

Untersuchungen an *Datura stramonium* Hairy Root Wurzelkulturen im Hinblick auf das Enzym Littorinmutase

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

der

Universität Karlsruhe

angenommene

DISSERTATION

von

Diplom-Chemikerin

Gaby Morlock

aus Pforzheim

Dekan: Prof. Dr. M. Metzler

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Rétey

2. Gutachter: Prof. Dr. A. Ulrich

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2002

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie, Lehrstuhl Biochemie, der Universität Karlsruhe (TH), unter der Leitung von Prof. Dr. J. Rétey in der Zeit von Oktober 1999 bis Dezember 2002 angefertigt.

Herrn Prof. Dr. J. Rétey danke ich recht herzlich für die Übergabe dieses anspruchsvollen Themas und das Vertrauen, welches er mir damit entgegengebracht hat. Es hat mir Freude bereitet mich an neuen, modernen Methoden zu versuchen. Ich habe die freie Hand dabei stets genossen. Auch habe ich immer Unterstützung erfahren, wenn ich einmal ein Projekt ausserhalb des eigenen Institutes bearbeiten wollte. Vielen Dank!

Bei Herrn Dr. M. Focke (Botanisches Institut) bekenne ich mich recht herzlich dafür, dass er oft der Retter in letzter Not war. Sowie für die unzähligen praktischen und theoretischen Tipps die er mir im gesamten Verlauf der Dissertation gegeben hat. Und natürlich Herrn Volk (Werkstatt des botanischen Instituts) der ein Schneidewerkzeug zum Aufschluss der Wurzeln gefertigt hat.

Herrn Dr. E. Gottwald (IMB, Forschungszentrum Karlsruhe) und seinem Laborteam möchte ich recht herzlichen Dank sagen für die großzügige apparative und materielle Unterstützung bei der Durchführung der 2D-Gelelektrophorese. Ebenso für die freundliche Aufnahme im Laboralltag. Herrn Dr. Gottwald gilt mein spezieller Dank für die zahlreichen praktischen Tipps auch während des Erziehungsurlaubs, sowie sein persönliches Interesse an der Verbesserung der "suboptimalen" Gele.

Mein besonderer Dank gilt auch:

- Herrn Dr. H. Delincée (Bundesforschungsanstalt für Ernährung) für die Bereitschaft mich an der Kapillarelektrophorese arbeiten zu lassen.
- Simone Hartung die diese Arbeit mit Ihrer Diplomarbeit ein Stück vorwärts bewegt hat.
- Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Arbeitskreises Rétey, denn die gute Arbeitsatmosphäre trug wesentlich zum Gelingen der Arbeit bei. Besonders die Tee- und Kaffeerunden, (vor allem mit Nadia, Sandra, Heimi und Anja) in denen Ideen und Ratschläge ausgetauscht wurden, haben mich oft weitergebracht. Und natürlich die "Wiesensitzungen", die ab und zu zur Aufheiterung nötig waren.
- Herrn Dr. H. Körner für die vielen Tipps rund um die Maldi-Analyse.
- Herrn Jens Weinbrecht für die Überarbeitung des Manuskripts zu dieser Arbeit.
- Meinen Eltern für die Übernahme der Druckkosten.

In Dankbarkeit

meinen Eltern

Veröffentlichung

Röther, D., Poppe, L., Morlock, G., Viergutz, S., Rétey, J. (2002).

An active site homology model of phenylalanine ammonia-lyase from *P. crispum*

Eur. J. Biochem., **269**, 3065-3075.

Inhaltsverzeichnis	Seite
I. Einleitung	1
1.1 Vitamin-B ₁₂	1
1.2 S-Adenosylmethionin	2
1.3 S-Adenosylmethionin ein B ₁₂ -Analogon in Pflanzen?	5
1.4 Radikalische Umlagerung von Littorin nach Hyoscyamin; die Littorinmutase-Reaktion	6
1.5 Alkaloidbiosyntheseweg	11
1.6 Hairy Roots und <i>Datura stramonium</i>	13
II. Themenstellung	14
III. Material	15
3.1 Chemikalien/Verbrauchsmaterialien und Bezugsquellen	15
3.1.1 Wurzelkulturen	15
3.1.2 Alkaloidbestimmung	15
3.1.3 Aktivitätstest	15
3.1.4 Proteinaufschluss	16
3.1.5 SDS/Nativ-Gelelektrophorese	16
3.1.6 2D-Gelelektrophorese	16
3.1.7 Blau-Native-Polyacrylamidelektrophorese	17
3.1.8 Radioaktive Arbeiten	18
3.1.9 Genbibliothek/RNA-Isolierung	18
3.1.10 Gentechnische Arbeiten	19
3.1.11 Leitersequenzierung	19
3.1.12 Kapillarelektrophorese	19
3.2 Geräte	20
3.2.1 Wurzelkulturen	20
3.2.2 Alkaloidbestimmung/Aktivitätstest	20
3.2.3 Proteinaufschluss	20
3.2.4 SDS/Nativ-Gelelektrophorese	20
3.2.5 2D-Gelelektrophorese	21
3.2.6 Blau-Native-Polyacrylamidelektrophorese	21

3.2.7 Radioaktive Arbeiten	21
3.2.8 Gentechnische Arbeiten	21
3.2.9 Allgemeine Geräte	22
3.2.10 Allgemeine Verbrauchsmaterialien	23
3.3 Molekularbiologische Kits	23
3.4 Enzyme	24
3.5 Oligonukleotide für die Sequenzierung, PCR, Bindemotivsuche	24
3.6 Organismen, Vektoren, DNA- und Proteinstandards	25
IV. Medien, Puffer und Stammlösungen	26
4.1 Kulturmedien	26
4.2 Puffer und Stammlösungen	27
4.2.1 Aufschlusspuffer	27
4.2.2 Puffer und Stammlösungen für die Elektrophorese	28
4.2.3 Puffer für die Enzymisolierung	32
4.2.4 Stammlösungen	33
V. Methoden	34
5.1 Steriltechnik	34
5.2 Mikrobiologische Arbeitstechniken	34
5.2.1 Herstellung einer Glycerinkultur	34
5.2.2 Ausstrich von Glycerinkulturen auf Agarplatten	34
5.2.3 Ansetzen einer Übernachtskultur	34
5.2.4 Herstellung elektrokompetenter Bakterienzellen	35
5.3 DNA relevante Arbeitstechniken	35
5.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA	35
5.3.2 DNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial	36
5.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	36
5.3.4 Agarose-Gelelektrophorese	36
5.3.5 Isolierung von DNA aus dem Agarosegel	37
5.3.6 Restriktionsverdau von Nukleinsäuren	37
5.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten	38
5.3.8 Elektrotransformation in Bakterienzellen	38

5.3.9 Amplifikation von DNA mit Hilfe der „Polymerase Chain Reaction“ (PCR)	39
5.3.10 DNA-Sequenzierung	40
5.3.11 Klonierung mit dem Perfectly Blunt™ Cloning Kit	40
5.4 Herstellung einer cDNA-Bibliothek und RNA relevante Arbeitstechniken	42
5.4.1 Allgemeines zum Umgang mit RNA	42
5.4.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial	43
5.4.3 mRNA-Isolierung	44
5.4.4 Bibliothekserstellung	45
5.4.5 Reverse Transkription	51
5.5 Bindemotivsuche	51
5.5.1 PCR	51
5.5.2 Colony Blots/Hybridisierung	53
5.5.3 Differential Display	54
5.5.4 DNA-Chip Technologie	56
5.5.5 RACE PCR/Terminale Transferase	56
5.6 Proteinchemische Arbeiten	58
5.6.1 Aufschluss der Wurzelkulturen	58
5.6.2 Aktivitätstest auf Littorinmutase	58
5.6.3 SDS/Nativ-Polyacrylamidelektrophorese	59
5.6.4 Direkte SDS Probenvorbereitung aus Wurzeln	61
5.6.5 Coomassie/Silberfärbung	61
5.6.6 Proteinblot zur radioaktiven Bindungsstudie von SAM	62
5.7 2D-Gelelektrophorese	65
5.7.1 Probenvorbereitung	65
5.7.2 Proteinbestimmung für die 2D-Gelelektrophorese	66
5.7.3 Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)	67
5.7.4 Die zweite Dimension	69
5.7.5 Silberfärbung	70
5.7.6 Sypro® Ruby Färbung	71
5.7.7 Coomassie Färbung	72
5.7.8 Colloidale-Coomassie Färbung	72

5.7.9 In-Gel Verdau und Maldi-Tof Proteinbestimmung für die 2D-Gelelektrophorese	73
5.8 Blau-Native-Polyacrylamidelektrophorese	75
5.9 <i>Datura stramonium</i> Wurzelkulturen	78
5.9.1 Induktion der Hairy Roots	78
5.9.2 Kulturerhaltung	80
5.10 Alkaloidbestimmung	80
5.11 Kapillarelektrophorese	85
5.12 Leitersequenzierung	85
VI. Eigene Arbeiten	88
6.1 Induktion von Hairy Roots aus <i>Datura stramonium</i>	88
6.2 Messreihen an den vorhandenen Wurzelkulturlinien	89
6.3 Herstellung einer cDNA-Bibliothek	90
6.4 Versuche zur Aktivierung der Littorinmutase	92
6.5 Bindemotivsuche	96
6.5.1 PCR	97
6.5.2 Colony Blots/Hybridisierung	99
6.6. Möglichkeiten zur Steigerung und Unterdrückung des Hyoscyamingehaltes in den Wurzelzellen	102
6.7 Auswirkungen der Induktion/Inhibition	103
6.7.1 Proteinebene	104
6.7.1.1 2D-Gelelektrophorese	104
6.7.1.2 Maldi aus der 2D-Gelelektrophorese	108
6.7.1.3 Blau-Native-Gelelektrophorese	111
6.7.1.4 Maldi aus der Blau-Nativen-Gelelektrophorese	117
6.7.1.5 Leitersequenzierung aus der Blau-Nativen-Gelelektrophorese	120
6.7.2 mRNA-Ebene	121
6.7.2.1 Differential Display	121
6.7.2.2 mRNA-Polyacrylamidgelelektrophorese	122
6.8 Radioaktive Fütterungsversuche	125

VII. Diskussion	129
7.1 Messreihen an den vorhandenen Wurzelkulturlinien	129
7.2 Aktivitätstest	128
7.3 Bindemotivsuche	130
7.4 2D-Gelelektrophorese	131
7.5 Blau-Native-Gelelektrophorese	133
7.6 Radioaktive Fütterungsversuche	134
VIII. Zusammenfassung und Ausblick	135
IX. Literatur	137
X. Anhang	
Anhang I: 2D-Gele	143
Anhang II: Blau-Native-Polyacrylamidgele	154

Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolut
ACA	6-Amino-capronsäure (6-Amino-hexansäure)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
Bis-Tris	<i>Bis</i> (2-hydroxyethyl)amino- <i>tris</i> (hydroxymethyl)methan
BN	Blau-Nativ
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	circa
CC	Colloidal-Coomassie
cDNA	copy Desoxyribonucleic Acid
CoA	Coenzym A
Cy5	N,N'-biscarboxypentyl-5,5'-disulfonatoindodicarbocyanine Cyanin Farbstoff
Chaps	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
2D	2 Dimensionale
D	Dalton (g/mol)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
<i>D. stramonium</i>	<i>Datura stramonium</i>
DTT	Dithiothreitol
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
EC	Enzyme Commission (Nomenklatur)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FAM	6-Carboxyfluorescein (Fluorescein)
g	Gramm
g	g-Kraft, relative Zentrifugalkraft
GCMS	Gaschromatograph mit Massenspektrometer gekoppelt
h	Stunden
HPLC	Hiph Performance Liquid Chromatographie
HV	Hochvakuum
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
Kan	Kanamycin
Kap.	Kapitel
kbp	1000 (kilo) Basenpaare
l	Liter
LB	Luria-Bertani
Maldi	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MeJa	Methyljasmonat
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NP 40	Nonident P40
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm

Abkürzungsverzeichnis

p.a.	pro analysis
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction
pI	Isoelektrischer Punkt
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidone
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RNA	Ribonucleic Acid
RNase	Ribonuclease
mRNA	messenger-RNA
tRNA	transfer-RNA
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkriptase/Transkription oder Raumtemperatur
S.	Seite
s	Sekunden
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TBE	Tris/Borat/EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T _m	Schmelztemperatur
Tof	time of flight
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
tRNA	transfer Ribonucleic Acid
U	Internationale Enzymeinheit
ÜNK	Übernachtskultur
V	Volt
Vh	Voltstunden (Zeit die eine bestimmte Spannung anliegt)

I. Einleitung

1.1 Vitamin-B₁₂

Viele chemisch ungewöhnliche, enzymatische Reaktionen verlaufen über radikalische Zwischenstufen. Jedoch stehen nur wenige Cofaktoren zur Verfügung um z.B. ein H-Atom aus einer nichtaktivierten Alkan Position abstrahieren zu können. Dies sind zum einen das Cytochrom P450 und zum anderen das 5'-Desoxyadenosylradikal. Dieses entsteht primär aus Coenzym-B₁₂.

Im Jahre 1948 gelang es Folkers *et al.* erstmalig, Vitamin-B₁₂ aus Leber zu kristallisieren. Seit damals wurden Tausende von Veröffentlichungen geschrieben, welche Aspekte wie die Corrinoidstruktur, Chemie, Metabolismus, Synthese, Biosynthese, Transport, Enzymologie, ernährungswissenschaftliche Aspekte des Vitamin-B₁₂, als auch die Rolle von B₁₂ in Medizin und Landwirtschaft behandeln.

Die einzelnen Coenzym-B₁₂-Derivate unterscheiden sich in jeweils einem axialen Liganden. Wird z.B. der 5'-Desoxyadenosyl-Rest des Coenzym-B₁₂ durch Cyanid ersetzt, so gelangt man zum Vitamin-B₁₂.

Während das Vitamin-B₁₂ ausschließlich in Bakterien biosynthetisiert werden kann, wird das daraus abgeleitete Coenzym-B₁₂ sowohl von Bakterien als auch von Mensch und Tier genutzt. Die bekannteste, in allen Spezies vorkommende Reaktion ist die Umlagerung von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA (Abb.1). Diese Reaktion ist beim Abbau ungeradzahligter Fettsäuren von Bedeutung.

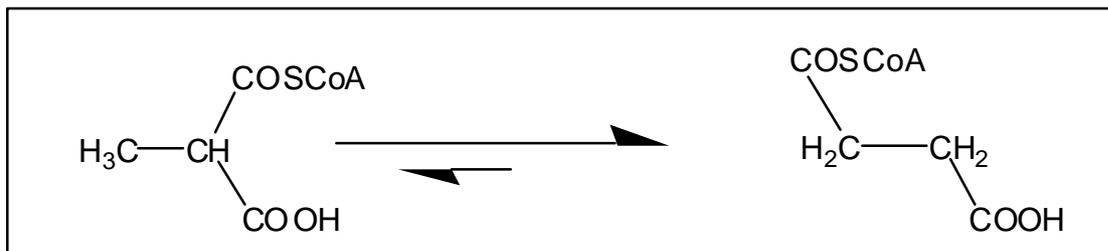


Abb.1: Reaktion von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA

Adenosylcobalamin abhängige Reaktionen werden durch die Homolyse der Kohlenstoff-Cobalt-Bindung initiiert. Das 5'-Desoxyadenosylradikal abstrahiert das migrierende Wasserstoffatom vom Substrat. Dadurch wird ein Substratradikal gebildet, welches sich zum Produktadikal umlagert. Zum Schluss der Enzymkaskade abstrahiert das Produktadikal eines der drei Wasserstoffatome des 5'-Desoxyadenosin, um das Produkt zu bilden und das 5'-Desoxyadenosylradikal zu regenerieren (Abb. 2, folgende Seite).

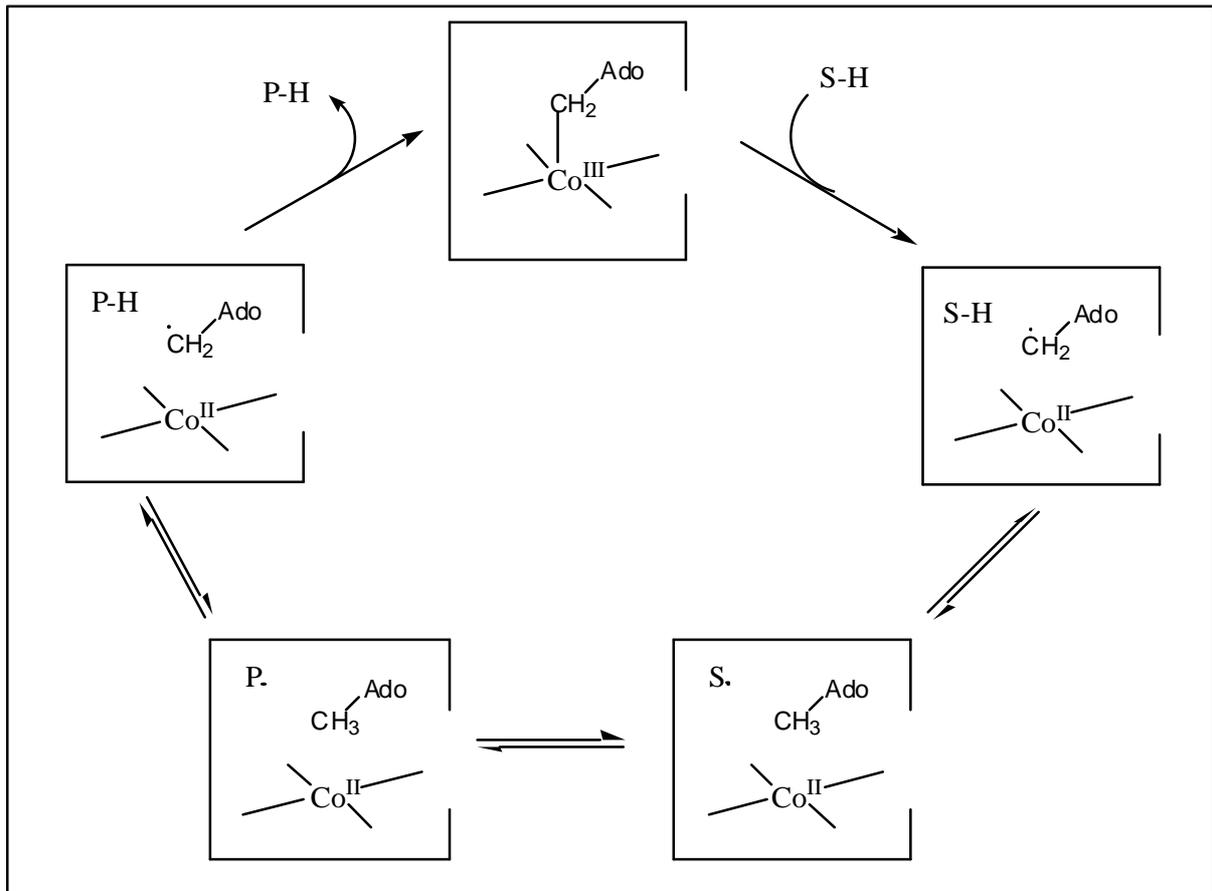


Abb. 2: Mechanistische Rolle von Adenosylcobalamin bei enzymatischen Isomerisierungsreaktionen (S: Substrat, P: Produkt)

1.2 S-Adenosylmethionin [Frey *et al.* 2000, Frey *et al.* 1998]

Als zweite Quelle des 5'-Deoxyadenosylradikals wurde in den 80er Jahren das S-Adenosylmethionin (SAM) entdeckt. SAM kommt in allen Lebewesen vor. Seine klassische Aufgabe ist die Methylierung von DNA, Hormonen, Neurotransmittern und Komponenten der Signaltransduktion. Bei der Reaktion von Lysin-2,3-Aminomutase (Abb. 3) aus *Clostridien* ist die Rolle von SAM jedoch grundlegend verschieden. Der 5'-Deoxyadenosyl-Rest des S-Adenosylmethionin initiiert bei dieser Reaktion einen Wasserstofftransfer, ähnlich der adenosylcobalaminabhängigen Reaktionen.

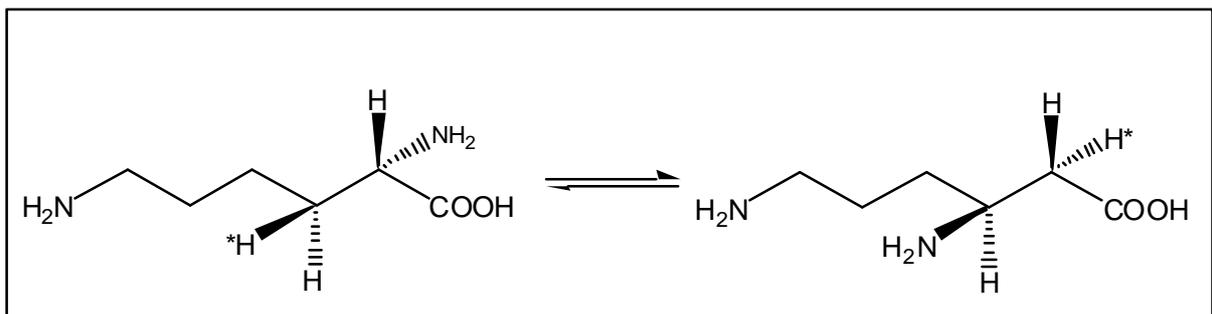


Abb. 3: Reaktionsschema der Lysin-2,3-Aminomutase

I Einleitung

S-Adenosylmethionin und ein Eisen-Schwefel-Cluster übernehmen die Rolle des Adenosylcobalamin. Aufgrund der Coenzym-B₁₂-Ähnlichkeit wurde SAM ursprünglich von H. A. Barker als „A poor man’s adenosyl cobalamin“ bezeichnet [Zit. Stadtman,1982].

Die Strukturen von Adenosylcobalamin und SAM haben nur das 5'-Deoxyadenosyl gemeinsam, wie aus der folgenden Abbildung ersichtlich wird.

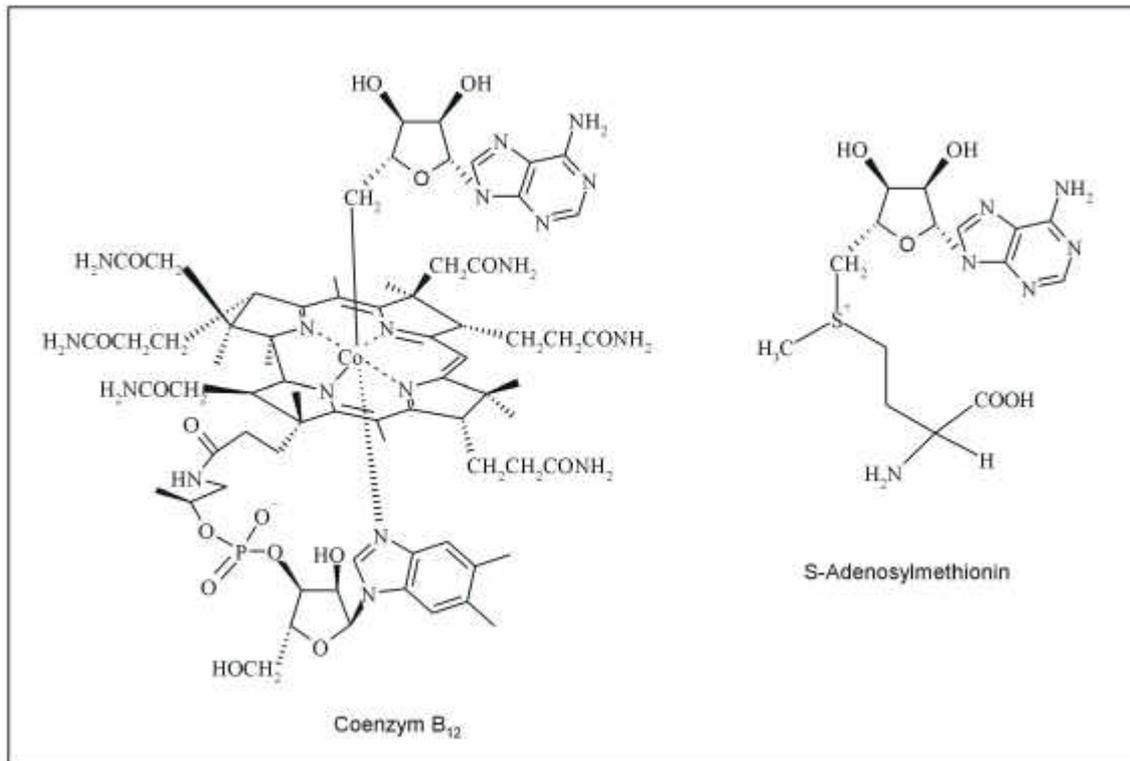


Abb. 4: Strukturvergleich: Coenzym-B₁₂ und SAM

Der bedeutendste Unterschied ist die Stärke der Kohlenstoff-Cobalt-Bindung in Adenosylcobalamin und der Kohlenstoff-Schwefel-Bindung in SAM. Die Co-C5'-Bindung ist mit einer Dissoziationsenergie von 30 kcal/mol schwach [Halpern *et al.* 1984, Finke *et al.* 1984]. Diese Bindung ist stark genug, um unter zellulären Bedingungen stabil zu sein, und gleichzeitig so schwach, um eine homolytische Spaltung an einem enzymatischen Reaktionszentrum einzugehen.

Im Kontrast dazu ist die Kohlenstoff-Schwefel-Bindung stark mit einer Dissoziationsenergie von ≥ 60 kcal/mol. Somit scheint eine physikalische Spaltung der S-C5'-Bindung in SAM analog zu der in Coenzym-B₁₂ nicht realisierbar. Nichtsdestoweniger ist die mechanistische Funktion des 5'-Deoxyadenosyl-Restes von SAM und Coenzym-B₁₂ analog. Aus diesem Grund ist eine chemische Modifikation von SAM, welche die reversible Spaltung der S-C5'-Bindung ermöglicht, nötig. Im Falle der Lysin-2,3-Aminomutase übernimmt diese Rolle ein Eisen-Schwefel-Zentrum [Frey *et al.*, 1998].

SAM kann auf zweierlei Arten mit einem Eisen-Schwefel-Zentrum reagieren [Frey *et al.*, 2001]. Zum einen kann eine reversible Bildung des 5'-Deoxyadenosylradikals bei einer chemischen Spaltung von SAM mit Hilfe eines $[4\text{Fe-4S}]^+$ -Zentrums in Lysin-2,3-Aminomutase erfolgen. Bei der anderen Reaktion von SAM mit einem Eisen-Schwefel-Protein wird SAM irreversibel verbraucht, um ein 5'-Deoxyadenosylradikal zu bilden. Dieses aktiviert ein Enzym, indem es ein Wasserstoffatom von einem enzymatischen Glycyl-Rest abstrahiert, um ein Glycyl-Radikal zu generieren. Zu diesen Glycyl-Radikal-Enzymen zählen zum Beispiel die Pyruvat-Format-Lyase, die anaerobe Ribonucleotid-Reduktase aus *E.coli* und die Benzylsuccinat-Lyase.

Biotin-Synthase und Lipoat-Synthase sind SAM-abhängige $[4\text{Fe-4S}]$ -Proteine, die eine Schwefelinsertion in eine unaktivierte C-H-Bindung katalysieren. Die C-H-Bindung wird von dem 5'-Deoxyadenosylradikal aus SAM gespalten. Die Spaltung von SAM zu einem 5'-Deoxyadenosylradikal benötigt ein Elektron, welches von einem reduzierten $[4\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster zur Verfügung gestellt wird. Es gibt verschiedene vorgeschlagene Mechanismen, wie diese Spaltung stattfinden könnte. Im einfachsten Fall überträgt der FeS-Cluster ein Elektron auf das Sulfonium-Ion des S-Adenosylmethionins und verursacht dadurch die Fragmentierung zu Methionin und dem 5'-Deoxyadenosylradikals (Abb. 5).

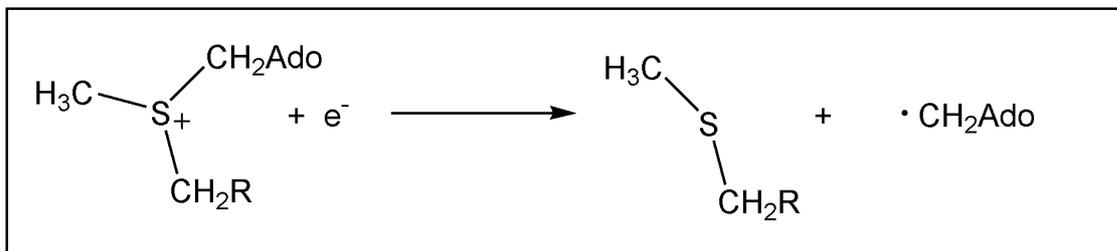


Abb. 5: Fragmentierung von SAM zu Methionin und einem 5'-Deoxyadenosylradikal

Alternativ könnte SAM ein Brückensulfid des Clusters adenosylieren. Eine homolytische Spaltung würde ein Radikal und einen oxidierten FeS-Cluster liefern. Andere Vorschläge involvieren eine Teilnahme des Eisenatoms des Clusters. Es könnte z.B. ein 5'-Deoxyadenosylradikal aus einer homolytischen Spaltung einer Fe-C-Bindung entstehen.

Für den Fall der Lysin-2,3-Aminomutase wurde der Mechanismus mit Hilfe eines Selenium-Derivates von SAM untersucht [Casper *et al.*, 2000]. Es wird ein Mechanismus vorgeschlagen, bei dem die Substratbindung eine konformationelle Veränderung verursacht und somit das nichtbindende Elektronenpaar des Sulfoniums in die Nähe eines Schwefelatoms des FeS-Clusters gelangt. Diese Näherung würde das Redoxpotential des S-Adenosylmethionins erhöhen und somit einen innersphären Elektronentransport mit konzertierter C-S-Bindungsspaltung ausgehend vom FeS-Cluster ermöglichen (Abb. 6).

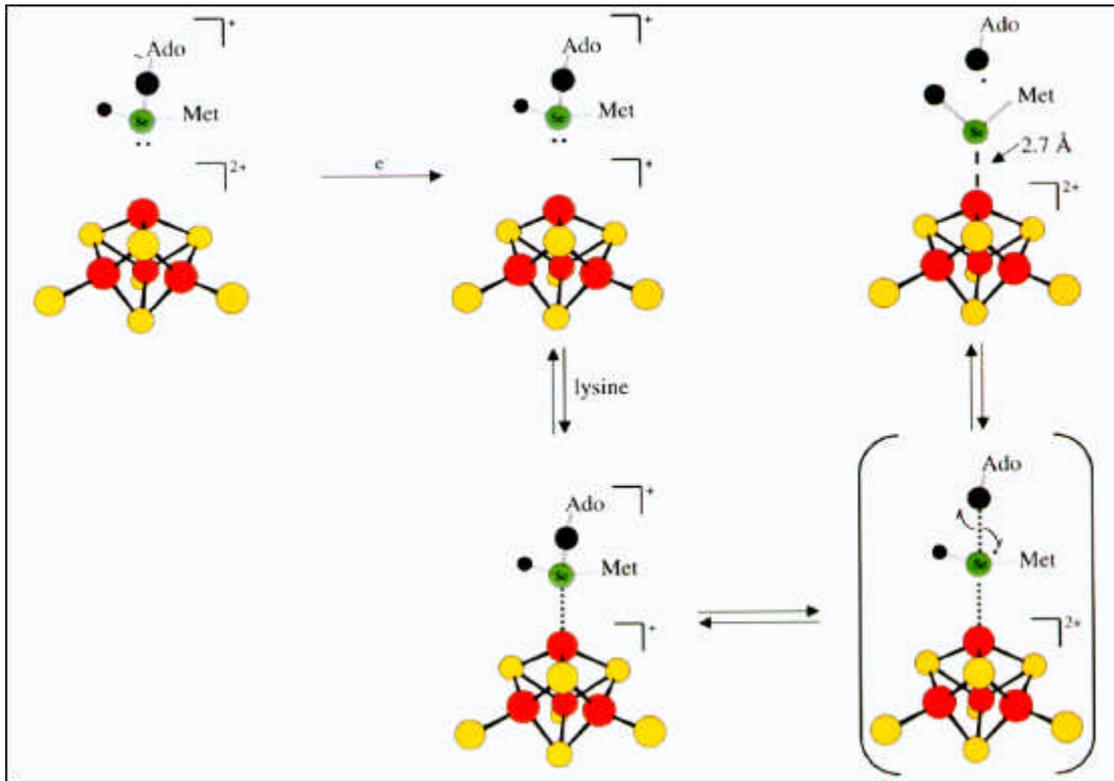


Abb. 6: Vorgeschlagener Mechanismus zur Generation des 5'-Deoxyadenosylradikals bei Lysin-2,3-Aminomutase

1.3 S-Adenosylmethionin ein B₁₂-Analogon in Pflanzen?

Viele radikalische Umlagerungsreaktionen in Mensch, Tier und Bakterien werden von Coenzym-B₁₂ induziert. Welcher Cofaktor ist aber in der Pflanzenwelt verantwortlich?

In Pflanzen wurde B₁₂ noch nie nachgewiesen [Rétey, 1999]. Allerdings täuschen Patente wie z.B. „Vitamin-B₁₂haltige Sanddornkonzentrate oder Extrakte, Verfahren zu deren Herstellung und die Verwendung von Sanddorn“ [Pandalis *et al.*, 1996] ein B₁₂-Vorkommen in Pflanzen vor. Für getrocknete Sanddorn Beeren wurde ein Wert von 32 µg Vitamin-B₁₂/100 g ermittelt. Dieser Wert ist vergleichbar mit dem Vitamin-B₁₂-Gehalt von Schweineleber (25-39 µg/100 g) und Rinderniere (31-33 µg/100g). Dieser scheinbare Vitamin-B₁₂-Gehalt in Sanddorn ist auf Symbiose mit dem Strahlenpilz *Actinomyces* zurückzuführen.

Vitamin-B₁₂-Verbindungen sind in Organismen, die atmosphärischen Stickstoff fixieren, weit verbreitet [Evans *et al.*, 1964]. Das Vitamin wurde in Blaugrün-Algen, Knötchen von Hülsen- und Nighthülsenfrüchten, Symbionten, *Rhizobium* spezies, *Azotobacter vinelandii* und *Clostridium pasteurianum* gefunden. Kleine Mengen an Vitamin-B₁₂ wurde in Gewebe von höheren Pflanzen detektiert, dies ist jedoch kein zwingender Beweis, dass höhere Pflanzen *par se* die Möglichkeit zur Biosynthese besitzen. Es ist wahrscheinlich, dass dieses B₁₂ mikrobieller Herkunft ist. Evans kommt zu dem Ergebnis, dass alle stickstofffixierenden

Organismen, die er getestet hat, Cobalt und B₁₂ für Wachstum und Synthese benötigen. Jedoch hat er keine schlüssigen experimentellen Beweise für den Bedarf von Cobalt für höhere Pflanzen in Abwesenheit von Mikroorganismen.

Welcher Cofaktor ist also für die radikalische Umlagerungen in Pflanzen zuständig? Es könnten dies Spuren von B₁₂, Cytochrom P450 oder auch S-Adenosylmethionin sein.

Bei der Umlagerung von Littorin nach Hyoscyamin, die am Ende einer Biosynthesekette von Tropanalkaloiden in Stechapfel-Arten steht, wird die Beteiligung von P450 und SAM diskutiert.

1.4 Radikalische Umlagerung von Littorin nach Hyoscyamin; die Littorinmutase-Reaktion [Brown *et al.*,1990]

Littorin und Hyoscyamin gehören zu der Familie der Tropanalkaloide. Sie treten in Nachtschattengewächsen (*Solanaceae*) auf und sind bestens in Spezies wie *Datura*, *Atropa*, *Hyoscyamus*, *Scopalia* und *Duboisia* bekannt.

Seit 1820 ist der gemeine Stechapfel (*Datura stramonium*, *Jimson Weed*) eine als offizielle Droge (Parasympatholytikum, Narkotikum, Analgetikum und Mydriatikum) anerkannte Pflanze. Indianerheiler der Kalifornien- und Südweststämme verwendeten die zerquetschte Wurzel als schmerzstillende und heilwirksame Auflagenkompressen für Verbrennungen und Verbrühungen. Darüber hinaus wendeten sie *Datura* bei Erkrankungen der Atemwege, speziell bei Asthma, Ruhr, Magen- und Darmbluten, Katalepsie, Ekstase, Epilepsie, Hysterie, Meningitis, Keuchhusten, Sonnenstich, Stottern, Tetanus und Typhus an.

Schon 4-5 g der Rohblätter können bei einem Kind zum Tod führen. Alle Pflanzenteile enthalten die toxischen Substanzen, wobei die Konzentrationen in den Samen am höchsten sind. Die unzubereitete und unverdünnte Einnahme des Krauts ist lebensgefährlich. Indianerheiler wendeten *Datura* in seltenen Fällen, sowie mit äußerster Vorsicht in der Dosierung und unter ständiger Beobachtung des Patienten an.

Atropin (racemisches Hyoscyamin) und Scopolamin binden an Acetylcholinrezeptoren. Dies erklärt ihre heutige Verwendung als schwache Muskelrelaxantien, Nervengasgegentifte und Mittel gegen Seekrankheit.

Atropin in therapeutischen Dosen (0.5-1 mg) wird auch bei starken Asthmaanfällen verwendet, es erhöht die Tiefe der Atmung als Ergebnis der bronchialen Ausdehnung. Bei toxischen Dosen nimmt die zentrale Erregung zu, dieses führt zu Ruhelosigkeit, Reizbarkeit, Desorientierung, Halluzinationen oder Delirium. Bei noch höheren Dosen folgt der

Stimulierung Depression, welche zu einem Kreislaufkollaps und Atemstillstand führt.

Tropanalkaloide sind eine strukturell gut definierte Gruppe an Naturprodukten. Über 200 Tropanalkaloide wurden isoliert, und die meisten medizinisch bedeutsamen wurden aus Pflanzen erhalten.

Die Tropanalkaloidbiosynthese ist schon ein Jahrhunderte altes Problem, wobei noch immer ungelöste Probleme existieren [Humphrey *et al.*, 2001]. Auch die Stufe Littorin-Hyoscyamin (Abb. 11, Seite 14) gehört zu den noch nicht vollständig gelösten Rätseln.

Während der Umlagerung von Littorin nach Hyoscyamin werden zwei Bindungen gebrochen und zwei neue gebildet. Mit jeweils einer Inversion der Konfiguration an den Zentren. Diese Inversion wurde durch zwei Sets an markierten Fütterungsexperiment belegt. Noch nicht eindeutig bewiesen ist, welcher Cofaktor für die Umlagerung *in vivo* verantwortlich ist. Die Isomerisierung zeigt eine deutliche Ähnlichkeit zu den Coenzym-B₁₂ vermittelten Umlagerungen. Zum Beispiel vermittelt die Gruppe welche wandert gleichzeitig eine Rückwanderung eines H-Atoms wie bei der Methylmalonyl-CoA-Mutase (Abb. 7).

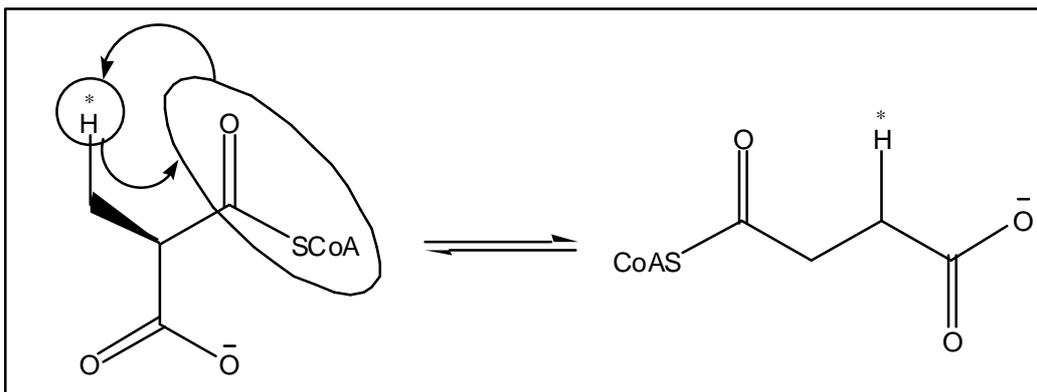


Abb. 7: Methylmalonyl-CoA-Mutase Reaktion

E. Leete, der viel zur Aufklärung des Tropanalkaloid-Ringsystems und der Cocain-Biosynthese beigetragen hat, war sich der potentiellen Rolle des Coenzym-B₁₂ in der Tropanesterbiosynthese bewusst. Jedoch bemerkte er, dass es keinen Beweis für die Anwesenheit von Vitamin-B₁₂ in Pflanzen gab. Eine Pflanzengewebsanalyse von *D. innoxia* für Cobalt ergab keine signifikante Menge an dem Metall [Leete *et al.*, 1987].

In einem Experiment bei dem *D. innoxia* Pflanzen mit (2*S*, 3*R*)- und (2*S*, 3*S*)-[3-³H₁]Phenylalanin gefüttert wurden, wird die Ähnlichkeit zu Coenzym-B₁₂ vermittelten Reaktionen deutlich. Dabei wurde das Tritium der 3-Position des Phenylalanins an der 3'-Position des resultierenden Hyoscyamins lokalisiert [Leete *et al.*, 1984]. Diese Beobachtung ist konsistent mit der Migration eines H-Atoms in einem vicinalen Austauschprozess, welcher von einer gleichzeitigen Carboxylatwanderung in die

entgegengesetzte Richtung begleitet wird. Dies ist ein Prozess der charakteristisch für Coenzym-B₁₂ vermittelte Reaktionen ist. Allerdings beruhte die Bestimmung der Einbaurate auf einer chemischen Abbaumethode, und diese war mit 0.2 % sehr gering.

Eine nachfolgende ¹³C-NMR-Studie, welche den Einbau von 3(*R*)- und 3(*S*)-[2-¹³C, 3-²H](*R*)Phenyllactat untersuchte, zeigte trotz hoher Einbauraten (15-20 %) keinen Beweis für die Deuterium Migration während des Isomerisierungsprozesses [Chester *et al.*, 1995].

Somit sind diese beiden Experimente widersprüchlich. Jedoch in Anbetracht der höheren Einbauraten, scheint es unwahrscheinlich, dass ein vicinaler Austauschprozess stattfindet [Humphrey *et al.*, 2001].

Die Abwesenheit von Vitamin-B₁₂ in Pflanzen führte zu der Überlegung, dass S-Adenosylmethionin dessen Rolle übernehmen könnte. Die Mechanismen von B₁₂ und SAM sind ähnlich. Damit sollte die SAM vermittelte Isomerisierung auch einen vicinalen Austauschprozess zeigen, welcher jedoch nicht beobachtet wird.

Ein zellfreies Extrakt aus *D. stramonium* wurde zur Klärung der Abhängigkeit von Cofaktoren verwendet. Es wurde gefunden, dass die Zugabe von SAM den Hyoscyaminlevel in diesem Extrakt deutlich erhöht [Ollagnier *et al.*, 1998]. In einer Studie mit einer tritiierten Adenosylmethylgruppe an SAM wurde allerdings das Tritium nicht auf die Tropansäuregruppe des Hyoscyamins übertragen. Dieses Ausbleiben des Isotopenaustausches ist unerwartet, da die mechanistische Hypothese einen Wasserstoff-Transfer von einer intermediären Adenosylmethylgruppe zur Quenchung des Produktradikals vorhersagt. Es wurde vermutet, dass die Radioaktivität durch eine reversible Dehydrogenaseaktivität im Extrakt ausgewaschen wurde.

Somit muss die Rolle von SAM bei der Transformation von Littorin nach Hyoscyamin noch bestätigt werden.

Es existieren auch Hinweise auf eine eventuelle P450 Beteiligung. Clotrimazol, ein P450 Inhibitor, inhibierte bei einer Ganzzellinkubation die Umlagerung von Littorin nach Hyoscyamin. 30 % einer ^{18}O -Markierung von $[2\text{-}^{18}\text{O}, \text{}^2\text{H}]\text{Littorin}$ gehen bei dieser Umlagerung relativ zur Deuteriummarkierung verloren (Abb. 8).

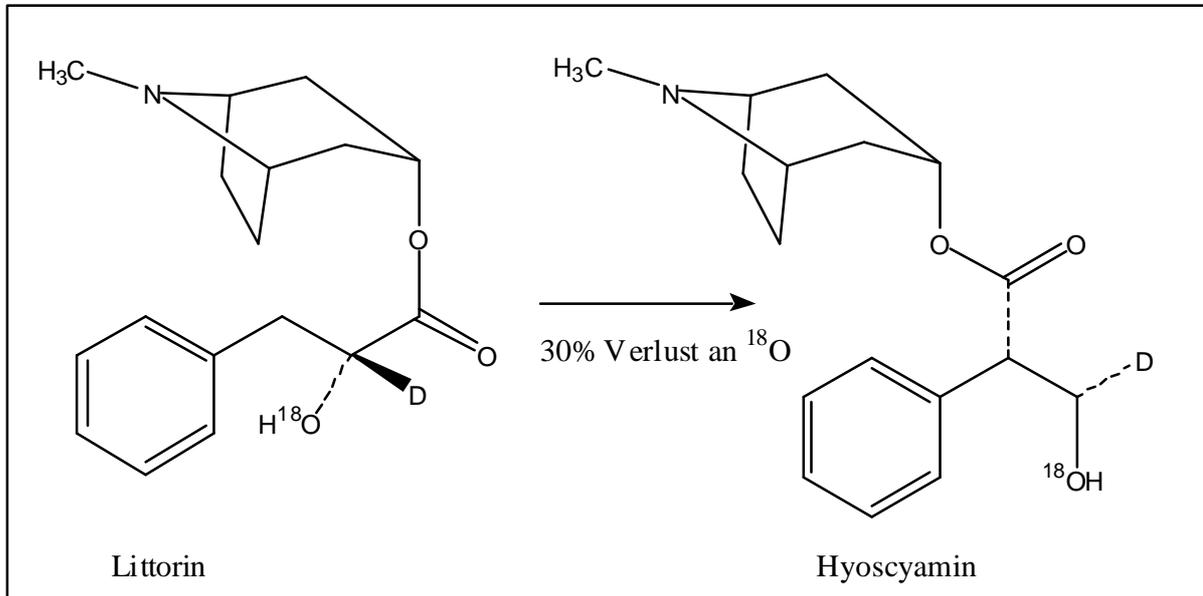


Abb. 8: 30 % Verlust an ^{18}O bei der Umlagerung Littorin Hyoscyamin

Dies könnte auf ein Aldehydintermediat schließen lassen, welches auf zwei verschiedenen Wegen entstehen könnte (Abb. 9, folgende Seite).

Weg a:

Über einen Sauerstoffanbindungsprozess nach einer 1e^- -Oxidation und radikalischer Umlagerung, wie es typisch für P450-Oxidationen ist.

Weg b:

Es wäre alternativ eine carbokationinduzierte Wanderung denkbar, ebenfalls unterstützt durch P450 über eine 2e^- -Oxidation. Der Aldehyd wird anschließend durch eine Reduktion zu einem Tropatester umgewandelt.

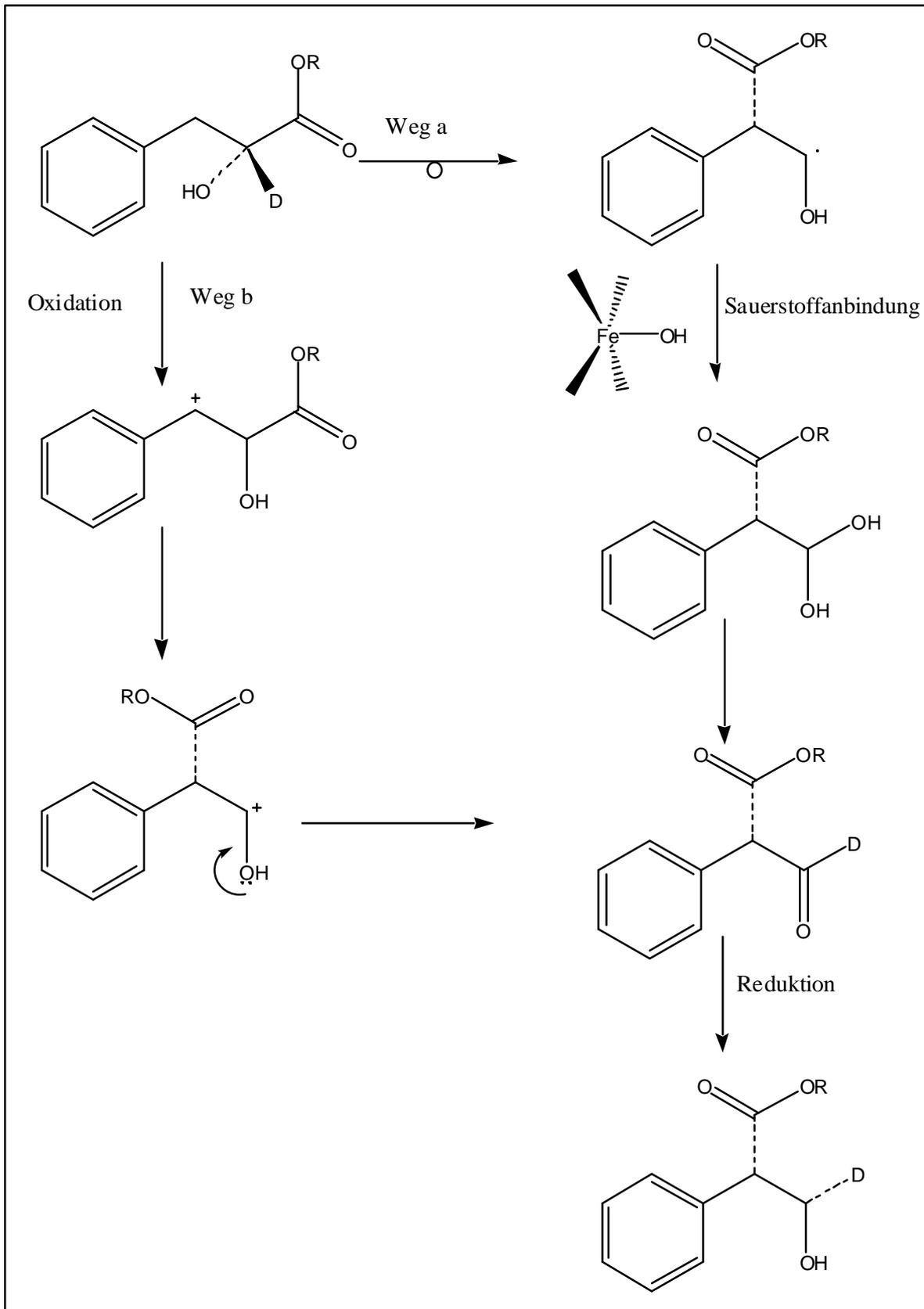


Abb. 9: Zwei mögliche Wege zu Hyoscyamin über ein Aldehyd-Intermediat

1.5 Alkaloidbiosyntheseweg

Die Tropanalkaloide sind Esteralkaloide, welche aus drei verschiedenen biogenen Bausteinen zusammengesetzt sind. Am Beispiel des Hyoscyamins ist das der Aminoalkohol Tropin. Er setzt sich aus dem N-Methylpyrrolidin, einem Derivat des Ornithins, und aus drei Kohlenstoffatomen, welche dem Acetatstoffwechsel entstammen, zusammen. Bei der Estersäure handelt es sich um das Zimtsäurederivat Tropasäure.

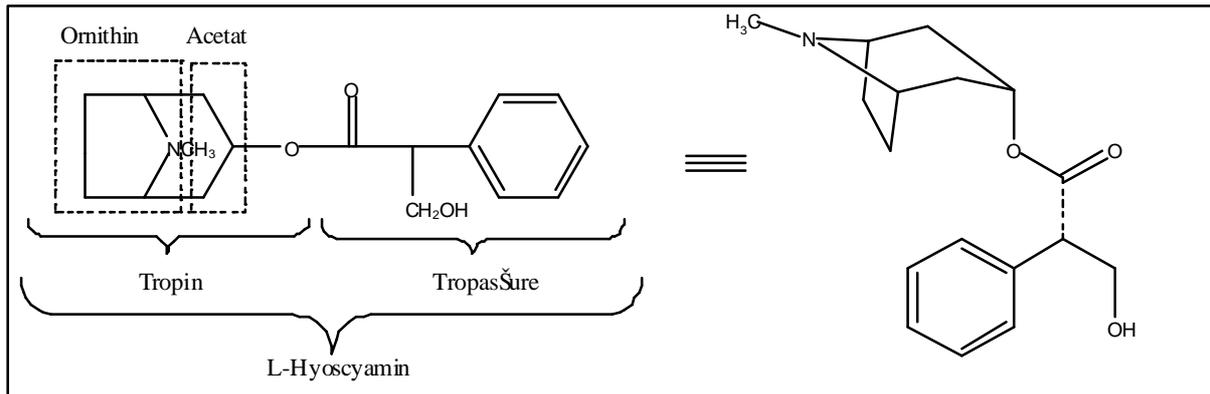


Abb. 10: Zusammensetzung des Hyoscyamins

L-Hyoscyamin und sein Epoxid, das L-Scopolamin, sind die Hauptalkaloide einer Gattung der *Solanaceae*. Strukturell verwandt und nach demselben Bauprinzip gestaltet sind die Tropanalkaloide der *Erythroxylaceae*, deren bekanntester Vertreter das Cocain ist.

Am Anfang des gemeinsamen Biosyntheseweges (Abb. 11, folgende Seite) steht mit dem N-Methyl- Δ^1 -Pyrrolin, ein Ringsystem, welches auf das Ornithin zurückgeht. Von Acetat ausgehend wird über Acetoacetat [Richter *et al.*, 1988] eine C₄-Komponente ankondensiert. Über mehrere Zwischenverbindungen entsteht Tropin. Dieses wird mit der Tropasäure zu L-Hyoscyamin verestert.

I Einleitung

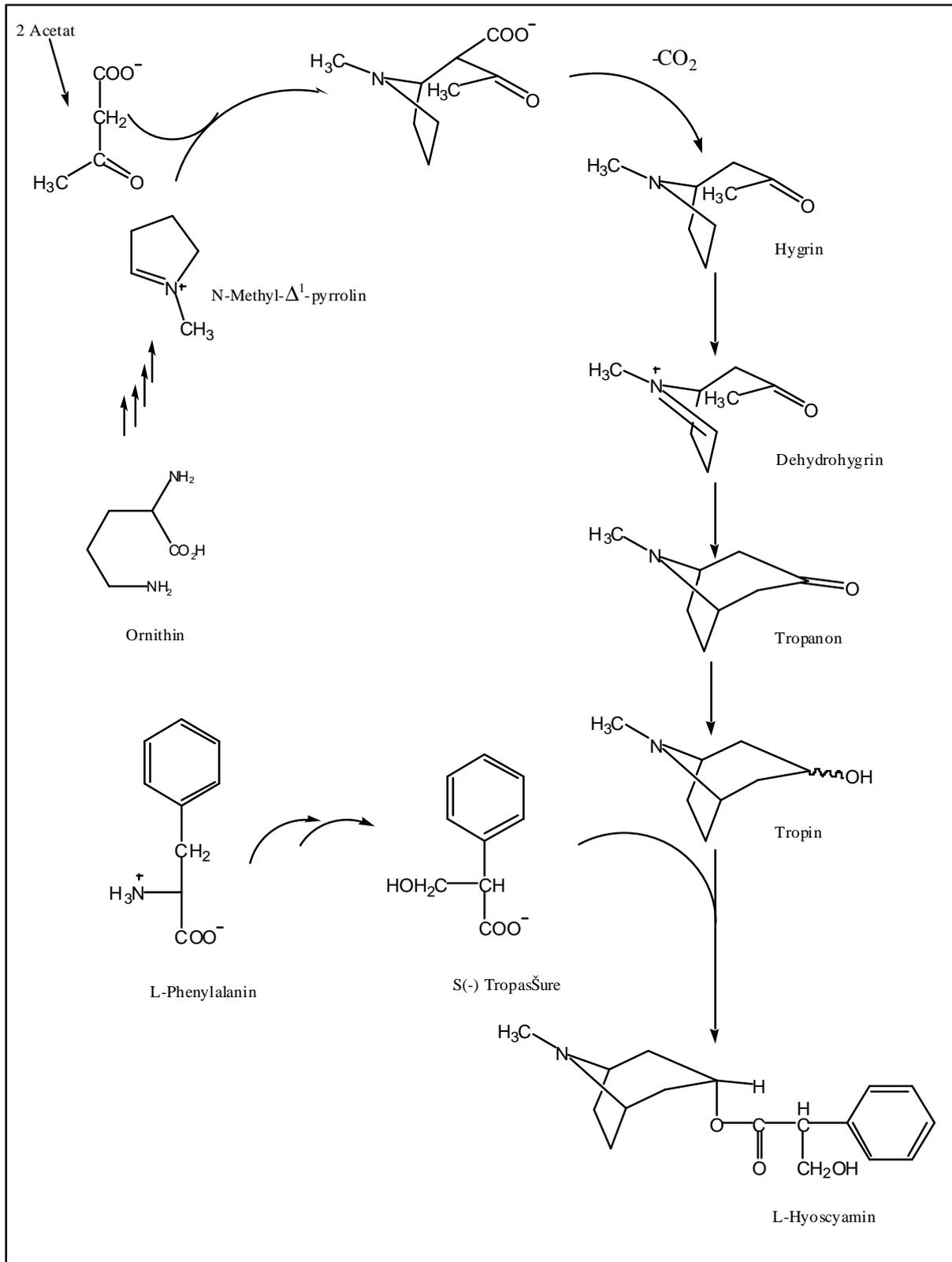


Abb. 11: Biosyntheseweg der Tropanalkaloide

1.6 Hairy Roots und *Datura stramonium*

Die Tropanalkaloide werden hauptsächlich in Wurzeln und Blättern von *Solanaceae* gefunden. Die wichtigsten Vertreter sind *Datura*, *Atropa* und *Hyoscyamus*. Das natürliche Wachstumsverhalten ist für die biochemische Forschung hinderlich. Durch die Induktion von Blattmaterial mit dem Bodenbakterium *Agrobacterium rhizogenes* ist es möglich, transformierte Wurzelklone zu generieren. Diese Hairy Roots sind in der Lage, Hyoscyamin in mindestens dem gleichen Level wie natürliche Wurzeln zu synthetisieren. Die Wachstumsrate ist dabei vergleichbar mit einer schnellwachsenden Zellsuspensionskultur. Die ersten Hyoscyamin produzierenden Hairy Root Klone konnten über 15 Jahre, ohne Anzeichen auf eine Veränderung der biosynthetischen Kapazität, erhalten werden [O'Hagan *et al.*, 1998]. Die Verwendung von Hairy Roots bei der Untersuchung des Tropanalkaloidstoffwechsels ist nur möglich, da diese Alkaloide fast ausschließlich in den Pflanzenwurzeln synthetisiert werden und erst anschließend über das Xylem-System zu den Blättern transportiert, und dort teilweise modifiziert, werden. Dieses Hairy Roots Wurzelsystem bietet einige Vorteile gegenüber dem ganzen Pflanzensystem:

- große Mengen genetisch identischen Materials können produziert werden
- die Wurzeln wachsen mit akzeptabler Geschwindigkeit
- Experimente erfolgen unter sterilen Bedingungen
- Precursor können direkt zugegeben und deren Aufnahme verfolgt werden.

II. Themenstellung

Dem Endziel, der Isolierung und Charakterisierung der Littorinmutase (vgl. Kap. 1.4, S. 6 ff. und Abb. 11, unten) aus *Datura stramonium* Hairy Root Kulturen, sollte in dieser Arbeit möglichst nahe gerückt werden.

Dazu zählten :

- Etablierung von Anzucht und Kultivierung der Wurzelkulturen am Institut
- Untersuchungen der Wurzelkulturen auf Zeit-Enzymprodukt-Abhängigkeit
- Erstellung einer cDNA-Bibliothek aus Hairy Roots
- Erstellung eines reproduzierbaren Enzymassays mit anschließender Aufreinigung des Enzyms mittels chromatographischen Methoden

Da der letzte Punkt scheiterte, sollte mit modernsten, biochemischen Methoden versucht werden, dem Protein auf andere Art und Weise näher zu kommen. Dazu wurden folgende Methoden gewählt:

- Gensuche mittels Bindemotivsonden
- Markierungs- und Fütterungsexperimente mit [³H]S-Adenosylmethionin
- Inhibierung und Aktivierung des Enzyms im Hinblick auf die Produktkonzentration in den Wurzelzellen und Untersuchung der stimulierten Hairy Roots mit:
 - gelelektrophoretischen Methoden; um Unterschiede auf Proteinebene sichtbar zu machen. Es wurde die 2D-Gelelektrophorese und die Blau-Native Gelelektrophorese ausgewählt.
 - gentechnischen Methoden; um Unterschiede auf mRNA-Ebene sichtbar zu machen.

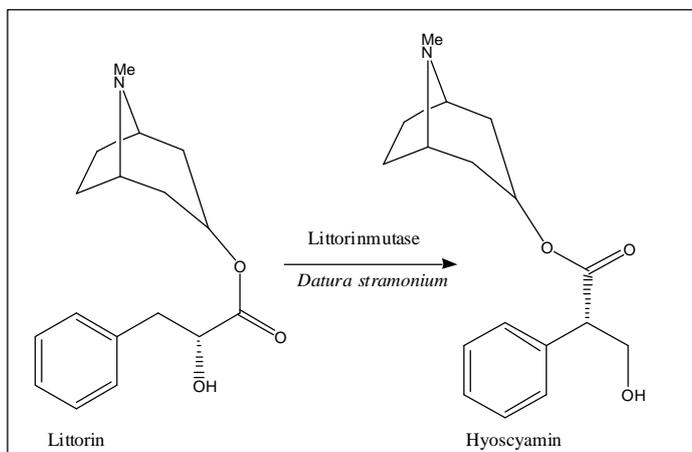


Abb. 11: Die Littorinmutase-Reaktion

III. Material

3.1 Chemikalien/Verbrauchsmaterialien und Bezugsquellen

Alle nachfolgenden Chemikalien entsprachen, wenn nicht anders vermerkt, dem Reinheitsgrad p.A. Die hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Chemikalienausgabe des Instituts für Organische Chemie der Universität Karlsruhe bezogen.

3.1.1 Wurzelkulturen

Ampicillin Natriumsalz	Duchefa, Niederlande
Cefotaxim	Merck, Darmstadt
Gomborg's B5 Medium	Duchefa, Niederlande
Natriumhypochlorit 12%	Roth, Karlsruhe
Methyljasmonat	Duchefa, Niederlande
Sucrose, doppelt kristallisiert	Duchefa, Niederlande
Sterilfilter Filtropur BT 50 0.2 µm, 500 ml	Sarstedt, USA
Sterilisationsfolie für Autoklaven	Praxisdienst, Schweich, Mosel
Petrischalen 20 x 150 mm	Sarstedt, USA

3.1.2 Alkaloidbestimmung

Bismethylsilylacetamid	Merck, Darmstadt
1,4-Dioxan	Acros, Belgien
Extrelut [®] NT	Merck, Darmstadt

3.1.3 Aktivitätstest

S-Adenosylmethionin	Fluka, Neu-Ulm
Bismethylsilylacetamid	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol	Merck, Darmstadt
Extrelut [®] NT	Merck, Darmstadt
Filtrationssystem 150 ml Nalgene [®]	Fischer Scientific, Schwerte
Mira cloth Membran	Calbiochem, Frankfurt
PD 10 Säulen	Amersham Pharmacia, Freiburg
Pyridoxalphosphat	Merck, Darmstadt
Sephadex G25, medium size	Amersham Pharmacia, Freiburg
Littorin wurde von Dr. E. Kervio in unserem Institut synthetisiert	

3.1.4 Proteinaufschluss

Benzamidin	Merck, Darmstadt
Benzonase	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol	Merck, Darmstadt
EDTA	Roth, Karlsruhe
K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄	Fluka, Neu-Ulm
Pefablok	Merck, Darmstadt
PVPP	Sigma, München
Sucrose	Duchefa, Niederlande
Tris	ICN Biomedicals Inc., USA

3.1.5 SDS/Nativ-Gelelektrophorese

Ammoniumperoxodisulfat	BioRad, München
Coomassie G250	Serva, Heidelberg
Glycin	Roth, Karlsruhe
Nitrocellulose Membran	Serva, Heidelberg
Ponceau S	Acros, Belgien
Rotiphorese [®] Gel 30	Roth, Karlsruhe
Serva Blue R	Serva, Heidelberg
TEMED	BioRad, München
Tris	ICN Biomedicals Inc., USA

3.1.6 2D-Gelelektrophorese

Ammoniumsulfat	Fluka, Neu-Ulm
Brilliant Blue R	Sigma, München
Bromphenolblau	BioRad, München
Coomassie G250	Fluka, Neu-Ulm
CHAPS	Fluka, Neu-Ulm
DTT	Merck, Darmstadt
ExelGel [™] SDS Buffer Strips	Amersham Pharmacia, Freiburg
Harnstoff	Acros, Belgien
IEF Sample Application Pieces	Amersham Pharmacia, Freiburg
Immobiline Dry Strip pH 3-10, 180mm	Amersham Pharmacia, Freiburg
IPG Buffer pH 3-10 L	Amersham Pharmacia, Freiburg

Strip holder	Amersham Pharmacia, Freiburg
NP 40	Fluka, Neu-Ulm
<i>ortho</i> Phosphorsäure	Fluka, Neu-Ulm
PlusOne Dry Strip Cover Fluid	Amersham Pharmacia, Freiburg
Protease Inhibitor Mix Plant	Sigma, München
SDS Gel/ExcelGel™ SDS 12-14	Amersham Pharmacia, Freiburg
SDS Gel/ExcelGel™ SDS 8-18	Amersham Pharmacia, Freiburg
Silver Staining Kit Protein PlusOne	Amersham Pharmacia, Freiburg
Sypro® Ruby Protein Gel Stain	MoBiTec, Göttingen
Thioharnstoff	Acros, Belgien
Triton X100	Sigma, München

Proteinbestimmung für 2D-Gelelektrophorese

Cytoskeleton Advanced Protein Assay	TEBU GmbH, Frankfurt am Main
BioRad Protein Assay	BioRad, München

In-Gel Verdau der 2D-Spots

Sequencing Grade Modified Trypsin	Promega, Mannheim
α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure	Fluka, Neu-Ulm
2,5-Dihydroxybenzoic acid	Fluka, Neu-Ulm

3.1.7 Blau-Native-Polyacrylamidelektrophorese

ACA	Sigma, München
Acrylamid 2x	Serva, Heidelberg
Bis Tris	Sigma, München
Coomassie 250 G	Sigma, München
Dodecyl- β -D-maltosid (n-Dodecylmaltosid)	AppliChem, Darmstadt
EDTA	Sigma, München
N,N'-Methylen-bis-acrylamid	Roth, Karlsruhe
Mixed Bed Resin TMD-8	Sigma, München
<i>ortho</i> Phosphorsäure	Fluka, Neu-Ulm
Tricine	Sigma, München
SDS	Sigma, München

3.1.8 Radioaktive Arbeiten

[α - ^{32}P]dCTP	Hartmann analytic, Braunschweig
Fuji Imaging Plate BAS TR2040S	Raytest, Straubenhardt
Glasfaser Mikrofilter Whatman 1322060	LHG, Karlsruhe
Ponceau S	Acros, Belgien
Scintillationsflüssigkeit Luma Safe Plus	Canberra Packard GmbH, Dreieich
Scintillationsgefäße	Canberra Packard GmbH, Dreieich
Soluene 350	Canberra Packard GmbH, Dreieich
Hionic Fluor	Canberra Packard GmbH, Dreieich
[^3H]SAM / [^{14}C]Littorin wurde von Dr. Eric Kervio in unserem Institut hergestellt.	
[^3H -Me]SAM	2355cpm/ μl
[5', 2, 8 ^3H]SAM	158615 cpm/ μl
[^{14}C]Littorin, [12.8 mg/ml]	1800 cpm/ μl
[^{57}Co]B $_{12}$	6 ml, 10.5 μCi
[U- ^{14}C]ATP	200 μl , 10 μCi
L-Methyl-[^3H]methionin	250 μl , 250 μCi

3.1.9 Genbibliothek/RNA-Isolierung

[α - ^{32}P]dCTP	Hartmann analytic, Braunschweig
DEPC	Sigma, München
dNTP's	Hybaid, Heidelberg
Dstroy-SR Sticks	Biozym, Hess. Oldendorf
Electroporationsküvetten (1mm)	Biozym, Hess. Oldendorf
Oligotex mRNA Mini Kit	QIAGEN, Hilden
Omniscript Reverse Transkriptase	QIAGEN, Hilden
Poly T Primer	MWG Biotech, Ebersberg
Random Hexamer Primer	Promega, Mannheim
RNeasy Plant Mini Kit	QIAGEN, Hilden
RNasefreie Amplifikationsgefäße 0.5 ml	Sarstedt, USA
RNasefreie Eppendorfgefäße 2 ml, 1.5 ml	Biozym, Hess. Oldendorf
Safeseal Tips (-10 μl , -100 μl , -1000 μl)	Biozym, Hess. Oldendorf
SUPERSCRIPT TM Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning	Life Technologies, Karlsruhe

3.1.10 Gentechnische Arbeiten

Agar	Difco Laboratories, Michigan
Agarose	Gibco, Karlsruhe
Ampicillin Natriumsalz	Fluka, Neu Ulm
Bactotrypton	Difco Laboratories, Michigan
Bactoyeast	Difco Laboratories, Michigan
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
dNTP's	Hybaid, Heidelberg
Pwo DNA Polymerase	Sigma, München
Polaroidfilme Typ 667	Peqlab, Erlangen
RNasin	Boehringer, Mannheim
Taq DNA Polymerase	Sigma, München
Terminale Transferase	New England Biolabs, Frankfurt

Membrane für Colony Blots

BioTrace™ NT	Pall, Dreieich
Biodyne® A, B, Plus 0.45 µm	Pall, Dreieich

3.1.11 Leitersequenzierung

Ethylacetat p.a.	Acros, Belgien
Heptan	Acros, Belgien
Hexafluoroisopropanol	Acros, Belgien
Phenylisocyanat	Acros, Belgien
Phenylisothiocyanat	Acros, Belgien
Pyridin	Acros, Belgien
Trifluoressigsäure	Sigma, München
Trimethylamin/H ₂ O 25% wt/wt	Acros, Belgien

3.1.12 Kapillarelektrophorese

Kapillare aus Fused Silica	
ID 50 µm, AD 365 µm, 24 cm	BioRad, München
Phosphatpuffer 0.1 M pH 2.5	BioRad, München

3.2 Geräte

3.2.1 Wurzelkulturen

Fermenter BIOFLO 3000	New Brunswick, Nürtingen
Reinraumbank HeraSafe	Heraeus Instruments, Fellbach
Schüttler	Labor Zenk, München
Klimatisierter Raum	Daikin Inverter
Membran Vakuumpumpe MZ2C	Vacuubrand

3.2.2 Alkaloidbestimmung/Aktivitätstest

GCMS Gerät Hewlett Packard HP5890	Hewlett Packard
GCMS Säule 5 % PH ME Siloxan 25m x 0.2 mm x 0.33 µm	Agilent Technologies, USA
HPLC: Hewlett Packard Series 1050	Hewlett Packard
HPLC Säule: MN Nucleosil 120 3 C 18	Chrom
Rotationsverdampfer (Rotavapor)	Büchi AG, Schweiz

3.2.3 Proteinaufschluss

Braun Haushaltsmixer MX 32	Braun
Schneidwerkzeug für MX 32	
gebaut von der Werkstatt des Botanischen Instituts II der Universität Karlsruhe nach <i>Carlsberg Res. Commun.</i> , Vol. 42 , p 431-439, 1977	
Schick Injector Klängen	Jüngler & Gebhardt GmbH, Köln

3.2.4 SDS/Nativ-Gelelektrophorese

Electrophoresesystem Mini-Protean II Cell	BioRad, München
JOEY™ Gel Casting System Modell JGC-4	Peqlab, Erlangen
Laufkammer OWL Modell P8DS	Owl Scientific, USA
Netzgerät Power Pac 300	BioRad, München
Rotationsverdampfer (Rotavapor)	Büchi AG, Schweiz

3.2.5 2D-Gelelektrophorese

Multiphor II	Amersham Pharmacia, Freiburg
MultiTemp III	Amersham Pharmacia, Freiburg
IPGphor	Amersham Pharmacia, Freiburg
Färber Hoefer® Automated Gel Stainer	Amersham Pharmacia, Freiburg
Electrophoresis Power Supply EPS 3501 XL	Amersham Pharmacia, Freiburg

3.2.6 Blau-Native-Polyacrylamidelektrophorese

Hoefer Vertical Slab Gel Electrophorese unit	
SF 600	Amersham Pharmacia, Freiburg
LKB Bromma 2297 Macrodrive5	
Constant Power Supply	Amersham Pharmacia, Freiburg

3.2.7 Radioaktive Arbeiten

Liquid Scintillation Counter 2000CA	Canberra Packard GmbH, Dreieich
Fluorescent Image Analyzer FLA 3000	Raytest, Straubenhardt
Eraser	Raytest, Straubenhardt
Software	
BAS Reader Version 2.26	Raytest, Straubenhardt
AIDA 2.11	Raytest, Straubenhardt

3.2.8 Gentechnische Arbeiten

Agagel Mini	Biometra, Göttingen
Autoklav Varioklav Typ 400	H+P Labortechnik GmbH
Brutschrank	Heraeus KB 500
Gene Pulser™	BioRad, München
Hybridisierungsofen	Biometra, Göttingen
Inkubator Shaker G25	New Brunswick Scientific Co. Inc.
Mikrowellenherd	Privileg M200
Netzgerät Consort E455	Fröbel Laborgeräte, Lindau
Polaroidkamera MP4	Land Camera
Puls Controller	BioRad, München
Reinraumbank ET130V/UV	Ehret, Emmendingen

Schüttelwasserbad	Köttermann 3047
Speedvac Univapo 100V	Fröbel Laborgeräte, Lindau
Thermocycler Progene	Thermo DUX, Wertheim
Tempcyler PCR Express, Gradient	Hybaid Labsystems, Frankfurt
Trockenschrank	Memmert
Wasserbad U3	Julabo

3.2.9 Allgemeine Geräte

Feinwaage Satorius analytic	Satorius
Folienschweißgerät	Privileg
Magnetrührer Ikamag® RCT	Janke & Kunkel GmbH CoKG
pH-Messgerät Multiline P4	LHG, Karlsruhe
Schüttler Typ KL2	Bühler Laborgeräte, Tübingen
UV/VIS Spectralphotometer Lambda 2	Perkin Elmer
UV/VIS Spektralphotometer Cary 3E	Varian
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG, Zürich
Waage	Mettler Toledo PB 3001Staufen

Zentrifugen:

Beckman Kühlzentrifuge J2-21	Beckman
Biofuge Fresco	Heraeus Instruments
Ultrazentrifuge Beckman L8-60M	Beckman
Sigma Zentrifuge 202-MK	Sigma
Sorvall Super T21	Kendro, Laboratory Products
Sorvall RC 5B Plus	Kendro, Laboratory Products

MALDI:

Biflex IV, LSA 1000 Series	
Software: Flex Control Vers. 1.0	Bruker Daltonic

Kapillarelektrophorese:

Biofocus® Capillary Electrophoresis System	BioRad, München
--	-----------------

3.2.10 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Einmalsterilfilter 0.2 µm, 0.45 µm	Peqlab
Elektroporationsküvetten 2 mm	Eurogentec
Elektroporationsküvetten 1 mm	Biozym
Eppendorfgefäße 1.5 ml, 2 ml	Renner
Eppendorfgefäße RNasefrei	Biozym
Falcon Tubes 15 ml, 50 ml	Sarstedt
Petrischalen 15x100 mm	Sarstedt
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1 ml, 5 ml	Renner
Pipettenspitzen RNasefrei	Biozym
Ultrafree 4 Filtereinheit (Centricons)	Millipore
Ultrafree PF 60 Filtereinheiten	Millipore

3.3 Molekularbiologische Kits

Zur mRNA-Isolierung:

Oligotex mRNA Mini Kit	QIAgen, Hilden
------------------------	----------------

Zur Plasmidisolierung aus *E.coli*:

QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAgen, Hilden
---------------------------	----------------

Zur gesamt-RNA-Isolierung aus Wurzelkulturen:

RNeasy Plant Mini Kit	QIAgen, Hilden
-----------------------	----------------

Zur DNA-Isolierung aus pflanzlichem Material:

DNeasy Plant Mini Kit	QIAgen, Hilden
-----------------------	----------------

Zur cDNA-Bibliothek Erstellung:

SUPERScript™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning	Life Technologies, Karlsruhe
---	------------------------------

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen:

QIAquick Gel Extraction Kit	QIAgen, Hilden
-----------------------------	----------------

Zur PCR Fragment Klonierung:

Introductory pETBlue™-2 Perfectly Blunt™

Cloning Kit

Novagen, Schwalbach

3.4 Enzyme

Alle verwendeten Enzyme werden bei -20 °C gelagert. Bei Arbeiten mit den Enzymen wird ein gekühlter Metallblock verwendet, um unnötige Erwärmung zu vermeiden.

Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs bezogen. Die Aktivität betrug üblicherweise zwischen 5 und 10 U/µl.

Enzym	Erkennungssequenz	Enzym	Erkennungssequenz
<i>Hind</i> III	5'...A↓AGCTT...3'	<i>Nde</i> I	5'...CA↓TATG...3'
<i>Nsp</i> I	5'...PuCATG↓Py...3'		

Sonstige Enzyme:

Benzonase	Merck
Omniscript Reverse-Transkriptase	QIAGEN
Proteinase-K	Sigma
Pwo DNA-Polymerase	Sigma
RNasin	Boehringer
Sequenzierung-Grade-Modified Trypsin	Promega
Taq DNA-Polymerase	Sigma
Terminale Transferase	New England Biolabs

3.5 Oligonucleotide für die Sequenzierung, PCR, Bindemotivsuche

Die Oligonucleotide wurden, falls nicht anderweitig gekennzeichnet, von der Firma MWG Biotech, Ebersberg bezogen.

I steht für Inosin, Wobble Paare stehen in Klammern.

FeS	5'-TG(CT) III III TG(CT) III III III TG(CT) CC-3'
pET Blue(+)	5'-GGG TAA CGC CAG GAT TCT CCC AGT CAC-3'
pQE(-)	5'-GTT CTG AGG TCA TTA CTG G-3'
poly A	5'-AAA AAA AAA AAA AA (GCT)-3'
poly T	5'-TTT TTT TTT TTT TT (AGC)-3'

pSport(+)	5'-CGT ACG TAA GCT TGG ATC CTC TA-3'
SAMradical	5'-TG(CT) III III III TG(CT) III III TG(CT)-3'
SAMradicalCy5 ¹	5'-Cy5 TG(CT) III III III TG(CT) III III TG(CT)Cy5-3'
SAMradicaloregon	5'-6-FAM TG(CT) III III III TG(CT) III III TG(CT)-3'
SAM I	5'- GAI III GGI III GGI III GG-3'
SAM III	5'-(CT)TI (CT)TI (AC)(AG)I GGI GGI (ACT)(GT)I IT-3'

¹ dieser Primer wurde von IBA GmbH, Göttingen bezogen.

3.6 Organismen, Vektoren, DNA- und Proteinstandards

Organismen:

<i>E.coli</i> BL 21 DE3	Dr. Stanley Tabor, USA
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> LBA 9402	David O'Hagan, England
Elektro Max DHB TM Zellen	Life Technologies, Karlsruhe
Nova Blue Singles TM kompetene Zellen	Life Technologies, Karlsruhe

Datura stramonium Wurzelkulturen

Stamm N4 und B1	Birgid Dräger, Halle
Stamm G2	Eigener Stamm

Vektoren:

cDNA Vektor pSPORT 1	Life Technologies, Karlsruhe
Klonierungsvektor pET Blue-2, Novagen	Calbiochem-Novabiochem GmbH Schwalbach
Klonierungsvektor pQE 70	QIAGEN, Hilden

DNA Längenstandards:

DNA Sizer III	Peqlab, Erlangen
100 bp DNA ladder	New England Biolabs, Frankfurt

Protein Längenstandards:

High und Low range Marker	Boehringer, Mannheim
Wide range Marker	Sigma, München
peQ Gold Protein Marker	Peqlab, Erlangen

IV. Medien, Puffer und Stammlösungen

4.1 Kulturmedien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Lösungen mit deionisiertem Wasser angesetzt und durch Autoklavieren bei 121 °C sterilisiert.

B5-Medium:	30 g Sucrose 3.16 g Gomborg's B5-Medium mit H ₂ O bidest. auf 1 l auffüllen, pH 5.8 (Nicht autoklavieren sondern sterilfiltrieren! Lagerung: 4 °C)
B5-Agar:	1 l B5-Medium 30 g Agar pH 6.4 (Muss sehr fest sein, sonst finden die Pflanzen keinen Halt.)
LB-Medium:	10 g Bactotrypton 10 g NaCl 5 g Bactoyeast mit H ₂ O bidest. auf 1 l auffüllen
LB-Platten:	1 l LB-Medium 15 g Agar
LB-Amp-Platten:	1 l LB-Medium 15 g Agar 85 mg Ampicillin (Das Ampicillin wird kurz vor dem Gießen der Platten in das auf ca. 50 °C abgekühlte Medium gegeben.)
LB-Amp/Kann-Platten:	LB-Amp-Platten mit 25 mg Kanamycin pro Liter
SOB-Medium:	2 % Bactotrypton 1 % Bactoyeast 10 mM NaCl 2.5 mM KCl 10 mM MgSO ₄ (Autoklavieren, danach mit einer sterilfiltrierten 1 M MgCl ₂ Stammlösung auf 10 mM MgCl ₂ einstellen.)
SOC-Medium:	2 % Bactotrypton

	0.5 % Bactoyeast
	10 mM NaCl
	2.5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄
	10 mM Glucose
YMB-Medium:	0.5 g K ₂ HPO ₄
	0.2 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	0.1 g NaCl
	0.4 g Yeast
	10 g D-Mannitol
	mit H ₂ O bidest. auf 1 l auffüllen, pH 7.0

4.2 Puffer und Stammlösungen

4.2.1 Aufschlusspuffer

Standardaufschlusspuffer:	17.4 g K ₂ HPO ₄
	1.9 g Na ₂ EDTA
	85.6 g Sucrose
	mit H ₂ O auf 1 l auffüllen, pH 8
frisch zugeben:	Pefablok (48 mg/ml 10x Stamm)
	DTT 0.46 mg/ml
2D-Gelelektrophorese:	2 M Thioharnstoff
	7 M Harnstoff
	4 % NP 40
frisch zugeben:	1 % DTT
	1 % Plant Protease Inhibitor Cocktail
Blau-Native-Polyacrylamidelektrophorese:	
	64 g Sorbit
	8 ml 0.25 M HEPES (KOH pH 7.8)
	400 µl 1 M KCl
	400 µl 0.1 M EDTA
	mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen

4.2.2 Puffer und Stammlösungen für die Elektrophorese

Puffer für die Gelelektrophorese

50 x TAE-Puffer (für Agarosegele): 242 g Tris
 57.1 ml Eisessig
 125 ml 0.4 M EDTA-Lösung, pH 8.0
 mit H₂O auf 1 l auffüllen

Probenpuffer für Agarosegele: 0.025 g Bromphenolblau
 4 g Saccharose
 mit H₂O auf 10 ml auffüllen

Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE

4 x SDS-PAGE-Laufpuffer : 24 g Tris
 115 g Glycin
 8 g SDS
 auf 2 l mit H₂O auffüllen, pH 8.3

1 x SDS-Probenpuffer: 0.64 g Tris
 0.4 g SDS
 0.16 g DTT
 2 mg Bromphenolblau
 0.27 ml Eisessig
 2 ml Glycerin
 mit H₂O auf 10 ml auffüllen

SDS-PAGE Lösung A: 36.6 g Tris
 230 µl TEMED
 mit H₂O auf 100 ml auffüllen
 pH 8.8

SDS-PAGE Lösung B: 2.33 g Tris
 800 µl 20 % SDS
 50 µl TEMED
 mit H₂O auf 100 ml auffüllen

SDS-PAGE Lösung C: Rotiphorese Gel 30
 (wässrige Lösung aus 30 % Acrylamid und 0.8 %
 Bisacrylamid)

Puffer und Lösungen für die Native-PAGE

Nativ-Laufpuffer (10 x):	30.3 g Tris 144 g Glycin mit H ₂ O auf 1 l auffüllen
Nativ-Lösung A:	18.3 g Tris mit H ₂ O auf 100 ml auffüllen, pH 8.8 (HCl)
Nativ-Lösung B:	6.1 g Tris mit H ₂ O auf 100 ml auffüllen, pH 6.8 (HCl)
Probenpuffer (nicht reduzierend):	0.5 ml 1 M Tris pH 6.8 0.8 ml Glycerin Spatelspitze Bromphenolblau mit H ₂ O auf 8 ml auffüllen
Coomassie-Färbelösung:	1.4 g Coomassie R250 450 ml Ethanol 50 ml Eisessig mit H ₂ O auf 1 l auffüllen
Entfärbelösung:	450 ml Ethanol 450 ml H ₂ O 100 ml Eisessig

Lösungen für die 2D-Page

Rehydratisierungslösung:	2 M Thioharnstoff 7 M Harnstoff 4 % NP 40
Äquibrierungslösung (Stamm):	50 mM Tris HCl 6 M Harnstoff 30 % Glycerin 2 % SDS zu 10 ml Aliquots portionieren, -20 °C
Äquibrierungslösung A:	5 ml Äquibrierungslösung (Stamm) 50 mg DTT
Äquibrierungslösung B:	5 ml Äquibrierungslösung (Stamm) 125 mg Iodacetamid etwas Bromphenolblau

Lösungen für die Colloidale-Coomassie Färbung

Stammlösung A:	20 g <i>ortho</i> Phosphorsäure (85 %) 100 g Ammoniumsulfat mit H ₂ O auf 980 ml auffüllen
Stammlösung B:	1 g Coomassie G250 mit H ₂ O auf 20 ml auffüllen
Fixierlösung:	40 % Methanol 10 % Eisessig
Färbelösung:	98 % Stammlösung A 2 % Stammlösung B frisch ansetzen und einige Stunden rühren
Färbung CC:	80 % Färbelösung 20 % Methanol
Entfärbung CC:	H ₂ O

Lösungen für die Silberfärbung

Fixierung:	35 ml Eisessig 140 ml Ethanol 175 ml H ₂ O
Sensitivierung:	105 ml Ethanol 1.75 ml Glutardialdehyd (25% w/v) 14 ml Natriumthiosulfat (5% w/v) 23.8 g Natriumacetat mit H ₂ O auf 350 ml auffüllen
Färbelösung:	35 ml Silbernitratlösung (2,5% w/v) 0,14 ml Formaldehyd (37% w/v) mit H ₂ O auf 350 ml auffüllen
Entwickler:	8.75 ml Natriumcarbonat 0.07 ml Formaldehyd (37% w/v) mit H ₂ O auf 350 ml auffüllen
Stopplösung:	5.11 g Na ₂ EDTA 2 H ₂ O mit H ₂ O auf 350 ml auffüllen

Puffer und Lösungen für die 2D-Blau-Native Tricine-SDS- PAGE

1. Geldimension

5 x Kathodenpuffer:	44.8 g Tricine 15.7 g Bis Tris 1 g Coomassie G250 mit H ₂ O auf 1 l auffüllen/ pH 7 (HCl)
6 x Anodenpuffer:	125.5 g Bis Tris mit H ₂ O auf 2 l auffüllen/ pH 7 (HCl)
6 x Gelpuffer BN:	42.2 g ACA 7.8 g Bis Tris mit H ₂ O auf 250 ml auffüllen/ pH 7 (HCl)
ACA 750:	49.2 g ACA 5.23 g Bis Tris 0.1 g EDTA mit H ₂ O auf 500 ml auffüllen/ pH 7 (HCl)
5 % Serva Blue G:	9.84 g ACA 5 g Coomassie G250 mit H ₂ O auf 100 ml auffüllen
1 x Probenpuffer:	750 µl ACA 750 150 µl 10 % n-Dodecylmaltosid 150 µl 5 % Serva Blue G (immer frisch ansetzen!)
49,5T/3C:	240 g Acrylamid 7.5 g N,N'-Methylen-bis-acrylamid 1 Löffel Mixed-Bed-Resin mit H ₂ O auf 500 ml auffüllen (30 min rühren, in eine Flasche abfiltrieren.)

2. Geldimension (Gelgröße 140 x 160 x 0.75, V_{max} 16.8 ml)

Gelpuffer-Tricine:	181.71 g Tris 15 ml 10 % SDS mit H ₂ O auf 500 ml auffüllen. (Erst Tris lösen (erwärmen), dann SDS zugeben, pH auf 8.45 einstellen, Volumen einstellen.)
--------------------	---

IV Medien, Puffer und Stammlösungen

Anodenpuffer:	36.34 g Tris mit H ₂ O auf 1.5 l auffüllen/ pH 8.9 (HCl)
Kathodenpuffer:	12.11 g Tris 17.92 g Tricine 10 ml 10 % SDS mit H ₂ O auf 1 l auffüllen
Overlay-Lösung:	1 M Tris 0.1 % SDS pH 8.45 (HCl)

Puffer für Colony Blots

1. Lösung:	10 % SDS
Denaturierungslösung:	0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl
Neutralisierungslösung:	1.5 M NaCl, 0.5 M Tris HCl, pH 7.4
20 x SSC:	175.3 g NaCl, 88.2 g NaCitrat mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen pH 7
Hybridisierungspuffer:	11.9 g K ₂ HPO ₄ , 4.2 g KH ₂ PO ₄ , 2 g BSA 0.074 g EDTA mit H ₂ O auf 200 ml auffüllen
Proteinase-K Verdaupuffer:	1.51 g Tris HCl pH 7.6 (50 mM) 0.25 g SDS (0.1 %) 0.73 g NaCl (50 mM) (100µg/ml Proteinase-K frisch zusetzen.)

Lösungen für Proteinblots

Transfer-Puffer (für Membranblot):	11.26 g Glycin 2.42 g Tris mit H ₂ O auf 1 l auffüllen
Ponceau-S Färbelösung (für Membrane):	0.5 % Ponceau-S 1 % Essigsäure

4.2.3 Puffer für die Enzymisolierung

Standard-Aufschluss-Puffer:	17.4 g K ₂ HPO ₄ 1.9 g Na ₂ EDTA 85.6 g Sucrose
------------------------------------	--

frisch zugeben: mit H₂O auf 1 l auffüllen, pH 8.0
Pefablok (Konz (1000 x): 48 mg/ml)
DTT (460 mg auf 1 l Puffer)

4.2.4 Stammlösungen

10 % APS	100 mg Ammoniumperoxodisulfat 1 ml H ₂ O
Ampicillin (Molekularbiologisch):	85 mg Ampicillin/ml H ₂ O bei -20 °C lagern
Ampicillin für Wurzelkulturen:	500 mg Ampicillin/ml H ₂ O (-20 °C)
0.5 mM Benzamidin:	78 mg Benzamidin/ml H ₂ O (4 °C)
Cefotaxim (Claforan TM)	200 mg/l
1 % Ethidiumbromid:	100 mg Ethidiumbromid/10 ml H ₂ O (4 °C)
100 mM IPTG:	23.8 mg IPTG/ml H ₂ O (-20 °C)
Kanamycin:	25 mg Kanamycin/ml H ₂ O (-20 °C)
Oxytetracyclin:	12.1 mg/ml 2:1 H ₂ O/EtOH
20 mM Pefablok:	4.8 mg/ml H ₂ O (4 °C)
Rifampicin:	75 mg/ml
Tetracyclin:	12.5 mg/ml

V. Methoden

Die im Folgenden aufgelisteten Methoden und Arbeitstechniken wurden weitgehend dem Handbuch „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“ [Sambrook *et al.*, 1989] entnommen. Entspricht die Vorschrift aus einer anderen Quelle, so wurde dies kenntlich gemacht.

5.1 Steriltechnik

Zur Sterilisierung werden alle Medien, Puffer und Verbrauchsmaterialien bei 121 °C und 1.5 bar 20 min im Autoklaven erhitzt. Hitzeempfindliche Lösungen werden sterilfiltriert (z.B. Gomborg's B5-Pflanzenmedium). Pipetten und Glasgeräte werden im Trockenschrank mindestens 2 h bei 200 °C gebacken. Arbeiten, bei denen eine Kontamination mit Fremdorganismen verhindert werden soll, werden unter einer Reinraumbank ausgeführt.

5.2 Mikrobiologische Arbeitstechniken

5.2.1 Herstellung einer Glycerinkultur

Das Anfertigen einer Glycerinkultur dient zur längeren Lagerung einer bestimmten Bakterienkultur. Dazu werden 700 µl einer ÜNK mit 300 µl sterilem 50%igem Glycerin gemischt. Bei Einlagerung in den –80 °C Tiefkühlschrank bleiben die Zellen für etwa 1 Jahr aktiv.

5.2.2 Ausstrich von Glycerinkulturen auf Agarplatten

Um von einer Glycerinkultur Kolonien anziehen zu können, wird diese zuvor auf geeignetem Medium ausgestrichen. Mit Hilfe einer sterilen Impföse wird vorsichtig etwas von der Glycerinkultur abgenommen und auf einer Agarplatte ein Verdünnungsausstrich ausgebracht. Die so behandelte Agarplatte wird bei 37 °C im Brutschrank inkubiert bis die Kolonien einen Durchmesser von ca. 2 mm erreicht haben (12-15 h). Zur Lagerung dieser Ausstriche werden die Agarplatten mit Parafilm verschlossen und bei 4 °C aufbewahrt.

5.2.3 Ansetzen einer Übernachtskultur

Mit Hilfe einer sterilen Impföse wird eine einzelne Bakterienkolonie von einer Agarplatte abgenommen und in 5 ml eines geeigneten Flüssigmediums überführt. Soll eine Selektion über eine Resistenz erfolgen, so wird das Medium zuvor mit dem geeigneten Antibiotika versetzt. Das so angeimpfte Medium wird für 12-15 h bei 37 °C und 250 rpm in einen Schüttler gestellt.

5.2.4 Herstellung elektrokompenter Bakterienzellen

Kompetente Zellen sind Zellen, die befähigt sind DNA aufzunehmen. Bei der Anzucht von kompetenten Zellen für die Elektroporation ist es besonders wichtig steril zu arbeiten und die Bakterien möglichst immer auf Eis zu handhaben.

500 ml LB-Medium werden mit 10 ml einer ÜNK des betreffenden Bakterienstammes angeimpft. Die Zellen werden bis zu einem OD_{600} von 0.3-0.4 kultiviert. Nach einer Zentrifugation bei 5000 rpm für 20 min wird der Überstand vollständig abgeschüttet und die Zellen sofort auf Eis gestellt.

Nun erfolgt eine Resuspendierung des Bakterienpellets in 500 ml eiskalter 10%iger Glycerinlösung. Die Zentrifugation und Resuspendierung wird noch viermal wiederholt, wobei die Zellen nacheinander in 250 ml, 50 ml und 10 ml Glycerinlösung (10 %) aufgenommen werden. Zum Schluss werden die so gewaschenen und aufkonzentrierten Zellen in insgesamt 500 μ l der 10%igen Glycerinlösung resuspendiert und in 70 μ l Portionen aliquotiert. Diese werden sofort in einem Isopropanol/Trockeneis-Gemisch schockgefroren. Bei Lagerung im -80 °C Tiefkühlschrank sind die Zellen längere Zeit haltbar.

5.3 DNA relevante Arbeitstechniken

5.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA [QIAprep, 1997]

Plasmidisolierungen wurden mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits von Qiagen durchgeführt. Die aufgeführte Vorschrift wurde aus der Beschreibung des QIAprep Spin Kits entnommen. Zur Durchführung der Plasmidisolierung werden 4-5 ml einer ÜNK 10 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. Das überstehende Medium wird verworfen und das Bakterienpellet in 250 μ l Puffer-P1 resuspendiert. P1 enthält RNase und sorgt für den Abbau der zellulären RNA nach der Lyse. Anschließend werden 250 μ l Puffer-P2 zugegeben, vorsichtig durch mehrmaliges Invertieren des Eppendorfgefäßes durchmischt, und für maximal 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In diesem Schritt wird durch den SDS/NaOH-haltigen Puffer-P2 die Zelllyse erzielt und Proteine werden denaturiert. Nun werden mit 350 μ l des guanidiniumhydrochloridhaltigem Puffer-N3 Proteine und chromosomale-DNA ausgefällt. Nach Zentrifugation bei 14 000 rpm für 10 min wird der Überstand, welcher die Plasmid-DNA enthält in ein Spinsäulchen überführt und erneut für 1 min bei 14 000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und das Säulchen zuerst mit 500 μ l Puffer-PB und anschließend mit 750 μ l EtOH-haltigem Puffer-PE gewaschen. Zuletzt wird das Säulchen nach Entfernung des Durchflusses noch einmal zentrifugiert, so dass möglichst wenig PE an

der Säulenmembran haftet. Die Säulchen werden in 1.5 ml Eppendorfgefäße überführt und die DNA mit 100 µl H₂O eluiert.

5.3.2 DNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial [DNeasy, 2000]

DNA-Isolierung aus den Wurzelkulturen wurden mit Hilfe des DNeasy[®] Plant Mini Kits der Firma Qiagen durchgeführt. Maximal 100 mg Material sind mit diesem Kit aufarbeitbar. Dieses wird mit Hilfe eines Dstroy[®] Stick in einem 2 ml Eppendorftube mit flüssigem Stickstoff zermörsert. Mit 400 µl Puffer-AP1 und 4 µl RNase (100 mg/ml) werden die Pflanzenzellen für 10 min bei 65 °C aufgeschlossen. Durch 130 µl Puffer-A2 werden Proteine, Detergenzien und Polysaccharide auf Eis langsam ausgefällt. Dieses langsame Ausfällen verhindert eine Co-Präzipitation der DNA und damit deren Scherung. Der entstandene Niederschlag wird abzentrifugiert und das Lysat für einen Homogenisierungsschritt durch eine QIAshredder-Säule zentrifugiert. Der Durchfluss wird mit 1.5 Volumen Puffer-AP3 versetzt. Durch den in diesem Puffer enthaltenen Ethanol kann beim nächsten Schritt, einer Zentrifugation durch eine DNeasy-Mini-Säule, die DNA an der Säulenmembran haften. Die Säule wird zweimal mit je 500 µl Puffer-AW gespült. Nach Verwerfung des Filtrats wird, um die komplette Entfernung des Ethanols zu gewährleisten, für 2 min trocken zentrifugiert. Die DNA wird zweimal mit 100 µl 65 °C warmen Puffer-AE von der Säulenmembran eluiert.

5.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgt mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese durch Vergleich mit einem Marker bekannter Größe und Konzentration. Alternativ kann eine Konzentrationsbestimmung in Lösung durchgeführt werden. Dazu wird der OD bei 260 und 280 nm bestimmt. OD₂₆₀=1 entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml RNA oder 33 µg/ml einzelsträngiger DNA. Das Verhältnis der Optischen Dichten OD₂₆₀/OD₂₈₀ sollte etwa 1.8 betragen. Bei einem niedrigeren Wert ist viel Protein vorhanden, ein höherer Wert signalisiert eine Kontamination mit RNA.

5.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung verschieden langer DNA-Fragmente und zur Konzentrationsbestimmung kann eine Agarosegelelektrophorese verwendet werden. Für ein 1%iges Agarosegel werden 0.5 g Agarose in 50 ml 1 x TAE-Puffer suspendiert und für ca. 1 min in der Mikrowelle gekocht bis sich die Agarose löst. Sollen kleinere DNA-Fragmente (< 0.5 kbp) aufgetrennt

werden, so kann die Agarosekonzentration auf bis zu 2 % erhöht werden. Nach dem Aufkochen werden 2.5 µl Ethidiumbromid zugegeben. Die Agaroselösung wird in die vorbereitete Kammer gegossen und der Kamm für die Probenaschen gesetzt. Nach ca. 30-60 min ist das Gel auspolymerisiert. Der Kamm wird gezogen und das Gel in eine mit TAE-Puffer gefüllte Laufkammer überführt.

Die aufzutrennenden Proben werden vor dem Auftragen 1:1 mit Probenpuffer vermischt. Der Lauf erfolgt bei einer konstanten Spannung von 100 V. Das zugegebene Ethidiumbromid bildet mit den DNA-Fragmenten eine Interkalationsverbindung, diese fluoresziert im UV-Licht und kann somit auf einem UV-Transilluminator betrachtet und photographiert werden.

5.3.5 Isolierung von DNA aus dem Agarosegel [QIAquick™, 1995]

Die Isolierung von DNA aus einem Agarosegel wurde mit dem QIAquick Gel Extraktions Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Die Vorschrift wurde dem Handbuch des Kits entnommen.

Auf einem UV-Transilluminator wird die gewünschte Bande mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Gelstücke werden nach ihrer Gewichtsbestimmung in der dreifachen Menge Puffer-QG bei 50 °C im Wasserbad aufgelöst. Ist das zu isolierende DNA-Fragment kleiner als 0.5 kbp oder größer als 4 kbp, wird ein Volumen Isopropanol zugegeben. Die Lösung wird nun auf ein Säulchen aufgegeben und bei 14 000 rpm abzentrifugiert. Das Säulchen wird mit 500 µl Puffer-QG und anschließend mit 750 µl EtOH-haltigem Puffer-PE gewaschen. Da verbliebenes Ethanol bei weiteren Umsetzungen stören würde, wird es mittels einer zusätzlichen Zentrifugation bei 14 000 rpm entfernt. Nach dem Trocknen des Säulchens erfolgt die Elution mit 50 µl H₂O oder TE-Puffer.

5.3.6 Restriktionsverdau von Nukleinsäuren

Der Verdau von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen erfolgt meist bei 37 °C für 1-2 h. Einige wenige Enzyme arbeiten bei anderen Temperaturen. Es wird ein mindestens dreifacher Enzymüberschuss eingesetzt, um zu gewährleisten, dass ein vollständiger Verdau erfolgt.

Das Reaktionsvolumen eines Restriktionsverdaus beträgt üblicherweise 20 µl. Als Reaktionspuffer wird der vom Hersteller mitgelieferte 10 x Puffer verwendet. Bei einem Doppelverdau wird derjenige Puffer verwendet, bei dem beide Enzyme die höchste Aktivität aufweisen. Als Berechnungsgrundlage für die eingesetzte Enzymmenge gilt die Definition der

Enzymeinheit. Dabei ist eine Einheit (1 unit) die Menge an Enzym, die 1 µg λ-DNA bei 37 °C in 1 h vollständig schneidet. Der Enzymanteil im Verdauansatz sollte jedoch 10 % nicht überschreiten, da sonst das Glycerin, in welchem die Enzyme gelagert sind, den Verdau stören kann. Üblicherweise werden 0.5-1.5 µl Restriktionsenzym (10 U/µl) zu einem Verdauansatz zugegeben.

5.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente können, falls sie komplementäre Enden besitzen, mit Hilfe einer DNA-Ligase wieder verknüpft werden. Dazu werden 50-100 ng Vektor-DNA mit dem 5 bis 10fachen Überschuss an Insert-DNA in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit 5 x Ligase-Reaktionspuffer, 1 mM ATP, 5 mM DTT und 0.5 µl T4 DNA-Ligase (2 U/µl) vermischt. Nach 15 h Inkubation bei 16 °C kann der Ansatz direkt in die gewünschten Zellen transformiert werden. Bei einer Ligation von DNA-Fragmenten mit glatten (blunt) Enden, muss ein spezieller Reaktionspuffer verwendet werden.

Wird die DNA und das Insert mit nur einem Restriktionsenzym geschnitten, ist es nötig dass nach der Transformation erhaltene Klone auf Religation, Mehrfachinsertion und Insertionsrichtung untersucht werden. Eine Möglichkeit, die Religation verdauter Vektor-DNA zu verhindern, ist die Dephosphorylierung am 5'-Ende mit Hilfe alkalischer Phosphatase.

5.3.8 Elektrotransformation in Bakterienzellen

Durch Transformation wird es Bakterienzellen ermöglicht, fremde DNA (z.B. Plasmide) aufzunehmen. Dazu sind sie aber nur in der Lage, wenn die Zellwand für kurze Zeit durchlässig wird. Elektrokompente Zellen wurden mit einer Glycerin/H₂O-Mischung behandelt, so dass bei der Aussetzung eines kurzen Spannungsimpulses bei der Elektroporation die Zellwand für kurze Zeit durchlässig wird und somit die DNA aufgenommen werden kann. Die Selektion der transformierten Zellen erfolgt über die Antibiotikaresistenz, welche das aufgenommene Plasmid enthält. Somit können nur solche Zellen Kolonien auf einem Antibiotikanährboden bilden, welche das Plasmid aufgenommen haben.

Für die Transformation werden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit der zu transformierenden DNA (ca. 20 ng) vorsichtig durchmischt und in eine gekühlte Transformationsküvette überführt. Die Küvette wird in einen vorgekühlten

Transformationsschlitten gestellt und die Transformation unter folgenden Bedingungen durchgeführt.

Physikalische Messgröße	Wert
Spannung [kV]	1.25
Kapazität [μ F]	25
Widerstand [Ω]	200
Elektrodendistanz [mm]	2
Zeitkonstante [ms]	2-5

Tabelle 1: Parameter für die Elektroporation von *E.coli*

Unmittelbar im Anschluss an den Elektroporationsschritt wird der Küvetteninhalt in 1 ml SOC-Medium pipettiert und 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wird der Ansatz auf einem geeigneten Medium ausplattiert und für 15 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

5.3.9 Amplifikation von DNA mit Hilfe der „Polymerase Chain Reaction“ (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion dient zur *in vitro* Vermehrung von DNA. Ein typischer Reaktionsansatz besteht aus 1-50 ng Templat-DNA in geeignetem Volumen, 2 μ l 10 x Reaktionspuffer, 0.2 μ l dNTP-Mix (40 mM), je 25 pmol der verwendeten Primer und 1 U thermostabile Polymerase. Mit H₂O wird auf 20 μ l aufgefüllt.

Die gewählte annealing Temperatur richtet sich nach der Länge und Zusammensetzung der verwendeten Primer. Als optimale Temperatur wird ein Wert empfohlen, der 5 °C unter dem T_m-Wert der Primer liegt. Werden dabei zu viele unspezifische Amplifikate erhalten, kann sie erhöht werden. Wird dagegen kein PCR-Produkt erhalten, muss sie eventuell erniedrigt werden. Standardmäßig werden 25 Zyklen durchfahren. Die notwendige Dauer der Extension richtet sich nach der Länge des PCR-Produktes. Als Faustregel gilt eine Zeit von 1 min pro 1000 bp die amplifiziert werden sollen.

Die Polymerasekettenreaktion kann auch dazu verwendet werden, gewünschte Restriktionsschnittstellen in ein DNA-Fragment einzufügen. Dies wird durch die Verwendung von Primern erreicht, die an ihrem 5'-Ende die Sequenz für die entsprechende Schnittstelle tragen.

Um zu überprüfen, ob das gewünschte Fragment entstanden ist, kann nach der PCR ein Teil des Ansatzes auf ein Agarosegel oder einen DNA-Chip aufgetragen werden.

5.3.10 DNA-Sequenzierung

Die zu sequenzierende DNA wurde entweder als Lyophilisat zu GATC in Konstanz oder zu MWG-Biotech in Ebersberg gesandt, um dort die Sequenzierung durchführen zu lassen. Alternativ wurden die Sequenzierung mit Hilfe des ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit von Perkin Elmer durchgeführt [ABI PRISM®, 1998] und nur zur Auswertung an die oben genannten Firmen versandt.

Die Didesoxynucleotide sind bei diesem Kit mit einem Fluorescein-Donorfarbstoff (z.B. 6-Carboxyfluorescein), der mit einem Dichlorrhodamin-Akzeptorfarbstoff verbunden ist, markiert. Das Extinktionsmaximum jedes Farbstoffs wird durch den Fluorescein-Donor und das Emissionsspektrum durch den Rhodamin-Akzeptor bestimmt. Die vier verschiedenen Didesoxynucleotide sind mit unterschiedlichen Akzeptorfarbstoffen markiert. Die Sequenzierreaktion kann somit in einem Reaktionsansatz ablaufen.

Pro Reaktion werden 5 µl der zu sequenzierenden DNA (100-250 ng), 4 µl des „Terminator Ready Reaction Mix“ und 1 µl Primer (3.2 pmol) gut vermischt. In der schon fertig angesetzten Reaktionsmischung befinden sich alle Desoxy- und die markierten Didesoxynucleotide, sowie die thermostabile AmpliTaq DNA-Polymerase in einem geeigneten Puffersystem. Folgender Zyklus wird 25mal durchfahren:

96 °C	30 s
50 °C	15 s
60 °C	4 min

Tabelle 2: Parameter für die „Cycle-Sequencing“ Reaktion

Nach Beendigung der Reaktion wird der Ansatz in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß überführt, auf 30 µl aufgefüllt und zur Auswertung zu GATC nach Konstanz versendet.

5.3.11 Klonierung mit dem Perfectly Blunt™ Cloning Kit

[Perfectly Blunt™ Cloning Kit, 1999]

Zur Klonierung von geringen Mengen (0.05 pmol) an DNA sind die Perfectly Blunt™ Cloning Kits von Novagen geeignet. In dieser Arbeit wurde das Introductory pETBlue™-2 Perfectly Blunt™ Cloning Kit verwendet. Die zu klonierenden Fragmente stammten aus der Bindemotivsuche mittels PCR wie sie in Kapitel 5.5.1 beschrieben wird.

Im ersten Schritt werden an dem Fragment eventuelle 3´ oder 5´-Überhänge entfernt und die stumpfen Enden (blunt ends) phosphoryliert. Im folgenden Schritt wird das phosphorylierte Insert in einen dephosphorylierten Vektor ligiert und anschließend in hocheffiziente Nova

Blue Kompetente Zellen transformiert. Falls eine Überexpression des klonierten Genproduktes erwünscht ist, kann die Plasmid-DNA in TunerTM(DE3)*pLacI* kompetente Zellen umtransformiert werden. Bei diesen Zellen ist eine Induktion mit IPTG möglich.

Die aufgeführte Vorschrift wurde aus der Beschreibung zu dem Kit entnommen und hinsichtlich der Transformation optimiert.

Für die Klonierung kann entweder der PCR-Ansatz direkt, oder aus einem Agarosegel isolierte DNA, verwendet werden. Um eine direkte Klonierung zu ermöglichen werden 1 Volumen einer Chloroform:Isoamylalkohol (24:1)-Mischung zu dem PCR-Ansatz gegeben, für 1 min stark gevortext und anschließend zentrifugiert.

End Conversion

Bis zu 2 µl der wässrigen Phase können für die Klonierung verwendet werden. Falls ein Insert zu Vektor Ratio von 1:1 bis 2.5:1 mit diesen Volumina nicht erreichbar ist, muss die DNA entweder an einer Speedvac oder durch Ausfällung aufkonzentriert werden.

Als Standard verwendet man 0.05 pmol DNA (16.5 ng eines 500 bp Fragmentes). Für die End Conversation wird folgende Reaktionsmischung pipettiert:

0.5- 2	µl PCR-Produkt
x	µl Nuklease-freies Wasser
5	<u>µl End Conversation Mix</u>
10	µl Gesamtvolumen

Die Reaktionsmischung wird bei 22 °C für 15 min inkubiert und anschließend bei 75 °C für 5 min erhitzt, um die in dem Mix enthaltene Kinase zu inaktivieren, da diese sonst zu einem hohen Hintergrund beitragen würde. Die Mischung wird kurz auf Eis abgekühlt und zentrifugiert. Anschließend kann mit der Ligation fortgefahren werden.

Ligation

Für die Ligation werden 1 µl Blunt Vektor und 1 µl T4 DNA-Ligase (4 U) direkt zu der End Conversion Reaktion gegeben und bei 22 °C für 15 min inkubiert.

Transformation

Für die Transformation werden die NovaBlue SinglesTM Competent Cells auf Eis für 3-5 min aufgetaut. Nun wird 1 µl der Ligationsreaktion zu den Zellen geben und mit der Pipettenspitze vorsichtig mischen. Der Ansatz wird für 5 min auf Eis, anschließend genau 30 sec bei 42 °C und danach wieder für 2 min auf Eis inkubiert. Unter der Reinraumbank werden 250 µl raumtemperiertes SOC-Medium zu den Transformationsansätzen gegeben und für mindestens

1 h bei 37 °C auswachsen lassen, bevor sie auf LB-Amp-Platten ausplattiert werden können.

Um zu überprüfen, ob eine Rekombination oder eine Religation vorliegt, werden die Plasmide der Klone isoliert und durch einen Doppelverdau mit *Hind* III und *Nsp* I die Fragmentgröße überprüft.

Falls eine Überexpression des Genproduktes gewünscht ist, muss das Plasmid in Tuner(DE3)*pLacI* kompetente Zellen umtransformiert werden. Dazu werden 1 µl des zu transformierenden Plasmids (~1ng/µl) zu den auf Eis aufgetauten Zellen gegeben. Das Zell/Plasmid-Gemisch wird für 5 min auf Eis, 30 sec bei 42 °C und 2 min auf Eis inkubiert. Zu dem Gemisch wird 80 µl raumtemperiertes SOC-Medium gegeben und für mindestens 1 h bei 37 °C auswachsen lassen. Anschließend kann der Ansatz ausplattiert werden. Die Zellen wachsen sehr langsam, so dass u. U. eine Inkubation des Nährbodens über Nacht nicht ausreicht, um Klone zu sehen.

5.4 Herstellung einer cDNA-Bibliothek und RNA relevante Arbeitstechniken

5.4.1 Allgemeines zum Umgang mit RNA

RNasefreies Arbeiten

Ribonucleasen (RNasen) sind sehr stabile Enzyme die für ihre Aktivität keine Cofaktoren benötigen. Da sie sehr schwer zu inaktivieren sind, genügen minimalste Mengen um RNA zu zerstören. Deshalb sollten bestimmte Maßnahmen beim Umgang mit RNA beachtet werden. Um eine RNase Kontamination zu vermeiden, müssen ständig Handschuhe getragen werden. Am Besten werden Einwegplastikartikel, die als RNasefrei gekennzeichnet sein müssen, verwendet. Muss doch auf Glasgefäße zurückgegriffen werden, so sind diese bei > 240 °C für mindestens 4 h zu backen. Lösungen sind mit 0.1 % DEPC zu behandeln. Dazu wird das DEPC zu den zu behandelnden Lösungen (Trislösungen sind nicht geeignet) gegeben und für 12 h bei 37 °C geschüttelt. Das DEPC wird durch Autoklavieren entfernt. Werden Trislösungen verwendet, so muss zuerst das Wasser mit DEPC behandeln werden und erst anschließend kann das Tris zugeben werden, da DEPC mit primären Aminogruppen reagiert und in Gegenwart von Tris zu Ethanol und CO₂ zerfällt.

Lagerung von RNA

Gesamt und mRNA kann bei -20 oder -80 °C für mindestens 1 Jahr in Wasser gelagert werden.

Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von RNA

Die Konzentration und Reinheit von RNA ist mit Hilfe von Absorptionsmessungen an einem Spektrometer bei 260 nm (A_{260}) und 280 nm (A_{280}) bestimmbar. Eine Absorption von 1 bei 260 nm korrespondiert mit einer RNA-Menge von 40 µg pro ml. Diese Beziehung ($A_{260} = 1 = 40 \mu\text{g/ml}$) gilt für eine wässrige Lösung.

Ein Ratio der Absorptionswerte bei 260 und 280 nm ergibt eine Einschätzung der RNA-Reinheit. Das Verhältnis wird durch den pH-Wert beeinflusst. Deshalb wird für diese Messung ein 10 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7.5) empfohlen, im Gegensatz zur Konzentrationsbestimmung, die in H₂O durchgeführt werden sollte.

Reine RNA hat in 10 mM Tris (pH 7.5) ein A_{260}/A_{280} -Ratio von 1.8-2.1, in Wasser beträgt das Verhältnis 1.5-1.9.

5.4.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial

[RNeasy^â Mini Handbook, 1999]

Die Isolierung wurde mit Hilfe des RNeasy[®] Mini Kits von Qiagen durchgeführt. Folgende Vorschrift wurde dem dazugehörigen Handbuch entnommen und zum Teil modifiziert.

Die Bindekapazität der Säulchen des Kits ist auf 100 µg RNA beschränkt. Das entspricht in etwa einer Pflanzenmaterialmenge von 100 mg. Das Kit beinhaltet zwei verschiedene Lysepuffer. Zum einen Puffer-RLT der Guanidinisothiocyanat und den Puffer-RLC, welcher Guanidinhydrochlorid enthält. Als Standard wird der Puffer-RLT empfohlen, der auch in dieser Arbeit verwendet wurde, da er ein höheres Denaturierungs- und Lösungsvermögen besitzt als der RLC-Puffer. Bei einigen Geweben kann dieser Puffer jedoch zur Verhärtung der Probe führen, z.B. bei Mais wegen dessen sekundären Metabolite. Dies macht die RNA-Extraktion unmöglich, weshalb auf Puffer-RLC ausgewichen werden muss.

Nach dem Aufschluss der Zellen werden alle Schritte sehr schnell und bei RT durchgeführt. Für den Aufschluss wurde in dieser Arbeit ein Dstroyer StickTM von Biozym verwendet. Dazu wurde das Wurzelmaterial in flüssigem Stickstoff schockgefroren, mit Hilfe einer Pinzette in 2 ml RNasefreie Eppendorfgefäßen - welche ebenfalls in N₂(l) getaucht waren - überführt und mit dem RNasefreien Stick gemörsert. Nun werden zu dem noch gefrorenen, zermörserten Pflanzenmaterial 450 µl Puffer-RLT gegeben, für 3 min bei 56 °C inkubiert und immer wieder gevortext. Das Lysat wird anschließend auf eine QIAshredder Spin Column gegeben und für 2 min bei maximaler Umdrehung zentrifugiert. Dieser Schritt dient zur Homogenisierung der Probe. Der Durchfluss wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 0.5 Volumen Ethanol (RNasefrei) versetzt und durchmischt. Die Mischung wird auf eine

RNeasy Mini Spin Column aufgetragen und für 15 sec bei maximaler Umdrehung zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und das Säulchen mit 700 µl RW1 gespült, indem die Lösung durchzentrifugiert wird. Das Säulchen wird anschließend in ein neues Eppendorfgefäß gestellt und mit 500 µl RPE-Puffer gespült. Nun wird 2 min bei maximaler Umdrehung zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und das Säulchen erneut zentrifugiert, um das komplette Ethanol, das in diesem Puffer enthalten ist, zu entfernen. Das Säulchen wird erneut in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die RNA zweimal mit 50 µl RNasefreiem Wasser eluiert, d.h. das Wasser auf die Membran gegeben, kurz einwirken lassen und im Anschluss zentrifugiert.

5.4.3 mRNA-Isolierung [Oligotex™ Handbook,1999]

Die Isolierung der mRNA aus der Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des Oligotex Mini Kits der Firma Qiagen durchgeführt.

Oligotex ist ein patentiertes Affinitätsmaterial für die Detektierung, Isolierung, Reinigung und enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren die eine polyadenylierte Sequenz enthalten. Das Material ist ein sphärischer Polystyren-Latex-Partikel, welcher dC₁₀T₃₀-Nukleotide kovalent gebunden hat. Dadurch kann die mRNA, die im Gegensatz zu den restlichen RNA-Arten ein polyadenyliertes Ende besitzt, an die Oligotex-Partikel hybridisieren und somit abgetrennt werden. Mit dem Mini Kit kann die mRNA aus maximal 250 µg Gesamt-RNA isoliert werden.

Die Gesamt-RNA wird in ein RNasefreies Eppendorfgefäß überführt und mit RNasefreiem Wasser auf 250 µl aufgefüllt. Dazu werden 250 µl des 70 °C warmen OEB-Puffers und 15 µl der zuvor bei 37 °C inkubierten, gevortexten und wieder auf RT abgekühlten Oligotex-Suspension gegeben. Die Mischung sollte gut durchmischt und für 3 min bei 70 °C inkubiert werden. Anschließend wird bei Raumtemperatur (20-30 °C) für 10 min inkubiert. Nun wird die Probe bei maximaler Umdrehung für 2 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Oligotex-Pellet wird in 400 µl OW2-Puffer resuspendiert, in eine Spin Column überführt und für 1 min bei maximaler Umdrehung zentrifugiert. Das Säulchen wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 400 µl OW2-Puffer versetzt und wieder für 1 min zentrifugiert. Um die mRNA vom Resin abzulösen wird das Säulchen in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 20-100 µl 70 °C warmem OEB-Puffer resuspendiert und abzentrifugiert. Dieser Schritt wird einmal wiederholt, um eine optimale Ausbeute zu gewährleisten.

5.4.4 Bibliothekserstellung [Superscript™ Plasmid System]

Die cDNA-Bibliothek wurde mit Hilfe des „SuperScript™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning“ von Life Technologies erstellt. Die Vorschrift wurde dem dazugehörigen Manual entnommen.

Dieses Kit ermöglicht die Erstellung einer gerichteten cDNA-Bibliothek in *E.coli*, d.h. alle Fragmente sind in der für die Expression der Genprodukte benötigten Richtung inkloniert. Die gesamte Bibliothekserstellung ist, ausgehend von der isolierten mRNA, auf drei Tage aufgeteilt.

In Abbildung 12 ist ein Überblick der Bibliothekserstellung dargestellt.

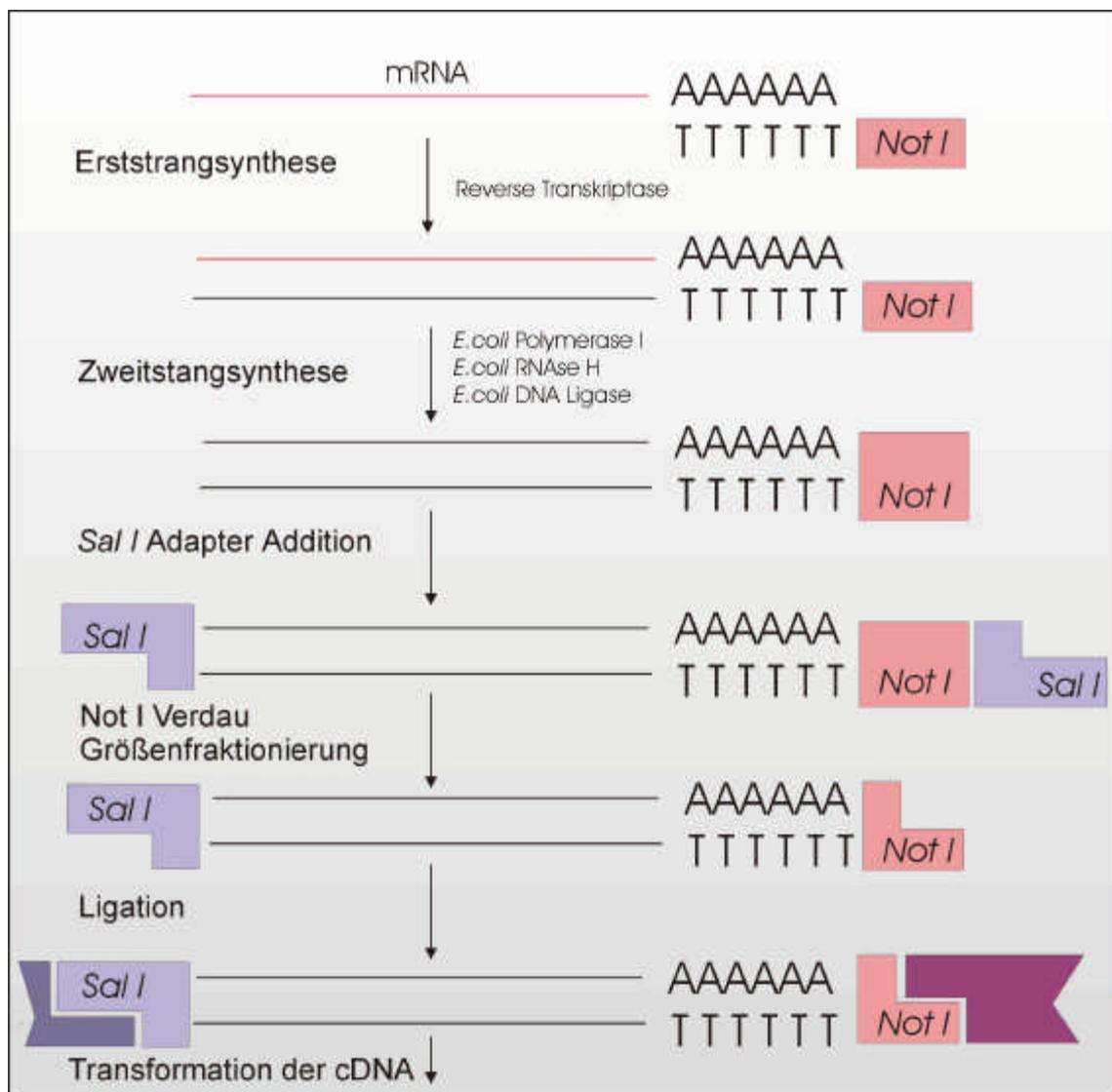


Abb. 12: Überblick über die cDNA-Bibliothek Erstellung

Ausgehend von mRNA wird mit Hilfe einer Reversen-Transkriptase die Erststrang cDNA synthetisiert. Als Startpunkt dient ein polyT-Primer mit einem *Not I*-Adapter. Die

Zweitstrangsynthese wird durch eine Kombination von drei Enzymen katalysiert.

Mit *E. coli* RNase H wird der RNA aus dem RNA/DNA-Hybrid abgebaut. Es entstehen Einzelstrangbrüche (engl. nicks). Das zweite Enzym eine Polymerase I verfügt über eine Kombination von 5'-3' Exonuklease- und Polymeraseaktivität. Durch diese werden Nukleotide auf der 5'-Seite des Bruches durch Neue ersetzt. Mit dieser Reaktion wird der Einzelstrangbruch in Richtung 3'-Ende des DNA-Stranges verschoben (translatiert). Das 3. Enzym für die Zweitstrangsynthese ist eine DNA-Ligase. Diese verbindet die von der Polymerase I synthetisierten Teilstücke zu einem kompletten Gegenstrang.

Um eine gerichtete cDNA-Bibliothek zu erhalten, wird im folgenden Schritt eine Asymmetrie eingeführt. Diese wird durch unterschiedliche Restriktionsschnittstellen an den cDNA-Enden erhalten. Durch eine *Sal I*-Adapter Addition und anschließendem *Not I*-Verdau ist es möglich die cDNA gerichtet über *Sal I* und *Not I* in das Plasmid einzuklonieren.

Für die Bibliotheken wurde mRNA der *Datura stramonium* Wurzelkulturen G2 verschiedenen Alters (11, 13, 18 Tage) verwendet. Das heißt es wurden insgesamt drei Bibliotheken hergestellt.

Erststrangsynthese

Die eingesetzte mRNA-Menge sollte zwischen 1 und 5 µg liegen. In dieser Arbeit wurde die maximal einsetzbare mRNA-Menge verwendet. Die mRNA (5 µg) wird in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und mit RNasefreiem Wasser auf 5 µl aufgefüllt, dazu werden 2 µl des *Not I*-Primer-Adapters addiert. Die Mischung wird für 10 min bei 70 °C inkubiert, auf Eis abgekühlt und zentrifugiert. Nun werden folgende Lösungen dazupipettiert:

5 x First-Strand Buffer	4 µl
0.1 M DTT	2 µl
10 mM dNTP-Mix	1 µl
<u>[α-³²P]dCTP [1µCi/µl]</u>	<u>1 µl</u>
Gesamtvolumen	15 µl

Die Mischung wird kurz gevortext, zentrifugiert und bei 37 °C für 2 min equilibriert. Im Folgenden werden 5 µl der Superscript II RT zugegeben, vorsichtig durchmischt und bei 37 °C für 1 h inkubiert. Um die Reaktion abubrechen, wird das Eppendorfgefäß auf Eis gestellt. Für die Erststrangsyntheseausbeutebestimmung werden 2 µl der Mischung entnommen.

Zweitstrangsynthese

Die restlichen 18 μl werden sofort weiterprozessiert. Dazu werden auf Eis folgende Lösungen hinzugefügt:

RNasefreies Wasser	93 μl
5 x Second-Strand Buffer	30 μl
10 mM dNTP-Mix	3 μl
<i>E. coli</i> DNA-Ligase (10 U/ μl)	1 μl
<i>E. coli</i> DNA-Polymerase (10 U/ μl)	4 μl
<i>E. coli</i> RNaseH (2 U/ μl)	1 μl

Die Mischung wird vorsichtig gevortext und bei 16 °C für mindestens 2 h inkubiert, die Temperatur darf dabei nicht über 16 °C steigen. Anschließend werden 2 μl T4 DNA-Polymerase zugegeben und für weitere 5 min bei 16 °C inkubiert. Die Reaktion wird auf Eis gestellt und nachdem 10 μl 0.5 M EDTA zupipettiert wurden, werden 150 μl einer Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)-Mischung addiert, die Mischung gevortext und für 5 min bei maximaler Umdrehung zentrifugiert. Vom wässrigen Überstand werden 140 μl in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Mit 70 μl 7.5 M NH_4OAc und 0.5 ml abs. EtOH (-20 °C) wird die DNA ausgefällt, welche während 20 min bei maximaler Umdrehung abzentrifugiert wird. Der Überstand (radioaktiv) wird vorsichtig entfernt und das Pellet mit 0.5 ml 70%igem EtOH (-20 °C) gewaschen. Die DNA wird 10 min bei 37 °C getrocknet.

Sal I-Adapter Addition

Zu der getrockneten DNA werden nun auf Eis folgende Lösungen zugegeben und für mindestens 16 h bei 16 °C inkubiert:

RNasefreies Wasser	25 μl
5 x T4 DNA-Ligase Puffer	10 μl
Sal I-Adapter	10 μl
T4 DNA-Ligase	5 μl

Danach wird mit 50 μl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)-Mischung die DNA extrahiert, indem die Mischung gut gevortext, abzentrifugiert und 45 μl der oberen wässrigen Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt wird. Mit 25 μl 7.5 M NH_4OAc und 150 μl abs. EtOH (-20 °C) wird die DNA ausgefällt, indem die Mischung sofort bei RT für 20 min mit maximaler Umdrehung zentrifugiert wird. Das DNA-Pellet wird mit 0.5 ml 70%igem EtOH (-20 °C) gewaschen (2 min, max rpm) und bei 37 °C für 10 min getrocknet.

***Not I* -Verdau**

Folgende Lösungen werden auf Eis zu der getrockneten DNA gegeben:

RNasefreies Wasser	41 µl
REACT 3 Buffer	5 µl
<i>Not I</i>	4 µl

Der Verdau wird bei 37 °C für 2 h durchgeführt. Mit 50 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol wird wieder die DNA extrahiert und 45 µl der wässrigen Phase entnommen. Wie bei der Adapter Addition wird die DNA ausgefällt, gewaschen und getrocknet.

Säulenchromatographie

Dieser Schritt führt dazu, dass eine Größenoptimierung der cDNA-Fragmente stattfindet und dadurch die Klonierung größerer Fragmente wahrscheinlicher wird. Dazu wird die getrocknete DNA in 100 µl TEN-Puffer auf Eis rehydratisiert. Während dieser Zeit wird die Säule geöffnet und mit insgesamt 4 ml TEN-Puffer (5 Portionen á 0.8 ml) gespült. Inzwischen werden 20 Eppendorfgefäße bereitgestellt und durchnummeriert. Die gesamte cDNA wird aufgetragen und der Durchfluss in Eppendorfgefäß Nr. 1 gesammelt. Nun werden 100 µl TEN-Puffer aufgetragen und der Durchfluss in Eppendorfgefäß 2 gesammelt. Mit den nächsten 100 µl TEN-Puffer wird die Sammlung etwas verändert, da nun jeder Tropfen des Durchflusses in einem frischen Gefäß gesammelt wird.

Ist die komplette, aufgegebene Lösung durchgelaufen, wird das Volumen des gesammelten Durchflusses in jedem einzelnen Eppendorfgefäßes bestimmt und die Volumina der Reihe nach aufaddiert. Sobald 550 µl Gesamtvolumen erreicht werden, verwirft man die darauf folgenden Gefäße. Bei diesen unterschreiten die cDNA-Fragmente eine bestimmte, für die Klonierung erforderliche Größe. Die restlichen Tubes werden an einem Scintillationszähler ohne Scintillationsflüssigkeit ausgelesen, indem man die Eppendorfgefäße einzeln in Messröhrchen gibt und mit Hilfe des Tritium-Kanals die Cerenkov-Counts bestimmt. Diese sollten bei 400-450 µl Gesamtvolumen erscheinen. Mit Hilfe der Cerenkov-Counts ist es möglich, die cDNA-Menge zu berechnen. Da für die Transformation 10 ng cDNA benötigt werden, werden diejenigen Fraktionen vereinigt, welche die größten cDNA-Fragmente enthalten, bis die Menge von 10 ng erreicht ist. Nach erneuter Aufreinigung (EtOH/NH₄Ac-Fällung) wird die DNA getrocknet, in 10 µl TEN-Puffer aufgenommen und über Nacht bei -20 °C gelagert.

Ligation der cDNA in den Vektor

Bei Raumtemperatur werden folgende Lösungen in ein Eppendorftube pipettiert und vorsichtig vermischt:

5 x T4 DNA-Ligase Puffer	4 µl
pSport 1 Vektor, verdaut	1 µl
cDNA	10 ng
mit RNasefreiem H ₂ O auf 19 µl auffüllen	
1 µl T4 DNA-Ligase	

Die Reaktionsmischung wird für 3 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend kann direkt transformiert werden.

Transformation in ElectroMax™ DH10B Zellen

Um die Transformation durchführen zu können, werden 5 µl Hefe-tRNA und 12.5 µl 7.5 M NH₄OAc zu obiger Ligationsreaktion gegeben. Die DNA wird mit 70 µl abs. Ethanol (-20 °C) ausgefällt und bei maximalen rpm 20 min abzentrifugiert. Anschließend wird mit 0.5 ml 70%igem Ethanol (-20 °C) gewaschen (2 min, max. rpm) und für 10 min bei 37 °C getrocknet. Die so gewonnene DNA wird in 5 µl sterilem Wasser rehydratisiert. Für die Transformation werden 1 µl DNA für 40 µl ElectroMax DH10B Zellen benötigt. Der Elektrodenabstand der Küvetten sollte 0.1 cm betragen. Denn nur so kann die erforderliche Kilovoltzahl erreicht werden. Mit folgenden Parametern wird die Transformation durchgeführt :

Spannung:	2.5 kV
Kapazität:	25 µF
Widerstand:	100 Ω
Zeitkonstante:	2-3 ms

Der Transformationsansatz wird nach dem Spannungsimpuls unter der Sterilbank mit 1 ml 37 °C warmem SOC-Medium versetzt. Die Zellen werden für mindestens 1 h im Brutschrank auswachsen lassen, bevor sie auf LB-Amp Nährböden verdünnt ausplattiert werden.

Analyse der cDNA-Produkte

Erststrangausbeute:

Wegen der Verwendung radioaktiv markierter [α -³²P]dCTPs bei der Erststrangsynthese, kann durch eine anschließende Messung der Radioaktivität eine Aussage über den Erfolg der

Synthese gemacht werden. Dazu wurde nach der Erststrangsynthese 2 µl des Ansatzes abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nun werden 43 µl EDTA (20 mM, pH 7.5) und 5 µl Hefe-tRNA addiert. Von diesem Ansatz werden jeweils 10 µl auf zwei Glasfaserfilter pipettiert. Ein Filter wird gefönt, der andere unmittelbar nach aufbringen der Probe dreimal für jeweils 5 min in 50 ml eiskalter 10% TCA/1% Natriumpyrophosphat getaucht und anschließend einmal für 2 min mit raumtemperiertem 95%igem Ethanol gewaschen. Dieser Filter wird nun ebenfalls mit Hilfe eines Föns getrocknet. Der erste Filter dient zur Bestimmung der spezifischen Aktivität und der zweite zur Erststrangausbeutebestimmung. Beide Filter werden in Scintillationsflüssigkeit gegeben und ausgelesen. Mit den Messwerten können die spezifische Aktivität (SA) und die Erststrangausbeute (EA) nach folgenden Formeln bestimmt werden:

$$SA \text{ (cpm/pmol dCTP)} = \frac{\text{cpm} / 10 \mu\text{l}}{200 \text{ pmol dCTP} / 10 \mu\text{l}}$$

$$EA \text{ (}\mu\text{g)} = \frac{(\text{cpm})(50 \mu\text{l} / 10 \mu\text{l})(20 \mu\text{l} / 2 \mu\text{l})(4 \text{ pmol dNTP} / \text{pmol dCTP})}{SA (3030 \text{ pmol dNTP} / \mu\text{g cDNA})}$$

Bestimmung der cDNA- Ausbeute nach der Säulenchromatographie

Nach der Säulenchromatographie kann die Menge der cDNA im Eluat durch Messung der Cerenkov-Counts (Tritiumfenster) nach folgender Formel bestimmt werden:

$$\text{Menge an cDNA [ng]} = \frac{\text{cpm} \cdot 2 (4 \text{ pmol dNTP} / \text{pmol dCTP}) (1000 \text{ ng} / \mu\text{g ds cDNA})}{SA(\text{cpm} / \text{pmol dCTP})(1515 \text{ pmol dNTP} / \mu\text{g ds cDNA})}$$

Amplifikation der Primärbibliothek [Hanahan *et al.*, 1991]

Um die Primärbibliothek zu amplifizieren, wird die komplette Bibliothek auf LB-Amp Nährböden ausplattiert. Die gewachsenen Klone (Ø 0.5-1 mm) löst man mit 10-15 ml SOB-Medium/Glycerin (80:20) vom Nährboden und sammelt die Suspension auf Eis in Falcon Tubes. Aliquots (500 µl) werden entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

5.4.5 Reverse Transkription (RT) [Omniscript™, 1999]

Eine Reverse Transkriptase schreibt RNA in einzelsträngige DNA um. Um spezifisch cDNA zu erhalten, ist es möglich zum Start der DNA-Synthese einen polyT-Primer einzusetzen, dieser hybridisiert an das polyA-Ende der mRNA und somit wird nur diese umgeschrieben. Der Umweg über eine mRNA-Isolierung ist dadurch nicht nötig. Als weitere Möglichkeit könnten Random Hexamer Primer gewählt werden, diese sind jedoch nicht spezifisch für mRNA.

Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Kits von Qiagen, wie in Kap. 5.4.2 beschrieben, isoliert. Es können pro 20 µl RT Ansatz bis zu 2 µg RNA eingesetzt werden. Für die Reaktion werden folgende Lösungen auf Eis gemischt und 60 min bei 37 °C inkubiert:

10 x RT-Puffer	2 µl
dNTP-Mix (jedes dNTP 5 mM)	2 µl
polyT-Primer (100 pmol)	2 µl
RNasin (40 U/µl)	0.2 µl
Templat-RNA	50 ng – 2 µg
RNasefreies H ₂ O	ad 19 µl
Omniscript Reverse-Transcriptase	1 µl

Die Reverse-Transkriptase kann bei 93 °C für 5 min inaktiviert werden. Dies ist aber für eine nachfolgende PCR nicht unbedingt erforderlich.

Es ist möglich, cDNA bei –20 °C oder –80 °C zu lagern.

5.5 Bindemotivsuche

5.5.1 PCR

Zur Bindemotivsuche mittels der Polymerasekettenreaktion wurden verschiedene Template gewählt. Zum einen cDNA, die direkt aus einer Reversen Transkription (Kap. 5.4.5) der RNA stammt, cDNA-Plasmid aus den Genbibliotheken von *Datura stramonium* (Kap. 5.4.4) verschiedenen Alters und auch genomische-DNA der Wurzelkulturen. Es wurden jeweils PCRs mit verschiedenen Programmen und Temperaturgradienten durchgeführt. Die Primer für die PCR sind ein polyT-Primer und für den Gegenstrang ein Bindemotivprimer wie z.B. für S-Adenosylmethionin in Funktion als Methyl donor SAM I und III, als Radikaldonor SAMradical oder das Eisenschwefelclusterbindemotiv FES.

polyT	5'-TTT TTT TTT TTT TT (AGC)-3'
SAMradical	5'-TG(CT) III III III TG(CT) III III TG(CT)-3'

SAM I	5'- GAI III GGI III GGI III GG-3'
SAM III	5'-(CT)TI (CT)TI (AC)(AG)I GGI GGI (ACT)(GT)I IT-3'
FeS	5'-TG(CT) III III TG(CT) III III III TG(CT) CC-3'

Als Standard PCR-Mischung wurde folgender 20 µl Ansatz verwendet:

10 x Polymerase-Puffer	2 µl
H ₂ O	13.3 µl
dNTP (40 mM)	0.5 µl
polyT-Primer (25 pmol)	1 µl
Bindemotiv-Primer (25 pmol)	1 µl
Templat-DNA (z.B. cDNA)	2 µl
Taq DNA-Polymerase (5U/µl)	0.2 µl

Als Ausgangs PCR-Programm hat sich das Folgende als sinnvoll herauskristallisiert:

94 °C	2 min	1 Zyklus
94 °C	30 sec	10 Zyklen
45-60 °C	30 sec	
72 °C	55 sec	
94 °C	30 sec	20 Zyklen
45-60 °C	30 sec	
72 °C	55 sec + 5 sec/ Zyklus	
72 °C	7 min	1 Zyklus

Auch eine **Touchdown-PCR** wurde versucht. Bei dieser PCR-Art wird bei einer möglichst hohen Annealing Temperatur, mit dem Ziel möglichst spezifische PCR-Produkte zu erhalten, begonnen. Im Verlauf der PCR wird diese Temperatur gesenkt. Jedoch reichern sich nun auch noch die spezifischen Produkte, die schon früher amplifiziert wurden, vermehrt an. Die Annealingtemperatur sollte im Idealfall bei einer PCR ca. 5-10 °C unter der Schmelztemperatur der Primer liegen.

In diesem speziellen Fall, bedingt durch die vielen Inosin, sind die Schmelztemperaturen mit ca. 50 °C und bei polyT mit 27 °C deutlich zu niedrig, um die Annealingtemperatur noch in einem vernünftigen Rahmen zu halten. Mit aus diesem Grund wurde eine Touchdown-PCR versucht, da ansonsten zu viele unspezifischen PCR-Amplifikate auftreten. Das verwendete Programm für die PCR ist auf der folgenden Seite aufgelistet.

PCR-Programm für die Touchdown-PCR:

95 °C	2 min	1 Zyklus
95 °C	30 sec	4 Zyklen
60 °C	30 sec	
72 °C	60 sec	
95°C	30 sec	17 Zyklen
60 °C-1 °C/Zyklus	30 sec	
72 °C	60 sec	
95 °C	30 sec	10 Zyklen
43 °C	30 sec	
72 °C	60 sec	
72 °C	7 min	1 Zyklus

Falls es Amplifikate gab, wurden diese mittels des Qiagen Gelextraktionskits (Kap. 5.3.5) aus einem Agarosegel isoliert. Mit dem Blunt-End Cloning Kit (Kap. 5.3.11) wurden sie anschließend kloniert, um DNA in ausreichender Menge für eine Sequenzierung (Kap. 5.3.10) zur Verfügung zu haben.

5.5.2 Colony Blots/Hybridisierung

Für die Bindemotivsuche mittels Hybridisierung wurden folgende Primer verwendet:

SAMradicalCy5 5'-Cy5_TG(CT) III III III TG(CT) III III TG(CT)_Cy5-3'

SAMradicaloregon 5'-6-FAM_TG(CT) III III III TG(CT) III III TG(CT)-3'

Der Primer SAMradicaloregon hat sich relativ schnell als unbrauchbar erwiesen, da bei der Wellenlänge (473 nm), bei der gemessen wird, bereits die Zellmembran von *E.coli* schon selbst ein positives Signal ergibt. Auch die Entfernung der Zelldebris mittels Proteinase K Verdau oder Abrubbeln der Debris brachte keine Verbesserung, da die Fluoreszenz von Fluorescein zu gering war, um sich gegen den Hintergrund durchzusetzen. Es wurde daher der Primer SAMradicalCy5 als Alternative gewählt.

Für die Hybridisierung wird zuerst ein „Abklatsch“ der Bakterienkolonien einer ausplattierten cDNA-Bibliothek hergestellt. Dazu legt man vorsichtig einen Nitrocellulosefilter auf den Nährboden und wartet bis der Filter komplett feucht ist. Um später eine Identifizierung zu erleichtern, werden in den Filter mit einer Nadel unsymmetrisch Löcher hineingestochen. Mit einer stumpfen Pinzette wird der Filter vorsichtig von der Platte abgehoben und mit den

Kolonien nach oben nacheinander auf verschiedene, mit folgenden Lösungen getränkte Filterpapiere, die sich auf handelsüblicher Frischhaltefolie befinden, gelegt:

1. SDS-Lösung (10 %), 3 min
2. Denaturierungslösung, 5 min
3. Neutralisierungslösung, 5 min
4. 2 x SSC-Lösung, 5 min

Die Platten werden in den 37 °C Brutschrank gestellt, bis die Kolonien wieder sichtbar nachgewachsen sind.

Die Membran wird für mindestens 1 h luftgetrocknet und anschließend bei 80 °C im Trockenschrank 1 h fixiert. Die Filter können nun bis zur Weiterverarbeitung gelagert werden.

Die Zelldebris auf den Membranen muss entweder mit viel 2 x SSC und einem behandschuhten Finger abgerubbelt oder nach der Fixierung mit Proteinase K abverdaut werden. Ansonsten kommt es bei der Hybridisierung zu falschen positiven Signalen. In dieser Arbeit wurde zuletzt der Weg des Proteinase K Verdaus gewählt, da es nach dem „Abrubbeln“ oft zu keinen Signalen bei der Positivkontrolle kam.

Der Proteinase-K Verdau wird in einem 50 ml Falcon mit 30 ml Verdaupuffer im Brutschrank bei 37 °C für 6 bis 12 h durchgeführt. Die Membranen werden kurz in 2 x SSC-Lösung gespült und sofort hybridisiert.

Dazu werden sie in Hybridisierungsröhren (300 x 35) mit 30 ml Hybridisierungslösung bei 65 °C für mindestens 2 h vorhybridisiert. Dieser Schritt dient der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen. Der Hybridisierungsprimer (SAMradicalCy5, 2 µl 100 pmol) wird in 100 µl sterilem Wasser für 5 min aufgekocht, abgekühlt und in 30 ml Hybridisierungslösung gegeben. Nun wird die Hybridisierungslösung die zur Vorhybridisierung verwendet worden ist gegen die frische Lösung mit dem Primer ausgetauscht und die Temperatur auf 35 °C gesenkt. Die Hybridisierung erfolgt für mindestens 3 h. Nach der Entnahme und dem Trocknen der Membran kann sie am Fluorescent Image Analyzer FLA 3000 bei 633 nm ausgewertet werden.

5.5.3 Differential Display (DD)

Die Differential Display Technik wurde zuerst von Liang und Pardee [Liang *et al.*, 1992] eingeführt. Mit dieser Technik ist es möglich, unterschiedlich exprimierte eukaryotische Gene zu identifizieren und zu klonieren. Damit ist das Differential Display (DD) das Gegenstück zur 2D-Gelelektrophorese auf DNA-Ebene.

Für das DD wird zuerst RNA (oder mRNA) isoliert und mit Hilfe einer Reversen-Transkriptase cDNA synthetisiert. Der nächste Schritt besteht aus einer PCR mit einem Set zufällig gewählter Primer und einem polyT als Gegenstrangprimer. Die kurzen Sequenzen werden auf einem Polyacrylamidgel ausgewertet. Standardmäßig werden 10mer Oligos, denen je nach Anwendung noch eine Restriktionsstelle angehängt wird, verwendet. Das erste Set an Primern, wurde der Literatur entnommen [Wang *et al.*, 1995].

DD1 5'-GAC CGC TTG T-3'

DD2 5'-GCG AAT TCC GAC CGC TTG T-3' (enthält *Eco* RI Erkennungssequenz)

DD3 5'-CGG ATC CCT₁₂ (GAC)-3' (enthält *Bam* HI Erkennungssequenz)

Das zweite Set an Primern wurde gemäß dem Codon usage von *Datura stramonium* ausgewählt.

DD4 5'-ATG CAA TGT-3'

DD5 5'-TGG ATG GAT-3'

DD6 5'- GAT TGT TAT G-3'

Der PCR-Ansatz für das zweite Set an Primern wurde folgendermaßen angesetzt:

10 x Reaktionspuffer	2 µl
DNTP-Mix (40 mM)	0.5 µl
poly T-Primer (25 pmol)	3 µl
DD6 (25 pmol)	1 µl
DD5 (25 pmol)	1 µl
DD4 (25 pmol)	1 µl
CDNA-Templat aus einer RT	2 µl
H ₂ O	9.3 µl
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0.2 µl

Als PCR-Programm wurde Folgendes gewählt [Wang *et al.*, 1995]:

94 °C	30 sec	40 Zyklen
40 °C	2 min	
72 °C	30 sec	
70 °C	10 min	1 Zyklus

Die PCR wurde mit einem ExcelGel[®] DNA Analyse Kit von Pharmacia und dem Silver Staining Kit von Pharmacia laut Vorschrift ausgewertet. Auf das Gel wurden 5 µl PCR-Lösung mit 2 µl Probenpuffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, Bromphenolblau) aufgetragen.

5.5.4 DNA-Chip Technologie

Außer Agarose und Polyacrylamidgelen gibt es noch eine weitere Möglichkeit um DNA-Fragmente auszuwerten. Dazu benötigt man einen Agilent Bioanalyser 2100 von Agilent Technologies und die entsprechenden Chips (DNA 1000 Reagent & Supplies). Mit deren Hilfe ist es möglich 1 µl einer PCR-Reaktion in Bezug auf exakte Größe (auf 1 bp genau) und auch Menge des Fragmentes auszuwerten. Die Chipvorbereitung wurde laut Versuchsvorschrift durchgeführt.

5.5.5 Race PCR/Terminale Transferase [Gassen *et al.*, 1999]

Die Race PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends) ermöglicht die Vervollständigung der Sequenzen von Transkripten mit unbekannt Sequenzen am 5' oder 3'-Ende, ausgehend von bekannten Sequenzen. Diese Methode ist eine Alternative zur Durchsuchung von cDNA-Bibliotheken. Sie erlaubt es, ausgehend von kurzen Bereichen bekannter Sequenz unbekannt Bereiche gezielt zu amplifizieren [Ochmann *et al.*, 1993].

Die 3'-Race PCR beginnt mit einer cDNA-Erststrangsynthese unter Verwendung eines polyT-Primers, der im Bereich des polyA-Schwanzes der mRNA hybridisiert. Anschließend wird der RNA-Strang aus dem Hybrid-Doppelstrang mit Hilfe von RNase H abgebaut. Es erfolgt eine PCR mit einem polyA und einem sequenzspezifischen Primer. Bei dieser PCR wird selektiv der DNA Bereich zwischen dem OligoT-Schwanz der cDNA und des spezifischen Primers amplifiziert.

Ähnlich wird bei der 5'-Race PCR vorgegangen. Ein von der bekannten Sequenz abgeleiteter Primer wird zur cDNA Erststrangsynthese verwendet. Nach Abbau des mRNA-Stranges erfolgt eine Verlängerung des cDNA-Stranges an dessen 3'-Ende um 20-100 Basen, das sogenannte "Tailing". Die Terminale Transferase katalysiert diese Reaktion, in die nur eines der vier Desoxynukleotide eingesetzt wird. Beispielsweise wird nur dATP in die Reaktion eingesetzt, so dass in der anschließenden PCR als zweiter, unspezifischer Primer Oligo dT verwendet werden kann. Auf diese Weise ist die spezifische Amplifikation des 5'-Bereiches der cDNA durchführbar.

5'-Race

Für eine Race PCR ausgehend von cDNA sollte die RT-Reaktion (Kap. 5.4.5) mit 10 µg mRNA durchgeführt werden. Anschließend werden die dNTPs und Primer über eine NH₄OAC/EtOH-Fällung abgetrennt.

Die Race PCR wurde auch mit genomischer-DNA durchgeführt. Im Folgenden wird die

Vorschrift hierfür gegeben.

1. PCR mit SAMradical Primer:

H ₂ O	ad 20 µl
Genomische-DNA	500 ng
10 x Puffer	2 µl
Primer (SAMrad 25 pmol)	2 µl
dNTPs (40 mM)	0.5 µl
Taq Polymerase (5U/µl)	0.2 µl

Programm (Gesamtzeit ~3 h):

94 °C	2 min	1 Zyklus
94 °C	30 s	30 Zyklen
40-55 °C	30 s	
72 °C	90 s	
72 °C	7 min	1 Zyklus

Anschließend wird die DNA mit 1/10 Volumen 3 M NH₄OAc (pH 4.8), 2.5 Volumen EtOH (-20 °C) und MgCl₂ (Endkonzentration 0.01 M) 30 min auf Eis ausgefällt. Die DNA wird während 20 min bei 4 °C mit maximaler Umdrehung abzentrifugiert. Das Pellet wird mit 1 ml 70%igem EtOH (-20 °C) während einer 5 minütigen Zentrifugation gewaschen. Die DNA wird bei 37 °C getrocknet und in 20 µl H₂O gelöst.

T Tailing

Für das Tailing wird folgender Ansatz 15 min bei 37 °C inkubiert.

H ₂ O	18.25 µl
10 x Reaktions-Puffer	2.5 µl
CoCl ₂ (2.5 mM)	2.5 µl
Templat-DNA aus 1. PCR	1 µl
dTTP (10 mM)	0.5 µl
Terminale Transferase (20U/µl)	0.25 µl

Das Enzym wird bei 70 °C für 10 min inkubiert. Danach erfolgt, bevor die zweite PCR angesetzt werden kann, ein Ausfällungsschritt wie oben beschrieben.

2. PCR

H ₂ O	13.3 µl
10 x Reaktions Puffer	2 µl
dNTP (40 mM)	0.5 µl
Primer PolyA (25 pmol)	1 µl
Primer SAMrad (25 pmol)	1 µl
Templat aus T-Tailing	2 µl
Taq DNA-Polymerase (5U/µl)	0.2 µl

Das Programm entspricht dem der ersten PCR, allerdings mit einer niedrigeren Annealingtemperatur, wegen des polyA-Primers, der nur einen T_m von 27 °C besitzt.

5.6 Proteinchemische Arbeiten

5.6.1 Aufschluss der Wurzelkulturen

Die sehr feinen Wurzeln der *Datura stramonium* Hairy Roots können auf unterschiedliche Arten aufgeschlossen werden.

Entweder werden sie mit Seesand, PVPP und flüssigem Stickstoff in einem Mörser zermahlen und noch gefroren in Aufschlusspuffer überführt. Eine schonendere Variante ist der Aufschluss mit Hilfe eines Haushaltsmixers. Dazu wird das Material 1:1 (w/v) mit Aufschlusspuffer und einem Löffelspatel PVPP pro 50 g Wurzeln in einem Braun Haushaltsmixer in sehr kurzen Intervallen aufgeschlossen bis sich eine homogene Lösung gebildet hat. Puffer und Mixer werden in der Kühlzelle gelagert, dadurch wird eine Erwärmung des Lysats vermieden. Das Schneidwerkzeug wurde speziell für Pflanzenmaterial nach einer Literaturvorschrift [Kannangara, 1977] von der Werkstatt des Botanischen Instituts hergestellt.

5.6.2 Aktivitätstest auf Littorinmutase [Ollagnier *et al.*, 1998]

Um einen Aktivitätstest durchführen zu können, muss zuerst das zelleigene Hyoscyamin und Littorin mit Hilfe einer PD 10 Säule (Entsalzung) aus dem Lysat entfernt werden. Die Säule (Bettvolumen 9.1 ml) wird zuerst mit 25 ml 1:10 Aufschlusspuffer gespült. Genau 2.5 ml Probe werden auf die Fritte aufgegeben und das Eluat verworfen. Mit 3.5 ml 1:10 Aufschlusspuffer wird die entsalzte, d.h. auch nahezu alkaloidfreie Proteinprobe von der Säule eluiert.

Für einen Standardaktivitätstest wird folgender Ansatz verwendet und bei 34 °C für 1 h inkubiert:

Proteinprobe	
Littorin (7 mg/ml)	5 µl
SAM (1.7 mg/ml)	50 µl
DTT (13.8 mg/ml)	10 µl
Pyridoxalphosphat (3.9 mg/ml)	50 µl
Kaliumphosphatpuffer pH 7.7 (verschiedene Zusätze, Cofaktoren)	
<hr/>	
	300 µl

Mit 150 µl konzentriertem Ammoniak wird der Test abgebrochen und die Mischung auf eine Extrelut[®] Säule, d.h. eine Pasteurpipette mit Extrelut Füllung, aufgegeben. Nach 15 min wird die organische Phase mit 15 ml Chloroform eluiert. Das Chloroform wird am Rotationsverdampfer bis zur Trockene entfernt und die Probe über Nacht am Hochvakuum getrocknet. Mit 40 µl Dioxan und 20 µl N, O-Bis(trimethylsilyl)acetamid wird die Probe gelöst, silyliert und dadurch für die GCMS-Analyse vorbereitet (Kap. 5.10). Für die Analyse werden 5 µl benötigt.

Als Blindwert wird immer eine Probe ohne Zusatz von Littorin mitgeführt, um den Gehalt an noch vorhandenem, natürlichem Hyoscyamin und Littorin zu bestimmen.

5.6.3 SDS/Nativ-Polyacrylamidelektrophorese

Als Trennverfahren für geladene Makromoleküle eignet sich die Elektrophorese. Bei dieser Methode wandern geladene Moleküle im elektrischen Feld zur entgegengesetzt geladenen Elektrode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei von der Eigenladung und der Größe der Moleküle abhängig. Besonders gute Trennergebnisse werden erhalten, wenn die Elektrophorese in einem Medium durchgeführt wird, welches die Brownsche Bewegung so weit wie möglich herabsetzt. Als geeignetes Medium haben sich hierfür Gele erwiesen.

Die verwendeten Gele verringern die Beweglichkeit großer Moleküle relativ zu den kleineren, da die netzartige Struktur die Wanderung großer Moleküle stärker behindert. Mit einer SDS-Gelelektrophorese ist eine exakte Molekulargewichtsbestimmung möglich. Sodiumdodecylsulfat (SDS) denaturiert Proteine, bindet durch hydrophobe Wechselwirkungen an sie und zwingt sie in eine ellipsoide Form. Während Quartär-, Tertiär- und Sekundärstrukturen zerstört werden, bleibt die Primärstruktur der Proteine erhalten. Die negative Ladung, welche SDS auf das Protein überträgt, maskiert die Eigenladung des

Proteins. Da die Proteine nach der SDS-Beladung (ca. 1.4 g SDS pro Gramm Protein) ein konstantes Oberflächen/Ladungsverhältnis aufweisen, hängt die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel nur noch von der Molekülgröße ab.

Die Elektrophorese wird in einem Minigel Elektrophoresesystem durchgeführt. Es werden einheitliche Sammelgele mit einer Konzentration von 5 % Polyacrylamid verwendet. Für das Trenngel werden je nach Verwendungszweck 10, 12 oder 14%ige Gele verwendet.

Die Lösungen für die Polyacrylamidgele werden gemäß Tabelle 3 pipettiert, vermischt und zwischen zwei Glasplatten gegossen. Zu Beachten ist, dass TEMED und APS zuletzt zugegeben werden, da sie die Polymerisation starten. Das Trenngel wird mit etwas Wasser überschichtet und für mindestens 1 h auspolymerisiert. Danach wird das Wasser entfernt und über das Trenngel ein großporiges Sammelgel gegossen. Dieses dient dazu, die Proteine vor dem Eintritt in das Trenngel in einer schmalen Bande zu sammeln. In das Sammelgel muss ein Probenkamm eingesetzt werden der die Taschen für die Probenaufnahme vorformt.

% T	H ₂ O dest.	Puffer A	Puffer B	Puffer C	SDS (20%)	TEMED	APS (20%)
5	1.2 ml	-	0.5 ml	0.33 ml	-	5 µl	10-20 µl
10	2.65 ml	0.625 ml	-	1.675 ml	25 µl	5 µl	15-20 µl
12	2.3 ml	0.625 ml	-	2.0 ml	25 µl	5 µl	15-20 µl
15	1.8 ml	0.625 ml	-	2.5 ml	25 µl	5 µl	15-20 µl

Tabelle 3: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele

Nach der vollständigen Auspolymerisation des Sammelgels kann der Probenkamm gezogen, das Gel in der Laufkammer montiert und mit 1 x SDS-Laufpuffer aufgefüllt werden. Die aufzutragenden Proben (ca. 10 µl) werden 1:1 mit Probenpuffer vermengt und für 5 min zum Denaturieren in einem Wasserbad gekocht. Nach dem Auftragen der Proben in die Geltaschen, wird die Elektrophorese bei konstanter Stromstärke von 18 mA durchgeführt, bis die Bromphenolblaufront des Probenpuffers die Gelunterkante erreicht hat.

Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Nativ Page)

Im Gegensatz zur denaturierenden Elektrophorese, bei der die Mobilität der Proteine nur von deren Molekulargewicht abhängt, ist bei der nativen Gelelektrophorese die Beweglichkeit abhängig von der Ladung und Größe des Proteins.

Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer entspricht denen der SDS-PAGE. Auf die Verwendung von denaturierenden Substanzen wie SDS und β-Mercaptoethanol wird in den Gelpuffern, dem Elektrophoresepuffer und im Probenpuffer verzichtet. Auch werden die Proben nicht aufgeköcht. In Tabelle 4 (S. 61) sind die Zusammensetzungen aufgelistet.

% T	H ₂ O	Puffer A	Puffer B	Puffer C	TEMED	APS (20 %)
5	1.45 ml	-	0.625 ml	0.42 ml	5 µl	10-20 µl
10	2.1 ml	1.25 ml	-	1.65 ml	5 µl	15-20 µl
12	1.75 ml	1.25 ml	-	2.00 ml	5 µl	15-20 µl
15	1.25 ml	1.25 ml	-	2.50 ml	5 µl	15-20 µl

Tabelle 4: Zusammensetzung der nativen Polyacrylamidgele

Wie bei der SDS-Page werden die Lösungen nach der obigen Tabelle pipettiert und die Polymerisation durch die Zugabe von TEMED und APS gestartet. Die Elektrophorese- (S. 60) und Färbebedingungen (S. 61) sind der SDS-Elektrophorese gleich.

5.6.4 Direkte SDS Probenvorbereitung aus Wurzeln [Piñol *et al.*, 1996]

Die Wurzeln werden in flüssigem Stickstoff mit einem Dstroy Stick[®] in einem Eppendorftube gemörsert und anschließend 5 min in einem denaturierenden Puffer (20 mM Tris-HCl pH 8.6, 1 % SDS, 2 % 2-Mercaptoethanol) gekocht. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei maximaler Umdrehung kann der Überstand direkt für eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese eingesetzt werden.

5.6.5 Coomassie/Silberfärbung

Coomassie Färbung

Das Gel kann nach dem Lauf aus den Glasplatten entfernt und bei 50 °C im Wasserbad für 20 min in Coomassie gefärbt werden. Danach wird das gefärbte Gel bei Raumtemperatur mit Entfärbelösung auf einem Schüttler so weit entfärbt, bis die Proteinbanden gut sichtbar sind.

Silberfärbung [Heukeshoven *et al.*, 1985]

Falls eine empfindlichere Färbemethode notwendig ist, kann auf eine Silberfärbung der Proteine zurückgegriffen werden. Pro Bande können damit 0.1–1 ng Protein nachgewiesen werden. Das Gel wird dazu nacheinander mit verschiedenen Lösungen inkubiert. Diese Lösungen und die dazugehörigen Zeitangaben sind der Tabelle 5 der folgenden Seite zu entnehmen.

40 % Ethanol, 7 % Eisessig	>3h	Fixierung
10 % Ethanol	2 x 10 min	Waschen
H ₂ O	3 x 10 min	Waschen
0.1 % AgNO ₃	30 min	Versilbern
H ₂ O	10 s	Waschen
2.5-3 % Na ₂ CO ₃ , 0.02 % Formaldehyd	5-20 min	Entwickeln
1 % Essigsäure	10 min	Abstoppen
H ₂ O	3 x 10 min	Waschen
0.2 % Na ₂ S ₂ O ₃ , 0.01 % K ₃ [Fe(CN) ₆]	10-30 s	Abschwächen nach FARMER [Gassen <i>et al.</i> , 1999]
fließendes Leitungswasser	1 min	Spülen
H ₂ O	3 x 10 min	Waschen

Tabelle 5: Protokoll zur Silberfärbung

5.6.6 Proteinblot zur radioaktiven Bindungsstudie von SAM

Mit [³H]SAM sollte untersucht werden, ob dieses an irgendwelche Proteine bindet. Tritium ist wegen seiner sehr kurzen Reichweite schwer detektierbar. Somit sind SDS- oder Nativ-Gele ungeeignet um solche Bindungsstudien zu machen. Selbst ein Referenzspot, der vor der Detektion an einem Fluorescent Imager FLA 3000 auf ein getrocknetes Gel aufgetragen wurde, war nicht detektierbar. Das Gel schirmt die komplette Radioaktivität ab. Zur Detektion von Tritium benötigt man spezielle Imagingplatten die keine Schutzfolie besitzen. Hierbei wird die Imagingplatte zu einem Einwegprodukt, da sich das radioaktive Signal auch im Eraser nicht mehr löschen lässt.

Auch war der Versuch die Polyacrylamidgele in kleine Parzellen zu zerschneiden und mit einem Scintillationszähler auszuwerten erfolglos. Dazu wurden die Gelschnipsel über Nacht in 1 ml Wasser rehydratisiert, mit 10 ml der Scintillationsflüssigkeit (wässriges System) versetzt und mit dem Tritiumfenster ausgelesen.

Somit mussten die Proteinspots auf ein anderes Medium übertragen werden, welches das radioaktive Signal nicht so abschirmt wie die Polyacrylamidgele. Geeignet dafür ist ein Western Blot. Dabei werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus dem Trenngel auf einen Trägerfilter (z.B. Nitrocellulose) geblottet. Auf dem Filter werden die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen und H-Brücken gebunden und immobilisiert. Dadurch wird eine genaue Kopie des Trenngels erhalten, die es ermöglicht, die Immunreaktivität oder die funktionelle Aktivität der Proteine zu erhalten. Die Übertragung der Proteine vom Trenngel auf einen Filter verläuft als Elektrophorese quer zum Gel. Dazu wird ein „Sandwich“ mit

folgenden Schichten hergestellt:

Durchlöcherter Polyethylenrost
Schaumstofflage
3-lagige Filterpapierschicht
SDS-Gel/ Nativ-Gel/ Blau-Nativ-Gel
Nitrocellulosefilter
3-lagige Filterpapierschicht
Schaumstofflage
Durchlöcherter Polyethylenrost

Alle Komponenten (bis auf das Gel) werden vor dem Zusammenbau in Transfer-Puffer getränkt. Beim Auflegen der Nitrocellulosemembran auf das Polyacrylamidgel ist besonders darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen bilden, da ansonsten an diesen Stellen die Proteine nicht übertragen werden. Das zusammengebaute „Sandwich“ wird mit der Nitrocellulosemembran in Richtung Anode in die mit Puffer gefüllte Blotting Apparatur, die mit Eis gekühlt wird, gesetzt. Der Blot erfolgt entweder bei 25 mA für ca. 10 h oder bei 350 mA für 1 h.

Für die Bindungsstudie des radioaktiven SAM wurden Nativ-, SDS- und Blau-Native (1. Dimension) Gele verwendet. Zum einen wurde die Aktivitätstestlösung (Kapitel 5.6.2) aufgetragen. Anstatt SAM wurden die verschieden tritiummarkierten S-Adenosylmethioninproben verwendet. Für den Aktivitätstest wurde folgende Mischung hergestellt:

50 µl Pyridoxalphosphat (3.9 mg/ml)
10 µl DTT (13.8 mg/ml)
5 µl Littorin (3.8 mg/ml)
185 µl Proteinlösung
* 50 µl SAM (1.7 mg/ml) nichtradioaktive Blindprobe
* 5 µl [³H-Me]SAM (**Fraktion 1**, 158618 cpm/µl) + 45 µl SAM
* 50 µl [³H-5', 2, 8]SAM (**Fraktion 2**, 2344 cpm/µl)

Eine graphische Darstellung der verschiedenen tritiummarkierten S-Adenosylmethioninproben ist auf der folgenden Seite (Abb. 13) abgebildet.

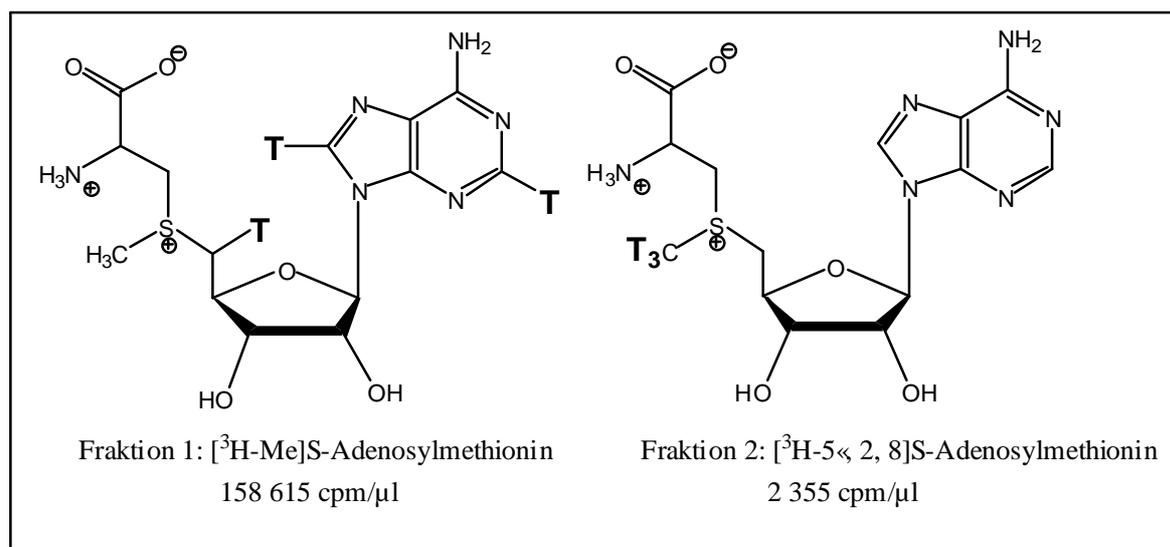


Abb. 13: Die verschiedenen Tritium markierten S-Adenosylmethionin Fraktionen

Als Proteinlösung wurden verschiedene Fraktionen verwendet. Zum einen eine unbehandelte Probe, d.h. Aufschluss aus 45 g Wurzelkulturen in 4.5 ml Aufschlusspuffer (Endvolumen nach Filtration ca. 30 ml). Für eine zweite Probe wurde die Proteinlösung an der Speedvac um den Faktor zwei aufkonzentriert. Die dritte Probe wurde 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand an der Speedvac ebenfalls um den Faktor zwei aufkonzentriert.

Die Aktivitätstestmischung wurde 1 h bei 34 °C inkubiert. Davon wurden anschließend je 20 μl auf ein Nativ- und SDS-Gel aufgetragen, geblottet und über Nacht auf der Imaging-Platte entwickeln lassen.

Für weitere Versuche der Bindungsstudie von radioaktivem SAM an Proteinen wurden Rohextrakte von Hairy Roots Aufschlüssen auf SDS- und Nativ-Gele aufgetragen und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Die Membran wurde in Folie eingeschweißt und mit 8 ml Aufschlusspuffer, dem 300 μl [³H]SAM (Fraktion 2, 2355 cpm/μl) beigemischt war, über Nacht inkubiert. Die Membran wurde kurz mit destilliertem Wasser abgespült, getrocknet und auf einer tritiumsensitiven Imaging-Platte ausgewertet.

Für eine Bindungsstudie mit BN-Polyacrylamidgelen wurde die 1. Dimension auf Nitrocellulose geblottet und die Membran für 1-4 h in 50 ml BN-Aufschlusspuffer, 20 μl [¹⁴C]Littorin (1800 cpm/μl), 10 μl [³H]SAM (Fraktion 1) und 100 μl der [³H]SAM (Fraktion 2) inkubiert. Anschließend wurde die Membran unterteilt, in je 10 ml 10 % SDS aufgekocht, um eine Denaturierung und damit eine Freisetzung von gebundenem Substrat zu gewährleisten. Dieser Cocktail wurde mit Scintillationsflüssigkeit versetzt und am Scintillationszähler ausgewertet.

5.7 2D-Gelelektrophorese

Seit der Publikation von O'Farrell [O'Farrell, 1975] hat sich die Methode der 2D-Gelelektrophorese (2D-PAGE) in vielen Wissenschaftsbereichen als eine Standardmethode entwickelt. Die 2D-PAGE hat zwei Vorteile gegenüber anderen Proteinelektrophorese-Techniken. Zum Ersten die hohe Auflösung, die durch zwei unabhängige Trennungsverfahren, die hintereinander geschaltet sind, erreicht wird. Somit ist die Co-Migration, wie sie bei der 1D-Elektrophorese auftreten kann, ausgeschlossen. Zum Zweiten können einige hundert bis sogar tausend (je nach Geldimension) verschiedene Proteine gleichzeitig aufgetrennt werden. Somit ist die 2D-PAGE ein unentbehrliches Mittel in der "Proteom-Ära" geworden. Mit dieser Technik ist es möglich Änderungen in der Genomexpressionen durch verschiedene Faktoren (z.B. äußere Einflüsse, Entwicklungsstadien, usw.) zu analysieren.

5.7.1 Probenvorbereitung

Da pflanzliches Material Inhaltsstoffe wie z.B. Stärke, Alkaloide, Phenole, Lipide und Pigmente, welche die 2D-Page erheblich stören können enthalten, müssen diese zuvor abgetrennt werden. Dazu kann man z.B. eine Proteinfällung verwenden. In dieser Arbeit wurde eine TCA/Acetonfällung gewählt.

Je eine Wurzelkultur wird kurz mit einem Tuch getrocknet, ein Teil für eine Alkaloidbestimmung abgenommen, und dann gewogen. Die Wurzeln werden in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff übergossen und mit einem Pistill gemörsert. Das Wurzelmehl wird noch gefroren in einen Zentrifugenbecher gegeben in den schon 10 ml 10 % TCA in Aceton (-20°) und 7.5 µl β-Mercaptoethanol vorgelegt wurden. Dieses Gemisch wird 1 h bei -20 °C in ein Gefrierfach gestellt. Im Anschluss an eine 20 min Zentrifugation bei 20 000 rpm (0 °C) wird der Überstand verworfen, der Niederschlag in 10 ml Aceton (-20 °C) und 7.5 µl β-Mercaptoethanol resuspendiert und wieder für 1 h bei -20 °C inkubiert, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Diese Waschschrte mit Aceton/β-Mercaptoethanol werden insgesamt dreimal ausgeführt.

Nach der letzten Zentrifugation wird der Überstand verworfen und das Pellet in einem Exsikkator am Hochvakuum getrocknet. Das getrocknete Pellet wird in 8 ml Extraktionspuffer (2 M Thioharnstoff, 7 M Harnstoff, 4 % NP 40, 1 % DTT, 1 % Plant-Protease-Inhibitor-Mix) aufgenommen. Somit werden die Proteine aus dem Pflanzenmaterialgemisch herausgelöst. Nach einer Ultrazentrifugation bei 100 000 g entspricht der Überstand der Probe welche für die 2D-PAGE verwendet wird. Der

Niederschlag wird verworfen. Das komplette Präzipitat muss entfernt sein. Notfalls sollte die Zentrifugation einige Male wiederholt werden, ansonsten kommt es zu Fokussierungsproblemen bei der ersten Dimension.

5.7.2 Proteinbestimmung für die 2D-Gelelektrophorese

Da sich die Proteinlösung in einem Harnstoffpuffer befindet, welcher mit den meisten Proteinbestimmungsmethoden interferiert, müssen die Proteine ausgefällt werden. Dies wird z.B. mit 10 % TCA in Aceton bei -18 °C durchgeführt. Die ausgefällten Proteine werden in H₂O aufgenommen. Jedoch schien es auch mit dieser ausgefällten Probe noch Schwierigkeiten zu geben. Die spektroskopischen Methoden von Warburg, Groves und Murphy/Kies lieferten für 12 unterschiedliche Proteinproben nahezu gleiche Werte. Entweder ist dies noch auf Spuren von Harnstoff oder den Protease-Inhibitor-Mix zurückzuführen. Auch die BSA-Methode führte nicht zum Erfolg, genauso wenig wie die BioRad Proteinassay Methode.

Die glaubhaftesten Ergebnisse lieferte der Advanced Protein Assay von Cytoskeleton. Aus diesem Grunde kam diese Methode in dieser Arbeit zur Anwendung.

Dazu wurden 100 µl Proteinprobe mit 900 µl 10 % TCA in Aceton über Nacht bei -18 °C inkubiert. Die ausgefällten Proteine wurden abzentrifugiert, in 100 µl Aceton (-18 °C) resuspendiert und bei -18 °C für 1 h inkubiert. Nach einer Zentrifugation wird der Überstand verworfen und das Pellet luftgetrocknet. Die Proteine werden in 100 µl 1 M NaOH aufgenommen.

Für den Macroassay (>3mg/ml Protein) werden 10 µl der Proteinprobe in ein Reagenzglas pipettiert. Dazu werden 5 ml 1x Advanced Assay Mix gegeben und sofort gevortext. Die Proben werden bei 590 nm gegen 10 µl 1 M NaOH in 5 ml 1x Assay Mix vermessen. Als Berechnungsgrundlage für die Proteinkonzentration dient:

$OD_{560}=1$ entspricht einer Proteinmenge von 30 µg/ml Reagenz

Umgerechnet auf 10 µl Probe und 5 ml Assayreagenz bedeutet dies:

$OD_{560}=1$ entspricht einer Proteinkonzentration von 15 mg/ml

Für geringere Proteinkonzentrationen kann ein Microassay verwendet werden. Dazu werden 10 µl Proteinprobe in ein Eppendorfgefäß pipettiert, 1 ml 1x Advanced Protein Assay Mix zugegeben, gevortext und bei 590 nm vermessen. Hierbei entspricht, wenn die Verdünnung gleich mit einbezogen wird der

$OD_{560} = 1$ einer Proteinkonzentration von 3 mg/ml.

5.7.3 Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)

Die erste Dimension bei der 2D-PAGE ist eine Isoelektrische Fokussierung. In einem pH-Gradienten bewegt sich jedes Proteinmolekül zu der Stelle, die seinem isoelektrischen Punkt (pI) entspricht, d.h. sie fokussieren (konzentrieren sich) an dieser Stelle. Der isoelektrische Punkt eines Proteins ist jener pH-Wert, an dem seine Nettoladung null ist. Proteine sind bei pH-Werten unter ihrem pI positiv und bei pH-Werten über ihrem pI negativ geladen. Dadurch geraten die Proteine sobald sie sich von ihrem pI entfernen wieder unter den Einfluss des elektrischen Feldes und bewegen sich zu ihrem Fokussierungspunkt zurück.

Ein stabiler und kontinuierlicher pH-Gradient mit gleichmäßiger und konstanter Leitfähigkeit sowie Pufferkapazität ist Grundbedingung zur Erzielung hochauflösender und reproduzierbarer Trennergebnisse. Ein immobilisierter pH-Gradient (IPG) wird durch Kopolymerisation von Acrylamidionen und Acrylamidderivaten mit puffernden Gruppen, den Immobilinen, erzeugt. Die allgemeine Formel der Immobiline lautet:



Hierbei ist R entweder eine Carboxyl- oder eine tertiäre Aminogruppe. Der pH-Gradient entsteht durch lineares Mischen von zwei verschiedenen Polymerisationslösungen, die dem Anfangs- bzw. Endpunkt des pH-Gradienten entsprechen.

Die IPG-Streifen für die 1. Dimension sind käuflich. Sie werden in verschiedenen pH-Bereichen angeboten. Der weiteste Bereich wird mit IPG-Strips pH 3-10 abgedeckt. Auch in dieser Arbeit wurde die 2D-PAGE für diesen pH-Bereich optimiert. Jedoch wurde festgestellt, dass etwa 80 % der Proteine sich in dem Bereich von pH 4-7 aufhalten. Deshalb wurde dieser Bereich gewählt. Zwar werden dadurch ein paar Proteinspots abgeschnitten, jedoch zugunsten einer besseren Auflösung in dem neuen Bereich. Auch ist es ein bekanntes Phänomen, dass Proteine im sauren und basischen d.h. in den äußeren pH-Bereichen der IPG-Streifen nicht so gut fokussieren, somit ist der Verlust von 20 % vertretbar.

Um nach der 2D-Page eine Silberfärbung durchführen zu können, werden standardgemäß 350 µg Protein aufgetrennt. Silberfärbung ist von Vorteil, wenn die Genexpression untersucht werden soll, da sich dadurch auch die „low abundant“-Proteine bis zu einem gewissen Grad sichtbar machen lassen. Soll eine Coomassie Färbung durchgeführt werden, muss die Proteinmenge entsprechend erhöht werden.

Die Probe, die aufgetrennt wird, setzt sich folgendermaßen zusammen:

- 350 µg Proteinlösung
- mit Rehydratisierungslösung auf 1 ml auffüllen
- 20 µl Ampholyte 4-7 L
- 20 µl Plant Protease Inhibitor Mix
- 5 mg DTT
- etwas Bromphenolblau

Der Strip Holder (Abb. 14) wird folgendermaßen bestückt:

Auf die Elektroden werden mit destilliertem Wasser befeuchtete Sample-Application-Pieces gelegt. 350 µl der Probe werden gleichmäßig verteilt. Nun kann der IPG-Streifen mit der Gelseite nach unten in der vorgegebenen Orientierung eingelegt werden. Luftblasenbildung ist zu vermeiden.

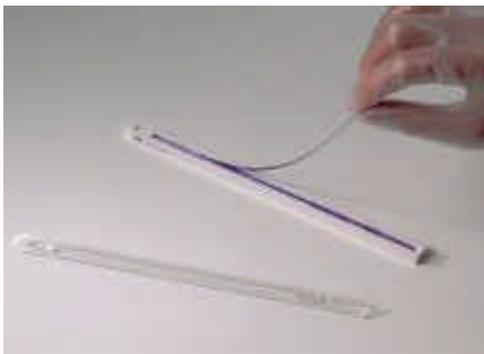


Abb. 14: IPG-Strip wie er in einen Strip Holder eingelegt wird

An den beiden Enden des Holders werden bis zu den Elektroden (ohne zu überlappen) mit Wasser getränkte Wattestückchen eingelegt. Diese dienen dazu, die Proteine, deren pI nicht innerhalb des gewählten pH-Bereiches liegt, zu sammeln. Die Probe wird noch mit 700 µl Cover-Fluid überschichtet. Dadurch wird eine Auskristallisation des Harnstoffs oder eine Eintrocknung der Probe verhindert.

Nach Auflegen der Abdeckung können die Holder auf die Elektroden der IPGphor gestellt und das folgende Programm (Tabelle 6, folgende Seite) gestartet werden:

Schritt	Zeit	Spannung	Spannungsanlegung
Rehydratisierung	16 h	30 V	step n hold
S2	1 h	200 V	step n hold
S3	1 h	500 V	step n hold
S4	1 h	1000V	step n hold
S5	4 h	4000 V	gradient
S6	16 V	4000 V	step n hold Ende bei 20 000 Vh

Tabelle 6: Programm für die IEF

Die IEF-Streifen können nach der Fokussierung bei -80 °C bis zu Weiterverarbeitung aufbewahrt werden.

Dieses Programm wurde für diese speziellen Proben als optimal ermittelt. Für die IEF gibt es kein Standardprogramm, sondern es muss immer auf jede Problemstellung optimiert werden. In diesem Fall wurde die IEF im Schritt S6 bei 20 000 Vh gestoppt. Es ist problematisch, bei der ersten Dimension ist es, eine gute Fokussierung zu erhalten. Legt man die Spannung zu kurz an, ist die Fokussierung noch nicht abgeschlossen. Liegt die Spannung zu lange an, kann es zu einer Überfokussierung und zur Semiosmose kommen. Diese Phänomene sind aber erst nach der zweiten Dimension optisch erkennbar. Somit ist die Parameterfindung bei der 1. Dimension eine recht zeit- und materialraubende Angelegenheit.

5.7.4 Die zweite Dimension

Die Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgt nach der Molekülgröße mit Hilfe einer SDS-PAGE. Auch hierfür gibt es Gele die kommerziell erhältlich sind. In diesem Fall wurden die ExcelGele[®] XL SDS 12-14 von der Firma Pharmacia Biotech gewählt. Vor der Überführung der 1. Dimension auf die zweite müssen die IEF-Streifen noch folgendermaßen vorbehandelt werden. Für je 15 min werden sie zuerst in die Äquibrierungslösung A und anschließend in der Äquibrierungslösung B inkubiert. Lösung A enthält DTT als Reduktionsmittel und Lösung B Iodacetamid, welches die Thiolgruppen von Proteinen alkyliert (ebenso überschüssiges DTT) und dadurch ihre Reoxidation während der Elektrophorese verhindert. Nach der Inkubation werden die Streifen kurz auf einem feuchten Filterpapier abgelegt, um überschüssige Flüssigkeit zu entfernen und dann auf das SDS-Gel mit der Gelseite nach unten aufgebracht (Abb. 15, folgende Seite). Blasenbildung ist dabei zu vermeiden.



Abb. 15: Aufbringung des IEF-Streifen auf die das SDS-Gel

Nach Anbringung der Elektroden wird das Programm gestartet. Nach 45 min wird der Lauf unterbrochen um den IEF-Streifen zu entfernen und die Elektroden zur Lauffront (Bromphenolblau welches in Lösung B ist) nachzujustieren. Die Elektrophorese läuft nach untenstehendem Programm (Tab. 7) noch 2.5 h, bis die Lauffront die entgegengesetzte Elektrode erreicht hat.

Schritt 1	20 mA konstant	1000 V	40 W	45 min
Schritt 2	40 mA konstant	1000 V	40 W	2,5 h

Tabelle 7: Programm für die SDS-PAGE

5.7.5 Silberfärbung

Die Silberfärbung ist die empfindlichste, nichtradioaktive Detektionsmethode. Ihre Nachweisgrenze liegt bei 0.05-0.1 ng Protein/mm² [Michov, 1996]. Es sollte beachtet werden, dass nicht alle Proteine sich in gleichem Maße mit Silber färben lassen. Es gibt solche die kaum oder gar nicht mit Silber-Ionen reagieren.

Nach dem Fixierungsschritt wird bei dieser Methode noch ein Schritt zur Sensibilisierung/Färbung eingeschoben. Hierbei werden Silber-Ionen von den präzipitierten Proteinen gebunden und dort durch Reduktion in Silberkeime umgewandelt. Die Reduktion wird von den funktionellen Gruppen der Aminosäureresten und den Peptidbindungen verursacht. Beim Entwickeln werden alle Silber-Ionen im Gel mit Hilfe der Silberkeime, als Katalysator, von einem starken Reduktionsmittel (z.B. Formaldehyd) zu metallischem Silber reduziert. Die Reduktion verläuft in unmittelbarer Nähe der Silberkeime, d.h. dort wo sich die Proteinbanden befinden, wesentlich schneller als im restlichen Gel und führt zur Umwandlung der Proteinbanden in eine dunkelbraune bis schwarze Färbung.

Die Vorschrift wurde dem Silberfärbekit entnommen [Silver Staining Kit] und ist auf der Methode von Heukeshoven und Dernick basierend [Heukeshoven *et al.*, 1985]. Das Volumen

von 350 ml ist auf den Hoefer Färbeautomat ausgelegt. Der Ablauf ist in Tabelle 8 dargestellt.

Fixieren	35 ml Eisessig, 140 ml EtOH, 175 ml H ₂ O	30 min
Sensibilisieren	105 ml EtOH, 1.75 ml Glutardialdehyd (25 % w/v), 14 ml Natriumthiosulfat (5 % w/v), 23.8 g Natriumacetat ad 350 ml H ₂ O	30 min
Waschen	350 ml H ₂ O	5 min
Waschen	350 ml H ₂ O	5 min
Waschen	350 ml H ₂ O	5 min
Färben	35 ml Silbernitrat (2.5 % w/v), 0.14 ml Formaldehyd (37 % w/v) ad 350 ml H ₂ O	20 min
Waschen	350 ml H ₂ O	1 min
Waschen	350 ml H ₂ O	1 min
Entwickeln	8.75 g Natriumcarbonat, 0.07 ml Formaldehyd (37 % w/v) ad 350 ml H ₂ O	3.5 min
Stoppen	5.11 g Na ₂ EDTA· 2 H ₂ O ad 350 ml H ₂ O	10 min
Waschen	350 ml H ₂ O	5 min
Waschen	350 ml H ₂ O	5 min
Waschen	350 ml H ₂ O	5 min
optional: Konservieren	350 ml 10 % Glycerinlösung	20 min

Tabelle 8: Protokoll zur Silberfärbung

5.7.6 Sypro[®] Ruby Färbung

Die Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen wie z.B. Sypro[®] Ruby verspricht eine genauso sensitive Detektierung wie sie mit Silberfärbung erreicht wird. Die Vorteile gegenüber der Silberfärbung liegen in folgenden Punkten:

- keine Überfärbung
- lineare Quantifizierung über 3 Größenordnungen
- weniger Protein zu Protein Variabilität
- färbt auch Glycoproteine, Lipoproteine, calciumbindende und andere schwer färbbaren Proteine
- färbt keine Nukleinsäuren

- interferiert nicht mit der Edmann Sequenziermethode

Für die Färbung muss das Gel zuerst 1 h in 10 % MeOH/7 % HOAc fixiert werden. Die anschließende Inkubation mit dem Farbstoff sollte im Dunkeln für 3 h bis 12 h erfolgen. Für ein 200 x 200 x 1 mm Gel werden 500 ml Lösung benötigt, welche nur einmal verwendet werden sollte, da es sonst zu Sensitivitätsverlusten kommen kann. Nach der Färbung wird das Gel 30 min mit 10 % MeOH/7 % HOAc gewaschen und kann anschließend mit einem Fluorescent Image Analyzer bei 473 nm ausgelesen werden.

5.7.7 Coomassie Färbung

Die Coomassie Färbung ist eine sehr einfache Färbemethode. Sie ist 50mal weniger sensitiv, jedoch quantitativer als Silber. Coomassie bindet stöchiometrisch an Proteine, so dass diese Methode bei einer densitometrischen Auswertung bevorzugt werden sollte. Auch für einen anschließenden In-Gel Verdau und massenspektrometrische Analyse sollte diese Färbung gewählt werden, da der Farbstoff bei der Analyse nicht stört und auch die erforderliche Proteinmenge vorhanden ist, sobald sie mit Coomassie sichtbar ist. Die Empfindlichkeit beträgt in etwa 100 ng Protein pro Bande.

Für die Färbung werden die Gele im Färbeautomat mit 325 ml Coomassie Lösung (50 % MeOH, 10 % HOAc, 0.1 % Brilliant Blue R) übergossen und für mindestens 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird mit 50 % MeOH/10 % HOAc zweimal für je 1 h entfärbt, bis die Proteinspots gut erkennbar sind.

Für einen anschließenden In-Gel Verdau sollte das Gel mindestens 3 h mit dreimaligem Wechsel der Entfärbelösung behandelt werden, um eine ausreichende Entfernung des SDS aus dem Gel zu gewährleisten.

5.7.8 Colloidale-Coomassie Färbung

Diese Methode nützt den Umstand, dass sich Coomassie G250 bei Anwesenheit von Ammoniumsulfat und Phosphorsäure in einem kolloidalen Zustand befindet, aus. Diese Färbung ist ungefähr dreimal sensitiver als die klassische Coomassie Methode, mit einer Empfindlichkeit von 0.7 ng/mm^2 (30 ng Protein pro Bande) [Michov, 1996]. Ein Vorteil für die weitere Prozessierung des Gels, z.B. für eine Maldi-Analyse, ist die Entfärbung mit Wasser.

Die Vorschrift wurde einem Laborprotokoll der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jürgen Wehland der GBF Braunschweig (Abt. Zellbiologie) entnommen.

Zuerst muss das Gel für 1 h in 40 % MeOH und 10 % HOAc fixiert werden. Die Färbung

erfolgt für mindestens 3 h, am besten über Nacht, mit 80 % Färbelösung/20 % MeOH. Entfärbt wird mit viel Wasser das mehrmals gewechselt wird. Falls sich der Hintergrund nicht vollständig entfernen lässt, kann dieser mit 20 % MeOH weiter reduziert werden.

5.7.9 In-Gel Verdau und MALDI-ToF Proteinbestimmung für die 2D-Gelelektrophorese

Im Jahre 1988 führten Karas und Hillenkamp [Karas *et al.*, 1988] eine Massenspektroskopiemethode genannt „matrix assisted laser desorption ionisation“ (MALDI) ein. Damit war es möglich die Molekulargewichte von Biopolymeren zu bestimmen und das Werkzeug für eine einfache Proteinidentifikation von 100 bis 1 000 000 D stand zur Verfügung. Wird ein Protein unter konstanten Bedingungen gespalten, so ist das Fragmentmuster (Fingerprint) sehr gut reproduzierbar und auch charakteristisch. Mit Hilfe einer Massenanalyse wird der Massenfingerprint erhalten und dieser kann im weiteren z.B. über eine Datenbanksuche zur Identifikation des Proteins führen.

Mit einem In-Gel Verdau kann ein Coomassie-gefärbter Proteinspot aus der 2D-Gelelektrophorese direkt für einen Massenfingerprint vorbereitet werden. Zu beachten ist, dass das Gel zuvor, entweder schon beim Entfärben oder anschließend mindestens dreimal 1 h z.B. in Entfärber gewaschen wird. Dies geschieht um eine ausreichende Entfernung des SDS aus dem Gel zu gewährleisten.

Das verwendete Protokoll (Tabelle 9, folgende Seite) ist eine Mischung aus Laborprotokollen von Dr. H. Körner des Mikrobiologischen Instituts der Universität Karlsruhe und der empfohlenen Methode von Bruker Daltonic.

Zuerst wird der Spot mit einem Skalpell so eng wie möglich ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt werden. Als Hintergrundkontrolle wird ein Stück blankes Gel separat mitlaufen lassen.

Vor jedem neuen Schritt wird, falls nicht anders vermerkt, der Überstand abgenommen und verworfen.

V Methoden

Waschen	250 µl 50 % CH ₃ CN	5 min
Waschen	250 µl 50 % CH ₃ CN/50 mM NH ₄ HCO ₃	30 min
Trocknen	an der Speedvac	~3 min
Dehydratisierung	100 µl CH ₃ CN	10 min
Trocknen	an der Speedvac	~3 min
Reduktion	50 µl 10 mM DTT, 5 mM NH ₄ HCO ₃	55 °C, 30 min
Alkylierung	100 µl 10 mM Iodacetamid, 5 mM NH ₄ HCO ₃	im Dunkeln, 30 min
Dehydratisierung	100 µl CH ₃ CN	10 min
Trocknen	an der Speedvac	~3 min
Waschen	250 µl 50 % CH ₃ CN/50 mM NH ₄ HCO ₃	30 min
Trocknen	an der Speedvac	~3 min
Verdau	60 µl von frisch zubereiteter Trypsinlösung (0 °C) [20 µg Trypsin in 1000 µl eiskalter 50 mM NH ₄ HCO ₃]	10 min Überstand wird nach diesem Schritt nicht entfernt!
Verdau	zu dem Verdauansatz werden 10 µl 50 mM NH ₄ HCO ₃ gegeben Der Überstand entspricht der Maldiprobe. 1 µl kann sofort zur Analyse verwendet werden. Optional kann extrahiert und aufkonzentriert werden.	37 °C, über Nacht
Extraktion	200 µl 0.1 % TFA, 60 % CH ₃ CN	60 min, gelegentlich vortexen. Überstand (Probe) wird mit Maldiprobe vereinigt. Aufkonzentration in Speedvac, jedoch nicht bis zur Trockene!!
Extraktion	obigen Schritt wiederholen	

Tabelle 9: In-Gel Verdau

Die vereinigten Überstände der Extraktion, welche die Proteinfragmente enthalten, werden vereinigt und auf 10 µl an einer Speedvac aufkonzentriert. Es ist darauf zu achten, dass die Probe nicht bis zur Trockene eingengt wird. Als Standard wird 1 µl dieser aufkonzentrierten Probe zur Analyse verwendet. Die restliche Probe kann bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt werden.

Maldi Target Präparation

Für die Targetpräparation werden 1 µl Matrix (z.B. gesättigte Lösung von α-Cyano-4-hydroxy-zimtsäure in 30 % Acetonitril/70 % TFA (0.1 %) vorgelegt. Darauf werden 1 µl der Probe pipettiert und vermischt. Nach dem Trocknen des Gemisches kann analysiert werden. Dabei ist darauf zu achten, dass das Gerät zuerst mit einem Proteinstandard geeicht wird und daneben auch der Fingerprint von Keratin, das allgegenwärtig ist, gefunden wird.

Alternativ kann eine Sandwichstruktur verwendet werden. Dazu 1 µl Matrix auf dem Target trocknen lassen. Darauf wird eine schon fertige Mischung von Probe/Matrix (1:1) gegeben.

5.8 Blau-Native-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Blau-Native-Gelelektrophorese ist auch eine 2D-Elektrophorese. Hierbei wird in der 1. Dimension eine Blau-Nativ und für die 2. Dimension eine Tricin-SDS-Page gefahren. Mit dieser Methode ist es möglich membrangebundene Enzymkomplexe aufzutrennen. Die Proteine werden hierbei mit Hilfe der Aminocaprinsäure und Dodecylmaltosid solubilisiert. Die Ladung für die Elektrophorese erhalten die Komplexe durch Coomassie G250, dieser anionische Farbstoff bindet an hydrophobe Bereiche von Proteinen. Während der ersten, nativen Dimension bleiben die Proteinkomplexe intakt, während bei der zweiten, denaturierenden Elektrophoresedimension die einzelnen Proteineinheiten aufgetrennt werden. Die folgende Vorschrift wurde einem Laborprotokoll von Herrn H.-P. Braun der Universität Hannover (Institut f. Angewandte Genetik) entnommen. Es ist eine abgewandelte Form der Originalliteratur nach Schägger [Schägger *et al.*, 1991].

1. Geldimension

Für die 1. Dimension wird ein Schichtgel von 4.5 –16 % gegossen. Die Geldimensionen für das folgende Tabelle (Tab. 10, folgende Seite) ausgelegt ist, sind: 140 x 160 x 1 mm mit einem Gelvolumen von 22.4 ml.

	4.5 %	16 %	Sammelgel 4 %
H₂O	15.6 ml	6 ml	5.7 ml
6 x Gelpuffer-BN	3.5 ml	3 ml	1.25 ml
49.5T/3C	1.9 ml	6 ml	0.6 ml
Glycerin	--	3.5 ml	--
10 % APS	95 µl	61 µl	46 µl
TEMED	9.5 µl	6.1 µl	5 µl

Tabelle 10: Gelzusammensetzung 1. Dimension BN

Die Schichten werden folgendermaßen hergestellt:

	16%	4.5%
1. Schicht (unterste)	4 ml	--
2. Schicht	3 ml	1 ml
3. Schicht	2 ml	2 ml
4. Schicht	1 ml	3 ml
5. Schicht	--	4 ml

Tabelle 11: Pipettierschema für das Schichtgel

Das Gel wird unter einer Wasserschicht auspolymerisieren lassen. Anschließend kann das 4%ige Sammelgel mit dem Probenkamm aufgesetzt werden. Das fertig gegossene, auspolymerisierte Gel kann in der Kühlzelle, mit feuchten Tüchern umwickelt, über Nacht gelagert werden.

Probenvorbereitung

Für die Isolierung membrangebundener Proteinkomplexe aus *Datura stramonium* Wurzelkulturen werden diese zuerst mit BN-2D-Aufschlusspuffer 1:1 (w/v) und einem Löffelspatel PVPP pro 50 g Wurzelmasse in einem modifizierten Braun Haushaltsmixer aufgeschlossen (vgl. Kap. 5.6.1). Nach einer Filtration durch eine Miracloth Membran erfolgt ein erster Zentrifugationsschritt bei 10 000 rpm (4 000g) für 15 min. Hierbei werden Chloroplasten (falls vorhanden), intakte Zellen, Plastide, Kerne und andere schwere Zellfragmente aufgetrennt. Um die Mitochondrien abzutrennen erfolgt ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 20 000 rpm (16 000g) für 30 min. Die microsomale Fraktion wird bei einer Ultrazentrifugation (100 000g) während 1 h isoliert.

Um Proteinkomplexe intakt aus ihrer Membran herauszulösen kann Dodecylsulfat, ein mildes, nichtionisches Detergenz verwendet werden. Für die Probenvorbereitung gilt folgende Faustregel: ungefähr 10 % der Membranmasse entspricht der Proteinmenge.

Für die BN-2D sollten pro Spur 1 mg Protein aufgetragen werden. Dafür werden 10 mg Niederschlag in 75 µl ACA 750 resuspendiert. Das ACA 750 stellt das für die nachfolgende Solubilisieren der Proteine unterstützende Salz, die Aminocaprinsäure zur Verfügung. Das enthaltene Bis-Tris dient als Puffersubstanz. Durch Zugabe von 15 µl frisch angesetztem 10 % Dodecylmaltosid klart sich die Lösung auf, da die Membranen zerstört werden und die Proteinkomplexe in Lösung gehen. Durch eine Zentrifugation bei 4 °C mit maximaler rpm für 30 min werden die unlöslichen Bestandteile entfernt. Der Überstand wird mit 1 µl 5 % Serva Blue G versetzt und ist somit vorbereitet für die Aufgabe auf das Polyacrylamidgel.

Gellauf

Der Lauf findet bei 4 °C statt. Deshalb sind alle Puffer und Lösungen vorzukühlen. Bevor man die Proben aufträgt, wird dem Kathodenpuffer 0.03 % Dodecylmaltosid zugefügt. Dies sollte eine 1/2 h vor dem Gelstart erfolgen, um eine Solubilisierung der Proteine auch während des Laufes zu gewährleisten.

Für den Lauf gelten folgende Stromstärken:

	0.75 mm Gel	1 mm Gel
Stromstärke pro Gel	13 mA	17 mA

Die Spannung sollte anfangs bei 80-90 V liegen. Zuletzt steigt sie bis auf 500 V. Ein Lauf dauert 5-7 h. Gleich im Anschluss an den Lauf kann die 2. Dimension vorbereitet werden.

2. Dimension

Um nach der ersten Dimension die Probe, d.h. eine Gelspur der 1. Dimension, für die Tricin-SDS-Page vorzubereiten, wird das Gel für 30 min in 1 % SDS/1 % β-Mercaptoethanol inkubiert. Anschließend wird für 30-60 sec mit Wasser gespült. Diese Zeiten sollten eingehalten werden, da zum einen Mercaptoethanol die Polymerisation von Polyacrylamidgelen behindert, zum anderen eine zu lange Spülzeit zur Renaturierung der Proteine führt. Der Gelstreifen wird nun in etwa der Position eines Sammelgels auf eine Glasplatte gelegt und das Plattensystem für das Gießen zusammengebaut. In der 2. Dimension wird auch ein Schichtgel verwendet, welches nur zwei unterschiedliche Schichten aufweist, wobei die Obere etwa nur 2 cm breit sein sollte. Diese dient zur Auftrennung sehr kleiner Proteinfragmente. Insgesamt sollte dieses Zweischichtgel etwa 2-3 cm unter der Kante des Gelstreifens aufhören, so dass das Sammelgel noch genügend breit gegossen werden kann. Zur Auspolymerisierung des Schichtgels wird es mit Overlay-Lösung überschichtet. Die Zusammensetzung der Gelschichten ist in Tabelle 12 (folgende Seite) aufgelistet.

Die folgenden Volumina gelten für folgendes Gelsystem: 140 x 160 x 0.75 mm V= 18 ml.

	16.5 %	10 %	Sammelgel 10 %
H₂O	3.6 ml	2.8 ml	2.1 ml
49.5T/3C	6 ml	1.2 ml	1.2 ml
Gelpuffer-Tricin	6 ml	2 ml	--
6 x Gelpuffer-BN	--	--	2 ml
Glycerin	2.4 ml	--	--
SDS 10 %	--	--	60 µl
APS 10 %	92 µl	30 µl	30 µl
TEMED	6 µl	2 µl	2 µl

Tabelle 12: Gelzusammensetzung für die 2. Dimension der BN-2D-Gelelektrophorese

Gellauf

Der Gellauf kann bei der zweiten, denaturierenden Elektrophorese bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Die Stromstärken entsprechen denen des 1. Laufs. Die Proteine können anschließend mit Colloidal-Coomassie (Kap. 5.7.8) sichtbar gemacht werden.

5.9 *Datura stramonium* Wurzelkulturen

5.9.1 Induktion der Hairy Roots

Schon zu Beginn des 20. Jahrhunderts konnte gezeigt werden, dass ein Bodenbakterium für eine neoplastische Auswucherung von feinen Haaren an Infektionsstellen verantwortlich war. Da die befallenen Pflanzen an Robustheit verloren, wurde das Symptom als „Hairy Root Disease“ bezeichnet. 1930 wurde das verantwortliche Bakterium als *Agrobacterium rhizogenes* identifiziert. Tepfer berichtete 1980 [Tepfer *et al.*, 1981] zum ersten Mal über das schnelle *in vitro* Wachstum dieser transformierten Wurzeln in speziellen Medien, ohne Zusätze von exogenen Phytohormonen. Kurze Zeit später wurde das Potential von Hairy Roots beim Studium des Sekundären Pflanzenstoffwechsels entdeckt, z.B. von Flores bei Tropanalkaloiden in *Hyoscyamus muticus* [Flores *et al.*, 1985].

Für die Induktion der Hairy Roots aus *Datura stramonium* gibt es verschiedene Ausgangsmaterialien. Am einfachsten für die Induktion sind sterile Pflanzen, da es hierbei zu weniger Kontaminationen kommt. Um sterile Pflanzen anzuziehen werden die Samen sterilisiert und auf Agar angezogen. Als weitere Variante gelten natürlich wachsende Pflanzen, deren Blätter vor der Animpfung mit *Agrobacterium rhizogenes* sterilisiert werden.

Anzucht steriler Pflanzen

Um Samen zu sterilisieren kann ganz gewöhnlicher Haushaltsreiniger, das Domestos, verwendet werden.

Zur Beschleunigung des Sprießvorganges wurden die Samen vor der Sterilisation 2 Tage in Wasser eingelegt. Anschließend werden sie für einige Stunden in 30%igem Domestos auf einem Schüttler behandelt. Nach dieser Sterilisationsbehandlung müssen die Samen einige Mal mit sterilem Wasser gespült werden, bevor sie auf B5-Agarplatten ausgelegt werden. Nach ca. 4 Wochen, bei 24 °C sprießen die Samen aus und werden in Bechergläser mit B5-Agar umgesetzt, so dass sich die Pflanzen entwickeln können. Diese sterilen Pflanzen können in Kultur gehalten werden, indem kleine Sprosse steril abgetrennt und in B5-Agar mit 1 % Sucrose gesteckt werden. Diese Sprosse ziehen nach kurzer Zeit Wurzeln.

Sterilisation von Blättern

Um natürlich gewachsene Pflanzenblätter zu sterilisieren, werden diese 10 min mit 60 % EtOH und anschließend weitere 10 min mit 2 % Natriumhypochlorit behandelt. Diese Zeiten sollten nicht überschritten werden, da ansonsten die Blattzellen absterben. Die Blätter werden nun mit viel sterilem Wasser unter der Reinraumbank gespült.

Animpfung mit *Agrobacterium rhizogenes*

Für das Animpfen der Blätter wird eine 48 h Kultur des Agrobakteriums benötigt. Dazu werden 15 ml YMB-Medium (für Stamm LBA 9402 zusätzlich 0.75 mg Rifampicin) mit 75 µl einer Glycerinkultur angeimpft und bei 25 °C angezogen. Hierbei spielt eine konstante Temperatur von 25 °C eine entscheidende Rolle, da ansonsten die Plasmide aus den Bakterienzellen ausgeschleust werden.

Aus dem sterilen Blattmaterial werden ca. 2 x 2 cm große Stücke herausgeschnitten. Dabei sollten Blattrippen und Adern ausgespart werden, da diese zu natürlichem Wurzelwachstum neigen. Eine Schnittkante des Blattecks wird in die Bakteriensuspension eingetaucht und das Blatt mit der Oberseite nach unten auf eine B5-Agarplatte gelegt. Die Platten werden ohne Parafilm bei 25 °C für zwei Tage inkubiert. Anschließend werden die Blattstücke entnommen, in sterilem Wasser mit 200 mg/l Cefotaxim gespült und auf B5-Cefotaxim-Agarplatten umgesetzt (max. 4 Blattstücke pro Platte). Dieser Schritt dient der Abtötung der Agrobakterien, da diese sonst alles überwuchern und das Blattmaterial abtöten würden. Die Petrischalen werden mit Parafilm verschlossen und im Dunkeln bei 25 °C inkubiert. Von nun an müssen die Blattstücke jeden Tag auf eventuell auftretende Kontamination überprüft und gegebenenfalls befallenen Blattstücke entfernt werden. Alle 2-4 Tage werden alle Blattstücke

auf neue Antibiotikanährböden transferiert, bis das Wurzelwachstum nach ca. 4 Wochen beginnt. Gewachsene Wurzeln werden bei einer Länge von 1-2 cm vom Blatt entfernt und einzeln in einen Erlenmeyerkolben mit 50 ml B5-Flüssigmedium (0.5 g Amp/l) gegeben. Transformierte Wurzeln kann man von natürlichen Wurzeln dahingehend unterscheiden, dass letztere viel langsamer wachsen und z.T. auch im Flüssigmedium absterben. Bei transformierten Wurzeln sollte sich das Wurzelvolumen nach 14 Tagen 10-20fach vermehrt haben.

5.9.2 Kulturerhaltung

Erlenmeyerkultur

Zur Kulturerhaltung werden 14tägig ca. 400 mg junges Wurzelmaterial in einen frischen 300 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml B5-Medium und 0.5 g/l Ampicillin transferiert. Dabei ist darauf zu achten, dass das Pflanzenmedium welches bei 4 °C gelagert wird auf Raumtemperatur temperiert wurde und das Antibiotika erst kurz vor dessen Verwendung dem Medium zugesetzt wird.

Fermentiertechnik

Für Größere Wurzelanzuchten kann auf die Fermentiertechnik zurückgegriffen werden. Die Bedingungen sind im Folgenden aufgelistet:

Medium	3 Liter
Temperatur	24 °C
pH	5.8 konstant
Sauerstoffsättigung	80 %
Rührwerk	15 rpm

Nach 19 Tagen werden aus ca. 8 g Ausgangsmaterial 150 g Biomasse. Optisch unterscheiden sich diese Wurzeln durch robustere Wurzelarme und weniger Verzweigungen von den Erlenmeyerkulturen. Auch muss beachtet werden, dass eine Fermenterkultur in den Anzuchtbedingungen unflexibler zu handhaben ist als Erlenmeyerkulturen. Bei diesen können, z.B. für Fütterungsexperimente, in jedem Kolben sehr schnell andere Bedingungen eingestellt werden.

5.10 Alkaloidbestimmung

Zur Alkaloidbestimmung einer *D. stramonium* Hairy Roots Kultur, wird zuerst das Feuchtgewicht und nach einer Nacht am Lyophilisator das Trockengewicht bestimmt. Die

trockenen Wurzeln werden mit einem Glasstab in einem 50 ml Falcon Tube pulverisiert. Mit 10 ml EtOH/NH₃ 19:1 werden über Nacht, unter Rühren die Alkaloide extrahiert. Anschließend wird die Pflanzensuspension mit einem Glasfilter abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingengt und getrocknet. Der Rückstand wird mit 3 x 200 µl und 1 x 400 µl 0.1 N HCl herausgelöst. Davon werden 200 µl auf eine Extrelutsäule, d.h. eine Pasteurpipette, die mit Extrelut[®] NT gefüllt ist, aufgegeben und 15 min einwirken lassen. Die organische Phase kann anschließend mit 15 ml Chloroform eluiert werden. Am Rotationsverdampfer wird bis zur Trockene eingengt und über Nacht am Hochvakuum getrocknet. Die Alkaloide werden mit 100 µl Dioxan herausgelöst. 10 µl dieser Probe wird mit 15 µl Bismethylsilylacetamid silyliert und ist somit bereit für die GCMS-Analyse. Die silylierte Probe wird mit 100 µl Dioxan verdünnt und 2 µl davon für die Analyse verwendet. Die Analyse am GCMS erfolgt nach folgendem Temperaturprogramm (Tab. 13):

	Temperatur	Endtemperatur	Zeit
Step	100 °C	100 °C	2 min
Gradient	20 °C/min	280 °C	9 min
Gradient	1 °C/min	283 °C	3 min
Gradient	20 °C/min	300 °C	0.9 min
Step	300 °C	300 °C	10 min

Tabelle 13: Temperaturprogramm für die GCMS-Analyse

In Abb. 16 ist eine GCMS-Analyse von Hyoscyamin und Littorin abgebildet.

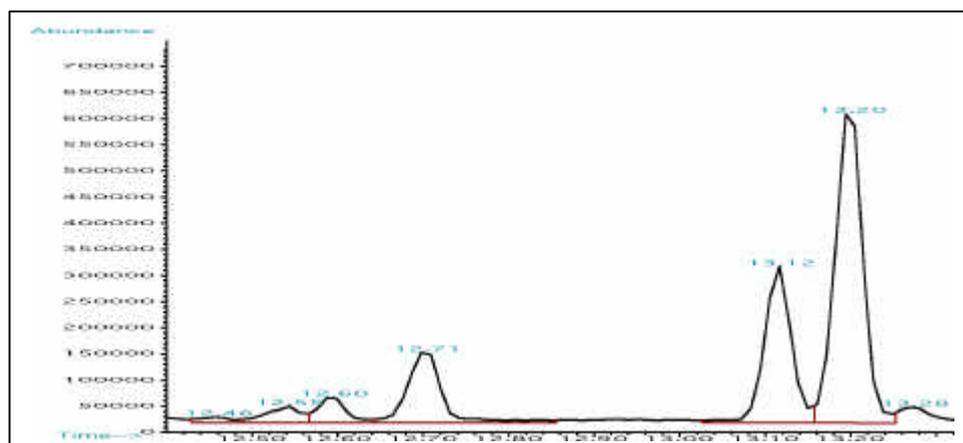


Abb. 16: GCMS-Analyse einer Alkaloidbestimmung

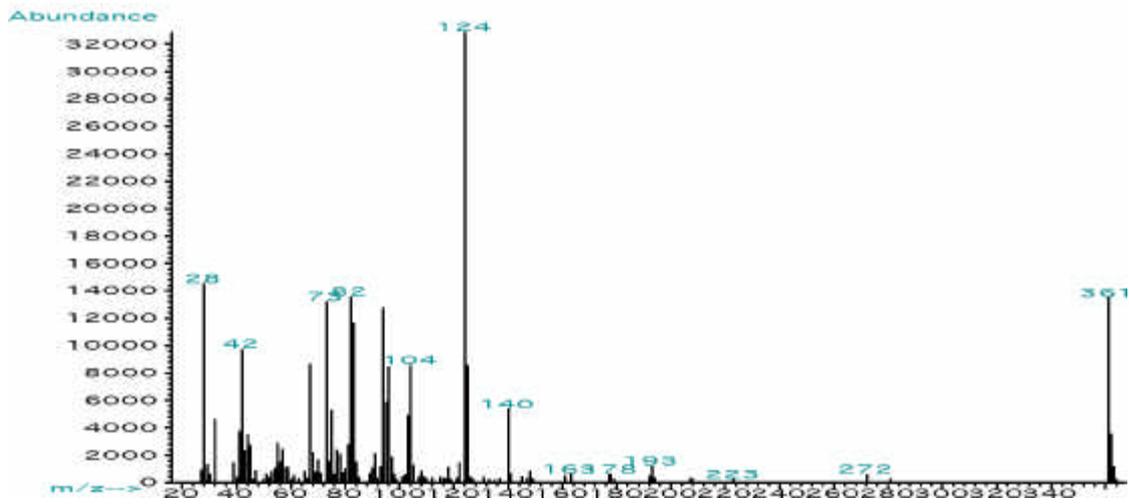
Der Peak bei 13.12 min entspricht dem Hyoscyamin und der darauffolgende Peak (13.20 min) dem Littorin.

Die Alkaloide Hyoscyamin (13.12 min) und Littorin (13.20 min) können durch folgende Massenpeaks identifiziert und unterschieden werden:

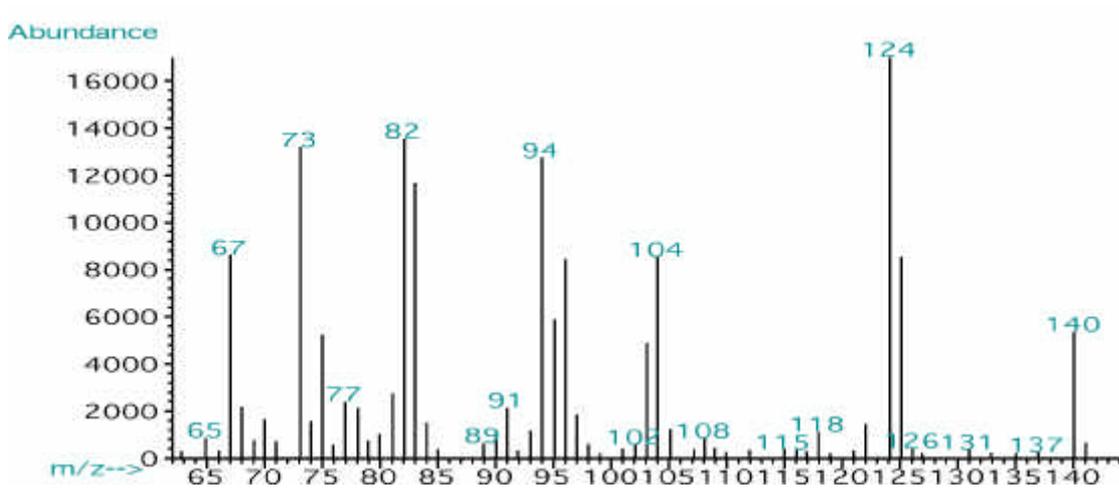
Hyoscyamin	<p>361 Massenpeak + Me₃Si</p> <p>91 Tropylium Peak ist klein</p> <p>124 Tropinrest</p> <p>104>140 (Größenverhältnis)</p> <p>163 sehr klein</p>
Littorin	<p>361 Massenpeak + Me₃Si</p> <p>91 größer als bei Hyoscyamin</p> <p>104~140</p> <p>163</p>

In Abbildung 17 (folgende Seite) sind die Massenspektren dargestellt. Ein Signal bei 73 sollte immer zu sehen sein, ansonsten bedeutet dies, dass die Probe unsilyliert ist, wobei in diesem Fall auch ein Signal bei 289 erhalten wird.

A:



B:



C:

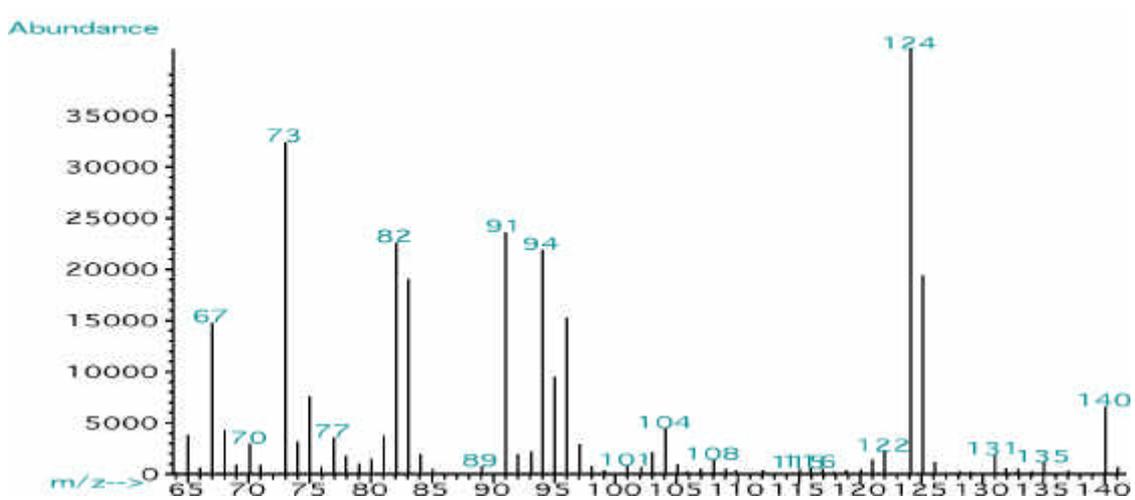


Abb. 17: A: Massenspektrum von Hyoscyamin, B: Ausschnitt des Massenspektrums von Hyoscyamin
C: Ausschnitt des Massenspektrums von Littorin

HPLC-Analyse von Hyoscyamin und Littorin

Eine Alternative zur GCMS-Analyse stellt die HPLC-Analyse dar. Aus diesem Grund wurde versucht eine Auftrennung der beiden zu bestimmenden Alkaloide zu erhalten. Das beste Ergebnis wurde mit einer Nucleosil 3C18 Säule erhalten (MN Nucleosil 120 3 C 18). Die Bedingungen sind im Folgenden aufgelistet.

Lösungsmittel A: H₂O + 0.1 % TFA

Lösungsmittel B: CH₃CN + 0.1 % TFA

Fluß: 0.6 ml/min

Programm:

Zeit [min]	% Lösungsmittel B
0	10
25	35
26	100
30	100
31	10
35	10

In Abb. 18 ist ein Elutionsschema dargestellt.

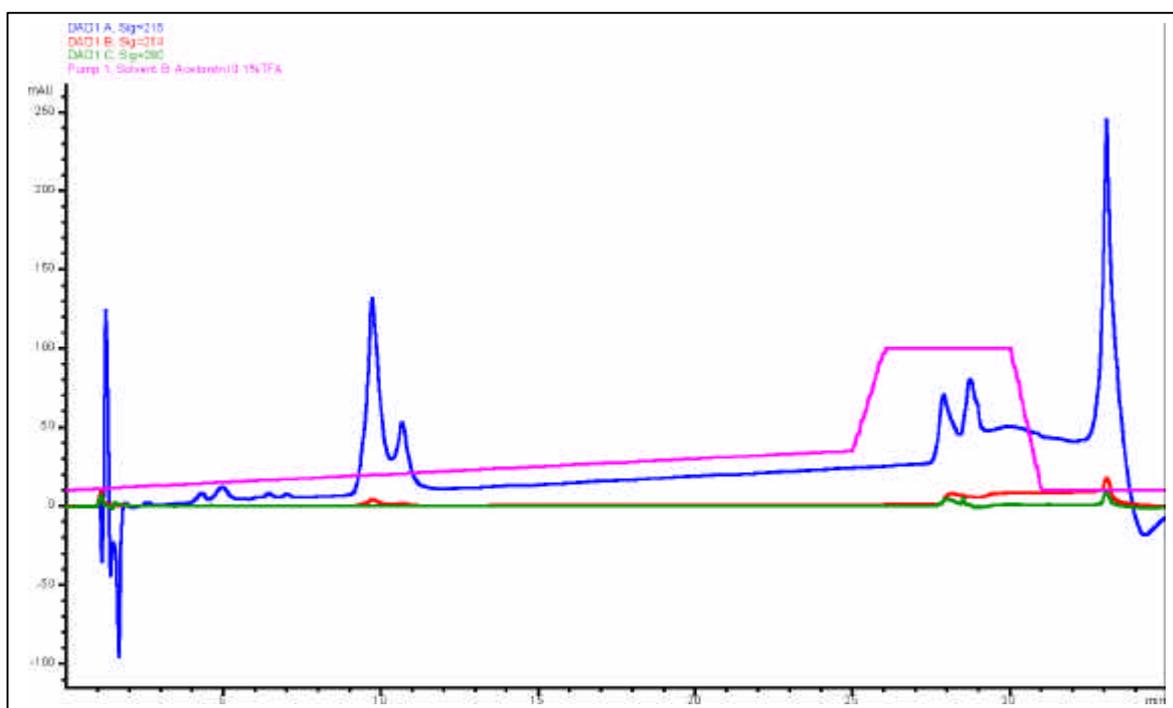


Abb. 18: Elutionsprofil der HPLC Analyse von Hyoscyamin und Littorin

Bei 9 min wird zuerst Hyoscyamin eluiert, gefolgt von Littorin bei 10 min.

5.11 Kapillarelektrophorese

Die Kapillarelektrophorese ist eine Analysetechnik, mit der sich hauptsächlich Peptide, Proteine und Oligosaccharide, aber auch DNA und RNA auftrennen lassen. Die Kapillarelektrophorese unterscheidet sich von der klassischen Elektrophorese darin, dass sie trägerfrei in einer Kapillare mit einem Innendurchmesser von $\leq 100 \mu\text{m}$ durchgeführt wird. Als Trennmittel werden wässrige Puffersysteme eingesetzt, um den Stromtransport zu gewährleisten und den pH-Wert in der Kapillare konstant zu halten. Die Trennung findet bei einer elektrischen Feldstärke von mehreren hundert V/cm statt, wobei der Strom, durch den geringen Innendurchmesser, im Bereich von $100 \mu\text{A}$ liegt.

Für die Trennung von Peptiden, wie hier in dieser Arbeit wird üblicherweise die Kapillarzonenelektrophorese (CZE) verwendet. In der CZE findet die Trennung auf Grund der Mobilitätsunterschiede statt, d.h. sowohl die Größe als auch die Ladung des Teilchens sind für die Trennung entscheidend. Die Kapillare ist mit einem einheitlichen Elektrolytssystem gefüllt, um den Stromtransport zu gewährleisten und um eine einheitliche Feldstärke und einen konstanten pH-Wert aufrecht zu erhalten.

In dieser Arbeit wurde die CZE gewählt, um verschiedene Peptide nach einem In-Gel Verdau hinsichtlich der Leitersequenzierung zu trennen. Als Puffer wurde ein 0.1 M Phosphatpuffer (pH 2.5) gewählt. Bei der Kapillare handelte es sich um eine Fused Silica Kapillare mit einem Innendurchmesser von $50 \mu\text{m}$ und einer Länge von 24 cm. Als Injektionsart hat sich die Druckinjektion bewährt, da sie gerade, wenn präparativ gearbeitet werden soll, die "Lauf zu Lauf"-Unterschiede geringer hält als eine Elektroinjektion. Letztere bietet jedoch den Vorteil, dass nur geladene Teilchen in die Kapillare gelangen. Die Spannung und damit auch die Laufzeit muss mit jeder Probe neu getestet werden. Bei höherer Spannung wird die Elutionszeit geringer, jedoch wird auch das Elutionsprofil gestaucht. Bei geringerer Spannung wird das Chromatogramm gedehnt. Es kann dadurch jedoch zu einer Peakverbreiterung kommen.

5.12 Leitersequenzierung

Mit Hilfe der MALDI-Massenanalyse ist es möglich ein Peptid zu sequenzieren. In der Literatur werden zwei verschiedene Leitersequenzierungsarten beschrieben. Die erstere, die auch in dieser Arbeit getestet wurde, ist die apparativ einfachere Variante nach Chait *et al.* [Chait *et al.*, 1993], da sämtliche Schritte in einer Eintopfreaktion in einem Eppendorftube durchgeführt werden. Eine zweite Variante bietet den Vorteil, dass die Reagenzien flüchtig

sind und sich somit die Nebenprodukte nicht im Reaktionsgemisch ansammeln, sondern einfach durch eine Trocknung entfernt werden können. Jedoch ist diese Variante nach Bartlett-Jones *et al.* [Bartlett-Jones *et al.*, 1994] apparativ aufwendiger.

Zu groß dürfen die zu analysierenden Peptide nicht sein (maximal 30 Aminosäuren). Das Peptid wird mit Phenylisothiocyanat (PICT) umgesetzt, das 5 % Phenylisocyanat (PIC) enthält. PICT bildet mit der N-terminalen Aminosäure ein Phenylthiocarbamylpeptid. PIC das entsprechende Phenylcarbamylpeptid. Nach dieser Kopplungsreaktion wird überschüssiges Reagenz extrahiert. Die verbleibenden, derivatisierten Peptide werden mehrmals gewaschen und anschließend an der Speedvac getrocknet. Dann wird TFA zugegeben. Das PICT-Peptid zyklisiert und die N-terminale Aminogruppe spaltet sich ab (Edman Abbau). Das PIC-Peptid wird durch TFA nicht angegriffen. Die Produkte werden wieder getrocknet und ein neuer Zyklus kann, mit dem nun um eine Aminosäure verkürztem Peptid, beginnen. Der Zyklus kann beliebig oft wiederholt werden. Zum Schluss werden alle freien N-Termini mit PIC blockiert. Das Maldi-Tof trennt die PIC-Peptidleiter auf und misst die Molekulargewichte der einzelnen PIC-Peptide. Die Peptidsequenz kann direkt aus dem Spektrum abgelesen werden. Alle Reaktionen werden in einem Reaktionsgefäß durchgeführt. Der komplette Prozess ist in Abbildung 19 graphisch dargestellt und in Tabelle 14 (folgende Seite) aufgeführt.

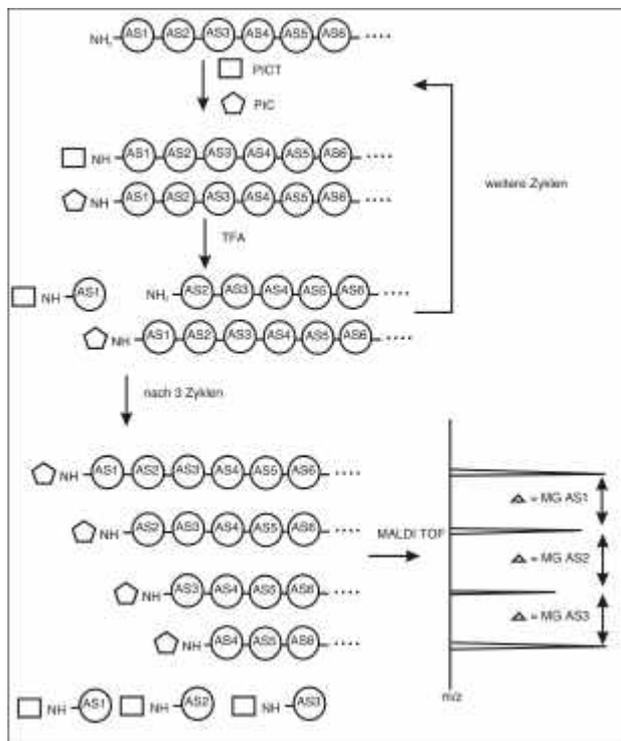


Abb. 19: Prinzip der Leitersequenzierung

V Methoden

Lösen	200 pmol – 10 nmol Peptid in 20 µl Pyridin/H ₂ O (1:1 v/v)	
Kopplung	20 µl PITC/PIC/Pyridin/ Hexafluoroisopropanol (HFIP) (20:1:76:4 v/v)	unter Stickstoff 50 °C, 3 min
Extraktion	2 mal 300 µl Heptan/Ethylacetat (10:1 v/v) 2 mal 300 µl Heptan/Ethylacetat (2:1 v/v)	vorsichtig vortexen, zentrifugieren und obere Phase verwerfen
Trocknen	an Speedvac	
Spaltung	20 µl TFA (wasserfrei)	50 °C, 2 min
Trocknen	an Speedvac	
Zyklenwiederholung	Wdh. ab "Lösen" entsprechend der gewünschte Zyklenanzahl	
Blockierung	Probe in 20 µl [Trimethylamin/H ₂ O (25 % wt/wt)]/ Pyridin (1:1 v/v) lösen + 20 µl PIC/Pyridin/HFIP (1:76:4 v/v)	50 °C, 5 min
Extraktion	siehe oben	
Trocknen	Speedvac	
Analyse	für die MALDI Analyse Probe in 0.1 % TFA/ Acetonitril (2:1 v/v) lösen	

Tabelle 14: Leitersequenzierung nach Chait *et al.*

VI. Eigene Arbeiten

6.1 Induktion von Hairy Roots aus *Datura stramonium*

Zu Beginn dieser Arbeit wurde eine eigene Wurzelkulturlinie aus *Datura stramonium* induziert. Die Induktion wurde mit natürlichem Blattmaterial gemäß Kapitel 5.9 (S. 78 ff.) durchgeführt. Das Aussprossen von Wurzeln erfolgte ca. 3 Wochen nach der Animpfung mit den Agrobakterien. Jedoch war das natürliche Wurzelwachstum bevorzugt. Durch Wachstumsversuche in Flüssigmedium konnte eine transformierte Wurzellinie separiert werden. Sie wurde G2 genannt. Auch gelang es sterile *Datura stramonium* Pflanzen zu kultivieren.

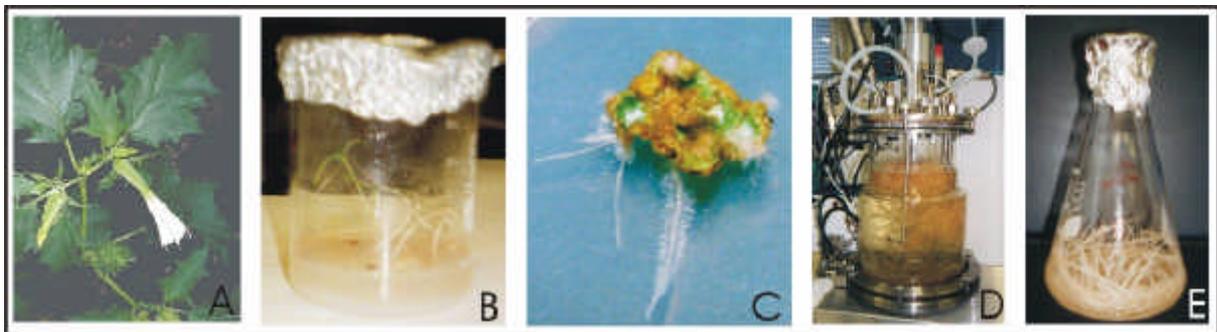


Abb. 20: A: natürliche *Datura stramonium*, B: sterile Pflanze, C: Induktion von Hairy Roots aus natürlichem Blattmaterial, D: Fermenteranzucht, E: Erlenmeyeranzucht

In Abbildung 20 A ist eine natürlich wachsende *D. stramonium* Pflanze abgebildet. Daneben (Abb. 20 B) ist die erfolgreiche Anzucht von sterilen Keimlingen erkennbar. Die sterilen Pflanzen sind zwar verhältnismäßig klein im Gegensatz zu den natürlichen Pflanzen, doch zur Induktion von Hairy Roots bieten steril angezogene Blätter die optimaleren Bedingungen, da diese im Gegensatz zu sterilisierten, natürlichen Blättern weniger zu Kontamination während der 3 Wochen Inkubationszeit bis zum Wurzelsprossen neigen (vgl. Kap. 5.9.1, S. 78 ff.). In Abb. 20 C ist das erfolgreich induzierte Wurzelwachstum zu erkennen. Sehr schön sind die namensgebenden Wurzelhaare erkennbar.

Kultiviert wurden die Hairy Roots anschließend in 300 ml Erlenmeyerkolben oder als Fermenterkultur (Abb. D/E). Wobei bei dem zum Wachstum benötigten Pflanzenmedium (Gomborg's B5) sehr darauf geachtet werden muss, dass dieses nach dem Einstellen des pH-Wertes auf 5.8 nicht autoklaviert werden darf. Denn beim Autoklavieren wird der pH-Wert deutlich abgesenkt, was dazu führt, dass die Wurzeln absterben. Auch muss sehr steril bei der Kultivierung der Wurzelkulturen gearbeitet werden, da die Wurzeln eine Wachstumsperiode von 2-3 Wochen haben. Eine Kontamination mit Bakterien oder Hefen führt zum Absterben der Wurzeln.

6.2 Messreihen an den vorhandenen Wurzelkulturlinien

Um den Zeitpunkt der höchsten Littorinmutaseaktivität herauszufinden, wurden drei verschiedene Wurzelkulturlinien (genannt B1, N4 und G2 (die selbst induzierte Kulturlinie)) zeitabhängig auf ihren Hyoscyamin und Littoringehalt hin untersucht. Zeitgleich wurden der pH-Wert, Leitwert und die Biomassenentwicklung verfolgt. Parallel wurde die Linie N4 jeweils 4 Tage vor Ernte mit 1.5 µl Methyljasmonat (Duchefa c = 0.1-5 mg/ml) angeimpft. Methyljasmonat ist ein bedeutendes Pflanzenstress-Signalmolekül. In der Literatur werden Konzentrationssteigerungen von Hyoscyamin in den Wurzelzellen um bis zu 100 % durch 0.1 µM MeJa beschrieben [Zabetakis *et al.*, 1999].

Die Ergebnisse der Messreihen sind in Abbildung 21 dargestellt. Es wurden jeweils 200-400 mg Ausgangsmaterial eingewogen und 3 Kulturen pro Messpunkt verwendet, um eine statistische Aussage zu ermöglichen.

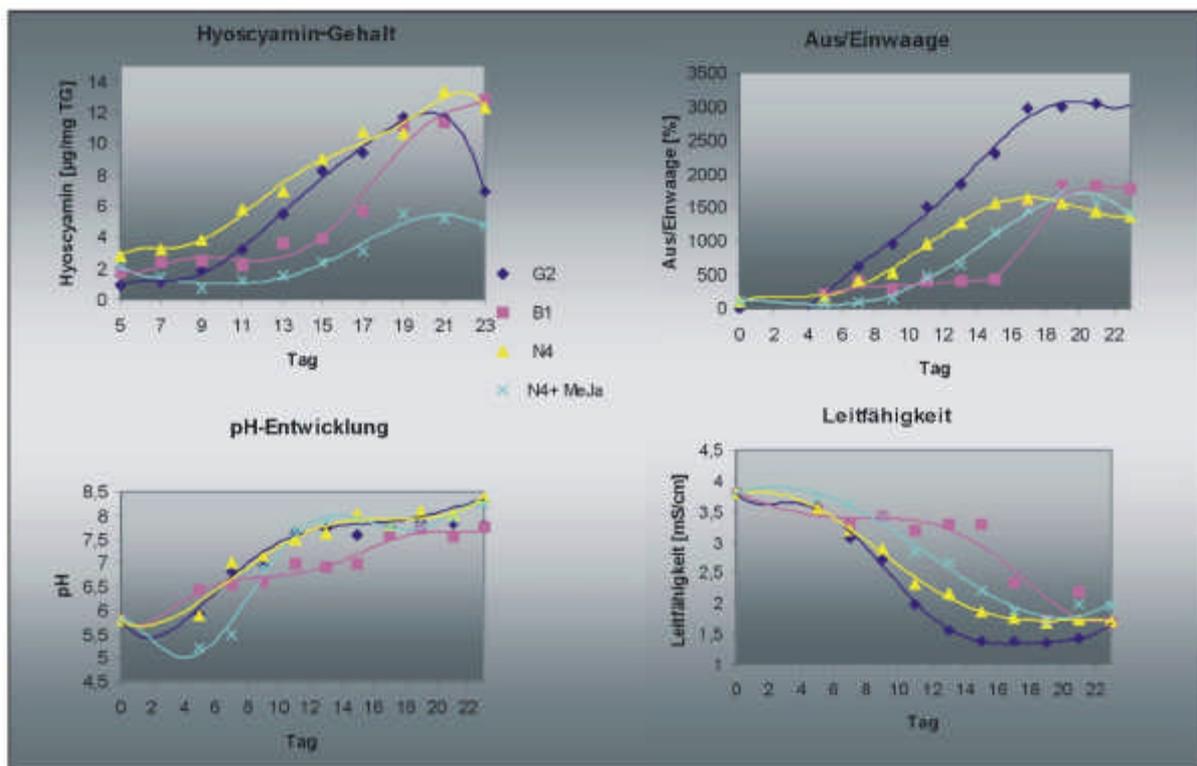


Abb. 21: Vermessung der Wurzelkulturlinien

Nach 23 Tagen ergab sich je nach Kultur eine Biomasse zwischen 6 und 8 g mit einem Trockengewicht von 400-500 mg.

Der Hyoscyamingehalt wurde mit Hilfe der in Kapitel 5.10 (S. 80 ff.) beschriebenen Methode bestimmt.

Als Schlussfolgerung dieser Messreihen wurden die Wurzeln, für weitere Enzymuntersuchungen, um den 15. Tag geerntet.

6.3 Herstellung einer cDNA-Bibliothek

Es wurden 3 Bibliotheken unterschiedlichen Wurzelalters (11, 13, 18 Tage) erfolgreich hergestellt. Zu Beginn wurde eine gesamt-RNA und daraus eine mRNA-Präparation gemäß Kapitel 5.4.2 f. (vgl. S. 43 ff.) durchgeführt. Der Tabelle 15 können die verwendeten Mengen und Ausbeuten entnommen werden.

Wurzelalter	Material [g]	Gesamt-RNA [µg]	Reinheit A_{260}/A_{280} Soll: 1.8- 2.1	mRNA [µg]	Anteil an gesamt- RNA [%] Theorie 0.5-2 %
11 Tage	2	635.2	1.9	6.4	1.0
13 Tage	4	457.0	1.9	4.1	0.9
18 Tage	2	416.0	1.9	5.1	1.2

Tabelle 15: Ergebnisse der RNA-Isolierung aus *D. stramonium* Hairy Roots

Für die Erststrangsynthese wurde die maximal einsetzbare Menge von 5 µg mRNA verwendet. Da nur ein maximales Volumen von 5 µl erlaubt ist, wurde die mRNA an der Speedvac getrocknet und entsprechend in DEPC-H₂O aufgenommen.

Die Ausbeute der Erststrangsynthese kann mit Hilfe des Einbaus von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ bestimmt werden (vgl. Kap. 5.4.4, S. 45 ff.).

Für die 3 Bibliotheken ergaben sich folgende Ergebnisse:

	11 Tage Bibliothek 1	13 Tage Bibliothek 2	18 Tage Bibliothek 3
spez. Aktivität [pmol ⁻¹]	366.3	670.5	442.6
Menge an Erststrang cDNA	0.22	0.25	0.34

Der nächste "Kontrollpunkt" bei der Erstellung der cDNA-Bibliothek befindet sich zeitlich nach der Säulenchromatographie, welche durchgeführt wird, um zu kleine cDNA-Fragmente abzutrennen.

Über die Cerenkov-Counts kann von jedem Elutionstropfen der Chromatographiesäule die Menge an cDNA bestimmt werden. Im Folgenden (Tabelle 16, untergliedert in 3 separate Blocks) sind alle Messergebnisse der 3 cDNA-Bibliotheken aufgelistet.

cDNA-Bibliothek 1 (Wurzelalter: 11 Tage)					
Fraktion Nr.	Volumen [µl]	Gesamtvolumen [µl]	cpm	Menge an cDNA [ng]	Konzentration der cDNA [ng/µl]
1	97	97	16.8	0.24	-
2	96	193	12.5	0.17	-
3	36	229	16.7	0.24	-
4	33	262	64.5	0.93	-

VI Eigene Arbeiten

5	62	324	36.0	0.52	-
6	32	356	102.2	1.47	0.05
7	36	392	106.1	1.53	0.04
8	34	426	258.8	3.73	0.11
9	34	460	473.7	6.82	0.2
10	36	496	646.9	9.31	0.26
11	34	530	555.5	8.0	0.24
12	30	560	-	-	-
13	35	595	-	-	-
14	35	630	-	-	-
15	37	667	-	-	-
16	38	705	-	-	-
17	31	736	-	-	-
18	31	767	-	-	-
19	32	799	-	-	-
20	37	836	-	-	-

Tabelle 16 a: Messergebnis der 1. cDNA-Bibliothek (Wurzelkulturalter: 11 Tage)

cDNA-Bibliothek 2 (Wurzelalter: 13 Tage)					
Fraktion Nr.	Volumen [μ l]	Gesamtvolumen [μ l]	cpm	Menge an cDNA [ng]	Konzentration der cDNA [ng/ μ l]
1	97	97	26.4	-	-
2	85	182	29.7	-	-
3	31	213	20.0	-	-
4	30	243	25.0	-	-
5	25	268	29.6	-	-
6	24	292	40.3	-	-
7	32	324	94.1	-	-
8	35	359	509.0	4.1	0.12
9	37	396	195.7	1.6	0.04
10	34	430	224.9	1.8	0.05
11	38	468	403.3	3.2	0.08
12	31	499	297.7	2.4	0.08
13	36	535	401.7	3.2	0.25
14	39	574	-	-	-
15	35	609	-	-	-
16	36	645	-	-	-
17	39	684	-	-	-
18	36	720	-	-	-
19	38	758	-	-	-
20	36	794	-	-	-

Tabelle 16 b: Messergebnis der 2. cDNA-Bibliothek (Wurzelkulturalter: 13 Tage)

cDNA-Bibliothek 3 (Wurzelalter: 18 Tage)					
(Fließgeschwindigkeit bei der "free-flow"-Säulenchromatographie technisch bedingt zu hoch)					
Fraktion Nr.	Volumen [μ l]	Gesamt Volumen [μ l]	cpm	Menge an cDNA [ng]	Konzentration der cDNA [ng/ μ l]
1	98	98	19.0	-	-
2	99	197	21.3	-	-
3	38	235	20.7	-	-
4	35	270	11.1	-	-
5	38	308	14.1	-	-
6	38	346	10.0	-	-
7	38	384	16.0	-	-
8	38	422	16.7	-	-
9	39	461	9.5	-	-
10	39	500	16.7	-	-
11	70	570	7.0	-	-

VI Eigene Arbeiten

12	38	608	22.0	-	-
13	37	645	16.1	-	-
14	37	682	34.5	-	-
15	34	716	51.1	-	-
16	34	750	80.1	1.0	0.03
17	35	785	137.2	1.6	0.05
18	46	831	219.8	2.6	0.06
19	36	867	175.4	2.1	0.06
20	34	901	154.8	1.8	0.05

Tabelle 16 c: Messergebnis der 3. cDNA-Bibliothek (Wurzelkulturalter: 18 Tage)

In Tabelle 16 c ist das Ergebnis der dritte cDNA-Bibliothek aufgelistet. Bei dieser Bibliothek trat bei der Fraktionierung der cDNA über eine Chromatographiesäule (Kap. 5.4.4) eine Verschiebung des Elutionsprofils auf, da die Fließgeschwindigkeit materialtechnisch zu hoch war. Dieses Phänomen wird auch in der Anleitung zu dem verwendeten cDNA-Bibliotheks-Kit beschrieben. Aus diesem Grund ist der grau unterlegte Bereich (Fraktionen die für die Ligation verwendet wurden) bei dieser Bibliothek zu einer höheren Fraktionszahl hin verschoben.

Für die Ligation werden insgesamt 10 ng cDNA benötigt. Die Menge an cDNA je Fraktion ist in Spalte 5 dargestellt. Die Berechnung ist dem Kapitel 5.4.4 zu entnehmen. Aus der Bibliothek Nr. 1 (Wurzelalter: 11 Tage) war es möglich zwei Ansätze zu ligieren. Die Bereiche die für die Ligation ausgewählt wurden sind Grau unterlegt. Bei Bibliothek Nr. 1 sind dementsprechend beide Bereiche die für die Ligation verwendet wurden farblich abgestuft dargestellt.

Für die Transformation wurden 2.5 µl DNA auf 50 µl Zellen eingesetzt.

6.4 Versuche zur Aktivierung der Littorinmutase

Aktivitätstest

Der Standardaktivitätstest, sowie dessen Durchführung ist in Kapitel 5.6.2 (S. 58 ff.) beschrieben. Zusätzlich wurden noch zahlreiche Parameter variiert um optimale Bedingungen zu finden und vor allem, um den Test reproduzierbar zu gestalten.

Das Ziel eines geeigneten Aktivitätstestes ist es, eine Aktivität wirklich reproduzierbar nachzuweisen. Hierbei gilt es die 10 % Grenze in Bezug auf die Umsetzung des Littorins (Substrat) zu überschreiten. Im Folgenden (Tab. 17, folgende Seite) wurde eine Liste erstellt, in der jeweils ausgehend vom Standardaktivitätstest die variierten und getesteten Parameter aufgeführt sind.

VI Eigene Arbeiten

Parameter	Veränderung
Aufschlusspuffer	- EDTA - Pefablok + Littorin (Substrat) dem Aufschlusspuffer zugegeben (5 mg/100 ml) + Protease Inhibitor Cocktail zugegeben Tris-Puffer anstatt Kaliumphosphat-Puffer
Aktivitätstest	Verlängerte Reaktionszeit: 25 min, 2 h, 5 h Temperatur: 4 °C, 10 °C, 20 °C, 34 °C, 37 °C SAM Konzentration: 2 x, 10 x + ATP (10 µl einer 2 mg/ml Lösung) + BSA Endkonzentration 0.5 mg/ml + APS 5 µl einer 20 % Lösung + Tropin und Phenyllactat Liponsäuresynthaseaktivitätstest mit Desazariboflavin [Heimberger, 2000]
	anaerober Aufschluss und Assay Assay unter Lichtausschluss
Membranfraktion	Detergenzien: Triton X 100 Tween 20 Polyoxyethylene 9 laurylether Brij 35 Chaps
Aufschluss	Gemäß der Blau-Nativen-Gelelektrophorese Probenvorbereitung. Membranenzymkomplexe sollten dabei noch im enzymatisch aktiven Verbund vorliegen.
Ein Aktivitätstest aus Rohaufschluss ohne PD 10 Säule, d.h. ohne Zentrifugation und PD 10 Säule ist aufgrund des hohen Hyoscyamingehaltes nicht möglich.	

Tabelle 17: Variationen des Aktivitätstestes

Es wurden verschiedene Aufschlusspuffer getestet. Wobei immer nur eine Komponente hinzugefügt oder weggelassen wurden. Zum einen wurden ausgehend vom Standardaufschlusspuffer (100 mM Phosphatpuffer (pH 8), 4 mM Na₂EDTA, 250 mM Sucrose) Zusätze wie EDTA und Pefablok entfernt, um die Komplexierung von eventuellen Cofaktoren zu vermeiden. Bei anderen Tests wurde Littorin als Substrat zugesetzt. Es wurde vermutet, dass Substrat das Enzym stabilisieren könnte, ähnlich der Dioldehydratase, bei der 1,2-Propandiol dem Aufschlusspuffer zugesetzt werden muss. Zur Vermeidung eines Abbaus des Proteins während des Aufschlusses wurde ein Test mit einem käuflichen Protease Inhibitor-Cocktail durchgeführt. Auch wurde ein Tris-Puffer anstatt des üblichen Phosphatpuffers getestet.

Der Aktivitätstest wurde in Bezug auf verschiedene Reaktionszeiten und Temperaturen variiert. Ebenso wurde die S-Adenosylmethionin Konzentration verdoppelt und verzehnfacht. Als weitere Zusätze wurden ATP, BSA (zur Protein stabilisierung) und APS (als eventueller

Radikalstarter) getestet. Jeweils wieder nur ein neuer Zusatz pro Test. Des Weiteren wurde zusätzlich Tropin und gleichzeitig Phenyllactat als Vorstufen des Littorins zugesetzt. Ziel war es eine *in vitro* Synthese des Littorins zu bekommen, welches dann eventuell sofort umgewandelt wird.

Es kann davon ausgegangen werden, dass die Littorinmutase einen Eisen-Schwefel-Cluster enthält. Bei der Biotin-Synthase sorgt ein 5'-Desazaflavin-System *in vitro* für dessen Regenerierung. Photoreduziertes 5'-Desazariboflavin ist in der Lage das natürlich vorkommende Flavodoxin/Flavodoxinreduktase-System vollständig zu ersetzen. Mit denselben Bedingungen wurde in dieser Arbeit versucht eine Aktivität der Littorinmutase zu erreichen. Der folgende Aktivitätstest wurde der Diplomarbeit von M. Heimberger entnommen.

Substanz	Menge (Probe) [μ l]	Menge (Blindprobe) [μ l]
0.1 M KCl	60	60
0.15 M Tris-Puffer pH 8	63	68
0.1 M $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$	6	6
Littorin (3.4 mg/ml)	5	--
Proteinlösung (2-3 mg/ml)	150	150
8 mM 5'-Desazariboflavin	5	5
8 mM DTT	5	5
SAM (5mg/ml)	6	6
Endvolumen	300	300

Die Probe wird bei 30 °C inkubiert und 5 h mit einem handelsüblichen Diaprojektor bestrahlt. Unter der Annahme, dass eventuell ein Eisen-Schwefel-Cluster bei der Enzymaktivität eine Rolle spielen könnte, wurde einmal die komplette Probenvorbereitung bis hin zu dem Ansetzen des Aktivitätstestes, unter einer Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Ebenso wurde zum Teil der Aktivitätstest unter Lichtausschluss angesetzt.

Membranfraktionen wurden getestet, da u.a. eine 38%ige Aktivität im Niederschlag nach einer 20 min Zentrifugation des Rohaufschlusses bei 14 000 rpm gefunden wurde. Daraufhin wurde versucht die eventuell membranständige Littorinmutase mit verschiedenen Detergenzien herauszulösen. Dazu wurde die Membran in 1 ml Aufschlusspuffer (+1 % Detergenz) 1 Stunde auf Eis inkubiert, anschließend zentrifugiert und der Überstand auf Aktivität getestet. Als Blindprobe zu der Detergenzbehandlung wurde eine Probe ohne Detergenz parallel verfolgt. Das zuvor aufgetretene positive Ergebnis konnte im Weiteren nicht mehr reproduziert werden.

Der Aktivitätstest wurde mit Membranfraktionen gemäß einer Blau-Nativen-

Gelelektrophorese Vorbereitung durchgeführt. Bei dieser Membranprobenvorbereitung sollten die Membrankomplexe in ihrer natürlichen Anordnung vorliegen, so dass eventuell notwendige Coproteine noch an die Littorinmutase in nativem Zustand gebunden sind.

Ein üblicher Weg, um festzustellen, ob Cofaktoren fehlen, ist die Durchführung eines Aktivitätstest direkt aus dem Rohaufschluss (inklusive aller Zellbestandteile). Nur so kann gewährleistet werden, dass der komplette Zellinhalt beim Test vorhanden ist. Schon durch Zentrifugation und die PD 10 Entsalzung werden unter Umständen wichtige Cofaktoren entfernt. Ein Aktivitätstest direkt aus frisch vorbereitetem Rohaufschluss, ohne jegliche Manipulation, ist aufgrund des natürlichen Hyoscyamingehaltes bei dieser Arbeit nicht möglich.

In den folgenden zwei Diagrammen (Abb. 22 A/B) ist der besagte Aktivitätsfund dargestellt. Das erste Diagramm (Abb. 22 A) stellt die GCMS-Analyse des Aktivitätstestes dar. Im Folgenden (Abb. 22 B) ist die dazugehörige Blindprobe (Aktivitätstest ohne Zugabe von Littorin) abgebildet.

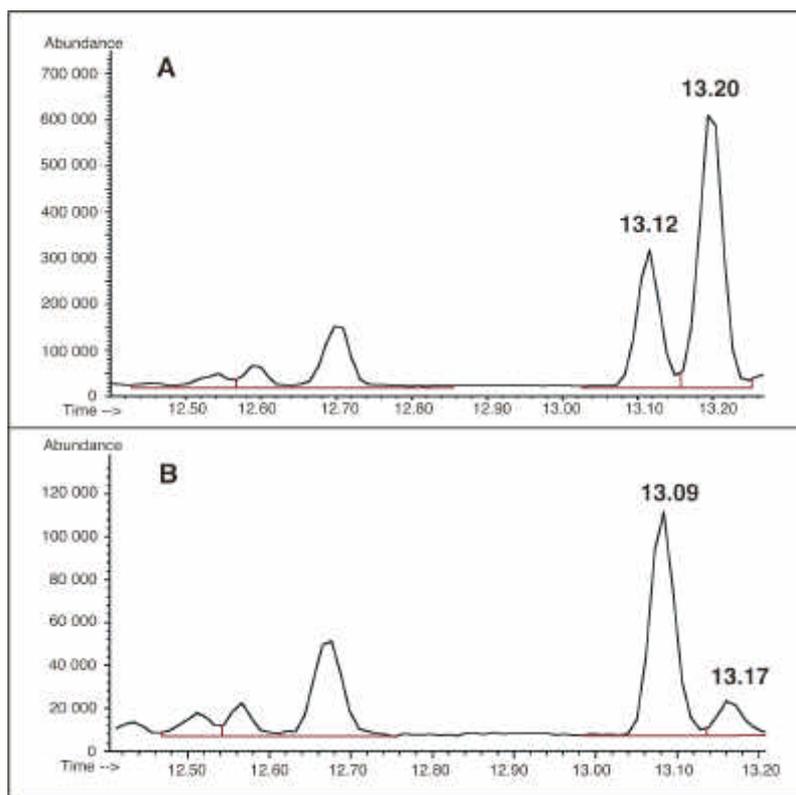


Abb. 22 A/B: GCMS-Analyse von A: Aktivitätstest einer Membranfraktion, B: dazugehörige Blindprobe

Bei Abb. 20 A ist sehr schön der Hyoscyaminpeak bei 13.12 min zu erkennen. In der Blindprobe (Abb. 20 B) ist dieser Peak bei 13.09 min deutlich weniger intensiv. An dieser Blindprobe ist auch das natürliche Verhältnis von Hyoscyamin und Littorin (13.17 min) zu

erkennen. Die Integraldifferenz des Hyoscyaminpeaks von Aktivitätstest und Blindprobe beträgt 34 %. Somit sollte davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um „echte“ Aktivität und nicht um eine Messungenauigkeit handelt.

Alle Variationen des Standardaktivitätstestes führten zu keiner Verbesserung. Somit war es nicht möglich, aufbauend auf einen Aktivitätstest, eine klassische Enzymreinigung durchzuführen. Es musste ein anderer Weg eingeschlagen werden.

6.5 Bindemotivsuche

S-Adenosylmethionin, das nach ATP der am meisten verwendete Cofaktor ist, wird zumeist von Methyltransferasen verwendet. Die Methyltransferasen sind eine große und verschiedenartige Klasse von Enzymen die eine Methylgruppe von SAM auf eine Großzahl an Substraten wie z.B. kleine Moleküle, Nukleinsäuren und Proteinen übertragen. Schon im Jahre 1994 wurden für das SAM drei Bindemotive veröffentlicht [Kagan *et al.*, 1994]. Von 84 mit multiple Alignment verglichenen nicht DNA-Methyltransferasen besitzen 69 das Motiv I, Motiv II besitzen nur 45 dieser Enzyme und Motiv III ist in 61 Sequenzen vorhanden. Diese Motive werden stets in der gleichen Reihenfolge und mit vergleichbaren Abständen auf der Polypeptidkette gefunden. Es wird vermutet, dass diese konservierte Region entweder zur Bindung des SAM und/oder des Produktes S-Adenosylcystein beiträgt. Die Konsensus Sequenzen der Motive werden wie folgt angegeben:

SAM I: (V/I/L)(L/V)(D/E)(V/I)G(G/C)G(T/P)G

SAM II: (P/G)(Q/T)(F/Y/A)DA(I/V/Y)(F/I)(C/V/L)

SAM III: LL(R/K)PGG(R/I/L)(L/I)(L/F/I/V)(I/L)

Für diese Arbeit wurden nur die Bindemotive I und III in eine Primersequenz übersetzt, da diese beiden in den meisten Fällen auftreten. Übersetzt wurden folgendermaßen:

SAM I: 5'GAI III GGI I III GGI III GG 3' \equiv ((D/E)xGxGxG)

SAM III: 5'(CT)TI (CT)TI (AC)(AG)I GGI GGI (ACT)(GT)I IT 3'
 \equiv LL(R/K)GG (R/I/L)(L/I)

Der Grund für die Wahl von SAM Bindemotiven als Grundlage zur Durchsuchung lag in der Annahme, dass, auch wenn SAM radikalisch agiert vom Protein gebunden werden muss und somit sollte ein solches Motiv zu finden sein.

Während der Anfertigung dieser Arbeit wurde das SAM-Radikal Bindemotiv von Sofia *et al.* [Sofia *et al.*, 2001] veröffentlicht. Mit Hilfe von bioinformatischen Methoden wurden 645

Mitglieder der sogenannten „Radikal SAM Superfamilie“ untersucht. Diese besitzen alle ein ungewöhnliches Cysteinmotiv, zumeist nahe am N-terminus oder bei einigen längeren Sequenzen mehr zur Mitte orientiert. 592 Proteine zeigen exakt den Consensus CxxxCxxC, die restlichen 53 Sequenzen besitzen einen etwas weiteren Abstand zwischen den ersten beiden Cysteinen.

Auch dieses Bindemotiv, sowie das Eisen-Schwefel-Cluster Bindemotiv wurden in eine Primersequenz übersetzt. Das FeS-Cluster Motiv wurde zusätzlich gewählt, da z.B. die Lysin-2,3-Aminomutase, die Biotin-Synthase und die Liponsäuresynthase einen FeS-Cluster besitzen, welcher vermutlich mit der radikalischen Spaltung von SAM in Zusammenhang steht.

6.5.1 PCR

Um die Primerbindung zu überprüfen wurde die Liponsäuresynthase (Lip5 #2 in pQE 70) als Positivkontrolle verwendet. Die Liponsäuresynthase besitzt einen Eisen-Schwefel-Cluster und somit auch das Cystein Bindemotiv (CTRGCRFC). Eine Kontroll-PCR wurde mit dem SAMradical Primer und einem Primer (pQE(-)), welcher auf dem Vektor bindet, durchgeführt. Das erwartete PCR-Produkt wurde wie aus Abbildung 23 hervorgeht amplifiziert.



Spur 1: DNA-Sizer III
 Spur 2: PCR
 a: 564 bp
 b: 831 bp

Abb. 23: PCR Positiv-Kontrolle für den SAMradikal Primer

Die Polymerasekettenreaktionen wurden mit frisch präparierter cDNA von 15 Tage alten Wurzeln durchgeführt. Als Primer wurde jeweils ein Bindemotivprimer mit einem polyT-Primer als Partner gewählt. Die PCR wurde an einem Gradientencycler mit maximalem Gradient von 15 °C durchgeführt. Es wurden verschiedene schwache Banden amplifiziert, welche aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des Perfectly Blunt™ Cloning Kits in einen Vektor zur Sequenzierung inkloniert wurden. Eine Reamplifikation war nicht

erfolgreich.

Amplifikate wurden nur bei der cDNA, welche mit einem polyT-Primer synthetisiert wurde, erhalten. Mit Random Hexamer Primern generierte cDNA führte bei den anschließenden PCR Screenings zu keinen signifikanten Banden, ebenso wie die Screenings mit den FeS-Primern.

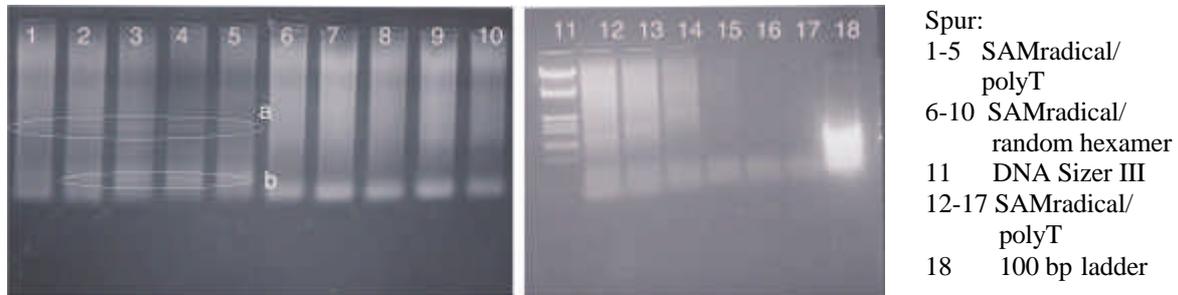


Abb. 24: verschiedene PCR Ansätze mit nebenstehender Primerpaarung von links nach rechts mit ansteigender Annealingtemperatur über einen Gradienten von 15 °C

Die in Abb. 24 markierten 1000 bp Fragmente (a), die durchgehend bei allen Annealingtemperaturen von 43 bis 58 °C erscheinen, konnten erfolgreich kloniert und sequenziert werden. Bei einer FastX-Datenbanksuche (Vergleich einer Nucleotidsequenz gegen eine Proteindatenbank, wobei Frameshifts mit einbezogen werden), die in das Programmpaket Husar (DKFZ Heidelberg) einbezogen ist, wurde ein Expectationvalue (E) von $1.2 \cdot e^{-27}$ erreicht. E gibt die Wahrscheinlichkeit an, diese Sequenz in einer Random Database zu finden. Ist $E \approx 0$ ist es sehr unwahrscheinlich, einen Hit durch Zufall zu bekommen. Somit sind die $1.2 \cdot e^{-27}$ als zuverlässig einzustufen. Allerdings ergab sich dabei ein Treffer bei einem tetracyclinresistenz Protein von *E.coli* der Klasse C mit 89.2%iger Identität bei einem 83 Aminosäuren-Overlap. Das SAMradical Bindemotiv konnte in dieser Sequenz nicht gefunden werden.

Die markierten Fragmente b wurden als ein Teil des 26S ribosomalen RNA-Genes, bei einer BlastN2-Suche (Nukleinsäuresequenz gegen eine DNA Sequenz Datenbank) mit einem E-Wert von $8 \cdot e^{-76}$, identifiziert. Mit einer Identität von 100 % über 147 Basen bei dem Vergleich mit der Sequenz von *Nicotiana tabacum*. Die anderen Banden ließen sich zum Teil schlecht klonieren und waren auch nicht eindeutig zu identifizieren.

Die PCR wurde auch mit den verschiedenen Genbibliotheken durchgeführt. Wie aus Abb. 25 ersichtlich, ergab sich ein sehr gleichmäßiges Muster über den Annealingtemperatur Gradienten von 40-55 °C.

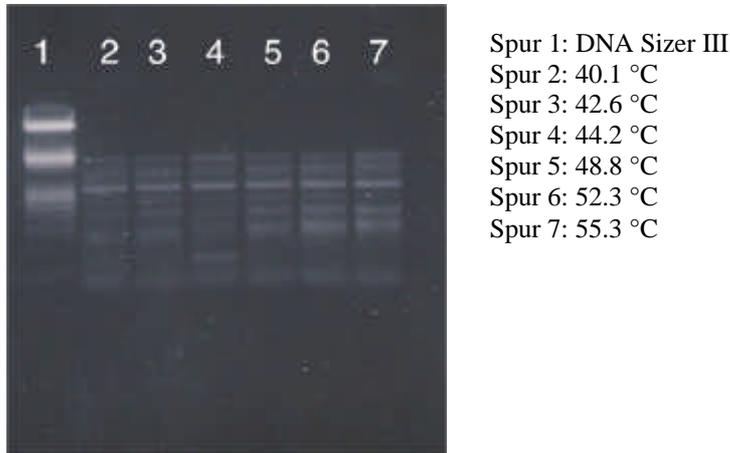


Abb. 25: Genbibliotheks PCR mit SAMradical Primer über einen Temperaturgradienten

Beim Sequenzieren wurde der Verdacht bestätigt, dass der SAMradical Primer an den Vektor pSport 1, in den die cDNA-Bibliotheken einkloniert sind, bindet. Somit kann zum Screening nach einem SAMradical Bindemotiv nicht auf eine cDNA-Bibliothek zurückgegriffen werden.

6.5.2 Colony Blots/ Hybridisierung

Eine Alternative zum Screening mittels PCR bietet die Hybridisierung. Dabei werden die zu durchsuchenden Bakterienklone auf Agarplatten ausplattiert, um anschließend auf eine Nitrocellulosemembran geblottet zu werden. Nach Aufschluss der Zellen und Fixierung der DNA auf den Membranen werden diese mit einer Sonde inkubiert. In dieser Arbeit wurden fluoreszenzmarkierte Primer gewählt. Zuerst ein SAMradical Primer mit Fluorescein am 5' und anschließend ein doppelt markierter Primer, der am 3'- und 5'-Ende mit Cy5 markiert war. Als Positivkontrolle wurde die Liponsäuresynthase verwendet. Fluorescein hat sich als schlecht handhabbar erwiesen, da es bei einer Wellenlänge von 473 nm ausgelesen wird und bei dieser Wellenlänge die Zelldebris an sich ein positives Signal vortäuscht. Als nach etlichen Tests mit verschiedenen Membranen, variierenden Bedingungen und unterschiedlichen Arten der Debrisentfernung (rubbeln oder Proteinase K Verdau) der fluorescein markierte Primer zu keinem positiven Ergebnis führte, wurde ein doppelt markierter Primer mit Cy5 gewählt. Dieser bot den Vorteil, dass dieser Farbstoff an sich intensiver ist und sich dieser Effekt durch die Doppelmarkierung noch verstärkt. Zusätzlich

wird er bei 633 nm ausgelesen. Jedoch muss auch hier die Zelldebris zur besseren Detektion entfernt werden.

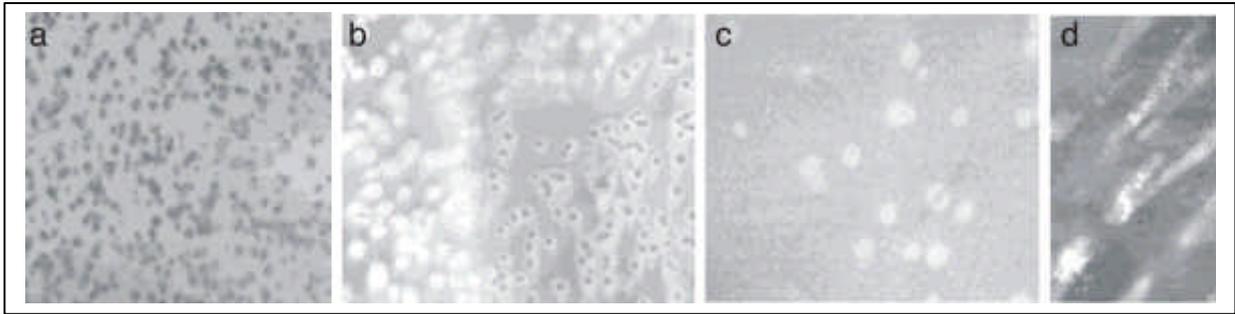


Abb. 26 a-d: Verschiedene Membrane: a) fixierte Klone mit Zelldebris ohne Hybridisierung b) fixierte Klone mit nicht vollständig abgerubbelter Debris c) Membran mit Proteinase K abverdauter Debris nach der Hybridisierung d) vgl. c)

In Abbildung 26 sind verschiedenen Membrane dargestellt. Aus 26 a wird ersichtlich, wie die Membran ohne Verdau der Debris detektiert wird. Bei 633 nm ist der Hintergrund besser retouchierbar, jedoch ist auch hier das komplette Entfernen der Debris von Vorteil. Von Pall, dem Hersteller der Hybridisierungsmembran, wird im mitgelieferten Manual empfohlen, die Debris entweder durch Abrubbeln mit einem behandschuhtem Finger oder durch Proteinase K Verdau zu entfernen. Das Abrubbeln stellt zwar die weniger zeitintensive Variante dar, jedoch wie in Abbildung 26 b ersichtlich, ist es unsicher sich auf die vollständige Entfernung zu verlassen, da die verbleibenden Debrisreste positive Signale vortäuschen können. In 26 c ist eine Proteinase K verdaute Membran dargestellt. Diese Methode ist zuverlässiger, jedoch scheint die Prozedur überall dort, wo sich ursprünglich ein Klon befand, einen hydrophoben Hintergrund zu hinterlassen.

Insgesamt sind von der Firma Pall fünf verschiedene Membrane getestet worden:

Biodyne B (0.45 μm), Biodyne A (0.45 μm), Biodyne A (0.2 μm), Biodyne Plus (0.45 μm) und die Biotrace NT (0.45 μm).

Zu Beginn wurden die empfohlenen Bedingungen gewählt. Die Prähybridisierung wurde in einem 0.5 M Natriumphosphatpuffer mit 1 % BSA und 1 mM EDTA bei 65 °C für mindestens 1 h durchgeführt. Anschließend wurde die Prähybridisierungslösung gegen die Hybridisierungslösung ausgetauscht. Diese enthielt die Sonde in einer Konzentration von 10 pg/ml, wobei diese zuvor 5 min gekocht wurde, um sicherzustellen, dass sie einzelsträngig vorlag. Die Hybridisierung wurde bei unterschiedlichen Temperaturen und mit unterschiedlichen Inkubationszeiten getestet, wobei zumeist eine Temperatur von 35-40 °C und eine Inkubation über Nacht zugrunde gelegt wurde. Ein anschließender Waschschritt ist wegen des Fluoreszenzlabels nicht nötig. Es ist möglich die Membran sofort nach dem

Trocknen am Fluoreszenzimager auszulesen.

Der mit Fluorescein markierte Primer hat eine Schmelztemperatur von 48.2 °C. Die beste Hybridisierungstemperatur wurde am Gradientencycler mit Hilfe der Liponsäuresynthase getestet wurde. Das Ergebnis ist der Abbildung 27 zu entnehmen.

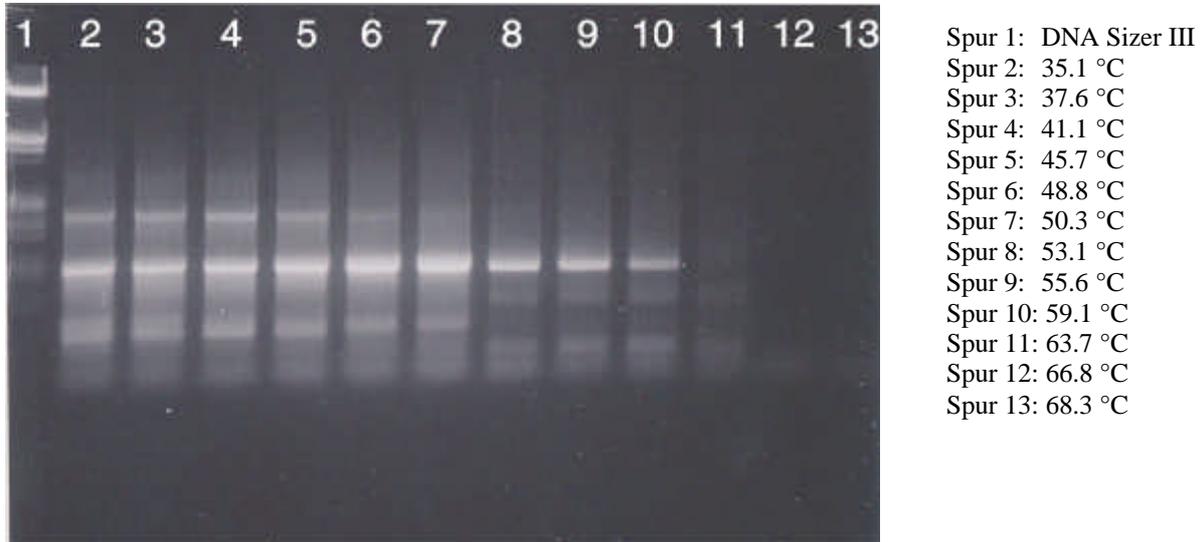


Abb. 27: PCR-Test für die geeignete Annealingtemperatur

Dabei ist erkennbar, dass die Sonde (markierter Primer) auf jeden Fall bei einer Hybridisierungstemperatur von 35 bis 40 °C binden muss. Ein Test mit dem Cy5 markiertem Primer war nicht möglich, da dieser auch am 3'-Ende markiert ist und somit eine PCR nicht durchführbar ist. Jedoch sollte die Annealingtemperatur im selben Bereich liegen.

Als die Hybridisierungsversuche mit variierenden Temperaturen und Zeiten keinen Erfolg brachte, wurde der Vorhybridisierungs- und Hybridisierungspuffer verändert. Da die PCR erfolgreich war, d.h. der Primer gebunden hat, wurde der PCR-Puffer auch als Hybridisierungspuffer verwendet. Zur Vorhybridisierung wurde 1 % BSA zugesetzt. Es wurden ebenfalls Zeit- und Temperaturvarianten getestet, jedoch ohne Erfolg. Bei der Bodyne B Membran schien es bei einem Test positive Signale mit Liponsäuresynthase zu geben. Doch eine Negativ-Kontrolle mit einem cDNA-Bibliotheksverdünnungsausstrich zeigte, wie in Abb. 26 d (vgl. S 100) abgebildet, dass es sich um zufällige Signale handelte. Die Signale sind gleichmäßig auf der Membran verteilt. Dort, wo sich Bakterien-DNA befand, ersichtlich durch die hellen Striche, die vom Platindrahtausstrich her rührten, waren keine Signale zu erkennen.

Zuletzt wurde die Hybridisierung direkt mit Plasmid-DNA getestet. Dazu wurden verschiedene Mengen DNA (ca. 80 ng bis 4 ng) direkt auf die Membran getüpfelt, fixiert und hybridisiert. Doch auch diese direkte Testhybridisierung führte zu keinen Signalen. Um zu

vermeiden, dass die Sonde wegen des DNA-Doppelstranges nicht binden kann wurde z.T. die komplette Membran gekocht und anschließend sofort hybridisiert. Auch wurde die Plasmid-DNA für verschiedene Tests vor der Auftragung auf die Membran gekocht.

6.6 Möglichkeiten zur Steigerung und Unterdrückung des Hyoscyamingehaltes in den Wurzelzellen

Alkaloide stehen schon lange Zeit, da es sich um biologisch aktive Wirkstoffe handelt, im Mittelpunkt von Untersuchungen. Bei weniger als 3 % der ca. 220 000 Blütenpflanzen unserer Erde kennt man den Gehalt an Alkaloiden, der bedeutendsten Gruppe pflanzlicher Wirksubstanzen. Etwa ein Viertel der heute vermarkteten Medikamente basiert auf Wirkstoffen pflanzlichen Ursprungs. Dazu zählen natürlich auch die Tropanalkaloide. Zusätzlich spielen die Alkaloide in den Pflanzen selbst eine bedeutende ökologische Rolle. Sie sind Abwehrstoffe gegen Pathogene und Herbivore.

Es wurde festgestellt, dass Hairy Root Kulturen bessere Alternativen für die Tropanalkaloid-Produktion darstellen als Zellsuspensionskulturen. Das liegt daran, dass Erstere über einen längeren Subkulturzeitraum genetisch stabiler und syntheseproduktiver sind. Aus diesem Grund wurden zahlreiche wissenschaftliche Artikel veröffentlicht die sich mit der Steigerung der Alkaloidbiosynthese in Hairy Roots beschäftigen.

Dadurch, dass die Alkaloide als Pflanzenabwehr fungieren, wird vielfach Methyljasmonat als Induktor verwendet. Jasmonsäure und ihr flüchtiger Ester Methyljasmonat, die üblicherweise unter dem Namen Jasmonate zusammengefasst werden, sind Pflanzenstresshormone, die als Regulatoren der Abwehrantwort fungieren. Die Induktion der sekundären Pflanzenstoffe ist eine bedeutende Stressantwort die von Jasmonaten als Regulatoren abhängen.

Verschiedene Gruppen arbeiten auf diesem Gebiet der Induktion. Von der Gruppe Loyola-Vargas wird eine 100%ige Steigerung des Hyoscyamingehaltes in *Datura stramonium* Hairy Roots bei exogener Gabe von Methyljasmonat berichtet [Sáenz-Carbonell *et al.*, 1996]. Ebenso variierten sie den Sucrosegehalt des Mediums von 3 % auf 6 %, welcher einen positiven Effekt von 32 % Hyoscyamingehaltssteigerung ergab. Jedoch gleichzeitig mit einer Wachstumseinschränkung der Wurzeln von 26 % einherging. Eine Steigerung der Alkaloidkonzentration wurde unter anderem auch von Essigsäure berichtet [Ballica *et al.*, 1993].

6.7 Auswirkungen der Induktion/Inhibition

Schon zu Beginn dieser Arbeit wurde bei der Bestimmung der Wachstumskurven Methyljasmonat (MeJa) verwendet, um sich einen gesteigerten Hyoscyamingehalt zu nutzen zu machen. Allerdings stellte sich genau der entgegengesetzte Effekt ein, es kam zu einer Verringerung des Hyoscyamingehaltes (vgl. Kap. 6.2). Dieser ist auf die Konzentrationsabhängigkeit der Induktion zurückzuführen. Bei hohen Konzentrationen wirkt Methyljasmonat inhibierend. Bei einer Konzentration von $0.1 \mu\text{M}$ ist nach Sáenz-Carbonell [Sáenz-Carbonell *et al.*, 1996] eine maximale Induktion zu beobachten. Dies führte in dieser Arbeit zu dem Problem, dass Methyljasmonat von der Firma Duchefa bezogen wurde. Seitens dieser Firma wurde mit einer Konzentrationsangabe von 0.01-5 mg/ml eine sehr vage Angabe gemacht. Hierdurch war die Dosis, die zu Beginn der Arbeit verwendet wurde zu hoch, was zu einem inhibitorischen Effekt führte.

Aus diesem Grund wurden zu Beginn der proteinchemischen Arbeiten Messreihen durchgeführt, um die Auswirkung verschiedener Konzentrationen MeJa, Essigsäure und einem selbsthergestellten Zusatz auf den Hyoscyamingehalt in den Wurzeln zu untersuchen. Dieser selbsthergestellte Zusatz beinhaltete eine zerkleinerte, autoklavierte Wurzelkultur die von einer rötlichen Hefespezies befallen war. Der Versuch galt einem eventuell vorhandenen Inhaltsstoff dieser Hefen der in den Wurzeln eine Stimulation der Abwehrreaktion und damit die Alkaloidproduktion anregen würden.

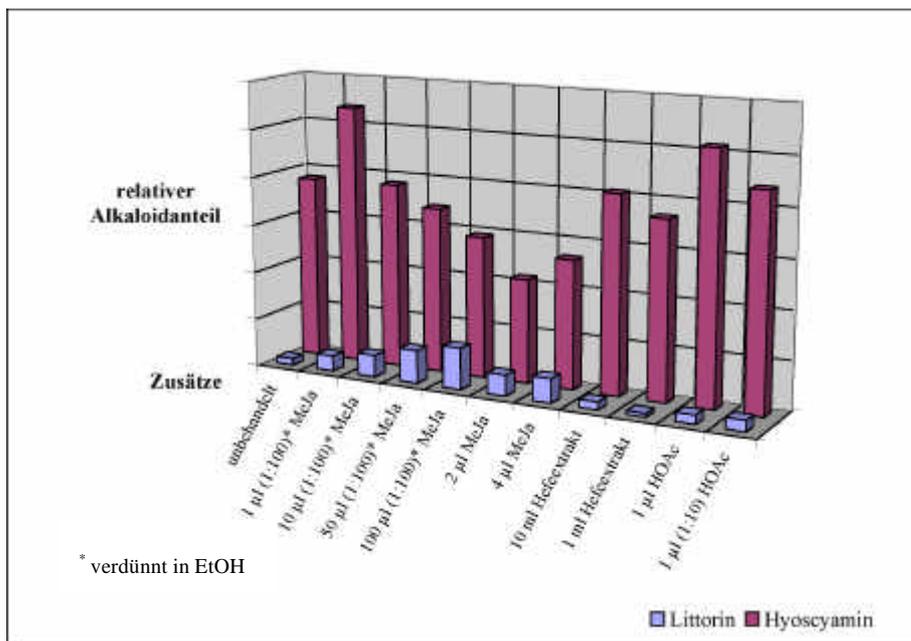


Abb. 28: Auswirkung verschiedener Zusätze auf den Alkaloidinhalt von Wurzelkulturen

In Abbildung 28 (S. 103) ist das Ergebnis der durchgeführten Messreihen ersichtlich. Pro Messpunkt wurden wiederum 3 Kulturen verwendet. Die Induktion erfolgte 4 Tage vor der Ernte, d.h. am Tag 11.

6.7.1 Proteinebene

Mit dem Ziel der Littorinmutase auf die Spur zu kommen, wurde der Versuch unternommen, sich der verschiedenen Hyoscyamingehalte bei der Induktion zu Nutze zu machen. Denn, ergibt sich durch Elicitoren ein gesteigerter Alkaloidgehalt der Wurzeln, so muss dieser auch auf irgendeine Weise produziert werden. Somit sollte unter anderem bei induzierenden Bedingungen auch die Littorinmutase aktiviert werden.

6.7.1.1 2D-Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese ist eine moderne Methode mit dem höchsten Auflösungsvermögen für die Analyse komplexer Proteingemische. Mit dieser Methode ist es möglich Unterschiede der Proteinausstattung sichtbar zu machen.

Für die Analyse wurden, um möglichst große Unterschiede zu erkennen, folgende induzierende Bedingungen ausgewählt:

- 1 µl MeJa (1:100 in EtOH)
- 4 µl MeJa
- 1 µl HOAc
- uninduziert

Um eine vernünftige Aussage über eventuelle Unterschiede zu ermöglichen, sollten pro Zustand mindestens 3 verschiedene Kulturen verwendet werden. Ansonsten könnten die Unterschiede auch zufälliger Art sein. Zudem ist es nicht möglich eine Induktion oder Inhibition von ein paar Prozent zu erkennen. Am zuverlässigsten sind die Aussagen über einen vorhandenen oder nicht vorhandenen Proteinspot, wobei dies auch wieder von mindestens 2 Gelen bestätigt werden sollte. Aussagen im Prozentbereich über Induktion und Inhibition werden zwar über verschiedene Software Programme ermöglicht, jedoch sind diese Ergebnisse bei einer Silberfärbung immer als potentiell fehlerhaft einzustufen. Ein Unterschied kann schon bei geringfügig veränderter Entwicklungszeit entstehen, welche unter Umständen gerätetechnisch bedingt sind. Dieses Problem könnte z.B. durch eine Fluoreszenzfärbung mit Sypro[®] Ruby umgangen werden. Dieser Farbstoff verspricht die

Empfindlichkeit einer Silberfärbung und zusätzlich einen größeren linearen Bereich, d.h. die Gele sind zuverlässiger zu quantifizieren. Die Färbung mit Sypro[®] Ruby, wurde auch im Rahmen dieser Arbeit getestet, das Ergebnis ist im Anhang I (Seite 150) abgebildet. Es ist dabei zu erkennen, dass die Empfindlichkeit bei diesen Pflanzenproben eher einer Colloidal-Coomassie Färbung gleicht. Da der Farbstoff recht teuer ist, wurde aus Kostengründen in dieser Arbeit auf die konventionelle Silberfärbung zurückgegriffen.

Um eine genaue Quantifizierung zu ermöglichen sollte auch eine exakte Proteinbestimmung möglich sein. Damit wäre sichergestellt, dass exakt die gleichen Mengen auf das Gel aufgetragen werden. Die Schwierigkeiten dabei sind dem Methodenteil zu entnehmen. Auch Herr J. Voshol (Novartis), Sprecher auf der 9. Arbeitstagung für Mikromethoden in der Proteinchemie 2002 in München, bemerkte, dass es im Moment keine vernünftige Proteinbestimmung für die 2D-Gelelektrophorese gibt. Und selbst bei sicherer Proteinbestimmung ist es nicht möglich wirklich zu garantieren, dass bei der 1. Dimension in der Rehydratationsphase exakt die gleiche Proteinmenge in das Gel absorbiert wird.

Deshalb wurden in dieser Arbeit nur wirklich die Unterschiede betrachtet bei denen eine eindeutige Aussage möglich war. Es wurden von jedem Zustand drei verwertbare Gele hergestellt, d.h. insgesamt 12 Gele die miteinander verglichen wurden. Sämtliche auswertbaren Gele sind im Anhang I (Seiten 143-153) abgedruckt.

Im Folgenden (Abb. 29/30, auf den folgenden Seiten) sind die Vergleiche der Gele dargestellt, wobei der Bereich in dem die Unterschiede existieren hervorgehoben ist.

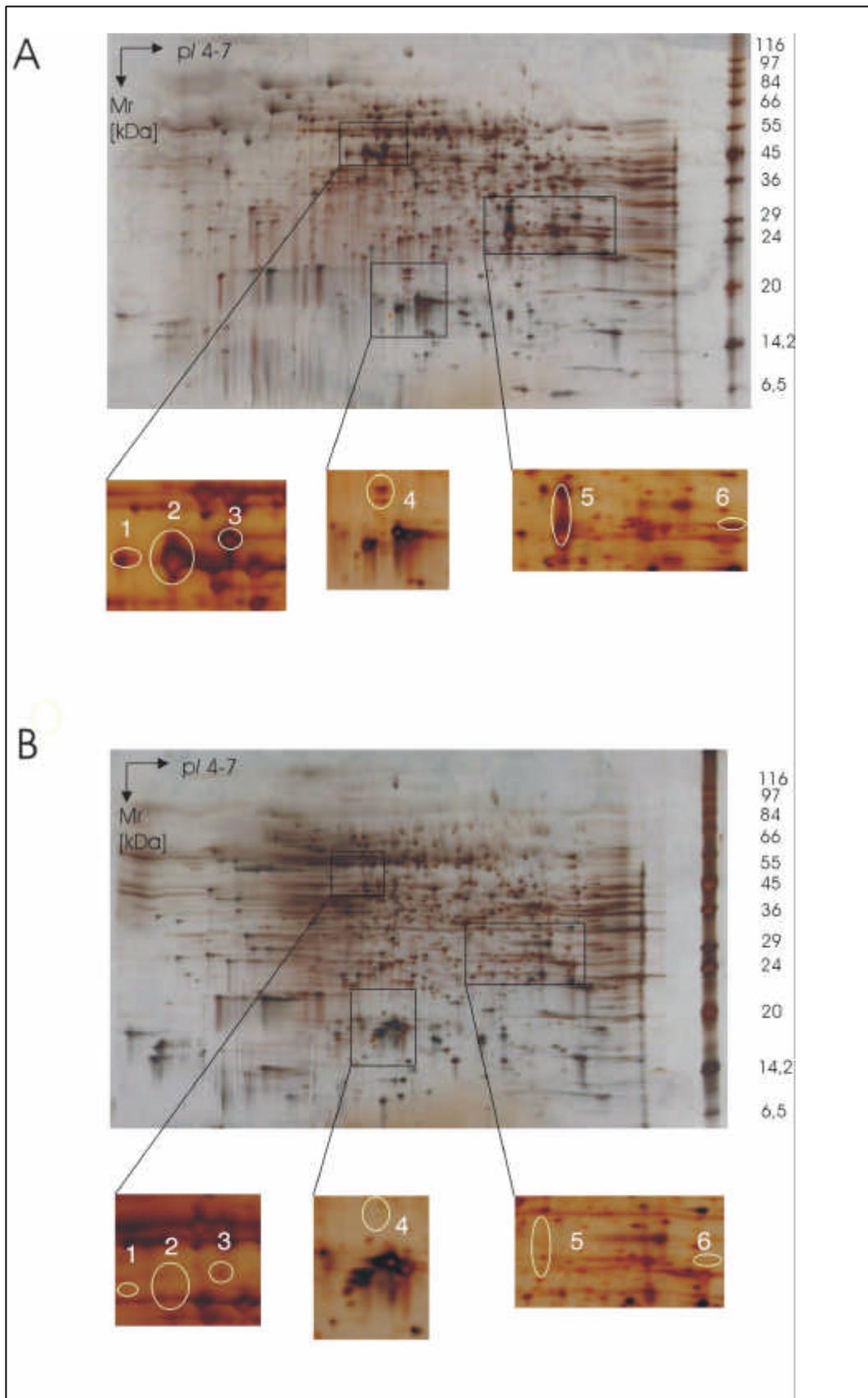


Abb. 29: Unterschiede bei der 2D-Gelelektrophorese

A: 4 µl MeJa; B: uninduzierter Zustand

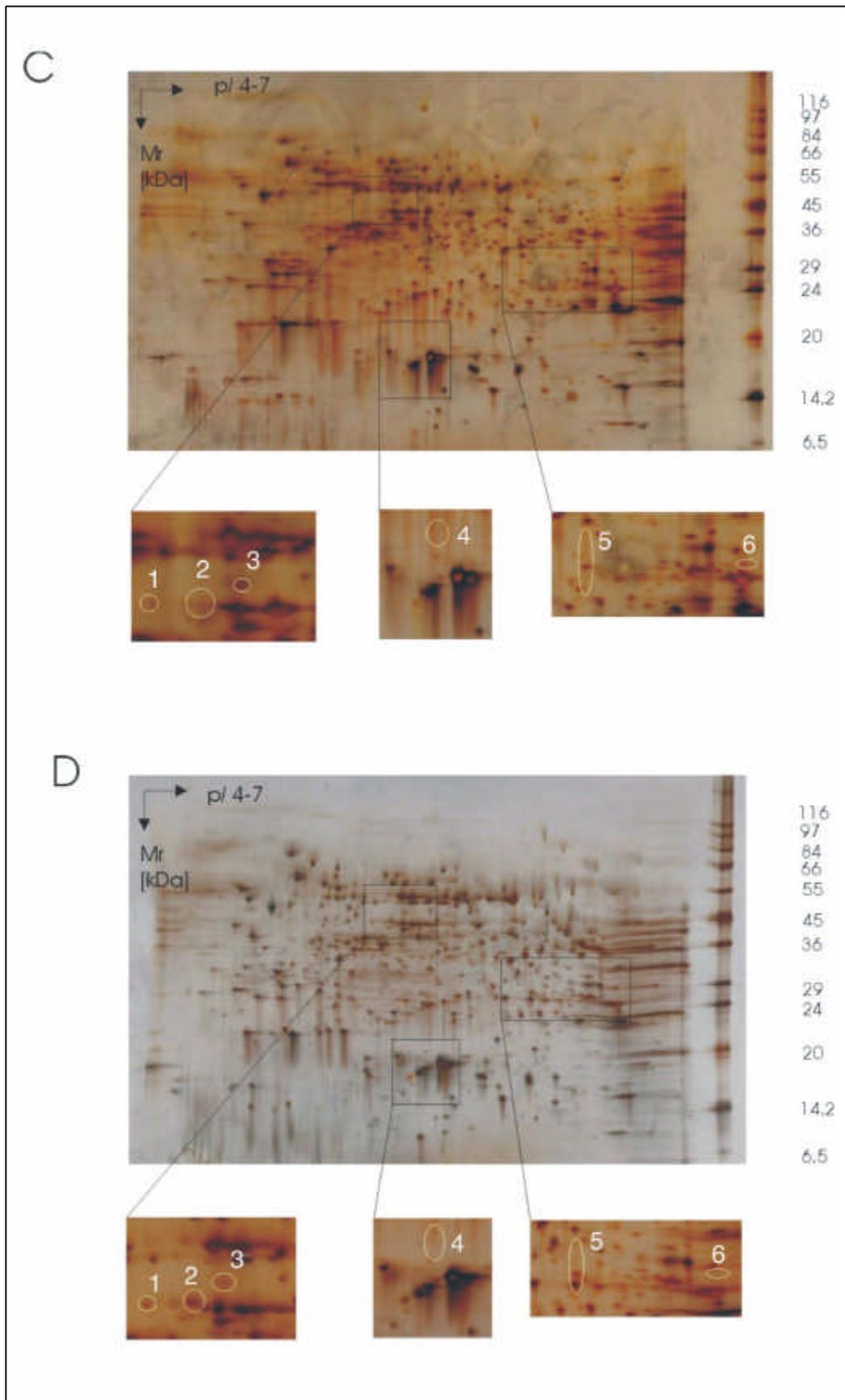


Abb. 30: Unterschiede bei der 2D-Gelelektrophorese

C: 1 μ l HOAc; D: 1 μ l MeJa (1:100)

Wie aus den Abbildungen 29/30 (vorhergehende Seiten) ersichtlich, sind wesentliche Unterschiede nur im quasi inhibierten Zustand (Abb. 29 A, S. 106) mit 4 µl MeJa ersichtlich. Mit diesen hohen Methyljasmonatkonzentrationen wird der Alkaloidgehalt, wie schon in Abb. 28 (S. 103) gezeigt, in den Wurzelzellen heruntergeregelt. Die Alkaloidgehalte der Kulturen die für die 2D-Elektrophorese verwendet wurden sind in Tabelle 18 aufgelistet. Für die Analyse wurden die Kulturen die demselben Zustand entsprachen vereinigt und analysiert.

	Integralfläche bzgl. Trockengewicht	prozentualer Vergleich bzgl. Grundzustand
Grundzustand	74 926 575	100%
4 µl MeJa	43 972 154	59%
1 µl MeJa (1:100)	121 963 136	163%
1 µl HOAc	94 271 542	126%

Tabelle 18: Alkaloidgehalt (GCMS Integral) der 2D-Proben

Auch aus den Werten der Tabelle 18 wird deutlich, dass es doch einen gewaltigen Unterschied im Hyoscyamingehalt gab. Bei Betrachtung der beiden MeJa-Zustände ergibt sich eine Differenz von 104 Prozent.

Im inhibierten Zustand sind sechs bedeutende Proteinspots (Abb. 29 A Nr. 1-6, S. 106) sichtbar die in den anderen drei Zuständen nicht vorhanden sind. Dabei besteht der mit der Nr. 4 bezeichnete Spot aus 3 kleineren Einzelspots und der mit Nr. 5 bezeichnete aus zwei größeren. Diese beiden befinden sich am Anfang und Ende des markierenden Ovals (vgl. Abbl 29 A), wobei diese zwei Spots durch einen "Schmier" verbunden sind. Dieser lässt eine Beurteilung, ob ein weiteres, induziertes Protein verdeckt darunter liegt, nicht zu. In Anhang I (S. 145, 146) sind die anderen für diesen Zustand hergestellten Gele abgebildet, wobei auch bei diesen dasselbe Phänomen zu sehen ist. Wie schon in der Einleitung beschrieben sind mit Sicherheit noch mehr Unterschiede ersichtlich, jedoch liegen diese in einem Größenrahmen, in dem die eindeutige Beurteilung schwierig wird. Auffällig ist, dass die anderen drei Zustände (Grundzustand, induzierter Zustand mit HOAc und MeJa) sich nicht voneinander unterscheiden, obwohl der Unterschied im Alkaloidgehalt eindeutig ist (vgl. Tab. 18, oben).

6.7.1.2 Maldi aus der 2D-Gelelektrophorese

Um einen Massenfingerprint von einzelnen Proteinspots und damit eine Proteinidentifikation durchführen zu können, muss eine ausreichende Proteinmenge zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund wurden je 3 Gele mit 4µl MeJa und 1 µl MeJa (1:100) hergestellt und mit

Colloidal-Coomassie angefärbt. Diese Gele sind ebenfalls im Anhang I auf den Seiten 143 bis 153 zu finden. Es wurde in diesem Fall Colloidal-Coomassie anstatt eine Coomassie Färbung gewählt, da erstere empfindlicher ist. Der maximale Auftrag der Proben war nicht ausreichend, um eine Coomassie Färbung durchzuführen. Die colloidal gefärbten Gele konnten sehr gut mit den ursprünglichen Silbergelten abgeglichen werden. Es war somit möglich die Spots die näher betrachtet werden sollten auszuschneiden. Insgesamt wurden 20 Spots analysiert. Darunter die gefundenen Unterschiede bis auf zwei Spots (Abb. 29 A Nr. 4 und 6, S. 106) deren Konzentration für die Coomassiefärbung zu gering war. Die restlichen Spots stellen so genannte Landmarks dar. Das heißt es handelt sich um Proteine, die in diesem Organismus im Untersuchten Zustand eine hohe Expressionsrate besitzen. Diese intensiven Spots werden verwendet um verschiedene Gele übereinander zu legen. Eine Darstellung der ausgewählten Spots (Abb. 31) und des Massenfingerprints (Tab. 19, folgende Seite) sind im Folgenden dargestellt.

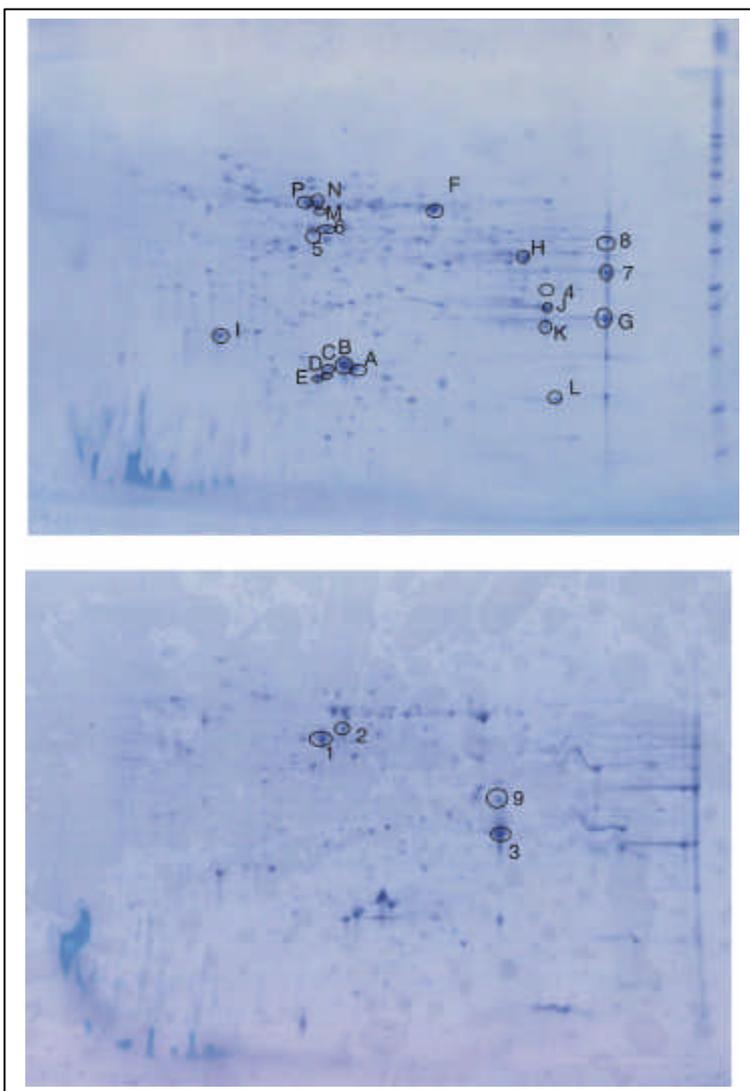


Abb. 31: Ausgewählte Spots für die MalDI-Analyse

VI Eigene Arbeiten

	Hauptpeaks	best score	Protein	Organismus
1	792.95, 793.83, 1215.51, 1368.22, 1373.72, 1408.19, 1490.04, 1634.25, 1643.23, 1734.04, 1913.48, 2278.32	92	conserved hypothetical protein aq_1006	aquifex aeolicus
2	793.02, 1244.98, 1408.55, 1490.46, 1567.51, 1634.75, 1682.42, 1691.11, 1734.47, 1775.59, 1914.00, 2000.98, 2066.24, 2126.39, 2144.94, 2295.05, 2488.36	89	hypothetical protein aq_1795	aquifex aeolicus
3	792.88, 810.28, 1162.700, 1227.13, 1305.05, 1320.68, 1409.15, 1420.91, 1581.81, 1748.57, 2000.84, 2149.21, 2410.77, 2410.77, 2470.96, 2500.31	64	HIV	human
5	793.13, 794.03, 814.33, 1215.78, 1408.59, 1567.52, 1634.84, 1762.16, 1770.98, 1914.07, 2000.81, 2066.23, 2125.99, 2145.22, 2211.19, 2279.02, 2294.96, 2310.94, 2569.12	69	YNR5_yeast hypothetical protein	yeast
6	793.13, 794.02, 814.32, 1215.78, 1408.59, 1567.52, 1634.84, 1762.16, 1770.98, 1914.07, 2000.81, 2066.23, 2125.99, 2145.22, 2211.19, 2279.01, 2294.96, 2310.94, 2569.13	69	g45121345	bacillus holodurans
7	1285.98, 1359.89, 1400.03, 1503.24, 1536.61, 1627.10, 1717.73, 1737.05, 1755.77, 1769.81, 1990.10, 2011.80, 2164.03, 2241.60, 2432.31	60	g3170239	african malaria mosquito
8	1248.27, 1282.38, 1289.46, 1567.15, 1913.27, 1970.64, 2228.45, 2257.62	52	Ribonuclease T	haemophilus influenza
9	793.00, 810.39, 1119.93, 1162.67, 1215.58, 1226.75, 1244.76, 1257.38, 1408.65, 1425.26, 1567.02, 1634.18, 1716.53, 1761.81, 1774.87, 1913.35, 2065.70, 2125.68, 2139.50, 2144.46, 2152.88, 2198.60, 2210.68, 2294.28, 2309.61, 2409.00, 2499.82	82	YNR_5 yeast hypothetical Protein	yeast
A	793.10, 811.12, 874.86, 899.20, 1061.39, 1120.52, 1174.36, 1245.94, 1324.70, 1408.25, 1426.11, 1716.61, 2294.70	71	g4467888	lacotococcus lactis
B	792.99, 981.68, 1120.45, 1173.85, 1215.66, 1245.06, 1257.23, 1293.46, 1368.45, 1408.30, 1425.83, 1567.20, 1634.34, 1643.34, 1716.40, 1761.90, 1781.76, 1913.62, 2000.59, 2125.56, 2294.56	59	SRKinesin	syncephalastrum racemosum
C	867.23, 900.19, 925.38, 1215.98, 1245.23, 1408.21, 1424.93, 1567.47, 1634.71, 1719.45, 1913.59, 2004.12, 2147.24, 2063.62, 2125.81, 2139.99, 2211.29, 2294.53	49	HIV virus typ I	human
D	907.97, 924.41, 925.32, 1044.77, 1228.07, 1408.00, 1423.63, 1436.72, 2026.67, 2047.54, 2063.58, 2079.32, 2126.93, 2295.58	54	g2388616	plasmodium yoelli
E	994.65, 1120.00, 1196.00, 1215.83, 1257.41, 1363.35, 1408.63, 1436.64, 1456.76, 1567.18, 1913.24, 1225.70	57	g2760002	chayote mosaic virus
F	792.94, 1043.92, 1567.03, 1728.76, 1751.32, 1802.84, 1818.08, 1844.11, 1913.46, 1924.46, 2165.75, 2236.23, 2293.52	53	g3282389	thiobacillus denitrificans
G	1076.05, 1095.86, 1841.82, 2041.24, 2058.05, 2096.69, 2549.94	46	hypothetical protein HI1410	haemophilus influenza
H	1867.55, 1913.05, 1934.85, 2217.25, 2277.55, 2388.27, 2496.48, 2512.34	46	biliverdin reductase EC 1.3.1.24	cyanobacterium synechocystis
J	999.02, 999.91, 1309.67, 1328.42, 1531.65, 1548.33, 1567.04, 1643.08, 1912.93, 2001.18, 2016.73, 2066.07, 2126.39	64	hypothetical protein 6.8 kD	cuscuta reflexa
M	899.16, 909.02, 909.94, 925.59, 926.42, 1244.82, 1407.92, 1566.59, 1715.29, 1762.65, 1778.44, 1793.82, 1814.83, 1886.12, 1913.37, 1971.16, 2000.56, 2125.68, 2294.31	49	g398805	rhesus monkey
N	1113.59, 1114.56, 1324.94, 1343.88, 1424.82, 1435.36, 1573.62, 1589.65, 1605.75, 1650.06, 1665.84, 1787.26, 1913.20, 1962.25, 1978.91, 2100.90, 2166.59, 2484.08	62	conserved hypothetical protein AF 0318	achaeoglobus fulgidus
P	1076.76, 1113.57, 1325.11, 1334.15, 1424.78, 1573.60, 1589.93, 1650.05, 1787.22, 1913.32, 1962.35, 1979.03, 2101.04, 2166.64, 2484.67	60	g1483633	fuga rubripez rubripes

Tabelle 19: Massenfingerprint der analysierten Spots aus den 2D-Polyacrylamidgelen

Die einzelnen Fragmentmassen der analysierten Gelstücke nach dem In-Gel Verdau sind in Tabelle 19 (S. 110) aufgelistet. Es wurden nur die Hauptpeaks aufgelistet. Anschließend wurde eine Mascot-Datenbanksuche zur möglichen Identifizierung durchgeführt. Zumeist wurde die OWL- oder Swissprot-Proteindatenbank über alle Organismen durchsucht. Die maximale Anzahl der fehlenden Spaltungsstellen wurde auf zwei beschränkt. Auch in obiger Tabelle aufgelistet ist der Best Score, wobei beachtet werden muss, dass dieser wieder ein Maß für die Zuverlässigkeit eines Hits ist. Der Score ist $-10 \cdot \log(P)$, wobei P die Wahrscheinlichkeit eines zufälligen Treffers ist. In der Mascot-Auswertemaske wird ein Wert größer 67 als signifikanter Treffer bezeichnet. Doch auch dann ist Vorsicht geboten, es sollten die Sequenzen die angegeben werden genau überprüft und eingeschätzt werden. In obiger Tabelle kann davon ausgegangen werden, dass selbst die Werte über 70 keine wirklichen Hits darstellen.

Eine N-terminale Sequenzierung nach der Edman-Methode wurde bei keinem Spot durchgeführt. Es konnte keiner gefunden werden der eventuell mit der Littorinmutase in Verbindung steht. Die induzierten Proteine wurden im inhibierten Zustand gefunden, somit ist es höchst unwahrscheinlich bei diesen Spots das gesuchte Enzym zu finden. Eine kostenintensive Ansequenzierung anderer Spots hätte einer extrem teuren Suche der „Nadel im Heuhaufen“ geglichen.

6.7.1.3 Blau-Native-Gelelektrophorese

Eine weitere Möglichkeit, eventuelle Unterschiede bei der Expression sichtbar zu machen, bietet eine andere Elektrophorese-Art, die Blau-Nativen-Gelelektrophorese. Bei dieser handelt es sich um eine Methode, mit der es möglich ist Membrankomplexe aufzutrennen und zu analysieren. Die Membrankomplexe werden ursprünglich nach der Methode von Schägger [Schägger *et al.*, 1991] mit Dodecylmaltosid und ACA aus den Membranen herausgelöst. Anschließend werden sie, mit Coomassie G als Ladungsträger, nativ aufgetrennt. Bei der zweiten Dimension werden die einzelnen, durch die erste Dimension aufgetrennten, Membrankomplexe durch eine Tricin-SDS-Page in ihre einzelnen Polypeptide getrennt. Somit ist es möglich, einzelne Polypeptide auf ihre Zugehörigkeit zu einem speziellen Komplex hin zu überprüfen.

Die Idee bei der Durchführung der BN-2D-Gelelektrophorese im Rahmen dieser Arbeit beruht darauf, dass bei dem Aktivitätstest einmal eine positive Reaktion in der Membranfraktion gefunden wurde (Kap. 6.4). Unter Umständen ließe sich ein Unterschied bei den verschiedenen induzierten Stadien feststellen, falls Membran und Cytosol getrennt

betrachtet werden. Die Induktion wurde über den Verlauf von 4 Tagen verfolgt, denn es ist auch die Möglichkeit gegeben, dass 4 Tage nach Induktion die Proteine schon wieder abgebaut sind, obwohl dann erst das Enzymprodukt sichtbar wird. Es wurden jedoch nur der Grundzustand und die beiden mit Methyljasmonat induzierten und inhibierten Stadien untersucht, da dort der Unterschied des Alkaloidgehaltes am Größten ist.

Pro Zustand wurden wieder mehrere Gele angefertigt. Bei der Probenvorbereitung und auch bei den Gelen mussten einige Änderungen gegenüber der Originalvorschrift vorgenommen werden. Nach Schägger *et al.* wird pro Spur 1 mg Protein benötigt, das entspricht in etwa 10 mg Membrangewicht. Für die *Datura stramonium* Proben waren 30 mg erforderlich. Das heißt, es wurden 10 mg Membran in 75 µl ACA 750 resuspendiert. Mit 30 µl 10 % Brij 35[®] wurden die Membrane während einer 30 min Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit herausgelöst. Drei solcher Präparationen wurden in einem 0.5 ml Zentricon (Biomax, 5 kD, Millipore) auf ca. 100 µl aufkonzentriert und anschließend mit 5 µl 5 % Serva Blue G (1:4 verdünnt) vermischt.

Bei den Cytosol Fraktionen wurden 2.3 mg pro Spur aufgetragen. Idealerweise sind diese in ca. 100 µl Volumen enthalten. Diese werden mit 5 µl 5 % Serva Blue G (1:4 verdünnt) vermischt.

Für die erste Dimension wurde ein 7%iges, natives Trenngel mit 5%igen Sammelgel verwendet. Für die 2. Dimension wurde ein 12%iges SDS-Gel mit einem 8%igen Sammelgel verwendet. In dieses wurde die 1. Dimension einpolymerisiert. Die Gele werden anschließend mit Colloidaler-Coomassie angefärbt. Eine Auswahl an Gelen ist im Anhang 2 (Seiten 152-171) abgebildet.

In den Abbildungen 32 und 33 auf den folgenden Seiten sind die Unterschiede bei den cytosolischen Proteinen dargestellt.

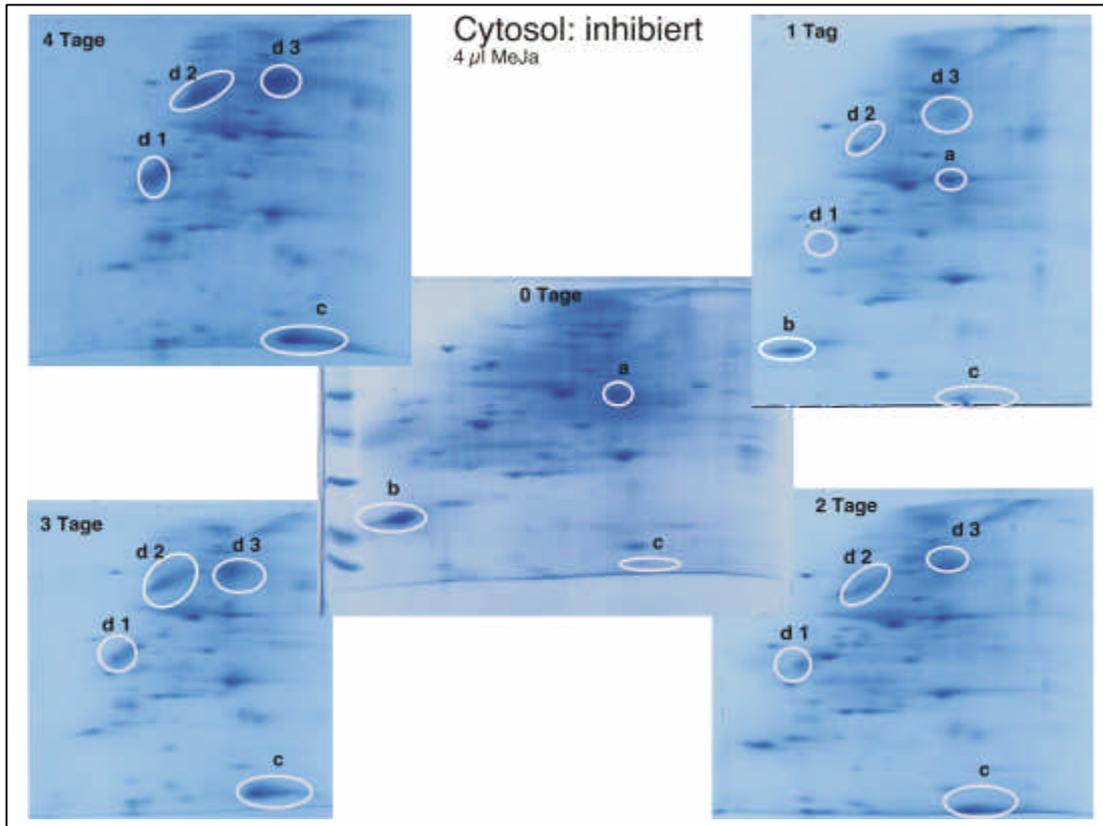


Abb. 32: Cytosolische Fraktion mit 4 µl MeJa

In Abb. 32 sind die quasi inhibierten Zustände, d.h. niedrige Hyoscyaminkonzentrationen, dargestellt. Sehr schön ist die vorhandene Dynamik zu erkennen. Im Laufe der 4 Tage entwickelt und intensiviert sich zum Beispiel der mit c markierte Spot, der im Grundzustand noch nicht ersichtlich ist. Das Protein, welches mit a markiert ist, verschwindet an Tag 1 und ein ähnlicher Spot entsteht etwas höher gelegen. Die Dreiergruppe die mit d (d 1 bis d 3) gekennzeichnet ist, reichert sich über die 4 Tage immer stärker an. Zu Anfang sieht diese Gruppe wie ein "Schmier" aus, der sich jedoch durch alle Gele hindurch bestätigt und auch an Intensität wie schon erwähnt zunimmt. So scheint sich dahinter doch ein Protein und keine Verunreinigung zu verbergen.

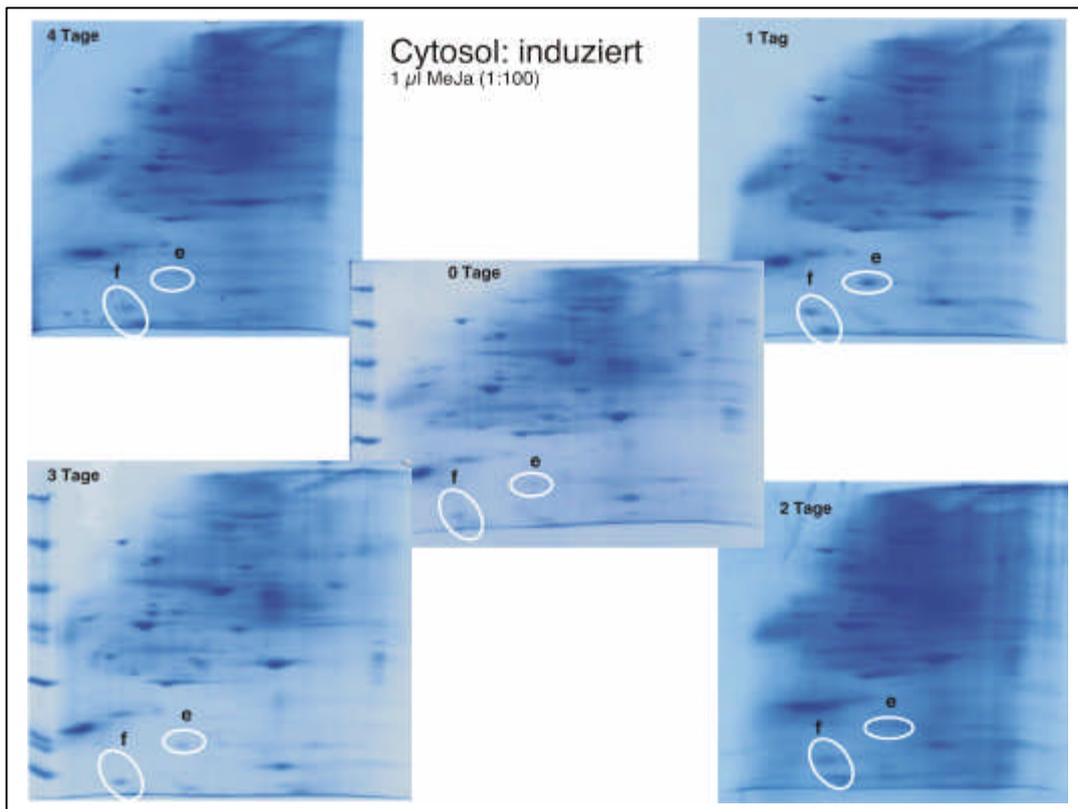


Abb. 33: Cytosolische Fraktion mit 1 µl MeJa (1:100)

Im für diese Arbeit interessanten Fall, dem induzierten, d.h. gesteigerte Hyoscyaminkonzentration in den Zellen, sind nicht so viele Veränderungen zu erkennen im Vergleich zum inhibierten Zustand. Am Tag 1 nach der Induktion wird kurzfristig ein Protein (Kennzeichnung: e) induziert, welches jedoch am nächsten Tag schon wieder nicht mehr detektiert werden kann. Genauso wie kurzfristig eine Zweiergruppe (Kennzeichnung: f) in höheren Konzentrationen vorliegt, welche sich aber auch wieder rasch normalisiert.

Somit verblieben nur noch die Membranfraktionen. Diese sind in den folgenden Abbildungen (Abb. 34 ff., folgende Seiten) dargestellt.

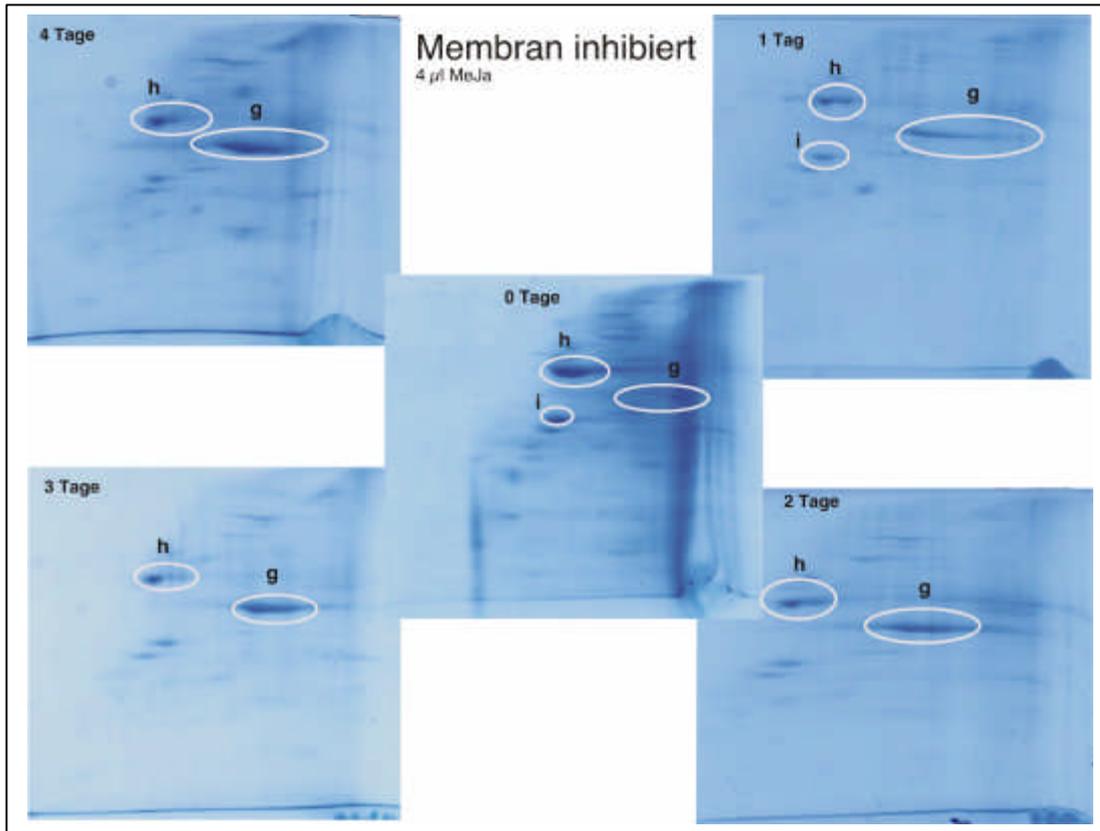


Abb. 34: Membranfraktionen mit hoher Konzentration an Methyljasmonat inhibiert

Bei den Membranfraktionen gibt es insgesamt weniger Proteine. Aus einem im Grundzustand nicht ersichtlichen Doppelspot (h), wird schon an Tag 1 ersichtlich, dass es sich um einen echten Doppelspot handelt, da eine Hälfte inhibiert wird. Über den Zeitraum der 4 Tage entwickelt sich ein neues Membranprotein (g), welches stetig an Intensität zunimmt.

In der folgenden Abbildung (Abb. 35, folgende Seite) ist der induzierte Membran Zustand abgebildet.

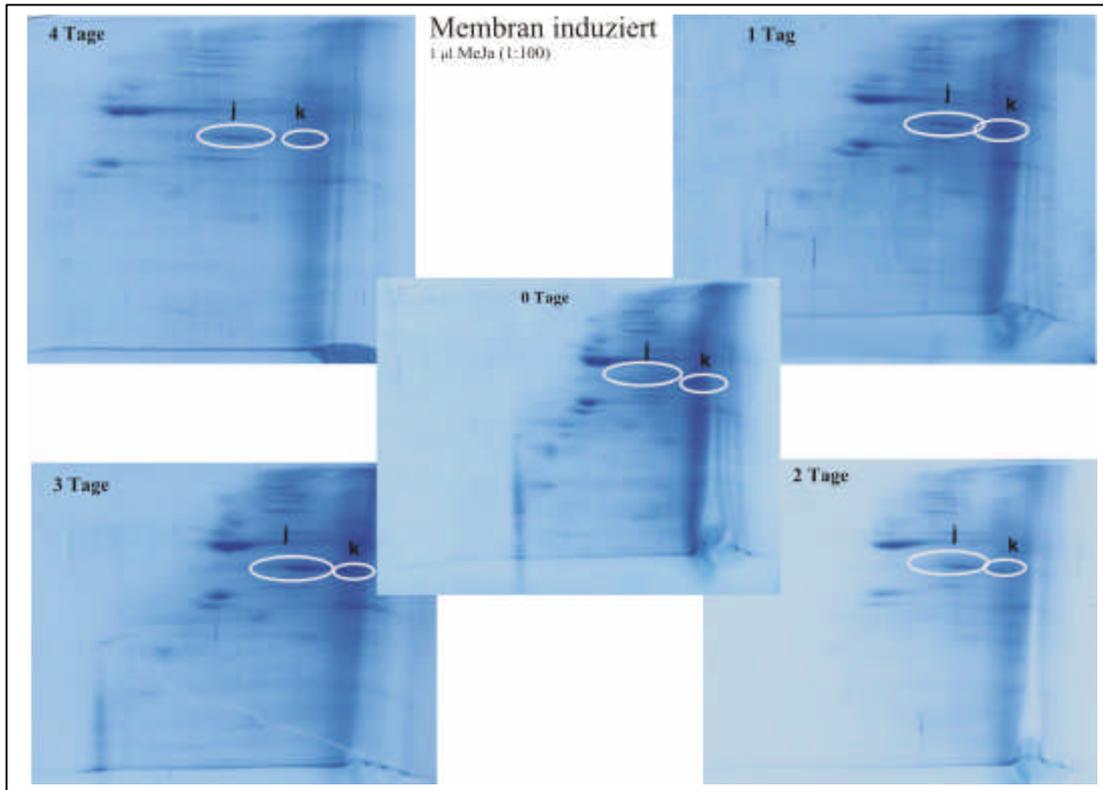


Abb. 35: Membran induziert mit geringen Methyljasmonat Konzentrationen

Im Gegensatz zu dem inhibierten Membranzustand bleibt hier der Doppelspot (Abb. 34 h, S. 115) erhalten. Es wird genau dasselbe Membranprotein (j) induziert wie beim inhibierten Zustand (g, Abb. 34, S. 115). Jedoch nicht mit gleich hoher Konzentration. Ungefähr auf derselben Höhe entsteht auch ein sehr schwacher Proteinspot (k).

Diese tageweise Entwicklung des neu entstehenden Spots ist in den folgenden Abbildungen (Abb. 36, 37) noch einmal verdeutlicht.

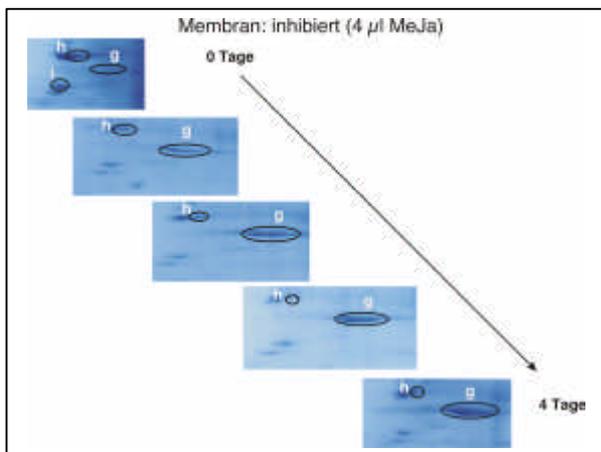


Abb. 36: Proteinentwicklung der Membranfraktion bei hohen MeJa-Konzentrationen

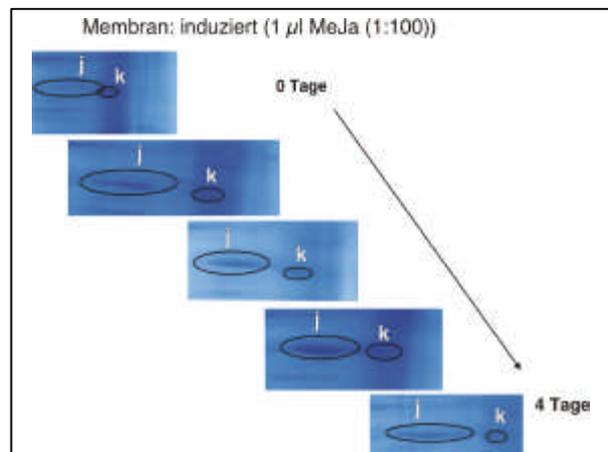


Abb. 37: Proteinentwicklung bei niedrigen MeJa-Konzentrationen

Auffällig ist, dass im inhibierten Zustand die Konzentration von Protein g stetig zunimmt, wohingegen im induzierten Zustand (Protein j) das Maximum nach 3 Tagen erreicht wird und die Expression am 4. Tag zurückgeht. Jedoch ist dieser Proteinspot (Abb. 36 g) einer derjenigen, der unter anderem eindeutig dem induzierten Zustand (Abb. 37 j) zugeordnet werden kann. Aus diesem Grund sollte dieser näher untersucht werden.

6.7.1.4 Maldi aus der Blau-Nativen-Gelelektrophorese

Ebenso wie bei der 2D-Gelelektrophorese wurde auch bei dieser Methode eine Kartierung durchgeführt. Dazu wurde ein tryptischer In-Gel Verdau und eine Maldi-Analyse durchgeführt.

Die analysierten Spots können den folgenden zwei Abbildungen (Abb. 38/39) entnommen werden.

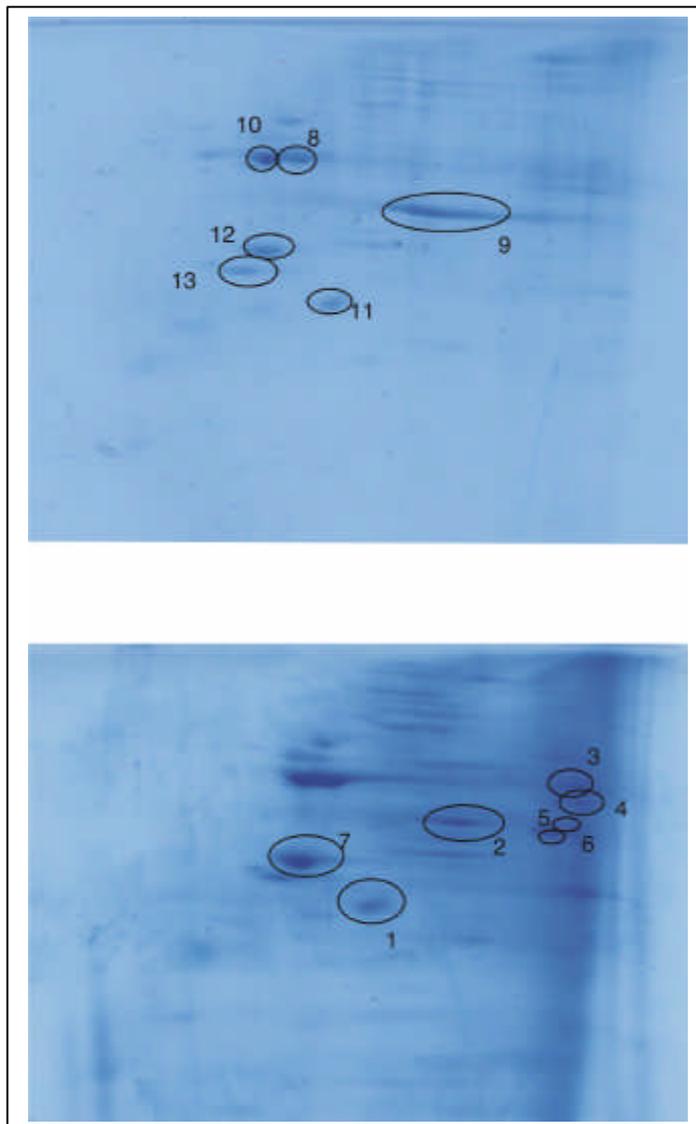


Abb. 38: Ausgewählte Proteinspots der Membranfraktionen für den Massenfingerprint

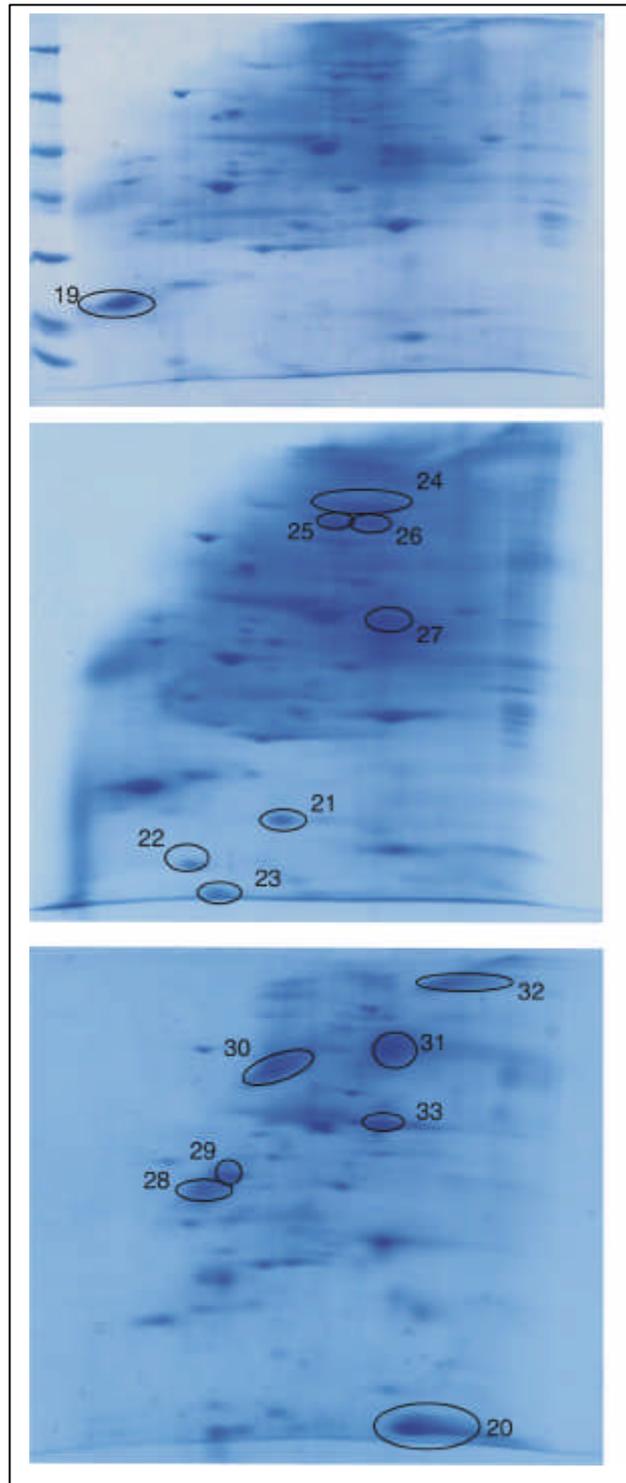


Abb. 39: Ausgewählte Proteinspots der cytosolischen Fraktionen für den Massenfingerprint

Die Ergebnisse, welche bei der Mascot-Datenbanksuche erzielt wurden sind in Tabelle 20 (folgende Seite) aufgelistet. Ebenso wie zuvor konnte keine eindeutige Identifizierung erzielt werden. Der Grund ist auch hier mit Sicherheit die fehlende Sequenz von *Datura stramonium* oder vergleichbaren Pflanzen. Doch sobald diese greifbar sind, sollte zumindest eine Kartierung möglich sein.

VI Eigene Arbeiten

Hauptpeaks	best score	Protein	Organismus
1477.77, 1775.21, 2153.01, 2172.66, 2188.23, 2191.90, 2205.41, 2208.89, 2223.26, 2242.64, 2247.30, 2258.93	65	g293447	mus musculus
1017.79, 1018.81, 1019.86, 1037.32, 1362.12, 1717.55, 1718.60, 1742.16, 1743.25, 1889.42, 1896.44, 1925.27, 2024.62, 2171.54, 2172.47, 2190.66, 2217.55, 2236.03, 2283.06, 2444.07, 2463.74, 2497.12, 2498.50, 2499.69	65	g4539272	fission yeast
1065.23, 1306.26, 1317.43, 1421.02, 1434.19, 1471.54, 1614.36, 1630.87, 1649.92, 1684.30, 1701.60, 1781.96, 1800.20, 1845.49, 1867.55, 1994.66, 2052.48, 2071.27, 2093.24, 2216.50, 2258.09, 2295.40, 2359.41, 2674.48, 2698.77	87	protein with DnaJ Domain	malaria parasite
1046.93, 1060.57, 1096.57, 1116.13, 1169.56, 1219.90, 1339.21, 1361.74, 1380.60, 1429.12, 1472.05, 1544.74, 1564.43, 1780.67, 1875.74, 1933.60, 1987.84, 2007.56, 2092.92, 2214.66, 2232.39, 2257.47, 2295.08, 2356.04, 2396.69, 2489.94, 2640.66	75	annexin P35	maize
1017.95, 1024.39, 1036.67, 1051.88, 1069.91, 1114.07, 1188.65, 1252.53, 1297.16, 1307.42, 1317.94, 1327.94, 1361.61, 1369.89, 1388.47, 1402.34, 1421.76, 1439.49, 1457.10, 1463.95, 1472.47, 1510.63, 1520.51, 1545.59, 1649.84, 1679.92, 1695.11, 1743.87, 1758.37, 1759.65, 1780.19, 1849.53, 1889.40, 1896.73, 1947.46, 1989.09, 2025.91, 2070.86, 2190.73, 2216.12, 2234.36, 2258.02, 2272.06, 2300.52, 2373.37, 2390.19, 2411.64, 2447.01	93	g1151157	plasmodium chabaudi
946.58, 1112.21, 1188.53, 1520.63, 1743.03, 1932.87, 2129.23, 2213.87, 2234.33, 2295.71, 2363.43, 2392.76, 2412.93, 2432.70, 2487.34, 2542.02, 2561.21	64	g1107510	bacteriophage A511
1030.94, 1031.98, 1100.14, 1173.08, 1273.39, 1314.33, 1330.80, 1349.90, 1365.10, 1729.86, 1748.24, 1762.09, 1780.55, 1798.90, 1868.95, 1909.31, 1927.29, 2160.84, 2388.30, 2406.21, 2551.76, 2568.86, 2623.35, 2642.42, 2660.92, 2735.26	69	g3758820	human
1519.32, 1538.27, 1643.81, 1843.83, 1859.31, 1888.58, 1899.29, 1917.00, 2070.09, 2078.87, 2205.69, 2214.79, 2296.5, 2528.92, 2571.02, 2673.08	56	hypothetical protein	fungus
1017.21, 1361.06, 1717.75, 1742.49, 1895.77, 1924.34, 1943.68, 2023.65, 2170.75, 2189.60, 2214.12, 2234.14, 2444.14, 2496.94	61	g4001709	porphyromonas gingivalis
1117.68, 1598.39, 1664.18, 1808.02, 1858.76, 1876.98, 1944.33, 1964.07, 1991.87, 2049.01, 2215.53, 2410.02, 2530.52, 2777.42	57	g4378156	zymomas mobilis
1322.2, 1476.5, 1640.0, 1708.0, 1840.2, 1852.7, 2209.4, 2384.0, 2501.7	68	g897695	caenorhabditis elegans
1143.9, 1206.7, 1270.8, 1398.2, 1764.8, 1780.3, 1793.2, 1808.7, 1937.2, 2473.8, 2550.8, 2629.3	56	N-terminal acetyltransferase 1 (EC 2.3.1.88)	saccharomyses cerevisiae
1036.6, 1147.7, 1276.0, 1409.8, 1428.9, 1505.8, 1721.9, 1809.0, 1965.1, 2029.1, 2063.9, 2155.5, 2171.9, 2228.0, 2241.9, 2334.1	91	s66274	annexin pepper
1219.8, 1236.0, 1237.7, 1344.4, 1482.3, 1502.8, 1859.2, 1873.8, 1899.2, 1929.7, 2151.2, 2201.6	60	hypothetical protein	methanothermobacter thermautotrophicus
1591.5, 1872.3			
1364.0, 1381.3, 1403.5, 1829.2, 2045.7, 2077.3, 2320.5	54	g3036950	nicotiana sylvestris leaf
1549.5, 1563.1, 1703.3, 1704.1, 1736.3, 1737.2, 1738.2, 1739.0, 1744.3, 1760.8, 1776.5, 1778.0, 1782.2	64	g1805279	human
1395.16			
1041.9, 1096.9, 1097.9, 1181.8, 1182.7, 1456.4, 1659.3, 1791.0, 1807.5, 1823.4, 1864.2, 1976.3, 1992.1, 2130.9, 2174.6, 2309.2, 2335.0, 2423.4, 2437.8, 2466.2, 2593.9	52	S-adenosyl-methyltransferase mraW	brucella melitensis
996.80, 997.81, 998.79, 1267.53, 1484.67, 1485.35, 1486.57, 1807.64, 2038.21, 2054.67, 2067.82, 2246.09, 2247.50, 2262.18, 2279.09	76	40S ribosomal protein S4	gossypium hirsutum
996.97, 997.92, 1096.91, 1181.99, 1268.11, 1486.06, 1590.25, 1659.92, 1807.65, 1864.32, 1976.79, 1992.77, 2055.20, 2247.26, 2263.82, 2279.95, 2295.88, 2423.76, 2438.56, 2594.52	50	hypothetical protein	swollen duckweed
1430.54, 1620.04, 1676.12, 1776.12, 1791.51, 1807.17, 1831.67, 1845.95, 1864.50, 2128.82, 2147.05, 2245.97, 2261.53, 2277.12, 2293.83, 2309.64, 2333.32, 2489.86, 2506.08	61	probable snlycerol 3-phosphate acyltransferase	chlamydia trachomatis
1325.75, 1371.37, 1467.07, 1494.56, 1614.53, 1650.76, 1689.28, 1832.65	66	hypothetical protein yosx	bacillus subtilis
1328.49, 1469.77, 1496.98, 1517.58, 1519.61, 1617.25, 1653.45, 1654.83, 1837.21, 1973.32	54	hypothetical protein MJ0078	methanococcus jannaschii
1441.59, 1539.66, 1561.17, 1577.58, 1583.14, 1599.42, 1761.56, 1939.53, 1973.87	65	g431486	simian immunodeficiency virus
1171.85, 1223.60, 1224.58, 1289.67, 1385.63, 1477.45, 2181.85, 2256.96, 2477.20, 2499.79, 2535.79, 2593.24	69	g2340159	acinetobacter haemolyticus
1011.15, 1322.27, 2603.53, 2625.85			
1014.82, 1146.44, 1439.51, 1559.18, 1623.27, 1753.96, 1775.93, 1792.02, 1806.67, 1833.44, 1844.93, 1865.92, 1904.04, 1909.96, 1925.65, 1934.85, 1951.87, 1993.22, 2019.88, 2147.24, 2163.97, 2178.77, 2202.22, 2217.51	76	probable chromosome assembly protein	pyrococcus horikoshii

Tabelle 20: Ergebnis des Peptid Massenfingerprints und der Datenbanksuche

6.7.1.5 Leitersequenzierung aus der Blau-Nativen-Gelelektrophorese

Eine Möglichkeit um Sequenzinformationen aus einem Proteinspot zu gewinnen ist die so genannte Leitersequenzierung. Mit dieser Methode sollte es möglich sein, bei einem Peptid in einer Eintopfreaktion nach einer Art Edman-Abbau den N-Terminus anzusequenzieren. Die Auswertung erfolgt dabei über eine MALDI-ToF Analyse. In dieser Arbeit wurde diese Methode mit einem In-Gel Verdau versucht. In Abbildung 40 ist ein Versuch gezeigt.

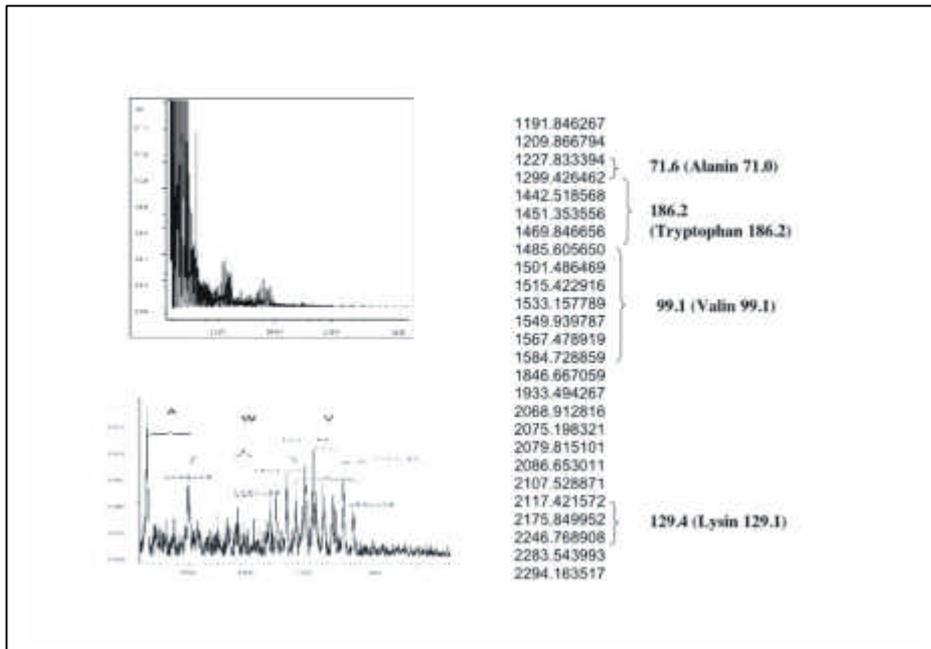


Abb. 40: Leitersequenzierung

Links oben ist dabei das komplette MALDISpektrum gezeigt. Darunter eine Vergrößerung des interessanten Bereiches und rechts daneben die gemessenen Massen. Der Nachteil bei Verwendung eines In-Gel Verdaues ist, dass schon zu Anfang eine Mischung an Peptiden vorhanden ist. Die Leiter zu finden ist dabei nicht ganz einfach. Eine bessere Variante besteht darin, direkt mit einem einzelnen Peptid zu starten. Eine Möglichkeit aus einem In-Gel Verdau die Peptide zu separieren ist eine kapillarelektrophoretische Trennung. Dies wurde auch in dieser Arbeit versucht. Dazu wurde der tryptische Verdau von elf Spots des in Abbildung 36 (S. 116) dargestellten Proteins (g) verwendet. Der Verdau wurde auf ca. 40 µl aufkonzentriert.

Für die Trennung wurde eine 50 µm Kapillare mit einer Länge von 24 cm verwendet. Als Trennpuffer wurde ein 0.1 M Phosphatpuffer (pH 2.5) gewählt. Da eine präparative Aufreinigung geplant war, wurde Druckinjektion anstatt Elektroinjektion gewählt. Denn nur mit dieser Methode ist es möglich den Fraktionssammler sinnvoll zu nutzen. Bei der Elektroinjektion verschiebt sich bei jedem Lauf, aufgrund der veränderten Leitfähigkeit, das

Chromatogramm.

Allerdings musste festgestellt werden, dass die Kapillarelektrophorese bei weitem nicht so sensitiv ist wie das MALDI-ToF. Ebenso ist es eine sehr langwierige Angelegenheit eine präparative Trennung zu erreichen, wobei diese auch mit einem massiven Materialverlust einhergeht. Da das Minimum an Probenvolumen 15 µl beträgt, stellt dieses Volumen auch gleichzeitig das Totvolumen dar. Dies ist eine beträchtliche Materialmenge die verloren geht, vor allen Dingen, da die Proben vom In-Gel Verdau sehr konzentriert sein müssen. Die Trennung wurde mit Trypton als Testsubstanz optimiert. Bei der Proteinprobe stellte sich heraus, dass es zum einen sehr wenig Fragmente in ausreichender Konzentration gab und dass diese im Chromatogramm zu dicht aufeinanderlagen. Die Chromatogramme sind in Abb. 41 abgebildet.

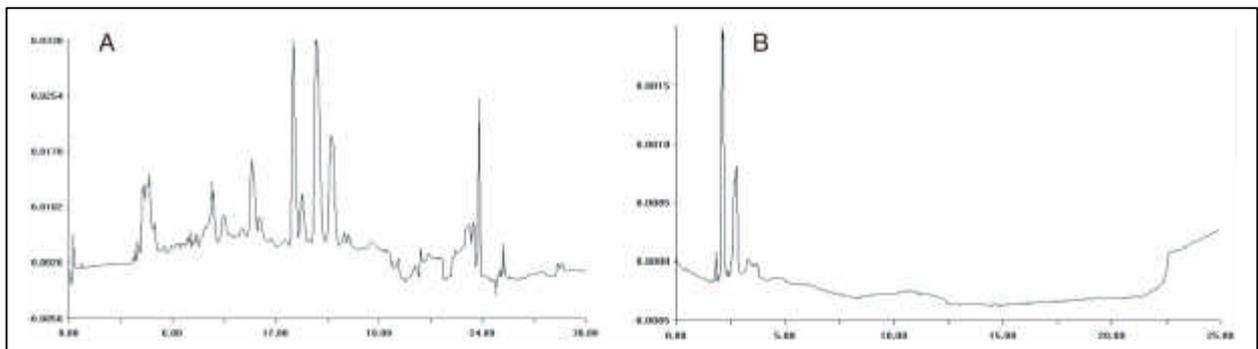


Abb. 41: Chromatogramm der Kapillarelektrophorese A: Trypton B: In-Gel Verdau eines Proteinspots

6.7.2 mRNA Ebene

Um Unterschiede bei der Expression zu untersuchen, ist es auch möglich, anstatt auf das Protein zu schauen, direkt die mRNA zu untersuchen. Eine gängige Methode ist dabei das Differential Display.

6.7.2.1 Differential Display

Der Methode des Differential Display liegt die Idee zugrunde, die RNA-Profile mehrerer Zellpopulationen mittels Gelelektrophorese miteinander zu vergleichen. Zuvor muss jedoch eine Amplifikation mittels PCR stattfinden, zum einen, um die Analyse überschaubarer zu gestalten und ebenso um die Analyse von low-copy mRNAs zu vereinfachen.

Dazu wird zuerst die mRNA in cDNA umgeschrieben. Anschließend wird in einer PCR durch bestimmte Primerkombinationen ein Anteil der cDNA amplifiziert. Diese amplifizierten Anteile werden auf Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und sind aufgrund einer gegenüber der gesamt RNA herabgesetzten Komplexität analysierbar.

Die Primerkombinationen bestehen meist aus einem Set an Primern mit ca. 9 Basen zufälliger Abfolge. Je länger die einzelne Primersequenz, desto kleiner wird die Auswahl der Amplifikate. Das erste Set wurde der Literatur entnommen (siehe Kap. 5.5.3). Wobei der Gegenprimer jeweils ein polyT-Primer ist. Für diese Arbeit wurden Proben von induzierten (1 µl HOAc, 1 µl MeJa (1:100 in EtOH)), inhibierten (4 µl MeJa) und unbehandelten Kulturen verwendet. Die Ernte erfolgte 18 h, 42 h, 66 h und 90 h nach der Animpfung. Das PCR Programm wurde ebenfalls der Literatur entnommen.

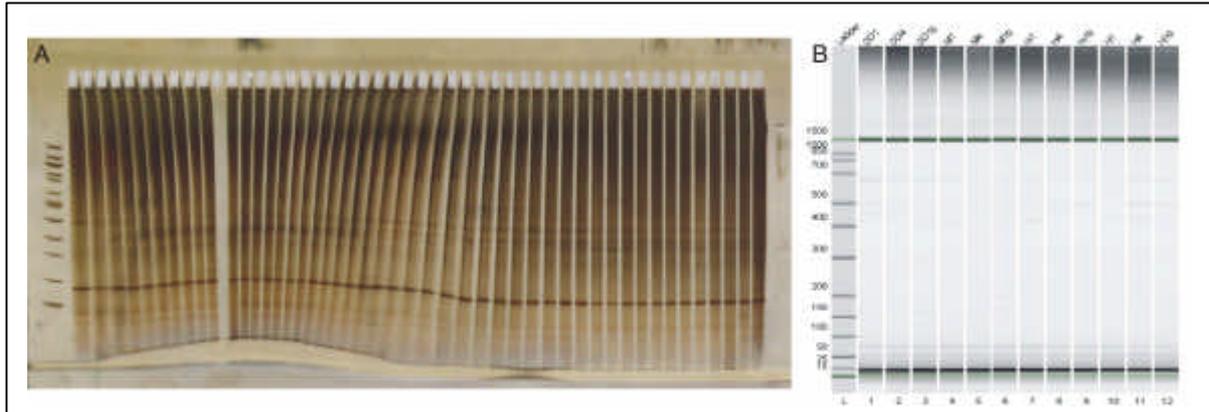


Abb. 42: Differential Display A: Excel Gel[®], B: Agilent DNA Chip

In Abbildung 42 sind die erzielten Resultate ersichtlich. Zu Beginn wurde die PCR auf Excel Gelen der Firma Amersham mit anschließender Silberfärbung ausgewertet. Es ist zu erkennen, dass die Konzentrationen der Fragmente bei weitem zu gering sind. Allerdings ergab sich das Problem, dass sich die PCR Reaktion nicht an der Speedvac aufkonzentrieren lies. Danach war gar nichts mehr zu erkennen. Das Problem der Aufkonzentrierung in der Speedvac z.B. nach einer Ethanol-fällung wird auch in der Literatur beschrieben [Svaren *et al.*, 1987]. Eine empfindlichere Methode, mit weitaus weniger Materialbedarf, ist die Auswertung mit Hilfe eines DNA-Chips, jedoch genügte auch hierbei die Konzentration nicht.

Aufgrund dieses Problems wurde eine andere Methode erarbeitet. Zuerst wurde versucht mRNA direkt über Polyacrylamidgele aufzutrennen, was jedoch scheiterte. Zum einen eventuell da mRNA relativ schnell abgebaut wird und zum anderen natürlich auch wegen der Konzentration die bei der Isolierung relativ gering ist.

6.7.2.2 mRNA-Polyacrylamidgelelektrophorese

Da das Differential Display sich für diese Pflanzenproben als nicht ideal herausstellte, wurde versucht die komplette mRNA unspezifisch zu amplifizieren.

Dies ist möglich, falls ein Teil der RACE-PCR, welche im Methodenteil (Kap. 5.5.5, S. 56 f.) beschrieben ist, genutzt wird. Das Enzym, Terminale Transferase, ist in der Lage, an das

3'-Ende von einzel- oder doppelsträngiger DNA einen Schwanz von Nucleotiden zu setzen. In diesem Fall wurde dTTP gewählt. Durch diesen Schwanz wird die Sequenzinformation erreicht, die benötigt wird, um die cDNA doppelsträngig und unspezifisch zu amplifizieren. Das Prinzip ist in Abbildung 43 dargestellt.

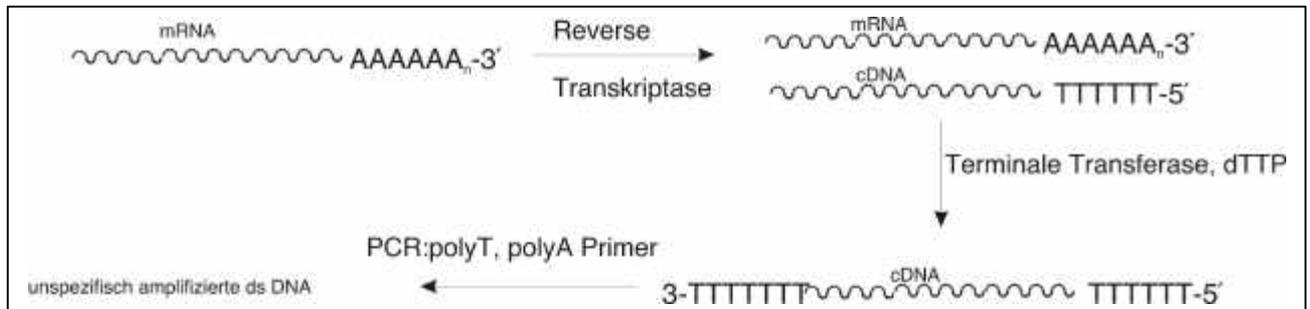


Abb. 43: unspezifische Amplifikation von mRNA

Als Proben wurden der uninduzierte und verschiedene induzierte Stadien (4 µl MeJa, 1 µl MeJa (1:100 in EtOH)) verwendet. Die Vorbereitung der Proben erfolgte 20 min, 40 min, 65 min, 150 min, 265 min, 7 h 15 min und 23.5 h nach der Fütterung. Zur Auswertung wurden Excel[®] Gele mit anschließender Silberfärbung verwendet. Um genügend konzentrierte Proben zur Verfügung zu haben, wurden 2 PCR's hintereinandergeschaltet und eine EtOH-Fällung durchgeführt. Das PCR-Programm kann Tabelle 21 entnommen werden.

Temperatur [°C]	Zeit	Anzahl Zyklen
94	2 min	1
94	30 sec	30
35	30 sec	
72	60 sec	
72	7 min	1

Tabelle 21: PCR-Programm

Für die erste PCR wurden 4 µl cDNA für einen 20 µl Ansatz eingesetzt. Der zweite Amplifikationsschritt wurde mit 8 µl DNA der ersten PCR, bei einem 40 µl Ansatz, gefahren. Das Analyseigel ist im Folgenden (Abb. 44, folgende Seite) abgebildet.

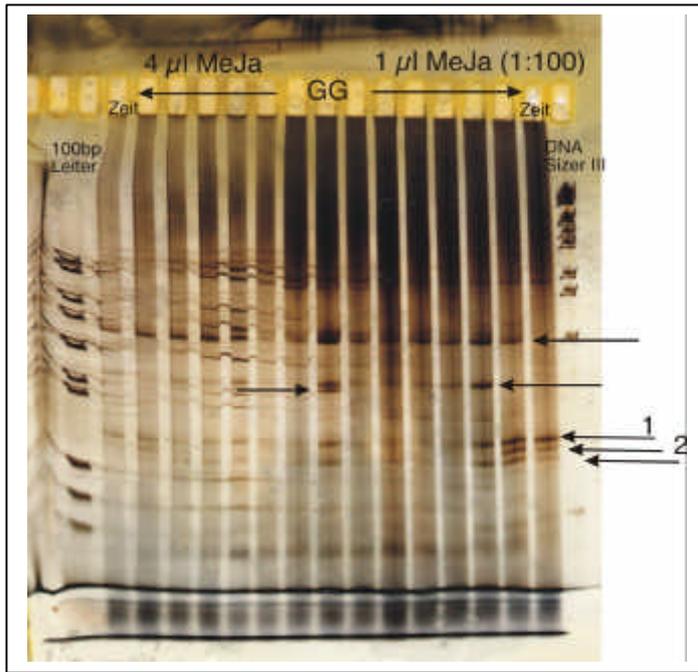


Abb. 44: Silbergefärbtes Excel® Gel

Die Banden, welche von Interesse sind können ausgeschnitten und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren werden. Um die DNA zu extrahieren, wird das Gelstück mit $100\text{ }\mu\text{l}$ sterilem Wasser 10 min gekocht und anschließend bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht inkubiert. Nun wird eine PCR zur Amplifikation durchgeführt, bevor eine Insertion in das Blunt End Kloning Kit zur Sequenzierung erfolgt. Teilweise werden jedoch nur Bruchstücke ligiert, da die vorhandene DNA-Konzentration nicht den idealen Ligationsbedingungen entspricht und vermutlich auch durch den langen Aufbereitungsweg teilweise abgebaut wird.

Die mit 1 und 2 bezeichneten Banden der Abbildung 44 konnten erfolgreich kloniert und identifiziert werden.

Bei Bande 1 konnte jedoch nach der Sequenzierung nur der Beginn des Inserts und nicht das Ende gelesen werden. Aus diesem Grund wurde eine Blast X2 (vergleicht Nukleinsäuren mit einer Proteindatenbank) über den gesamten unbekanntem Sequenzbereich durchgeführt. Dabei konnte das Insert mit einem Expectationvalue von $3\cdot e^{-10}$ dem Enzym β -Lactamase (EC 3.5.2.6) zugeordnet werden. Im Folgenden (Abb. 45/46, folgende Seite) ist das Suchergebnis dargestellt:

```
pironly:I40905
beta-lactamase (EC 3.5.2.6) - synthetic Length = 286

Score = 46.6 bits (109), Expect(2) = 3e-10
Identities = 24/39 (61%), Positives = 26/39 (66%)
Frame = -1

Query: 738 GPDGKPSRIVVITRRGVRLWMNEIDRSAEIGASLIKHW 622
          GPDGKPSRIVVI   G +             + AEIGASLIKHW
Sbjct: 248 GPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLIKHW 286
```

Abb. 45: Blast X2 Suche der Bande 1 aus Abbildung 44

Bei der Klonierung der Bande 2 ergab sich ein Insert mit 137 bp, wobei 39 bp davon einen polyT-Schwanz darstellten. Bei der Datenbanksuche wurde mit einem E-Wert von $7 \cdot 10^{-4}$ ein Intrinsic Protein gefunden (Abb. 46).

```
pironly:T12342
major intrinsic protein homolog - common ice plant Length = 285

Score = 42.0 bits (97), Expect = 7e-04
Identities = 19/25 (76%), Positives = 20/25 (80%)
Frame = +2

Query: 11  PLFGPISIGFPGFLVHLATIPITGT 85
          PL P+ IGF FLVHLATIPITGT
Sbjct: 207 PLLAPLPIGFAVFLVHLATIPITGT 231
```

Abb. 46: Blast X2 Suche der Bande 2 aus Abbildung 44

Bei den restlichen Banden scheiterte zum Teil die Klonierung oder es konnten keine Hits in der Datenbank gefunden werden.

6.8 Radioaktive Fütterungsversuche

Eine völlig andere Ansatzmöglichkeit zur Lösung der Problemstellung dieser Arbeit bieten radioaktive Markierungs- oder Fütterungsversuche.

Am Institut waren verschieden tritiummarkierte S-Adenosylmethionine (Kap. 5.6.6, S. 64) vorhanden. Das Ausgangsexperiment stellte ein Standardaktivitätstest dar, bestehend aus:

50 µl Pyridoxalphosphat (3.9 mg/ml)

10 µl DTT (13.8 mg/ml)

5 µl Littorin (7 mg/ml)

185 µl Proteinlösung

verschiedene SAM-Zusätze wie:

SAM (5 µl Fraktion 1 {0.35 µCi} + 45 µl nicht markiertes SAM)

SAM (50 µl Fraktion c {0.55 µCi})

SAM (nicht markiertes 1.7 mg/ml).

Diese Mischungen wurden 1 Stunde bei 34 °C inkubiert. Im Anschluss wurden Aliquote auf Nativ- und SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Auch unter Blau-Nativ- Gelelektrophorese-Bedingungen wurden Versuche durchgeführt. Die Auswertung stellte dahingehend ein Problem dar, dass die geplante Auslesemöglichkeit mit dem Fluorescentimager und einer Standard Imagingplatte nicht funktionierten. Das Auslesen von Tritium war damit nicht möglich, da die Strahlung nicht durch die Schutzschicht der Platte dringen kann. Somit musste das Gel in Parzellen zerschnitten und am Scintillationszähler mit dem Tritiumfenster ausgelesen werden. Die Gelstücke wurden dazu zuerst in Wasser rehydratisiert und mit dem Scintillationscocktail bei 50 °C inkubiert. Weitere Experimente wurden mit speziellen Chemikalien durchgeführt, welche die Gelstruktur auflösen. Dazu wurden zu jedem Gelstück 0.5 ml Soluene-350 gegeben, 30 min bei Raumtemperatur und zusätzlich für mindestens 3 h bei 50 °C inkubiert. Nachdem die Mischung abgekühlt war, wurden 10 ml Hionic Fluor zugegeben, gevortext und am Scintillationszähler ausgelesen. Jedoch wurde dabei kein eindeutiges Ergebnis erzielt. Die Markierung, falls sie vorhanden war, war zu schwach.

Des Weiteren wurde eine Testplatte, speziell für Tritium, für den Fluorescentimager geordert. Allerdings musste festgestellt werden, dass aus einem Polyacrylamidgel nicht einmal die Referenzpunkte, die vor der Detektion zur Orientierung auf dem Gel aufgetragen werden, detektierbar sind. Um ein Signal, zumindest das der Referenzpunkte erkennen zu können, müssen die Gele auf Nitrocellulose geblottet werden. Die Ergebnisse sahen immer gleich aus. Wie aus Abbildung 47 ersichtlich ist, sind außer den Referenzpunkten keine radioaktiven Signale erkennbar.



Abb. 47: Tritium-Image eines geblotteten Polyacrylamidgels

Ein anderes Experiment nutzte die Tatsache aus, dass die Polyacrylamidgele geblottet werden müssen. Es wurde eine Art Westernblot durchgeführt. Ein nichtradioaktives Nativ- und SDS-Gel wurden auf Nitrocellulose geblottet und anschließend mit der Aktivitätstestmischung, auch

mit radioaktivem Littorin, jedoch ohne Proteinlösung, da die Proteine schon auf der Membran immobilisiert waren, inkubiert und anschließend ausgelesen. Die Idee war eine Art Immunoreaktion zu erzeugen, da zumindest im nativen Zustand der Cofaktor bei Inkubation an das geblottete Enzym binden müsste. Doch auch für dieses Experiment war das tritiummarkierte SAM nicht geeignet, d.h. brachte kein auswertbares Ergebnis.

Eine unter Umständen effektivere Methode wurde in der direkten Fütterung der Wurzeln mit markierten Substanzen gesehen. Denn es bestand die Möglichkeit, dass das gesuchte Enzym schon vor Behandlung mit radioaktivem Substrat oder Cofaktor abgesättigt ist und dieses dann natürlich nicht ausgetauscht wird, oder zumindest mit einer geringen Rate. Falls jedoch schon bei der Proteinbiosynthese Substrat und Cofaktor markiert zur Verfügung stehen, so ist die Wahrscheinlichkeit viel höher, dass auch dieses eingebaut wird. Somit wurden schon bei der Kultivierung der Wurzeln radioaktive Substanzen zugesetzt. Da am Institut radioaktives B₁₂ zur Verfügung stand wurde dieses parallel getestet. Es wurde gleich zu Beginn eine bestimmte Menge an Substrat und SAM zugesetzt und nach 7 Tagen noch einmal nachgelegt. Pro Versuch wurden 3 Kulturen parallel behandelt. In Tabelle 22 können die gemessenen Werte entnommen werden.

Substanz	Kultur	nach 1. Fütterung [cpm]	nach 7 Tagen [cpm]	nach 2. Fütterung [cpm]	vor der Ernte (14 d) [cpm]	Membran Aliquot [cpm/70 µl]	Cytosol Aliquot [cpm/100 µl]
⁵⁷ Co]	1	2996	2866	--	2606	97	115
	2	3505	3402	--	3459		
	3	3733	3245	--	3466		
³ H]SAM Fraktion1 158615 cpm/µl	4	8344	4460	13313	9992	2427	5084
	5	15324	7835	27181	20148		
	6	8761	5437	13744	12443		

Tabelle 22: Werte des Fütterungsexperimentes

Die Wurzeln wurden nach 14 Tagen geerntet und wie für die Blau-Native-Gelelektrophorese, getrennt in Cytosol und Membran, vorbereitet. Anschließend wurden wieder Nativ- und SDS-Polyacrylamidgele zur Auswertung verwendet. Die Imaging Platte wurde 7 Tage belichtet, um auch möglichst schwache Signale auswerten zu können.

Das Ergebnis ist der nächsten Abbildung zu entnehmen (Abb. 48, folgende Seite).

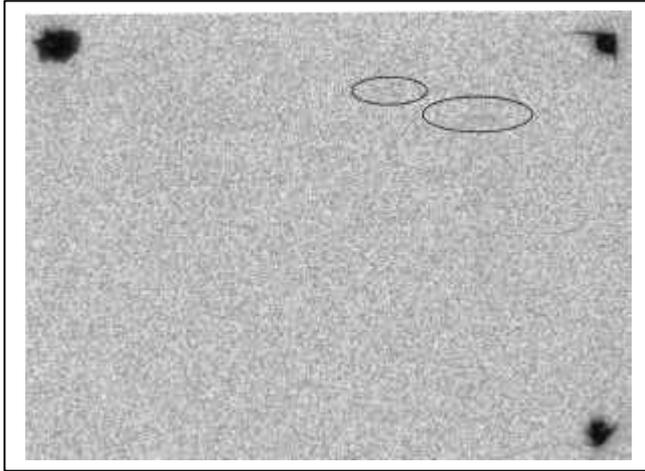


Abb. 48: Ergebnis des Fütterungsexperimentes

An zwei Stellen konnten nach 7 Tagen Expositionszeit Banden erahnt werden. Es wurden die Proben nochmals aufkonzentriert und die Imagingplatte 14 Tage aufgelegt, doch das Signal konnte nicht verstärkt werden.

Somit muss festgestellt werden, dass ein Markierungsexperiment mit Tritium nicht geeignet ist, da es viel zu schwierig zu detektieren ist.

VII. Diskussion

7.1 Messreihen an den vorhandenen Wurzelkulturlinien

Um den optimalen Zeitpunkt der Wurzelernte zu bestimmen, wurden die Kennlinien der Wurzeln wie sie aus Abbildung 21 (vgl. Seite 88) ersichtlich sind, gemessen. Der optimale Erntezeitpunkt bezieht sich dabei auf maximale Hyoscyaminkonzentration und demzufolge auf erhöhte Littorinmutase-Aktivität.

Aus dem zeitlichen Verlauf der Konzentrationsentwicklung ist erkennbar, dass erst nach ca. 9 Tagen die Alkaloidproduktion signifikant erfolgt. An den ersten Tagen findet nahezu keine Biomassenveränderung statt, da sich die Wurzelfragmente zuerst an das frische Medium gewöhnen müssen. Ähnlich der lag-Phase bei Bakterien. Es folgt eine kontinuierliche Hyoscyaminanreicherung bis zu Tag 19. Anschließend bleibt das Niveau erhalten bzw. fällt leicht ab. Dies geschieht zeitgleich mit der Biomassenstagnation. Die drei Kulturlinien unterschieden sich nur unwesentlich in ihrer Hyoscyaminproduktion. Die mit MeJa behandelten Kulturen verhielten sich entgegen der zu erwarteten Entwicklung. Dies liegt vermutlich an der Konzentration des Pflanzenhormons Methyljasmonat. Von der Vertreiberfirma wird nur eine Konzentrationsbandbreite von 0.1–5 mg/ml angegeben. Die 1.5 µl mit denen angeimpft wurde entsprechen einer 0.1 µM Lösung bei einer Ausgangskonzentration von 2.5 mg/ml. Es ist aus der Literatur bekannt, dass höhere Konzentrationen an MeJa die Hyoscyaminkonzentrationen in den Wurzeln herabsetzen [Sáenz-Carbonell *et al.*, 1996]. Dies scheint bei dieser Testreihe der Fall zu sein. Interessant bei der Induktion mit MeJa ist die pH-Entwicklung. Über die ersten 7 Tage liegt der pH-Wert des Pflanzenmediums deutlich unter dem Niveau der uninduzierten Wurzeln.

Der Leitwert nimmt wie zu erwarten stetig ab, da Salze aus dem Medium zum Zellwachstum absorbiert werden.

Als Schlussfolgerung dieser Messreihe wurden die Wurzeln für weitere Enzymuntersuchungen um Tag 15 geerntet. Dieser liegt in der steigenden Phase des Hyoscyaminlevels und wird davon ausgegangen, dass bei Tag 17-19 die höchste Konzentration vorliegt, so muss die Enzymaktivität ca. 2 Tage zuvor gesteigert sein.

7.2 Aktivitätstest

Als sehr problematisch erweist sich bei dem Assay der nicht vollständig abtrennbare Gehalt an natürlichem Hyoscyamin. Selbst nach einer Aufreinigung des Rohextraktes über eine

PD 10 Säule verbleibt ein nicht zu vernachlässigbarer Teil des Hyoscyamins in der Probe. Dieser macht es unmöglich von einer Aktivität zu sprechen, falls z.B. ein Zuwachs des Hyoscyamingehaltes während des Aktivitätstestes nur 10 % gegenüber dem Blindwert beträgt. Anders läge der Fall, wenn bei der Blindprobe der Hyoscyamingehalt tatsächlich gleich Null wäre. Solange Integraldifferenzen betrachtet werden, wird die Auswertung gerade im unteren Aktivitätsbereich schwierig oder gar unmöglich. Schon das zweimalige Aufgeben derselben Probe für eine GCMS-Analyse führt zu Schwankungen von 5-10 %. Auch ist die Aufarbeitung nach dem eigentlichen Aktivitätstest noch recht langwierig, so dass damit einhergehend ein unterschiedlicher Probenverlust von Probe und Blindprobe nicht zu vermeiden ist.

Mit der HPLC-Methode ist die Analysendifferenz geringer, da mit einem Probensampler gearbeitet wird. Das Hauptproblem des natürlichen Hyoscyamins ist damit jedoch nicht gelöst. Die GCMS-Analyse ist weitaus empfindlicher und somit vorzuziehen.

Durch verschiedene Variationen des Aktivitätstestes, angefangen von verschiedenen Aufschlusspuffern, Zusätzen zu den Tests bis hin zu unterschiedlichen Testbedingungen, wurden zahlreiche mögliche Fehlerquellen getestet. Jedoch konnten keine optimalen, reproduzierbaren Bedingungen gefunden werden, bei denen die Aktivität eindeutig zu belegen war.

Da der Aktivitätstest nicht etabliert werden konnte, muss davon ausgegangen werden, dass entweder durch die Entsalzung oder Zentrifugation vor dem Aktivitätstest eventuell ein wichtiger Cofaktor oder ein notwendiges Ion entfernt wurde. Unter Umständen ist das Enzym jedoch auch streng anaerob. Es wurden zwar Tests in einer Glovebox durchgeführt, doch bei diesem Modell ist ein 100%iger Sauerstoffausschluß nicht möglich.

In dieser Arbeit war aufgrund des fehlenden, reproduzierbaren Aktivitätstest eine Aufreinigung des Enzyms im klassischen Sinne nicht möglich. Deswegen mussten andere Methoden getestet werden, um die Identifizierung der Littorinmutase zu ermöglichen

7.3 Bindemotivsuche

Durch die Bindemotivsuche mittels PCR konnten verschiedene Banden amplifiziert werden. Bei der Sequenzierung dieser Banden stellte sich allerdings heraus, dass diese nicht in Zusammenhang mit dem gesuchten Enzym Littorinmutase stehen. Da diese entweder direkt identifiziert werden konnten oder das gesuchte Bindemotiv nicht enthielten. Ein Screening der

cDNA-Bibliothek mit Hilfe der PCR war nicht möglich, da sich herausstellte, dass der Bindemotivprimer an den Klonierungsvektor, in den die Bibliothek inkloniert ist, bindet. Es wurden aus diesem Grund Hybridisierungstests mittels fluoreszenz markierten Primern durchgeführt. Verschiedene Variationen der Bedingungen brachten keine positiven Signale hervor, obwohl gezeigt werden konnte, dass der einfach markierte Primer bei einer PCR mit Liponsäuresynthase als Positivkontrolle generell bindet. Dieser einfach mit Fluorescein markierte, getestete Primer stellte sich jedoch als ungeeignet heraus. Zum einen auf Grund der Laserfrequenz bei der ausgelesen wird und zum anderen ist Fluorescein eine wenig intensive Markierungssubstanz, die in diesem Falle nicht genügt hat. Mit Hilfe eines doppelt markierten Cy5-Primers sollte dieses Problem umgangen werden. Allerdings wurde mit diesem auch kein Erfolg erzielt, obwohl sämtliche Variationen getestet wurden (vgl. Kap. 6.5, S. 96 ff.). Selbst mit reiner Plasmid-DNA konnte kein Signal erzielt werden.

So dass als letzte Konsequenz davon ausgegangen werden muss, dass entweder auch der Cy5-markierte Primer ein noch zu schwaches Signal ergibt, oder dass dieser nicht funktionsfähig war, was durch die 5'- und 3'-Markierung nicht mittels einer PCR überprüft werden konnte.

7.4 2D-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese sollten Unterschiede auf Proteinebene von verschiedenen induzierten und inhibierten Wurzelzuständen, d.h. erhöhter und erniedrigter Hyoscyamingehalt, sichtbar gemacht werden. In den Abbildungen 29 und 30 (vgl. S. 106, 107) sind die Unterschiede der verschiedenen Zustände graphisch hervorgehoben. Dabei ist zu erkennen, dass die induzierten Proteinspots, d.h. Spots die nur in bestimmten Zuständen auftreten und in anderen nicht, nur bei dem niedrig Hyoscyaminniveau-Zustand auftreten. Das heißt im inhibierten Zustand sind induzierte Proteine erkennbar. Erstaunlicherweise sind Grundzustand und die beiden induzierten Zustände (HOAc, niedrig konzentriertes MeJa) von der Proteinausstattung, die mit der 2D-Gelelektrophorese sichtbar gemacht wurde, nahezu gleich. Nahezu gleich bedeutet dabei, dass nur überdeutliche Unterschiede betrachtet wurden (Spot vorhanden oder nicht). Eine Differenz von nur 30 % ist nicht eindeutig belegbar, wie schon in den "Eigenen Arbeiten"-Teil (Kap. 6.7.1.1) beschrieben.

Um sicherzugehen, dass die dargestellten Zustände wirklich induziert und inhibiert waren, und um einen quantitativen Anhaltspunkt zu bekommen, wurden die verwendeten Wurzelkulturen auf ihren Hyoscyamingehalt hin überprüft. Die Ergebnisse sind der Tabelle 18 (vgl. S. 108) zu entnehmen. Die Unterschiede fielen mit bis zu 104 % Differenz zwischen

den beiden Methyljasmonat-Zuständen (induziert und inhibiert) sehr deutlich aus. Die Hoffnung in Bezug auf diese beiden Zustände war es eventuell ganze Abwehrkaskaden, die von Methyljasmonat stimuliert werden und nichts mit der direkten Synthese von Hyoscyamin zu tun haben, in beiden Zuständen gleichermaßen angeregt zu sehen. Damit wäre schon ein Teil der Spots aussortierbar gewesen die nichts mit der Littorinmutase zu tun haben.

Insgesamt wurden 6 induzierte Proteinspots (Abb. 29A, Nr. 1-6, S. 106) sichtbar. Wobei sich hinter dieser Nummerierung bei Nr. 4 ein Triplet von verhältnismäßig schwachen Proteinspots verbirgt und mit Nr. 5 mindestens zwei sichtbar intensive Proteinspots gekennzeichnet sind.

Diese und auch verschiedene, so genannte Landmarks wurden einem In-Gel Verdau mit anschließender MALDI-Analyse unterzogen. Die Ergebnisse sind der Tabelle 19 (vgl. S. 110) zu entnehmen. Mit Hilfe einer Mascot-Datenbanksuche wurden diese Massenfingerprints mit Datenbanken abgeglichen. Unter Umständen wäre es möglich gewesen, ähnliche Proteine z.B. aus verwandten Spezies zu finden und somit die Spots zu identifizieren.

Jedoch wird hierbei das Hauptproblem bei der Anfertigung dieser Dissertation widerspiegelt. Dadurch, dass der Organismus *Datura stramonium* noch nicht sequenziert ist, können weder DNA- noch Proteinfragmente eindeutig identifiziert werden. Es gibt dennoch eine Chance ein sehr ähnliches Protein in einer anderen, schon sequenzierten Pflanze zu finden und somit Rückschlüsse ziehen zu können. Diese Chance ist sehr gering und bei dieser 2D-Analyse leider nicht eingetroffen.

Sobald *D. stramonium* sequenziert ist, sollte es möglich sein, aus obigen Daten und den Originalmessungen verwertbare Informationen zu bekommen, auch wenn diese eventuell nur der Kartierung dienen.

Damit gilt es als Schlussfolgerung aus der 2D-Gelelektrophorese festzuhalten, dass diese Methode erfolgreich auf die Pflanzenkulturproben adaptiert werden konnte. Das Hauptziel dieser Methode, unterschiedlich exprimierte Proteine sichtbar zu machen wurde erreicht. Allerdings wurden diese induzierten Proteine nicht bei dem gewünschten, induzierten Wurzelkulturzustand sichtbar, sondern bei den inhibierten Proben.

Dieses Ergebnis an sich ist erstaunlich, da zwei unterschiedlich induzierte Zustände (niedrig konzentriertes MeJa, HOAc) untersucht wurden und auch ein Hyoscyaminkonzentrations-Unterschied von bis zu 104 % ein anderes Ergebnis erwarten liesen. Dahingehend, dass sich induzierte Proteine auch tatsächlich im induzierten Zustand abbilden.

Zudem ist die Feststellung einer sichtbar identischen Proteinausstattung bei den beiden

induzierten Zuständen und dem Grundzustand, trotz deutlicher Unterschiede des Zell-Hyoscyamin-Gehaltes sehr interessant.

7.5 Blau-Native-Gelelektrophorese

Die Diskussion der einzelnen Unterschiede bei den induzierten und inhibierten Zuständen ist direkt im Anschluss an die einzelnen Abbildungen 32 bis 35 (vgl. S. 113-116) gestellt. Dadurch soll die Übersicht etwas erhöht werden, da bei dieser Methode die tageweise Entwicklung über die Dauer von 4 Tagen untersucht und die Abbildungen recht komplex wurden.

Auch hier sind einzelne Spots mit einem In-Gel Verdau und einer MALDI-Analyse näher untersucht worden (vgl. Tab.20, S. 119). Allerdings ergab sich dasselbe Problem wie bei der 2D-Gelelektrophorese. Es konnte kein Massenfingerprint mangels fehlender Datenbank identifiziert werden.

Auch hier muss festgehalten werden, dass die Methode der Blau-Nativen-Gelelektrophorese erfolgreich auf die Problemstellung dieser Dissertation angewendet werden konnte. Allerdings differierten bei dieser Methode ebenfalls die erwarteten Ergebnisse (deutlich zuzuordnender, induzierter Proteinspot, der in den inhibierten Zuständen und im Grundzustand nicht oder in geringerer Konzentration vorhanden ist) mit den tatsächlich erhaltenen. Wobei dies nicht den Grundvoraussetzungen zuzuordnen ist.

Zum einen wurde bei den verwendeten Proben eine deutliche Induktion auf der Basis des Hyoscyaminkonzentration beobachtet. Und zum anderen war es durch Adaption der ursprünglichen Blau-Nativen Gelelektrophorese nach Schägger [Schägger et al., 1991] auf *D. stramonium* Probenmaterial möglich, Unterschiede sowohl bei den Cytosolischen- wie auch bei den Membran-Fractionen herauszuarbeiten.

Als Anhaltspunkt für weitere Untersuchungen bietet sich der Proteinspot j (Abb. 36, S. 116) an. Dabei handelt es sich um ein membranständiges Protein das eindeutig unter induzierenden Bedingungen angesprochen wird. Allerdings wird dieses Protein zudem unter inhibierenden Bedingungen verstärkt in den Pflanzenzellen produziert (Abb. 37, S. 116, Spot g). Somit kann er nicht eindeutig der Littorinmutase zugeordnet werden. Es könnte sich dabei um einen Transporter, für das Importieren von Methyljasmonats in die Zelle, handeln.

7.6 Radioaktive Fütterungsversuche

Mit Hilfe von verschiedenen, tritiummarkierten S-Adenosylmethionin Fraktionen wurde versucht die Littorinmutase mittels ihres vermutlichen Cofaktors SAM zu markieren. Allerdings musste festgestellt werden, dass Tritium an sich sehr schwer zu detektieren ist. Von Polyacrylamidgelen werden selbst die nachträglich aufgetragenen Referenzpunkte resorbiert. Somit muss auf jeden Fall geblottet werden. Doch selbst dann war es nicht möglich Signale zu detektieren.

Aus diesem Grund wurden direkte Fütterungsversuche der Wurzelkulturen mit radioaktiven Substanzen getestet. Bei dieser Methode dürfte markierter Cofaktor in demselben Maße aufgenommen werden wie der natürliche. Eine Cofaktorverdrängung wie bei den zuvor durchgeführten Proteininkubationen ist dabei nicht nötig. Es wird davon ausgegangen, dass sobald das S-Adenosylmethionin in die Pflanzenzelle aufgenommen wird, dieses ebenso eingebaut wird wie das zelleigene. Tabelle 22 (vgl. S. 127) zeigt, dass SAM auf jeden Fall resorbiert wird. Allerdings scheiterten auch bei dieser Methode die anschließenden Detektionsversuche.

Somit muss festgestellt werden, dass Tritium nicht die geeignete Markierung für Bindungsstudien darstellt. Es sollte auf andere, stärkere und weitreichendere Strahler zurückgegriffen werden.

Bei der Fütterungsvariante wurde eine sehr auffällige Beobachtung gemacht. Die Wurzelkulturen welche mit [^{57}Co] beimpft wurden, zeigten ein erheblich eingeschränktes Wurzelwachstum im Vergleich zu den anderen angeimpften Kulturen. Wobei diese Hemmung bei allen 3 parallelen Kulturen in gleichem Maße beobachtet wurde, so dass ein zufälliges Ereignis ausgeschlossen werden kann. Auch konnte diese Beobachtung nicht auf einen zu sauren pH-Wert des Mediums zurückgeführt werden, welcher ebenso die Ursache sein könnte. Somit scheint wahrscheinlich, dass sich die Wurzeln durch das [^{57}Co] quasi vergiften. Dafür gibt es jedoch keine Erklärung, da laut Theorie in Pflanzen kein Vitamin-B₁₂ vorkommt! (vgl. Kap. 1.1, S. 1) Wieso sollten die Wurzeln ihr Wachstum einstellen, falls sie das Cobalt nicht benötigen? Cobalt sollte dann nur einen ungenutzten Mediumszusatz darstellen, aber nicht so gravierende Auswirkungen haben.

VIII. Zusammenfassung und Ausblick

Die *D. stramonium* Hairy Root Wurzelkulturhaltung konnte am Lehrstuhl erfolgreich etabliert werden. Es gelang zusätzlich eine eigene Wurzelkulturlinie zu induzieren.

Durch Messreihen an den vorhandenen Wurzellinien wurde eine Zeitabhängigkeit der Hyoscyaminproduktion gezeigt und mit Hilfe dieser Kennlinien der geeignete Erntezeitpunkt festgelegt.

Aus der eigenen Wurzelkulturlinie G2 wurden erfolgreich drei cDNA-Bibliotheken verschiedenen Alters hergestellt.

Versuche zur Etablierung eines reproduzierbaren Aktivitätstestes blieben erfolglos.

Mit Hilfe von Bindemotiven für radikalisch agierendes S-Adenosylmethionin wurde mittels Polymerasekettenreaktionen und Hybridisierungen versucht, Proteine die dieses Motiv enthalten, zu fischen. Mit dem Liponsäuresynthase Testsystem konnte gezeigt werden, dass die Bindemotivsuche mittels PCR prinzipiell funktioniert. Die gefundenen Fragmente bei den Wurzelproben konnten jedoch der gesuchten Littorinmutase nicht zugeordnet werden.

Mit Methyljasmonat, einem Pflanzenhormon, ist es möglich Hyoscyamin in den Wurzelzellen anzureichern oder zu unterdrücken. Es wurden erfolgreich Messreihen durchgeführt, um geeignete Bedingungen für die Induktion und Inhibierung zu finden. Auch Essigsäure hat sich als Induktor erwiesen.

Die 2D-Gelelektrophorese sollte die verschieden induzierten und inhibierten Proteine, und damit auch die Littorinmutase, zum Vorschein bringen. Die Methode wurde erfolgreich auf das Wurzelmaterial adaptiert. Deutlich induzierte Proteine wurden bei dem inhibierten Zellzustand ersichtlich. Diese und verschiedene Landmarks wurden mit Hilfe eines tryptischen In-Gel Verdau und einer Massenanalyse charakterisiert.

Eine weitere Elektrophorese-Methode, die Blau-Native-Gelelektrophorese wurde auf die Wurzelkulturproben angepasst. Damit war es möglich cytosolische und membrangebundene Proteine getrennt zu betrachten. Wiederum wurden Unterschiede bei den inhibierten Zuständen sichtbar, wobei mit dieser Methode zusätzlich eine 4-Tage-Dynamik verfolgt wurde. Des Weiteren konnten Unterschiede bei den induzierten Stadien gezeigt werden. Wie bei der 2D-Gelelektrophorese wurde auch hier ein In-Gel Verdau mit anschließender Analyse durchgeführt.

Bei radioaktiven Fütterung- und Bindungsstudien mit [³H]S-Adenosylmethionin, erwies sich Tritium als Strahler mit zu geringer Reichweite.

Mit Hilfe des Enzyms Terminalen Transferase war es möglich cDNA unspezifisch zu

vermehrten und somit in ausreichender Menge zur Verfügung zu haben, um sie auf Polyacrylamidgelen aufzutrennen und mittels Silberfärbung sichtbar zu machen.

Weitere Möglichkeiten die Littorinmutase zu isolieren bestehen unter Umständen darin, stärker strahlende radioaktive Substrate herzustellen, um damit das Protein zu markieren. Besonders bei den Fütterungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass prinzipiell eine Aufnahme des Cofaktors erfolgt und dieser auch gebunden wird. Nur die Tritiumsignale erwiesen sich als zu schwach.

Auch bei der Bindemotivsuche konnte das prinzipielle Binden des Primers anhand des Testsystems gezeigt werden. Hier sollte auf eine radioaktive Markierung der Hybridisierungssonde zurückgegriffen werden.

Sobald *D. stramonium* sequenziert ist, kann auf der Schiene der Induktion/Inhibierung ein Erfolg erzielt werden. Zusätzlich wird dadurch die eindeutige Identifizierung der mittels Massenfingerprint charakterisierten Proteinspots aus den Elektrophoresemethoden möglich sein.

IX Literatur

ABI PRISM[®], (1998)

BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit Protocol,
PE Applied Biosystems, Weiterstadt

Ballica, R., Ryu, DDY, Kado, C., (1993)

Tropane alkaloid production of *D. stramonium* suspension cultures: elicitor
and precursor effects,

Biotechn. Bioeng., **41**, 1075-1081

Banerjee, R. (Ed.), (1999)

Chemistry and Biochemistry of B₁₂,
John Wiley & Sons Inc

Bartlet-Jones, M., Jeffery, W. A., Hansen, H. F., Pappin, D. J. C., (1994)

Peptide Ladder Sequencing by Mass Spectrometry Using a Novel, Volatile
Degradation Reagent,

Rapid Commun. Mass Spectrom., **8**, 737-742

Brown, J. H., (1990)

In: Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics,
pp 150-165, Pergamon Press, New York

Casper, N. J., Booker, S. J., Ruzicka, F., Frey, P. A., Scott, R. A., (2000)

Direct FeS Cluster Involvement in Generation of a Radical in Lysine-2,3-
Aminomutase,

Biochemistry, **39**, 15668-15673

Chait, B. T., Wang, R., Beavis, R. C., Kent, S. B. H., (1993)

Protein Ladder Sequencing,

Science, **262**, 89-92

Chesters, N. C. J. E., O'Hagan, D., Robin, R. J., Kastle, A., Floss, H. G., (1995)

The biosynthesis of tropic acid: the stereochemical course of the mutase involved in
hyoscyamine biosynthesis in *Datura stramonium*,

J. Chem. Soc. Chem. Comm., **2**, 129-130

Chrambach A., Dunn M. J., Radola B. J., (1987)

In: Advances in Electrophoresis,

Vol. 1, VCH Weinheim, 441 pp

DNeasy[®] Plant Mini Kit Handbook, QIAgen, Hilden (August 2000)

- Evans, H. J., Kliewer, M., (1964)
Vitamin-B₁₂ compounds in relation to the requirement of cobalt for higher plants and nitrogen-fixing organisms,
Ann. N. Y. Acad. Sci., **112** (2), 735-755
- Finke, R. J., Hay, B. P., (1984)
Thermolysis of adenosylcobalamin: a product, kinetic, and cobalt-carbon-bond (C5') bond dissociation energy study,
J. Inorg. Chem., **23**, 3041-3043
- Flores, H. E., Filner, P., (1985)
In: Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures,
ed. Newmann, K.H., Barz, W., Reinhard, E., Springer Verlag Heidelberg, 174-186
- Frey, P. A., (2001)
Radical Mechanisms of enzymatic catalysis,
Annu. Rev. Biochem., **70**, 121-148
- Frey, P. A., Reed, G. H., (2000)
Radical Mechanisms in Adenosylmethionine and Adenosylcobalamin Dependent Enzymatic Reactions,
Arch. Biochem. Biophys., **382**, 6-14
- Frey, P. A., Ballinger, M. D., Reed, G. H., (1998)
S-Adenosylmethionine: a "poor man's B₁₂" in the reaction of lysine-2,3-aminomutase,
Biochem. Soc. Trans., **26**, 304-310
- Gassen, H. G., Schrimpf G. (Hrsg.), (1999)
In: Gentechnische Methoden,
2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg
- Halpern, J., Kim, S. H., Leung, T. W., (1984)
Cobalt-Carbon bond dissociation energy of coenzyme B₁₂,
J. Am. Chem. Soc., **106**, 8317-8319
- Hanahan, D., Meselson, M., (1991)
Large Scale Plate Amplification, Storage and Retrieval of Plasmid Libraries,
Methods Enzymol., **204**, 97-98
- Heimberger, M., (2000)
Isolierung und Versuche zur Aktivierung der Liponsäure Synthese aus Hefe,
Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biochemie, Universität Karlsruhe

- Heukeshoven, J., Dernick, R., (1985)
Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamid gels and the mechanism of silver staining,
Electrophoresis, **6**, 103-112
- Humphrey, A. J., O'Hagan, D., (2001)
Tropane alkaloid biosynthesis. A century old problem unresolved,
Nat. Prod. Rep., **18**, 494-502
- Kagan, R.M., Clarke, S., (1994)
Widespread Occurrence of Three Sequence Motifs in Diverse S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferases Suggests a Common Structure for These Enzymes,
Arch. Biochem. Biophys., **310**, 417-427
- Kannangaro, C.G., (1977)
Bulk isolation of plastids,
Carlsberg Res. Commun., **42**, 431-439
- Karas, M., Hillenkamp, F., (1988)
Laser desorption ionisation of proteins with molecular masses exceeding 10 000 daltons,
Anal. Chem., **60**, 2291-2301
- Kinter, M., Sherman, E., (2000)
In: Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry,
Wiley Interscience
- Leete, E., (1984)
Chemistry of the tropane alkaloids. Part 34. 1,2 Migration of hydrogen during the biosynthesis of tropic acid from phenylalanine,
J. Am. Chem. Soc., **106**, 7271-7272
- Leete, E., (1987)
Chemistry of the tropane alkaloids. Part 35. Stereochemistry of the 1,2 migration of the carboxylgroup that occurs during the biosynthesis of tropic acid from phenylalanine,
Can. J. Chem., **65**, 226-228
- Liang, P., Pardee, A.B., (1992)
Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction,
Science, **257**, 967-971

Michov, B., (1996)

In: Elektrophorese Theorie und Praxis,
Walter de Gruyter

Ochman, H., Ayala, F.J., Hardt, D.L., (1993)

Use of polymerase chain reaction to amplify segments outside boundaries of known sequences,
Methods Enzymol., **218**, 309-321

O'Farrell, P. H., Patrick, H., (1975)

High resolution two dimensional electrophoresis of proteins,
J. Biol. Chem., **250**, 4007-4021

O'Hagan, D., Robins, R. J., (1998)

Tropic acid ester biosynthesis in *Datura stramonium* and related species,
Chem. Soc. Rev., Vol. 1, **27**, 207-212

Oligotex™, (July 1999)

Handbook for Purification of poly A⁺RNA from total RNA,
QIAGEN, Hilden

Ollagnier, S., Kervio, E., Rétey, J., (1998)

The role and source of 5'-deoxyadenosyl radical in a carbon skeleton rearrangement catalysed by a plant enzyme,
FEBS Lett., **437**, 309-312

Omniscript™, (April 1999)

Reverse Transcriptase Handbook,
QIAGEN, Hilden

Pandalis, G., (1996)

Vitamin B₁₂-containing sallow thorn concentrates or extracts,
PCT Int. Appl., 10 pp.

Perfectly Blunt® Cloning Kits, (1999)

TB 183 11/99, Novagen

Piñol, M. T., Palazón, J., Cusidó, R., Serrano, M., (1996)

Effects of Ri T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes* on Growth and Hyoscyamine Production in *Datura stramonium* Root cultures,
Bot. Acta, **109**, 133-138

QIAprep, (April 1997)

Miniprep Handbook,

QIAGEN, Hilden

QIAquik™, (September 1995)

Handbook for DNA extraction from agarose gels,

QIAGEN, Hilden

Rétey, J., (1999)

S-Adenosylmethionin-Armeleute-B₁₂?

Chemie in unserer Zeit, **3**, 171-172

Richter, G., (1998)

In: Stoffwechselphysiologie der Pflanze,

Thieme Verlag, 5. Auflage

RNeasy Mini®, (Mai 1999)

Handbook,

QIAGEN, Hilden

Sáenz-Carbonell, L., Loyola-Vargas, V., M., (1996)

Datura stramonium Hairy Roots Tropane Alkaloid Content as a Response to Changes in Gomborg's B₅ Medium,

Applied Biochemistry and Biotechnology, **61**, 321-337

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

Molecular Cloning-A laboratory Manual (second edition),

Cold Spring Harbor Laboratories, N.Y.

Schägger, H., Jagow, G., (1991)

Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form,

Anal. Biochem., **199**, 223-231

Silver Staining Kit Protein Instructions,

Pharmacia Biotech Edition AE (71-7177-00)

Sofia, H.J., Chen, G., Hetzler, B.G., Reyes-Spindola, J.F., Miller, N.E., (2001)

Radical SAM: A novel protein superfamily linking unresolved Steps in familiar

Biosynthetic pathways with radical mechanisms: Funktional characterization using new analysis and information visualization methods,

NAR, **29**, 5079-50116

Stadtman, T. C., (1982)

In: B₁₂

Band 2, Seite 206, Wiley Verlag, Herausgeber D. Dolphin

Superscript™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning,

Instruction Manual,

Life Technologies, Karlsruhe

Svaren, J., Inagum, S., Lovegren, E., Chalkley, R., (1987)

DNA denatures upon drying after ethanol precipitation,

Nucleic Acid Res., **15**, 8739-8754

Tepfer, D.A., Tempe, J., (1981)

Production of agropine in roots under the action of *Agrobacterium rhizogenes* strain A4,

Acad. Sci. Paris Ser. III, **292**, 153-156

Wang, X., Feuerstein, G.Z., (1995)

Direct Sequencing of DNA Isolated from mRNA Differential Display,

BioTechniques, **18**, 448-453

Zabetakis, I., Edwards, R., O'Hagan, D., (1999)

Elicitation of tropane alkaloid biosynthesis in transformed root cultures of *Datura stramonium*,

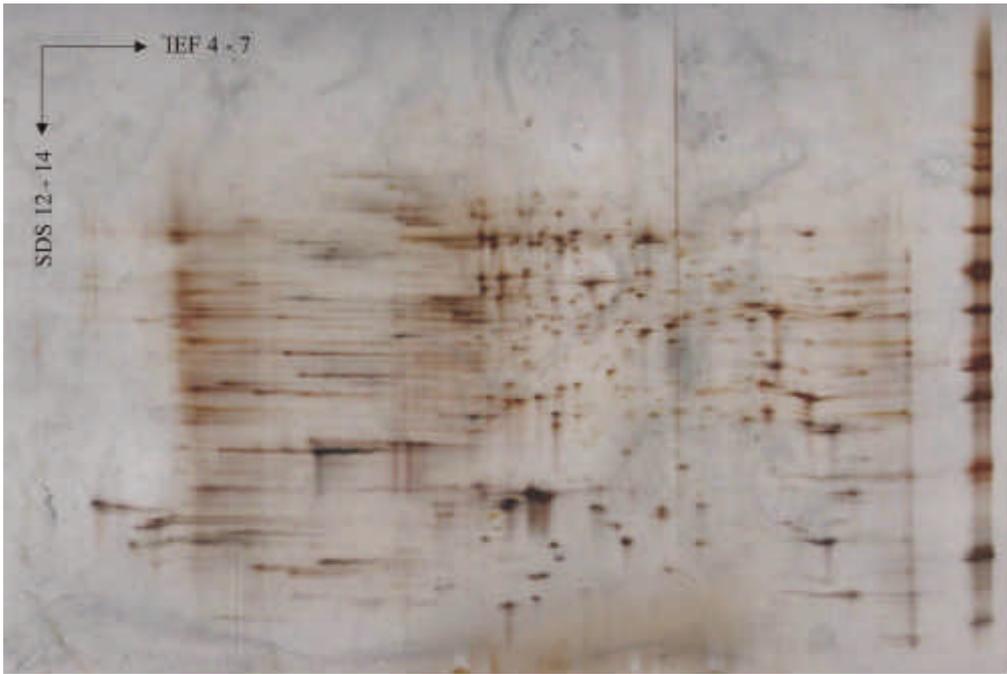
Phytochemistry, **50**, 53-56

Anhang I:
2D-Gele



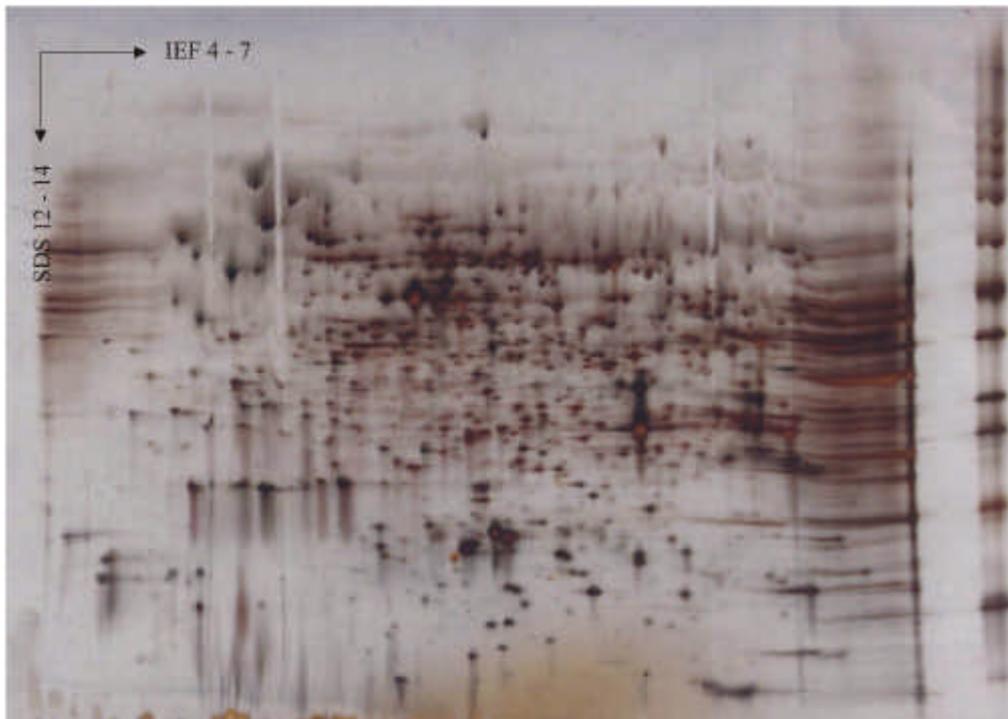
Oben: Grundzustand
Unten: Grundzustand

Anhang I



Oben: Grundzustand

Unten: Inhibiert durch Methyljasmonat in hohen Konzentrationen



Oben: Inhibiert durch Methyljasmonat in hohen Konzentrationen
Unten: Inhibiert durch Methyljasmonat in hohen Konzentrationen



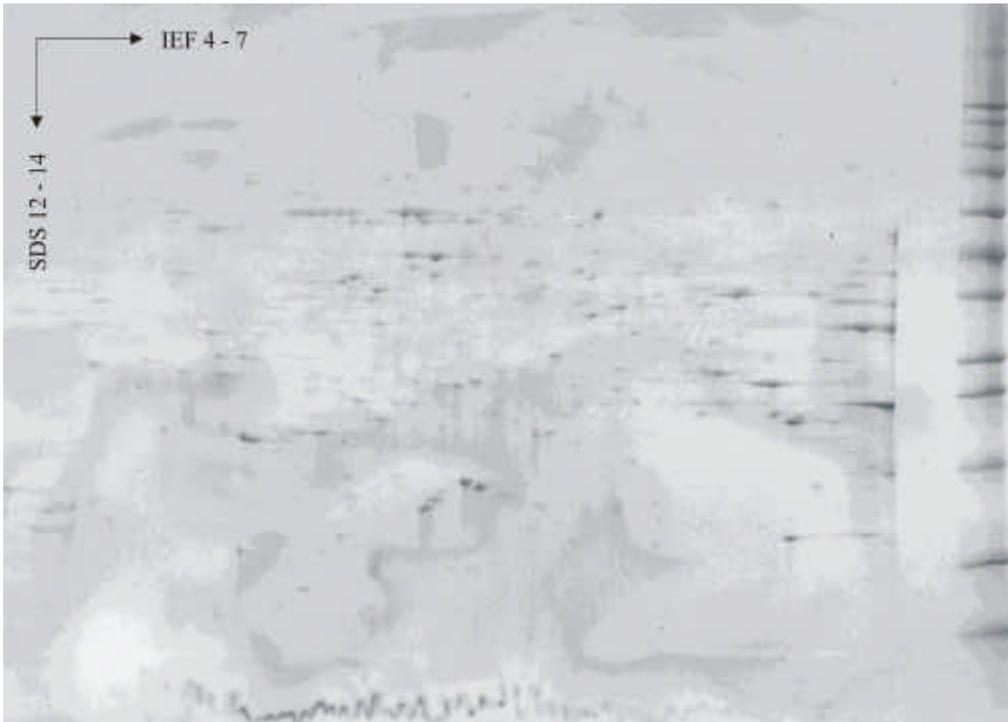
Oben: Induziert durch Methyljasmonat in geringen Konzentrationen
Unten: Induziert durch Methyljasmonat in geringen Konzentrationen



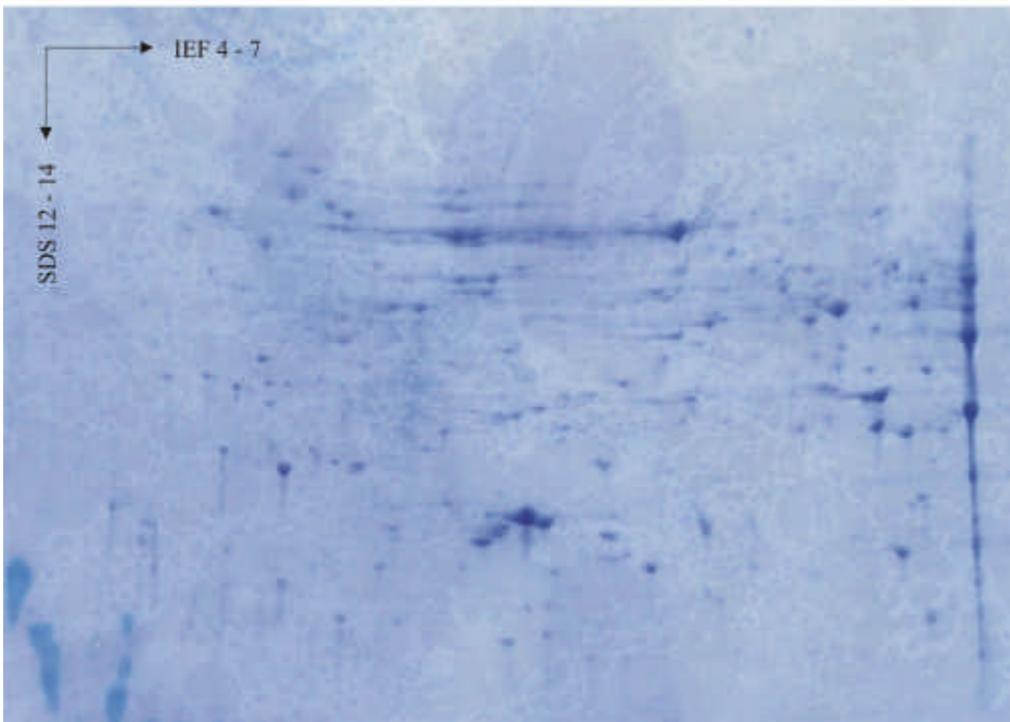
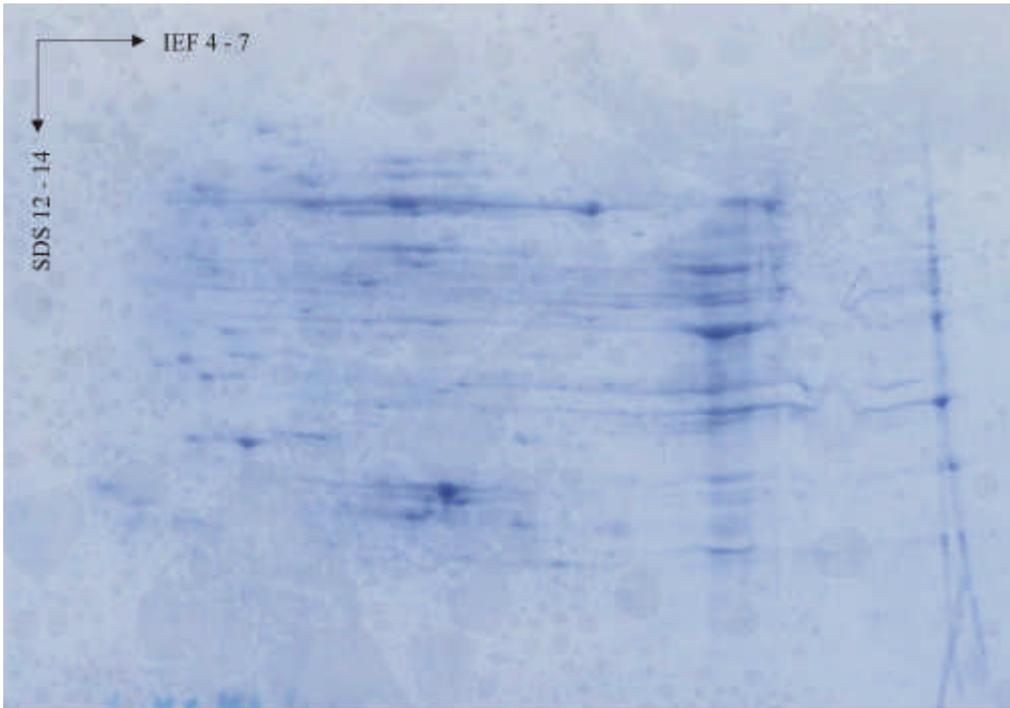
Oben: Induziert durch Methyljasmonat in geringen Konzentrationen
Unten: Induziert durch Essigsäure



Oben: Induziert durch Essigsäure
Unten: Induziert durch Essigsäure

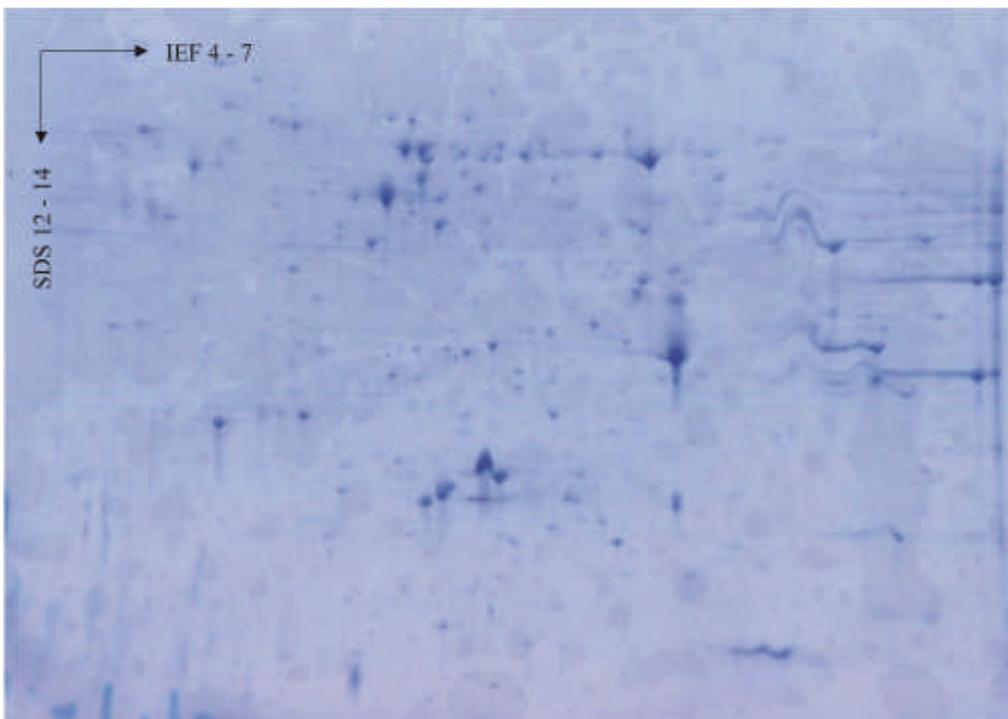
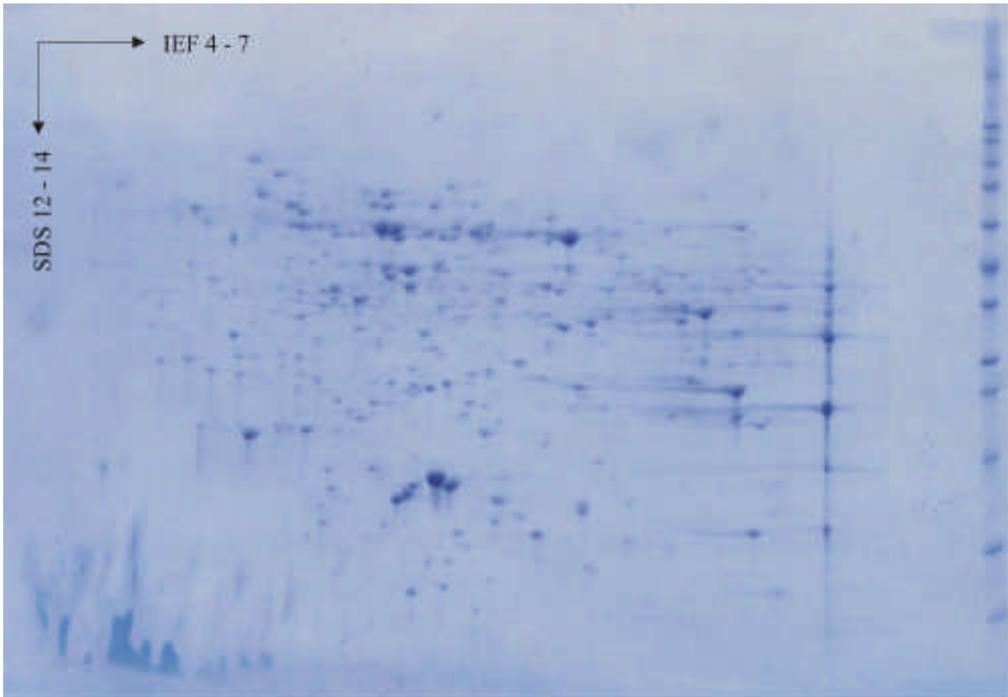


Oben: SyproRuby® Färbung

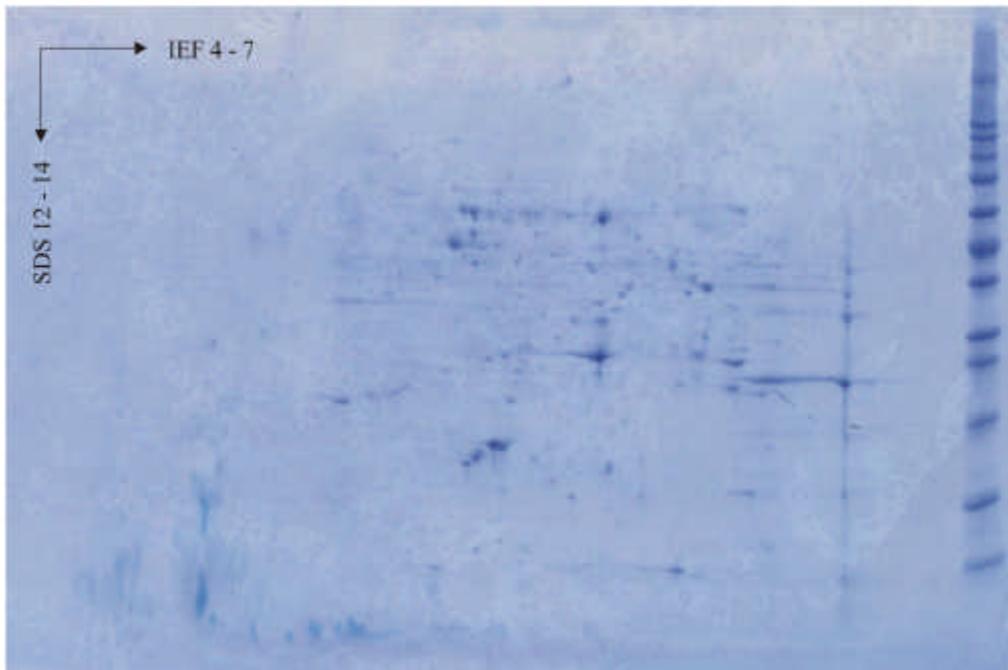
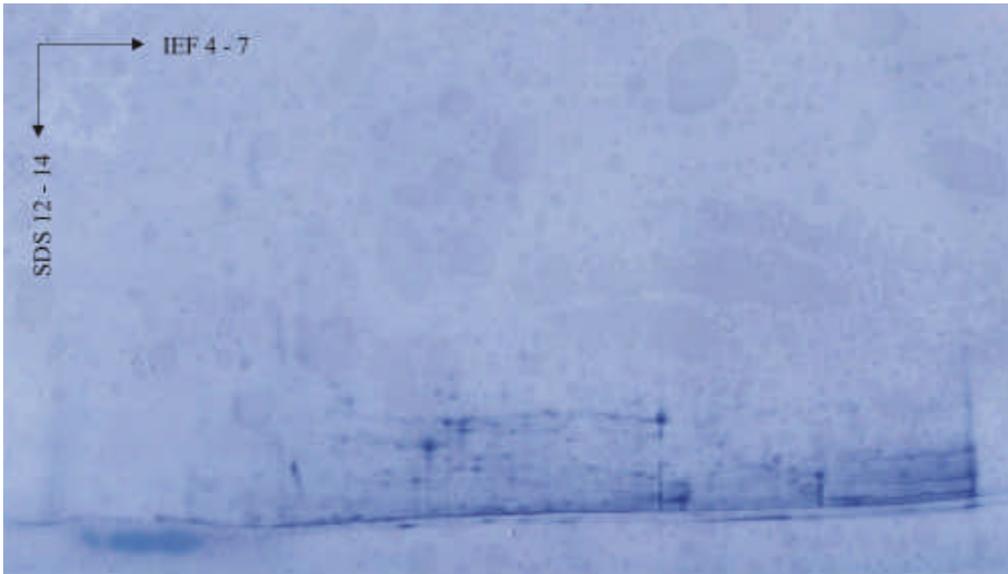


Oben: Induziert durch Methyljasmonat in geringen Konzentrationen
Colloidal-Coomassie gefärbt

Unten: Induziert durch Methyljasmonat in geringen Konzentrationen
Colloidal-Coomassie gefärbt



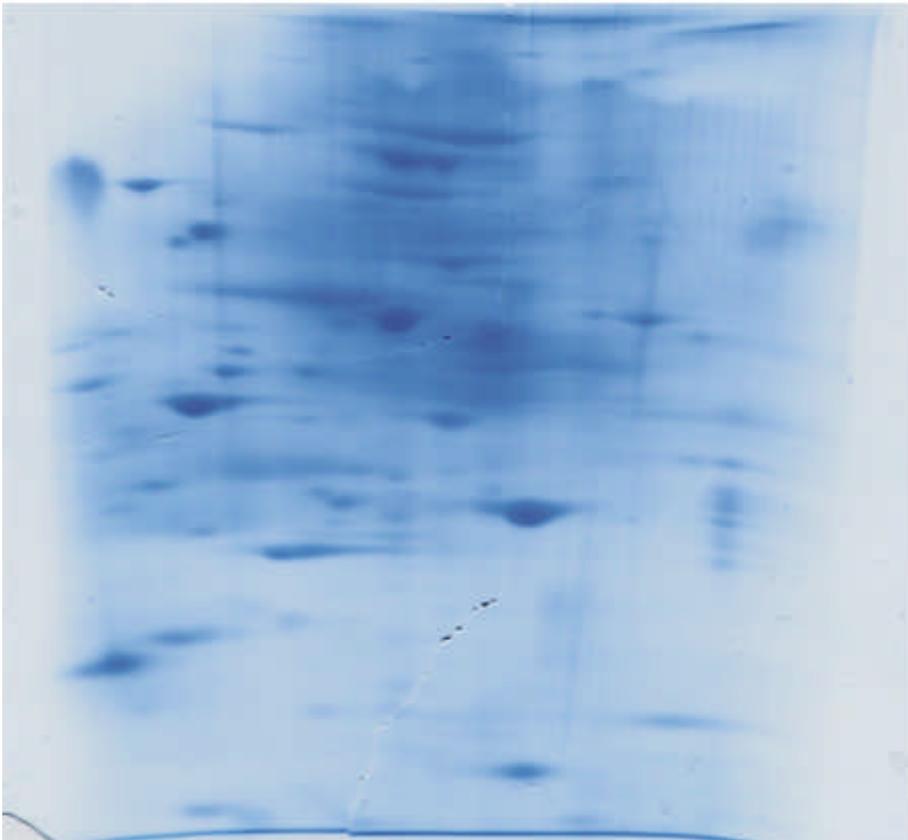
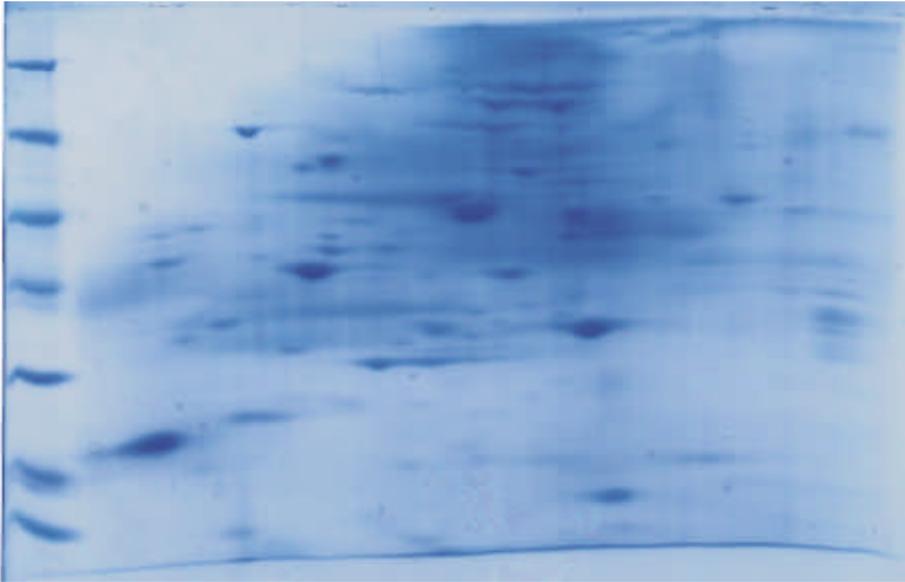
Oben: Induziert durch Methyljasmonat in geringen Konzentrationen
Colloidal-Coomassie gefärbt
Unten: Inhibiert durch Methyljasmonat in hohen Konzentrationen
Colloidal-Coomassie gefärbt



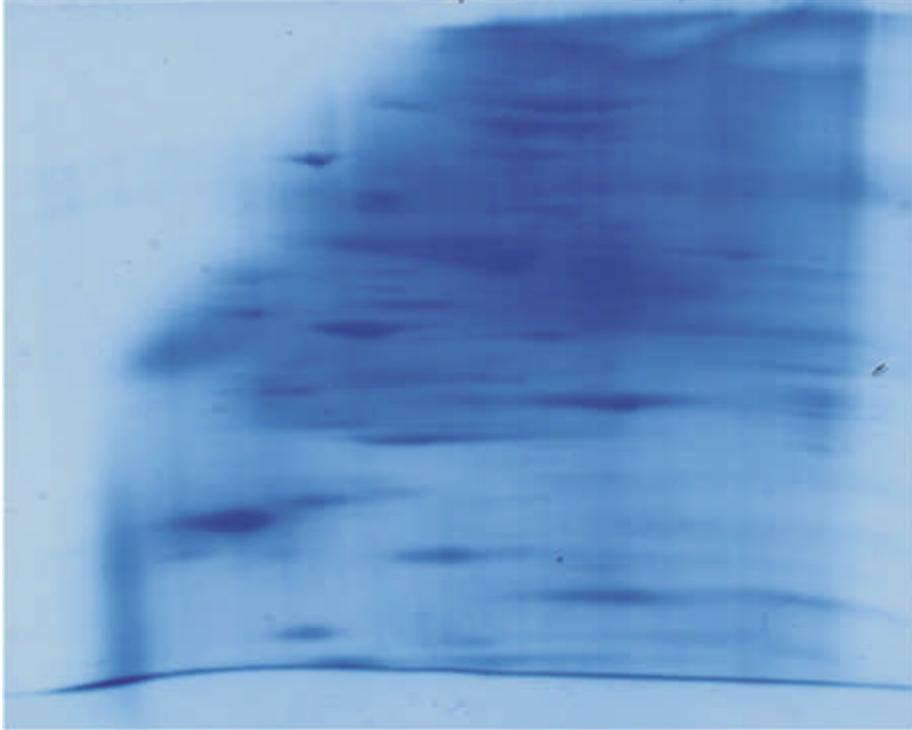
- Oben: Inhibiert durch Methyljasmonat in hohen Konzentrationen
Colloidal-Coomassie gefärbt
- Unten: Inhibiert durch Methyljasmonat in hohen Konzentrationen
Colloidal-Coomassie gefärbt

Anhang II:
Blau-Native-Polyacrylamidgele

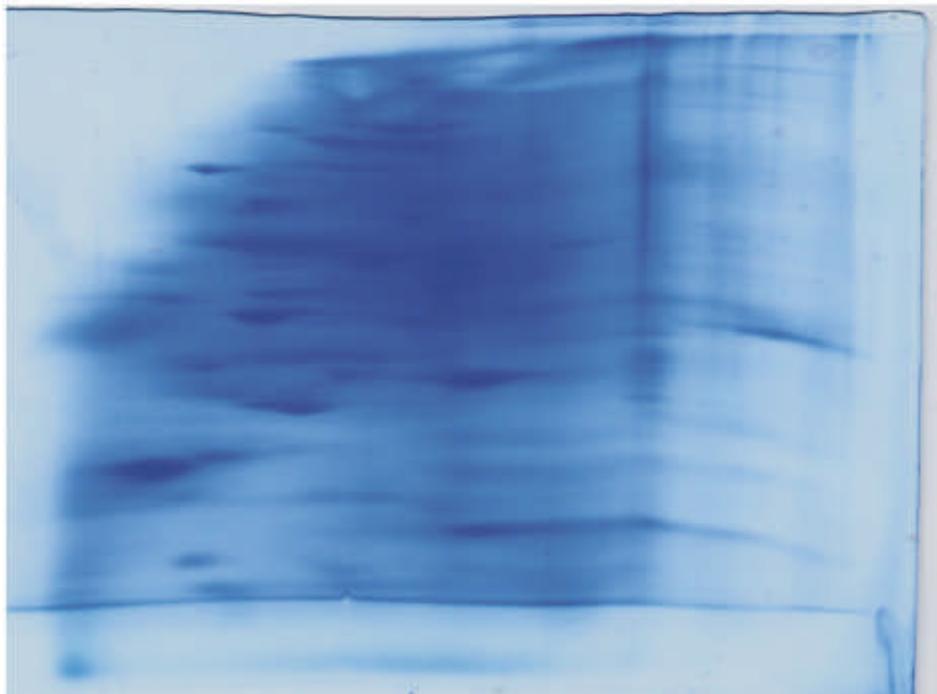
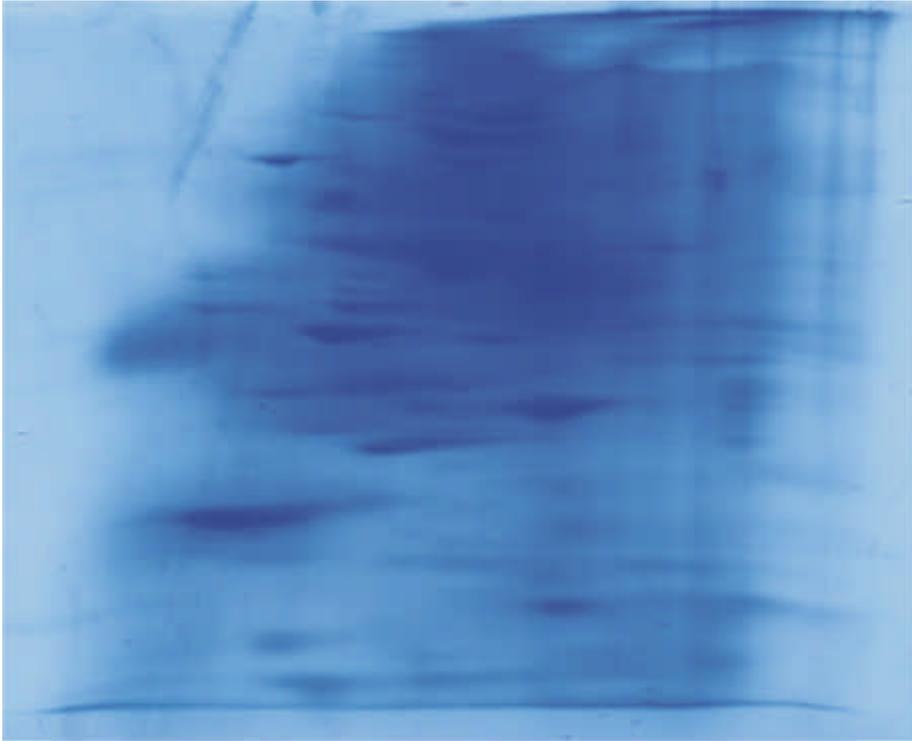
Cytosolische Fraktionen:



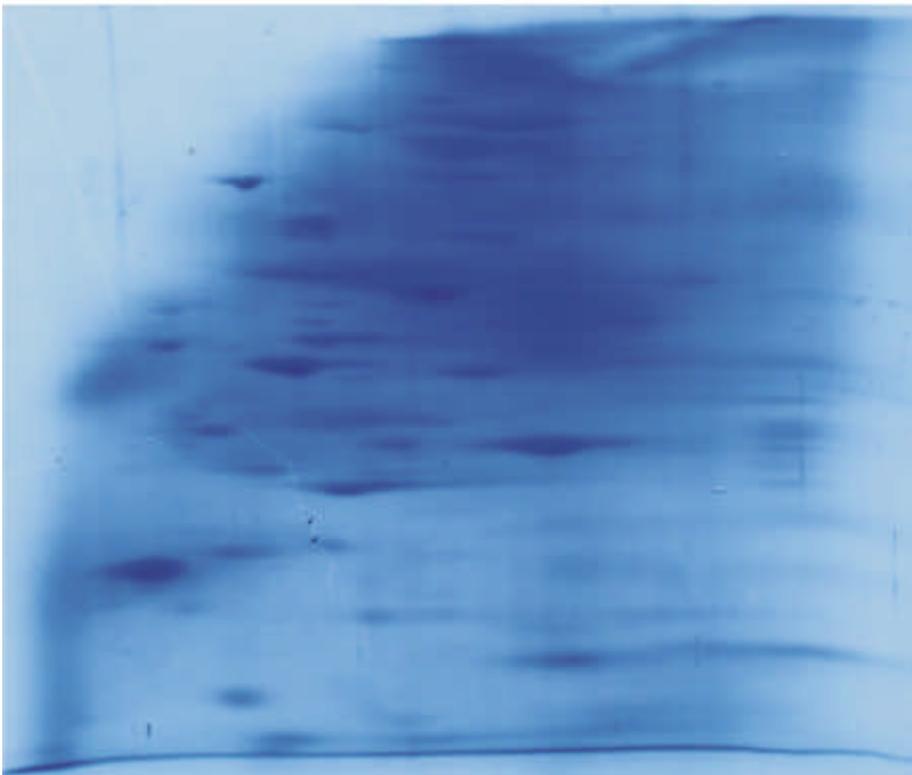
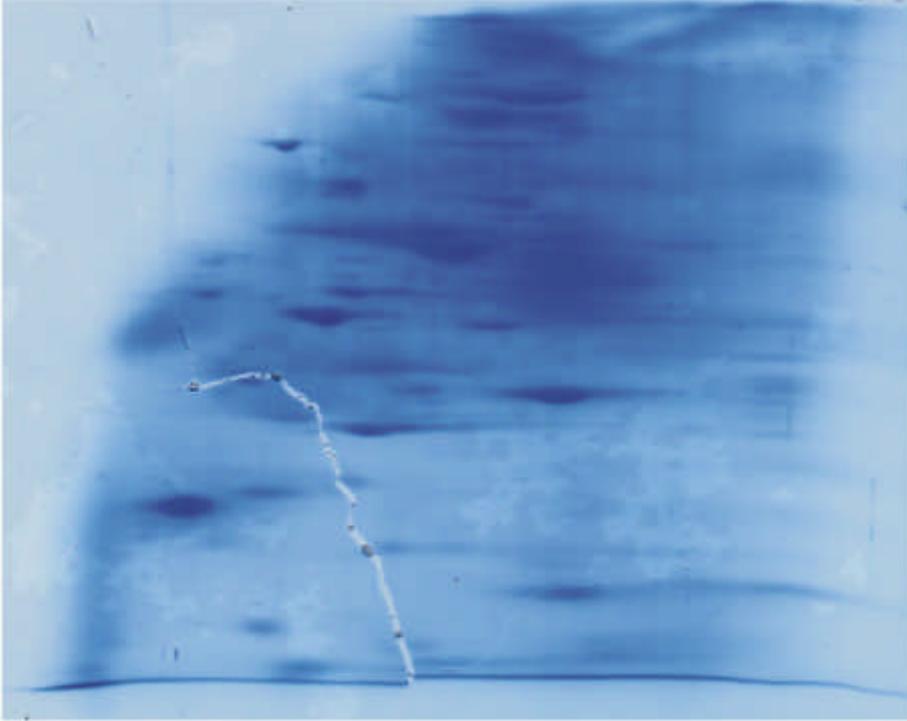
Oben: Cytosol Grundzustand
Unten: Cytosol Grundzustand



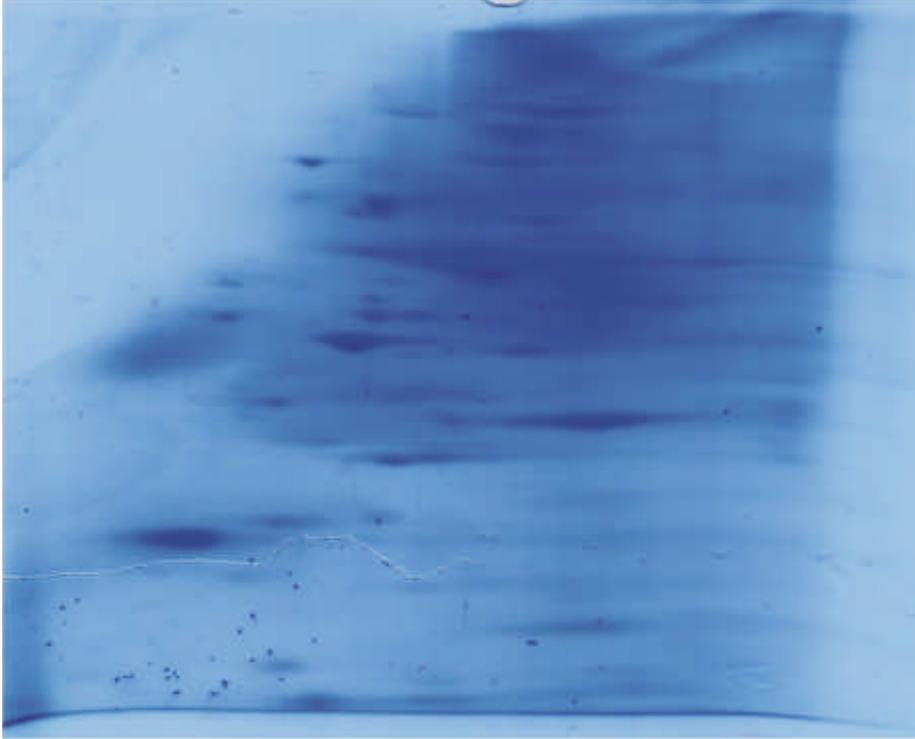
Oben: Cytosol: 1 Tag induziert mit geringer Konzentration an Methyljasmonat
Unten: Cytosol: 1 Tag induziert mit geringer Konzentration an Methyljasmonat



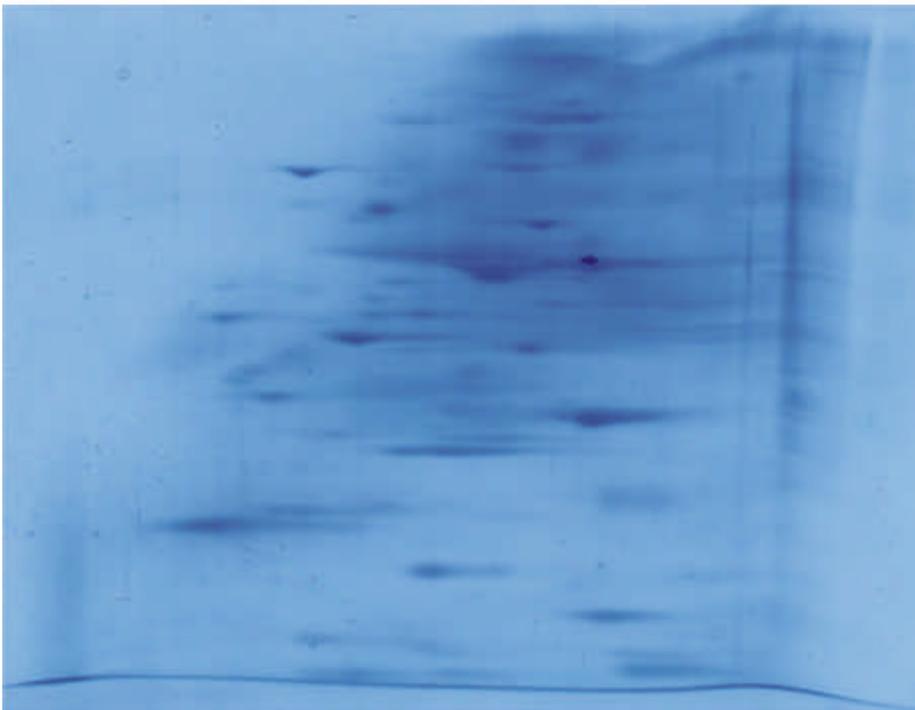
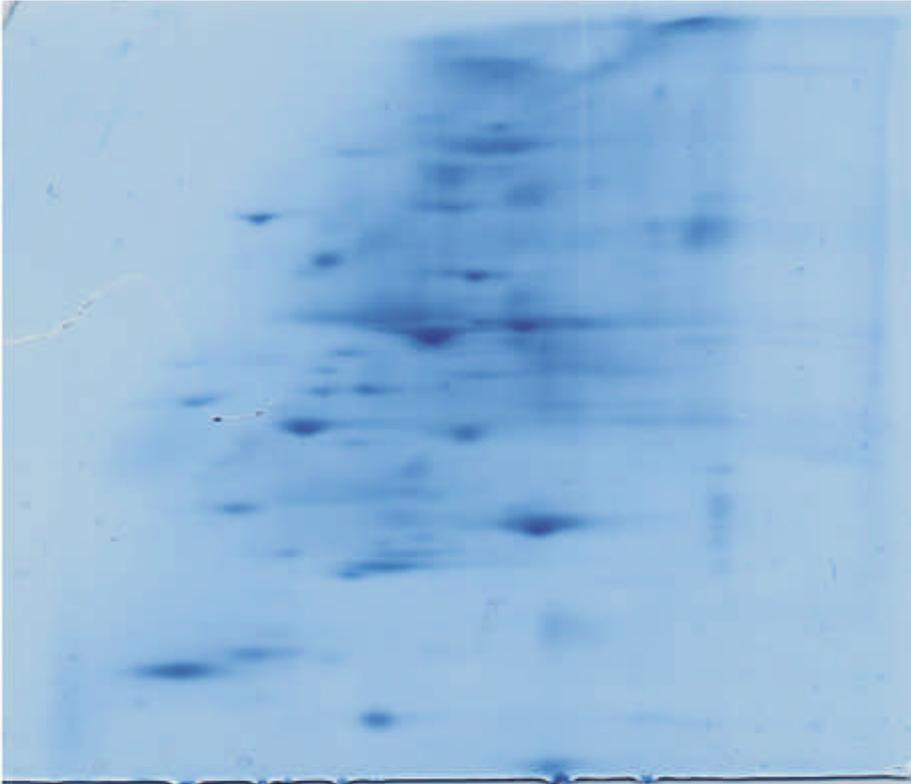
Oben: Cytosol: 2 Tage induziert mit geringer Konzentration an Methyljasmonat
Unten: Cytosol: 2 Tage induziert mit geringer Konzentration an Methyljasmonat



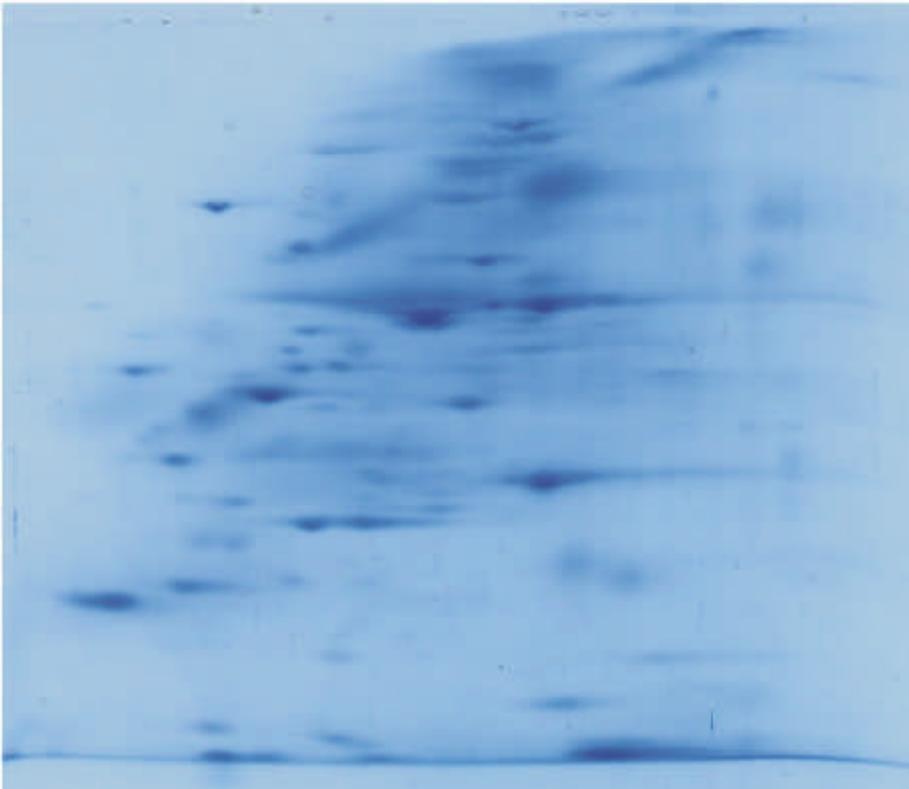
Oben: Cytosol: 3 Tage induziert mit geringer Konzentration an Methyljasmonat
Unten: Cytosol: 3 Tage induziert mit geringer Konzentration an Methyljasmonat



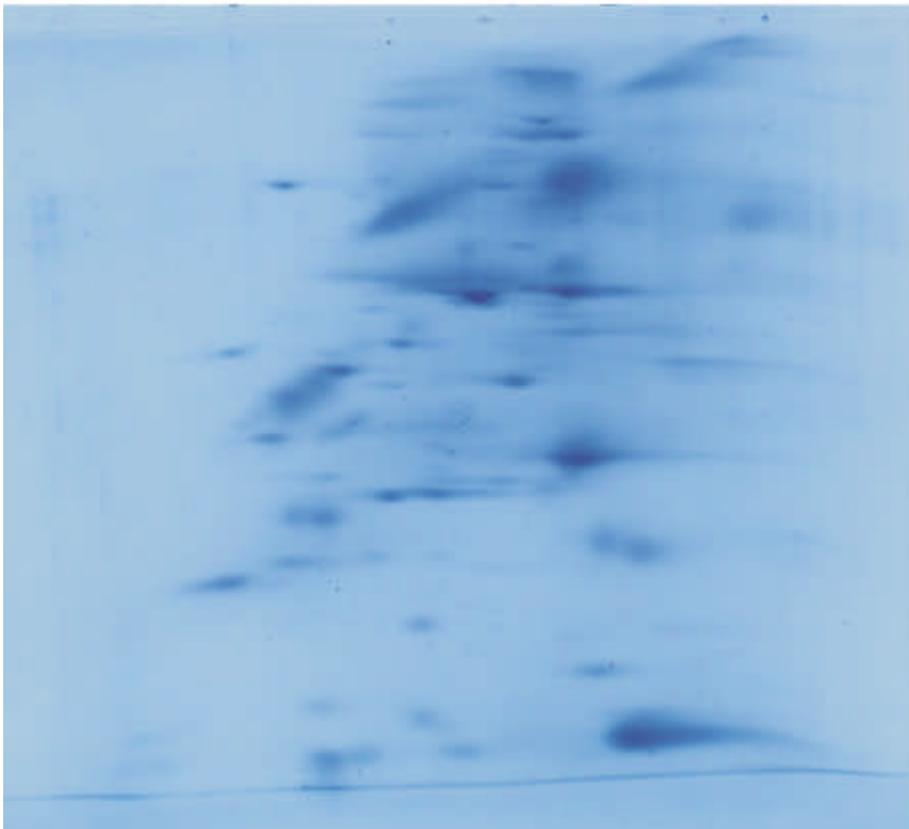
Oben: Cytosol: 4 Tage induziert mit geringer Konzentration an Methyljasmonat
Unten: Cytosol: 4 Tage induziert mit geringer Konzentration an Methyljasmonat



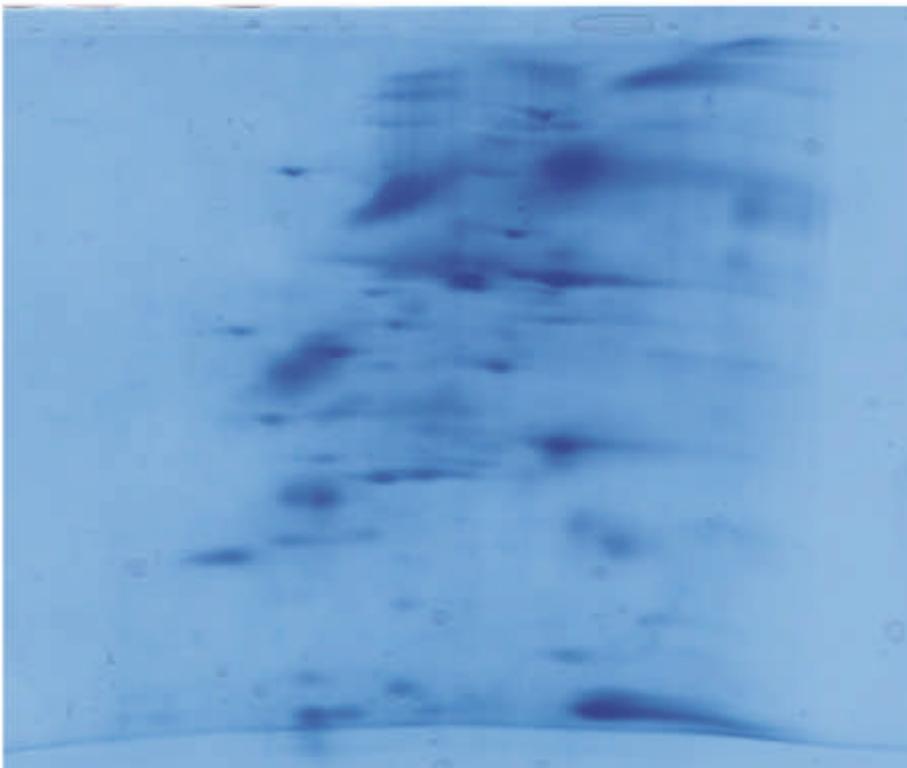
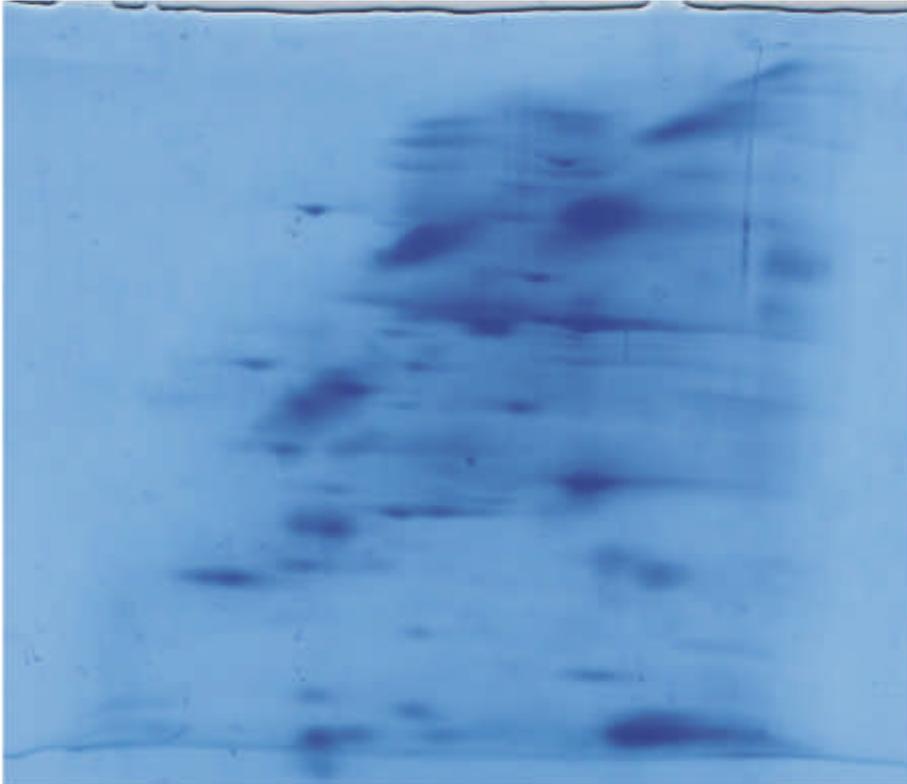
Oben: Cytosol: 1 Tag inhibiert mit hoher Konzentration an Methyljasmonat
Unten: Cytosol: 1 Tag inhibiert mit hohen Konzentration an Methyljasmonat



Oben: Cytosol: 2 Tage inhibiert mit hoher Konzentration an Methyljasmonat
Unten: Cytosol: 2 Tage inhibiert mit hoher Konzentration an Methyljasmonat

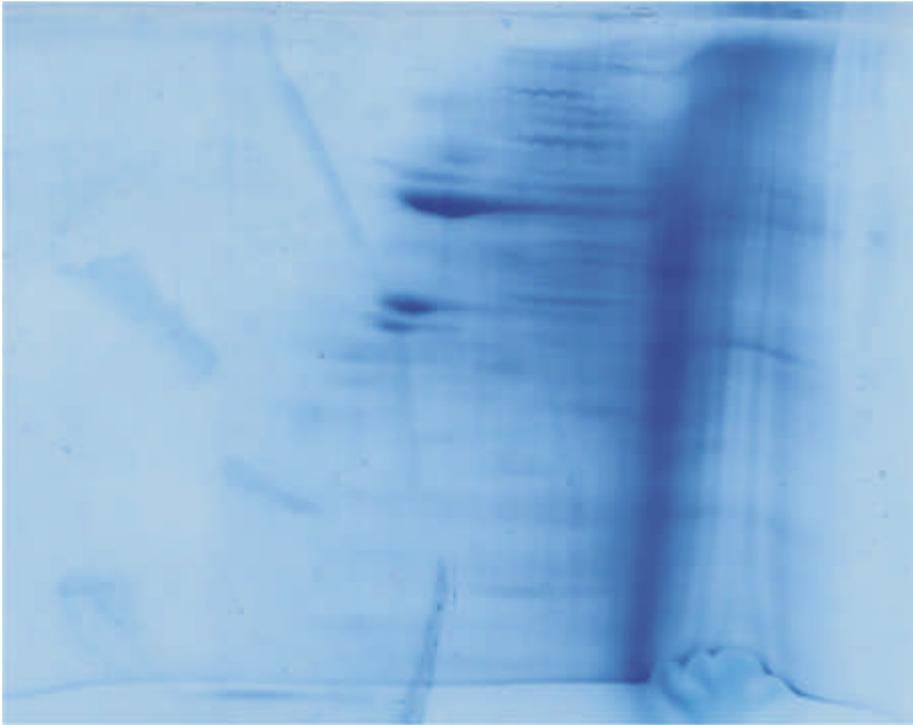


Oben: Cytosol: 3 Tage inhibiert mit hoher Konzentration an Methyljasmonat
Unten: Cytosol: 3 Tage inhibiert mit hoher Konzentration an Methyljasmonat

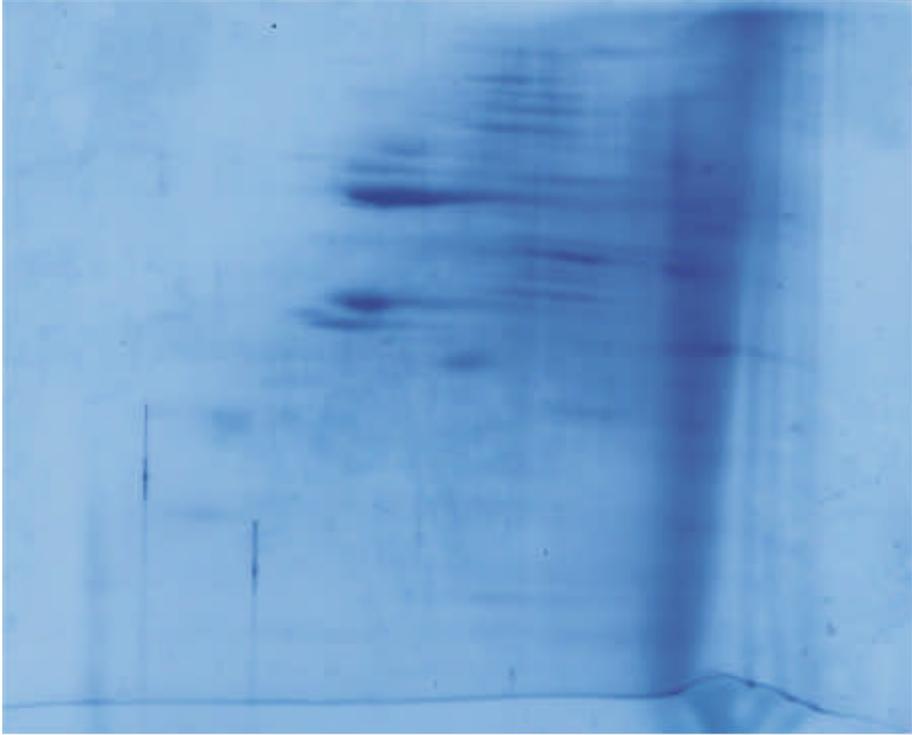


Oben: Cytosol: 4 Tage inhibiert mit hoher Konzentration an Methyljasmonat
Unten: Cytosol: 4 Tage inhibiert mit hoher Konzentration an Methyljasmonat

Membran Fraktionen:



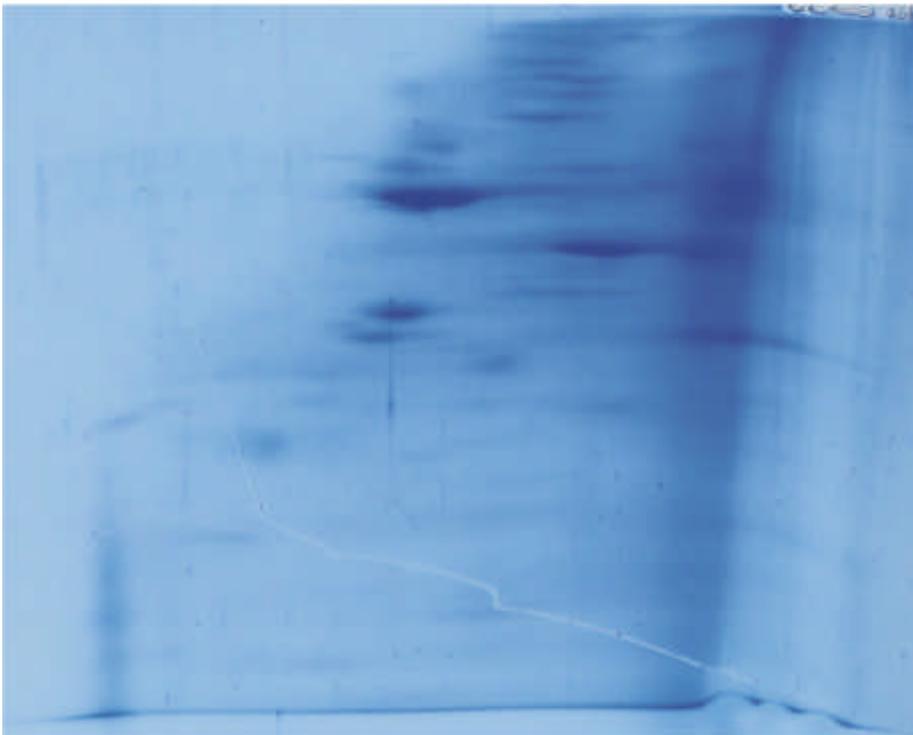
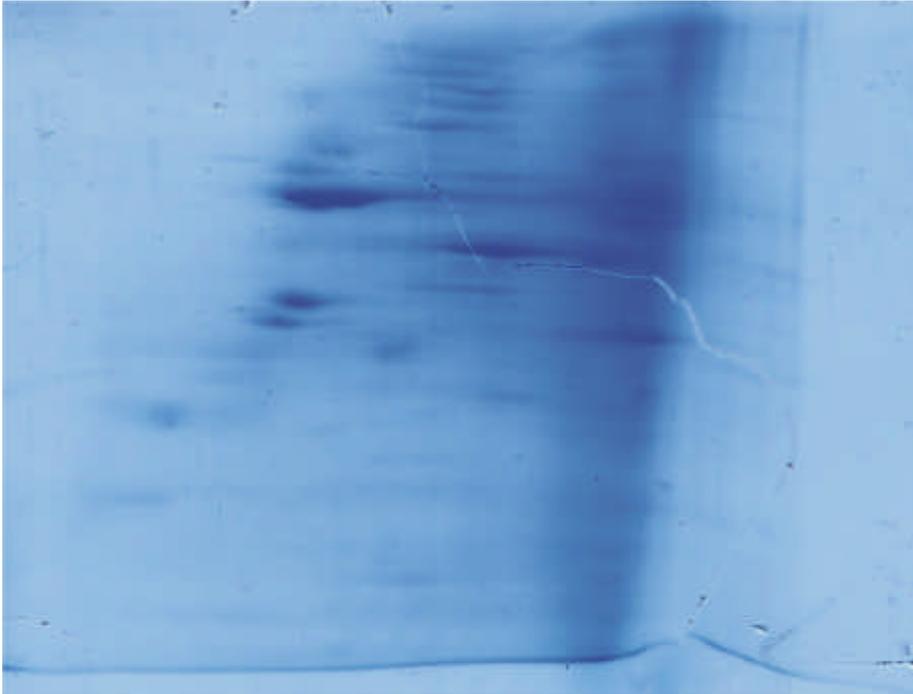
Oben: Membran: Grundzustand
Unten: Membran: Grundzustand



Oben: Membran: 1 Tag induziert mit geringer Konzentration an Methyljasmonat
Unten: Membran: 1 Tag induziert mit geringer Konzentration an Methyljasmonat



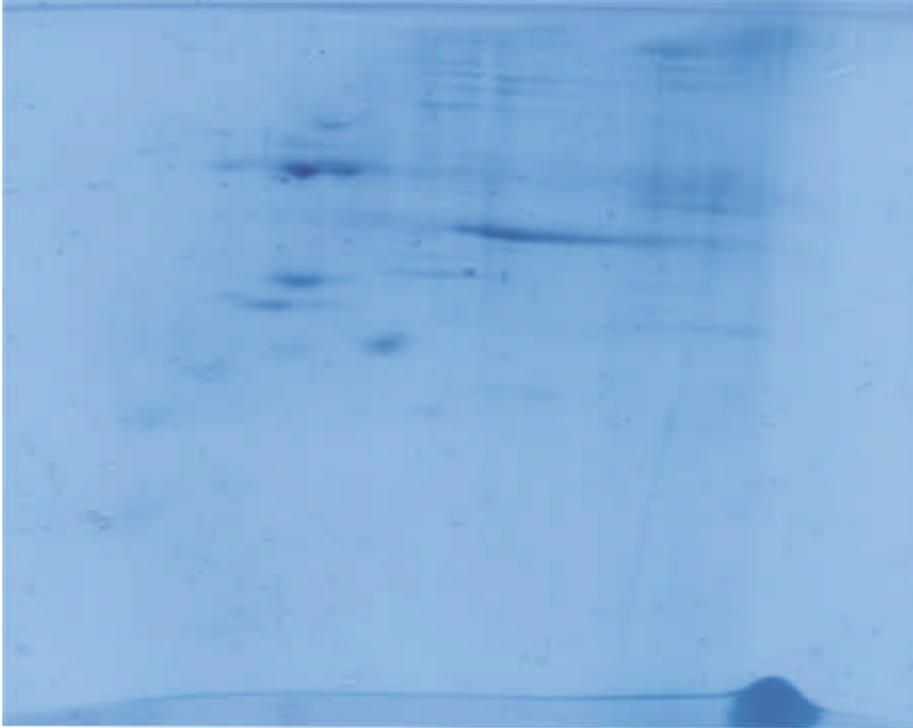
Oben: Membran: 2 Tage induziert mit geringer Konzentration an Methyljasmonat
Unten: Membran: 2 Tage induziert mit geringer Konzentration an Methyljasmonat



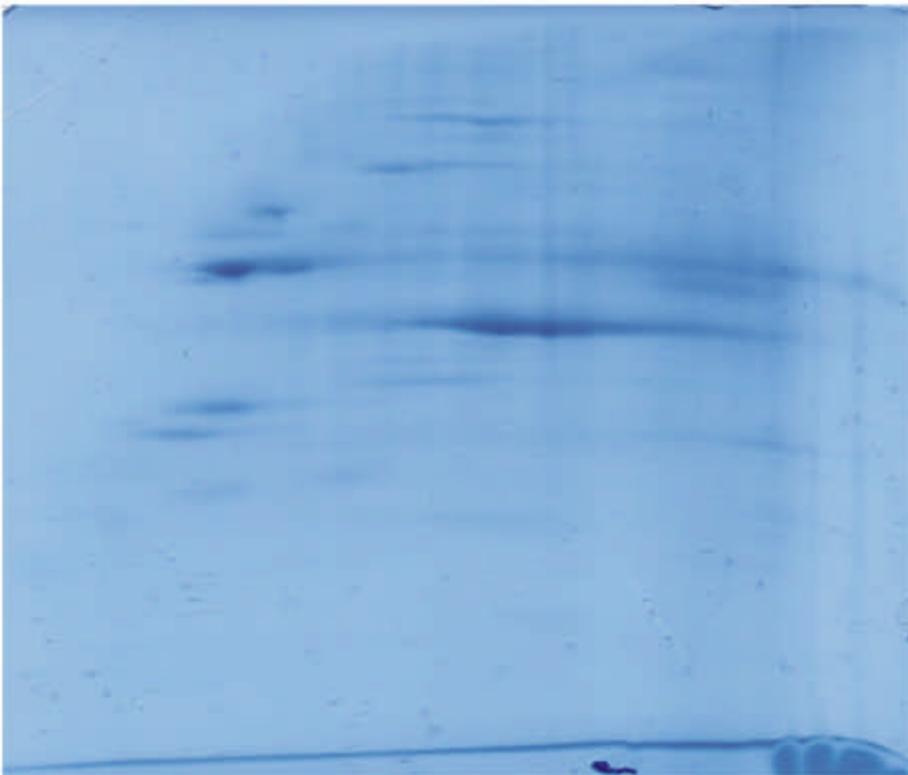
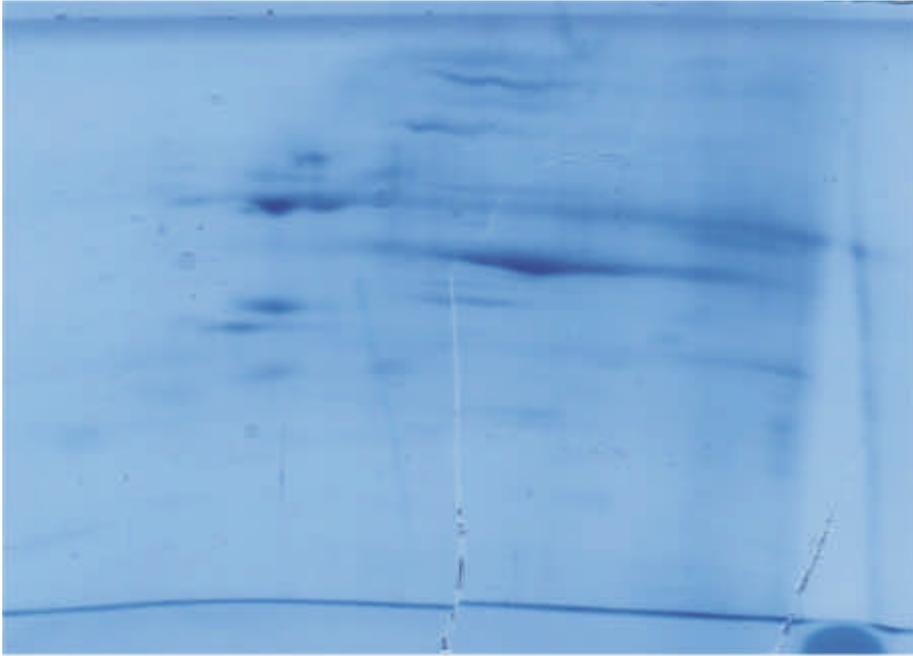
Oben: Membran: 3 Tage induziert mit geringer Konzentration an Methyljasmonat
Unten: Membran: 3 Tage induziert mit geringer Konzentration an Methyljasmonat



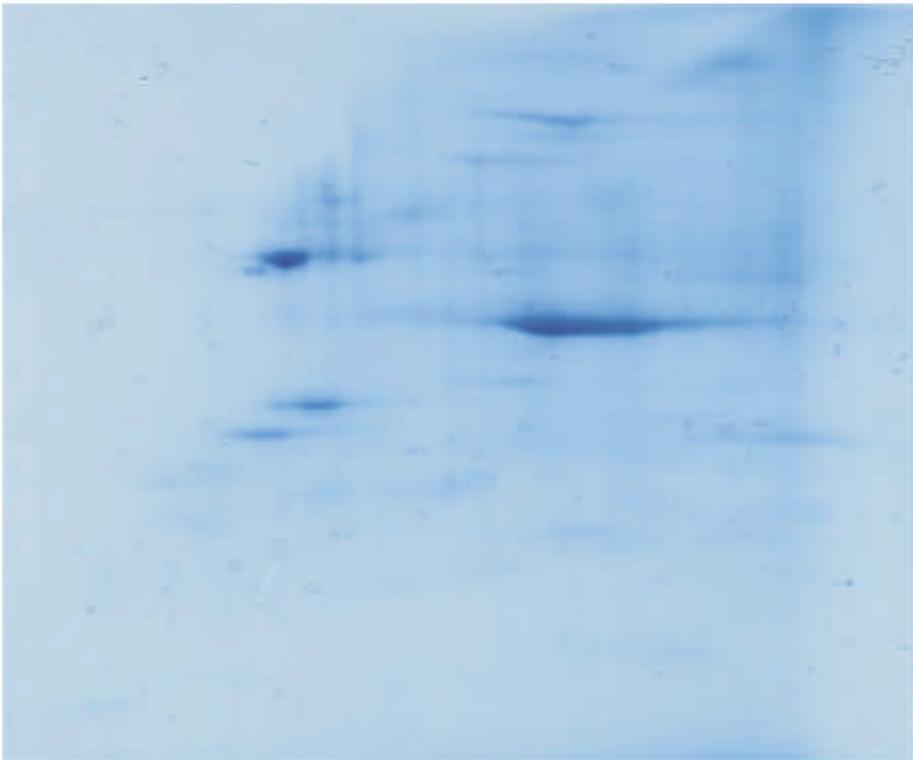
Oben: Membran: 4 Tage induziert mit geringer Konzentration an Methyljasmonat
Unten: Membran: 4 Tage induziert mit geringer Konzentration an Methyljasmonat



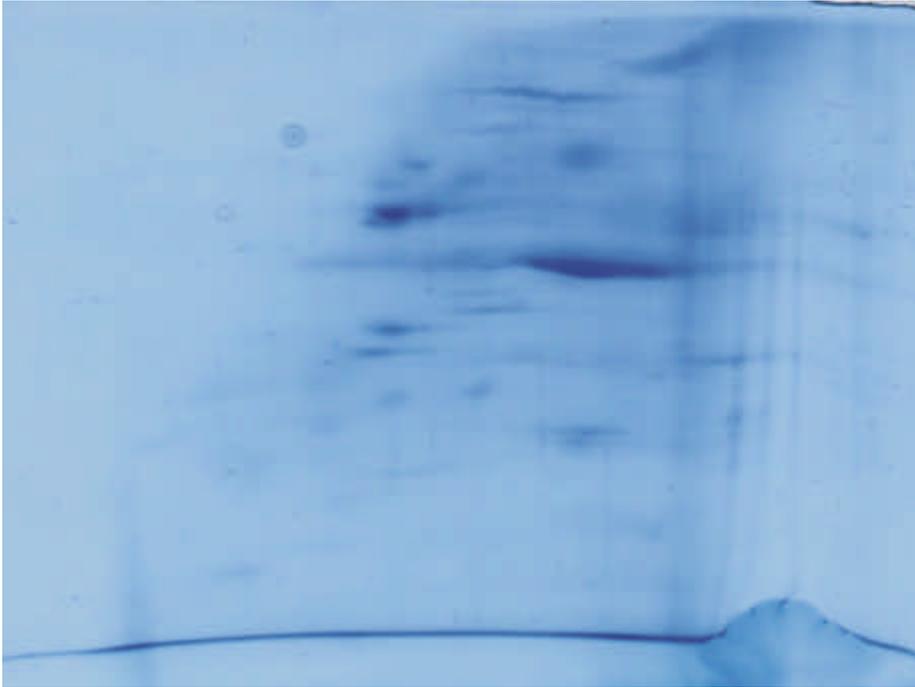
Oben: Membran: 1 Tag inhibiert mit hoher Konzentration an Methyljasmonat
Unten: Membran: 1 Tag inhibiert mit hoher Konzentration an Methyljasmonat



Oben: Membran: 2 Tage inhibiert mit hoher Konzentration an Methyljasmonat
Unten: Membran: 2 Tage inhibiert mit hoher Konzentration an Methyljasmonat

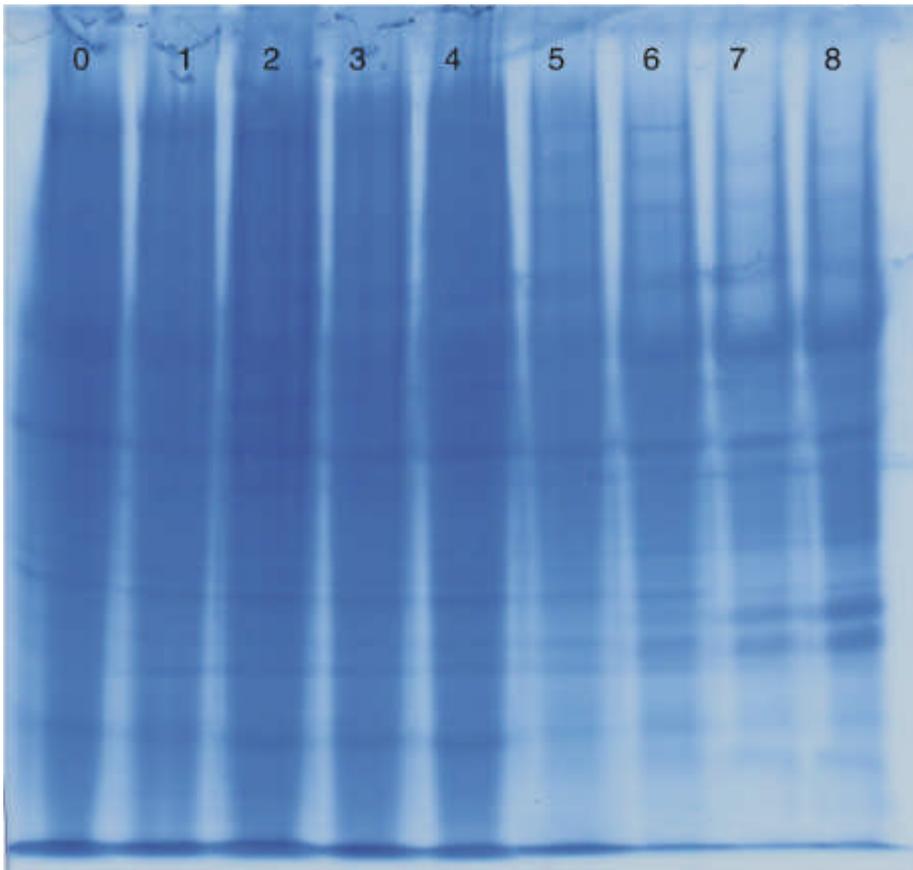


Oben: Membran: 3 Tage inhibiert mit hoher Konzentration an Methyljasmonat
Unten: Membran: 3 Tage inhibiert mit hoher Konzentration an Methyljasmonat



Oben: Membran: 4 Tage inhibiert mit hoher Konzentration an Methyljasmonat

1. Dimension Cytosol



- Spur 0: 4 Tage induziert mit niedriger Konzentration an Methyljasmonat
- Spur 1: 3 Tage induziert mit niedriger Konzentration an Methyljasmonat
- Spur 2: 2 Tage induziert mit niedriger Konzentration an Methyljasmonat
- Spur 3: 1 Tag induziert mit niedriger Konzentration an Methyljasmonat
- Spur 4: Grundzustand
- Spur 5: 1 Tag inhibiert mit hoher Konzentration an Methyljasmonat
- Spur 6: 2 Tage inhibiert mit hoher Konzentration an Methyljasmonat
- Spur 7: 3 Tage inhibiert mit hoher Konzentration an Methyljasmonat
- Spur 8: 4 Tage inhibiert mit hoher Konzentration an Methyljasmonat

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name: Gaby Morlock
Geboren am: 18. Februar 1974
Geburtsort: Pforzheim
Nationalität: Deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

Aug. 1980-Juni 1984 Grundschohle in Stein
Aug. 1984-Juni 1990 Realschohle in Königsbach
Abschluss: Mittlere Reife
Aug. 1990-Mai 1993 Technisches Gymnasium in Pforzheim
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

Okt. 1993-Aug. 1996 Chemiestudium an der Universität Karlsruhe (TH)
Aug. 1996-Juli 1997 Chemiestudium an der University of Manchester
Institute of Science and Technology (UMIST)
Abschluss: Bachelor of Science
Okt. 1997- Jan. 1998 Chemiestudium an der Universität Karlsruhe (TH)
Feb. 1999-Aug. 1999 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biochemie der Universität
Karlsruhe unter der Leitung von Prof. Dr. J. Rétey
Thema: Untersuchung zum aktiven Zentrum der
Phenylalanin Ammoniak-Lyase (EC 4.3.1.5): Herstellung
und Untersuchung der Mutanten N259A, R353A, E428A,
E483, Q487A
Aug. 1999 Hauptdiplom Chemie
Okt. 1999 Wissenschaftliche Angestellte und
Beginn der Dissertation am Lehrstuhl für Biochemie der
Universität Karlsruhe unter der Leitung von Prof. Dr. J.
Rétey