

**Molekularbiologische und immunbiochemische
Charakterisierung
der Antigene des monoklonalen Antikörpers TIM-11B2**

vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Biochem. Bustanur Rosidi

geboren am 09.02.1966

in Nganjuk, Indonesien

2001

Referent : Prof. Dr. W. Müller

Korreferent : Prof. Dr. H.-J. Jacobsen

Tag der Promotion : 13. Juli 2001

Abstract

The monoclonal antibody TIM11-B2 was developed to characterize a 40 kDa protein correlated with the elongation growth of pea seedlings (Reinard *et al.*, 1994; Sprunck, 1996). The aim of this study was to characterize a co-migrating second antigen of TIM-11B2, which had not been identified so far. An immunostaining with TIM-11B2 following a native PAGE of pea crude extract could separate the antigens into two distinct protein bands. The lower band was previously identified as a cytosolic isoenzyme of fructose-1,6-bisphosphate aldolase. The second band („the upper band“) showing no recognition by anti cytosolic aldolase polyclonal antibodies was cut out from a native polyacrylamide gel and the protein was isolated by electroelution. The homology comparison of the microsequences achieved after microsequencing of the 40 kDa eluate led to the cytosolic isoenzymes of glutamine synthetase GS3A/B (three peptides) and GS1 (one peptide).

The genes coding for *cALD1*, *cALD2*, *GS1* and *GS3A* were successfully amplified from a pea seedling cDNA pool via PCR using specific primers. The DNA fragments were cloned into pGemT vector and then subcloned into the expression vector pET32(a+). TIM-11B2 immunostaining of recombinant proteins overexpressed in *E. coli* BLR(DE3) bacteria confirmed that this monoclonal antibody indeed recognizes all of these recombinant proteins.

By alignment and comparison of their hydropathy, antigenic index and surface probability plots a putative epitope for TIM-11B2 could be located within the amino acid sequences of *cALD1*, *cALD2*, *GS3A*, *GS3B* and *GS1*. This potential epitope consisting of 8 amino acids is represented by the constitutive sequence DG*(T/S)T*Q*. The multispecificity of the monoclonal antibody TIM-11B2 is discussed.

Polyclonal antibodies against *cALD2* (antisera „575/737“) as well as antibodies against *GS3A* (antisera „514/518“) were successfully raised in rabbits. These antibodies were shown to be specifically recognizing their own antigen by immunostaining and no cross reactions were found. Anti *cALD2* antisera „575“ could successfully be applied in immunocytochemical studies. Only the cytoplasm was specifically labelled with gold particles.

The northern analysis of tissue sections of 12 d old etiolated pea seedling using the corresponding cDNA of *GS3A*, *cALD2*, *GS1* as well as *cALD1* as probes showed that *cALD1*, *cALD2* and *GS1* are specifically expressed only in the tissue sections mostly undergoing elongation growth, whereas *GS3A* remains almost constantly expressed over the whole tissue sections examined. About the possible distinct roles of each individual isoenzyme during development of seedling is discussed.

Keywords : aldolase, glutamine synthetase, pea.

Kurzfassung

Der monoklonale Antikörper TIM-11B2 wurde zur Charakterisierung eines 40 kDa großen Proteins entwickelt, dessen Abundanz in Korrelation mit dem Streckungswachstum der Erbsenkeimlinge steht (Reinard *et al.*, 1994; Sprunck, 1996). Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, das zweite co-migrierende und bisher noch nicht identifizierte Antigen von TIM-11B2 zu charakterisieren. In einer Immunfärbung nach einer nativen PAGE von Erbsenrohextrakt wurden zwei distinkte Proteinbanden durch TIM-11B2 spezifisch erkannt. Die untere Bande war bereits als cytosolische Isoenzyme der Fructose-1,6-Biphosphat-Aldolase identifiziert worden. Die zweite, nicht durch den Anti-cytosolische Aldolase Antikörper detektierte, „obere“ Bande wurde aus einem nativen Polyacrylamidgel ausgeschnitten und die Proteine durch Elektroelution isoliert. Die nach der Mikrosequenzierung des 40 kDa Eluates erhaltenen Mikrosequenzen konnten als legitime Lys-C-Proteolyseprodukte von cytosolischen Glutaminsynthetasen GS3A/B (3 Peptide) bzw. GS1 (1 Peptid) identifiziert werden.

Mit Hilfe von spezifischen Primern wurden die Gene für cALD1, cALD2, GS3A und GS1 erfolgreich aus einer Erbsenkeimlingen-cDNA mittels PCR amplifiziert werden. Die DNA-Fragmente wurden zuerst in pGemT-Vektor und anschließend in den Expressionsvektor pET32(a+) kloniert. In einer Immunfärbung konnte gezeigt werden, dass der monoklonale Antikörper TIM-11B2, wenn auch unterschiedlich stark, alle der in *E. coli*-BLR(DE3)-Zellen überexprimierten, rekombinanten Proteine erkennt.

Durch ein „Alignment“ der Aminosäuresequenzen von cALD1, cALD2, GS3A, GS3B und GS1 und Vergleiche der dazugehörigen Hydrophathie-, Antigenizitäts- und Oberflächenwahrscheinlichkeit-Plots konnte ein mutmaßliches Epitop für TIM-11B2 auf diesen Sequenzen lokalisiert werden. Dieses potentielle Epitop besteht aus 8 Aminosäuren und wird durch die Sequenz DG*(T/S)T*Q* vertreten. Die multispezifische Natur des monoklonalen Antikörpers TIM-11B2 wird diskutiert.

Zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern wurden Kaninchen mit rek. cALD2 bzw. rek. GS3A immunisiert. Die resultierenden polyklonalen Antikörper sind jeweils gegen cALD2 (Antiseren „575/737“) bzw. gegen GS3A (Antiseren „514/518“) spezifisch. Die Anti-cALD2-Antikörper „575“ konnten erfolgreich in immunocytochemischen Untersuchungen eingesetzt werden. Immungold-markierungen mit „575“-Antiseren als Erst-Antikörper zeigten eine spezifische cytoplasmatische Markierung.

Die Northern-Analysen der Gewebesegmente von 12 d etiolierten Erbsenkeimlingen mit *cALD1*-, *cALD2*-, *GS1*-, und *GS3A*-cDNA als Sonden zeigten, dass es eine Korrelation zwischen der Expression von *cALD1*, *cALD2* und *GS1* mit dem Streckungswachstum besteht. Das *GS3A*-Gen wird in den untersuchten Geweben dagegen relativ gleichmäßig exprimiert. Über die mögliche unterschiedliche Rolle der einzelnen Isoenzyme während der Entwicklung wird diskutiert.

Schlagwörter: Aldolase, Erbse, Glutaminsynthetase,

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Pflanzenwachstum	1
1.1.1. Etablierung eines Keimlings und post-germinatives Wachstum	1
1.1.2. Zellstreckungswachstum	3
1.2. Aldolase	5
1.3. Glutaminsynthetase	8
1.4. Aufgabenstellung	11
2. MATERIAL UND METHODEN	13
2.1. MATERIAL	13
2.1.1. Pflanzenmaterial	13
2.1.2. Bakterienstämme	13
2.1.3. Vektoren	14
2.1.4. Oligonucleotide	15
2.1.5. Verwendete Molekulargewichtsmarker	16
2.1.6. Antikörper	17
2.1.7. Verwendete Kits	18
2.1.8. Chemikalien	18
2.2. PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	19
2.2.1. Proteinextraktion	19
2.2.1.1. Proteinextraktion aus Erbsenkeimlingen	19
2.2.1.2. Proteinextraktion aus Bakterien	20
2.2.2. Aufreinigung von rekombinanten Proteinen	21
2.2.2.1. Affinitätschromatographie mittels His•Bind-Säule	21
2.2.2.2. Spaltung mit Enterokinase	22

2.2.2.3. Aufreinigung mittels präparativer SDS-PAGE	22
2.2.3. Proteinbestimmung	23
2.2.4. Fällungsmethoden	23
2.2.4.1. Methanol-Aceton-Fällung	23
2.2.4.2. TCA-Fällung	23
2.2.5. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	24
2.2.5.1. SDS-PAGE	24
a. Probenvorbereitung	24
b. SDS-PAGE Mini-Gelsystem	24
c. Präparative SDS-PAGE	25
2.2.5.2. Native PAGE	26
2.2.6. Färbemethoden für PAGE	27
2.2.6.1. Coomassie-Färbung	27
2.2.6.2. Silberfärbung	27
2.2.6.3. Kupferchloridfärbung	28
2.2.7. Elektroelution	28
2.2.8. Proteinaufreinigung für die Aminosäuresequenzierung	29
2.2.8.1. Isolierung des 40 kD-Proteins aus der “oberen” Bande	29
2.2.8.2. Cys-Derivatisierung	30
2.2.8.3. Aminosäuresequenzierung	31
2.2.9. Immunbiochemische Methoden	31
2.2.9.1. Protein-Transfer (Western-Blot)	31
a. „Semi-Dry-Blotting“ und Ponceau-Färbung	31
b. „Tank-Blotting“	32
2.2.9.2. Immunfärbungen	33
2.2.10. Gewinnung von polyklonalen Antikörpern aus Kaninchen	35
2.2.10.1. Immunisierung von Kaninchen	35
2.2.10.2. Immunfärbung zur Überprüfung der spezifischen Immunantwort ..	35
2.2.11. Immuncytochemische Untersuchungen	36
2.2.11.1. Fixierung und Einbettung der Pflanzenpräparate	36
2.2.11.2. Immunogoldmarkierung der Ultradünnschnitte	36

2.3. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	38
2.3.1. Anzucht von Bakterien	38
2.3.1.1. Anzucht von Bakterien in Flüssigmedium	38
2.3.1.2. Anlegen einer Dauerkultur (Glycerin-Stammkultur)	39
2.3.2. Transformation von Bakterienzellen	39
2.3.2.1. Herstellung von transformationskompetenten Bakterien	39
2.3.2.2. Transformation von kompetenten <i>E.coli</i> XL1-Blue-Zellen	40
2.3.2.3. Transformation von kompetenten <i>E.coli</i> BLR(DE3)-Zellen	41
2.3.3. Isolierung von DNA	41
2.3.3.1. Plasmid-Minipräparation aus Übernachtskulturen	41
2.3.3.2. Plasmid-Präparation mittels Nucleobond® Nucleic Acid Purification	42
2.3.3.3. DNA-Isolierung aus Agarosegel	43
2.3.3.4. Isolierung von PCR-Produkten	43
2.3.4. Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen	43
2.3.4.1. Isolierung von Gesamt-RNA mit TRIZOL®-Reagenz	43
2.3.4.2. Isolierung von Gesamt-RNA mittels RNeasy-Kit	44
2.3.5. Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	44
2.3.5.1. Konzentrationsbestimmung von DNA	44
2.3.5.2. Konzentrationsbestimmung von RNA	45
2.3.6. Agarosegelelektrophorese	45
2.3.6.1. Agarosegelelektrophorese für DNA	45
2.3.6.2. Denaturierende Agarosegelelektrophorese für RNA	46
2.3.7. Restriktionsendonuclease-Reaktionen	47
2.3.8. Klonierung von DNA-Fragmenten	47
2.3.8.1. T-Vektor-Klonierung	47
2.3.8.2. Ligation von DNA Fragmenten mit Vektor-DNA	48
2.3.9. Herstellung von cDNA aus Erbsenkeimlingen	49
2.3.10. PCR	49
2.3.10.1. Kolonie-PCR	50
2.3.10.2. PCR zur Herstellung DIG-markierter Sonden	51
2.3.11. Northern-Analyse	52
2.3.11.1. Kapillartransfer von RNA auf eine Nylonmembran	52

2.3.11.2. Fixierung der RNA auf einer Nylonmembran	52
2.3.11.3. Prähybridisierung und Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden	53
2.3.11.4. Detektion hybridisierter DIG-markierter Sonden	53
a. Posthybridisierungswaschschritte	53
b. Chemilumineszente Detektion mit CDP- <i>Star</i> [®]	53
2.3.11.5. Sondenentfernung und Rehybridisierung	55
2.3.11.6. Densitometrische Auswertung des Northern-Blots	55
2.3.12. DNA-Sequenzierung	56
2.3.13. Computergestützte Sequenzanalyse und Internet-Ressourcen	56
3. ERGEBNISSE	58
3.1. Aufreinigung des weiteren TIM-11B2-Antigens	58
3.1.1. Immunfärbung nach nativer Gelelektrophorese	58
3.1.2. Aufreinigung des 40 kDa-Protein aus der „oberen“ Bande	59
3.1.3. Gelelektrophoretische Analyse und Immunodetektion des Eluat aus der „oberen“ Bande	60
3.2. Mikrosequenzierung des 40 kDa-Proteins aus der „oberen Bande“	62
3.2.1. Präparative SDS-PAGE und Blotten auf PVDF-Membran	62
3.2.2. Verdau mit LysC-Endopeptidase und HPLC der Spaltprodukte	63
3.2.3. Ergebnisse der Mikrosequenzierung des 40 kDa-Proteins aus der oberen Bande	64
3.3. Klonierung von <i>GS3A</i> , <i>GSI</i> , <i>cALD2</i> und <i>cALD1</i>	65
3.3.1. PCR zur Amplifikation der Gene aus Erbsen-cDNA	66
3.3.2. Klonierung in pGemT	69
3.3.3. Subklonierung in den Expressionsvektor pET32(a+)	69
3.4. Expression der rekombinanten cALD1, cALD2, GS3A und GS1 in <i>E. coli</i>	71
3.4.1. Induktion der Expression	71
3.4.2. Immunfärbung der rekombinanten Proteine mit TIM11-B2	74
3.5. Aufreinigung der rekombinanten GS3A und cALD2 zur Immunisierung von Kaninchen	75
3.5.1. Aufreinigung von rek. cALD2 mittels HisBind-Säule	75
3.5.2. Versuch zur Enterokinasespaltung der rek. cALD2	76

3.5.3. Aufreinigung der rekombinanten GS3A	78
3.5.4. Aufreinigung von rek.cALD2 und GS3A mittels präparativer SDS-PAGE .	79
3.6. Herstellung von polyklonalen Antiseren	80
3.7. Immunfärbung des grünen Blattgewebes mit den anti-cALD2-Antikörpern „575/737“ und den anti-GS3A-Antikörpern „514/518“	83
3.8. Untersuchung der Spezifität der polyklonalen Antiseren	84
3.9. Immuncytochemische Untersuchungen mit polyklonalen Antikörper 575/737 und 514/518	85
3.10. Northern-Analysen	89
3.10.1. Northern-Detektion mit <i>GS3A</i> - und <i>cALD2</i> -Sonde	91
3.10.2. Northern-Detektion mit <i>GS1</i> - und <i>cALD1</i> -Sonde	93
4. DISKUSSION	96
4.1. Aufreinigung eines weiteren Antigens von TIM-11B2	96
4.2. Identifizierung der „oberen Bande“ als Glutaminsynthetase	98
4.3. Multispezifität des monoklonalen Antikörpers TIM-11B2 und Lokalisation eines potentiellen Epitops	99
4.4. Klonierung und heterologe Expression der von TIM-11B2 detektierten Antigene	103
4.5. Herstellung von polyklonalen Antikörpern	107
4.6. Immuncytochemische Untersuchungen	110
Cytosolische Glutaminsynthetase 1 & 3A/B	111
Cytosolische Aldolasen 1 & 2	113
4.7. Northern-Analyse	114
<i>GS3A</i> und <i>GS1</i>	115
<i>cALD2</i> und <i>cALD1</i>	117
Ausblick	120
5. ZUSAMMENFASSUNG	122
6. LITERATURVERZEICHNIS	124

7. ANHANG	142
7.1. Homologievergleiche der DNA-Sequenzen der klonierten Gene	142
7.1.1. Plasmid pGS3A	142
7.1.2. Plasmid pGS1	143
7.1.3. Plasmid pcALD1	144
7.1.4. Plasmid pcALD2	145
7.2. Homologievergleich der Aminosäuresequenzen von cALD1, cALD2, GS3A, GS3B und GS1	146

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALD	Aldolase
AP	Alkaline Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäuren
bp	Basenpaare
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, Toluidinsalz
BSA	Rinderserumalbumin
cALD	cytosolische (cytoplasmatische) Aldolase
cDNA	copy (komplementäre) DNA
Cu	Cuticula
Cyt	Cytosol
DEPC	Diethylpyrocarbammat
DIECA	Natriumdiethyldithiocarbamat
DIG	Digoxigenin
DMF	N,N'-Dimethylformamid
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	fötales Kälberserum
GOGAT	Glutamat-Oxoglutarat-Aminotransferase (Glutamatsynthase)
GS	Glutaminsynthetase
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPTG	Isopropyl- β -D-galactopyranosid
iz	Interzellulare
LB	Lauria Bertani (Medium)

LysC	Endopeptidase Lys-C
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
MOPS	3-Morpholino-1-propansulfonsäure
NC	Nitrocellulose
NBT	Nitro-Blau-Tetrazoliumchlorid
OD	optische Dichte (einer Bakterienkultur)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“ (Natriumphosphatpuffer)
PCR	„Polymerase Chain Reaction“ (Polymerase Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
pI	Isoelektrischer Punkt
PIPES	Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylflorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	„Sodium Saline Citrate“ (NaCl/Natriumcitrat)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
T _{Ann}	„Annealing“-Temperatur
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TFA	Triflouressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
vak	Vakuole
Vf	Verdünnungsfaktor

Vol.

X-Gal

zw

Volumen

5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

Zellwand

1. EINLEITUNG

1.1. Pflanzenwachstum

Wachstum und Entwicklung von Pflanzen werden durch koordinierte Aktivitäten mehrerer externer und endogener Faktoren kontrolliert. Licht ist einer der wichtigsten externen Faktoren, Pflanzenhormone sind die bedeutendsten endogenen Regulatoren, welche die Pflanzenentwicklung steuern. Der Mechanismus dieser Steuerung ist bisher nur unvollkommen bekannt (von Arnim & Deng, 1996; Jensen *et al.* 1998; Schopfer & Brennicke, 1999).

1.1.1. Etablierung eines Keimlings und post-germinatives Wachstum

Die Etablierung eines Keimlings ist eine der kritischsten Phasen im Lebenszyklus einer höheren Pflanze. Dies beginnt mit der Keimung, wenn die apparente metabolische Dormanz der ausgetrockneten Samen durch Quellung gebrochen und damit einhergehend eine Vielzahl von physiologischen und biochemischen Aktivitäten initiiert wird. Die Quellung der Samen induziert den Abbau von gespeicherten Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden in den Speicherorganen der Samen, um Energie und wichtige Nährstoffe für den wachsenden Embryo zu liefern (Holdsworth *et al.*, 1999; Pouille & Jones, 1988; Mitsuhashi *et al.* 1986; Nielson & Liener, 1984). Zur Hydrolyse von Speicherproteinen wirken während dieser Periode eine Reihe von Proteasen und Peptidasen zusammen, wobei die Kombination der Enzyme von Samen zu Samen variieren kann (Ashton, 1976; Shutov & Vaintraub, 1987). Der Abbau der Speicherproteine liefert Peptide und Aminosäuren, die für das frühe heterotrophe Pflanzenwachstum benötigt werden. Als Stärke abgelagerte Kohlenhydratreserven unterliegen ebenfalls einem weitreichenden Abbau. In den Kotyledonen von Erbsen erfolgt der Stärkeabbau hauptsächlich durch die Aktivitäten von Phosphorylasen, während in Sojabohnen und Linsen vor allem α -Amylasen diese Aufgabe übernehmen (ap Rees, 1988). Das Produkt des Stärkeabbaus im keimenden Erbsensamen ist daher hauptsächlich Saccharose. Andere Zucker wie Maltose, Maltotriose, Maltodextrine und Glucose kommen in den Kotyledonen von keimenden

1. Einleitung

Erbsensamen nicht oder wenn überhaupt nur in sehr geringen Mengen vor (Monerri *et al.* 1986).

Abhängig von den Lichtbedingungen können Keimlinge zwei verschiedene Entwicklungsstrategien verfolgen. Solange der Keimling sich im Dunkeln befindet, nehmen Keimlinge dicotyler Pflanze eine Morphologie und Physiologie an, die diesen unterirdischen Wachstumsbedingungen angepasst sind (Skotomorphogenese): Blatt- und Chloroplastentwicklung bleiben inhibiert, während das Epikotyl, ein das Apikalmeristem und die Kotyledonen verbindender Teil des Sprosses, einen Apikalhaken bildet und eine schnelle Elongation erfährt (Etiolierung). Bei Lichteinwirkung wird ein alternatives Entwicklungsprogramm, die Photomorphogenese, induziert: der Apikalhaken öffnet sich, die Chloroplasten und die Blätter entwickeln sich und das Wachstum des Epikotyls wird gehemmt (Crosgrave 1994; Quail *et al.* 1995). Aus den genetischen und physiologischen Daten geht hervor, dass Licht seine inhibitorische Wirkung auf das Hypokotyl^[1]-Wachstum über Stimulation von Phytochromen, eines Blaulichtrezeptors und eines oder mehrerer UV-B-Rezeptoren entfaltet (Überblick : von Arnim & Deng, 1996; Chory, 1997). Über den molekularen Mechanismus der Zellelongation im Hypokotyl und deren Kontrolle durch Licht ist wenig bekannt (Desnos, 1996).

Neben dem Licht spielen alle bekannten Pflanzenhormone eine wichtige Rolle bei dem Hypokotylwachstum: Brassinosteroide, Auxine und Gibberelline haben einen wachstumstimulierenden Effekt, während Ethylen, Cytokinine und Abscisinsäure (ABA) wachstumshemmend wirken (Davies, 1995; Smalle *et al.*, 1997). Dem Phytohormon Auxin konnte eine Beteiligung bei der Lichtregulation der Pflanzenentwicklung nachgewiesen werden, der genauen Charakter dieser Interaktion ist jedoch nicht gut verstanden worden (Kraipiel & Miginiac, 1997). Behringer und Davies (1992) schlugen vor, dass die Regulation der Stengelelongation durch Phytochrome zum Teil das Ergebnis der Veränderung des Auxinspiegels ist. Bei Keimlingen, die unter Licht gewachsen sind, ist die Hypokotyl-Elongation von einem Auxintransport abhängig. Da dies bei etiolierten

¹Hypokotyl : Ein das Apikalmeristem und die Wurzel verbindendes Gewebe in dikotylen Pflanzenkeimlingen mit oberirdischen Kotyledonen. In *Leguminosen*-Keimlingen (Kotyledonen unterirdisch) Epikotyl: ein das Apikalmeristem und die Kotyledonen verbindender Teil des Sprosses.

1. Einleitung

Keimlingen nicht der Fall ist, lässt eine wichtigere Rolle des Auxins bei Elongationsprozessen im Licht vermuten (Jensen *et al.*, 1998).

Das Licht verändert ebenfalls die Konzentration von anderen Phytohormonen (Gibberellinen (GAs): Ross *et al.*, 1992; Foster & Morgan, 1995; ABA: Weatherwax *et al.*, 1996; Cytokininen: Qamuruddin & Tillberg, 1989; Kreipiel *et al.*, 1995; und Ethylen: Kathiresen *et al.*, 1996 und Ref.). Viele Entwicklungsprozesse, die als ein Ergebnis der Lichtsignale zustandekommen, sind deshalb also auch von der (Mit-)Wirkung der Phytohormone abhängig (Jensen *et al.*, 1998).

1.1.2. Zellstreckungswachstum

Wachstum in Pflanzen wird als irreversible Volumenzunahme definiert. In dem Apikalmeristem wird das Wachstum durch die kombinierte Aktivität zweier mit einander verbundener Prozesse, die Zellstreckung und die Zellteilung, bestimmt. Das Wachstum in den subapikalen Regionen, das die entscheidende Komponente des Wachstums darstellt, wird dagegen allein durch Zellstreckung bedingt. Diese Zellstreckung wird durch den Turgordruck verursacht. Während dieses Prozesses nehmen die Zellen an Volumen mehrfach zu und werden vakuolisiert (Taiz & Zeiger, 1998). Das auf die Zellstreckung zurückzuführende Wachstum stellt einen zentralen Vorgang in der Entwicklungsphysiologie der Pflanzenzelle dar und wird seit langem untersucht. Trotz ihrer Wichtigkeit in der Morphogenese der Pflanze ist der Mechanismus der Zellstreckung auf molekularer Ebene nur wenig verstanden worden (Gendreau *et al.* 1997)

Biophysikalische Studien wiesen darauf hin, dass die Zellwand den Hauptkontrollpunkt für das durch den Turgor verursachte Zellstreckungswachstum darstellt (Cosgrove, 1997). Ein aktuelles Modell legt nahe, dass die Zellwand eine hoch organisierte und dynamische Struktur ist, die zwei wichtige strukturelle Netzwerke von Polysacchariden enthält: ein Last-tragendes Cellulose/Xyloglucan-Netzwerk und ein Druck-resistentes Pektin-Netzwerk (Roberts, 1994). Expansion der Zellwand wäre somit das Ergebnis des Zusammenspiels zwischen der Synthese von neuen Komponenten, ihrem regulierten

1. Einleitung

Einbau in die vorhandene Architektur und der Lockerung der Struktur. Die komplexe Struktur der Zellwand muß den Turgordruck widerstehen und gleichzeitig eine Zellexpansion erlauben. Damit eine Zellexpansion stattfindet, müssen drei Bedingungen erfüllt sein: (a) adäquater Turgor muß innerhalb der Zelle existieren; (b) Dehnbarkeit muß durch Umordnung oder Lockerung der vorhandenen Zellwand erreicht werden und (c) Synthese und Ablagerung von neu gebildeten Zellwandkomponenten müssen stattfinden.

Die Theorie des Säurewachstums besagt, dass der Zellwand-lockernde Faktor Wasserstoffionen sind. Sekretierte Protonen setzen den apoplastischen pH-Wert herab und Zellwand-lockernde Prozesse werden dadurch aktiviert. Dabei brechen die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Xyloglucanen und den Cellulose-Mikrofibrillen durch den Anstieg der Protonenkonzentration zusammen. Die plastische Dehnbarkeit der Zellwand wird dadurch erhöht, der Wanddruck erniedrigt und die Zellen können sich strecken (Überblick: Rayle & Cleland, 1992). Die Wände von expandierenden vegetativen Geweben besitzen eine Vielzahl von Enzymaktivitäten, die zu einer Modifikation der mechanischen Eigenschaften der Zellwand beitragen können. Dazu gehören Xyloglucan-Endotransglycosylasen (XET, Fry *et al.* 1992), Endo-1,4- β -Glucanasen (EGasen, Hayashi *et al.*, 1984) und Expansine (McQueen-Mason *et al.*, 1992). Die Fähigkeit, *in vitro* eine Zellwandstreckung zu bewirken, konnte bisher jedoch nur bei den Expansinen nachgewiesen werden. Expansine sind 29 - 30 kDa große Glykoproteine und gehören zu den HPRGs (Hydroxyprolin-reiche Glykoproteinen). Für ihre Wirkung erfordern die Expansine einen sauren pH-Wert (Optimum bei pH 3.0 - 4,5) (McQueen-Mason *et al.*, 1993; Cosgrove & Durachko, 1994). Der molekulare Basis der Expansinwirkung ist noch nicht geklärt. Die meisten publizierten Daten deuteten jedoch darauf hin, dass Expansine durch Lockerung von nicht-kovalenten intermolekularen Bindungen (Wasserstoffbrücken) zwischen den Cellulose-Mikrofibrillen und den Matrixpolymeren wirken, was somit zur Verminderung der mechanischen Festigkeit der Wände führt (McQueen-Mason & Cosgrove, 1994).

Die Cellulosemoleküle werden in Bündeln an Enzymkomplexen in der Plasmamembran synthetisiert (an in der Plasmamembran beweglichen Cellulosesynthasekomplexen) und lagern sich spontan unter Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu partiell kristallin geordneten Mikrofibrillen zusammen, welche auf innere Wandoberfläche aufgelagert

1. Einleitung

werden. Die Matrix-Polysaccharide und -Proteine werden dagegen im ER und Golgi-Apparat synthetisiert und gelangen durch Exocytose sekretorischer Vesikel in den Zellwandraum (Schopfer & Brennicke, 1999). Über die Rolle der Biosynthese der Zellwandverbindungen bei der Regulation der Zellstreckung gibt es jedoch bisher noch keine Information.

Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers TIM-11B2 (s. unten) wurde ein 40 kDa großes Protein („p40“) untersucht, dessen Vorkommen eine Korrelation mit dem Streckungswachstum zeigte (Sprunck, 1996). Dabei war unklar, ob die verstärkte Abundanz dieses Proteins in wachsenden Gewebeteilen auf Ursachen für Wachstum oder Folgen von Wachstum zurückzuführen war. Elektronmikroskopische Aufnahmen von Immunogoldmarkierungen mit TIM-11B2 zeigten auch teilweise eine Zellwandlokalisation. In weiteren Untersuchungen hat sich herausgestellt, dass der monoklonale Antikörper TIM-11B2 mehr als nur ein Protein erkennt. Eines der Antigene konnte als cytosolische Aldolase identifiziert werden (Sprunck, 1996). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Charakterisierung des weiteren TIM-11B2-Antigens führte zu den cytosolischen Isoenzymen der Glutaminsynthetasen.

1.2. Aldolase

Aldolase (ALD, D-Fructose-1,6-Bisphosphat D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Lyase, EC 4.1.2.13) katalysiert die reversible Aldolsplaltung von Fructose-1,6-Bisphosphat (FBP) in zwei Triosephosphate, Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP). Es gibt zwei Klassen von Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolasen. Klasse I Aldolasen sind relativ große Homotetramere (MG ca. 160 000), haben eine essentielle Sulfhydrylgruppe und bilden ein kovalentes Schiff'sche-Base-Intermediärprodukt zwischen der Dihydroxyacetonphosphat-Hälfte des Substrates und einer ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes in der aktiven Stelle während der Katalyse. Die Sequenz um diesen in der Bildung der Schiff'schen Base involvierten Lysinrest ist höchst konserviert und kann als eine Signatur für diese Klasse der Enzyme verwendet werden (Freemont *et al.*, 1988; Chopra *et al.* 1990). Klasse II Aldolasen sind kleinere (MG ca. 80 000) homodimere

1. Einleitung

Proteine, die Kalium und bivalente Kationen zur katalytischen Reaktion benötigen und keinen Schiff-Base-Reaktionsmechanismus zeigen. Klasse II Aldolasen zeigen keine signifikante Sequenz-Homologie mit den Klasse I Aldolasen (Plaumann *et al.*, 1997), was durch unterschiedliche, voneinander unabhängige evolutionäre Entwicklungslinien erklärt werden kann (Marsh & Lebherz, 1992). Tierische Aldolasen sind Klasse I, während Klasse II Aldolasen in Bakterien und Pilzen vorkommen. Höhere Pflanzen einschließlich Farne und Moose haben Klasse I Aldolasen, während Aldolasen aus eukaryotischen Algen sowohl Klasse I als auch Klasse II sein können (Miernyk, 1990; Marsh & Lebherz, 1992).

Bei Säugern wurden drei verschiedenen, Gewebe-spezifische ALD-Isoenzyme identifiziert: ALD-A in Muskeln, ALD-B in der Leber oder Niere und ALD-C im Gehirn (Gefflaut *et al.*, 1995; Penhoet *et al.*, 1969). Diese drei Isoenzyme zeigen geringfügige Unterschiede in ihren physikalischen Eigenschaften. Die ALD-A und ALD-B unterscheiden sich zudem in ihrer Substratspezifität sowie in dem Verhältnis ihrer Vor-/Rückwärtsaktivitäten. Während die Muskelaldolase (ALD-A) eine hohe Spezifität für FBP aufweist („glycolytisches Isoenzym“), spaltet das Isoenzym in der Leber (die „gluconeogenetische“ ALD) gleich gut sowohl FBP als auch F1B (Fructose-1-Phosphat) und zeigt ein viel höheres, relatives V_{\max} in der Rückreaktion (Gefflaut *et al.*, 1995; Penhoet *et al.*, 1969).

In Pflanzen existieren mindestens zwei Aldolase-Isoenzyme, die cytosolischen und die (chloro-) plastidären Formen (cALD und pALD, Anderson & Pacold, 1972). cALD und pALD wurden sowohl in photosynthetisch-aktiven als auch in nicht-photosynthetischen Geweben identifiziert (Krüger & Schnarrenberger, 1985). Genetische Untersuchungen haben bewiesen, dass beide Isoenzyme durch Kern-lokalisierte Gene kodiert sind, die sich wahrscheinlich aus Duplikation eines gemeinsamen Vorfahrens entwickelt haben (Plaxton, 1996). cALD und pALD zeigen ähnliche katalytische Eigenschaften, obwohl sie sich in ihrer thermischen Stabilität, Nettoladung, Aminosäurezusammensetzung, immunologischen Eigenschaften und der Größe ihrer Untereinheiten geringfügig unterscheiden (Marsh *et al.*, 1989). In photosynthetisch aktiven Geweben ist pALD in zwei Hauptstoffwechselwegen der Zuckerphosphate beteiligt: in dem C_3 -reduktiven

1. Einleitung

Pentosephosphatweg (Calvin-Zyklus), wo sie neben der Aldolkondensation von GAP und DHAP zu FBP die dem Calvin-Zyklus eigene Kondensation von DHAP und Erythrose-4-Phosphat (E4P) zu Sedoheptolose-1,7-Bisphosphat (SuBP) katalysiert (Heldt, 1996) und in den Reaktionen des Stärkestoffwechsels (gluconeogenetische Stärke-Biosynthese bei Tag und glucoolytische Stärkeabbau bei Nacht, Stitt, 1990). Die chloroplastidäre ALD stellt 95 % der gesamten Aldolaseaktivität im Blattgewebe dar (Krüger & Schnarrenberger, 1983; Lebherz *et al.* 1984). Über die Aldolasen aus nicht-photosynthetischen Geweben ist bisher wenig bekannt. Der Beitrag von cALD zu der Gesamt-Aldolaseaktivität von nicht-grünen Geweben scheint jedoch viel größer als in grünen Blättern zu sein und kann bis zu mehr als 50% der vorhandenen Gesamt-Aldolaseaktivität ausmachen (Botha & O'Kennedy, 1989; Krüger & Schnarrenberger 1985; Moorhead & Plaxton, 1990; Nishimura & Beevers, 1981).

Cytosolische und chloroplastidäre Aldolasen aus Erbse (*Pisum sativum* L.), aus Weizen (*Triticum aestivum* L.), aus Mais (*Zea mays* L.) und aus Spinat (*Spinacia oleracea* L.) konnten über DEAE-Ionenaustausch-Chromatographie voneinander getrennt werden. Dabei konnte in den grünen Blättern von Erbse ein Aktivitäten-Verhältnis von 9 % (cALD) : 91 % (pALD) ermittelt werden. Cytosolische Aldolase zeigte einen 5-fach niedrigeren K_m -Wert für FBP (1,2-2,3 mM) als das chloroplastidäre Enzym (8,0 - 10,5 mM) (Schnarrenberger & Krüger, 1986). Mit Hilfe von aus N-terminalen Mikrosequenzen abgeleiteten degenerierten Oligonucleotiden konnten cDNAs (Klone *cp1* und *cp2*) für zwei distinkte pALDs aus einer Erbsen-cDNA-Bibliothek isoliert und sequenziert werden. Das berechnete Molekulargewicht der pALD-Untereinheit ist 38 043 (*cp1*) bzw. 37 825 (*cp2*) (Razdan *et al.* 1992). Über die Expressionmuster dieser pALD-Gene ist bisher nichts bekannt. Die cDNAs für cytosolische Aldolase der Erbse sind ebenfalls bereit isoliert und sequenziert. Zwei cDNAs für cytosolische Aldolase aus Erbse wurden 1995 von Pelzer-Reith und Schnarrenberger aus einer Erbsenblatt-cDNA-Bank isoliert. Sie kodieren jeweils für 38 445 Da (357 AS, Klon *aldcyt1* = cALD1, EMBL-Nr.: X89828) bzw. 38 490 Da (359 AS, und Klon *aldcyt2* = cALD2, EMBL-Nr.: X89829) Untereinheiten der cytosolischen Aldolasen (Pelzer-Reith & Schnarrenberger, 1995). Daten über enzymkinetische bzw. eventuelle funktionelle Unterschiede dieser cytosolischen Isoenzyme und über die Expression der Gene liegen nicht vor.

1. Einleitung

Mittlerweile wurden außerdem einige cDNA-Klone für folgenden Aldolasen aus verschiedenen Pflanzen beschrieben : anaerob induzierbare cALD aus Mais (Kelley & Tolan, 1986), cALD und pALD aus Reis (Hidaka *et al.* 1990; Tsutsumi *et al.* 1994), cALD aus *Arabidopsis thaliana* (Chopra *et al.*, 1990), cALD und pALD aus Spinat (Pelzer-Reith *et al.*, 1993), hitze-induzierte pALD-Isoform aus *Avena sativa* (Michelis & Gepstein, 2000). In Reis wurden, wie bei der Erbse, auch multiple Gene für die cytosolische Aldolase (*AldC-1*, *AldC-2* und *AldC-a*) identifiziert (Tsutsumi *et al.* 1994). Für das Gen *AldC-1* konnte gezeigt werden, dass seine Expression wahrscheinlich über einen Signaltransduktionsweg reguliert wird, an dem ein Ca^{2+} -vermitteltes Proteinkinase-Proteinphosphatase-System involviert ist (Nakamura *et al.*, 1996). Untersuchungen mit dem *pALD*-Gen aus Reis in transgenen Tabakpflanzen zeigte außerdem eine Licht-induzierbare und Mesophyll-spezifische Expression dieses Gens (Kayaga *et al.*, 1995; Nakamura *et al.* 1997). Experimenten an Kartoffeln haben gezeigt, dass eine Antisense-Expression einer „full length“ pALD kodierenden cDNA zur verminderte Expression der Aldolase sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene führte. Es wurde beobachtet, dass eine geringe Abnahme der Aktivität von pALD die Photosynthese inhibiert, die Zucker- und Stärkespiegel verändert und das Wachstum der Kartoffelpflanze hemmt (Haake *et al.*, 1998). Obwohl (plastidäre) Aldolasen eine reversible Reaktion katalysieren und keine bekannten regulatorischen Eigenschaften besitzen, haben geringe Veränderung in ihren Aktivitäten deutliche Folgen für die Photosynthese, die Kohlenstoffverteilung („carbon partitioning“) und das Wachstum (Haake *et al.*, 1998).

1.3. Glutaminsynthetase

Glutaminsynthetase (GS; L-Glutamat-Ammoniak-Ligase (ADP), EC 6.3.1.2) ist ein ATP-abhängiges Enzym, das die Bildung von Glutamin aus Glutamat und Ammonium katalysiert (Meister, 1974). Zusätzlich zu ihrer Rolle als Bestandteil von Proteinen wird Glutamin über Transaminierung für die Biosynthese einiger Aminosäuren benötigt, und deren Amidstickstoff wird in vielen biosynthetischen Stoffwechselwegen einschließlich der Synthese von Purinen, Pyrimidinen, Glucosaminen und Carbamoylphosphaten verwendet (Meister, 1974). In höheren Pflanzen ist Glutamin außerdem als eine der Hauptverbindungen bekannt, die dem interzellulären Stickstofftransport dienen (Mifflin &

1. Einleitung

Lea, 1976 und 1977; Lea & Mifflin, 1980a/b). Man unterscheidet klassischerweise zwei Typen von GS: GSI, das typische prokaryotische Enzym mit Untereinheiten von ca. 52 kDa, die ein dodecameres Enzym bildend in zwei planaren Hexameren angeordnet sind, und GSII, das typische eukaryotische Enzym mit Untereinheiten von ca. 40 kDa, die als Octamere angeordnet sind. Diese zwei Enzymklassen zeigen ca. 25 % Homologie in ihren Aminosäuresequenzen und haben wahrscheinlich eine ähnliche Untereinheitstruktur mit der aktiven Stelle, die zwischen den Untereinheiten lokalisiert ist (Eisenberg, 1987; Mathis *et al.* 2000).

In höheren Pflanzen stellt GS im Zusammenspiel mit Glutamatsynthase (GOGAT; E.C.1.4.7.1) das Schlüsselenzym bei der Assimilation von Ammonium dar (Mifflin and Lea, 1976). Über den GS/GOGAT-Zyklus werden Ammoniumionen, die aus dem Grundwasser (Oak & Hirel, 1985), aus der Stickstoff-Fixierung (Cullimore *et al.*, 1983) oder aus der Nitratreduktion stammen, in organische Verbindungen (Glu bzw. Gln) eingebaut (Temple, 1998). Außerdem hat GS eine Funktion bei der Reassimilation von Ammoniumionen, die während einiger Stoffwechselprozesse einschließlich Protein- und Aminosäure-Katabolismus (Lea & Joy, 1983), Photorespiration (Givan *et al.*, 1988) und der Biosynthese von Phenylpropanoiden freigesetzt werden. Wegen ihrer zentralen Rolle in dem pflanzlichen Stickstoffmetabolismus wurden die Biochemie und die Molekularbiologie von GS umfassend untersucht (Lea *et al.*, 1990; Lam *et al.*, 1996).

GS existiert in Pflanzen als zwei Isoformen mit unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften und verschiedenen Gewebe- sowie subzellulären Lokalisationen (McNally & Hirel, 1983) : eine chloroplastidäre Isoform (GS2), die in allen bisher untersuchten Pflanzenspezies von einem einzigen Kern-lokalisierten Gen per Haploid-Genom kodiert wird (Becker *et al.*, 1992; Tingey *et al.*, 1987) und cytosolische Isoformen, die durch differentielle Expression einer Kern-kodierten Multigen-Familie entstanden sind (Bennett *et al.*, 1989; Givan *et al.*, 1988; Peterman & Goodman, 1991; Tingey *et al.*, 1988). Die Gene für cytosolische GS werden vorzugsweise in nicht photosynthetisch aktiven Geweben, wie keimenden Samen, Wurzeln und Wurzelknöllchen, exprimiert. Im keimenden Samen sind sie bei der Reassimilation von aus der Mobilisierung der stickstoffhaltigen Reserve freigesetztem NH_4^+ während der Keimung bzw. bei der für das

1. Einleitung

frühe Wachstum des Keimlings benötigten Gln-Synthese beteiligt (Walker & Coruzzi, 1989; Hirel *et al.* 1987). Während die cytosolischen GSs in photosynthetisch aktiven grünen Geweben nur in unbedeutend geringen Mengen vorkommen, ist die chloroplästidare GS hier die vorherrschende Isoform, die für die Assimilation des bei der Nitratreduktion und der photorespiratorischen Glycin-Decarboxylierung freigesetzten NH_4^+ verantwortlich ist (Edwards & Coruzzi, 1989). Eine verstärkte Expression von cytosolischen GSs in photosynthetischen Geweben wurde allerdings unter einigen physiologischen Bedingungen beobachtet, wie bei natürlicher Seneszenz (Kamachi *et al.*, 1992; Buchanan-Wollaston & Ainsworth, 1997), als Antwort auf einen pathogenen Angriff und Herbizidbehandlung (Pérez-García *et al.* 1995; 1998) oder auf Wasserstress (Bauer *et al.*, 1997). In all dieser Fällen wurde eine Funktion von cytosolischen GSs zur Generierung von Glutamin für den Stickstofftransport zu den *sink*-Geweben vermutet.

In *Pisum sativum* L. kodieren vier unterschiedliche aber homologe Kern-lokalisierte Gene für Glutaminsynthetasen. Die cytosolischen Isoformen werden von drei, die plastidäre GS (GS2) wird von einem dieser Gene kodiert (Tingey *et al.* 1987, 1988). Das GS2-Gen kodiert für ein 47,345 kDa großes GS2-Vorläuferprotein (bzw. 42 kDa ohne Transitpeptid) und wird Licht-abhängig in den Blättern exprimiert.

Die drei für die cytosolischen GSs kodierenden Gene werden in zwei Klassen unterteilt. Die fast identischen oder „Zwilling“-GS-Gene (*GS3A* und *GS3B*) einerseits und das *GS1*-Gen andererseits, das sowohl in den kodierenden als auch den nicht-kodierenden Regionen sich von den *GS3A/GS3B*-Genen unterscheidet (Walker & Coruzzi, 1989; Walker *et al.* 1995). *GS3A* und *GS3B* sind in ihren kodierenden Regionen zu 99% identisch und weisen nur einfache Nukleotidsubstitutionen auf, die in 3 Aminosäureunterschieden resultieren. Ihre nicht-kodierenden Regionen zeigen interessanterweise auch eine hochgradige (96%) Homologie (Walker *et al.* 1995). In Hinblick auf die Gewebespezifität und die Kinetik der mRNA-Akkumulation zeigen diese „Zwilling“-GS-Gene eine koordinierte Expression (Walker & Coruzzi, 1989). Durch eine gen-spezifische S1-Nuclease-Analyse konnte jedoch gezeigt werden, dass das „steady state“-Niveau von *GS3A*-mRNA in allen untersuchten Geweben stets 5 bis 10-fach höher liegt als das von *GS3B*-mRNA (Walker & Coruzzi, 1989). *GS1*-Gen weist im kodierenden Bereich eine 80%-ige Homologie zu *GS3A/B* auf (Tingey *et al.* 1988).

1. Einleitung

Die cytosolische Glutaminsynthetasen GS1 und GS3A/B scheinen unterschiedliche Funktionen auszuüben. In Wurzeln ist GS1 die vorherrschende Isoform, obwohl sie auch in den Wurzelknöllchen exprimiert wird (Tingey *et al.*, 1987). In Blättern wurden in geringeren Mengen auch *GS3A/B*- und *GS1*-Transkripte detektiert (Tingey *et al.*, 1987). Es wurde gezeigt, dass die *GS3A/B*-mRNA in Knöllchen und Kotyledonen von keimenden Samen akkumuliert, zwei „Entwicklungskontexten“, wo große Mengen Stickstoff assimiliert und zu den sich entwickelnden Wurzeln und Sprossen transportiert werden müssen (Tingey *et al.*, 1987; Edwards & Coruzzi, 1989; Brears *et al.*, 1991). Es wurde daher postuliert, dass die „Zwilling“-GS-Gene möglicherweise eine cytosolische GS-Isoform kodieren, die der Synthese von Glutamin für interzellulären Transport dient. Im Gegensatz dazu akkumuliert die *GS1*-mRNA zwar auch in sich entwickelnden Wurzelknöllchen, nicht aber in den Kotyledonen von keimenden Samen. Aus diesem Grunde wurde angenommen, dass die Aufgabe der durch *GS1* kodierten GS-Isoform eher in der Glutamin-Synthese für den intrazellulären Gebrauch bestehen müsste, als für den interzellulären Stickstofftransport (Edwards & Coruzzi, 1989). Untersuchungen an den *GS3A*-Promotor ergaben eine gewebespezifische Expression von *GS3A* in den Phloemelementen (Edwards *et al.*, 1990; Brears *et al.*, 1991). Dies bekräftigt die für *GS3A* postulierte Funktion bei der Gln-Synthese für den interzellulären Stickstofftransport (Edwards *et al.* 1990; Brears *et al.* 1991).

1.4. Aufgabenstellung

Im Zusammenhang mit der Charakterisierung von ABP₄₄, einem löslichen auxinbindenden Protein der Erbse, (Reinard & Jacobsen, 1995) wurden Mäuse mit einer über eine Auxin-Affinitäts-Chromatographie aufgereinigten Proteinfraction immunisiert (Reinard, 1992). Die Immunisierungen führten unter anderem zu einem Hybridoma-Klon „TIM-11B2“, der einen Antikörper des IgM-Typs produziert. In einer Immunfärbung nach SDS-PAGE erkennt dieser Antikörper ein Protein um 40 kDa („p40“), das jedoch keine Eigenschaft als auxinbindendes Protein besitzt (Reinard, 1992).

Erste immunbiochemische Untersuchungen des Proteins wiesen auf eine mögliche extrazelluläre Lokalisation und potentielle Korrelation mit dem Streckungswachstum hin

1. Einleitung

(Sprunck *et al.*, 1993; Reinard *et al.*, 1994; Sprunck, 1996). In weiteren Untersuchungen konnte das Antigen von TIM-11B2 über ein immunomagnetisches Separationssystem („MACS“) fraktioniert und nachfolgend über eine präparative SDS-PAGE aufgereinigt werden (Sprunck, 1996). Die anschließende Aminosäuresequenzierung resultierte in fünf Mikrosequenzen, wobei für vier dieser Sequenzen in Datenbanken hohe Homologien zu cytosolischen Fructose-1,6-Bisphosphat Aldolasen (E.C. 4.1.2.13) ermittelt wurden (Sprunck, 1996). Ein aus Erbsenkeimlingen über eine Säulenchromatographie aufgereinigtes, von TIM-11B2 erkanntes Protein, zeigte ebenfalls eine Aldolase-Aktivität (Ebeling, 1996; Sprunck, 1996). Immunfärbungen nach zweidimensionalen Gelelektrophoresen (IEF und SDS-PAGE) zeigten, dass der Antikörper TIM-11B2 mindestens drei Polypeptide um 40 kDa mit einem pI von 6,0 - 6,4 ($\pm 0,1$) detektiert. Zwei dieser Polypeptide konnten in weiteren 2D-Immunfärbungen mit einem Antiserum gegen cytosolische Aldolasen als Isoformen der cytosolischen Aldolase identifiziert werden. Das dritte Polypeptid (pI 6,0 \pm 0,1) wurde nicht von den anti-cytosolische-Aldolase-Antikörpern erkannt.

Die Aufgabenstellung dieser vorliegenden Arbeit bestand darin, eine Aufreinigungsmethode zu entwickeln, die die Trennung der TIM-11B2-Antigene sowie deren Mikrosequenzierungen ermöglichen sollte. Mit Hilfe einer präparativen, nativen PAGE und anschließender Elektroelution sollten die Proteine isoliert und durch eine Aminosäuresequenzierung charakterisiert werden. Nach Analysen der erhaltenen Mikrosequenzen (Datenbankrecherche, Homologievergleich) sollten daraus degenerierende Oligonukleotide abgeleitet werden, die bei einer PCR-gestützten Durchmusterung nach dem entsprechenden Gen in einer cDNA-Bank aus *Pisum sativum* L. als Primer eingesetzt werden sollten. Das dabei erhaltene PCR-Produkt sollte kloniert, sequenziert und anschließend die vollständige Sequenz des Gen ermittelt werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. MATERIAL

2.1.1 Pflanzenmaterial

Die Untersuchungen wurden an Erbse (*Pisum sativum* L.) der Sorte *Solara* (Cebeco Saaten, Celle) durchgeführt. Bei der Anzucht von Keimlingen für die RNA-Präparation wurden die Samen vorher durch Inkubation für 1 min in 70% Ethanol und für 10 min in 6 % Hypochlorit-Lösung oberflächensterilisiert. Nach mehrmaligem Waschen mit sterilem Wasser wurden sie über Nacht vorgequollen. Die Anzucht erfolgte 12 Tage bei Dunkelheit bei 20 - 26 °C in einem Gefäß auf feuchtem autoklavierten Vermiculite (Deutsche Vermiculite GmbH, Sprockhövel). Für Proteinextraktion wurden reife Samen ohne Sterilisation über Nacht in Leitungswasser vorgequollen und die Keimlinge auf feuchtem Vermiculite bei Dunkelheit für 5 bis 12 Tage angezogen. Die zu untersuchenden Pflanzenteile wurden geerntet, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.1.2. Bakterienstämme

<u>Stamm</u>	<u>Genotyp</u>
E. coli XL 1-Blue (Stratagene)	: <i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac</i> F'[<i>proAB⁺ lacI^f lacZΔM15 Tn10(tet^r)</i>]
E. coli BLR (DE3) (Novagen)	: F ⁻ <i>ompT hsdSB(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm Δ(srl-recA)306::Tn10 (DE3)</i>

2.1.3. Vektoren

<u>Bezeichnung</u>	<u>Beschreibung/Herkunft</u>
pGemT	: Promega
pET32(a+)	: Novagen
pET21(a+)	: Novagen
pcALD2c5	: pGemT enthält in MCS PCR amplifizierte kodierende Region der cALD2-cDNA/ Diese Arbeit
pcALD1K14	: pGemT enthält in MCS PCR amplifizierte kodierende Region der cALD1-cDNA/ Diese Arbeit
pGS3Ab3	: pGemT enthält in MCS PCR amplifizierte GS3A-cDNA (Nukleotide 48 - 1132) / Diese Arbeit
pGS1d12	: pGemT enthält in MCS PCR amplifizierte GS1-cDNA(Nukleotide 16 -1268) / Diese Arbeit
pET32cALD1	: pET32a(+) enthält in den EcoRI/XhoI-Schnittstellen die kodierende Region der cALD1-cDNA / Diese Arbeit
pET32cALD2	: pET32a(+) enthält in den EcoRI/XhoI-Schnittstellen die kodierende Region der cALD2-cDNA / Diese Arbeit
pET32GS3A	: pET32a(+) enthält in den EcoRI/SalI-Schnittstellen die kodierende Region der GS3A-cDNA / Diese Arbeit
pET32GS1	: pET32a(+) enthält in den EcoRI/SalI-Schnittstellen die kodierende Region der GS1-cDNA / Diese Arbeit
pET21cALD1	: pET21a(+) enthält in den EcoRI/XhoI-Schnittstellen die kodierende Region der cALD1-cDNA / Diese Arbeit

2. Material und Methoden

- pET21cALD2 : pET21a(+) enthält in den EcoRI/XhoI-Schnittstellen die kodierende Region der cALD2-cDNA / Diese Arbeit
- pET21GS3A : pET21a(+) enthält in den EcoRI/SalI-Schnittstellen die kodierende Region der GS3A-cDNA / Diese Arbeit
- pET21GS1 : pET21a(+) enthält in den EcoRI/SalI-Schnittstellen die kodierende Region der GS1-cDNA / Diese Arbeit

2.1.4. Oligonucleotide

<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz : / Beschreibung</u>
cALD2for	: 5'- <u>GAATTC</u> ATGTCTGCACTTCAAGAGC- 3' / <i>sense</i> -Primer enthaltend kodierende Region der cALD2-cDNA vom Startcodon bis Position bp 20 mit <u>EcoRI-Schnittstelle</u>
cALD2Rev	: 5'- <u>CTCGAG</u> AGAAGAAACCAGCATTGAT-3' / <i>antisense</i> -Primer, komplementär zu Nukleotiden 2 - 19 hinter dem Stopcodon (Pos. bp 1146 auf der cALD2-cDNA) mit <u>XhoI-Schnittstelle</u>
cALD1for	: 5'- <u>GAATTC</u> ATGTCTGCCTTTGTTGGAA-3' / <i>sense</i> -Primer enthaltend kodierende Region der cALD1-cDNA vom Startcodon bis Position bp 19 mit <u>EcoRI-Schnittstelle</u>
cALD1Rev	: 5'- <u>CTCGAG</u> AAGCTCTCCATTTAGAA-3' / <i>antisense</i> -Primer, komplementär zu 19 bp hinter dem Stopcodon (Pos. bp 1136 auf der cALD1-cDNA) mit <u>XhoI-Schnittstelle</u>
GS3Afor1	: 5'-AACCGCGTTCTTCTTTTTTCC-3' / <i>sense</i> -Primer enthaltend Nukleotide 48 - 67 der GS3A-cDNA
GS3ARev1	: 5'-TGGTGGTTGGAACCTTCATGG-3' / <i>antisense</i> -Primer komplementär zu Nukleotiden 1113 - 1132 der GS3A-cDNA

2. Material und Methoden

- GS3Afor2 : 5'-GAGCTC**GAATTC**CATGTCTTCACTTTCAGAT-3' / *sense*-Primer enthaltend Nukleotide 90 - 107 der GS3A-cDNA mit EcoRI-Schnittstelle
- GS3ARev2 : 5'-CTCGAG**GTCGACT**TGGTTGGAAC TTCAT-3' / *antisense*-Primer komplementär zu Nukleotiden 1128 - 1115 der GS3A-cDNA SalI-Schnittstelle
- GS1for1 : 5'-GATTCATCATCCAACGATCC-3' / *sense*-Primer enthaltend Nukleotide 16 - 25 der GS1-cDNA
- GS1Rev1 : 5'-AAGAACACAAAGCCATGTCC-3' / *antisense*-Primer komplementär zu Nukleotiden 1268 - 1249 GS1- cDNA
- GS1for2 : 5'-GAGCTC**GAATTC**CATGTCTCTTTCAGATC-3' / *sense*-Primer enthaltend Nukleotide 33 - 48 der GS1-cDNA mit EcoRI-Schnittstelle
- GS1Rev2 : 5'-CTCGAG**GTCGACCA**AGTGGTAGCTTATG-3' / *antisense*-Primer komplementär zu Nukleotiden 1161 - 1145 der GS1-cDNA mit SalI-Schnittstelle

2.1.5. Verwendete Molekulargewichtsmarker

DNA-Marker :
(Fa. MBI/Fermentas)

M21 (pBR322/
Alw441, MvaI) : 2617 bp/ 1857 bp/ 1246 bp/ 1058 bp/ 929 bp/ 498
bp/ 383 bp/ 121 bp

2. Material und Methoden

Proteinsmarker :

MS-SDS-70 (Sigma)	:	66 kDa/ 45 kDa/ 36 kDa/ 29 kDa/ 24 kDa/ 20,1 kDa/ 14,2 kDa
„Prestained Marker“ (Stratagene)	:	120 kDa/ 80 kDa/ 46 kDa/ 35 kDa/ 27 kDa/ 19 kDa

2.1.6. Antikörper

<u>Beschreibung</u>	<u>Herkunft</u>
TIM-11 B2	Reinard, T. (1992)
α plALD (anti-plastidäre Aldolase, polyklonaler Antikörper)	Prof. Dr. Schnarrenberger (FU Berlin)
α cytALD (anti-cytosolische Aldolase, polyklonaler Antikörper)	Prof. Dr. Schnarrenberger (FU Berlin)
G α M μ -AP (Ziegen-anti-Maus- μ -Kette, konjugiert mit alkalischer Phosphatase)	Sigma
RAM-AP (Kaninchen-anti-Maus konjugiert mit alkalischer Phosphatase)	Sigma
GARAP (Ziegen-anti-Kaninchen konjugiert mit alkalischer Phosphatase)	Sigma
anti-His-„Tag“ (monoklonaler Mausantikörper gegen His-„Tag“)	Pharmacia Biotech
Antiseren „575/737“ (anti-cALD2, polyklonale Antikörper)	Diese Arbeit

2. Material und Methoden

Antiseren „514/518" (anti-GS3A, polyklonale Antikörper)	Diese Arbeit
anti-DIG-Fab-AP (anti-Digoxygenin-Fab-Fragment, konjugiert mit alkalischer Phosphatase)	Roche

2.1.7. Verwendete Kits

<u>Bezeichnung :</u>	<u>Hersteller :</u>
Nucleobond® Nucleic Acid Purification Kit	Clontech / Heidelberg
Nucleotrap® Extraktion Kit	Macherrey-Nagel/Düren
Plant RNeasy Mini Kit	Qiagen/Hilden
SMART™PCR cDNA Library Construction Kit	Clontech / Heidelberg
QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit	Qiagen / Hilden
Invisorb PCR Purification Kit	Invitek / Berlin

2.1.8. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien entsprachen in der Regel dem Reinheitsgrad p.a. und wurden, falls nichts anders vermerkt von folgenden Firmen bezogen : Applichem (Darmstadt), Boehringer -Roche (Mannheim), Calbiochem (Frankfurt), Duchefa (Haarlem, NL), Fluka (Neu-Ulm), Gibco/BRL (Effenstein), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Riedel de Haën (Sarstedt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen), Stratagene (Heidelberg).

2.2. Proteinbiochemische Methoden

2.2.1. Proteinextraktion

2.2.1.1. Proteinextraktion aus Erbsenkeimlingen

Extraktionspuffer :

50 mM (später auch 20 mM)	Tris/HCl pH 7,4
10 µM	Leupeptin
3 mg/ml	DTT
10 µM	PMSF
4mM	DIECA
3 %	PVP (Polyklar AT)

10 g Pflanzengewebe (jüngste Internodien einschließlich Apices von 7 d alten Erbsenkeimlingen) wurden in 2 x Volumen Extraktionspuffer in einem Homogenisator (HO4, Bühler, Tübingen) zerkleinert (3 x 20 sec, dazwischen je 1 min abkühlen lassen). Das Homogenat wurde durch 2 Lagen Nylon-Monofilament (100 und 60 µm, Nyltal, Schweizer Seidengazefabrik AG, Thal, CH) gefiltert und anschließend zentrifugiert (30 min, 40 000xg, 4°C). Der Überstand wurde durch ein Filterpapier (595 1/2, Schleicher & Schüll) filtriert. Bei den späteren Extraktionen wurde das Pflanzenmaterial statt mit Hilfe des Bühler-Homogenisators durch Mörsern unter flüssigem Stickstoff homogenisiert. Das pulverisierte Gewebe wurde in ein SS34-Röhrchen überführt, 20 ml Extraktionspuffer dazugegeben, gemischt und anschließend 30' bei 18300 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde über ein Filterpapier filtriert. Die Konzentration des so erhaltenen Gesamtproteinextraktes wurde nach Bradford (2.2.3.) bestimmt. Für die native Gelelektrophorese wurde die Gesamtproteinlösung (9:1) mit dem nativen Proteinprobenpuffer (2.2.5.2) versetzt.

2.2.1.2. Proteinextraktion aus Bakterien

<u>Waschpuffer</u> :	10 mM	Tris/HCl pH 7,5
	40 mM	NaCl
<u>Aufschlusspuffer</u> :	20 mM	Tris/HCl pH 7,5
	1 mg/ml	Lysozym
	1 % (v/v)	Triton X100
	20 µg/ml	DNAse
	10 mM	MgCl ₂
	2 mM	PMSF
	4 µg/ml	Leupeptid

50 ml LB-Medien (2.3.1.1.) mit 50 µg/ml Carbenicillin wurden mit 2 ml Übernachtskulturen der mit den entsprechenden pET32(a+)-Expressionsplasmiden transformierten *E. coli*-Bakterien des Stammes BLR (DE3) angeimpft und bei 37°C und 180 rpm im Inkubator geschüttelt. Bei OD₆₀₀ = 0,6 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von final 1 mM IPTG induziert. Nach weiterer Inkubation unter Schütteln bei 30°C für 3 h bis über Nacht wurden die Zellen nach 2 h Stehenlassen bei 4°C durch eine 5 min Zentrifugation bei 5000 x g und 4°C geerntet.

Die sedimentierten Bakterienzellen wurden in 2 ml eiskaltem Waschpuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml Aufschlusspuffer aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend durch Ultraschall-Behandlung (6 x 1 min bei 36 % „duty“ und mit einem Intervall von je 1 min) auf Eis aufgeschlossen. Das Homogenat wurde dann für 20 min bei 40000 x g (18300 rpm, SS34) zentrifugiert. Im Überstand befanden sich die löslichen Proteine.

Für die Aufreinigung mittels His-Bind-Säule wurde der Aufschlusspuffer in 1 x Bindungspuffer (s. 2.2.2.1) statt in 20 mM Tris/HCl pH 7,5 angesetzt.

2. Material und Methoden

Zur gelanalytischen Überprüfung der Expression (2.2.5.1) wurden jeweils 100 µl Aliquots aus den Bakterienkulturen entnommen, bei maximaler Geschwindigkeit kurz in der Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Sediment wurde in 100 µl Waschpuffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Das gewonnene Bakteriensediment wurde in 100 µl SDS-Probenpuffer (2.2.5.1) aufgenommen, resuspendiert und 10 min bei 75°C denaturiert.

2.2.2. Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

2.2.2.1. Affinitätschromatographie mittels His•Bind-Säule

Bei rekombinanten Proteinen, die als Fusionproteine mit einem His-Tag exprimiert werden, besteht die Möglichkeit, die Proteine über an einer Säulenmatrix immobilisierte Ni²⁺-Ionen aufzureinigen. Als Säulenmaterial wurde das „His•Bind metal chelation resin“ von Novagen verwendet. Die dafür benötigten Lösungen waren :

8x Bindungspuffer :

40 mM Imidazol
4 M NaCl
160 mM Tris/HCl, pH 7,9
auf pH 7,9 einstellen

4x Elutionspuffer :

4 M Imidazol
2 M NaCl
80 mM Tris/HCl, pH 7,9
auf pH 7,9 einstellen

8x Ladungspuffer :

400 mM NiSO₄

8x Waschpuffer :

480 mM Imidazol
4 M NaCl
160 mM Tris/HCl, pH 7,9
auf pH 7,9 einstellen

4x „Strip“-Puffer :

400 mM EDTA
2 M NaCl
80 mM Tris/HCl, pH 7,9
auf pH 7,9 einstellen

Die Durchführung der Chromatographie erfolgte nach Herstellerangaben.

2.2.2.2. Spaltung mit Enterokinase

Durch Vorhandensein einer Enterokinasespaltungstelle in dem Fusionprotein ist es möglich, die aus dem pET-Expressionsvektor stammenden „Tags“ zu schneiden. Für die Enterokinasespaltung wurde ein Enterokinase-Kit der Fa. Novagen, enthaltend 50 U rekombinante Enterokinase und die für die Spaltungsreaktion benötigten Pufferlösungen, verwendet. Die gewählten Reaktionsbedingungen entsprachen der Angabe des Herstellers. Die Spaltungsreaktion wurde mittels SDS-PAGE (2.2.5.1) und Immunfärbung (2.2.9.2) analysiert.

2.2.2.3. Aufreinigung mittels präparativer SDS-PAGE

Diese Aufreinigung der rekombinanten Proteine besteht in einer präparativen SDS-PAGE, Ausschneiden der Proteinbande und anschließender Elution der Proteine aus dem Gel. Dazu wurden die nach der Lyse (2.2.1.2) im Sediment enthaltenen „inclusion bodies“ in 5 ml 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen und durch eine Ultraschallbehandlung (bis zu 3 x 1 min bei 36 % „duty“ und mit einem Intervall von je 1 min) resuspendiert. Daraufhin wurde die Suspension für 5 min bei 95°C im Wasserbad denaturiert, wobei die „inclusion bodies“ gelöst wurden.

Lag das rekombinante Protein wie im Falle von rek.cALD2 in löslicher Form exprimiert vor, so wurde der Überstand nach der Lyse (2.2.1.2) abgenommen, 1:1 mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt, denaturiert und so für die präparative SDS-PAGE (2.2.5.1.c) aufbereitet. Vor der Elektrophorese wurde die Konzentration der Proteinproben mittels Esen-Test (2.2.3) bzw. SDS-PAGE in einem Minigel (2.2.5.1.b) mit BSA-Verdünnungen als Standards ermittelt.

Bei der präparativen SDS-PAGE wurden Gele mit breiten Auftragschalen verwendet, so dass pro Gel bis zu ca. 500 µg Proteinproben aufgetragen werden konnten. Nach der Elektrophorese wurden am linken und rechten Rand sowie in der Mitte des Gels jeweils ca. 0,5 -1 cm breite Streifen abgeschnitten, die sofort mit 0,3 M CuCl₃ gefärbt wurden (2.2.6.3). Mit Hilfe dieser mit CuCl₃ gefärbten Gelstreifen als Orientierung wurde die dem induzierten rekombinanten Protein zuzuordnende Bande aus dem Gel ausgeschnitten und für die Elektroelution (2.2.7) vorbereitet.

2.2.3. Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte nach Bradford (1976) anhand einer Eichkurve, die mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellt wurde. Ein Abschätzen der Gesamtproteinmenge in Proben für die SDS-Gelelektrophorese erfolgte nach Esen (1978), gegebenenfalls mit Hilfe von BSA-Proteinsstandards bekannter Konzentration.

2.2.4. Fällungsmethoden

2.2.4.1. Methanol-Aceton-Fällung

Durch Elektroelution gewonnene Proteine für die Mikrosequenzierung wurden in Corex-Röhrchen durch Zusatz eines vierfachen Überschusses an kaltem (-20 °C) Methanol/Aceton (2:7 (v/v)) und anschließender Inkubation über Nacht bei -20°C gefällt. Die Probe wurde zentrifugiert (30 min, 40.000 x g) und das sedimentierte Protein in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

2.2.4.2. TCA-Fällung

Proben mit geringem Proteingehalt wurden mit 0,1 Vol. einer 0,15 %-igen Natriumdesoxycholat-Lösung versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe von 0,1 Vol. einer 100%-igen TCA-Lösung ausgefällt. Nach 10-minütiger Inkubation wurde der Proteinniederschlag für 15 min bei 40.000 x g und 4°C zentrifugiert und zweimal mit einer bei -20°C vorgekühlten 80%-igen Acetonlösung gewaschen. Um das Aceton zu entfernen, wurden die Proben bei RT getrocknet. Die Proteinpellets wurden dann je nach Größe in 20 - 200 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und vor der Gelelektrophorese 5 min bei 95 °C im Wasserbad/Heizblock oder in Eppendorfgefäßen mit durchlöcherten Deckeln 1 min in der Mikrowelle denaturiert.

2.2.5. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

2.2.5.1. SDS-PAGE (modifiziert nach Laemmli, 1970)

a. Probenvorbereitung

<u>SDS-Probenpuffer</u>	:	62,5 mM	Tris/HCl, pH 6,8
		50 mM	DTT
		10 % (v/v)	Glycerin
		2 % (w/v)	SDS
		0,01 % (w/v)	Bromphenolblau

Konzentrierte Proteinlösungen wurden auf gewünschte Konzentration mit 2x SDS-Probenpuffer verdünnt und gefällte Proteinproben in entsprechender Menge 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen und anschließend für 5 min bei 95°C oder 1 min bei 600 Watt in der Mikrowelle aufgeköcht.

b. SDS-PAGE Mini-Gelsystem

<u>SDS-Elektrophorese-</u>	:	25 mM	Tris
<u>Laufpuffer</u>		192 mM	Glycin
		0,1 % (w/v)	SDS

Die Elektrophoresen mit Minigelen wurden in vertikalen Elektrophoreseapparaturen der Fa. Biometra durchgeführt. Je nach Art der aufzutrennenden Proteinproben wurden Gele mit Polyacrylamidamid-Konzentrationen zwischen 10 - 15 % verwendet. Tabelle 1a gibt die Zusammensetzung der Lösungen für 10 % und 15 % SDS-Trenngele und des Sammelgels im Minigelsystem wieder. Die Elektrophorese erfolgte zuerst bei einer Stromstärke von ca. 12 mA/Gel, die nach dem vollständigen Eintreten der Proben ins Sammelgel auf 15 mA/Gel erhöht wurde. Die Spannung betrug etwa 100 V. Der Gellauf erfolgte bei RT und dauerte ca. 2 Std.

2. Material und Methoden

	Trenngel (5 ml)		Sammelgel (2 ml)
Lösungen	15 %	10 %	5 %
30 % (w/v) Acrylamid/0,8% N,N'-Methylen-bisacrylamid	2,5 ml	1,7 ml	0,33 ml
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	1,3 ml	1,3 ml	-
0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)	-	-	0,5 ml
10 % (w/v) SDS	50 µl	50 µl	20 µl
H ₂ O	1,2 ml	2,0 ml	1,15 ml
10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS)	50 µl	50 µl	20 µl
N,N,N',N'-Tetra-Methyldiamin (TEMED)	2 µl	2 µl	2 µl

Tab 1a : Zusammensetzung der Gellösungen für eine SDS-PAGE im Minigelsystem

c. Präparative SDS-PAGE

Die präparative SDS-PAGE wurde zur Auftrennung der Proteinproben für die Mikrosequenzierung (2.2.8) sowie zur Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus einem Gesamtproteinextrakt von induzierten Bakterien bzw. aus den „inclusion bodies“ (2.2.2.3) eingesetzt. Durchgeführt wurde die Elektrophorese in einer Protean-Gelelektrophoreseanlage von Fa. Biorad. Ein 10 %-iges SDS-Polyacrylamidgel der Größe (20x16) cm² und Dicke 1,5 mm wurde verwendet. Tabelle 1b gibt die Zusammensetzung der Lösungen für 7 % und 10 % SDS-Trenngele und des Sammelgels im Proteansystem wieder. Die Elektrophorese erfolgte unter folgenden Bedingungen :

Sammelgel = 25 mA/Gel und Trenngel = 35 mA/Gel.

2. Material und Methoden

	Trenngel (50 ml)		Sammelgel (12 ml)
Lösungen	7 %	10 %	5 %
30 % (w/v) Acrylamid/0,8% N,N'-Methylen-bisacrylamid	11,7 ml	16,6 ml	2 ml
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	12,5 ml	12,5 ml	-
0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)	-	-	3 ml
10 % (w/v) SDS	0,5 ml	0,5 ml	0,12 ml
H ₂ O	24,8 ml	20 ml	6,75 ml
10 % (w/v) Ammonium- peroxodisulfat (APS)	0,5 ml	0,5 ml	0,12 ml
N,N,N',N'-Tetra- Methyldiamin (TEMED)	35 µl	20 µl	12 µl

Tab 1a : Zusammensetzung der Gellösungen für eine SDS-PAGE im Proteansystem

2.2.5.2. Native PAGE

Nativer Probenpuffer : 50 mM Tris/HCl, pH 6,8
 40 % (w/v) Saccharose
 0,005 % (w/v) Bromphenolblau

Die Zusammensetzungen der Polyacrylamidgele und des Laufpuffers für die native PAGE entsprachen den unter 2.2.5.1. aufgeführten, jedoch ohne Zusatz von SDS. Die nativ aufbereiteten Proteinproben wurden vor dem Probenauftrag 9 : 1 mit dem nativen Probenpuffer versetzt. Im Minigelsystem erfolgte die Elektrophorese bei 12 mA/Gel.

Die präparative native PAGE wurde zur Aufreinigung des als „obere Bande“ bezeichneten TIM-11B2-Antigens (s.3.1) eingesetzt. Die Elektrophorese wurde wie bei der präparativen SDS-PAGE ebenfalls in einem Protean-Elektrophoresesystem von Biorad durchgeführt. Das verwendete Polyacrylamidgel war aus 7 % Trenn- und 5 %

2. Material und Methoden

Sammelgel (Tab. 1b, ohne SDS) zusammengesetzt und hatte eine Dimension von (16 x 20) cm² x 1,5 mm. Für den Probenauftrag wurde das native Gel so gegossen, dass eine um die gesamte Breite des Gels umfassende Auftrags tasche entstand, so dass eine möglichst große Menge an Protein pro Elektrophorese aufgetrennt werden konnte. Es konnten so bis zu 1 mg Protein/Gel aufgetragen werden. Die Elektrophorese lief über Nacht im Kühlraum (bei 4 - 8 °C) und bei 10-12 mA/Gel.

2.2.6. Färbemethoden für PAGE

2.2.6.1. Coomassie-Färbung

Färbelösung : 10 % (v/v) Essigsäure
25 % (v/v) Isopropanol
0,1 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue R 250

Entfärberlösung : 10 % (v/v) Essigsäure

Zum Anfärben der aufgetrennten Proteine mit Coomassie-Brilliant-Blue wurden die Gele direkt nach der Elektrophorese für 30 min in der Färbelösung unter Schütteln inkubiert. Die anschließende Entfärbung erfolgte unter mehrmaligem Wechseln der Entfärberlösung.

2.2.6.2. Silberfärbung

Benötigte Lösungen :

Fixier-Lösung : 50 % Methanol
Reduzierlösung (konz.) : 25 mg/ml DTT
Silberfärbungsreagenz : 0,1 % AgNO₃
Entwicklerlösung : 3 % Na₂CO₃,
vor Verwendung 25 µl Formaldehyd (37 %) in 50 ml Lösung zugeben
Stopp-Reagenz : 2,75 g Zitronensäure in 6,25 ml H₂O

2. Material und Methoden

Die Gele wurden nach der SDS-PAGE mindestens für 1 Std. in 50 % Methanol fixiert. Nach Inkubation für jeweils 30 min und 2 x 15 min in H₂O wurden sie für 20 min in Reduzierlösung geschüttelt. Die Reduzierlösung wurde durch 5000-faches Verdünnen der konzentrierten Lösung (10 µl 25 mg/ml DTT in 50 ml H₂O) hergestellt. Anschließend wurden die Gele für 20 min in 0,1 % AgNO₃ inkubiert. Die Silbernitratlösung wurde abgegossen und nach kurzem Waschen in H₂O wurde zuerst mit kleinerem Volumen Entwicklerlösung (50 ml 3 % Na₂CO₃ + 25 µl Formaldehyd, richtig durchmischt) entwickelt. Sobald die Lösung braun wurde, wurde die Entwicklerlösung gewechselt. Wenn die gewünschte Färbung eintrat, wurde die Reaktion durch Zugabe der Zitronensäure-Lösung gestoppt.

2.2.6.3. Kupferchloridfärbung

(nach Lee *et al.*, 1997)

Mit dieser Methode konnten in relativ kurzer Zeit Proteinbanden in einem SDS-Gel sichtbar gemacht werden, ohne angefärbt und fixiert zu werden (z.B. für den unter 2.2.2.3. angegebenen Zweck). Dazu wurde das Gel direkt nach einer SDS-PAGE für 5 min in einer frisch angesetzter 0,3 M CuCl₃-Lösung in H₂O inkubiert und anschließend in H₂O überführt. Über einer dunklen Unterlage erschienen die Proteinbanden als transparente Banden vor einem hellblauen Hintergrund.

2.2.7. Elektroelution

Für die Elektroelution wurde die Elektroelutionsanlage von Fa. Biorad (Model 422 Electro-Eluter) verwendet. Die Vorbereitung der Membran-Caps und der Zusammenbau des Eluters erfolgte nach Herstellerangaben. Als Elutionspuffer wurde 25 mM Tris/192 mM Glycin/ 0,1 % SDS verwendet. Wurde aus mit Coomassie gefärbten Gelstücken eluiert, so wurden diese vor der Elution mehrmals mit Wasser gewaschen, um Essigsäurespuren zu entfernen. Dies ist wichtig, da die Elution im Basischen stattfindet. Die Elutionseffizienz wurde erhöht, wenn die Gelstücke mittels Skalpell fein zerkleinert wurden. Die Elution erfolgte 4 h bei 10 mA/Glasröhrchen. Bei der Elution der „oberen“

2. Material und Methoden

Bande aus dem nativen Gel wurden die Eluate gegen 5 mM Tris/HCl pH 7,4 über Nacht bei 4 °C dialysiert und anschließend mit 4 x Vol eines (2:8)-Methanol/Aceton-Gemisches versetzt, um die Proteine zu präzipitieren. Aufgrund der Bildung eines unlöslichen Präzipitats nach Fällung mit dem Methanol/Aceton-Gemisch wurde später 50 mM NH_4HCO_3 /0,1 % SDS statt des oben genannten Puffers als Elutionspuffer verwendet. In diesem Fall wurden die Eluate gegen 5 mM NH_4HCO_3 dialysiert.

Bei der Elution nach einer präparativen SDS-PAGE zur Aufreinigung von rekombinanten Proteinen für die Immunisierung wurde mit 25 mM Tris/192 mM Glycin/ 0,1 % SDS eluiert. Die Elektroeluate wurden ausgiebig gegen 1 x PBS dialysiert. Um das Auskristallisieren des SDS bei 4°C zu vermeiden, wurde die Dialyse zuerst für 2 h bei RT durchgeführt und anschließend über Nacht und mehrere Stunden bei 4°C. Es wurden Proben vor und nach der Dialyse entnommen und in einem SDS-Minigel untersucht. Die dialysierten Eluate wurden zusammengeführt und mittels CentriconTM-Konzentratoren aufkonzentriert. Die Proteinlösungen wurden dann jeweils in 4 Portionen von je 500 µl aufgeteilt, die später für die jeweilige Immunisierung benötigt wurden. Aliquots aus den Proteinlösungen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt, zum Einen, um die Reinheit der Präparation beurteilen zu können und zum Anderen, um mit Hilfe von BSA-Verdünnungen als Standards deren Konzentrationen schließlich ermitteln zu können.

2.2.8. Proteinaufreinigung für die Aminosäuresequenzierung

2.2.8.1. Isolierung des 40 kD-Proteins aus der “oberen” Bande

Der Proteinrohextrakt aus Erbsenkeimlingen wurden wie unter 2.2.1.1. angegeben hergestellt. Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (2.2.3) bestimmt. Die nativ aufgereinigten Proteinproben wurden für die präparative native PAGE 9:1 mit nativem Probenpuffer (2.2.5.2) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte nach 2.2.5.2. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde am Gel längs ein Stück abgeschnitten, das anschließend geblottet wurde (2.2.9.1.a). Die nach einer Ponceaufärbung sichtbaren Hauptproteinbanden wurden auf der Membran markiert und anschließend einer Immunfärbung mit TIM-11B2 (2.2.9.2) unterzogen. Das restliche Gel wurde mit

2. Material und Methoden

Coomassie gefärbt. Mit Hilfe des Immunoblots konnte die „oberen Bande“ auf dem Coomassie gefärbten Gel lokalisiert werden. Die Proteine der „oberen Bande“ wurden mittels Elektroelution (2.2.7) aus den ausgeschnittenen Banden isoliert. Die mit Methanol/Aceton-Gemisch gefällten Eluate wurden in jeweils 60 µl 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen und nach 5 minutigen Denaturieren bei 95°C bis zur Benutzung bei -20° C eingefroren. Um die Ausbeute der Aufreinigung zu ermitteln, wurden jeweils 5 µl Aliquots mittels SDS-PAGE analysiert. Als Standards wurden Proben von BSA-Verdünnungen mit aufgetragen. Wenn ausreichende Mengen an Protein für die Mikrosequenzierung vorhanden waren, wurden die Proben zusammengeführt und in einer präparativen SDS-PAGE (2.2.5.1.c) aufgetrennt. Nach einem elektrophoretischen Transfer des SDS-Gels mittels „Tank-Blotting“-Methode (2.2.9.1.b) wurden die auf der PVDF-Membran transferierten Proteine einer Cys-Derivatisierung (2.2.8.2) unterzogen.

2.2.8.2. Cys-Derivatisierung

Coomassie-Färbelösung für PVDF-Membran :

0,1 % (w/v) Coomassie R250

40 % (v/v) Methanol

1 % (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung für PVDF-Membran :

45 % (v/v) Methanol

7 % (v/v) Essigsäure

Die Durchführung der Cys-Derivatisierung erfolgte nach Tarr *et al.* (1983) und Fullmer (1984). Zum Anfärben der Proteinbanden wurde die Membran anschließend für 30 sec in eine modifizierte Coomassie-Färbelösung gelegt. Die Entfärbung erfolgte in 45 % Methanol/ 7 % Essigsäure. Die sichtbaren Proteinbanden wurden ausgeschnitten, zwischen Filterpapier getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.8.3. Aminosäuresequenzierung

Die Aminosäuresequenzierung wurde durch Dr. F. Buck vom Institut für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie des Universitätskrankenhauses Eppendorf der Universität Hamburg durchgeführt.

Der proteolytische Verdau mit LysC-Endopeptidase, die Aufreinigung der Peptidfragmente mittels HPLC und ihre anschließende Aminosäuresequenzierung erfolgten gemäß den Angaben in Reinard *et al.* (2000).

2.2.9. Immunbiochemische Methoden

2.2.9.1. Protein-Transfer (Western-Blot)

a. „Semi-Dry-Blotting“ und Ponceau-Färbung

<u>Transferpuffer</u> (nach	:	25 mM	Tris
Towbin <i>et al.</i> 1978)		192 mM	Glycin
		20 % (v/v)	Methanol
Ponceau-S-	:	0,2 % (w/v)	Ponceau S
Färbereagenz		3 % (v/v)	Trichloressigsäure (TCA)

Für Immunfärbungen wurden die in Polyacrylamidgelen aufgetrennten Proteine mit einem „Semi-Dry-Blotting-Verfahren auf Nitrocellulosemembran (0,2 µm; Schleicher & Schüll, Dassel) transferiert. Hierzu wurde eine Trans-Blot-SD-Zelle der Fa. Biorad benutzt.

Sieben Filterpapiere der Größe (10 x 7) cm² (Whatmann Chromatographie-Papier 3MM), das Gel (ohne Sammelgel) und die Nitrocellulose(= NC)-Membran wurden in den Transferpuffer gelegt. In Richtung Kathode wurden auf 3 Lagen getränkte Filterpapiere nacheinander die NC-Membran und das Gel aufgeschichtet. Anschließend wurden die 4 restlichen Filterpapiere aufgelegt. Dabei musste berücksichtigt werden, dass dieses

2. Material und Methoden

„Blotting-Sandwich“ luftblasenfrei zusammengestellt wurde. Der Transfer erfolgte bei 25 V und 0,385 A bzw. 5,5 mA/ cm² (Filterpapiergröße), bei RT und für 45 min.

Die nun auf die NC-Membran transferierten Proteine wurden mit Ponceau S reversibel gefärbt. Dazu wurde die NC-Membran für 10 min in dem Ponceau-S-Färbereagenz unter Schütteln inkubiert und anschließend in H₂O entfärbt, bis die Proteinbanden die gewünschte Intensität zeigten. Bevor die NC-Membran weiter behandelt wurde (z.B. für die Immunfärbung, 2.2.8.2), wurden die Proteinbahnen markiert und der Molekulargewichtsmarker abgetrennt.

b. „Tank-Blotting“

<u>Carbonat-Transferpuffer</u>	:	10 mM	NaHCO ₃
(modifiziert nach Dunn,		3 mM	Na ₂ CO ₃
1986)		20 % (v/v)	Methanol
		0,025 %	SDS

Dieses „Tank-Blotting“-Verfahren wurde bei dem Transfer nach der präparativen SDS-PAGE der Proben für Mikrosequenzierung (2.2.8) angewendet. Die Proteine wurden auf PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore) transferiert.

Dazu wurde die PVDF-Membran zuerst für 15 sec. in Methanol aktiviert. Nach 2 min. Spülen in H₂O wurde sie für 15 min in dem Carbonat-Transferpuffer inkubiert. Um Reste vom Laufpuffer zu entfernen, wurde das SDS-Gel 2 bis 3 mal mit H₂O gewaschen. (Das im Laufpuffer und in dem unter 2.2.9.1.a. angegebenen Towbin-Transferpuffer enthaltene Glycin stört die Mikrosequenzierung, weswegen hier ein Transferpuffer anderer Zusammensetzung verwendet wurde). Das Gel und 12 entsprechend zurechtgeschnittene Filterpapiere (Whatmann Chromatographie-Papier 3MM) wurden ebenfalls für 15 min in dem Transferpuffer inkubiert. Für den Proteintransfer wurde unter Transferpuffer ein Sandwich bestehend aus : 1) einer Schaumstoffmatte, 2) 6 Lagen Filterpapiere, 3) dem Gel, 4) der PVDF-Membran, 5) 6 Lagen Filterpapiere und 6) einer Schaumstoffmatte zusammengelegt und in die *PROTEAN-Slab-Cell*-Apparatur von Biorad eingespannt. Die

2. Material und Methoden

PVDF-Membran war dabei der Anode, das Gel der Kathode zugewandt. Für den Transfer wurden insgesamt ca. 3,6 Liter Transferpuffer benötigt. Der Transfer selbst erfolgte über Nacht unter Rühren auf dem Magnetrührer bei einer konstanten Spannung von 5 V. Nach beendetem Transfer wurde die PVDF-Membran für die Cys-Derivatisierung nach 2.2.8.2. weiter behandelt.

2.2.9.2. Immunfärbungen

Benötigten Lösungen :

PBS : 2,7 mM KCl
1,5 mM KH_2PO_4
8 mM $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$
137 mM NaCl

PBST : PBS mit 0,05 % Tween 20

Blockierungs- : 1 % (w/v) BSA
Lösung : 1 % (v/v) Lammserum (Gibco)
0,05 % NaN_3
in PBS

Verdünnungs- : 0,05 % (w/v) BSA
Lösung : 5 % (v/v) Lammserum (Gibco)
0,05 % (w/v) NaN_3
in PBST

Blotto : 5 % (w/v) Magermilchpulver in PBST
0,05 % NaN_3
in PBST

2. Material und Methoden

Substratpuffer : 100 mM Tris/HCl, pH 9,5
0,5 mM MgCl₂

Substratstammlösungen :

NBT : 30 mg/ml in 70 % (v/v) DMF
BCIP : 15 mg/ml in DMF

Die mit Ponceau S gefärbte NC-Membran wurde für 2 x 5 min in PBS oder PBST entfärbt und anschließend zum Absättigen der freien Bindungsstellen für mindestens 30 min in der Blockierungslösung oder in Blotto inkubiert. Für die Detektion mit TIM-11B2 wurde die NC-Membran in Blotto blockiert und nach Waschen für 3 x 5 min mit PBS für 2 Std. bis über Nacht bei RT mit dem ersten Antikörper (1:200-Verdünnung des Hybridoma-Kulturüberstandes von TIM-11B2 in Verdünnungs-Lösung) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen von je 5 min mit PBS wurde die NC-Membran für weitere 2 Std. in der Lösung des zweiten Antikörpers (1 : 1000-Verdünnung des Ziegen-anti-Maus- μ -Kette-AP-Konjugats in Verdünnungs-Lösung) inkubiert. Nach erneutem Waschen für 3 x 5 min mit PBS wurde die NC-Membran in Substratpuffer überführt. Zur Färbeentwicklung wurde in 10 ml Subtratlösung jeweils 100 μ l der NBT/BCIP-Substratstammlösungen gegeben und gemischt. Die Farbreaktion erfolgte in dieser Färbesubstratlösung und wurde nach Erreichen einer optimalen Färbung durch Überführen in H₂O abgestoppt.

Bei der Immunfärbung mit den anderen Antikörpern (polyklonalen Antiseren sowie dem monoklonalen Maus-anti-HisTag-Antikörper) wurde die NC-Membran in Blotto blockiert. Die Inkubation mit dem Erstantikörper in entsprechender Verdünnung in Blotto erfolgte für ebenfalls 2 Std. bis über Nacht bei RT. Die Verdünnungen der Erstantikörper waren bei Antiseren in der Regel 1:2000 und bei dem monoklonalen Anti-HisTag-Antikörper 1:3000. Zwischen den Antikörperinkubationen wurde jeweils 3 x 5 min mit PBST gewaschen. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper (Ziegen-anti-Kaninchen-AP-Konjugat bzw. Kaninchen-anti-Maus-AP-Konjugat, jeweils 1:1000 bis 1:3000 in Verdünnungs-Lösung angesetzt) erfolgte ebenfalls für 2 Std. bei RT. Die Färbeentwicklung wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

2.2.10. Gewinnung von polyklonalen Antikörpern aus Kaninchen

2.2.10.1. Immunisierung von Kaninchen

Die Immunisierungen und die Blutentnahmen wurden im Zentralen Tierversuchlabor der Medizinischen Hochschule Hannover durch Dr. J. Maeß durchgeführt. Die zur Immunisierungen verwendeten Kaninchen (*Chinchilla*-Bastarde) stammten aus lokaler Zucht. Als Antigene wurden die durch präparative SDS-PAGE und Elektroelution (2.2.7) aufgereinigten rekombinanten Proteine, die rek. cALD2 und die rek. GS3A, verwendet. Die Proteine waren in 500 µl PBS gelöst. Für jedes Antigen wurde jeweils eine Doppelimmunisierung durchgeführt. Die Kaninchen Nr. 575 und 737 wurden mit 100 µg rek.cALD2 und die Kaninchen Nr. 514 und 518 mit 200 µg rek GS3A als (1:1) Emulsion mit komplettem Freund'schen Adjuvant (cFA) immunisiert. Dazu wurde die Emulsion subkutan in 10 Stellen der dorsalen Halsregion injiziert. Vor der Immunisierung (Präimmunsereum), sowie 2, 4 und 6 Wochen danach wurden jeweils ca. 30 ml aus der marginalen Ohrvene entnommen. Die Seren wurden durch Agglutinieren des Blutes (45 min bei 37°C) und anschließende Zentrifugation für 10 min bei 10000 x g und 4°C (klarer Überstand) gewonnen. Die spezifische Immunantwort wurde in Immunfärbungen mit Gesamtproteinextrakt aus Erbsenkeimlingen als Antigene (2.2.10.2) überprüft. War die Qualität der Antiseren nach 6 Wochen zufriedenstellend, wurde durch Injizieren von reiner Proteinlösung „geboostet“. Die Kaninchen wurden 8 Tagen nach dem „Boosten“ entblutet. Bei einer schwachen spezifischen Immunantwort wurde mit inkomplettem Freund'schen Adjuvant erneut immunisiert und für weitere 6 Wochen gewartet. Danach erfolgte das „Boosten“ nur mit dem Antigen.

2.2.10.2. Immunfärbung zur Überprüfung der spezifischen Immunantwort

Ca. 150 µg Proteinproben aus Erbsenrohextrakt wurden in SDS-PAGE (10 % SDS-Minigele mit einem breiten Kamm) aufgetrennt (2.2.5.1) und auf Nitrocellulosemembran geblottet (2.2.9.1). Nach der Inkubation in Blocklösung (Blotto) für mindestens 30 min wurde die NC-Membran in der Zehner-Hoferkammer (Fa. Hofer) eingespannt und mit Antiserenverdünnungsstufen von 1:500 - 1:4000 in Blotto für 2 h inkubiert. Zuerst wurde

2. Material und Methoden

2 x 5 min in den Kammern und anschließend 2 x 5 min in einer Schale mit PBST gewaschen. Die weiteren Schritte der Immunfärbung erfolgte wie unter 2.2.9.2. beschrieben.

2.2.11. Immuncytochemische Untersuchungen

Die immuncytochemischen Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Frau U. Kunz im Institut für Zellbiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover (Prof. Dr. H. Lehmann) durchgeführt.

2.2.11.1. Fixierung und Einbettung der Pflanzenpräparate

Die immuncytochemischen Untersuchungen wurden an Geweben von etiolierten Erbsenkeimlingen durchgeführt. Die Anzucht der Keimlinge erfolgte wie unter 2.1.1. beschrieben. Die Segmente aus dem oberen Internodus von Erbsenkeimlingen wurden unter Fixierungslösung (4% Formaldehyd in 50 mM PIPES-Puffer pH 7,0) präpariert. Nach 4 stündiger Inkubation in der Fixierungslösung wurden die Präparate 2 x 15 min mit Puffer (50 mM PIPES-Puffer pH 7,0) gewaschen und anschließend zum „Quenchen“ der freien Aldehydgruppen für 45 min in 50 mM NH_4Cl inkubiert. Die Präparate wurde wiederum 2 x 15 min mit Puffer gewaschen, bevor sie in Alkohol aufsteigender Konzentrationen (15%, 30%, 50%, 70%, 90%, 95%, 100%) für jeweils 2 x 15 min entwässert und anschließend in 100% Alkohol über einem Molekularsieb getrocknet wurden. Die Einbettung des Gewebes erfolgte in LRWhite/Alkohol (30% : 70% für 2x1 h; 50% :50% für 17 h; 70% :30% für 1 h) und LR White (100% für 1h; 100 für 20 h). Die Polymerisation erfolgte in geschlossenen Gelatine kapseln bei 55°C für 48 h.

2.2.11.2. Immunogoldmarkierung der Ultradünnschnitte

Die Ultradünnschnitte (50-70 nm) wurden auf Nickelnetzchen (50 Maschen, beschichtet mit 0,55% Pioloform-F) aufgenommen und getrocknet. Die Immunogoldmarkierung wurde durchgeführt, indem die mit den Ultradünnschnitten versehenen Netzchen mit der beschichteten Seite nach unten auf 20µl - 30µl Tropfen der jeweiligen Lösung inkubiert

2. Material und Methoden

wurden. Bei jedem Übertragen in eine neue Lösung wurde die Restflüssigkeit an den Netzchen mit Filterpapier abgesaugt.

Benötigte Lösungen :

- PBS-T : 0,1 % (v/v) Tween-20 in PBS (s. 2.2.9.2)
- 1 % (w/v) BSA in PBS-T
- 0,1 % (w/v) BSA in PBS-T
- 10 mM Na-Acetat, pH 4,5
- 10 mM Na-Perjodat in 10 mM Na-Acetat, pH 4,5
- 10 mM NaBH₄ in PBS

Zum Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen auf den Ultradünnschnitten wurden die Netzchen zunächst auf Tropfen mit 1% BSA/PBS-T inkubiert. Nach 30 min wurden sie auf Tropfen mit den ersten Antikörpern („575/737“- bzw. „514/518“-Antiseren, 1 : 20 und 1 : 40 in 1% BSA/PBS-T) gelegt und für 2 h inkubiert. Nach 2 x 5 min Waschen auf Tropfen mit 0,1% BSA/PBS-T wurden die Netzchen anschließend auf 20µl-Tropfen mit Goldkonjugat (Ziege-anti-Kaninchen, 10 nm Gold; Aurion, Biotrend Immunochemicals) übertragen. Das Goldkonjugat wurde in Verdünnungen von 1:20 bzw. 1:40 in 1% BSA/PBS-T eingesetzt. Nach 30-60 min wurden die Netzchen 2 x 5 min auf Tropfen mit 0,1% BSA/PBS-T, 2 x 5 min auf PBS-T und 2 x 5 min auf H₂O gewaschen. Anschließend wurden sie mit Filterpapier getrocknet. Als Kontrollen wurden Immunogoldmarkierungen mit Präimmunsereen bzw. ohne den ersten Antikörper durchgeführt.

Für die Perjodat-Behandlung (Swords & Staehelin, 1993) wurden einige Schnitte vor Beginn der Immunogoldmarkierung für 1 h auf Tropfen mit 10 mM Na-Perjodat in 10 mM Na-Acetat-Puffer inkubiert. Nach Waschen für 2x5 min auf Na-Acetat-Puffer (10 mM, pH 4,5) und 2 x 5 min auf PBS wurden die Netzchen auf Tropfen mit 10 mM NaBH₄ in PBS übertragen. Nach 30 min wurden sie erneut für 2 x 5 min auf PBS gewaschen und anschließend in die Immunogoldmarkierung - wie oben beschrieben - eingesetzt.

Vor der Auswertung der Markierung wurden die Ultradünnschnitte mittels Uranylacetat und Bleicitrat nachkontrastiert (Lehmann & Kunz, 2000). Dazu wurden die in einer Kontrastiermatte befestigten Netzchen in einem Kontrastierset mit 2% wässriger

2. Material und Methoden

Uranylacetat-Lösung für 3-15 min inkubiert und anschließend mit H₂O abgespült. Danach wurden sie in einem mit Bleicitrat-Lösung nach Reynolds (1963) befüllten Kontrastierset überführt und für 3-10 min inkubiert. Nach gründlichem Abspülen mit H₂O wurden die Netzchen mit Filterpapier getrocknet.

Die Auswertung der Immunogoldmarkierung erfolgte an einem Transmissions-Elektronenmikroskop (Zeiss EM 902), bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV.

2.3. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

Alle in dieser Arbeit angewandten molekularbiologischen Methoden wurden, wenn nicht anders vermerkt, nach „Molecular Cloning“ (Sambrook et al., 1989) bzw. nach Anleitung der verwendeten Kits durchgeführt.

2.3.1. Anzucht von Bakterien

2.3.1.1. Anzucht von Bakterien in Flüssigmedium

Medien und Antibiotika-Stammlösungen :

LB-Medien	:	1 % (w/v)	Trypton
		0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
		0,5 % (w/v)	NaCl
		auf pH 7,4	einstellen
LB-Agarplatte	:	1,5 % (w/v)	Agar-agar in LB

Antibiotika-Stammlösungen :	Endkonzentration in Medien :
50 mg/ml Carbenicillin	50 - 100 µg/ml (bei Platten)
5 mg/ml (in Tetracyclin 70% Ethanol)	10 -12,5 µg/ml

Alle Medien wurden durch Autoklavieren sterilisiert und Antibiotika-Stammlösungen sterilfiltriert.

2. Material und Methoden

Die Anzucht von Bakterienkulturen ging stets von einer Einzelkolonie aus. Zur Herstellung einer Übernachtskultur wurden 5 ml LB-Medien mit entsprechendem Antibiotika-Zusatz mit einem auf LB-Agarplatte vereinzelt Klon angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (180 rpm) inkubiert. Diese Übernachtskultur konnte zum Animpfen einer weiteren Kultur größeren Volumens, zur Plasmid-Minipräparation (2.3.3.1) oder zum Anlegen einer Dauerkultur (Glycerin-Stammkultur) (2.3.1.2) verwendet werden.

2.3.1.2. Anlegen einer Dauerkultur (Glycerin-Stammkultur)

Von einer frischen Übernachtskultur ($OD_{600nm} > 1$) wurden 825 μ l Kultur mit 175 μ l autoklaviertem 86 % Glycerin (für final 15 %) in einem 2 ml Reaktionsgefäß vermischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.2. Transformation von Bakterienzellen

2.3.2.1. Herstellung von transformationskompetenten Bakterien

Die Herstellung kompetenter *E.coli*-XL1Blue- bzw. BLR (DE3)-Bakterien wurde nach der Calciumchloridmethode durchgeführt. 1 ml Übernachtskultur, angeimpft mit einem einzeln gewachsenen Klon, wurden in 500 ml LB-Medium mit 12,5 μ g/l Tetracyclin überführt und im Schüttlerinkubator bei 37°C bis zu einer Dichte von $OD_{600nm} \approx 0,4$ wachsen gelassen. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (5000 x g, 10 min, 4°C) sedimentiert und zum Waschen vorsichtig in 150 ml eiskalter 50 mM $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert. Nach Zentrifugation (wie oben) wurden die Bakterien vorsichtig in 8 ml eiskalter 50 mM $CaCl_2$ -Lösung aufgenommen, 1 h auf Eis inkubiert und danach mit 1 Volumen 40 %iger Glycerin-Lösung in 50 mM $CaCl_2$ gemischt. Die Bakteriensuspension wurde in Aliquots zu 150 μ l in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.2.2. Transformation von kompetenten *E.coli* XL1-Blue-Zellen

SOC-Medium	:	2% (w/v)	Trypton
		1% (w/v)	Hefeextrakt
		10 mM	NaCl
		2,5 mM	KCl
		auf pH 7,0	einstellen, autoklavieren
		20 mM	Glucose
		10 mM	MgCl ₂

Die Glucose und das MgCl₂ wurden erst vor der Verwendung aus entsprechenden Stammlösungen steril dazugegeben.

IPTG-Lösung	:	0,833 M	IPTG in H ₂ O
X-Gal-Lösung	:	2 % (w/v)	X-Gal in N,N'-Dimethylformamid

Für die Transformation wurde die Hälfte des Ligationsansatzes (s. 2.3.8.3) bzw. die entsprechende Menge von Plasmid-DNA mit 150 µl der unter 2.3.2.1. hergestellten Suspension kompetenter Bakterienzellen (nach langsamen Auftauen auf Eis) vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Inkubation für 1,5 min bei 42°C und anschließend für 2 min auf Eis. Nach Zugabe von 900 µl SOC-Medium wurden die Bakterien für 1 h bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Der Transformationsansatz wurde dann für 3 min bei 3000 rpm sedimentiert und der Überstand bis auf ein Restvolumen von ca. 100 µl abgenommen. Das resuspendierte Bakteriensediment wurde auf Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika (i.d. R. 100 µg/ml Carbenicillin) ausplattiert. War eine sehr hohe Transformationseffizienz zu erwarten, so wurden aus dem Transformationsansatz -ohne vorher zu sedimentieren - Aliquots mit verschiedenen Volumina (50 - 300 µl) entnommen und auf Agarplatten ausgestrichen. Handelte es sich bei der Transformation um eine Blau-Weiß-Selektion, so wurden auf den Agarplatten vorher eine X-Gal/IPTG-Mischung (40 µl X-Gal-Lösung + 6 µl IPTG-Lösung + 54 µl H₂O) ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2. Material und Methoden

Die Durchmusterung der Transformanten erfolgte durch Kolonie-PCR (2.3.10.2) oder durch Restriktionsverdau (2.3.7) der mittels Plasmid-Minipräparation (2.3.3.1) isolierten Plasmide.

2.3.2.3. Transformation von kompetenten *E.coli* BLR(DE3)-Zellen

Für die Überexpression der rekombinanten Proteine wurden *E.coli* BLR(DE3)-Zellen (Fa. Novagen) mit dem entsprechenden pET-Expressionsplasmid transformiert. Zuerst wurden dazu i.d.R. kompetente *E.coli* XL1-Blue-Zellen zur Etablierung des Expressionsplasmids mit dem Ligationsansatz nach dem oben beschriebenen Verfahren transformiert. Mit dem resultierenden Plasmid wurden dann kompetente *E.coli* BLR(DE3)-Zellen transformiert. Da sich nach der unter 2.3.2.1. beschriebenen Methode selten effiziente kompetente *E.coli* BLR(DE3)-Zellen herstellen ließen, wurden hauptsächlich gekaufte kompetente Zellen zu diesem Zweck verwendet. Die Transformation erfolgte nach den Herstellerangaben.

2.3.3. Isolierung von DNA

2.3.3.1. Plasmid-Minipräparation aus Übernachtskulturen

Diese Methode diente einer schnellen Plasmidisolierung aus Übernachtskulturen für die DNA-Sequenzierung oder zur Durchmusterung der Transformanten nach einer Transformation mit Ligationsansätzen durch anschließenden Restriktionsverdau.

Benötigte Lösungen :

Lösung 1 : 50 mM Tris/HCl, pH 8
10 mM EDTA
100 µg/ml RNase A

Lösung 2 : 0,2 M NaOH
1 % SDS

2. Material und Methoden

Lösung 3	:	3 M	Kaliumacetat, pH 4,8
PEG-Lösung	:	30 % (w/v)	PEG 6000 1,5 M NaCl
TE-Puffer	:	10 mM	Tris/HCl, pH 8,0 1mM EDTA

3 - 4 ml Übernachtskultur wurden portionsweise durch Zentrifugation (Eppendorf-Tischzentrifuge, jeweils 30 s bei maximaler Geschwindigkeit) sedimentiert. Das Bakteriensediment wurde in 300 µl eiskalter Lösung 1 resuspendiert. Durch Zugabe von 300 µl Lösung 2 und vorsichtiges Durchmischen wurden die Zellen lysiert. Nach Inkubation bei RT für 5 min wurden 300µl Lösung 3 (4 °C) dazugegeben, vermischt und für 10 min auf Eis belassen. Der klare Überstand nach einer anschließenden Zentrifugation bei 15 000xg und 4°C für 15 min wurde mit 1 Volumen Isopropanol versetzt, wodurch die Plasmid-DNA präzipitiert wurde. Die DNA wurde durch Zentrifugation (15 min, 15 000xg und 4°C) sedimentiert und nach einmaligem Waschen mit 500 µl 70% Ethanol (-20°C) 15 min bei RT getrocknet. Das DNA-Sediment wurde in dH₂O aufgenommen und zur erneuten Fällung mit 50 µl PEG-Lösung versetzt. Nach einer Inkubation für 30 min auf Eis wurde die DNA sedimentiert (wie oben). Nach zweimaligem Waschen mit 70%-igem Ethanol wurde das DNA-Sediment getrocknet und anschließend in 50-100 µl dH₂O oder TE-Puffer aufgenommen. Die so präparierte Plasmid-DNA hatte einen hohen Reinheitsgrad und konnte zur Sequenzierung eingesetzt werden.

2.3.3.2. Plasmid-Präparation mittels Nucleobond® Nucleic Acid Purification Kit

Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde das „Nucleobond® Nucleic Acid Purification Kit“ der Fa. Clontech (Heidelberg) eingesetzt. Die Bakterienzellen wurden nach demselben Prinzip wie oben beschrieben lysiert und die Plasmid-DNA wurde über in Einwegsäulen gepackte Anionen-Austauschharze isoliert. Es wurde nach dem Herstellerprotokoll vorgegangen.

2.3.3.3. DNA-Isolierung aus Agarosegel

Die Isolierung von elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (2.3.6) erfolgte mit dem „Nucleotrap[®]Extraction Kit“ der Fa. Macherrey-Nagel (Düren) bzw. dem „QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit“ der Fa. Qiagen (Hilden). In beiden Fällen folgte die Durchführung den Herstellerangaben.

2.3.3.4. Isolierung von PCR-Produkten

Die PCR-Produkte wurden entweder aus dem Gel nach einer Agarosegelelektrophorese (2.3.3.3) oder mit Hilfe des Isolierungs-Kits von PCR-Produkten („Invisorb PCR Purification Kit“) der Fa. Invitex isoliert. Die Durchführung der Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.3.4. Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen

2.3.4.1. Isolierung von Gesamt-RNA mit TRIZOL[®]-Reagenz

(modifiziert nach Chomczynski und Sacchi, 1987)

DEPC-H ₂ O	:	0,05 % DEPC in H ₂ O _{reinst} über Nacht bei RT rühren, dann autoklavieren
Hochsalz-Lösung	:	0,8 M Na-Citrat 1,2 M NaCl

In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde 1 ml TRIZOL[®] (Fa. Gibco) vorgelegt. Etwa 200 mg gefrorenes Pflanzenmaterial wurden unter flüssigem Stickstoff fein gemörsert. Das pulverisierte Pflanzenmaterial wurde in das Reaktionsgefäß mit TRIZOL[®] überführt und gründlich gemischt. Nach Inkubation für 15 min bei RT wurde das unlösliche Pflanzenmaterial durch 10 min Zentrifugation bei 12000 x g und 4°C sedimentiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Zur Phasentrennung wurde 200 µl Chloroform zugegeben, gemischt, 2-3 min bei RT inkubiert und 15 min bei 12000 x g und

2. Material und Methoden

4°C zentrifugiert. 450 µl der wässrigen Phase wurden abgenommen und in einem frischen Reaktionsgefäß mit 250 µl Isopropanol sowie 250 µl Hochsalz-Lösung (0,8 M Natrium-Citrat/1,2 M NaCl) versetzt. In diesem Schritt wird selektiv die RNA gefällt und eine Kopräzipitation von Proteoglycanen und Polysacchariden durch Zugabe der Hochsalz-Lösung vermieden.

Nach gründlichem Mischen und Inkubation für 10 min bei RT wurde die RNA durch 10 min Zentrifugation bei 12000 x g und 4°C abgetrennt. Das RNA-Sediment wurde einmal mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen und 5 min bei 7500 x g und 4°C zentrifugiert. Die RNA wurde an der Luft getrocknet und anschließend in 20 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Zum Resuspendieren wurde die RNA 10 min bei 60°C inkubiert und anschließend für 1 min bei 12000 x g und RT zentrifugiert. Der Überstand mit der gelösten RNA wurde abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Gelagert wurden die RNA-Proben bei -80°C.

2.3.4.2. Isolierung von Gesamt-RNA mittels RNeasy-Kit

Für die Herstellung von cDNA aus Erbsenkeimlingen wurde die dazu benötigte Gesamt-RNA mittels „Plant RNeasy Mini Kits“ isoliert. Die Durchführung der Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.3.5. Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

2.3.5.1. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Quantifizierung von Nucleinsäuren erfolgte spektralphotometrisch durch Messung der Extinktion bei $\lambda = 260$ nm. Es besteht folgende Korrelation zwischen optischer Dichte (OD) und DNA-Konzentration :

$$\text{DNA-Konzentration} = (\text{OD}_{260\text{nm}} \cdot \text{Vf} \cdot 50) \mu\text{g/ml}$$

Zur Bestimmung der Reinheit der DNA-Lösung wurde gleichzeitig die OD bei $\lambda = 280$ nm gemessen. Für reine DNA gilt : $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}} \approx 1,8$.

2.3.5.2. Konzentrationsbestimmung von RNA

Für RNA-Lösungen besteht folgende Korrelation :

$$\text{RNA-Konzentration} = (\text{OD}_{260\text{nm}} \cdot \text{Vf} \cdot 40) \mu\text{g/ml}$$

Für reine RNA gilt : $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}} \approx 1,9 - 2,0$.

2.3.6. Agarosegelelektrophorese

2.3.6.1 Agarosegelelektrophorese für DNA

TAE-Puffer : 40 mM Tris/HCl, pH 8,2
 2 mM EDTA
 20 mM Eisessig

5x DNA-Probenpuffer :

 25 % (w/v) Ficoll 400
 50 mM EDTA
 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
 0,25 % (w/v) Xylen-Cyanol FF

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte durch eine Horizontal-Elektrophorese in 1 bis 2 % Agarosegelen, je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente. Die Agarose wurde in TAE-Puffer durch Aufkochen im Mikrowellengerät gelöst, nach dem Abkühlen auf ca. 50°C wurde 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben, gemischt und anschließend wurde die Gellösung in den Gelträger gegossen. In die noch flüssige Agarose-Lösung wurde ein Probentaschenkamm eingesteckt. Nach dem Aushärten des Gels wurden die DNA-Proben - versetzt mit ¼ Volumen 5 x DNA-Proben - unter TAE-Puffer in die Taschen des Gels geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 4,5 bis 6 V pro cm Elektrodenabstand.

2.3.6.2. Denaturierende Agarosegelelektrophorese für RNA

10X MOPS-Puffer : 0,2 M MOPS
 80 mM Na-Acetat
 10 mM EDTA
 auf pH 7,0 mit NaOH einstellen

Laufpuffer : 1x MOPS in DEPC-H₂O angesetzt

5x RNA-Probenpuffer :

0,16 % (v/v) gesättigte Bromphenolblaulösung
2 mM EDTA, pH 8,0
0,88 M Formaldehyd
20 % (v/v) Glycerin
30 % (v/v) Formamid
40 % (v/v) 10X MOPS
0,33 mg/ml Ethidiumbromid

Gießen der Gele :

Die verwendeten 1,2 % Agarosegele enthielten 3 % Formaldehyd und wurden in einem abgedichteten Gelträger der Größe (15 x 15)cm² gegossen. Dazu wurden 1,8 g Agarose in 123 ml DEPC-H₂O in einem Mikrowellegerät aufgeköcht, bis die Lösung klar war. Nachdem die Lösung etwa auf 50°C abgekühlt war, wurden 15 ml 10X MOPS und 12 ml 37 % Formaldehyd unter dem Abzug zugegeben, gemischt und auf den Gelträger gegossen. Ein 10 er Kamm für feine, dünne Probenaschen wurde eingesteckt und das Gel bis zu seinem Aushärten und Erkalten staubgeschützt unter dem Abzug stehen gelassen.

Probenvorbereitung :

Die Menge und die Reinheit der isolierten Gesamt-RNA wurde mittels spektralphotometrischer Messungen (2.3.5.2) ermittelt. Das 10 µg entsprechende Volumen der RNA-Lösung wurde (gegebenenfalls) auf 12 µl mit DEPC-H₂O verdünnt, mit 3 µl 5x RNA-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 65 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt.

Die Elektrophorese erfolgte im Kühlraum in einer Flachgel-Elektrophoresekammer "DNA

2. Material und Methoden

SUB CELL™ von Fa. Biorad für 5-6 h bei 70 mA oder über Nacht bei 30 mA. Für eine Beladungskontrolle wurde die Elektrophorese nach 15 min Laufzeit kurz unterbrochen und das Gel auf dem UV-Transilluminator fotografiert. Es wurden etwa 1,6 Liter Laufpuffer benötigt. Nach beendeter Elektrophorese - wenn die Bromphenolblaufront ca. 10 cm gewandert war - wurde das Gel erneut auf dem UV-Transilluminator fotografiert und sofort für den Northern-Transfer (2.3.11.1) weiter verwendet.

2.3.7. Restriktionsendonuclease-Reaktionen

Die Restriktion von DNA mit Restriktionsendonucleasen erfolgte in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem. Die Enzyme und die 10x konz. Pufferlösungen wurden von verschiedenen Herstellern bezogen und gemäß deren Empfehlungen (Reaktionstemperatur, -dauer etc.) verwendet. Eine typische Restriktionsreaktion von 1 µg Plasmid-DNA erfolgte in einem Volumen von 20 -50 µl mit 1-5 U Enzym für 1 h bei 37 °C. Bei einer Restriktionsspaltung eines PCR-Produktes wurden i.d.R. 10 U Restriktionsendonucleasen eingesetzt. Die Reaktion wurde entweder durch Zugabe von 2 mM EDTA und 5 min Inkubation bei 70°C oder durch Zugabe von ¼ Volumen 5x DNA-Probenpuffer abgestoppt. Die DNA wurde mittels „PCR Purification Kit“ (Fa. Invitex) oder nach einer elektrophoretischen Auftrennung des Restriktionsansatzes aus dem Agarosegel mittels „Nucleotrap® Extraktion Kit“ (Fa. Macherrey-Nagel) bzw. „QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit“ (Fa. QIAGEN) isoliert.

2.3.8. Klonierung von DNA-Fragmenten

2.3.8.1. T-Vektor-Klonierung

Bestimmte Taq-Polymerasen hängen an den 5'-Enden des PCR-Amplifikats ein zusätzliches Adenin-Nukleotid an („A-Tailing“). Dies kann dazu benutzt werden, PCR-Produkte ohne Einführen von Schnittstellen ungerichtet in einem sogenannten T-Klonierungsvektor zu klonieren. Der Vektor pGemT (Fa. Promega) ist ein solcher T-Vektor. Er ist in seiner MCS („multiple cloning site“) linearisiert und besitzt an den

2. Material und Methoden

beiden 3'-Enden ein zusätzliches Thymidin. Dadurch ist es möglich, mit einem Adenin versehene PCR-Produkte in diesen Vektor einzuligieren und zu klonieren. Der pGemT-Vektor besitzt eine Ampicillinresistenz und ist für eine Blau-Weiß-Selektion konstruiert. Für die Ligation wurden die PCR-Produkte entweder mittels „PCR Purification Kit“ (Fa. Invitex) oder aus dem Agarosegel mittels „Nucleotrap[®] Extraktion Kit“ (Fa. Macherey-Nagel) bzw. „QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit“ (Fa. QIAGEN) isoliert. Die Ligation der PCR-Produkte mit dem pGemT-Vektor erfolgte nach dem Herstellerprotokoll. Die Transformation von *E.coli* XL1-Blue-Zellen mit dem Ligationsansatz erfolgte nach 2.3.2.2. Für Weiß-Blau-Selektion zur Identifizierung der Klone mit den rekombinanten Plasmiden wurde der Transformationsansatz auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin (oder Carbenicillin) und IPTG/X-Gal ausplattiert (s. 2.3.2.2).

2.3.8.2. Ligation von DNA Fragmenten mit Vektor-DNA

Für Klonierungen in anderen Vektoren wurden die DNA-Fragmente nach dem Verdau mit entsprechenden Restriktionsendonucleasen (2.3.7) mit dem entsprechend linearisierten Vektor ligiert. Dazu wurden sie in einem molaren Vektor-Fragmentverhältnis von 1 : 4 zusammengegeben, in einem Volumen von 20 µl mit 2 U T4-DNA-Ligase über Nacht bei 16°C inkubiert.

<u>Ligationsansatz</u> :	x µl	Vektor-DNA
	y µl	Fragment-DNA
	2 µl	10 x Ligationspuffer
	2 µl (= 2U)	T4-DNA-Ligase (z.B. von Promega)
	(16 - x - y) µl	H ₂ O

2.3.9. Herstellung von cDNA aus Erbsenkeimlingen

Hergestellt wurde cDNA aus den jüngsten Internodien von 5 Tage alten Erbsenkeimlingen. Dazu wurde das „SMART™PCR cDNA Library Construction Kit der Fa. Clontech (Heidelberg) verwendet. Die Durchführung der cDNA-Herstellung erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

2.3.10. PCR

Die PCR-Reaktionen wurden mit der *Taq* DNA-Polymerase von Fa. Roche oder mit der *Red-Taq* DNA-Polymerase von Fa. Sigma durchgeführt. Es wurden jeweils die mitgelieferten 10x konzentrierten PCR-Pufferlösungen verwendet. In der Regel enthalten die 10x PCR-Puffer bereits MgCl₂ in entsprechender Konzentration. War dies nicht der Fall, so wurden dem PCR-Ansatz final 1,5- 5 mM MgCl₂ zugegeben. Für eine PCR-Amplifikation eines DNA-Fragmentes innerhalb eines Bereichs, der von *sense*- und *antisense*-Primer eingegrenzt wird, wurde in 0,5-ml-PCR-Reaktionsgefäß auf Eis ein 50 µl-PCR-Ansatz wie folgt zusammenpipettiert :

5 µl	10 x PCR-Puffer
2 µl	20 mM dNTP-Mix
2,5 µl	20 µM <i>sense</i> -Primer
2,5 µl	20 µM <i>antisense</i> -Primer
x µl	„Template“-DNA
1 - 2 U	<i>Taq</i> DNA-Polymerase
ad 50 µl	H ₂ O

Bei den PCR-Reaktionen zur Amplifikation von *cALDI*, *cALD2*, *GSI*, *GS3A* aus der unter 2.3.9. hergestellten ds-cDNA wurde jeweils 1 µl des ds-cDNA-„Pools“ als DNA-Vorlage eingesetzt. Amplifikationen eines DNA-Fragmentes aus einem Plasmid gingen in der Regel von maximal 50 ng Plasmid-DNA aus. Als Negativkontrolle wurde stets ein Ansatz ohne DNA-Vorlage zum Test auf mögliche Kontaminationen mitgeführt.

Die PCR-Reaktionen wurden in 30 Zyklen im programmierbaren TRIO-Thermoblock (Fa.

2. Material und Methoden

Biometra) durchgeführt. Wurde dabei kein Heizdeckel (120°C) benutzt, so wurde der PCR-Ansatz zur Vermeidung des Verdampfens während der Reaktionszyklen mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet.

Ein PCR-Zyklus bestand aus :

Dauer :	Temperatur :	Schritt :
1 min	95° C	Denaturierung
1,5 min	T _{Ann} (55 - 62)° C	Hybridisierung der Primer
2 min	72° C	Polymerase-Reaktion

Nach der letzten Runde der Amplifikation wurde der Ansatz für weitere 8 min bei 72°C inkubiert (finale Elongationsphase) und die Reaktion durch Abkühlen auf 4°C abgestoppt. Der Erfolg der Reaktion wurde durch Gelelektrophorese (1 % Agarose, s. 2.3.6.1) von 5 - 10 µl Aliquots des PCR-Produktes überprüft. Für die Klonierung und Restriktionsreaktion mit Endonucleasen (2.3.7., 2.3.8.) wurde das PCR-Produkt zuerst aufgereinigt (2.3.3.3., 2.3.3.4). Sowohl die „Annealing“- Temperatur (T_{Ann}), die sich nach der Länge und Zusammensetzung der Primer richtet, als auch die Dauer der Polymerase-Reaktion, die von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes abhängig ist, bedurften für jede spezifische PCR-Amplifikation einer Optimierung.

2.3.10.1. Kolonie-PCR

Kolonie-PCR diente einer schnellen Durchmusterung der Transformanten zur Identifizierung von solchen Klonen, die rekombinante Plasmide tragen. Die Bakterienkolonie wurde dazu mit einer sterilen Pipettenspitze eingestochen und in ein Reaktionsgefäß mit 25 µl H₂O überführt. Nach Erhitzen für 5 min bei 95°C wurde die Bakteriensuspension auf Eis abgekühlt und anschließend bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge für 1 min zentrifugiert. 20 µl des Überstandes wurden als „Template“ in die PCR-Reaktion (s. oben) eingesetzt. Für die Amplifikation wurden jeweils ein für die inserierte Sequenz spezifisches und ein aus dem Vektor stammender Primer verwendet. Die in einer anschließenden Agarosegelelektrophorese als positiv identifizierten Klone wurden einer Plasmid- Minipräparation (2.3.3.1) unterzogen.

2.3.10.2. PCR zur Herstellung DIG-markierter Sonden

Bei der DIG-Markierung über die PCR werden die dTTPs im Reaktionsansatz anteilig durch DIG-11-dUTPs ersetzt, die von der *Taq* DNA-Polymerase akzeptiert werden. Dadurch können empfindliche Sonden mit hoher Ausbeute hergestellt werden.

Ein 50 µl DIG-PCR-Ansatz war wie folgt zusammengesetzt :

100 pg	Plasmid
17,5 µM*	DIG-11-dUTP
83,5 µM*	dTTP
je 100 µM*	dATP, dGTP, dCTP
1 x	PCR-Puffer (1,5 mM MgCl ₂ enthaltend)
0,4 µM	<i>sense</i> -Primer
0,4 µM	<i>antisense</i> -Primer
2,5 U	<i>Taq</i> DNA-Polymerase (Fa. Roche oder <i>Red-Taq</i> DNA-Polymerase von Fa. Sigma)
ad 50 µl	H ₂ O
	* „DIG DNA Labeling Mix“ (Fa. Roche) verdünnt mit dNTP-Standardmix

Neben einer Nullkontrolle (Ansatz ohne DNA-Vorlage) wurde zusätzlich ein Ansatz mit nicht markierten dNTPs als Positivkontrolle angesetzt. Nach einem Denaturierungsschritt von 4 min bei 95°C folgten 30 PCR-Zyklen mit jeweils:

45 s	95° C
1 min	55° C oder 57° C (je nach zu markierender DNA-Sonde)
2 min	72° C

pro Zyklus. Nach einer abschließenden Strangsynthese für 8 min bei 72° C wurde die PCR-Reaktion durch Abkühlen auf 4°C abgestoppt. Durch anschließende Agarose-Gelelektrophorese konnte der Erfolg der Markierung überprüft sowie die Konzentration des Markierungsproduktes durch Vergleich der Intensität der Bande mit DNA bekannter

2. Material und Methoden

Konzentration abgeschätzt werden. Vor deren Einsatz als Sonde in einer Northern-Hybridisierung wurde das Markierungsprodukt zuerst gelelektrophoretisch aufgereinigt (2.3.3.3).

2.3.11. Northern-Analyse

2.3.11.1. Kapillartransfer von RNA auf eine Nylonmembran

20X SSC (Transferpuffer) : 3 M NaCl
0,3 M Na-Citrat
auf pH 7,0 mit konz. HCl einstellen

Zum Entfernen freien Formaldehyds und zum Äquilibrieren des Gels wurde das Formaldehyd-Gel 2 x 10 min in 20X SSC inkubiert. Entsprechend zurechtgeschnittene Nylonmembran (positiv geladen, Fa. Roche) wurde 5 min in DEPC-H₂O angefeuchtet und ca. 15 min in 20X SSC aquilibriert. Für den Transfer wurde das Gel mit den Geltaschen nach unten auf 2 Lagen in 20X SSC getränkten Filterpapiere, deren beide Enden in ein mit 20X SSC gefülltes Pufferreservoir getaucht waren, gelegt. Darauf wurde die aquilibrierte Membran luftbasenfrei aufgelegt und an den Rändern gegen Pufferkurzschluß mit wasserdichter Folie (Saran[®], Fa. Roth) abgedichtet. Zwei Lagen in 20X SSC getränkten Filterpapier wurden darauf geschichtet, gefolgt von einem 5 cm dicken Stapel von Papiertüchern, der für nötige Saugwirkung mit etwa 6 g/cm² Membran beschwert war. Der Transfer erfolgte über Nacht.

2.3.11.2. Fixierung der RNA auf einer Nylonmembran

Direkt nach dem Transfer wurde die Membran zum Entfernen von Salzen kurz in DEPC-H₂O gelegt, auf Filterpapiere abgetropft, mit der RNA-Seite zum Licht auf einer Klarsichtfolie für maximal 30 s mit UV-Licht kreuzvernetzt und dabei fotografiert. Die Membran wurde nochmals wie gehabt gespült und abgetropft, auf ein Filterpapier gelegt und anschließend für 20 min bei 120°C gebacken. Danach konnte die Membran direkt für die Prähybridisierung verwendet oder in Alufolie eingeschlagen bei 4 °C gelagert werden.

2.3.11.3. Prähybridisierung und Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden

Zum Prähybridisieren wurde die Membran in 35 ml DIG *Easy Hyb* in einem Hybridisierungs-glasröhrchen für 1 h bei 50°C im Hybridisierungssofen rotierend inkubiert. Für die Hybridisierung wurden 25 ng Sonden-DNA/ml Hybridisierungspuffer verwendet. Die Sonde wurde gegebenenfalls in 50 µl DEPC-H₂O verdünnt, bevor sie 10 min im Wasserbad bei 100°C denaturiert wurde. Nach dem Denaturieren wurde die Sonde sofort zu 9 ml vorgewärmter DIG Easy Hyb gegeben, um Renaturierung zu verhindern. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 50°C.

2.3.11.4. Detektion hybridisierter DIG-markierter Sonden

a. Posthybridisierungswaschschritte

Benötigte Lösungen :

20X SSC-Stammlösung : s. 2.3.11.1

SDS-Stammlösung : 10 %(w/v) SDS

Nach der Hybridisierung wurde die Membran in einem Hybridisierungsröhrchen mit insgesamt 200 ml 2X SSC/0,1 % SDS Waschlösung unter Schütteln gespült und 2 x 5 - 15 min auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran für 2 x 15 min mit insgesamt 100 ml auf 68°C vorgewärmter 0,5X SSC/0,1% SDS Waschlösung bei 68°C im Hybridisierungssofen inkubiert. Die weiteren Waschritte erfolgten mit insgesamt 100 ml auf 68°C vorgewärmter 0,1X SSC/0,1% SDS Waschlösung ebenfalls für 2 x 15 min bei 68°C im Hybridisierungssofen. Die Membran wurde anschließend direkt für die Detektion weiter verwendet.

b. Chemilumineszente Detektion mit CDP-*Star*[®]

Die chemilumineszente Detektion mit CDP-*Star*[®] entspricht einer Immunfärbung der DIG-markierten hybridisierten Sonden mit anti-DIG-AP Fab-Fragmenten (Fa. Roche). Das Substrat CDP-*Star*[®] (ein 1,2-Dioxetan-Derivat) wird durch die an diese Fab-

2. Material und Methoden

Fragmente konjugierte alkalische Phosphatase zu einem metastabilen Dioxetan-Phenolat-Anion dephosphoryliert, das unter Lichtemission zerfällt. Diese Lichtemission kann auf einem lichtempfindlichen Film sichtbar gemacht werden.

Benötigte Lösungen :

Maleinsäure-Puffer	:	100 mM	Maleinsäure
		150 mM	NaCl
		auf pH 7,5 einstellen	
Waschpuffer	:	0,3 % (v/v)	Tween-20 in Maleinsäure-Puffer
Blocklösung	:	1%(w/v)	Blockierungsreagenz (Fa. Roche) in Maleinsäure-Puffer,
Detektionspuffer	:	100 mM	Tris/HCl
		100 mM	NaCl
		auf pH 9,5 einstellen, autoklavieren	
Diethanolaminpuffer	:	100 mM	Diethanolamin
		1 mM	MgCl ₂
		auf pH 9,5 einstellen, steril filtrieren	
Antikörperlösung	:	1:20 000 Anti-DIG-AP in 1x Blocklösung (- 37,5 mU/ml)	
Substratlösung	:	0,25 mM	CDP- <i>Star</i> [®] in Diethanolaminpuffer,
		vor Gebrauch aus 12,5 mM CDP- <i>Star</i> [®] ansetzen	

Nach den Waschschritten wurde die Membran in einer Polystyrolschale für 1 min in Waschpuffer gewaschen, bevor sie für jeweils 30 min zunächst in 50 ml Blocklösung, dann in 50 ml Antikörper-Lösung inkubiert wurde. Nicht gebundene Antikörper wurden

2. Material und Methoden

durch Waschen mit Waschpuffer für 2 x 10 min entfernt. Nach Spülen mit Detektionspuffer wurde die Membran für weitere 5 min im Detektionspuffer inkubiert. 500 µl Substratlösung wurden auf einem Stück Plastikfolie (hergestellt aus Klarsichthülle) fein verteilt als Tröpfchen vorgelegt und die Membran nach leichtem Abtropfen mit der richtigen Seite auf die Substrattröpfchen gelegt und sofort durch ein zweites Stück Plastikfolie bedeckt. Zur gleichmäßigen Verteilung des Substrates wurde die Folie glatt gestrichen und überschüssige Lösung sowie evtl. Bläschen nach außen weggeschwift. Nach Erreichen des Emissionsmaximums (ca. 60 min nach Substratzugabe) erfolgte die Belichtung eines Kodak BioMax Light Films (oder Kodak BioMax MR-1 Röntgenfilm) (Fa. Sigma) je nach Signalstärke für 3 - 15 min. Der Film wurde in konventioneller Weise entwickelt.

2.3.11.5. Sondenentfernung und Rehybridisierung

Zum Entfernen des CDP-Star® wurde die Membran in einem Hybridisierungsröhrchen mit autoklavierten Reinstwasser unter Schütteln gewaschen. Zur Sondenentfernung wurde die Membran mit maximal 100 ml auf 100°C vorgewärmter 0,1% (w/v) SDS-Lösung zunächst unter Schütteln gespült und anschließend zweimal für weitere 10 min in 0,1 % (w/v) SDS-Lösung in einem Hybridisierungsröhrchen im Hybridisierungsöfen bei 100°C rotierend inkubiert. Nach Abkühlung in 0,1% SDS wurde die Membran in Waschpuffer (s. 2.3.11.4) äquilibriert und für die Prähybridisierung verwendet oder in 2x SSC (eingeschweift) bei 4°C gelagert und vor Wiederverwendung in Waschpuffer gespült.

2.3.11.6. Densitometrische Auswertung des Northern-Blots

Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Hilfe der ScanPack 2.0 Software (Fa. Biometra). Dazu wurden die Northern-Blots bzw. die dazugehörigen Fotos mit einer Auflösung von 300 dpi und 256 Graustufen eingescannt. Die Signalstärke wurde als Integral aus Fläche und Schwärzungsgrad mit Hilfe des ScanPack-Programms quantifiziert. Die Daten wurden in das Programm Quattro Pro 8 (Corel) exportiert, wo eine graphische Darstellung der relativen Signalintensitäten erfolgte. Die maximale Signalstärke wurde dazu formal gleich 100 % gesetzt.

2.3.12 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen der DNA wurden von der Fa. Sequence Laboratories Göttingen GmbH durchgeführt.

2.3.13 Computergestützte Sequenzanalyse und Internet-Ressourcen

Die Ermittlung von optimalen Primerpaaren für die PCR erfolgte mit dem Programm OMIGA 1.1 (Oxford Molecular Group, Ltd.). Die Analysen der Proteinsequenzen: Ermittlung der Hydrophilie-Plots nach Kyte-Doolittle (1982), der Antigenizitätsindexe nach Jameson-Wolf (1988) und der Oberflächenwahrscheinlichkeit-Plots nach Emini (1985) wurden mit Hilfe des Programms *ProteanTM/Lasergene* (DNA-Star) durchgeführt. Die Vergleiche der Aminosäuresequenzen erfolgte unter anderem auch mittels des Programms *MegAlign* (DNA-Star).

Außerdem kamen im Verlauf dieser Arbeit folgende Internet-Ressourcen zum Einsatz :

URL	Institution
http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/dialign	Bioinformatik-Server der Universität Bielefeld (BiBiServ). Zugriff auf das Programm <i>DIALIGN 2.1</i> (Morgenstern 1999) für Sequenzgegenüberstellungen.
http://www.ebi.ac.uk	Das <i>European Bioinformatics Institute</i> des EMBL. Zugriff auf die EMBL-Sequenzdatenbank sowie Sequenzvergleiche mittels FASTA und BLITZ (Pearson & Lipman, 1998; Smith & Waterman, 1981).
http://www.expasy.ch	Der ExPaSy-Server des Schweizer Instituts für Bioinformatik mit Zugang zu SwissProt-Datenbank.

2. Material und Methoden

<http://www.medline.de>

MEDLINE Deutsches Medizin Forum. Zugriff auf die *Medline*-Literatur-Datenbank.

<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov>

Das *National Center for Biotechnology Information* der *National Library of Medicine / National Institute of Health*. Sequenzabgleiche mittels BLAST Algorithmus (Altschul, 1990), Zugriff auf GenBank, die *Medline*-Literatur-Datenbank sowie das Informationssystem *Entrez*.

3. ERGEBNISSE

Sprunck konnte in ihrer Dissertation (1996) mittels Immunfärbung nach nativer PAGE zeigen, daß der monoklonale Antikörper TIM-11B2 neben der bereits identifizierten cytosolischen Aldolase mindestens ein weiteres Protein erkennt. In der Immunfärbung nach einer zweidimensionalen PAGE wurden zusätzliche Punkte mit einem pI zwischen 6,0 (ein Spot) bzw. 6,4 (ein bis zwei Spots) detektiert (Sprunck, 1996). In der vorliegenden Doktorarbeit sollten die weiteren Antigene des monoklonalen Antikörpers TIM-11B2 identifiziert und charakterisiert werden. Nach Klonierung der entsprechenden Gene sollen die bisher proteinbiochemisch erhaltenen Daten durch molekularbiologische Methoden verifiziert werden.

3.1. Aufreinigung des weiteren TIM-11B2-Antigens

3.1.1. Immunfärbung nach nativer Gelelektrophorese

Die Immunfärbung des Gesamtproteins aus Erbse mit dem monoklonalen Antikörper TIM-11B2 nach nativer Gelelektrophorese (2.2.5.2) führt zu zwei distinkten Banden, von denen die weiter gelaufene sich auf derselben Höhe mit der durch dem polyklonalen Antikörper gegen cytosolische Aldolase (Prof. Schnarrenberger, FU Berlin) erkannten Bande befindet. Diese TIM-11B2-Antigene werden anschließend "obere" bzw. "untere Bande" (Abb. 1) genannt.

Basierend auf diesen Daten sollte eine Aufreinigungsmethode erarbeitet werden, welche die Identifikation weiterer Antigene für den monoklonalen Antikörper TIM-11B2 ermöglichen sollte. Dazu wurden präparative native Polyacrylamidgelelektrophoresen durchgeführt. Der Bereich der "oberen Bande" wurde immunbiochemisch identifiziert, aus dem Gel ausgeschnitten und die Proteine elektroeluiert. Anschließend wurde das Eluat einer Aminosäuresequenzanalyse unterzogen.

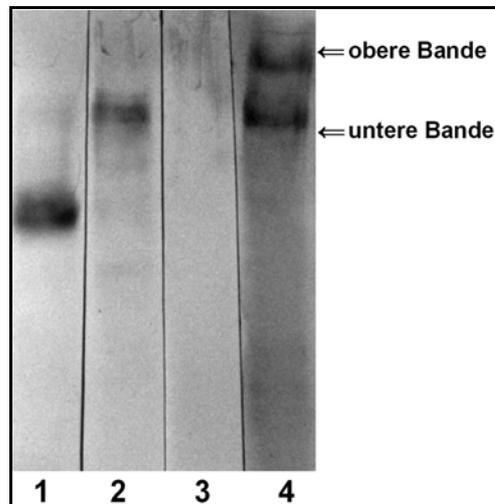


Abb. 1 : Immunfärbung nach nativer PAGE.

Jeweils 10 µg nativ aufgereinigter Proteinrohextrakt aus 7 Tage alten etiolierten Erbsenkeimlingen (2.2.1.1.) wurde unter nativen Bedingungen gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.2.5.2). Die NC-Membran wurde in Streifen geschnitten und separat mit dem polyklonalen Antikörper gegen plastidäre Aldolase (Bahn 1), gegen cytosolische Aldolase (Bahn 2), GaMµ-AP (Bahn 3) sowie TIM-11B2 (Bahn 4) detektiert. Die Immunfärbung wurde nach (2.2.9.2) durchgeführt.

3.1.2. Aufreinigung des 40 kDa-Protein aus der “oberen” Bande

Die Auftrennung der TIM-11B2-Antigene in eine obere und eine untere Bande konnte nur erreicht werden, wenn das diskontinuierliche native Polyacrylamidgel aus 7 % Trenngel und 5 % Sammelgel zusammengesetzt war. Nach der Elektrophorese wurde dem Gel am Rand ein 2 cm breites Gelstück der Länge nach ausgeschnitten. Das restliche Gel wurde mit Coomassie gefärbt (Abb.2A). Der abgeschnittene Streifen wurde geblottet und anschließend in einer Immunfärbung mit TIM-11B2 detektiert. Dies diente später als Orientierungshilfe, im welchem Bereich des Gels sich die auszuschneidende obere Bande befindet (Abb.2B).

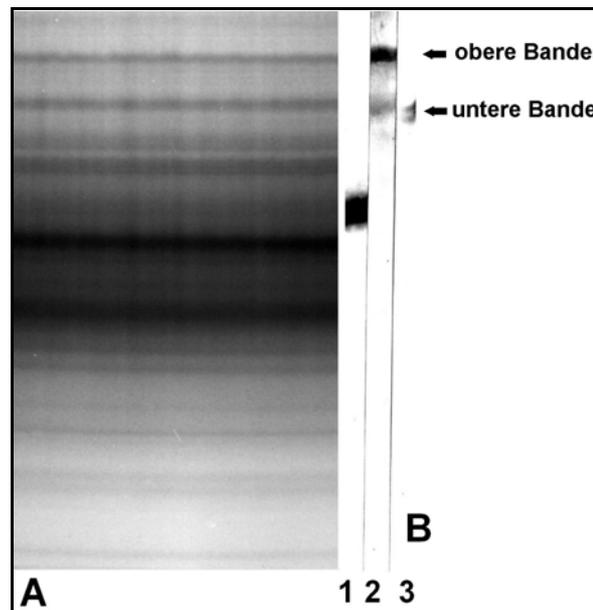


Abb. 2 : Native Präparative Gelelektrophorese.

600 - 1000 µg Gesamtprotein des Erbsenrohextraktes wurden auf ein präparatives natives PAGE der Größe (16 x 20 x 0,15) cm³ (ohne Kamm) aufgetragen. Das Trenngel war 7 % und das Sammelgel 5 %. 2 cm breites Gelstück wurde ausgeschnitten, auf NC-Membran geblottet und nach Ponceaufärbung die Hauptbanden markiert. Das restliche Gel wurde mit Coomassie gefärbt (A). Die Membran (B) wurde in 3 Streifen geschnitten und in einer Immunfärbung jeweils mit anti-plastidäre-Aldolase polyklonalen Antikörpern (1), TIM-11B2 (2) und anti-cytosolische-Aldolase polyklonalen Antikörpern (3) detektiert.

Nach der Elektroelution wurden die Eluate gegen 5 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,2 über Nacht dialysiert. Anschließend wurde mit einer Mischung aus Methanol/Aceton (2:8) gefällt.

3.1.3. Gelelektrophoretische Analyse und Immunodetektion des Eluat aus der “oberen” Bande

Aliquots von je 5µl wurden entnommen, um in einer gelelektrophoretischen Analyse die Ausbeute mit Hilfe eines BSA-Standards zu ermitteln (Abb.3). Neben der Bande bei 40 kDa erschien nach einer SDS-PAGE eine zusätzliche Bande bei 80 kDa, die mit einer stärkeren Intensität hervortrat.

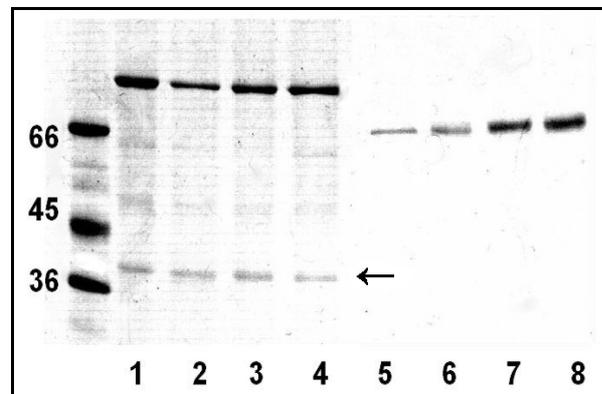


Abb. 3 : Coomassie gefärbtes SDS-Gel (10 %) zur Analyse der Eluate aus der “oberen” Bande. Jeweils 5 μ l Aliquots der in 60 μ l 1x SDS-Probenpuffer aufgenommenen Präzipitate der Elektroeluate nach der Fällung mit Methanol/Aceton (2:8) wurden aufgetragen. Zur Ermittlung Ausbeute wurden BSA-Standards von jeweils 100, 200, 300 und 400 ng (Bahn 5 - 8) mit aufgetragen. Bei den Bahnen 1 - 4 repräsentiert pro Bahn ein Aliquot einer Elution der Proteinbande aus einem einzigen präparativen nativen Polyacrylamidgel. Pfeil zeigt das interessierende Protein bei ca. 40 kDa.

Durch eine lineare Regression mit den BSA-Standards nach einer densitometrischen Analyse des Coomassie gefärbten Gels konnte eine Proteinmenge (Pfeil auf Abb.3) von durchschnittlich 100 ng pro Bahn, somit eine Gesamtausbeute von ca. 1 μ g pro präparatives natives Gel, ermittelt werden. Daraus folgt, dass aus 0,6 - 1 mg Gesamtprotein bis zu 1 μ g des 40 kDa-Proteins aufgereinigt werden.

Mittels Immunfärbung (TIM-11B2) wurden die Eluate auf das Vorhandensein der oberen Bande überprüft. Wie die Abbildung 4 zeigt, ist dies der Fall.

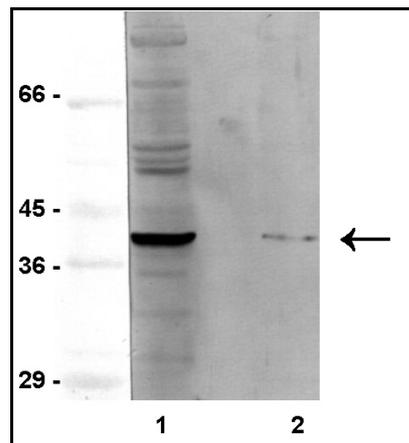


Abb. 4: Immunfärbung des Eluats aus der oberen Bande mit TIM-11B2. 5 μ l Aliquot der in 60 μ l 1x SDS-Probenpuffer aufgenommenen Präzipitate des Elektroeluats nach der Fällung mit Methanol/Aceton (2:8) wurde aufgetragen (Bahn2). Als Positivkontrolle diente eine Probe mit Proteinrohextrakt aus Erbse (Bahn 1).

3.2. Mikrosequenzierung des 40 kDa-Proteins aus der „oberen Bande“

3.2.1. Präparative SDS-PAGE und Blotten auf PVDF-Membran

Nachdem die erforderliche Menge an Protein erreicht wurde, wurden die gesammelten Proben schließlich in einer präparativen SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet, die dann nach 2.2.8.2. zur Vorbereitung für die Mikrosequenzierung behandelt wurde. Abbildung 5 zeigt die PVDF-Membran nach Cystein-Derivatisierung und anschließender Coomassiefärbung. Das 40 kDa-Protein der „oberen Bande“ (Pfeil) wurde ausgeschnitten und im Verdau mit LysC-Endopeptidase eingesetzt.

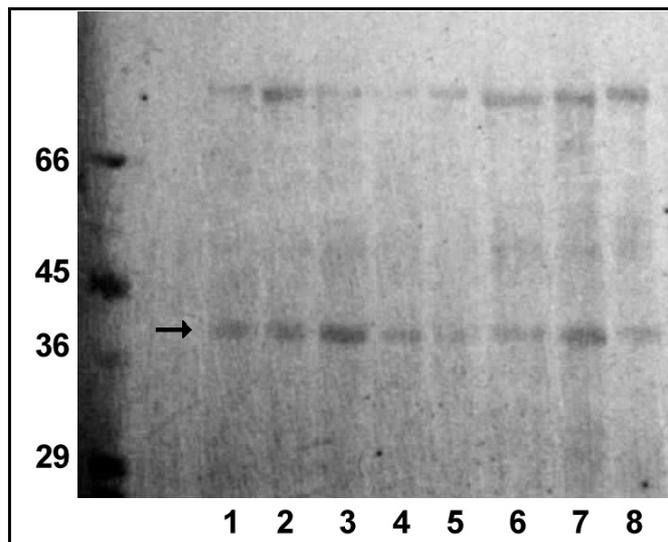


Abb.5 : Coomassie gefärbte PVDF-Membran mit den Proteinproben für die Mikrosequenzierung nach der Cystein-Derivatisierung. Es wurden pro Bahn (1 - 8) jeweils aus zwei Elutionen zusammengeführte Proben aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in einer SDS-PAGE (11%) bei 25 mA (Sammelgel) und 35 mA (Trenngel). Der Transfer erfolgte über Nacht bei 5 V in einer „Tank-Blotting“-Apparatur (Fa. Biorad) mit Dünn-Carbonat + 0,025 % SDS als Puffer. Nach der Cystein-Derivatisierung wurde der Blot nach dem Protokoll zur Färbung von PVDF-Blot für Mikrosequenzierung (2.2.8.2) mit Coomassie gefärbt. Pfeil zeigt das 40 kDa-Protein der oberen Bande.

3.2.2. Verdau mit LysC-Endopeptidase und HPLC der Spaltprodukte

Nach Verdau mit LysC-Endopeptidase (s.2.2.8.3) wurden die Peptide mittels HPLC (130A, Applied Biosystems) auf eine C4 Reverse-Phase-Säule (Vydac C4, 300 Å Porengröße, 5 mm Partikelgröße, 2,1 x 250 mm) aufgetrennt (Abb. 6). Ein Kontrollverdau mit einem Membranstück aus dem Originalblot, das kein Protein beinhaltetete, wurde parallel durchgeführt.

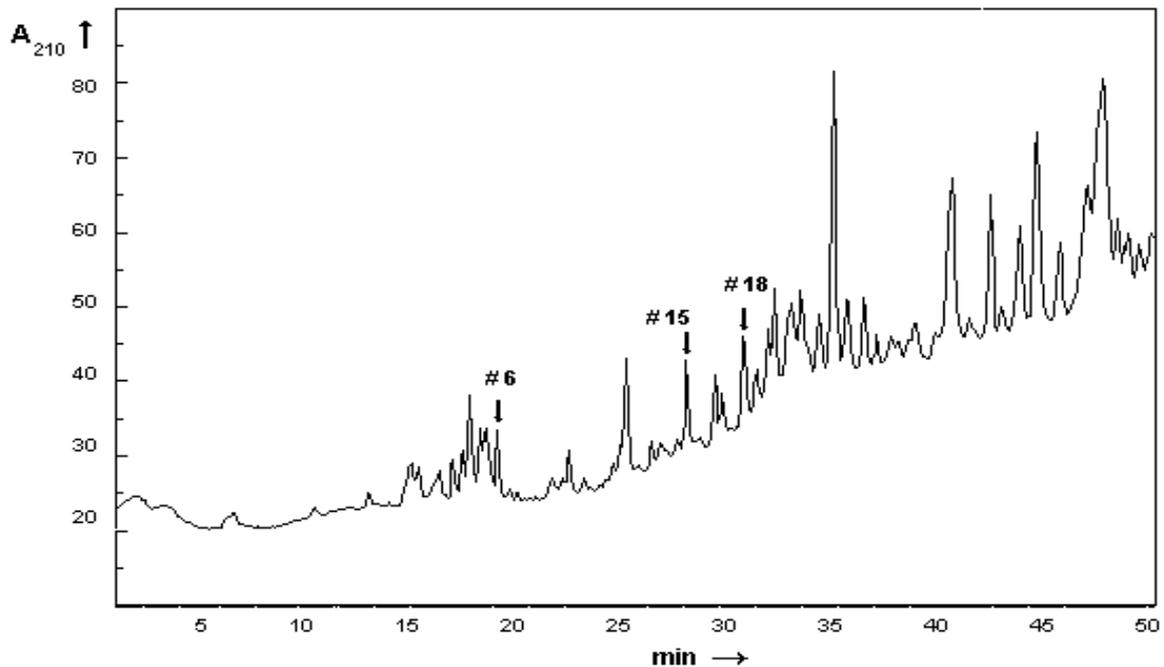


Abb. 6 : Elutionsprofil der HPLC der Spaltpeptide. Die HPLC erfolgte auf eine Reversed-Phase-Säule (Vydac C4, 300 Å Porengröße, 5 mm Partikelgröße, 2,1 x 250 mm). Die bei 210 nm detektierten Peptide wurden mit einem linearen Gradienten (0 - 100 % B in 50 min; Lösung A = Wasser/0,1 % TFA; Lösung B = 70 % Acetonitril/0,09 % TFA) bei einer Flußrate von 200 µl/min eluiert. A.U.F.S = 0,05. Es wurden die gekennzeichneten Peptidpeaks (Peaks #6, #15 und #18) sequenziert.

3.2.3. Ergebnisse der Mikrosequenzierung des 40 kDa-Proteins aus der oberen Bande

Die Sequenzierung der Peptidfragmente (s. Abb. 6) erfolgte mit Hilfe des 476A Protein Sequencers von Applied Biosystem. Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse der Sequenzierung. Durch internetgestützte Sequenzhomologievergleiche konnten die Sequenzen als legitime Produkte einer LysC-Spaltung in den Glutamin-Synthetasen GS1 (EMBL-Nr. AAA33669, bzw. PIR-Nr. B28089) und GS3A (EMBL-Nr. AAB03492 bzw. PIR-Nr. S62711) identifiziert werden.

Peak (Abb.6)	Aminosäuresequenz
Peak #6 GS1	A F G R D V V E A X ¹⁶⁵ A F G R D V V E A ¹⁷³
Peak #15 GS3A	X E/Y (T) A D I N V F X ²⁸¹ H E T A D I N V F ²⁸⁹
Peak #18 Hauptkomponente GS3A	I I A E Y I X V (G) X ¹⁹ I I A E Y I W V G ²⁷
Peak #18 schwache Nebenkompone GS3A GS1	D X E V I L ⁶⁷ D S E V I L ⁷² ⁶⁶ D S E V I L ⁷¹

Tabelle 2 : Mikrosequenzierung des 40 kDa-Proteins aus der oberen Bande. Vergleiche wurden mit den Glutamin-Synthetase-Isoenzymen 1 und 3 A aus *Pisum sativum L.* mit EMBL-Nr. AAA33669 und PIR-Nr. B28089 bzw. EMBL-Nr. AAB03492 und PIR-Nr. S62711 durchgeführt. ⁶⁵A -- N⁷⁰ : die Positionen der Aminosäure innerhalb der Polypeptidsequenzen. Als X dargestellt sind nicht eindeutig zu identifizierende Aminosäuren.

3.3. Klonierung von *GS3A*, *GS1*, *cALD2* und *cALD1*

Die durch die Mikrosequenzierung identifizierten Proteine sollten für weitere Untersuchungen kloniert werden. Die cDNAs für *cALD2*, *cALD1*, *GS3A* und *GS1* dienten dazu, die für die Herstellung von Gensonden für Northern-Analyse benötigte DNA zur Verfügung zu haben und außerdem sollten dadurch auch die entsprechenden rekombinanten Proteine in einem bakteriellen Expressionssystem überexprimiert werden können. Dies erlaubte eine einfachere Reindarstellung der Proteine, die für weitere immunbiochemischen Untersuchungen und für die Herstellung von polyklonalen Antikörpern benötigt wurden.

3.3.1. PCR zur Amplifikation der Gene aus Erbsen-cDNA

Zur Klonierung der Gene wurden die dazugehörigen DNA-Sequenzen, die in den Datenbanken bereits erhältlich sind, zu Hilfe gezogen. Es wurden Primer daraus abgeleitet (Tab.3), die dann zur Amplifikation der entsprechenden Genen in einer PCR mit ds-cDNA aus Erbsenkeimlingen als „Template“ eingesetzt wurden. Die ds-cDNA wurde aus der Gesamt-RNA aus den jüngsten Internodien von 5 Tagen alten Erbsenkeimlingen mit Hilfe des SMART-Kits (Fa. Clontech) hergestellt (2.3.9).

Gene	<i>sense</i> -Primer	<i>antisense</i> -Primer	Erwartete Größe
<i>GS3A</i>	5'-AACCGCGTTCTTCTT TTTCC-3'	5'- TGGTGGTTGGA ACTT CATGG-3'	1093 bp
<i>GS1</i>	5'-GATTCATCATCCAAC GATCC-3'	5'-AAGAACACAAAGCCA TGTCC-3'	1253 bp
<i>cALD2</i>	5'-GAATTCATGTCGCAC TTCAAGAGC-3'	5'-CTCGAGAGAAGAAAC CAGCATTGAT-3'	1100 bp
<i>cALD1</i>	5'-GAATTCATGTCTGCC TTTGTTGGAA-3'	5'-CTCGAGAAGCTCTCC ATTTAGAA-3'	1094 bp

Tabelle 3 : Die Primer zur Amplifikation der Gene aus einer Erbsen-cDNA. Die *GS3A*- und *GS1*-Primer stammen aus den UTR-Bereichen der *GS3A*-/*GS1*-cDNA. Die *cALD2*- und *cALD1*-Primer wurden aus den kodierenden Bereichen abgeleitet, jeweils mit den Schnittstellen *EcoRI* (*sense*-Primer) und *XhoI* (*antisense*-Primer) versehen (unterstrichen). Siehe auch 2.1.4.

Für die Amplifikation der Gene für *cALD1* und *cALD2* wurden bei den Primern direkt Restriktionsschnittstellen für *EcoRI* bzw. *XhoI* eingeführt, die später für die Klonierung in den Expressionsvektor pET32(a+) benötigt wurden. Im Falle von *GS3A* und *GS1* wurde auf Restriktionsschnittstellen verzichtet, da eine spezifische Amplifikation zuerst sehr wichtig war. Die für die Amplifikation der Gene für *GS3A* bzw. *GS1* abgeleiteten Primer stammen aufgrund der recht hohen Homologie in den 5'- bzw. 3' Enden aus den nicht translatierten Bereichen der mRNA. Konnten mit diesen Primern die Gene amplifiziert werden, so sollte für die Klonierung in den Expressionsvektor pET32(a+)

3. Ergebnisse

neue mit spezifischen Schnittstellen versehene Primer hergestellt werden, mit denen in einer weiteren PCR die kodierenden Regionen von GS3A bzw. GS1 amplifiziert werden sollten.

Abb. 7a und 7b zeigen das Ergebnis der PCR-Amplifikation.

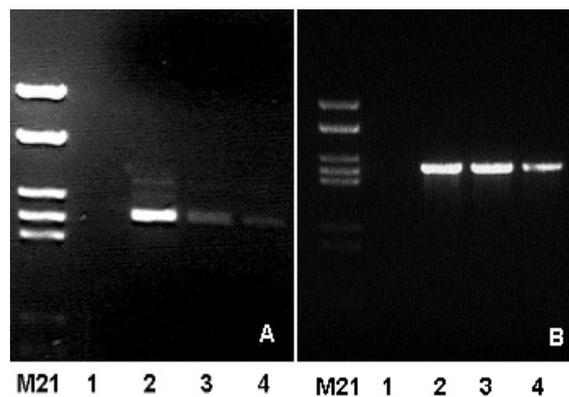


Abb. 7a : PCR-Amplifikation der Gene für cALD 1(A) und cALD2 (B)

Die PCR wurde unter (2.3.10) angegebenen Bedingungen durchgeführt. Jeweils 5 µl des PCR-Produktes wurde auf 1 % Agarosegel aufgetragen. M21 = M21-DNA-Marker mit 2617 bp, 1857 bp, 1246 bp, 1058 bp, 929 bp.

Bahn	Template	Primer	T _{Ann}	Bahn	Template	Primer	T _{Ann}
A1	-	cALD1for/ cALD1rev	56°C	B1	-	cALD2for/ cALD2rev	58°C
A2	ds-cDNA		56°C	B2	ds-cDNA		58°C
A3	(Internodien)		58°C	B3	(Internodien)		60°C
A4			60°C	B4			62°C

3. Ergebnisse

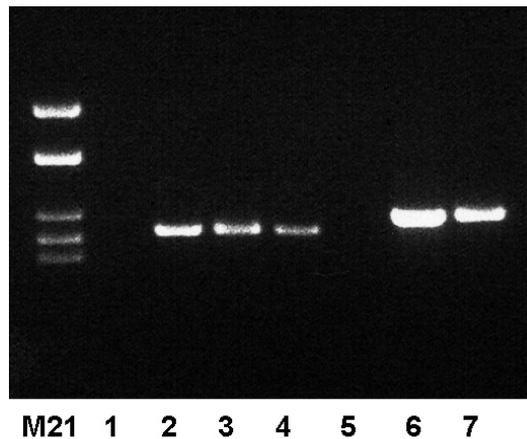


Abb. 7b : PCR-Amplifikation der Gene für GS3A (1 - 4) und GS1 (5 - 7)

Die PCR wurde unter (2.3.10) angegebenen Bedingungen durchgeführt. Jeweils 5 µl des PCR-Produktes wurde auf 1 % Agarosegel aufgetragen. M21 = M21-DNA-Marker mit 2617 bp, 1857 bp, 1246 bp, 1058 bp, 929 bp.

Bahn	Template	Primer	T _{Ann}	Bahn	Template	Primer	T _{Ann}
1	-		57°C	5	-		57°C
2	ds-cDNA (Internodien)	GS3Afor1/ GS3Arev1	57°C	6	ds-cDNA (Internodien)	GS1for1/ GS1rev1	57°C
3			59°C	7			59°C
4			61°C				

Wie die Abbildungen 7a und 7b zeigen, konnten die Gene für cALD1, cALD2, GS3A und GS1 erfolgreich aus einem „Pool“ von doppelsträngigen (ds-) cDNA aus den Internodien von Erbsen-keimlingen in einer PCR isoliert werden. Die cDNA für cALD1 konnte bei einer „Annealings“-Temperatur von 56 °C recht gut amplifiziert werden (Abb7a. A.). Die detektierten Banden wurden jedoch mit erhöhter Temperatur schwächer. Bei der Amplifikation der cDNA für cALD2 konnte dagegen kein Unterschied bei der „Annealing“-Temperatur von 58 °C und 60°C festgestellt werden. Selbst bei der „Annealing“-Temperatur von 62°C war die Schwächung der Bande nur unmerklich (Abb7a. A). Bei *GS3A* ist eine abnehmende Intensität der Bande mit steigender „Annealing“-Temperatur festzustellen (Abb. 7b). Die Bande der DNA für GS1 ist zwar mit steigender Temperatur schwächer, die Amplifikation war jedoch im Vergleich zu der von *GS3A* besser.

3.3.2. Klonierung in pGemT

Die erhaltenen PCR-Produkte (Abb.7a und 7b) wurden in den Klonierungsvektor pGemT (Fa.Promega) nach Herstellerangaben kloniert. Die positiven Klone wurden mit Hilfe eines Restriktionsverdau der durch Plasmid-Minipräparation aufgereinigten Plasmide mit den Restriktionsendonukleasen SstI und SstII (2.3.3.1 und 2.3.7) bzw. durch Kolonie-PCR (2.3.10.1) ermittelt. Die Plasmide aus den positiven Klonen wurden sequenziert (2.3.12). Die anschließend durchgeführten internetgestützten Homologievergleiche der dadurch erhaltenen Sequenzen bestätigten die Identität der inserierten Gene (siehe Anhang 7.1). In der Tabelle 4 werden die aus pGemT abgeleiteten Plasmide mit den klonierten Genen aufgelistet, mit denen die weiteren Untersuchungen gemacht wurden.

Nr.	Bezeichnung des Klons	Insert
1	pcALD2c5	<i>cALD2</i>
2	pcALD1K14	<i>cALD1</i>
3	pGS3Ab3	<i>GS3A</i>
4	pGS1d12	<i>GS1</i>

Tab. 4 : Die aus pGemT abgeleiteten Plasmide mit den klonierten Genen, die für die weiteren Untersuchungen eingesetzt wurden.

3.3.3. Subklonierung in den Expressionsvektor pET32(a+)

Für Expressionsuntersuchungen und die weiteren immunbiochemischen Analysen der in den Bakterien zu exprimierenden Genprodukte war eine Umklonierung der Gene in einen geeigneten Expressionsvektor notwendig. Dazu wurde der Expressionsvektor pET32(a+) mit dem *E. coli* -Stamm BLR (DE3) (Fa. Novagen) eingesetzt.

Die Gene für cALD1 und cALD2 wurden zwischen die Schnittstellen EcoRI und XhoI kloniert. Die Gene für GS3A und GS1 wurden zwischen die EcoRI- und Sall-Schnittstellen in den MCS des pET32(a+)-Vektors kloniert (*GS1* und *GS3A* besitzen eine interne XhoI-Schnittstelle). Dazu wurden in einer weiteren PCR die kodierenden Bereiche

3. Ergebnisse

von *GS3A* bzw. *GS1* mit Hilfe der Primerpaare GS3Afor2/GS3Arev2 bzw. GS1for2/GS1rev2 (2.1.4) amplifiziert (Abb. 8) und die PCR-Produkte nach dem EcoRI-/Sall-Verdau mit dem mit EcoRI-/Sall-verdauten pET32(a+)-Vektor ligiert (2.3.8.2).

Es wurden zuerst kompetente Zellen des *E. coli* -Stammes XL1Blue mit den Ligationsansätzen transformiert (2.3.2.2), um die Plasmide zu etablieren. Zur Expression der klonierten Genen wurden dann mit den erhaltenen positiven Plasmiden kompetente BLR (DE3)-Zellen transformiert. Die aus diesen Klonierungen hervorgegangenen Plasmide wurden bezeichnet : pET32cALD1, pET32cALD2, pET32GS3A und pET32GS1.

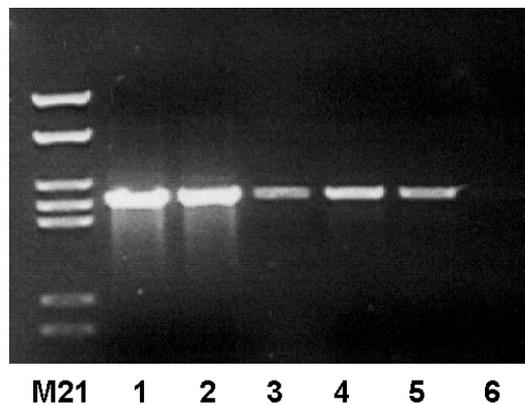


Abb. 8 : Agarosegel (1%) von PCR zur Amplifikation der Gene für GS1 und GS3A für die Klonierung in den pET32(a+)-Vektor. Die PCR erfolgte unter den unter (2.3.10) angegebenen Bedingungen. M21 = M21-DNA-Marker mit 2617 bp, 1857 bp, 1246 bp, 1058 bp, 929 bp, 498 bp, 383 bp.

Bahn	Template	Primer	T _{Ann}	Bahn	Template	Primer	T _{Ann}
1	pGS3Ab3	GS3Afor2/ GS3Arev2	55°C	4	pGS1d12	GS1for2/ GS1rev2	55°C
2			57°C	5			57°C
3			59°C	6			59°C

3.4. Expression der rekombinanten cALD1, cALD2, GS3A und GS1 in *E. coli*

3.4.1. Induktion der Expression

In pET-Vektoren steht das zu exprimierende Gen unter einer Kontrolle eines starken Transkriptions- und eventuell Translationssignals des Bakteriophagen T7; die Expression erfolgt durch die im Genom des Bakterienwirtes lokalisierte mit IPTG induzierbare T7-RNA-Polymerase. Im Falle von pET32cALD2 konnte nach 2 h ein Produkt bei ca. 56,5 kDa induziert werden (Abb.9, Pfeil). Dieses exprimierte Produkt ist ein Fusionprotein aus der rekombinanten cytosolischen Aldolase 2 (38,5 kDa) und dem durch den Vektor kodierten 18 kDa großen Polypeptid, das aus Thioredoxin (Trx•TagTM; 11,675 kDa), dem S•TagTM und dem His•Tag[®] zusammengesetzt ist. Im nicht induzierten Ansatz (Abb.9 Bahn 2 und 3) wurde das Fusionprotein in geringen Mengen exprimiert. Bezüglich der Induktion der Expression des Genproduktes selbst wurden bei den eingesetzten IPTG-Konzentrationen von 0,4 mM bzw. 1 mM keine Unterschiede festgestellt. Weiterhin konnte bei einer längeren Induktionszeit von 3,5 h auch kein Unterschied in der Expression festgestellt werden (Abb.9, Bahn 4, 5 und 6, 7).

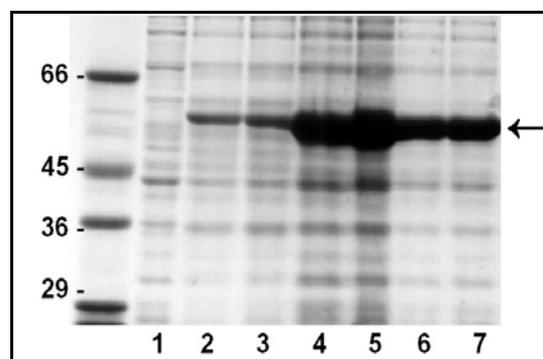


Abb. 9 : SDS-PAGE-Analyse der Expression der in pET32(a+) klonierten cytosolischen Aldolase 2 (cALD2). Auf das SDS-Gel (11%) wurden Rohextrakte aufgetragen, die aus Aliquots von Bakterienkulturen eines untransformierten Stammes (Bahn 1), der zum Animpfen verwendeten Übernachtskultur des mit pET32cALD2 transformierten BLR (DE3)-Stammes (Bahn2), einer Kultur vor der Induktion (Bahn 3), 2 h nach Induktion mit 0,4 mM (Bahn 4), mit 1 mM IPTG (Bahn 5) und 3,5 h nach Induktion mit 0,4 mM (Bahn 6) bzw. mit 1 mM IPTG (Bahn 7) aufbereitet wurden. Die Mengen der aufgetragenen Proteine entsprachen den aus 10µl (Bahn 1-5) bzw. 5 µl Aliquots der Bakterienkulturen präparierten Proteienmengen. Die Induktion erfolgte bei 30 °C.

3. Ergebnisse

Abb. 10 zeigt das Ergebnis der Expressionsinduktion der in pET32(a+) klonierten cytosolischen Aldolase 1 (cALD1). Wie im Falle von rek. cALD2 konnte rek. cALD1 mit ähnlicher Qualität erfolgreich induziert werden. Im Gegensatz zu rek. cALD2 konnte hier im nicht induzierten Ansatz keine unspezifische Expression des Proteins festgestellt werden (Abb. 10 Bahn 1, 3 und 5).

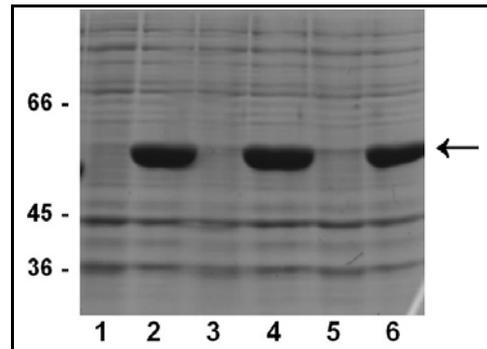


Abb. 10. : SDS-PAGE-Analyse der Expression der in pET32(a+) klonierten cytosolischen Aldolase 1 (cALD1). Auf das SDS-Gel (11%) wurden Rohextrakte aufgetragen, die aus Aliquots von Bakterienkulturen eines mit pET32cALD1 transformierten Stammes vor der Induktion (Bahn 1,3,5), Klon M5 (Bahn2), Klon M6 (Bahn4) und Klon M9 (Bahn 6) jeweils 3 h nach Induktion mit 1 mM IPTG aufbereitet wurden. Die Mengen der aufgetragenen Proteine entsprachen den aus 20µl Aliquots der Bakterienkulturen präparierten Proteinmengen. Die Induktion erfolgte bei 30 °C. Der Wirtstamm war *E coli* BLR (DE3).

Im Vergleich zu den rekombinanten cALD2 und cALD1 wies die rekombinante GS3A eine geringere Expressionsrate auf (Abb. 11, Pfeil). Dies konnte auch durch Übernachtinduktion bei 30°C nur unwesentlich gesteigert werden. Sowohl unterschiedliche Konzentrationen an IPTG als auch unterschiedliche Volumina der Kulturen zeigten keinerlei Effekte auf die Induktion der Expression (Abb.11). Die erwartete Größe des Fusionsproteins in diesem Fall ist $(39,5 + 18) \text{ kDa} = 57,5 \text{ kDa}$.

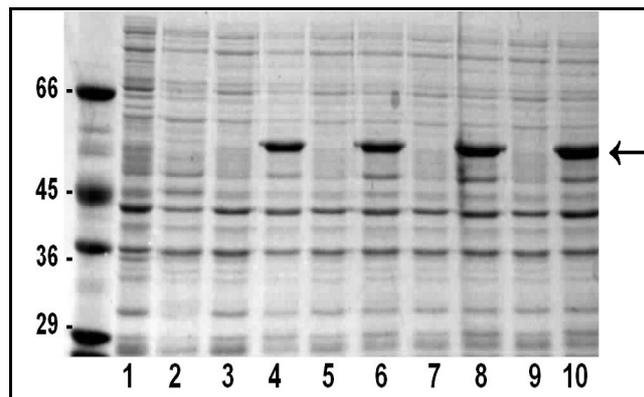


Abb. 11. : SDS-PAGE-Analyse der Expression der in pET32(a+) klonierten cytosolischen Glutaminsynthetase 3A (GS3A). Auf das SDS-Gel (11%) wurden Rohextrakte aufgetragen, die aus Aliquots von Bakterienkulturen eines untransformierten Stammes (Bahn 1), eines nur mit pET32(a+) transformierten Stammes (Bahn2), eines mit pET32GS3A transformierten Stammes vor der Induktion (Bahn 3, 5, 7,9), in 50 ml Kultur nach Übernachtinduktion mit 0,4 mM (Bahn 4), mit 1 mM IPTG (Bahn 6), in 100 ml Kultur nach Übernachtinduktion mit 0,4 mM (Bahn 8) bzw. 1 mM IPTG (Bahn 10) aufbereitet wurden. Die Mengen der aufgetragenen Proteine entsprachen den aus 20 μ l Aliquots der Bakterienkulturen präparierten Proteienmengen. Die Induktion erfolgte bei 30 °C. Der Wirtstamm war *E coli* BLR (DE3).

Die Expression der rekombinanten GS1 wies starke Ähnlichkeit zu der Expression der rekombinanten GS3A auf (Abb. 12, Pfeil). Das exprimierte Produkt ist $(38,9 + 18)$ kDa = 56,9 kDa groß.

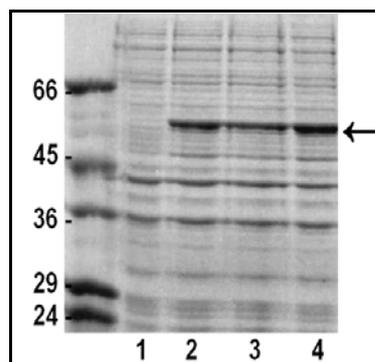


Abb. 12 : SDS-PAGE-Analyse der Expression der in pET32(a+) klonierten cytosolischen Glutaminsynthetase 1 (GS1). Auf das SDS-Gel (11%) wurden Rohextrakte aufgetragen, die aus Aliquots von Bakterienkulturen eines mit pET32GS1 transformierten Stammes vor der Induktion (Bahn 1), Klon J1 (Bahn 2), Klon J4 (Bahn 3), Klon J8 (Bahn4) jeweils 3 h nach Induktion mit 0,4 mM IPTG in 50 ml Kultur, aufbereitet wurden. Die Mengen der aufgetragenen Proteine entsprachen den aus 20 μ l Aliquots der Bakterienkulturen präparierten Proteienmengen. Die Induktion erfolgte bei 30 °C. Der Wirtstamm war *E coli* BLR (DE3).

3.4.2. Immunfärbung der rekombinanten Proteine mit TIM11-B2

Wie bereits erwähnt erkennt der monoklonale Antikörper TIM11-B2 neben den cytosolischen Isoenzymen 1 und 2 der Aldolase zusätzliche Polypeptide, deren Charakterisierung über native Gelelektrophorese und anschließende Aminosäuresequenzierung des eluierten Proteins im Rahmen dieser Arbeit zu den Isoenzymen GS3A bzw. GS1 der cytosolischen Glutaminsynthetase geführt hat. Die nun in dem pET32(a⁺)-Vektor kloniert vorliegenden rekombinanten Proteine cALD1, cALD2, GS3A und GS1 sollten in der hier durchgeführten Immunfärbung auf ihre Erkennung durch den monoklonalen Antikörper TIM11-B2 getestet werden. Als Positivkontrolle diente eine Probe eines Erbsenrohextraktes. Wie aus der Abb. 13 zu entnehmen ist, erkennt TIM11-B2 unterschiedlich gut die rekombinanten Proteine. Ein sehr deutliches Signal zeigt die rek.cALD2 (Bahn 2), gefolgt von rek. GS3A (Bahn 4) und rek. cALD1 (Bahn 3). Die Erkennung der rek. GS1 (Bahn 5) lieferte dabei das schwächste Signal.

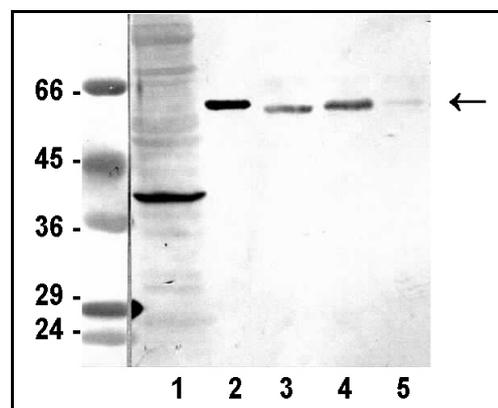


Abb. 13. : Immunfärbung der in pET32(a⁺) klonierten cALD1, cALD2, GS3A und GS1 mit TIM11-B2. Es wurde gleiche Menge der rekombinanten Proteine aufgetragen. Die Proben wurden aus Aliquots von IPTG induzierten *E. coli*- Kulturen des Stammes BLR(DE3) aufbereitet, der mit mit pET32cALD2 (Bahn 2), mit pET32cALD1 (Bahn3), mit pET32GS3A (Bahn 4) sowie mit pET32GS1 transformiert wurde. Als Positivkontrolle wurden auf Bahn 1 ca. 15µg Proteinproben aus Erbsenrohextrakt aufgetragen. Die Immunfärbung erfolgte nach dem unter 2.2.9.2. angegebenen Protokoll.

3.5. Aufreinigung der rekombinanten GS3A und cALD2 zur Immunisierung von Kaninchen

3.5.1. Aufreinigung von rek. cALD2 mittels HisBind-Säule

Es handelt sich hier um ein Affinitätschromatographisches Verfahren zur Aufreinigung des Proteins an mit Ni^{2+} beladenes Säulenmaterial. Das Protein wird über dessen aus 6xHis-Resten bestehenden „Tag“ an das Säulenmaterial fest gebunden und durch einen Imidazolpuffer bestimmter Konzentration spezifisch eluiert.

Zur Aufreinigung von rek. cALD2 wurde eine 50 ml Bakterienkultur nach 3-stündiger IPTG-Induktion und anschließender Inkubation für 2 h bei 4°C geerntet und gemäß (2.2.1.2.) mittels Ultraschallbehandlung lysiert. Wie aus Abb. 14 ersichtlich, konnte zwar ein bestimmter Teil der rek. cALD2 in löslicher Form gewonnen werden (Bahn 1), der größte Teil davon (ca.75%) blieb jedoch ungelöst im Pellet (Bahn 2). Der Anteil an rek. cALD2 in der löslichen Fraktion, die aus der 50 ml Bakterienkultur gewonnen werden konnte, betrug ca. 2 mg.

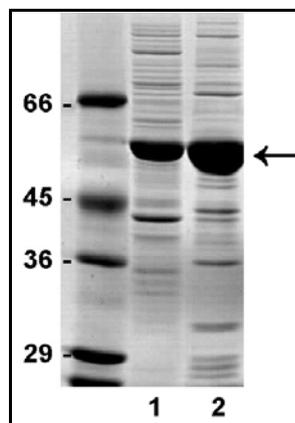


Abb. 14 : SDS-PAGE nach Zellaufschluß zur Aufreinigung von rek. cALD2. Aufgetragen wurden Proben aus dem Überstand (Bahn1) und Pellet (Bahn 2) des Zellaufschlußverfahrens mittels Ultraschall einer IPTG induzierten mit pET32cALD2 transformierten BLR(DE3)-Bakterienkultur. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt.

3. Ergebnisse

Mit dem gesamten löslichen Protein wurde eine Affinitätschromatographie mittels HisBind-Säule durchgeführt. Wie die Abb. 15 zeigt, konnte das Protein schon mit 100 mM Imidazolpuffer eluiert werden, mit dem weniger spezifisch gebundene Proteine in einem weiteren Waschschrift aus der Säule gewaschen werden sollten (Abb. 15, Bahn 2). Mit einem Elutionspuffer mit 0,4 M Imidazol konnte der größte Anteil des Proteins eluiert werden (Bahn 3 und 4). Dabei wurde kein Unterschied in der Reinheit zwischen dem 0,1 M- und dem 0,4 M-Imidazoleluat festgestellt. Die Elution mit 1 M Imidazol lieferte nur eine vergleichsweise geringe Menge an restlichen Protein (Bahn 5).

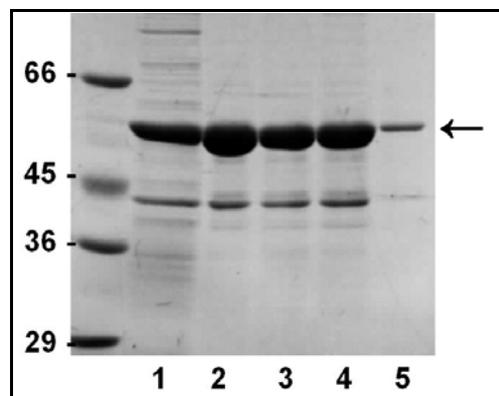


Abb. 15 : Aufreinigung von rek. cALD2 über HisBind-Säule. Auf 5 ml mit Ni²⁺ beladenen HisBind-Säule (NovaGen) wurden ca 2 mg Protein aufgegeben. Nach dem Auftrag wurde die Säule mit 10x Vol. Bindungspuffer und 6x Vol. Mit 60 mM Imidazolwaschpuffer gewaschen. Bahn 1 = Überstand nach der Lyse; Bahn 2 = Eluat aus dem „Waschschrift“ mit 100 mM Imidazol; Bahn 3 = Eluat I mit 0,4 M Imidazoleluationspuffer; Bahn 4 = Eluat II mit 0,4 M Imidazoleluationspuffer; Bahn 5 = Eluat mit 1 M Imidazoleluationspuffer.

Die Eluate wurden zusammengeführt, über Nacht gegen 20 mM Tris/HCl pH 7,4 dialysiert und anschließend mittels Centricon /Filtron-Concentrator aufkonzentriert. Die Proteinbestimmung nach Bradford (2.2.3) lieferte eine Ausbeute von durchschnittlich 0,35 mg.

3.5.2. Versuch zur Enterokinasespaltung der rek. cALD2

Das aus der HisBind-Säule-Affinitätschromatographie gewonnene Protein wurde anschließend der Enterokinasespaltung unterzogen (2.2.2.2). Es wurden 7,5 µg rek.cALD2 mit 0,2 U Enterokinase

unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen eingesetzt. Abb. 16 zeigt die Coomassie-Färbung des SDS-Gels zur Analyse der Spaltung und die Immunfärbungen derselben Proben mit anti-HisTag-Antikörper und einem polyklonalen Antikörper gegen cytosolische Aldolase (Schnarrenberger, FU Berlin).

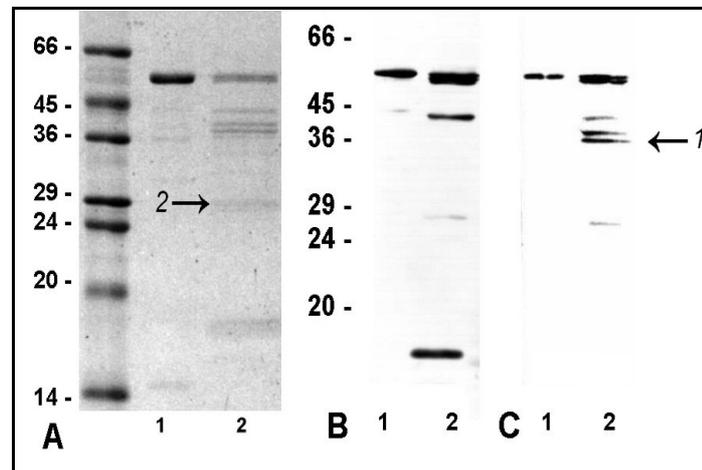


Abb. 16 : Coomassie gefärbtes SDS-Gels (A), Immunoblot mit anti-HisTag-Antikörper (B) und Immunoblot mit anti-cytosolische-Aldolase-Antikörper (C) zur Analyse der Enterokinasespaltung der rek.cALD2. Jeweils 1 μ g (Bahn A1), 0,2 μ g Protein vor der Enterokinasespaltung (Bahn B1 und C1) und 2 μ g Protein aus dem Enterokinasespaltungsansatz (Bahn A2, B2 bzw. C2) wurden auf ein 15 %-iges Gel aufgetragen. Die Immunfärbungen mit anti-HisTag-Antikörper (Pharmacia) und mit anti-cytosolische-Aldolase-Antikörper erfolgten nach (2.2.9.2).

Nach der Enterokinasespaltung entstand aus dem 56,5 kDa großen rek.cALD2-Fusionprotein eine Doppelbande, die beide sowohl von dem anti-HisTag-Antikörper als auch dem anti-cytosolische-Aldolase-Antikörper detektiert wurden. Aus dieser Doppelbande traten als Ergebnis der Spaltung des Vektor-„Tags“ aus dem Fusionprotein zwei Banden bei 37 - 38 kDa auf (Bahn C2, Pfeil 1), die wegen des Fehlens des His•Tags nicht mehr durch den anti-HisTag-Antikörper (Bahn B2), wohl aber durch den anti-cytosolische-Aldolase-Antikörper (Bahn C2) erkannt wurden. Das bereits oben erwähnte bei 44 kDa befindliche Neben- bzw. Spaltprodukt der Expression des rek.cALD2-Fusionproteins wurde, wie erwartet, vom anti-HisTag-Antikörper aber auch von dem anti-cytosolische-Aldolase-Antikörper detektiert. Dieses wurde durch Enterokinase gespalten und dessen Spaltprodukt erschien als diffuse Bande um 27 kDa (Bahn A2, Pfeil 2), von der eines als ein deutliches Signal mit dem anti-cytosolische-Aldolase-Antikörper

3. Ergebnisse

hervortrat (Bahn C2) und eine anderes etwas unterhalb des 29-kDa Markerproteins im Immunoblot mit anti-HisTag detektierbar war. Das letztere könnte auf Spuren eines Abbauproduktes zurückzuführen sein. Der aus dem Vektor stammende „Tag“ erschien im Immunoblot als ein deutliches Signal bei 18 kDa (Bahn B2).

3.5.3. Aufreinigung der rekombinanten GS3A

Die Expression der rekombinanten Glutaminsynthetase 3A in mit pET32GS3A transformierten Bakterienkulturen führte zur Bildung von Protein-Einschlusskörpern („inclusion bodies“), die sich auch nach der Lyse der Zellen mittels Ultraschallbehandlung nicht in Lösung bringen ließen (Abb. 17). Dadurch war eine Aufreinigung des rekombinanten GS3A-Proteins über HisBind-Säule (2.2.2.1) und somit die Spaltung des aus dem Vektor stammenden „Tags“ durch Enterokinase unmöglich.

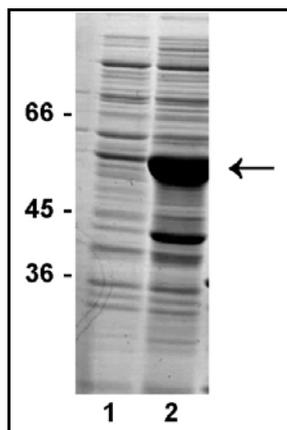


Abb. 17 : SDS-PAGE nach Zellaufschluss zur Aufreinigung von rek. GS3A. Aufgetragen wurden Proben aus dem Überstand (Bahn 1) und Pellet (Bahn 2) des Zellysats nach dem Ultraschallzellaufschluss einer IPTG induzierten mit pET32GS3A transformierten BLR(DE3)-Bakterienkultur. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt.

Auf eine Optimierung der Induktion der Expression und des Aufschlussverfahrens der Bakterienzellen zur Erhöhung der Löslichkeit des im Bakteriencytoplasma exprimierten Genproduktes wurde verzichtet. Zur Herstellung des polyklonalen Antikörpers wurde statt dessen das noch mit dem aus den Vektor stammenden „Tags“ versehene Protein zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt.

3.5.4. Aufreinigung von rek.cALD2 und GS3A mittels präparativer SDS-PAGE

Die Aufreinigung der rekombinanten cALD2 und GS3A mittels präparativer SDS-PAGE erfolgte nach 2.2.2.3. Abb. 18 zeigt ein solches präparatives Gel nach Coomassie-Färbung, nachdem die aufzureinigende Bande ausgeschnitten wurde.

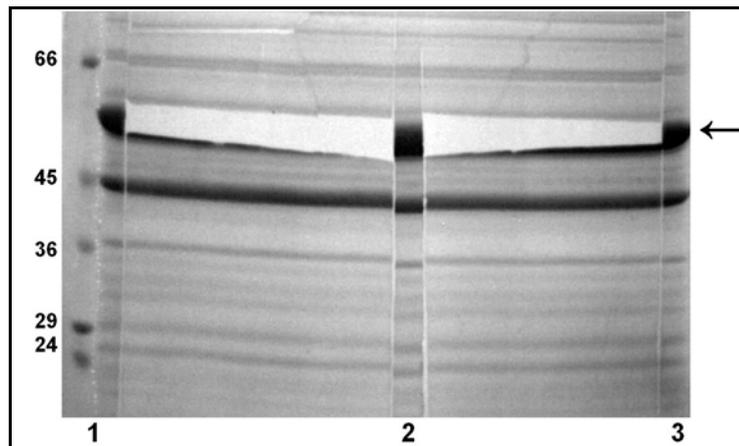


Abb. 18 : Präparative SDS-PAGE zur Aufreinigung des rekombinanten Proteins. Bis zu 500 µg Protein wurden auf ein 10 % Polyacrylamidgel mit einem breiten Kamm aufgetragen und elektrophoresiert. Etwa 1 cm aus den beiden Rändern (1, 3) und aus der Mitte des Gels (2) wurde ausgeschnitten und sofort mit 0,3 M CuCl_2 gefärbt. Diese gefärbten Gelstücke halfen, die Position der auszuschneidenden Bande zu bestimmen. Auf dem abgebildeten Gel wurde eine Probe mit der rek. GS3A aufgetrennt, die Bande (Pfeil) ausgeschnitten und das Gel mit Coomassie gefärbt.

Für jedes Protein wurden jeweils bis zu 6 präparativen SDS-PAGEs durchgeführt und die Banden dann elektroeluiert (s. 2.2.7). Aliquots aus den Proteinlösungen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt, zum einen um die Reinheit der Präparation beurteilen zu können und zum anderen um mit Hilfe von BSA-Verdünnungen als Standards deren Konzentrationen schließlich ermitteln zu können (Abb.19).

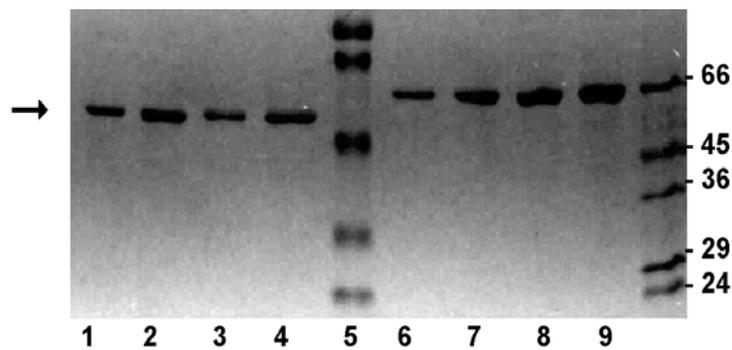


Abb. 19 : Coomassie-Färbung des SDS-Gels mit den Proteinproben für die Immunisierung. Jeweils 2 µl (Bahn 1) und 4 µl (Bahn 2) des rek. GS3A-Proteins bzw. 5 µl (Bahn 3) und 10 µl (Bahn 4) des rek.cALD2-Proteins wurden auf ein 11%-Gel aufgetragen. Als Standards dienten Proteinproben mit 0,5 µg (6), 1 µg (7), 1,5 µg (8) und 2 µg (9) BSA. Bahn 5 = hochmolekularer Molekulargewichtsmarker „Prestained Marker“ (Stratagene) mit 106/ 80/ 49,5/ 32,5/ 27,5/18,5 kDa.

Abb. 19 (Bahnen 1 - 4) bestätigt die Reinheit der Präparationen. Außerdem konnte über eine densitometrische Analyse des Gels mit den BSA-Proben als Standards (Abb. 19 Bahn 6 - 9) für die rek. GS3A und die rek.cALD2 jeweils eine Proteinkonzentration von 0,4 µg/µl bzw. 0,2 µg/µl bestimmt werden. Die 500 µl Proteinlösungen für die Immunisierung entsprachen somit einer Proteinmenge von jeweils 200 µg (rek. GS3A) bzw. 100 µg (rek.cALD2).

3.6. Herstellung von polyklonalen Antiseren

Für jedes Antigen wurde jeweils eine Doppelimmunisierung durchgeführt. Kaninchen Nr. 575 und 737 wurden jeweils mit 100 µg rek.cALD2 und Kaninchen Nr. 514 und 518 mit 200 µg rek GS3A immunisiert (s. 2.2.10.1). Schon nach einem einmaligen Immunisieren lieferten die Kaninchen 575 und 737 Antiseren, die sehr spezifisch ein Protein bei ca. 40 kDa detektieren (Abb. 20). In der 4. Woche nach der Immunisierung zeigte sich eine deutliche und spezifische Immunantwort (Abb. 20, Bahnen 3 und 7). Nach 6 Wochen zeigten die Seren keine Kreuzreaktivitäten und in beiden Fällen konnte bei einer Verdünnung von (1:2000) eine spezifische Erkennung im Immunoblot festgestellt werden.

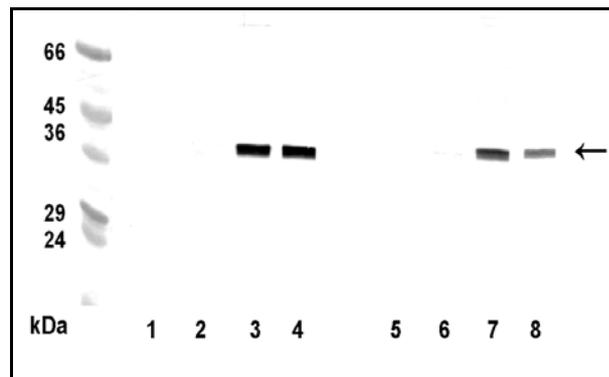


Abb. 20 : Immunfärbungen zur Bestimmung der spezifischen Erkennung der polyklonalen Antiseren gegen cALD2 im Gesamtproteinextrakt aus Erbse. Die Immunfärbungen wurden nach (2.2.9.2) durchgeführt. Es wurden Seren vor der Immunisierung (Bahnen 1 und 5), 2 Wochen (Bahnen 2 und 6), 4 Wochen (Bahnen 3 und 7) und 6 Wochen (Bahnen 4 und, 8) nach der Immunisierung getestet. Bahnen 1 - 4 wurden mit den Antiseren von Kaninchen „575“ und Bahnen 5 - 8 mit den Antiseren von Kaninchen „737“ detektiert. Die Verdünnungen der Antiseren waren 1:2000.

Das für die Immunisierung der Kaninchen „514“ und „518“ eingesetzte rekombinante GS3A-Protein war im Vergleich zu der rek.cALD2 weniger immunogen. Mit den Seren nach 6 Wochen Immunisierung konnte noch keine zufriedenstellende spezifische Immunantwort erreicht werden. Die Immunfärbungen mit den Seren ließ eine noch relativ starke Kreuzreaktivität erkennen (Abb. 21a, Bahnen 2, 4). Aus diesem Grunde wurden erneut immunisiert, diesmal jeweils nur mit der Hälfte der Proteinmenge (100 µg) und mit einem inkompletten Freund'schen Adjuvant. Den Verlauf der Immunantwort der zweiten Immunisierung zeigen die auf Abb. 21b dargestellten Immunfärbungen. Schon 2 Wochen nach der zweiten Immunisierung wurde die Erkennung einer Bande bei ca. 40 kDa spezifischer, Kreuzreaktivitäten wurden geringer (Abb. 21b, Bahnen 1, 5).

3. Ergebnisse

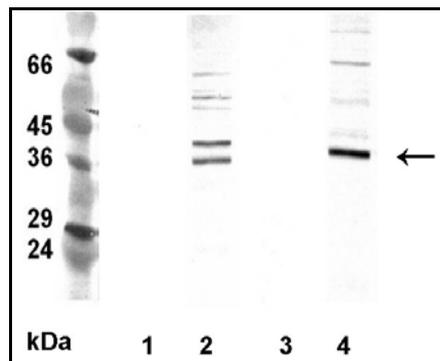


Abb. 21 a : Immunfärbungen zum Testen der polyklonalen Antiseren gegen GS3A nach der ersten Immunisierung. Dargestellt sind Immunfärbungsstreifen mit den Seren aus 4 Wochen (Bahnen 1 und 3) und 6 Wochen (Bahnen 2 und 4) nach der Immunisierung. Bahnen 1 und 2 wurden mit den Antiseren von Kaninchen „514“ und Bahnen 3 und 4 mit den Antiseren von Kaninchen „518“ detektiert. Die Verdünnungen der Antiseren waren 1:2000.

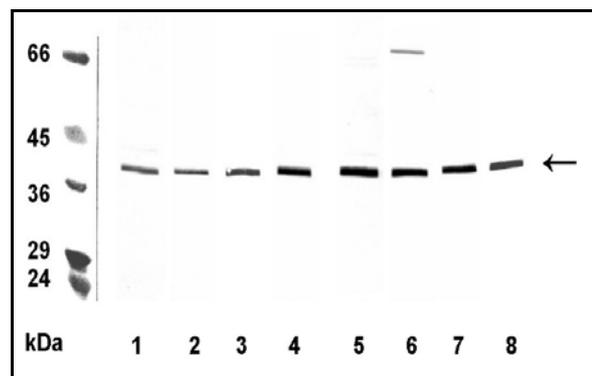


Abb. 21 b : Immunoblots zum Testen der polyklonalen Antiseren gegen GS3A nach der zweiten Immunisierung. Dargestellt sind Immunfärbungsstreifen mit den Seren aus 2 Wochen (Bahnen 1 und 5), aus 4 Wochen (Bahnen 2 und 6), 6 Wochen (Bahnen 3 und 7) nach der zweiten Immunisierung und die „Endseren“ (Bahnen 4 und 8). Bahnen 1 - 4 wurden mit den Antiseren von Kaninchen „514“ und Bahnen 5 - 8 mit den Antiseren von Kaninchen „518“ detektiert. Die Verdünnungen der Antiseren waren 1:2000. Als Antigen diente ein Gesamtproteinextrakt aus Erbse.

3.7. Immunfärbung des grünen Blattgewebes mit den anti-cALD2-Antikörpern „575/737“ und den anti-GS3A-Antikörpern „514/518“

Gesamtproteinextrakte aus grünen Erbsenblättern und aus etiolierten Keimlingen als Kontrolle wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf NC-Membran transferiert und sowohl mit anti-cALD2-Antikörpern „575/737“ als auch mit anti-GS3A-Antikörpern „514/518“ detektiert. Dabei zeigte es sich, dass die anti-GS3A-Antikörper „514/518“ auch die plastidäre Glutaminsynthetase erkennen (Bande bei 42 kDa, Abb. 22 Bahn 6 und 8, Pfeil 1). Die Detektion mit anti-cALD2-Antikörpern „575/737“ zeigte, dass diese Antikörper nicht mit den ca. 37 kDa großen plastidären Aldolasen (Abb. 22 Bahnen 1 - 4) kreuzreagieren.

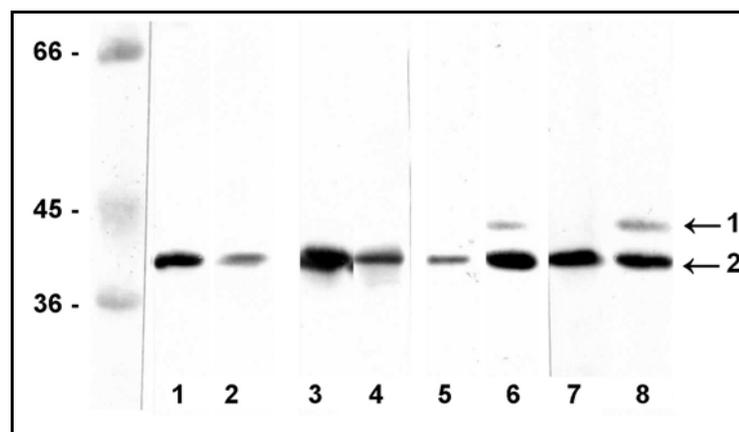


Abb. 22 : Immunodetektion des grünen Blattgewebes mit den polyklonalen anti-cALD2-Antikörpern „575/737“ und anti-GS3A-Antikörpern „514/518“. Aufgetragen wurden Gesamtproteinextrakte aus grünen Erbsenblättern (Bahnen 2, 4, 6, 8) und aus etiolierten Erbsenkeimlingen (Bahnen 1, 3, 5, 7). Die Detektion erfolgte mit Antiserum 737 (Bahnen 1, 2), Antiserum 575 (Bahnen 3, 4), Antiserum 518 (Bahnen 5, 6) und Antiserum 514 (Bahnen 7, 8). Die Seren wurden jeweils in (1:2000)-Vedünnung in Blotto eingesetzt.

3.8. Untersuchung der Spezifität der polyklonalen Antiseren

Die Untersuchung der Spezifität der polyklonalen Antiseren erfolgte durch Immunfärbung mit in pET21(a+) exprimierten Proteinen als Antigenen. Die cDNA für cALD1, cALD2, GS1 und GS3A wurden zu diesem Zweck in die dem pET32(a+)-Vektor entsprechenden Schnittstellen des pET(21a+)-Vektors subkloniert. Die BLR(DE3)-Klone mit den so hergestellten Plasmiden wurden pET21cALD1, pET21cALD2, pET21GS1 bzw. pET21GS3A bezeichnet.

In zwei parallel durchgeführten Immunfärbungen wurden Proben mit Gesamtproteinextrakten aus den IPTG induzierten Bakterienkulturen der Klone pET21cALD2, pET21cALD1, pET21GS3A und pET21GS1 jeweils mit den anti-GS3A-Antikörpern „514“ bzw. anti-cALD2-Antikörpern „575“ detektiert. Aus den in Abb. 23 dargestellten Immunfärbungen geht hervor, dass die Antiseren jeweils für das dazu gehörige Antigen spezifisch ist. Es besteht keine Kreuzreaktivität für das jeweils andere Antigen. Wie zu erwarten, erkennen anti-GS3A-Antikörper sowohl GS3A als auch GS1 (Abb. 23 A) und anti-cALD2-Antikörper sowohl cALD2 als auch cALD1 (Abb. 23 B). In einer Immunfärbung mit Gesamtproteinextrakt aus Erbse ist die durch den anti-GS3A-Antikörper markierte Bande also auf alle cytosolischen Isoenzyme der Glutaminsynthetasen und die durch den anti-cALD2-Antikörper markierte Bande auch auf alle cytosolischen Isoenzyme der Aldolasen zurückzuführen. Dies ist durch die relative hohe Homologie zwischen den Isoenzymen auf der Proteinebene zu erklären.

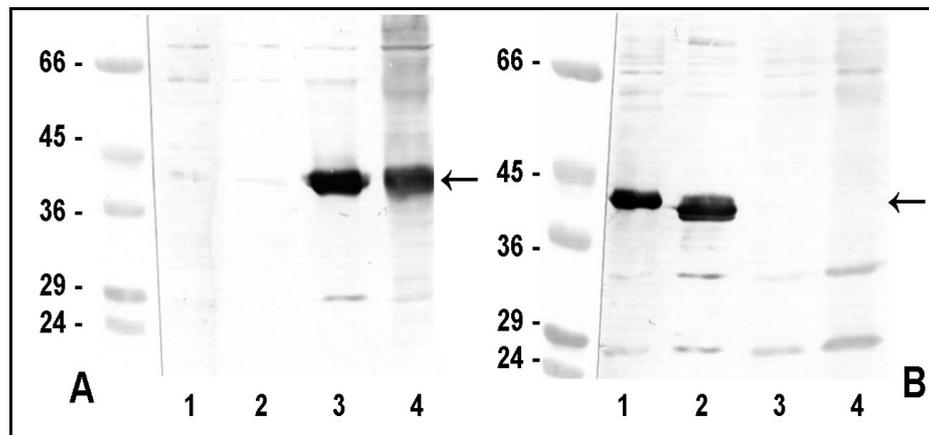


Abb. 23 : Charakterisierung der Spezifität der polyklonalen Antikörper anti-GS3A und anti-cALD2. Aufgetragen wurden Gesamtproteinextrakte aus IPTG-induzierten Klonen pET21cALD2 (Bahn 1), pET21cALD1 (Bahn 2), pET21GS3A (Bahn 3) und pET21GS1 (Bahn 4). Die aufgetragenen Proteinmengen entsprachen jeweils den aus ca. 10 μ l Kultur aufbereiteten Mengen. Blot A wurde mit anti-GS3A-Antiserum „514“ (1:2000 in Blotto) und Blot B mit anti-cALD2-Antiserum „575“ (1:2000 in Blotto) detektiert.

Mit den Antiseren aus den Kaninchen „518“ (anti-GS3A-Antikörper „518“) und „737“ (anti-cALD2-Antikörper „737“) wurden analog auch Immunfärbungen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Das Ergebnis war identisch.

3.9. Immuncytochemische Untersuchungen mit polyklonalen Antikörper 575/737 und 514/518

Die immuncytochemischen Untersuchungen von Ultradünnschnitten aus apikalen Internodien in indirekten Immunogoldmarkierungen mit TIM-11B2 ergab, dass hauptsächlich im Cytoplasma und vereinzelt auch im Zellkern von Epidermis- bzw. Parenchymzellen Goldmarkierungen gefunden wurden. Nach vorheriger Behandlung der Ultradünnschnitte mit Na-Perjodat trat neben einer Goldmarkierung im Cytoplasma und Zellkern auch eine Markierung in den Zellwänden auf (Sprunck, 1996). Es konnte allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die Markierung auf unspezifische Bindungen des TIM-11B2 zurückzuführen sein konnte, da durch die starke Oxidation des

3. Ergebnisse

Zellwandmaterials mit Perjodat auch unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper entstanden sein könnten.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die in dieser Arbeit hergestellten polyklonalen Antikörper auch als Erstantikörper in weiteren indirekten Immunogoldmarkierungen eingesetzt werden können. Diese immunocytochemischen Experimente sollten Hinweise darauf geben, welches der TIM-11B2-Antigene die von Sprunck detektierten Goldmarkierungen verursacht hat.

Es wurden Ultradünnschnittpräparate aus den apikalen Internodien von etiolierten Erbsenkeimlingen angefertigt und in eine Immunogoldmarkierung eingesetzt. Als Kontrollen wurden Markierungen mit Präimmunserum und dem sekundären Gold-Konjugat durchgeführt, um mögliche unspezifische Reaktion des Präimmunserums und des Gold-Konjugats zu erfassen. Die Markierung erfolgte gemäß (2.2.11.2) und nach Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat wurde unter dem Elektronenmikroskop ausgewertet. Abb. 24 und 25 zeigen das Ergebnis dieser Untersuchung.

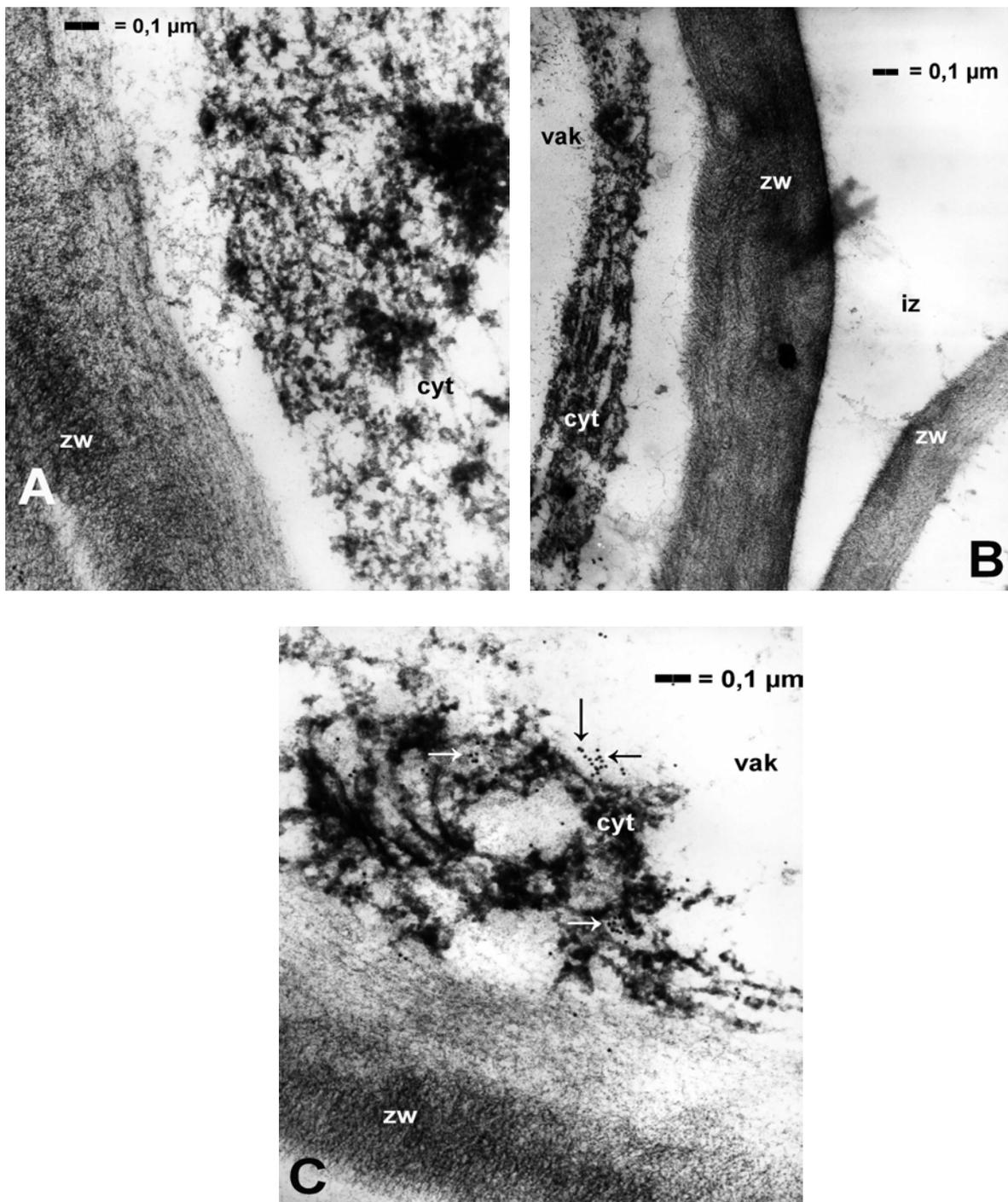


Abb. 24 : Immunogoldmarkierung von Ultradünnschnitten aus apikalen Internodien etiolierter Erbsenkeimlinge. A = Kontrollmarkierung mit „575“-Präimmunsereum + Ziegen-anti-Kaninchen- Goldkonjugat, B = Kontrolle nur mit Ziegen-anti-Kaninchen-Goldkonjugat allein und C = Markierung mit dem polyklonalen anti-cALD2-Antikörper („575“-Antiserum) + Ziegen-anti-Kaninchen- Goldkonjugat. cyt = Cytoplasma, zw = Zellwand, vak = Vakuole, iz = Interzellulare.

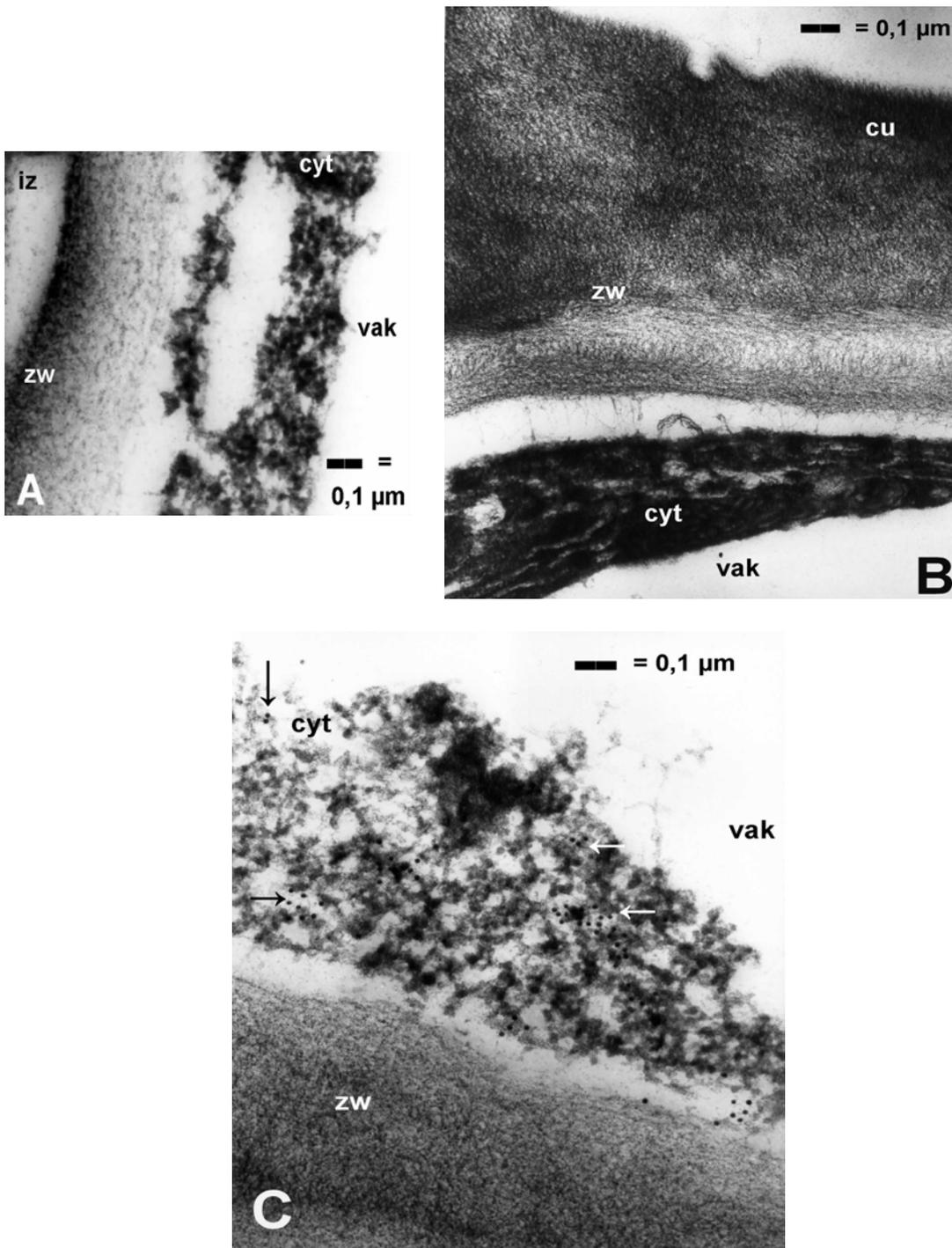


Abb. 25 : Immunogoldmarkierung von Ultradünnschnitten aus apikalen Internodien etiolierter Erbsenkeimlinge nach Perjodat-Behandlung. A = Kontrollmarkierung mit „575“-Präimmunserum + Ziegen-anti-Kaninchen- Goldkonjugat, B = Kontrolle nur mit Ziegen-anti-Kaninchen-Goldkonjugat allein und C = Markierung mit dem polyklonalen anti-cALD2-Antikörper („575“-Antiserum) + Ziegen-anti-Kaninchen- Goldkonjugat. cyt = Cytoplasma, zw = Zellwand, vak = Vakuole, cu = Cuticula, iz = Interzellulare.

Es zeigte sich eine spezifische Goldmarkierung im Cytoplasma (Abb. 24 C). Eine quantitative Auswertung der Markierungsdichte mehrerer EM-Bilder lieferte für das Cytoplasma einen Wert von 17 Goldpartikel/ μm^2 . In den Vakuolen und im Apoplasten wurden keine Markierungen gefunden. Die bei den Kontrollen mit dem „575“-Präimmunserum selten anzutreffende Markierung des Cytoplasmas und der Zellwand (Cytoplasma = 0,4 Goldpartikel/ μm^2 und Zellwand = 0,8 Goldpartikel/ μm^2) konnte einer unspezifischen Markierung zugeschrieben werden. Mit 1,25 Goldpartikel/ μm^2 bzw. 0,7 Goldpartikel/ μm^2 lagen die Werte für den Zellkern bzw. die Zellwand im Bereich der Kontrolle. Eine weitere Kontrolle mit nur dem Ziegen-anti-Kaninchen-Goldkonjugat allein führte zu keiner Markierung der untersuchten Ultradünnschnitte (Abb. 24B & 25B). Eine weitere Immunogoldmarkierung nach vorheriger Behandlung mit Na-Perjodat lieferte dasselbe Ergebnis (Abb. 25). Die für das Cytoplasma berechnete Markierungsdichte (13 Goldpartikel/ μm^2) lag in demselben Bereich wie die der Markierung mit dem „575“-Antiserum ohne vorherige Perjodat-Behandlung.

Die Versuche, die „514/518“-Antiseren in die Immunogoldmarkierungsexperimenten anzuwenden, schlugen fehl (Daten nicht gezeigt). Es konnte keine über die untersuchten Ultradünnschnitte gleichmäßig verteilte Markierung erreicht werden. Eine eventuelle Optimierung der Versuche über eine vorherige Aufreinigung der polyklonalen Antikörper (Keckwick-Fällung, Protein-A/G-Sepharose-Chromatographie) konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

3.10. Northern-Analysen

Die immunbiochemisch erhaltenen Daten bezüglich der Korrelation des durch den Antikörper TIM-11B2 hervorgerufenen Signals mit dem Streckungswachstum der Erbsenkeimlinge sollten nun molekularbiologisch mittels Northern-Analysen verifiziert werden. Als Pflanzenmaterial wurden 12 Tage etiolierte Erbsenkeimlinge verwendet. Die untersuchten Gewebesegmenten sind in Abb. 27 C dargestellt.

Die DNA-Sonden wurden in einer PCR durch Markierung mit Digoxigenin-11-dUTP hergestellt. Die die kodierenden Bereiche flankierenden Oligonukleotide, die auch zur Amplifikation der entsprechenden Gene benutzt wurden (2.3.10) dienten als Primer. Als

3. Ergebnisse

DNA-Vorlage („template“) wurden pGemT-Plasmide eingesetzt, in denen die jeweiligen Gene kloniert wurden (s. Tab 4).

Die Agarosegele mit den PCR-Produkten aus der Sondenherstellung sind auf Abb. 26 dargestellt. Die deutlichen Unterschiede in Laufverhalten zwischen markierten und nicht markierten DNA-Fragmenten zeigen den Erfolg der Markierung. Die PCR-Produkte mit den DNA-Sonden wurden aus dem Agarosegel aufgereinigt (2.3.3.3), um nicht eingebautes Digoxigenin-11-dUTP und eventuell vorhandenen DIG-markierten Kontaminationen aus den PCR-Ansätzen zu entfernen. Für die Hybridisierung wurden die DNA-Sonden in einer Konzentration von ca. 25 ng/ml, je nach Größe des Blots in zwischen 7,5 - 10 ml DIG *Easy Hyb*, eingesetzt.

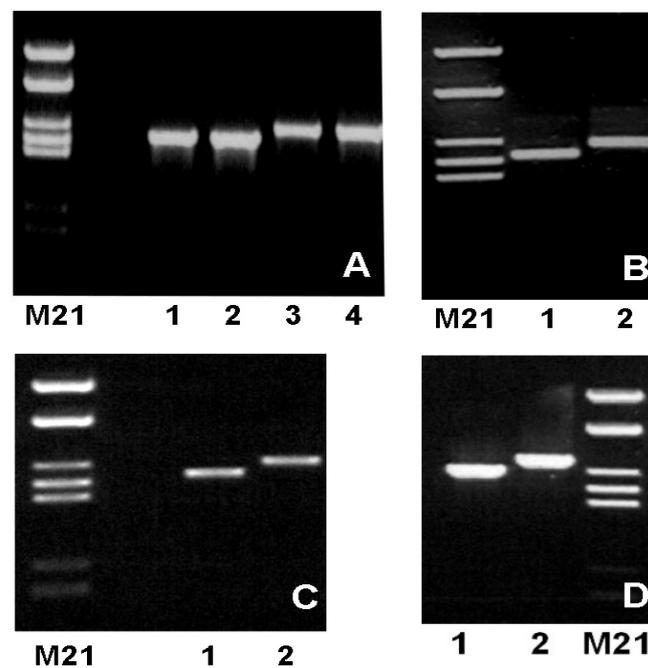


Abb. 26 : PCR zur Herstellung der DIG-markierten Sonden. (A) *cALD2*, 1 + 2 = unmarkierte Kontrollen, 3 + 4 = DIG-markierte Sonden. (B) *cALD1*, (C) *GS3A*, (D) *GSI* 1 = unmarkierte Kontrollen, 2 = DIG-markierte Sonden.

3.10.1. Northern-Detektion mit *GS3A*- und *cALD2*-Sonde

Bei der Detektion mit der *GS3A*-Sonde wurden die stärksten Signale in basalen Gewebesegmenten, nämlich in dem ersten Internodium und Nodium des Keimlings gefunden. In den übrigen Gewebesegmenten einschließlich der meristemalen Sproßspitze und der sich noch elongierenden jüngsten Internodien blieben die Signalintensitäten der *GS3A*-mRNA einigermaßen konstant und waren schwächer als im basalen Bereich (Abb. 27). Die Rehybridisierung des Blotes mit der *cALD2*-Sonde lieferte ein komplett anderes Bild (Abb. 28). Hier wurde in dem ersten ältesten Internodium kaum *cALD2*-mRNA mehr detektiert, während in der Sproßspitze und im dem jüngsten Internodien das Signal am stärksten war. Die Signale der *cALD2*-mRNA in dem 2. und 3. Internodium traten mit etwa gleicher Intensität auf, waren jedoch deutlich schwächer als in der Sproßspitze und in dem 4. Internodium. Die Nodien lieferten das schwächste Signal.

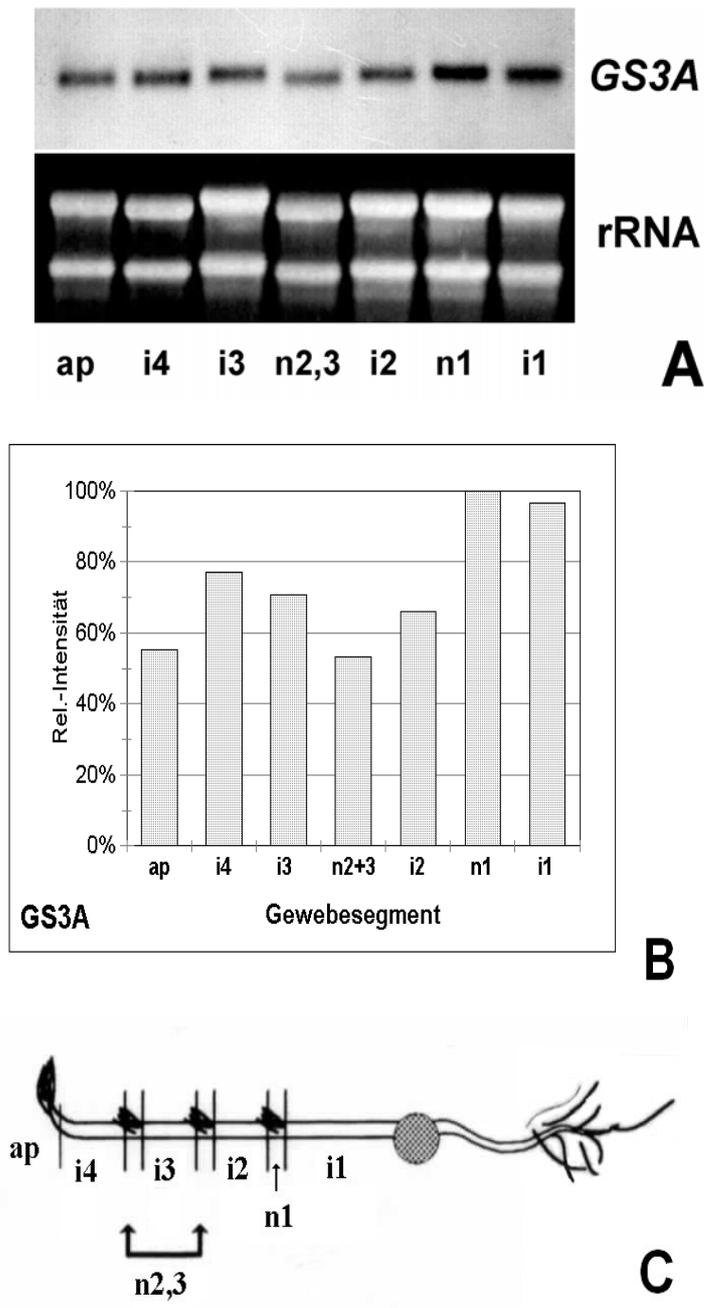


Abb. 27 : Northern-Detektion mit GS3A-Sonde. Pro Bahn wurden 10 µg Gesamt-RNA aus Gewebesegmenten etiolierter Erbsenkeimlinge aufgetragen. **A.** Mit der GS3A-Sonde detektierter Blot und das dazu gehörige denaturierende Agarosegel. **B.** Densitogramm. **C.** Schematische Darstellung der untersuchten Gewebe eines Keimlings. ap = Apices (Sproßspitze), i4 = 4. Internodium, i3 = 3. Internodium, n2,3 = 2. + 3. Nodien, i2 = 2. Internodium, n1 = 1. Nodium und i1 = 1. Internodium.

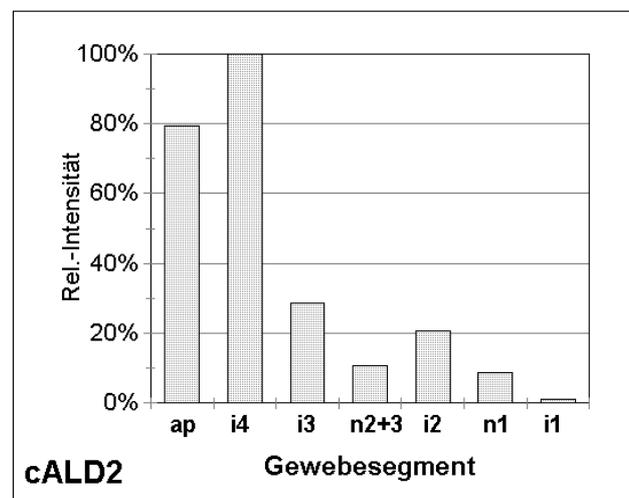
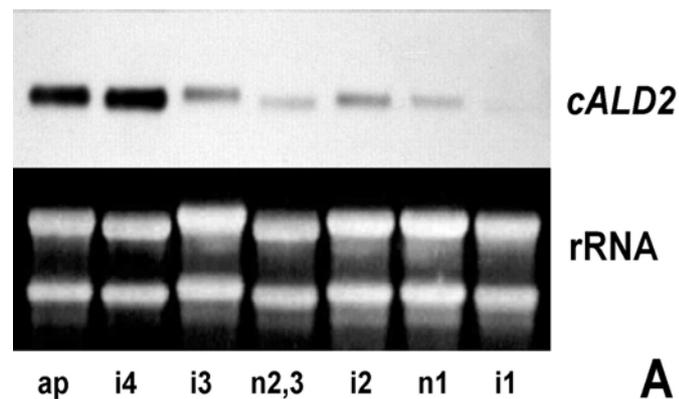


Abb. 28 : Northern-Detektion mit *cALD2*-Sonde. Pro Bahn wurden 10 µg Gesamt-RNA aus Gewebeesegmenten etiolierter Erbsenkeimlinge (s.Abb. 27 C) aufgetragen. ap = Apices (Sproßspitze), i4 = 4. Internodium, i3 = 3. Internodium, n2,3 = 2. + 3. Nodien, i2 = 2. Internodium, n1 = 1. Nodium und i1 = 1. Internodium. **A.** Mit der *cALD2*-Sonde detektierter Blot und das dazu gehörige denaturierende Agarosegel **B.** Densitogramm.

3.10.2. Northern-Detektion mit *GSI*- und *cALD1*-Sonde

Die auf Abb. 29 dargestellte Northern-Detektion mit der *GSI*-Sonde reflektiert die Expression von *GSI* in Erbsenkeimlingen. Die *GSI*-mRNA wurde am stärksten in dem jüngsten Internodium detektiert. Relativ stark trat das Signal im 3. Internodium auf, fiel dann in basaler Richtung allmählich ab und war dennoch in dem 1. Internodium noch deutlich detektierbar. In den Nodien waren die Signalintensitäten im allgemeinen auch

3. Ergebnisse

deutlich schwächer als in den Internodien. Die Signalintensität in der Sproßspitze entsprach etwa 50 % der in dem jüngsten Internodium auftretenden.

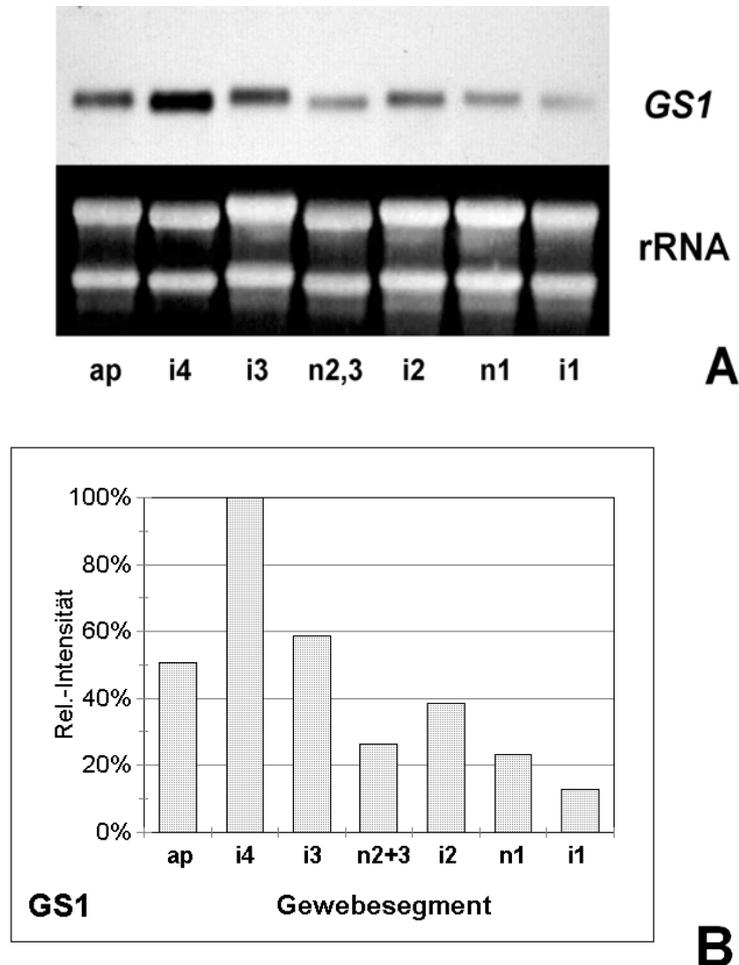


Abb. 29 : Northern-Detektion mit *GS1*-Sonde. Pro Bahn wurden 10 µg Gesamt-RNA aus Gewebeesegmenten etiolierter Erbsenkeimlinge (s. Abb. 27 C) aufgetragen. ap = Apices (Sproßspitze), i4 = 4. Internodium, i3 = 3. Internodium, n2,3 = 2. + 3. Nodien, i2 = 2. Internodium, n1 = 1. Nodium und i1 = 1. Internodium. **A.** Mit der *GS1*-Sonde detektierter Blot und das dazu gehörige denaturierende Agarosegel **B.** Densitogramm.

Die Detektion mit der *cALDI*-Sonde lieferte die stärksten Signale in der Sproßspitze und dem jüngsten 4. Internodium. Am schwächsten waren die Signale in dem 3. Internodium und dem 1. Nodium des Keimlings (Abb. 30). Im Gegensatz zu Detektion mit der *cALD2*-Sonde, wo in dem ältesten ersten Internodium kaum *cALD2*-mRNA zu detektieren war

(Abb. 28), konnte *cALDI*-mRNA hier mit etwa 50 % der relativen Intensität detektiert werden.

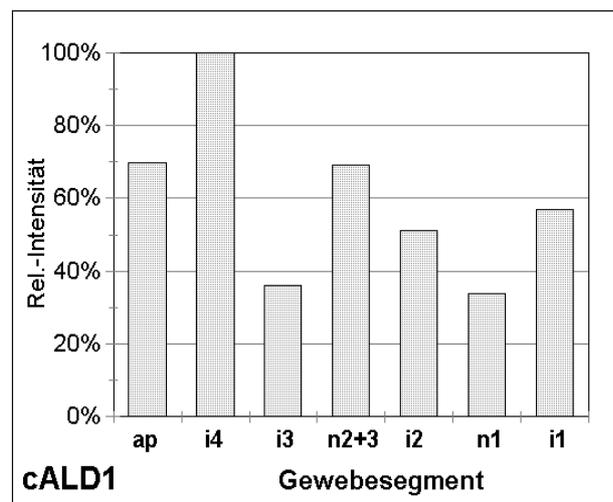
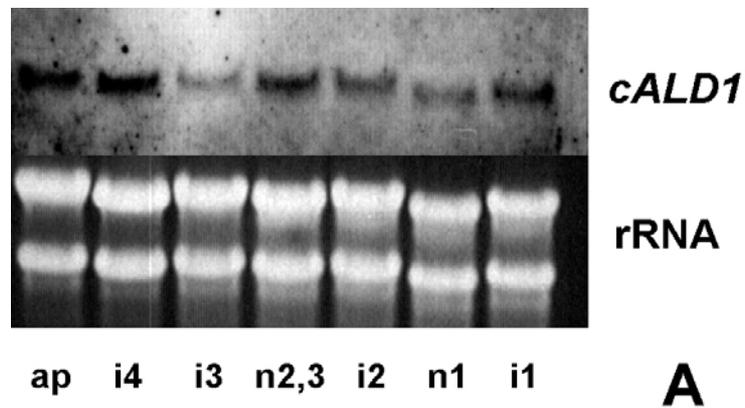


Abb. 30 : Northern-Detektion mit *cALDI*-Sonde. Pro Bahn wurden 10 µg Gesamt-RNA aus Gewebesegmenten etiolierter Erbsenkeimlinge (s. Abb. 27 C) aufgetragen. ap = Apices (Sproßspitze), i4 = 4. Internodium, i3 = 3. Internodium, n2,3 = 2. + 3. Nodien, i2 = 2. Internodium, n1 = 1. Nodium und i1 = 1. Internodium. **A.** Mit der *cALDI*-Sonde detektiertes Blot und das dazu gehörige denaturierende Agarosegel. **B.** Densitogramm.

4. DISKUSSION

Die vorangegangenen immunbiochemischen Untersuchungen mit dem monoklonalen Antikörper TIM-11B2 zeigten eine differentielle Regulation der Expression seines Antigens (Sprunck, 1996). Das Vorkommen des Antigens steht in einer möglichen Korrelation mit dem Streckungswachstum von Erbsenkeimlingen. Dabei blieb zunächst unklar, ob das Auftreten des Antigens Ursache oder Folge des Streckungswachstum ist. Die Charakterisierung des TIM-11B2-Antigens mittels immuno-magnetischer Separations-Methode führte zu dem cytosolischen Isoenzym der Fructose-1,6-Biphosphat Aldolase (E.C. 4.1.2.13). Aus den Immunodetektionen sowohl nach nativen als auch zweidimensionalen PAGE ging außerdem hervor, dass TIM-11B2 noch zusätzliche Polypeptide erkennt. Diese Proteine werden nicht von einem gegen die cytosolische Aldolase gerichteten Antikörper detektiert. Die Aufgabe dieser Doktorarbeit bestand darin, die weiteren Antigene des TIM-11B2-Antikörpers zu charakterisieren, deren mögliche Funktion zu untersuchen und die bisher immunbiochemisch erhaltenen Daten molekularbiologisch mittels Northern-Analyse zu verifizieren.

4.1. Aufreinigung eines weiteren Antigens von TIM-11B2

Führt man eine Proteinelektrophorese unter nativen Bedingungen bei einem bestimmten pH-Wert durch, so werden die Proteine aufgrund ihrer intrinsischen Ladungen aufgetrennt (Schägger & von Jagow, 1991; Schägger *et al.* 1994). Native PAGE werden durchgeführt, wenn biochemische Aktivitäten bzw. die native Struktur der aufgetrennten Proteine erhalten bleiben sollen. So können z.B. Enzym-Aktivität-Tests nach einer nativen PAGE auf dem Gel durchgeführt werden (Gabriel & Gersten 1992). Unter den unter 2.2.5.2. angegebenen Bedingungen lassen sich die TIM-11B2-Antigene voneinander trennen (Abb. 1). Die untere Bande entsprach der bereits isolierten cytosolischen Aldolase. Zur Charakterisierung des weiteren Antigens von TIM-11B2, der oberen Bande, wurde ein Aufreinigungsverfahren entwickelt, das eine Aminosäuresequenzanalyse ermöglichen sollte.

4. Diskussion

Der Gesamtproteinextrakt für die Aufreinigung wurde aus 7 d alten etiolierten Erbsenkeimlingen hergestellt (2.2.1.1). Die nach Bradford (2.2.3.1) oder Esen (2.2.3.2) ermittelte Konzentration des Proteinrohextraktes lag in der Regel im Bereich zwischen 0,4 bis 1 mg/ml. Die präparative native PAGE erfolgte nach 2.2.5.2 und dabei wurde maximal bis 1 mg Gesamtprotein pro Gel aufgetragen. Mit Hilfe von TIM-11B2 detektierten Immunoblotstreifen, auf denen die Hauptproteinbanden nach Ponceau-Färbung markiert waren, konnte der Bereich der oberen Bande auf dem Coomassie gefärbten nativen Gel lokalisiert werden.

Die Elektroelution führte nach der Fällung mit Methanol/Aceton-Mischung zur Bildung eines Präzipitats, das auch in SDS-Probenpuffer selbst nach 5 minutigen Denaturieren bei 95°C sich nicht lösen ließ. Dieses Präzipitat konnte dann durch Verwendung von 50 mM NH_4HCO_3 /0,1 % SDS als Elutionspuffer vermieden werden. In diesem Fall wurden die gesammelten Eluate gegen 5 mM NH_4HCO_3 bei mehrmaligem Pufferwechsel dialysiert, um die Salzkonzentration in der Probe nach der Aufnahme in 1x SDS-Proben-Puffer so gering wie möglich zu halten.

Aus 0,6 - 1 mg Gesamtproteinextraktes konnten bis zu 1 μg des 40 kDa-Proteins aufgereinigt werden (Abb.3). Da für die Mikrosequenzierung ca. 10 μg Protein benötigt wurden, mussten für die Mikrosequenzierung 16 präparative native PAGEs durchgeführt werden. Die Coomassiefärbung der Eluate (Abb. 3) zeigte eine zusätzliche Bande bei 80 kDa, die mit einer stärkeren Intensität hervortrat. Es handelt sich hier um ein Protein, das unter nativen Bedingungen der Gelelektrophorese gleiche Wanderungseigenschaften im Gel zeigt wie das 40 kDa-Protein aus der „oberen Bande“ und nun unter denaturierenden Bedingungen als individuelles Polypeptid auftrat. Es wäre auch denkbar, dass die beiden Proteine unter nativen Bedingungen interagieren bzw. als ein Komplex vorkommen könnten. In einer Immunodetektion des Elektroeluates mit TIM-11B2 wird nur das 40 kDa große Protein erkannt (Abb. 4).

Für die anschließende Mikrosequenzierung wurden die zusammengeführten Proteinlösungen in einer präparativen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Direkt nach dem Blotten wurde die Membran einer

4. Diskussion

Cysteinderivatisierung unterzogen (Friedman *et al.* 1970; Fullmer, 1984; Tarr *et al.*, 1983). Dieser Schritt ist wichtig, da Cystine und Cysteine leicht zur Cysteinsäure oxidiert bzw. zu einer Vielfalt von nicht-reaktiven Derivaten modifiziert werden können, dass deren Nachweis in der Aminosäuresequenzierung dadurch erschwert wird (Fullmer, 1984). Nach Färbung der PVDF-Membran mit Coomassie wurden die Proteinbanden ausgeschnitten und zur Sequenzierung eingesetzt. Die Sequenzierungen wurden von Dr. F. Buck (Institut für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie des Universitätskrankenhauses Eppendorf der Universität Hamburg) durchgeführt.

Im Vergleich zur klassischen 2D-PAGE konnte mit dieser Auftrennungsmethode schnell die notwendigen Mengen an Proteinen für die Sequenzierung gewonnen werden.

4.2. Identifizierung der „oberen Bande“ als *Glutaminsynthetase*

Bei der Mikrosequenzierung des mittels immunomagnetischer Separations-Methode isolierten TIM-11B2-Antigens wurde festgestellt, dass eine N-terminale Blockierung vorlag (Sprunck, 1996). Die Sequenzierung konnte also nur mit internen Peptidfragmenten nach Spaltung des Proteins mittels Endopeptidase Lys-C durchgeführt werden. Daher wurde in diesem Fall ebenfalls direkt eine Spaltung mit Lys-C durchgeführt. Nach der Trennung der Spaltprodukte mittels HPLC (Abb. 6) konnten mehrere Peptide erfolgreich sequenziert werden (Tab. 2).

Mit den erhaltenen Mikrosequenzen wurde in Peptidsequenz-Datenbanken *BLAST* (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> nach Homologien zu bekannten Proteinen gesucht. Das Peptid **AFGRDVVEA** (Abb. 6 Peak #6, und Tab. 5) konnte eindeutig als Spaltungsprodukt des Isoenzym GS1 (EMBL-Nr. AAA33669, bzw. PIR-Nr. B28089) der cytosolischen Glutamin-Synthetase (EC 6.3.1.2) identifiziert werden. Das aus dem Peak # 15 sequenzierte Peptid **E/Y(T)ADINVF** wurde als **ETADINVF** mit 100 %-iger Homologie in den Sequenzen von GS3A (EMBL-Nr. AAB03492 bzw. PIR-Nr. S62711) und GS3B (EMBL-Nr. AAB03493) gefunden. Ebenfalls aus GS3A bzw. GS3B stammen das Peptid **IIAEYIXV(G)** (Peak #18, Hauptkomponente), wobei das bei der

4. Diskussion

Sequenzierung nicht identifizierte Aminosäure X sich als Trp (= W) herausstellte (Tab. 5). GS3A und GS3B sind ebenfalls cytosolische Glutamin-Synthetasen, die aufgrund einer 99%-igen Homologie ihrer Aminosäuresequenzen auch als „Zwilling“-GS genannt werden (Walker *et al.* 1995). Das Peptid aus der Nebenkompente des Peaks #18, **DXEVIL**, muss sowohl GS3A/GS3B als auch GS1 zuzuordnen sein. Diese Aminosäuresequenz ist allerdings auch in der Sequenz der chloroplastidären Glutamin-Synthetase (GS2) zu finden (Tab. 5). Aufgrund der durch SDS-PAGE bestätigte Reinheit der in der Mikrosequenzierung eingesetzten Proben (Abb. 3 und 5) kann eine Kontamination durch GS2 jedoch ausgeschlossen werden.

Peptid	I IAEYIXVG		AFGRDVVEA	
GS3A	¹⁹ *****W**	(88%)	¹⁶⁶ *Y***I*D*	(67%)
GS3B	¹⁹ *****W**	(88%)	¹⁶⁶ *Y***I*D*	(67%)
GS1	¹⁸ *****WI*	(77%)	¹⁶⁵ *****	(100%)
GS2	²⁸ *****WI*	(77%)	¹⁷⁵ S****ISDA	(100%)
Peptid	Y/ETADINVF		DXEVIL	
GS3A	²⁹⁷ *****	(100%)	⁶⁷ *S****	(83 %)
GS3B	²⁹⁷ *****	(100%)	⁶⁷ *S****	(83 %)
GS1	²⁹⁶ *****T*	(87%)	⁶⁶ *S****	(83 %)
GS2	³⁰⁶ ***S**D*	(77%)	⁷⁶ *S****	(83 %)

Tab. 5 : Aminosäure-Mikrosequenzen von vier Peptidfragmenten im Vergleich mit korrespondierenden Sequenzen verschiedener Isoenzyme der Glutamin-Synthetasen der Erbse. Cytosolisch sind GS3A (EMBL-Nr. AAB03492), GS3B (EMBL-Nr. AAB03493) und GS1 (EMBL-Nr. AAA33669). GS2 (EMBL-Nr. AAA33653) ist chloroplastidär lokalisiert. ¹⁷⁵N: Position der Aminosäure innerhalb des Proteins. Die Homologie der Aminosäuren zu den Mikrosequenz-Peptiden wurden in (%) angegeben (nach *BLAST* (NCBI)).

4.3. Multispezifität des monoklonalen Antikörpers TIM-11B2 und Lokalisation eines potentiellen Epitops

Die Isotypbestimmung klassifizierte den Antikörper TIM-11B2 als einen Antikörper des IgM-Typus mit leichten Ketten des λ -Typus (Reinard 1992; Reinard *et al.* 1994). Die

4. Diskussion

Identität sowohl der leichten als auch der schweren Kette als λ - bzw. μ -Kette wurde außerdem durch Sequenzierung der für das Fab-Fragment kodierenden cDNAs aus dem Hybridomaklon TIM-11B2, welche in den pComb3-Vektor kloniert wurden, bestätigt (Rosidi, 1994 und unpublizierte Daten; Wagner, 1998). Die Möglichkeit, dass es sich bei TIM-11B2 nicht um ein mono- sondern um einen diklonalen Antikörper handelt erscheint daher sehr unwahrscheinlich. Zwar besitzt ein monoklonaler Antikörper eine hohe Spezifität für das Epitop, doch ist dies nicht immer der Fall. Es wurde nämlich beobachtet, dass monoklonale Antikörper oft keine absolute Monospezifität zeigen, also keinesfalls frei von Kreuzreaktionen sind (Wilson, 1988). Lane und Kaprowski berichteten 1982 über eine Reihe von kreuzreaktiven monoklonalen Antikörpern und untersuchten die dafür verantwortlichen Mechanismen (Lane & Kaprowski, 1982).

Auf die Wahrscheinlichkeit der Interaktionen, die sich aus der Ähnlichkeit der kreuzreaktiven Moleküle ergeben, oder auf die polyfunktionellen Charakteristika der Antikörperbindestelle basierend unterteilten Ghosh und Campbell die kreuzreaktiven Interaktionen in drei Gruppen. Das resultierende Modell umfaßt eine Reihe von Antikörperkreuzreaktionen, die zwischen Antigenen stattfinden können, die 1) identische Epitope, 2) partiell identische Epitope, und 3) vollständig nicht identische Epitope teilen. So finden sich Kreuzreaktionen meistens, wenn ein der Antigene eine hohe Epitopdichte aufweist wie z.B. bei einem aus sich wiederholenden Einheiten bestehenden Antigen (z.B. DNA, Aktin, Myosin, Vimentin) und wenn der Antikörper multivalent ist, so dass eine unechte Wechselwirkung mit niedriger intrinsischer Affinität durch lokale Konzentrationseffekte verstärkt wird, wie im Fall von Antikörpern der Klasse IgM (Ghosh & Campbell 1986). Dies ist dadurch zu erklären, dass IgM-Moleküle im frühen Stadium der Immunantwort produziert werden und in der Regel niedrigere Affinität als diejenigen Ig-Moleküle aufweisen, die später erscheinen. Aufgrund ihrer pentameren Struktur besitzen IgM-Moleküle jedoch bis zu zehn funktionellen Bindungsstellen pro Molekül und weisen somit eine sehr hohe Gesamt-Avidität auf als die höher affinen, später gebildeten IgG-Moleküle. Deswegen kann IgM sehr gut funktionieren, auch wenn jede seiner Bindungsstellen eine relativ niedrige Affinität aufweist (Alberts *et al.* 1990). Tatsächlich gehören die meisten bisher publizierten kreuzreaktiven Antikörper zum Isotypus Ig M. Es

4. Diskussion

wurde deswegen empfohlen, IgG über IgM produzierende Klone zu selektionieren, wenn Spezifität angestrebt ist (Gosh & Campbell, 1986).

Bei der Charakterisierung von Epitopen unterscheidet man zwischen kontinuierlichen und diskontinuierlichen Epitopen. Als kontinuierliche Epitope werden kurze lineare Peptidfragmente eines Antigens bezeichnet, die in der Lage sind, die gegen das intakte Protein gerichteten Antikörper zu binden. Diskontinuierliche Epitope dagegen bestehen aus nicht in einer Sequenz aufeinander folgenden Resten, die aber durch Faltung der Polypeptidkette zusammengebracht werden (Palfreyman, 1993). Es wird heute allgemein akzeptiert, dass ca. 90 % der gegen ein Protein gerichteten Antikörper für diskontinuierliche Epitope spezifisch sind, was erklärt, warum diese Antikörper normalerweise nicht mit linearen aus dem Antigen abgeleiteten Peptidfragmenten reagieren können. Bei der Vorhersage von Epitopen in Proteinen gibt es dennoch keine andere Alternative, als sich auf Versuche zu beschränken, die Identifikation von kontinuierlichen Epitopen vorherzusagen, da die Vorhersage der dreidimensionalen Struktur von diskontinuierlichen Epitopen aus dem Wissen der primären Struktur leider nicht möglich ist (van Regenmortel, 1993).

Die monoklonale Antikörper TIM-11B2 erkennt sowohl cytosolische Aldolasen als auch cytosolischen Glutamin-Synthetasen. Es müssten also gemeinsame Epitope auf beiden Enzymen existieren, die diese Erkennung verursachen. Hierbei ist noch einmal zu erwähnen, dass es sich hier um kontinuierliche oder diskontinuierliche Epitope handeln können bzw. eine Kombination von beiden. Da die Vorhersage von diskontinuierlichen Epitopen das Vorhandensein von strukturellen 3D-Daten der Antikörper-Antigen-Bindung voraussetzt, beschränkt sich der Versuch, die möglichen TIM-11B2-Epitope auf diesen Proteinen zu lokalisieren, auf Vorhersageverfahren von kontinuierlichen Epitopen. Hierzu wurden mit den Aminosäuresequenzen der Proteine die Hydrophilie-Plots nach Kyte-Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982), die Antigenizitätsindexe nach Jameson-Wolf (Jameson & Wolf, 1988) und die Oberflächenwahrscheinlichkeit-Plots nach Emini (Emini, 1985) mit Hilfe des Programms *ProteanTM/Lasergene* (DNA-Star) ermittelt. Außerdem wurden die Aminosäuresequenzen mittels des Programms *MegAlign/DNA-Star* sowie des Programms *DIALIGN 2.1* (Morgenstern, 1999; <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/dialign/>) miteinander verglichen.

4. Diskussion

Der Sequenzvergleich mittels des Programms *MegAlign/DNA-Star* zeigte lediglich eine Übereinstimmung von 10-12 %. Ein hoher Grad an Homologie ist jedoch nicht notwendigerweise entscheidend, um gleichzeitig von einem monoklonalen Antikörper erkannt werden zu können, wenn man bedenkt, dass ein Fragment von nur etwa 5-6 Aminosäuren ausreichend sein kann, um als Epitop auf einem Antigen erfassbar zu werden (Peters & Baumgarten, 1988). Das „Alignmnet“ der Aminosäuresequenzen von cALD1, cALD2, GS1, GS3A und GS3B mittels des Programms *DIALIGN 2.1* zeigte, dass innerhalb der Sequenzen dieser Proteine am N-terminalen Ende gewisse Gemeinsamkeiten vorhanden sind (s. Anhang 7.2.). Wurden die Daten aus den Hydrophilie-Plots, Antigenizitätsindexen und Oberflächen-Wahrscheinlichkeit-Plots miteinander verglichen und dabei das Ergebnis des Alignments hinzugezogen, so konnte ein Bereich von maximal 8 Aminosäuren auf den Aminosäuresequenzen eingegrenzt werden, die untereinander recht homolog sind und eine Überlappung ihrer Antigenizitätswerte aufweisen (Abb. 31).

				* * * * *			
cALD1	100	PGI	KVDKGVVELA	<u>GT<u>DGETTTQ</u>G</u>	FDSL	GAR---	-----
cALD2	101	PGI	KVDKGTVELA	<u>GT<u>DGETTTQ</u>G</u>	LDGL	GAR---	-----
GS3A	41	PGP	VSDPAKLPKW	<u>NY<u>DGSSTNQ</u>A</u>	PGKD	SEVILY	PQAIFKD
GS3B	41	PGP	VSDPAKLPKW	<u>NY<u>DGSSTDQ</u>A</u>	PGKD	SEVILY	PQAIFKD
GS1	40	PGP	VTDPSELPKW	<u>NY<u>DGSSTGQ</u>A</u>	PGQD	SEVILY	PQAIFKD

Abb. 31 : Lokalisation eines potentiellen TIM-11B2-Epitops auf den Sequenzen von cytosolischen Aldolasen (cALD1, cALD2) und cytosolischen Glutamin-Synthetasen (GS1, GS3A/B). Der Bereich besteht aus 8 Aminosäuren, die indentisch (D, G, T, Q), fast identisch (T/S) oder ähnlich sind (E/S, T/ND, G/A). Eine Ausnahme findet sich bei GS1 mit einem G in der Position 6. Stern (“*“) kennzeichnet Positionen mit höchster Homologie.

Dieses potentielle Epitop wird in den Positionen 1, 2, 5 und 6 aus vollständig identischen Aminosäuren (Asp, Gly, Thr, Gln) zusammengesetzt. Die übrigen Aminosäuren sind in ihren Eigenschaften sehr ähnlich (Position 4 : Thr bei cALD1/2 und Ser bei GS1/3A/3B) oder weisen polare bzw. hydrophile Eigenschaften auf (Position 3 : Glu bei cALD1/2 und Ser bei GS1/3A/3B und Position 6 : Thr bei cALD1/2 und Asn bzw. Asp bei GS3A/GS2B). Eine Ausnahme macht die GS1, bei der in der Position 6 dieses

4. Diskussion

mutmaßlichen Epitops statt polare/hydrophilen Aminosäuren ein Gly-Rest zu finden ist. GS1 wird durch TIM-11B2 allerdings auch nur sehr schlecht erkannt (Abb. 13). In der Position 8 befinden sich unpolare/hydrophobe Glycin bzw. Alanin-Reste.

Nicht jeder Aminosäurerest eines vermeintlichen Epitops muß notwendigerweise mit dem Paratop interagieren (van Regenmortel, 1993). Es ist jedoch denkbar, das die Aminosäurereste D, G, T und Q in der Sequenz DGETTTQG im Wesentlichen zusammenwirkend das Epitop für TIM-11B2 darstellen können und die übrigen Aminosäurereste für die Antikörper-Antigen-Erkennung vermutlich unwesentlich sind. Die Lokalisation solch eines kontinuierlichen Epitops ist das, was Vorhersageverfahren für antigene Determinante derzeit ermöglichen.

Die Erkennung von GS1/3A/3B durch den monoklonalen Antikörper TIM-11B2 könnte aber eventuell auch eine „unerwünschte“ Kreuzreaktivität des Antikörpers sein, die auf eigentlich niedrig affine Bindung zurückzuführen ist, die aber durch die multivalente IgM-Natur des Antikörpers verstärkt erscheint. Dies könnte die im Vergleich zu rek. cALD2 etwas schwächere Erkennung von rek. GS3A durch TIM-11B2 (Abb. 13) erklären. Außerdem konnte in Experimenten mit rekombinanten Antikörpern gezeigt werden, dass Phagenantikörper, die aus TIM-11B2 abgeleitete F_{ab}-Fragmente auf ihrer Oberfläche exprimierten, die rek. cALD2 erkannten, nicht aber die rek. GS3A (eigene unpublizierte Daten). Ein Fab-Fragment besteht aus der leichten Kette (V_L - und C_L -Region) und der V_H - und C_H1-Region der schweren Kette des Immunglobulins, und besitzt somit nur eine einzige antigenbindende Stelle (Porter, 1973). Das Fehlen eines verstärkenden Effektes in einem pentameren IgM-Molekül des TIM-11B2 könnte die Nicht-Erkennung der rek. GS3A durch den rekombinanten Antikörper erklären.

4.4. Klonierung und heterologe Expression der von TIM-11B2 detektierten Antigene

Die Klonierung der Gene diene einerseits dazu, die DNA-Vorlage zur Herstellung von entsprechenden Sonden zur Verfügung zu haben. Andererseits sollten die rekombinanten Proteine in *E. coli* überexprimiert und für immunbiochemische Untersuchungen und

Immunisierung von Kaninchen eingesetzt werden.

Die Klonierungen der Gene für *cALD1*, *cALD2*, *GS1* und *GS3A* gingen von einem „Pool“ von doppelsträngigen cDNA aus, der im Rahmen einer Herstellung von cDNA-Bank aus 5d alten etiolierten Erbsenkeimlingen mit Hilfe des „SMART-Kits“ (Fa. Clontech) gewonnen wurde (2.3.9). Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass bei der cDNA-Herstellung während der Erststrangsynthese eine bekannte SMART-Oligonukleotidsequenz an das 5'-Ende angehängt wird, wodurch das komplette Ende der cDNA und deren 7-Methylguanosin-Cap-Struktur erhalten bleiben. Die vollständige doppelsträngige cDNA (ds cDNA) wird in einer „long-distance“ PCR (LD-PCR) unter Verwendung der SMART-5'-und 3'-Primer, deren Sequenz den definierten 5'- und 3'-Enden der Erststrang-cDNA entsprechen, amplifiziert (*CLONTECHniques*, 1996). Mit dieser ds-cDNA als DNA-Vorlage wurden die cDNA für *cALD1*, *cALD2*, *GS1* und *GS3A* mit Hilfe von spezifischen Primern in PCR-Reaktionen amplifiziert (2.3.10). Die Primer wurden aus den jeweiligen, in den Gendaten-Banken erhältlichen cDNA-Sequenzen abgeleitet. Die Wahl der als Primer eingesetzten Oligonukleotide wurde mit Hilfe des Programms OMIGA 1.1 (Oxford Molecular Groups, Ltd.) durchgeführt, mit dem bei einer bekannten DNA-Sequenz optimale Primerpaare für Amplifikation bestimmter Fragmente ermittelt werden können. Im Falle von *cALD1* und *cALD2* konnten Primerpaare generiert werden, welche genau die codierenden Bereiche flankieren und somit zur Amplifikation dieser geeignet waren. Für die Amplifikation von *GS1* und *GS3A* stammten die vorgeschlagenen Primerpaare aus den UTR-Bereichen (Tab. 3). In der Tabelle 6 sind die EMBL-Acc.-No. der verwendeten cDNA-Sequenzen aufgelistet.

<i>cDNA</i>	EMBL-Acc.-No.
<i>cALD1</i>	X89828
<i>cALD2</i>	X89829
<i>GS1</i>	M20663
<i>GS3A</i>	U28924

Tab. 6 : Die zur Herstellung der Primer verwendeten cDNA-Sequenzen mit den dazugehörigen EMBL-Acc.-No.

4. Diskussion

In optimierten PCRs konnten die Gene für cALD1, cALD2, GS3A und GS1 erfolgreich amplifiziert werden (Abb. 7a und 7b). Diese wurden in den pGemT-Vektor kloniert und durch Sequenzierung verifiziert. Für die Überexpression der Gene wurden die DNA-Fragmente in den pET32(a+)-Vektor subkloniert (s. 3.3.3). In diesem Expressionsvektor wird das rekombinante Protein N-terminal als Fusionsprotein mit Thioredoxin (Trx•TagTM) exprimiert. Die Fusion mit Thioredoxin sollte eine Erhöhung der Löslichkeit des rekombinanten Proteins im Cytoplasma von *E. coli* bewerkstelligen. Beim Thioredoxin handelt es sich um ein 11 675 Da großes Thiolgruppen-haltiges, reduzierendes Protein, das die Cysteinreste der Cytosolproteine in der reduzierten (-SH) Form hält und somit verhindert, dass sich S-S-Bindungen (Disulfidbrücken) ausbilden (Alberts *et al.* 1990). Die N-terminal zwischen Trx und dem Zielprotein gelegenen S•TagTM und His•Tag[®] dienen der Aufreinigung bzw. der Immunodetektion des rekombinanten Proteins. Durch das Vorhandensein einer Spaltstelle für Enterokinase können diese „Tags“ aus dem Fusionprotein erfernt werden.

Unter den gewählten Induktionsbedingungen waren die Expressionsergebnisse unterschiedlich (s. 3.4.). So konnte sowohl bei rek. cALD1 als auch rek. cALD2 eine sehr gute Expression erzielt werden (Abb. 9 & 10), während bei rek. GS1 und rek. GS3A die Expressionsrate geringer ausfiel (Abb. 11 & 12). Unterschiedliche Konzentrationen an applizierten IPTG, unterschiedliche Volumina der Bakterienkulturen und unterschiedliche Dauer der Induktion konnten das Ergebnis der Expression nicht beeinflussen. Außerdem wurde festgestellt, dass zu etwa 25 % die rek. cALD2 in löslicher Form im Bakteriencytoplasma exprimiert und der Rest als „inclusion bodies“ angelegt wurde. Bei rek. GS3A wurde sogar der Hauptanteil ausschließlich als „inclusion bodies“ exprimiert. (Abb. 14 & Abb. 17).

Geringere Expressionsrate könnte auf das seltene Vorkommen bestimmter tRNAs in *E. coli* zurückzuführen sein, das mit der Bevorzugung der Verwendung bestimmter genetischen Codes („codon usage bias“) in *E. coli* korreliert (Ikemura, 1985). Dieses könnte bei erhöhter Wachstumsrate außerdem zur Bildung von „unfertigen“ Proteinen oder zum Einbau von falschen Aminosäuren führen, die infolge von fehlerhafter Faltung

4. Diskussion

zur Bildung von Proteinaggregaten („inclusions bodies“) im Cytoplasma der Bakterienzellen neigen. Die mitinduzierte, His-Tag-haltige Bande bei etwa 44 kDa (Abb. 14 - 17) könnte z.B. auf solche unvollständig synthetisierten Proteine zurückzuführen sein. Aus diesen genannten Gründen ist eine Induktion der Expression bei niedrigerer Temperatur (25°C, oder 15°C) und längere Inkubationsdauer zu empfehlen, da durch verlangsamtes Wachstum die Wahrscheinlichkeit, dass das rekombinante Protein korrekt synthetisiert wird, steigt. Ferner kann das zu exprimierende Gen für das in *E. coli* bevorzugte „codon usage“ synthetisch und mittels PCR optimiert werden, um das Problem des „codon usage bias“ umgehen zu können (Hua *et al.*, 1996). Alternativ können BIAS-optimierte Bakterienstämme (Stratagene) eingesetzt werden. Die Seltenheit bestimmter tRNAs in *E. coli* kann weiterhin durch Co-Transformation mit Plasmiden, die für die seltenen tRNAs codierende Gene tragen, kompensiert werden (Baca & Hol, 2000).

Die Bildung von „inclusion bodies“ ist ein weit verbreitetes Problem der heterologen Expression eukaryotischer Gene in *E. coli* (Taylor *et al.*, 1986; Schein, 1990). Diese Aggregation unlöslicher und inaktiver Proteine kann durch unpassende Protein-Protein-Wechselwirkungen verursacht werden, die - wie bereits erwähnt - aufgrund inkorrekt gefalteter Proteine zustande kommen. Die Rückfaltung biologisch aktiver Proteine aus „inclusion bodies“ ist möglich, stellt aber eine schwierige Aufgabe dar (Hua *et al.*, 1996; Hua, 1997). In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Proteinrückfaltungsverfahren entwickelt (Rudolph und Lilie, 1996; Mukhopadhyay, 1997).

Im dem vorliegenden Fall der Expression von rek. cALD1/2 bzw. rek. GS1/3A wurden auf weitere Optimierungsversuche verzichtet, da die geplanten Experimente keine biologisch aktiven Proteine voraussetzten (s. unten). Zur Überprüfung der Erkennung der rekombinanten Proteine durch den monoklonalen Antikörper TIM-11B2 wurden Aliquots eines Gesamtproteinextrakt aus einer induzierten Bakterienkultur verwendet. Die Immunfärbung zeigte, dass alle getesteten rekombinanten Proteine durch TIM-11B2 erkannt wurden (Abb. 13). Die Erkennung der rek. cALD2 ergab das stärkste Signal, gefolgt von rek. GS3A, rek. cALD1 und schließlich rek. GS1. Mit diesem Immunoblot ist eindeutig bestätigt worden, dass diese Proteine gemeinsam die Antigene des

monoklonalen Antikörper TIM-11B2 darstellen. Aufgrund einer 99%-igen Homologie zwischen GS3A und GS3B auf der Aminosäureebene (Walker, *et al* 1995) kann man davon ausgehen, dass auch GS3B von TIM-11B2 erkannt wird, was somit die von Sprunck gezeigte Detektion von 3 bis 5 Proteinspots in Immunfärbung nach 2D-PAGE erklärt (Sprunck, 1996). Der deutliche Unterschied der Signalintensität bei der Detektion durch TIM-11B2 zwischen cALD2 einerseits und den anderen TIM-11B2-Antigenen andererseits leitet zu der bereits erwähnten Hypothese, dass cALD2 möglicherweise das eigentliche Antigen von TIM-11B2 darstellen könnte, während die Erkennung der anderen Antigene aber von kreuzreaktiver Natur ist, die aufgrund der decameren Antigenbindestellen des IgM-Moleküls akkumulativ hervortritt.

4.5. Herstellung von polyklonalen Antikörpern

Gegen zwei Vertreter der TIM-11B2-Antigene, die cytosolische Aldolase 2 (cALD2) sowie die cytosolische Glutaminsynthetase 3A (GS3A) sollten polyklonale Antikörper in Kaninchen hergestellt werden. Das Ziel war, verschiedene polyklonale Antikörper zur Verfügung zu haben, die jeweils spezifisch nur das gegen sie gerichtete Antigen erkennen. Mit Hilfe dieser Antikörper sollten immunbiochemische und anschließend immucytochemische Untersuchungen durchgeführt werden, um die aus früheren Untersuchungen mit den monoklonalen Antikörper TIM-11B2 erhaltenen Daten zu differenzieren.

Zur Immunisierung sollten die rekombinanten Proteine, die rek. cALD2 bzw. die rek. GS3A, eingesetzt werden. Das ursprüngliche Ziel war, aus diesen rekombinanten Proteinen „tag“-freie Proteine durch Spaltung mit Enterokinase herzustellen, und sie für die Immunisierung zu verwenden. Die Aufreinigung über Ni²⁺-geladene His-Bind-Affinitätssäule hat sich im Falle von rek. GS3A aus dem Grunde erübrigt, da das rekombinante Protein unlöslich als „inclusion bodies“ exprimiert wurde (Abb.17). Im Falle von rek. cALD2 konnte mit Hilfe von Ni²⁺-geladenen His-Bind-Affinitätssäule das rekombinante Protein erfolgreich aus der löslichen Proteinfraction aufgereinigt werden. Ein Problem stellte jedoch noch das Vorhandensein eines His-Tag-haltigen, 44 kDa

4. Diskussion

großen Nebenproduktes dar (Abb. 15), das auf ein proteolytisches Abbauprodukt oder auf unvollständig synthetisierte Proteine zurückzuführen sein könnte (s. 4.3). Der Versuch der Enterokinasespaltung erwies sich als ineffizient. So konnte unter den von dem Hersteller angegebenen Standardbedingungen keine vollständige Spaltung erzielt werden (Abb. 16). Mehr als die Hälfte der eingesetzten Proteinmenge blieb ungespalten. Außerdem war eine unspezifische Spaltung zu beobachten, die sich durch das Auftreten von Doppelbanden sowohl bei dem Fusionprotein (bei ca. 56 kDa) als auch bei dem Spaltprodukt (bei 37 - 38 kDa) äußerte (Abb. 16). Die von der Enterokinase erkannten Spaltstellen sind DDDDK ρ (Collins-Racie *et al*, 1995) und GGGGK ρ (Carter, 1990). Unter den Bedingungen einer „over digestion“ wird statt dieser konventionellen Spaltstellen an der Sequenz EEER ρ gespalten (Furumoto, 1999). Diese genannten Spaltstellen sind jedoch in der Aminosäuresequenz von cALD2 nicht zu finden. Es wäre denkbar, dass eine Kontamination durch andere Proteasen, z.B. aus *E. coli*, vorgelegen haben könnte, die diese zusätzlich beobachtete Spaltungsaktivität verursacht hat.

Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurde die weitere Strategie geändert. Es sollte nun mit den Fusionproteinen, d.h. den noch mit den durch den pET32(a+)-Vektor codierenden „Tags“ versehenen Proteinen, immunisiert werden. Die Immunisierungen mussten mit denaturierten Proteinen durchgeführt werden, da deren Aufreinigung nur unter denaturierten Bedingungen möglich war. Die Aufreinigungsschritte umfassten eine präparative SDS-PAGE mit dem Gesamtextrakt bzw. den in SDS-Probenpuffer gelösten „inclusion bodies“ aus induzierten Bakterienkulturen, das Ausschneiden der Proteinbande aus dem Polyacrylamidgel und anschließend die Elektroelution der Proteine. Es wurden jeweils bis 6 präparative SDS-PAGE für jedes Protein durchgeführt. Pro Elektrophorese wurden jeweils 500 μ g aufgetrennt. Da der verwendete Elutionspuffer 0,1 % SDS (in 25 mM Tris/192 Glycin) enthielt, mussten die Proteinlösungen für die Immunisierungen in PBS umgepuffert werden. Die Elektroelutionen, die Dialysen und anschließendes Konzentrieren bzw. Umpuffern der Lösungen waren mit Verlusten verbunden, dass die Ausbeute am Ende der Präparation nur zwischen 0,5 und 1 mg Protein lag. Die Reinheit der aufgereinigten Proteine wurden mittels SDS-PAGE bestätigt (Abb. 19).

4. Diskussion

Die Produktion der polyklonalen Antikörper erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. J. Maeß vom Institut für Versuchtierkunde und Zentrales Tierlaboratorium der Medizinischen Hochschule Hannover. Es wurden jeweils mit 100 µg rek.cALD2 (Kaninchen Nr. 575 und 737) und 200 µg rek GS3A (Kaninchen Nr. 514 und 518) immunisiert. Nach der ersten Immunisierung zeigten die Antiseren „575/737“ in einer Immunfärbung mit Gesamtproteinextrakt aus Erbsenkeimlingen als Antigen eine spezifische Erkennung einer Proteinbande bei ca. 40 kDa (Abb. 20). Die nach dem Boost gewonnenen Finalantiseren (Anti-cALD2 polyklonale Antikörper) wurden für die weiteren immunbiochemischen Experimente verwendet. Die Qualität der Antiseren „514/518“ nach der ersten Immunisierung war nicht zufriedenstellend. Der detektierte Hintergrund war sowohl bei dem Antiseren „514“ als auch „518“ noch relativ stark (Abb. 21a). Deshalb folgte eine weitere Immunisierung mit je 100 µg rek. GS3A und anschließendes Boost nach weitere 6 Wochen (Harlow & Lane, 1988). Nach der zweiten Immunisierung konnte eine deutliche Erhöhung der spezifischen Erkennung der Antiseren „514/518“ erzielt und keinerlei unspezifische Hintergrundmarkierung mehr detektiert werden (Abb. 21b).

Zur weiteren Überprüfung der Spezifität wurden die polyklonalen Antikörper in Immunfärbungen getestet, in denen als Antigene rekombinante Proteine verwendet wurden, die in pET21(a+) exprimiert worden waren. Die als Fusionproteine mit Thioredoxin exprimierten rek. cALD2 und rek. GS3A sind hierzu aufgrund dieses gemeinsamen durch den Vektor pET32(a+) kodierte „Tags“ nicht geeignet. In dem Vektor pET21(a+) wird das exprimierte Genprodukt N-terminal nur mit einem aus 11 Aminosäuren bestehenden T7•Tag fusioniert, das in pET32(a+) nicht vorkommt. Dieses T7•Tag sollte für die Immundetektion nicht stören. Die Abbildungen 23A und 23B zeigen eindeutig, dass die polyklonalen Antikörper jeweils für ihr Antigen spezifisch sind. Wie erwartet, erkennen sie zusätzlich zu ihren Antigenen auch jeweils die dazugehörigen Isoformen. So erkennt der Anti-GS3A-Antikörper „514“ neben GS3A auch GS1 (Abb. 23A) und der Anti-cALD2-Antikörper „575“ neben cALD2 auch cALD1 (Abb. 23B). Dies ist durch die hohe Homologie der Aminosäuresequenzen dieser Isoformen untereinander zu erklären. GS3A und GS1 sind zu 89 % zueinander homolog (Tingey *et al.*, 1988). Zwischen cALD1 und cALD2 ist die Homologie mit 77 % ebenso hoch. Auch

4. Diskussion

Immunfärbungen mit dem Anti-GS3A-Antikörper „518“ bzw. dem Anti-cALD2-Antikörper „737“ führten zu dem gleichen Ergebnis.

Ein weiterer Test wurde mit einem Gesamtproteinextrakt aus Erbsenblättern als Antigen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Anti-GS3A-Antikörper „514“ und „518“ in den Proben aus Erbsenblättern ein weiteres Protein bei 42 kDa erkennen. Die Markierung dieser Bande war jedoch deutlich schwächer als bei der darunter liegenden, auf GS1/GS3A zurückzuführenden Bande (Abb. 22). Aufgrund der Größe handelt es sich hier mit hoher Wahrscheinlichkeit um die chloroplastidäre Glutaminsynthetase (GS2). GS2 sind auf Aminosäureebene zu 73 % homolog zu GS3A und zu 78 % homolog zu GS1 (Tingey *et al.*, 1988). Auch in den Proben aus Erbsenblättern wurde durch die Anti-cALD2-Antikörper „575/737“ nur eine einzige Bande (cALD1/2) erkannt. Eine Kreuzreaktivität mit den plastidären Aldolasen (plALD1/2, 37 kDa) war also nicht festzustellen. Demnach müssten die Anti-cALD2-Antikörper „575/737“ also spezifisch Epitope erkennen, die möglicherweise nicht in den chloroplastidären Aldolasen vorhanden sind.

4.6. Immuncytochemische Untersuchungen

Bei den immuncytochemischen Untersuchungen zur zellulären Lokalisation der TIM-11B2-Antigene wurden Goldmarkierungen im Cytoplasma und vereinzelt auch im Zellkern detektiert. Nach Vorbehandlung der Ultradünnschnitte mit Na-Perjodat wurden zusätzlich dazu auch Markierungen in der Zellwand festgestellt (Sprunck, 1996). Es wurde diskutiert, dass die Zellwandmarkierung nach der Perjodat-Behandlung durch „Demaskierung“ der Epitope von möglicherweise zellwandlokalisierten TIM-11B2-Antigenen zustande kommen könnte. Nicht ausgeschlossen wurde allerdings auch die Möglichkeit, dass durch die starke Oxidation des Zellwandmaterials mit Perjodat unspezifische Bindungsstellen für den IgM-Antikörper TIM-11B2 entstanden sein könnten (Sprunck, 1996).

Mit den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Anti-cALD2-Antikörpern „575/737“ und Anti-GS3A-Antikörpern „514/518“ sollten weitere immuncytochemische Experimente

durchgeführt werden, um die vorherigen mit TIM-11B2 erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren. Die Antiseren wurden ohne weitere Aufreinigungen in der Immungoldmarkierung eingesetzt.

Cytosolische Glutaminsynthetase 1 & 3A/B

Die immunocytochemische Markierungen mit dem Anti-GS3A-Antikörper wurden sowohl mit dem Antiserum „514“ als auch dem Antiserum „518“ durchgeführt. In beiden Fällen konnte keine gleichmäßige Verteilung der Goldmarkierungen über das gesamte Präparat erreicht werden. So wurden stellenweise Anhäufungen von Goldpartikeln gefunden, die nicht charakteristischerweise bestimmte zelluläre oder subzelluläre Strukturen markierten (Daten nicht gezeigt). Während in den Kontrollen allein mit dem Ziegen-Anti-Kaninchen-Goldkonjugat keine Markierung festgestellt wurde, waren in einigen Präimmenserum-Kontrollen hingegen auch gebundene Goldpartikeln unspezifischerweise zu beobachten. Die Vorbehandlung der Ultradünnschnitte mit Na-Perjodat führte diesbezüglich zu keiner Veränderung.

Die Erklärung ist in erster Linie in der Qualität der Antikörper selbst und des Antigens zu suchen. Zwar zeigten die Antiseren in Immunoblots -wenn auch erst nach einer zweiten Immunisierung - eine spezifische Erkennung der cytosolischen Glutaminsynthetasen 1 und 3A (Abb. 23A). In einer *in situ* Markierung von Proteinen ist aber eine andere Situation gegeben. Die subzelluläre Lokalisation eines Antigen macht Fixierungs- und Einbettungsprozesse für das Gewebematerial notwendig, die andererseits auch nachteilig auf die Antigenizität des Präparats auswirken können. So wurde demonstriert, dass jede Klasse von Antigenen einem bestimmten Fixierungsprotokoll gegenüber sich unterschiedlich verhielt (Bendayan, 1984; Bendayan *et al.* 1987; Kraehenbühl *et al.*, 1977). Es wäre also denkbar, dass durch die Fixierungs- und Einbettungsprozesse das Antigen derart verändert wurde, dass eine Detektion durch die Antiseren „514/518“ nicht mehr möglich war.

Die stellenweise anzutreffende Markierung in Präimmunkontrollen deutet außerdem auf unspezifische Wechselwirkungen mit den noch in der Antikörperlösung vorhandenen

4. Diskussion

Serumproteinen hin. Ferner könnten die beobachteten Markierungen mit den Antiseren „514/518“ auch auf eben diese Art der unspezifischen Wechselwirkungen zurückzuführen sein. Eine vorherige Aufreinigung des Antikörpers wird wesentlich zur Verbesserung der Markierung beitragen können. Dies könnte in einer Ammoniumsulfatfällung mit anschließender Affinitätschromatographie auf Protein A- oder Protein G -Sephrose verwirklicht werden. Eine weitere Aufreinigung über Affinitätschromatographie mittels an einer Matrix gebundenen Antigens (GS1 / GS3A) könnte eine Erhöhung der Spezifität der Antikörper bewirken.

Immunlokalisation von Glutaminsynthetasen mit einem Anti-GS-Antiserum, das sowohl cytosolische als auch chloroplastidäre Glutaminsynthetasen erkennt, zeigte eine ausschließlich cytosolische Markierung in den sowohl Epithel- als auch Parenchymzellen des Scutellums von keimenden Gerstensamen (Martilla *et al.* 1993). In Zentralgeweben der stickstofffixierenden Zone der Wurzelknöllchen von *Medicago truncatula* wurden Glutaminsynthetasen im Cytoplasma und in den Amyloplasten von sowohl infizierten als auch uninfizierten Zellen lokalisiert (Carvalho *et al.* 2000). In Tabakpflanzen konstitutiv exprimierte Glutaminsynthetase aus den Wurzeln der Sojabohne führte zu einer deutlichen Verstärkung der cytosolischen Markierung in den Blättern im Vergleich zu den Wildtyppflanzen (Hirel *et al.*, 1992). Eine erhöhte cytosolische Markierung wurde außerdem in seneszierenden Tabakblättern beobachtet (Brugière *et al.* 2000).

Untersuchungen mittels Promotor-GUS-Reportergenkonstrukte haben gezeigt, dass der Promotor des *GS3A*-Gens aus Erbse in Tabak und Alfafa eine GUS-Expression in die Phloemzellen dirigiert (Edwards, *et al.* 1990). Ähnliches Expressionsmuster wurde mittels Promotor des *GS21*-Gens der Sojabohne auch in *Lotus corniculatus* gesehen (Marsolier *et al.*, 1993). Immuncytochemische Untersuchungen mit Anti-Glutaminsynthetase-Antikörpern bestätigten die Lokalisation der cytosolischen Glutaminsynthetase in den Leitbündelsystemen der Blattkapillare sowohl der Reispflanze (Kamachi *et al.*, 1992) als auch der Tabakpflanze. In Tabak wurde gezeigt, dass sie spezifischerweise im Cytoplasma von Geleitzellen vorkommt (Carvalho *et al.*, 1992; Dubois, *et al.* 1996). Eine Lokalisation von cytosolischer GS im Cytoplasma von Phloemgeleitzellen konnte auch in

Solanum tuberosum L. durch Immungoldmarkierung nachgewiesen werden (Pereira *et al.* 1992).

Cytosolische Aldolasen 1 & 2

Für die Immungoldmarkierung von cytosolischen Aldolasen 1 und 2 (cALD1/2) wurde das Antiserum „575“ verwendet. Dabei konnten nur im Cytoplasma Goldpartikel gefunden werden. Sowohl im Zellkern als auch in der Zellwand wurde keine spezifische Markierung festgestellt. Die gezählte durchschnittliche Zahl Goldpartikel/μm dieser und anderer Bereiche lag in dem Bereich der Kontrollwerte. Die Vorbehandlung der Schnitte mit Na-Perjodat führte nicht zu Unterschieden in der Lokalisation der Markierung. Die Oxidation durch Na-Perjodat bewirkte also keinerlei Veränderungen, welche die Antigenizität und die molekulare Struktur des Präparates beeinflussen.

Die von Anderson *et al.* durchgeführte Untersuchung an Zellkernen von Erbsenblättern zeigte eine Immunlokalisation von Aldolasen auch im perinuklearen Raum der Zelle. Dabei wurden polyklonale Antikörper gegen plastidäre Aldolase eingesetzt, die sowohl plastidäre als auch cytosolische Aldolase erkannten. Aus diesem Grunde könnte die Markierung nicht eindeutig einem bestimmten Isoenzym zugeordnet werden (Anderson *et al.*, 1995). Bei der Immunlokalisation mit den Antiseren „575“ (Abb. 24C und 25C) konnte jedoch keine spezifische Zellkernmarkierung festgestellt werden. Die Daten von Anderson *et al.* konnten so in der vorliegenden Überprüfung nicht bestätigt werden.

Die Fixierung und Einbettung des Gewebematerials führte leider zum Verlust einiger Ultrastrukturen der Zellen. Plasmamembranstrukturen waren durch die Prozedur der Präparation der Schnitte zum Teil beschädigt. Außerdem war festzustellen, dass die cytoplasmatische Struktur der Protoplasten in einigen Stellen „schrumpfen“, was auf ein osmotisches Problem hindeutet. Die Begründung hierfür könnte in der Konzentration des Fixiermittels (4% Formaldehyd) liegen, die für eine Aufrechterhaltung der zellulären Struktur des verwendeten Gewebematerials nicht förderlich war. Zur Optimierung könnten niedrigere Konzentration des Fixiermittels oder eine Glutaraldehyd/Formaldehyd-Mischungen bestimmter Konzentrationen ausprobiert werden. Eine Verwendung eines

4. Diskussion

Osmotikums (z.B. 2 % Saccharose) im Fixierpuffer kann ebenfalls hilfreich sein (Hawes, 1988).

Abschließend läßt sich zusammenfassen, dass mit Hilfe des Anti-cALD2-Antikörpers „575“ gezeigt werden konnte, dass in etiolierten Erbsenkeimlingen die cytosolischen Aldolasen 1 und 2 eindeutig im Cytosol lokalisiert sind. Eine Zellwandlokalisation konnte nicht bestätigt werden und ist eher als eine artifizielle Markierung des Antikörpers TIM-11B2 anzusehen.

4.7. Northern-Analyse

Die immunbiochemischen Untersuchungen der verschiedenen Gewebesegmenten etiolierter Keimlinge mit den monoklonalen Antikörper TIM-11B2 deuteten auf eine mögliche Korrelation der detektierten Signalintensitäten mit dem Streckungswachstum der Pflanze hin. Die u.a. im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Charakterisierung der TIM-11B2-Antigene führte zu dem Ergebnis, dass TIM-11B2 bis zu vier Polypeptide ähnlicher Größe erkennt. Dabei handelt es sich um cALD1, cALD2, GS1 und GS3A/B. Die beobachteten unterschiedlichen Signalintensitäten in verschiedenen Gewebesegmenten sind somit auf unterschiedlich starke Markierungen dieser genannten Antigene zurückzuführen. Allerdings ermöglichen die Antiseren keine Unterscheidung der Isoenzyme untereinander, da sowohl die Anti-GS3A-Antiseren „514/518“ als auch die Anti-cALD2-Antiseren „575/737“ die jeweils ihren Antigenen zugehörigen Isoformen auch erkennen (Abb. 23). Diese sollte nun mit Hilfe molekularbiologischer Methoden in Northern-Analysen mit den dazu gehörigen Gensonden differenziert untersucht werden.

Zur Untersuchung wurden Gewebesegmenten aus 12 Tage alten im Dunklen gezogenen Erbsenkeimlingen genommen. In diesem Alter befinden sich die einzelnen Internodien in unterschiedlichen Wachstumsstadien (s. Abb. 27C). Die basalen ersten und zweiten Internodien haben ihr Längenwachstum bereits eingestellt, die oberen (dritten und vierten) Internodien befinden sich aber noch in einer starken Wachstumsphase (Sprunck, 1996). Die Ausbeute an Gesamt-RNA lag bei Proben aus Apex und den jüngsten Internodien etwa bei

4. Diskussion

1 µg/mg Pflanzenmaterial. Aus den älteren Internodien und Nodien waren die Ausbeute um ein fünftel bis ein zehntel geringer, so dass mehr Material zur Isolation eingesetzt werden musste, um genügend RNA-gewinnen zu können. Für den Northern-Transfer wurden jeweils 10 µg Gesamt-RNA aus jedem Keimlingsegment auf denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt.

Als Sonden wurden die entsprechenden cDNAs eingesetzt, die bereits in pGemT kloniert vorlagen (s. Tab. 4). Die PCR-Bedingungen der Markierung wurden in Anlehnung an das Protokoll von Firnhaber (2000) gewählt. Neben einer gelanalytischen Überprüfung des Markierungserfolges (Abb. 26) wurden die Gele mit den PCR-Produkten der Sondenmarkierung auf Nylonmembran geblottet und anschließend mit anti-DIG-Fab-AP (1:5000 in 1 % Blockierungsreagenz) detektiert. Nach Färbung mit NBT/BCIP wurden dabei Signale der DIG-markierten DNA-Fragmenten deutlich sichtbar (Daten nicht gezeigt). Es hat sich im Laufe der Untersuchung außerdem als sehr sinnvoll erwiesen, zur Reduktion von Hintergrundsignalen die Sonden vorher gelelektrophoretisch aufzureinigen. Die eingesetzte Menge an Sonde für die Hybridisierung richtete sich nach Rüger *et al.* (1997).

GS3A und GS1

Aufgrund der bereits erwähnten Eigenschaft von *GS3A* und *GS3B* als „Zwilling“-GS-Gene (s.1.3. und 4.2) wurde in dieser Arbeit nur das zumindest auf mRNA-Ebene dominante *GS3A*-Gen berücksichtigt. Zur Untersuchung der Expression des *GS1*-Gens wurde analog die entsprechende cDNA als Sonde eingesetzt.

Die basalen Gewebeselemente (der erste Internodium und der erste Nodium des Keimlings) lieferten bei der Detektion des Northern-Blots mit der *GS3A*-Sonde die stärksten Signale. In allen übrigen Gewebeteilen lagen die Signalintensitäten auf einem vergleichbaren Niveau, bei ca. 60 - 80 % der relativen Intensität im basalen Bereich (Abb. 27). Dies bedeutet, dass keine direkte Korrelation der Expression der *GS3*-Gene mit dem Wachstum des Keimlings besteht. In den jüngsten Internodien (3. und 4. Internodien), wo das Längenwachstum hauptsächlich stattfindet, wurde keine deutliche Akkumulation der

4. Diskussion

mRNA im Vergleich zu den restlichen Segmenten beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde im ersten Nodium, wo kein Zellstreckungswachstum stattfindet, und in dem ersten Internodium des Keimlings, wo sich das Längenwachstum bereits eingestellt hat, eine Verstärkung der Signale festgestellt. Die erhöhte *GS3*-Transkriptionsrate in der lokalen Nähe zu den Kotyledonen, die beim Wachstum unter währenden etiolierten Bedingungen als *source*-Gewebe fungieren, würde die dem Isoenzym *GS3A* zugeschriebene Rolle bei der Glutaminsynthese für den Stickstofftransport bestätigen (Walker & Coruzzi, 1989). Im keimenden Samen werden die für das Wachstum des Keimlings benötigten Nährstoffe aus dem hydrolytischen Abbau der Speicherstoffe in den Kotyledonen gebildet (Ashton, 1976; Swain & Dekker, 1966). Die aus den abgebauten Speicherproteinen freigesetzten Ammoniumionen werden durch die Glutaminsynthetase in dem *GS/GOGAT*-Zyklus in Form von Glutamin aufgefangen und so zu dem Ort des Verbrauchs (*sink*) transportiert (Lea *et al.* 1990). In einer Keimungsreihe konnte eine Induktion der *GS3A*-Expression ab dem 3. Tag der Keimung festgestellt werden (Walker & Coruzzi, 1989). Das Niveau der detektierten *GS3A*-Transkripte lag am 3. und 5. Tag am höchsten, nahm ab dem 7. Tag leicht ab und blieb bis zum 11. Tag relativ konstant (eigene unpublizierte Daten). Die gleichmäßige Signalstärke der *GS3A*-mRNA im gesamten Epikotyl der untersuchten Keimlinge, von einer Erhöhung in direkter Nachbarschaft zu den Kotyledonen abgesehen, deutet auf eine konstitutive, bis zu einem gewissen Grad entwicklungsunabhängige Expression des *GS3A*-Gens hin. Dies steht im Einklang mit der Bedeutung des *GS3A* als das Isoenzym, das die Aufgabe der Glutaminsynthese für den Stickstofftransport übernehmen sollte.

Das *GS1*-Gen zeichnete sich durch ein stark reguliertes Expressionsmuster aus. Bei der Hybridisierung mit der *GS1*-Sonde wurde das stärkste Signal in dem jüngsten, 4. Internodium detektiert (i4, Abb. 29). Während in der Sproßspitze und dem 3. Internodium die relativen Signalintensitäten noch ungefähr der Hälfte der in dem 4. Internodium detektierten entsprachen, nahmen sie zum basalen Ende hin deutlich ab, und in dem ältesten Internodium schließlich konnte nur noch weniger als 10 % der maximalen Signalintensität festgestellt werden. In den Nodien fielen die Transkriptionsraten von *GS1* deutlich geringer aus als in den übrigen Gewebesegmenten (mit Ausnahme des 1.

4. Diskussion

Internodium). Dieses Ergebnis impliziert eine Korrelation der *GS1*-Expression mit dem (Streckungs-) Wachstum. *GS1* spielt offenbar eine sehr wichtige Rolle bei der Biosynthese von aufbauenden, für das Wachstum benötigten Molekülen. In einer stoffwechselaktiven Zelle ist Glutamin nicht nur als Bestandteil von Proteinen wichtig, sondern auch als Stickstofflieferant für die Biosynthese von Purinen, Pyrimidinen und einer Vielzahl von anderen N-haltigen Verbindungen (Meister, 1974). Außerdem hat die Northern-Detektion gezeigt, dass das für cytosolische Isoform *GS1* kodierende Gen während der Entwicklung der Erbse eine andere Funktion besitzt als die *GS3*-Gene (s. oben), die zwei weitere Isoformen der cytosolischen *GS* kodieren. Dies bestätigt die von Walker und Coruzzi vertretene These, dass die durch *GS1* kodierte *GS*-Isoform für die intrazellulär benötigte Glutamin-Synthese verantwortlich ist, während die spezielle Funktion von *GS3A/B* in der Glutaminsynthese für den interzellulären Stickstofftransport besteht (Walker & Coruzzi, 1989). Durch die Betrachtung von Gewebesegumenten aus 12 Tage alten etiolierten Keimlingen, die unterschiedliche Wachstumsstadien aufweisen, konnte so eine differentielle Regulation der Expression von Genen, die verschiedenen Isoformen der cytosolisch lokalisierten Glutaminsynthetasen (*GS1*, *GS3A/B*) kodieren, dargestellt werden.

cALD2 und cALD1

Die Expression des für das Isoenzym 2 der cytosolischen Aldolase (*cALD2*) kodierenden Gens unterliegt ebenfalls einer Regulation. Die Hybridisierung des Northern-Blots mit der *cALD2*-Sonde lieferte die stärksten Signale in der Sproßspitze und im dem jüngsten Internodium des Keimlings. Die Abnahme der Signalintensitäten zum basalen hin war deutlich, in dem ältesten Internodium konnte *cALD2*-mRNA kaum mehr detektiert werden (Abb. 28). Dieses Ergebnis zeigt, dass zwischen der Expression des *cALD2*-Gens und dem Wachstum des Keimlings eine Korrelation besteht. Starke Stoffwechselaktivitäten in den wachsenden Geweben erfordern eine ständige Zufuhr von Energie und Intermediärprodukten, die für die Biosynthese von Makromolekülen und Zellstrukturen benötigt werden. In nicht photoautotroph wachsenden Keimlingen werden die Energie und die organischen C-Verbindungen aus dem Abbau der Reserven in den Kotyledonen bzw.

4. Diskussion

Endosperm gewonnen (Bewley & Black, 1983). Kohlenhydratspeicher (in der Regel in Form von Stärke) werden durch Amylasen und Phosphorylasen hydrolysiert (Kruger, 1990) und die dabei freigesetzten Saccharosemolekülen zu den Verbrauchsorten, den *sink*-Gewebe, transportiert. Dort werden sie durch Invertasen bzw. Saccharose-Synthasen in Fructosen und Glucosen (bzw. UDP-Glucosen) gespalten und so in die Glycolyse eingespeist (Sung *et al.*, 1988). Die Glycolyse liefert außer Energie auch Kohlenstoffgerüste für die Biosynthese von zahlreichen weiteren Verbindungen.

Die in dieser Northern-Analyse beobachtete Verstärkung der Expression des *cALD2*-Gens in den wachstumintensiven Geweben impliziert eine intensiv ablaufende Glycolyse, was in wachsenden stoffwechselaktiven Geweben auch zu erwarten ist. In der Glycolyse katalysiert die cytosolische Aldolase die Aldolspaltung von Fructose-1,6-Bisphosphat zu Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat. Die Gluconeogenese, bei der die Aldolase die Rückreaktion (Aldolkondensation) katalysiert, dürfte in den untersuchten Erbsenkeimlingen kaum eine Rolle spielen.

Diese ist eher bei der Saccharose-Synthese in photosynthetisch aktiven Geweben und bei der Keimung von Pflanzen mit fettreichen Samen, deren Fettreserven in Saccharose umgewandelt werden müssen wichtig (ap Rees, 1990). Da Erbsensamen aber stärke- und proteinreich sind (Sitte *et al.*, 1998) kann man davon ausgehen, dass etiolierte Erbsenkeimlinge zur Deckung ihres Stoffwechsels- und Energiebedarfs allein auf eine aktive Glycolyse angewiesen sind, wo die Abbauprodukte aus der Mobilisierung der Stärkespeicher verstoffwechselt werden. Es gibt noch keinen überzeugenden Beweis dafür, dass der Proteinabbau signifikanterweise Substrate für die Respiration produziert. In den Geweben, wo Proteinabbau stattfindet, scheinen jedoch die Aminosäuren anders transloziert und abgelagert oder gleich für die Proteinbiosynthese verwendet als in der Atmungskette umgesetzt zu werden (ap Rees, 1990).

Ob und inwiefern die differentielle Expression des *cALD2*-Gens unterschiedliche Aldolaseaktivitäten in den einzelnen Gewebesegmenten widerspiegelt, müssen weitere Untersuchungen aufklären. Eine Messung der Aldolaseaktivität in einem

4. Diskussion

Gesamtproteinextrakt wird jedoch die cytosolische nicht von der plastidären Aldolaseaktivität unterscheiden können. In etiolierten Spinatkeimlingen z.B. machen die plastidären Aldolasen immerhin 60 % der gesamten Aldolaseaktivität aus (Schnarrenberger, 1987). Durch DEAE-Ionenaustauschchromatographie können cytosolische und plastidäre Aldolasen allerdings voneinander getrennt werden (Anderson & Pacold, 1972 ; Krüger & Schnarrenberger, 1983; Schnarrenberger & Krüger, 1986). Eine separate Betrachtung der Aktivität der einzelnen Isoenzyme wäre also nach einer Auftrennung durch DEAE-Säule möglich.

Bei der Detektion mit der *cALD1*-Sonde ließ sich eindeutig auch eine abnehmende Tendenz der Signalintensitäten in basaler Richtung erkennen, die Abnahme an sich war jedoch nicht so drastisch wie im Falle von *cALD2*. Wenn bei dem letzteren kaum *cALD2*-Transkripte mehr in dem ältesten ersten Internodium zu detektieren waren (Abb. 28), konnte hier mit etwa 50 % der relativen Intensität noch deutlich *cALD1*-mRNA detektiert werden. Die *cALD1*-mRNA-Banden des auf der Abb. 30 dargestellten Northern-Blots konnten unter gleichen Detektionsbedingungen (s. 2.3.11.3. und 2.3.11.4) allerdings erst nach deutlich längeren Expositionszeiten (nach 30 min, vergleichsweise 3-5 min bei *cALD2*-Detektion) detektiert werden. Dies könnte als ein Hinweis dafür gelten, dass im Vergleich zu *cALD2*-mRNA die *cALD1*-mRNA in den untersuchten Geweben mengenmäßig merklich unterrepräsentiert sind. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit steht fest, dass sowohl *cALD2* als auch *cALD1* jeweils charakteristische Expressionsmuster in Gewebesegmenten etiolierter Erbsenkeimlinge aufweisen und dass *cALD2* bei der Entwicklung der Keimlinge unter nicht-photoautotrophen Bedingungen offenbar eine zentrale Rolle spielt.

Die Expression von *GSI*, *cALD2* und *cALD1* steht in Korrelation mit dem Wachstum des etiolierten Keimlings. Dies stimmt mit den bereits aus den immunbiochemischen Untersuchungen bekannten Erkenntnissen überein. Im Falle von *GS3A* jedoch, wo das von ihm codierte Protein in einer Immunfärbung mit TIM-11B2 immerhin das zweitstarke Signal nach *cALD2* beisteuert (Abb. 13), liegt ein anderes Expressionsmuster vor. Der ihm zugeschriebene Rolle als das für den interzellulären Glutamintransport

4. Diskussion

verantwortliche GS-Isoenzym entsprechend zeigt *GS3A* mit einer geringen jedoch signifikanten Verstärkung in der Nähe der Kotyledonen eine relativ gleichmäßige Expression über das gesamte Sprossgewebe der Erbsenkeimlinge.

Ausblick :

Um das Epitop vom TIM-11B2 zu identifizieren, können Punktmutationen in dem Bereich des mutmaßlichen Epitops in den Sequenzen von *cALD1*, *cALD2*, *GS3A* und *GS1* eingeführt werden. Gerichtete Mutagenese kann mittels PCR oder aber mittels kommerziell erhältlichen Systems, wie z.B. der von Deng und Nickoloff (1992) beschriebenen U.S.E.-Methode (Clemente & Márquez, 1999a/b und 2000) erreicht werden. Immunfärbungen der veränderten rekombinanten Proteinen mit TIM-11B2 werden Hinweise darauf geben, welche Aminosäuren des potentiellen Epitops für die Erkennung durch TIM-11B2 unentbehrlich sind. Diskontinuierliche Epitope (s. 4.3) werden jedoch so nicht ermittelt werden können.

Im Falle von *GS3A/GS1* gilt in erster Linie die Optimierung der Expression mit dem Ziel, eine verbesserte Löslichkeit der rekombinanten Proteine zu erreichen. Nur dann ist eine native Aufreinigung möglich, die für die Untersuchung der biochemischen Aktivität eine Voraussetzung ist. Die alternativen Strategien hierfür wurden bereits im unter 4.4. diskutiert. Eine Co-Transformation mit dem Plasmid, das die Gene für molekulare Chaperonen *E. coli*-GroES/EL trägt, kann möglicherweise die Bildung von „inclusion bodies“ unterdrücken. Da bisher keine enzymkinetischen Daten von Erbsen-Glutamin-Synthetasen bekannt sind, können durch die Expression von löslichen *GS3A/GS1* die Aktivitäten dieser Enzyme charakterisiert werden. Glutamin-Synthetasen kommen in aktiver Form als Octameren vor. In Pflanzen wurden nachgewiesen, dass von unterschiedlichen Genen codierten cytosolischen GS aktive Hetero-Octamere bilden können (Carvalho *et al.* 1997). Da sich die verschiedenen GS-Aktivitäten unter Umständen durch Ionenaustauschchromatographie auftrennen lassen (Carvalho *et al.* 1997), kann untersucht werden, ob die rek. *GS3A* und rek. *GS1* ebenfalls aktive Hetero-Octamere bilden können.

Im Falle von *cALD1/cALD2* sollten im Vordergrund die Untersuchung der enzymatischen Aktivitäten der rekombinanten Proteine stehen. Über die Regulation, eventuell unterschiedliche Funktionen und die Expression der beiden cytosolischen Aldolasen-Isoenzyme ist noch wenig bekannt. Enzymkinetische Untersuchungen können Einblicke in die Funktionen und Regulation dieser Isoenzyme gewähren. Ferner sollten die Expressionsmuster von *cALD1* und *cALD2* in verschiedenen Geweben der Pflanze miteinander verglichen werden. Während in den *sink*-Gewebe starke Akkumulation von *cALD2*-mRNA festzustellen war (3.10.3, 4.7; und Firnhaber, 2000), zeigten grüne Blätter eine reduzierte *cALD2*-Expression (Firnhaber, 2000). Für eine fortwährende Saccharosesynthese muss in photosynthetisch aktiven grünen Blättern (*source*-Gewebe) vorwiegend Gluconeogenese ablaufen (Quick & Schaffer, 1996; Foyer & Galtier, 1996). In den *sink*-Gewebe hingegen ist wegen der Verwertung der Saccharose eine aktive Glycolyse zu erwarten (Plaxton, 1996). Die Aldolasen katalysieren im ersten Fall die Aldolkondensation der aus den Chloroplasten exportierten Triosephosphate und im zweiten Fall die gegenläufige Reaktion, die Aldolspaltung. Aus diesen Gründen könnten Vergleiche der Expressionsmuster von *cALD1* und *cALD2* in verschiedenen *source*- und *sink*-Gewebe möglicherweise Hinweise auf eventuell vorhandene Unterschiede in der Funktion der beiden Isoenzyme geben.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, das zweite bisher noch nicht identifizierte Antigen des monoklonalen Antikörpers TIM-11B2 (Sprunck, 1996) zu charakterisieren. Dazu wurde das unterschiedliche Laufverhalten der TIM-11B2-Antigene in einer nativen PAGE ausgenutzt. Nach einer präparativen nativen PAGE und Mikrosequenzierung konnten die erhaltenen Mikrosequenzen als legitime Lys-C-Proteolyseprodukte von cytosolischen Glutaminsynthetasen GS3A/B (3 Peptide) bzw. GS1 (1 Peptid) identifiziert werden.

Mit Hilfe von spezifischen Primern wurden die Gene für cALD1, cALD2, GS3A und GS1 erfolgreich aus einem ds-cDNA-Pool von 5 d alten Erbsenkeimlingen mittels PCR amplifiziert werden. Die PCR-Produkte wurden in pGemT-Vektor kloniert und die Identität der Inserts wurde durch Sequenzierungen bestätigt. Die Gene wurden in den Expressionsvektor pET32(a+) subkloniert und erfolgreich in *E. coli* des Stammes BLR (DE3) exprimiert. Die rekombinanten Proteine wurden als Fusionproteine mit Thioredoxin (+ S•TagTM und His•Tag[®]) exprimiert. Die Immunfärbung mit TIM-11B2 zeigte, dass dieser monoklonale Antikörper, wenn auch unterschiedlich stark, alle der rekombinanten Proteine erkennt.

Durch ein „Alignment“ der Aminosäuresequenzen von cALD1, cALD2, GS3A, GS3B und GS1 und Vergleiche der dazugehörigen Hydrophilie-, Antigenizitäts- und Oberflächenwahrscheinlichkeit-Plots konnte ein mutmaßliches Epitop für TIM-11B2 auf diesen Sequenzen lokalisiert werden. Dieses potentielle Epitop besteht aus 8 Aminosäuren **DG*(T/S)T*Q***, die alle außer der als '*' dargestellten, ähnlichen (polar = E/S und T/N/D bzw. hydrophob = G/A) den genannten Aminosäuresequenzen gemeinsam sind. Die multispezifische Natur des monoklonalen Antikörpers TIM-11B2 und deren Ursachen wird diskutiert.

Zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern wurden Kaninchen mit rek. cALD2 bzw. rek. GS3A jeweils als Trx-Fusionproteinen immunisiert. Vier polyklonalen Antikörper wurden gewonnen, die jeweils gegen cALD2 (Antiseren „575/737“) bzw. gegen GS3A

5. Zusammenfassung

(Antiseren „514/518“) spezifisch sind. Immunfärbungen mit in pET21(a+) exprimierten Proteinen als Antigenen zeigten, dass Anti-cALD2-Antikörper neben cALD2 auch cALD1 und Anti-GS3A-Antikörper neben GS3A auch GS1 erkennen. Anti-GS3A-Antikörper „514/518“ erkennen in Immunfärbungen mit Gesamtproteinen aus grünen Blättern auch die chloroplastidäre Glutamin-Synthetase (GS2). Kreuzreaktionen der Anti-cALD2-Antikörper „575/737“ mit den chloroplastidären Aldolasen konnten nicht festgestellt werden.

Die Anti-cALD2-Antikörper „575“ konnten erfolgreich in immunocytochemischen Untersuchungen mit anschließender Elektronenmikroskopie angewendet werden. Immungoldmarkierungen mit „575“-Antiseren als Erst-Antikörper zeigten eine spezifische cytoplasmatische Markierung. Die Anti-GS3A-Antikörper „514/518“ hingegen konnten in Form ungereinigter Antiseren nicht in Immungoldmarkierungen eingesetzt werden.

Durch Northern-Analysen wurde gezeigt, dass die Gene für cytosolische Glutamin-Synthetase GS3A und GS1 distinkte Expressionsmuster in Gewebesegmenten von 12 Tage alten etiolierten Erbsenkeimlingen aufweisen. Während die Expression des *GS1*-Gens eine eindeutige Korrelation mit dem Wachstum zeigt, wird das *GS3A*-Gen relativ gleichmäßig exprimiert. Dieses Ergebnis bestätigt die unterschiedlichen physiologischen Funktionen dieser beiden GS-Isoenzyme (Walker & Coruzzi, 1989). Die Northern-Detektionen mit den *cALD1/2*-Sonden zeigten auch eine spezifische Expression dieser beiden Gene. Es konnte eine Korrelation mit dem Wachstum festgestellt werden. Während die Akkumulation der *cALD2*-mRNA zum basalen hin drastisch abnahm, konnte im Falle von *cALD1*-mRNA keine charakteristisch starke Abnahme festgestellt werden. Die unterschiedliche Sensitivität beider Detektionen, was auf eine unterschiedlich starke Expression dieser Gene relativ zueinander hindeutet, kann als ein Hinweis dafür gelten, dass eines dieser Aldolase-Gene, das *cALD2*-Gen, in den untersuchten Erbsenkeimlingen dominant exprimiert wird.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D.** (1990) Molekularbiologie der Zelle, Übers. von Jaenicke, L. (Leitung). VCH Verlag GmbH, Weinheim.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miler, W., Myers, E.W., Lipman, D.J.** (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Anderson, L.E. and Pacold, I.** (1972) Chloroplast and Cytoplasmic Enzymes, IV. Pea Leaf Fructose 1,6-Diphosphate Aldolases. *Plant Physiol.* **49**, 393-397.
- Anderson, L.E., Wang, X., Gibbons, J.T.** (1995) Three enzymes of carbon metabolism or their antigenic analogs in pea leaf nuclei. *Plant Physiol.* **108**, 659-667.
- ap Rees, T.** (1988) Hexose phosphate metabolism by non-photosynthetic tissues of higher plants. In: *The Biochemistry of Plants. A Comprehensive treatise*, Vol. **14**, pp.1-33, Stumpf, P.K. and Conn, E.E. (eds.), Academic Press, New York.
- ap Rees, T.** (1990) Carbon metabolism in mitochondria. In : *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, pp.106-123, Dennis, D.T. and Turpin, D.H. (eds.), Longman Publishers Ltd., Singapore.
- Ashton, F.M.** (1976) Mobilization of storage proteins of seeds. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **27**, 95-117.
- Baca, A.M., Hol, W.G.** (2000) Overcoming codon bias : a method for high-level overexpression of Plasmodium and other AT-rich parasite genes in *Escherichia coli*, *Int. J. Parasitol.* **30** (2), 113-118.
- Bauer, D., Biehler, K., Fock, H., Carrayol, E., Hirel, B., Migge, A., Becker, T.W.** (1997) A role for cytosolic glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during water stress in tomato. *Physiol. Plant.* **29**, 17-18.
- Becker, T.W., Caboche, M., Carrayol, E., Hirel, B.** (1992) Nucleotide sequence of a tobacco cDNA encoding plastidic glutamine synthetase and light inducibility, organ specificity and diurnal rhythmicity in the expression of the corresponding genes of tobacco and tomato. *Plant Mol. Biol.* **19**, 367-379.
- Behringer, F.J., Davies, P.J.** (1992) Indole-3-acetic acid levels after phytochrome-mediated changes in the stem elongation rate of dark- and light-grown *Pisum* seedlings. *Planta* **188**, 959-969.

6. Literaturverzeichnis

- Bendayan, M.** (1984) Protein A - gold electron microscopic immunocytochemistry : Methods, applications and limitations. *J. Electron Microsc. Tech.* **1**, 243.
- Bendayan, M., Nanci, A., Kan, F.W.K.** (1987) Effect of tissue processing on colloidal gold cytochemistry. *J. Histochem Cytochem.* **35**, 983.
- Bennet, M.J., Lighfoot, D.A., Cullimore, J.V.** (1989) cDNA sequence and differential expression of the gene encoding the glutamine synthetase γ polypeptide of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Mol. Biol.* **12**, 553-565.
- Bewley, J.D. and Black, M** (1983) Physiology and Biochemistry of Seeds in relation to Germination. Development, Germination and Growth. Vol 1., Springer Verlag, Berlin.
- Bishop, G.J., Harrison, K., Jones, J.D.G.** (1996) The tomato *dwarf* gene isolated by heterologous transposon tagging encodes the first member of a new cytochrome P450 family. *Plant Cell* **8**, 959-969.
- Boerjan, W., Cervera, M.T., Delarue, M., Beckman, T. , Dewitte, W., Bellini, C., Caboche, M., Onckelen, H.V., Montagu, M.V., Inzé, D.** (1995) *superrroot*, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. *Plant Cell* **7**, 1405-1419.
- Botha, F.C., O'Kennedy, M.M.** (1989) *J. Plant Physiol.* **135**, 433-438.
- Botha, F.C., Potgieter, G.P., Botha, A.-M.** (1992) Respiratory metabolism and gene expression during seed germination. *Plant Growth Regulation* **11**, 211-224.
- Bradford, M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brears, T., Walker, E., Coruzzi, G.M.** (1991) A promoter sequence involved in cell-specific expression of the pea glutamine synthetase *GS3A* gene in organs of transgenic tobacco and alfalfa. *Plant J.* **1**(2), 235-244.
- Brugière, N., Dubois, F., Masclaux, C., Sangwan, R.S., Hirel, B.** (2000) Immunolocalization of glutamine synthetase in senescing tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves suggests that ammonia assimilation is progressively shifted to the mesophyll cytosol. *Planta* **211**, 519-527.
- Buchanan-Wollaston, V., Ainsworth, C.** (1997) Leaf senescence in *Brassica napus*: Cloning of senescence related genes by subtractive hybridization. *Plant Mol. Biol.* **33**, 821-834.

6. Literaturverzeichnis

- Carter, P.** (1990) in „Protein Purification“. *Am. Chem. Soc.*, 183-195.
- Carvalho, H., Lescure, N., de Billy, F., Chabaud, M., Lima, L., Salema, R., Cullimore, J.** (2000) Cellular expression and regulation of the *Medicago truncatula* cytosolic glutamine synthetase genes in root nodules. *Plant Mol. Biol.* **42**, 741-756.
- Carvalho, H., Sunkel, C., Salema, R. and Cullimore, J.V.** (1997) Heteromeric assembly of the cytosolic glutamine synthetase polypeptides of *Medicago truncatula*: complementation of a *glnA Escherichia coli* mutant with a plant domain-swapped enzyme. *Plant Mol. Biol.*, **35**, 623-632.
- Carvalho, H., Pereira, S., Sunkel, C., Salema, R.** (1992) Detection of cytosolic glutamine synthetase in leaves of *Nicotiana tabacum* L. by immunocytochemical methods. *Plant Physiol* **100**, 1591-1594.
- Chaudhury, A.M., Letham, S., Craig, S., Dennis, E.S.** (1993) *amp1--* a mutant with high cytokinin levels and altered embryonic pattern, faster vegetative growth, constitutive photomorphogenesis and precocious flowering. *Plant J.* **4**, 907-916.
- Cho, H.-T., Kende, H.** (1997a). Expansins in deepwater rice internodes. *Plant Physiol.* **113**, 1137-1144.
- Cho, H.-T., Kende, H.** (1997b). Expansins and internodal growth of deepwater rice. *Plant Physiol.* **113**, 1145-1151.
- Chomczynski, P., Sacchi, N.** (1987) Single-step method of RNA isolation by guanidium thiocyanat-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162** (1), 156-159.
- Chopra, S., Dolferus, R., Jacobs, M.** (1990) Cloning and sequencing of the *Arabidopsis* aldolase gene. *Plant Mol. Biol.* **15**, 517-520.
- Chory, J.** (1997) Light modulation of vegetative development. *Plant Cell* **9**, 1225-1234.
- Chou, P.Y., Fasman G.D.** (1978) Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzymol.* **47**, 45-148.
- Clemente, M.T., Márquez, A.J.** (1999a) Site-directed mutagenesis of Glu-297 from α -polypeptide of *Phaseolus vulgaris* glutamine synthetase alters kinetic and structural properties and confers resistance to L-methionine sulfoximine. *Plant Mol. Biol.* **40**, 835-845.

6. Literaturverzeichnis

- Clemente, M.T., Márquez, A.J.** (1999b) Functional importance of Asp56 from the α -polypeptide of *Phaseolus vulgaris* glutamine synthetase, An essential residue for transferase but not for biosynthetic enzyme activity. *Eur. J. Biochem.* **264** (2), 453-460.
- Clemente, M.T., Márquez, A.J.** (2000) Site-directed mutagenesis of Cys-92 from the α -polypeptide of *Phaseolus vulgaris* glutamine synthetase reveals that this highly conserved residue is not essential for enzyme activity but it is involved in thermal stability. *Plant Science* **154**, 189-197.
- CLONTECHniques Technical Bulletin** (1996) Cap Finder PCR cDNA Synthesis Kit (January 1996). *CLONTECHniques* **XI**(1), 2-4.
- Clouse, S.D.** (1996) Molecular genetic studies confirm the role of brassinosteroids in plant growth and development. *Plant J.* **10**, 1-8.
- Collins-Racie, L.A., McColgan, J.M., Grant, K.L., DiBlasio-Smith, E.A.A., McCoy, J.M., LaVallie, E.R.** (1995) Production of recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in *Escherichia coli* using the novel secretory fusion partner DsbA. *Bio/Technology* **13**, 982-987.
- Cosgrove, D.J.** (1994) in *Photomorphogenesis in Plants*. 2nd Ed., pp. 631-658, Kendrick, R.E. & Kronenberg, G.H.M. (eds.), Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- Cosgrove, D.J., Durachko, D.M.** (1994) Autolysis and extension of isolated walls from growing cucumber hypocotyls. *J. Exp. Bot.* **45**, 1711-1719.
- Cosgrove, D.J., Li, Z.-C.,** (1993) Role of expansin in developmental and light control of growth and wall extension in oat coleoptiles. *Plant Physiol.* **103**, 1321-1328.
- Cosgrove, D.J.** (1997) Relaxation in a high-stress environment: The molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *Plant Cell* **9**, 1031-1041.
- Cullimore, J.V., Lara, M., Lea, P.J., Mifflin, B.J.** (1983) Purification and properties of two forms of glutamine synthetase from the plant fraction of *Phaseolus* root nodules. *Planta* **157**, 245-253.
- Davies, P.J.** (1995) *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.
- Deng, W.P., Nickoloff, J.A.** (1992) Site directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. *Anal. Biochem.* **200**, 81-88.

6. Literaturverzeichnis

- Desnos, T., Orbovič, V., Bellini, C., Kronnenberger, J., Caboche, M., Traas, J., Höfte, H.** (1996) *Procuste1* mutants identify two distinct genetic pathways controlling hypocotyl cell elongation, respectively in dark- and light-grown *Arabidopsis* seedling. *Development* **122**, 683-693.
- Dubois, F., Brugière, N., Sangwan, R.S., Hirel, B.** (1996) Localization of tobacco cytosolic glutamine synthetase enzymes and the corresponding transcripts shows organ- and cell-specific patterns of protein synthesis and gene expression. *Plant Mol. Biol.* **31**, 803-817.
- Ebeling, H.-J.** (1996) Native Reindarstellung von p40, einem mit Streckungswachstum korrelierten Protein aus *Pisum sativum* L., Diplomarbeit, Universität Hannover.
- Ecker, J.R., Theologis, A.** (1994) Ethylene: a unique plant signalling molecule. In *Arabidopsis*, Meyerowitz, E.M., Somerville, C.R. (eds.), pp 485-521, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Edwards, J.W., Coruzzi, G.M.** (1989) Photorespiration and light act in concert to regulate the expression of the nuclear gene for chloroplast glutamine synthetase. *Plant Cell* **1**, 241-248.
- Edwards, J.W., Walker, E.L., Coruzzi, G.M.** (1990) Cell-specific expression in transgenic plants reveals nonoverlapping roles for chloroplast and cytosolic glutamine synthetase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **87**, 3459-3463.
- Eisenberg, D., Almasy, R.J., Janson, C.A., Chapman, M.S., Suh, S.W., Cascio, D., Smith, W.W.** (1987) Some evolutionary relationships of the primary biological catalysts glutamine synthetase and Rubisco. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol.* **52**, 483-490.
- Emini, E.A., Hughes, J., Perlow, D., Boger, J.** (1985) Induction of hepatitis A virus neutralizing antibody by a virus specific synthetic peptide. *J. Virology* **55**, 836-839.
- Esen, A.** (1978) A simple method for quantitative, semiquantitative and qualitative assay of protein. *Anal. Biochem.* **89**, 264-273.
- Estelle, M., Klee, H.J.** (1994) Auxin and cytokinin in *Arabidopsis*. In *Arabidopsis*, Meyerowitz, E.M., Somerville, C.R. (eds.), pp 555-578, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Finkelstein, R.R., Zeevaart, J.A.D.** (1994) Gibberellin and abscisic acid biosynthesis and response. In *Arabidopsis*, Meyerowitz, E.M., Somerville, C.R. (eds.), pp 523-553, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

6. Literaturverzeichnis

- Firnhaber, C.** (2000) Entwicklung und Etablierung einer nicht-radioaktiven Northern Blot Methode zur Analyse der Expression der Isovaleryl-CoA Dehydrogenase aus *Pisum sativum L.*, Diplomarbeit, Universität Hannover.
- Fletscher, R.A., Zalik, S.** (1964) Effect of light quality on growth and free indolacetic acid content in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.* **39**, 328-331.
- Foster, K.R., Morgan, P.W.** (1995) Genetic regulation of development in *Sorghum bicolor*. IX. The ma_3^R allele disrupts diurnal control of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiol.* **108**, 337-343.
- Fox, P.C., Siraganian, R.P.** (1986) Multiple reactivity of monoclonal antibody. *Hybridoma* **5**, 223-229
- Foyer, C. H., Galtier, N.** (1996) Source-Sink Interaction and Communication in Leaves. In : Photoassimilate Distribution in Plants and Crops, Source-Sink Relationship, Zamski, E. and Schaffer, A.A. (eds.), pp. 311-341, Marcel Dekker, Inc., New York• Basel• Hong Kong.
- Freemont, P.S., Dunbar, B., Fothergill-Gilmore, L.A.** (1988) The complete amino acid sequence of human skeletal-muscle fructose-bisphosphate aldolase. *Biochem. J.* **249**, 779-788.
- Fry, S.C., Smith, R.C., Renwich, K.F., Martin D.J., Hodge, S.K., Matthews, K.J.** (1992) Xyloglucan endotransglycosylase, aa new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochem J.* **282**, 821-828.
- Fullmer C.S.** (1984) Identification of cystein-containing peptides in protein digests by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **142**, 336-339.
- Furumoto, T., Hata, S., Izui, K.** (1999) cDNA cloning and characterization of maize phosphoenolpyruvate carboxykinase, a bundle sheath cell-specific enzyme. *Plant Mol. Biol.* **41**, 301-311.
- Gabriel, O., Gersten, D.M.** (1992) Staining for enzymatic activity after gel electrophoresis I. *Anal. Biochem.* **203**, 1-21
- Gefflaut, T., Blonski, C., Perie, J., Wilson, M.** (1995) Class I Aldolases : Substrate specificity, mechanism, inhibitors and structural aspects. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **63**, 301-340.
- Gendreau, A., Traas, J., Desnos, T., Gandjean, O., Caboche, M., Höfte, H.** (1997) Cellular Basis of Hypocotyl Growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **114**, 295-305.

6. Literaturverzeichnis

- Ghosh, S., Campbell, A.M.** (1986) Multispecific monoclonal antibodies. *Immunol. Today* 7(7 & 8), 217-222.
- Givan, C.V., Joy, K.W. and Kleczkowski, L.A.** (1988) A decade of photorespiratory nitrogen recycling. *Trends Biol. Sci.* **13**, 433-437.
- Green, P.B.** (1997) Expansin and morphology : a role for biophysics. *Trends Plant Sci* **2**, 365-366.
- Haake, V., Zrenner, R., Sonnewald, U., Stitt, M.** (1998) A moderate decrease of plastid aldolase activity inhibits photosynthesis, alters the levels of sugars and starch, and inhibits growth of potato plants. *Plant J.* **14**(2), 147-157.
- Harlow, E., Lane, D.** (1988) *Antibodies - A Laboratory manual*. Harlow, E., Lane, D. (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Hawes, C.** (1988) Subcellular localization of macro molecules using microscopy. In: *Plant molecular biology, a practical approach*. Shaw, C.H. (ed.), pp. 103-129. IRL Press, Oxford, Washington DC.
- Hayashi, T., Wong, Y.-S., Maclachlan, G.** (1984) Pea xyloglucan cellulose: II. Hydrolysis by pea endo-1,4- β -glucanases. *Plant Physiol.* **75**, 605-610.
- Heldt, H.W.** (1996) *Planzenbiochemie*, pp. 163-189. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Hidaka, S., Kadowaki, K., Tsutsumi, K., Ishikawa, K.** (1990) Nucleotide sequence of the rice cytoplasmic aldolase. *Nucleic Acid Research*, **18** (13), 3991.
- Hirel, B., Bouet, C., King, B., Layzell, B., Jacobs, F., Verman, D.P.S.** (1987) Glutamine synthetase genes are regulated by ammonia provided externally or by symbiotic nitrogen fixation. *EMBO J.* **6**, 1167-1171
- Hirel, B., Marsolier, M.C., Hoarau, A., Hoarau, J., Brangeon, J., Schafer, R., Verma, D.P.S.** (1992) Forcing expression of a soybean root glutamine synthetase gene in tobacco leaves induces a native gene encoding cytosolic enzyme. *Plant Mol. Biol.* **20**, 207-218.
- Holdsworth, M., Kurup, S., McKibbin, R** (1999) Molecular and genetic mechanisms regulating the transition from embryo development to germination. *Trends Plant Sci.* **4**, 275-280.
- Hopp, T.P., Woods, K.R.** (1981) Prediction of Antigenic Determinants from Amino Acid Sequences of Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 3824-3828.

6. Literaturverzeichnis

- Hua, Z.-C.** (1997) Renaturation and purification of recombinant tissue-type plasminogen activator expressed in *E. coli*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **41**, 815-820.
- Hua, Z.-C., Dong, C., Zhu, D.-X.** (1996) Renaturation of recombinant human pro-urokinase expressed in *Escheichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **220**, 131-136.
- Iino, M.** (1982) Action of red light on indol-3-acetic-acid status and growth in coleoptiles of etiolated maize seedlings. *Planta* **156**, 21-32.
- Ikemura, T.** (1985) Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organism. *Mol. Biol. Evol.* **2** (1), 13-34.
- Jameson, B.A., Wolf, H.** (1988) The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Comput. Appl. Biosci. (CABIOS)* **4** (1), 181-186.
- Jensen, P.J., Hangarter, R.P., Estelle, M.** (1998) Auxin transport is required for hypocotyl elongation in light-grown but not dark-grown *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **116**, 455-462.
- Jones, A.M., Cochran, D.S., Lamerson, P.M., Evans, M.L., Cohen, J.D.** (1991) I. changes in the abundance of indolacetic acid and 22-kilodalton auxin-binding protein in the maize mesocotyl. *Plant Physiol.* **97**, 352-358.
- Kagaya, Y., Nakamura, H. Hidaka, S. Ejiri, S. Tsutsumi, K.** (1995) The promotor for the rice nuclear gene encoding chloroplast aldolase confers mesophyll-specific and light-regulated expression in transgenic tobacco. *Mol. Gen. Genet.* **248**, 668-674.
- Kamachi, K., Yamaya, T., Hayakawa, T., Mae, T., Ojima, K.** (1992) Changes in cytosolic glutamine synthetase polypeptide and its mRNA in a leaf blade of rice plant during natural senescence. *Plant Physiol.* **98**, 1323-1329.
- Kathiresan, A., Reid, D.M., Chinnappa, C.C.** (1996) Light- and temperature-entrained circadian regulation of activity and mRNA accumulation of l-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase in *Stellaria longipes*. *Planta* **199**, 329-335.
- Kayaga, Y., Nakamura, H., Hiaka, S., Ejiri, S., Tsutsumi, K.** (1995) The promotor from the rice nuclear gene encoding chloroplast aldolase confers mesophyll-specific and light-regulated expression in transgenic tobacco. *Mol. Gen. Genet.* **248**, 668-674.
- Karplus, P.A., Schulz, G.E.** (1985) Prediction of Chain Flexibility in Proteins, *Naturwissenschaften* **72**, 212-213.

6. Literaturverzeichnis

- Kelley, P.M., Tolan, D.R.** (1986) The complete amino acid sequence for the anaerobically induced aldolase from maize derived from cDNA clones. *Plant Physiol.* **82**, 1076-1080.
- Koornneef, M., Karssen, C.M.** (1994) Seed dormancy and germination. In *Arabidopsis*, Meyerowitz, E.M., Somerville, C.R. (eds.), pp 313-334, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Kornberg, H. L.& Beevers, H.** (1957) A mechanism of conversion of fat to carbohydrate in castor beans. *Nature (London)* **180**, 35-36.
- Kraehenbühl, J. P., Racine, L., and Jamieson, J. S.** (1977) Immunocytochemical localization of secretory proteins in bovine pancreatic exocrine cells. *J. Cell Biol.* **72**, 406.
- Kraepiel, Y., Marrec, K., Sotta, B., Caboche, M., Miginiac, E.** (1995) In vitro morphogenic characteristics of phytochrome mutants in *Nicotiana plumbaginifolia* are modified and correlated to high indole-3-acetic acid levels. *Planta* **197**, 142-146.
- Kraepiel, Y., Miginiac, E.** (1997) Photomorphogenesis and phytohormones. *Plant Cell Environ.* **20**, 807-812.
- Kruger, N.J.** (1990) Carbohydrate synthesis and degradation. In : *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, pp. 59-76, Dennis, D.T. and Turpin, D.H. (eds.), Longman Publishers Ltd., Singapore.
- Krüger, I., Schnarrenberger, C.** (1983) Purification, subunit structure and immunological comparison of fructose-bisphosphate aldolases from spinach and corn leaves. *Eur. J. Biochem.* **136**, 101-106.
- Krüger, I., Schnarrenberger, C.** (1985) Development of cytosol and chloroplast aldolases during germination of spinach seeds. *Planta* **164**, 109-134.
- Kyte, J., Doolittle, R.F.** (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.
- Lam, H.-M., Koschigano, K.T., Oliveira, I.C., Melo-Oliveira, R., Coruzzi, G.M.** (1996) The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 569-593.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- La Vallie, E. R., Di Blasio, E. A., Kovacic, S., Grant, K. L., Schendel, P.F., McCoy, J.M.** (1993) *Bio/Technology* **11**, 187-193

6. Literaturverzeichnis

- Lane, D., Kaprowski, H.** (1982) Molecular recognition and the future of monoclonal antibodies. *Nature (London)* **296**, 200.
- Lea, P.J., Joy, K.W.** (1983) Amino acid interconversion in germinating seeds. In *Recent Advances in Phytochemistry : Mobilization of Reserves in Germination*, pp. 77-109. Nozzolillo, C., Lea, P.J. and Loewus, F.A. (eds.), Plenum Press, New York.
- Lea, P.J., Miflin, B.J.** (1980a) Ammonia assimilation. In: Miflin, B.J. (ed.) *The biochemistry of plants* Vol. **5**, pp 169 - 202. Academic Press, San Diego.
- Lea, P.J. and Miflin, B.J.** (1980b) Transport and metabolism of asparagine and other nitrogen compounds within the plant. In : *The Biochemistry of plants*, Vol. **5**, pp. 569-607. Miflin, B.J. (ed.). Academic Press, San Diego.
- Lea, P.J., Robinson, S.A. , Stewart, G.R.** (1990) The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate and asparagine. In *The Biochemistry of Plant* Vol. **16**, pp. 121-159. Miflin, B.J., Lea, P.J. (eds.). Academic Press, San Diego.
- Lebherz, H.G., Leadbetter, M.M., Bradshaw, R.A.** (1984) Isolation and characterization of cytosolic and chloroplastic forms of spinach leaf fructose diphosphat aldolase. *J. Biol. Chem.* **259**, 1011-1017.
- Lee, C., Levin, A., Branton, D.** (1987) Copper staining: a five-minute protein stain for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **166**, 308-312.
- Lehmann, H., Kunz, U.** (2000) Kursus Ultrastruktur der Zelle, 2. überarbeitete Auflage, Institut für Zellbiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover.
- Li, J. Nagpal, P. Vitart, V. McMorris, T.C., Chory, J.** (1996) A role for brassinosteroids in the light dependent development of *Arabidopsis*. *Science* **272**, 398-401.
- Lilie, H. Schwarz, E., Rudolph, R.** (1998) Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr Opin Biotechnol.* **9** (5), 497-501.
- Listrom, C. D., Morizono, H., Rajagopal, B. S., McCann, M.T., Tuchman, M., Allewell, N.M.** (1997) Expression, purification, and characterization of recombinant human glutamine synthetase. *Biochem. J.* **328**, 159 - 163.
- Marsh, J.J., Lebherz, H.G.** (1992) Fructose-bisphosphate aldolases: an evolutionary history. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 110-113.
- Marsh, J.J., Wilson, K.J., Lebherz, H.G.** (1989) Structural Similarities between Spinach Chloroplast and Cytosolic Class I Fructose 1,6-Bisphosphat Aldolases. *Plant Physiol.* **91**, 1393-1401.

6. Literaturverzeichnis

- Marsolier, M.-C., Carrayol, E., Hirel, B.** (1993) Multiple functions of promoter sequences involved in organ-specific expression and ammonia regulation of a cytosolic glutamine synthetase gene in transgenic *Lotus corniculatus*. *Plant J.* **3** (3), 405-414.
- Marttila, S., Saarelainen, R., Porali, I., Mikkonen, A.** (1993) Glutamine synthetase isoenzyme in germinating barley seeds. *Physiol. Plant.* **88**, 612-618.
- Mathis, R., Gamas, P., Meyer, Y., Cullimore, J.V.** (2000) The Presence of GSI-Like Genes in Higher Plants : Support for the Paralogous Evolution of GSI and GSII Genes. *J. Mol. Evol.* **50**, 116-122.
- McNally, S.F., Hirel, B.** (1983) Glutamine synthetase isoforms in higher plants. *Physiol. Vég.* **21**, 761-774.
- McQueen-Mason, S., Cosgrove, D.J.** (1994) Disruption of hydrogen bonding between wall polymers by proteins that induce plant wall extension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 6574-6578.
- McQueen-Mason, S., Durachko, D.M., Cosgrove, D.J.** (1992) Two endogenous proteins that induce cell wall expansion in plants. *Plant Cell* **4**, 1425-1433.
- McQueen-Mason, S., Fry, S.C., Durachko, D.M., Cosgrove, D.J.** (1993) The relationship between xyloglucan endotransglycosylase and in vitro cell wall extension in cucumber hypocotyls. *Planta* **190**, 327-331.
- Meister, A.** (1974) in *The Enzymes, 3rd edn.*, Vol **10** (Boyer, P.D., ed) pp.699-754, Academic Press, New York
- Michaelis, R., Gepstein, S.** (2000) Identification and characterization of a heat-induced isoform of aldolase in oat chloroplast. *Plant Mol. Biol.* **44**, 487-498.
- Miernyk, J.A.** (1990) Glycolysis, the oxidative pentose phosphate pathway and anaerobic respiration. In : *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, pp.106-123. Dennis, D.T. and Turpin, D.H. (eds.), Longman Publishers Ltd., Singapore.
- Mifflin, B.J., Lea, P.J.** (1976) The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry* **15**, 873-885.
- Mifflin, B.J., Lea, P.J.** (1977) Amino acid metabolism. *Annu Rev Plant Physiol.* **28**, 299-329.
- Mitsuhashi, W., Koshiha, T., Minamikawa, T.** (1986) Separation and characterization of two endopeptidases from cotyledons of germinating *Vigna mungo* seeds. *Plant Physiol.* **80**, 628- 634.

6. Literaturverzeichnis

- Monerri, C., Garcia-Luis, A., Guardiola, J.L.** (1986) Sugar and starch changes in pea (*Pisum sativum* cultivar Progress) cotyledons during germination. *Physiol. Plant.* **67** (1), 49-54.
- Morgenstern, B.** (1999) DIALIGN 2 : improvement of the segment-to-segment approach to multiple sequence alignment. *Bioinformatics* **15** (3), 211-218.
- Moorhead, G.B.G., Plaxton, W.C.** (1990) Purification and characterization of cytosolic aldolase from carrot storage root. *Biochem. J.* **269**, 133-139.
- Mukhopadhyay, A.** (1997) Inclusion bodies of proteins in biologically active form. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **56**, 61-109.
- Nakamura, H., Satoh, W., Hikada, S., Kagaya Y., Ejiri, S., Tsutsumi, K.** (1996) Genomic structure of the rice aldolase isoenzyme C-1 gene and its regulation through a Ca²⁺-mediated protein kinase-phosphatase pathway. *Plant Mol. Biol.* **30** (2), 381-385.
- Nakamura, H., Tokairin, Y., Tamayama, S., Kon, S., Hidaka, S., Ejiri, S., Tsutsumi, K.** (1997) Cell type- and positionally specific regulation of the aldolase P gene expression in rice seedlings. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 256-262.
- Nielson, S.S., Liene, I.E.** (1984) Degradation of the major storage protein of *Phaseolus vulgaris* during germination. *Plant Physiol.* **74**, 494-498
- Nishimura, M., Beevers, H.** (1981) *Plant Physiol.* **67**, 1255-1258.
- Oaks, A. and Hirel, B.** (1985) Nitrogen metabolism in roots. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**, 345-365.
- Palfreyman, J.W.** (1993) Protein and Peptides. In *Methods of Immunological Analysis* **2**. Masseyeff, R.F. *et al.* (eds.) pp. 69-80, VCH Verlag-GmbH, Weinheim.
- Parker, J.M.R., Guo, D., Hodges, R.S.** (1986) New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray derived accessible sites. *Biochemistry* **25**, 5425-5432.
- Patnaik, S. K., Blumenfeld, O. O.** (2001) Use of On-Line Tools and Databases for Routine Sequence Analyses. *Anal. Biochem.* **289**, 1 - 9.
- Pearson, W.R, Lipman, D.J.** (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**(8), 2444-2448.

6. Literaturverzeichnis

- Pereira, S., Carvalho, H., Sunkel, C., Salema, R.** (1992) Immunocytolocalization of glutamine synthetase in mesophyll and phloem of leaves of *Solanum tuberosum* L. *Protoplasma* **167**, 66-73.
- Peng, J., Harbed, N.P.** (1997) Gibberellin deficiency and response mutations suppress the stem elongation phenotype of phytochrome-deficient mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **113**, 1051-1058.
- Pelzer-Reith, B., Penger, A., Schnarrenberger, C.** (1993) Plant aldolase: cDNA and deduced amino-acid sequences of the chloroplast and cytosol enzyme from spinach. *Plant Mol. Biol.* **21**, 331-340.
- Pelzer-Reith, B. and Schnarrenberger, C.** (1995) Characterization of cDNA clones and expression of two cytosolic fructose-1,6-bisphosphate aldolase genes in pea (*Pisum sativum* L.), Unpublished.
- Pérez-García, A., Cánovas, F.M., Gallado, F., Hiel, B., de Vicente, A.** (1995) Differential expression of glutamine synthetase isoforms in tomato detached leaflets infected with *Pseudomonas syringae* pv. Tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**, 96-103.
- Pérez-García, A., de Vicente, A., Cantón, F.R., Cazorla, F.M., Codina, J.C., García-Gutiérrez, A., Cánovas, F.M.** (1998) Light-dependent changes of tomato glutamine synthetase in response to *Pseudomonas syringae* infection or phosphinotricin treatment. *Physiol. Plant* **103**, 377-384.
- Peterman, T.K., Goodman, H.M.** (1991) The glutamine synthetase gene family of *Arabidopsis thaliana*: light regulation and differential expression in leaves, roots and seeds. *Mol. Gen. Genet.* **230**, 145-154.
- Peters, J. H., Baumgarten, H.** (1990) Monoklonale Antikörper : Herstellung und Charakterisierung 2.Aufl., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Plaumann, M., Pelzer-Reith, B., Matin, W.F., Schnarrenberger, C.** (1977) Multiple recruitment of class-I aldolases to chloroplast and eubacterial origin of eukaryotic class-II aldolases revealed by cDNAs from *Euglena gracilis*. *Curr. Genet.* **31**, 430-438.
- Plaxton, W.C.** (1996) The Organization and Regulation of Plant Glycolysis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 185-214.
- Porter, R. R.** (1973) Structural studies of Immunoglobulins. *Science* **180**, 713-716.
- Pouille, M., Jones, B.L.** (1988) A proteinase from germinating barley, I. Purification and some physical properties of a 30 kD cystein endoproteinase from green malt. *Plant Physiol.* **88**, 1454-1460.

6. Literaturverzeichnis

- Qamuruddin, M., Tillberg, E.** (1989) Rapid effects of the red light on the isopentyladenosine content in Scots pine seeds. *Plant Physiol.* **91**, 5-8.
- Quail, P.H., Boylan, M.T., Parks, B.M., Short, T.W., Xu, Y., Wagner, D.** (1995) Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. *Science* **268**, 675-680
- Quick, W. P., Schaffer, A. A.** (1996) Sucrose Metabolism in Sinks and Sources. In: *Photoassimilate Distribution in Plants and Crops, Source-Sink Relationship*. pp. 115-157. Zamski, E. and Schaffer, A.A. (eds.), Marcel Dekker, Inc., New York• Basel• Hong Kong.
- Rayle, D.L., Cleland, R.E.** (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol.* **99**, 1271-1274.
- Razdan, K., Heinrikson, R.L., Zurcher-Neely, H., Morris, P.W., Anderson, L.E.** (1992) Chloroplast and cytoplasmic enzyme : Isolation and sequencing of cDNAs coding for two distinct pea chloroplast aldolases. *Arch. Biochem. Biophys.* **298**, 192-197.
- Reid, B.R., Howell, S.H.** (1995) The functioning of hormones in plant growth and development. In *Plant Hormones; Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, pp. 448-485. Davies, P.J. (ed.), Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.
- Reinhardt, D., Wittwer, F., Mandel, T., Kuhlermeier, C.** (1998) Localized upregulation of a new expansin gene predicts the site of leaf formation in the tomato meristem. *Plant Cell* **10**, 1427-1437.
- Reinard, T.** (1992) Charakterisierung und Isolierung löslicher Auxin-bindender Proteine und eines mit Streckungswachstum korrelierten Zellwandproteins. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Reinard, T., Jacobsen, H.-J.** (1995) A soluble high affinity auxin-binding protein from pea apex. *J. Plant Physiol.* **147**, 132-138.
- Reinard, T., Janke, V., Willard, J., Buck, F., Jacobsen, H.-J. and Vockley, J.** (2000) Cloning of a gene for an acyl-CoA dehydrogenase from *Pisum sativum* L. and purification and characterization of its product as an isovaleryl-CoA dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **275** (43), 33738 - 33743.
- Reinard, T., Sprunck, S., Altherr, S., Jacobsen, H.J.** (1994) Biochemical properties of a novel cell wall protein associated with elongation growth in higher plants. *J. Exp. Bot.* **45**, 1593-1601.

6. Literaturverzeichnis

- Reynold, E.S.** (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**, 208.
- Roberts, K.** (1994) The plant extracellular matrix in a new expansive mood. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **6**, 688-694.
- Rose, J.K.C., Lee, H.H., Bennett, A.B.** (1997) Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5955-5960.
- Rosidi, B.** (1994) Herstellung eines rekombinanten Antikörpers aus der Hybridomazelllinie TIM-11B2, Diplomarbeit, Universität Hannover.
- Ross, J.J., Willis, C.L., Gaskin, P., Reid, J.B.** (1992) Shoot elongation in *Lathyrus elongatus* L.: gibberellin levels in light and dark-grown tall and dwarf seedlings. *Planta* **187**, 10-13.
- Rüger, B., Thalhammer, J., Obermeier, I., Grünewald-Janho, S.** (1997) Experimental procedure for detection of a rare human mRNA with the DIG system. *Front. Biosci.* **2**, c1-5; s.a. *Biochemica* **3** (1996)
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schägger, H., Cramerr, W.A., von Jagow, G.** (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* **217**, 220-230.
- Schägger, H., von Jagow, G.** (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199**, 223-231.
- Schein, C.H.** (1990) Solubility as a function of protein structure and solvent components. *Bio/Technol* **8** (4), 308-317.
- Schnarrenberger, C.** (1987) Regulation and Structure of Isoenzymes of Sugar Phosphate Metabolism in Plants. In : *Isoenzymes : Current Topics in Biological and Medical Research*. Volume **16** : Agriculture, Physiology, and Medicine, pp. 223-240, Alan R. Liss, Inc., 41 East 11th Steet, New York, NY 10003.
- Schnarrenberger, C. and Krüger, I.** (1986) Distinction between Cytosol and Chloroplast Fructose-Bisphosphate Aldolases from Pea, Wheat, and Corn Leaves. *Plant Physiol.* **80**, 301-304.
- Schopfer, P., Bernnicke, A.** (1999) *Pflanzenphysiologie, Begründet von Mohr, H.*, 5. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, NY.

6. Literaturverzeichnis

- Scott, T.K., Brriggs, W.R.** (1963) Recovery of native and applied auxin from the dark-grown „Alaska“ pea seedling. *Am. J. Bot.* **50**, 652-657.
- Shutov, A.D., Vaintraub, I.A.** (1987) Degradation of storage proteins in germinating seeds. *Phytochemistry*, **26** (6), 1557-1566.
- Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F., Brensinsky, A** (1998) *Lehrbuch der Botanik/ begr. Von E. Strasburger*, 34. Aufl., Fischer Verl., Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm.
- Smalle, J., Haegman, M. Kurepa, J., van Montagu, M., van der Straeten, D.** (1997) Ethylene can stimulate *Arabidopsis* hypocotyl elongation in the light. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2756-2761
- Sprunck, S., Reinard, T., Altherr, S., Jacobsen, H.-J.** (1993) Immunological characterization of a cell wall protein correlated with elongation growth in higher plants. Joint Meeting German and Dutch Societies for Cell Biology, Münster, 28.3.-1.4.1993.
- Sprunck, S.** (1996) Ist das Protein p40 mit dem Streckungswachstum höherer Pflanzen korreliert ? Charakterisierung, Isolierung und funktionelle Analyse. Dissertation, Universität Hannover.
- Sung, S.-J.S., Xu, D.-P., Galloway, C.M., Black, C.C., Jr.** (1988) A reassessment of glycolysis and gluconeogenesis in higher plants. *Physiol. Plant.* **72**, 650-654.
- Stern, P.S.** (1991) Predicting antigenic sites on proteins. *Trends in Biotechnology* **9**, 163-169
- Stitt, M.** (1990) The flux of carbon between the chloroplast and cytoplasm. In : *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, pp 309-326, Dennis, D.T. and Turpin, D.H. (eds.), Longman Publishers Ltd., Singapore.
- Swain, R.R., Dekker, E.E.** (1966) Seed germination studies, I. Purification and properties of an α -amylase from the cotyledons of germinating peas. *Biochim. Biophys. Acta.* **122**, 75-86.
- Swords, K. M. M., Staehelin, L.A.** (1993) Complementary Immunolocalization Patterns of Cell Wall Hydroxyproline-Rich Glycoproteins Studied with the Use of Antibodies Directed against Different Carbohydrate Epitopes. *Plant Physiol.* **102**, 891-901.
- Szekeres, M., Németh, K., Koncz-Kálmán, Z., Mathur, J., Kauschmann, A., Altmann, T., Rédei, G.P., Nagy, F. Schell, J., Koncz, C.** (1996) Bassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome p450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis*. *Cell* **85**, 171-182.

6. Literaturverzeichnis

- Ta, T.-V., Takano, R., Kamei, K., Xu, X.-Y., Kariya, Y., Yoshida, K., Hara, S.** (1999) Fructose 1,6-Bisphosphate Aldolase Is a Heparin-Binding Protein. *J. Biochem.* **125**, 554-559.
- Tarr, G.E., Black, S.D., Fujita, V.S., Coon, M.J.** (1983) Complete amino acid sequence and predicted membrane topology of phenobarbital-induced cytochrome P-450 (isoenzyme 2) from rabbit liver microsomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 6552-6556.
- Taiz, L., Zeiger, E.** (1998) *Plant Physiology*, 2nd Edition, Sinauer Associates, Inc., Publisher, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Taylor, G., Hoare, M., Gray, D.R., Marston, F.A.O.** (1986) *Bio/Technol* **4**, 553-557.
- Temple, S.J., Vance, C.P., Gantt, J.S.** (1998) Glutamate synthase and nitrogen assimilation. *Trends in Plant Science* **3** (2), 51-56.
- Tillberg, E.** (1974) Levels of indol-3-yl-acetic acid and acid inhibitors in green and etiolated bean seedlings (*Phaseolus vulgaris*). *Physiol. Plant.* **31**, 106-111.
- Tingey, S.V., Walker, E.L., Couzzi, G.M.** (1987) Glutamine synthetase genes of pea encode distinct polypeptides which are differentially expressed in leaves, roots and nodules. *EMBO J.* **6**, 1-9.
- Tingey, S.V., Tsai, F.-Y., Edwards, J.W., Walker, E., and Coruzzi, G.M.** (1988) Chloroplast and Cytosolic Glutamine Synthetase Are Encoded by Homologous Nuclear Genes Which Are Differentially Expressed *in Vivo*. *J. Biol. Chem.* **263** (20), 9651-9657.
- Towbin, H., Stachelin, J., Gordon, J.** (1978) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 4350-4354.
- Tsutsumi, K., Kagaya, Y., Hidaka, S., Suzuki, J., Tokairin, Y., Hirai, T., Hu, D.L., Ishikawa, K., Ejiri, S.** (1994) Structural analysis of the chloroplastic and cytoplasmic aldolase-encoding genes implicated the occurrence of multiple loci in rice. *Gene* **141**, 215-220.
- van Regenmortel, M.H.V.** (1993) Factors Modulating Antigenicity in *Methods of Immunological Analysis*, **1**, pp.105-111. Masseyeff, R.F. *et al.* (eds.), VCH Verlag-GmbH, Weinheim.
- van Regenmortel, M.H.V.** (1996) Mapping Epitope Structure and Activity : From One-Dimensional Prediction to Four-Dimensional Description of Antigenic Specificity. *METHODS: A companion to Methods in Enzymology* **9**, 465-472.

6. Literaturverzeichnis

- von Arnim, A., Deng, X.W.** (1996) Light control of seedling development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 215-243.
- Wagner, M.** (1998) Molekularbiologische Untersuchungen zum Protein p40 sowie eines gegen ihn gerichteten rekombinanten Antikörpers, Diplomarbeit, Universität Hannover.
- Walker, E.L., Coruzzi, G.M.** (1989) Developmentally regulated expression of the gene family for cytosolic glutamine synthetase in *Pisum sativum*. *Plant Physiol.* **91**, 702-708
- Walker, E.L., Weeden, N.F., Taylor, C.B., Green, P., Coruzzi, G.M.** (1995) Molecular evolution of duplicate copies of genes encoding cytosolic glutamine synthetase in *Pisum sativum*. *Plant Mol. Biol.* **29**, 1111 - 1125.
- Watherwax S.C., Ong, M.S., Degenhardt, J. Bray, E.A., Tobin, E.M.** (1996) The interaction of light and abscisic acid in the regulation of plant gene expression. *Plant Physiol.* **111**, 363-370.
- Wilson, R.W.** (1988) Monoclonal Antibodies Exhibiting Polyspecific Reactivity: An Overview. *J. Clin. Immunoassay* **11**(1), 41 - 46

7. ANHANG

7.1. Homologievergleiche der DNA-Sequenzen der klonierten Gene
(nach W.R. Pearson & D.J. Lipman, 1988/ FASTA)

7.1.1. Plasmid pGS3A

```
>>EM_PL:PSGSR1 U28924 Pea mRNA for glutamine synthetase (1373 nt)
  initn: 1665 initl: 1665 opt: 1665 Z-score: 1532.3 bits: 293.9 E():
  2.6e-79
  100.000% identity (100.000% ungapped) in 333 nt overlap (1-333:21-353)
```

```

                                10      20      30      40
pGS3A_      AACCGCGTTCCTTTTCCTTCAAAGCTTTTCATTATCA
              ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PL: CTGTAGCTATCTTTCAACAAAACCGCGTTCCTTTTCCTTCAAAGCTTTTCATTATCA
          10      20      30      40      50      60

          50      60      70      80      90      100
pGS3A_ TTATGTCTTCACTTTTCAGATCTCATCAATTTTAATCTTTCAGATTCACAGAAAAGATTA
              ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PL: TTATGTCTTCACTTTTCAGATCTCATCAATTTTAATCTTTCAGATTCACAGAAAAGATTA
          70      80      90      100     110     120

          110     120     130     140     150     160
pGS3A_ TTGCTGAATACATATGGGTTGGTGGATCAGGCATAGACATTAGAAGCAAAGCCAGGACTC
              ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PL: TTGCTGAATACATATGGGTTGGTGGATCAGGCATAGACATTAGAAGCAAAGCCAGGACTC
          130     140     150     160     170     180

          170     180     190     200     210     220
pGS3A_ TTCCTGGACCAGTGAGTGACCCTGCAAAACTTCCTAAGTGGAAGTATGATGGGTCTAGCA
              ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PL: TTCCTGGACCAGTGAGTGACCCTGCAAAACTTCCTAAGTGGAAGTATGATGGGTCTAGCA
          190     200     210     220     230     240

          230     240     250     260     270     280
pGS3A_ CAAATCAAGCACCAGGAAAAGATAGTGAAGTTATTTTATATCCACAAGCTATTTTCAAGG
              ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PL: CAAATCAAGCACCAGGAAAAGATAGTGAAGTTATTTTATATCCACAAGCTATTTTCAAGG
          250     260     270     280     290     300

          290     300     310     320     330
pGS3A_ ACCCATTTCAGAAGAGGGAATAATATTCTTGTGATTTGTGATGTTTACACCCCA
              ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PL: ACCCATTTCAGAAGAGGGAATAATATTCTTGTGATTTGTGATGTTTACACCCAGCTGGAG
          310     320     330     340     350     360
```

7.1.2. Plasmid pGS1

>>EM_PL:PSGSCY1A **M20663** Pisum sativum glutamine synthet (1434 nt)rev-comp
 initn: 1673 initl: 1673 opt: 1673 Z-score: 1755.2 bits: 335.4
 E(): 3.9e-91
 99.118% identity (99.118% ungapped) in 340 nt overlap (376-37:929-1268)

```

pGS1_-                               370       360       350
                               TATGGAGAAGGCAACGAGCGCAGATTGACA
                               ::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PL: GGAAGAGGCTGCCCGAGCACATCTCCGCTTATGGAGAAGGCAACGAGCGCAGATTGACA
      900       910       920       930       940       950

pGS1_-          340       330       320       310       300       290
          GGGAAACACGAAACAGCTGACATTAATACCTTCTCATGGGGTGTGCAAACCGTGGCGCT
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PL: GGGAAACACGAAACAGCTGACATTAATACCTTCTCATGGGGTGTGCAAACCGAGGCGCT
      960       970       980       990       1000      1010

pGS1_-          280       270       260       250       240       230
          TCGGTTTCGGGTTGGAAGGGACACAGAGAAAGAAGGGAAGGGTTATTTTGGAGGACAGGAGG
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PL: TCGGTTTCGGGTTGGAAGGGACACAGAGAAAGAAGGGAAGGGTTATTTTGGAGGACAGGAGG
      1020      1030      1040      1050      1060      1070

pGS1_-          220       210       200       190       180       170
          CCAGCATCTAACATGGACCCATATGTTGTTACTTCCATGATTGCAGAGACTACCATCCTC
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PL: CCAGCATCTAACATGGACCCATACGTTGTTACTTCCATGATTGCAGAGACTACCATCCTC
      1080      1090      1100      1110      1120      1130

pGS1_-          160       150       140       130       120       110
          TTGAAACCATAAGCTACCACTTGTACCACAAAAAACTTATACTACATTGTATTGCAACCT
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PL: TTGAAACCATAAGCTACCACTTGTACCACAAAAAACTTATACTACATTGTATTGCAACCT
      1140      1150      1160      1170      1180      1190

pGS1_-          100       90       80       70       60       50
          TTGAGAGTCATTGTTGGTTCCTCGTTAGAGTTTGGTTCTTGGTTTTTCTAGGACATGGCT
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PL: TTGAGAGTCATTGTTGGTTCCTCGTTAGAGATTGGTTCTTGGTTTTTCTAGGACATGGCT
      1200      1210      1220      1230      1240      1250

pGS1_-          40       30       20       10
          TTGTGTTCTTAATCCCGCGGCCATGGCGCCGGGAGCATGCGACGT
          ::::::::::::::
EM_PL: TTGTGTTCTTGTATGGTTCACACGTTGTTTGTCTTTCTTGTCTTACTTATGTGTC
      1260      1270      1280      1290      1300      1310

```

7.1.3. Plasmid pcALD1

>>EM_PL:PSRNAF16B_x89828 P.sativum mRNA for fructose-1,(1207 nt)initn:
 2272 init1: 2272 opt: 2272 Z-score: 2116.2 bits: 402.2 E(): 8.7e-112
 99.563% identity (99.563% ungapped) in 458 nt overlap (1-458:34-491)

```

pcALD1                               10      20      30
                                CATGTCTGCCTTTGTTGGAAAGTATGCAGA
                                ::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PL: GTTTCCCGCCATACAATATCAATTTCAAAGCATGTCTGCCTTTGTTGGAAAGTATGCAGA
      10      20      30      40      50      60

pcALD1          40      50      60      70      80      90
TGAGCTTATCAAGAATGCCAAGTACATAGCTACTCCTGGCAAGGGTATCTTGGCGGCTGA
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PL: TGAGCTTATCAAGAATGCCAAGTACATAGCTACTCCTGGCAAGGGTATCTTGGCGGCTGA
      70      80      90      100     110     120

pcALD1          100     110     120     130     140     150
TGAGGGCACAGGGACCATTGGCAAGCGTTTAGCAAGCATCAACGTTGAGAACATCGAGGC
:::: :::::::::::::::::::::::::::::: ::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PL: TGAGAGCACAGGGACCATTGGCAAGCGTCTAGCAAGCATCAACGTTGAGAACATCGAGGC
      130     140     150     160     170     180

pcALD1          160     170     180     190     200     210
CAACCGTCAAGCTCTTCGCGAACTTCTTTTCACTTCTCCTAATGCACTCCAATACCTCTC
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PL: CAACCGTCAAGCTCTTCGCGAACTTCTTTTCACTTCTCCTAATGCACTCCAATACCTCTC
      190     200     210     220     230     240

pcALD1          220     230     240     250     260     270
TGGTGTTCATCTCTTCGAGGAAACTCTTTTACCAGAAGTCCTCAGAAGGGAAGCCTTTTGT
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PL: TGGTGTTCATCTCTTCGAGGAAACTCTTTTACCAGAAGTCCTCAGAAGGGAAGCCTTTTGT
      250     260     270     280     290     300

pcALD1          280     290     300     310     320     330
TGAAATTCTCCAAGAGAACAATGTCATACCCGGCATCAAAGTTGACAAGGGTGTGTTGA
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PL: TGAAATTCTCCAAGAGAACAATGTCATACCCGGCATCAAAGTTGACAAGGGTGTGTTGA
      310     320     330     340     350     360

pcALD1          340     350     360     370     380     390
ATTGGCTGGAACAGATGGTGAACAACAACAAGGCTTTGACTCTCTTGGAGCTAGATG
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PL: ATTGGCTGGAACAGATGGTGAACAACAACAAGGCTTTGACTCTCTTGGAGCTAGATG
      370     380     390     400     410     420

pcALD1          400     410     420     430     440     450
CCAGCAGTACTACAAGGCTGGAGCGCGCTTTGCCAAGTGGCGTGCAGTCCTCAAGATTGG
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PL: CCAGCAGTACTACAAGGCTGGAGCGCGCTTTGCCAAGTGGCGTGCAGTCCTCAAGATTGG
      430     440     450     460     470     480

```

7.1.4. Plasmid pcALD2

>>EM_PL:PSRNAF16A **x89829** P.sativum mRNA for fructose-1, (1362 nt)
 initn: 1551 initl: 935 opt: 1573 Z-score: 1612.9 bits: 308.8 E():
 8.4e-84
 98.784% identity (99.693% ungapped) in 329 nt overlap (1-326:48-376)

```

                                10      20      30
pcALD2                        TCATGTCGCACTTCAAGAGCAAGTACCATG
                                :
EM_PL: TCATTTCCAAAAACCCTCTTCTTCCTCGATCATGTCGCACTTCAAGAGCAAGTACCATG
      20      30      40      50      60      70

                                40      50      60      70      80      90
pcALD2 ATGAGCTTATTGCCAATGCTGCCTATATTGGCACACCCGGTAAGGGTATTCTTGCTGCTG
                                :
EM_PL: ATGAGCTTATTGCCAATGCTGCCTATATTGGCACACCCGGTAAGGGTATTCTTGCTGCTG
      80      90      100     110     120     130

                                100     110     120     130     140     150
pcALD2 ATGAGTCAACTGGAACAATCGGTAAGCGTCTGAGCAGCATCAATGTTGAGAATGTTGAAT
                                :
EM_PL: ATGAGTCAACTGGAACAATCGGTAAGCGTCTGAGCAGCATCAATGTTGAGAATGTTGAAT
      140     150     160     170     180     190

                                160     170     180     190     200
pcALD2 CCAACAGACAGGCTCTTCGTGAGCTTCTTTTCACTG-CTCCTGG-TGTT-CTTCAGTACC
                                :
EM_PL: CCAACAGACAGGCTCTTCGTGAGCTTCTTTTCACTGCCTCCTGGTTGTTTCTTCAGTACC
      200     210     220     230     240     250

                                210     220     230     240     250     260
pcALD2 TCAGTGGAGTTATCCTCTTTGAGGAAACCCTCTACCAAAAAACAGCTGCAGGCAAGCCTT
                                :
EM_PL: TCAGTGGAGTTATCCTCTTTGAGGAAACCCTCTACCAAAAAACAGCTGCAGGCAAGCCTT
      260     270     280     290     300     310

                                270     280     290     300     310     320
pcALD2 TCGTTGATGTTTTGAACGAAGCTGGTGTTCCTTCTGGTATCAAGGTTGACAAGGGTACC
      :
EM_PL: TTGTTGATGTTTTGAACGAAGCTGGTGTTCCTTCTGGTATCAAGGTTGACAAGGGTACCG
      320     330     340     350     360     370

```

Die unterstrichenen Sequenzbereiche stammen aus dem Vektor (pGemT).

7.2. Homologievergleich der Aminosäuresequenzen von cALD1, cALD2, GS3A, GS3B und GS1 (nach Morgenstern, 1999/ DIALIGN 2.1)

Options:

=====

- 1) proteine sequences aligned
- 2) 5 "*" characters for regions of maximum similarity

Alignment (DIALIGN format):

=====

```

CALD1      1  MSAFVVGKYAD ELIKNAKYIA TPGKGILAAD ESTGTIGKRL ASINVENIEA
CALD2      1  MSHFKSKYHD ELIANAAYIG TPGKGILAAD ESTGTIGKRL SSINVENVES
GS3A       1  MSSLSDL---  -----  -----  -----  --INFNLSDS
GS3B       1  MSSLSDL---  -----  -----  -----  --INFNLSDS
GS1        1  m-SLSDL---  -----  -----  -----  --INLDLSGT

```

```

*****
*****
*****
*****
*****

```

```

CALD1      51  NRQALRELLF Tspna-LQYL  SGVILFEETL YQKSSEGKPF VEILQENNVI
CALD2      51  NRQALRELLF TaswlfLQYL  SGVILFEETL YQKTAAGKPF VDVLINEAGVL
GS3A       16  TEKIIAEYIW -----  -----  -----VGGSG IDIRSKARTL
GS3B       16  TEKIIAEYIW -----  -----  -----VGGSG IDIRSKARTL
GS1        15  TEKIIAEYIW -----  -----  -----IGGSG LDLRCKARTL

```

```

***** *      *****
***** *      *****
*****      *****
*****      *****

```

```

CALD1      100  PGIKVDKGVV ELAGTDGETT TQGFDSLGAR -----
CALD2      101  PGIKVDKGTV ELAGTDGETT TQGLDGLGAR -----
GS3A       41  PGPVSDPAKL PKWNYDGSST NOAPGKDSEV ILYPQAIFKD PFRRGNNILV
GS3B       41  PGPVSDPAKL PKWNYDGSST DOAPGKDSEV ILYPQAIFKD PFRRGNNILV
GS1        40  PGPVTDPSSEL PKWNYDGSST GQAPGQDSEV ILYPQAIFKD PFRRGNHILV

```

```

*****
*****
*****
*****
*****

```

7. Anhang

CALD1	130	-CQQYYKAGA	RFAKWRAVLK	IGPNEPSELS	IQQNAQGLAR	YAIICQENGL
CALD2	131	-CRKYYEAGA	RFAKWRAVLK	IGANEPSEHS	IHENAYGLAR	YAVICQENGL
GS3A	91	ICDVYTPAGE	PLP-----	-----	-----	-----
GS3B	91	ICDVYTPAGE	PLP-----	-----	-----	-----
GS1	90	MCDAYSPAGE	PIP-----	-----	-----	-----

CALD1	179	VlfVEPEILT	DGSHDIKCA	AVTETVLAAC	YKALNDQHVL	LEGTLLKPNM
CALD2	180	VpivePEILV	DGSHDILKCA	AITERVLAAT	YKALSDHHVI	LEGTLLKPNM
GS3A	104	-----T	NKRYNAAKIF	SHPDVAAEVP	WYGIEQEYTL	LQKDINWPLG
GS3B	104	-----T	NKRYNAAKIF	SHPDVAAEVP	WYGIEQEYTL	LQKDINWPLG
GS1	103	-----T	NKRHAAAKVF	SHPDVVAEET	WYGIEQEYTL	LQKDINWPLG

* *****
* *****
* *****
* *****
* *****

CALD1	229	VTPGSD----				
CALD2	230	VTPGSD----				
GS3A	145	WPIGGYPGKQ				
GS3B	145	WPIGGYPGKQ				
GS1	144	WPAGGYPGPQ				

Unterstrichen und kursiv dargestellt sind die Bereiche des mutmaßlichen TIM-11B2-Epitops.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H.-J. Jacobsen danke ich für die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit, für seine langjährige Unterstützung und für die fachlichen Ratschläge und Anregungen.

Herrn Prof. Dr. W. Müller danke ich für die Übernahme des Referats und für seine Hilfe während meines Studiums in Hannover.

Herrn Dr. F. Buck vom Institut für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie des Universitäts-krankenhauses Eppendorf der Universität Hamburg danke ich für die Durchführung der Aminosäuresequenzierung. Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. J. Maeß vom Zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover für die Durchführung der Immunisierung. Für ihre Hilfe und die Möglichkeit der Durchführung der Elektronen-Mikroskopie bedanke ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. H. Lehman und Frau U. Kunz vom Institut für Zellbiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover.

Thomas Reinard danke ich besonders für die gute langjährige Zusammenarbeit und seine unermüdliche Hilfe.

Meinen Mitdoktoranden Viktoria Janke, Mark von Stackelberg und Michael Hust danke ich für ihre Interessen an meiner Arbeit, für die gute Zusammenarbeit und für die freundliche Laboratmosphäre. Mark danke ich speziell für das Durchlesen des Material- und-Methoden-Teils.

Allen Mitgliedern des Lehrgebiets Molekulargenetik gilt mein besonderer Dank für ihre Hilfsbereitschaft und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Last but not least danke ich meiner Mutter, meinen Geschwistern und deren Familien auf Java, die mich all die ganzen Jahre durch ihre Gebete und Liebe spirituell begleitet haben.

LEBENS LAUF

Name	Bustanur Rosidi
Geburtsdatum	09. Februar 1966
Geburtsort	Nganjuk, Ost-Java (Indonesien)
Staatsangehörigkeit	indonesisch
Familienstand	ledig
Werdegang :	
1973 -1979	Grundschule : SDN Sidorejo, Sawahan, Nganjuk
1979 -1982	Mittelschule : SMPN I Nganjuk
1982 - 1985	Oberschule : SMPP Nganjuk
Sept.1985 - April 1986	Deutschkurs beim Goethe Institut in Jakarta
September 1985 - März 1994	Stipendiat des indonesischen "Agency for Assesment and Application of Technology" im Rahmen des "Overseas Fellowship Programs " für ein Studium in Deutschland.
Mai 1986 - Januar 1987	Studienkolleg an der RWTH Aachen
April 1987	Biochemiestudium an der Universität Tübingen
Oktober 1991	Wechsel zur Universität Hannover bis Diplom im Herbst 1994
April 1994	Diplomprüfung in den Fächern : Biochemie, Organische Chemie und Allgemeine Genetik
Mai 1994 - Oktober 1994	Diplomarbeit am Lehrgebiet Molekulargenetik Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. H.-J. Jacobsen mit dem Thema: Herstellung eines rekombinanten Antikörpers aus der Hybridomazelllinie TIM-11B2.
Februar 1995 - Januar 1997	Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter an dem Projekt "NGF-Signaltransduktion in primären Neuronen" am Lehrstuhl für Molekulare Neurobiochemie der Ruhr-Universität Bochum
seit Februar 1997	Arbeiten zur vorliegenden Dissertation am Lehrgebiet Molekulargenetik Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. H.-J. Jacobsen.

Eidesstattliche Erklärung :

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ich versichere, dass sie noch nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, den 7. Juni 2001

Bustanur Rosidi