Proteinen aus Blättern infizierter Pflanzen. Diese mit dem Antiserum gegen das repetitive GRP-Element nachweisbare Signalbande tritt in Proteinextrakten aus Kontrollpflanzen zum Zeitpunkt der Wasserbehandlung (0 d) nicht auf, ist aber in Kontrollpflanzen fünf Tage nach Behandlung und in Extrakten aus verwundeten Blättern in geringer Intensität erkennbar. Damit ist auszuschließen, daß das Signal auf eine Kreuzreaktion mit einem vom Pilz stammenden Protein zurückzuführen ist. Auffällig ist die Korrelation der Signalintensitäten im Western-Blot mit den für die Expression der GRP-Gene in Northern-Untersuchungen erzielten Resultaten (vgl. Kapitel 3.3). In ihrer Größe von unter 20 kDa könnte die Signalbande sowohl dem GRP1-Präprotein (ca. 16 kDa), als auch dem reifen GRP2 nach Abspaltung des Signalpeptids (ca. 19 kDa) entsprechen. SDS-PAGE-Gele mit einer besseren Auftrennung im in Frage kommenden Molekulargewichtsbereich und Western-Analysen entsprechender Blots könnten hier möglicherweise Aufschluß geben. Unter Umständen wäre in einem solchen Versuchsansatz auch die eindeutige Zuordnung des Signals zu einer Proteinbande möglich, deren partielle Sequenzierung die Frage beantworten würde, ob es sich bei dem das Signal im Western-Blot verursachenden Protein tatsächlich um eines der beiden GRPs handelt. Einen diesbezüglichen Hinweis könnten auch Versuche zur peroxidativen Quervernetzung des in Frage kommenden Proteins aus Extrakten infizierter Pflanzen liefern, wie sie für das heterolog exprimierte GRP durchgeführt wurden (vgl. Kapitel 3.5.2 und 4.5.2).

In Extrakten löslicher Proteine aus Stengeln infizierter Pflanzen ist das oben beschriebene Signal nicht zu erkennen (vgl. Abbildung 3-24), allerdings ist hier auch auf der Ebene der mRNA eine schwächere GRP-Expression zu detektieren (CORNELS 1998). In Extrakten aus Wurzeln ist die Signalbande unterhalb von 20 kDa ebenfalls nicht vorhanden, allerdings treten zwei deutlich mit dem Antikörper reagierende Banden bei ca. 36 und 60 kDa auf, sowie mehrere schwächere Signale bei höheren Molekulargewichten. Diese Banden sind mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht auf eines der beiden hier untersuchten GRPs zurückzuführen, da sie zum einen deutlich zu groß sind, zum anderen zumindest die GRP1-mRNA in Wurzeln nicht nachgewiesen werden konnte (vgl. Abbildung 3-9). Es könnte hier eine unspezifische Kreuzreaktion des Antikörpers vorliegen, möglicherweise entsprechen die in Wurzeln detektierbaren Signale aber auch bisher nicht beschriebenen GRPs oder GRP-ähnlichen Proteinen (z.B. Nodulinen). Ein Einfluß der Infektion mit *Ascochyta rabiei* auf die Signalintensität ist nicht zu erkennen. Da diese Proteine anscheinend spezifisch in der Wurzel gebildet werden, ist es vorstellbar, daß ihre Sequenzinformationen in keiner der im Rahmen der hier beschriebenen Arbeiten eingesetzten cDNA-Banken aus Blättern und Zellkulturen vorhanden sind, bzw. über das von Y. ICHINOSE durchgeführte differentielle Screening nicht erfaßt werden konnten (vgl. Kapitel 1.2.3).

Das Bandenmuster in Western-Blots mit Extrakten ionisch gebundener Zellwandproteine unterscheidet sich deutlich von den mit löslichen, cytosolischen Proteinen erzielten Resultaten (vgl. Abbildung 3-23). Das oben beschriebene, in Extrakten löslicher Proteine zu erkennende Signal unterhalb von 20 kDa ist nicht vorhanden. Es treten hingegen mehrere Signalbanden bei höheren Molekulargewichten auf, die zwar auch in Extrakten aus Kontrollpflanzen vorhanden sind, in Extrakten aus infizierten und verwundeten Pflanzen jedoch leicht intensiver erscheinen. Auffällig ist, daß zwischen den Molekulargewichten der mit dem Antiserum reagierenden Proteine (ca. 26, 40, 54 und 70 kDa) relativ gleichbleibende Schritte von ca. 14 kDa liegen. Dies entspricht nahezu exakt der theoretischen Größe des reifen GRP1 ohne Signalpeptid (ca. 13,5 kDa, vgl. Kapitel 3.1.3). Es ist demnach zumindest vorstellbar, daß es sich bei den detektierten Proteinen um das Di-, Tri-, Hepta- und Pentamer von GRP1 handeln könnte. Dies würde eine Polymerisierungsreaktion der GRP1-Monomere in der Zellwand voraussetzen. Eine kovalente Verknüpfung der Proteine untereinander wäre

zu fordern, da eventuell vorhandene ionische Wechselwirkungen durch die Art der Extraktion der Proteine aus der Zellwand höchstwahrscheinlich aufgelöst worden wären. Eine möglich Form dieser Polymerisierung wäre eine peroxidative Quervernetzung über Tyrosinreste innerhalb der Proteine, wie sie für andere Zellwandstrukturproteine beschrieben wurde (BRADLEY et al. 1992; OTTE und BARZ 2000; GROTEN und BARZ 2000; RINGLI et al. 2001). Bei den meisten Beobachtungen dieser Art ging die vermutete oxidative Quervernetzung allerdings mit einer Insolubilisierung der Proteine in der Zellwand einher, d.h. die Proteine ließen sich nicht mehr durch eine einfache Salzextraktion, wie sie hier durchgeführt wurde, aus der Zellwand herauslösen (OTTE und BARZ 1996; OTTE und BARZ 2000; RINGLI et al. 2001; JACKSON et al. 2001). Dies spricht gegen die Vermutung, daß es sich bei den detektierten Proteinen tatsächlich um die Produkte einer peroxidativen Quervernetzung handelt. Als Ursache für die o.g. Insolubilisierung wird eine Verknüpfung der Zellwandstrukturproteine mit anderen Komponenten der Zellwand oder die Bildung netzartiger, hochpolymerer Strukturen vermutet, was ebenfalls ein Herauslösen aus der Zellwand verhindern würde. Möglicherweise handelt es sich bei den in den Zellwandextrakten aus Blättern der Kichererbse mit dem GRP-Antikörper detektierbaren Proteinen um Bruchstücke oder Vorstufen eines solchen größeren Polymers. Besonders im Hinblick auf die Ergebnisse der „Tissue-blots“ (vgl. Kapitel 3.5.3 und 4.6) wäre eine Untersuchung von Zellwandextrakten aus Stengeln im Western-Blot interessant. Eine solche Analyse konnte im Rahmen der hier beschriebenen Arbeiten nicht durchgeführt werden, da die Proteinausbeute bei der Extraktion von Zellwänden aus Stengelmaterial sich als äußerst gering herausstellte. Eine größer angelegte Pflanzenkinetik wäre notwendig, um das für eine Analyse ausreichende Ausgangsmaterial zu erhalten.

4.5.2 Peroxidative Quervernetzung des heterolog exprimierten GRPs

Die in Kapitel 3.5.2 dargestellten Versuche basieren auf den Arbeiten von O. OTTE, dem es gelang, die *in vitro*-Quervernetzung von aus Zellwänden isolierten Strukturproteinen durch Applikation von Wasserstoffperoxid in Gegenwart einer Peroxidase nachzuweisen (OTTE 1998; OTTE und BARZ 2000). Es gilt mittlerweile als relativ gesichert, daß dieser Prozeß *in planta* als Folge eines „oxidative burst“ unter Katalyse von Peroxidasen in der Zellwand abläuft (BROWNLEADER et al. 2000; JACKSON et al.

2001), was eine Insolubilisierung der Zellwandstrukturproteine zur Folge hat. In bestimmten Systemen kann dabei auch die Peroxidase selbst durch ihre eigene katalytische Aktivität in eine unlösliche Form überführt werden (MORIMOTO et al. 1999). Die Quervernetzung von GRPs auf diese Art wird zwar schon länger postuliert, konnte aber erst in einem Fall nachgewiesen werden (RINGLI et al. 2001).

Das Verschwinden der mit dem Antiserum gegen das repetitive GRP-Element detektierbaren Bande des heterolog exprimierten GRPs bei gleichzeitiger Applikation von H₂O₂ und Meerrettichperoxidase (vgl. Abbildung 3-25) liefert einen starken Hinweis auf die oxidative Quervernetzung dieses Proteins. Ein abschließender Beweis wäre der Nachweis des verknüpften Polymers und die Isolation und Identifikation von Tyrosin-Tyrosin-Bindungen daraus (vgl. Abbildung 1-4). Solche Untersuchungen konnten aufgrund der geringen Menge an in löslicher Form isolierbarem heterolog exprimierten GRP nicht durchgeführt werden. Interessant wären in diesem Zusammenhang, wie bereits erwähnt, auch Versuche zur Quervernetzung des im Extrakt cytosolischer Proteine aus Blättern infizierter Pflanzen mittels Western-Blot detektierten Proteins (MW >20 kDa). Mehrere Formen der Verknüpfung von Tyrosinresten konnten bisher bei Pflanzen identifiziert werden, etwa das Dimer Isodityrosin (FRY 1982; FRY 1986) oder das Tetramer Di-Isodityrosin (BRADY et al. 1996, vgl. auch Abbildung 1-4). Es konnte aber noch nicht explizit gezeigt werden, daß eine solche kovalente Verknüpfung tatsächlich zwischen zwei Proteinen und nicht nur zwischen verschiedenen Tyrosinresten innerhalb eines Proteins stattfindet. Die Quervernetzung von Proteinen über Tyrosinreste ist kein auf die Zellwände höherer Pflanzen beschränktes Phänomen. Man findet sie u.a. bei der einzelligen Alge *Chlamydomonas* (WAFFENSCHMIDT et al. 1993), den Ascosporen der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (BRIZA et al. 1996) und vermutet sie bei den Sporenhüllen von *Bacillus subtilis* (PANDEY und ARONSON 1979). Der Nachweis von Tyrosin-Tyrosin-Bindungen und die spektrometrische Analyse ihres Aufbaus setzten eine relativ große Menge an möglichst reinem Ausgangsprotein voraus, was einer der ursprünglichen Beweggründe war, die heterologe Expression eines GRPs in *E. coli* durchzuführen, in der Erwartung, dadurch theoretisch beliebige Mengen des Proteins produzieren zu können.

4.6 Lokalisation der GRPs mittels Tissue-blots

4.6.1 Vorteile und Schwächen des „Tissue-blot“

Die Vorteile der Immunolokalisation von Proteinen mittels Gewebeabdrucktechnik („Tissue-blots“) liegen vor allem in der relativ unkomplizierten und raschen Durchführbarkeit dieser Methode. Eine „klassische“ Immunohistologische Untersuchung würde das Fixieren und Einbetten der zu untersuchenden Gewebe und die Herstellung von Dünnschnitten beinhalten. Diese Prozesse können unter Umständen sehr langwierig und aufwendig sein. Die Qualität der Ergebnisse einer anschließenden licht- oder gar elektronenmikroskopischen Untersuchung von auf diese Weise hergestellten und anschließend zur Immunodetektion eingesetzten Präparaten übertrifft die mit „Tissue-blots“ erzielten Resultate allerdings bei weitem. Diese eingeschränkte Qualität bezüglich der Auflösung ist der größte Nachteil der Methodik. „Tissue-blots“ können nur einen groben Eindruck von der Lokalisation der detektierten Proteine in Geweben vermitteln, eine subzelluläre Lokalisation ist nicht möglich. Ebenso ist eine vergleichende Quantifizierung von Signalen oft nicht durchführbar, da ein reproduzierbarer Proteintransfer beim Gewebeabdruck nicht gegeben ist. Ein weiterer Nachteil ist, daß sich nur bestimmte Organe oder Gewebe für diese Methode eignen. Gewebeabdrücke von weichen oder sehr flexiblen Materialien (z.B. dünnen Blättchen) sind teilweise äußerst schwierig, können aber unter Umständen durch Einfrieren der Proben erleichtert werden (CONLEY und HANSON 1997). Neben dem immunologischen Nachweis von Proteinen bieten „Tissue-blots“ noch eine Reihe anderer Anwendungsmöglichkeiten, z.B. die Detektion von mRNAs oder die Visualisierung von H_2O_2 in Abdrücken von pflanzlichen Geweben (SCHOPFER 1994; VARNER und YE 1994). Eine weitere Applikation ist der immunologische Nachweis und die Lokalisation von Viruspartikeln in Pflanzen (KNAPP et al. 1995; MAS und PALLAS 1995; DICENTA et al. 2000).

4.6.2 Korreliert die Lokalisation der GRP-Expression mit der Lignifizierung oberirdischer Leitgewebselemente?

Bei der Interpretation der in Kapitel 3.5.3 dargestellten Ergebnisse muß berücksichtigt werden, daß Kontrollansätze zwar nur eine geringe Kreuzreaktion des sekundären Antikörpers mit den Gewebeabdrücken zeigten (nicht dargestellt), die Möglichkeit der Beeinträchtigung der Resultate durch andere Effekte, wie z.B. ungleichmäßige

Abdrücke oder unspezifische Bindung des primären Antikörpers, aber durchaus besteht. Abbildung 3-26 zeigt ein relativ deutliches Signal des Antikörpers gegen das repetitive Element der Kichererbsen-GRPs im Leitgewebe der Stengel. Eine Intensivierung des Signals in infizierten Pflanzen analog zu den Ergebnissen der Northern-Untersuchungen konnte nicht festgestellt werden, was aber auf Schwächen der angewandten Methodik zurückzuführen sein könnte. Für die Spezifität dieses Signals spricht, daß es oft nicht die kompletten Leitbündel umfaßt. Wiederholt wurde im mittleren Bereich der Leitbündel, d.h. in der Region des Phloems und des faszikulären Kambiums, kein oder nur ein deutlich schwächeres Signal beobachtet (vgl. Abbildung 3-27). Da diese Gewebe in der Coomassie-Färbung am intensivsten gefärbt sind und daher wahrscheinlich den höchsten Proteingehalt aufweisen, würde man bei einer unspezifischen Reaktion des Antikörpers gerade in diesen Bereichen ein besonders deutliches Signal erwarten. Die leichte Anfärbung in den epidermalen Regionen des Abdruckes des Stengelquerschnittes könnte auf eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit der RubisCO zurückzuführen sein, wie sie auch im Western-Blot beobachtet wurde. In einigen Fällen konnte ein Anfärbung von beim Blot auf die Nitrocellulosemembran übertragenen Chloroplasten in den epidermalen Zellschichten beobachtet werden (nicht dargestellt). Auffällig ist, daß das Leitgewebe im Zentralzylinder der Wurzeln im „Tissue-blot“ kaum ein Signal zeigt. Diese Beobachtung korrespondiert mit dem Fehlen eines Signals der GRP1-mRNA in Wurzeln. Lediglich die peripheren Bereiche des Wurzelabdrucks zeigen eine Reaktion mit dem Antikörper. Möglicherweise wird dieses Signal durch die in Extrakten cytosolischer Proteine aus Wurzeln im Western-Blot detektierbaren Proteine (MW ca. 36 und 60 kDa) verursacht.

Abbildung 3-27 zeigt, daß GRPs möglicherweise vermehrt im Xylem und den Zellen der Sklerenchymscheide, d.h. in durch Lignifizierung verstärkten Geweben, gebildet werden. Die Korrelation von GRP-Expression und Lignifizierung wurde in einigen Systemen beschrieben (SHOWALTER 1993; CASSAB und VARNER 1998; SACHETTO-MARTINS et al. 2000), aber auch gegenteilige Beobachtungen sind bekannt (RYSER und KELLER 1992; CONDIT 1993; RYSER et al. 1997). Eine Rolle der GRPs in der Lignifizierung der Leitgewebselemente, z.B. als Bindeglied zwischen den Proteinbestandteilen und phenolischen Komponenten der Zellwand, ist nicht auszuschließen. In der Kichererbse ist eine mögliche Funktion der GRPs bei der Verstärkung der die unlignifizierten Bestandteile der Leitbündel umgebenden Gewebe denkbar. Diese „Abdichtung“ von Phloem und Kambium gegenüber den umliegenden Geweben könnte

zu einer Verhinderung des systemischen Ausbreitens von *Ascochyta rabiei* in der Pflanze beitragen, welcher nach mikroskopischer Beobachtung in den späten Phasen seines Wachstums in den Leitbündel meist auf Phloem und Kambium beschränkt bleibt (vgl. Kapitel 1.2.2).

4.7 Fazit: Welche Rolle spielen GRPs in der Interaktion der Kichererbse mit *Ascochyta rabiei*?

Mehrere Ergebnisse der hier dargestellten Arbeiten deuten auf eine Beteiligung der Glycin-reichen Proteine in der Wirt-Pathogen-Interaktion von Kichererbse und *Ascochyta rabiei* hin. Die rasche Induktion der Expression der GRP-Gene in Folge einer Inokulation von Pflanzen mit *Ascochyta rabiei*-Sporensuspension wurde nachgewiesen (vgl. Kapitel 3.3 und 4.3). Die Northern-Untersuchungen zeigen aber auch, daß Pathogenbefall zwar der effektivste, nicht aber der einzige Reiz ist, der zu einer Akkumulation von GRP-mRNA führt. Die Induktion durch Verwundung und Kontrollbehandlung läßt eine Beteiligung der GRPs an einer eher allgemeinen Streßantwort vermuten. Für eine Funktion der GRPs in der Pathogenabwehr spricht ihre Lokalisation in den oberirdischen Pflanzenteilen und die Korrelation der Menge an nachweisbarem GRP-Transkript mit den zu beobachtenden bevorzugten Orten der Penetration der Pflanze (starke Expression in Blättchen, schwächere Expression in Stengeln, keine Expression in Wurzeln). Eine Funktion der GRPs läßt sich möglicherweise aus ihrer *in vitro* demonstrierten Fähigkeit zur peroxidativen Quervernetzung ableiten (vgl. Kapitel 3.5.2 und 4.5.2). Es ist wahrscheinlich, daß dieser Prozeß auch *in planta* in der Zellwand abläuft, möglicherweise in Folge eines durch Pathogenbefall oder andere Streßfaktoren ausgelösten „oxidative burst“. Das Resultat einer solchen Quervernetzung von GRPs untereinander oder mit anderen Komponenten der extrazellulären Matrix wäre vermutlich eine erhöhte mechanische Belastbarkeit und eine Erschwerung des enzymatischen Abbaus der Zellwände, was sowohl das Wachstum von Pathogenen im apoplastidären Raum, als auch den Übergang zum intrazellulären Wachstum, d.h. die Penetration von Zellen, erschweren könnte. Möglicherweise kommt es zunächst zu einer Quervernetzung eventuell konstitutiv vorhandener GRPs, später erfolgt dann eine Neusynthese Glycin-reicher Proteine zur weiteren Verstärkung der betroffenen Gewebe. Es wäre denkbar, daß eine solche *de novo*-Produktion von GRPs zuerst lokal im Bereich der primären Infektionsstelle auftritt, später dann, parallel zum Wachstum des Pathogens, auf große Bereiche der Pflanze ausgedehnt und intensiviert wird. Für diese

Theorie spricht, daß die GRP-mRNAs zwar sehr schnell nach Inokulation von Pflanzen nachweisbar sind, das Maximum der Expression aber bei einem Zeitpunkt liegt, bei dem zumindest in einer kompatiblen Interaktion die primäre Penetration der Pflanze bereits erfolgt ist und der Pilz beginnt, sich systemisch auszubreiten. Dieses relativ späte Expressionsmaximum und die mögliche Lokalisation von GRPs in den verholzten Teilen der Leitbündel der Sproßachse (vgl. Kapitel 3.5.3 und 4.6.2) könnten darauf hindeuten, daß die Hauptaufgabe von GRPs im System Kichererbse/*Ascochyta rabiei* möglicherweise nicht so sehr in der Abwehr der primären Infektion der Pflanze liegt, sondern vielmehr in der Beschränkung der Ausbreitung des Pilzes in späteren Stadien der systemischen Infektion. Möglich wäre dies durch eine Verstärkung der Zellwände in den die unlignifizierten Bestandteile der Leitbündel umgebenden Geweben.

Ein Aspekt, der bei der Bewertung der Rolle Glycin-reicher Proteine in der Wirt-Pathogen-Interaktion nicht außer acht gelassen werden sollte, ist eine mögliche antimikrobielle Wirkung der GRPs (vgl. Kapitel 4.4.2). Zwar sind die Hinweise auf eine solche Funktion der Kichererbsen-GRPs bestenfalls indirekt und vage, trotzdem sollten sie auch in Hinblick auf mögliche weiterführende Untersuchungen berücksichtigt werden. Eine antimikrobielle Wirkung von GRPs oder ihren Bestandteilen bzw. Abbauprodukten steht nicht zwangsläufig im Widerspruch zu der Auffassung von GRPs als Strukturproteinen der Zellwand. Möglicherweise stellt die vermutete Schadwirkung gegenüber Pathogenen nur einen für die Pflanze positiven Nebeneffekt dar, der unter Umständen beim Abbau der Zellwandproteine durch Enzyme des Pathogens auftritt. Vielleicht ist der Einbau von GRPs in mit dem Pathogen in Kontakt stehende Zellwände aber auch ein effizienter Mechanismus der Pflanze, eine antimikrobiell wirksame Substanz gezielt gegen ein Pathogen zum Einsatz zu bringen. Untersuchungen dieser Aspekte wären sicherlich interessant.

Abschließend läßt sich sagen, daß eine Funktion der hier untersuchten GRPs in der Pathogenabwehr zwar anzunehmen ist, eine Wirkung als Resistenzfaktor der Kichererbse aber eher unwahrscheinlich ist. Dafür spricht die Tatsache, daß das suszeptible Kichererbsenkultivar zwar eine gegenüber dem resistenten Kultivar deutlich erhöhte konstitutive Expression der GRPs aufweist, dies aber keinen Einfluß auf die Infektion mit *Ascochyta rabiei* zu haben scheint.

5 Zusammenfassung

Aus den Sequenzen einer großen Gruppe von Klonen innerhalb einer cDNA-Population, welche mRNAs repräsentiert, die in der Kichererbse in Folge einer Infektion durch den Pilz *Ascochyta rabiei* verstärkt gebildet werden, konnten zwei Glycin-reiche Proteine (GRPs) abgeleitet und charakterisiert werden. Beide Proteine weisen ein identisches repetitives Aminosäuremotiv (GGGNYGx) auf. Die Sequenzen der N-Termini beider Proteine sind wahrscheinlich unvollständig, Vergleiche mit Datenbanken lassen aber vermuten, daß dem ORF des kleineren GRP1 nur drei Aminosäuren zur Vollständigkeit fehlen. Für GRP1 konnte das Vorhandensein eines Signalpeptids mit einer spezifischen Proteaseschnittstelle vorhergesagt werden. Die wahrscheinlichsten Zielorte des reifen Proteins sind die Vakuole (90%) oder der Apoplast (82%).

Northern-Untersuchungen belegten die rasche, transiente Induktion der Expression beider GRPs nach Infektion mit einem Maximum fünf Tage nach Inokulation von Pflanzen mit *Ascochyta rabiei*-Sporensuspension. Ebenso konnte eine schwächere Induktion durch Verwundung von Blättern und den Streß der Kontrollbehandlung nachgewiesen werden, was auf eine Beteiligung der GRPs an einer unspezifischen Streßantwort hindeutet.

Die heterologe Expression des Hauptteils von GRP1 in *E. coli* führte zu einer raschen Einstellung des Bakterienwachstums, was auf eine toxische Wirkung des exprimierten Proteins zurückgeführt wird. Das heterolog exprimierte GRP wurde in den unlöslichen Rückständen der Bakterienlyse nachgewiesen, nur geringe Mengen konnten in löslicher Form isoliert werden.

Western-Analysen mit einem polyklonalen Antikörper gegen das repetitive Aminosäuremotiv der Kichererbsen-GRPs konnten in Extrakten cytosolischer Proteine aus infizierten Pflanzen ein kleines Protein (>20 kDa) detektieren, welches in Kontrollpflanzen in wesentlich geringeren Mengen oder gar nicht nachweisbar war. In entsprechenden Extrakten von ionisch gebundenen Zellwandproteinen reagierten mehrere Proteine mit höherem Molekulargewicht mit dem Antikörper. Eine Quervernetzung der GRPs in der Zellwand wird vermutet. Versuche zur *in vitro*-

Quervernetzung des heterolog exprimierten GRP durch Zugabe von H₂O₂ unter Katalyse einer Peroxidase verliefen erfolgreich.

Immunologische Untersuchungen mit Gewebeabdrücken lieferten Hinweise auf eine Lokalisation der GRPs in den verholzten Teilen der Leitbündel der Sproßachse. Aus dem relativ späten Expressionsmaximum und der Lokalisation im Leitgewebe wird eine mögliche Funktion der GRPs bei der Verstärkung der Gewebe hergeleitet, welche die unlignifizierten Bestandteile der Leitbündel umgeben. Diese „Abdichtung“ könnte zu einer Behinderung des systemischen Ausbreitens von *Ascochyta rabiei* in der Pflanze beitragen, welcher in seinem Wachstum auf die unverholzten Gewebe der Leitbündel beschränkt bleibt.

6 Literatur

Agrios, G. N. (1997)

Plant Pathology, Academic Press, San Diego, London, Tokyo

Albersheim, P.; An, J.; Freshour, G.; Fuller, M. S.; Guillen, R.; Ham, K. S.; Hahn, M. G.; Huang, J.; O'Neill, M.; Whitcombe, A. (1994)

Structure and function studies of plant cell wall polysaccharides. *Biochem.Soc.Trans.* **22(2)**:374-378

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. D. (1990)

Molekularbiologie der Zelle, 2. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Basel, Cambridge, New York

Aleith, F.; Richter, G. (1990)

Gene expression during induction of somatic embryogenesis in carrot cell suspensions. *Planta* **183**:17-24

Alting-Mees, M. A.; Sorge, J. A.; Short, J. M. (1992)

pBluescript II: Multifunctional cloning and mapping vectors. *Methods Enzymol.* **216**:483-495

Altschul, S. F.; Boguski, M. S.; Gish, W.; Wootton, J. C. (1994)

Issues in searching molecular sequence databases. *Nat.Genet.* **6(2)**:119-129

Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. (1990)

Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.* **215(3)**:403-410

Bacic, A.; Du, H.; Stone, B. A.; Clarke, A. E. (1996)

Arabinogalactan proteins: a family of cell-surface and extracellular matrix plant proteoglycans. *Essays Biochem.* **31**:91-101

Barz, W. (1997)

Phytoalexins. In: Hartleb, H., Heitefuss, R. und Hoppe, H. H. (eds.): Resistance of crop plants against fungi, S. 198-201, Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, Lübeck, Ulm

Barz, W.; Bless, W.; Borger-Papendorf, G.; Gunia, W.; Mackenbrock, U.; Meier, D.; Otto, C.; Super, E. (1990)

Phytoalexins as part of induced defence reactions in plants: their elicitation, function and metabolism. *Ciba Found.Symp.* **154**:140-153

Batalia, M. A.; Monzingo, A. F.; Ernst, S.; Roberts, W.; Robertus, J. D. (1996)

The crystal structure of the antifungal protein zeamatin, a member of the thaumatin-like, PR-5 protein family. *Nat.Struct.Biol.* **3(1)**:19-23

Becker-Dillingen, J. (1929)

Die echte Kichererbse *Cicer arietinum* L. In: Handbuch des Hülsenfruchterbaues und Futterbaues, S. 159-164, Verlag Paul Parey, Berlin

Bell, A. A. (1981)

Biochemical mechanisms of disease resistance. *Annu.Rev.Plant Physiol.* **32**:21-81

Benhamou, N.; Lafontaine, P. J.; Mazau, D.; Esquerré-Tugayé, M. T. (1991a)

Differential accumulation of hydroxyproline-rich glycoproteins in bean root nodule cells infected with a wild-type strain or a C₄-dicarboxylic acid mutant of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. *Planta* **184**:457-467

Benhamou, N.; Mazau, D.; Grenier, J.; Esquerré-Tugayé, M. T. (1991b)

Time-course study of the accumulation of hydroxyproline-rich glycoproteins in root cells of susceptible and resistant tomato plants infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Planta* **184**:196-208

Bennet, R. N.; Wallsgrove, R. M. (1994)

Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *Phytol.* **127**:617-633

Bergeron, D.; Boivin, R.; Baszczyński, C. L.; Bellemare, G. (1994)

Root-specific expression of a glycine-rich protein gene in *Brassica napus*. *Plant Sci.* **96**:87-98

Bjellqvist, B.; Basse, B.; Olsen, E.; Celis, J. E. (1994)

Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. *Electrophoresis* **15(3-4)**:529-539

Bjellqvist, B.; Hughes, G. J.; Pasquali, C.; Paquet, N.; Ravier, F.; Sanchez, J. C.; Frutiger, S.; Hochstrasser, D. (1993)

The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* **14(10)**:1023-1031

Bolwell, G. P. (1999)

Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Curr.Opin.Plant Biol.* **2(4)**:287-294

Bonas, U.; Van den Ackerveken, G. (1999)

Gene-for-gene interactions: bacterial avirulence proteins specify plant disease resistance. *Curr.Opin.Microbiol.* **2(1)**:94-98

Boyle, P. P.; Grada, O. (1986)

Fertility trends, excess mortality, and the Great Irish Famine. *Demography* **23(4)**:543-562

Börner, H. (1990)

Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz (UTB für Wissenschaft: Uni-Taschenbücher, Nr. 518), 6. Auflage, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

Braam, J. (1999)

If walls could talk. *Curr.Opin.Plant Biol.* **2(6)**:521-524

Bradford, M. M. (1976)

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**:248-254

Bradley, D. J.; Kjellbom, P.; Lamb, C. J. (1992)

Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* **70(1)**:21-30

Brady, J. D.; Sadler, I. H.; Fry, S. C. (1996)

Di-isodityrosine, a novel tetrameric derivative of tyrosine in plant cell wall proteins: a new potential cross-link. *Biochem.J.* **315 (Pt 1)**:323-327

Briza, P.; Kalchauer, H.; Pittenauer, E.; Allmaier, G.; Breitenbach, M. (1996)

N,N'-Bisformyl dityrosine is an in vivo precursor of the yeast ascospore wall. *Eur.J.Biochem.* **239(1)**:124-131

Brownleader, M. D.; Hopkins, J.; Mobasher, A.; Dey, P. M.; Jackson, P.; Trevan, M. (2000)

Role of extensin peroxidase in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedling growth. *Planta* **210(4)**:668-676

Bruns, R.; Barz, W. (2001)

Studies on Cell Number and Nuclei in Spores and on Polidy Level in *Ascochyta rabiei* Isolates. *J.Phytopathol.* **149**:253-258

Burzio, L. A.; Saéz, C.; Pardo, J.; Waite, J. H.; Burzio, L. O. (2000)

The adhesive protein of *Choromytilus chorus* (Molina, 1782) and *Aulacomya ater* (Molina, 1782): a proline-rich and a glycine-rich polyphenolic protein. *Biochim.Biophys.Acta* **1479(1-2)**:315-320

Butler, E. J. (1911)

Fungi and disease in plants. *Dehradun Periodical Experts* **42(D)** (Nachdruck 1973, Vivek Vihar, Delhi, Indien)

Carpenter, C. D.; Kreps, J. A.; Simon, A. E. (1994)

Genes encoding glycine-rich *Arabidopsis thaliana* proteins with RNA-binding motifs are influenced by cold treatment and an endogenous circadian rhythm. *Plant Physiol.* **104(3)**:1015-1025

Cassab, G. I.; Varner, J. E. (1987)

Immunocytolocalization of extensin in developing soybean seed coats by immunogold-silver staining and by tissue printing on nitrocellulose paper. *J.Cell Biol.* **105(6 Pt 1)**:2581-2588

Cassab, G. I.; Varner, J. E. (1988)

Cell wall proteins. *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.* **39**:321-351

Cassab, G. I.; Varner, J. E. (1998)

Plant cell wall proteins. *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.* **49**:281-309

Cheng, S. H.; Keller, B.; Condit, C. M. (1996)

Common occurrence of homologues of petunia glycine-rich protein-1 among plants. *Plant Mol.Biol.* **31(1)**:163-168

Chomczynski, P. (1992)

One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal.Biochem.* **201(1)**:134-139

Condit, C. M. (1993)

Developmental expression and localization of petunia glycine-rich protein 1. *Plant Cell* **5(3)**:277-288

Condit, C. M.; McLean, B. G.; Meagher, R. B. (1990)

Characterization of the expression of the petunia glycine-rich protein-1 gene product. *Plant Physiol.* **93**:596-602

Condit, C. M.; Meagher, R. B. (1986)

A gene encoding a novel glycine-rich structural protein of petunia. *Nature* **323**:178-182

Condit, C. M.; Meagher, R. B. (1987)

Expression of a gene encoding a glycine-rich protein in petunia. *Mol.Cell Biol.* **7(12)**:4273-4279

Conley, C. A.; Hanson, M. R. (1997)

Cryostat tissue printing: an improved method for histochemical and immunocytochemical localization in soft tissues. *Biotechniques* **22(3)**:491-496

Cook, R. J. (1998)

The molecular mechanisms responsible for resistance in plant-pathogen interactions of the gene-for-gene type function more broadly than previously imagined. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95(17)**:9711-9712

Cornels, H. (1998)

Untersuchungen über Glycin-reiche Proteine in der Kichererbsenpflanze (*Cicer arietinum* L.). Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

Cornels, H.; Ichinose, Y.; Barz, W. (2000)

Characterization of cDNAs encoding two glycine-rich proteins in chickpea (*Cicer arietinum* L.): accumulation in response to fungal infection and other stress factors. *Plant Sci.* **154(1)**:83-88

Coyne, K. J.; Qin, X. X.; Waite, J. H. (1997)

Extensible collagen in mussel byssus: a natural block copolymer. *Science* **277(5333)**:1830-1832

Crétin, C.; Puigdomènech, P. (1990)

Glycine-rich RNA-binding proteins from *Sorghum vulgare*. *Plant Mol.Biol.* **15**:783-785

Cubero, J. I. (1987)

Morphology of chickpea. In: Saxena, M. C. und Singh, K. B. (eds.): *The Chickpea*, S. 35-66, CAB International, Wallingford, Großbritannien

Dangl, J. L. (1995)

Pièce de Résistance: novel classes of plant disease resistance genes. *Cell* **80**(3):363-366

De Oliveira, D. E.; Franco, L. O.; Simoens, C.; Seurinck, J.; Coppieters, J.; Botterman, J.; Van Montagu, M. (1993)

Inflorescence-specific genes from *Arabidopsis thaliana* encoding glycine-rich proteins. *Plant J.* **3**(4):495-507

De Oliveira, D. E.; Seurinck, J.; Inzé, D.; Van Montagu, M.; Botterman, J. (1990)

Differential expression of five *Arabidopsis* genes encoding glycine-rich proteins. *Plant Cell* **2**(5):427-436

De Wit, P. J. (1995)

Cf9 and Avr9, two major players in the gene-for-gene game. *Trends Microbiol.* **3**(7):251-252

Dicenta, F.; Martinez-Gomez, P.; Bellanger, I.; Audergon, J. M. (2000)

Localization of Plum pox virus in stem and petiole tissues of apricot cultivars by immuno-tissue printing. *Acta Virol.* **44**(6):323-328

Didierjean, L.; Frendo, P.; Burkard, G. (1992)

Stress responses in maize: sequence analysis of cDNAs encoding glycine-rich proteins. *Plant Mol.Biol.* **18**(4):847-849

Didierjean, L.; Frendo, P.; Nasser, W.; Genot, G.; Marivet, J.; Burkard, G. (1996)

Heavy-metal-responsive genes in maize: identification and comparison of their expression upon various forms of abiotic stress. *Planta* **199**(1):1-8

Dixon, R. A. (2001)

Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**(6839):843-847

Duke, J. A. (1981)

Handbook of legumes of world economic importance, Plenum Press, New York

Dunn, M. A.; Brown, K.; Lightowlers, R.; Hughes, M. A. (1996)

A low-temperature-responsive gene from barley encodes a protein with single-stranded nucleic acid-binding activity which is phosphorylated in vitro. *Plant Mol.Biol.* **30**(5):947-959

Ebel, J. (1986)

Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. *Annu.Rev.Phytopathol.* **24**:235-264

Ebel, J. (1998)

Oligoglucoside elicitor-mediated activation of plant defense. *Bioessays* **20**(7):569-576

Ebel, J.; Grisebach, H. (1988)

Defense strategies of soybean against the fungus *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*: a molecular analysis. *Trends Biochem.Sci.* **13**(1):23-27

Egea, C.; Alcázar, M. D.; Candela, M. E. (1996)

β -1,3-glucanase and chitinase as pathogenesis-related proteins in the defense reaction of two *Capsicum annuum* cultivars infected with cucumber mosaic virus. *Biologia Plantarum* **38**(3):437-443

Ellis, J.; Dodds, P.; Pryor, T. (2000a)

Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Curr.Opin.Plant Biol.* **3**(4):278-284

Ellis, J.; Dodds, P.; Pryor, T. (2000b)

The generation of plant disease resistance gene specificities. *Trends Plant Sci.* **5**(9):373-379

Erickson, F. L.; Dinesh-Kumar, S. P.; Holzberg, S.; Ustach, C. V.; Dutton, M.; Handley, V.; Corr, C.; Baker, B. J. (1999)

Interactions between tobacco mosaic virus and the tobacco N gene. *Philos.Trans.R.Soc.Lond.B Biol.Sci.* **354**(1383):653-658

Etzler, M. E. (1998)

Oligosaccharide signaling of plant cells. *J.Cell Biochem.Suppl* **30-31**:123-128

Fang, R. X.; Pang, Z.; Gao, D. M.; Mang, K. Q.; Chua, N. H. (1991)

cDNA sequence of a virus-inducible, glycine-rich protein gene from rice. *Plant Mol.Biol.* **17**(6):1255-1257

Fincher, G. B.; Stone, B. A.; Clarke, A. E. (1983)

Arabinogalactan-proteins: Structure, biosynthesis, and function. *Annu.Rev.Plant Physiol.* **34**: 47-70

Flor, H. H. (1942)

Inheritance of pathogenicity in a cross between physiologic races 22 and 24 of *Melampsora lini*. *Phytopathol.* **32**:5

Flor, H. H. (1955)

Host-parasite interaction in flax rust – its genetics and other implications. *Phytopathol.* **45**: 680-685

Flor, H. H. (1971)

Current status of the gene-for-gene concept. *Annu.Rev.Phytopathol.* **9**:275-296

Florack, D. E.; Stiekema, W. J. (1994)

Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of action. *Plant Mol.Biol.* **26(1)**:25-37

Frandsen, G. I.; Mundy, J.; Tzen, J. T. (2001)

Oil bodies and their associated proteins, oleosin and caleosin. *Physiol.Plant.* **112(3)**:301-307

Frank, S. A. (1992)

Models of plant-pathogen coevolution. *Trends Genet.* **8(6)**:213-219

Freire, M. A.; Pages, M. (1995)

Functional characteristics of the maize RNA-binding protein MA16. *Plant Mol.Biol.* **29(4)**:797-807

Fröhlich, G. (1991)

Wörterbücher der Biologie: Phytopathologie und Pflanzenschutz (UTB für Wissenschaft: Uni-Taschenbücher, Nr. 867), 2., überarbeitete Ausgabe, Gustav Fischer Verlag, Jena

Fry, S. C. (1982)

Isodityrosine, a new cross-linking amino acid from plant cell-wall glycoprotein. *Biochem.J.* **204(2)**:449-455

Fry, S. C. (1986)

Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annu.Rev.Plant Physiol.* **37**:165-186

Fry, S. C.; Aldington, S.; Hetherington, P. R.; Aitken, J. (1993)

Oligosaccharides as signals and substrates in the plant cell wall. *Plant Physiol.* **103(1)**:1-5

Fukushima, Y. (1998)

Genetically engineered syntheses of tandem repetitive polypeptides consisting of glycine-rich sequence of spider dragline silk. *Biopolymers* **45(4)**:269-279

Furumoto, T.; Hata, S.; Izui, K. (2000)

Isolation and characterization of cDNAs for differentially accumulated transcripts between mesophyll cells and bundle sheath strands of maize leaves. *Plant Cell Physiol.* **41(11)**:1200-1209

Garcia-Muniz, N.; Martinez-Izquierdo, J. A.; Puigdomènech, P. (1998)

Induction of mRNA accumulation corresponding to a gene encoding a cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein by fungal elicitors. *Plant Mol.Biol.* **38(4)**:623-632

Garcia-Olmedo, F.; Molina, A.; Alamillo, J. M.; Rodriguez-Palenzuela, P. (1998)

Plant defense peptides. *Biopolymers* **47(6)**:479-491

Goddemeier, M. L.; Wulff, D.; Feix, G. (1998)

Root-specific expression of a *Zea mays* gene encoding a novel glycine-rich protein, zmGRP3. *Plant Mol.Biol.* **36(5)**:799-802

Gomez, J.; Sanchez-Martinez, D.; Stiefel, V.; Rigau, J.; Puigdomènech, P.; Pages, M. (1988)

A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glycine-rich protein. *Nature* **334(6179)**:262-264

Grant, M.; Mansfield, J. (1999)

Early events in host-pathogen interactions. *Curr.Opin.Plant Biol.* **2(4)**:312-319

Groten, K.; Barz, W. (2000)

Elicitor-induced defence reactions in cell suspension cultures of soybean cultivars. *Z.Naturforsch.[C.]* **55(9-10)**:718-730

Guiltinan, M. J.; Niu, X. (1996)

cDNA encoding a wheat (*Triticum aestivum* cv. Chinese spring) glycine-rich RNA-binding protein. *Plant Mol.Biol.* **30(6)**:1301-1306

Hanano, S.; Sugita, M.; Sugiura, M. (1996)

Isolation of a novel RNA-binding protein and its association with a large ribonucleoprotein particle present in the nucleoplasm of tobacco cells. *Plant Mol.Biol.* **31(1)**:57-68

Hanselle, T. (2000)

Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen apoplastidärer Komponenten aus *Ascochyta rabiei* infizierten Kichererbsenpflanzen (*Cicer arietinum* L.). Doktorarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

Hanselle, T.; Barz, W. (1995)

PR-Proteins from the intercellular washing fluid of *Ascochyta rabiei* infected chickpea leaves. In: 4th International Workshop of Pathogenesis-Related Proteins in Plants: Biology and Biotechnology Potential (Abstract Book), Kloster Irsee

Hawtin, G. C. (1989)

Cicer arietinum L. In: Rehm (ed.): Spezieller Pflanzenbau in den Tropen und Subtropen. Handbuch der Landwirtschaft und Ernährung in den Entwicklungsländern, Bd. 4, 2. Auflage, S. 256-257, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

Heath, M. C. (2000)

Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr.Opin.Plant Biol.* **3(4)**:315-319

Heintzen, C.; Fischer, R.; Melzer, S.; Kappeler, K.; Apel, K.; Staiger, D. (1994a)

Circadian oscillations of a transcript encoding a germin-like protein that is associated with cell walls in young leaves of the long-day plant *Sinapis alba* L. *Plant Physiol.* **106(3)**:905-915

Heintzen, C.; Melzer, S.; Fischer, R.; Kappeler, S.; Apel, K.; Staiger, D. (1994b)

A light- and temperature-entrained circadian clock controls expression of transcripts encoding nuclear proteins with homology to RNA-binding proteins in meristematic tissue. *Plant J.* **5(6)**:799-813

Heintzen, C.; Nater, M.; Apel, K.; Staiger, D. (1997)

AtGRP7, a nuclear RNA-binding protein as a component of a circadian-regulated negative feedback loop in *Arabidopsis thaliana*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. **94(16)**:8515-8520

Hejgaard, J.; Jacobsen, S.; Svendsen, I. (1991)

Two antifungal thaumatin-like proteins from barley grain. FEBS Lett. **291(1)**:127-131

Heslot, H. (1998)

Artificial fibrous proteins: a review. Biochimie **80(1)**:19-31

Hoffmann, G. M.; Nienhaus, F.; Poehling, H. M.; Schönbeck, F.; Weltzien, H. C.; Wilbert, H. (1994)

Lehrbuch der Phytomedizin, 3. Auflage, Blackwell, Berlin

Hoffmann, K.; Stoffel, W. (1993)

TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. Biol.Chem.Hoppe-Seyler **374**:166

Holt, B. F.; Mackey, D.; Dangl, J. L. (2000)

Recognition of pathogens by plants. Curr.Biol. **10(1)**:R5-R7

Hong, H. P.; Ross, J. H.; Gerster, J. L.; Rigas, S.; Datla, R. S.; Hatzopoulos, P.; Scoles, G.; Keller, W.; Murphy, D. J.; Robert, L. S. (1997)

Promoter sequences from two different *Brassica napus* tapetal oleosin- like genes direct tapetal expression of beta-glucuronidase in transgenic Brassica plants. Plant Mol.Biol. **34(3)**:549-555

Horvath, D. P.; Olson, P. A. (1998)

Cloning and characterization of cold-regulated glycine-rich RNA-binding protein genes from leafy spurge (*Euphorbia esula* L.) and comparison to heterologous genomic clones. Plant Mol.Biol. **38(4)**:531-538

Höhl, B.; Pfautsch, M.; Barz, W. (1990)

Histology of disease development in resistant and susceptible cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.) inoculated with spores of *Ascochyta rabiei*. J.Phytopathol. **129**:31-45

Ichinose, Y.; Tiemann, K.; Schwenger-Erger, C.; Toyoda, K.; Hein, F.; Hanselle, T.; Cornels, H.; Barz, W. (2000)

Genes expressed in *Ascochyta rabiei*-inoculated chickpea plants and elicited cell cultures as detected by differential cDNA-hybridization. Z.Naturforsch. **55c**:44-54

Innes, R. W. (1995)

Plant-parasite interactions: has the gene-for-gene model become outdated? Trends Microbiol. **3(12)**:483-485

Jackson, P. A.; Galinha, C. I.; Pereira, C. S.; Fortunato, A.; Soares, N. C.; Amancio, S. B.; Ricardo, C. P. (2001)

Rapid Deposition of Extensin during the Elicitation of Grapevine Callus Cultures Is Specifically Catalyzed by a 40-Kilodalton Peroxidase. Plant Physiol. **127(3)**:1065-1076

- Jones, D. A.; Brading, P.; Dixon, M.; Hammond-Kosack, K.; Harrison, K.; Hatzixanthis, K.; Parniske, M.; Piedras, P.; Torres, M.; Tang, S.; Thomas, C.; Jones, J. D. (1998)**
Molecular, genetic and physiological analysis of *Cladosporium* resistance gene function in tomato. *Symp.Soc.Exp.Biol.* **51**:111-113
- Jones, D. A.; Thomas, C. M.; Hammond-Kosack, K. E.; Balint-Kurti, P. J.; Jones, J. D. (1994)**
Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* **266(5186)**:789-793
- Josè, M.; Puigdomènech, P. (1993)**
Structure and expression of genes coding for structural proteins of the cell wall. *New Phytol.* **125**:259-282
- Judelson, H. S. (1997)**
The genetics and biology of *Phytophthora infestans*: modern approaches to a historical challenge. *Fungal.Genet.Biol.* **22(2)**:65-76
- Kaldenhoff, R.; Richter, G. (1989)**
Sequence of cDNA for a novel light-induced glycine-rich protein. *Nucleic Acids Res.* **17(7)**:2853
- Kamoun, S. (2001)**
Nonhost resistance to Phytophthora: novel prospects for a classical problem. *Curr.Opin.Plant Biol.* **4(4)**:295-300
- Keen, N. T. (1990)**
Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu.Rev.Genet.* **24**:447-463
- Keller, B.; Baumgartner, C. (1991)**
Vascular-specific expression of the bean GRP 1.8 gene is negatively regulated. *Plant Cell* **3(10)**:1051-1061
- Keller, B.; Heierli, D. (1994)**
Vascular expression of the grp1.8 promoter is controlled by three specific regulatory elements and one unspecific activating sequence. *Plant Mol.Biol.* **26(2)**:747-756
- Keller, B.; Sauer, N.; Lamb, C. J. (1988)**
Glycine-rich cell wall proteins in bean: gene structure and association of the protein with the vascular system. *EMBO J.* **7(12)**:3625-3633
- Keller, B.; Templeton, M. D.; Lamb, C. J. (1989)**
Specific localization of a plant cell wall glycine-rich protein in protoxylem cells of the vascular system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **86** :1529-1533
- Kjellbom, P.; Snogerup, L.; Stohr, C.; Reuzeau, C.; McCabe, P. F.; Pennell, R. I. (1997)**
Oxidative cross-linking of plasma membrane arabinogalactan proteins. *Plant J.* **12(5)**:1189-1196

Kleis-San Francisco, S. M.; Tierney, M. L. (1990)

Isolation and characterization of a proline-rich cell wall protein from soybean seedlings. *Plant Physiol.* **94**:1897-1902

Knapp, E.; da Camara, M. A.; Puhlinger, H.; Wang, Q.; Hanzer, V.; Weiss, H.; Weiss, B.; Katinger, H.; Laimer da Camara, M. M. (1995)

Localization of fruit tree viruses by immuno-tissue printing in infected shoots of *Malus* sp. and *Prunus* sp. *J.Virol.Methods* **55(2)**:157-173

Koiwa, H.; Kato, H.; Nakatsu, T.; Oda, J.; Yamada, Y.; Sato, F. (1997)

Purification and characterization of tobacco pathogenesis-related protein PR-5d, an antifungal thaumatin-like protein. *Plant Cell Physiol.* **38(7)**:783-791

Köhler, G.; Barz, W. (1995)

Infection studies of *Cicer arietinum* (L.) with GUS-(*E. coli* β -glucuronidase) transformed *Ascochyta rabiei* strains. *J.Phytopathol.* **143**:589-995

Körber-Grohne, U. (1987)

Kichererbse, Kicher (*Cicer arietinum* L.). In: Nutzpflanzen in Deutschland, Kulturgeschichte und Biologie, S. 361-363, Verlag Theiss, Stuttgart

Kreuger, M.; van Holst, G. J. (1996)

Arabinogalactan proteins and plant differentiation. *Plant Mol.Biol.* **30(6)**:1077-1086

Küster, H.; Schröder, G.; Frühling, M.; Pich, U.; Rieping, M.; Schubert, I.; Perlick, A. M.; Pühler, A. (1995)

The nodule-specific VfENOD-GRP3 gene encoding a glycine-rich early nodulin is located on chromosome I of *Vicia faba* L. and is predominantly expressed in the interzone II-III of root nodules. *Plant Mol.Biol.* **28(3)**:405-421

Laberge, S.; Castonguay, Y.; Vezina, L. P. (1993)

New cold- and drought-regulated gene from *Medicago sativa*. *Plant Physiol.* **101(4)**:1411-1412

Ladizinsky, G.; Pickersgill, B.; Yamamoto, K. (1988)

Exploitation of wild relatives of the food legumes. In: Summerfield, R. J. (ed.): *World Crops: Cool Season Food Legumes*, S. 967-978, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande

Laemmli, U. K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227(259)**:680-685

Lam, E.; Kato, N.; Lawton, M. (2001)

Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* **411(6839)**:848-853

Lamb, C. J. (1994)

Plant disease resistance genes in signal perception and transduction. *Cell* **76(3)**:419-422

- Lawrence, C. B.; Joosten, M. H. A. J.; Tuzun, S. (1996)**
Differential induction of pathogenesis-related proteins in tomato by *Alteraria solani* and the association of a basic chitinase isozyme with resistance. *Physiol.Mol.Plant Path.* **48**:361-377
- Lawton, M. A.; Lamb, C. J. (1987)**
Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitor, wounding, and infection. *Mol.Cell Biol.* **7**(1):335-341
- Lei, M.; Wu, R. (1991)**
A novel glycine-rich cell wall protein gene in rice. *Plant Mol.Biol.* **16**(2):187-198
- Levine, A.; Tenhaken, R.; Dixon, R.; Lamb, C. (1994)**
H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**(4):583-593
- Linthorst, H. J. M.; Meuwissen, R. L. J.; Kauffmann, S.; Bol, J. F. (1989)**
Constitutive expression of pathogenesis-related proteins PR-1, GRP, and PR-S in tobacco has no effect on virus infection. *Plant Cell* **1**:285-291
- Linthorst, H. J. M.; Van Loon, L. C.; Memelink, J.; Bol, J. F. (1990)**
Characterization of cDNA clones for a virus-inducible, glycine-rich protein from petunia. *Plant Mol.Biol.* **15**(4):671
- Luo, M.; Lin, L. H.; Hill, R. D.; Mohapatra, S. S. (1991)**
Primary structure of an environmental stress and abscisic acid-inducible alfalfa protein. *Plant Mol.Biol.* **17**(6):1267-1269
- Luo, M.; Liu, J. H.; Mohapatra, S.; Hill, R. D.; Mohapatra, S. S. (1992)**
Characterization of a gene family encoding abscisic acid- and environmental stress-inducible proteins of alfalfa. *J.Biol.Chem.* **267**(22):15367-15374
- Majewska-Sawka, A.; Nothnagel, E. A. (2000)**
The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. *Plant Physiol.* **122**(1):3-10
- Marcus, A.; Greenberg, J. T.; Averyhart-Fullard, V. (1991)**
Repetitive proline-rich proteins in the extracellular matrix of the plant cell. *Physiol.Plant.* **81**:273-279
- Martin, G. B. (1999)**
Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors. *Curr.Opin.Plant Biol.* **2**(4):273-279
- Marty, I.; Monfort, A.; Stiefel, V.; Ludevid, D.; Delseny, M.; Puigdomènech, P. (1996)**
Molecular characterization of the gene coding for GPRP, a class of proteins rich in glycine and proline interacting with membranes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol.Biol.* **30**(3):625-636

Mas, P.; Pallas, V. (1995)

Non-isotopic tissue-printing hybridization: a new technique to study long-distance plant virus movement. *J.Virol.Methods* **52(3)**:317-326

Matsuyama, T.; Satoh, H.; Yamada, Y.; Hashimoto, T. (1999)

A maize glycine-rich protein is synthesized in the lateral root cap and accumulates in the mucilage. *Plant Physiol.* **120(3)**:665-674

McCann, M. C.; Roberts, K. (1991)

Architecture of the primary cell wall. In: Lloyd, C. W. (ed.): *The cytoskeletal basis of plant growth and form*, S. 109-129, Academic Press, San Diego, New York, Berkeley

McCann, M. C.; Wells, B.; Roberts, K. (1990)

Direct visualisation of cross-links in the primary cell wall. *J.Cell Sci.* **96**:323-334

McDowell, J. M.; Dangl, J. L. (2000)

Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochem.Sci.* **25(2)**:79-82

McPartlin, J. (1997)

Diet, politics and disaster: the great Irish famine. *Proc.Nutr.Soc.* **56(1B)**:211-223

Mellon, J. E.; Helgeson, J. P. (1982)

Interaction of a hydroxyproline-rich glycoprotein from tobacco callus with potential pathogens. *Plant Physiol.* **70**:401-405

Moerschbacher, B. M.; Reisener, H. J. (1997)

The hypersensitive resistance reaction. In: Hartleb, H., Heitefuss, R. und Hoppe, H. H. (eds.): *Resistance of crop plants against fungi*, S. 126-158, Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, Lübeck, Ulm

Molina, A.; Mena, M.; Carbonero, P.; Garcia-Olmedo, F. (1997)

Differential expression of pathogen-responsive genes encoding two types of glycine-rich proteins in barley. *Plant Mol.Biol.* **33(5)**:803-810

Morimoto, S.; Tateishi, N.; Inuyama, M.; Taura, F.; Tanaka, H.; Shoyama, Y. (1999)

Identification and molecular characterization of novel peroxidase with structural protein-like properties. *J.Biol.Chem.* **274(37)**:26192-26198

Morrissey, J. H. (1981)

Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal.Biochem.* **117(2)**:307-310

Mouly, A.; Rumeau, D.; Esquerré-Tugayé, M. T. (1992)

Differential accumulation of hydroxyproline-rich glycoprotein transcripts in sunflower plants infected with *Sclerotinia sclerotiorum* or treated with oxalic acid. *Plant Sci.* **85**:51-59

Mullis, K. B.; Faloona, F. A. (1987)

Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**:335-350

Mundy, J.; Chua, N. H. (1988)

Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO J.* **7(8)**: 2279-2286

Murphy, D. J.; Ross, J. H. (1998)

Biosynthesis, targeting and processing of oleosin-like proteins, which are major pollen coat components in *Brassica napus*. *Plant J.* **13(1)**:1-16

Mühlenbeck, U. (1993)

Untersuchungen an elicierten Zellkulturen der Kichererbse (*Cicer arietinum* L.). Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

Nakai, K. (2000)

Protein sorting signals and prediction of subcellular localization. *Adv. Protein Chem.* **54** : 277-344

Nakai, K.; Kanehisa, M. (1992)

A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics* **14(4)**:897-911

Naqvi, S. M.; Park, K. S.; Yi, S. Y.; Lee, H. W.; Bok, S. H.; Choi, D. (1998)

A glycine-rich RNA-binding protein gene is differentially expressed during acute hypersensitive response following Tobacco Mosaic Virus infection in tobacco. *Plant Mol. Biol.* **37(3)**:571-576

Nielsen, H.; Engelbrecht, J.; Brunak, S.; von Heijne, G. (1997)

Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* **10(1)**:1-6

Nürnberg, T.; Wirtz, W.; Nennstiel, D.; Hahlbrock, K.; Jabs, T.; Zimmermann, S.; Scheel, D. (1997)

Signal perception and intracellular signal transduction in plant pathogen defense. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* **17(1-3)**:127-136

Obokata, J.; Ohme, M.; Hayashida, N. (1991)

Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding a putative glycine-rich protein of 19.7 kDa in *Nicotiana sylvestris*. *Plant Mol. Biol.* **17(4)**:953-955

Okada, Y. (1999)

Historical overview of research on the tobacco mosaic virus genome: genome organization, infectivity and gene manipulation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **354(1383)**:569-582

Osborn, A. E. (1996a)

Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack. *Plant Cell* **8**:1821-1831

Osborn, A. E. (1996b)

Saponins and plant defence - a soap story. *Trends Plant Sci.* **1(1)**:4-9

Osborn, A. E. (1999)

Antimicrobial phytoprotectants and fungal pathogens: a commentary. *Fungal.Genet.Biol.* **26(3)**:163-168

Otte, O. (1998)

Frühe elicitorstimulierte Reaktionen von Zellen der Kichererbse (*Cicer arietinum* L.).
Doktorarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

Otte, O.; Barz, W. (1996)

The elicitor-induced oxidative burst in cultured chickpea cells drives the rapid insolubilization of two cell wall structural proteins. *Planta* **200**:238-246

Otte, O.; Barz, W. (2000)

Characterization and oxidative in vitro cross-linking of an extensin-like protein and a proline-rich protein purified from chickpea cell walls. *Phytochemistry* **53(1)**:1-5

Otte, O.; Pachten, A.; Hein, F.; Barz, W. (2001)

Early elicitor-induced events in chickpea cells: functional links between oxidative burst, sequential occurrence of extracellular alkalisation and acidification, K^+/H^+ exchange and defence-related gene activation. *Z.Naturforsch.[C.]* **56(1-2)**:65-76

Overkamp, S. (2000)

Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen über Cytochrom P450 Monooxygenasen aus der Biosynthese der Pterocarpan Phytoalexine der Kichererbse (*Cicer arietinum* L.). Doktorarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

Pandey, N. K.; Aronson, A. I. (1979)

Properties of the *Bacillus subtilis* spore coat. *J.Bacteriol.* **137(3)**:1208-1218

Park, A. R.; Cho, S. K.; Yun, U. J.; Jin, M. Y.; Lee, S. H.; Sachetto-Martins, G.; Park, O. K. (2001)

Interaction of the Arabidopsis receptor protein kinase Wak1 with a glycine-rich protein, AtGRP-3. *J.Biol.Chem.* **276(28)**:26688-26693

Park, C. J.; Park, C. B.; Hong, S. S.; Lee, H. S.; Lee, S. Y.; Kim, S. C. (2000)

Characterization and cDNA cloning of two glycine- and histidine-rich antimicrobial peptides from the roots of shepherd's purse, *Capsella bursa-pastoris*. *Plant Mol.Biol.* **44(2)**:187-197

Pawłowski, K.; Twigg, P.; Dobritsa, S.; Guan, C.; Mullin, B. C. (1997)

A nodule-specific gene family from *Alnus glutinosa* encodes glycine- and histidine-rich proteins expressed in the early stages of actinorhizal nodule development. *Mol.Plant Microbe Interact.* **10(5)**:656-664

Pearson, W. R. (1990)

Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol.* **183**:63-98

Pearson, W. R.; Lipman, D. J. (1988)

Improved tools for biological sequence comparison. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. **85(8)**: 2444-2448

Phillips, G. O. (1998)

Acacia gum (Gum Arabic): a nutritional fibre; metabolism and calorific value. Food Addit.Contam **15(3)**:251-264

Pontier, D.; Balague, C.; Roby, D. (1998)

The hypersensitive response. A programmed cell death associated with plant resistance. C.R.Acad.Sci.III **321(9)**:721-734

Porter, S. (1998)

Confronting famine: the case of the Irish Great Hunger. Nurs.Inq. **5(2)**:112-116

Qin, X. X.; Coyne, K. J.; Waite, J. H. (1997)

Tough tendons. Mussel byssus has collagen with silk-like domains. J.Biol.Chem. **272(51)**:32623-32627

Rausher, M. D. (2001)

Co-evolution and plant resistance to natural enemies. Nature **411(6839)**:857-864

Reddy, A. S.; Poovaiah, B. W. (1987)

Accumulation of a glycine rich protein in auxin-deprived strawberry fruits. Biochem.Biophys.Res.Comm. **147(3)**:885-891

Richter, T. E.; Ronald, P. C. (2000)

The evolution of disease resistance genes. Plant Mol.Biol. **42(1)**:195-204

Rigden, D. J.; Mello, L. V.; Bertioli, D. J. (2000)

Structural modeling of a plant disease resistance gene product domain. Proteins **41(1)**:133-143

Ringli, C.; Hauf, G.; Keller, B. (2001)

Hydrophobic interactions of the structural protein grp1.8 in the cell wall of protoxylem elements. Plant Physiol. **125(2)**:673-682

Robert, L. S.; Gerster, J.; Allard, S.; Cass, L.; Simmonds, J. (1994)

Molecular characterization of two *Brassica napus* genes related to oleosins which are highly expressed in the tapetum. Plant J. **6(6)**:927-933

Ross, J. H.; Murphy, D. J. (1996)

Characterization of anther-expressed genes encoding a major class of extracellular oleosin-like proteins in the pollen coat of Brassicaceae. Plant J. **9(5)**:625-637

Rubinelli, P.; Hu, Y.; Ma, H. (1998)

Identification, sequence analysis and expression studies of novel anther-specific genes of *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol.Biol. **37(4)**:607-619

Ruiter, R. K.; Van Eldik, G. J.; Van Herpen, R. M.; Schrauwen, J. A.; Wullems, G. J. (1997)

Characterization of oleosins in the pollen coat of *Brassica oleracea*. *Plant Cell* **9(9)**:1621-1631

Ryan, C. A. (1989)

Proteinase inhibitor gene families: strategies for transformation to improve plant defenses against herbivores. *Bioessays* **10(1)**:20-24

Ryser, U.; Keller, B. (1992)

Ultrastructural localization of a bean glycine-rich protein in unlignified primary walls of protoxylem cells. *Plant Cell* **4**:773-783

Ryser, U.; Schorderet, M.; Zhao, G. F.; Studer, D.; Ruel, K.; Hauf, G.; Keller, B. (1997)

Structural cell-wall proteins in protoxylem development: evidence for a repair process mediated by a glycine-rich protein. *Plant J.* **12(1)**:97-111

Sachetto-Martins, G.; Franco, L. O.; De Oliveira, D. E. (2000)

Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif? *Biochim.Biophys.Acta* **1492(1)**:1-14

Saiki, R. K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich, H. A.; Arnheim, N. (1985)

Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230(4732)**:1350-1354

Sakai, W. S. (1973)

Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue o. *Stain Technol.* **48(5)**:247-249

Sakuta, C.; Oda, A.; Yamakawa, S.; Satoh, S. (1998)

Root-specific expression of genes for novel glycine-rich proteins cloned by use of an antiserum against xylem sap proteins of cucumber. *Plant Cell Physiol.* **39(12)**:1330-1336

Sakuta, C.; Satoh, S. (2000)

Vascular tissue-specific gene expression of xylem sap glycine-rich proteins in root and their localization in the walls of metaxylem vessels in cucumber. *Plant Cell Physiol.* **41(5)**:627-638

Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. (1989)

Molecular cloning - a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977)

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **74(12)**:5463-5467

Santino, C. G.; Stanford, G. L.; Conner, T. W. (1997)

Developmental and transgenic analysis of two tomato fruit enhanced genes. *Plant Mol.Biol.* **33(3)**:405-416

- Sato, S.; Toya, T.; Kawahara, R.; Whittier, R. F.; Fukuda, H.; Komamine, A. (1995)**
Isolation of a carrot gene expressed specifically during early-stage somatic embryogenesis. *Plant Mol.Biol.* **28(1)**:39-46
- Schindler, T. (1993)**
Das neue Bild der Zellwand. *Biologie in unserer Zeit* **(2)**:113-120
- Schlösser, E. (1997)**
Allgemeine Phytopathologie, 2., neubearbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Schopfer, P. (1994)**
Histochemical demonstration and localization of H₂O₂ in organs of higher plants by tissue printing on nitrocellulose paper. *Plant Physiol.* **104**:1269-1275
- Schopfer, P.; Brennicke, A. (1999)**
Pflanzenphysiologie, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Schröder, G.; Frühling, M.; Puhler, A.; Perlick, A. M. (1997)**
The temporal and spatial transcription pattern in root nodules of *Vicia faba* nodulin genes encoding glycine-rich proteins. *Plant Mol.Biol.* **33(1)**:113-123
- Sheng, J.; D'Ovidio, R.; Mehdy, M. C. (1991)**
Negative and positive regulation of a novel proline-rich protein mRNA by fungal elicitor and wounding. *Plant J.* **1(3)**:345-354
- Showalter, A. M. (1993)**
Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* **5(1)**:9-23
- Showalter, A. M.; Butt, A. D.; Kim, S. (1992)**
Molecular details of tomato extensin and glycine-rich protein gene expression. *Plant Mol.Biol.* **19(2)**:205-215
- Showalter, A. M.; Zhou, J.; Rumeau, D.; Worst, S. G.; Varner, J. E. (1991)**
Tomato extensin and extensin-like cDNAs: structure and expression in response to wounding. *Plant Mol.Biol.* **16(4)**:547-565
- Simmonds, N. W. (1991)**
Genetics of horizontal resistance and susceptibility to disease of crops. *Biol.Rev.* **66**:189-241
- Singh, K. B.; Malhotra, R. S.; Mühlbauer, F. J. (1984)**
An annotated Bibliography of Chickpea Genetics and Breeding 1915-1983, ICARDA/ICRISAT, Aleppo, Syrien und Hyderabad, Indien
- Singh, K. B.; Van der Maesen, L. J. G. (1977)**
Chickpea Bibliography 1930-1974, ICRISAT, Patancheru A.P., Indien

Staskawicz, B. J.; Ausubel, F. M.; Baker, B. J.; Ellis, J. G.; Jones, J. D. (1995)

Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* **268(5211)**:661-667

Stählin, A. (1957)

Cicer arietinum L. Kichererbse. In: Die Beurteilung der Futtermittel. Methodenbuch Bd. XII, S. 337, Verlag Neumann, Radebeul, Berlin

Steinert, P. M.; Mack, J. W.; Korge, B. P.; Gan, S. Q.; Haynes, S. R.; Steven, A. C. (1991)

Glycine loops in proteins: their occurrence in certain intermediate filament chains, loricrins and single-stranded RNA binding proteins. *Int.J.Biol.Macromol.* **13(3)**:130-139

Stryer, L. (1994)

Biochemie, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D. G. (1997)

The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25(24)**:4876-4882

Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. (1994)

CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22(22)**:4673-4680

Tiemann, K.; Inze, D.; Van Montagu, M.; Barz, W. (1991)

Pterocarpan phytoalexin biosynthesis in elicitor-challenged chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell cultures. Purification, characterization and cDNA cloning of NADPH:isoflavone oxidoreductase. *Eur.J.Biochem.* **200(3)**:751-757

Ting, J. T.; Wu, S. S.; Ratnayake, C.; Huang, A. H. (1998)

Constituents of the tapetosomes and elaioplasts in *Brassica campestris* tapetum and their degradation and retention during microsporogenesis. *Plant J.* **16(5)**:541-551

Van der Biezen, E. A.; Jones, J. D. (1998)

Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem.Sci.* **23(12)**:454-456

Van der Plank, J. E. (1968)

Disease Resistance in Plants, Academic Press, New York

Van Kan, J. A.; Cornelissen, B. J.; Bol, J. F. (1988)

A virus-inducible tobacco gene encoding a glycine-rich protein shares putative regulatory elements with the ribulose biphosphate carboxylase small subunit gene. *Mol.Plant Microbe Interact.* **1(3)**:107-112

Van Loon, L. C. (1999)

Occurrence and properties of plant-pathogenesis-related proteins. In: Datta, S. K. und Muthukrishnan, S. (eds.): Pathogenesis-related proteins in plants, S. 1-20, CRC-Press, Boca-Raton, London, New York, Washington DC

Varner, J. E.; Cassab, G. I. (1986)

A new protein in petunia. *Nature* **323**:110

Varner, J. E.; Ye, Z. (1994)

Tissue printing. *FASEB J.* **8(6)**:378-384

Velazhahan, R.; Datta, S. K.; Muthukrishnan, S. (1999)

The PR-5 family: thaumatin-like proteins. In: Datta, S. K. und Muthukrishnan, S. (eds.): Pathogenesis-related proteins in plants, S. 107-129, CRC-Press, Boca-Raton, London, New York, Washington DC

Vogelsang, R.; Berger, E.; Hagedorn, T.; Mühlenbeck, U.; Tenhaken, R.; Barz, W. (1994)

Characterization of metabolic changes involved in hypersensitive-like browning reactions of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell cultures following challenge by *Ascochyta rabiei* culture filtrate. *Physiol.Mol.Plant Path.* **44**:141-155

Vollrath, F. (1999)

Biology of spider silk. *Int.J.Biol.Macromol.* **24(2-3)**:81-88

Waffenschmidt, S.; Woessner, J. P.; Beer, K.; Goodenough, U. W. (1993)

Isodityrosine cross-linking mediates insolubilization of cell walls in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* **5(7)**:809-820

Waite, J. H.; Qin, X. X.; Coyne, K. J. (1998)

The peculiar collagens of mussel byssus. *Matrix Biol.* **17(2)** :93-106

Wallace, G.; Fry, S. C. (1994)

Phenolic components of the plant cell wall. *Int.Rev.Cytol.* **151**:229-267

Wang, T. W.; Balsamo, R. A.; Ratnayake, C.; Platt, K. A.; Ting, J. T.; Huang, A. H. (1997)

Identification, subcellular localization, and developmental studies of oleosins in the anther of *Brassica napus*. *Plant J.* **11(3)**:475-487

Yang, Y.; Shah, J.; Klessig, D. F. (1997)

Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.* **11(13)**:1621-1639

Yasuda, E.; Ebinuma, H.; Wabiko, H. (1997)

A novel glycine-rich/hydrophobic 16 kDa polypeptide gene from tobacco: similarity to proline-rich protein genes and its wound-inducible and developmentally regulated expression. *Plant Mol.Biol.* **33(4)**:667-678

Ye, X. Y.; Wang, H. X.; Ng, T. B. (1999)

First chromatographic isolation of an antifungal thaumatin-like protein from French bean legumes and demonstration of its antifungal activity. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **263(1)**:130-134

Ye, Z. H.; Song, Y. R.; Marcus, A.; Varner, J. E. (1991)

Comparative localization of three classes of cell wall proteins. *Plant J.* **1(2)**:175-183