

**Molekularbiologische und biochemische Analyse  
der Lektine Horcolin und HL#2 und weiterer  
apoplastidärer Proteine von *Hordeum vulgare***

Vom Fachbereich Biologie der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation von

**Dipl.-Biol. Ingo Grunwald**

geboren am 11.03.1968 in Münster / Westfalen

**2002**

**1. Referent:**

Prof. Dr. K. R. Kloppstech (Institut für Botanik, Universität Hannover)

**2. Referent:**

Prof. Dr. W. Müller (Abteilung Biochemie, Medizinische Hochschule Hannover)

**3. Referent:**

Prof. Dr. H. Lörz (AMP II, Institut für Allgemeine Botanik und Botanischer Garten Hamburg, Universität Hamburg)

Tag der Promotion: 08.02.2002

## Zusammenfassung

Stichworte: Lektine, Apoplast, Hordeum vulgare

HL#2 und Horcolin sind zwei serologisch verwandte Proteine aus *Hordeum vulgare* (Gerste). Frühere Ergebnisse zeigten einen Zusammenhang von HL#2 und Lichtstress sowie eine Reaktion auf Jasmonatbehandlung. Restriktionsanalysen ließen einen Aufbau des HL#2-Gens aus zwei ungleich großen Exons erkennen, welche durch eine Intronsequenz getrennt sind.

Zur Klärung der Frage, ob das Protein Horcolin (vorherige Bezeichnung HL#2\*) möglicherweise von einem dieser beiden Exons kodiert wird, wurde dieses aufgereinigt und sequenziert. Es wurde gefunden, dass es sich beim Horcolin um ein säure- und hitzestabiles Protein mit basischem pI-Wert handelt. Durch die Verwendung von sauren Extraktionspuffern sowie mittels der Hydroxyapatit- und Anionenaustauscher-Chromatographie konnte das Protein bis zur Homogenität aufgereinigt werden.

Wie die Proteinsequenzierung zeigte, handelt es sich beim Horcolin um ein eigenständiges Gen bzw. Protein. Die Annahme der Kodierung durch das größere Exon von HL#2 für Horcolin erwies sich somit als nicht richtig. Die Daten der Sequenzierung sowie der Klonierung des Horcolin ergaben jedoch starke Sequenzhomologien zum HL#2 und erklären die Kreuzreaktion des Anti-HL#2-Antikörpers mit dem Horcolin. Beide Proteine gehören demnach zu einer Multigenfamilie.

Zur serologischen Unterscheidung beider Proteine konnte ein Peptidantikörper erhalten werden, der nur das HL#2 erkennt. Elektronenmikroskopische Aufnahmen belegen eine extrazelluläre Lokalisation von Horcolin und HL#2 im Apoplasten. Obwohl beide Proteine keine eindeutig identifizierende Signalsequenz für die Sekretion erkennen lassen, weisen die elektronenmikroskopischen Aufnahmen auf einen vesikulären Transport hin.

Anhand von gefundenen Sequenzhomologien zu Proteinen der Lektinfamilie, durch Funktionsuntersuchungen mit Lektinbindungs- und Hämagglutinations-Tests mit den nativen Proteinen und mit dem rekombinanten Horcolin konnte die Funktion beider Proteine als Lektin mit ausgewiesener Affinität zu Mannose- und Mannan-Zuckern nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Eigenschaften sowie der berechneten Homologien auf Ebene der Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur handelt es sich bei Horcolin und HL#2 um zwei neue Mitglieder der Familie der Jacalin-verwandten mannosebindenden Lektine. Diese Proteinfamilie weist eine 3D-Struktur auf, die als  $\beta$ -Prismafaltung bezeichnet wird und auch bei dem Protein VMO-I und dem  $\delta$ -Endotoxin CryIA aus *B. thuringiensis* vorkommt.

Bei einigen Mitgliedern dieser Lektinfamilie handelt es sich nach neueren Erkenntnissen um eine Multigenfamilie von stressinduzierten Lektinen. Deren Beteiligung an der Pathogenabwehr und an Signalweiterleitungsprozessen wird diskutiert.

Southernblot-Analysen ergeben für Horcolin ein Gen pro Genom, wie dies bereits für HL#2 gezeigt werden konnte. Northernblot-Analysen zeigen eine ausschließliche

Expression von Horcolin in den Koleoptilen, wobei diese in etiolierten Koleoptilen am stärksten ist.

Ausgehend von der apoplastidären Lokalisation von Horcolin und HL#2 wurde dieser extrazelluläre Bereich genauer analysiert. Dies geschah beispielhaft an der Guttationsflüssigkeit, da diese den apoplastidären Raum durchströmt und ohne Schädigung der Pflanze gesammelt werden kann. Sie sollte alle nicht gebundenen Proteine des Apoplasten enthalten. Diese neuen Daten zeigen eine Zusammensetzung der Guttationsflüssigkeit aus ca. 250 überwiegend sauren Proteinen mit Molekulargewichten in den monomeren Formen zwischen 10 kDa bis 90 kDa. Mit Hilfe der ESI-MS konnten einige dieser Proteine identifiziert werden. Nahezu alle identifizierten Proteine gehören zur Gruppe der PR-Proteine (pathogenesis related proteins). Diese Zusammensetzung der Guttationsflüssigkeit deutet auf ein synergistisches Zusammenspiel von Chitinasen, Glucanasen und Thaumatin-ähnlichen Proteinen bei der prophylaktischen Pathogenabwehr hin.

## Abstract

Keywords: lectins, apoplast, Hordeum vulgare

HL#2 and Horcolin are two immunological related proteins of *Hordeum vulgare* (barley). Earlier experiments had unravelled a relation between HL#2 and light-stress as well as a reaction (response) to treatment with Jasmonate. Restriction analyses of DNA were in favour of the composition of HL#2 by two exons of different sizes. To test the possibility whether Horcolin could derive from one of these exons by alternate splicing this protein was purified and sequenced. During this procedure it was found that Horcolin is resistant against low pH and high temperature and has a basic pI. The protein was purified to homogeneity.

Sequencing yielded the result that Horcolin is a protein of its own, thus the assumption of dual splicing was disproved. Nevertheless, the proteins are highly related in their sequences, this finding explains the cross reactivity with the antibody against the recombinant HL#2 but is also in accordance with the assumption that both proteins belong to a multigene family.

In order to be able to discriminate the two proteins an antibody against the amino terminal sequence was obtained that recognizes specifically the HL#2 but not Horcolin and thus allows to discriminate between the proteins. With the help of immune electron microscopy both proteins could be detected within the cell wall. Even though it was not possible to recognize an external- or internal-transit peptide evidence for vesicular transport was obtained. Both proteins function as lectins. This was shown with the aid of homology search, by functional assays for Lectins and by hemagglutination tests using native and recombinant Horcolin. The affinity was highest to mannose and mannans. Based on these properties as well as by use of calculated homologies in primary, secondary and tertiary structures Horcolin and HL#2 are recognized as new members of the Jacalin related Mannose-binding lectins. This protein family owns a tertiary structure that is known as  $\beta$ -prism-folding. These structures have also been found in VMO-I proteins as well as in the  $\delta$ -Endotoxin CryIA from *B. thuringiensis*. Some members of this multigene family have recently been classified as stress-induced lectins. They have been discussed to participate in defence against pathogens and in signal transduction processes. Southern blot analyses resulted in the finding that Horcolin is represented by a single gene per haploid genome. By Northern analysis it was found that Horcolin is specifically expressed in the coleoptiles and the highest transcript levels have been found in the coleoptiles of etiolated plants.

Starting from the extracellular localisation of Horcolin and HL#2 this compartment was studied in more detail. For this purpose we used the guttation fluid since this fluid passes through the apoplast and can be collected without any disturbance (violation) of the plants. This fluid should contain all non-bound proteins of the apoplast. The data demonstrated a composition of the guttation fluid by approximately 250, predominantly acid proteins of molecular masses between 10 kDa and 90 kDa. By means of ESI-MS

several of these proteins have been identified, almost all of them belong to the group of PR (pathogenesis related) proteins. This composition of the guttation fluid suggests a concerted action of chitinases, glucanases, and thaumatin-like proteins during a prophylactic defence against the pathogens.

„Alles, was ein Mensch glaubt, lässt sich auf drei Kategorien zurückführen. Erstens Dinge, die durch Denkprozesse bewiesen werden können, wie Mathematik oder Geometrie; zweitens Dinge, von deren Existenz unsere fünf Sinne uns überzeugen können; drittens Dinge, die der Tradition nach durch Propheten und weise Männer bekannt sind. Nur ein Narr würde über diese Kategorien hinaus irgend etwas glauben“

Ein Zitat vom Philosophen Mose ben Mainon, aus „Das geheime Buch der Grazia dei Rossie“ von Jacqueline Park.

---

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1. ABIOTISCHE UND BIOTISCHE STRESSFAKTOREN	1
1.2. HL#2 UND HORCOLIN	2
1.3. LEKTINE DER PFLANZEN	3
1.4. PR-PROTEINE	6
1.5. APOPLAST UND GUTTATION	8
1.6. FRAGESTELLUNGEN	11
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>13</b>
2.1. VERWENDETES MATERIAL UND REAGENZIEN	13
2.2. PFLANZENANZUCHT UND BELICHTUNGSBEDINGUNGEN	14
2.3. PROTEINCHEMISCHE METHODEN	15
2.3.1. EXTRAKTION UND PRÄZIPITATION VON PROTEINEN	15
2.3.2. BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION	16
2.3.3. KONZENTRATION UND UMPUFFERUNG	17
2.3.4. REINIGUNG DES HORCOLIN	18
2.3.4.1. HYDROXYAPATIT-CHROMATOGRAPHIE	18
2.3.4.2. ANIONENAUSTAUSCHER-CHROMATOGRAPHIE	18
2.3.5. SDS-GELELEKTROPHORESE	19
2.3.6. COOMASSIE- UND SILBERFÄRBUNG	21
2.3.7. WESTERN BLOTTING	22
2.3.8. IMMUNFÄRBUNG	23
2.3.9. ENZYMATISCHE PROTEINSPALTUNG	24
2.3.10. AUFTRENNUNG UND SEQUENZIERUNG DER PEPTIDE	24
2.3.11. 2D-GELELEKTROPHORESE	25
2.3.12. DOKUMENTATION	26
2.4. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	27
2.4.1. ISOLIERUNG VON RNA	27
2.4.2. ISOLIERUNG VON DNA	28
2.4.3. SYNTHESE VON CDNA	29
2.4.4. POLYMERASEKETTENREAKTION	30
2.4.5. RESTRIKTIONSVERDAU VON DNA	31
2.4.6. AGAROSEGEL- ELEKTROPHORESE	32
2.4.7. EXTRAKTION VON DNA AUS AGAROSEGELEN	32
2.4.8. HERSTELLUNG KOMPETENTER E. COLI ZELLEN	32



2.4.9.	LIGATION UND PRÄZIPITATION VON DNA	33
2.4.10.	TRANSFORMATION VON BAKTERIEN	33
2.4.11.	KULTUR VON BAKTERIEN	34
2.4.12.	PLASMIDPRÄPARATIONEN	35
2.4.13.	SOUTHERNBLOT-ANALYSE	35
2.4.14.	RADIOAKTIVE DNA-MARKIERUNG	36
2.4.15.	NORTHERNBLOT-ANALYSE	37
2.4.16.	HERSTELLUNG VON REKOMBINANTEM HORCOLIN	37
<b>2.5.</b>	<b>FUNKTIONSBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN</b>	<b>39</b>
2.5.1.	LEKTINBINDUNGS-TEST	39
2.5.2.	HÄMAGGLUTINATIONS-TEST	40
<b>2.6.</b>	<b>EM-LOKALISATION VON HORCOLIN UND HL#2</b>	<b>40</b>
<b>2.7.</b>	<b>METHODEN DER BIOINFORMATIK</b>	<b>40</b>
<b>2.8.</b>	<b>ANALYSE DER GUTTATIONSFLÜSSIGKEIT</b>	<b>41</b>
2.8.1.	PFLANZENANZUCHT UND ERNTE	41
2.8.2.	MASSENSPEKTROSKOPISCHE ANALYSE	43
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>45</b>
<hr/>		
<b>3.1.</b>	<b>ISOLIERUNG UND AUFREINIGUNG VON HORCOLIN AUS GERSTEN-KOLEOPTILEN</b>	<b>45</b>
3.1.1.	SAURE EXTRAKTION VON HORCOLIN	46
3.1.2.	KONZENTRATION / UMPUFFERUNG DES GEWONNENEN ROHEXTRAKTES	47
3.1.3.	HYDROXYAPATIT-CHROMATOGRAPHIE	47
3.1.4.	ANIONENAUSTAUSCHER-CHROMATOGRAPHIE	48
3.1.5.	TRIS-TRICIN-PAGE	50
3.1.6.	WESTERN MIT DUNN-CARBONAT-SYSTEM	51
3.1.7.	LYSC-VERDAU UND AUFTRENNUNG DER PEPTIDE SOWIE SEQUENZIERUNG DER HPLC-FRAKTIONEN	52
<b>3.2.</b>	<b>KLONIERUNG DER NUKLEOTIDSEQUENZ VON HORCOLIN</b>	<b>53</b>
3.2.1.	PRIMER-DESIGN	54
3.2.2.	RT-PCR UND KLONIERUNG VON HORCOLIN	54
3.2.3.	KLONIERUNG WEITERER SEQUENZEN	57
3.2.4.	SEQUENZIERUNG DER KLONE	59
3.2.4.1.	HORCOLIN	59
3.2.4.2.	KLONE 5A-5, 5A-6, 4A-30, 4B-9, 4B-10	60
<b>3.3.</b>	<b>REKOMBINANTES HORCOLIN</b>	<b>63</b>
3.3.1.	ENTWURF DES KONSTRUKTES	63
3.3.2.	UMKLONIERUNG IN DEN PQE-30 EXPRESSIONSVEKTOR	65
3.3.3.	ÜBEREXPRESSION IN E. COLI	68

3.3.4.	AUFREINIGUNG ÜBER AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE	71
3.3.4.1.	AUFSCHLUSS DER ZELLEN UND PROTEINEXTRAKTION	71
3.3.4.2.	NI-AGAROSE	71
3.3.4.3.	MANNOSE-AGAROSE	72
<b>3.4.</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG VON HORCOLIN AUF NUKLEOTIDEBENE</b>	<b>74</b>
3.4.1.	SOUTHERNBLOT-ANALYSE	74
3.4.2.	NORTHERNBLOT-ANALYSE	75
<b>3.5.</b>	<b>PEPTID-ANTIKÖRPER GEGEN N-TERMINUS VON HL#2</b>	<b>75</b>
<b>3.6.</b>	<b>FUNKTIONSUNTERSUCHUNGEN</b>	<b>76</b>
3.6.1.	LEKTINBINDUNGS-TEST	76
3.6.1.1.	NATIVES HORCOLIN UND HL#2	77
3.6.1.2.	REKOMBINANTES HORCOLIN	78
3.6.2.	HÄMAGGLUTINATIONS-TEST	79
<b>3.7.</b>	<b>METHODEN DER BIOINFORMATIK</b>	<b>80</b>
3.7.1.	DATENBANKRECHERCHEN	81
3.7.2.	SEQUENZVERGLEICHE VON HORCOLIN, HL#2 UND VERWANDTEN PROTEINEN	82
3.7.3.	PHYLOGENETISCHER STAMMBAUM	83
3.7.4.	2D-STRUKTUR VON HORCOLIN, HL#2 UND VERWANDTEN PROTEINEN	84
3.7.5.	MODELLIERTE 3D-STRUKTUR VON HORCOLIN, HL#2 UND VERWANDTEN PROTEINEN	85
3.7.6.	UNTERSUCHUNG MÖGLICHER MODIFIKATIONS- UND LOKALISATIONSSEQUENZEN	86
<b>3.8.</b>	<b>NACHWEIS UND LOKALISATION VON HORCOLIN UND HL#2</b>	<b>87</b>
3.8.1.	NACHWEIS IM BEREICH DER GEWEBE UND ORGANE DER GERSTE	87
3.8.2.	NACHWEIS AUF ZELLULÄRENER EBENE	89
3.8.3.	NACHWEIS IN VERWANDTEN GRÄSERN	93
<b>3.9.</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG VON HORCOLIN UND HL#2 MIT HILFE DER 2D-GELELEKTROPHORESE</b>	<b>93</b>
<b>3.10.</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG VON PROTEINEN IN DER GUTTATIONSFLÜSSIGKEIT</b>	<b>94</b>
3.10.1.	ANZUCHTBEDINGUNGEN UND ERNTE DER GUTTATIONSTROPFEN	95
3.10.2.	ÜBERPRÜFUNG DER GUTTATIONSFLÜSSIGKEIT AUF MIKROBIELLE KONTAMINATIONEN	97
3.10.3.	AUFTRENNUNG MIT HILFE DER 1D- UND 2D-GELELEKTROPHORESE	98
3.10.4.	IDENTIFIZIERUNG VON GUTTATIONSPROTEINEN MIT HILFE DER ESI-MS	102

---

3.10.5.	NACHWEIS VON PR-PROTEINEN DURCH SPEZIFISCHE ANTIKÖRPER	106
3.10.6.	DNASE-, RNASE- UND PROTEIN K-VERDAU	107
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>109</b>
<hr/>		
4.1.	ISOLIERUNG UND AUFREINIGUNG VON HORCOLIN	111
4.2.	KLONIERUNG DER SEQUENZ UND REKOMBINANTES HORCOLIN	113
4.3.	FUNKTION UND LOKALISATION VON HORCOLIN	116
4.4.	CHARAKTERISIERUNG VON HORCOLIN	130
4.5.	APOPLAST UND GUTTATIONSFLÜSSIGKEIT	131
4.6.	FUNKTION VON HORCOLIN UND HL#2	140
<b>5.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>142</b>
<hr/>		
<b>6.</b>	<b>VERZEICHNISSE</b>	<b>155</b>
<hr/>		
6.1	ABKÜRZUNGEN	155
6.2.	ABBILDUNGEN	158
6.3.	TABELLEN	160
<b>ANHANG</b>		<b>161</b>
<hr/>		
	VERWENDETE PRIMER	161
	ABKÜRZUNGEN DER AMINOSÄUREN	162
	PAGE-DOKUMENTATION	163
	PCR-PLANER	164

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. ABIOTISCHE UND BIOTISCHE STRESSFAKTOREN

Pflanzen können sich im Gegensatz zu den Tieren einer veränderten Umweltbedingung nicht durch Migration entziehen. Um diese Unfähigkeit auszugleichen, sind die Pflanzen dazu gezwungen, sich sehr stark an ihren Lebensraum anzupassen. Sie müssen daher am Standort die Möglichkeit besitzen, speziell auf alle potentiell schädigenden Einflüsse reagieren zu können. Hierzu zählen nicht nur die Bedrohung durch Fressfeinde, sondern auch abiotische Faktoren wie z.B. Hitze, Strahlung oder Trockenheit.

Als der Mediziner und Biochemiker Hans Selye (26.01.1907 - 16.10.1982) die Lehre vom Stress entwickelte, dachte er vermutlich kaum an Pflanzen. Für ihn bezeichnete Stress eine angespannte Reaktionslage des Körpers bei Einwirkung verschiedener äußerer Reize (Verletzung, Infektion, Überanstrengung), wobei die Folge dieser Reize eine endogene Anpassung des Körpers oder das Erlahmen der Abwehr mit Todesfolge sein kann [Duden Lexikon, 1989].

Nichts anderes ist Stress aber auch für Pflanzen. Bedingt durch ihre Sessilität können sie äußere Reize nicht durch Flucht beantworten. Die Folge ist eine angespannte Reaktionslage, der entweder durch endogene Anpassung begegnet werden kann oder es anderenfalls zum Absterben kommt. Es liegt die Vermutung nahe, dass die Stressantworten bei Pflanzen sehr viel entwickelter und differenzierter sind als bei den aquatischen Organismen und bei den Tieren.

Nach Lacher [1987] stellt Stress keinen Ausnahmezustand dar, sondern ist ein Bestandteil des Lebens. Hieraus resultiert die Unterteilung in einen sogenannten Eustress und einen Distress. Beim Eustress treten Belastungssituationen auf, die innerhalb der Toleranzgrenzen liegen und somit die Pflanze nicht schädigen. Im Gegensatz hierzu schädigt der Distress die Organismen, im vorliegenden Fall die Pflanzen. Die Stressantworten werden laut Hoffmann [1987] auf verschiedenen Hierarchieebenen gegeben. In höheren Pflanzen müssen die Ebenen zwischen und innerhalb der Zellkompartimente, auf interzellulärer und zellulärer sowie auf Ebene der Organe unterschieden werden. Dementsprechend können sich auch die einzelnen Stressantworten von Ebene zu Ebene unterscheiden [Hoffmann, 1987].

Im Gegensatz zum Konzept von Stress bei tierischen Organismen unterteilt man die auf die Pflanze einwirkenden Reize in vielfältiger Weise. Gehen diese von anderen Lebewesen wie Bakterien, Pilze oder Insekten aus, so spricht man von biotischen Stressfaktoren. Die Pflanze kann auf solche Stressfaktoren, die sich meist in einem Befall mit Pathogenen äußern, mit der Induktion von Abwehrstoffen reagieren. Durch das Wissen um diese Vorgänge können Methoden zum Schutz der Pflanzen entwickelt werden [Berna and Bernier, 1999; Grover et al., 1998; Vanacker et al., 1998].

Geht der den Stress hervorrufende Reiz nicht von anderen Lebewesen aus, sondern von physikalischen Faktoren wie z.B. Temperatur (Hitze oder Kälte), Strahlung (Hochlicht oder Niedriglicht, UV-Licht) oder Wassergehalt (Trockenheit oder Überflutung), so spricht man von abiotischen Stressfaktoren [Forster et al., 1997; Pernas et al., 2000].

Einen wichtigen abiotischen Faktor für Pflanzen stellt das Licht dar. Licht ist nicht nur treibende Kraft für die photosynthetische Energiegewinnung, sondern auch Auslöser und Modulator komplexer regulatorischer Vorgänge innerhalb des Wachstums und der Entwicklung der Pflanzen. So wichtig Licht für die Pflanze einerseits ist, so schnell kann es andererseits auch zu einem Stressfaktor werden, insbesondere dann, wenn als Folge vollständiger Reduktion der Elektronentransportkette bei weiterem Anstieg der Lichtflüsse freie Radikale entstehen, die zur oxidativen Schädigung der Zellen führen können [Prasil et al., 1992; Herouart et al., 1993]. Als Reaktion auf diesen Lichtstress werden unterschiedlichste Gene induziert, wie z.B. die Gene für die ELIPS [Adamska et al., 1992; Pötter and Kloppstech, 1993].

Die Analyse lichtstress-induzierter Gene sowie ihrer Produkte hilft beim Verständnis der beteiligten Reaktionswege und Stressantworten.

Zur Identifizierung solcher Gene bzw. deren Transkripte wurden von Pötter et al. [1993] cDNA-Banken angelegt, die von lichtgestressten Gerstenpflanzen stammten. Durch die Methode der Subtraktionsklonierung konnten verschiedene lichtinduzierte mRNA's kloniert und sequenziert werden. Bei einem dieser Klone handelte es sich um das HL#2 („High Light clone 2“).

Der folgende Abschnitt fasst die wichtigsten Daten über das HL#2 zusammen. Die Daten stammen aus der Dissertation von E. Pötter [1994], der Veröffentlichung Pötter et al. von 1996 sowie der Dissertation von A. R. Menhaj [1998] und der Veröffentlichung Menhaj et al. von 1999.

## **1.2. HL#2 UND HORCOLIN**

Die Ergebnisse der Sequenzierung von HL#2 zeigten zum damaligen Zeitpunkt eine Sequenzhomologie zu dem lichtinduzierbaren Protein GOS9 [de Pater and Schilperoord, 1992; Rey et al., 1993] und dem durch Salzstress induzierbaren Protein salt [Claes et al., 1990; Garcia et al., 1998]. Beide Proteine stammen aus dem Reis.

Untersuchungen zur Genexpression von HL#2 zeigten, dass die mRNA unter Hochlichtbedingungen nach 3 h ein Maximum erreichte und für mindestens 9 h ohne abzusinken (maximale Versuchszeit) auf diesem hohen Niveau verblieb. Unter Erholungsbedingungen im Niedriglicht verblieb die HL#2 mRNA auf 2 - 3fach höherem Niveau als bei den Kontrollpflanzen. Werden etiolierte Pflanzen ins Licht gebracht, so kann nach 2 h eine maximale Transkriptmenge beobachtet werden, die im Verlauf der nächsten 24 h nur langsam absinkt. Bei einem Vergleich verschiedener Belichtungsstärken (zwischen 20 und 2000 W m<sup>-2</sup>) konnte gezeigt werden, dass die Transkriptmenge mit steigender Lichtstärke anstieg. Im Blattgradienten zeigte sich für HL#2 eine erhöhte Menge mRNA im basalen Bereich im Vergleich zum mittleren und apikalen Blattbereich. Geringe Mengen an mRNA konnten auch in etiolierten Pflanzen detektiert werden.

Zur weiteren Untersuchung des HL#2 wurde von Menhaj [1998] rekombinantes HL#2 in *E. coli* überexprimiert und durch die Immunisierung einer Ziege ein Anti-HL#2-Antikörper gewonnen. Mit Hilfe dieses Antikörpers konnten weitere Information gesammelt werden. Es zeigte sich, dass bei Lichtstress im Vergleich zur mRNA die Proteinmenge

nicht signifikant erhöht war. Nach Methyljasmonatbehandlung konnte im Vergleich zu den Kontrollpflanzen eine 5fach erhöhte Proteinmenge im Blatt gefunden werden. Dieser Effekt zeigte sich erst nach 48 h, während die mRNA schon nach 24 h deutlich erhöht war. Zusätzlich konnten mit dem Anti-HL#2-Antikörper zwei 32,6 und 32,7 kDa große Jasmonat induzierte Proteine (JIP) [Lee et al., 1996] gefunden werden.

Neben der Bande von HL#2 mit 18,0 kDa wurde im basalen Blattsegment eine weitere Bande mit 15,5 kDa beobachtet. Dieses Protein wurde in Analogie HL#2\* oder einfach „kleines HL#2“ genannt. Zur Unterscheidung von HL#2 und HL#2\* wurde für letzteres der Name Horcolin (**H**ordeum **vulgare** **c**oleptil **l**ectin) eingeführt.

Beide Proteine konnten in geringen Mengen in 6 - 7 Tage alten etiolierten Pflanzen gefunden werden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass es sich bei beiden um lösliche Proteine handelt. Weder in Chloroplasten und Mitochondrien noch im Zellkern konnten Spuren beider Proteine gefunden werden. Versuche mit Kälte- sowie mit Salzstress zeigten keinen Einfluss auf mRNA und Proteinmenge von HL#2.

Die gewebespezifische Lokalisation von Horcolin konnte auf die Koleoptilen eingegrenzt werden, in Blättern konnte dieses Protein nicht gefunden werden. Dagegen kommt HL#2 sowohl in Koleoptilen als auch in den Blättern vor. Versuche zur Sammlung der interzellulären Waschflüssigkeit haben gezeigt, dass das Horcolin im Apoplasten vorliegt, wobei auch geringe Mengen an HL#2 dort gefunden werden können.

Weitere Datenbankrecherchen wiesen zusätzliche Homologien zu Lektinen wie Jacalin [Sastry et al., 1986] und Ipomoelin [Imanishi et al., 1997] auf. Dass dies von Bedeutung für HL#2 und Horcolin ist, zeigen auch neueste Daten von Zhang et al. [2000], die die Zugehörigkeit von salT zu der Familie der Lektine aufzeigen.

### 1.3. LEKTINE DER PFLANZEN

Die folgende Zusammenfassung ist inhaltlich, soweit nicht anders angegeben, aus dem Review von van Damme et al. [1998] entnommen, welche sich eingehend mit der Struktur, der biologischen Funktion und der Evolution der Lektine beschäftigt. Die Autoren schlagen auch eine Einteilung dieser Proteine in sieben Familien vor.

Bei den Lektinen handelt es sich per Definition um zuckerbindende Proteine, die die Eigenschaft haben, Zellen zu agglutinieren und/oder Glykokonjugate (Polysaccharide, Glykoproteine und Glykolipide) zu präzipitieren. Historisch gesehen wurde der Begriff 1954 von W. Boyd und E. Slapeigh eingeführt. Der Lateinische Wortstamm „legere“ bedeutet übersetzt „auswählen“- es werden also von den Lektinen bestimmte Substanzen ausgewählt. Da die Lektine zuerst in Pflanzen entdeckt wurden, gab man ihnen zunächst den Namen Phytohämagglutinine. Die Lektine selbst sind im Pflanzenreich sehr verbreitet und kommen in Wurzeln, Sprossen, Blättern, Samen und Früchten vor, wobei einige von ihnen für den Menschen giftig sind. Als Beispiel sind hier das Phasein aus der Bohne, das Ricin aus dem Ricinus und das Concanavalin A aus der Jackbohne genannt. Außer in den Pflanzen kommen Lektine auch in Bakterien, Viren, Pilzen oder tierischen Lebewesen vor. Hier dienen sie u.a. der Zell-Zell-Adhäsion oder der Zell-Zell-Erkennung (Immunantwort, Blutkörpererkennung,

etc.). Einige der Wirkungen der Lektine kommen durch ihre Eigenschaft zustande, Oberflächenproteine zu vernetzen. Dies führt zu physiologischen Veränderungen der Zellmembran mit anschließender Signalweiterleitung (Mitogenität der Lektine).

Damit ein Protein als Lektin fungieren kann, muss es über mindestens zwei Zuckerbindungsstellen verfügen. Die meisten Lektine verfügen nur über eine solche Bindungsstelle und lagern sich vermutlich deshalb zu Komplexen aus zwei, vier oder mehr Untereinheiten zusammen. Lektine können hierbei komplexe Kohlenhydratstrukturen erkennen, die hochspezifische Interaktionen vermuten lassen. Aus vier Monosacchariden können rein rechnerisch über 35.000 verschiedene verzweigte Tetrasaccharide aufgebaut werden - eine Vielzahl von möglichen Erkennungsstrukturen.

Den Lektinen werden u.a. Funktionen als Fraßgift, Insektizid, Bakterizid oder Fungizid zugeschrieben. Auch spielen sie eine Rolle in der Erkennung von parasitären Pilzen und der Induktion von Abwehrmechanismen. Neuere Ergebnisse weisen ihnen auch eine Funktion innerhalb der Stressantwort bei Pflanzen zu [Zhang et al., 2000]. Dies nicht zuletzt aufgrund der Tatsache, dass sie durch unterschiedliche Reize wie Salzstress, Trockenstress, Verwundung, Jasmonat- und ABA-Behandlung induziert werden können [Imanishi et al., 1997; Zhang et al., 2000; Peumans et al., 2000a]

Die Einteilung der pflanzlichen Lektine erfolgt nach dem Review von Damme et al. [1998] in sieben Familien, die hier kurz genannt seien:

1. **Leguminosen Lektine:** Hierzu zählt u.a. das oben bereits genannte Phasein aus der Bohne. Mit über 100 Vertretern in über 70 Spezies ist diese Familie eine der größten. Diese Lektine besitzen eine durchschnittliche Größe von 30 kDa und lagern sich nicht-kovalent zu Di- oder Tetrameren zusammen, wobei für die Bindungsaktivität  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mn}^{2+}$  nötig sind. Die Proteine selber sind meist glykosyliert.
2. **Chitin-bindende Lektine:** Diese Familie ist durch das Vorhandensein einer Hevein-Domäne gekennzeichnet. Die Hevein-Struktur besteht aus 40 AS und ist für die Chitinbindung verantwortlich. Da viele Chitinasen der Klasse I eine solche Domäne besitzen, die im N-terminalen Bereich liegt, wird bei ihnen auch von „Chimero“-Lektinen gesprochen. Neben dieser Form kommen auch Varianten vor, bei der die Lektine aus zwei bis sieben kovalent verknüpften Untereinheiten bestehen, die sich wiederum zu Dimeren zusammenlagern können.
3. **Typ 2 ribosomen-inaktivierende Proteine:** Diese Proteine können eukaryontische Ribosomen durch die Modifizierung eines Adenosinrestes inaktivieren. Hiernach kann der Elongationsfaktor EF2 nicht mehr an dieses Ribosom binden, was zur Folge hat, dass die Proteinsynthese arretiert wird. Neben dieser enzymatischen Aktivität verfügen diese Proteine noch über eine Bindungsstelle für Kohlenhydrate. Sie stellen somit ebenfalls Chimero-Lektine dar. Das Ricin aus dem Ricinus ist eines dieser Lektine. Auch bei dieser Lektinfamilie kommen Di- und Multimere vor, wobei die toxische Untereinheit A mit der für die Zuckerbindung verantwortlichen Untereinheit B über Disulfidbrücken verbunden ist. Ein solches Dimer vermag sich dann über nicht-kovalente Bindungen mit weiteren identischen Dimeren zu Multimeren zusammenzulagern.

4. **Amaranthus Lektine:** Diese homodimeren Lektine aus zwei 33 kDa Untereinheiten kommen vor allem in den Samen von Amaranthus vor. Die Sequenz der Untereinheiten kann in zwei Domänen unterteilt werden, die über eine kurze Helix miteinander verbunden sind. Über die physiologische Rolle dieser Lektine ist zur Zeit nicht viel bekannt.
5. **Cucurbitaceae-Phloem Lektine:** Wie der Name vermuten lässt, kommen diese in der Phloemflüssigkeit von u.a. Gurken, Kürbissen und Melonen vor. Sie zeigen eine deutliche Bindung an Chitin, werden aber aufgrund ihrer Struktur nicht zu den chitinbindenden Lektinen gezählt und besitzen auch keine Hevein-Domäne. Ihre Funktion wird u.a. im Wundverschluss von durch Infektion oder Fraß zerstörten Gefäßen vermutet.
6. **Monokotylen mannosebindende Lektine:** Es handelt sich bei diesem um eine Superfamilie von Lektinen, die nur in monokotylen Pflanzen gefunden werden. Eines dieser Lektine, das GNA aus dem Schneeglöckchen, scheint eine ausgewiesene Wirkung gegenüber Phytopathogen zu besitzen [Wang and Guo, 1999]. Die Familie darf nicht mit der nachfolgend beschriebenen Familie der Jacalin-verwandten Lektine verwechselt werden, die ebenfalls mannosebindende Lektine enthält, die aus Monokotylen stammen, aber eine unterschiedliche Struktur aufweisen.
7. **Jacalin-verwandte Lektine:** Zu dieser Familie werden alle Lektine gezählt, die eine dem Jacalin ähnliche Struktur aufweisen. Diese spiegelt sich sowohl in der Primär- und Sekundärstruktur als auch in der Tertiärstruktur wieder. Hierbei unterscheidet man Lektine, die wie das Jacalin aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette aufgebaut sind, und solche die aus einem einzigen Protomer bestehen. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten des Jacalins entstehen durch co- und posttranslationale Modifikationen eines Preproteins. Eine Einheit lagert sich mit drei weiteren identischen Einheiten zu einem funktionellen Tetramer zusammen. Dieser Familie von Lektinen wird eine aktive Rolle in der Pathogenabwehr der Pflanzen zugesprochen [Zhang et al., 2000].

Obwohl Jacalin der Namensgeber ist, scheinen die meisten Lektine dieser Familie außerhalb der der Moraceae vorzukommen. Zusätzlich zeigen letztere eine andere Zuckerspezifität. Dies veranlasste die Arbeitsgruppe um van Damme und Peumans [Peumans et al., 2000a; Zhang et al., 2000], die Familie in zwei Untergruppen zu teilen. Die eine Untergruppe enthält u.a. das Jacalin mit seiner Spezifität für Galaktose und ist zusätzlich durch den Aufbau aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette sowie durch die Bildung des funktionsfähigen Lektins aus vier Untereinheiten gekennzeichnet.

Die zweite Untergruppe enthält Lektine wie Heltuba und Calsepa [Nakagawa et al., 1996; van Damme et al., 1996]. Weitere neu entdeckte Mitglieder dieser Familie sind die beiden Proteine BanLec und PlanLec [Peumans et al., 2000a]. Besonders interessant ist ebenfalls ein weiteres Mitglied, das bereits im Abschnitt „HL#2 und Horcolin“ genannt wurde. Es handelt sich hierbei um das mit HL#2 sequenzverwandte Protein salT. Zhang et al. [2000] konnten zeigen, dass es sich beim salT um einen Vertreter



der Jacalin-verwandten mannosebindenden Lektine handelt. Dies ist insoweit von Bedeutung, als es sich hierbei um eines der wenigen bekannten Lektine handelt, die stressinduziert sind [Zhang et al., 2000].

Hervorzuheben ist auch eine weitere Eigenschaft, die HL#2 und Horcolin mit den Lektinen Ipomoelin, BanLec und salT verbindet, und zwar die Reaktion aller Vertreter auf Behandlung mit Methyljasmonat. Bei allen genannten Proteinen führt Methyljasmonat entweder zu einer verstärkten oder zu einer induzierten Expression der mRNA bzw. des Proteins. Betrachtet man zusätzlich die vorliegenden Sequenzhomologien zu anderen Jasmonat-induzierten Proteinen [Menhaj et al., 1999], so scheint Jasmonat eine Rolle bei der Expression dieser Lektine zu spielen.

Jasmonat induziert in Pflanzen die Expression einer Reihe von Proteinen, die als JIP's (Jasmonat-induzierbare Proteine) bezeichnet werden. Für einige dieser JIP's wird eine Beteiligung an Abwehrreaktionen gegenüber abiotischen und biotischen Stressfaktoren vermutet [Reinbothe et al., 1994; Schweizer et al., 1997; Hause et al., 1999]. Hierzu zählen u.a. durch Licht- und Wasserstress induzierte Proteine [Silhavy et al., 1995; Wang et al., 1999; Wierstra and Klopstech, 2000]. Ebenso zählen hierzu durch Verwundung oder nach Infektion mit Mikroorganismen induzierte Proteine [Chang et al., 1997; Silhavy et al., 1995; Vignutelli et al., 1998; Bergey and Ryan, 1999; Wierstra and Klopstech, 2000].

Des Weiteren scheint Jasmonat ein wichtiger Regulator beim Wachstum und der Entwicklung sowie bei der Seneszenz zu sein [Wasternack and Parthier, 1997; Wasternack et al., 1998], obwohl letztere Eigenschaft auch als Rückdifferenzierung verstanden werden könnte.

Sowohl die Lektine als auch einige der JIP's scheinen eine Rolle bei der Abwehr von Pathogenen zu spielen, welche die Pflanze befallen und zerstören können. Im Arsenal der Waffen gegen einen solchen Pathogenbefall verfügen die Pflanzen über eine weitere Familie von Proteinen, mit deren Hilfe sie sich gegen Angreifer verteidigen könnten. Diese als „pathogen-related proteins“ oder kurz PR-Proteine bezeichneten Proteine werden im nachfolgenden Abschnitt kurz dargestellt.

#### **1.4. PR-PROTEINE**

Eine Interaktion der Pflanzenzelle mit Symbionten oder aber auch mit Pathogenen erfordert als ersten Schritt immer eine Erkennung. Dieser Erkennung folgen dann – initiiert über unterschiedliche Signaltransduktionsketten - spezifische Reaktionen. Nach dem Befall mit Pathogenen kann es zum Anschalten von Abwehrmechanismen und der Expression einer Vielzahl von PR-Proteinen kommen [Kombrink and Somssich, 1997]. Neben der de novo Synthese von PR-Proteinen ist es für eine Zelle von Vorteil, wenn sie über konstitutiv exprimierte Proteine verfügt bzw. über solche, die in bestimmten Stresssituation vermehrt prophylaktisch gebildet werden, um hierdurch einer möglichen Infektion begegnen bzw. eine unspezifische Infektionsabwehr einleiten zu können. Mit dieser Eigenschaft scheint die angeborene Immunität vieler höherer Lebewesen vergleichbar zu sein.

Die folgende Darstellung der wichtigsten Familien von PR-Proteinen wird dem Kapitel 6 von E. Kombrink und I. E. Somssich aus „The Mycota V Part A“ entnommen.

Per Definition handelt es bei den PR-Proteinen um eine Gruppe von Polypeptiden, die bislang nach Pathogenbefall oder Verwundung exprimiert werden, wobei sie auch in anderen Pflanzenteilen konstitutiv oder während bestimmter Entwicklungsprozesse gebildet werden können [van Loon, 1997].

Die Einteilung der PR-Proteine erfolgt in mindestens 11 Familien. Manche dieser Familien enthalten wiederum Untergruppen. Zusätzlich gibt es auch noch einige Proteine, die nicht klassifiziert werden können. So werden die Peroxidasen, die Superoxid-Dismutasen und die Amylasen hinsichtlich ihrer Zuordnung zu den PR-Proteinen uneinheitlich diskutiert.

Zur ersten Familie der PR-Proteine gehören die des Typus PR-1. Bei ihnen handelt es sich vorwiegend um saure Polypeptide mit einer Größe von ungefähr 15 kDa. Die sauren Formen kommen extrazellulär vor und können mit der IWF extrahiert werden. Die basischen Isoformen enthalten neben einem N-terminalen Signalpeptid, wie es auch bei den sauren vorzufinden ist, eine C-terminale Sequenz, die die Lokalisation in der Vakuole vermittelt. Die Funktion dieser PR-Proteine ist noch ungeklärt, eine fungizide Wirkung wird angenommen.

Zu der zweiten Familie der PR-Proteine werden die 1,3- $\beta$ -Glucanasen gezählt. Diese werden in drei Untergruppen eingeteilt. Bei der ersten handelt es sich um basische Glucanasen, die in der Vakuole vorkommen. Die zweite Gruppe umfasst u.a. die PR-Proteine PR-1a, b und c. Diese werden in den Apoplasten sekretiert und weisen ebenfalls einen pI-Wert im sauren Bereich auf. Auch die dritte Gruppe enthält saure extrazelluläre Proteine. Die Funktion dieser durch Pathogene induzierten Proteine liegt eindeutig in der Degradation der Zellwände angreifender Pilze.

In dieser Eigenschaft arbeiten die PR-2 Proteine mit der dritten Familie der PR-Proteine synergistisch zusammen. Bei diesen handelt es sich um die große Gruppe der Chitinasen, die ebenfalls die Zellwände von Pilzen abbauen können. Die Chitinasen werden in vier Untergruppen aufgeteilt. Interessanterweise kommen die sauren Formen außerhalb der Zelle und die basischen Formen in der Vakuole vor. Die Mehrheit der Chitinasen sind Endochitinasen, einige wenige sind Exochitinasen. In der Zuckerrübe konnten bis zu 13 verschiedene Isoformen gleichzeitig gefunden werden. Bei den PR-4 Proteinen, oder auch als Win-ähnliche Proteine bezeichnet, handelt es sich um 13 bis 15 kDa große, vorwiegend saure Proteine, die u.a. in den Apoplasten sekretiert werden. Manche dieser PR-Proteine sind mit einer sogenannten Hevein-Domäne ausgestattet und zeigen eine Bindung an Chitin. Die Bezeichnung Hevein-Domäne wird für homologe Sequenzen verwendet, die mit einem 43 Aminosäuren kleinen Protein aus dem Gummibaum (*Hevea brasiliensis*) mit Chitinbindungsaktivität verwandt sind.

In der fünften Familie der PR-Proteine sind die Thaumatin-ähnlichen Proteine zusammengefasst. Diese zeigen Sequenzähnlichkeiten zu dem süßschmeckenden Protein Thaumatin sowie zum Osmotin. Die PR-5 Proteine kommen sowohl in der Vakuole als auch extrazellulär vor und werden durch Virus- oder Pilzinfektion induziert [Garcia-Casado et al., 2000]. Sie scheinen die Zellwände von Pilzen permeabler zu machen. Hierbei sollen sie mit den Chitinasen und Glucanasen zusammenarbeiten.

Zu den weiteren Familien gehören die Proteinaseinhibitoren (PR-6), die die Pflanze vor fremden Proteinase schützen sowie eine pflanzliche alkalische Endoproteinase (PR-7).

In der achten Familie der PR-Proteine finden sich Lysozyme und Chitinasen, welche sich von den Chitinasen der dritten Familie unterscheiden. Diese in drei Klassen unterteilten Chitinasen kommen in der sauren Isoform ebenfalls extrazellulär vor.

Eine weitere interessante Gruppe stellen die Thionine dar. Diese kleinen (5 kDa) und schwefelreichen Proteine zeigen ihre Toxizität in der Beeinflussung der Membranpermeabilität. Als Preproprotein gebildet kommen sie in den Vakuolen, in Microbodies und in der Zellwand vor. Ihre Funktion als PR-Protein wird für wahrscheinlich gehalten [Vignutelli et al., 1998].

Die Tatsache, dass viele der genannten PR-Proteine nach Infektion in den Apoplasten sekretiert werden, zeigt die Bedeutung dieses „Raumes“ für die Abwehr von Pathogenen. Lange Zeit war der Apoplast unbeachtet geblieben, weil er sich außerhalb der Zelle befindet. Seine Bedeutung bei der Pathogenabwehr nimmt in dem Maße zu, wie neue Proteine im Apoplasten identifiziert werden, die eine ausgewiesene Funktion bei der Abwehr von Mikroorganismen besitzen.

### **1.5. APOPLAST UND GUTTATION**

Der Apoplast, als derjenige Raum der Zelle definiert, der außerhalb des Plasmalemmas liegt, stellt mehr als nur einen "toten Bereich" dar. Er ist nicht nur für den apoplastischen Wassertransport durch die Zellwand wichtig, sondern stellt auch den Bereich dar, in dem eine aktive Auseinandersetzung mit der Umgebung stattfindet. Er dient nicht nur als Empfangs- bzw. Weiterleitungsort für Signalmoleküle, sowohl eigener als auch symbiotischer Herkunft, sondern auch als erste Verteidigungsbarriere gegenüber Phytopathogenen. Es ist daher keine Überraschung, wenn im apoplastischen Bereich auch andere Proteine gefunden werden, als die für die Zellwandsynthese benötigten [Sattelmacher et al., 1998]. Die im vorherigen Kapitel aufgezählten PR-Proteine gehören ebenfalls hierzu.

Bedingt durch seine Rolle bei der passiven Wasserweiterleitung stellt der Apoplast einen zentralen Punkt bei allen Prozessen dar, die im Zusammenhang mit der Wasseraufnahme und -abgabe sowie den damit physiologisch verbundenen Reaktionen stehen.

Der normale Weg der Wasserabgabe bei den höheren Pflanzen, die auf dem Land leben, ist die Transpiration. Mit ihrer Hilfe gelangen über Wurzeln aufgenommene Salze und Wasser in die Sprossachsen und Blätter. Von dort aus kann das Wasser verdunsten und sorgt so für den Transpirationssog. Die treibende Kraft der Transpiration ist die Differenz zwischen dem niedrigen Wasserpotential der nicht wasserdampfgesättigten Luft und dem hohen Wasserpotential im Bereich der Wurzel [Sitte et al., 1991].

Für den Transpirationsstrom werden die Elemente des Leitbündels verwendet, die als Xylem bezeichnet werden. Im Vergleich hierzu ist das Phloem für den Transport von vorwiegend organischen Verbindungen verantwortlich. Über das Xylem werden die

photosynthetisch aktiven Bereiche der Pflanzen mit dem für die stoffwechselphysiologischen Vorgänge lebensnotwendigen Wasser versorgt [Sitte et al., 1991]. Der Transpirationssog funktioniert aber nur so lange, wie eine ausreichend große Wasserpotentialdifferenz zwischen der Pflanze und der sie umgebenden Luft besteht. Bei einer hohen relativen Luftfeuchte, wie sie nachts oder in tropischen Klimaten vorzufinden ist, reicht die Potentialdifferenz zwischen Boden und Luft für den Wassertransport nicht aus.

Damit der Wasserstrom aber dennoch aufrechterhalten werden kann, vermögen viele Pflanzen aktiv Wasser durch die Blätter abzugeben. Auf diesem Weg wird gewährleistet, dass die Blatt- und Sprossgewebe mit den notwendigen Ionen versorgt werden können. Bei diesem als Guttation bezeichneten Vorgang wird die Xylemflüssigkeit in Form von Tropfen ausgeschieden. Der Austritt erfolgt über sogenannte Hydathoden. Bei der Familie der Poaceae sind diese im Bereich der Blattspitze vorzufinden. Dieser Guttationsvorgang kann häufig morgens beobachtet werden und wird manchmal mit Taubildung verwechselt, die in der Tat zu dieser Zeit stattfindet und wegen der hohen Luftfeuchtigkeit die Guttation bedingt.

Die der Guttation zugrundeliegende Kraft, die die Flüssigkeit aus den passiven Hydathoden treten lässt, liegt im Wurzelndruck. Die Hydathoden stellen ein Porensystem dar, das es dem unter positiven Druck stehenden Xyleminhalt erlaubt, nach außen zu treten [Sitte et al., 1991].

Die Guttationsflüssigkeit wird in ihrer Zusammensetzung in vielen Veröffentlichungen [Simmlin-Annefeld, 1976; Lütge et al., 1988; Mohr and Schopfer, 1992; Sitte et al., 1991] als wässrige Lösung beschrieben, die Salze, Zucker und organische Bestandteile in niedrigen Konzentrationen enthält - nicht zuletzt aufgrund der Tatsache, dass sie dem für den Wassertransport verantwortlichen Xylem entstammt. Als Orte der Herkunft dieser Substanzen, die in den extrazellulären Raum gelangen, werden das Wurzelparenchym- bzw. die Xylemparenchymzellen diskutiert [Biles and Abeles, 1991]. Aus gleichem Grund kann man die Guttationsflüssigkeit als Flüssigkeit des Apoplasten betrachten. In diesem pflanzlichen Kompartiment findet die erste Auseinandersetzung zwischen Pflanze und Mikroorganismen statt, die letztlich über die Überlebensfähigkeit der Pflanze entscheidet. Es kann deshalb nicht überraschen, dass neben den oben genannten niedermolekularen Inhaltsstoffen noch weitere - zumeist höhermolekulare - Substanzen identifiziert werden konnten. Bei diesen handelt es sich vornehmlich um lösliche Proteine mit Molekulargewichten bis 90.000 Dalton. Diese Beobachtung führt zu den Fragen, um welche Proteine es sich handelt, woher sie stammen und welche Funktion sie haben. Diese Fragen lassen sich primär nur mittels Sequenzierung und Klonierung beantworten.

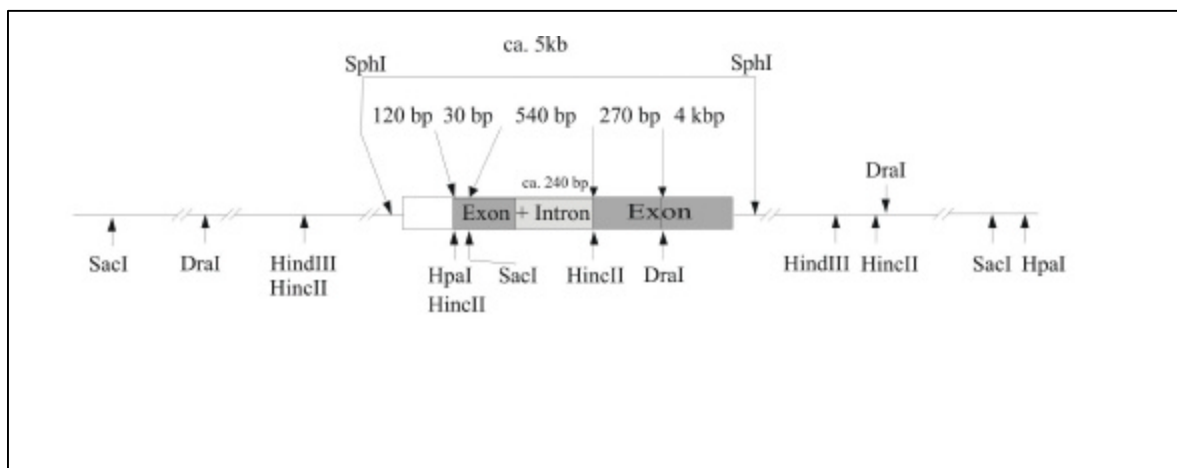
Die älteren Untersuchungen haben sich hauptsächlich mit einer Gruppe von Proteinen beschäftigt, die eine leicht zu messende enzymatische Aktivität besitzen. Es handelt sich hierbei um eine Klasse von wasserlöslichen Peroxidasen [Ivanoff, 1963; Lindner and Brand, 1989; Biles and Abeles, 1991; Magwa et al., 1993]. Diese Enzyme katalysieren nach Aktivierung durch Peroxyde das oxidative „Cross-linking“ und die Polymerisation von verschiedenen organischen Substanzen [Kerstetter et al., 1998]. Eine mögliche Funktion dieser in der Guttationsflüssigkeit vorzufindenden Peroxidasen

liegt darin, einer Infektion durch Mikroorganismen vorzubeugen bzw. bei Verletzung der Gefäße diese wieder zu verschließen [Magwa et al., 1993; Young et al., 1995]. Die Guttationsflüssigkeit stellt demnach also mehr da, als nur eine zucker- und salzhaltige wässrige Lösung, die durch den Wurzeldruck in die Blätter gepresst wird. Man muss vielmehr annehmen, dass die Pflanze aktiv Proteine über das Xylemparenchym in die Gefäße abgibt. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass bestimmte Proteine speziell modifiziert werden, bevor sie über die Plasmamembran in die Guttationsflüssigkeit gelangen [Magwa et al., 1993]. Durch die Steuerung der Zusammensetzung in der Xylemflüssigkeit bzw. Guttationsflüssigkeit ist die Pflanze in der Lage, gezielt auf Änderungen von abiotischen und biotischen Faktoren zu reagieren. Hierzu zählen u.a. Hitze- und Kältestress, hohe Lichtintensitäten sowie die Infektion mit Mikroorganismen. Besonders die Abwehr von Pathogenen, die über Spaltöffnungen und Hydathoden eindringen können, stellt für die Pflanze eine große potentielle Gefahr dar. Diese muss erkannt und möglichst schnell bekämpft werden. Hierbei bietet das Leitungssystem der Pflanzen den Vorteil, u.a. Proteine, die zur Klasse der PR-Proteine gehören, schnell und effizient in alle Organe zu verteilen (systemische Resistenz).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Guttation derzeit hauptsächlich als Vorgang für die Wasser- und Nährstoffversorgung der Blattorgane bei hohen relativen Luftfeuchten beschrieben wird. In Bezug auf die Zusammensetzung dieser Flüssigkeit wurden wegen der hohen Wechselzahlen vornehmlich Proteine untersucht, die zur Klasse der Peroxidasen gehören. Eine ausführlichere Charakterisierung der Guttationsflüssigkeit, die sich z.B. mit der Proteinzusammensetzung in der Gerste befasst, ist bis jetzt noch nicht veröffentlicht. Dies liegt nicht zuletzt an methodischen und analytischen Schwierigkeiten, die erst durch Techniken wie die 2D-Elektrophorese mit anschließender MALDI-TOF Analyse und/oder Edman-Abbau gelöst werden können. Diese Methoden bedingen, dass heutzutage sehr viel weniger Material für eine Analyse benötigt wird als es noch vor 5 – 10 Jahren der Fall war [Lottspeich and Zorbas, 1998]. Es wird vermutet, dass in der Guttationsflüssigkeit nur sehr geringe Proteinkonzentrationen vorkommen.

## 1.6. FRAGESTELLUNGEN

Die Identifizierung von HL#2 in einer Lichtstressbank durch Pötter et al. [1996] und die sich daran anschließenden Untersuchungen von Menhaj [1998] und Menhaj et al. [1999] konnten eine Reihe von Ergebnissen zum Verständnis dieses Proteins liefern. Eine der Fragen war, welche Funktion HL#2 hat. Es stellte sich weiterhin die Frage, in welcher Beziehung HL#2 mit dem Horcolin (HL#2\*) steht. Southernblot-Analysen von Menhaj [1998] zeigten hier eine mögliche Antwort auf. Die mit Hilfe von Restriktionsanalysen postulierte Genstruktur von HL#2 zeigt einen Aufbau aus zwei Exons, die durch ein Intron voneinander getrennt sind. Die beiden Exons sollen den Daten von Menhaj [1998] entsprechend unterschiedlich groß sein, wobei das größere von beiden alleine für Horcolin – beide Exons gemeinsam für HL#2 kodieren könnten.



**Abb. 1.1: Darstellung der möglichen Genstruktur von HL#2**

Gezeigt ist die angenommene Genstruktur von HL#2 (modifiziert nach Menhaj [1998]). Das größere der beiden Exons soll möglicherweise das Horcolin kodieren.

Eine mögliche Erklärung wird im alternativen Spleißen der mRNA gesehen. Diese Überlegung wird auch durch die gewebespezifische Definition von Intron und Exon [Domon and Steinmetz, 1994; Brown und Simpson, 1998] gestützt, wonach diese Form des Spleißens in der Koleoptile HL#2 und Horcolin und im Blatt nur HL#2 entstehen lassen könnte.

Zur Klärung dieses Sachverhaltes sollte das Horcolin isoliert, aufgereinigt und sequenziert werden. Daran sollte sich dann die Klonierung der cDNA anschließen. Mit Hilfe des cDNA-Klons sollte weiterhin versucht werden, das Protein rekombinant in *E. coli* zu exprimieren. Eine cDNA vom Horcolin ermöglichte zusätzlich die Herstellung von Sonden für Southernblot- und Northernblot-Analysen. Mit ihrer Hilfe könnten Aussagen über die Anzahl der Genkopien vom Horcolin im Genom der Gerste

getroffen werden. Weiterhin kann hiermit die Expression des Gens auf mRNA-Ebene untersucht werden bzw. die Gewebelokalisation durch den Anti-HL#2-Antikörper verifiziert werden.

Weiterhin sollen verschiedene Methoden der Bioinformatik eingesetzt werden, um der Antwort auf die Frage nach der Funktion von Horcolin und HL#2 näher zu kommen. Neben der Modellierung von Sekundär – und Tertiärstrukturen können diese Methoden Hinweise auf mögliche Modifikations- und Signalsequenzen sowie auf theoretische chemische Eigenschaften liefern.

Durch Funktionsuntersuchungen wie den Bindungstests an verschiedene Zucker sollte geklärt werden können, ob die Ähnlichkeiten zu den Lektinen nicht nur auf Sequenzebene sondern auch auf Ebene der Funktion bestehen. Lokalisationsuntersuchungen mit Hilfe der Elektronenmikroskopie sollen zusätzliche Informationen über die Proteine HL#2 und Horcolin liefern. Dies sollte es ermöglichen, Aussagen zu den Funktionen der Proteine HL#2 und Horcolin in der Pflanze machen zu können.

Auf Basis der von Menhaj [1998] postulierten Lokalisation der beiden HL#2-Proteine sollte weiterhin anhand des Model-Systems „Guttation“ die Zusammensetzung dieser Flüssigkeit in Bezug auf die darin vorkommenden Proteine studiert werden. Hierzu müssen zunächst optimale Bedingungen für die Guttation ermittelt und die Ernte der Tropfen optimiert werden. Nachfolgend kann die Aufarbeitung der Guttationsflüssigkeit und die Identifizierung der Proteine erfolgen.

Zusätzliche Daten über die Guttationsproteine könnten hierbei beim Verständnis der Funktion von HL#2 und Horcolin helfen. Die Guttation als Spiegel der Tätigkeit des Apoplasten kann vielleicht deutlich machen, dass es sich bei diesem nicht um einen toten Bereich, sondern um einen Ort aktiver Auseinandersetzung mit der Umwelt handelt. Von Bedeutung wäre hierbei auch die Frage nach einem Zusammenspiel von Proteinen im Apoplasten. Kombrink und Somssich [1997] führen in ihrem Review über die PR-Proteine einige Beispiele an, die zeigen, dass erst bei gemeinsamer Expression zweier PR-Proteine ein Effekt zu sehen ist. So scheinen einige Chitinasen nur zusammen mit  $\beta$ -1,3-Glucanasen eine wachstumshemmende Wirkung bei Pilzinfektionen zu entwickeln.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. VERWENDETES MATERIAL UND REAGENZIEN

Es wurden Chemikalien der Firmen Baker, Serva, Biozym, Boehringer Mannheim, Pall, Difco, Sigma Merck, Pierce, Biomol, Fluka und Pharmacia verwendet. Die eingesetzten Chemikalien hatten den Reinheitsgrad „pro analysis“ für den normalen Gebrauch und „sequencing grade“ für die Sequenzierung des Horcolin.

Enzyme wie z.B. die REDTag-Polymerase, die T4-Ligase oder die Restriktionsenzyme stammten von Sigma, NEB, Boehringer Mannheim oder Gibco BRL.

Die Nitrocellulosemembran stammte von Schleicher & Schüll, während die PVDF-Membrane über Millipore bezogen wurde. Filter, bzw. Filtrationseinheiten stammten von der Firma Sartorius, die u.a. auch die verwendeten Waagen lieferte.

Radiochemikalien stammten von Hartmann und Pharmacia, Fotomaterial, wie Filme, Fixierer (Agfa G350) oder Entwickler (Agfa G150) von Kodak, DuPont und Agfa.

Die verwendeten mit Enzymen gekoppelten sekundären Antikörper wie die alkalische Phosphatase oder die Peroxidase wurden von Sigma bezogen.

Für Zentrifugationen wurden Tischzentrifugen von Heraeus und Eppendorf, sowie Standzentrifugen von DuPont (Sorvall RC-5B mit SS34- und GSA-Rotoren) und von Heraeus Sepatech (Variofuge 20 RS mit HSS 4.500-, HSA 13.94- und HFA 2250-Rotoren) verwendet.

Als Stromgeber für Elektrophoresen wurden das EPS 600 und das ECPS 3000/150 Netzgerät von Pharmacia sowie die Elektrophoresekammern „Mini-Sub Cell GT“, „Sub Cell GT“ und „Wide Mini-Sub Cell GT“ der Firma Bio-Rad eingesetzt. Für die Messung von pH Werten wurde u.a. das Beckmann Ø 31 pH Meter benutzt.

Die Gefriertrocknung von Proben wurde mit der Anlage beta 1-16 der Firma Christ / Osterode (Harz) durchgeführt.

Lichtmikroskopische Aufnahmen wurden mit einem Mikroskop der Firma Zeiss (Jena) durchgeführt. Die Dokumentation erfolgte mit einer SPOT-CCD-Kamera der Firma VisitronSystem GmbH (Puchheim).

Von der Aufzählung abweichende bzw. zusätzliche Hersteller und Informationen zu den verwendeten Kits werden an den entsprechenden Stellen im Text gegeben. Soweit die erforderlichen Reinheitsgrade bzw. technischen Ansprüche verwendet werden, können auch Chemikalien, Reagenzien und Geräte von anderen Herstellern als den genannten verwendet werden.

Lösungen und Puffer für Arbeiten mit DNA und RNA wurden vor Gebrauch autoklaviert bzw., bei hitzeempfindlichen Substanzen, steril filtriert. Lösungen, die gekühlt werden sollten, wurden bei 4-5°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Zur Inhibition von Proteasen während der Proteinaufreinigung wurden sowohl ein Proteaseinhibitor Cocktail der Firma Sigma (1 mL pro 30 g Pflanzenmaterial in 100 mL Extraktionslösung), als auch eine Mischung aus folgenden Proteininhibitoren



verwendet: 1 mM PMSF (500 mM Stock in DMSO), 1 mM Benzamidin (15,6 mg/500  $\mu$ L, frisch zugegeben) und 5 mM  $\epsilon$ -Capronsäure (65,6 mg/500  $\mu$ L, frisch zugegeben). Als Größenstandards für Protein- bzw. Agarosegel-Elektrophoresen wurden folgende Marker verwendet:

SeeBlue (Pre-Stained) von Novex als Proteinstandard: für Tris-Glycine-Gele, in Klammern für Tricine-Gele mit 4 [4] kDa Insulin, B-Kette, 6 [7] kDa Aprotinin, 16 [16] kDa Lysozyme, 30 [23] kDa Myoglobin, 36 [34] kDa Carboanhydrase, 50 [45] kDa Alkoholdehydrogenase, 64 [55] Glutamindehydrogenase, 98 kDa [78] BSA, 250 kDa [210] Myosin.

Als DNA-Molekulargewichtsmarker: Lambda/HindIII von Gibco BRL mit: 23.130 bp, 9.416 bp, 6.557 bp, 4.361 bp, 2.322 bp, 2.027 bp, 564 bp und 125 bp sowie Phi X174RF/HaeIII DNA-Molekulargewichtsmarker von Gibco BRL mit 1353 bp, 1078 bp, 872 bp, 603 bp, 310 bp, 281 bp, 271 bp, 234 bp, 194 bp, 118 bp und 72 bp.

50 bp DNA-Molekulargewichtsmarker von Promega mit 50 bp bis 800 bp in 50 bp Stufen.

## 2.2. PFLANZENANZUCHT UND BELICHTUNGSBEDINGUNGEN

Für die Versuche wurden folgende Pflanzensamen verwendet, die von der Firma Lochow-Pektus bzw. vom IPK in Gatersleben bezogen wurden.

Gerste	<i>Hordeum vulgare cv. Apex</i>
Reis	<i>Oriza sativa cv. IR58</i>
Mais	<i>Zea mays cv. Gaucho</i>
Weizen	<i>Triticum vulgare cv. Sorbas</i>
Hafer	<i>Avena sativa cv. Winnipeg</i>
Roggen	<i>Secale cereale cv. Hacada</i>
Hirse	<i>Sorghum bicolor</i>
Triticale	<i>Triticale triticales cv. Lupus</i>

Die Anzucht erfolgte entweder in Töpfen (wenn kleinere Mengen bzw. Versuchsreihen benötigt wurden) oder in Pflanzschalen, die mit Hilfe von durchsichtigen Kunststoffhauben in Mini-Gewächshäuser umfunktioniert werden konnten. Diese wurden für die Anzucht der Pflanzen eingesetzt, die für die Guttationsversuche verwendet werden sollten.

Die Samen wurden auf eine wassergesättigte Schicht aus Vermiculit ausgebracht, die eine ungefähre Schichtdicke von 4-6 cm aufwies. Anschließend wurden die Samen mit einer gleichbehandelten Schicht Vermiculit von ca. 2 cm bedeckt. Bei Bedarf wurden die Pflanzen mit Leitungswasser gegossen. Für die Guttationsversuche wurde das Vermiculit bei 120 °C für 30 min autoklaviert und die verwendeten Gerstensamen mit einer Hypochloritlösung (10 Teile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 3 Teile 12 % Na-Hypochlorit; 1 Teil 10 % (w/v) SDS) oberflächensterilisiert, gründlich mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und ausgesät.

Bei Normallichtbedingungen wurden die Pflanzen unter Lichtintensitäten von 70-100  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> angezogen, die von Leuchtstoffröhren der Marke Philips, Radium NL 36 W721 weiß Radiocolor erzeugt wurden. Für Hochlichtexperimente (2000  $\mu$ mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>)

wurden Klimakammern verwendet, die mit Metaldampflampen der Firma Osram (HQI-T 400) ausgestattet sind.

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Pflanzen unter einer simulierten Tageslänge von 12 h und einer Temperatur von 20-25 °C angezogen. Zur Anzucht von etiolierten Pflanzen wurden abgedunkelte Kammern verwendet.

### 2.3. PROTEINCHEMISCHE METHODEN

#### 2.3.1. EXTRAKTION UND PRÄZIPITATION VON PROTEINEN

Zur Extraktion der Proteine aus den Pflanzenproben wurden verschiedene Methoden verwendet. Hierfür wurde entweder mit flüssigen Stickstoff gemörsertes (Lagerung bei -80 °C) oder frisches Material eingesetzt.

**Gesamtproteine:** zur Extraktion der Gesamtproteine wurde in flüssigem Stickstoff fein pulverisiertes Pflanzenmaterial in 1x SDS-Probenpuffer (3x SDS-Probenpuffer: 150 mM Tris-HCl pH 6,8; 3 % (w/v) SDS; 30 % (w/v) Glycerol; 0,06 % (w/v) Bromphenolblau; DTT final 89 mM- frisch zugegeben) aufgenommen (500 mg Material auf 1,5 mL Probenpuffer), für mehrere Minuten geschüttelt und für 5 min aufgeköcht (bzw. 15 min bei 75 °C). Hiernach wurde die Probe bei 15.000 rpm für 5 min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und erneut zentrifugiert. Nachdem alle Zelltrümmer entfernt wurden, konnte der Extrakt entweder für die Auftrennung in der SDS-PAGE verwendet oder bei -20 °C eingefroren werden.

**Membranproteine und lösliche Proteine:** Zur Extraktion von löslichen sowie von membrangebundenen Proteinen wurde 500 mg Pflanzenmaterial unter flüssigen Stickstoff gemörsertes Material mit 1300 µL Extraktionspuffer LP (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl sowie Proteinaseinhibitoren) für mehrere Minuten gründlich geschüttelt. Die Probe wurde anschließend für 5 min bei 15.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß überführt, zum Pellet erneut 1 mL Extraktionspuffer LP zugegeben und gut gemischt. Sowohl der Überstand als auch das Pellet wurden erneut zentrifugiert und die Prozedur wiederholt. Hierdurch sollte der wässrige Überstand von allen unlöslichen und das Pellet von allen löslichen Anteilen befreit werden. Nach dem dritten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand mit 3x SDS-Probenpuffer versetzt und kann nach erfolgtem Aufkochen für eine SDS-PAGE der löslichen Proteine eingesetzt werden. Zum Pellet wurden 1x SDS-Probenpuffer zugegeben, gemischt, 5 min gekocht, nochmals 5 min bei 15.000 rpm zentrifugiert, der Überstand kann in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dann für die Auftrennung der Membranproteine verwendet oder eingefroren.

**Nativ lösliche Proteine:** Die geernteten Pflanzenteile, je nach Versuch Wurzeln, Koleoptilen, Primärblätter oder Koleoptilen mit Primärblättern zusammen, wurden in einem Haushaltsmixer mit Extraktionspuffer N (100 mM Citratpuffer pH 3,0; 1 mM

MgCl<sub>2</sub>; 100 mM NaCl; Proteinaseinhibitoren) im Verhältnis 10 g Material zu 100 mL Puffer gründlich homogenisiert. Durch dreimaliges Zentrifugieren bei 8.000 xg für 10 min und 4 °C wurden die Zelltrümmer entfernt. Der gelblich klare Überstand wurde für die Bindungs-Tests mit NaOH auf pH 7,0 –7,5 umgepuffert, wobei die Färbung ins Grünliche wechselte.

Neben der Verwendung von Citratpuffer konnte auch eine 2,5 % TCA-Lösung zur Extraktion eingesetzt werden, da selbst unter diesen stark sauren Bedingungen Horcolin in Lösung ging und nicht denaturierte.

**Proteinpräzipitation:** Lagen die zu untersuchenden Proteine in zu geringen Mengen vor, so wurden verschiedene Fällungsmethoden eingesetzt, um diese zu konzentrieren. Zur Proteinfällung wurde entweder TCA in einer Endkonzentration von 10 % oder Aceton in einer finalen Konzentration von 80 % verwendet.

Für die TCA-Fällung wurde eiskalte 50%ige TCA zur Probe gegeben, diese gut geschüttelt und für 30 bis 60 min auf Eis inkubiert. Die Fällung mit Aceton erfolgte für 3 bis 24 h bei –20 °C. Nach erfolgter Fällung wurden beide Proben für 15 min bei 15.000 rpm zentrifugiert, der Überstand vorsichtig entfernt und erneut kurz zentrifugiert, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen. TCA-Pellets wurden mit 80 % Aceton gewaschen. Beide Pellets wurden in 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen.

Durch die Proteinpräzipitation konnten die Konzentrationen um das 10fache erhöht werden.

### 2.3.2. BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION

**Bio-Rad Protein Assay:** Der Test basiert auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie BB G250 bei 465 nm zu 595 nm, wenn dieser Farbstoff mit Proteinen interagiert [Bradford, 1976; Reisner et al., 1975; Sedmak and Grossberg, 1977].

Für diesen Test wurde eine von der Firma Bio-Rad vorgefertigte Lösung (Coomassie BB G250, Methanol und Phosphorsäure, siehe Herstellerangaben) verwendet. Im Mikroassay werden 800 µL Probe (mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt) zusammen mit 200 µL der Färbelösung für 5 min inkubiert und anschließend bei 595 nm im Photometer gemessen. Mit Hilfe einer Eichreihe (0 bis 10 µg/mL) BSA können über lineare Regression die Konzentrationen bestimmt werden. Für einen Standard-Assay wird die Färbelösung 1 zu 4 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Hiervon werden 5 mL zusammen mit 100 µL Probe für ebenfalls 5 min inkubiert und im Photometer bei 595 nm gemessen. Für eine Eichreihe wird BSA in einer Konzentration von 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 und 0,9 mg/mL verwendet [Bio-Rad, Protein-Assay].

**Esen-Schnelltest:** Mit dem Esen-Test kann eine grobe Abschätzung der Proteinkonzentration vorgenommen werden, z.B. damit ein SDS-Gel nicht überladen wird. Für den Test werden eine BSA-Eichreihe von 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 und 10 µg pro 5 µL sowie die zu untersuchenden Proben auf ein Whatman 3MM Filterpapier aufgetragen. Nach dem Trocknen der Proben wird das Papier für 10 min in Esenlösung inkubiert (1

g Coomassie Brilliant Blue G250; 250 mL Isopropanol; 100 mL Eisessig in 1 L ddH<sub>2</sub>O, gut mischen und anschließend filtrieren). Das Filterpapier wird dann so lange in fließendem Leitungswasser gewaschen, bis das Verhältnis von Signal-zu-Hintergrund eine Mengenabschätzung möglich macht. Anmerkung: Proben in SDS-Probenpuffer können direkt verwendet werden; keinen Wasserstrahl auf das Papier richten, da sonst unterschiedliche Entfärbung auftritt; LDS stört den Nachweis.

**Bicinchoninsäure-Assay:** Für die Bestimmung der Proteinmenge mit diesem Test werden die Bicinchoninsäure Reagenzien A (Bicinchoninsäure, Natriumcarbonat/ -bicarbonat und Natriumtartratlösung in 0,1 Natriumhydroxidlösung, pH 11.25) sowie Bicinchoninsäure Reagenz B (4 % w/v Kupfersulfat-Pentahydrat) benötigt. Für eine Eichreihe werden 10, 20, 40, 60, 80 und 90 µg Protein in jeweils 100 µL NaOH, bzw. als TCA-Pellet (1 mg/ mL BSA-Lösung) verwendet. Die Proteine werden in 1:5 und 1:10 Verdünnung mit 0,1 M NaOH eingesetzt [Smith, 1985].

Vor Beginn der Analyse werden 1 Teil Reagenz B mit 50 Teilen Reagenz A vermischt und hiervon 1900 µL zu 100 µL Probe gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen werden die Ansätze bei 562 nm im Photometer gemessen (ddH<sub>2</sub>O als Blank). Durch lineare Regression wird anhand der Eichreihe (jeweils drei Messungen pro Eichpunkt) die Proteinkonzentration bestimmt.

### 2.3.3. KONZENTRATION UND UMPUFFERUNG

Eluate von chromatographischen Auftrennungen oder große Volumina der Proteinextraktion wurden mit Hilfe von zentrifugierbaren Ultrakonzentratoren der Marke VivaSpin (cut-off Bereich 5000 Da) von Sartorius (Göttingen) eingeeengt. Hierzu wurden die Proben in den oberen Bereich der Konzentratoren gefüllt und bei maximal 6000 xg solange zentrifugiert, bis nahezu alle Flüssigkeit vom oberen Bereich durch die Membran in den unteren Teil gelangt war. Durch Zugabe eines gewünschten Puffers und erneuter Zentrifugation konnte die Probe konzentriert und/ oder umgepuffert werden.

Neben dieser Methode wurden auch Dialysemembranen verwendet (Serva 20/32 cut-off 5000 Da), um Lösungen umzupuffern. Hierzu wurden die Membranen zuerst in eine 2 % Natriumcarbonatlösung mit 1 mM EDTA-Lösung, dann in nur 1 mM EDTA-Lösung gekocht und anschließen mit ddH<sub>2</sub>O gespült. Die mit der Probe gefüllten Dialysehschläuche wurden über Nacht in 1,5 L des gewünschten Puffers inkubiert. Eingeeengt werden konnten die Proben durch PEG, in das die Schläuche eingelegt wurden, bis so viel Wasser entzogen wurde, wie benötigt.

### 2.3.4. REINIGUNG DES HORCOLIN

Zur Aufreinigung des Horcolin wurden verschiedene chromatographische Methoden eingesetzt, die im folgenden näher beschrieben werden. Für die Sequenzierung des Horcolin wurde dieses zuerst in einer Tris-Tricin-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet.

#### 2.3.4.1. Hydroxyapatit-Chromatographie

Hydroxyapatit ist eine kristalline Form von Calciumphosphat mit der Zusammensetzung  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ . Für die Chromatographie wurde Macro-Prep CHT, 40  $\mu\text{m}$  Typ I von Bio-Rad verwendet [Bio-Rad, Hydroxyapatit]. Diese wurde über Nacht in 1 mM Phosphatpuffer in Suspension gebracht und anschließend in eine oben offene und unten durch Glaswolle abgeschlossene Glassäule gefüllt (8 cm lang, Durchmesser 1,5 cm). Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Säule nie trocken fiel und sich keine Luftblasen im Material bildeten. Über eine Schlauchklemme im unteren Bereich des Säulenauslasses konnte die Flussgeschwindigkeit reguliert werden.

Für die Hydroxyapatit-Chromatographie wurde der saure Pflanzenextrakt aus den etiolierten Koleoptilen mit 1 mM Phosphatpuffer pH 6,8 umgepuffert und vorsichtig auf die Säule gegeben. Der Durchfluss wurde in Fraktionen zu mehreren mL gesammelt. Nachfolgend wurde die Säule mit 5 mM  $\text{MgCl}_2$  / 1 mM Phosphat pH 6,8 und 1000 mM  $\text{MgCl}_2$  / 1 mM Phosphat pH 6,8 gewaschen sowie mit 300 mM Phosphatpuffer pH 6,8 eluiert. Aliquots des Durchflusses, der Waschfraktionen und des Eluats wurden mit TCA gefällt, die Proben in einem 14 %igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und eine Silberfärbung durchgeführt sowie zusätzlich im Tankblot-Verfahren auf PVDF-Membran transferiert. Die Detektion der Proteine auf der Membran erfolgte mit dem Anti-HL#2-Antikörper als Primärantikörper und der NBT/BCIP-Reaktion durch den sekundären alkalischen Phosphatase Antikörper.

#### 2.3.4.2. Anionenaustauscher-Chromatographie

Als zweiter Reinigungsschritt wurde die Anionenaustauscher-Chromatographie mit SourceQ15-Material [Pharmacia, 1994] verwendet, welches als gelförmige Substanz von Pharmacia Biotech in 10 mL Flaschen geliefert wird. Das Material muss vom Anwender selbst in die leere Glassäule gepackt werden [Geckeler, 1987], in diesem Fall wurde eine HR 5/5-Glassäule [Pharmacia, 1985] von Pharmacia verwendet. Das SourceQ15-Material ist aus einer monodispersen Polystyrol/ Divinylbenzol-Matrix aufgebaut, die eine Partikelgröße von 15  $\mu\text{m}$  aufweist. Als Austauscherguppen liegen  $-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -Gruppen vor. Die Flussrate liegt bei 3 mL/min. Nachdem die Säule luftblasenfrei mit dem Material bepackt und äquilibriert wurde, konnte diese an die FPLC-Anlage angeschlossen werden. Die Anlage bestand aus folgenden Komponenten: zwei FPLC-Pumpen (LKB), einem Durchfluss-Detektor (LKB), einem Controller mit PC (LKB), einem Fraktionssammler (Frac100 LKB) [Pharmacia, 1983]. Mit Hilfe einer „Superloop“ wurde der konzentrierte und mit 20 mM Piperidin + 20 mM NaCl pH 12,0 umgepufferte Extrakt des Hydroxyapatit-Durchflusses auf die Säule

aufgebracht. Bei einer Flussrate von 1,5 mL/min wurde die Säule zunächst mit 50 mM NaCl in 50 mM Piperidin pH 12,0 gewaschen. Zum Eluieren der Proteine wurde ein Gradient von 50 bis 1000 mM NaCl in 50 mM Piperidin pH 12,0 verwendet (Gradientenverlauf siehe Abb. 3.3), wobei vom Fraktionssammler eine Fraktion pro 1,5 Minuten gesammelt wurden. Anhand eines Durchfluss-Detektors wurde ein Chromatogramm bei 260 nm erstellt und so die Eluierung der Proteine verfolgt. Aliquots der Fraktionen wurden wie im Abschnitt 2.3.4.1 beschrieben analysiert.

### 2.3.5. SDS-GELELEKTROPHORESE

Zur Auftrennung der Proteine mit Hilfe der PAGE wurden folgende drei Methoden verwendet:

- Tris-Glycin SDS-PAGE
- Tris-Tricin SDS-PAGE
- Bio-Rad Criterion Precast System

Für normale Auftrennungen wurde das Tris-Glycin System mit verschiedenen Acrylamid Konzentrationen (10 bis 17 %) eingesetzt. Für die Auftrennung des aufgereinigten Proteins Horcolin wurde das Tris-Tricin System benutzt, um störendes Glycin zu vermeiden. Diese Methode zeigt eine besonders gute Auftrennung im unteren Molekularbereich. Zur Durchführung der 2D-Gelelektrophorese wurde das Criterion Precast System von Bio-Rad ausgewählt, um möglichst reproduzierbare Gradientengele verwenden zu können.

**Tris-Glycin SDS-PAGE:** Zur Auftrennung der Proteine wurde u.a. die Methode nach Laemmli [1970] verwendet. Für die Trennung der Proteine wurden sowohl 12%ige als auch 15%ige und 18%ige Polyacrylamidgele hergestellt, wobei sich die Prozentangaben auf den Acrylamid/Bisacrylamid Anteil bezogen und dieser je nach Bedarf verändert wurde. In den meisten Fällen wurde mit Minigelen (8,5 x 11 cm, Stärke 0,75 mm) der Firma Hoefer Scientific gearbeitet, die in einer speziellen Kammer gegossen wurden. Exemplarisch sind hier die Mengen für ca. 8 Minigele aufgeführt, die in eine der großen Hoefer Scientific Kammern passen:

30,00 mL	Acrylamid : Bisacrylamid (30:0,8 %, w/v)
18,25 mL	ddH <sub>2</sub> O
0,50 mL	SDS (10 %, w/v)
6,25 mL	3 M Tris-HCl, pH 8,8
400,0 µL	APS (10 %, w/v)
40,00 µL	TEMED

Nachdem die Kammer befüllt worden war, wurde mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet, um eine gleichmäßige Polymerisation zu gewährleisten. Nach frühesten 3 Stunden wurden die Gele in die Laufapparaturen eingesetzt (ebenfalls Hoefer Scientific) und mit dem Sammelgel (3,5 % Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8 %); 200 mM

Tris-HCl pH 6,8, 0,05 % BPB; pro 1 mL Gel 10 µL APS (10 %) und 1 µL TEMED für die Polymerisation zugeben) befüllt und die Kämme (für 10 oder 15 Taschen) eingesetzt. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurden die Kämme entfernt und die Taschen mit Laufpuffer gespült. Zur Auftrennung wurde Laufpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS (w/v)) in die Elektrophoresekammer gefüllt. Zur Trennung wurde eine konstante Stromstärke von 20 mA pro Gel verwendet. Sobald die Bromphenolbande das untere Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Auftrennung gestoppt und die Gele zur weiteren Untersuchung entweder gefärbt oder der Westernblot-Analyse zugeführt.

**Tris-Tricin SDS-PAGE:** Bei dem hier beschriebenen Verfahren nach Schägger und von Jagow [1987] wird neben der Verwendung des Tricins als Ersatz für das Glycin noch ein Spacergel hinzugefügt. Dieses erhöht zusätzlich die Auftrennung der Proteine im Bereich von 1 bis 100 kDa. Trenngel, Spacergel und Sammelgel weisen eine unterschiedliche Acrylamid (T) – Bisacrylamid (C) Zusammensetzung auf. Zusätzlich enthält das Trenngel noch Glycerol, damit es sich beim Überschichten mit dem ca. 1 cm breiten Spacergel nicht vermischt. Die Polymerisation wird durch Zugabe von 0,5 % APS (10 % w/v) und 0,055 % TEMED gestartet. Das Gel wird ebenfalls mit Isobutanol überschichtet.

Tris-Tricin Gele wurden wie folgt hergestellt.

	Trenngel 16,5 / 6%	Spacergel 10 / 3%	Sammelgel 4/3%
49,5% T 3% C		10,16 mL	1 mL
49,5% T 6% C	16,66 mL	-	-
Gelpuffer	16,66 mL	16,66 mL	3,1 mL
Glycerol	6,64 g	-	-
mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen	50,0 mL	50,0 mL	12,5 mL

Der verwendete Gelpuffer (3x: 3 M Tris-HCl pH 8,45; 0,3 % SDS), Anodenpuffer (10x: 2 M Tris-HCl pH 8,9) und Kathodenpuffer (10x: 1 M Tris; 1 M Tricin; 1% SDS; pH 8,25 ohne Einstellen) unterscheiden sich vom Tris-Glycin Gel. Die elektrophoretische Auftrennung dauert wesentlich länger als bei anderen Systemen, liefert dafür aber gute Auftrennungen.

**Criterion-Precast Gele:** Die Firma Bio-Rad bietet sogenannte Precast Gele an, die vorgefertigt geliefert werden. Diese sind so aufgebaut, dass sie direkt für die Criterion-Elektrophoresekammer [Bio-Rad, Criterion-System] verwendet werden können. Ein Probenkamm sowie das obere Pufferreservoir sind in den Gelen bereits vorhanden. Für die Anwendung muss nur ein Siegelband im unteren Bereich abgezogen werden, das Gel in die Kammer geschoben, der Kamm entfernt und die Reservoirs mit Laufpuffer gefüllt werden. Die Fertiggele, die in unterschiedlichen Zusammensetzungen erhältlich sind, eignen sich besonders für Anwendungen, bei denen es auf eine hohe Reproduzierbarkeit ankommt, wie z.B. der 2D-Gelelektrophorese mit Gradientengelen. Die Laufbedingungen entsprechen der Tris-Glycin SDS-PAGE. Die Gele enthalten kein SDS, welches nur im Laufpuffer vorhanden ist.

Die Trennung der Proteine erfolgte bei den kleinen Gelen bei 30 mA und bei den Criterion Gelen bei 50 mA mit konstanter Spannung bis die BPB-Bande das Ende des Gels erreicht hatte. Vor dem Auftragen wurden die Proben 5 min bei 95 °C inkubiert. Es wurden sowohl 15%ige Gele als auch 10 bis 20%ige Gradientengele verwendet.

### 2.3.6. COOMASSIE- UND SILBERFÄRBUNG

**Coomassie-Färbung:** Zur Färbung der Gele mit dem Farbstoff Coomassie wurden die Gele nach der elektrophoretischen Auftrennung für ca. 1 bis 2 h in Färbelösung (400 mL H<sub>2</sub>O; 400 mL Methanol, 80 mL Eisessig; 1,1 g Coomassie Blue R250) unter leichtem Schütteln inkubiert. Zum Entfernen überschüssigen Farbstoffs werden die Gele unter mehrmaligem Wechsel in Entfärber (10 % Methanol; 7 % Essigsäure) inkubiert.

Die Gele können auch direkt in Entfärber gelegt werden, dem etwas von der Färbelösung zugegeben wurde. Nach Inkubieren auf dem Schüttler über Nacht sind die Banden gut sichtbar abgefärbt (Äquilibriumsfärbung).

An dieser Stelle sei noch auf eine sehr sensitive Färbemethode verwiesen, die als Coomassie-Kolloidal-Färbung bezeichnet wird. Hierbei wird anstatt CBB R250 das CBB G250 verwendet. Die Färbelösung enthält zusätzlich noch 10 % Ammoniumsulfat, 2 % Phosphorsäure und 20 % Methanol. Die Färbung erfolgt über Nacht, wobei keine Entfärbung notwendig ist. Die Hintergrundfärbung ist sehr gering und die Sensitivität soll zwischen derjenigen der herkömmlichen Coomassie- und der der Silber-Färbung liegen [Neuhoff et al., 1985].

**Coomassie Färbung von PVDF-Membranen:** Proteine, die durch den Westernblot auf PVDF-Membranen transferiert wurden, können mit Coomassie-Färber (0,1 % Coomassie R250; 40 % Methanol; 1 % Eisessig) sichtbar gemacht werden, in dem sie für 1 min mit diesem inkubiert und durch mehrfaches Wechseln des Entfärbers (45 % Methanol; 7 % Eisessig) behandelt werden.

**Silberfärbung:** Für diese Färbemethode von SDS-Gelen wurde ein modifiziertes Verfahren nach Blum et al. [1987] durchgeführt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Gele in Fixierlösung (50 % Methanol; 12 % Essigsäure) über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde das Gel drei mal für mindestens 30 min mit 30 % (v/v) Ethanol gewaschen. Anschließend wurde pro Gel 30 mL Imprägnierungslösung (150 µL Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; 43 mg/mL; 200 µL 37 % Formaldehyd) zugegeben und 1 min inkubiert. Anschließend wurde drei mal 1 min mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen, 30 mL Färbelösung (60 mg AgNO<sub>3</sub>; 20 µL 37 % Formaldehyd) hinzugegeben und ca. 25 bis 40 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Von diesem Schritt an wurde mit gekühlten Lösungen gearbeitet. Das Gel wurde zwei mal 30 sek. mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Dann wurde zur Entwicklung 30 mL Entwickler (3 µL Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 43 mg/mL; 15 µL 37 % Formaldehyd) in Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, (60 g/L) hinzugegeben. Bei ausreichend starker Färbung wurde die Reaktion gestoppt, in dem mit 7 % (v/v) Essigsäure zweimal für 10



min auf dem Schüttler inkubiert wurde. Nachfolgend wurde das Gel kurz mit ddH<sub>2</sub>O gespült und in 30 % Methanol aufbewahrt.

### 2.3.7. WESTERN BLOTTING

Der Transfer von Proteinen vom SDS-Gel auf PVDF- oder NC-Membrane wurde sowohl mit dem Tank-Blot-Verfahren [Towbin et. al., 1979], als auch mit dem Semi-Dry Verfahren [Kyhse-Andersen, 1984] durchgeführt. Innerhalb des Tank-Blot-Verfahrens wurden zwei unterschiedliche Methoden eingesetzt, um beim Transfer der zu sequenzierenden Proteine auf Glycin im Transferpuffer zu verzichten.

**Tank-Blot-Verfahren:** Der Transfer bei diesem System findet in einer mit Transferpuffer (0,025 mM Tris; 0,192 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol; 0,02% (w/v) SDS) gefüllten Kammer (Hoefer Scientific, San Francisco) statt, die mit einer Kühlmöglichkeit sowie einem Magnetrührer ausgestattet ist. In diese Kammer wird eine passende Blot-Apparatur eingesetzt, so dass diese mit Puffer überdeckt ist.

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele vorsichtig von der vorderen Glasplatte und der hinteren Aluminiumoxidplatte getrennt und in einer Schale mit Transferpuffer inkubiert. Werden PVDF-Membranen verwendet, so müssen diese durch Methanolbehandlung benetzt werden. Hierzu werden diese kurz in 100 % Methanol und anschließend 2x 5 min in Transferpuffer inkubiert. NC-Membranen wurden nur für 5 min in Transferpuffer inkubiert. Das Transferpaket, bestehend aus einem Gitter, einer mit Puffer getränkten Schaumstoffmatte, einem Filterpapier (Whatman 3MM) und der Membran wurde unter Transferpuffer zusammengebaut, um Luftblaseneinschlüsse zu vermeiden. Die Reihenfolge des Aufbaus war: Gitter – Schwamm – Filterpapier - Membrane - SDS-Gel – Filterpapier – Schwamm - Gitter.

Im Anschluss wurde das Ganze in den mit Transferpuffer gefüllten Tank überführt (auf Polung achten: SDS-Proteine wandern zum + Pol) und unter Kühlung (10-15 °C) die Proteine 1 bis 2 h bei 400 mA auf die Membran geblottet.

**Dunn-Karbonat System:** Bei diesem System wird auf Glycin verzichtet, welches sich bei der Sequenzierung störend auswirken kann [Dunn, 1986]. Die Prozedur des Tank-Blot-Verfahrens wurde bereits oben beschrieben. Der Unterschied liegt jedoch in der Zusammensetzung des Transferpuffers, der Natriumhydrogenkarbonat/ Natriumkarbonat enthält (Dunn-Carbonat Transferpuffer: 10 mM NaHCO<sub>3</sub>; 3 mM NaCO<sub>3</sub>; 20 % Methanol, pH 9,9). Die Zeitdauer für den Transfer wurde für diese Methode auf 3 h verlängert.

**Semi-Dry Verfahren:** Bei diesem Verfahren werden die Proteine im SDS-Gel horizontal liegend zwischen zwei Elektrodenplatten auf die Membranen transferiert, wobei der benötigte Transferpuffer aus getränkten Filterpapieren stammt und kein Tank verwendet wird.

Für den Semi-Dry Transfer wurde die Trans-Blot SD Apparatur von Bio-Rad verwendet [Bio-Rad, Transfer-Apparatur]. Es wurde der Transferpuffer nach Towbin verwendet.

Anstatt der Schwämme wurden sowohl unten als auch oben drei Lagen Whatman Filterpapier 3MM eingesetzt, um einen ausreichend großen Feuchtigkeitsspender zu erhalten. Der Aufbau erfolgte wie folgt: untere Elektrodenplatte – Filterpapier – Membran - SDS-Gel – Filterpapier - obere Elektrodenplatte. Nach dem Zusammenbau wurden mit Hilfe einer Rolle mögliche Luftblasen entfernt. Minigele wurden für 15–30 min bei 10–15 V und große Gele für 30 min bei 15–25 V transferiert. Faustformel: 3 mA/cm<sup>2</sup> für große Gele, 5,5 mA/cm<sup>2</sup> für Minigele.

Durch die Färbung mit dem Farbstoff Ponceau S können NC-Membranen reversibel angefärbt werden, um den Transfer zu überprüfen. Wurden PVDF-Membranen verwendet, so ist eine Färbung mit Coomassie wesentlich sensitiver. Verwendet man einen vorgefärbten Proteinmarker wie z.B. SeeBlue von Novex, so kann der Transfer anhand der sichtbaren Banden überprüft werden.

### 2.3.8. IMMUNFÄRBUNG

Die durch den Westernblot auf die Membran transferierten Proteine können mit spezifischen antikörpergekoppelten Enzymen nachgewiesen werden. Die Sichtbarmachung der Proteine erfolgt über die Enzymreaktionen mit NBT/BCIP- oder über ECL. Bei der ersten wird eine an den Antikörper gekoppelte alkalischen Phosphatase, bei der zweiten eine gekoppelte Peroxidase verwendet. Nachfolgend wird der gegen das Protein gerichtete Antikörper als erster und der mit den Enzymen gekoppelte, der gegen den ersten gerichtet ist, als zweiter Antikörper bezeichnet.

Nach dem Transfer wurde die Membran kurz mit ddH<sub>2</sub>O gespült und für 30 bis 60 min in Blockierungspuffer (4 % Magermilchpulver in PBST) inkubiert. Anschließend wurde die Membran über Nacht mit dem ersten Antikörper (Anti-HL#2-Antikörper aus der Ziege oder Peptidantikörper I aus dem Kaninchen) in einer Verdünnung von 1:500 (in Blockierungspuffer) bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper wurde die Membran 5x 5 min mit PBST (10 mM [NaPO<sub>4</sub>], pH 7,2; 150 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Tween 20) gewaschen. Hiernach wurde der zweite Antikörper (entweder Anti-Ziege oder Anti-Kaninchen mit Enzym gekoppelter Antikörper) in einer Verdünnung von 1:10.000 bis 1:20.000 in Blockierungspuffer für 1 bis 2 h zugegeben. Je nach Methode wurde wie folgt weiterverfahren:

**NBT/BCIP-Reaktion mit alkalischer Phosphatase:** Nach der Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurde die Membran erneut 5x 5 min mit PBST und 1x 3 min mit TMN-Puffer (100 mM Tris-HCl; pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>) gewaschen. Anschließend wurden pro Membran 10 mL Färbelösung, die aus 33 µL BCIP-Lösung (50 mg 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat pro mL N,N Dimethylformamid) und 66 µL NBT-Lösung (50 mg Nitroblue Tetrazoliumsalz pro mL 70 % N,N; Dimethylformamid) in TMN-Puffer besteht, zugegeben und so lange inkubiert, bis die Banden deutlich zu sehen waren. Die Reaktion wurde unter fließendem Wasser abgestoppt.

**ECL-Reaktion mit Peroxidase:** Diese Reaktion ist ungefähr 10 mal sensitiver als die durch die alkalische Phosphatase katalysierte Farbreaktion. Als zweiter Antikörper wird eine gekoppelte Peroxidase verwendet, die Luminol oxidiert und so eine Chemilumineszenz-Reaktion hervorruft. Nachdem die Membran mit dem zweiten Antikörper inkubiert und 5x 5 min mit PBST gewaschen wurde, wurde ein 1:1 Gemisch der ECL-Lösung I (100 mM Tris-HCl pH 8,5; 2,5 mM Luminol und 0,4 mM p-Cumarsäure beide als 100 mM Stammlösung in DMSO) und ECL-Lösung II (100 mM Tris-HCl pH 8,5; 5,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) für etwa 1 min auf die Membran gegeben. Nachdem die Lösung abgetropft war, wurde die Membran in Frischhaltefolie eingewickelt. In der Dunkelkammer wurde dann ein Röntgenfilm (Kodak X-Omat AR) für ca. 2 min auf die Membran gelegt. Nach erfolgter Entwicklung konnte die Signalstärke abgeschätzt werden und gegebenenfalls erneut exponiert werden.

### 2.3.9. ENZYMATISCHE PROTEINSPALTUNG

Das aufgereinigte Horcolin musste, da sich beim ersten Sequenzieren eine N-terminale Blockierung zeigte, proteolytisch gespalten werden, damit Peptidsequenzen erhalten werden konnten [Matsudaira, 1993]. Hierzu wurde die entfärbte PVDF-Membran in kleine Stücke geschnitten und mit 250 µL 0,25 % PVP 40 in Methanol für 30 min inkubiert. Hiernach wurde die Probe mit 250 µL H<sub>2</sub>O versetzt und nach ca. 10 min das Wasser entfernt und weitere 10x mit je 250 µL H<sub>2</sub>O gewaschen. Danach wurde 1x mit 100 mM Tris-HCl, pH 9,0; 1 mM EDTA, 0,1% Triton X-100 gewaschen und anschließend wieder in 100 µL Puffer aufgenommen. Nun setzte man die Endoprotease LysC (*Achromobacta lyticus*, Wako) in Verhältnis 1:10 hinzu und inkubiert den Spaltungsansatz 15 h bei 30 °C. Zum Beenden des Spaltungsansatzes wurden 100 µL 80 % Ameisensäure für 45 min hinzugesetzt. Vor der Auftrennung der Peptidfragmente auf der HPLC wurde der Spaltungsansatz mit 800 µL H<sub>2</sub>O verdünnt.

### 2.3.10. AUFTRENNUNG UND SEQUENZIERUNG DER PEPTIDE

Die Auftrennung erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Herrn PD Dr. H. Thole am MPI für Endokrinologie in Hannover.

Die HPLC Anlage war folgendermaßen ausgestattet:

- Pumpe von Applied Biosystem 140B Solvent Delivery System
- 500 µL Probenschleife
- HPLC-Säule: MZ-Microcolumn von Analysetechnik Mainz, 250 mm x 1,0 mm, VYDAC 218TP 5µm. Serien Nummer 1721182 + Vorsäule
- Detektor von Applied Biosystems 785A Programmable Absorbance Detector, Wavelength 215 nm, Range 0,2, Lamp: high
- Schreiber von Kipp & Zonen, Dual Schreiber (ANALOG). 10 mV (blau)/ 50 mV (rot), 2 mm/min

Folgendes Eluierungsprofil wurde verwendet, hierbei wird nur der Eluent B angegeben. A errechnet sich aus 100 % minus B %:

1,0 % bis 10 % B bis 1 Minute  
10 % bis 20 % bis in 15 Minute  
75 % B bis in 75 Minute  
80 % B bis in 90 Minute  
99 % B bis in 100 Minute  
100 % B für 4 Minuten  
0 % B für 1 Minute  
gesamt: 105 Minuten

Als Eluenten/Lösungsmittelgemische wurden verwendet A (H<sub>2</sub>O mit 0,1 % TFA) und B (20 % H<sub>2</sub>O; 60 % Acetonitril; 10 % Isopropanol; 0,085 % TFA) bei einer Flussrate von 60 µL/min. Aufgetragen wurden 2x 500 µL, wobei die Anlage zuvor 2x ohne Probe laufen gelassen wurde, um die Säule vorzubereiten.

Fractionen wurden nach Anstieg/Abfall des Detektorschreibers aufgefangen und in 1,5 mL Eppendorfreaktionsgefäßen gesammelt. Etwa 40 Peaks wurden gesammelt. Probe Nr. 6 ist nicht mit eingefroren, sondern verworfen worden.

Die gesammelten Fractionen wurden bei -80 °C eingefroren und für die Sequenzierung nach Edman [1950] an Herrn PD Dr. H. Thole, MH Hannover übergeben. Die Sequenzierung wurde mit einem Flüssigphasen Sequenzer Modell 477A der Firma Applied Biosystems durchgeführt.

### 2.3.11. 2D-GELELEKTROPHORESE

Zur Analyse der Proteine in der 2D-Gelelektrophorese [O'Farrel, 1975; Cordewell et al, 2000] wurde zuerst eine IEF an immobilisierten IPG-strips [Görg, 1988; Bjellqvist, 1982] mit dem IPG-Phor Gerät von Pharmacia [Pharmacia, IPGphor-System; Berkelman and Stenstedt, 1998] und anschließend eine SDS-PAGE mit dem Criterion System durchgeführt.

Die Proben für die IEF müssen möglichst sauber sein und dürfen nur wenige Salze enthalten. Die 2D-Gelelektrophorese wird exemplarisch für die Auftrennung von Proteinen der Guttationsflüssigkeit beschrieben.

Zuerst wurde mit Hilfe des Bio-Rad Assays die Proteinkonzentration bestimmt und 70 µg Protein eingesetzt (ca. 325 µL Probe), die mit einer Endkonzentration von 80 % Aceton bei -20 °C für 2 h gefällt wurden. Hiernach wurde die Probe für 10 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde 1x mit 2 mL eiskaltem 80 % Aceton gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 190 µL 2D-Probenpuffer (für 5 mL: 3 g Harnstoff; 100 mg CHAPS; 50 mg DTT; 100 µL IPG pH 3-10; add ddH<sub>2</sub>O 5 mL) aufgenommen.

180 µL der Probe wurden in den Sarkophag gegeben, der IPG-Streifen mit der Gelseite nach unten aufgelegt, die Luftblasen vorsichtig herausgedrückt und der Sarkophag mit einem Deckel verschlossen. Nachdem der Sarkophag auf dem IPG-Phor Gerät positioniert war, wurde das Programm I (1 h 0 V - 6 h 30 V - 6 h 60 V - 1 h 500 V - 1 h 2000 V - 4 h 8000 V) gestartet. Nach 1 h wurde mit 200 µL Öl überschichtet, um Verdunstungen zu vermeiden. Nach Ablauf des Programms zeigte das Gerät eine Voltstundenzahl von 22.000 an (ist ausreichend für gute Fokussierung).

Der Streifen wurde als nächstes aus dem Sarkophag entfernt und sofort in frisch vorbereitete Äquibrierungslösung I (6 M Harnstoff, 30 % w/v Glycerol; 2 % w/v SDS; 0,05 M Tris-HCl pH 8,8 und frisch zugegeben 100 mg DTT pro 10 mL) gegeben und 1x 15 min auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde das DTT durch 1x 15minütiges Inkubieren mit Äquibrierungslösung II (6 M Harnstoff, 30 % w/v Glycerol; 2 % w/v SDS; 0,05 M Tris-HCl pH 8,8 und frisch zugegeben 400 mg Iodoacetamid pro 10 mL) entfernt, welches eine Schmierbildung in der zweiten Dimension vermindert [Görg et al., 1987].

Bevor der IPG-Streifen in das Criterion Gradientengel gelegt wurde, musste der Streifen mit ddH<sub>2</sub>O kurz gewaschen und getrocknet werden. Die Geloberfläche sollte ebenfalls getrocknet werden. Nachdem der Streifen vorsichtig auf die Geloberfläche gelegt wurde, konnte der Streifen mit 0,5 % Agarose (in Laufpuffer und 0,01 % BPB) befestigt werden (Tasche für Marker nicht vergessen). Gleichzeitig mit dem Auftrag des Proteinmarkes wurde die Elektrophorese gestartet, dies verhindert ein Auseinanderlaufen des Markers. Aufgetrennt wurde bei 150 V (ca. 60 mA) für etwa 2 h (bis BPB-Bande exakt aus Gel lief).

Anschließend wurde das Gel entweder mit Silber gefärbt oder für eine Westernblot-Analyse verwendet.

### 2.3.12. DOKUMENTATION

Westernblot-Membranen, Röntgenfilme, EM-Aufnahmen, Coomassie- oder Silbergele wurden mit handelsüblichen Flachbettscannern der Firmen HP, Agfa oder Plustek eingescannt und im \*.tif- oder \*.jpg-Dateiformat gespeichert. Die Bearbeitung erfolgte mit Bildbearbeitungs- oder Graphikprogrammen wie Photopaint oder CorelDraw (Version 9.0).

Ethidiumbromid gefärbte Agarosegele wurden unter UV-Licht mit dem GelDoc 100 System gescannt und mit dem Programm Multianalyst bearbeitet- beide von Bio-Rad. Neben den Laborbucheintragungen wurden die Parameter für Proteinauftrennungen und PCR-Versuche in eigens dafür entwickelte Versuchsdatenblätter notiert. Mit Hilfe dieser Art von Dokumentation können zwei oder mehr Versuche schnell in Bezug auf die Versuchsparameter verglichen werden. Der Aufbau der Datenblätter ist dem Anhang zu entnehmen.

## 2.4. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

### 2.4.1. ISOLIERUNG VON RNA

**Gesamt-RNA** wurde mit der Phenol-Chloroform-Methode (modifiziert nach von Gromoff et al. [1989]) extrahiert.

Zur Isolierung der RNA wurden Blätter, Koleoptilen und Wurzeln sorgfältig unter flüssigem N<sub>2</sub> gemörsert. Pro Ansatz wurde 1 g Material abgewogen (nicht auftauen lassen) und 1,5 mL Extraktionspuffer (0,1 M LiCl; 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA 1% SDS; 1 mM Aurintricarbonsäure (RNase Inhibitor, direkt vor Gebrauch zugeben)) und 1,5 mL Phenol hinzugeben. Beide Lösungen wurden auf 80 °C vorgewärmt. Die Probe wurde ca. 30-50 sec gemischt, das gleiche Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) hinzugeben und erneut ca. 30-50 sec gemischt. Anschließend wurde die Probe für 10 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die obere klare Phase, die sich über der weißen und grünen Phase befindet, wurde in ein neues Gefäß überführt (ca. 1 mL) und das gleiche Volumen 4 M LiCl hinzugeben, gemischt und über Nacht bei -20 °C gefällt. Nach der Inkubation wurde für 10 min bei 14.000 rpm (Eppendorf-tischzentrifuge) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 mL DEPC-ATA ddH<sub>2</sub>O (20 µL DEPC pro 100 mL ddH<sub>2</sub>O mit 100 µM ATA) aufgenommen. Zur Fällung wurden 0,1 Volumenanteile 3 M Natriumacetat pH 5,5, und 2,5 vol 100 % ETOH (-20 °C) hinzugeben, gemischt und für 1 h bei -20 °C inkubiert. Nachfolgend wurde die Probe 15 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und das Pellet in ca. 40 µL DEPC-ATA (100 µM) ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

Zur Kontrolle wurden die RNA-Proben in einem TBE-Gel mit t-RNA als Standard aufgetrennt. Dies wurde wie folgt durchgeführt:

- 1%iges Agarosegel mit TBE (5x TBE-Puffer: Tris 270 g; Borat 137,5 g; EDTA 0,5 M 100 mL; auf 5 L mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen)
- ohne Ethidiumbromid im Gel, da dieses dem Probenpuffer stark verdünnt zugegeben wurde
- Marker tRNA (10 µg/µL) mit 1, 5 und 10 µg pro Spur
- DNA Probenpuffer (5x: 50 % Glycerol; 0,1 % Bromphenolblau; 0,1 % Xylenyanol, 5 mM EDTA)
- 1 und 5 µL RNA-Probe:
  - 1 µL EtBr (1:25 Verdünnung der 10 mg/mL Lösung)
  - 1 bzw. 5 µL Probe bzw. 1 µL (10 µg), 0,5 µL (5 µg) und 1 µL (1:10 verdünnt, so dass 1 µg aufgetragen wurden)
  - 2 µL 5x DNA Probenpuffer
  - 7 µL ddH<sub>2</sub>O mit ATA s.o.

Die Auftrennung wurde zuerst bei ca. 80 V für wenige Minuten durchgeführt, da die tRNA sehr klein ist und schnell läuft. Hierdurch konnte eine ungefähre Mengenbestimmung durchgeführt werden. Nachdem das Gel dokumentiert wurde, konnte die Auftrennung für ca. 30 min fortgeführt und anschließend erneut fotografiert werden.

**Poly(A)-mRNA** wurde in Anlehnung an das von Kloppstech und Schweiger [1976] beschriebene Verfahren isoliert. Hierfür wurde 6 g unter N<sub>2</sub> gemörstertes Material mit 65 mL des 60 °C heißen Aufschlusspuffers (50 mM Tris-HCl pH 9,0; 0,1 M NaCl; 2 % SDS) für 30 min auf einem Schüttler inkubiert. Nachfolgend wurde für 10 min bei 22.000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend mit 1/12 Volumenanteil 4 M NaCl sowie einer in Bindungspuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,4 M NaCl; 1 mM EDTA; 0,1 % SDS) vorliegenden Oligo(dT)-Zellulose Suspension (ca. 0,4 g) gemischt und für 40 min auf einem Schüttler inkubiert, um die Poly(A)-mRNA anzureichern [Pemberton et al., 1975]. Das Zellulosematerial wurde dann für 5 min bei 4300 xg pelletiert und nachfolgend 3x mit Bindungspuffer und 2x mit Säulenpuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1 M NaCl; 1 mM EDTA; 0,2 % SDS) gewaschen. Mit 5 mL 65 °C warmen Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA) im Wasserbad (65 °C) wurde die mRNA von dem Material eluiert und die Zellulose nochmals mit 4 mL nachextrahiert. Zur Fällung der mRNA wurde diese mit 1/20 Volumenanteilen 4 M NaCl-Lösung und 3 Volumenanteilen 96 % Ethanol versetzt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Nach 40minütiger Zentrifugation bei 15.000 rpm (SS34-Rotor) und 4 °C wurde das Pellet in 1,2 mL 70%igen Ethanol mit 0,2 M Natriumacetat resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach einem erneuten Waschriff mit 70%igen Ethanol wurde das Pellet getrocknet und in ca. 50 µL ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte im Photometer (Beckman DU 7500) bei OD<sub>260nm</sub>, wobei 1 OD<sub>260nm</sub> = 40 µg/mL RNA entsprechen.

#### 2.4.2. ISOLIERUNG VON DNA

Die Extraktion von genomischer DNA wurde in Anlehnung an die Methode nach Bernatzky and Tanksley [1986] durchgeführt. Für diese Methode wurden folgende Reagenzien und Lösungen verwendet, der Extraktionspuffer wurde frisch vor der Extraktion angesetzt.

- 1x Pre-Extraktionspuffer: 0,35 M Sorbitol, 0,1 M Tris-HCl pH 7,5, 0,5 mM EDTA
- Sarcosyl: 5 %
- Nucleo-Lysispuffer: 0,2 M Tris, 2 M NaCl, 2 % CTAB
- Chloroform/Oktanol 24:1
- Lagerungspuffer: 80 % Ethanol, 0,5 M Natriumacetat pH 7,0
- Extraktionspuffer: 0,038g Natriumbisulfit, 10 mL 1x Pre-Extraktionspuffer, 4 mL Sarcosyl, 10 mL Nucleo-Lysispuffer.

Zur weiteren DNA-Extraktion wurden 500 mg des in flüssigem Stickstoff gemörsterten Materials mit 300 µL Extraktionspuffer homogenisiert, weitere 400 µL Extraktionspuffer zugeben und 20 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde soviel 24:1 Chloroform:Oktanol-Gemisch zugeben, bis das Reaktionsgefäß gefüllt war. Die Probe wurde kräftig geschüttelt und anschließend 5 min bei maximaler Drehzahl (Eppendorf Tischzentrifuge) zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und in ein neues

Reaktionsgefäß überführt sowie Lagerungspuffer zugegeben, bis das Gefäß voll war. Nach vorsichtigem Mischen wurde erneut für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in der Speedvac getrocknet, in 1 mL 70 % Ethanol zum Waschen aufgenommen und 5 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet getrocknet und in 60 µL ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Probe bei OD<sub>260 nm</sub> und OD<sub>280nm</sub> im Photometer gemessen. Es wurde eine Konzentration von 2,94 mg/mL (total 176 µg) berechnet (1 OD 260 nm = 50 µg/mL), wobei der Quotient aus OD<sub>260 nm</sub> zu OD<sub>280nm</sub> 1,95 war. Dieser Quotient zeigt an, dass die isolierte DNA relativ frei von Proteinverunreinigungen war.

### 2.4.3. SYNTHESE VON cDNA

Die Synthese von cDNA aus RNA wurde mit dem ProSTAR Ultra HF RT-PCR System von Stratagene [1996] durchgeführt. Mit diesem System kann cDNA von 0,1 bis 8 kb Länge amplifiziert werden aus 10 bis 500 ng Gesamt RNA bzw. aus 0,1 bis 10 ng Poly(A)-RNA. Der Kit enthält alle benötigten Komponenten wie z.B. die PfuTurbo DNA Polymerase oder die MMLV-Reverse Transkriptase. Zusätzlich benötigt werden nur die RNA und bei Bedarf genspezifische Primer [Cline et al., 1996]. Im Folgenden wird beschrieben wie cDNA aus etiolierten Koleoptilen mit Oligo(dT) Primern synthetisiert wurde.

Alle Komponenten wurden zunächst kurz zentrifugiert und anschließend wie folgt in ein Reaktionsgefäß pipettiert:

- 5,9 µL RNase-freies Wasser (kein DEPC)
- 1,0 µL 10x MMLV-RT Puffer
- 0,6 µL Oligo(dT) Primer (100 ng/µL)
- 1,0 µL dNTP-Mix (40 mM)
- 1,0 µL der Template RNA (500 ng)

Anmerkungen: neben den Oligo(dT) Primern wurden auch „random hexamer“ und genspezifische Primer (RP3-Horcolin) in einer Konzentration von 100 ng/µL eingesetzt. Zur Berechnung der Template-RNA wurde folgende Angabe zu Grunde gelegt: Gesamt-RNA ca. 200 bis 500 ng, mRNA 0,1 bis 10 ng.

Der Reaktionsansatz wurde kurz gemischt und zentrifugiert. Nachfolgend wurde der Ansatz für 5 min bei 65°C inkubiert und langsam auf RT zum Annealing abgekühlt. Zum Ansatz wurden dann 0,5 µL MMLV-RT (20 U/µL) zugegeben, gemischt, kurz zentrifugiert und für 40 min bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der MMLV-RT wurden die Proben 15 min bei 70 °C inkubiert und die Proben anschließend auf Eis für weitere Versuche verwendet oder bei -20 °C eingefroren.



#### 2.4.4. POLYMERASEKETTENREAKTION

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden anhand ausgewählter Primer DNA-Sequenzen amplifiziert. Zum Einsatz kam die PCR bei der Klonierung von Horcolin, dem Test auf positive Klone nach der Transformation, der Vermehrung von DNA-Sequenzen für Klonierungen, der Bestimmung der Insertausrichtung und der Erzeugung von Sonden für die Southern- bzw. Northern-Analyse [Innis and Gelfand, 1990]. Für die Durchführung der PCR wurde der PTC - 200 Peltier Thermal Cycler von MJ Research verwendet. Dieses Gerät verfügt über eine sogenannte Gradientenfunktion. Hierdurch können Temperaturgradienten für das Annealing programmiert werden und so die optimale Annealingtemperatur bestimmt werden. Das Gerät verfügt weiterhin über die Funktion, eine „touch down“-PCR durchführen zu können. Hierbei wird über ein gewähltes Inkrement die Annealingtemperatur von Zyklus zu Zyklus reduziert. Hierdurch werden spezifische Primer-Template-Paarungen zuerst bevorzugt amplifiziert und anschließend werden diese vorwiegend vermehrt.

Nachfolgend wird exemplarisch eine normale PCR-Durchführung vorgestellt, wie sie auch verwendet wurde. Je nach Art der Primer und des Templates wurden für andere PCR-Versuche die Temperatur und Zeit für das Annealing modifiziert. So weit dies von den Versuchsbedingungen möglich war, wurde ein sogenannter „Hot Start“ durchgeführt. Hierbei wird die Polymerase erst bei Temperaturen oberhalb von 72 °C zugegeben. Hierdurch wird das Risiko der Amplifizierung von falsch gepaarten Primern reduziert, da das Enzym bereits unterhalb von 72 °C aktiv ist.

Für einen Reaktionsansatz von 50 µL wurden 1 µL dNTP-Mix (40 mM- je 10 mM), 10x Polymerasepuffer, 38,5 µL ddH<sub>2</sub>O, 1 µL Forward-Primer (10 µM), 1 µL Reverse-Primer (10 µM) sowie 0,5 µL Template (200 pg/µL) auf Eis zusammen pipettiert, gemischt und zentrifugiert. Nach dem Start der PCR wurden bei einer Temperatur von 94 °C 2,5 µL Red-Tag Polymerase (1 U/µL) zugegeben. Die Red-Tag Polymerase der Firma Sigma enthält einen roten Farbstoff, der eine gute Durchmischung des PCR-Ansatzes mit dem Enzym anzeigt. Überdies kann der PCR-Ansatz sofort auf ein Agarosegel aufgetragen werden, da er die nötige Dichte besitzt, der Farbstoff wandert dem BPB vergleichbar im elektrischem Feld durch das Gel.

Das Protokoll für die PCR sah wie folgt aus:

1. Erste Denaturierung bei 94 °C für 3 min
  2. weitere Denaturierung bei 94 °C für 30 sek
  3. Annealing bei 54 °C für 1 min
  4. Elongation bei 72 °C für 1 min
  5. Finale Elongation bei 72 °C für 10 min
  6. Bis zum Ausschalten des Gerätes 4 °C
- Anzahl der Wiederholungen von 2. bis 4. = 35 Zyklen

Beim Lauf der PCR wurde der Deckel auf 100 °C erhitzt, um Kondensationen zu vermeiden. Deswegen brauchen die Reaktionsansätze auch nicht mit Öl überschichtet

zu werden. Durch die Angabe des Reaktionsvolumens von 50  $\mu\text{L}$  in 200  $\mu\text{L}$  Gefäßen wurden vom Gerät die Heiz- und Kühlzeiten im Reaktionsgefäß berechnet. Im Anhang ist eine PCR-Dokumentation gezeigt, mit deren Hilfe PCR-Versuche geplant und neben den Laborbucheintragungen dokumentiert werden können. Gleichzeitig ist hiermit ein schneller Vergleich verschiedener PCR-Versuche möglich.

**Kolonie-PCR:** Um zu untersuchen, ob ein Insert in der richtigen Orientierung in den Vektor gelangt ist und ob die Transformation mit diesem Konstrukt erfolgreich war, wurden einige positive Klone mit einem Zahnstocher von der Masterplatte in einem PCR-Gefäß ausgestrichen. Nach der Zugabe der Komponenten für die PCR wurde diese durchgeführt und ein 10  $\mu\text{L}$  Aliquot im Agarosegel aufgetrennt. Mit Hilfe von Primern, die an Positionen vor und hinter der Insertionsstelle binden, z.B. T7- und M13-Primer für das pBluescript Plasmid, konnten anhand der Größe der amplifizierten Banden Klone identifiziert werden, die das Insert trugen.

#### 2.4.5. RESTRIKTIONSVERDAU VON DNA

Zum Schneiden von DNA wurden verschiedene Restriktionsenzyme unterschiedlicher Hersteller verwendet (Boehringer, Gibco, MLB). Der Restriktionsverdau wurde sowohl bei der Klonierung von Sequenzen, als auch zur Kontrolle positiver Klone nach erfolgter Transformation verwendet. Auch kann mit dessen Hilfe die Ausrichtung eines Inserts im Plasmid bestimmt werden. Für die Southern-Analyse wurde diese Technik zur Herstellung genomischer DNA-Fragmente verwendet. Es wurden sowohl Einzel- als auch Doppelverdaue mit zwei Restriktionsenzymen eingesetzt.

Exemplarisch für einen Restriktionsverdau wird ein Versuch beschrieben, in welchem genomische DNA für eine Southern-Analyse (siehe Abschnitt 2.4.13) vorbereitet wurde.

Für den Restriktionsverdau wurden 15  $\mu\text{g}$  DNA pro Ansatz mit den Enzymen EcoRI, KpnI, XbaI, XhoI, BamHI und HindIII in den zugeordneten Puffern verdaut. Das Gesamtvolumen pro Reaktion war 200  $\mu\text{L}$ . Hierfür wurden 20  $\mu\text{L}$  der 10x Puffer, 1,5  $\mu\text{L}$  (15 U) Enzym, 5,4  $\mu\text{L}$  DNA (entsprechen 15  $\mu\text{g}$ ) und 173  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O zusammenpipettiert, gemischt, zentrifugiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 20  $\mu\text{L}$  3 M Natriumacetat pH 5,5 und 600  $\mu\text{L}$  100 % Ethanol (-20°) für 1h bei -20 °C gefällt. Nach einer Zentrifugation für 15 min und 4 °C bei maximaler Drehzahl in einer Eppendorf Tischzentrifuge wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 500  $\mu\text{L}$  75 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen und das Pellet 15 min in der Speedvac getrocknet. Das fast getrocknete Pellet wurde in 18  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Anschließend wurden 5  $\mu\text{L}$  5x DNA Probenpuffer zugegeben, gemischt und kurz zentrifugiert. Die Proben wurden hiernach auf ein Agarosegel aufgetragen (120 mL 0,8 % Agarosegel in 1x TBE-Puffer mit 12  $\mu\text{L}$  Ethidiumbromid).

#### **2.4.6. AGAROSEGEL-ELEKTROPHORESE**

DNA und RNA wurden in Agarosegelen aufgetrennt, wobei unterschiedliche Puffersysteme verwendet wurden. Für RNA wird dies im Abschnitt 2.4.15 näher beschrieben. Zur Auftrennung von Plasmiden, PCR-Produkten oder geschnittener DNA wurden Agarosegele in Konzentrationen von 0,8 bis 1,5 % Agarose in TAE-Puffer verwendet (1x TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat pH 8,0; 1 mM EDTA). Nach zweimaligem Aufkochen in einer Mikrowelle und Abkühlen auf 50 bis 60 °C wurden 0,25 µg/mL Ethidiumbromid zugeben und die flüssige Agarose in eine Flachbettkammer gegossen. Nach Entfernung aller Luftblasen konnte der Kamm eingesetzt werden. Nachdem das Gel erstarrt war, wurde es in die Gelkammer gesetzt und der Kamm vorsichtig entfernt. Die Proben werden vor dem Pipettieren in die Taschen mit DNA Probenpuffer (5x: 50 % Glycerol; 0,1 % Bromphenolblau; 0,1 % Xylenyanol, 5 mM EDTA) versehen. Die Trennung wurde bei 5-8 Volt pro cm Gellänge so lange durchgeführt, bis die Farbbande das letzte Viertel des Gels erreicht hatte. Das Gel kann direkt mit der Flachbettkammer auf den UV-Tisch gesetzt und dokumentiert werden. [Sambrook et al., 1989].

#### **2.4.7. EXTRAKTION VON DNA AUS AGAROSEGELEN**

Für die Extraktion von Plasmiden oder PCR-Produkten wurde u.a. der Kit MinElute der Firma Qiagen verwendet. Mit Hilfe dieses Kits können DNA-Banden zwischen 70 bp und 4 kb isoliert werden. Durch den Einsatz von kleinen zentrifugierbaren Säulen, an deren Füllmaterial die DNA bindet, kann die DNA in kurzer Zeit präpariert werden. Für die Extraktion wurde das Protokoll exakt befolgt [Qiagen, MinElute Handbuch].

Neben diesem Kit wurde auch das GeneClean Kit von Dianova eingesetzt. Die Aufreinigung mit dieser Methode dauert länger und hat eine geringere Effizienz als das MinElute System.

Für die PCR mit Templates aus Agarosegelen wurde die DNA nicht extrahiert, sondern mit einer Pipettenspitze ein winziges Stück Gel ausgestanzt und in den PCR Ansatz geben. So konnten PCR-Banden ohne Aufreinigung erfolgreich amplifiziert werden.

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde entweder ein Agarosegel mit verschiedenen Mengen eines bekannten Standards beladen oder eine photometrische Bestimmung bei 260 nm durchgeführt, wobei 1 OD<sub>260nm</sub> einer DNA-Konzentration von 50 µg/mL entspricht. Der Vergleich im Agarosegel ist im Vergleich zur photometrischen Bestimmung wesentlich genauer.

#### **2.4.8. HERSTELLUNG KOMPETENTER E. COLI ZELLEN**

Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurden 1 L LB-Medium mit 1/100 Volumenanteile einer Übernachtskultur angeimpft und so lange bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert, bis die OD<sub>600nm</sub> einen Wert zwischen 0,6 und 0,9 erreicht hatte. Vor der Ernte wurde das Medium auf Eis abgekühlt (ca. 30 min) und anschließend für 15 min bei

4000 xg zentrifugiert (GSA Becher). Das Pellet wurde in der gleichen Menge kalten 1 mM Hepes-Puffer pH 7,0 (bzw. ddH<sub>2</sub>O) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde diesmal in der Hälfte der Menge 1 mM Hepes-Puffer pH 7,0 (bzw. ddH<sub>2</sub>O) aufgenommen und erneut zentrifugiert. Diesmal wurde das Pellet in 20 mL 10 % Glycerol aufgenommen und wieder zentrifugiert. Das Pellet wird in ca. 2 bis 3 mL 10 % Glycerol resuspendiert, wobei die Zellkonzentration bei ca.  $3 \times 10^{10}$  Zellen/mL liegen sollte. 100 µL Aliquots werden sofort in Trockeneis eingefroren und bei -70 °C maximal für 6 Monate gelagert.

#### 2.4.9. LIGATION UND PRÄZIPITATION VON DNA

Zur Ligation von Insert mit Plasmid wurden verschiedene Methoden verwendet, die sich je nach Hersteller des Plasmids unterscheiden.

Exemplarisch wird die Ligation des Horcolin-Inserts in den pT-Adv Vektor von Clontech beschrieben.

Auf Eis wird ein Ansatz aus 5 µL ddH<sub>2</sub>O, 1 µL 10x Ligationspuffer, 2 µL pTAdv Plasmid (25 ng/µL), 1-2 µL PCR-Produkt (ca. 10 ng) und 1 µL T4 Ligase zusammenpipettiert und vorsichtig gemischt. Der Ligationsansatz wird bei 14 °C über Nacht inkubiert.

Zum Entsalzen kann der Ansatz gefällt werden, dies vermindert die Gefahr des Kurzschlusses bei der Elektrotransformation. Hierzu werden 10 µL Ligationsansatz, 5 µL 3M Natriumacetat pH 5,5, 1 µL t-RNA (10 mg/mL) zusammenpipettiert und auf 50 µL mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt und gemischt. Zur Fällung werden 125 µL -20 °C 100 % Ethanol hinzugeben und mindestens für 30 min bei -20 °C gefällt. Anschließend wird 15 min bei 14.000 rpm (Tischzentrifuge) zentrifugiert, der Überstand verworfen und 200 µL 75 % Ethanol (RT) hinzugeben, gemischt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wird erneut verworfen, das Pellet getrocknet (Speedvac) und anschließend in 8 µL ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### 2.4.10. TRANSFORMATION VON BAKTERIEN

Für die Transformation von Bakterien mit Plasmiden wurde sowohl die Hitzeschock-Methode als auch die Elektroporations-Methode verwendet. Erstere u.a. für die Transformation von TOP10F' *E. coli* Zellen mit dem pTAdv Vektor und letztere u.a. für die Transformation von XL-1 blue Zellen mit dem pBluescript oder dem pGEM Vektor.

**Hitzeschock-Methode:** Hierfür wurden 100 µL TOP10F *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut, 1 bis 2 µL des Ligationsansatzes hinzugegeben und sehr vorsichtig gemischt (Antippen mit Finger). Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz für exakt 30 Sekunden im Wasserbad bei 42 °C inkubiert (Achtung: nicht mixen). Nach erneuter Inkubation für 2 min auf Eis wurden 1 mL SOC-Medium (2 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; autoklavieren; 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 10 mM MgCl<sub>2</sub> getrennt autoklavieren; 20 mM Glucose) zugegeben (normales LB-

Medium ohne Antibiotika kann auch genommen werden; auf Luftversorgung achten). Nach einer Stunde im Schüttler bei 37 °C kann der Ansatz ausplattiert werden.

**Elektroporations-Methode:** Für die Transformation werden 0,5 bis 1,0 µL des Ligationsansatzes verwendet. Der Ligationsansatz wird hierfür in eine Elektroporationsküvette pipettiert und 50 µL *E. coli* (XL-1 blue) hinzugeben, der Startknopf am Bio-Rad MicroPulser betätigt (Einstellung: bacteria) und 1 mL LB (ohne Antibiotikum) zugeben, gemischt und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Danach erfolgt eine Inkubation für 1 h bei 37 °C im Wasserband oder im Schüttler. Anschließend können die Zellen ausplattiert werden.

### 2.4.11. KULTUR VON BAKTERIEN

Zur Kultur von *E. coli* Bakterien wurden diese sowohl in Flüssigkeit als auch auf festen Nährböden angezogen. Als Kulturmedium wurde hierfür überwiegend Luria Broth (LB) verwendet und die Bakterien bei 37 °C auf dem Schüttler oder im Brutschrank bei ausreichender Sauerstoffversorgung inkubiert.

**Flüssigkultur:** Kleinere Mengen (2 bis 20 mL) wurden durch Animpfen von LB-Medium (1 L: 10 g Bacto Trypton; 10 g NaCl; 10 g Bacto Hefeextrakt; pH 7,5; autoklaviert) mit Einzelkulturen als Übernachtskultur im Schüttler (180 bis 200 rpm) angezogen. Größere Volumina von z.B. 1 L wurden mit 20 mL Vorkultur angeimpft und bei 37 °C in Schikanekolben auf dem Schüttler inkubiert.

**Feste Nährböden:** Für einen LB-Agar wurde LB-Medium mit 1,2 % w/v Bacto-Agar gemischt, autoklaviert und auf handelsübliche Petrischalen verteilt. Diese wurden nach dem Erstarren kopfüber bei 4 °C gelagert.

**Antibiotikazusatz:** Um ein selektives Wachstum zu ermöglichen wurden dem auf 50 – 60 °C abgekühlten LB-Medium bzw. LB-Agar Antibiotika zugeben. Ampicillin und Kanamycin wurden ausgehend von einer 100 mg/mL Stammlösung bei Bedarf in einer 1.000fachen bzw. 2.000fachen Verdünnung zugeben.

**Blau/weiß Selektionsnährböden:** Zur Identifikation positiver Klone wurde neben der Verwendung selektiver Nährböden auch das blau/weiß Screening verwendet, wobei weiße Kolonien mit höherer Wahrscheinlichkeit die klonierte Sequenz inseriert hatten. Für dieses Verfahren wurde auf LB-Platten ein Gemisch aus IPTG (0,1 mM und 40 µg/mL X-Gal) verteilt, getrocknet und anschließend wurden die transformierten Bakterien ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C sowie für 4 h bei 4 °C konnte zwischen blauen und weißen Kolonien unterschieden werden. Weiße und hellblaue Einzelkolonien wurden für die Kolonie-PCR oder eine Restriktionsanalyse von amplifizierten Plasmiden weiterwendet.

**Glycerinkultur:** Zur dauerhaften Aufbewahrung von *E. coli* Zellen wurden 0,5 mL einer Übernachtskultur mit 1 mL sterilem 87%igen Glycerol gemischt, 10 min bei RT inkubiert und bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### 2.4.12. PLASMIDPRÄPARATIONEN

Zur Präparation von Plasmiden aus Bakterien wurden verschiedene Methoden verwendet. Sollte eine Klonierung und Transformation mit Hilfe der Restriktionsanalyse überprüft werden, so wurden die Plasmide über HB-Lyse isoliert. Für die Sequenzierung von Plasmiden ist es notwendig, dass diese in besonders reiner Form vorliegen. Hierzu wurden diese mit einem Midi-Plasmid Kit der Firma Qiagen [Qiagen Midi-/Maxiprep] aufgereinigt. Wurden kleinere Mengen an sauberen Plasmiden benötigt, so wurde ein Mini-Plasmid Kit [Qiagen Miniprep] der selben Firma verwendet. Die Aufreinigungen erfolgten exakt nach den Vorschriften

Für die HB-Lyse von *E. coli* Zellen wurden ca. 2 mL Übernachtskultur bei 7000 xg zentrifugiert und 300  $\mu\text{L}$  Puffer I (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  RNase) zugegeben, gemischt und 300  $\mu\text{L}$  Puffer 2 (200 mM NaOH; 1 % SDS) zugegeben, vorsichtig überkopf gedreht und 5 min bei RT inkubiert. Hiernach wurden 300  $\mu\text{L}$  Puffer 3 (3 M Kaliumacetat pH 5,0) zum Neutralisieren zugegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde bei 15.000 rpm (Tischzentrifuge) zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dieser Schritt wiederholt. 400  $\mu\text{L}$  Überstand wurden nachfolgend mit 700  $\mu\text{L}$  Isopropanol versetzt, sehr vorsichtig gemischt und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde dann mit 500  $\mu\text{L}$  70%igen Ethanol ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) versetzt und nach dem Vermischen für 10 min erneut zentrifugiert bei 15.000 rpm. Nachdem der Überstand vorsichtig entfernt und das Pellet getrocknet worden war, konnte es in 50  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O aufgenommen werden.

#### 2.4.13. SOUTHERNBLOT-ANALYSE

Die Analyse der im Genom vorhandenen Kopienzahl des Gens für Horcolin sollte durch die Southernblot-Analyse erfolgen. Genomische DNA wurde hierfür aus Gerste isoliert (Abschnitt 2.4.2) und mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen verdaut (Abschnitt 2.4.5).

Nachdem die DNA im Agarosegel aufgetrennt wurde, musste sie zunächst denaturiert werden. Dies erhöht die Effizienz des Transfers auf die Nylonmembran. Hierfür wurde das Gel auf dem Schüttler mit 0,25 M HCl für 35 min inkubiert. Als nächster Schritt wurde die DNA 60 min mit 0,5 M NaOH und 1,5 M NaCl bei RT auf dem Schüttler denaturiert. Zum Neutralisieren wurde das Gel anschließend in 0,5 M Tris-HCl pH 8,0 und 1,5 M NaCl für 60 min inkubiert.

Zum Transfer der DNA auf die Nylonmembran (Hybond N) wurde folgende Apparatur verwendet:

Auf eine Glasplatte, die auf einer Kunststoffschale mit 5x SSC (20x SSC: 3 M NaCl, 300 mM Natriumcitrat-2-Hydrat, pH 7,0) lag, wurden zwei Streifen Filterpapier

(Whatman 3MM) so übereinander plziert, dass beide Enden des Papiers in Puffer lagen. In der Mitte der Glasplatte wurden anschließend drei weitere Filterpapiere gelegt, die die gleiche Größe wie das Gel besaßen. Auf diese wurde dann das Gel gelegt und hierauf luftblasenfrei die Nylonmembran plziert. Nachdem drei weitere Filterpapiere auf die Membran gelegt wurden, konnte ein Stapel von saugfähigem Papier und abschließend eine Glasplatte hierauf gelegt werden. Beschwer wurde der Versuchsaufbau mit einem ca. 500 g schweren Katalog. Nach 24 h wurde die Transferapparatur abgebaut, die Nylonmembran an der Luft getrocknet und anschließend die DNA durch 2minütige UV-Bestrahlung (UV-Transilluminator, 302 nm, ca. 120 mJoul) fixiert [Sambrook et al., 1989].

**Hybridisierung:** Die Nylonmembran wurde zunächst ohne radioaktive Sonde für 2 h bei 42 °C auf einem Schüttler mit Hybridisierungslösung (50 % v/v Formamid; 5x SSC; 1 % SDS w/v; 100 µg/mL Lachssperma-DNA und 5x Denhardts (50x Denhardts: 1 % Ficoll; 1 % BSA, 1 % PVP) vorhybridisiert. Nach dieser Zeit wurde die Sonde in die Hybridisierungslösung gegeben und über Nacht auf dem Schüttler bei 42 °C inkubiert. Die Membran wurde anschließend gewaschen: einmal in 5x SSC und 1 % SDS für 30 min bei 42 °C, zweimal mit 0,2x SSC und 1 % SDS für 15 min bei 42 °C sowie zweimal mit 0,2x SSC und 1 % SDS für 15 min bei 65 °C. Bei den letzten Waschschrten wurde keine Radioaktivität mehr in der Waschlösung gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Phosphorimagers BAS 100 der Firma Fuji, indem die in Folie eingewickelte Membran für 6 h auf die Detektionsplatte exponiert und anschließend ausgelesen wurde.

#### **2.4.14. RADIOAKTIVE DNA-MARKIERUNG**

Zur Doppelstrang-Markierung von DNA wurde das Prime-it-II-Kit von Stratagene verwendet. Hierbei wurden durch das „random-priming“ Verfahren, der Verwendung von <sup>32</sup>P-dCTP Nukleotiden und dem Einsatz von Horcolin cDNA radioaktiv markierte Sonden hergestellt, die für Northernblot- und Southernblot-Analysen eingesetzt wurden.

Es wurde nach den Vorgaben des Herstellers verfahren. Für die Reaktion wurden ca. 2 MBq <sup>32</sup>P-dCTP (5 µL) und 100 ng einer 445 bp Horcolin cDNA-Sequenz, die per PCR amplifiziert wurde, verwendet.

Die Trennung von markierter Sonde und den radioaktiven Nukleotiden wurde mit einer selbstgebauten Säule durchgeführt. Hierzu wurde ein 1,5 mL Eppendorfgefäß am Boden durchlöchert (Spritzenkanüle) und dieses Loch mit Glaswolle bedeckt. In dieses Gefäß wurden 1 mL Sephadex G-25 Suspension gefüllt, auf ein weiteres Eppendorfgefäß gesetzt und exakt 2 min bei 6.000 rpm (Eppendorftischzentrifuge) zentrifugiert. Mit einem neuen Gefäß versehen wurde der Markierungsansatz anschließend auf die Sephadexsäule pipettiert und erneut zentrifugiert. Das Eluat der Säule konnte nun direkt für die Hybridisierungsreaktion verwendet werden, musste jedoch kurz aufgeköcht werden, um die DNA-Stränge zu trennen.

### 2.4.15. NORTHERNBLOT-ANALYSE

Der Nachweis von Horcolin mRNA in Wurzeln, Koleoptilen und Primärblättern erfolgte durch die Northernblot-Analyse. Die Analyse wurde mit Gesamt-RNA (Abschnitt 2.4.1) der jeweiligen Gewebe und der radioaktiv markierten Horcolin-Sonde (Abschnitt 2.4.14) durchgeführt.

Für die Auftrennung der RNA im denaturierenden Agarosegel wurden 1 bis 5 µL Gesamt-RNA mit 10 bis 15 µL RNA-Probenpuffer (5 Teile: 1x MOPS pH 7,0; 6,5 % Formaldehyd; 50 % Formamid mit 1 Teil: 50 % Glycerol, 1 mM EDTA; 0,25 % BPB, pH 8,0 vermischt) (MOPS-Puffer 10x: 0,2 M MOPS; 50 mM Natriumacetat; 10 mM EDTA; bei 4 °C aufbewahren) gemischt. Um die rRNA visualisieren zu können, wurde dem Puffer EtBr (final 0,5 µg/mL) zugegeben. Das denaturierende RNA-Gel wurde wie folgt hergestellt: für 120 mL Gel wurden 88 mL ddH<sub>2</sub>O mit 1,2 g Agarose aufgeköcht, 12 mL MOPS-Gelpuffer (20 mM MOPS; 5 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA; pH 8,0; 10 % Formaldehyd) zugegeben. Nachdem die flüssige Agarose auf 55 °C bis 65 °C abgekühlt war, wurden 20 mL Formaldehyd (siehe MOPS-Gelpuffer) zugeben und in die Flachbettkammer gegossen.

Zum Vorlauf des Gels wurde eine Spannung von 4 V/cm für 20 bis 30 min angelegt, die Proben bei 60-70 °C für 5 min denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung in MOPS-Laufpuffer (20 mM MOPS; 5 mM Natriumacetat; pH 7,0; 1 mM EDTA; 10 % Formaldehyd) erfolgte für 2 h bei 4 V/cm. Nach dem Lauf wurde die RNA durch Kapillartransfer (vgl. Abschnitt 2.4.13) auf eine Hybond N Membran übertragen. Das Gel wurde hierzu mit der Oberfläche nach unten auf die Membran gelegt, für den Transfer wurde 5x SSC verwendet. Nach 24 h wurde die RNA durch UV-Crosslinking an die Membran fixiert.

Die Membran wurde bei 42 °C für 2 h vorhybridisiert und nachfolgend die Horcolin-Sonde für die Hybridisierung zugeben und bei der gleichen Temperatur für 24 h auf dem Schüttler inkubiert. Nach dem Waschen unter stringenten Bedingungen wurde die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen und mit Hilfe eines Phosphorimagers ausgewertet (vgl. Abschnitt 2.4.13).

### 2.4.16. HERSTELLUNG VON REKOMBINANTEM HORCOLIN

Die klonierte cDNA von Horcolin wurde für die Synthese von rekombinantem Protein verwendet. Das Protein wurde hierfür mit einem His-Tag versehen und in *E. coli* überexprimiert. Für die Arbeiten wurde das System „The QIAExpressionist“ der Firma Qiagen verwendet, das alle benötigten Bakterienstämme und Vektoren für die Klonierung sowie Ni-Agarose und Chemikalien für Überexpression und Aufreinigung enthält. Nachfolgend wird die gewählte Vorgehensweise erläutert. Bei der Versuchsdurchführung wurde exakt nach den Herstellerangaben vorgegangen, das mitgelieferte Handbuch enthält alle nötigen Vorschriften, Details und Hilfestellungen [Qiagen, The QIAExpressionist, Handbook].

Für die Klonierung wurde der pQE30-Vektor verwendet, der im 5' Bereich der MCS über eine RGS-His Sequenz sowie im 3' Bereich über ein Stopcodon in allen drei



Leserahmen verfügt. Mit Hilfe der PCR und den Primern FP1-Horcolin und RP3-Horcolin, die in Anlehnung zu der cDNA von Horcolin mit einer BamHI und HindIII Restriktionsschnittstelle entworfen worden waren, wurde ein 445 bp großes Fragment amplifiziert. Als Polymerase wurde die BIO-X-Act-DNA-Polymerase der Firma BIOLINE verwendet, da diese über eine sehr geringe Fehlerrate verfügt.

Die erhaltene PCR-Bande wurde aus dem Agarosegel isoliert, die DNA-Konzentration im Gel bestimmt, in das pGEM-Plasmid kloniert und in *E. coli* XL-1 blue transformiert. Nach der Identifikation positiver Klone mit Hilfe der Kolonie-PCR wurde ein Klon amplifiziert und das Plasmid isoliert. In einem parallelen Ansatz wurde das pGEM-Plasmid und das pQE30-Plasmid mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII doppelverdaut und das Horcolin-Fragment und das linearisierte pQE30-Plasmid aus dem Gel isoliert. Nach erfolgter Ligation dieser Sequenzen wurde ein *E. coli* XL-1 blue Stamm mit diesem Konstrukt transformiert. Positiv identifizierte Klone (Kolonie-PCR) wurden amplifiziert, die Plasmide isoliert und für eine Restriktionsanalyse verwendet, um die Orientierung des Inserts zu bestimmen. Ein als geeignet identifizierter Klon wurde nachfolgend amplifiziert und das pQE30-Plasmid isoliert. Der hitzekompetente *E. coli* Stamm M15, der zur Verhinderung einer frühzeitigen Proteinexpression ein zusätzliches pREP4-Plasmid enthält, wurde mit dem isolierten pQE30-Plasmid transformiert. Nach erneutem Test der nach der Transformation gewachsenen Kolonien wurde hiervon eine für die Überexpression ausgewählt.

Für die Überexpression des rekombinanten Horcolin wurde 1 L LB-Medium mit 20 mL Vorkultur angeimpft. Nachdem eine  $OD_{600nm}$  von 0,6 erreicht worden war, wurde mit 1 mM IPTG die Expression des Proteins induziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde der Kultur eine Probe entnommen, diese im Photometer untersucht und die Proben anschließend für eine Analyse im Westernblot sowie für eine Coomassie-Färbung vorbereitet.

Die geernteten Bakterien wurden dem Protokoll zur Aufreinigung von rekombinantem Protein unter nativen Bedingungen folgend aufgeschlossen und das so erhaltene klare Lysat für die Affinitätschromatographie mit Ni-Agarose eingesetzt. Abweichend vom sonst eingehaltenen Protokoll für eine native Batch-Aufreinigung wurden folgende Puffer verwendet:

- Lysispuffer (250 mL): 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0 mit HCl einstellen
- Waschpuffer (250 mL): 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0 mit HCl einstellen
- Eluierungspuffer (250 mL): 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0 mit HCl einstellen

Ein Aliquot des erhaltenen Eluats sowie des Lysates und der Waschfraktionen wurden mit TCA gefällt und für eine Analyse im Westernblot mit dem Anti-RGB-His-Antikörper bzw. dem Anti-HL#2-Antikörper und für eine SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung verwendet.

Zur weiteren Aufreinigung wurde das Eluat nach Umpufferung (u.a. um das Imidazol zu entfernen) für eine Affinitätschromatographie mit Mannose-Agarose eingesetzt. Hierfür wurde die Agarose-Matrix mit 50 mM Tris-HCl pH 7,2 gewaschen, anschließend das auf den gleichen Puffer umgepufferte Eluat auf die Matrix gegeben und für 60 min bei

RT auf dem Schüttler inkubiert. Nachdem dreimal mit dem 10fachen Säulenvolumen mit 50 mM Tris-HCl pH 7,2 gewaschen worden war, konnte das Protein mit einem 100 mM Citratpuffer pH 2,8 eluiert werden. Die Agarose-Matrix wurde anschließend noch einmal mit 50 mM Tris-HCl pH 7,2 gewaschen und danach mit dem doppelten Säulenvolumen 1x SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C inkubiert. Dieser Schritt sollte nicht eluiertes Protein von der Matrix lösen.

## **2.5. FUNKTIONSBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN**

Für die Aufklärung der Funktionen von Horcolin und HL#2 wurden verschiedene Tests durchgeführt. Hierzu zählten u.a. Bindungsstudien mit unterschiedlichen Zuckern, die gebunden an eine Matrix vorliegen bzw. Versuche, die die Hämagglutinationsfähigkeit des rekombinanten Horcolin testeten.

### **2.5.1. LEKTINBINDUNGS-TEST**

Die Bindung von Proteinen an immobilisierte Zucker ist ein Nachweis zur Klassifizierung von Proteinen, die zur Familie der Lektine gehören. Für einen solchen Bindungs-Test wurden sowohl native Extrakte, die Horcolin und HL#2 enthalten, als auch das rekombinante Protein verwendet.

Für einen Test mit nativem Protein wurden aus Koleoptilen und Primärblättern von Gerstenpflanzen saure Extrakte gewonnen. Hierzu wurden 10 g Material mit 50 mL Extraktionspuffer L (100 mM Citronensäure; 100 mM NaCl; 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 2,9) in einem Haushaltsmixer homogenisiert. Nach zweimaliger Zentrifugation für 15 min bei 5000 xg zur Entfernung von Zellfragmenten wurde der klare Überstand 2fach mit einem Viviaspinkonzentrator eingengt. Anschließend wurde der pH mit NaOH auf 7,2 eingestellt.

Für den Test wurden 400 µL der jeweiligen Zucker-Matrizes (Galaktose-, Mannose-, Mannan- und Maltose-Agarose der Firma Sigma) eingesetzt. Die Zucker-Matrix wurde mit 10fachem Volumen an Bindungspuffer (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 1mM NaCl<sub>2</sub>, pH 7,2 mit HCl) vorgewaschen. Nachdem der Waschpuffer entfernt wurde (Matrix wird bei 5000 xg sedimentiert), wurden 3,7 mL Rohextrakt, bzw. 1,5 mL des Eluates der Aufreinigung vom rekombinanten Horcolin auf die Matrix gegeben. Nach 60minütiger Inkubation bei RT auf einem Schüttler wurde die Matrix erneut sedimentiert und der Überstand abgenommen. Nachfolgend wurde die Matrix mit Bindungspuffer 3x mit einem 12fachen des Matrixvolumens gewaschen. Zum Eluieren der gebundenen Lektine wurde die Matrix für 10 min mit einem Matrixvolumen Eluierungspuffer L (100 mM Zitronensäure; 100 mM NaCl; 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 2,4) auf dem Schüttler inkubiert. Durch erneute Sedimentation der Matrix konnte das Eluat abgenommen werden. Hiernach wurden 400 µL 1x SDS-Probenpuffer zum Nachextrahieren zugeben und das Ganze für 10 min gekocht. Aliquots des Rohextraktes vor und nach Bindung sowie der Eluate mit Zitronensäure und 1x DS-Probenpuffer wurden mit 80 % Aceton gefällt und im Westernblot mit Anti-HL#2-Antikörper und dem Anti-RGB-His-Antikörper sowie im Silbergel untersucht.

### **2.5.2. HÄMAGGLUTINATIONS-TEST**

Mit diesem Test sollte getestet werden, ob das rekombinante Horcolin in der Lage ist, rote Blutkörperchen zu agglutinieren. Für diesen Versuch wurden wenige mL Kaninchenblut verwendet, das bei der Gewinnung von Antikörperseren anfiel. Das Blut wurde freundlicherweise vom Tierhaus des „Departments of Biology“ des Technions in Haifa zur Verfügung gestellt.

Für den Test wurde aus dem Blut mit PBS (1L: 0,2 g KCl; 8,0 g NaCl; 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1,15 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,4, steril filtriert) eine 2 % Lösung hergestellt. In einer handelsüblichen 96-Well Mikrotiterplatte wurden 50  $\mu\text{L}$  vom rekombinanten Horcolin, von der Guttationsflüssigkeit sowie von einer ConA-Lösung als Positivkontrolle 1:10 Verdünnungen (in PBS) pipettiert [Ayoub, 1993]. Anschließend wurden 50  $\mu\text{L}$  der Erythrozytenlösung hinzu pipettiert. Als Negativkontrolle wurden 50  $\mu\text{L}$  PBS mit 50  $\mu\text{L}$  Erythrozytenlösung verwendet. Nach vorsichtigen Schütteln der Platte wurde diese bei RT für 2 h stehen gelassen. Zur Auswertung wurde diese Platte mit einem normalen Flachbettscanner aufgenommen.

### **2.6. EM-LOKALISATION VON HORCOLIN UND HL#2**

Die Lokalisation von Horcolin und HL#2 mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. D. Neuman am IPB in Halle durchgeführt. Für die EM-Aufnahmen wurden etiolierte und unter Licht gewachsene Koleoptilen und Primärblätter von Gerste verwendet. Als primäre Antikörper wurden der Anti-HL#2-Antikörper, der Horcolin und HL#2 erkennt, und der Peptidantikörper, der nur HL#2 erkennt, eingesetzt. Durch die Kombination von Antikörpern und etiolierten bzw. unter Licht gewachsener Koleoptilen bzw. Primärblätter sollte eine Unterscheidung zwischen Horcolin und HL#2 erzielt werden. Hierfür wurden kleine Stücke der Blätter mit Koleoptilen für 3 h mit 4 % Formaldehyd fixiert, in einer Serie von Ethanolbehandlungen dehydriert und bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  in Lowicryl K4M (PLANO, Wetzlar) eingebettet. Ultradünnschnitte wurden anschließend mit 0,5 % BSA, 0,1 % Gelatine 0,5 % Tween-20 blockiert und 12 h mit den primären Antikörpern bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach Waschen mit PBS, 0,5 % BSA, 0,1 % Gelatine und 0,5 % Tween-20 wurden die Schnitte mit einem Protein A / 15 nm Gold-Konjugat (Aurion, Wageningen, Niederlande) für 1 h behandelt. Anschließend wurden die Schnitte mit einer 5%igen wässrigen Uranylacetatlösung für 20 h behandelt, getrocknet und im Transmissionselektronenmikroskop (LEO 912 OMEGA, LEO Elektronenmikroskopie GmbH, Oberkochen) betrachtet und dokumentiert.

### **2.7. METHODEN DER BIOINFORMATIK**

Zur Datenbankrecherche wurden hauptsächlich die NCBI-Datenbanken verwendet, die unter der Internetadresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> zu erreichen sind. DNA- und Protein-Sequenzvergleiche wurden hierbei mit den Programmen FASTA [Pearson und Lipman, 1988] und BLAST [Basic Local Alignment Search Tool, Altschul et al., 1990] durchgeführt.

Für Literaturrechen wurden neben der Datenbank „Web of Science“, zu erreichen über die Internetseiten der Technischen-Informations- Bibliothek der Universität Hannover, auch die PubMed-Datenbank des NCBI verwendet ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Um Strukturdaten zu erhalten, die für die Modellierung von 3D-Graphiken benötigt werden, bietet die Bookhavn Protein Database eine umfangreiche Datenbank (<http://www.rcsb.org/pdb/index.html>).

Benötigte pdb-Dateien, die für die 3D-Darstellung notwendig sind, wurden über FAMS (<http://physchem.pharm.kitasato-u.ac.jp/FAMS/fams.html>), über den ICRF-Server <http://www.bmm.icnet.uk/~3dpssm/> oder über das Programm Geno3D (<http://geno3d-pbil.ibcp.fr/>) modelliert.

Auf den Internetseiten des ExPASy-Servers wurden die Programme ClustalW (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>) für Sequenzalignments, PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp/>) und SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) für die Identifizierung von Targeting-Sequenzen [Emanuelsson et al., 2000; von Heijne, 1990] und Prosite (<http://www.expasy.ch/tools/scnpsite.html>) zur Erkennung möglicher Modifikationssequenzen verwendet. Mit Hilfe des Programms ProteinIdent ([http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html)) war es möglich, Aussagen zum pI und zum errechneten Molekulargewicht zu erhalten. Zur Analyse von 2D-Strukturen wurden die Programme Jpred (<http://barton.ebi.ac.uk/servers/jpred.html>), Predator ([http://www.embl-heidelberg.de/cgi/predator\\_serv.pl](http://www.embl-heidelberg.de/cgi/predator_serv.pl)) und Psipred (<http://insulin.brunel.ac.uk/psipred/>) verwendet.

Fast alle der genannten Programme, Internetseiten bzw. Links sind über die ExPASy-Internetseite <http://www.expasy.ch/tools/> zu erreichen. Zur Suche nach allgemeinen Begriffen wurde die Suchmaschine Metager des RRZN Hannovers (<http://www.metager.de>) sowie die hervorragende Ergebnisse liefernde Suchmaschine Google (<http://www.google.com>) verwendet.

Des Weiteren wurden zur Bearbeitung von Protein- und Nukleotidsequenzen die Programme Omega (Version 1.1.3, Oxford Molecular Ltd), DNA-Star (DNA-Star Inc.), ClonManager (Sci Ed Central) und Primer eingesetzt. Die Bearbeitung von Graphik-Dateien wurde mit den Programmen Photopaint und CorelDraw 9.0 (Corel Cooperation) durchgeführt. 3D-Modelle wurde anhand von pdb-Dateien mit dem Programm WebLab Viewer (MSI Inc.) erzeugt.

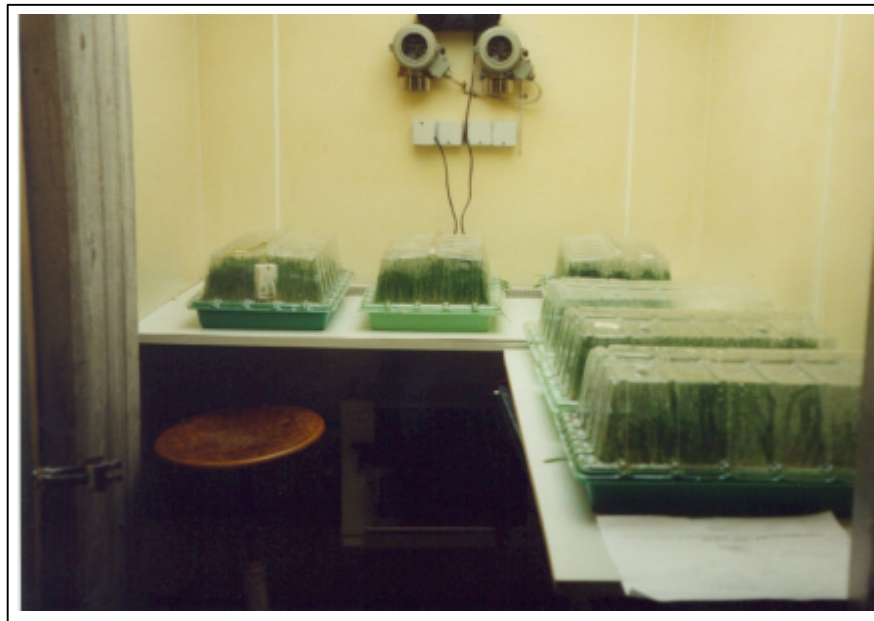
### **2.8. ANALYSE DER GUTTATIONSFLÜSSIGKEIT**

Die Guttationsflüssigkeit sollte in bezug auf ihre Proteinzusammensetzung untersucht werden. Hierzu mussten zunächst experimentell geeignete Bedingungen für die Pflanzenanzucht und Ernte der Flüssigkeit getestet werden.

#### **2.8.1. PFLANZENANZUCHT UND ERNTE**

Für die Anzucht von Gerstenpflanzen wurden spezielle Schalen verwendet, die mit Kunststoffhauben abgedeckt werden konnten. Ausgebracht wurden die Gerstensamen auf dem Mineralgemisch Vermiculit, das den Wurzel Halt bietet und sie mit Wasser

versorgt (siehe hierzu auch Abschnitt 2.2). Nach ca. drei Tagen durchbrachen die Sämlinge die sie bedeckende Vermiculitschicht. Zuerst erschienen die Koleoptilen, welche schon ausgeprägte Guttationstropfen ausbildeten. Einige Stunden später durchbrachen dann die Primärblätter die sie schützend umgebene Koleoptile. Je nach Anzuchtbedingung konnten vom 3. bis zum 7. Tag sowohl von den Primärblättern als auch von den Koleoptilen Guttationstropfen gesammelt werden (siehe Abb. 2.1). Von den Blättern konnten solange Tropfen geerntet werden, bis diese an die Haube stießen.



**Abb. 2.1: Pflanzschalen mit guttierenden Gerstenpflanzen**

Sowohl an der Koleoptile als auch am Blatt können Tropfen geerntet werden, wobei dies nur möglich ist, wenn die Abdeckhauben auf den Pflanzschalen plaziert sind. Im linken Mini-Gewächshaus ist als weißer Kasten der Messfühler zu erkennen.

Die Ernte der Tropfen erfolgte mit einer eigens hierfür konstruierten Sammelvorrichtung. Diese besteht aus einer 2 L Vakuumflasche, in die ein 50 mL Falconröhrchen hinein gehängt wurde. Die Aufhängung erfolgte an einem Glasrohr, das durch einen Kunststoffstopfen in die Vakuumflasche geführt wurde. Der Deckel des Falconröhrchens besaß eine große Öffnung für das Glasrohr, sowie viele kleinere, mit welchen eine Verbindung zwischen dem Vakuum in der Flasche und dem Falconröhrchen hergestellt wurde. Am oberen Ende des Glasröhrchens wurde eine T-Verbindung eingebaut, an welcher sich über ein Reduzierstück zwei Kunststoffschläuche befanden. Über eine Vakuumpumpe wurde in der Flasche ein Unterdruck erzeugt, der sich über das Falconröhrchen zu den Schläuchen übertrug. Berührte man die Guttationstropfen mit den Schlauchenden, so wurden diese durch das Vakuum direkt ins Falconröhrchen gezogen (Abb. 2.2).



**Abb. 2.2: Sammelvorrichtung für Guttationstropfen**

Die Vorrichtung besteht aus einer Vakuumpumpe, einer Wolfschen Flasche zum Schutz der Pumpe vor Flüssigkeit sowie aus einem Sammelgefäß mit zwei angeschlossenen Schläuchen. Die Guttationsflüssigkeit gelangt direkt in das eisgekühlte Probengefäß.

Die Vakuumflasche wurde mit Eiswasser befüllt, so dass das Falconröhrchen mit samt der Guttationsflüssigkeit gekühlt wurde. Optional kann auf eine Kühlfalle mit flüssigen Stickstoff verwendet werden. Nach jeder Ernte wurde die Sammelvorrichtung mit einer Folge von ddH<sub>2</sub>O-, 70 % Ethanol- und ddH<sub>2</sub>O-Spülungen gewaschen und nachfolgend getrocknet.

Es konnten nur dann Guttationstropfen erhalten werden, wenn die Luftfeuchtigkeit bei nahezu 100 % lag. Zur Überwachung der Luftfeuchtigkeit und Temperatur wurde ein transportabler Datenlogger der Firma (Testostor 175, Testo GmbH) in der Anzucht-schale plaziert. Um eine hohe Luftfeuchtigkeit in der Klimakammer zu erhalten, wurden zusätzlich große Schalen im ddH<sub>2</sub>O aufgestellt.

### 2.8.2. MASSENSPEKTROSKOPISCHE ANALYSE

Die Analyse der Proteine in der Guttationsflüssigkeit wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Z. Tamar am „Protein Center Technion“ des Technions in Haifa / Israel durchgeführt.

Für die Analyse wurden Teile der Guttationsflüssigkeit konzentriert und in der SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden verschiedene Bereiche ausgeschnitten und für den folgenden Trypsin-Verdau im Gel an das Protein Center weitergegeben.

Dort wurden die Proben im Gel mit 100 mM Iodoacetamid carboxymethyliert. Nach weiterer Entfärbung des Gels mit 50 % Acetonitril wurden die Gelstücke mit 10 mM Ammoniumbicarbonat (pH 7,4) rehydriert, wobei diese Lösung modifiziertes Trypsin (Promega) enthielt. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurden die Peptide mit 60 %

Acetonitril und 0,1 % TFA aus dem Gel eluiert. Die Trennung der Peptide erfolgte an einer HPLC-Anlage, die mit einer mit 1x50 mm C-18 RP-HPLC Säule (Vydac) ausgestattet war. Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten von 4 % bis 65 % Acetonitril in 0,025 % TFA bei 1% pro Minute und einer Flussrate von 40 µL/min. Das Eluat wurde nach der Säule aufgesplittet, wobei 30 % der Probe in das ESI-MS (LCQ, Finnigen, San Jose, USA) gesprüht wurden. Die MS Analyse wurde im positiv Ionen-Modus durchgeführt, mit vollem MS-Scan gefolgt von einer MS/MS Analyse der dominantesten gesammelten Fraktion der ersten MS. Die Analyse der Daten erfolgte mit dem Programm TurboSEQUENT (Finnigan, San Jose, USA).

### 3. ERGEBNISSE

Die Klärung der Frage nach der Verwandtschaft von HL#2 und Horcolin sollte durch die Sequenzierung des Horcolin beantwortet werden. Da das Protein jedoch nur in sehr geringen Mengen in den Koleoptilen vorkommt, mussten geeignete Methoden für die Aufreinigung gefunden werden. Der erste Schritt hierbei stellte die Extraktion des Proteins aus dem Pflanzengewebe dar. Dieser schlossen sich dann verschiedene chromatographische Methoden zur Aufreinigung des Horcolin an. Für die Sequenzierung des Proteins wurde dieses proteolytisch verdaut und die Peptide mit Hilfe der RP-HPLC getrennt. Dieser Trennung folgte dann die Sequenzierung der endogenen Peptidfragmente an der MH Hannover durch Herrn PD Dr. H. Thole.

#### 3.1. ISOLIERUNG UND AUFREINIGUNG VON HORCOLIN AUS GERSTEN-KOLEOPTILEN

Zur Isolierung und Aufreinigung des Proteins Horcolin wurden etiolierte Koleoptilen von vier bis fünf Tage alten Gerstenkeimlingen verwendet. Zum einen aus dem Grund, dass Horcolin nur in der Koleoptile gefunden werden kann und zum anderen, dass HL#2 in etiolierten Gerstenkeimlingen dieser Alterstufe nicht auf Proteinebene nachgewiesen werden kann. Hierdurch konnte sichergestellt werden, dass es bei den Aufreinigungsschritten weder zu Verwechslungen noch zu Verunreinigungen mit HL#2 käme. Ein weiterer Vorteil in der exklusiven Verwendung der Koleoptilen liegt darin, dass hierdurch, gemessen am Gesamtanteil von Proteinen im Gerstenkeimling, eine Anreicherung erzielt wird. Weiterhin kann so die Isolierung störender Sekundärmetabolite, die vermehrt in den Blättern vorkommen, vermieden werden. Für die Isolierung von löslichen Proteinen, die HL#2 und Horcolin enthalten, wurden Primärblätter mit samt den Koleoptilen von im Licht gewachsenen Pflanzen verwendet. Zum Zweck der Aufreinigung des Horcolin wurden ca. 3 bis 5 cm lange Primärblätter mit Koleoptilen per Hand geerntet. Die Koleoptilen wurden vorsichtig abgezogen und sofort in N<sub>2</sub> eingefroren. Dies ging besonders gut, wenn die Primärblätter schon aus der sie schützenden Koleoptile herausgewachsen waren. Eine kurze Belichtung bzw. eine Temperaturerhöhung direkt vor der Ernte beschleunigte diesen Vorgang. Je nach Größe der Koleoptilen wurden 800 Stück für ca. 20 g Material benötigt. Die unter N<sub>2</sub> fein gemahlene Koleoptilen wurden sofort weiterverwertet oder bei -80 °C gelagert.

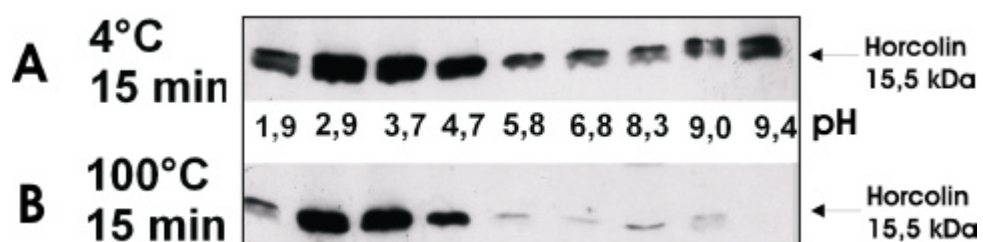


### 3.1.1. SAURE EXTRAKTION VON HORCOLIN

Da es sich bei Horcolin um ein lösliches Protein handelt [Menhaj, 1998], erfolgte die Isolierung mit sauren Extraktions- bzw. Zellaufschlusspuffern. Hierdurch konnte eine weitere relative Anreicherung des Proteins erzielt werden, da gemessen an der Gesamtproteinmenge das Horcolin eine größere prozentuale Menge im Anteil der löslichen Proteine ausmacht. Zusätzlich entfallen auf diese Weise auch alle Membranproteine, die in den nachfolgenden Reinigungsschritten störend wirken könnten.

Im Falle von Proteinen, die sich in wässrigen Puffern lösen können, bietet sich weiterhin an, verschiedene Extraktionspuffer zu testen. Neben unterschiedlichen Konzentrationen von Salzen oder milden Detergenzien spielt auch der pH-Wert des Extraktionspuffers eine bedeutende Rolle. Je nach Proteineigenschaft lassen sich Proteine entweder bei basischen oder sauren pH-Werten besser in Lösung bringen. Umgekehrt kann es von Vorteil sein, wenn sich viele Proteine nicht lösen bzw. denaturieren, während das Zielprotein sich gut löst. Dies gilt auch für die Eigenschaft der Hitzestabilität. Proteine, die leicht durch Kochen denaturiert werden, können durch Zentrifugieren abgetrennt werden. Auch hierdurch kann der relative Anteil eines gesuchten Proteins erhöht werden.

Um Aufschluss darüber zu bekommen, ob sich Horcolin bei einem bestimmten pH-Wert besonders gut extrahieren lässt, wurden verschiedene Extraktionspuffer getestet, die sich in ihrer Zusammensetzung nur durch pH-Wert bzw. durch den Puffer unterschieden. Das Verhalten auf Hitzedenaturierung wurde durch 15-minütiges Kochen des jeweiligen Extraktionsansatzes analysiert. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Abb. 3.1 dargestellt.



**Abb. 3.1: Westernblot-Analyse von Fraktionen der Extraktion von Horcolin**

Das Protein wurde bei unterschiedlichen pH-Werten extrahiert. Diese Extrakte wurden entweder bei 4 °C (A) oder bei 100 °C (B) inkubiert. Nach TCA-Fällung und SDS-PAGE wurde eine Westernblot-Analyse mit dem Anti-HL#2-Antikörper (1:500-Verdünnung, erkennt sowohl HL#2 als auch Horcolin) durchgeführt.

Es ist eindeutig zu sehen, dass zwischen pH 2,9 und 3,7, also in einem relativ sauren Bereich, das Horcolin eine deutlich stärkere Bande im Westernblot aufweist als bei anderen pH-Werten. Ebenso scheint das Protein relativ stabil gegenüber der Hitzedenaturierung zu sein, da es den Kochvorgang übersteht. Da jeweils gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden, kann anhand der gefundenen Daten von einer „Proteinanreicherung durch sauren Zellaufschluss“ ausgegangen werden, da sich die relative Menge des Horcolin erhöht. Im Verlauf der weiteren Untersuchungen wurde das Horcolin mit Hilfe dieser Methode aus den Koleoptilen extrahiert. Auf die Verwendung der Hitzedenaturierung wurde jedoch verzichtet, da das Horcolin hierdurch zwar zusätzlich angereichert werden könnte, eine Beeinflussung seiner Funktion und Eigenschaften aber nicht vollends ausgeschlossen werden kann.

### **3.1.2. KONZENTRATION / UMPUFFERUNG DES GEWONNENEN ROHEXTRAKTES**

Für die weiteren Methoden der Aufreinigung musste der saure Rohextrakt zunächst konzentriert und umgepuffert werden, da sich zum einen kleinere Volumina einfacher handhaben lassen, und zum anderen für die Bindung der Proteine häufig spezielle Bindungspuffer mit entsprechenden pH-Werten benötigt werden.

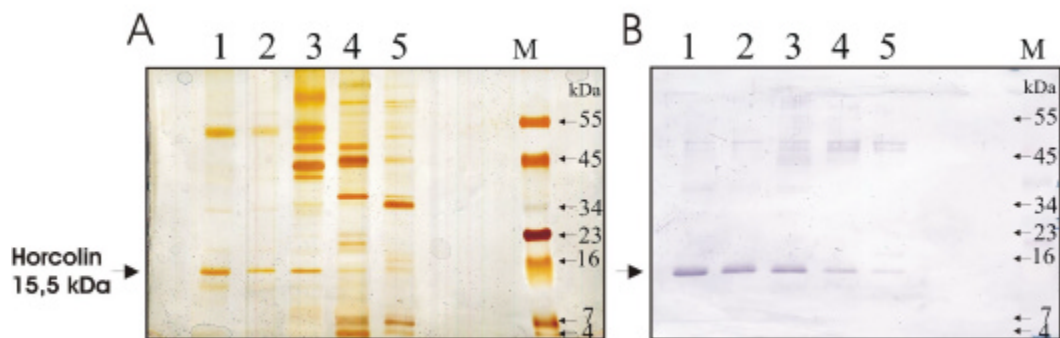
Zum Umpuffern der Probe wurde zunächst das Verfahren der Dialyse und zur Konzentrierung der Entzug des Wassers mit PEG verwendet. Es zeigte sich aber, dass während der Dialyse Proteine ausfielen, die nur noch schwer zu lösen waren. Eine Analyse dieses Proteinniederschlags zeigte, dass er einen Großteil des Horcolin im Extrakt enthielt. Um dieses Problem zu umgehen, wurde der saure Extrakt mit zentrifugierbaren Ultrakonzentratoren eingengt und durch erneute Zugabe des entsprechenden Puffers umgepuffert. Bei dieser Methode bildeten sich keine unlöslichen Proteinniederschläge. Sie wurde daher auch bei den weiteren Versuchen immer dann eingesetzt, wenn konzentriert und/oder umgepuffert werden musste.

### **3.1.3. HYDROXYAPATIT-CHROMATOGRAPHIE**

Die Trennwirkungen der Hydroxyapatit-Chromatographie basieren auf den Interaktionen der Amino- bzw. der Carboxylgruppen der Proteine mit der Oberfläche des Hydroxyapatits (HA). HA ist ein aus Kalziumphosphat aufgebautes Mineral, wobei die Phosphatgruppen und Kalziumionen für die Trennwirkungen verantwortlich sind.

An diesem Träger reagieren basische und saure Proteine unterschiedlich. Die basischen treten über elektrostatische Kräfte der Aminogruppen mit der negativen Oberfläche des Kalziumphosphates, die sauren über Komplexbindungen der Carboxylgruppen mit den Kalziumionen des HA in Wechselwirkung.

Zur Aufreinigung des Horcolin wurde die HA-Chromatographie als Negativ-Chromatographie eingesetzt. Hierbei wird die Eigenschaft des Horcolin ausgenutzt, unter den gegebenen Bedingungen nicht an das Säulenmaterial zu binden. Während ein Großteil der Proteine an das HA-Material band (siehe Abb. 3.2), befand sich das Horcolin in der ersten bis dritten Fraktion, d.h. im Durchfluss der Säule.



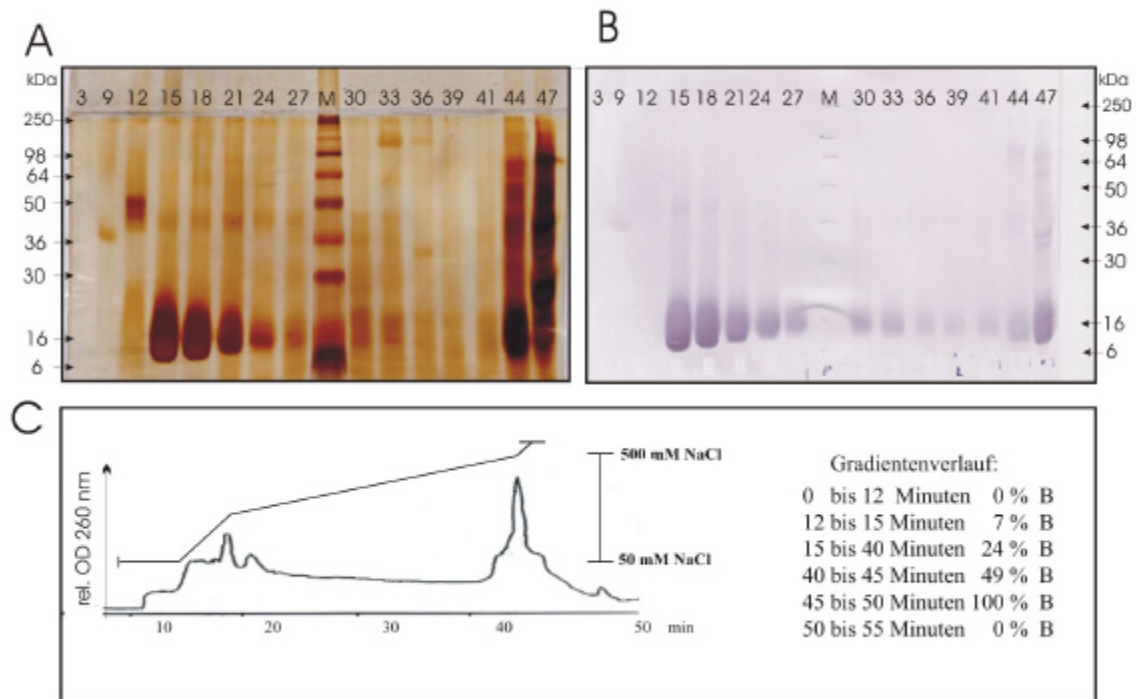
**Abb. 3.2: Analyse der Fraktionen der Hydroxyapatit-Chromatographie durch SDS-PAGE und Westernblot-Analyse**

Zur Analyse wurde 1 mL der Fraktionen TCA gefällt und in einem 16,5%igen Tris-Tricin-Gel aufgetrennt. A zeigt ein silbergefärbtes Gel. B zeigt ein Westernblot mit dem Anti-HL#2-Antikörper. Weitere Bezeichnungen: 1 Durchfluss Fraktion I - 2 Durchfluss Fraktion II+III - 3 Eluat 5 mM MgCl<sub>2</sub> - 4 Eluat 1000 mM MgCl<sub>2</sub> - 5 Eluat 300 mM Phosphat - M Proteinmarker (SeeBlue).

Die Elution mit Magnesiumchlorid und Phosphatpuffer wusch einen Großteil der gebundenen Proteine von der HA-Säule. Mit Hilfe des Anti-HL#2-Antikörpers konnten die einzelnen Fraktionen nach TCA-Fällung und SDS-PAGE im Westernblot auf das Vorkommen von Horcolin hin überprüft werden. In Abb. 3.12 kann weiterhin gesehen werden, dass das Horcolin sich zwar zum Großteil im Durchfluss befand, Teile aber auch in den Eluaten wiederzufinden waren. Dies bedeutet einen Verlust von Protein während der Aufreinigung und zieht die Überlegung nach sich, ob Qualität und Quantität der HA-Chromatographie zu rechtfertigen sind. Für einen weiteren Reinigungsschritt wurde der Durchfluss gesammelt, konzentriert und umgepuffert. Die Eluate wurden verworfen, da sie im Vergleich zum Durchfluss zu viele Verunreinigungen enthielten.

### 3.1.4. ANIONENAUSTAUSCHER-CHROMATOGRAPHIE

Je nach Blickwinkel können Reinigungsschritte das Ziel haben, Verunreinigungen zu entfernen, wie bei der hier erfolgten HA-Chromatographie geschildert, oder das gesuchte Protein anzureichern. Hierfür eignen sich nicht nur die in Abschnitt 3.1.1 erwähnten Extraktionsmethoden, sondern auch weitere Chromatographietechniken. Für die weitere Aufreinigung des Horcolin wurde die Ionenaustauscher-Chromatographie eingesetzt. Hierbei konkurrieren Salz-Ionen mit dem Proteinen um die geladenen Gruppen der Ionenaustauscher-Matrix.



**Abb. 3.3: Analyse der Fraktionen der Anionenaustauscher-Chromatographie durch SDS-PAGE und Westernblot-Analyse**

Bild A zeigt jede dritte gesammelte Fraktion, von der ein Teil TCA - gefällt wurde, in der SDS-PAGE (14%iges Gel) aufgetrennt und anschließend Silber gefärbt wurde. In B wurde mit einem identischen Gel ein Westernblot mit dem Anti-HL#2-AK (1:500 verdünnt) durchgeführt. C zeigt den Verlauf des Chromatogramms sowie den Verlauf des Salzgradienten.

Für das Horcolin wurde eine Anionenaustauscher-Matrix verwendet, bei der quaternäre Trimethylaminoethylgruppen für den stark anionischen Charakter verantwortlich sind. Es wurden stark basische Pufferbedingungen (Piperidin, pH 12) gewählt, um sicher zu stellen, dass das Horcolin eine negative Ladung besitzt und hierdurch an das Material bindet. Gebundenes Horcolin wird im Verlauf der Chromatographie durch eine steigende Chlorid-Ionenkonzentration von der Säule eluiert. Abb. 3.3 zeigt das Elutionsprofil einer solchen Anionenaustauscher-Chromatographie, bei der das Horcolin mit Hilfe eines steigenden NaCl-Gradienten von der Säule eluiert wurde. Die unscharfen Banden im Silbergel und im Westernblot weisen auf eine massive Überladung des Gels hin, waren aber erforderlich, um die Reinheit der Proteinfraktion von Verunreinigungen belegen zu können. Teil C in Abb. 3.3 zeigt das vom Schreiber aufgenommene Chromatogramm des Versuchs und den Verlauf des NaCl-Gradienten. Das Horcolin eluierte in einer relativ frühen Phase ab ca. 100 mM NaCl. Um den Eluierungsvorgang in dieser Phase zu beschleunigen, bzw. das Protein nicht über zu viele Fraktionen zu verteilen, wurde der Gradient in diesem Bereich mit steilerem Anstieg programmiert.

Teil B der Abb. 3.3 zeigt deutlich, dass ein Großteil des Horcolin zwar im Bereich der Fraktionen 15 bis 21 eluierte, Teile aber auch in den weiteren Fraktionen sowie im Hochsalz-Eluat zu finden waren. Der Grund könnte in möglichen Lektineigenschaften des Proteins zu suchen sein. Für den weiteren Reinigungsprozess wurden die Fraktionen 17 bis 20 zusammengefasst, um das Peakmaximum zu erfassen.

### 3.1.5. TRIS-TRICIN-PAGE

Als analytische SDS-Gele wurden in dieser Arbeit Tris-Glycin-Gele verwendet. Eine Ausnahme stellte aber die Gelelektrophorese des Horcolin für die Sequenzierung dar. Hierfür wurden Tris-Tricin-Gele eingesetzt, da zum einen das Tricin bei der Sequenzierung nicht stört, und zum anderen verfügen die Tris-Tricin-Gele, insbesondere wenn zwischen dem Sammel- und Trenngel noch ein Spacergel befindet, über eine bessere Trennwirkung im niedermolekularen Bereich.

In Abb. 3.4 ist ein solches Tris-Tricin-Gel mit Spacer zu sehen, das für die gelchromatographische Auftrennung der Horcolin-Fractionen von der Anionenaustauscher-Chromatographie verwendet wurde.

Das Silber gefärbte Gel zeigte im Bereich von 15,5 kDa eine Proteinbande, bei der es sich, verifiziert durch einen Westernblot mit dem Anti-HL#2-Antikörper, um Horcolin handelte. Weiterhin waren im oberen Bereich noch zusätzliche Banden zu sehen, die die Notwendigkeit einer zusätzlichen gelelektrophoretischen Auftrennung unterstrichen. Nur hierdurch konnte sichergestellt werden, dass für die Sequenzierung ein sauberes Protein eingesetzt werden konnte.

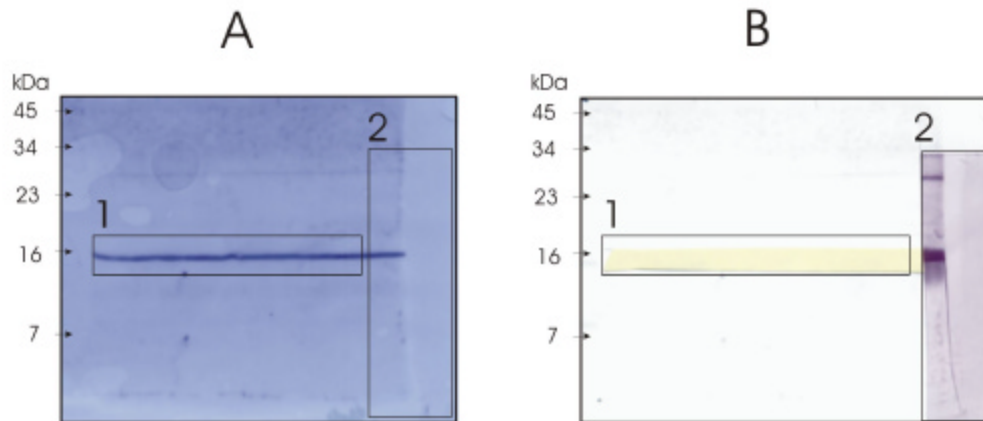


**Abb. 3.4: Tris-Tricin-Gel der gepoolten Fraktionen 17-20**

Ein Aliquot der Probe der gepoolten Fraktionen der Anionenaustauscher-Chromatographie wurde TCA gefällt, mit Hilfe der Tris-Tricin-PAGE (16,5%iges Gel mit Spacer) aufgetrennt und anschließend Silber gefärbt. Für die Trennung wurde ein 16,5%iges Tris-Tricin-Gel verwendet. Die Identifizierung des Proteins erfolgt mit Hilfe der Westernblot-Analyse (Anti-HL#2-AK, 1:500 verdünnt) (vgl. Abb. 3.5)

### 3.1.6. WESTERN MIT DUNN-CARBONAT-SYSTEM

Ebenso wie die Tris-Tricin-Gelelektrophorese ohne Glycin auskommt, ist es sinnvoll, bei dem Western-Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran auf Glycin zu verzichten. Glycin kann wegen seiner Eigenschaft als Aminosäure während der Sequenzierung zu Geisterpeaks führen. Um solche Störpeaks zu vermeiden, sollte es möglichst nicht verwendet werden.



**Abb. 3.5: Mit Dunn-Carbonat-Methode auf PVDF-Membran transferiertes SDS-Gel**

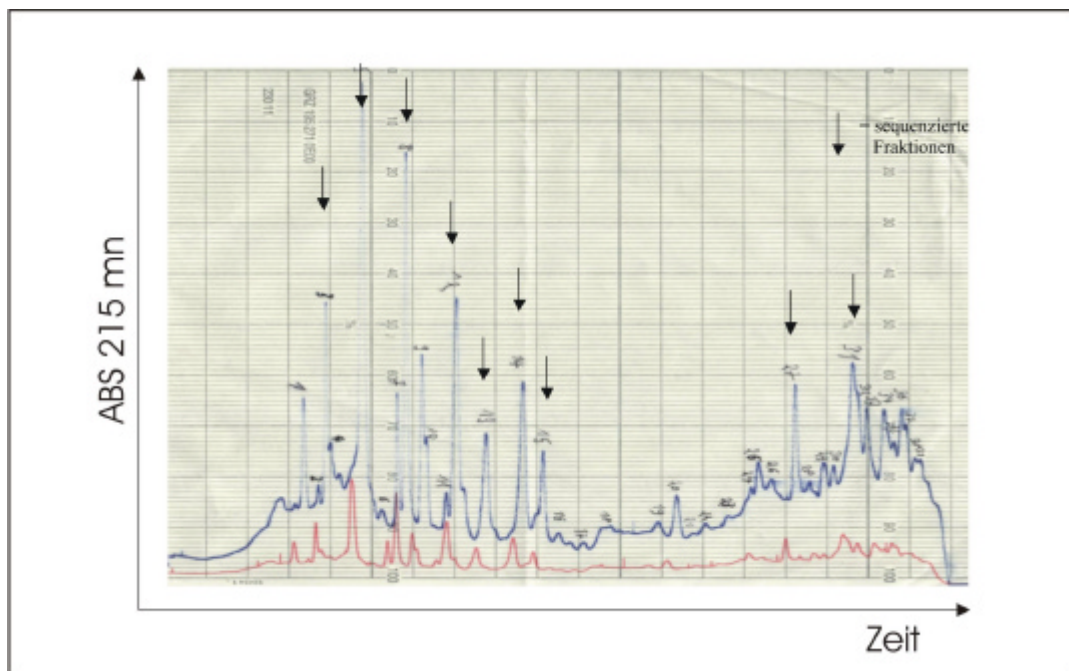
Abbildung A zeigt die Membran nach Coomassie-Färbung. 1 und 2 zeigen die korrespondierenden Bereiche von A in Abbildung B. Der Bereich 1 wurde nach dem Entfärben für den LysC-Verdau verwendet. Mit Bereich 2 wurde eine Westernblot-Analyse mit dem Anti-HL#2-Antikörper (1:500 verdünnt) durchgeführt, damit auch sichergestellt ist, dass das richtige Protein für die Sequenzierung verwendet wird.

Das Dunn-Carbonat-System kommt ohne Glycin im Transferpuffer aus, da an seiner Stelle ein Carbonat-Puffer verwendet wird. In Abb. 3.5 ist das Ergebnis eines solchen Transfer zu sehen. Teil A zeigt die PVDF-Membran nach Coomassie-Färbung, die genutzt wurde, um die Proteinbande zu lokalisieren.

Abschnitt 1 aus Abb. 3.5 A wurde ausgeschnitten und wieder entfärbt und für den LysC-Verdau verwendet, wohingegen Abschnitt 2 entfärbt und für eine Immunreaktion mit dem Anti-HL#2-Antikörper weiterverwendet wurde. Abbildung 3.5 B zeigt, dass es sich bei der ausgeschnittenen Bande um Horcolin gehandelt hatte, das vermutlich rein war.

### 3.1.7. LYS-C-VERDAU UND AUFTRENNUNG DER PEPTIDE SOWIE SEQUENZIERUNG DER HPLC-FRAKTIONEN

Die entfärbte PVDF-Membran mit dem gebundenen Horcolin wurde zur weiteren Analyse an Herrn PD Dr. H. Thole an der MH Hannover übergeben. Der Versuch einer N-terminalen Sequenzierung des Proteins schlug jedoch fehl, da das Protein blockiert war. Für eine Aufklärung der Aminosäuresequenz war es daher notwendig, das Protein proteolytisch zu spalten, die erhaltenen Peptide mit Hilfe der RP-HPLC aufzutrennen, und diese dann einzeln zu sequenzieren. Hierdurch kann man zwar das Problem der N-terminalen Blockierung umgehen, erhält aber nur endogene Sequenzen. Es wurden erneut Proben aufbereitet und auf eine PVDF-Membran transferiert. Nach erfolgter Coomassie-Färbung und Entfärbung wurde die Membran jedoch diesmal mit der Protease LysC behandelt. Als Ergebnis einer solchen Spaltung erhält man eine Vielzahl von Peptiden. Abb. 3.6 zeigt die Auftrennung des Peptidgemisches in Form eines Chromatogramms. Jeder einzelne Peak repräsentiert eine Peptidfraktion, die gesammelt wurde. Eine Auswahl hiervon wurde für die Edman-Sequenzierung eingesetzt.



**Abb. 3.6: Chromatogramm der RP-HPLC Auftrennung des LysC-Verdaus**

Die Pfeile kennzeichnen die sequenzierten Peptidfraktionen. Das rote (10 mV) und blaue (50 mV) Chromatogramm entspricht unterschiedlichen Signalverstärkungen des Schreibers (Papiervorschub 2 mm/min). Die durch den Verdau mit LysC entstandenen Peptide wurde an einer RP-HPLC-Säule (Typ VYDAC 218TP) aufgetrennt (vgl. 2.3.10) und fraktioniert gesammelt.

Das Ergebnis dieser Sequenzierungsreaktionen ist in Tabelle 3-1 dargestellt. Durch die Mithilfe von Herrn PD Dr. H. Thole konnten über 50 % der Aminosäuren vom Horcolin identifiziert werden. Es lies sich jedoch weder eine Aussage über die Reihenfolge der Sequenzen noch über die N-terminale Sequenz machen. Hierfür müsste entweder das Protein mit anderen Proteasen gespalten und die Sequenzen verglichen werden, oder die Sequenz über molekularbiologische Methoden identifiziert werden. Erstere Methode ist jedoch bedingt durch den Aufwand und die Kosten der Sequenzierung nicht weiter verfolgt worden.

Eine Datenbanksuche ergab, dass keine der identifizierten Sequenzen bis zu diesem Zeitpunkt als Proteinsequenz (Swissprot) oder Nukleotidsequenz (NCBI- non redundant und EST) vorlag. Die Datenbanksuche ergab weiterhin, dass die Sequenzen Ähnlichkeiten zum HL#2 bzw. zu dessen sequenzhomologen Verwandten aufweisen, jedoch nicht identisch sind.

Nr.	Identifiziertes Peptid
1	WGGTGGTEDITNLDA
2	NYVTEISGTVGK
3	IGPWGGXGG ( S )
4	VS ( S ) GAIVDAI ( A ) ( F )
5	FGTDDIVTSLK
6	TYVGTNVQ ( Q ) ( S )
7	WGGTGG ( T ) ( E ) ( D )
8	GVTRTY
9	VVTDNVQ ( V ) Q

**Tabelle 3-1: N-terminale Aminosäuresequenzen von endogenen Peptidfragmenten nach LysC Verdau.** Klammern symbolisieren Aminosäuren, die nicht eindeutig identifiziert wurden.

Hierüber ist es bedingt möglich, Teile der Peptidsequenzen in eine mögliche Reihenfolge zu bringen, indem man die Peptide anhand der verwandten Proteinsequenzen ordnet.

Ausgehend von den Recherchen kann postuliert werden, dass es sich bei dem aufgereinigten und zum größten Teil sequenzierten Protein Horcolin um ein neues Protein aus den Koleoptilen der Gerste handelt. Die Teilsequenzen wurden bei EMBL eingereicht und sind unter "Accession number: AAK54458" registriert. Ziel der weiteren Untersuchungen ist die vollständige Aufklärung der Aminosäuresequenz.

### 3.2. KOLONIERUNG DER NUKLEOTIDSEQUENZ VON HORCOLIN

Nachdem über 50 % der Aminosäuresequenz vom Horcolin identifiziert werden konnten, sollte nun die vollständige Sequenz mit Hilfe molekularbiologischer Methoden ermittelt werden. Aus dem großen Repertoire der hierfür möglichen Methoden schien die RT-PCR, mit aus den Peptiden entworfenen degenerierten Primern, die



naheliegendste zu sein. Dies auch vor dem Hintergrund, dass mit den Methoden der 5´ bzw. 3´-Primerextension ein Volllängenklon zu erhalten wäre, welches mit der alleinigen Verwendung von internen Primern nicht möglich ist. Alternativ wäre das Screenen einer cDNA-Bank von etiolierten Koleoptilen eine mögliche Methode gewesen. Da eine solche cDNA-Bank aber nicht zur Verfügung stand, wurde aus Zeitgründen die RT-PCR Methode gewählt.

### **3.2.1. PRIMER-DESIGN**

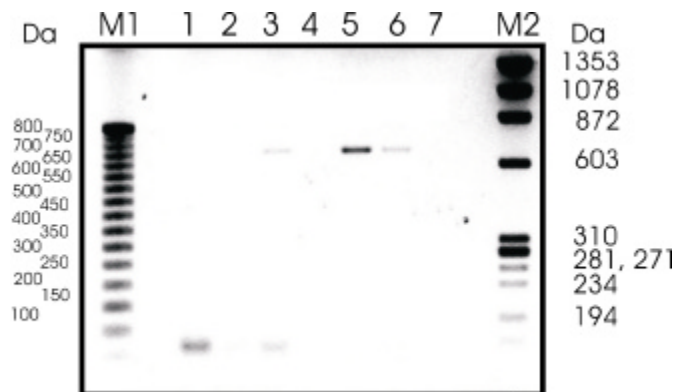
Die benötigten Primer für die RT-PCR wurden mittels zweier Methoden entworfen, wobei nur eine von beiden letztendlich zum Ziel geführt hat, da sie schneller die gewünschten Ergebnisse lieferte. Hierbei sei aber angemerkt, dass sie nur deshalb schneller war, weil mit Hilfe der Peptidsequenzen ein EST-Klon identifiziert werden konnte, der dem Horcolin sehr ähnlich war. Dieser war jedoch erst ab Ende 2000 in der Datenbank eingetragen. Auf der Basis dieses EST-Klons sowie der bekannten Sequenzen konnten Primer entworfen werden, die zur Aufklärung der Sequenz des Horcolin führte. Als damit begonnen wurde, mit Hilfe der RT-PCR die Sequenz zu entschlüsseln, war dieser EST-Klon noch nicht in der Datenbank zu finden. Daher wurden mit Hilfe der „Kazusa-codon-usage“ Tabelle für Gerste degenerierte Primer entworfen (vgl. Primertabelle im Anhang). Mit Hilfe dieser Primer konnten auch Sequenzen in der PCR amplifiziert werden. Erst nachdem einige dieser PCR-Produkte kloniert und sequenziert worden waren - jedoch ohne die gesuchte Sequenz gefunden zu haben - wurde bei der routinemäßigen Suche nach EST-Klonen der besagte Klon gefunden.

Die Klonierung weiterer PCR-Produkte wurde zugunsten des neuen Ansatzes eingestellt, da dieser nach kurzer Zeit erfolgreich war. Die Ergebnisse der Sequenzierung der Banden aus der RT-PCR mit den degenerierten Primern werden in Abschnitt 3.2.4 vorgestellt.

### **3.2.2. RT-PCR UND KLONIERUNG VON HORCOLIN**

Für die Klonierung der Horcolin-Sequenz wurde die sogenannte two-step RT-PCR eingesetzt. Hierbei wird zuerst der cDNA aus Gersten-mRNA revers transkribiert und danach in einem separaten Schritt mit der cDNA als Template und den auf Basis des EST-Klons entworfenen Primern eine PCR durchgeführt.

Das Ergebnis einer solchen two-step RT-PCR ist in Abb. 3.7 zu sehen. In diesem Versuch wurden verschiedene cDNA´s als Template für die PCR mit den beiden Primer FP1-Horcolin (forward) und RP3-Horcolin (reverse) eingesetzt.

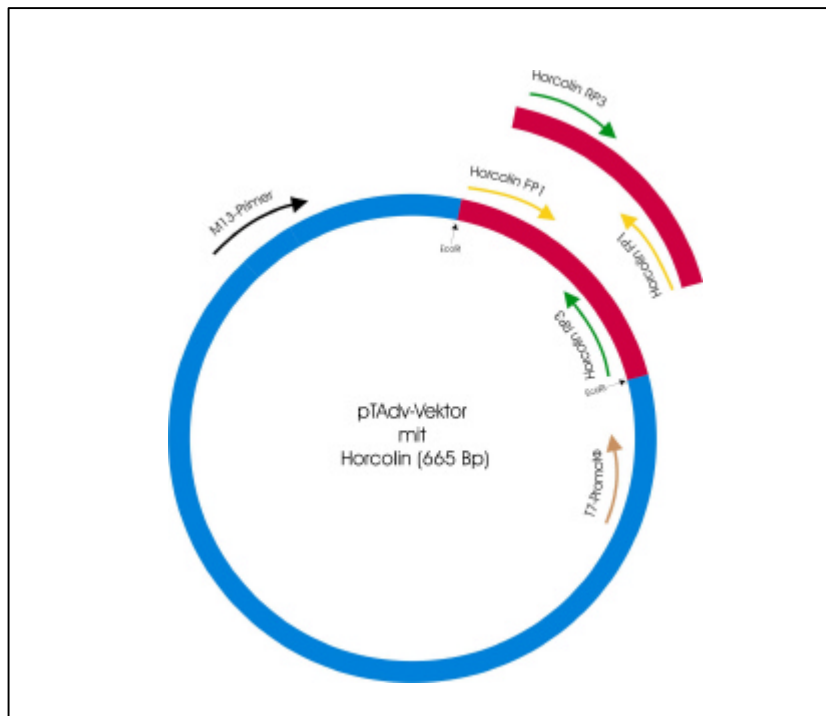


**Abb. 3.7: Agarosegel mit DNA-Fragmenten der RT-PCR mit Horcolin spezifischen Primern**

Die cDNA wurde mit verschiedenen Primer für die Erstrangsynthese durchgeführt und diese dann als Template für die PCR mit den FP1- und RP3-Horcolin Primer eingesetzt. 1: etiolierte Koleoptilen-cDNA mit Zufalls-hexamer Primer, 2: etiolierte Koleoptilen-cDNA mit Oligo(dT) Primer, 3: etiolierte Koleoptilen-cDNA mit RP3-Horcolin Primer, 4: HL Koleoptilen-cDNA mit Zufalls-hexamer Primer, 5: HL Koleoptilen-cDNA mit Oligo(dT) Primer, 6: HL Koleoptilen-cDNA mit RP3-Horcolin Primer, 7: Kontrolle mit nur Primern ohne Template. M1: 100 bp step-ladder Marker, M2: 2 µL  $\phi$ -Marker. Jeweils 10 µL der PCR-Ansätze wurden in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt.

Für die weiteren Arbeitsschritte wurde das in Abb. 3.7 dargestellte 665 bp große PCR-Fragment (Spur 5 aus Abb. 3.7) ausgeschnitten, die DNA aus dem Agarosegel eluiert, erneut amplifiziert, wieder aus dem Gel eluiert, die Konzentration bestimmt und für die Ligation in den pTAdv-Vektor verwendet.

Das 665 bp Fragment wurde nach erfolgter Klonierung in TOP10F1 *E. coli*-Zellen transformiert. Positive Transformanden wurden mit Hilfe des blau/weiß-Screenings identifiziert und auf eine Master-Platte übertragen. Ausgehend von diesen Klonen wurden mehrere Kolonien für eine Mini-Plasmidpräparation ausgewählt und amplifiziert. Nach erfolgter Plasmid-Isolation wurden diese als Template für eine PCR eingesetzt, mit der die richtige Orientierung des Inserts bestimmt wurde. In Abb. 3.8 ist der pTAdv-Vektor mit dem Insert schematisch dargestellt.



**Abb. 3.8: Schema des pT-Adv Vektors mit dem Horcolin-Insert**

Angegeben sind die verwendeten Primer (Pfeile), die für den Test der Insertausrichtung verwendet wurden. Der rote Bereich stellt das klonierte 665 bp große Horcolin-Insert dar. Der Vektor hat ohne Insert eine Größe von 3150 bp und trägt im 5' Bereich von der MCS liegend eine M13 und im 3' Bereich eine T7 Primersequenz.

Die Orientierung des Inserts wurde mit Hilfe der beiden insertspezifischen Primer FP1- und RP3-Horcolin, sowie der plasmidspezifischen Primer M13 und T7 bestimmt. Folgende Aussagen lassen sich anhand verschiedener Primerpaarungen machen:

- FP1 mit RP3-Horcolin: ergibt bei vollständiger Insertion ein Fragment von 665 bp
- M13 mit RP3-Horcolin: ergibt bei Insertion in 5'-3'Richtung ein Fragment von ca. 700 bp
- M13 mit FP1-Horcolin: ergibt bei Insertion in 5'-3'Richtung kein Signal, sondern nur bei Insertion in 3'-5'
- M13 mit T7: ergibt ein Fragment von ca. 816 bp wenn Insert sich zwischen diesen befindet. Sonst nur ein 160 bp Fragment.

Das Resultat eines solchen Tests hinsichtlich richtiger Insertion des PCR-Fragmentes ist in Abb. 3.9 dargestellt.



**Abb. 3.9: Agarosegel zur Überprüfung der Klonierung in den pTAdv-Vektor**

Als Template für die PCR wurde ein positiver Klon der Transformation mit dem 665 bp Horcolin Fragment eingesetzt. Folgende Primerpaarungen wurden verwendet. 1: FP1 mit RP3-Horcolin, 2: M13 mit RP3-Horcolin, 3: M13 mit FP1-Horcolin, 4: M13 mit T7, M:  $\phi$  DNA Marker. Die Auftrennung erfolgte in einem 1,5%igen Agarosegel. Es wurden 10  $\mu$ l des PCR-Ansatzes aufgetragen.

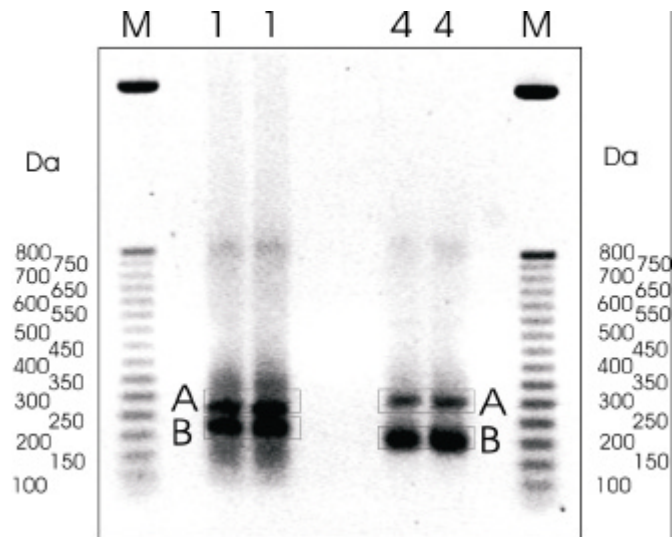
Anhand dieser Daten konnte die Aussage getroffen werden, dass das 665 bp PCR Fragment vollständig in den pTAdv-Vektor inseriert wurde und in 5'-3' Richtung vorliegt. Für die Sequenzierung des Plasmides wurde dieses für eine Midi-Plasmidpräparation erneut reamplifiziert, die Konzentration bestimmt und bis zur Sequenzierung bei  $-20$  °C eingefroren.

### 3.2.3. KOLONIERUNG WEITERER SEQUENZEN

In Abschnitt 3.2.1 wurde bereits erwähnt, dass für die Klonierung der Horcolin-Sequenz zwei unterschiedliche Vorgehensweisen eingesetzt wurden. Bis zum Zeitpunkt, an dem durch die Sequenz bzw. dessen Translation in den entsprechenden Leserahmen feststand, dass die richtige Sequenz kloniert wurde, konnten weitere PCR-Fragmente kloniert werden.

Für die Klonierung dieser Sequenzen wurden degenerierte Primer verwendet, die auf Basis der bekannten Peptide und der „codon-usage“ von Gerste entworfen wurden. Als Template für eine two-step RT-PCR wurden ebenfalls cDNA von etiolierten bzw. mit Licht gewachsenen Koleoptilen und der erwähnten Primer durchgeführt. Nachteil dieser Verfahrensweise ist eindeutig, dass hierdurch nur Sequenzen erhalten werden können, die intern liegen bzw. interne Teile und den PolyA-Schwanz enthalten. 5'-Bereiche, wie der unbekannte N-terminale Bereich, können nur durch Primerextension erhalten werden. Hinzu kommt, dass durch die Verwendung von degenerierten Primern sehr leicht andere als die gesuchte Sequenz gefunden werden können.

Abb. 3.10 zeigt ein Ergebnis einer PCR mit den degenerierten Primern und der Koleoptilen-cDNA. Die Banden 1A, 1B, 4A und 4B wurden aus dem Gel ausgeschnitten, reamplifiziert und in den Vektor pBluescript SK kloniert.

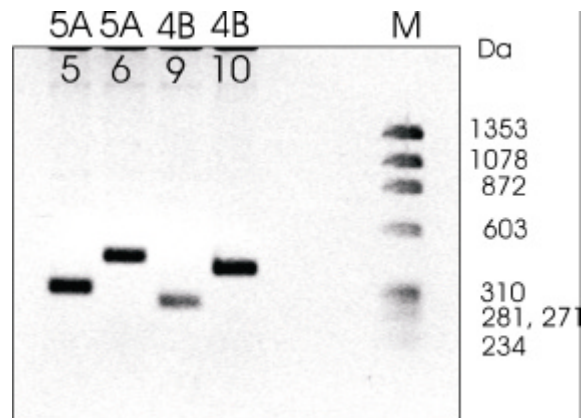


**Abb. 3.10: Agarosegel der PCR-Produkte 1 A+B und 4 A+B vor Klonierung in den Vektor pBluescript SK**

In Spur 1 (doppelt aufgetragen) wurde als Template cDNA von etiolierten Koleoptilen mit Oligo(dT) Primern, in Spur 4 (ebenfalls doppelt aufgetragen) cDNA von etiolierten Koleoptilen mit Zufalls-hexamer Primern. Als Primer für die PCR wurden der HL#2\*-P3 und ein Oligo(dT) primer verwendet. M: 100 bp step-ladder als Molekulargewichtsmarker. Die Auftrennung von jeweils 10 µL PCR-Ansatz erfolgte in einem 1,5%igen Agarosegel.

Nach erfolgter Klonierung wurden positive blau/weiß - Klone mit Hilfe der Kolonie-PCR getestet. Waren die Klone hier ebenfalls positiv, wurden sie amplifiziert, die Plasmide isoliert und für die Sequenzierung vorbereitet.

Weitere Klone konnten nach RT-PCR von cDNA aus mRNA von etiolierten Koleoptilen und den Primern HL#2\*-P1 und Oligo(dT) erhalten werden. Die erhaltenen Fragmente wurden ebenfalls in den pBluescript SK Vektor kloniert. Verschiedene blau/weiß-positive Klone wurden mit Hilfe eines Restriktionsverdau auf das Vorhandenseins des Inserts getestet. In Abb. 3.11 ist das Ergebnis eines solchen Verdau mit anschließender Auftrennung im Agarosegel dargestellt.



**Abb. 3.11: Agarosegel eines Doppelverdaus der Klone 5A-5, 5A-6, 4B-9 und 4B-10 mit den Restriktionsenzymen BamHI und KpnI**

Die entsprechenden PCR-Produkte wurden zuvor aufgereinigt, in pBluescript SK kloniert und die Plasmide transformiert und aus *E. coli* aufgereinigt, um anschließend sequenziert zu werden. Die Analyse des Verdaus erfolgte in einem 1%igen Agarosegel.

Klone, die nach Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen BamHI und KpnI, ein Insert besaßen, wurden reamplifiziert und für die Sequenzierung vorbereitet. Alle für die Sequenzierung aufbereiteten Plasmide wurden in ddH<sub>2</sub>O gelöst, die Konzentration entsprechend der Vorgaben der Sequenzierfirmen eingestellt und in 1,5 mL Eppendorfreaktionsgefäßen versandt.

### 3.2.4. SEQUENZIERUNG DER KLONE

Für die Sequenzierung der klonierten PCR Fragmente wurden sowohl die Dienste der Firma SeqLab in Göttingen als auch von GATC in Konstanz genutzt. SeqLab versendet die erhaltenen Sequenzen per email, GATC nutzt eine sogenannte „WatchBox“, bei der per Internet der Stand der Sequenzierungsarbeiten verfolgt sowie die Ergebnisse heruntergeladen werden können.

#### 3.2.4.1. Horcolin

Die Ergebnisse der Sequenzierung des 665 bp Fragmentes mit den PCR-Primern FP1- und RP3-Horcolin sind in Abb. 3.12 dargestellt. Die Sequenz wurde sowohl von 5´ - 3´ als auch von 3´ - 5´ Richtung sequenziert. Nach Umschreibung der 3´ - 5´ Sequenz in 5´ - 3´ Richtung mit Hilfe des Computerprogramms OMIGA wurden die Sequenzen verglichen und auf Fehler überprüft. Anhand der bekannten Sequenz des pTAdv-Vektors sowie der Klonierungsstelle konnte die Insertionsstelle genau bestimmt werden.

```

GCACGAGCTAAGTCACTCTTCTAGACCAATACATAGGTTGCTGCCTTGGGTGGATT
TGGTAAAGCAGGAGCCAAAATGAGCAAGCCTGTGAAGATTGGGCCATGGGGTGGG
AATGGTGGCAGCGAGCGTGATGTCCAGCCAAAGCCCATCCGTATGGTTAGTATGAC
CGTCAGTAGCGGAGCTATCGTTGACGCTATTGCATTACCTATGTGGGCACCGATAA
CGTTCAACACTCTTCCGGCATCAAGTGGGGTGGCACTGGCGGCACAGAAGATACG
ATTAATCTAGACGCTACGAACTACGTGACCGAAATCTCCGGGACAGTGGGTAAATT
TGGGACCGACGACATCGTCACGTCTCTTAAAATTATCACCTCCAAGGGGGTTACCA
GGACATACGGCTCAGGTACCGGAATTCATTCCGCGTCCCGGTGCTTGACGGGGGT
AAGATCGCCGGCTTCTTTGGACGGGCTGGTGCTTTCCTGGACGCGATTGGGTCTA
CATTACTCCATGAATGGTTGGTTGATATCGGCCGgccACCTCTCTCTGGAGGAAGG
AGGTGGCGTAGTACTACCGGCAGCGTCTGCTTGCTAGAATAAAATAAACTTGTGAAG
TGCCTTACATGGCACTTTAGCATATGTGTGGGATAATGTGTGACGCTGC

```

### Abb. 3.12: Klonierte cDNA-Sequenz von Horcolin

Der rote Bereich kennzeichnet den für die Translation gewählten Ausschnitt der Sequenz, schwarze Bereiche die Anteile des pTAdv-Vektors. Die klonierte Sequenz hat eine Größe von 665 Bp.

Mit Hilfe des Programms OMIGA wurde die inserierte Sequenz unter Verwendung des Standard-Codes im Leserahmen +2 in die entsprechende Aminosäuresequenz translatiert. Folgende Aminosäuresequenz konnte auf diese Weise ermittelt werden:

```

MSKPVKIGPWGGNGGSERDVQPKPIRMVSMTVSSGAIVDAIAFTYVGTDNVQHSSGI
KWGGTGGTEDTINLDATNYVTEISGTVGKFGTDDIVTSLKIITSKGVTRTYGSGTGIPF
RVPVLDGGKIAGFFGRAGAFLLDAIGFYITP

```

Die roten Aminosäuren entsprechen denen der sequenzierten Peptide. Kursive Lysine (**K**) stellen LysC-Spaltstellen dar. Aufgrund dieser hohen Übereinstimmungen kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der klonierten Sequenz um die cDNA des Proteins Horcolin handelt. Non-redundante Datenbankenabfragen ergaben, dass die Sequenz bis dahin keinem bekannten Protein zuzuordnen war.

Die Sequenz wurde bei NCBI eingereicht und ist unter der „Accession number“: AY033628 registriert.

#### 3.2.4.2. Klone 5A-5, 5A-6, 4A-30, 4B-9, 4B-10

Folgende Sequenzen konnten durch die Klonierung der PCR Fragmente identifiziert werden. Diese wiesen aufgrund der Verwendung von degenerierten Primern unterschiedliche Sequenzen auf.

Graue Bereiche kennzeichnen die Sequenz des pBluescript SK Vektors. Der Vektor wurde mit dem Restriktionsenzym SmaI geöffnet, so dass die Insertionsstelle der PCR Fragmente eindeutig zu bestimmen war. Die Plasmide wurden sowohl in 5´ - 3´ als auch in 3´ - 5´ Richtung sequenziert. Angegeben ist die 5´-3´ Sequenz. Die Klammern kennzeichnen die jeweiligen nach der Einreichung erhaltenen NCBI „Accession number“.

Insert 4A-HL#2-R (AJ303115)

gGAgCTCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAAGTGGATCCCCGGCCGTGGGGCGGA  
 CGCGGCCGGCCACGACCCCGCCGGGTGGCGCGCGGGAGGACGTGGAAGAGCAGCAG  
 CGTCTGGAGCGACCTCAGGTTGCGGGGCTCCAGCAGGAAGCGCTGAACTCCGGGTCGAG  
 GTCCCGCTCCAGCGCCTCGTTCGGGGCGCGAAGATGGTGACGTCGTGCCGCCCCAGGG  
 CTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGGTA

Die Suche in EST-Datenbanken (NCBI, Blast est) ergab, dass der Klon 4A-HL#2-R homologien zu Sequenzen aus Weizen (BE586778), Gerste (BG369871) und Reis (AA752549) aufweist. Die Abfrage non-redundanter Datenbanken (NCBI, Blast nr) ergab keine signifikanten Treffer (E Wert unter 0,05).

Insert von PCR-Produkt 1A:

GCCAGGNTCCGTNCCGCAGCTAGGTAGCTAGCTATGAGCAGGACAGC

Insert 5A in Klon 5 5A-5T7 (AJ303113)

AGGTCGACGGTATCCATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCAAGATCGGGCCGTGGGG  
 TGGACCCGTCGCTGCCGCGTTCAAGTGCCAGGAATGCCACCGGGCGCTCGTCGTCGTC  
 GGCCTGGAGTCATCCCGATAGTTGCCCGCTCACGCCAACTCTGGTATGCATGCATCT  
 TCTGTTACAGGGCAGCATTATGGGGGCGAGCAGGATGGACAGTTCTTACGTTGTGTTGACC  
 AAGCAGAACAGACCTNAAGGCCCTGGTATTCCCCACGGCCCGATCTTGGGGATCCACTA  
 NTTCTAGAGCGGTCNNCACCGCCGNGGAGCTCCAGCTTTNGTTNCCTTTANCGAGGGT

Für den Klon 5A-5T7 ergaben sich bei der EST-Suche Übereinstimmungen mit Sequenzen von gestressten Gerstenpflanzen (BG301189), von infizierten Gerstenpflanzen (BF268121), von Weizen (BG906435 und BG606353) und von Reiscalli (C28120).

Ergebnis einer non-redundanten Datenbanksuche ist lediglich eine ähnliche Sequenz aus Weizen für das „beclin1-like“ Protein.

Insert 5A in Klon 6 5A-6T7 (AJ303114):

GAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCAAGATCGGGCCGTGGGGT  
 GGGCGGAATATTCTTTGATGATCTCAGTGACCATGATCAAGAACTCTACTTGACTTCGCG  
 GCAGAGTGCGCGGCCTCTGTAATTCCTGCATACATCCCATCATAGAACGTCCGAAAGAC  
 ACCCATTTACAGAAGATCACAGGGCATGGCAGCAGCTACGGAGAGGTCGCTATGTGGAA  
 TTCAACCTCGTCTATGATCGTGGCACAACATTTGGCCTCAAACTGGAGGACGGATCGAGA  
 GTATCCTTGTTTCCCTCCCTCTGACGGCACGGTGGGAGTATGATCATGTAATTTAAGATGC  
 TCTGTTACTGTTATATAACTGATAAACACAAACAGTTTCGATCCCCACGGCCCGATCTTGGGA  
 TCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTTA

Für den Klon 5A-6T7 ergab die EST-Recherche Homologien zu Sequenzen aus Gerste (AW983316) von cDNA aus „pre-anthesis“ Gewebe, zu Sequenzen aus wasser-gestresster Hirse (BE593138 und AW747385) sowie zu Sequenzen aus Weizen (BG909281).

Die Suche in non-redundanten Datenbanken zeigt, dass es sich bei der Sequenz mit höchster Wahrscheinlichkeit um Teile der mRNA für die Coproporphyrinogen Oxidase (X82830) handelt (E Wert von  $5e^{-38}$  bei einer Identität von 84 %).



Insert 4B in Klon 9 4B-9T7.seq:

TCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCGGGCCATGGGGCGGC  
ACGCTCTACCACTTAGACGATCTGCCCTTCAGGCTCAATGACATGCCATCCAGCTATGGCG  
GATTCAGGGAGGCTGTCAAGGGGTTGGAGTTAGGAAGGTGCTGGACGCGCCAGAAGAG  
GTCAAGTGTGTGCCTATGAAGAATGTGCTTGAGCCTGGTCCCGCCCAAGGCCCGGGATC  
CACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGT

Die EST-Datenbanksuche ergab für diesen Klon Übereinstimmungen mit Tomaten-Resistenz-EST's sowie mit Sequenzen aus einer Baumwollfaser-Bibliothek.

Insert 4B in Klon 10 4B-10T7 (AJ303111)

CGAATTGGGTACCGGGCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATT  
CCTGCAGCCGGGCCCTTGGGGCGGGACCGATCAACATGCACAACGCGTCACGGGTTGACG  
AAGACGTGAGCTCGAGGACGGCGTTGGGGTGGTCGAGCCGGACGGTCTTCCACAGCAC  
GTACCCTGTGGCCATCCTGAACTGCCCGTGC CGCCCAAGGCCCGGGCCATGGGGCGG  
CACCGGAGGGGAGAAGGAAGACCCGGACACGATCACGTTGGGCCCTCGGAGTACATAA  
CTCAGGTGACTGGTTCGGTGGGACCGTTCAAGCTCAAGGAGATCGAGCACTGCATCACCT  
CGCTCAAGTTTGTGACCAACCAGGCCAGCTACGTCCCGCCCAAGGCCCGGGATCCACTA  
NTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGNGGAGCTCCANCTTNTGNTCCCTTTANNGANGC

Die Datenbanksuche im Bereich der EST-Sequenzen ergab eine Vielzahl von homologen EST's. Hierunter sind Sequenzen aus der Gerste ([BF625823](#), [BE 411737](#), [BF620088](#)) Weizen ([BF482592](#), [BE426067](#), [BE429737](#), [BF628327](#)), Roggen ([BE705062](#)) und u.a. Reis ([D40095](#)). Die unterstrichenen Sequenzen erscheinen ebenfalls bei der Datenbanksuche mit der Sequenz von Horcolin und HL#2.

Hervorzuheben ist hier das Ergebnis der non-redundanten Datenbank, da hier die Sequenz des HL#2 als Treffer angegeben wurde. Für eine genauere Untersuchung dieses Befundes wurde der Klon 10 4B-10T7 in die verschiedenen Leserahmen translatiert. Hierbei ergab der Leserahmen +2 folgende Aminosäuresequenz:

GLGAGPINMHNASRVDEDVELEDGVGVVEPDGLPQHVPCGHPPELPRAPRPGPWG  
GTGGEKEDPDTITLGPSEYITQVDWSVGPFLKEIEHCITSLKFVTNQASYVPPQG

Der unterstrichene Bereich kennzeichnet einen Teil der Aminosäuresequenz, der eine hohe Übereinstimmung mit dem mittleren Teil des Proteins HL#2 aufweist. Auf diese und weitere Besonderheiten von verwandten Sequenzen wird im Diskussionsteil näher eingegangen.

### 3.3. REKOMBINANTES HORCOLIN

Für weitere Funktionsuntersuchungen sollte die Sequenz des Horcolin in einen Expressionsvektor kloniert werden, um das Protein rekombinant in *E. coli* zu überexprimieren. Mit dem rekombinanten Protein können verschiedenste Untersuchungen zur Aufklärung seiner Funktion durchgeführt werden. So sind Hemm-Tests in Bezug auf das Wachstum von Mikroorganismen, Lektinbindungs-Tests, Hämagglutinations-Tests, Mitogenitäts-Tests und weitere, die Funktion charakterisierende Versuche möglich. Die Produktion von rekombinantem Horcolin ist auch aus dem Grund sinnvoll, dass diese Isolierung und Aufreinigung des nativen Proteins aus etiolierten Koleoptilen sehr zeit- und arbeitsaufwendig ist.

#### 3.3.1. ENTWURF DES KONSTRUKTES

Als Expressionssystem wurde das System „QiaExpress“ der Firma Qiagen in Hilden gewählt. Hierbei wird das rekombinante Protein mit einem 6xHis-Tag versehen und in M15 *E. coli* Zellen nach IPTG Induktion überexprimiert. Der His-Tag wurde dem N-terminalen Bereich des Horcolin hinzugefügt.

Damit die Sequenz an die richtige Stelle und im Leserahmen in den pQE-30 Vektor inseriert werden konnte, mussten in die Horcolin-Sequenz jedoch vorher Restriktionschnittstellen eingeführt werden. Dies wurde mit Hilfe der PCR durchgeführt. Hierzu wurden folgende zwei Primer entworfen:

Horcolin-expr-F (forward) Primer mit BamHI Schnittstelle:  
CGC**GGATCC**ATGAGCAAGCCTGTGAAGATTGG

Horcolin-expr-R (revers) Primer mit HindIII Schnittstelle:  
CGC**AAGCTT**TGGAGTAATGTAGAACCCAATCG

Abb. 3.13 ist die cDNA von Horcolin mit den Positionen der eingefügten Schnittstellen dargestellt. Mögliche Restriktionsenzyme mussten die Bedingung erfüllen, dass sie in der MCS des pQE-30 Vektors vorkommen, aber nicht innerhalb der Sequenz des Horcolin schneiden. Mit dem Computerprogramm GeneRunner konnten die Restriktionsenzyme BamHI und HindIII gefunden werden, die beide Bedingungen erfüllten. Die BamHI Schnittstelle befindet sich im Bereich des ATG-Startkodons, während die HindIII-Schnittstelle im 3'-Bereich der Sequenz liegt. Die natürlich vorkommende EcoRI-Schnittstelle innerhalb der klonierten Sequenz ist von Bedeutung für die Kontrolle des Inserts nach erfolgter Klonierung in den Vektor.

```

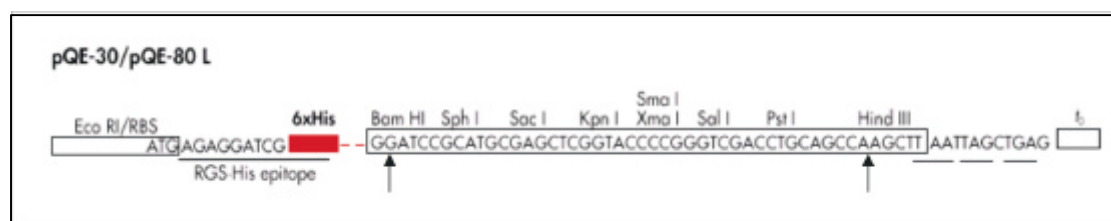
GCACGAGCTAAGTCACTCTTCTAGACCAATACATAGGTTGCTGCCTTGGGTGGATTTGGTA
      GGATCG BamHI
AAGCAGGAGCCAAAATGAGCAAGCCTGTGAAGATTGGGCCATGGGGTGGGAATGGTGGC
AGCGAGCGTGATGTCCAGCCAAAGCCCATCCGTATGGTTAGTATGACCGTCAGTAGCGGA
GCTATCGTTGACGCTATTGCATTCACCTATGTGGGCACCGATAACGTTCAACACTCTTCCG
GCATCAAGTGGGGTGGCACTGGCGGCACAGAAGATACGATTAATCTAGACGCTACGAACT
ACGTGACCGAAATCTCCGGGACAGTGGGTAAATTTGGGACCGACGACATCGTCACGTCTC
TTAAAATTATCACCTCCAAGGGGGTTACCAGGACATACGGCTCAGGTACCGGAATTCATT
      EcoRI
CCGCGTCCCGGTGCTTGACGGGGGTAAGATCGCCGGCTTCTTTGGACGGGCTGGTGCTT
      TTCGAA HindIII
TCCTGGACGCGATTGGGTTCTACATTACTCCATGAATGGTTGGTTGATATCGGCCGgccACC
TCTCCTCTGGAGGAAGGAGGTGGCGTAGTACTACCGGCAGCGTCTGCTTGTAGAATAAA
TAAACTTGTGAAGTGCCTTACATGGCACTTAGCATATGTGTGGGATAATGTGTGACGCTG

```

### Abb. 3.13: Modifizierte cDNA Sequenz von Horcolin

Die unterstrichenen Bereiche kennzeichnen die mit der PCR modifizierten Stellen. Die EcoRI-Schnittstelle ist natürlicherweise in der Sequenz vorhanden und konnte wegen ihrer asymmetrischen Lage zur Kontrolle des Inserts verwendet werden.

Wie in Abb. 3.14 zu sehen ist, befindet sich der 6xHis-Tag im 5'-Bereich vor der zu klonierenden Sequenz. Hierdurch wird das rekombinante Protein im N-terminalen Bereich mit sechs Histidinen versehen. Diese ermöglichen die spätere Aufreinigung mit Hilfe der Nickel-Affinitäts-Chromatographie. Der HindIII-Schnittstelle nachfolgend liegen drei Stopkodons für die entsprechenden Leserahmen. Hierdurch wird ein eindeutiges Translationsende definiert.



### Abb. 3.14: Schema des verwendeten pQE-30 Vektors von Qiagen

Die Pfeile kennzeichnen die Restriktionsschnittstellen der MCS, in die die Horcolin-Sequenz kloniert wurde (Quelle: <http://www.qiagen.com>).

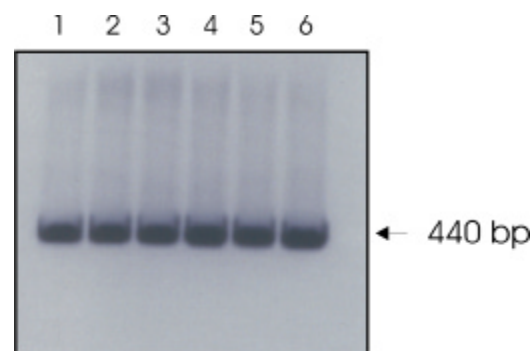
Das rekombinante Protein hat unter Verwendung des Standardkodes für die Translation, auf Basis der verwendeten Vektor- und cDNA Sequenzen, folgende Aminosäuresequenz:

**MRGSHHHHHHGSMSKPVKIGPWGGNGGSDVDVQPKPIRMVSM TVSSGAIVDAIAFT  
YVGTDNVQHSSGIKWGGTGGT EDTINLDATNYVTEISGTVGKFGTDDIVTSLKIITSKG  
VTRTYGSGTGIPFRVPVLDGGKIAGFFGRAGAF LDAIGFYITPKLN**

Das RGS-His Epitop wird von einem speziellen Antikörper erkannt, so dass die Detektion des rekombinanten Proteins erleichtert wird.

### 3.3.2. UMKLONIERUNG IN DEN PQE-30 EXPRESSIONSVEKTOR

Zur Klonierung der Sequenz wurde zuerst mit Hilfe der PCR ein 440 bp großes Fragment amplifiziert, das die Sequenzen für die Restriktionsschnittstellen enthielt. Das in Abb. 3.15 gezeigte Fragment wurde nach Auftrennung in einem Agarosegel aus diesem eluiert.

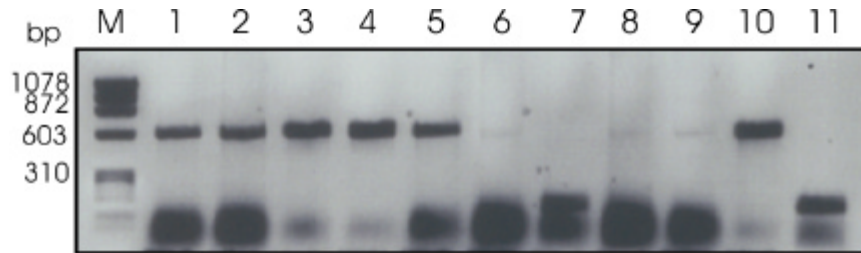


**Abb. 3.15: Agarosegel mit amplifizierten DNA-Fragmenten für die Klonierung des Horcolin**

Mit Hilfe der PCR und der Primer Horcolin-FP, -RP sowie der klonierten cDNA von Horcolin wurde eine Sequenz von 440 Bp amplifiziert, die nun die gewünschten Restriktionsschnittstellen trägt. 1-6 jeweils identische Ansätze für Insert-Isolierung. Die DNA-Fragmente wurden in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und anschließend aus dem Gel isoliert.

Das Insert wurde nicht direkt in den pQE-30 Vektor kloniert, sondern zuerst in den pGEM Vektor. Dies war u.a. deshalb sinnvoll, weil ein Restriktionsverdau mit isolierten PCR-Produkten häufig unvollständig ist und zu Problemen bei der Klonierung führen kann. Da der pGEM Vektor mit dem  $\beta$ -Galaktosidasegen ausgestattet ist, vereinfachte dieser die Überprüfung der Klonierung.

Nach erfolgter Ligation in den Vektor und Transformation von XL-1 blue *E. coli* Zellen wurden positive blau/weiß Kolonien mit Kolonie-PCR hinsichtlich des Insertionsereignisses überprüft (Abb. 3.16).



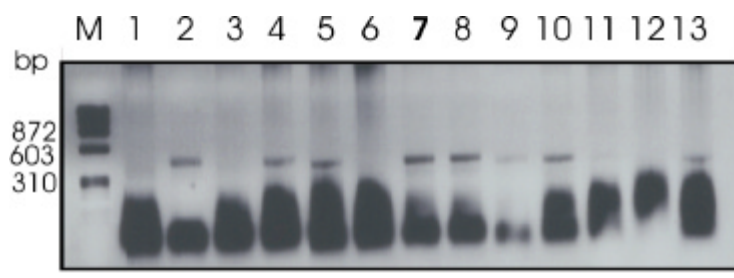
**Abb. 3.16: Agarosegel der DNA-Fragmente der Kolonie-PCR nach blau/weiß-Screening**

1-11 repräsentieren PCR-Ansätze mit SP7- und T7-Primer sowie mit den jeweiligen Kolonien 1-11 nach der Transformation. Hierdurch konnten positive Klone identifiziert bzw. verifiziert werden. Die DNA wurde in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt. Es wurden jeweils 10  $\mu$ L des PCR-Ansatzes aufgetragen. Von den positiven Kolonien 1 bis 5 und 10 wurde Nr. 1 für die weiteren Schritte ausgewählt.

Für die weiteren Arbeitsschritte wurde die Kolonie 1 ausgewählt. Diese Kolonie wurde amplifiziert, die Plasmide isoliert und ein Restriktionsverdau mit den Enzymen BamHI und HindIII durchgeführt. Nach Auftrennung der DNA wurde das 440 bp Fragment aus dem Gel isoliert. Parallel hierzu wurde ein weiterer Restriktionsverdau mit dem pQE-30 Vektor und den gleichen Restriktionsenzymen durchgeführt. Das geöffnete Plasmid wurde ebenfalls aus dem Agarosegel aufgereinigt.

Nach erfolgter Ligation von Insert und pQE-30 Vektor wurden XL-1 blue *E. coli* Zellen mit diesem Konstrukt transformiert.

In Abb. 3.17 ist das Ergebnis einer PCR mit einigen der gewachsenen Kolonien gezeigt. Da der pQE-30 Vektor nicht über das  $\beta$ -Galaktosidase-Gen verfügt, ist kein blau/weiß Screening möglich.

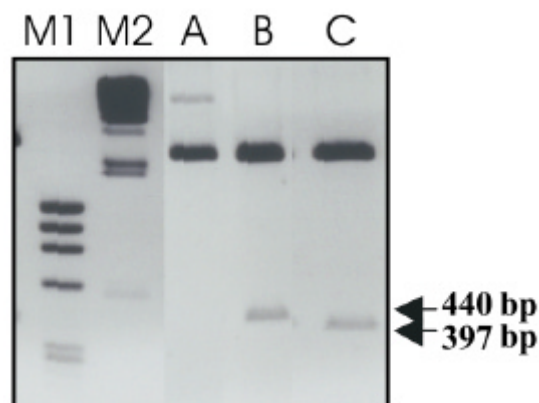


**Abb. 3.17: Agarosegel der Kolonie-PCR mit dem aus pGEM ausgeschnittenen und in den pQE 30 ligierten Fragment**

Als Template für die PCR mit den Horcolin-FP und -RP Primern wurden einige der gewachsenen Kolonien verwendet. Die Auftrennung erfolgte in einem 1,2%igen Gel. Für die weiteren Klonierungsschritte wurde die Kolonie Nr. 7 verwendet.

Für die Transformation der M15 *E. coli* Zellen wurde die positive Kolonie 7 amplifiziert, die Plasmide isoliert und nach erfolgter Aufreinigung eingesetzt.

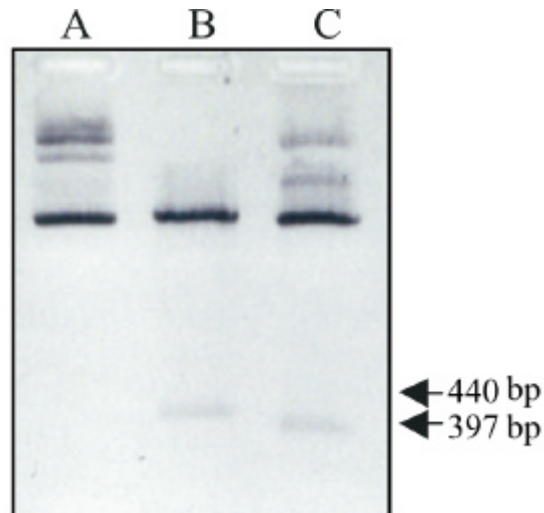
Vor der Transformation wurde der Vektor durch Restriktionsverdau auf die richtige Orientierung des Inserts überprüft. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abb. 3.18 dargestellt. Ein Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen lieferte ein Fragment von ca. 440 bp. Ein Verdau mit EcoRI muss bei richtiger Orientierung des Inserts ein Fragment von ca. 397 bp ergeben und bei falscher ein Fragment von 160 bp. Dies aufgrund der asymmetrischen EcoRI-Schnittstelle, die in der Horcolin-Sequenz natürlicherweise vorkommt.



**Abb. 3.18: Agarosegel der Fragmente eines Restriktionsverdaus zur Bestimmung der Insertorientierung**

A zeigt nicht geschnittenes Plasmid der Kolonie 7. In Spur B wurde mit BamHI und HindIII und in Spur C nur mit EcoRI geschnitten. Bei falscher Orientierung wäre in C nur ein Fragment mit der Größe von 160 bp zu erwarten gewesen. In Spur M1 wurde  $\phi$ -DNA-Marker und in M2  $\lambda$ -DNA-Marker als Größenstandard verwendet. Die Auftrennung erfolgte in einem 1%igen Agarosegel.

Nach erfolgter Transformation der M15 *E. coli* Zellen wurde von einigen der gewachsenen Kolonien eine Masterplatte angelegt. Mit einer dieser Kulturen wurde eine Vorkultur angeimpft. Von einigen mL dieser Vorkultur wurde ebenfalls eine Plasmidpräparation und anschließend ein Restriktionsverdau durchgeführt. Das Ergebnis dieses Verdaues wird in Abb. 3.19 gezeigt.



**Abb. 3.19: Agarosegel der DNA-Fragmente eines Restriktionsverdaus von Plasmid-DNA aus einer Probe der Vorkultur für die Proteinüberexpression**

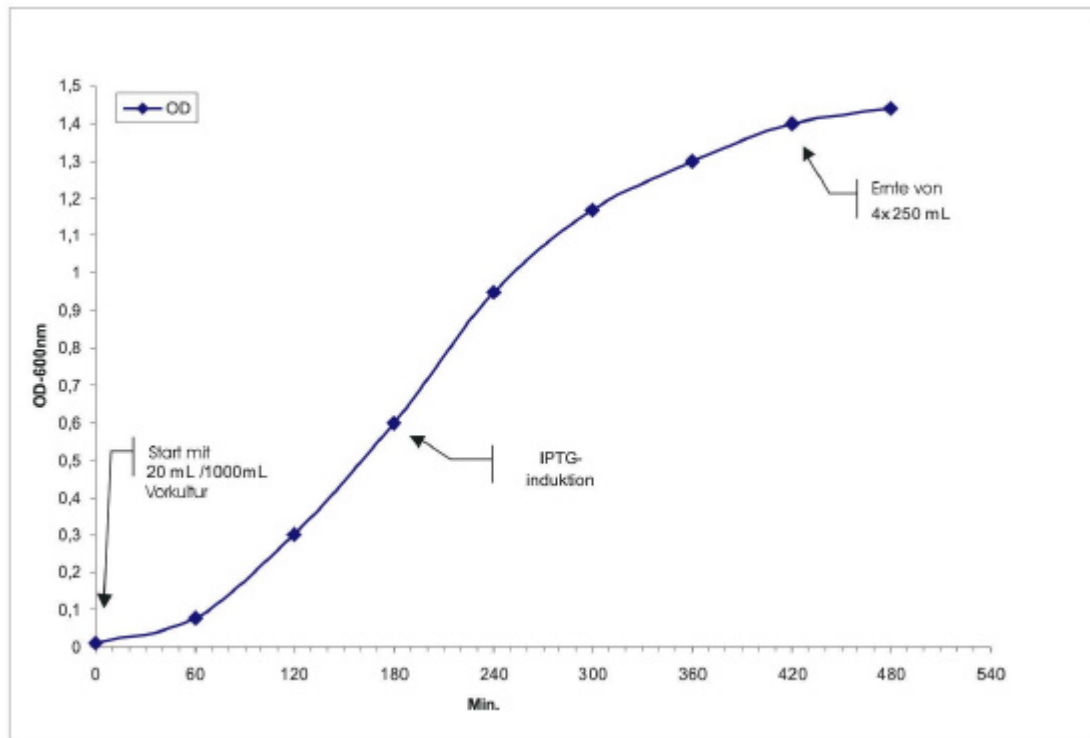
A zeigt nicht geschnittenes Plasmid der Vorkultur. In Spur B wurde mit BamHI und HindIII und in Spur C nur mit EcoRI geschnitten. Die Banden im Bereich von 440 Bp und 397 bp weisen darauf hin, dass die *E. coli* Bakterien das Plasmid trugen. Die Auftrennung erfolgte in einem 1%igen Agarosegel.

Das Ergebnis zeigt, dass die verwendete Kolonie das Plasmid mitsamt dem richtigen Insert trug. Daher wurde diese Vorkultur für die Überexpression des rekombinanten Horcolin weiterverwendet.

### 3.3.3. ÜBEREXPRESSION IN *E. COLI*

20 mL einer Vorkultur wurden zum Animpfen von 1L LB-Medium eingesetzt. Das Wachstum der Kultur wurde anhand des OD-Wertes verfolgt. Hierzu wurde jede Stunde 1 mL der Kultur im Photometer gemessen. Abb. 3.20 zeigt die Wachstumskurve der *E. coli* Kultur.

Nachdem eine  $OD_{600nm}$  von 0,6 erreicht war, wurde der Kultur IPTG (final 1 mM) zugegeben und dadurch die Proteinexpression induziert. Nach 4 h wurden die Zellen abzentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung eingefroren.



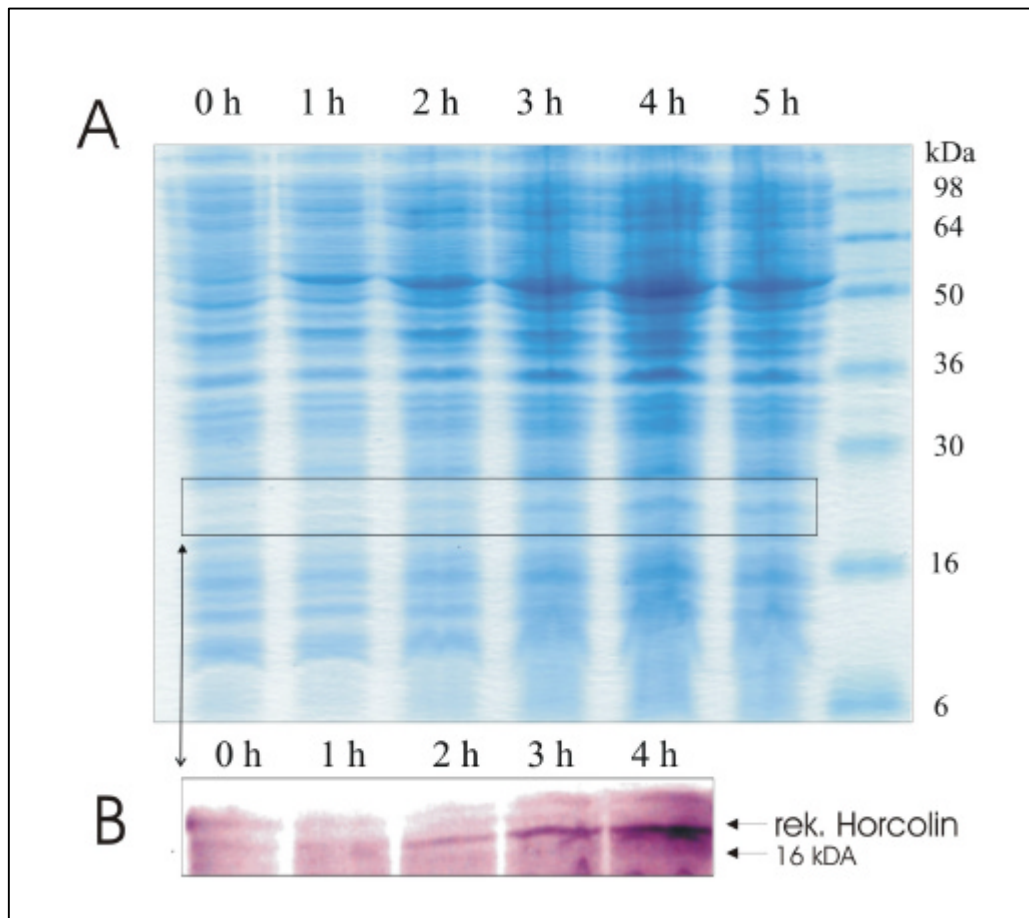
**Abb. 3.20: Wachstumskurve der Expressionskultur**

Nachdem die Kultur eine OD von 0,6 erreicht hatte, wurde mit 1 mM IPTG die Expression des rekombinanten Proteins gestartet. In Regelmäßigen Abständen wurde 1 mL abgenommen, um den OD-Wert zu bestimmen und um damit eine SDS-PAGE sowie eine Westernblot-Analyse durchführen zu können (vgl. Abb. 3.21)

Die gesammelten Proben für die Wachstumskurve wurden nicht verworfen, sondern aufbereitet, um sie in einem SDS-Gel aufzutrennen bzw. für eine Westernblot-Analyse zu verwenden. Das Coomassie gefärbte Gel (A) und der Westernblot-Analyse (B) sind in Abb. 3.21 zu sehen.

Der markierte Kasten in Teil A der Abb. 3.21 zeigt den Bereich des Gels, in dem sich das rekombinante Protein aufgrund seiner Molekularmasse befinden müsste. In der Tat ist dort auch eine schwache Bande zu sehen, die im zeitlichen Verlauf der Induktion zunimmt. Ebenso kann die Zunahme eines Proteins in diesem Bereich im Westernblot verfolgt werden, wie in Teil B der Abb. 3.21 zu sehen ist. Es ist jedoch nicht so, dass diese Bande den prominentesten Teil des Coomassie-Gels darstellt, wie bei einer optimalen Expression zu erwarten wäre.





**Abb. 3.21: Coomassie gefärbtes SDS-Gel und Westernblot-Analyse von Proben der Proteinüberexpression vom Horcolin**

A zeigt ein Coomassie gefärbtes SDS-Gel vom Gesamtextrakt zum jeweiligen Zeitpunkt. Teil B zeigt die jeweiligen Proben analysiert im Westernblot. Die Proteine wurden in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Westernblot-Analyse wurde mit dem 1:500 verdünnten Anti-HL#2-Antikörper durchgeführt, der das native Horcolin erkennt.

Aufgrund der Tatsache, dass vom Antikörper eine Bande im erwarteten Molekulargewichtsbereich detektiert wurde, wurden die eingefrorenen *E. coli* Zellen der weiteren Aufarbeitung zugeführt, um das rekombinante Protein mit Hilfe der Nickel-Affinitäts-Chromatographie aufzureinigen.

### 3.3.4. AUFREINIGUNG ÜBER AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

Die Aufreinigung des rekombinanten Horcolin erfolgte zum einen über die Nickel-Affinitäts-Chromatographie. Der His-Tag interagiert hierbei über Komplexbindungen mit der Ni-NTA-Matrix. Da diese Bindung reversibel ist, kann das Protein unter geeigneten Bedingungen von der Matrix eluiert und hierdurch aufgereinigt werden (weitere Information hierzu unter „The QIAExpressionist“ [Qiagen, 2001]).

Zum anderen wurde versucht, das Protein über seine Eigenschaften als Lektin aufzureinigen. Dies in der Annahme, dass das rekombinante Protein diese Eigenschaften noch besitzt.

#### 3.3.4.1. Aufschluss der Zellen und Proteinextraktion

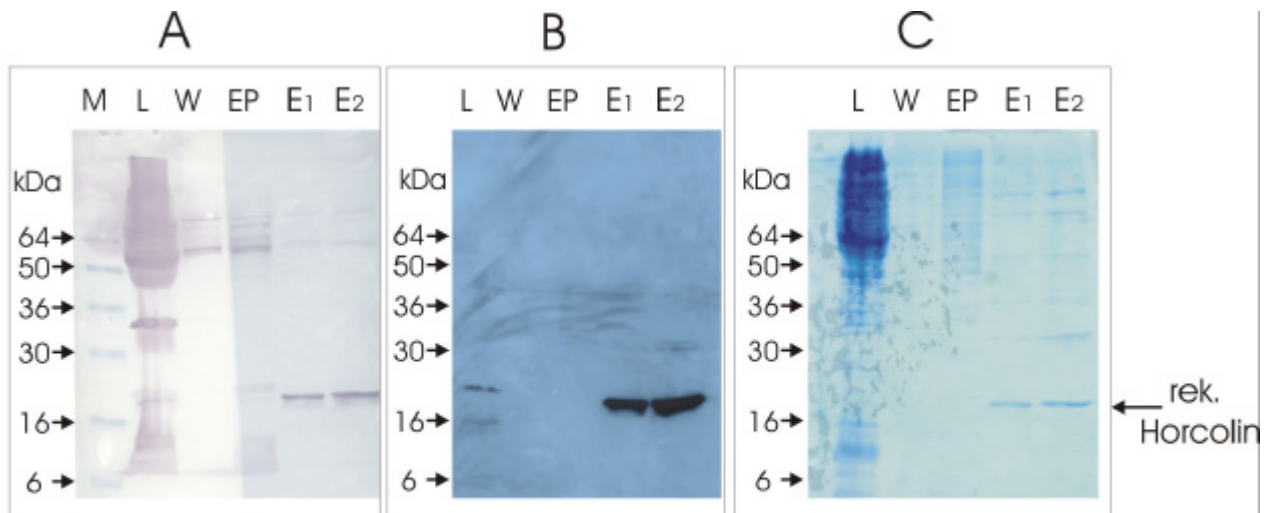
Zentraler Punkt bei der Aufreinigung ist immer der Aufschluss der Zellen und die Extraktion des Proteins. Dies natürlich besonders vor dem Hintergrund, dass eine Vielzahl von rekombinant überexprimierten Proteinen in unlöslichen „inclusion bodies“ vorliegt.

Für den Zellaufschluss wurde ein Verfahren aus „freeze thawing“ und Lysozymverdau mit Ultraschallbehandlung verwendet. Vergleicht man diese Methode mit dem Aufschließen der Zellen durch die French Press, so ist der French Press der Vorzug zu geben, da diese die Zellen gründlicher aufzuschließen scheint.

Das rekombinante Horcolin wurde soweit wie möglich unter nativen Bedingungen aufgereinigt, um Funktionsbeeinträchtigungen zu vermeiden.

#### 3.3.4.2. Ni-Agarose

In Abb. 3.22 wurde der Verlauf der Aufreinigung über die Ni-Affinitäts-Chromatographie durch Westernblot-Analysen dokumentiert. Es ist deutlich zu erkennen, dass das Protein sowohl vom His-Tag-Antikörper, als auch vom Anti-HL#2-Antikörper erkannt wird. Da der Anti-HL#2-Antikörper sowohl das rekombinante als auch das native Horcolin erkennt, kann davon ausgegangen werden, dass das Protein im richtigen Leserahmen kloniert wurde. Die Analyse des Lysates zeigt, dass das Protein nicht in „inclusion bodies“ vorliegt, da nur eine geringe Menge im Pellet nachzuweisen ist.



**Abb. 3.22: Nachweis des überexprimierten Proteins im Westernblot und SDS-Gel**

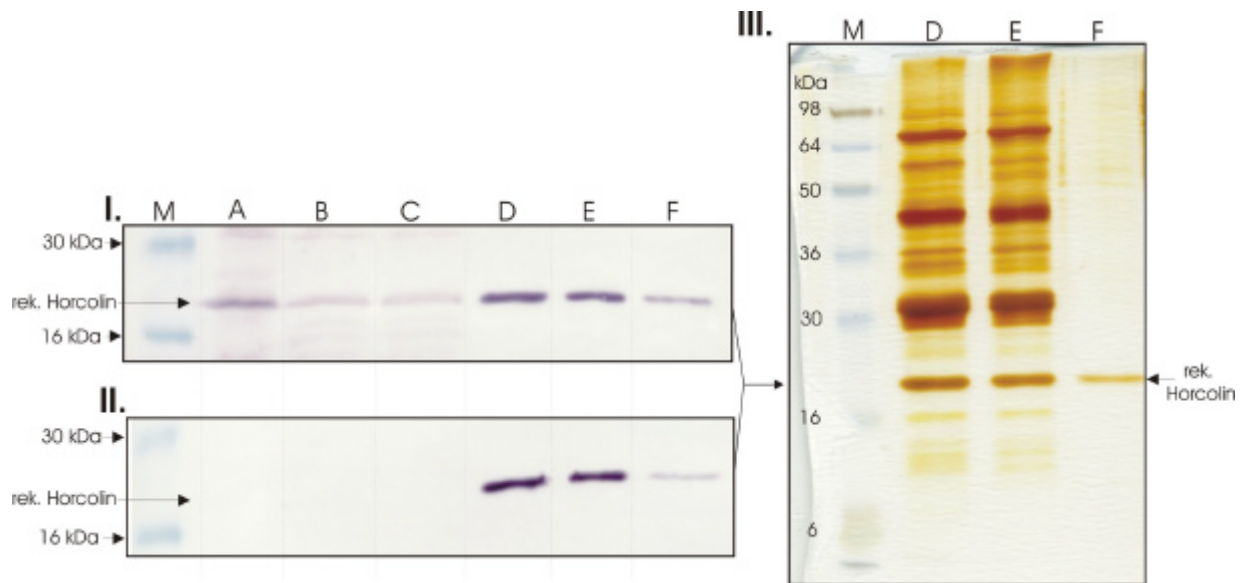
A und B zeigen einen Westernblot mit dem Anti-HL#2-AK (1:500 verd.) und dem Anti-His-Tag-AK (1:1000 verd.) von verschiedenen Reinigungsschritten. C ein SDS-Gel. Abkürzungen stehen für: L = Lysat vor Ni-Säule, W = Waschfraktion, EP = SDS-Eluate von Ni-Matrix, E1/2 = Imidazol-Eluat (1= einfache und 2= doppelte Menge aufgetragen), M = 3  $\mu$ L SeeBlue Marker. Als zweiten Antikörper wurde in A ein an eine alkalische Phosphatase (1:10.000 verd.) und in B ein an eine Peroxidase (1:5000 verd.) gekoppelter AK verwendet.

Obwohl die Aufreinigung erfolgreich war, war die Menge des erhaltenen Proteins relativ gering. Um auszuschließen, dass möglicherweise das Protein trotz Eluierung an der Matrix verblieben war (in diesem Falle würde es Eigenschaften eines Lektins besitzen), wurde ein Teil dieser Matrix mit 1x SDS-Probenpuffer aufgeköcht. Wie in Abb. 3.22 in den Spuren mit der Bezeichnung EP zu erkennen ist, fand keine nachweisbare Interaktion mit der Matrix statt.

#### 3.3.4.3. Mannose-Agarose

Für das native Horcolin konnte eine Funktion als Lektin nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.6.1).

Aufgrund dieses Befundes wurde versucht, das rekombinante Protein mit Hilfe einer Affinitäts-Chromatographie mit Mannose-Agarose aufzureinigen. Das Ergebnis dieses Versuchs zeigt Abb. 3.23. Die Daten belegen, dass das rekombinante Horcolin eine deutliche Affinität zu Mannose besitzt.



**Abb. 3.23: Westernblot und Silbergel der Aufreinigung des rekombinanten Horcolin**

Teil I und II zeigen eine Westernblot-Analyse der einzelnen Reinigungsstufen. In I wurde der Anti-HL#2-AK (1:500 verd.) und in II der Anti-His-Tag-AK (1:1.000) als erster AK verwendet. Als zweiter AK wurde ein an eine alkalische Phosphatase gekoppelter AK verwendet (1:10.000 verd.). Teil III zeigt ein Silbergel mit den Proben. Abkürzungen bedeuten: A- Rohextrakt, B- Überstand vor Ni-Säule, C-Überstand nach Ni-Säule, D- Eluat der Ni-Säule vor Bindung an Mannose-Säule, E- Eluat der Ni-Säule nach Bindung an Mannose-Säule (zeigt, dass nur ein kleiner Teil an die Mannose-Säule bindet), F- Eluat der Mannose-Säule (nach dreimaligem Waschen), M- SeeBlue Molekulargewichtsmarker. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 15%igen SDS-Gel.

Durch den Einsatz der Mannose-Agarose gelang es weiterhin, das Protein von Kontaminationen durch andere Proteine zu befreien, die ebenfalls an die Ni-Matrix gebunden hatten und im Eluat vorlagen. Diese Verunreinigungen wären durch stringenteres Waschbedingungen zu reduzieren gewesen. Der Einsatz der Mannose-Agarose führte zu einer deutlich sichtbaren Aufreinigung des rekombinanten Proteins- wie in Teil III Spur F der Abb. 3.24 zu erkennen ist.

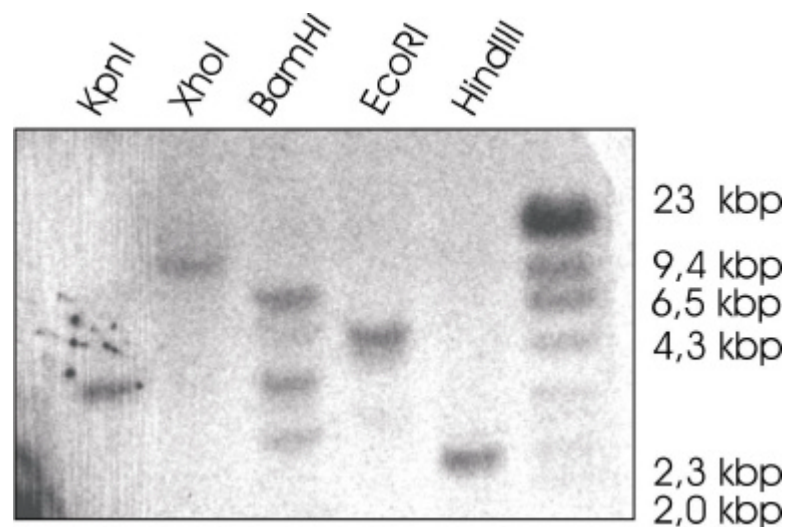
### 3.4. CHARAKTERISIERUNG VON HORCOLIN AUF NUKLEOTIDEBENE

Die Arbeiten von Pötter et al. [1995] und Menhaj [1998] konnten durch Northernblot- und Southernblot-Analysen Daten zur Expression des HL#2-Gens sowie zu dessen Anzahl im haploiden Genom liefern. Für Horcolin stand erst nach dessen Klonierung eine geeignete Sonde für diese Untersuchungen zu Verfügung.

#### 3.4.1. SOUTHERNBLOT-ANALYSE

Die Southernblot-Analyse soll Aufschluss über die Anzahl der Kopien im Genom der Gerste geben. Zur Gewinnung der genomischen DNA wurden ebenfalls etioliierte Koleoptilen verwendet, da diese weder über Chloroplasten noch über größere Mengen an Sekundärmetaboliten und Zellwandmaterialien verfügen, welche die Extraktion negativ beeinflussen können.

Die durch Restriktionsenzyme verdaute genomische DNA wurde, nachdem sie im Agarosegel aufgetrennt worden war, modifiziert, auf eine Nylonmembran geblottet und mit einer Horcolin-Sonde hybridisiert. Das Resultat der Southern-Analyse ist in Abb. 3.24 zu sehen.



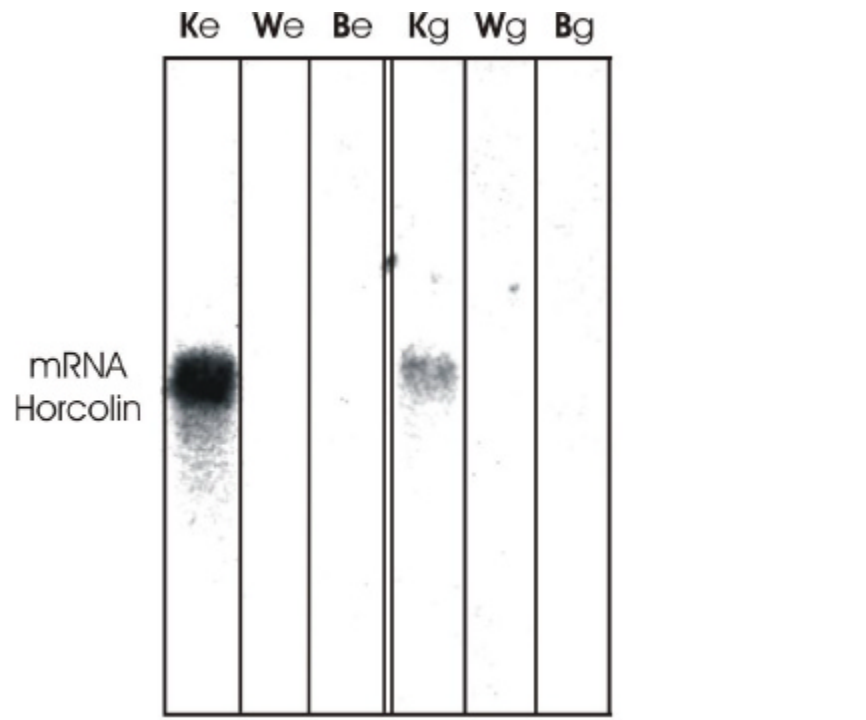
**Abb. 3.24: Southernblot-Analyse genomischer Gersten DNA mit Horcolin cDNA-Sonde**

Die Hybridisierung erfolgte unter stringenten Bedingungen unter Verwendung einer mit  $^{32}\text{P}$  radioaktiv markierten 440 Bp großen Horcolin cDNA-Sonde. Als Größenstandard wurde ein ebenfalls  $^{32}\text{P}$  markierter  $\lambda$ -HindIII Molekulargewichtsstandard eingesetzt. Pro Verdau wurden jeweils 15  $\mu\text{g}$  Gesamt-DNA verwendet. Die Hybridisierung fand bei 42°C statt (vgl. 3.4.1).

Bis auf den Verdau mit BamHI, der vier Banden ergeben hat, ist in den weiteren Ansätzen, die mit KpnI, XhoI, EcoRI und HindIII geschnitten wurden, nur jeweils eine Bande zu sehen. Dieses Ergebnis deutet auf ein „single copy“ Gen hin.

### 3.4.2. NORTHERNBLOT-ANALYSE

Die Analyse der Horcolin-Expression auf Ebene der RNA zeigt, dass das Gen ausschließlich in den Koleoptilen transkribiert wird. Wie in Abb. 3.25 dargestellt, konnte weder in den Wurzeln noch in den Blättern mit der Horcolin-Sonde ein Transkript nachgewiesen werden.



**Abb. 3.25: Northernblot-Analyse von verschiedenen Gewebeteilen (+/- Licht) mit Horcolin-Sonde**

Für die Northernblot-Analyse wurde Gesamt-RNA (jeweils 5 µg) von etiolierten Koleoptilen (Ke), etiolierten Primärblättern (Be) und den dazugehörigen Wurzeln (We) sowie von im Licht gewachsenen Koleoptilen (Kg), Blättern (Bg) und den dazugehörigen Wurzeln (Wg) verwendet. Hybridisiert wurde mit einer 440 bp großen Horcolin-Sonde, die mit  $^{32}\text{P}$  markiert wurde. Als Marker (M) wurde ein radioaktiver  $\lambda$ -HindIII DNA Standard verwendet. Die Hybridisierung erfolgte bei 42 °C.

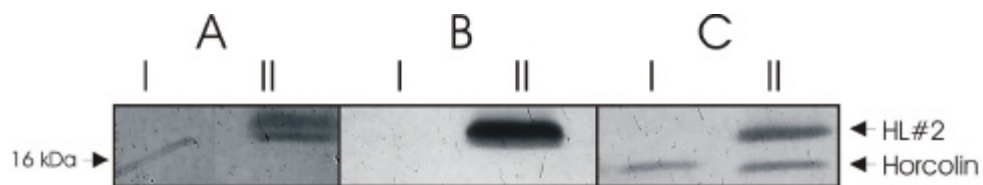
In den etiolierten Koleoptilen scheint eine höhere stationäre Konzentration des Horcolin-Transkripts vorzuliegen. Da im Vergleich hierzu die den unter Licht gewachsenen Koleoptilen eine geringere Transkriptmenge zu sehen ist, kann Licht hier möglicherweise ein regulatorisches Signal darstellen. Die Größe der mRNA von Horcolin kann auf ungefähr 880 Basen geschätzt werden.

### 3.5. PEPTID-ANTIKÖRPER GEGEN N-TERMINUS VON HL#2

Zur Unterscheidung von HL#2 und Horcolin wurde ein Peptid-Antikörper in Auftrag gegeben. Dieser wurde von der Firma Agro-bio / Frankreich gegen die N-terminale

Peptidsequenz „GDDGVAHDIT“ durch die Immunisierung von zwei Kaninchen hergestellt. Die Sequenz wurde anhand der Annahme ausgewählt, dass sich HL#2 und Horcolin zumindest im N-Terminus unterscheiden.

Die Abb. 3.26 zeigt einen Westernblot der beiden Kaninchen-Antikörper. Als Referenzprobe wurde ein löslicher Extrakt aus etiolierten Koleoptilen sowie ein Extrakt aus belichteten Koleoptilen und Primärblättern verwendet. Zur Kontrolle wurde der Anti-HL#2-Antikörper eingesetzt, der durch die Immunisierung einer Ziege mit dem rekombinanten HL#2 gewonnen wurde.



**Abb. 3.26: Vergleich der beiden Peptid-Antikörper aus Kaninchen mit dem Anti-HL#2-Antikörper aus Ziege**

Zum Test der Antikörper wurden lösliche Proteinextrakte aus etiolierten Koleoptilen (I) sowie Proteinextrakte aus unter Licht gewachsenen Gerstenkoleoptilen (II) mit Hilfe der SDS-PAGE (14%iges Gel) aufgetrennt und im Westernblot mit 1:500-Verdünnungen der Antikörperseren aus dem Kaninchen 2 (A), dem Kaninchen 1 (B) sowie aus der Ziege (C) analysiert.

Sowohl der Antikörper aus Kaninchen 1 als auch aus Kaninchen 2 erkennen nur das HL#2 und kein Horcolin. Hierdurch können beide Proteine mit Hilfe der Antikörper eindeutig voneinander unterschieden werden.

Vergleicht man Teil A und B der Abb. 3.26 miteinander, so fällt auf, dass der Antikörper aus Kaninchen 1 eine stärkere Erkennung von HL#2 aufweist.

### 3.6. FUNKTIONSUNTERSUCHUNGEN

Die Recherche in non-redundanten Datenbanken ergab u.a. für Horcolin und HL#2 eine Reihe von verwandten Proteinen, die eine nachweisliche Funktion als Lektin besitzen.

Anhand dieser Homologien wurden Horcolin und HL#2 auf ihre Eigenschaft hin überprüft, an Zucker zu binden. Diese Eigenschaft wurde mit Hilfe eines einfachen Lektinbindungs-Tests getestet und für das rekombinante Horcolin mit einem Hämagglutinations-Test verifiziert.

#### 3.6.1. LEKTINBINDUNGS-TEST

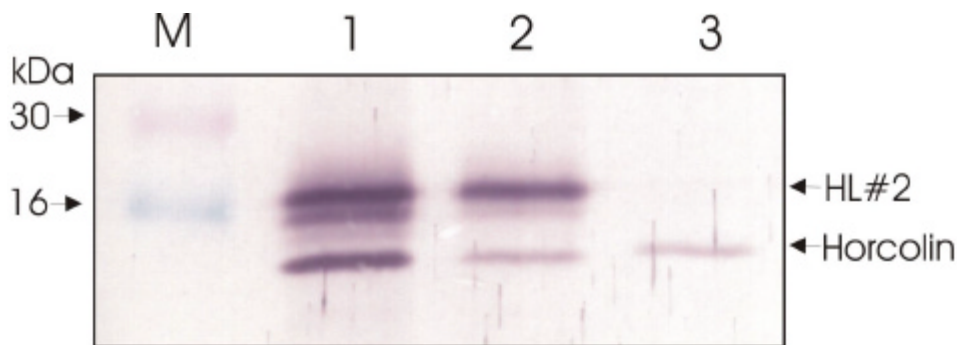
Mit Hilfe von verschiedenen Zuckern, die kovalent an eine Agarosematrix gekoppelt sind, können Aussagen über die Fähigkeit eines Proteins gemacht werden, an diese Zuckern zu binden. Bei Proteinen, die über diese Fähigkeit verfügen, spricht man von

Lektinen. Neben der allgemeinen Aussage, eine Lektinfunktion zu besitzen, ist auch die Frage nach dem jeweiligen Zucker von Bedeutung, da hierdurch eine genauere Einteilung erfolgen kann.

#### 3.6.1.1. Natives Horcolin und HL#2

Der Test basiert auf der Annahme, dass das Lektin reversibel an einen Zucker bindet, welcher an einer Agarose immobilisiert vorliegt. Nach Bindung an die Zucker-Agarose und mehrmaligem Waschen der Matrix sollte das Lektin durch geeignete Bedingungen wieder von der Zucker-Agarose eluiert werden können.

Die Abb. 3.27 zeigt das Ergebnis eines solchen Versuchs. Es ist deutlich zu sehen wie der Anteil des Horcolin nach der Bindung an die Mannose-Agarose abnimmt und wie es wieder von der Matrix eluiert wurde. HL#2 bindet nur in sehr geringem Umfang an die Matrix und konnte ebenfalls in nur geringem Maße durch Kochen der Matrix mit 1x SDS-Probenpuffer eluiert werden.

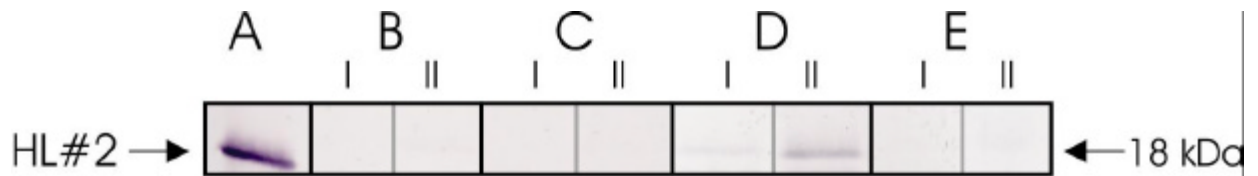


**Abb. 3.27: Westernblot-Analyse des Lektinbindungs-Tests mit nativem Horcolin und nativem HL#2 an Mannose-Agarose**

Für die Westernblot-Analyse wurden der Rohextrakt vor Bindung (1), der Überstand nach Bindung (2) und das Eluat der Mannose-Säule verwendet (3). M- SeeBlue Molekulargewichts-Marker. Als primärer Antikörper wurde der Anti-HL#2-AK (1:500 verdünnt) und als sekundärer ein an eine alkalische Phosphatase (1:10.000 verdünnt) gekoppelter AK verwendet. Die Proben wurde in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt.

Aufgrund der Tatsache, dass HL#2 nur sehr gering an die Mannose-Matrix gebunden hat, wurden weitere immobilisierte Zucker für den Lektinbindungs-Test eingesetzt. Neben Galaktose-, Maltose-, und Mannose-Agarose wurde bei diesem Versuch auch eine Mannan-Agarose verwendet. In Abb. 3.28 ist zu sehen, dass HL#2 zum Mannan eine deutlich stärkere Affinität aufweist als zu den anderen verwendeten Zuckern.





**Abb. 3.28: Lektinbindungs-Test von HL#2 an verschiedene Zucker-Agarosen**

A zeigt den verwendeten Rohextrakt, B das Eluat von der Galaktose-Matrix, C von der Maltose-Matrix, D von der Mannan-Matrix und E von der Mannose-Matrix. Eluiert wurde jeweils mit einem sauren Citrat-Puffer (I) sowie durch Aufkochen mit 1x SDS-Probenpuffer (II). In E ist eine schwache Bande zu sehen, die jedoch durch die Bildbearbeitung nahezu verloren gegangen ist. Die Proben wurden in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt. Als primärer AK wurde der Anti-HL#2-AK in einer 1:500-Verdünnung und als sekundärer ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter Anti-Ziegen-AK (1:10.000 verdünnt) verwendet.

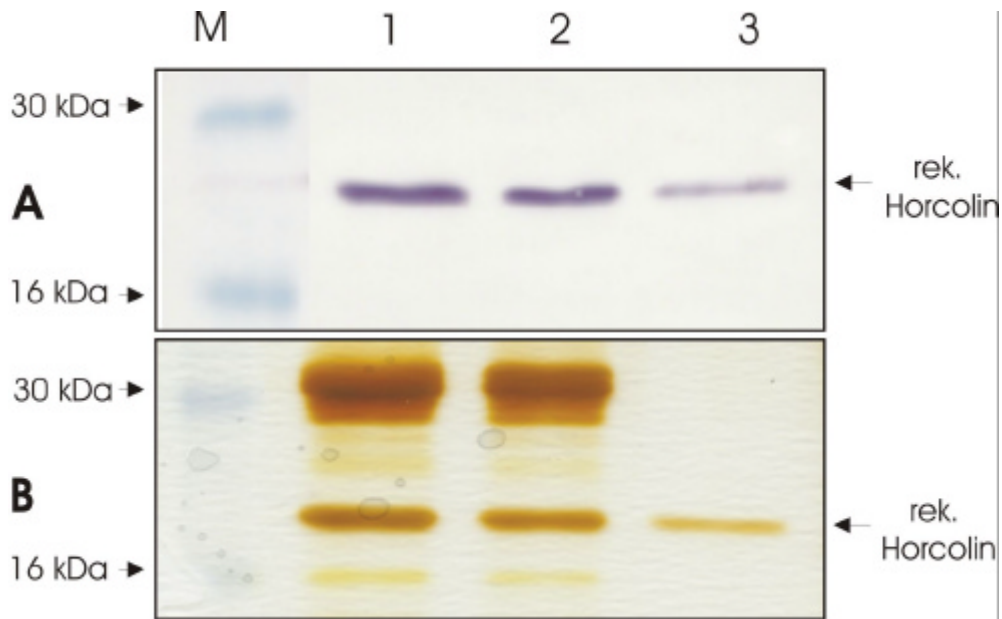
Für die Durchführung des Lektinbindungs-Tests sind die Bedingungen der Extraktion des Rohextraktes von Bedeutung, der für den Test eingesetzt wird. Der Rohextrakt sollte durch Homogenisieren im Mixer bei pH 3 gewonnen werden. Nach dem Abzentrifugieren von Zelltrümmern ist eine leicht gelbliche Färbung vorhanden, die sich, nach dem Umpuffern auf pH 7 in eine grünliche umwandelt. Voraussetzung hierfür ist, dass im Licht gewachsene Pflanzen verwendet wurden. Rohextrakte, die aus gefrorenem Material bei pH 7 bis pH 8 isoliert wurden, zeigten kaum noch Bindungseigenschaften. Die möglichen Gründe hierfür werden im Diskussionsteil erläutert.

#### 3.6.1.2. Rekombinantes Horcolin

Wie bereits in Abschnitt 2.4.16 erwähnt wurde, zeigt das rekombinante Horcolin ebenfalls eine Affinität zur Mannose-Agarose. Diese Eigenschaft wurde zur Aufreinigung des Proteins aus dem Eluat der Ni-Matrix eingesetzt.

Die Abb. 3.29 zeigt das Ergebnis des Lektinbindungs-Tests in Vergrößerung. Im Vergleich zur deutlichen Abnahme des nativen Horcolin vor und nach Bindung an die Matrix (vgl. Abb. 3.27), nimmt die Menge des rekombinanten Horcolin nur sehr geringfügig ab. Zusätzlich kann nur eine kleine Menge wieder von der Säule eluiert werden.

Grund für dieses Resultat könnten unzureichende Bindungsbedingungen des Tests sein, wie z.B. eine falsche Salzkonzentration oder ein falscher pH-Wert. Eine weitere Möglichkeit könnte auch darin zu suchen sein, dass die Zuckerbindungsstellen während der Aufreinigung mit bakteriellen Zuckern abgesättigt wurden. Es ist jedoch wahrscheinlicher, dass nur eine kleine Menge des Proteins noch aktiv ist.

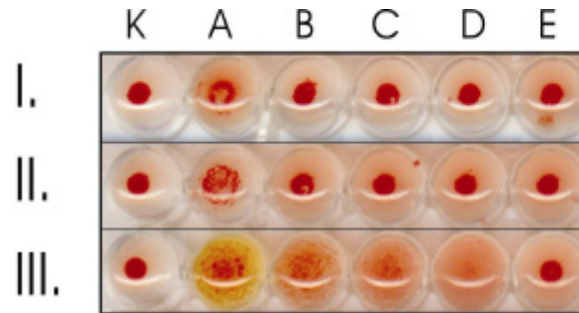


**Abb. 3.29: Westernblot und Silbergel eines Lektinbindungs-Tests mit dem rekombinanten Horcolin an Mannose-Agarose**

A zeigt eine Westernblot-Analyse mit 1- Eluat der Ni-Säule vor Bindung, 2- nach Bindung und 3- das Eluat der Mannose-Säule. In B ist das identisch beladene Silbergel zu sehen. Als Molekulargewichtsmarker (M) wurde der SeeBlue Marker (jeweils 3 $\mu$ ) verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 15%igen SDS-Gel. Für den Westernblot wurde eine Kombination aus Anti-HL#2-AK (1:500) und ein an eine alkalische Phosphatase gekoppelter Anti-Ziegen-AK (1:10.000 verdünnt) verwendet.

### 3.6.2. HÄMAGGLUTINATIONS-TEST

Mit dem rekombinanten Horcolin wurde ein weiterer klassischer Versuch zum Nachweis von Lektineigenschaften eines Proteins durchgeführt. Beim Hämagglutinations-Test werden Erythrozyten zusammen mit dem zu untersuchenden Protein bei RT inkubiert. Zeigt das Protein Bindungsaffinität zu den Zuckern auf der Oberfläche der roten Blutkörperchen, so verklumpt (hämagglutiniert) es diese. Zu sehen ist diese Reaktion daran, dass es zu keinem Sedimentieren der roten Blutkörperchen kommt. Abbildung 3.30 zeigt einen solchen Test.



**Abb. 3.30: Hämagglutinations-Test**

In Reihe I wurde für den Test Guttationsflüssigkeit, in Reihe II rekombinantes Horcolin und in Reihe III als Positivkontrolle das Lektin Concanavalin A verwendet. Folgende Verdünnungen der jeweiligen Substanzen wurden eingesetzt: A- 1:0, B- 1:10, C- 1:100, D- 1:1.000 und E- 1:10.000. Für den Test wurden 50  $\mu$ L einer 5%igen Erythrozytenlösung mit 50  $\mu$ L Probe (in den jeweiligen Verdünnungen) zusammenpipettiert, gemischt und dann stehen gelassen. In K wurden als Negativkontrolle nur 50  $\mu$ L 1x PBS zu den Erythrozyten gegeben.

Im Vergleich zu der Sedimentation der Negativkontrolle (auch als Knopf-Bildung bezeichnet), zeigte das rekombinante Horcolin eine Hämagglutination der roten Blutkörperchen (siehe Teil II in Abb. 3.30). Als Positivkontrolle wurde das als sehr stark hämagglutinierend wirkende Lektin ConA eingesetzt. Für einen weiteren Test wurde Guttationsflüssigkeit verwendet, die Lektine zu enthalten scheint, da es ebenfalls die roten Blutkörperchen hämagglutiniert.

### 3.7. METHODEN DER BIOINFORMATIK

Die Bioinformatik versucht die komplexen Daten aus biochemischen und molekulargenetischen Methoden zu strukturieren, zu analysieren und verständlich darzustellen. Hierzu bedient sie u.a. Techniken wie die graphische Darstellung komplexer Sachverhalte. Als Beispiel sind hier 2D- und 3D-Strukturen von Molekülen, sowie Alignments von Sequenzen oder von phylogenetischen Zusammenhängen zu nennen.

Zunehmende Bedeutung bei dem Einsatz der Bioinformatik hat das Internet, insbesondere im Bereich der Datenbankabfragen. Neben Datenbanken wie NCBI, EMBL, TIGR, Swissprot und weiteren ist auch eine fast unüberschaubare Menge an Internetseiten aufrufbar, die eine Vielzahl von Analyse-Tools bereitstellen. So können 3D-Strukturen von Proteinen modelliert, Lokalisations- und Modifikationssequenzen erkannt oder chemische Eigenschaften von Proteinen errechnet oder verglichen werden.

### 3.7.1. DATENBANKRECHERCHEN

Für die Untersuchung von Nukleotid- und Proteinsequenzen wurden hauptsächlich die Datenbanken am NCBI verwendet. Soweit es sich nicht um spezielle Datenbanken handelt, besteht unter verschiedenen Organisationen ein Abkommen zum Datenaustausch. Hierdurch ist es z.B. möglich, über die NCBI-Datenbanken Informationen von den TIGR-Datenbanken zu erhalten.

Mit den Sequenzen von Horcolin und HL#2 wurden in regelmäßigen Abständen NCBI-Datenbanken durchsucht, da täglich neue Sequenzen aufgenommen werden. Eine dieser Suchen ergab dann auch den Hinweis auf einen EST-Klon, mit dessen Hilfe das Horcolin kloniert werden konnte.

Recherchen wurden in sogenannten non-redundanten und EST Datenbanken durchgeführt. Während erstere Daten zu untersuchten Sequenzen liefern, geben letztere Hinweise auf Nukleotidsequenzen, deren Funktion unbekannt ist. Auch wenn diese noch nicht beschrieben wurden, so liefern die EST-Klone Informationen über ihre Herkunftsart.

Name	Nukleotidsequenz	Proteinsequenz
Horcolin	AY033628	AAK54458
HL#2	AJ237754	CAB40792
BanLec	AF001527	AAB82776
GOS9	X51909	S19115
Calsepa	U56820	AAC49564
CR8	AF233284	AAG10403
SALT	AF001395	AAB53810
MRL	AB012605	BAA25369
Heltuba	AF064029	AAD11575
WCI-BTH induziert	U32427	AAC49284
Jacalin	L03797	A46630
VER2	AB012103	BAA32786
Ipomoelin	D89823	BAA14024
Hv 32,0 kDa	AF021257	AAB72097
Hv 32,7 kDa	U43497	AAA87042
Castanea lectin	AF319617	AAG40322
Mais-EST	AI622506	-
Sorghum EST	BE361823	-
Wheat pre-anthesis EST	BG605081	-
Wheat salt stress EST	BF475001	-
Mais root stress EST	AI966956	-
HVSMEa0017L06 EST	BF624771	-
HVSMEb0012P07 EST	BF629627	-
WHE2151_F12_K23ZS	BF293285	-

**Tabelle 3-2: Auf Protein- und Nukleotidebene verwandte von Horcolin und HL#2**

Die Proteine bzw. Nukleotidsequenzen wurden anhand von Recherchen mit den Sequenzen von Horcolin und HL#2 ermittelt. Hierbei wurden u.a. die Such-Algorithmen blastp, blastn in non-redundanten und EST-Datenbanken des NCBI verwendet. Es handelt sich nur um eine Auswahl von Sequenzen mit besonders ausgeprägter Homologie zu den beiden Proteinen.

So konnten zum HL#2 verwandte EST-Sequenzen gefunden werden, die aus mit Salz oder Trockenheit gestressten Pflanzen stammen (WHE2104\_E12\_J24ZS, BF475001), oder aus solchen, die mit tiefen Temperaturen behandelt wurden (HVSMEa0013L16f, BF6258239). Horcolin zeigte u.a. Homologien zu cDNA Sequenzen von unter Trockenstress gesetzten Pflanzen (HVSMEb0012E14f, BF630621; HVSMEa0017L06f, BF624771).

In Tabelle 3-2 sind einige der zu Horcolin und HL#2 sequenzverwandten Proteine und EST-Klone aufgeführt.

### 3.7.2. SEQUENZVERGLEICHE VON HORCOLIN, HL#2 UND VERWANDTEN PROTEINEN

Der Vergleich von Horcolin und HL#2 mit verwandten Proteinen wurde anhand der Ergebnisse einer NCBI-Suche mit den Aminosäuresequenzen durchgeführt. Mit Hilfe des Programms Clustal W wurde ein Alignment multipler Sequenzen durchgeführt und zugleich graphisch dargestellt. Ein solches Alignment mit den Proteinen HL#2, Horcolin, Heltuba, salt, BanLec und Calsepa zeigt die Abb. 3.31.

Heltuba	MAASDIAVQAGPWGGNGGKRWLQTAHGKITSIIIKGGTCIF--SIQFVYKDKDNIEYHS	58
HL#2	-MSSSPVVKLGPWGGDDGVAHDITVAPQRLESITIRWGKVLH--SVAFTYRDKDNQLHTA	57
Horcolin	---MSKFPVKIGPWGGNGGSRDVQPKPIRMVSM TVSSGAIVD--AIAFTYVGTDNVQHSS	55
salt	----MTLVKIGPWGGNGGSAQDISVPPKLLGVTIYSSDAIR--SIAFN YIGVDGQEYAI	54
BanLec	---MNGAIKVGAWGGNGGSAFDMG-PAYRIISVKIFSGDVVDGVDVTFYYGKTETRHYG	56
Calsepa	-MAVPMDTISGPWGNNGGNFWSFRPVNKNQIVISYGGGGNNPIALTFSSTKADGSKDTI	59
	*.*.*.*.* : : *	
Heltuba	G-KFGVLG---DKAETITFAEDEDITAI SGTFGAYYH---MTVVTS LTFQTNKKVYGPFG	111
HL#2	G-PWGGAGGEKEDPDTITLGPSEYITQVDWSVGPFFKLKEIEHCITSLKFVTNQASYGPFG	116
Horcolin	GIKWGGTG---GTEDTINLDATNYVTEISGTVG-KFGTD--DIVTSLKIITSKGVTRTYG	109
salt	G-PWGGGE---STSTEIKLGSSEQIKEISGTHGPVYDLA--DIVTYLKI VTSANNTYEAG	108
BanLec	G-----SG---GTPHEIVLQEGEYLVGMAGEVANYHG---AVVLGKLG FSTNKKAYGPFG	105
Calsepa	TVGGGGPDS-ITGTEMVNIGTDEYLTGISGTFGIYLDNN---VLR SITFTTNLKAHPYG	115
	: : : : . : : : *	
Heltuba	-TVASSSFSLP-LTKGKFAGFFGNSGDVLD SIGGVVVP-----	147
HL#2	YAVDSTHYS L PVLNNGSVVGMFGRAGDYLHAIGFYVLPETSLAS	160
Horcolin	-SGTGIPFRVPVLDGCKIAGFFGRAGAF L DAIGFYITP-----	146
salt	-VPNGKEFSIPLQDSGHVVGFFGRSGTLIDAIGIYVHP-----	145
BanLec	-NTGGTPFSLP-IAAGKISGFFGRGGKFLDAIGVYLEP-----	141
Calsepa	-QKVGTPPFSSANVVGNEIVGFLGRSGYVDAIGTYNRHK-----	153
	. : . . *::*..* :::**	

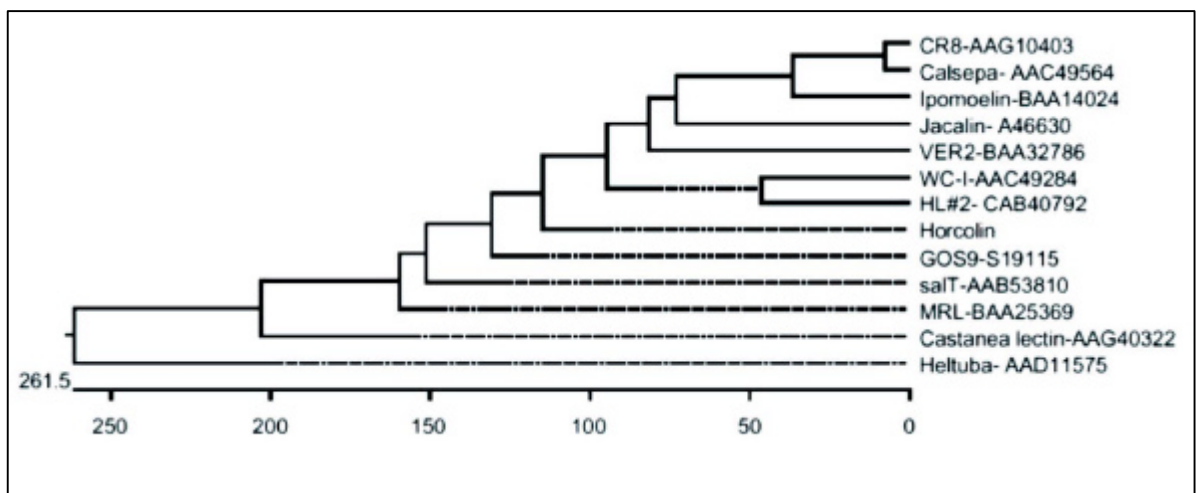
**Abb. 3.31: Multiples Alignment von Horcolin und HL#2 mit homologen Proteinen**

Daten basieren auf Clustal W Methode. Aminosäuren mit gleichen Eigenschaften sind unterhalb der Sequenz markiert. Sterne stehen für identische Aminosäuren innerhalb einer Spalte. Punkte und Doppelpunkte für ähnliche Aminosäuren. Das Alignment wurde mit Hilfe des Programms Clustal W auf dem ExPasy-Server erstellt.

Die sechs Proteine zeigen eine hohe Übereinstimmung in ihren Aminosäuresequenzen. An 12 Positionen im Alignment stimmen die Proteine zu 100 % überein, in 30 weiteren bestehen sehr hohe Ähnlichkeiten untereinander. Die größten Übereinstimmungen befinden sich im N-terminalen und im C-terminalen Bereich.

### 3.7.3. PHYLOGENETISCHER STAMMBAUM

Der phylogenetische Baum, basierend auf den Proteinsequenzen erstellt, soll den Verwandtschaftsgrad der miteinander verglichenen Proteine darstellen. Mit ihm kann gezeigt werden, welche Proteine über gemeinsame Merkmale verfügen und wie eng ihr Verwandtschaftsgrad ist. Die Abb. 3.32 zeigt einen solchen phylogenetischen Stammbaum.



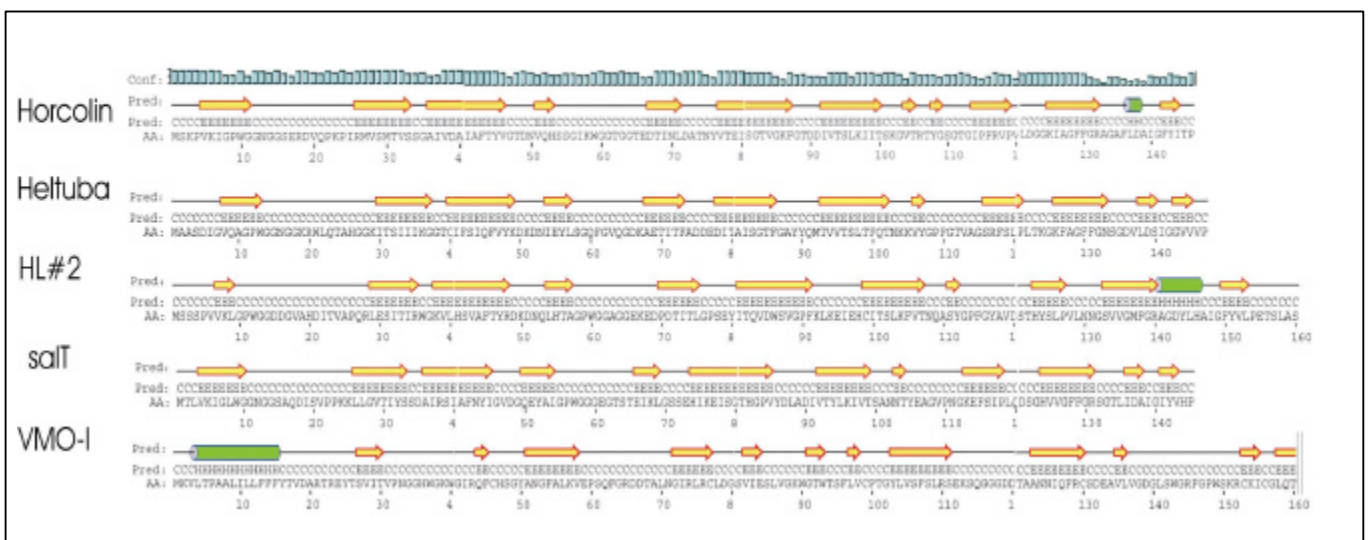
**Abb. 3.32: Phylogenetischer Stammbaum von Horcolin, HL#2 und homologer Proteine**

Daten auf Basis der Clustal Methode unter der Berücksichtigung der „PAM250 residue weight“ Tabelle. Zur Berechnung der Darstellung wurde das Programm MegAlign (DNAStar Inc.) verwendet.

Je dichter die einzelnen Verzweigungspunkte beisammen liegen, desto näher sind die jeweiligen Proteine miteinander verwandt. Es zeigt sich, dass Horcolin und HL#2 mit einer Gruppe von weiteren Lektinen eine enge Verwandtschaft aufweisen. Letztendlich müssen die Ergebnisse der phylogenetischen Stammbaumanalyse vor dem Hintergrund gesehen werden, dass diese Gruppen von Proteinen an und für sich sehr verwandt sind. Würde man z.B. alle löslichen Pflanzenproteine vergleichen, so würden die aufgeführten Proteine der Abb. 3.32 wahrscheinlich auf einem Ast des Stammbaums stehen - die Relation entscheidet demnach.

### 3.7.4. 2D-STRUKTUR VON HORCOLIN, HL#2 UND VERWANDTEN PROTEINEN

In Abschnitt 3.7.2 wurden die Primärstrukturen der Aminosäuresequenzen miteinander verglichen. Unter Verwendung geeigneter Programme, die ebenfalls über das Internet zugänglich sind, können auch Aussagen zu möglichen Sekundärstrukturen gemacht werden. Das Ergebnis einer solchen Untersuchung ist in Abb. 3.33 dargestellt. Anhand der Aminosäuresequenz wurde mit dem Programm PSIPRED eine mögliche Sekundärstruktur berechnet und in Form einer Graphik ausgegeben. Die einzelnen Graphiken wurden dann manuell mit dem Programm CorelDraw 9.0 zusammengefügt.



**Abb. 3.33: Vergleich der Sekundärstrukturen von Horcolin und HL#2 mit strukturverwandten Proteinen**

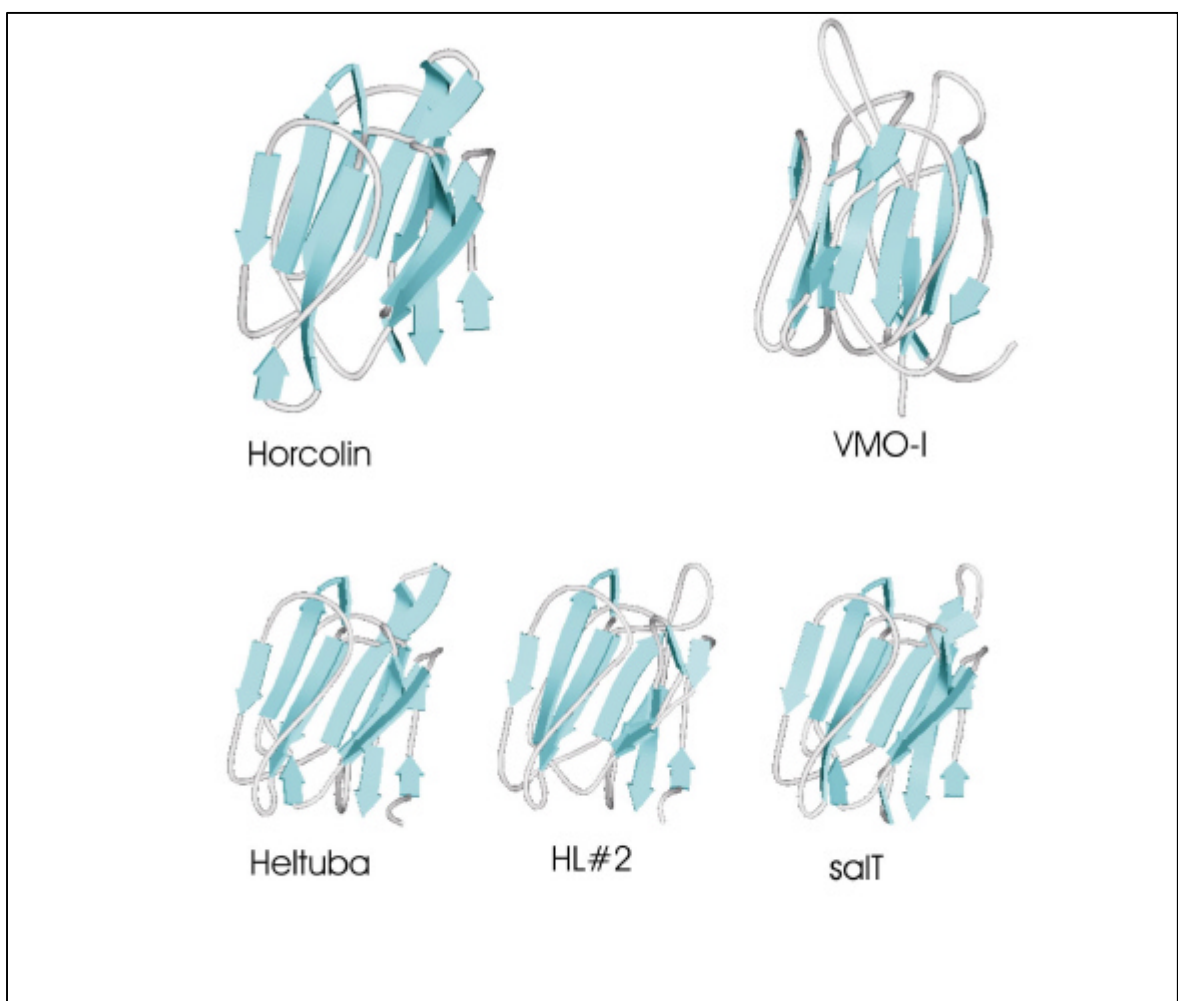
Auf Basis der Proteinsequenz wurden mit Hilfe des Programms PSIPRED die Sekundärstrukturen modelliert. Pfeile kennzeichnen  $\beta$ -Faltblattstrukturen (E), Zylinder  $\alpha$ -Helices (H) und Linien „coiled“ (C) Bereiche.

Die Graphik zeigt eine große Übereinstimmung in der Abfolge der  $\beta$ -Faltblattstrukturen der verwendeten Proteine Horcolin, Heltuba, HL#2, salT und VMO-I. Auffällig ist die Abfolge von 12  $\beta$ -Faltblättern.

Anzumerken ist hierbei, dass VMO-I keine große Ähnlichkeit auf Ebene der Proteinsequenz im Vergleich mit den anderen genannten Proteinen aufweist, jedoch über eine ähnliche Sekundärstruktur verfügt. Die Darstellung der Sekundärstrukturen ist für das Verständnis der 3D-Strukturen von Bedeutung, die im nachfolgenden Abschnitt besprochen werden. Weiterhin dienen sie der Veranschaulichung von strukturell konservierten Bereichen.

### 3.7.5. MODELLIERTE 3D-STRUKTUR VON HORCOLIN, HL#2 UND VERWANDTEN PROTEINEN

Für die Modellierung der tertiären Proteinstrukturen wurde ein über das Internet zugängliches Programm der Kitasato Universität (Japan) eingesetzt. Das Programm mit dem Namen FAMS (**F**ull **A**utomated **M**odeling **S**ervice) generiert anhand der eingegebenen Aminosäuresequenz eine pdb-Datei, die die räumlichen Koordinaten des 3D-Modells enthält. Eine solche Datei kann mit Programmen wie Rasmol oder dem WebLab Viewer graphisch dargestellt werden. Die räumlichen Koordinaten basieren auf bereits bekannten Strukturen, die durch Röntgenstrukturanalysen gewonnen wurden. Zu Beginn einer jeden Modellierung wird vom FAMS-Programm eine Strukturdatenbank durchsucht.



**Abb. 3.34: Modellierte 3D-Struktur von Horcolin, HL#2 und strukturverwandten Proteinen**

Auf der Basis von pdb-Dateien wurden die Modelle mit Hilfe des Programms WebLab Viewer erzeugt und manuell räumlich angeordnet, um einen Vergleich zu erleichtern. Die pdb-Dateien wurden entweder der Brookhavn-Datenbank entnommen bzw. aus der Sequenz mit Hilfe des FAMS Service generiert. Die Proteine zeigen eine ausgewiesene  $\beta$ -prisma Faltung.



Weist die Sequenz eine ausreichende Homologie zu bekannten Strukturen auf, dann kann mit der Berechnung der Koordinaten begonnen werden. Bei zu geringen Sequenzhomologien wird die Bearbeitung der Anfrage an dieser Stelle abgebrochen. Die in Abb. 3.34 gezeigten Modelle wurden entweder aus einer Strukturdatenbank entnommen (Heltuba und VMO-I) oder mit Hilfe des FAMS Programms basierend auf den Koordinaten von Heltuba generiert (Horcolin, HL#2 und salT). Die graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm WebLab Viewer.

Das herausragende strukturelle Merkmal der gezeigten Proteine sind die 12 Stränge von anti-parallel angeordneten  $\beta$ -Faltblättern, welche eine sogenannte  $\beta$ -Prisma-Faltung ausbilden. Bei dieser liegen drei Bündel mit jeweils vier  $\beta$ -Faltblättern vor. Neben VMO-I weisen das  $\delta$ -Endotoxin von *B. thuringiensis* sowie Jacalin und MPA eine  $\beta$ -prisma-Faltung auf.

Auf die Bedeutung dieser strukturellen Verwandtschaften wird im Diskussionsteil näher eingegangen.

### **3.7.6. UNTERSUCHUNG MÖGLICHER MODIFIKATIONS- UND LOKALISATIONSSEQUENZEN**

In der Datenbank PROSITE sind Informationen zu biologischen Motiven und Signaturen zu finden. Anhand von Sequenzmustern können mögliche Bindungsstellen, Motive oder Modifikationsstellen identifiziert werden. Bei einer Suche mit der Proteinsequenz von Horcolin ergab sich folgendes Ergebnis:

- vier Bereiche für eine mögliche Phosphorylierung (PKC und CK2)
- neun Bereiche für eine mögliche N-Myristilierung

Mit der Datenbank PSORT kann ein Protein auf Sortierungssignale hin untersucht werden. Hier ergab sich für die Proteine Horcolin und HL#2 kein eindeutiges Signalpeptid. Mit einem Wahrscheinlichkeitswert von 0,62 gibt das Programm eine Lokalisation in „Microbodies“ an. Auf die Lokalisation bzw. auf Lokalisationssequenzen wird im Diskussionsteil näher eingegangen.

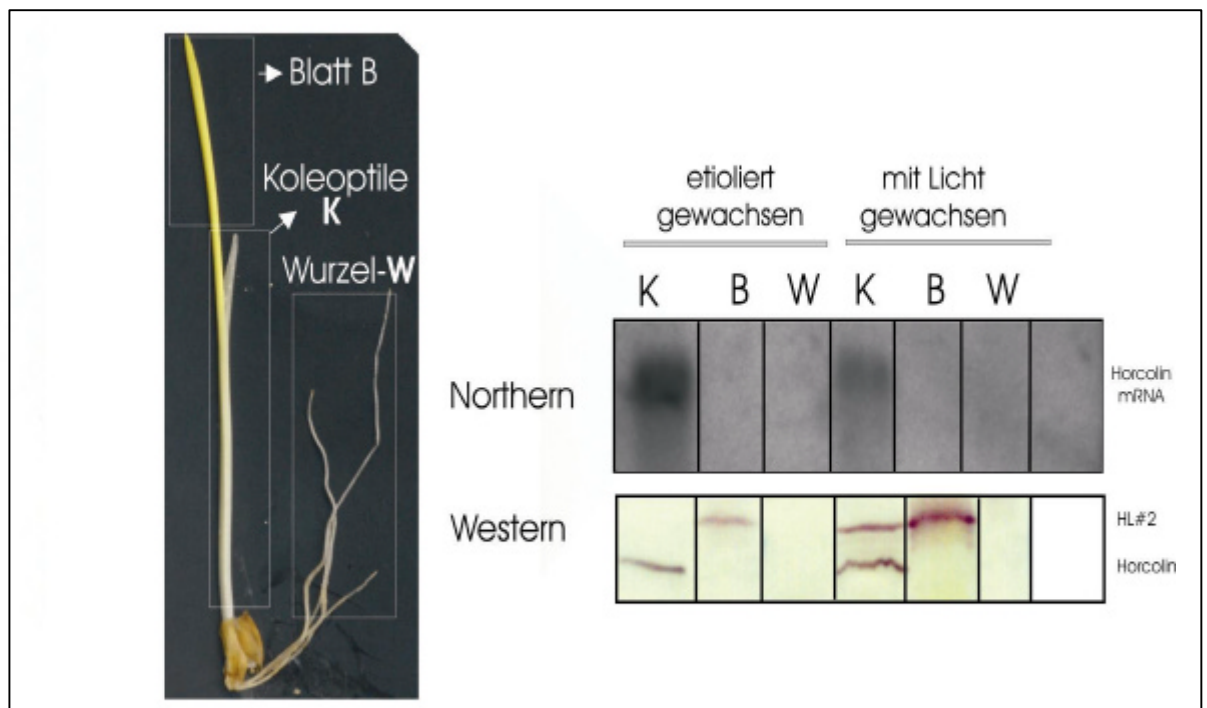
Die Angaben der Datenbanken PROSITE und PSORT basieren auf bekannten Sequenzen, die Identifizierung unbekannter Signale ist mit ihnen nicht möglich.

### 3.8. NACHWEIS UND LOKALISATION VON HORCOLIN UND HL#2

Daten über die Lokalisation eines Proteins im Bereich der Gewebe und Organe einer Pflanze sind durchaus von Bedeutung für die Klärung der Funktion des Proteins. Zusätzlich stellt sich auch die Frage, in welchem zellulären Bereich das Protein vorkommt. So kann es im Zellkern, in Plastiden, im Zytoplasma oder im Apoplasten vorkommen, wobei auch mehr als nur ein einziger Lokalisationsort möglich ist. Zur Klärung dieser Fragen wurden verschiedene Gewebe der Gerste mit Hilfe der Antikörper und cDNA-Sonden untersucht. Für die Untersuchung der zellulären Lokalisation wurden in Zusammenarbeit mit Dr. D. Neumann am IPB in Halle EM-Aufnahmen angefertigt.

#### 3.8.1. NACHWEIS IM BEREICH DER GEWEBE UND ORGANE DER GERSTE

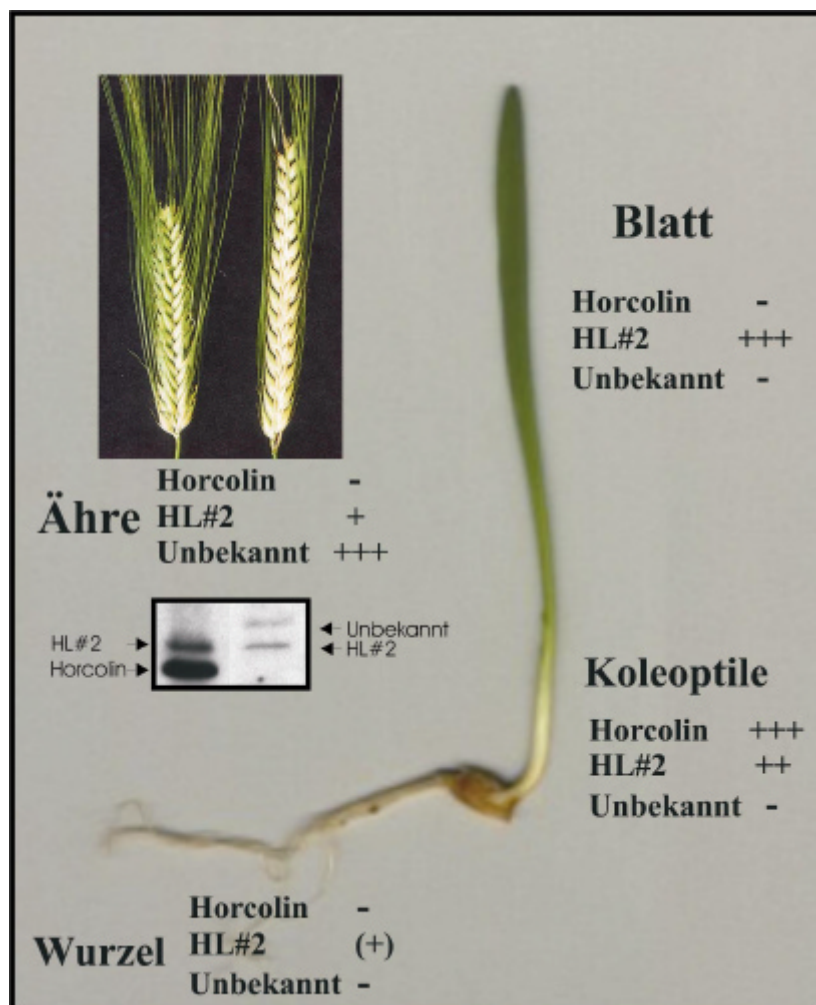
In Abschnitt 2.3.1 wurde bereits erwähnt, dass Horcolin exklusiv in den Koleoptilen gefunden werden kann. Für die Aufreinigung des Proteins war dies ein wichtiger Punkt, da es die Arbeiten erleichtert hat. Zur Übersichtlichkeit sind die Daten der gewebe-spezifischen Lokalisation von Horcolin und HL#2 zusammengefasst in Abb. 3.35 dargestellt.



**Abb. 3.35: Gewebespezifische Lokalisation von Horcolin mit Hilfe von Northern- und Westernblot-Analysen**

Zum Nachweis der Horcolin-mRNA wurde eine 440 bp große Horcolin-cDNA Sonde verwendet. Auf Proteinebene erfolgte der Nachweis mit dem Anti-HL#2-AK, wobei zur Auftrennung ein 15%iges SDS-Gel eingesetzt wurde. Folgende Abkürzungen wurden verwendet: K- Koleoptile, B- Primärblatt, W- Wurzel.

Horcolin kann ausschließlich in den Koleoptilen von etiolierten oder unter Lichteinfluss gewachsenen Pflanzen gefunden werden. HL#2 kann in den Koleoptilen und Primärblättern gefunden werden. In jungen Koleoptilen wird es unter dem Einfluss von Licht verstärkt gebildet, ebenso gilt dies für die Primärblätter. In den ersten Tagen des im Dunklen angezogenen Gerstenkeimlings kann Horcolin, aber kein HL#2 detektiert werden. In der Wurzel konnte im Rahmen dieser Arbeit kein Horcolin oder HL#2 detektiert werden. Daten von Ines Rupprecht (Diplomarbeit) deuten aber auf das Vorkommen von HL#2 in den Gerstenwurzeln hin. Unterschiedliche Ergebnisse können auf der geringen Proteinkonzentration in den Wurzeln und den Extraktions- und Arbeitsmethoden basieren.



**Abb. 3.36: Identifizierung eines weiteren Proteins durch den Anti-HL#2-Antikörper**

Zur Identifizierung der Proteine wurden lösliche Extrakte aus den jeweiligen Geweben gewonnen, diese in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt und im Westernblot mit dem Anti-HL#2-AK (1:500) nachgewiesen. Die Intensitäten der Banden wurde in Relation zueinander bewertet.

Northernblot-Analysen stützten die Aussage, dass Horcolin nur in den Koleoptilen exprimiert wird (Abb. 3.35).

Die Datenbankrecherchen mit HL#2 und Horcolin zeigten eine große Anzahl von homologen Proteinen und Nukleotidsequenzen. Unter diesen waren auch EST-Klone, die aus dem Gewebe der Ähren kloniert werden konnten. Aufgrund dieser Tatsache wurden Gerstenpflanzen mit Ähren angezogen und für eine Westernblot-Analyse mit dem Anti-HL#2-Antikörper aufgearbeitet. Das Resultat dieses Versuchs ist in Abb. 3.36 zusammenfassend dargestellt.

In dem löslichen Extrakt der Gerstenähren konnte ein weiteres Protein gefunden werden, das eine immunologische Kreuzreaktion mit dem verwendeten Antikörper aufweist. Es verfügt über eine ungefähre Größe von 19,5 kDa und ist exklusiv in den Ähren nachzuweisen. Ob es sich bei diesem Protein ebenfalls um ein verwandtes Lektin handelt, muss noch geklärt werden.

### **3.8.2. NACHWEIS AUF ZELLULÄRER EBENE**

Neben der gewebetypischen Verteilung der untersuchten Proteine ist auch deren Lokalisation auf zellulärer Ebene von Bedeutung. Zur Klärung dieser Frage wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. D. Neumann aus Halle elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Für die Untersuchungen wurden etiolierte sowie unter Lichteinfluss gewachsene Koleoptilen und Primärblätter verwendet. Zur Detektion der Proteine wurden der Peptidantikörper aus Kaninchen und der Anti-HL#2-Antikörper aus Ziege mit anschließender Immunogold-Markierung verwendet. Folgende Überlegungen sind für die Interpretation der in den Abb. 3.37 und Abb. 3.38 gezeigten EM-Bilder hilfreich.

Zum immunologischen Nachweis der beiden Proteine HL#2 und Horcolin stehen ein Antikörper (Anti-HL#2-Antikörper) aus der Ziege und ein Peptidantikörper aus Kaninchen zur Verfügung. Der Anti-HL#2-Antikörper erkennt beide Proteine, der Peptidantikörper nur das HL#2. Zusätzlich kann zwischen den Proteinen auch durch ihre Lokalisation unterschieden werden. Horcolin kommt nicht in den Blättern vor, HL#2 nur in Blättern und in älteren Koleoptilen, vor allem, wenn diese unter Lichteinfluss gewachsen sind, jedoch nicht in jungen etioliert angezogenen Koleoptilen.

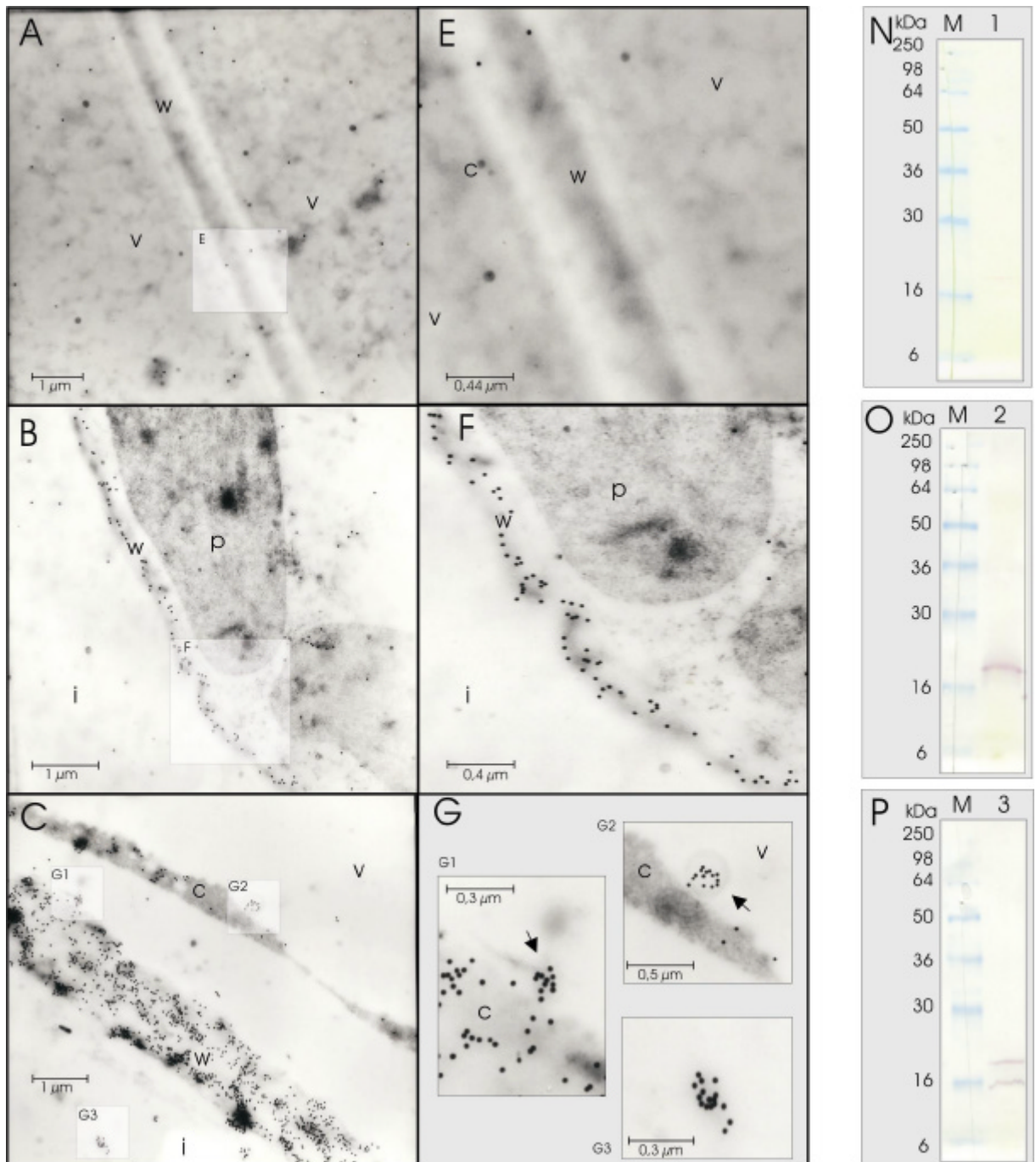
Die Kontrolle mit Präimmunserum (Abb. 3.37 A und E) zeigt keine Anfärbung mit Immunogold. Ein Westernblot mit Gesamtprotein mit Präimmunserum zeigt ebenfalls keine Reaktion (Abb. 3.37 N). Im Blatt, wo nur HL#2 vorkommt (vgl. Westernblot O in Abb. 3.37 und R in Abb. 3.38), ist eine Färbung im Bereich der Zellwand zu sehen (Abb. 3.37 B und F sowie 3.38 D und K).

In der etiolierten Koleoptile, die noch kein HL#2 exprimiert, ist mit dem Peptidantikörper weder eine Färbung durch die Immunogoldpartikel (Abb. 3.38 H und L) noch eine im Westernblot (Abb. 3.38 S) zu sehen. Im Gegensatz hierzu zeigt der Anti-HL#2-Antikörper in den etiolierten Koleoptilen eine deutliche Färbung im Bereich der Zellwand (vgl. Abb. 3.38 I und M).

Dass es sich hierbei um Horcolin handelt, wird auch durch den Westernblot in der Abb. 3.38 T bestätigt, der eine einzelne Bande im Bereich von 15,5 kDa zeigt. Wäre hier HL#2 ebenfalls exprimiert, so wären zwei Banden zu sehen, so wie es in Abb. 3.37 P zu sehen ist. Zusätzlich zeigten auch die Analysen mit dem Peptidantikörper, dass HL#2 in den verwendeten etiolierten Proben nicht vorhanden ist.

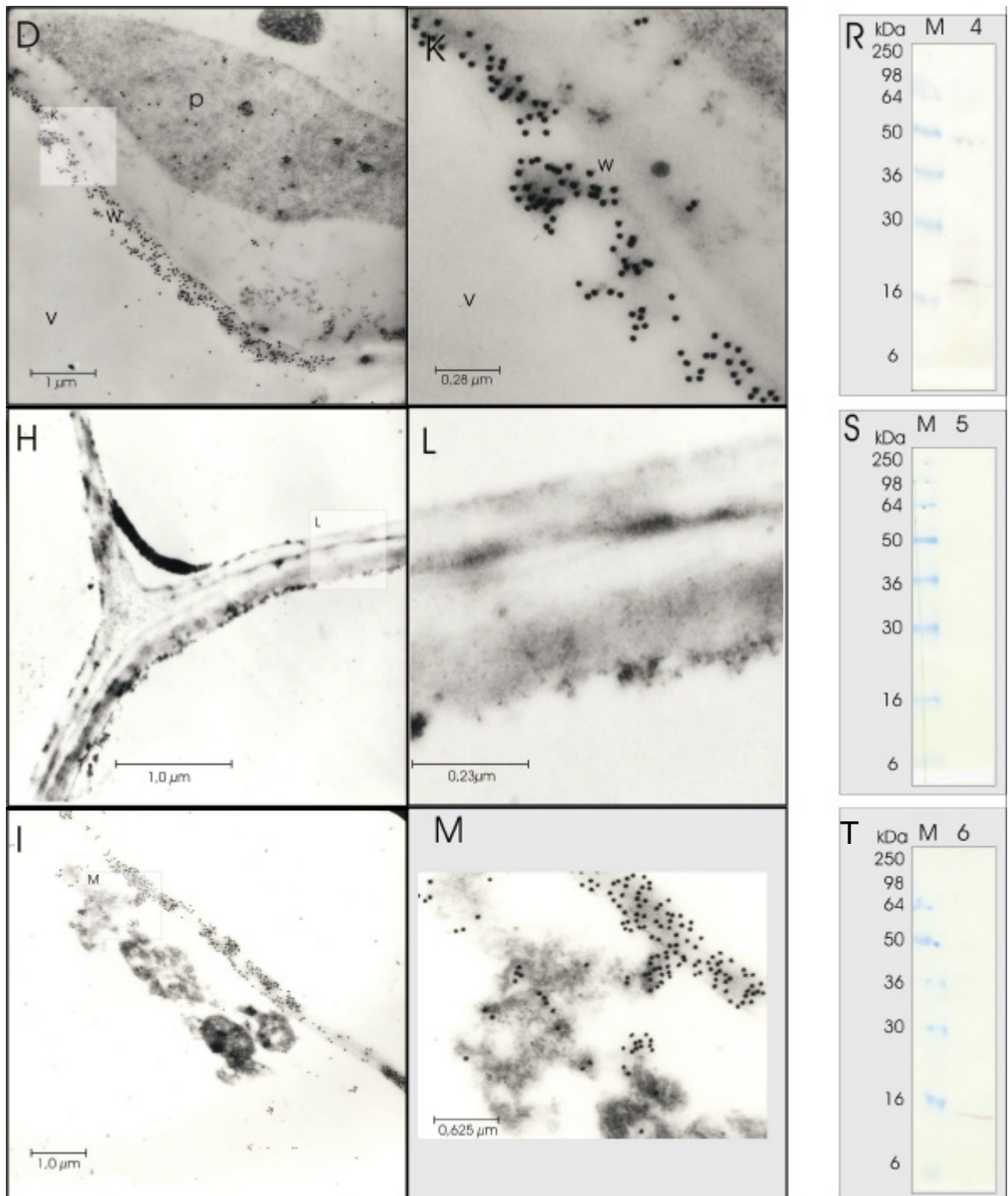
Interpretiert man die EM-Aufnahmen zusammen mit den Westernblot-Analysen, so scheinen sowohl Horcolin als auch HL#2 im Apoplasten lokalisiert vorzukommen.

In einem Teil der EM-Bilder kann auch ein möglicher Mechanismus für den Transport der Proteine gefunden werden. Die Vergrößerung der EM-Aufnahme C in Abb. 3.37 lässt die Interpretation zu, dass die Proteine von einer Art Vesikel oder Vakuole zur Zellwandmembran transportiert werden. Mit Hinweis auf Abschnitt 3.7.6 lässt sich jedoch sagen, dass weder Horcolin noch HL#2 über eine eindeutige Signalsequenz verfügen (PSORT-Recherche).



**Abb. 3.37: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Koleoptilen und Primärblättern etiolierter und belichteter Gerstenpflanzen**

A + E zeigen eine Kontrolle mit Präimmunsereum, N ein Westernblot mit diesem Serum. B und F eine Aufnahme vom Blatt mit dem Anti-HL#2-Antikörper, O einen Westernblot mit dem gleichen Antikörper. C, G und P (Westernblot) zeigen belichtete Koleoptilen mit dem Anti-HL#2-Antikörper. G1, G2 und G3 zeigen mögliche vesikuläre Bereiche auf. Die weiteren Abkürzungen bedeuten w = Zellwand, v = Vakuole, c = Zytoplasma, i = Interzellulare, p = Plastid. Die Westernblot-Analysen wurden mit Gesamtproteinen aus den jeweiligen Blättern oder Koleoptilen durchgeführt (15%iges SDS-Gel, primärer AK 1:500 und sekundärer AK 1:10.000 verdünnt, Molekulargewichtsmarker SeeBlue).

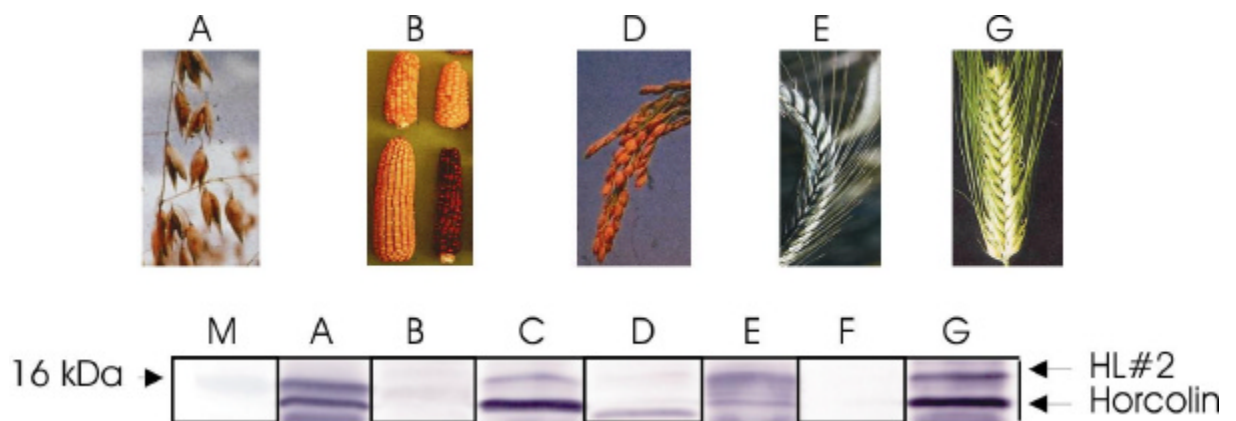


**Abb. 3.38: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Koleoptilen und Primärblättern etiolierter und belichteter Gerstenpflanzen**

D, K und R (Western blot) zeigen ergrünte Gerstenblätter mit dem Peptidantikörper. H, L und S (Western blot) etiolierte Koleoptilen und Gesamtextrakt aus diesen mit dem Peptidantikörper. I, M und T (Western blot) von etiolierten Koleoptilen mit dem Anti-HL#2-Antikörper. Die weiteren Abkürzungen bedeuten w = Zellwand, v = Vakuole, c = Zytoplasma, i = Interzellulare, p = Plastid. Die Western blot-Analysen wurden mit Gesamtproteinen aus den jeweiligen Blättern oder Koleoptilen durchgeführt (15%iges SDS-Gel, primärer AK 1:500 und sekundärer AK 1:10.000 verdünnt, Molekulargewichtsmarker SeeBlue).

### 3.8.3. NACHWEIS IN VERWANDTEN GRÄSERN

Die Suche nach verwandten Sequenzen von Horcolin und HL#2 lieferte eine Vielzahl von homologen Proteinen, die nicht nur aus der Gerste stammten, sondern auch aus Weizen, Roggen oder Reis. Horcolin und HL#2 wurden bis dahin nur in der Gerste gefunden. Die Frage nach dem Vorhandensein in anderen Gräsern ist daher berechtigt. Zur Klärung dieser Frage wurden verschiedene Gräser angezogen, die löslichen Proteine extrahiert und eine Westernblot-Analyse durchgeführt. Wie in Abb. 3.39 zu erkennen ist, können mit dem Anti-HL#2-Antikörper verschiedene Proteine mit der Größe von HL#2 und Horcolin nachgewiesen werden.



**Abb. 3.39: Analyse verwandter Gräser mit Hilfe des Anti-HL#2-Antikörpers**

Folgende Monokotylen wurden getestet: A - Hafer, B - Mais, C – Hybrid-Roggen, D - Reis, E – Winter-Roggen, F - Triticale, G – Gerste. M – SeeBlue Molekulargewichtsmarker. Es wurden jeweils 100 µg lösliche Proteine in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt und anschließend eine Westernblot-Analyse mit dem Anti-HL#2-AK (1:500 verdünnt) durchgeführt.

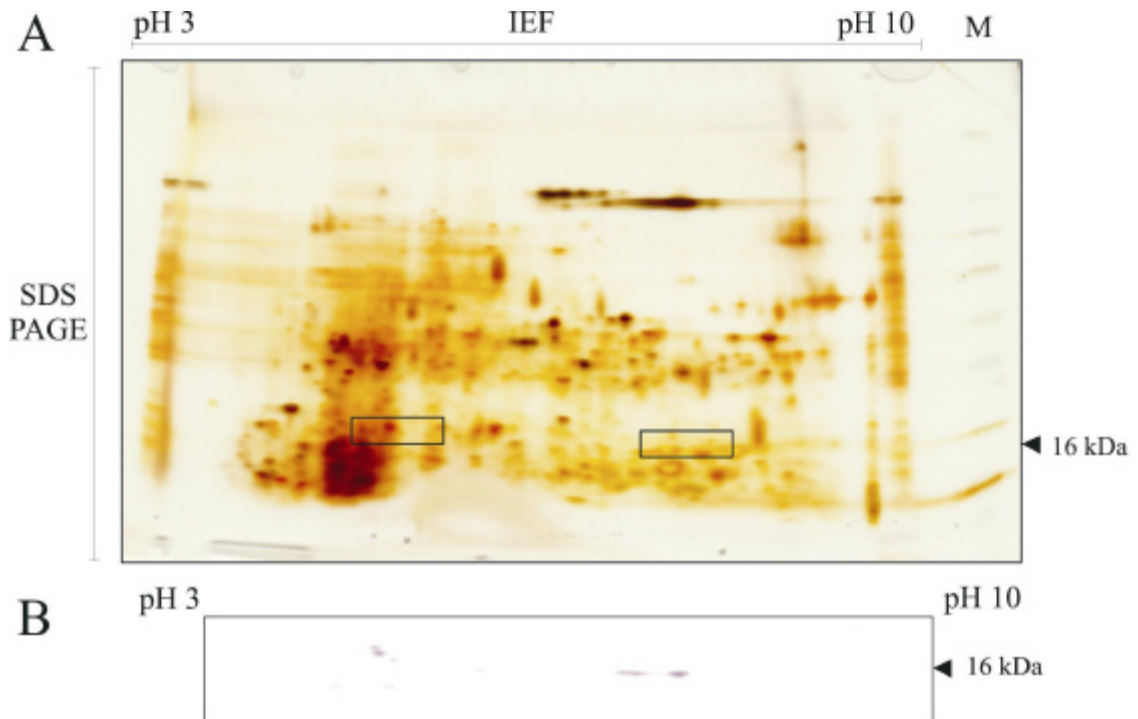
Lediglich in Mais und in Triticale konnte keine Kreuzreaktivität des Antikörpers festgestellt werden. Diese Daten basieren nur auf der Erkennung durch den Antikörper und bedürfen der Verifizierung durch weitere Versuche wie z. B. Southern- und Northernblot-Analysen.

### 3.9. CHARAKTERISIERUNG VON HORCOLIN UND HL#2 MIT HILFE DER 2D-GELELEKTROPHORESE

Die Technik der 2D-Gelelektrophorese wurde eingesetzt, um Aussagen über den isoelektrischen Punkt der nativen Formen von HL#2 und Horcolin machen zu können. Zusätzlich können hierdurch mögliche Modifikationen und Isoenzyme identifiziert werden. Für die 2D-Analyse wurden die löslichen Extrakte von im Licht gewachsenen Koleoptilen verwendet. Auf diese Weise konnten beide Proteine zugleich untersucht werden. Die zweifach gefällten Proben wurden in der ersten Dimension in der IEF nach dem isoelektrischen Punkt und in der zweiten Dimension in einer SDS-PAGE nach dem Molekulargewicht aufgetrennt.



Es wurden zwei identische Ansätze für die Analyse durchgeführt, wobei das eine der erhaltenen SDS-Gele Silber gefärbt und das andere im Westernblot mit dem Anti-HL#2-Antikörper untersucht wurde (siehe Abb. 3.40).



**Abb. 3.40: Silbergel und Westernblot-Analyse von löslichen Proteinen der Koleoptile**

A zeigt ein silbergefärbtes 10-20%iges SDS-Gradientengel, in dem 80 µg lösliche Proteine der Koleoptile in der IEF und dem Molekulargewicht nach aufgetrennt wurden. B zeigt einen Ausschnitt von einem gleichem SDS-Gel, das in der Westernblot-Analyse mit dem Anti-HL#2-Antikörper (1:500 verdünnt) untersucht wurde. Als Proteingrößen-Standard wurde SeeBlue-Marker verwendet. In der IEF wurden die Proteine in einen IPG-Strip mit pH-Gradient 3 bis 10 aufgetrennt.

Multiple Banden/Flecken im Westernblot des 2D-Gels können von der Degradation oder der Modifikation der Proteine herrühren. Ebenso ist das Vorkommen von Isoformen möglich.

### 3.10. CHARAKTERISIERUNG VON PROTEINEN IN DER GUTTATIONSFLÜSSIGKEIT

Zur Charakterisierung der Guttationsflüssigkeit wurden junge Gerstenpflanzen in speziellen Kammern angezogen und die gebildeten Tropfen mit einer eigens hierfür konstruierten Sammelvorrichtung geerntet. Die so erhaltene Flüssigkeit wurde anschließend steril filtriert, und für unterschiedliche Untersuchungsverfahren und Tests eingesetzt.

### 3.10.1. ANZUCHTBEDINGUNGEN UND ERNTE DER GUTTATIONSTROPFEN

Die untersuchten Gerstenpflanzen zeigten nur unter bestimmten Anzuchtbedingungen eine nutzbare Guttation. So mussten die Pflanzen in speziellen Mini-Gewächshäusern (vgl. Abb. 2.1) angezogen werden. Darüber hinaus wurden in der für die Anzucht verwendeten Klimakammer zusätzlich wassergefüllte Schalen aufgestellt.

Diese Maßnahmen waren notwendig, um eine möglichst hohe Luftfeuchtigkeit zu erzeugen. Sobald diese unter einen bestimmten Wert sank, bildeten die Pflanzen keine Guttationsflüssigkeit mehr. Die verwendete Klimakammer war mit einem Tag/Nacht-Wechsel von 12 Stunden programmiert. Eine Dunkelabsenkung mit resultierender Temperaturabsenkung (keine Erwärmung durch die Lampen) wurde vor allem aus dem Grund verwendet, um das Wachstum der Pflanzen ein wenig zu verlangsamen. Wurden die Pflanzen zu groß, so stießen sie an die Decke der Abdeckhaube und die Tropfen konnten nicht mehr gesammelt werden.

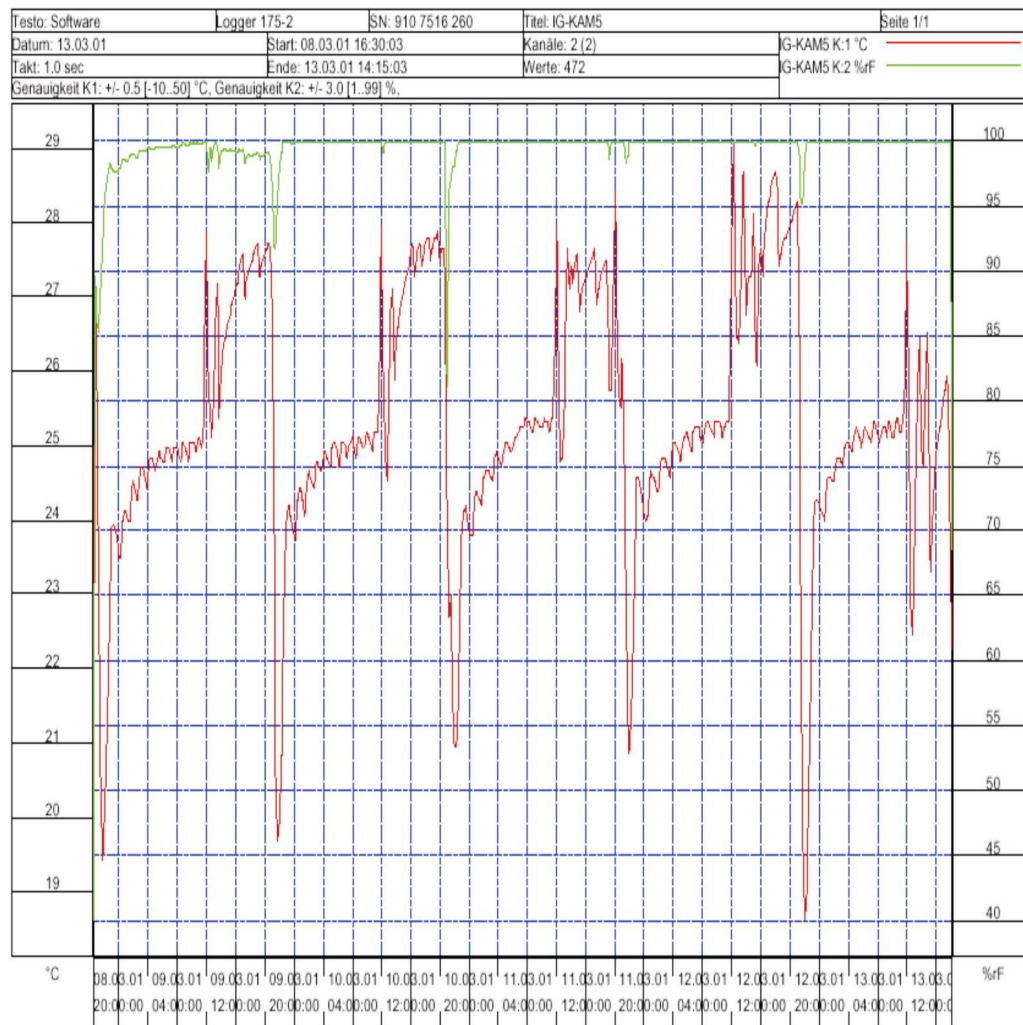
Der Verlauf von Temperatur und Luftfeuchtigkeit wurde durch einen Messfühler in den kleinen Gewächshäusern registriert. Den Verlauf einer dieser Messprotokolle zeigt die Abb. 3.41.

Der unregelmäßige Temperaturverlauf kommt durch den erwähnten Effekt der Lampen und durch den Temperaturwächter in der Klimakammer zustande, der entweder die Kühlung oder die Erwärmung steuert.

Da es sich bei diesem um einen alten Quecksilberschalter handelte, der sich nur sehr ungenau einstellen lässt und lange Ansprechzeiten hat, kommt es zu den unregelmäßigen Temperaturverläufen (rote Linie in Abb. 3.41). Dies führte aber zu keinen nennenswerten Problemen bezüglich der Luftfeuchtigkeit. Die aufgezeichnete Luftfeuchtigkeitskurve ist grün dargestellt und fiel nur zu Zeitpunkten ab, in denen die Abdeckhaube zur Ernte geöffnet wurde.

Zur Ernte der Guttationstropfen wurde eine eigens dafür entwickelte Sammelvorrichtung verwendet (siehe hierzu Abb. 2.2). Über eine Vakuumpumpe werden die Tropfen in einem durch Eis gekühlten Sammelgefäß aufgefangen. Dieses kann unmittelbar zur weiteren Verwendung eingefroren werden.

Neben dieser Vorrichtung wurden weitere Verfahren entworfen und getestet, aber nicht eingesetzt, da sie in Relation zu den kleinen Pflanzenmengen einen zu großen Verlust an Flüssigkeit aufgewiesen hätten. Als Beispiel seien nur die Überkopfanzucht mit Abschütteln der Flüssigkeit oder das Ablaufen der Tropfen an Glasplatten genannt. Für eine biotechnologische Anwendung im großen Maßstab im Bereich des „Molecular Pharming“ wären diese vorstellbar.



**Abb. 3.41: Temperatur- und Luftfeuchtigkeit-Messprotokoll**

Das Diagramm zeigt die Messwerte von Temperatur (rot) und Luftfeuchtigkeit (grün) in der Anzuchtammer. Die Daten wurden mit Hilfe eines transportablen Datenloggers (TestoTester 175) aufgenommen. Während der Ernte und bei starken Temperaturschwankungen veränderte sich die Luftfeuchtigkeit messbar.

Die Guttationstropfen konnten unter den gegebenen Bedingungen mehrmals am Tag geerntet werden. Da die Tropfen nach Erreichen eines bestimmten Volumens so schwer wurden (siehe Abb. 3.42), dass sie vom Blatt abfielen, erfolgte die Ernte mehrmals am Tag. Guttationstropfen konnten auch bei Pflanzen geerntet werden, die etioliert, bei Hochlicht und bei Kälte mit zusätzlichem Hochlicht angezogen wurden.



**Abb. 3.42: Guttierende Gerstenpflanzen**

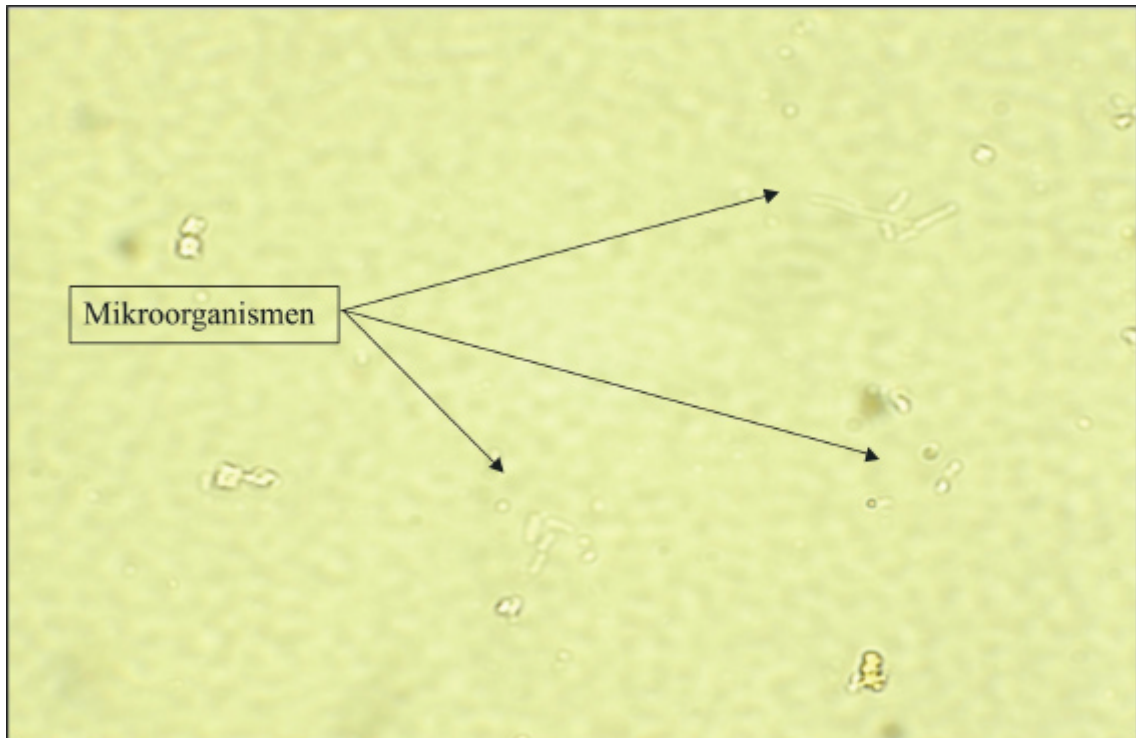
Neben den Tropfen, die aus den Hydathoden der Primärblätter ausgeschieden werden, sind hier auch solche zu sehen, die von den Koleoptilen stammen.

Nach der Ernte wurde die Guttationsflüssigkeit durch eine 0,2  $\mu\text{M}$  Membransterilfiltriert, um mikrobielle Kontaminationen zu entfernen. Ein Verlust an Proteinen muss hierbei einkalkuliert werden, da die Filtermembranen einen Teil der Proteine zurückhalten können.

### **3.10.2. ÜBERPRÜFUNG DER GUTTATIONSFLÜSSIGKEIT AUF MIKROBIELLE KONTAMINATIONEN**

Bakterien und Pilze leben sowohl symbiotisch als auch parasitär in vielen Bereichen der Pflanze. Um zu überprüfen, ob auch Bakterien in der gesammelten Guttationsflüssigkeit vorkommen, wurden einige der gesammelten Tropfen im Lichtmikroskop untersucht. Die in Abb. 3.43 gezeigte Aufnahme weist auf ein vereinzelt Vorkommen von Bakterien hin.

Ob die Bakterien mit der Flüssigkeit aus der Pflanze gespült wurden oder ob sie von außen in die Tropfen gelangt waren, kann nicht gesagt werden. In der filtrierten Guttationsflüssigkeit konnten keine Kontaminationen mit Mikroorganismen mehr nachgewiesen werden.



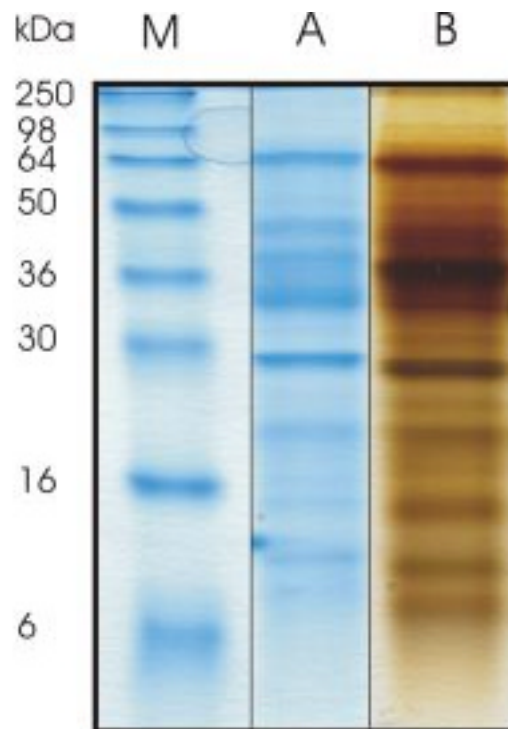
**Abb. 3.43: Lichtmikroskopische Aufnahme von Guttationsflüssigkeit**

In einer 1000fachen Vergrößerung wurde ein Tropfen der konzentrierten Guttationsflüssigkeit auf einen Objektträger überführt und untersucht. Es können sowohl stäbchenförmige als auch rundliche Bakterien beobachtet werden. Die Aufnahme wurde mit einem Zeiss Axioskop-Mikroskop gemacht, das zur Dokumentation mit einer Digitalkamera (VisitronSystem GmbH) ausgestattet war.

Die filtrierten Proben wurden entweder mit Hilfe von Ultrakonzentratoren der Firma Sartorius oder durch Gefriertrocknung um den Faktor 20 konzentriert. Es konnten Proteinkonzentrationen von ca. 300 µg/mL Guttationsflüssigkeit gemessen werden.

### **3.10.3. AUFTRENNUNG MIT HILFE DER 1D- UND 2D-GELELEKTROPHORESE**

Zur Analyse der Guttationsflüssigkeit wurde diese mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt und für eine SDS-PAGE vorbereitet. Nach erfolgter Auftrennung wurde ein Teil des SDS-Gels Coomassie gefärbt bzw. mit Silber angefärbt. Neben der Tatsache, dass die Silber-Färbung wesentlich sensitiver ist als die Coomassie-Färbung, wurden auch aus dem Grund zwei verschiedene Färbemethoden gewählt, weil Proteine sich bei den unterschiedlichen Methoden aufgrund ihrer Aminosäurezusammensetzung verschieden färben lassen. Das Ergebnis einer SDS-PAGE mit der Guttationsflüssigkeit sowie Silber- und Coomassie-Färbung ist Abb. 3.44 dargestellt.

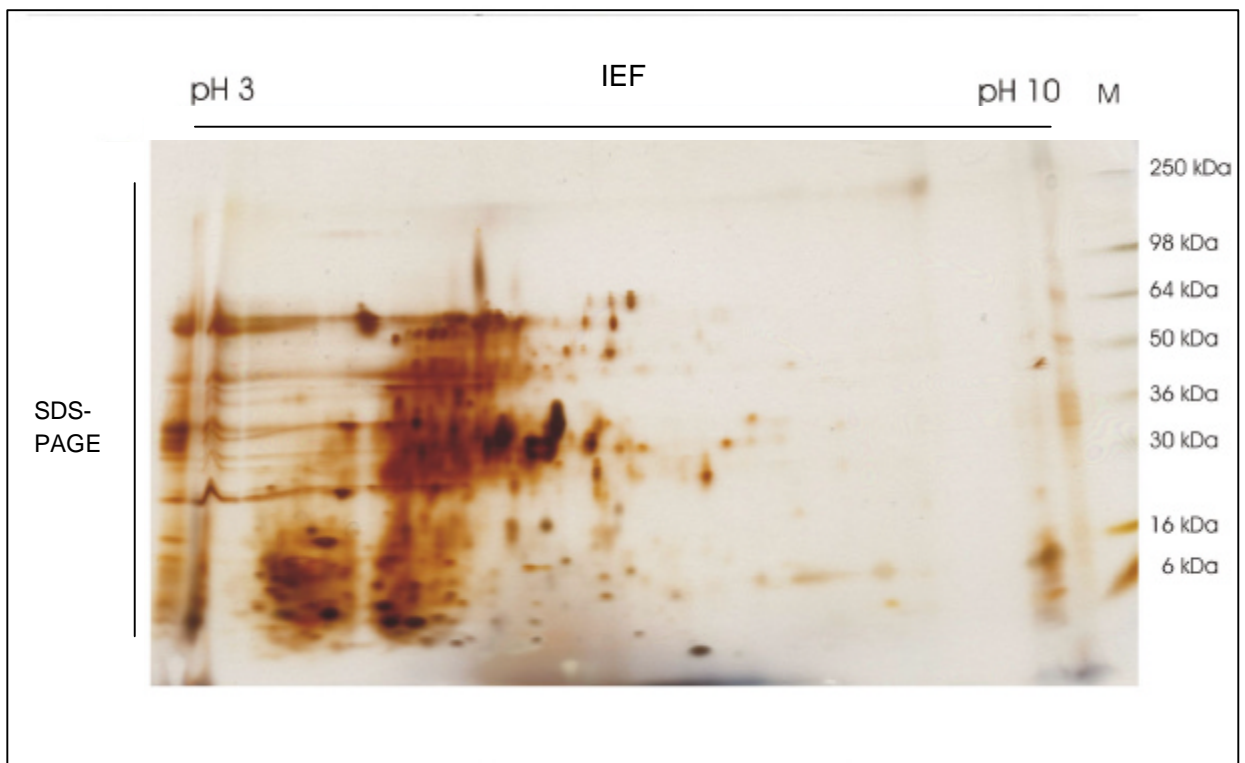


**Abb. 3.44: Silber und Coomassie gefärbte SDS-Gele von Guttationsproteinen**

A zeigt eine SDS-PAGE von Guttationsflüssigkeit mit anschließender Coomassie-Färbung (Kolloidal-Methode). B ein gleiches Gel, das mit Silber gefärbt wurde. Als Größenstandard wurde ein SeeBlue-Marker verwendet. Für den Nachweis wurden 70 µg Protein in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt.

Es ist deutlich zu erkennen, wie sich die Proteine der Guttationsflüssigkeit (siehe hierzu auch 3.10.6) in der SDS-PAGE auftrennen und durch die eingesetzten Färbemethode sichtbar machen ließen. Die Proteine scheinen hauptsächlich in einem Molekulargewichtsbereich von ca. 10 bis 90 kDa aufzutreten (in monomerer Form, Untersuchungen der nativen Zusammensetzung wurde nicht durchgeführt). Diese Tatsache zeigte sich bei allen durchgeführten Auftrennungen und scheint charakteristisch für diese Proteingruppe zu sein. In Übereinstimmung mit dem Vorkommen in der Guttationsflüssigkeit sind die Proteine sehr gut wasserlöslich.

Neben der eindimensionalen Auftrennung nach dem Molekulargewicht wurde mit den Proteinen auch eine 2D-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Proteine wurden hierbei in der ersten Dimension mit Hilfe der IEF und in der zweiten durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Durch anschließende Silberfärbung erhielt man das in Abb. 3.45 gezeigte Verteilungsmuster.



**Abb. 3.45: 2D-Gelelektrophorese von Proteinen der Guttationsflüssigkeit**

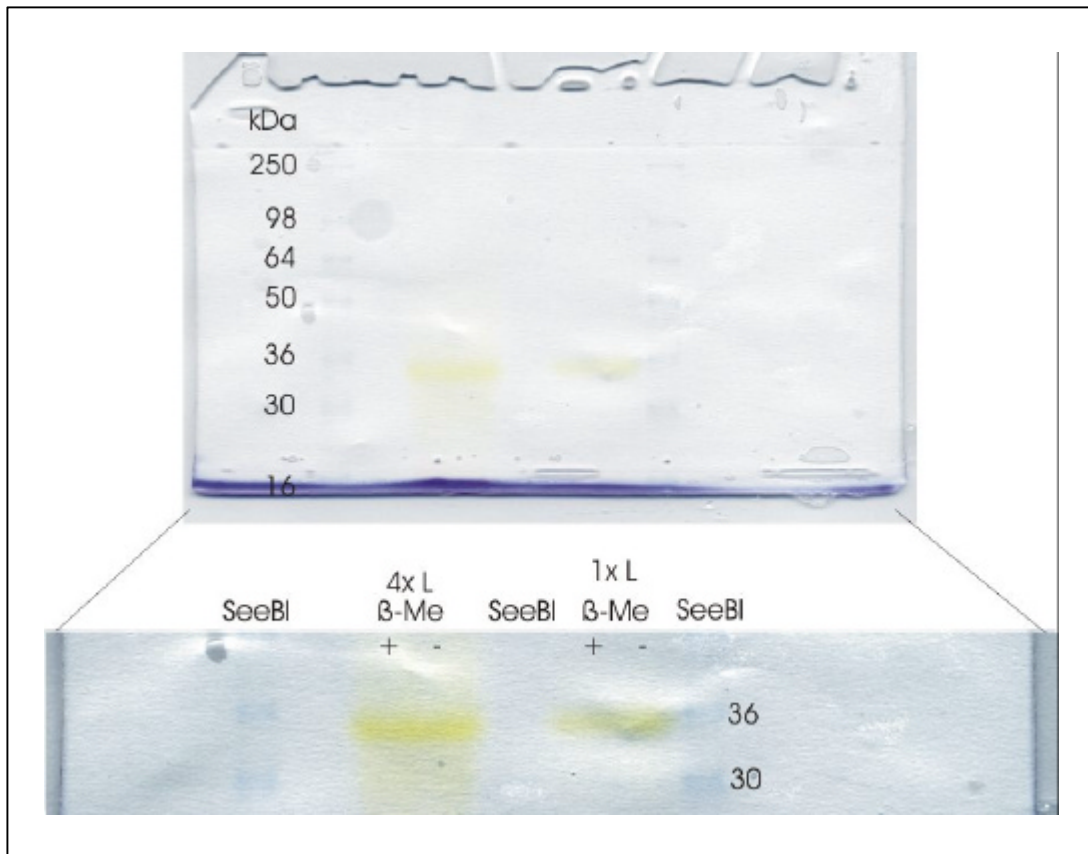
Die Guttationsproteine (80 µg) wurden zunächst in der IEF (linearer pH Gradient zwischen 3 und 10) und anschließend mit Hilfe der SDS-PAGE (15%iges SDS-Gel) aufgetrennt. In der 2ten Dimension wurde als Größenstandard der SeeBlue-Marker verwendet.

Sehr auffällig ist hier zu sehen, dass ein Großteil der Proteine in einem sauren pH-Bereich auftritt, der ca. zwischen pH 4 und pH 6 liegt. Auch hier ist wieder eine Verteilung der Proteine im Bereich zwischen ca. 10 kDa und 90 kDa zu sehen. Anhand des 2D-Gels lässt sich die Anzahl der unterschiedlichen Proteine in der Guttationsflüssigkeit auf ca. 250 schätzen.

Folgende Merkmale scheinen den Ergebnissen nach charakteristisch für einen Großteil der Proteine in der Guttationsflüssigkeit zu sein:

- molekulare Masse von ca. 10 kDa bis 90 kDa (in monomerer Form)
- isoelektrischen Punkt zwischen pH 3,5 und pH 6
- vorwiegend hydrophile Struktur, da wasserlöslich

Die Guttationsflüssigkeit zeigte nach erfolgter Konzentrierung eine leicht bräunliche Färbung. Nach der Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE war eine deutlich sichtbare gelbe Bande zu erkennen (siehe Abb. 3.46).



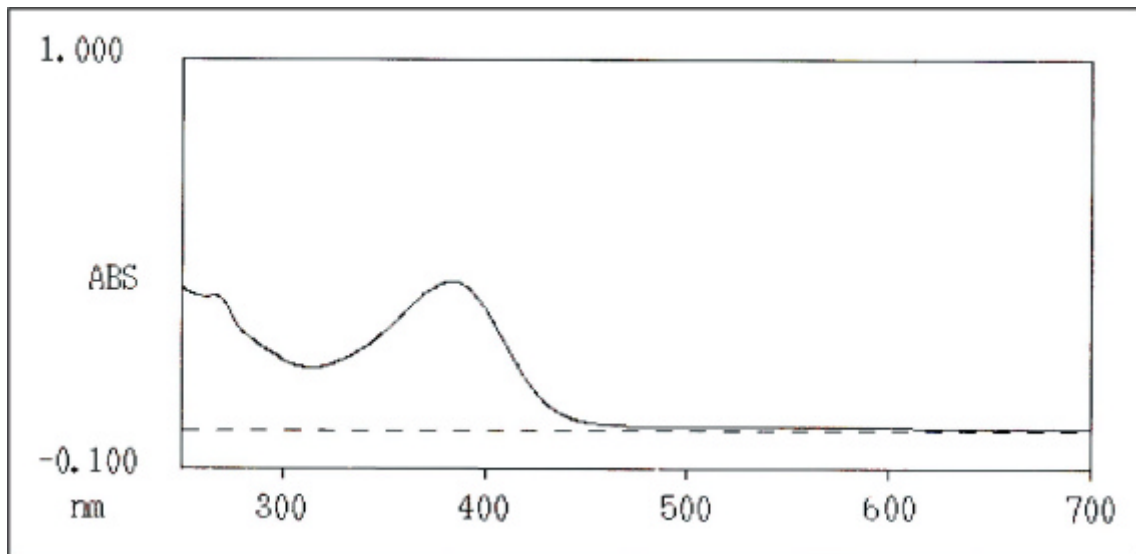
**Abb. 3.46: Gelbe Bande im SDS-Gel**

In der Abbildung ist ein SDS-Gel gezeigt, das direkt nach der Auftrennung von Guttationsflüssigkeit in einem 15%igen SDS-Gel gescannt wurde. Es wurden Proben sowohl mit als auch ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol und in unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (4x und 1x- relativ zueinander) verwendet. Als Standard wurde der SeeBlue Marker eingesetzt.

Diese Bande lief in einem Bereich von ca. 36 kDa (15% SDS-Gel). Weder DTT noch  $\beta$ -Mercaptoethanol haben Einfluss auf das Laufverhalten der gelben Bande, Komplexe mit Proteinen scheinen nicht vorzuliegen. Zur weiteren Analyse wurde dieser Bereich aus dem Gel herausgeschnitten und die Bande mit ddH<sub>2</sub>O eluiert.

Zur Identifizierung wurde eine Spektralanalyse mit dem Eluat durchgeführt. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abb. 3.47 gezeigt.





**Abb. 3.47: Spektralanalyse von der aus dem Gel eluierten gelben Bande**

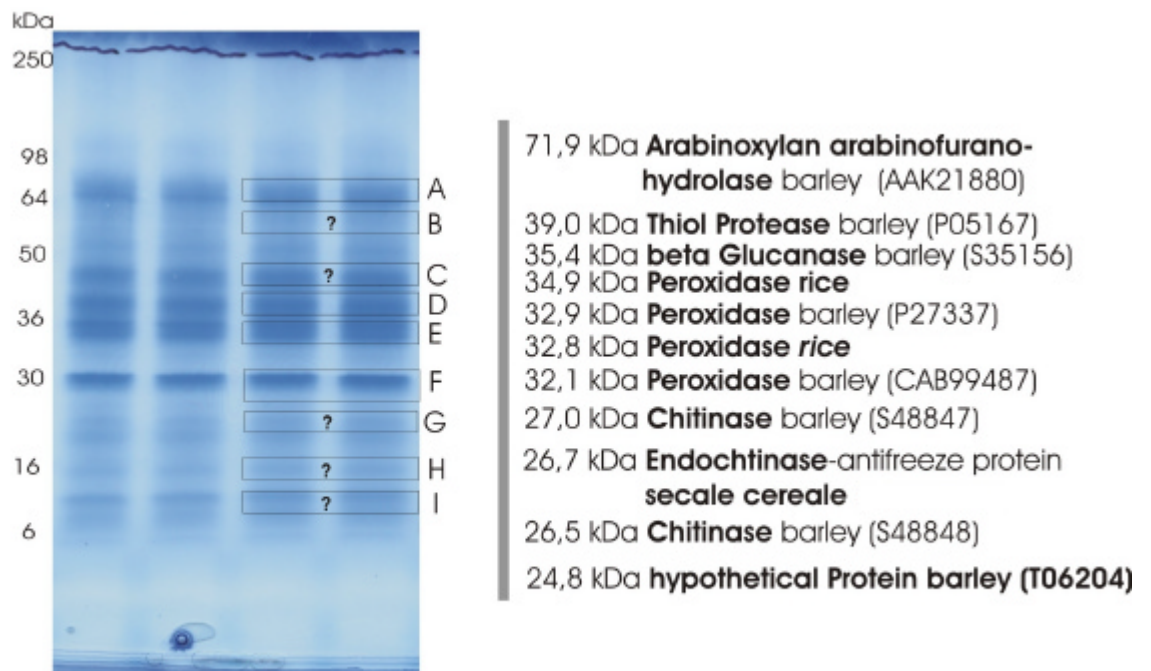
Mit Hilfe eines Spektralphotometers wurde die gelbe Bande untersucht, die bei der Auftrennung der Guttationsflüssigkeit in der SDS-PAGE sichtbar wird. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um ein Flavonoid.

Anhand dieser Analyse kann vermutet werden, dass es sich bei der gelben Bande um wasserlösliche Flavonoide handelt. Zur Überprüfung und Verifizierung dieser Vermutung müsste die Probe jedoch massenspektroskopisch analysiert werden. Die gelbliche Substanz scheint jedoch nicht an Proteinkomplexe über SS-Brücken gebunden zu sein, da die Behandlung mit  $\beta$ -Mercaptoethanol das Laufverhalten im Gel nicht veränderte.

#### **3.10.4. IDENTIFIZIERUNG VON GUTTATIONSPROTEINEN MIT HILFE DER ESI-MS**

Die Identifizierung der Proteine in der Guttationsflüssigkeit sollte mit Hilfe der Elektrospray-Ionisations-Massenspektroskopie durchgeführt werden. Hierzu wurden die Proteine zuerst in einem SDS-Gel aufgetrennt und nach Coomassie-Färbung einige Banden bzw. Gelbereiche ausgeschnitten. Zur weiteren Analyse wurden die Proteine mit Trypsin verdaut. Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Tamar Ziv am „Protein Center“ in Haifa / Israel sowie der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Gadi Schuster, Department of Biology des Technions in Haifa / Israel durchgeführt.

Die durch den Verdau entstandenen Peptidfragmente wurden mit Hilfe der RP-HPLC aufgetrennt und direkt für die ESI-MS Untersuchung verwendet. In der ESI-MS wird das Eluat der HPLC durch eine elektronisch hoch geladene Kapillare in einen Hochvakuumraum gesprüht. Die hierdurch geladenen Moleküle werden in Bezug auf ihre Masse und Ladung analysiert. Mit den Ergebnissen dieser Untersuchung können die Peptide bzw. Proteine durch Vergleich mit bekannten Sequenzen in der Swissprot oder NCBI-Datenbank identifiziert werden. Eine schematische Übersicht der identifizierten Proteine und der verwendeten Gelbereiche zeigt Abb. 3.48.



**Abb. 3.48: Coomassie gefärbtes SDS-Gel mit identifizierten Proteinen**

Für die ESI-MS wurden die gerahmten Bereiche des Gels ausgeschnitten und tryptisch verdaut. Fragezeichen kennzeichnen Bereiche mit Proteinen, die nicht identifiziert werden konnten und demnach nicht in Datenbanken (NCBI) erfasst sind.

Eine tabellarische Zusammenstellung mit zusätzlichen Informationen über die Sequenzen der identifizierten Peptide / Proteine der Guttationsflüssigkeit gibt die nachfolgende Aufstellung.

1.)

Bezeichnung: **Aleu\_Horvu thiol protease aleurain precursor**  
 Herkunft: *Hordeum vulgare*  
 Accession-ID: P05167  
 Molekulargewicht: 39.122 Da  
 Identifizierte Peptide: 1. EDGIVSPVK  
 2. YNGGIDTEESYPYK

2.)

Bezeichnung: **Beta-glucanase**  
 Herkunft: *Hordeum vulgare*  
 Accession-ID: S35156  
 Molekulargewicht: 35.454 Da  
 Identifizierte Peptide: 1. AYNQGLINHVGNTPK  
 2. IYAPESNVLK

3.)

Bezeichnung: **Chitinase (EC 3.2.1.14) cht2b precursor**  
Herkunft: *Hordeum vulgare*  
Accession-ID: S48848  
Molekulargewicht: 26.630 Da  
Identifizierte Peptide:  
1. GPIQLTGQSNYDLAGR  
2. ELAAFFGQTSHETTGGTR  
3. DLVSNPDLVSTDAVVSFR  
4. GFYTYDAFIAAANTFPGFGT-TGSADDVK

4.)

Bezeichnung: **Hypothetical protein pBH6-12**  
Herkunft: *Hordeum vulgare*  
Accession-ID: T06204  
Molekulargewicht: 24.911 Da  
Identifizierte Peptide:  
1. EYGAAAYAK  
2. SVGGITGDNLK  
3. RPADGDTVTLAVR  
4. DTNGIASTSGSTELSAR  
5. AGYVAANWVK

5.)

Bezeichnung: **Chitinase (EC 3.2.1.14) chta precursor**  
Herkunft: *Hordeum vulgare*  
Accession-ID: S48847  
Molekulargewicht: 27.052 Da  
Identifizierte Peptide:  
1. ELAAFFGQTSHETTGGTR  
2. YCGMLGTATGGNLDCTQR  
3. DLVSNPDLVSTDAVVSFR  
4. GAADQFQWGYCFK

6.)

Bezeichnung: **Peroxidase (EC 1.11.1.7) precursor**  
Herkunft: *Oryza sativa*  
Accession-ID: S22087  
Molekulargewicht: 32.876 Da  
Identifiziertes Peptid:  
1. GLLHSDQVLFNGGSADNTVR

7.)

Bezeichnung: **Peroxidase**  
Herkunft: *Secale cereale*  
Accession-ID: CAB99487  
Molekulargewicht: 32.162 Da  
Identifizierte Peptide:  
1. SELEIAFK  
2. GFEVIDSIK  
3. DSIDANEAAANLDLPGFTSSR  
4. DSVVALGGPSWTVPLGR

8.)

Bezeichnung: **Per1\_Horvu pathogen induced peroxidase 1 precursor**  
 Herkunft: *Hordeum vulgare*  
 Accession-ID: P27337  
 Molekulargewicht: 32.976 Da  
 Identifizierte Peptide:
 

1. GFGVIDSIK
2. AELEAAFLK
3. DSVVALGGPSWTVPLGR
4. IYGGDTNINAAYAASLR

9.)

Bezeichnung: **Arabinoxylan arabinofuranohydrolase isoenzyme AXAH-II**  
 Herkunft: *Hordeum vulgare*  
 Accession-ID: AF320325  
 Molekulargewicht: 71.999 Da  
 Identifizierte Peptide:
 

1. TLFNMK
2. YYLGNYLK
3. DVLDSLEFAR

10.)

Bezeichnung: **Peroxidase isotype = RPN**  
 Herkunft: *Oryza sativa*  
 Accession-ID: 2114377b  
 Molekulargewicht: 34908 Da  
 Identifizierte Peptide:
 

1. GYEVIDAIK
2. YGVLLSGGPDYDVLLGR

11.)

Bezeichnung: **Thaumatococcus-like protein**  
 Herkunft: *Hordeum vulgare*  
 Identifiziertes Peptid: über PR2-Antikörper identifiziert

Mit Hilfe der ESI-MS können allerdings nur Proteine identifiziert werden, deren Sequenz bereits bekannt ist und die in der Datenbank geführt werden. Unbekannte Sequenzen können nur mit Hilfe von Techniken wie ESI-Triple-Quadrupol-Analysen oder der klassischen Edman-Sequenzierung aufgeklärt werden. Da erstere nicht zur Verfügung stand und letztere den finanziellen Rahmen dieses Projektes zur Charakterisierung der Guttationsproteine überstieg, wurde nur die ESI-MS eingesetzt.

Durch die ESI-MS konnten sogar Proteine identifiziert werden, die unbekannt für die Gerste sind. Hierbei handelte es sich um homologe Proteine aus verwandten Gräsern. Diese gefundenen Proteine der Gerste scheinen eine nahezu identische Aminosäurezusammensetzung im Vergleich zu den in der Datenbank identifizierten zu besitzen. So wurden mit Hilfe der Peptide aus der Guttationsflüssigkeit Sequenzen gefunden, die aus dem Reis stammen. Indirekt können also doch „unbekannte“ Proteine der Gerste gefunden werden.

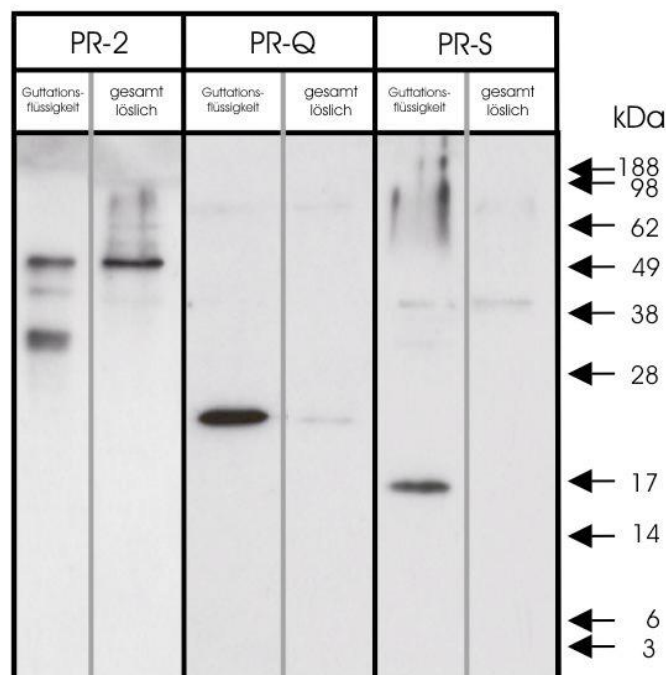
Es konnten insgesamt 11 Proteine identifiziert werden, die in der Guttationsflüssigkeit von Gerstenpflanzen vorkommen. Nahezu alle Vertreter dieser Proteine gehören zur Familie der PR-Proteine. Auf die Bedeutung dieser Entdeckung wird im Diskussionsteil näher eingegangen.

Bei den identifizierten Aminosäuresequenzen handelt es sich um pflanzeigene Proteine. Dies mag zwar auf den ersten Blick selbstverständlich sein, dennoch wäre es auch vorstellbar gewesen, dass ein Teil der identifizierten Proteine von Mikroorganismen stammen könnten, die in der Guttationsflüssigkeit leben.

### 3.10.5. NACHWEIS VON PR-PROTEINEN DURCH SPEZIFISCHE ANTIKÖRPER

Neben der ESI-MS wurde auch die klassische Methode der Identifizierung von Proteinen durch spezifische Immunglobuline eingesetzt. Hierfür wurden Antikörper gegen die PR-Proteine PRQ, PRS und PR2 verwendet, die freundlicherweise von Dr. Michel Legrand vom CNRS/Frankreich zur Verfügung gestellt wurden. Mit diesen Antikörpern wurden Westernblot-Analysen mit in der SDS-PAGE aufgetrennten Guttationsproteinen durchgeführt.

Wie aus Abb. 3.49 zu entnehmen ist, kommt es zu einer Kreuzreaktion der Antikörper mit Guttationsproteinen.



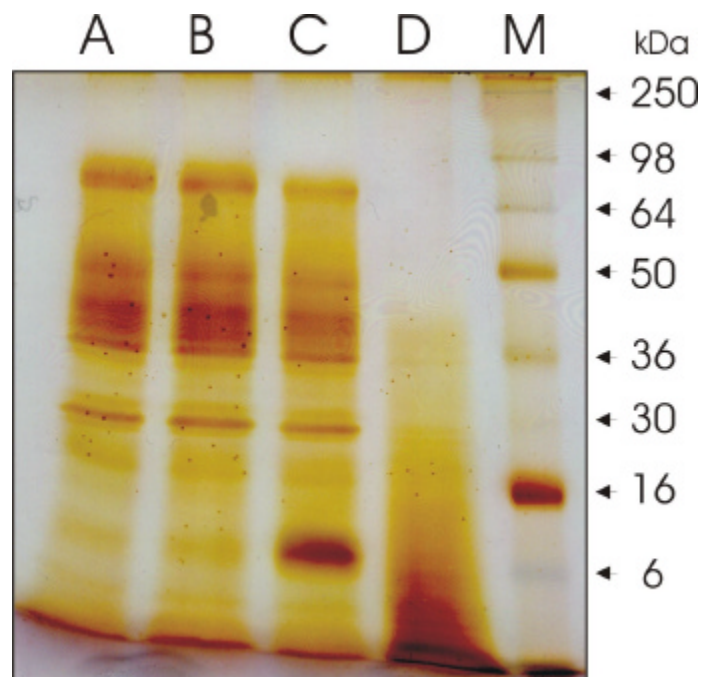
**Abb. 3.49: Westernblot-Analyse von Guttationsflüssigkeit mit Antikörpern gegen PR-Proteine**

Für die Untersuchung wurden 70 µg Proteine der Guttationsflüssigkeit sowie gesamtlösliche Proteine der Gerste im Westernblot mit Antikörpern (1:500 verdünnt) gegen die PR-Proteine PR-2, PR-Q und PR-S im Westernblot analysiert. Zur Auftrennung wurde ein 14%iges SDS-Gel verwendet und als Größenstandard ein Protein-Marker (4 µL) aufgetragen.

Ein solcher Nachweis muss natürlich mit Vorsicht bewertet werden, da die Verwendung von polyklonalen Seren die Gefahr birgt, falsch positive Ergebnisse zu erhalten. Das Resultat der Westernblot-Analyse wird zum Teil aber durch die ESI-MS bestätigt, da die PR-Proteine PR-Q zur Familie der Chitinasen und das PR-2 zur Familie der 1,3- $\beta$ -Glucanasen gehören und in der ESI-MS ebenfalls identifiziert wurden. Diese legt die Vermutung nahe, dass auch Thaumatin-ähnliche Proteine in der Guttationsflüssigkeit vorkommen, da der PR-S-Antikörper eben solche erkennt.

### 3.10.6. DNASE-, RNASE- UND PROTEIN K-VERDAU

Zur Klärung der Frage, ob möglicherweise auch DNA oder RNA in der Guttationsflüssigkeit vorkommen konnte und diese in der Silberfärbung der SDS-Gele Banden erzeugten, wurde ein Aliquot der Guttationsflüssigkeit mit DNase, RNase und als Positivkontrolle mit Protein K für mehrere Stunden inkubiert. Die Ansätze des Verdauens mit den jeweiligen Enzymen wurden anschließend mit TCA gefällt, in der SDS-PAGE aufgetrennt und Silber gefärbt. Das Resultat dieses Versuches ist in Abb. 3.50 dargestellt.



**Abb. 3.50: Verdau von Guttationsflüssigkeit mit DNase, RNase und Protein K**

In Spur A wurde zur Kontrolle eine unbehandelte Probe, in B mit DNase, in C mit RNase und im Spur D mit Protein K verdaute Probe Guttationsflüssigkeit auf ein SDS-Gel aufgetragen und nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem 15%igen Gel Silber gefärbt. Als Marker wurde der SeeBlue Standard verwendet. Es wurde jeweils die gleiche Menge Protein mit 10 U Enzym für 4 h bei 37°C inkubiert.

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle sind durch den DNase- und RNase-Verdau keine Banden im Silbergel degradiert worden. Zusätzliche Banden erklären sich durch die verwendeten Enzyme. Durch die Protease Protein K wurde ein Großteil der Proteine in der Guttationsflüssigkeit proteolytisch gespalten. In der Guttationsflüssigkeit scheinen größere Mengen von DNA und RNA nicht vorhanden zu sein.

## 4. DISKUSSION

Das Protein Horcolin konnte mit Hilfe verschiedener chromatographischer Methoden aufgereinigt, sequenziert und kloniert werden. Anhand der vorliegenden cDNA-Sequenz konnten Sonden für Northernblot- und Southernblot-Analysen erzeugt und hierdurch Aussagen zur Expression des Horcolin in den unterschiedlichen Geweben sowie zur Anzahl der Gene im Genom gemacht werden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Gewebeschnitten von Blättern und Koleoptilen zeigen eine deutliche Lokalisation von HL#2 und Horcolin im apoplastidären Bereich an. Untersuchungen zur Funktion der beiden Proteine weisen darauf hin, dass es sich bei ihnen um Lektine handelt. Aufgrund der Affinität von Horcolin und HL#2 zu Mannose-Zuckern und ihrer modellierten Tertiärstruktur, die eine  $\beta$ -Prismafaltung aufzeigt, können die beiden Proteine zur Familie der Jacalin-verwandten mannosebindenden Lektine gezählt werden. Innerhalb dieser Familie scheinen Horcolin, HL#2 und weitere Proteine eine bedeutsame Untergruppe von bisher wenig charakterisierten stressinduzierten Lektinen zu bilden.

Ein entscheidender Punkt bei der Charakterisierung eines neuen Proteins ist die Aufklärung seiner Funktionen in der Zelle. Wie für ein Puzzle braucht man meist mehr als nur einen Teil des Ganzen, um die Funktionen zu erkennen. Stehen ausreichend Teile, hier als Synonym für Daten verwendet, zur Verfügung, so kann bereits ein Bild erkannt werden, auch wenn einzelne Elemente fehlen. Ist ein Szenario bekannt, so reichen weniger Teile aus, als bei einem unbekanntem. Eine mögliche Gefahr liegt jedoch darin, dass aus wenigen Teilen voreilig ein Bild zusammengesetzt wird. Insbesondere dann, wenn einzelne Teile bereits bekannt sind. Neue Bilder enthalten aber oft auch viele alte Elemente, die anders betrachtet ein neues Bild ergeben können. Die nachfolgende Diskussion der Ergebnisse soll die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Teile zu einem Bild zusammenfügen, um mögliche Antworten auf die Frage nach den Funktionen von Horcolin und HL#2 zu finden. Mit Bedacht wird nicht das Wort „Gesamtbild“ verwendet, da noch Teile fehlen - ein Bild zeichnet sich jedoch ab.

Die in der Einleitung aufgeworfene Frage nach der Beziehung zwischen HL#2 und Horcolin kann anhand der erhaltenen Ergebnisse beantwortet werden. Bei dem „kleinen HL#2“ bzw. HL#2\*, das nach Klärung seiner Funktionen den Namen Horcolin (*Hordeum – coleoptile - lectin*) erhalten hat, handelt es sich um ein eigenes Gen bzw. Protein. Die Arbeitshypothese, wonach Horcolin und HL#2 von einem Gen stammen, kann anhand der vorliegenden Daten nicht aufrecht erhalten werden. Die Proteinsequenzen weichen so stark voneinander ab (vgl. Abb. 4.1), dass nicht angenommen werden kann, Horcolin könnte als Transkript von dem größeren Exon von HL#2 stammen (vgl. Abschnitt 1.6).

Betrachtet man die Ähnlichkeit in den Sequenzen von Horcolin und HL#2 (siehe Abb. 4.1), so drängt sich die Vermutung auf, es könnte sich bei diesen Proteinen um Mitglieder einer Genfamilie handeln [Churin et al., 1999].



Zu einer solchen Familie werden durch Genverdopplung entstandene und deshalb aufgrund ihrer Nukleotidsequenz verwandte Gene gerechnet [Zhu et al., 1996]. Als Beispiel für solche Familien sollen hier nur die rRNA-Gene,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globulin, Actin-Gene und die Vitellogenin-Gene genannt werden [Ibelgaus, 1992]. Auf die Bedeutung von Genfamilien wird im weiteren Verlauf der Diskussion noch näher eingegangen. Dies auch vor dem Hintergrund, dass durch den Anti-HL#2-Antikörper in den Ähren der Gerste ein weiteres mit dem HL#2 serologisch verwandtes Protein dieser möglichen Genfamilie identifiziert wurde. Zusätzlich konnten bei dem Versuch der Klonierung vom Horcolin Sequenzen identifiziert werden, die starke Homologien zum HL#2 aufweisen.

```

Horcolin  --MSKPVKIGPWGGNGGSDVDVQPKPIRMVSMVSSGAIVDIAIAFTYVGTDNVQHSSGIK
HL#2      MSSSPVVKLGPWGGDDGVAHDITVAPQRLESITIRWGKVLHLSVAFTYRDKDNQLHTAG-P
          * **:*****:.* :*: * *: **: * :*:***** ..** *::*

Horcolin  WGGTGGTE---DTINLDATNYVTEISGTVGKFGTDDI---VTSLKIITSKGVTRTYGSGT
HL#2      WGGAGGEKEDPDTITLGPSEYITQVDWSVGPFLKEIEHCITSLKFVTNQASYGPPGYAV
          ***:** :   **.*.....*:::.. :** *  .* :*****:*.:.  .* ..

Horcolin  -GIPFRVPVLDGGKIAFFGRAGAFLLDAIGFYITP-----
HL#2      DSTHYSLPVLNNGSVVGMFGRAGDYLHAIGFYVLPETSLAS
          . : :***:.*.:*::***** :*.*****: *

```

**Abb. 4.1: Alignment von Horcolin und HL#2 mit dem Programm Clustal W**

Die Proteine weisen 41 % identische Aminosäuren auf, die mit \* gekennzeichnet sind. Die verwendeten Abkürzungen : und . stehen für ähnliche und verwandte Aminosäuren. Unterstrichen ist die für die Immunisierung der Kaninchen für den Peptidantikörper verwendete Peptidsequenz.

Die Homologien zwischen HL#2 und Horcolin erstrecken sich über den gesamten kodierenden Bereich, wobei diese im C-terminalen Bereich besonders ausgeprägt sind. Die Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz erklärt auch die Kreuzreaktivität des Horcolin mit dem Anti-HL#2-Antikörper, der durch Immunisierung einer Ziege mit einem GST-HL#2-Protein gewonnen wurde [Menhaj, 1998]. Für die immunologische Unterscheidung der beiden Proteine wurde durch Immunisierung zweier Kaninchen ein Peptidantikörper gegen das Peptid „GDDGVAHDIT“ hergestellt. Dieser sollte nur das HL#2 erkennen, wobei die verwendete Sequenz anhand der im Folgenden aufgezeigten Überlegungen gewählt wurde.

Zum einen war sie nicht in den bereits sequenzierten Peptiden vom Horcolin vorhanden, und zum anderen stammte sie aus dem N-terminalen Bereich des HL#2 (vgl. Abb. 4.1). Dieser Bereich sollte sich anhand der Exonstrukturen des HL#2-Gens vom Horcolin unterscheiden. Der Peptidantikörper zeigt keine Kreuzreaktivität mit Horcolin (Abb. 3.26). Dadurch wird ermöglicht, eindeutig zwischen HL#2 und Horcolin zu unterscheiden, was für die EM-Lokalisation mit Immunogold gekoppelten Antikörpern von entscheidender Bedeutung ist. Hierauf wird im weiteren Verlauf der Diskussion noch eingegangen.

#### 4.1. ISOLIERUNG UND AUFREINIGUNG VON HORCOLIN

Die Frage nach der Verwandtschaft von Horcolin und HL#2 konnte nur über die Identifizierung der Nukleotid- oder der Proteinsequenz eindeutig beantwortet werden. Die einzigen bekannten Informationen entstammen der Kreuzreaktivität des vorhandenen Antikörpers gegen das HL#2. Klonierungsstrategien, die bekannte Sequenzen voraussetzen, konnten mangels solcher Informationen nicht angewandt werden. Die Suche in EST- und non-redundanten Datenbanken erbrachte weder mit den HL#2-Proteinsequenzen, noch mit der Nukleotidsequenz einen Hinweis auf Horcolin. Das Durchsuchen von cDNA-Bänken, die aus Koleoptilen-mRNA bzw. durch Subtraktionsklonierung von Gesamt-RNA aus etiolierten und unter Licht gewachsenen Pflanzen [Potter et al., 1996] hergestellt werden, wäre sehr zeitaufwendig gewesen. Die Wahrscheinlichkeit, hierdurch auf die Nukleotidsequenz zu stoßen, ist wesentlich geringer, als mit Hilfe der Proteinaufreinigung zu Ergebnissen zu gelangen.

Der Vorteil bei der Isolierung und Aufreinigung von Horcolin lag eindeutig darin, dass der Erfolg der verwendeten Methoden wie Extraktionen, Fällungen und der chromatographischen Verfahren anhand des vorhandenen Antikörpers überprüft werden kann. Informationen der 2D-Gelelektrophorese (Abb. 3.40) über den basischen Charakter des Horcolin (berechneter pI von 7,9), sein Molekulargewicht, in der SDS-PAGE mit 15,5 kDa und errechnet mit 15,12 kDa (pI/MW-Programm auf ExPasy Internetseiten- siehe Abschnitt 2.7), sowie die weiteren bekannten Fakten über die gewebespezifische Lokalisation (Abb. 3.36) in den Koleoptilen junger Gerstenpflanzen [Menhaj, 1998], halfen bei der Erstellung einer Strategie zur Aufreinigung.

Zur Extraktion des Horcolin wurden etiolierte Koleoptilen verwendet, die ca. 4-6 Tage alt waren. So konnte davon ausgegangen werden, dass HL#2 noch nicht exprimiert ist (bei der Anzucht unter Licht lässt sich HL#2 auch in den Koleoptilen nachweisen) [Menhaj et al., 1999]. Im Falle einer Expression von HL#2, das mit Horcolin verwandt ist, und demnach ähnliche Eigenschaften aufweist, könnte die Aufreinigung erschwert werden.

Die Verwendung der einzeln per Hand geernteten und von den Primärblättern abgezogenen Koleoptilen erhöhte den Anteil von Horcolin im Vergleich zur Verwendung von Primärblättern zusammen mit den sie umschließenden Koleoptilen um den Faktor 5 (berechnet aus Verhältnis des Gewichtes der Koleoptilen zum Gesamtgewicht).

Die Extraktion des löslichen Proteins wurde bei verschiedenen pH-Werten getestet. Es zeigte sich, dass sich Horcolin besonders gut im sauren pH-Bereich isolieren lässt (Abb. 3.1). Ein solcher Test wird von Deutscher [1990] als mögliche Methode bei der Proteinreinigung in Erwägung gezogen.

Da Horcolin, im Vergleich zum Großteil der gesamtlöslichen Proteine der Koleoptile, bei sauren Bedingungen noch löslich war, konnte es hierdurch zusätzlich angereichert werden (berechnet nach dem Verhältnis vom Protein im sauren Extrakt zu den gesamtlöslichen Proteinen [Kaneko et al., 2000]).

Die saure Extraktion wurde bei pH 2,9 bis pH 3,2 mit Citratpuffer durchgeführt. Zu diesem Zweck kann aber auch 2,5 % TCA oder Essigsäure pH 3,0 verwendet werden. Zum Zeitpunkt des Beginns der Aufreinigung konnte nur über die Funktion von Horcolin

als Lektin aufgrund der Verwandtschaft von HL#2 zu anderen Lektinen nur spekuliert werden, ein eindeutiger Nachweis fehlte jedoch [Menhaj, 1998; Menhaj et al., 1999]. Das Lektin Calsepa, ein Sequenzverwandter vom HL#2, wurde von Peumans et al. [Peumans et al., 1997], mit PBS pH 7,4 aus *Calystegia sepium* extrahiert, aufgereinigt und kloniert [van Damme et al., 1996]. Dieselbe Arbeitsgruppe um van Damme veröffentlichte im Jahre 2000 zwei Arbeiten, in denen die Aufreinigung und Charakterisierung weiterer Lektine beschrieben wird. Zum einen handelte es sich um zwei Lektine aus der Banane (BanLec) bzw. Platane (PlanLec) [Peumans et al., 2000a], zum anderen um salT aus dem Reis [Zhang et al., 2000]. Die Lektine wurden von der Gruppe entweder mit 50 mM Essigsäure oder Ascorbinsäure (1,5 g/L) bzw. für ein weiteres Lektin aus dem Krokus [van Damme et al., 2000] mit 0,1 % Ascorbinsäure bei saurem pH extrahiert.

Die für Horcolin experimentell ermittelte saure Extraktionsmethode findet demnach auch Anwendung für andere Proteine, die als Lektine identifiziert werden konnten. Peumans et al. [2000a] begründen ihre Extraktionsmethode damit, dass die Lektine BanLec und PlanLec bei pH-Werten unter 3,0 reversibel inaktiviert werden, aber dennoch löslich bleiben und dadurch während des Zentrifugierens nicht präzipitieren. Eine weitere Eigenschaft von Horcolin ist seine Hitzestabilität (Abb. 3.1). Diese Eigenschaft wurde jedoch nicht für die Aufreinigung eingesetzt, da durch das Kochen des Extraktes eine unerwünschte Denaturierung nicht ausgeschlossen werden konnte, welche für die weitere Aufreinigung möglicherweise von Nachteil gewesen wäre. BanLec und weitere Lektine zeigen jedoch nach Hitzebehandlung noch Aktivität als Lektin [Peumans et al., 2000a], so dass die Hitzebehandlung dem Horcolin wahrscheinlich nicht geschadet haben würde.

Für die weitere Aufreinigung wurde der saure Extrakt neutralisiert, umgepuffert und zur Hydroxyapatit-Chromatographie eingesetzt. Im Gegensatz zu Ipomoelin, einem Lektin der Süßkartoffel, welches an Hydroxyapatit bindet [Imanishi et al., 1997], befand sich das Horcolin bei den gewählten Bedingungen im Säulendurchfluss (vgl. Abb. 3.2). Die Reinigung erfolgte daraufhin so, dass dadurch ein Großteil der aufgetragenen Proteine an das Hydroxyapatit-Material bindet und auf diesem Weg entfernt werden konnte.

Eine weitere Aufreinigung konnte durch den Einsatz der Anionenaustauscher-Chromatographie erzielt werden. Im einem stark basischen Puffersystem konnte Horcolin durch einen steigenden NaCl-Gradienten von der Säulenmatrix eluiert werden (siehe Abb. 3.3). Das Eluat wurde anschließend umgepuffert und konzentriert, so dass es für eine Tris-Tricin-SDS-PAGE eingesetzt werden konnte (Abb. 3.4). Dieses System wurde gewählt, weil es zum einen ohne Glycin auskommt und zum anderen besonders gut für die Auftrennung von Proteinen im niederen Molekularbereich geeignet ist [Schägger and von Jagow, 1987]. Für den Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (vgl. Abb. 3.5) wurde ebenfalls ein System verwendet, welches auf den Einsatz von Glycin verzichtet [Dunn, 1986], da Glycin bei der Edman-Sequenzierung zu unerwünschten Peaks führen kann [Bollag et al., 1996].

Die erste durchgeführte Sequenzierung von Horcolin ergab kein Resultat, da das Protein anscheinend am N-Terminus blockiert war. Aus diesem Grund wurde ein LysC Verdau durchgeführt, die Peptide mit Hilfe einer RP-HPLC aufgetrennt (siehe Abb. 3.6)

und die Peptide anschließend zur Sequenzierung an Herrn PD Dr. H. Thole, MH Hannover weitergegeben.

Mit Hilfe der Sequenzierung konnten neun Peptide mit 6 bis 15 Aminosäuren identifiziert werden. Dies entspricht über 50 % der gesamten Aminosäuresequenz von Horcolin- allerdings ist die Reihenfolge der Peptide nicht bekannt. Ein Vergleich der Peptidsequenzen mit der Proteinsequenz vom HL#2 zeigte, dass beide Proteine nicht vom selben Gen stammen können. Die Peptide zeigten auch keine Übereinstimmung mit anderen in der Datenbank veröffentlichten Proteinen. Es wurden jedoch Sequenzhomologien zu denselben Proteinen aufgezeigt, die bereits bei der Untersuchung der HL#2 Sequenzen gefunden wurden. Bei diesen handelt es sich überwiegend um Proteine mit Lektineigenschaften [Lee et al., 1998; Peumans et al., 2000a; van Damme et al., 1999; Zhang et al., 2000].

Die Lektineigenschaften des Horcolin (vgl. Abschnitt 3.6.1) könnten möglicherweise ein Grund für das ungleiche Eluierungsverhalten in den chromatographischen Aufreinigungsschritten sein. Lektine zeigen hierbei oft unspezifische Interaktionen mit der verwendeten Säulenmatrix bzw. Aggregatbildungen unter sich oder mit heterologen Glykoproteinen. Dieser Umstand könnte auch die höhermolekularen Banden in einigen der Westernblot-Analysen erklären.

#### **4.2. KOLONIERUNG DER SEQUENZ UND REKOMBINANTES HORCOLIN**

Zur Aufklärung der Proteinsequenz von Horcolin sollte mit Hilfe der RT-PCR die Nukleotidsequenz kloniert werden. Hierfür wurde mit mRNA aus Koleoptilen eine entsprechende cDNA synthetisiert. Basierend auf der cDNA als Template und degenerierten Primern, die mit Hilfe einer „codon usage“ Tabelle für *Hordeum vulgare* (<http://www.kazusa.or.jp/codon>) anhand der Peptidsequenzen entworfen wurden, konnten auch verschiedene PCR-Banden in den Vektor pBluescript kloniert werden (Abb. 3.10 und Abb. 3.11). Nach erfolgter Sequenzierung zeigte sich jedoch, dass keine der translatierten Sequenzen mit den Peptiden von Horcolin übereinstimmte. Weitere erhaltene PCR-Banden wurden reamplifiziert und für die Klonierung vorbereitet. Parallel zu diesen Arbeiten wurden weitere Datenbankrecherchen mit den Peptidsequenzen durchgeführt.

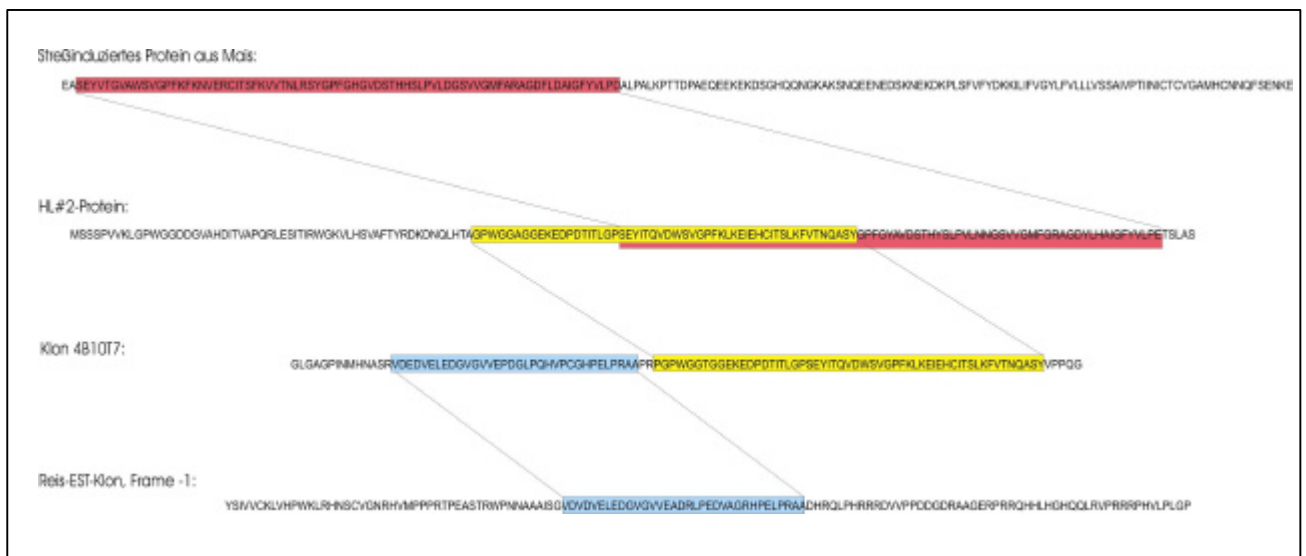
Aus diesen Recherchen resultierte eine EST-Sequenz, die nach ORF-Suche und Translation des Leserasters +2 eine Proteinsequenz ergab, die nahezu identisch mit den Peptidsequenzen war. Dieser EST-Klon (HVSMEb0012E14) stammte von einer Gersten - cDNA-Bank, die aus trockengestressten Gerstenschösslingen hergestellt worden war. Die Daten erschienen erst ab Ende 2000 in der GenBank Datenbank des NCBI. Eine weitere übereinstimmende Sequenz stammte von einer Kältestress-cDNA-Bank (HVSMEa0017L06). Beide Klone stammen vom Clemson University Genomics Institute, Clemson University, South Carolina, USA und wurden im Rahmen eines Projektes zum „Establishment of a genetically and physically anchored EST resource for barley genomics“ sequenziert (<http://www.genome.clemson.edu/projects/barley>).

Anhand der vorliegenden Nukleotidsequenzen konnten neue passende Primer entworfen und für die RT-PCR eingesetzt werden (Abb. 3.7). Die Klonierung der PCR-

Produkte, die auf Basis der degenerierten Primer amplifiziert wurden, wurde aus Zeitgründen nicht weiter verfolgt.

Eine mit Hilfe der neuen Primer erhaltene PCR-Bande wurde in den pTAdv Vektor kloniert und anschließend sequenziert (Schema des Vektors siehe in Abb. 3.8). Das Ergebnis war eine Nukleotidsequenz (Abb. 3.12 und Abb. 3.13), die translatiert alle Peptidsequenzen enthält. Der Vergleich von EST-Sequenz und der klonierten Horcolin-Sequenz zeigt eine hohe Übereinstimmung. Einzelne Basenaustausche erklären sich wahrscheinlich durch die EST-Sequenzierung, die häufig ungenaue Resultate liefert. Das Horcolin-Insert im pTAdv Vektor wurde von beiden Richtungen aus sequenziert. Beide Ergebnisse wurden verglichen, um mögliche Fehler im Sequenzierungsvorgang zu lokalisieren. Hierdurch konnten vier Aminosäuren korrigiert werden, die beim Vergleich der translatierten EST-Sequenz von den Peptidsequenzen abwichen. Die Datenbankrecherche mit der Proteinsequenz von Horcolin ergab keine Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Proteinen. Bei Horcolin handelt es sich demnach um ein neues Protein aus der Koleoptile der Gerste. Die Nukleotidsequenz sowie die Peptidsequenzen des Horcolin wurden zur Veröffentlichung beim NCBI eingereicht.

Die Ergebnisse der Klonierung und Sequenzierung der weiteren PCR-Banden, die anhand von degenerierten Primern ermittelt wurden, lieferten einige neue, aber auch bereits bekannte Sequenzen. Hervorzuheben ist hierbei der Klon 4B-10T7.



**Abb. 4.2: Ergebnis einer Datenbankrecherche mit HL#2 und dem Klon 4B10T7**

Mit Teilen der HL#2 Sequenz wurde in den NCBI-Datenbanken nach verwandten Sequenzen gesucht. Erhaltene EST-Klone wurden translatiert (Programm Omega) und die Primärstrukturen analysiert. Farblich hervorgehobene Sequenzen zeigen homologe Bereiche an.

Dieser weist in einem Teilbereich eine hohe Übereinstimmung mit HL#2 auf. Aufgrund dieser Tatsache wurde die Proteinsequenz des HL#2 in zwei bzw. drei Teile unterteilt, mit denen separate Datenbankrecherchen durchgeführt wurden. Daraus resultierende Sequenzen wurden ggf. translatiert (wenn es sich um EST-Sequenzen gehandelt

hatte) und miteinander verglichen. Das Ergebnis dieser Recherchen ist graphisch aufgearbeitet in Abb. 4.2 dargestellt. Zur Vereinfachung wurden die Proteine bzw. die hypothetischen Proteine – sofern es sich um translatierte EST-Sequenzen handelt - in einen vorderen (N-terminalen), mittleren und hinteren (C-terminalen) Bereich eingeteilt. Der hintere Bereich des HL#2 zeigt eine Homologie zum vorderen Bereich einer Sequenz, die von einem EST-Klon (AI948150) einer Stressbank aus den Wurzeln von Mais stammt. Ein mittlerer Teil von HL#2 stimmt mit Teilen des Klons 4B10T7 überein, wobei ein Teil dieser Sequenz auch beim Stressprotein des Mais wiederzufinden ist (überlappender gelb-roter Bereich). Der vordere Teil des Klons 4B-10T7 zeigt wiederum eine Sequenzhomologie mit einer EST-Sequenz aus Reisschösslingen. Der vordere Teil dieses Reisproteins zeigt wiederum Verwandtschaft mit EST-Sequenzen von weiteren Stressproteinen. Der hintere Teil des Maisproteins weist keine bekannten oder verwandten Sequenzen auf.

Diese Befunde lassen sich unter der Annahme erklären, dass die Natur sich hier einer Art Baukasten zu bedienen scheint, bei der die Proteine wie bei den Immunglobulinen aus verschiedenen Teilen zusammengesetzt werden [Klein, 1991]. Exons bieten hier die Möglichkeit der Neukombination von Domänen. Durch Genverdopplung, Diversifikation und Punktmutationen sowie durch das alternative Spleißen können neue Proteine entstehen [Wilson, 1985; Stryer, 1991]. Weitere Beispiele für die Verwendung einer Domäne in unterschiedlichen Proteinen sind u.a. Sequenzen für mannosebindende Jacalin-verwandte Lektine sowie vom Jacalin selbst, die in Gerste, Weizen, *Arabidopsis* und *Brassica napus* identifiziert wurden, wobei manche in Wiederholungen von 2-5 Domänen sowie als Chimäre mit anderen Sequenzen vorkommen [Sastry et al., 1986; Yang and Czaplá, 1993; Peumans et al., 1997; Geshi and Brandt, 1998; Chisholm et al, 2000; Taipalensuu et al., 1997].

Wie diese Daten belegen, war die Annahme der Verwendung eines Exons vom HL#2 zur Kodierung vom Horcolin als Arbeitshypothese durchaus gerechtfertigt.

Zur weiteren Untersuchung von Horcolin sollte dieses rekombinant überexprimiert werden. Das rekombinante Protein kann zur Gewinnung von Antikörpern bzw. für Funktionsuntersuchungen verwendet werden. Zum Zweck der Klonierung in den Expressionsvektor wurden zuerst mit der PCR und entsprechend modifizierten Primern zwei Restriktionsschnittstellen in die Sequenz eingefügt. Die erhaltene PCR-Bande wurde in einen pGEM Vektor zwischenkloniert. Ausgehend von diesem wurde die Sequenz in den Expressionsvektor pQE30 (Abb. 3.14) umkloniert. Mit diesem Vektor kann das Protein, mit einem His-Tag versehen, in *E. coli* überexprimiert werden (vgl. Abb. 3.20).

Anhand von Analysen mit dem Anti-His-Antikörper und dem Anti-HL#2-Antikörper konnte der Erfolg der Klonierung und Überexpression verfolgt werden, da von beiden Antikörpern das gleiche Protein erkannt werden musste (Ab.3.22). Wäre die Klonierung im falschen Leserahmen erfolgt, hätte nur der Anti-His-Antikörper ein Protein bzw. beide keines erkannt. Die gebildete Proteinmenge fiel geringer aus als erwartet. Im Coomassie gefärbten Gel konnten nur geringe Mengen des rekombinanten Proteins detektiert werden (Abb. 3.21). Wie in vielen anderen Fällen auch, könnte die Ursache hierfür die Toxizität der Proteine für *E. coli* sein [Qiagen, The Qiaexpressionist-

Hanbook; Pötter, 1996]. Es ist auch möglich, dass durch die Lektineigenschaften nicht das gesamte Protein in Lösung gebracht werden konnte. Es konnten allerdings keine großen Proteinmengen im Pellet gefunden werden, was nicht auf das Vorhandensein von „inclusion bodies“ deuten würde.

Durch die Verwendung von Ni-Agarose konnte das Protein aufgereinigt werden, wobei die Fraktionen noch Proteinkontaminationen aufwiesen. Zur weiteren Reinigung wurde daher eine Affinitätschromatographie mit Mannose-Agarose durchgeführt. Sollte das rekombinante Protein noch Lektineigenschaften besitzen, müsste es hierdurch aufgereinigt werden können. Wie Abb. 3.23 zu entnehmen ist, besitzt das rekombinante Protein noch Bindungseigenschaften. Dieser Umstand ermöglichte die Aufreinigung bis zur Homogenität. Anzumerken ist hierbei, dass nur ein kleiner Teil des rekombinanten Proteins an die Mannose-Agarose bindet. Laut Aussage von van Damme und Peumans gelingt die rekombinante Überexpression von mannosebindenden Lektine nur selten, und falls ja, dann nur mit sehr geringen Mengen an aktivem Protein, wobei der Grund hierfür in der Toxizität dieser Proteine für *E. coli* zu finden sein wird (persönliche Mitteilung von E.J. van Damme und W. Peumans).

Für die beiden rekombinant überexprimierten Proteine Sechumin [Wu et al., 1998] und Trichosanthin [Zhu et al., 1992] wird ein ähnlicher Effekt beschrieben, wobei als Grund für die 5x geringere Aktivität der His-tag diskutiert wird, der die optimale Proteinfaltung beeinträchtigen soll. Dieser Punkt wird bei der Besprechung der Lektineigenschaften von Horcolin und HL#2 näher diskutiert.

### 4.3. FUNKTION UND LOKALISATION VON HORCOLIN

Die Entdeckung der Lektineigenschaften von Horcolin und HL#2 stellt einen entscheidenden Fortschritt bei der Aufklärung ihrer Funktionen dar. Hierbei war nicht nur von Bedeutung, dass beide Proteine an Zucker binden, sondern auch an welche sie dies vornehmlich tun. Anhand dieser Spezifitäten ist eine Einordnung in die Lektinfamilien sowie die Untersuchung weiterer Funktionen möglich. Ein Beispiel bieten die Mannane, bei denen es sich um Polysaccharide aus verzweigten Mannosezuckern handelt. Mannane kommen u.a. bei Algen (Mannose  $\beta$ -1-4 verknüpft) oder bei pflanzen- bzw. humanpathogenen Pilzen ( $\alpha$ -1-2 und  $\alpha$ -1-3 verknüpft) vor [Ibeas et al., 2000].

Hinweise auf eine mögliche Eigenschaft als Lektin ergaben bereits die Datenbankrecherchen, die Verwandtschaften zu Heltuba [Nakagawa et al., 1996; Nakagawa et al., 2000; van Damme et al., 1999], Calsepa [Peumans et al., 1997], BanLec [Peumans et al., 2000a], Ipomolein [Imanishi et al., 1997], salT [Zhang et al., 2000], MRL [Hirano et al., 2000], Jacalin [Kabir, 1998] und anderen Lektinen aufzeigten.

Für den Nachweis wurde ein einfacher Lektinbindungs-Nachweis entwickelt. Hierfür wurde eine entsprechende Zucker-Agarose mit Bindungspuffer equilibriert, ein Rohextrakt zugegeben und die Matrix mit Bindungspuffer mehrmals gewaschen. Eluiert wurde mit einem speziellen Eluierungspuffer sowie durch Kochen mit 1x SDS-Probenpuffer. Letzteres sollte das gebundene Protein gänzlich von der Matrix lösen.

Die ersten Versuche mit diesen Tests ergaben uneinheitliche Ergebnisse. Wie sich herausstellte, lag dieses an den Extraktions- und Bindungsbedingungen. So wurde für die ersten Versuche in Stickstoff gemörseretes Material verwendet. Aus diesem Material wurden die löslichen Proteine mit einem Puffer extrahiert, der einen pH-Wert von 7,0 bis pH 8,0 besaß. Da diese Methode unzureichende Ergebnisse lieferte, wurde eine andere Methode eingesetzt. In Anlehnung an die Extraktionsmethoden der Arbeitsgruppe um van Damme und Peumans [Peumans et al., 2000a; Zhang et al., 2000] wurde der Rohextrakt aus nicht gefrorenen Gerstenpflanzen durch Homogenisieren mit saurem Extraktionspuffer (pH 2,9) gewonnen. Für die Bindungsstudien wurde der Extrakt mit NaOH auf pH 7,0 bis 8,0 gebracht. Das geschah aufgrund der Erkenntnis, dass bei saurem pH die Lektine ihre Bindungseigenschaft reversibel verlieren und durch pH-Erhöhung wieder zurück gewinnen [Peumans et al., 2000a]. Es scheint so zu sein, dass bei der Extraktion um pH 7,0 die Lektine an freigesetzte Zucker binden und so im Lektinbindungs-Test keine Reaktion mehr zeigen, weil ihre Bindungsstellen abgesättigt sind.

Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass Horcolin an Mannose-Agarose bzw. dem aus Mannosemolekülen aufgebauten Mannan bindet (vgl. Abb. 3.27). HL#2 zeigt eine äußerst schwache Bindung an Mannose, aber eine sehr deutliche an Mannan (Abb. 3.28). Das rekombinante Horcolin bindet ebenfalls an Mannose, jedoch schwächer als die native Form (Abb. 3.29). Erwähnenswert ist auch, dass die rekombinante Form eine leichte Bindung an Galaktose-Agarose zeigte, während dies beim nativen Protein nicht festgestellt werden konnte. Die angeführte Galaktose-Agarose wird als Negativkontrolle im Lektinbindungs-Test eingesetzt. So wird zum einen die Effizienz der Waschschriffe demonstriert und zum anderen sichergestellt, dass die Proteine nicht an die Agarose binden.

Neben dem Test auf die Bindungseigenschaften an Zuckern wurde auch ein Hämagglutinations-Test mit dem rekombinanten Horcolin durchgeführt. Dieser zeigt nicht nur die Bindung des Lektins an die Glykoproteine auf der Erythrozytenoberfläche, sondern auch deren Quervernetzung. Das Resultat einer solchen Reaktion ist, dass die roten Blutkörperchen nicht geordnet sedimentieren, sondern sich diffus quervernetzen. Voraussetzung für die Hämagglutination ist, dass ein Protein die Fähigkeit besitzt, gleichzeitig an zwei Blutkörperchen binden zu können [Klein, 1992]. Dementsprechend verfügt ein Lektin entweder wie bei Immunglobulinen über zwei Bindungsstellen, oder es lagern sich mehrere identische Proteinmoleküle zu einem Komplex zusammen. Diese Quartärstrukturen sind je nach Bindung mehr oder weniger stabil. Nakagwa et al. [1996] nennen als Beispiel hierfür das Lektin Heltuba, das bei pH 5 zwar seine Fähigkeit zur Hämagglutination verliert, aber dennoch an Zucker bindet. Heltuba formt ein Komplex aus vier identischen 15,5 kDa nicht-kovalent verbundenen Untereinheiten [van Damme et al., 1999]. Das Lektin Calsepa aus *Calystegia sepium* bildet ein Dimer aus zwei identischen 16,0 kDa Untereinheiten [Peumans et al., 1997]. Die Lektine BanLec und PlanLec bilden ebenfalls Dimere aus 15,0 kDa [Peumans et al., 2000a]. Eine Dimerisierung wird auch für das Lektin salT mit  $[15 \text{ kDa}]_2$  angenommen, da das Protein in der Gelfiltration bei 30 kDa läuft [Zhang et al., 2000]. Ein ähnliches Laufverhalten zeigt ein mannosebindendes Lektin aus *Narcissus tazetta*, welches aber aus zwei identischen 13 kDa Untereinheiten aufgebaut ist [Ooi et al., 2000a; Ooi et al.,



2000b]. Das als Preproprotein translatierte und verschiedenen Modifikationen unterzogene Lektin Jacalin ist hiervon abweichend [Sastry et al., 1986]. So wird u.a. ein Signalpeptid entfernt, eine N-Glykosylierung durchgeführt, ein N-terminales Propeptid entfernt sowie ein vier Aminosäure langer Linker zwischen den reifen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten entfernt. Nach diesen posttranslationalen Modifikationen wird folgender Komplex ausgebildet:  $[2 \text{ kDa} + 13 \text{ kDa}]_4$ , wobei die kleine Untereinheit aus 20 AS und die größere aus 133 AS besteht [Kabir, 1995].

Da für das rekombinante Horcolin die Fähigkeit zur Hämagglutination gezeigt werden konnte (vgl. Abb. 3.30), muss eine Komplexbildung angenommen werden. Diese Annahme sollte jedoch durch Gelfiltrationsexperimente verifiziert werden. Dies gilt natürlich auch für das HL#2, für das diese Untersuchungen ebenfalls noch nicht durchgeführt wurden.

Die Gemeinsamkeiten der Lektine Heltuba, saIT, Horcolin und HL#2 erstrecken sich nicht nur auf den Bereich der Primärstruktur, wie aus dem Alignment der Aminosäuresequenzen zu ersehen ist (vgl. Abb. 3.31), sondern auch in der Sekundärstruktur. Der Vergleich der Sekundärstrukturen in Abb. 3.33 zeigt deutlich eine Abfolge von 12  $\beta$ -Faltblättern (in der Tertiärstruktur antiparallel angeordnet), die die strukturelle Homologie der verglichenen Lektine widerspiegelt. Diese Homologie setzt sich in der Tertiärstruktur fort (vgl. Abb. 3.34).

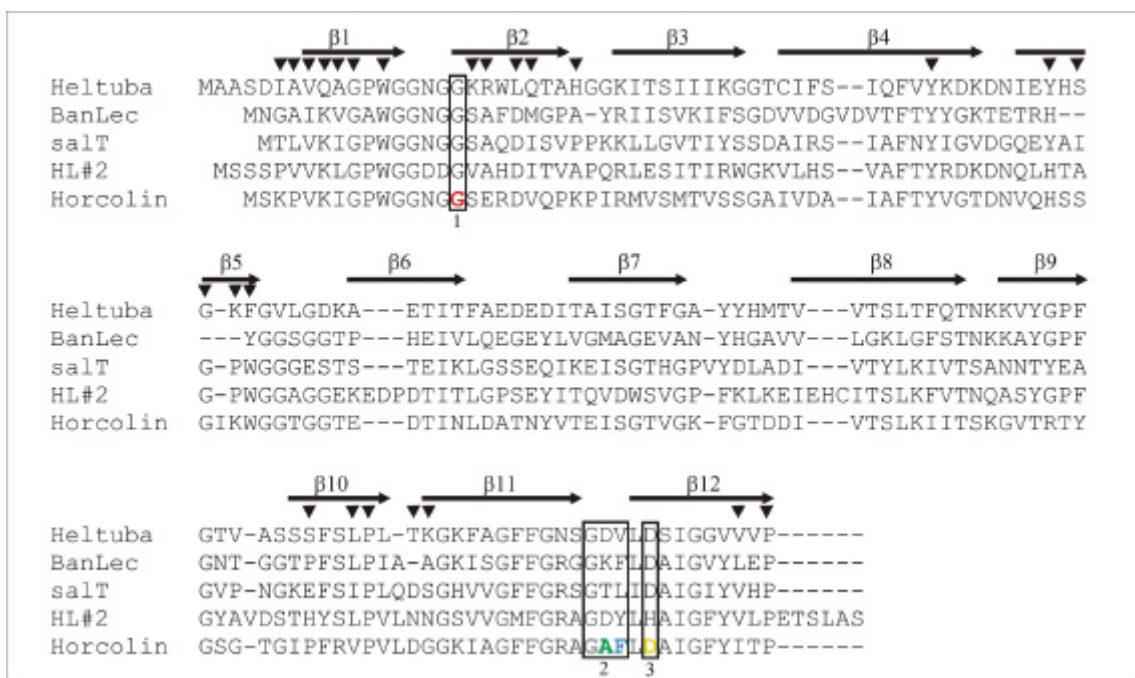
Die Daten für die Modellierung von HL#2, Horcolin und saIT wurden ausgehend von den Röntgenkristallstrukturdaten von Heltuba (PDB: 1C3M) ermittelt [Bourne et al., 1999], wobei die Berechnungen durch den FAMS Service der Kitasato Universität durchgeführt wurden [Mitsuo, 2001; Ogata and Umeyama, 1998]. Zur Kontrolle der Berechnung wurde saIT durch den FAMS Service modelliert und mit dem Modell der Berechnung von Zhang et al. [2000] verglichen, das auf einer Silicon Graphics Workstation O2 R10000 mit dem Programm InsightII erstellt wurde. Der Vergleich zeigte die Übereinstimmung beider Berechnungsmethoden.

Die Tertiärstruktur zeigt ein sogenanntes  $\beta$ -prisma Motiv [Chothia and Murzin, 1993]. Diese Struktur wurde 1996 von Shimizu und Morikawa für die Proteine VMO-I (vitelline membrane outer layer protein I) [Shimizu et al., 1994; Kido et al., 1995] und dem  $\delta$ -Endotoxin aus *Bacillus thuringiensis* [Chen et al., 1993] beschrieben. Hervorgehoben wird hierbei, dass sich die Proteine zwar in ihrer 3D-Struktur ähneln, die Aminosäuresequenzen aber sehr unterschiedlich sind. Zusätzlich verfügen beide Proteine über eine Kohlenhydrat-Bindungsstelle im apikalen Bereich der  $\beta$ -prisma Struktur [Shimizu and Morikawa, 1996].

Dieser Vergleich kann auch auf Horcolin und HL#2 in Bezug auf VMO-I übertragen werden - die 3D-Strukturen ähneln sich sehr, während die Primärstrukturen unterschiedlich sind (vgl. Abb. 3.34). Dies trifft auch auf den Vergleich von Heltuba mit VMO-I zu, wohingegen Horcolin und HL#2 mit Heltuba sowohl große Homologien im Bereich der Primär- und Sekundär als auch der Tertiärstruktur aufweisen. Weitere Sequenz- und Strukturverwandte sind neben dem bereits erwähnten saIT auch die Lektine Jacalin [Sankaranarayanan et al., 1996], MPA aus *Maclura pomifera* [Lee et al., 1998] sowie BanLec und PlanLec [Peumans et al., 2000a] (siehe auch Abb. 3.34).

Die aufgeführten Lektine zeigen eine aus 12 antiparallel angeordneten  $\beta$ -Faltblättern gebildete  $\beta$ -prisma Struktur, wobei diese aus drei Bündeln mit je vier  $\beta$ -Faltblättern zusammengesetzt wird und die Faltblattstrukturen über Schleifen verbunden und parallel zur Achse der  $\beta$ -prisma Struktur angeordnet sind (vgl. Abb. 3.34 und Abb. 4.4). Die drei Bündel der viersträngigen  $\beta$ -Faltblätter formen drei sogenannte „greek-key“-Motive, für dessen Aufbau zur  $\beta$ -prisma Struktur besonders Glycine und aromatische Aminosäuren von Bedeutung sind [Bourne et al., 1999].

Die folgenden Überlegungen zu den Zuckerbindungsstellen basieren auf den Daten von Heltuba, das dahingehend von Bourne et al. [1999] untersucht wurde. Ebenso fließen die Daten von Sankaranarayanan et al. [1996] und Suresh et al. [1997] mit in die Betrachtungen ein, da diese für den Vergleich der Zuckerspezifitäten eine Rolle spielen. Da weder für Horcolin noch für HL#2 Röntgenstrukturdaten vorliegen, kann über die Zuckerbindungsstellen nur spekuliert werden. Betrachtet man die 3D-Strukturen sowie die Sequenzvergleiche, lassen sich Übereinstimmungen mit Heltuba und Jacalin feststellen. Nachfolgend sollen einige der bekannte Daten dieser Lektine auf Horcolin und HL#2 übertragen werden, wobei es sich hier nur um theoretische Betrachtungen handelt.



**Abb. 4.3: Multiples Sequenzalignment von Heltuba mit BanLec, salT, HL#2 und Horcolin**

Die Abbildung veranschaulicht die Lage der  $\beta$ -Faltblätter von Heltuba im Vergleich mit den anderen Lektinen. Durch die schwarzen Kästen 1, 2 und 3 werden die für die Zuckbindungsstelle wichtigen Sequenzbereiche gekennzeichnet. Die farbige markierten Aminosäuren Glycin, Alanin, Phenylalanin und Asparaginsäure im Bereich der Horcolin-Sequenz dienen dem Vergleich mit Abb. 4.4 und Tabelle 4-1. Die Dreiecke symbolisieren die an der Komplexbildung beteiligten Aminosäuren von Heltuba. Die Zuordnung der Elemente erfolgte anhand der Daten von Bourne et al. [1999].

Die apikal gelegene Bindungsstelle für Mannose liegt bei Heltuba im Bereich der Schleifen, die die  $\beta$ -Faltblätter 1 mit 2, 7 mit 8 sowie 11 mit 12 verbinden (vgl. Abb. 4.3).

Die Aminosäuren Gly<sup>135</sup>-Asp<sup>136</sup>-Val<sup>137</sup> und die Aminosäure Asp<sup>139</sup>, welche in der  $\beta$ 11- $\beta$ 12-Schleife liegen, bilden ein Netzwerk von Wasserstoff-Brücken-Bindungen (WBB) mit den Sauerstoffatomen O6, O5 und O4 der Hydroxylgruppen von Mannose aus. Gly<sup>18</sup> im Bereich der  $\beta$ 1- $\beta$ 2-Schleife bildet eine weitere WBB mit dem O3 Atom sowie van der Waals Kräfte mit dem äquatorialen O4 der Mannose aus. Die Bindungsstelle für Mannose wird von drei Schleifen abgegrenzt, wobei die dritte  $\beta$ 11- $\beta$ 12-Schleife hoch variabel ist [Bourne et al., 1999].

Die Kohlenhydrat-Bindungsstelle selbst ist 10 Å tief [Bourne et al., 1999]. Eine Größe, die für Di- und Trimannoside Platz bietet. So konnte in Inhibierungsansätzen gezeigt werden, dass Tri- und Pentamannoside nicht stärker inhibieren als Dimannoside [Bourne et al., 1999]. Oberflächen-Plasmon-Resonanz Versuche (SPR) zeigten, dass Dimannoside mit Man  $\alpha$ 1-2 und  $\alpha$ 1-3 glykosidischen Bindungen die wirkungsvollsten Inhibitoren sind. Man  $\alpha$ 1-2 Verknüpfungen kommen besonders bei verzweigt-kettigen Mannosezuckern in Glykoproteinen vor [Bourne et al., 1999].

Der Vergleich der Sequenzen (Abb. 4.3) zeigt eine deutliche Übereinstimmung von Horcolin und HL#2 in der Lage der Faltblätter sowie der sie verbindenden Schleifen mit den Lektinen Heltuba, BanLec und salT. Die Faltblätter und Bindungsstellen wurden anhand der von Bourne et al. [1999] angestellten Überlegungen für Heltuba auf die alignierten Proteinsequenzen übertragen.

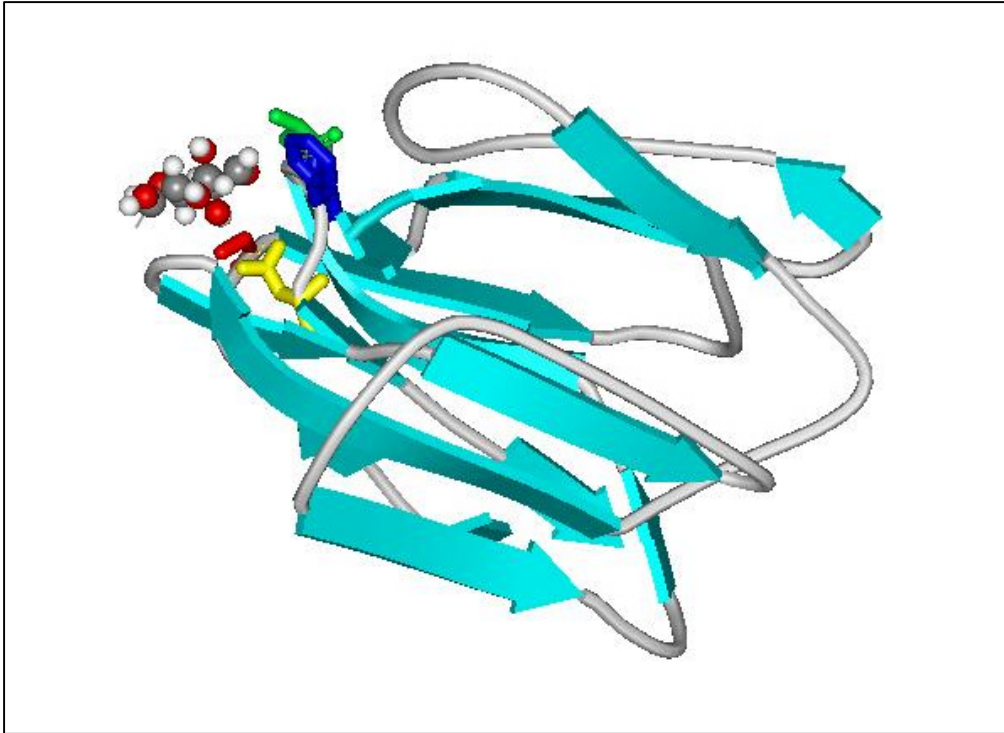
Von Professor P. Rougé durchgeführte computergestützte Untersuchungen mit der Sequenz von Horcolin untermauern die Verwandtschaft von Horcolin mit Heltuba. Die von ihm durchgeführten Berechnungen zeigen, wie die eigenen Untersuchungen ebenfalls auf, dass Horcolin die typische  $\beta$ -prisma Faltung der Jacalin-verwandten Lektine aufweist (persönliche Mitteilung). Das monomere Horcolin ist hiernach aus den folgenden drei viersträngigen  $\beta$ -Faltblättern aufgebaut:

greek-key 1: Stränge 5-11, 17-21, 126-133 und 139-145

greek-key 2: Stränge 29-34, 40-47, 51-54 und 67-70

greek-key 3: Stränge 79-86, 95-100, 104-109 und 114-119

Die eingerahmten Bereiche in Abb. 4.3 verdeutlichen die für die Zuckerbindung verantwortlichen Aminosäuren. Farblich gekennzeichnete Aminosäuren sollen die Lagebeziehungen im 3D-Modell von Horcolin verdeutlichen (Abb. 4.4.) sowie Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Bindungsstellen aufzeigen.



**Abb. 4.4: 3D-Modell von Horcolin zur Darstellung der Zuckerbindungsstelle**

Die hervorgehobenen und farbig gekennzeichneten Aminosäuren entsprechen den in Abb. 4.3 markierten Sequenzen vor Horcolin. Der Farbcode entspricht der den in Tabelle 4-1 verwendeten. Mannose und Aminosäuremoleküle sind nicht maßstabsgetreu wiedergegeben. Die Abbildung wurde mit dem Programm WebLab Viewer erstellt. Die pdb-Datei wurde mit dem FAMS Service der Kitasato Universität in Japan erstellt.

Zur Veranschaulichung dieser Zusammenhänge wurden in Tabelle 4-1 die für die Zuckerbindung verantwortlichen Aminosäuren von Heltuba [Bourne et al., 1999], BanLec [Peumans et al., 2000a] und salT [Zhang et al., 2000] mit Horcolin und HL#2 verglichen.

Der Vergleich der 3D-Modelle von Horcolin und HL#2 zeigt, dass die die Zuckerbindungsstelle bildenden Schleifen  $\beta 1$ - $\beta 2$  und  $\beta 11$ - $\beta 12$  exakt an der Position eine Tasche ausbilden, die auch für Heltuba berechnet wurde [Bourne et al., 1999]. Exemplarisch wurden für Horcolin die Aminosäurepositionen Gly<sup>15</sup>, Gly<sup>134</sup>, Ala<sup>135</sup>, Phe<sup>136</sup> und Asp<sup>138</sup> im 3D-Modell hervorgehoben (Abb. 4.4), die für die Ausbildung der Zuckerbindungsstelle verantwortlich sein sollen. Bei HL#2 kommen hierfür die Aminosäuren Gly<sup>17</sup>, Gly<sup>142</sup>, Asp<sup>143</sup>, Tyr<sup>144</sup> und His<sup>146</sup> in Frage. Die ermittelten Aminosäuren für Horcolin stimmen genau mit den von Professor P. Rougè berechneten überein (persönliche Mitteilung)

Diese theoretischen Vergleiche könnten mit Punktmutationen der rekombinanten Proteine Horcolin und HL#2 nach in vitro Mutagenese im Lektinbindungs-Test überprüft werden.

Wie aus Abb. 4.3 (Kasten 1 und 2) und Tabelle 4-1 (Zeile A und B) zu entnehmen ist, sind die Glycine der Schleife  $\beta 1$ - $\beta 2$  und  $\beta 11$ - $\beta 12$  bei allen Lektinen hoch konserviert.

Dieser Bereich zeigt auch in den davor liegenden Aminosäuren Glycin-Asparagin-Glycin-Glycin eine hohe Übereinstimmung, wobei nur bei HL#2 das zweite Asparagin und das dritte Glycin durch Asparaginsäure ersetzt sind. Dieser flexible Bereich bildet die Seite der Zuckerbindungsstelle aus [Zhang et al., 2000] und ist bei Heltuba, salT, BanLec und Horcolin identisch.

Das gleiche gilt auch für die Asparaginsäure der  $\beta$ 11- $\beta$ 12-Schleife (Abb. 4.3 Kasten 3 und Tabelle 4-1 Zeile E), wobei HL#2 mit einem Histidin die Ausnahme bildet. Innerhalb der Sequenzen befindet sich vor der Asparaginsäure bei allen verglichenen Proteinen entweder Leucin oder Isoleucin (salT).

	Schleife	Heltuba	Jacalin	BanLec	Salt	HL#2	Horcolin
A	b1-b2	Gly <sup>18</sup>	Gly <sup>1*</sup>	Gly <sup>15</sup>	Gly <sup>14</sup>	Gly <sup>17</sup>	Gly <sup>15</sup>
B	b11-b12	Gly <sup>135</sup>	Gly <sup>121</sup>	Gly <sup>129</sup>	Gly <sup>134</sup>	Gly <sup>142</sup>	Gly <sup>134</sup>
C	b11-b12	Asp <sup>136</sup>	Tyr <sup>122</sup>	Lys <sup>130</sup>	Thr <sup>135</sup>	Asp <sup>143</sup>	Ala <sup>135</sup>
D	b11-b12	Val <sup>137</sup>	Trp <sup>123</sup>	Phe <sup>131</sup>	Leu <sup>136</sup>	Tyr <sup>144</sup>	Phe <sup>136</sup>
E	b11-b12	Asp <sup>139</sup>	Asp <sup>125</sup>	Asp <sup>133</sup>	Asp <sup>138</sup>	His <sup>146</sup>	Asp <sup>138</sup>

**Tabelle 4-1: Vergleich der an der Zuckerbindung beteiligten Aminosäuren**

Für HL#2 und Horcolin wird dies nur aufgrund der jeweiligen Position im Alignment von Abb. 4.3 angenommen. Anmerkung: \* ist das erste Glycin der  $\alpha$ -Kette von Jacalin und trägt daher eine NH<sub>2</sub>-Gruppe.

Eine weniger starke Konservierung scheint innerhalb der Bindungsstelle im Bereich der letzten zwei Aminosäuren im Kasten 2 der Abb. 4.3 bzw. den Zeilen C und D in der Tabelle 3-1 vorzuliegen. Aminosäureaustausche scheinen hier nicht die Affinität zu Mannosezuckern zu beeinflussen, wie dies für Heltuba [van Damme et al., 1999], BanLec [Peumans et al., 2000a], salT [Zhang et al., 2000], Horcolin und HL#2 eindeutig gezeigt werden konnte.

Im Vergleich des Bindungsverhaltens von Heltuba [Bourne et al., 1999], BanLec [Peumans et al., 2000a] und salT [Zhang et al., 2000], die an Mannose binden, mit dem zur Galaktose affinen Bereich von Jacalin [Sankaranarayanan et al., 1996], werden die durch die posttranslationalen Modifikationen des Jacalin bedingten Unterschiede deutlich. Bourne et al. [1999] weisen darauf hin, dass durch die proteolytische Spaltung der  $\alpha$  und  $\beta$ -Kette eine freie NH<sub>2</sub>-Gruppe am N-terminus der  $\alpha$ -Kette entsteht. Das die NH<sub>2</sub>-Gruppe tragende Glycin kann so mit einer O3-Gruppe der Galaktose interagieren. Diesem Glycin<sup>1</sup> entsprechen die Glycine in der Spalte A von Tabelle 4-1 von Heltuba, BanLec, salT, Horcolin und HL#2, die bedingt durch ihre Position innerhalb der Sequenz über keine freie NH<sub>2</sub>-Gruppe verfügen und deshalb keine Wechselwirkungen mit dem O3 der Galaktose ausbilden können [Bourne et al., 1999]. Weiterhin unterscheidet sich der die Flanke der Bindungsstelle bildende Bereich (Gly-Asn-Gly-Gly- s.o.) von Heltuba, BanLec, salT und Horcolin von Jacalin (Ala-Lys-Val-Ser). Dieser Sachverhalt wurde von Peumans et al. [2000a] als zusätzlicher Grund für die unterschiedlichen Affinitäten interpretiert.

Vergleicht man Horcolin und HL#2 in Bezug auf die Aminosäuren in der potentiellen Zuckerbindungsstelle, so fallen vor allem die Gemeinsamkeiten auf (Abb. 4.3 und Tabelle 4-1). Daneben gibt es aber auch Unterschiede in dem die Bindungsstelle seitlich abgrenzenden Bereich (s.o.) und in der  $\beta$ 11- $\beta$ 12-Schleife (Tabelle 4-1, Zeile C-E). Diese sind möglicherweise für das unterschiedliche Bindungsverhalten verantwortlich.

Von Professor P. Rouge durchgeführte rechnergestützte Bindungsstudien mit Mannose zeigen ein Netzwerk von WBB zwischen der Bindungsstelle und dem Zucker. Hierbei können folgende WBB ausgebildet werden:

Horcolin Gly<sup>15</sup>N – O3 Mannose  
 Horcolin Ala<sup>135</sup> – O5 Mannose  
 Horcolin Phe<sup>136</sup>N – O6 und Phe<sup>136</sup>O – O6 Mannose  
 Horcolin Asp<sup>138</sup>Od1-O4 und Asp<sup>138</sup>Od2-O6 Mannose

Zwei WBB von Heltuba, die Asp<sup>136</sup> mit O5 und O6 von Mannose verbinden, kommen nicht in Horcolin vor. Zusätzlich fehlt auch eine hydrophobe Interaktion vom Met<sup>92</sup> beim Heltuba (durch Asp<sup>90</sup> beim Horcolin ersetzt) mit dem Pyranosering der Mannose. Hierdurch scheint Horcolin zu einem geringeren Maße mit Mannose zu interagieren als Heltuba dies kann.

Bedingt durch das Asp<sup>138</sup> in der Bindungsstelle vom Horcolin scheint diese einen ausgeprägten sauren Charakter zu besitzen (GRASP Kalkulation). Weitere Berechnungen zeigen, dass Glukose ebenfalls mit der Bindungsstelle interagieren kann. Durch die hydrophoben AS Phe<sup>136</sup>, Ile<sup>37</sup> und Ile<sup>92</sup>, die in Nachbarschaft zur Bindungsstelle liegen, scheint Horcolin eine erhöhte Affinität zu methylierten bzw. phenylierten Zuckern wie z.B. Methyl- $\alpha$ -Mannopyranosiden oder p-Nitrophenyl- $\alpha$ -Mannopyranosiden aufzuweisen (Mitteilung Professor P. Rougé).

Die theoretischen Überlegungen werden auch durch die Lektinbindungs-Tests bestätigt. Horcolin bindet an Mannose-Agarose und z.T. auch an Mannan-Agarose. HL#2 zeigt kaum Affinität zu Mannose, dafür aber zu Mannan-Agarose. Beide besitzen keine Affinität zu Galactose, wobei aber das rekombinante Horcolin eine leichte Affinität zu Galaktose-Agarose zu haben scheint.

Als mögliche Erklärungen für letztere Beobachtung kommen der His-Tag sowie eine von der Gerste abweichende Häufigkeit in der Kodonverwendung von *E. coli* und ein Fehlen von möglichen posttranslationalen Modifikationen in Betracht, die zu veränderten Bindungsstellen führen könnten. Inwieweit noch weitere Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen Horcolin (nativ und rekombinant) und HL#2 bestehen, müsste anhand weiterer Versuche wie z.B. der SPR untersucht werden.

Ein weiterer Aspekt, der von Bourne et al. [1999] untersucht wurde, ist die Bildung von Multimeren beim Heltuba. Heltuba soll sich zu Tetrameren bzw. zu Oktameren aus identischen Untereinheiten zusammenlagern. Hierdurch wird einer der größten Komplexe für pflanzliche Lektine gebildet [Bourne et al., 1999]. Dieser verfügt über acht Zuckerbindungsstellen. Dadurch soll der Komplex in der Lage sein, N-Glykane verschiedener Glykoproteine gleichzeitig vernetzen zu können. Für den Zusammenhalt des Komplexes sind die in Abb. 4.3 mit einem Dreieck über der Heltuba-Sequenz

gekennzeichneten Aminosäuren verantwortlich. Diese zu den außen gelegenen  $\beta$ -Faltblättern gehörenden Aminosäuren sollen über hydrophobe Interaktionen miteinander in Wechselwirkung treten und hierdurch den Zusammenhalt des Komplexes bewirken. Inwieweit dies auch für Horcolin und HL#2 zutrifft, kann anhand der vorliegenden Daten nicht ermittelt werden. Von den 24 für die Interaktion verantwortlichen Aminosäuren beim Heltuba stimmen nur ca. 1/3 mit Horcolin und HL#2 überein - nicht mehr als auch zwischen Heltuba und BanLec und salT selbst. Für salT [Zhang et al., 2000] und BanLec [Peumans et al., 2000a] wird aufgrund von Gelfiltrationsexperimenten ein Komplex aus jeweils zwei identischen Untereinheiten angenommen. Neben den Sequenzähnlichkeiten, die sich auch im phylogenetischen Stammbaum widerspiegeln (vgl. Abb. 3.32), der Zuordnung von BanLec, salT, Horcolin und HL#2 zu den Monokotylen mannosebindenden Lektinen sowie der Hämagglutinierungsfähigkeit des rekombinanten Horcolin, ist eine Komplexbildung aus zwei identischen Untereinheiten für Horcolin und HL#2 denkbar. Neben der Eigenschaft, an Zucker zu binden (apikaler Bereich) sowie sich zu Komplexen zusammen zu lagern (seitlicher Bereich) vermutet Professor W. Peumans (persönliche Mitteilung) im basalen Bereich eine Proteinbindungsstelle. Diese Daten bedürfen aber noch einer eingehenden Überprüfung.

Fasst man die gewonnenen Daten zusammen, so können Horcolin und HL#2 der Familie der Jacalin-verwandten mannosebindenden Lektine zugerechnet werden. Abhängig vom Grade der Verwandtschaft bilden diese mit BanLec (PlanLec), salT und weiteren Lektinen eine Untergruppe dieser durch ihre Zugehörigkeit zu den Monokotylen. Die Bindung von Mannose ist hierbei von besonderer Bedeutung, nicht zuletzt vor dem Hintergrund, dass die Natur zur Erkennung dieses Zuckers mindestens drei unterschiedliche Motive entwickelt hat. Neben dem bereits beschriebenen  $\beta$ -Prisma Motiv kommen auch noch die  $\beta$ -Sandwich Motive einiger Leguminosenlektine sowie die  $\beta$ -Faß (barrel) Motive der Monokotylen (nicht Jacalin verwandten) mannosebindenden Lektine zum Einsatz [van Damm et al., 1998; Peumans and van Damme, 1998; Wright, 1997].

Mannose und seine Oligo- bzw. Polysaccharide sind im Pflanzenreich relativ selten vorzufinden, aber dagegen sehr häufig in Form von Glykokonjugaten auf der Oberfläche von Viren, Pilzen und Bakterien [Suzuki, 1995; Bourne et al., 1999]. Dies legt die Vermutung nahe, dass mannosebindende Lektine eine Rolle in der Abwehr von Phytopathogenen spielen [Chrispeels and Raikhel, 1991; Peumans and van Damme, 1995]. Transgene Pflanzen, die das Gen für ein mannosebindendes Lektin (GNA aus *Galanthus nivalis*) überexprimieren, zeigen Phytopathogenen gegenüber eine erhöhte Resistenz [Hilder et al., 1995].

Ebenso wichtig wie die Klärung der Frage nach den Lektineigenschaften ist auch die Frage nach der Lokalisation dieser Proteine in der Pflanze.

Das Lektin BanLec kommt vornehmlich in reifen Bananen vor, kann aber nach Jasmonatbehandlung auch in den Blättern gefunden werden [Peumans et al., 2000a]. Das Lektin salT wird durch Salz- und Trockenstress, ABA- und PEG-Behandlung sowie durch Jasmonatbehandlung in Wurzeln und Blättern von Reispflanzen induziert [Garcia et al., 1998]. Junge, stark wachsende Pflanzenbereiche zeigen hierbei eine besonders hohe Expression von salT. Die Lektine Heltuba und Calsepa wurden aus Knollen bzw.

Wurzeln extrahiert und aufgereinigt [van Damme et al., 1999; Peumans et al., 1997]. Ipomoelin, ein Lektin aus der Süßkartoffel, kann nach Verwundung oder Jasmonatbehandlung in Stängeln und Blättern induziert werden. Die mRNA des Ipomoelins kann 6 h nach Wundinduktion detektiert werden, wobei benachbarte, nicht induzierte Blätter ebenfalls eine mRNA-Expression zeigen. Dieser Befund spricht neben einer lokalen für eine systemische Reaktion [Imanishi et al., 1997].

Im Bereich der Gewebelokalisation von Horcolin und HL#2 konnten die Daten von Menhaj et al. [1998] insoweit bestätigt werden, als Horcolin nur in den Koleoptilen und HL#2 in Koleoptilen sowie in den Primärblättern vorkommt. In den Wurzeln sollen nach Rupprecht [2001] sehr geringe Mengen vom HL#2 nachzuweisen sein.

Menhaj et al. [1999] zeigten für HL#2, dass seine mRNA eindeutig durch Jasmonatbehandlung erhöht wird, wobei es sich hier um einen Anstieg und nicht - wie bei den klassischen JIPs - um eine de novo Induktion handelt. Anzumerken ist hierbei, dass die Proteinmenge nicht signifikant erhöht ist. Hierfür gibt es entweder die Erklärung, dass eine Regulation auf Translationsebene stattfindet, das Protein relativ schnell abgebaut wird, oder aber sich in einer bisher nicht aufgeklärten Art und Weise der Extraktion entzieht. Denkbar wäre hier die feste Bindung an Zellwandelemente, so dass das Protein nicht durch wässrige Puffer extrahiert werden kann.

Es konnte weiterhin festgestellt werden, dass nach Lichtstress HL#2 und Horcolin in etiolierten Pflanzen zeitlich früher exprimiert werden. Die HL#2-mRNA zeigt hierbei auch wiederum eine stärkere Erhöhung in der stationären Konzentration als dies am Protein zu beobachten ist. Salzstress hat keinen Einfluss auf die Expression von HL#2 [Menhaj et al., 1999; Rupprecht, 2001], wobei Rupprecht [2001] eine leichte Zunahme des Horcolin durch Prolinbehandlung festgestellt hat. Zusätzliche Versuche mit etiolierten Koleoptilen, die mit Jasmonat und Prolin behandelt werden, könnten hier weitere Hinweise auf die Expression von Horcolin geben, da durch die Klonierung der Horcolin-Sequenz nun homologe Sonden für Northernblot-Analysen zur Verfügung stehen.

Für Horcolin konnte bereits gezeigt werden, dass seine mRNA in etiolierten Koleoptilen stärker exprimiert zu sein scheint, als in unter Lichteinfluss gewachsenen Pflanzen (vgl. Abb. 3.25). Dies weist auf eine negative Lichtregulation der Expression hin. Da die Koleoptile die Primärblätter schützend durch die Erde leitet und nach einigen Tagen abstirbt, kann in diesem Fall Licht ein Signal für apoptotische Prozesse sein. Es wird hierdurch möglicherweise angezeigt, dass der Schutz im Erdreich nicht mehr benötigt wird, da die Pflanze die Oberfläche erreicht hat. Betrachtet man die große Anzahl von phytopathogenen Erregern im Erdreich sowie die noch nicht besonders stark entwickelten Zellwände der wachsenden Primärblätter, so ist eine Schutzfunktion der Koleoptile durchaus plausibel. Das alleinige Vorkommen von Horcolin in den Koleoptilen scheint eine bedeutende Eigenschaft dieses Proteins zu sein (Professor W. Peumans, persönliche Mitteilung).

Durch weitere Versuche zur Gewebelokalisation konnte in den Ähren ebenfalls HL#2 nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.36). Zusätzlich konnte dort durch eine weitere Kreuzreaktion vom Anti-HL#2-Antikörper (neben der mit Horcolin) ein unbekanntes Protein identifiziert werden. Inwieweit es sich hierbei ebenfalls um ein Lektin handelt, müssen Bindungstests noch zeigen. Mit Hilfe des Antikörpers gegen HL#2 wurden



auch in verschiedenen anderen Gräsern Kreuzreaktion beobachtet, die Proteine mit gleicher Molekulargröße wie Horcolin und HL#2 aufzeigen (Abb. 3.39). Dieser Befund deutet darauf hin, dass diese beiden Proteine höchst wahrscheinlich nicht nur auf die Gerste beschränkt sind. Diese beschriebenen Daten müssen noch durch Southern- und Northernblot-Analysen bestätigt werden. Es zeichnet sich jedoch ab, dass HL#2, Horcolin und ihre Verwandten eine wichtige Funktion in der Familie der Gräser zu haben scheinen.

Es zeigt sich, dass die beschriebenen Lektine in unterschiedlichen Geweben lokalisiert werden können. Betrachtet man die Gruppe der Monokotylen mannosebindenden Lektine (saT, BanLec, Horcolin und HL#2), so sind diese vorwiegend in den oberirdischen Pflanzengeweben zu finden. Neben diesem Befund grenzen sie sich auch durch ihre Reaktion auf Lichtstress oder Jasmonatbehandlung von Heltuba und Calsepa ab.

Ein weiterer Unterschied zwischen Horcolin und HL#2 auf der einen Seite und Heltuba und Calsepa auf der anderen Seite scheint neben der Gewebelokalisation auch in ihrer zellulären Verteilung zu bestehen.

Für Heltuba, Calsepa und weitere mannosebindende Lektine wird eine zytoplasmatische Lokalisation aufgrund einer nicht vorhandenen bzw. bislang nicht bekannten Signalsequenz angenommen [Peumans et al., 2000b; van Damme et al., 1999; Zhang et al., 2000; Peumans, et al., 2000a; van Damme et al., 1996]. Untermuert wurden diese Annahmen durch Immunfluoreszenz-Aufnahmen von Gewebeschnitten aus *Calystegia sepium*, die mit einem Antikörper gegen das Lektin Calsepa angefärbt wurden. Peumans et al. [2000b] wiesen das Protein im Zytoplasma nach. Neben diesem Befund wurde aber auch eine Markierung von apoplastidären Bereichen beobachtet. Die weniger starke Färbung in manchen Bereichen des Apoplasten wurde auf eine mögliche in vivo Beschädigung der Zellen zurückgeführt. Parallel zur diesen Studien von Peumans et al. [2000b] wurde auch die Lokalisation von Jacalin untersucht. Jacalin kommt hiernach vornehmlich in kleineren Vakuolen als Speicherprotein vor. Das in derselben Pflanze vorkommende mannosebindende Lektin KM+ [Rosa et al., 1996], welches eine 52%ige Identität mit Jacalin aufweist, soll dagegen im Zytoplasma lokalisiert sein [Peumans et al., 2000b]. Die unterschiedlichen Lokalisationen von Jacalin und KM+ sowie Calsepa werden von Peumans et al. [2000b] dahingehend diskutiert, dass das Jacalin durch seine co- und post-translationalen Modifikationen, ausgehend von einem Preproprotein mit Entfernung von Signalsequenzen, am ER gebildet wird und den sekretorischen Pfad beschreitet. KM+ und Calsepa hingegen werden nicht als Preproprotein synthetisiert, nicht modifiziert und sollen daher auch den sekretorischen Pfad nicht durchlaufen.

Im Verlauf der Evolution soll Jacalin möglicherweise dadurch entstanden sein, dass einem Vorläuferprotein von KM+ eine Signalsequenz vorgeschaltet wurde [Peumans et al., 2000b]. Für die Lektine saT und BanLec liegen bislang keine Lokalisationsstudien vor, wobei aber angenommen wird, dass sie aufgrund einer nicht zu identifizierenden Signalsequenz zytoplasmatisch lokalisiert sind [Zhang et al., 2000].

Ausgehend von der Beobachtung von Menhaj [1998], dass Horcolin und HL#2 in unterschiedlichen Mengen in der intrazellulären Waschflüssigkeit (IWF) nachzuweisen sind, wurde die zelluläre Lokalisation mit Hilfe der Elektronenmikroskopie näher

untersucht. Für die Studien wurde zum einen der Anti-HL#2-Antikörper, der HL#2 und Horcolin erkennt, sowie der Peptidantikörper eingesetzt, der nur HL#2 erkennt. Neben dieser Möglichkeit zur Unterscheidung von HL#2 und Horcolin wurde auch der Nachweis in verschiedenen Geweben verwendet. In Blättern ist kein Horcolin zu finden, in etiolierten Koleoptilen zu einem frühen Zeitpunkt kein HL#2, wohl aber Horcolin. Nach Belichtung sind dort beide Proteine nach kurzer Zeit nachzuweisen. Zur Kontrolle der Antikörperspezifität wurde mit einem Gesamtproteinextrakt eine Westernblot-Analyse durchgeführt. Unter den gewählten Bedingungen zeigten sich keine Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen.

Durch die Kombinationsmöglichkeiten von Antikörper und Gewebe konnte auf Basis der EM-Bilder nachgewiesen werden, dass beide Proteine im Apoplasten lokalisiert sind. Ergrünte Blätter zeigen mit beiden Antikörpern ein deutliches Signal in der Zellwand. In etiolierten Koleoptilen zeigte der Peptidantikörper keine Markierung, wohl aber der das Horcolin erkennende Anti-HL#2-Antikörper. In unter Licht gewachsenen Koleoptilen zeigten beide Antikörper eine Reaktion. Zusammen mit den IWF-Versuchen von Menhaj [1998] unterstützen die EM-Aufnahmen die Annahme der apoplastidären Lokalisation von HL#2 und Horcolin.

Aufgrund dieser Ergebnisse stellt sich die Frage, über welchen Mechanismus die Proteine in den Apoplasten gelangen.

Für die Sortierung und den Transport von Proteinen über Membranen werden normalerweise spezielle Signalsequenzen verwendet, die sich N- oder C-terminal und manchmal auch intern lokalisiert befinden [Vitale et al., 1993]. Bei diesen handelt es sich entweder um Peptide, Aminosäure-Motive oder Oligosaccharid-Motive auf Proteinen. Proteine, die für die Synthese am ER vorgesehen sind, enthalten fast immer am N-terminus ein Signalpeptid, das von bestimmten Signalerkennungspartikeln (SRP; Ribonukleoproteine) erkannt wird und den Kontakt zwischen Ribosom und ER vermittelt [Buchanan et al., 2000], wobei hierdurch das rauhe ER gebildet wird. Solche Signalpeptide bestehen oft aus ein oder mehreren positiv geladenen Aminosäuren, gefolgt von 6 bis 12 hydrophoben Aminosäuren [von Heijne, 1990; Denecke et al., 1992].

Je nach Bestimmungsort können die Proteine auch mehr als eine Signalsequenz enthalten. Melchers et al. [1993] konnten zeigen, dass das Protein AP24, eine basische Chitinase und eine basische  $\beta$ -1,3-Glucanase jeweils mit einer C-terminalen Sequenz ausgestattet sind. Diese Sequenz ist für die Lokalisation in der Vakuole notwendig. Ohne dieses Peptid werden die Proteine aus dem ER in den Apoplasten sekretiert [Paris and Rogers, 1996]. Dieser Sachverhalt konnte auch für ein vakuoläres Gerstenlektin bewiesen werden [Bednarek and Raikhel, 1991].

Für Proteine, die im ER verbleiben sollen, werden die Retentionssequenzen KDEL und HDEL beschrieben. Wenn diese Sequenzen fehlen, erfolgt ebenfalls eine Sekretion in den Apoplasten [Townsend et al., 1994; Frigerio et al., 1999].

Enthalten Proteine nur eine N-terminale Signalsequenz, so werden sie über den sekretorischen Pfad sekretiert, der das ER und das Trans-Golgi-Netzwerk einschließt. Für alle anderen Lokalisationen scheinen zusätzliche Signalsequenzen notwendig zu sein [Hadlington and Denecke, 2000; Gomord and Faye, 1996].

Der Transport von Proteinen über das ER und den Golgi-Apparat zu ihrem Bestimmungsort verläuft über Vesikel, die bei Erreichen ihres Bestimmungsortes mit den jeweiligen Membranen verschmelzen und dadurch die transportierten Proteine nach außen abgeben. Neuere Daten haben gezeigt, dass es hierbei unterschiedliche Wege zu geben scheint. So kann der Golgi-Apparat auch umgangen und Protein-vesikel können direkt aus dem ER gebildet werden. Diese erscheinen im EM-Bild aufgrund ihres hohen Proteingehaltes als elektronendichtere Vesikel. Ein Zusammenhang zwischen ihrem Transport und dem Actin-System wird hierbei diskutiert [Boevink et al., 1998; Buchanan et al., 2000].

Untersuchungen der Proteinsequenzen von Horcolin und HL#2 mit dem Programm PSORT, das der Identifizierung von bekannten Signalsequenzen dient, ergaben keine eindeutigen Hinweise auf ER-spezifische Signalpeptide. Das Programm PSORT vergleicht hierbei unterschiedliche Parameter (das System „Pflanze“ wird ausdrücklich, vermutlich aber unzureichend berücksichtigt), die Hinweise auf die Lokalisation geben können. Die Auswertung erfolgt anhand von Wahrscheinlichkeitswerten für den jeweiligen Ort. Je dichter der Wert an 1,0 liegt, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit für den angegebenen Lokalisationsort.

Für Horcolin und HL#2 werden als möglicher Lokalisationsort Microbodies (Peroxisomen) mit einem Wert von 0,64 und das Zytoplasma mit 0,45 angegeben. Für Horcolin wurden die Sequenzen vor dem ersten Methionin in verschiedenen Leserastern translatiert, N-terminal vor die Sequenz gehängt und mit PSORT untersucht. Interessanterweise zeigt sich bei dem Peptid HSSRPIHLLLWVDLAKREPK eine andere Lokalisation, da jetzt das ER mit 0,55 und die Microbodies mit nur noch 0,32 berechnet werden. Das verwendete Peptid befindet sich in einem anderen Leseraster als die Horcolin-Sequenz. Dieser Umstand könnte sich durch einen Sequenzierungsfehler erklären lassen. Dieser Sachverhalt bedarf weiterer Klärung, besonderes deshalb, weil es den vesikulären Transport des Horcolin erklären könnte. Es stellt sich auch die Frage, ob die C-terminale Sequenz „ETSLAS“ vom HL#2, die bei den anderen Lektinen (vgl. Abb. 4.3) nicht vorhanden ist, im Zusammenhang mit der apoplastidären Lokalisation des Proteins steht.

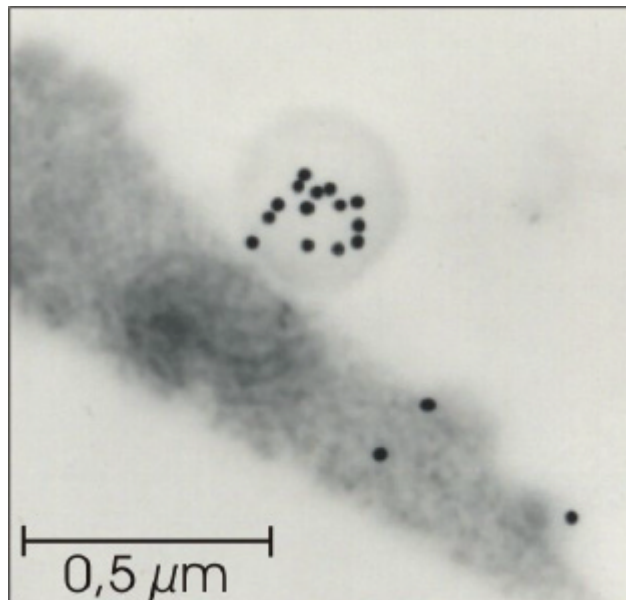
Zum Vergleich mit weiteren Lektinen wurden die Sequenzen von salT, BanLec und Heltuba ebenfalls berechnet. Das Ergebnis war nahezu identisch mit dem für HL#2 und Horcolin erhaltenen.

salT	0,54	Microbodies (Peroxisomen)
	0,45	Zytoplasma
BanLec	0,64	Microbodies (Peroxisomen)
	0,45	Zytoplasma
Heltuba	0,64	Microbodies (Peroxisomen)
	0,45	Zytoplasma
	0,26	Chloroplastenmembran

Für das Lektin KM+ wurde für Microbodies (Peroxisomen) ein Wert von 0,75 berechnet, eine zytoplasmatische Lokalisation wird nicht angegeben. Jacalin soll mit einem Wert von 0,62 im Apoplasten vorkommen. Es wird ein Vorkommen in der

Vakuole mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,44 sowie in Microbodies mit 0,19 angenommen. Dass diese Ergebnisse vorsichtig betrachtet werden müssen, zeigt sich am Beispiel des Jacalin. Peumans et al. [2000b] weisen es in der Vakuole nach, das Programm PSORT zeigt ein Vorkommen im Apoplasten an. Auch wenn dies je nach Standpunkt des Betrachters eine identische Lokalisation sein mag, zeigt sich dennoch, dass noch viele Punkte im Bereich des pflanzlichen Proteintransportes ungeklärt sind. Einen klaren und überzeugenden Beleg für die Art und Weise des Transportes von Horcolin oder HL#2 ergibt die Auswertung der EM-Aufnahmen. Neben der deutlich sichtbaren Markierung im Bereich der Zellwand können vereinzelt Ansammlungen von markierten Proteinen innerhalb des Zytoplasmas in Nähe der Membranen gefunden werden, wie in Abb. 3.37 und Abb. 3.38 zu erkennen ist.

Wie in Abb. 4.5 gezeigt, liegen die Proteine hier relativ dichtgedrängt innerhalb eines elektronendichteren Bereiches vor, der eine Art Vesikel darstellt. Diese Strukturen konnten auf verschiedenen EM-Aufnahmen gefunden werden, was gegen einen Präparationsartefakt spricht.



**Abb. 4.5: Vesikulärer Transport von Horcolin / HL#2**

Vergrößerung eines Teils der Abb. 3.37 zur Verdeutlichung eines möglichen Mechanismus für den Export in den Apoplasten für Horcolin und HL#2. Immunogold markierte Proteine liegen dicht gedrängt in einem möglichen Vesikel von 0,3 µm vor.

Obwohl keine eindeutigen Signalpeptide bei HL#2 und Horcolin identifiziert werden konnten, liegt die Vermutung nahe, dass sie über Vesikel transportiert werden. Inwieweit es sich hierbei um mögliche Peroxisomen-verwandte Strukturen handelt, muss noch untersucht werden. Möglicherweise liegt auch ein rezeptorvermittelter Transport vor, für den ER-Signalsequenzen nicht notwendig wären. In diesem Zusammenhang schlägt Professor W. Peumans (persönliche Mitteilung) die

Möglichkeit vor, dass HL#2 oder Horcolin durch ihre Lektineigenschaft an Zuckerstrukturen der Vesikel binden und so transportiert werden können.

Dass noch viele Details nicht geklärt sind, zeigt auch das Beispiel eines zuckerbindenden Proteins aus der Sojapflanze. Dieses Protein ist in der äußeren Plasmamembran lokalisiert, verfügt aber über keine Signalpeptide und scheint zusätzlich an freien Ribosomen im Zytosol synthetisiert zu werden – der Transport erfolgt über einen bislang unbekanntem Weg [Buchanan et al., 2000].

Diskutiert man die Funktion der Lektine im Zusammenhang mit der Pathogenabwehr [Peumans and van Damme 1995, 1998; Chrispeels and Raikhel, 1991], so scheint es folgerichtig, dass die Pflanze die Lektine in einer Zone plaziert, die zuerst Angriffen von Mikroorganismen ausgesetzt ist. Der Apoplast ist ein solcher Bereich, der wesentlich mehr darstellt als nur eine Zone für den Wassertransport. Hier findet die erste Auseinandersetzung mit der Umwelt statt. Es ist auch denkbar, dass Lektine im Apoplasten helfen können, beschädigte Zellwandbereiche zu stabilisieren. Eine solche Schädigung muss nicht unbedingt durch Mikroorganismen zustande kommen, sondern kann auch durch abiotischen Stress hervorgerufen werden. Es scheint jedoch gesicherte Daten zu geben, dass sich je nach Stresseinwirkung unterschiedliche Proteine im Apoplasten anreichern [Tamas et al., 1997].

#### **4.4. CHARAKTERISIERUNG VON HORCOLIN**

Mit Hilfe der Horcolin-cDNA konnte die Anzahl der Genkopien im Genom der Gerste bestimmt werden. Diesen Ergebnissen zufolge kommt das Horcolin-Gen nur einmal im haploiden Genom vor. Dies steht im Einklang mit den Daten von Menhaj [1998], der für das sequenzverwandte Protein HL#2 ebenfalls nur einen Genlocus identifiziert hat. Für andere Mitglieder der Familie der mannosebindenden Jacalin-verwandten Lektine werden mehrere Banden in der Southernblot-Analyse gefunden, was für ein multiples Vorkommen der Gene im Genom spricht [Peumans et al., 2000a; van Damme et al., 1999].

Mit Hilfe der Sonden für HL#2 und Horcolin sollte es möglich sein zu untersuchen, ob die beiden Proteine auch in anderen Gräsern vorkommen.

Zur weiteren Charakterisierung von HL#2 und Horcolin wurden 2D-Gelelektrophoresen mit einem löslichen Extrakt aus Gerstenkoleoptilen durchgeführt (vgl. Abb. 3.40). In diesem sind sowohl Horcolin als auch HL#2 nachweisbar und können daher gleichzeitig analysiert werden. Die Proteine wurden zuerst in der IEF und anschließend in der SDS-PAGE aufgetrennt. Wie bereits durch die computergestützte Berechnung vorgeschlagen, unterscheiden sich die beiden Proteine nicht nur theoretisch sondern auch praktisch in ihrem pI-Wert. HL#2 liegt im sauren (berechneter pI 5,3) und Horcolin im basischen Bereich (berechnet 7,9).

Die Westernblot-Analyse der 2D-Auftrennung zeigt für Horcolin zwei in die Länge gezogene Bereiche (vgl. Abb. 3.40). Die Ursache hierfür könnte an möglichen Modifizierungen liegen, da in der Horcolin-Sequenz mehrere potentielle Phosphorylierungs- und Glycosylierungsstellen und weitere potentielle Orte für die Modifikation vorliegen.

HL#2 zeigt ebenfalls zwei Flecken, die sich jedoch in ihrem Molekularbereich unterscheiden und durch Degradation des Proteins entstanden sein könnten. Vergleicht man die pI-Werte der anderen Lektine (Heltuba pI 6,8, salT pI 5,0, BanLec pI 6,8 und Calsepa pI 6,7) mit dem von Horcolin, so ist dieses mit einem pI von 7,9 das basischste Protein. Inwieweit es dadurch eine Sonderrolle einnimmt, muss noch geklärt werden. Auf den Zusammenhang zwischen dem pI der Proteine und ihrer Lokalisation im Apoplasten wird im nächsten Abschnitt noch näher eingegangen.

#### 4.5. APOPLAST UND GUTTATIONSFLÜSSIGKEIT

Die Untersuchung der IWF erbrachte erste Hinweise auf die apoplastidäre Lokalisation von HL#2 und Horcolin [Menhaj et al. 1999]. Die IWF wird durch die Inkubation von Blattmaterial mit wässrigen Extraktionspuffern unter Vakuum und dem Herausschleudern dieser aus den Blättern gewonnen. Diese Verfahrensweise könnte mehr oder weniger ausgeprägte Verletzungen der Blätter verursachen.

Es stellte sich die Frage nach einem System, das ohne jegliche mechanische Belastung Aussagen über die löslichen Proteine außerhalb der Zelle zulässt. Ein solches System stellt die Guttation dar, bei der die Pflanze aktiv Flüssigkeit durch ihre Blätter ausscheidet. Die auszuscheidende Flüssigkeit durchquert hierbei auch den apoplastidären Bereich der Zellen und spiegelt der Vorstellung nach hierdurch dessen Zusammensetzung wider. Es stellt sich aber auch die Frage, ob die Guttation und die IWF grundsätzlich auf so einfache Weise miteinander verglichen werden können.

- Guttation als natürlicher Prozess der aktiven Wasserausscheidung
- Gewinnung der IWF durch Ernte, Vakuumfiltration und Zentrifugation

Die erhaltenen Ergebnisse müssen auf jeden Fall vor diesem Hintergrund betrachtet werden. Folgende Überlegungen sollten hierbei berücksichtigt werden.

Bedingt durch die bei der Extraktion angewandten Verfahren könnten in der IWF mehr Proteine vorkommen, als dies der normalen Zusammensetzung im Apoplasten entspricht. Zeigt die Pflanze vielleicht durch die Prozedur hervorgerufene Stressantworten?

Betrachtet man die Guttation als normalen physiologischen Prozess, so müsste dessen Zusammensetzung von der Pflanze definiert sein. Möglich wäre, dass bestimmte Proteine bevorzugt in ihr vorzufinden sind. Weiterhin kann sich die Guttation auch dadurch von der IWF unterscheiden, dass sie nur einen Teil des Blattes durchströmt, der der Wasserausscheidung vornehmlich dient und somit nicht repräsentativ für den gesamten Apoplasten ist.

Für die Untersuchung der Guttationsflüssigkeit von *Hordeum vulgare* wurden die Pflanzen in speziellen Mini-Gewächshäusern angezogen (Abb. 2.1). Bei normaler Anzucht bilden die Pflanzen keine Guttationstropfen aus. Erst wenn die Luftfeuchtigkeit bei nahezu 100 % liegt, tritt der Effekt auf (Abb. 3.41). Welche Größe die Guttationstropfen erreichen können, ist in der Abbildung 4.7 nochmals dargestellt.

Weiterhin tritt pro Blatt mehr als ein Tropfen auf. Die für die Ausscheidung verantwortlichen Hydathoden kommen sowohl an der Blattspitze als auch in den Randbereichen vor.



**Abb. 4.6: Guttierende Pflanzen in Vergrößerung**

Es ist deutlich zu sehen, dass an einem Blatt mehrere Tropfen gebildet werden können. Die Pflanzen wurden in einem Mini-Gewächshaus bei nahezu 100 % Luftfeuchtigkeit angezogen, damit eine Ausscheidung von Guttationsflüssigkeit stattfindet.

Zum Sammeln der Tropfen erwies sich die in Abbildung 2.2 gezeigte Vorrichtung als überaus geeignet.

Durch die Kühlung der Probe mit Eis wurde das Wachstum von Mikroorganismen während der Erntezeit reduziert. Diese können vereinzelt in der Guttationsflüssigkeit vorkommen, was anhand von lichtmikroskopischen Aufnahmen gezeigt werden konnte. Verschiedene Autoren weisen auf endophytisch lebende Bakterien in Gräsern hin, so z.B. in der Gerste [Pohlmann and McColl, 1982], in Weizen [Hecht-Buchholz, 1998] oder dem Reis [Hurek et al., 1997]. Einige dieser Bakterien leben symbiotisch, aber viele auch parasitär als Phytopathogene im Apoplasten [Hecht-Buchholz, 1998]. Um die Untersuchung möglicher Bakterienproteine zu verhindern, wurde die Guttationsflüssigkeit steril filtriert. Dieser Schritt entfernt zwar die Bakterien, führt aber auch zu geringeren Proteinausbeuten, da viele der verwendeten Membranen außerordentlich gut Proteine binden (bis zu 1 g Protein pro 1 g Membrane).

Die Guttationsflüssigkeit wurde nach der Filtration durch Gefriertrocknung oder Ultrafiltration konzentriert. Nach der Zugabe von Probenpuffer wurde die Flüssigkeit entweder im SDS-Gel aufgetrennt oder eine 2D-Gelelektrophorese durchgeführt. In der ersten Dimension wurden die Proteine hierbei in der IEF und in der zweiten in der SDS-PAGE aufgetrennt.

Die SDS-Gele zeigen deutlich, dass eine erhebliche Anzahl verschiedener Proteine in der Guttationsflüssigkeit vorhanden ist (vgl. Abb. 3.44). Diese verteilen sich hauptsächlich im molekularen Bereich von 10 kDa bis 90 kDa (SDS-PAGE). Es scheint, als ob die Pflanze keine Proteine bzw. Proteinuntereinheiten über 90 kDa ausschleust. Um auszuschließen, dass es sich bei den Banden um DNA oder RNA handelt- die ebenfalls

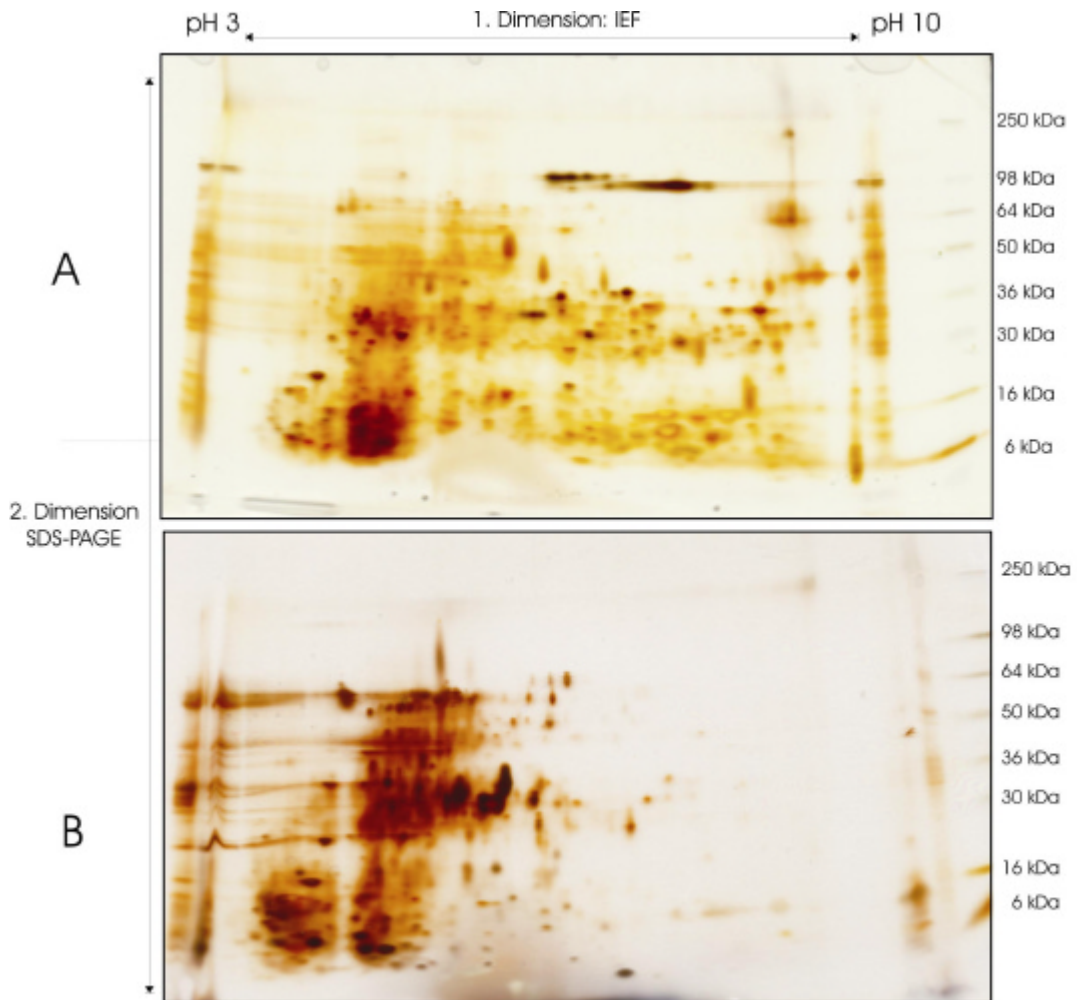
durch Silberfärbung nachgewiesen werden können, wurden Guttationsproben mit DNase und RNase behandelt. Zur Kontrolle wurde eine Proteolyse mit Protein K durchgeführt. Das Vorkommen von Nukleinsäuren außerhalb der Zelle wird von unterschiedlichen Arbeitsgruppen beschrieben. Als Beispiele sollen hier die mRNA für den „SUCROSE TRANSPORTER1“ [Fillion et al., 1999], kleine RNA's für Kosuppression [Hamilton and Baulcombe, 1999] und die mRNA für CmNACP [Ruiz-Medrano et al., 1999] angeführt werden. Laut Mezitt und Lucas [1996] ist das Phloem frei von RNasen, so dass freie RNA für längere Transporte innerhalb dieses Raumes existieren kann. Kontamination mit bakteriellen Nukleinsäuren sind ebenso vorstellbar. Die Ergebnisse des Verdauens zeigen kein Vorkommen von Nukleinsäuren in der Guttationsflüssigkeit. Durch Protein K wurde ein Großteil der Proteine verdaut (vgl. Abb. 3.50). Das Vorkommen von kleineren Mengen an Nukleinsäuren wäre vorstellbar, aber mit den verwendeten Methoden nicht nachweisbar.

Während der Auftrennung der Guttationsproteine in der SDS-PAGE konnte eine gelbe Bande beobachtet werden, die mit den Proteinen im Gel lief (Abb. 3.46). Zur Analyse dieser Bande wurde mit einem Photometer ein Wellenlängenspektrum im Labor von Professor Noam Adir, Technion, Haifa/Israel aufgenommen. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abb. 3.46 dargestellt. Die Substanz zeigt ein Absorptionsmaximum bei ca. 390 nm. Es handelt sich bei der gelben Bande mit größter Wahrscheinlichkeit um einen Vertreter der Flavonoide (persönliche Mitteilung von Professor Yossi Hirschberg, Hebrew University, Jerusalem/Israel).

In der Literatur konnten bis lang keine Hinweise oder Erklärungen für Flavonoide in der Guttationsflüssigkeit gefunden werden. In der Natur kommen mehr als 4500 Flavonoide oder davon abgeleitete Substanzen vor [Buchanan et al., 2000]. Sie haben Funktionen als Pigmente, Tannine oder als Isoflavonoide. Letztere spielen eine Rolle in Signal- und Abwehrprozessen [Stafford, 1997]. Bekannte antimikrobielle Vertreter sind die Coumarine, Furanocoumarine und die Stilbene [Buchanan et al., 2000]. Takahama und Oniki [2000] diskutieren die Flavonoide als Substrate für Peroxidasen, die gebildeten Produkte können aufgrund ihrer toxischen Eigenschaften antimikrobiell wirken. Eine solche fungizide Substanz ist die 3,4- Dihydroxybenzoesäure, die durch die Peroxidase-vermittelte Oxidation des Flavonoids Quercetin gebildet werden soll [Takahama and Hirota, 2000]. Christensen et al. [1998] beschreiben die Expression einer Flavonoid 7-O-Methyltransferase, die als Reaktion auf eine Pathogenattacke induziert wird. Der Nachweis einer solchen Funktion des postulierten Flavonoids müsste noch erbracht werden.

Ein sehr interessantes Bild über den Charakter der Proteine in der Guttationsflüssigkeit ergeben die 2D-Analysen. Wie in Abbildung 4.7 im Vergleich mit gesamtlöslichen Proteinen dargestellt, scheint der überwiegende Teil der Proteine in der Guttationsflüssigkeit einen pI im sauren Bereich zu besitzen.





**Abb. 4.7: Vergleich zwischen Proteinen der Guttationsflüssigkeit und löslichen Proteinen der Koleoptile mittels 2D-Gelen**

Teil A zeigt die in der 2D-Gelelektrophorese aufgetrennten löslichen Proteine der Koleoptile. In Teil B sind die Guttationsproteine gezeigt. Während bei den löslichen Proteinen eine breitere Verteilung vorliegt, scheinen die Guttationsproteine auf den sauren Bereich konzentriert zu sein. Es wurden jeweils 80 µg Protein zuerst in der IEF und anschließend in einem 10 bis 20%igen SDS-Gradientengel aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mit Silber. Als Molekulargewichtsmarker wurden in der zweiten Dimension 5 µL SeeBlue verwendet.

Betrachtet man diese Zone näher, so scheinen kleinere Proteine einen niedrigeren  $pI$  zu besitzen als die höher molekularen. Neben einer starken Ballung im sauren Bereich kommen auch einige basische Proteine vor. Im Vergleich zu den gesamtlöslichen Proteinen ist dies aber nur ein sehr geringer Teil. Auch wenn in der Literatur keine Hinweise zu einer solchen Ballung im sauren Bereich zu finden sind, so stehen die Daten im Einklang mit der Untersuchung verschiedener extrazellulärer Proteine. Parent und Asselin [1984] beschreiben eine Reihe von sauren PR-Proteinen, die nach Infektion mit Mikroorganismen bzw. nach abiotischem Stress in der interzellulären Flüssigkeit gefunden werden können. Nach Infektion von Tabak konnten auch

unterschiedliche basische Proteine im Apoplasten gefunden werden, obwohl diese in wesentlich geringerer Anzahl als die sauren Proteine vorkommen [Hogue and Asselin, 1987].

Für die genauere Untersuchung der Guttationsflüssigkeit wurden einige Banden aus einem Coomassie gefärbten SDS-Gel ausgeschnitten und tryptisch verdaut. Die Fragmente wurden anschließend aus dem Gel eluiert, mit der RP-HPLC aufgetrennt und mit Hilfe der ESI-Massenspektroskopie untersucht. Gefundene Fragmente wurden mit Datenbanken verglichen. Aus der Methode leitet sich ab, dass nur solche Proteine identifiziert werden konnten, die bereits in den Datenbanken vorhanden und folglich bekannt waren. Die in Abbildung 3.48 gezeigten Proteine konnten anhand ihrer Peptidfragmente eindeutig identifiziert werden. Die mit Fragezeichen gekennzeichneten Bereiche enthielten Proteine, die bislang unbekannt sind und nur mit Hilfe anderer Methoden wie der klassischen Edman-Sequenzierung oder durch ESI-Quadropol-MS aufgeklärt werden könnten.

Die erhaltenen Daten konnten durch den Einsatz von Antikörpern gegen die PR-Proteine PR-Q, PR-S und PR-2 (mit freundlicher Genehmigung von Dr. M. Legrand vom CRNS in Frankreich) erweitert bzw. verifiziert werden. Durch die Antikörper kann nur gezeigt werden, dass Proteine mit entsprechendem Epitop vorliegen, eine genaue Identifizierung ist selten möglich. Die Daten sind insoweit verlässlich, als sowohl durch die Antikörper als auch durch die ESI-MS Chitinasen und Glucanasen gefunden werden konnten (vgl. Abb. 3.49). Zusätzlich konnte mit Hilfe der Westernblot-Analyse ein Thaumatin-ähnliches Protein (TLP) identifiziert werden. Da diese Thaumantin-ähnlichen Proteine jedoch in acht Isoformen in der Gerste vorkommen, kann nicht genau gesagt werden, um welches es sich handelt.

Hervorzuheben ist bei der Analyse mit den Antikörpern, dass in der Kontrolle, die aus den gesamtlöslichen Proteinen der Gerste stammt, wenig bis keine Kreuzreaktionen festgestellt werden konnten. Der Grund dafür kann darin zu suchen sein, dass bei gleicher Proteinbeladung der Anteil der PR-Proteine in den Gesamtproteinen sehr gering ist. Das würde dann aber bedeuten, dass in der Guttationsflüssigkeit diese Proteine angereichert vorliegen müssten.

Mit der ESI-MS konnten pflanzliche Peroxidasen, Chitinasen, eine Thiol-Protease, eine Glucanase, eine Arabinoxylan Arabinofuranhydrolase und ein Protein mit unbekannter Funktion („hypothetical protein“) identifiziert werden. Es wurden keine bakteriellen oder sonstigen artfremden Proteine gefunden. Bei einem Großteil der in der Guttationsflüssigkeit gefundenen Proteinen handelt es sich demnach um solche pflanzlichen Ursprungs. Mit Ausnahme des hypothetischen Proteins pBH6-12 und der TLP handelt es sich bei allen anderen um Proteine mit nachgewiesener Enzymaktivität. Allein diese Tatsache deutet auf eine hohe Proteinaktivität in der Guttationsflüssigkeit bzw. der Xylemflüssigkeit und dem Apoplasten hin.

In Tabelle 4-2 sind die Ergebnisse einer PSORT-Analyse dargestellt. Anhand der vollständigen Sequenzen, die mit Hilfe der ID aus der NCBI-Datenbank erhalten werden konnte, wurde jedes Protein einzeln untersucht. Die vom PSORT-Programm gefundene Signalsequenz, die Spaltungsstelle und der vorhergesagte Lokalisationsort zeigen deutlich, dass bis auf eine Peroxidase (CAB99487) alle Proteine ein Signalpeptid besitzen und außerhalb der Zelle vorkommen. Nach dem Entfernen der

Signalsequenz wurden von den Proteinen die pI-Werte berechnet. Bis auf zwei basische Chitinasen zeigten die übrigen Proteine einen pI im sauren Bereich. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der 2D-Gelelektrophorese, die auf eine überwiegend saure Proteinverteilung hinweist.

Accession ID	Name des Proteins	Herkunft	Vorhergesagte Lokalisation		mögl. N-term Signalsequenz	mögliche Spaltungsstelle	mögliche Signalsequenz
			Ort	Wert			
T06204	Hypothetical protein pBH6-12	<i>Hordeum vulgare</i>	outside microbody	0,820 0,269	ja	21	MKISIAAAAVLLLLALA ATASAV
S48848	Chitinase cht2b precursor	<i>Hordeum vulgare</i>	outside microbody	0,820 0,195	ja	21	MARYAALAALLLAVA VGGAAA
S35156	Beta-glucanase	<i>Hordeum vulgare</i>	vacuole outside	0,900 0,820	ja	28	MAKQGVASVLAMAL VLVFLAAFPTGVHS
AAG53610	Endochitinase-antifreeze protein	<i>Secale cereale</i>	outside microbody	0,820 0,178	ja	21	MARFAALAALLLAVA VGGAAA
P27337	PER1_HORVU peroxidase	<i>Hordeum vulgare</i>	outside	0,628	ja	21	MASSSYTSLLVLVAL VTAASA
S48847	Chitinase cht2a precursor	<i>Hordeum vulgare</i>	mito. outer membr. outside	0,850 0,820	ja	25	MARYAALAALLLAVA VGGAAQ
CAB99487	Peroxidase	<i>Hordeum vulgare</i>	cytoplasm	0,450	nein	?	?
AAK21880	Arabinoxylan arabionfuranhydrolase	<i>Hordeum vulgare</i>	outside microbody	0,820 0,282	ja	26	MGSRQVFVPTIACVL LLFCFGCKCIA
2114377B	Peroxidase isotype=RPN	<i>Oryza sativa</i>	outside vacuole	0,820 0,391	ja	32	MEYATRGDRTASCL SFLCNIVLLGLAAAA GS
S22087	Peroxidase precursor	<i>Oryza sativa</i>	outside	0,795	ja	20	MASATNSSLSMLLV AAAMA
P05167	ALEU-HORV thiol protease	<i>Hordeum vulgare</i>	outside	0,820	ja	18	MAHARVLLLALAVLA TAA

**Tabelle 4-2: Lokalisationssequenzen von Guttationsproteinen**

Die Daten wurden mit Hilfe des Programms PSORT (Expasy Server) ermittelt. Hierfür wurden die Proteinsequenzen in ihrer nichtmodifizierten Form eingesetzt, so dass mögliche Signalsequenzen erkannt werden konnten. Je dichter der Wert für die vorhergesagte Lokalisation an 1,0 liegt, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit hierfür.

Die in Tabelle 4-2 gezeigten Signalsequenzen besitzen eine Sequenzlänge von 18 bis 32 Aminosäuren und enthalten relativ viele Alanine und Leucine. Die Aminosäurezusammensetzung der Signalpeptide sowie deren Vorhandensein stimmt mit den Überlegungen verschiedener Autoren zu apoplastidär lokalisierten Proteinen überein. Das einzige Protein ohne eine erkennbare Signalsequenz ist eine Peroxidase (CAB99487). Entweder liegt diese als Kontamination in der Guttationsflüssigkeit vor, oder bei der Klonierung und Sequenzierung wurde die Sequenz wegen eines Frameshifts übersehen. Es kann aber auch diskutiert werden, dass diese Peroxidase

eine unbekannte, vielleicht interne, Signalsequenz besitzt bzw. über einen anderen Weg exportiert wird.

Die Erkenntnis, wonach PR-Proteine extrazellulär lokalisiert sind, ist nicht neu, wobei vor allem Chitinasen, Peroxidasen, Glucanasen und/oder Thaumatin-ähnliche Proteine beschrieben werden [Bauer et al., 1998]. Einige dieser Proteine werden sowohl konstitutiv als auch durch Stress oder Pathogenbefall induziert [Buchanan et al., 2000]. Einige der identifizierten Proteine werden bislang als Pathogen-induziert eingestuft, welches einen weiteren interessanten Aspekt darstellt. Des Weiteren liegen nach gründlicher Recherche in verschiedenen Literaturlieferanten keine Hinweise darüber vor, ob die hier gefundene Zusammensetzung von PR-Proteinen in der Guttationsflüssigkeit bereits beschrieben wurde. Nachfolgend sollen die einzelnen Proteine bzw. Proteinfamilien kurz diskutiert werden. Es sei an dieser Stelle auf die in der Einleitung gegebenen allgemeinen Informationen zu den PR-Proteinen hingewiesen.

Die Zuordnung der Peroxidasen zu den PR-Proteinen wird zur Zeit noch diskutiert, wobei diese Superfamilie von Proteinen weiter unterteilt werden muss, und nur einige Vertreter eine Rolle bei der Pathogenabwehr spielen. Hierbei werden vor allem die sauren extrazellulär vorkommenden Peroxidasen zu den PR-Proteinen gezählt [van Loom et al., 1994]. Ihre Funktion wird unter anderem beim „Oxidative Burst“ gesehen, bei der Stabilisierung von Zellwänden, bei den lokalen hypersensitiven Reaktionen nach Infektion, bei der Neutralisierung oxidativer Stoffe, bei der Bildung antimikrobieller Substanzen sowie bei den Interaktionen mit Bakterien in der Xylemflüssigkeit [Bolwell et al., 1999]. Die in der Guttationsflüssigkeit vorgefundenen Peroxidasen erfüllen sicherlich mehr als nur eine der aufgezählten Funktionen, da unter den identifizierten Proteinen allein vier Peroxidasen waren.

Die PR-2 Familie der Glucanasen wird in drei Klassen aufgeteilt. Die basischen Glucanasen der Klasse I werden überwiegend in den Vakuolen gefunden [Salzer et al., 1997]. Glucanasen der Klasse II, mit u.a. PR-2a, PR-2b und PR-2c (alte Bezeichnung **PR2**, PR-N und PR-O) zeigen einen sauren pI-Wert und werden in den extrazellulären Raum transportiert [MunchGarthoff et al., 1997]. Bei der Klasse III Glucanase, mit PR-Q´ bezeichnet, handelt es sich ebenfalls um ein saures extrazellulär vorkommendes Enzym [Payne et al., 1990].

Die Funktion der Glucanasen wird von verschiedenen Autoren in einem synergistischen Zusammenspiel mit einer weiteren großen Familie von PR-Proteinen diskutiert [Kombrink and Somssich, 1997, Ji and Kuc, 1995]. Bei dieser Familie handelt es sich um Chitin-spaltende Enzyme, die sogenannten Chitinasen. Diese große Gruppe wird ebenfalls in verschiedene Klassen unterteilt. Zu diesen gehören auch die von Legrand et al. 1987 im Tabak beschriebenen PR-Proteine PR-3a und PR-3b (alte Bezeichnung PR-P und **PR-Q**). Auch bei den Chitinasen werden sowohl saure als auch basische Formen gefunden [Kombrink and Somssich, 1997]. Die sauren Isoformen werden als extrazellulär lokalisiert beschrieben [Legrand et al., 1987], während die basischen in den Vakuolen vorkommen sollen [Neuhaus et al., 1991]. In der Guttationsflüssigkeit wurden sowohl saure als auch basische Isoformen identifiziert. Inwieweit das extrazelluläre Vorkommen von basischen Chitinasen in der Guttationsflüssigkeit eine Besonderheit darstellt, muss noch weiter untersucht werden. In der Literatur liegen hierüber kaum Informationen vor.

Wie bereits erwähnt, scheinen Chitinasen und Glucanasen bei der Degradation der Zellwand von Pilzen zusammenzuarbeiten. Bei einigen Pilzen konnte nur in Kombination beider Enzymtypen ein Pilzwachstum inhibiert werden [Mauch et al., 1988]. Die durch die Chitinase und Glucanase freigesetzten Glucan- und Chitinfragmente scheinen eine Wirkung als Elicitor zu zeigen, wobei durch diese weitere pflanzeigene Abwehrprogramme induziert werden [Boller, 1988; Mauch et al., 1988]. Eine weitere Gruppe von PR-Proteinen bilden die Thaumatin-ähnlichen Proteine, welche die PR-5 Familie bilden (früher auch als **PR-S** und PR-R bezeichnet) [Kombrink and Somssich, 1997]. Eines dieser Proteine konnte im Westernblot in der Guttationsflüssigkeit nachgewiesen werden. Um welches es sich hierbei jedoch handelt, kann anhand des Antikörpers nicht genau bestimmt werden, da es von diesem Protein acht Isoformen in der Gerste gibt. Für einige der PR-S Proteine wurde nach erfolgter Infektion mit Bakterien oder Pilzen eine extrazelluläre Lokalisation nachgewiesen [Stintzi et al., 1993]. Auch bei den Thaumatin-ähnlichen Proteinen wurden fungizide Eigenschaften gefunden, wobei hier ebenfalls ein synergistischer Effekt zwischen Chitinasen und Glucanasen vermutet wird, zumal einige der Thaumatin-ähnlichen Proteine an  $\beta$ -1,3-Glucane binden können [Hejgaard et al., 1991; Hu and Reddy, 1997; Koiwa et al., 1997; Stintzi et al., 1993].

Die Funktion der gefundenen Thiolprotease bleibt unklar. Das extrazelluläre Vorkommen dieses Proteins wird durch die PSORT-Analyse untermauert. Ein Vertreter dieser Gruppe ist eindeutig durch Salz- und Trockenstress sowie durch Methyljasmonatbehandlung induzierbar. Die Gruppe scheint innerhalb des Pflanzenreichs diverse proteolytische Funktionen zu besitzen [Forsthoeffel et al., 1998]. Zusammenhänge mit Seneszenzprozessen werden ebenfalls diskutiert [Granell et al., 1998].

Die in der Guttationsflüssigkeit gefundene Arabinoxylan-Arabinofuranhydrolase (AXAH) ist ein klassisches Enzym der Gerstenzellwand. Sie verfügt im Einklang damit auch über ein Signalpeptid für die Sekretion [Ferre et al., 2000; Sakurai and Masuda, 1978]. Dieses Enzym spielt vor allem bei Um- und Aufbauvorgängen in der Zellwand eine Rolle, wie sie z.B. bei Wachstumsvorgängen von Bedeutung sind. Da die Guttationsflüssigkeit von jungen sich entwickelnden Pflanzen geerntet wurde, scheint das Vorkommen von zellwandmodifizierenden Enzymen wie der AXAH durchaus verständlich. Zur Funktion des hypothetischen Proteins pBH6-12 gibt es keine Hinweise in der Literatur. Recherchen über die Arbeitsgruppe um D. B. Collinge aus Schweden, die dieses Protein entdeckt haben, haben ergeben, dass sich diese Gruppe u.a. mit PR-Proteinen beschäftigt. Hauptsächlich mit solchen, die nach Pathogenbefall induziert werden [Christensen et al., 1998; Collinge et al., 1993; Rasmussen et al., 1992]. Eigene Nachforschungen in den NCBI-Datenbanken mit der Sequenz vom pBH6-12 zeigen Ähnlichkeiten zu BTH-induzierten Proteinen aus dem Weizen (WCI-5, ID: T06278) sowie zu einem Protein aus Tabak. Dieses Protein, als NtPRp27 (ID: BAA81904) bezeichnet, wird von Tabakkulturen ins Medium sekretiert und wird im Zusammenhang mit PR-Proteinen diskutiert [Okushima et al., 2000]. Interessant hierbei ist, dass die Chemikalie BHT u.a. beim Weizen eine systemische Resistenz gegenüber Pathogenen induziert [Kogel et al., 1994; Willmann and Fakoussa, 1997]. Ein hierdurch induziertes Protein / Gen ist das WCI-5 (wheat chemical induced), welches neben dem BTH auch durch Virusinfektion, Trockenstress und mechanischer

Verwundung induziert wird - es fällt damit unter die Definition der PR-Proteine [Friedrich et al., 1996; Grolach et al., 1996; Siegrist et al., 1997; Wendehenne et al., 1998]. Das pBH6-12 kann also ein weiteres PR-Protein sein, das seine Funktion in der Guttationsflüssigkeit ausübt. In diesen Zusammenhang sei erwähnt, dass das HL#2 gewisse Homologien zum BTH-induzierten Protein WCI-1 zeigt. Ein weiterer möglicher Hinweis auf die Funktion von HL#2 und Horcolin.

Die gefundenen PR-Proteine in der Guttationsflüssigkeit scheinen eine Rolle bei der Abwehr von Bakterien und Pilzen zu spielen. Viele der bereits identifizierten PR-Proteine besitzen einen sauren pI-Wert und verfügen über eine Signalsequenz für die Sekretion [Kombrink and Somssich, 1997]. Diese Erkenntnis spiegelt sich auch in den gefundenen PR-Proteinen sowie in der 2D-Gelelektrophorese wieder. Diese zeigen, dass in der Guttationsflüssigkeit bestimmte Proteine bevorzugt vorkommen.

Bedenkt man, dass die Guttationsflüssigkeit durch den Apoplasten und die Xylemgefäße durchfließt und dann durch die Hydathoden nach außen gelangt, so können Mikroorganismen den umgekehrten Weg wählen, um die Pflanze zu infizieren. Ein wässriges System wie die Guttationsflüssigkeit stellt für mit Flagellen ausgestattete Bakterien ein bevorzugtes Medium dar. Es ist daher vorstellbar, dass die Pflanze diesen Bereich zur Abwehr präventiv mit PR-Proteinen ausstattet. Im Apoplasten würden PR-Proteine sozusagen an „vorderster Front“ platziert sein und wären dadurch dort, wo zuerst eine Auseinandersetzung mit den Pathogenen stattfindet.

Die detektierten PR-Proteine scheinen in ihrer Zusammenstellung einen synergistischen Effekt bei der Bekämpfung von Pathogenen zu besitzen, der potentiellen Infektionen vorbeugen könnte. Der synergistische Effekt könnte durch das Zusammenwirken von zwei, drei oder mehreren PR-Proteinen hervorgerufen werden, wobei jedes für sich allein möglicherweise nur eine geringe Aktivität gegenüber den Pathogenen aufweist, die Proteine im Ensemble aber sehr effektiv gegen Pathogene wirken. Die angestellten Vermutungen könnten in transgenen Pflanzen getestet werden, die mehr als nur ein PR-Protein exprimieren.

#### 4.6. FUNKTION VON HORCOLIN UND HL#2

Das Puzzle, dessen Teile ein Bild der Funktion von HL#2 und Horcolin ergeben, ist sicherlich noch nicht vollständig. Weitere Teile müssen dem Funktionspuzzle hinzugefügt werden, angeregt durch die bereits vorliegenden Daten können aber gezielt neue Teile gesucht und eingefügt werden.

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit sowie durch die Daten von Pötter et al. [1994], Menhaj et al. [1999] und Mishra et al. [eingereicht] zeichnet sich jedoch aus den Einzelteilen ein Bild ab.

HL#2 und Horcolin stellen neue Mitglieder der Familie der Jacalin-verwandten mannosebindenden Lektine dar. Horcolin scheint in der Familie der Lektine zu einem derjenigen Proteine zu gehören, die ein breites Bindungsspektrum aufweisen. Bedingt durch die Unterschiede in der Zuckerbindungsstelle scheinen sich Horcolin und HL#2 jedenfalls in ihren Affinitäten zu Zuckern voneinander zu unterscheiden. Während das Horcolin sehr aktiv zu sein scheint, bindet das HL#2 eher an polymere Zuckerstrukturen.

Die Übereinstimmungen von Horcolin und HL#2 mit den anderen Jacalin-verwandten Lektinen bestehen sowohl in der Fähigkeit an Zucker zu binden als auch auf der Ebene der Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur. Die Daten der Tertiärstruktur unterstützen dies nicht nur, sondern zeigen zusätzlich eine Strukturverwandtschaft zu dem Protein VMO-I und dem CryIA auf. Beide Proteine zeigen eine Funktion als Toxin oder spielen eine Rolle bei der Abwehr von Pathogenen.

Die Sequenzhomologie und ihr Verhalten auf Hochlicht und Jasmonatbehandlung lassen vermuten, dass HL#2 und Horcolin bei den Reaktionen auf Stress eine Rolle spielen. Ihre Lokalisation im Apoplasten lässt es möglich erscheinen, dass sie wie viele der extrazellulär lokalisierten PR-Proteine eine Funktion im Zusammenhang mit der Interaktion von Pflanze und Pathogen besitzen. Eine Rolle bei der Abwehr ist denkbar. Ebenso könnten sie bei der Stabilisierung und dem Aufbau von bestimmten Zellwandstrukturen eine Funktion haben, die zum Schutz der Pflanze oder aber auch für entwicklungsbedingte Prozesse gebraucht werden. Hierbei könnten die Lektineigenschaften von HL#2 und Horcolin in der Art und Weise zu Tage treten, dass sie verschiedene Elemente der Zellwand quervernetzen und dadurch stabilisieren.

Inwieweit die Vermutung von Professor W. Peumans (persönliche Mitteilung) zutreffen könnte, wonach die Gruppe der Lektine um das salT eine Funktion im Zusammenhang mit der Signaltransduktion haben, muss noch geklärt werden. Denkbar wäre eine solche sicherlich, wenn man ein Lektin als Bindeglied zwischen einem Protein und einem glykosylierten Molekül (Glykoprotein, Polysaccharid oder Glykolipid) betrachtet. Damit verbunden sein könnte eine Funktion als eine Art „löslicher Rezeptor“, der nach Kontakt mit seinem Liganden weitere Signaltransduktionsketten auslöst, dies kann vielleicht über die Quervernetzung von Oberflächenstrukturen an Membranen erreicht werden. Bedingt durch die extrazelluläre Lokalisation von HL#2 und Horcolin sind hier die äußeren Bereiche der Membran des Plasmalemmas als ein Ort möglicher

Interaktion darzustellen. Das Plasmalemma trennt das Zytosol vom Apoplasten ab, eine Kommunikation zwischen der Zelle mit der Außenwelt muss also zwangsläufig über diese Membran ablaufen.

Einen weiteren Hinweis auf mögliche Funktionen von HL#2 und Horcolin geben auch die Ergebnisse der Datenbanksuchen. Die überwiegende Anzahl der zu HL#2 und Horcolin verwandten Nukleotidsequenzen bzw. Proteine stammen entweder von Lektinen, JIPS und / oder aus gestressten Pflanzen. Neben Salz-, Trocken- und Kältestress scheint auch Lichtstress ein inducer für diese Proteine / Gene zu sein. Den Lektinen, vor allem den zytoplasmatisch oder extrazellulär lokalisierten, sollte diesen Überlegungen nach eine stärkere Bedeutung bei der Antwort auf Umweltreize beigemessen werden.

Die genauen Funktionen von HL#2 und Horcolin müssen durch weitere Experimente geklärt werden. Es ist denkbar, dass sie möglicherweise mehr als nur eine Funktion besitzen.



## 5. LITERATURVERZEICHNIS

- Adamska, I., Ohad, I. and Kloppstech, K. (1992)** Synthesis of the Early Light-Inducible Protein is controlled by blue light and related to light stress. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 2610-2613.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990)** Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215, 403-410.
- Ayoub A., Roques D., Cavada B.S., Oliveira J.T.A., Moreira R.A. and Rougé P. (1993)** The carbohydrate-specificity of three lectins from the tribe Diocleae: *Canavaliabrasiliensis*, *Cratylia floribunda* and *Dioclea gran-diflora*, p. 51-57. In J Basu, M Kundu, P Chakrabarti (eds), *Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, Vol 9, Wiley Eastern Ltd, India.
- Bauer, M., Libantova, J., Moravcikova, J. and Bekesiova, I. (1998)** Transgenic tobacco plants constitutively expressing acidic chitinase from cucumber. *Biologia* 53, 749-758.
- Bednarek, S.Y. and Raikhel, N.V. (1991)** The barley lectin carboxyl-terminal propeptide is a vacuolar protein sorting determinant in plants. *Plant Cell* 3, 1195-1206.
- Bergey, D.R. and Ryan, C.A. (1999)** Wound- and systemin-inducible calmodulin gene expression in tomato leaves. *Plant Molecular Biology* 40, 815-823.
- Berkelman, T. and Stenstedt, T. (1998)** 2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients: Principles and Methods. Amersham Pharmacia Biotech Inc.
- Berna, A. and Bernier, F. (1999)** Regulation by biotic and abiotic stress of a wheat germin gene encoding oxalate oxidase, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing enzyme. *Plant Molecular Biology* 39, 539-549.
- Bernatzky R. and Tanksley S.D. (1986)** Methods for detection of single or lox copy sequences in tomato on southern blots. *Plant Mol. Biol. Rep.* 4, 37-41
- Biles C. and Abeles F.B. (1991)** Xylem sap proteins. *Plant Physiology* 96, 597-601.
- Bio-Rad, Criterion-System**, <http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/>
- Bio-Rad, Hydroxyapatit**, [http://www.bio-rad.com/webmaster/pdfs/9099\\_HTP.pdf](http://www.bio-rad.com/webmaster/pdfs/9099_HTP.pdf)
- Bio-Rad, Protein-Assay**, [http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin\\_9004.pdf](http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_9004.pdf)
- Bio-Rad, Transfer-Apparatur**, <http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/>
- Bjellqvist, B., Righetti, P.G., Gianazza, E., Görg, A., Westermeier, R. and Postel, W. (1982)** Isoelectric focussing in immobilized pH gradients: principle, methodology, and some applications. *J. Biochem. Biophys. Methods* 6, 317-339.
- Blum, H., Beier, H. and Gross, H.J. (1987)** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.
- Boevink, P., Oparka K., Cruz S.S., Martin B., Betteridge A. and Hawes C. (1998)** Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant J.* 15, 441-447.
- Bollag D.M., Rozycki M.D. and Edelstein S.J. (1996)** *Protein Methods*. Second Edition, Wiley-Lies, Yew York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.

- Boller, T. (1988)** Ethylene and the regulation of antifungal hydrolases in plants. In: Mifflin BJ (ed) Oxford surveys of plant molecular and cell biology. Vol 5., Oxford University Press, Oxford 145-174
- Bolwell, G.P., Blee, K.A., Butt, V.S., Davies, D.R., Gardner, S.L., Gerrish, C., Minibayeva, F., Rowntree, E.G. and Wojtaszek, P. (1999)** Recent advances in understanding the origin of the apoplastic oxidative burst in plant cells. Free Radical Research 31, S137-S145.
- Bourne, Y., Zamboni, V., Barre, A., Peumans, W.J., van Damme, E.J. and Rouge, P. (1999)** Helianthus tuberosus lectin reveals a widespread scaffold for mannose-binding lectins. Structure. Fold. Des. 7, 1473-1482.
- Bradford, M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
- Brown, J.W.S. and Simpson G.C. (1998)** Splice site selection in plants pre-mRNA splicing. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49, 77-95
- Buchanan, B.B., Gruissem, W. and Russel, L.J. (editors) (2000)** Biochemistry and molecular biology of plants. Third impression, Courier Company Inc. USA.
- Chang, P.F.L., Xu, Y., Narasimhan, M.L., Cheah, K.T., Durzo, M.P., Damsz, B., Kononowicz, A. K., Abad, L., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A. (1997)** Induction of pathogen resistance and pathogenesis-related genes in tobacco by a heat-stable Trichoderma mycelial extract and plant signal messengers. Physiologia Plantarum 100, 341-352.
- Chen, X.J., Lee, M.K. and Dean, D.H. (1993)** Site-directed mutations in a highly conserved region of Bacillus thuringiensis delta-endotoxin affect inhibition of short circuit current across Bombyx mori midguts. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 9041-9045.
- Chisholm, S.T., Mahajan, S.K., Whitham, S.A., Yamamoto, M.L. and Carrington, J.C. (2000)** Cloning of the Arabidopsis RTM1 gene, which controls restriction of long-distance movement of tobacco etch virus. Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 97, 489-494.
- Chothia, C. and Murzin, A.G. (1993)** New folds for all-beta proteins. Structure 1, 217-222.
- Chrispeels, M.J. and Raikhel, N.V. (1991)** Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. Plant Cell 3, 1-9.
- Christensen, A.B., Gregersen, P.L., Olsen, C.E. and Collinge, D.B. (1998)** A flavonoid 7-O-methyltransferase is expressed in barley leaves in response to pathogen attack. Plant Molecular Biology 36, 219-227.
- Churin, Y., Schilling, S. and Borner, T. (1999)** A gene family encoding glutathione peroxidase homologues in Hordeum vulgare (barley). Febs Letters 459, 33-38.
- Claes B., Dekeyser R., Villarroel R., van den Bulcke M., Bauw G, van Montagu M. and Caplan A. (1990)** Characterisation of a rice gene showing organ-specific expression in response to salt stress and drought. Plant Cell (1):19-27.
- Cline, J., Braman, J.C. and Hogrefe, H.H. (1996)** PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. Nucleic Acids Res. 24, 3546-3551.

- Collinge, D.B., Kragh, K.M., Mikkelsen, J.D., Nielsen, K.K., Rasmussen, U. and Vad, K. (1993)** Plant chitinases. *Plant J.* 3, 31-40.
- Cordewell, S.J., Nouwens, A.S., Verrills, N.M., Basseal, D.J. and Walsh, B.J. (2000)** Subproteomics based upon protein cellular location and relative solubilities in conjunction with composite two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 21, 1094-1103.
- de Pater, B.S. and Schilperoort, R.A. (1992)** Structure and expression of a root-specific rice gene. *Plant Mol. Biol.* 18, 161-164.
- Denecke J., De Rycke R. and Botterman J. (1992)** Plant and mammalian sorting signals for protein retention in the endoplasmic reticulum contain a conserved epitope. *EMBO J.*, 11, 2345-2355.
- Deutscher P.M. (editor) (1990)** Guide to Protein Purification. Methods in Enzymology, Volume 182, Academic Press.
- Domon, C. and Steinmetz, A. (1994)** Exon shuffling in anther-specific genes from sunflower. *Mol. Gen. Genet.* 244, 312-317.
- Duden Lexikon (1989)** Das neue Duden Lexikon. Band 9 Schy-Tsav. Brockhaus AG, Mannheim, Germany.
- Dunn, S.D. (1986)** Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western blots by monoclonal antibodies. *Anal. Biochem.* 157, 144-153.
- Edman, P. (1950)** Method for the determination of amino acid sequences in peptides. *Acta. Chem. Scand.* 4, 283-293.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. and von Heinje, G. (2000)** Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* 300, 1005-1016.
- Ferre, H., Broberg, A., Duus, J.E. and Thomsen, K.K. (2000)** A novel type of arabinoxylan arabinofuranohydrolase isolated from germinated barley. *Eur. J. Biochem.* 267, 6633-6641.
- Fillion, L., Ageorges, A., Picaud, S., Coutos-Thevenot, P., Lemoine, R., Romieu, C. and Delrot, S. (1999)** Cloning and expression of a hexose transporter gene expressed during the ripening of grape berry. *Plant Physiol.* 120, 1083-1094.
- Forster, B.P., Russell, J.R., Ellis, R.P., Handley, L.L., Robinson, D., Hackett, C.A., Nevo, E., Waugh, R., Gordon, D.C., Keith, R. and Powell, W. (1997)** Locating genotypes and genes for abiotic stress tolerance in barley: a strategy using maps, markers and the wild species. *New Phytologist* 137, 141-147.
- Forsthoefel, N.R., Cushman, M.A.F., Ostrem, J.A. and Cushman, J.C. (1998)** Induction of a cysteine protease cDNA from *Mesembryanthemum crystallinum* leaves by environmental stress and plant growth regulators. *Plant Science* 136, 195-206.
- Friedrich, L., Lawton, K., Ruess, W., Masner, P., Specker, N., Rella, M.G., Meier, B., Dincher, S., Staub, T., Uknes, S., Metraux, J. P., Kessmann, H. and Ryals, J. (1996)** A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant Journal* 10, 61-70.

- Frigerio, L., Pastres A., Prada, A. and Vitale, A (1999)** KDEL acts before the Golgi-mediated formation of complex asparagine-linked glycans. Abstract 969 of the Annual Meeting of the American Society of Plant Physiologists, Baltimore, Maryland, USA.
- Garcia, A.B., Engler, J.D., Claes, B., Villarroel, R., van Montagu, M., Gerats, T. and Caplan, A. (1998)** The expression of the salt-responsive gene *salT* from rice is regulated by hormonal and developmental cues. *Planta* 207, 172-180.
- Garcia-Casado, C., Collada, C., Allona, I., Soto, A., Casado, R., Rodriguez-Cerezo, E., Gomez, L. and Aragoncillo, C. (2000)** Characterization of an apoplastic basic thaumatin-like protein from recalcitrant chestnut seeds. *Physiologia Plantarum* 110, 172-180.
- Geckeler, K.E. and Eckstein, H. (1987)** Analytische und präparative Labor-methoden. Braunschweig, Wiesbaden, Vieweg.
- Geshi, N. and Brandt, A. (1998)** Two jasmonate-inducible myrosinase-binding proteins from *Brassica napus* L. seedlings with homology to jacalin. *Planta* 204, 295-304.
- Gomord, V. and Faye, L. (1996)** Signals and mechanisms involved in intracellular transport of secreted proteins in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 34, 165-181.
- Görg, A., Postel, W. and Günther, S. (1988)** The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9, 531-546.
- Görg, A., Postel, W., Weser, J., Günther, S., Strahler, J.R., Hanash, S.M. and Somerloz, L. (1987)** Elimination of point streaking on silver stained two-dimensional gels by addition of iodacetamid to the equilibration buffer. *Electrophoresis* 8, 122-124.
- Gorlach, J., Volrath, S., KnaufBeiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K. H., Oostendorp, M., Staub, T., Ward, E., Kessmann, H. and Ryals, J. (1996)** Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8, 629-643.
- Granell A., Cerco´ M. and Carbonell J. (1998)** Plant cysteine proteinases in germination and senescence. In AJ Barret, ND Rawlings, JF Woessner, eds, *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, London, pp 578–583.
- Grover, A., Pareek, A., Singla, S.L., Minhas, D., Katiyar, S., Ghawana, S., Dubey, H., Agarwal, M., Rao, G.U., Rathee, J. and Grover, A. (1998)** Engineering crops for tolerance against abiotic stresses through gene manipulation. *Current Science* 75, 689-696.
- Hadlington, J.L. and Denecke, J. (2000)** Sorting of soluble proteins in the secretory pathway of plants. *Current Opinion in Plant Biology* 3, 461-468.
- Hamilton, A.J. and Baulcombe, D.C. (1999)** A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950-952.
- Hause, B., Voros, K., Kogel, K.H., Besser, K. and Wasternack, C. (1999)** A jasmonate-responsive lipoxygenase of barley leaves is induced by plant activators but not by pathogens. *Journal of Plant Physiology* 154, 459-462.
- Hecht-Buchholz, C. (1998)** The Apoplast-habitat of endophytic dinitrogen-fixing bacteria and their significance for nitrogen nutrition of nonleguminous plant. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 161, 509-520.

- Hejgaard, J., Jacobsen, S. and Svendsen, I. (1991)** Two antifungal thaumatin-like proteins from barley grain. *FEBS Lett.* 291, 127-131.
- Herouart D., Van Montagu M. and Inze D. (1993)** Redox-activated expression of the cytosolic copper/zinc superoxide dismutase gene in *Nicotiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(7), 3108-12.
- Hilder, V.A. and Boulter, D. (1995)** Expression of snowdrop lectin in transgenic tobacco plants results in added protection against aphids. *Transgenic Res.* 4, 18-25.
- Hirano, K., Teraoka, T., Yamanaka, H., Harashima, A., Kunisaki, A., Takahashi, H. and Hosokawa, D. (2000)** Novel mannose-binding rice lectin composed of some isolectins and its relation to a stress-inducible salT gene. *Plant and Cell Physiology* 41, 258-267.
- Hoffmann, P. (1987)** Photosynthese. WTB, Bd. 158, Akademie-Verlag, Berlin.
- Hogue, R. and Asselin, A. (1987)** Detection of 10 additional pr-proteins in intercellular fluid extracts from stressed Xanthi-nc tobacco leaf tissue. *Can. J. Bot.* 65, 476-481.
- Hu, X. and Reddy, A.S. (1997)** Cloning and expression of a PR5-like protein from *Arabidopsis*: inhibition of fungal growth by bacterially expressed protein. *Plant Mol. Biol.* 34, 949-959.
- Hurek, T., Reinhold-Hurek, B., van Montague, M. and Kellenberger, E. (1994)** Root colonization and systemic soreding of *Azoarcus* sp. Strain BH72 in grasses. *J. Bacteriol.* 178, 1912-19-23.
- Ibeas, J.I., Lee, H., Damsz, B., Prasad, D.T., Pardo, J.M., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. and Narasimhan, M.L. (2000)** Fungal cell wall phosphomannans facilitate the toxic activity of a plant PR-5 protein. *Plant Journal* 23, 375-383.
- Ibelgaus, H. (1992)** Gentechnologie von A bis Z. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, New York, Basel, Cambridge.
- Imanishi, S., KitoNakamura, K., Matsuoka, K., Morikami, A. and Nakamura, K. (1997)** A major jasmonate-inducible protein of sweet potato, Ipomoelin, is an ABA-independent wound-inducible protein. *Plant and Cell Physiology* 38, 643-652.
- Innis, M.A. and Gelfand, D.H. (1990)** Optimization of PCR's. In: *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, New York, USA
- Ivanoff, S.S. (1963)** Guttation injuries of plants. *Botanical Review.* 29, 202-228.
- Ji, C. and Kuc, J. (1995)** Purification and characterization of an acidic beta-1,3-glucanase from cucumber and its relationship to systemic disease resistance induced by *Colletotrichum lagenarium* and tobacco necrosis virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8, 899-905.
- Kabir, S. (1995)** The isolation and characterization of jacalin based on its charge properties. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 27, 147-156.
- Kabir, S. (1998)** Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. *Journal of Immunological Methods* 212, 193-211.

- Kaneko, T., Takahashi, S. and Saito, K. (2000)** Characterization of acid-stable glucose isomerase from *Streptomyces* sp., and development of single-step processes for high-fructose corn sweetener (HFCS) production. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 64, 940-947.
- Kerstetter R.E., Zepp R.G. and Carreira L.H. (1998)** Peroxidases in grass dew derived from guttation: Possible role in polymerisation of soil organic matter. *Biogeochemistry-Dordrecht* 42(3), 311-323.
- Kido, S., Doi, Y., Kim, F., Morishita, E., Narita, H., Kanaya, S., Ohkubo, T., Nishikawa, K., Yao, T. and Ooi, T. (1995)** Characterization of Vitelline membrane outer layer protein-I, VMO-I - amino-acid-sequence and structural stability. *J. Biochem.* 117, 1183-1191.
- Klein, J. (1992)** Immunologie. 1 Auflage, VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge.
- Kloppstech K. and Schweiger O. (1976)** In vitro translation of poly(a)-RNA from *Acetabularia*. *Cytobiologie* 13, 394-400.
- Kogel, K.H., Beckhove, U., Dreschers, J., Munch, S. and Romme, Y. (1994)** Acquired-resistance in barley- the resistance mechanism induced by 2,6-dichloroionictinic acid is a phenocopy of a genetically based mechanism governing race-specific powdery mildew resistance. *Plant Physiology* 106, 1269-1277.
- Koiwa, H., Kato, H., Nakatsu, T., Oda, J., Yamada, Y. and Sato, F. (1997)** Purification and characterization of tobacco pathogenesis- related protein PR-5d, an antifungal thaumatin-like protein. *Plant and Cell Physiology* 38, 783-791.
- Kombrink E. and Somssich I.E. (1997)** Pathogenesis-Related Proteins and Plant Defense. *The Mycota Part A, Plant Relationships*. Carroll / Tudzynski (Eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Kyhse-Andersen, J. (1984)** Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10, 203-209.
- Laemmli, U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Larcher, W. (1987)** Stress bei Pflanzen. *Naturwissenschaften* 74, 158 - 167.
- Lee, J., Parthier, B. and Lobler, M. (1996)** Jasmonate signalling can be uncoupled from abscisic acid signalling in barley: Identification of jasmonate-regulated transcripts which are not induced by abscisic acid. *Planta* 199, 625-632.
- Lee, X., Thompson, A., Zhang, Z.M., Ton-that, H., Biesterfeldt, J., Ogata, C., Xu, L.L., Johnston, R.A.Z. and Young, N.M. (1998)** Structure of the complex of *Maclura pomifera* agglutinin and the T-antigen disaccharide, Gal beta 1,3-GalNAc. *Journal of Biological Chemistry* 273, 6312-6318.
- Legrand, M., Kauffmann, S., Geoffrey, P. and Fritig B. (1987)** Biological function of pr-proteins: four tobacco PR-proteins are chitinases. *PNAS* 84, 6750-6754
- Lindner W.A. and Brand J.M. (1989)** Peroxidases and other enzymes in maize guttation fluid. *S. Afr. J. Sci.* 85, 128-135.
- Lottspeich F. and Zorbass H. (1998)** Bioanalytik. Spektrum Verlag, Heidelberg.

- Lütge U., Kluge M. and Bauer G. (1988)** Botanik- Ein grundlegendes Lehrbuch. VCH, Weinheim.
- Magwa M.L., Lindner W.A. and Brand J.M. (1993)** Guttation fluid peroxidases from *Helianthus annuus*. *Phytochem.* 32, 251-253.
- Matsudaira P. (1993)** A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing. 2nd edition. Academic Press. London.
- Mauch, F., Mauch-Mani, B. and Boller, T. (1988)** Antifungal hydrolases in pea tissue. II Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and 1,3- $\beta$ -glucanase. *Plant Physiol.* 88, 936-942.
- Melchers, L.S., Selabuurlage, M.B., Vloemans, S.A., Woloshuk, C.P., van Roekel, J.S.C., Pen, J., vandenzelen, P.J.M. and Cornelissen, B.J.C. (1993)** Extracellular targeting of the vacuolar tobacco proteins AP-24, chitinase and beta-1,3-glucanase in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 21, 583-593.
- Menhaj, A.R. (1998)** Untersuchung zur Expression und Funktion zweier pflanzlicher Stressproteine unter Licht- und Temperaturstress. PhD thesis, Universität Hannover, Germany.
- Menhaj, A.R., Mishra, S.K., Bezhani, S. and Klopstech, K. (1999)** Posttranscriptional control in the expression of the genes coding for high-light-regulated HL#2 proteins. *Planta* 209, 406-413.
- Mezitt, LA. and Lucas, W.J. (1996)** Plasmodesmal cell-to-cell transport of proteins and nucleic acids. *Plant Mol. Biol.* 32, 251-273.
- Mishra, S.K., Grunwald, I., Neumann, D., Menhaj, A.R., Bezhani, S. and Klopstech, K. (2001)** The high-light-regulated, Jacalin-related lectin HL#2 of barley is targeted to the Apoplast. Submitted to *The Plant Journal*.
- Mitsuo I. (2001)** Full-Automated-Modeling-System. Department of Biomolecular Design. School of Pharmaceutical Sciences Kitasato University (<http://www.physchem.pharm.kitasato-u.ac.jp/FAMS>).
- Mohr H. and Schopfer P. (1992)** Lehrbuch der Pflanzenphysiologie. 4. Auflage, Springer Verlag, Berlin.
- MunchGarthoff, S., Neuhaus, J.M., Boller, T., Kemmerling, B. and Kogel, K.H. (1997)** Expression of beta-1,3-glucanase and chitinase in healthy, stem-rust-affected and elicitor-treated near-isogenic wheat lines showing Sr5- or Sr24-specified race-specific rust resistance. *Planta* 201, 235-244.
- Nakagawa, R., Yasokawa, D., Ikeda, T. and Nagashima, K. (1996)** Purification and characterization of two lectins from callus of *Helianthus tuberosus*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 60, 259-262.
- Nakagawa, R., Yasokawa, D., Okumura, Y. and Nagashima, K. (2000)** Cloning and sequence analysis of cDNA coding for a lectin from *Helianthus tuberosus* callus and its jasmonate-induced expression. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 64, 1247-1254.
- Neuhaus, J.M., Sticher, L., Meins, F. and Boller, T. (1991)** A short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of chitinases to the plant vacuole. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88, 10362-10366.
- Neuhoff, V., Stamm, R. and Eibl, H. (1985)** Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis* 6, 427-448.

- O'Farrel, P.H. (1975)** High resolution two-dimensional electrophoresis of Proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021.
- Ogata, K. and Umeyama, H. (1998)** The role played by environmental residues on side chain torsional angles within homologous families of proteins: A new method of side chain modelling. *Proteins-Structure Function and Genetics* 31, 355-369.
- Okushima, Y., Koizumi, N., Kusano, T. and Sano, H. (2000)** Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology* 42, 479-488.
- Ooi, L.S.M., Ng, T.B., Geng, Y.Q. and Ooi, V.E.C. (2000a)** Lectins from bulbs of the Chinese daffodil *Narcissus tazetta* (family Amaryllidaceae). *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie et Biologie Cellulaire* 78, 463-468.
- Ooi, L.S.M., Ng, T.B., Sun, S.S.M. and Ooi, V.E.C. (2000b)** Mannose-specific isolectins with different hemagglutinating potencies isolated from Chinese daffodil (*Narcissus tazetta* var. *chinensis*) leaves. *Journal of Protein Chemistry* 19, 163-168.
- Parent, J.G. and Asselin, A. (1984)** Detection of pathogenesis-related proteins and other proteins in the intercellular fluid of hypersensitive plants infected with tobacco mosaic virus. *Can. J. Bot* 62, 564-569
- Paris, N. and Rogers, J.C. (1996)** The role of receptors in targeting soluble proteins from the secretory pathway to the vacuole. *Plant Physiology and Biochemistry* 34, 223-227.
- Payne, G., Ward, E., Gaffney, T., Goy, P.A., Moyer, M., Harper, A., Meins, F., Jr. and Ryals, J. (1990)** Evidence for a third structural class of beta-1,3-glucanase in tobacco. *Plant Mol. Biol.* 15, 797-808.
- Pearson, W.R. and Lipman, D.J. (1988)** Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85, 2444-2448.
- Pemberton, R.E., Liberti, P. and Baglioni, C. (1975)** Isolation of messenger RNA from polysomes by chromatography on oligo(dT)-cellulose. *Analyt. Biochem.* 66, 18-28.
- Pernas, M., Sanchez-Mong, R. and Salcedo, G. (2000)** Biotic and abiotic stress can induce cystatin expression in chestnut. *Febs Letters* 467, 206-210.
- Peumans, W.J. and van Damme, E.J.M. (1995)** Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology* 109, 347-352.
- Peumans, W.J. and van Damme, E.J.M. (1998)** Plant lectins: Specific tools for the identification, isolation, and characterization of O-linked glycans. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 33, 209-258.
- Peumans, W.J., Hause, B. and van Damme, E.J.M. (2000b)** The galactose-binding and mannose-binding jacalin-related lectins are located in different sub-cellular compartments. *Febs Letters* 477, 186-192.
- Peumans, W. J., Winter, H.C., Bemer, V., van Leuven, F., Goldstein, I.J., TruffaBachi, P. and van Damme, E.J.M. (1997)** Isolation of a novel plant lectin with an unusual specificity from *Calystegia sepium*. *Glycoconjugate Journal* 14, 259-265.



- Peumans, W.J., Zhang, W.L., Barre, A., Astoul, C.H., Balint-Kurti, P.J., Rovira, P., Rouge, P., May, G.D., van Leven, F., Truffa-Bachi, P. and van Damme, E.J.M. (2000a)** Fruit-specific lectins from banana and plantain. *Planta* 211, 546-554.
- Pharmacia Biotech (Hg.) (1994)**, Source15Q. Data File high performance ion exchange. Uppsala: Pharmacia Biotech. <http://www2.apbiotech.com/applic/upp00738.nsf/>
- Pharmacia GmbH (Hg.) (1983)** Fraktionssammler Frac-100. Bedienungsanleitung. Freiburg: Deutsche Pharmacia GmbH.
- Pharmacia Laboratory Separation Division (Hg.) (1985)** Mono Q HR 5/5. Instructions. Uppsala: Pharmacia.
- Pharmacia, IPGphor-System**, <http://www2.apbiotech.com/applic/upp00738.nsf/>
- Pohlman, A.A. and McColl J.J. (1982)** Nitrogen fixation in the rhizosphere and rhizoplane of barley. *Plant and Soil* 186, 341-352
- Pötter, E. (1994)** Untersuchungen zur Expression der frühen lichtinduzierbaren Proteine der Gerste (*Hordeum vulgare*). Dissertation, Universität Hannover.
- Pötter, E. and Kloppstech, K. (1993)** Expression of early light inducible proteins in the barley developmental leaf gradient under light stress. *Eur. J. Biochem.* 214, 779-786.
- Potter, E., Beator, J. and Kloppstech, K. (1996)** The expression of mRNA's for light-stress proteins in barley: Inverse relationship of mRNA levels of individual genes within the leaf gradient. *Planta* 199, 314-320.
- Prašil, O., Adir, N. and Ohad, I. (1992)** Dynamics of photosystem II: mechanism of photoinhibition and recovery processes. Volume 11. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. (Barber J, Topics in Photosynthesis The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology, 11), p 295-348.
- Qiagen, Midi-/Maxiprep Plasmide**, [http://www.qiagen.com/literature/handbooks/plk/1015605\\_092000.pdf](http://www.qiagen.com/literature/handbooks/plk/1015605_092000.pdf)
- Qiagen, MinElute**, <http://www.qiagen.com/literature/handbooks/minelute>
- Qiagen, Miniprep Plasmide**, <http://www.qiagen.com/literature/handbooks/>
- Qiagen, The QIAExpressionist Handbuch**, <http://www.qiagen.com/literature/>
- Rasmussen, U., Bojsen, K. and Collinge, D.B. (1992)** Cloning and characterization of a pathogen-induced chitinase in *Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.* 20, 277-287.
- Reinbothe, C., Tewes, A., Lehmann, J., Parthier, B. and Reinbothe, S. (1994)** Induction by methyl jasmonate of embryogenesis-related proteins and messenger-RNAs in *Nicotiana-plumbaginifolia*. *Plant Science* 104, 59-70.
- Reisner, A.H., Nemes, P. and Bucholtz, C. (1975)** The use of Coomassie Brilliant Blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. *Anal.Biochem.* 64, 509-516.
- Rey P., Diaz C., Schilperoort R.A. and Hensgens L.A (1993)** Cell-type specific expression of three rice genes GOS2, GOS5 and GOS9. *Plant Mol. Biol.* 4, 889-94.

- Rosa, J.C., De Oliveira, P.S.L., Garratt, R., Beltramini, L., Resing, K., Roque-Barreira, M.C. and Greene, L.J. (1999)** KM+, a mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*: Amino acid sequence, predicted tertiary structure, carbohydrate recognition, and analysis of the beta-prism fold. *Protein Science* 8, 13-24.
- Ruiz-Medrano, R., Xoconostle-Cazares, B. and Lucas, W.J. (1999)** Phloem long-distance transport of CmNACP mRNA: implications for supracellular regulation in plants. *Development* 126, 4405-4419.
- Rupprecht, I. (2001)** Charakterisierung der HL#2-Genexpression in *Hordeum vulgare*. Diplomarbeit, Institut für Botanik, Universität Hannover, Hannover, Deutschland.
- Sakurai, N. and Masuda, Y. (1978)** Auxin-induced changes in barley coleoptile cell wall composition. *Plant Cell Physiol.* 19, 1217-1223.
- Salzer, P., Hubner, B., Sirrenberg, A. and Hager, A. (1997)** Differential effect of purified spruce chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases on the activity of elicitors from ectomycorrhizal fungi. *Plant Physiology* 114, 957-968.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989)** *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sankaranarayanan, R., Sekar, K., Banerjee, R., Sharma, V., Surolia, A. and Vijayan, M. (1996)** A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a Moraceae plant lectin with a beta-prism fold. *Nature Structural Biology* 3, 596-603.
- Sastry, M.V., Banarjee, P., Patanjali, S.R., Swamy, M.J., Swarnalatha, G.V. and Surolia, A. (1986)** Analysis of saccharide binding to *Artocarpus integrifolia* lectin reveals specific recognition of T-antigen (beta-D-Gal(1--3)D-GalNAc). *J. Biol. Chem.* 261, 11726-11733.
- Sattelmacher, B., Muhling, K.H. and Pennewiss, K. (1998)** The apoplast - its significance for the nutrition of higher plants. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 161, 485-498.
- Schägger, H. and von Jagow, G. (1987)** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368-379.
- Schweizer, P., Buchala, A., Silverman, P., Seskar, M., Raskin, I. and Metraux, J.P. (1997)** Jasmonate-inducible genes are activated in rice by pathogen attack without a concomitant increase in endogenous jasmonic acid levels. *Plant Physiology* 114, 79-88.
- Sedmak, J.J. and Grossberg, S.E. (1977)** A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal. Biochem.* 79, 544-552.
- Shimizu, T. and Morikawa K. (1996)** The  $\beta$ -prism: a new folding motif. *Trends Biochem. Sci.* 21,3-6.
- Shimizu, T., Vassylyev, D.G., Kido, S. Doi, Y. and Morikawa K. (1994)** Crystal structure of VMO1: a folding motif with homologues Greek key structure related by an internal three-fold symmetry. *EMBO J.* 13, 1003-1010
- Siegrist, J., Glenewinkel, D., Kollé, C. and Schmidtke, M. (1997)** Chemically induced resistance in green bean against bacterial and fungal pathogens. *Zeitschrift fuer Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection* 104, 599-610.

- Silhavy, D., Hutvagner, G., Barta, E. and Banfalvi, Z. (1995)** Isolation and characterization of a water-stress-inducible cDNA clone from *Solanum chacoense*. *Plant Molecular Biology* 27, 587-595.
- Simmling-Annefeld M. (1976)**. Auswirkung von Wachstumsbeeinflussung, Vernalisation und Sortenspezialität auf die Guttation. Doktorarbeit DJ 7675, Mainz.
- Smith, P.K, Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson B.J. and Klenk D.C. (1985)** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
- Stafford, H.A. (1997)** Roles of flavonoids in symbiotic and defense functions in legume roots. *Botanical Review* 63, 27-39.
- Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemannmerdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M. and Fritig, B. (1993)** Plant PR-Proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* 75, 687-706.
- Sitte P, Ziegler H., Ehrendorfer, F. and Bresinsky A. (1991)** Strasburger-Lehrbuch der Botanik. 33. Auflage neuberarb., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York.
- Stratagene, (1996)**, Guide to Pfu DNA Polymerase La Jolla, California.
- Stryer, L. (1991)** Biochemie. Korrigierter Nachdruck der völlig überarbeiteten Auflage 1990, Spektrum der Wissenschaft Verlag, Heidelberg, Berlin, New York.
- Suresh, S., Rani, P.G., Pratap, J.V., Sankaranarayanan, R., Surolia, A. and Vijayan, M. (1997)** Homology between jacalin and artocarpin from jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) seeds. Partial sequence and preliminary crystallographic studies of artocarpin. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 53, 469-471.
- Suzuki, S. (1995)** Immunochemical study on mannan, the antigenic polysaccharide of pathogenic yeasts in man of genus *Candida*. *Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 115, 280-294.
- Taipalensuu, J., Eriksson, S. and Rask, L. (1997)** The myrosinase-binding protein from *Brassica napus* seeds possesses lectin activity and has a highly similar vegetatively expressed wound-inducible counterpart. *European Journal of Biochemistry* 250, 680-688.
- Takahama, U. and Hirota, S. (2000)** Deglucosidation of quercetin glucosides to the aglycone and formation of antifungal agents by peroxidase-dependent oxidation of quercetin on browning of onion scales. *Plant and Cell Physiology* 41, 1021-1029.
- Takahama, U. and Oniki, T. (2000)** Flavonoids and some other phenolics as substrates of peroxidase: Physiological significance of the redox reactions. *Journal of Plant Research* 113, 301-309.
- Tamas, L., Huttova, J. and Zigova, Z. (1997)** Accumulation of stress-proteins in intercellular spaces of barley leaves induced by biotic and abiotic factors. *Biologia Plantarum* 39, 387-394.
- Towbin, H., Stachelin, T. and Gordon, J. (1979)** Electrophoretic transfer of Proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.

- Townsley F.M, Frigerio G. and Pelham H.R (1994)** Retrieval of HDEL proteins is required for growth of yeast cells. *J. Cell Biol*, 127:21-28.
- van Damme, E.J.M., Peumans, W.J., Barre, A. and Rouge, P. (1998)** Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Critical Reviews in Plant Sciences* 17, 575-692.
- van Damme, E.J., Astoul, C.H., Barre, A., Rouge, P. and Peumans, W.J. (2000)** Cloning and characterization of a monocot mannose-binding lectin from *Crocus vernus* (family Iridaceae). *Eur. J. Biochem.* 267, 5067-5077.
- van Damme, E.J., Barre, A., Mazard, A.M., Verhaert, P., Horman, A., Debray, H., Rouge, P. and Peumans, W.J. (1999)** Characterization and molecular cloning of the lectin from *Helianthus tuberosus*. *Eur. J. Biochem.* 259, 135-142.
- van Damme, E.J., Barre, A., Verhaert, P., Rouge, P. and Peumans, W.J. (1996)** Molecular cloning of the mitogenic mannose/maltose-specific rhizome lectin from *Calystegia sepium*. *FEBS Lett.* 397, 352-356.
- van Loon L.C., Pierpoint W.S., Boller T. and Conejero V. (1994)** Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol Biol. Rep.* 12, 245-264.
- van Loon, L.C. (1997)** Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology* 103, 753-765.
- Vanacker, H., Harbinson, J., Ruisch, J., Carver, T.L.W. and Foyer, C.H. (1998)** Antioxidant defences of the apoplast. *Protoplasma* 205, 129-140.
- Vignutelli, A., Wasternack, C., Apel, K. and Bohlmann, H. (1998)** Systemic and local induction of an Arabidopsis thionin gene by wounding and pathogens. *Plant Journal* 14, 285-295.
- Vitale A., Ceriotti A. and Denecke J. (1993)** The role of the endoplasmic-reticulum in protein-synthesis, modification and intracellular-transport. *J. Exp. Botany*, 44, 1417-1444.
- Von Gromoff, E.D., Treier, U. and Beck, C.F. (1989)** Three light-induced heat shock genes of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Cell. Biol.* 9, 3911-3918.
- Von Heijne, G. (1990)** Protein targeting signals. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2, 604-608.
- Wang, C.S., Lin, S.M. and Wei, S.L. (1999)** A stress-inducible protein associated with desiccation in lily pollen. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 40, 199-205.
- Wang, Z.B. and Guo, S.D. (1999)** Expression of two insect-resistant genes cryIA (bandc)/GNA in transgenic tobacco plants results in added protection against both cotton bollworm and aphids. *Chinese Science Bulletin* 44, 2051-2058.
- Wasternack, C. and Parthier, B. (1997)** Jasmonate signalled plant gene expression. *Trends in Plant Science* 2, 302-307.
- Wasternack, C., Miersch, O., Kramell, R., Hause, B., Ward, J., Beale, M., Boland, W., Parthier, B. and Feussner, I. (1998)** Jasmonic acid: biosynthesis, signal transduction, gene expression. *Fett-Lipid* 100, 139-146.
- Wendehenne, D., Durner, J., Chen, Z.X. and Klessig, D.F. (1998)** Benzothiadiazole, an inducer of plant defenses, inhibits catalase and ascorbate peroxidase. *Phytochemistry* 47, 651-657.

- Wierstra, I. and Kloppstech, K. (2000)** Differential effects of methyl jasmonate on the expression of the early light-inducible proteins and other light-regulated genes in barley. *Plant Physiology* 124, 833-844.
- Willmann, G. and Fakoussa, R.M. (1997)** Extracellular oxidative enzymes of coal-attacking fungi. *Fuel Processing Technology* 52, 27-41.
- Wilson, A.C. (1985)** Die molekulare Grundlage der Evolution. Spektrum der Wissenschaft Verlag Heidelberg, Berlin, New York.
- Wright, C.S. (1997)** New folds of plant lectins. *Current Opinion in Structural Biology* 7, 631-636.
- Wu, T.H., Chow, L.P. and Lin, J.Y. (1998)** Sechiumin, a ribosome-inactivating protein from the edible gourd, sechium edule Swartz. *Eur. J. Biochem.* 255, 400-408.
- Yang, H. and Czaplá, T.H. (1993)** Isolation and characterization of cDNA clones encoding jacalin isolectins. *J. Biol. Chem.* 268, 5905-5910.
- Young, S.A., Guo, A., Guikema, J.A., White, F.F. and Lach, J.E. (1995)** Rice cationic peroxidase accumulates in xylem vessels during incompatible interactions with *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. *Plant Physiol* 107, 1333-1341.
- Zhang, W., Peumans, W.J., Barre, A., Astoul, C.H., Rovira, P., Rouge, P., Proost, P., Truffa-Bachi, P., Jalali, A.A. and van Damme, E.J. (2000)** Isolation and characterization of a jacalin-related mannose-binding lectin from salt-stressed rice (*Oryza sativa*) plants. *Planta* 210, 970-978.
- Zhu, K.Y., Huesing, J.E., Shade, R.E., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. and Murdock, L.L. (1996)** An insecticidal N-acetylglucosamine-specific lectin gene from *Griffonia simplicifolia* (Leguminosae). *Plant Physiology* 110, 195-202.
- Zhu, R.H., Ng, T.B., Yeung, H.W. and Shaw, P.C. (1992)** High level synthesis of biologically active rekombinante trichosanthin in *Escherichia coli*. *Int. J. Peptide Protein Res.* 39, 77-81.

## 6. VERZEICHNISSE

### 6.1. ABKÜRZUNGEN

2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
A	Ampere
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATA	Aurintricarboxylisäure
AXA	Arabinoxylan Arabinofuranohydrolase
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
Bq	Bequerel
BSA	Rinderserumalbumin
BTH	Benzodithiazol
cDNA	„Copy DNA“
ConA	Concanavalin A
C-Terminus	Carboxy-Terminus einer Aminosäuresequenz
cv.	Kultivar
Da	Dalton
dCTP	Desoxy-Cytidintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxynukleinsäure
DNase	Desoxiribonuklease
dNTP	Desoxinukleosidtriphosphat
DTT	DL-Dithiothreitol; 1,4 Dimercaptobutan-2,3-Diol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskopie
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektroskopie
EST	„Expressed Sequence Tag“
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
h	Stunde
HA	Hydroxyapatit
HL	„High Light“ Hochlicht

HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	„Immobilized pH Gradient“
IWF	Interzelluläre Waschflüssigkeit
JIP	Jasmonsäure induzierte Proteine
jpg	Dateiformat für Graphiken, die komprimiert sind
LDS	Lauryldodecylsulfonat
LL	„Low Light“ Niedriglicht
max	Maximum
min	Minute
MMLV-RT	„Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase“
MOPS	3-(N-Morpholin)propansulfonsäure
mRNA	„Messenger RNA“
MCS	„Multi Cloning Site“
MW	Molekulargewicht
NBT	Nitroblue Tetrazoliumsalz
NC	Nitrocellulose
NCBI	National Center of Biological Informatics
N-Terminus	Amino-Terminus einer Aminosäuresequenz
OD	Optische Dichte
ORF	„open reading frame“
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PC	IBM-kompatibler Personal Computer
PCR	Polymerasekettenreaktion
pdb	„Protein Database Brokhavn“ Dateiformat für 3D Strukturen
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der $H_3O^+$ - Ionenkonzentration
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PR-Proteine	„Pathogen-Related“-Proteine
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP-HPLC	Reversed-Phase-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
rpm	Umdrehungen per Minute
rek.	rekombinant
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfonat
SPR	Oberflächen-Plasmon-Resonanz
sec	Sekunde
t	Zeit
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

tif	Dateiformat für Graphiken
TLP	„thaumantin like proteins“
TMN	Tris-Magnesium-Natriumchlorid-Puffer
Tris	Tis-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Einheit der Enzymaktivität (unit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
verd.	verdünnt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WCI	„wheat chemical induced“
WBB	Wasserstoff-Brücken-Bindungen
xg	x-faches der Erdbeschleunigung

Abkürzungen für SI Maßeinheiten (System international) und chemische Elemente sowie Moleküle entsprechen den allgemeingültigen Bezeichnungen und Nomenklaturen. Hinweise zur internationalen Nomenklatur können unter <http://www.chem.qmw.ac.uk> erhalten werden.



## 6.2. ABBILDUNGEN

Abb. 1.1: Darstellung der möglichen Genstruktur von HL#2	11
Abb. 2.1: Pflanzschalen mit guttierenden Gerstenpflanzen	42
Abb. 2.2: Sammelvorrichtung für Guttationstropfen	43
Abb. 3.1: Westernblot-Analyse von Fraktionen der Extraktion von Horcolin	46
Abb. 3.2: Fraktionen der Hydroxyapatit-Chromatographie	48
Abb. 3.3: Analyse der Fraktionen der Anionenaustauscher-Chromatographie durch SDS-PAGE und Westernblot-Analyse	49
Abb. 3.4: Tris-Tricin-Gel der gepoolten Fraktionen 17-20	50
Abb. 3.5: Mit Dunn-Carbonat-Methode auf PVDF-Membran transferiertes SDS-Gel	51
Abb. 3.6: Chromatogramm der RP-HPLC Auftrennung des LysC-Verdaus	52
Abb. 3.7: Agarosegel mit DNA-Fragmenten der RT-PCR mit Horcolin spezifischen Primern	55
Abb. 3.8: Schema des pT-Adv Vektors mit dem Horcolin-Insert	56
Abb. 3.9: Agarosegel zur Überprüfung der Klonierung in den pTAdv-Vektors	57
Abb. 3.10: Agarosegel der PCR-Produkte 1 A+B und 4 A+B vor Klonierung in den Vektor pBluescript SK	58
Abb. 3.11: Agarosegel eines Doppelverdaus der Klone 5A-5, 5A-6, 4B-9 und 4B-10 mit den Restriktionsenzymen BamHI und KpnI	59
Abb. 3.12: Klonierte cDNA-Sequenz von Horcolin	60
Abb. 3.13: Modifizierte cDNA Sequenz von Horcolin	64
Abb. 3.14: Schema des verwendeten pQE-30 Vektors von Qiagen	64
Abb. 3.15: Agarosegel mit amplifizierten DNA-Fragmenten für die Klonierung des Horcolin	65
Abb. 3.16: Agarosegel der DNA-Fragmente der Kolonie-PCR nach blau/weiß-Screening	66
Abb. 3.17: Agarosegel der Kolonie-PCR mit dem aus pGEM ausgeschnittenen und in den pQE 30 legierten Vektor	66
Abb. 3.18: Agarosegel der Fragmente eines Restriktionsverdaus zur Bestimmung der Insertorientierung	67
Abb. 3.19: Agarosegel der DNA-Fragmente eines Restriktionsverdaus von Plasmid-DNA aus einer Probe der Vorkultur für die Proteinüberexpression	68
Abb. 3.20: Wachstumskurve der Expressionskultur	69
Abb. 3.21: Coomassie gefärbtes SDS-Gel und Westernblot-Analyse von Proben der Proteinüberexpression vom Horcolin	70
Abb. 3.22: Nachweis des überexprimierten Proteins im Westernblot und SDS-Gel	72
Abb. 3.23: Westernblot und Silbergel der Aufreinigung des rekombinanten Horcolin	73
Abb. 3.24: Southernblot-Analyse genomischer Gersten DNA mit Horcolin cDNA-Sonde	74
Abb. 3.25: Northern-Analyse von verschiedenen Gewebeteilen (+/- Licht) mit Horcolin-Sonde	75
Abb. 3.26: Vergleich der beiden Peptid-Antikörper aus Kaninchen mit dem Anti-HL#2-Antikörper aus Ziege	76
Abb. 3.27: Westernblot-Analyse des Lektinbindungs-Tests mit nativem Horcolin und nativem HL#2 an Mannose-Agarose	77
Abb. 3.28: Lektinbindungs-Test von HL#2 an verschiedene Zucker-Agarosen	78

---

Abb. 3.29: Westernblot und Silbergel eines Lektinbindungs-Tests mit dem rekombinanten Horcolin an Mannose-Agarose	79
Abb. 3.30: Hämagglutinations-Test	80
Abb. 3.31: Multiples Alignment von Horcolin und HL#2 mit homologen Proteinen	82
Abb. 3.32: Phylogenetischer Stammbaum von Horcolin, HL#2 und homologer Proteine	83
Abb. 3.33: Vergleich der Sekundärstrukturen von Horcolin und HL#2 mit strukturverwandten Proteinen	84
Abb. 3.34: Modellerte 3D-Struktur von Horcolin, HL#2 und strukturverwandten Proteinen	85
Abb. 3.35: Gewebespezifische Lokalisation von Horcolin mit Hilfe von Northern- und Westernblot-Analysen	87
Abb. 3.36: Identifizierung eines weiteren Proteins durch den Anti-HL#2-Antikörper	88
Abb. 3.37: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Koleoptilen und Primärblättern etiolierter und belichteter Gerstenpflanzen	91
Abb. 3.38: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Koleoptilen und Primärblättern etiolierter und belichteter Gerstenpflanzen	92
Abb. 3.39: Analyse verwandter Gräser mit Hilfe des Anti-HL#2-Antikörpers	93
Abb. 3.40: Silbergel und Westernblot-Analyse von löslichen Proteinen der Koleoptile	94
Abb. 3.41: Temperatur- und Luftfeuchtigkeit-Messprotokoll	96
Abb. 3.42: Guttierende Gerstenpflanzen	97
Abb. 3.43: Lichtmikroskopische Aufnahme von Guttationsflüssigkeit	98
Abb. 3.44: Silber und Coomassie gefärbte SDS-Gele von Guttationsproteinen	99
Abb. 3.45: 2D-Gelelektrophorese von Proteinen der Guttationsflüssigkeit	100
Abb. 3.46: Gelbe Bande im SDS-Gel	101
Abb. 3.47: Spektralanalyse von der aus dem Gel eluierten gelben Bande	102
Abb. 3.48: Coomassie gefärbtes SDS-Gel mit identifizierten Proteinen	103
Abb. 3.49: Westernblot-Analyse von Guttationsflüssigkeit mit Antikörpern gegen PR-Proteine	106
Abb. 3.50: Verdau von Guttationsflüssigkeit mit DNase, RNase und Protein K	107
Abb. 4.1: Alignment von Horcolin und HL#2 mit dem Programm Clustal W	110
Abb. 4.2: Ergebnis einer Datenbankrecherche mit HL#2 und dem Klon 4B10T7	114
Abb. 4.3: Multiples Sequenzalignment von Heltuba mit BanLec, salT, HL#2 und Horcolin	119
Abb. 4.4: 3D-Modell von Horcolin zur Darstellung der Zuckerbindungsstelle	121
Abb. 4.5: Vesikulärer Transport von Horcolin / HL#2	129
Abb. 4.6: Guttierende Pflanzen in Vergrößerung	132
Abb. 4.7: Vergleich von 2D-Gelen mit Guttationsproteinen und löslichen Proteinen der Koleoptile	134

### 6.3. TABELLEN

Tabelle 3-1: N-terminale Aminosäuresequenzen von endogenen Peptidfragmenten nach LysC Verdau	53
Tabelle 3-3: Auf Protein- und Nukleotidebene verwandte von Horcolin und HL#2	81
Tabelle 4-1: Vergleich der an der Zuckerbindung beteiligten Aminosäuren	122
Tabelle 4-2: Lokalisationssequenzen von Guttationsproteinen	136

## ANHANG

### VERWENDETE PRIMER

Nr.	Bezeichnung	Sequenz in 5' - 3' Richtung	Länge (Basen)	Bemerkung
1	FP-Horcolin 1	GCA CGA GCT AAG TCA CTC TTC	21	Forward-Primer
2	FP-Horcolin 2	GCT ATC GTT GAC GCT ATT GC	20	Forward-Primer
3	RP-Horcolin 3	GCA GCG TCA CAC ATT ATC AC	20	Reverse-Primer
4	TYV-P-F	P- ACC GAC AAC GTB CAR CA	17	Forward-Primer
5	TYV-P-R	P- TG YTG VAC GTT GTC GGT	17	Reverse-Primer
6	GTE-P-F	P- GG SAC SGA GGA CAC SAT CAA	20	Forward-Primer
7	GTE-P-R	P- TTG ATS GTG TCC TCS GTS CC	20	Reverse-Primer
8	FGT-P-F	P- TTC GGS ACS GAC GAC ATC GT	20	Forward-Primer
9	FGT-P-R	P- AC GAT GTC GTC SGT SCC GAA	20	Reverse-Primer
10	VSS-P-F	P- ATC GTB GAC GCS ATC GCS TT	20	Forward-Primer
11	VSS-P-R	P-AA SGC GAT SGC GTC VAC GAT	20	Reverse-Primer
12	HL#2*-Primer1	AAG ATC GGG CCG TGG GG	17	Forward-Primer
13	HL#2*-Primer3	GGG CCN TGG GGC GGS ACS	18	Forward-Primer
14	HL#2*-Primer2	ACS TAC GTG GGC ACC GAC AAY	21	Forward-Primer
15	HL2*-Primer1P	P-AAG ATC GGG CCG TGG GG	17	Forward-Primer
16	HL#2*Primer3P	P-GGG CCN TGG GGC GGS ACS	18	Forward-Primer
17	HL#2*Primer2P	P-ACS TAC GTG GGC ACC GAC AAY	21	Forward-Primer
18	Horcolin-expr-F	CGCGGATCCATGAGCAAGCCTGTGAAGATTGG	35	Forward-Primer
19	Horcolin-exp-R	CGCAAGCTTTGGAGTAATGTAGAACCCAATCG	35	Reverse-Primer
20	Olido(dT)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	20	Reverse-Primer

Anmerkung: P bedeutet phosphoryliert. Weitere Buchstaben für die Wobble: S = G + C; Y = C + T; V = G + A + C; B = G + C + T; R = A + G

**ABKÜRZUNGEN DER AMINOSÄUREN**

Aminosäuren	3-Buchstaben- Code	1-Buchstaben- Code
<b>Unpolare Aminosäuren</b>		
Alanin	Ala	A
Glycin	Gly	G
Leucin	Leu	L
Isoleucin	Ile	I
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Tryptophan	Trp	W
Valin	Val	V
<b>Polare Aminosäuren</b>		
Asparagin	Asn	N
Glutamin	Gln	Q
Cystein	Cys	C
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tyrosin	Tyr	Y
<b>Positiv geladene Aminosäuren</b>		
Arginin	Arg	R
Histidin	His	H
Lysin	Lys	K
<b>Negativ geladene Aminosäuren</b>		
Asparaginsäure	Asp	D
Glutaminsäure	Glu	E

## PAGE-DOKUMENTATION

**PAGE-Dokumentation** <sup>©</sup>

Name: \_\_\_\_\_ Datum: \_\_\_\_\_ Gel Nr.: \_\_\_\_\_

Versuchsbez.: \_\_\_\_\_ Bei gescannten Gelen Dateiname: \_\_\_\_\_

Probenvorbereitung (Denat. bei °C+min; DTT/β-Me; nativ): \_\_\_\_\_

**Gel:**

<input type="checkbox"/> _____ % Sammelgel	<input type="checkbox"/> _____ % Trenngel	<input type="checkbox"/> _____ % Spacergel
<input type="checkbox"/> 0,75 mm	<input type="checkbox"/> 1,5 mm	<input type="checkbox"/> _____ mm
<input type="checkbox"/> Minigel	<input type="checkbox"/> _____ x mm	_____ sonstig.
<input type="checkbox"/> 10 Taschen	<input type="checkbox"/> 15 Taschen	<input type="checkbox"/> _____ Taschen/ Präparativ

Anmerkungen zu Gel: \_\_\_\_\_

<b>Lauf:</b>	Zeit von - bis	mA	V	<input type="checkbox"/> Coomassie-Gel
Vorlauf:	_____	_____	_____	<input type="checkbox"/> Silber-Gel
Sammeln:	_____	_____	_____	<input type="checkbox"/> Western: <input type="checkbox"/> ECL/ <input type="checkbox"/> AP
Trennen:	_____	_____	_____	Sonstiges: _____
Gesamtdauer:	_____	Prim. Antikörper: _____	_____	Verdünnung/Zeit: _____
Anmerkungen: _____	_____	Sek. Antikörper: _____	_____	Verdünnung/Zeit: _____

Waschbedingungen (% PBS-T, Zeiten, Wechsel): \_\_\_\_\_

Taschen-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Katalog-Nr.															
Proben- bezeichnung															
µL / Tasche															
µg / Tasche															
mg / mL															

Kommentar:

---



---



---



---



---



## **Danksagung**

Meiner Meinung nach können erfolversprechende wissenschaftliche Arbeiten nur in Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern entstehen. Hier ist nicht nur die technische Hilfe - man kann und braucht nicht alles können; Räder gibt es schon genug - sondern auch die Diskussion der erhaltenen Daten gemeint. Gerade konstruktive Kritik hilft dabei, sich nicht „zu verrennen“ und mehr oder weniger sinnlose Experimente durchzuführen - Dank an alle diejenigen, die sich an solchen Diskussionen beteiligt haben!

Dafür, dass ich Einblicke in die Forschung bekommen durfte, möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Klaus Kloppstech bedanken, der mir das Thema dieser Arbeit zur weitgehend selbständigen Bearbeitung überlassen hat. In zahlreichen Diskussionen stand er mir hierbei stets zur Seite, auch wenn wir dann und wann bei gesellschaftspolitischen Themen landeten oder uns über die Tücken des Betriebssystems eines bestimmten Herstellers ärgerten.

Bei Herrn Prof. Dr. W. Müller möchte ich mich für die Übernahme des Korreferates bedanken. Dr. Sanjay Mishra und Dr. Ali Menhaj weihten mich in die Geheimnisse von HL#2 und Horcolin ein, wobei Sanjay mir zusätzlich noch zeigen konnte, wie man indische Gerichte kocht. Auch wenn man „noch nichts sieht“, danke ich Herrn Dr. Achim Gau für die vielen Antworten der manchmal komplizierten Fragen. Ohne seine kritischen Bemerkungen wäre der „Datenfriedhof“ in meinem Laborbuch sicherlich nicht so überschaubar geblieben. Die Anregungen zur Korrektur der Dissertation habe ich dankbar angenommen.

Natürlich war auch das Gespräch mit den übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe wichtig, als da waren und sind Anke, Margret, Melanie, Joachim und unsere Gärtner. Besonders freut es mich, dass Ines Rupprecht so viel Interesse an HL#2 und Horcolin hat, und sie die Untersuchung dieser Proteine in ihrer Doktorarbeit fortsetzt - es fehlen ja noch einige Teile des Puzzles!

Für die Hilfe beim Sequenzieren des Horcolin möchte ich mich bei Herrn Dr. Hubert Thole bedanken. Ebenso für die Anfertigung der EM-Aufnahmen bei Herrn Dr. D. Neumann. Für Hilfestellungen im Labor, für Materialien und/oder der Interpretation einiger Daten möchte ich mich bei Frau Dr. Jutta Papenbrock, Herrn Dr. Hans-Peter Braun, Herrn Dr. Thomas Reinard, Herrn Dr. Bernd Huchzermeyer und Herrn Dr. Carsten Zeilinger bedanken. Prof. Gadi Schuster am Technion in Haifa gab mir die Möglichkeit, einen Teil meiner Dissertation in seinem Labor durchzuführen. Ihm und seinen Mitarbeitern möchte ich für die freundliche und hilfsbreite Unterstützung danken. Frau Dr. Tamar Ziv vom „Protein Center“ am Technion führte die ESI-MS Analysen durch und ließ mich ihre Geräte für die 2D-Elektrophorese benutzen- auch hierfür ein herzliches „toda raba“.

Neben der finanziellen Unterstützung der DFG und des MWK in Niedersachsen war auch das private Umfeld für die Promotion wichtig. Daher möchte ich mich an dieser Stelle auch bei meinen Eltern sowie der Lebensgefährtin meines Vaters bedanken. Liebe Cordula, vielen Dank für dein Verständnis und vieles mehr....- „kommt hier ein ß, ss oder ein s hin?“.

Dank auch an alle, die meinen, hier aufgeführt sein zu sollen, die ich aber leider vergessen habe!



### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen, Hilfsmittel und Hilfestellungen verwendet habe. Die vorliegende Arbeit ist nicht als Diplom- oder Doktorarbeit oder sonstige Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form dieser oder einer anderen Prüfungsbehörde von mir vorgelegt worden.

Hannover, den 08.03.2002

---

(Ingo Grunwald)