

Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen stressinduzierter Proteine im Apoplasten der Gerste

Vom Fachbereich Biologie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biol. Ines Rupprecht

geboren am 17.09.1975 in Eisenach / Thüringen

2005

Referent: Prof. Dr. K. R. Kloppstech

Korreferent: Prof. Dr. H. J. Jacobsen

Tag der Promotion: 21.12.2004

Zusammenfassung

Die Proteine HL#2 und Horcolin aus der Gerste sind nah verwandte Mitglieder einer Proteinfamilie mit Lektineigenschaften, die in verschiedenen Pflanzenspezies vertreten ist und im Zusammenhang mit der Abwehr von Pathogenen und osmotischem Stress diskutiert werden. HL#2 wurde bei Untersuchungen zu den Einflüssen von abiotischem Stress auf die Genexpression als lichtstressinduzierbare cDNA isoliert und nachfolgend zusammen mit dem verwandten, koleoptilspezifischen Horcolin näher untersucht. Innerhalb dieser Proteinfamilie nehmen HL#2 und Horcolin eine besondere Stellung ein, da sie als Einzige mit einer apoplastidären Lokalisation diskutiert werden.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit zur weiteren Charakterisierung von HL#2 und Horcolin sind insbesondere die Isolierung ihrer Gene und Promotorregionen, Untersuchungen zum Einfluss verschiedener abiotischer und biotischer Stressbedingungen auf die Genexpression, Versuche zur Aufklärung des Transportes aus der Zelle in den Apoplasten und die Bestimmung biochemischer Eigenschaften sowie der möglichen Funktionen.

Durch PCR-basierte Methoden konnten die vollständigen Gene von HL#2 und Horcolin und jeweils ca. 400 bp der upstream gelegenen Promotorregionen isoliert werden. Die nachfolgende Sequenzierung ergab, dass jeweils zwei Introns in vergleichbarer Lage und Länge in beiden Genen enthalten sind. Aufgrund der Ähnlichkeiten der Gene zueinander, als auch zu einigen anderer Arten, wie beispielsweise zu GOS9 aus *Oryza sativa*, wird davon ausgegangen, dass es sich hier um eine Genverdopplung, vermutlich vor der evolutiven Trennung der monokotylen Pflanzen handelt. Die Analyse der isolierten Bereiche der Promotoren deutet daraufhin, dass beide Genexpressionen unabhängig voneinander und verschieden reguliert werden. So konnte durch Untersuchungen der Genexpression auf Transkriptebeleg gezeigt werden, dass die mRNA des HL#2 nach einer mechanischen Verwundung transient innerhalb weniger Stunden steigt, während Horcolin nicht beeinflusst wird. Andererseits kann eine positive Regulation der Genexpression des Horcolin unter osmotischem Stress in Form von 1,5 % NaCl nachgewiesen werden. Der Transkriptlevel von HL#2 bleibt unter diesen Bedingungen jedoch unverändert.

Eine weitere Besonderheit von HL#2 und Horcolin als apoplastidäre Proteine ist das Fehlen eines bekannten Signalpeptides für den vesikulären Transport über das ER/Golgi-Membransystem. Es wurden daher mittels transienter Expression von HL#2-GFP-Fusionen Versuche unternommen, zu klären, ob möglicherweise durch stressinduziertes alternatives Spleißing eine Signalsequenz angefügt wird oder ein anderer als der bekannte, vesikuläre Transportweg genutzt wird. Diese Frage konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden.

HL#2 und Horcolin sind dimere bzw. tetramere Proteine, die pH-abhängig an verschiedene Zucker, wie Maltose und Mannose binden können. Aufgrund ihrer Sequenzhomologien zu Proteinen, die an β -Glucosidase und Myrosinase binden, ihrer stressinduziert verstärkten Genexpression und ihrer apoplastidären Lokalisation werden HL#2 und Horcolin mit einer Funktion bei der extazellulären Signalerzeugung, -erkennung oder -weiterleitung unter biotischen und abiotischen Stressbedingungen diskutiert.

Stichwörter: Lektine, Apoplast, Stress

Abstract

HL#2 and Horcolin are close-related members in a protein family with the characteristics of lectins, which is recently discussed playing a role in defence of pathogens and osmotic stress. HL#2 cDNA was isolated and specified while investigations into the influences of light stress on barley were undertaken. HL#2 and the related protein Horcolin are discussed playing a special role within the protein family because of their apoplastic localization. However Horcolin can only be verified in the coleoptiles when observing specific tissues.

The further characterization of HL#2 and Horcolin in this research is conducted. The objectives are mainly focused on four areas, (1) the isolation of their genes and promoter regions, (2) the influence of different stress forms on gene expression, (3) the conduction of experiments to clarify how these proteins are transported from cells into the apoplast, and (4) the ascertainment of biochemical attributes, properties and possible functions.

With the application of PCR-based methods the complete genomic sequences of HL#2 and Horcolin as well as approximate 400 bp upstream have been isolated. Two introns with comparable position and length are found existing contained in the two genes. These similarities between the two genes occur also to some genes of other different species, such as GOS9 from *Oryza sativa*. Due to this finding it can be inferred that there has been a gene duplication before the evolutionary separation of monocot plants. Moreover, the analysis of isolated promoter domains shows that the gene expression of HL#2 and Horcolin are independent and regulated differently. The investigation of gene expression on the mRNA layer then reveals that the amount of mRNA of HL#2 increases transiently within few hours after a mechanic injury, while there is no influence on mRNA of Horcolin from this injury. Aside from that, a positive regulation of Horcolin's gene expression is affirmed to exist on the condition of 1.5% NaCl osmotic stress while the transcription level of HL#2 remains unaffected.

Furthermore, the occurrence of proteins HL#2 and Horcolin within the interstitial washing fluid (IWF) has been detected by using adequate controls in the form of antibody verification of cytoplasmic and apoplastic proteins. Both cDNAs show that there is no known signal sequence for the vesicular transportation within the ER/Golgi membran system. Therefore, experiments have been undertaken by means of the transient expression of HL#2-GFP fusion to check whether a signal sequence could be added by stress-induced alternative splicing or another transporting route is used. These issues however have not yet been resolved completely in this research.

HL#2 and Horcolin, di- or tetrameric proteins, are composed of two or four identical subunits and can bind pH-dependently with different sugars like maltose and mannose. Due to their sequence homology to those proteins, which can specially bind beta-glucosidase and myrosinase, their stress-induced enhanced gene expression and their apoplastic localization HL#2 and Horcolin are eventually discussed having a function of extra cellular signal generation, transmission or recognition under biotic and abiotic stress conditions.

Keywords: lectins, apoplast, stress

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1. Einordnung der Gerste	1
1.2. Stress in Pflanzen	1
1.2.1. Abwehrmechanismen gegen biotische Stressfaktoren	2
1.2.2. Abwehrmechanismen gegen abiotische Stressfaktoren	3
1.3. HL#2 und Horcolin	6
1.4. Lektine in Pflanzen	7
1.5. Der Apoplast	9
1.6. Arbeitsprogramm	11
2. Material und Methoden	13
2.1. Pflanzenmaterial und -anzucht	13
2.1.1. Behandlungen	13
2.1.1.1. Hochlicht	13
2.1.1.2. Phytohormone	14
2.1.1.3. Salz	14
2.1.2. Aufbereitung des Pflanzenmaterials	14
2.2. Molekularbiologische Methoden	15
2.2.1. Isolierung von genomischer DNA aus Höheren Pflanzen	15
2.2.2. Agarosegelelektrophorese	15
2.2.3. PCR-basierte Methoden	16
2.2.3.1. Gradienten-PCR	17
2.2.3.2. Inverse PCR	19
2.2.3.3. "nested" PCR, GenomeWalker™ System	19
2.2.3.4. Two-Step RT-PCR	21

Inhaltsverzeichnis

2.2.4.	Restriktionsenzymverdau	21
2.2.5.	Dephosphorylierung und Ligation	22
2.2.6.	Elektroporation	22
2.2.7.	Blau-Weiß-Selektion	23
2.2.8.	Plasmidisolierung	23
2.2.9.	Particle Gun Bombardment	24
2.2.10.	Isolierung der Gesamt-RNA	26
2.2.11.	Northern-Blot-Verfahren	27
2.2.12.	Southern-Blot-Verfahren	30
2.3.	Proteinchemische Methoden	30
2.3.1.	Isolierung von Proteinen	30
2.3.1.1.	Isolierung von Gesamtproteinen	30
2.3.1.2.	Isolierung von löslichen und Membranproteinen	31
2.3.1.3.	Isolierung der Proteine der IWF	32
2.3.1.4.	Isolierung der Proteine der Guttationsflüssigkeit	33
2.3.2.	Methoden zur Proteinkonzentrationsbestimmung	33
2.3.2.1.	Proteinbestimmung nach Smith	34
2.3.2.2.	Proteinbestimmung nach Bradford	34
2.3.2.3.	Esenfärbung	35
2.3.3.	Methoden zur Proteinkonzentrierung	35
2.3.4.	SDS-PAGE	35
2.3.4.1.	Tris-Glycin-Gele	36
2.3.4.2.	Tris-Tricin-Gele	37
2.3.5.	2D-Gelelektrophorese	37
2.3.6.	Färbung von Protein-Gelen	39
2.3.6.1.	Coomassie-Colloidal-Färbung	39
2.3.6.2.	Silberfärbung	40
2.3.7.	Western-Blot-Verfahren	41
2.3.8.	Gelfiltration	43
2.4.	Verwendete Kits	43
3.	Ergebnisse	45
3.1.	Erweiterung der Sequenzdaten für HL#2 und Horcolin	45
3.1.1.	Isolierung der Gene für HL#2 und Horcolin	45
3.1.1.1.	Bestimmung der Sequenz und Lage der Introns	45
3.1.1.2.	Isolierung der Upstream-Regionen	50

3.1.1.3.	Aktuelle, vollständige Version der Gene für HL#2 und Horcolin	56
3.1.2.	Southern-Blot-Analyse	56
3.2.	Sequenzvergleiche von HL#2 und Horcolin mit eng verwandten Proteinen	57
3.2.1.	Proteinsequenzhomologien	58
3.2.2.	Verwandtschaftsgrad von HL#2 und Horcolin	60
3.2.3.	EST-Klone der GABI-Datenbank	60
3.3.	Promotoranalyse von HL#2 und Horcolin	61
3.3.1.	Datenbankrecherche	61
3.3.2.	Funktionsanalyse der Promotorregionen von HL#2 und Horcolin	62
3.4.	Untersuchungen zur Genexpression von HL#2 und Horcolin auf mRNA-Ebene	68
3.5.	Untersuchungen zu Lokalisation und Transport	70
3.5.1.	Nachweis von HL#2 und Horcolin in der IWF unter Verwendung geeigneter Kontrollen	70
3.5.2.	Überprüfung möglicher Signalsequenzen für HL#2 und Horcolin	72
3.5.3.	Untersuchungen zum Transport durch Klonierung in den Vektor pGFP	74
3.5.4.	Nachweis der hypothetischen HL#2-Leadersequenz durch RT-PCR	78
3.6.	Biochemische Eigenschaften der Proteine HL#2 und Horcolin	79
3.6.1.	Herstellung eines Peptid-AK für Horcolin	79
3.6.2.	Zuckerbindungstest	80
3.6.3.	Papainverdau von HL#2 und Horcolin	84
3.6.4.	Untersuchung der Quartärstruktur des Horcolin	85
3.7.	Untersuchung der Proteinzusammensetzung der IWF	87
3.7.1.	Massenspektrometrische Bestimmung einiger IWF-Proteine	87
3.7.2.	Vergleich der IWF und Guttationsproteine in der 2D-Gelelektrophorese	91
3.7.3.	Konzentrationsbestimmung von PR-Q in IWF und Guttation	91
4.	Diskussion	95
4.1.	Isolierung der Gene für HL#2 und Horcolin	96
4.2.	Verwandtschaft zu anderen Proteinen	97
4.3.	Promotoranalyse	99
4.3.1.	Promotorbestimmung und -aktivität	99
4.3.2.	Expression	101
4.4.	Extrazelluläre Lokalisation und Transport	104
4.5.	Biochemische Eigenschaften von HL#2 und Horcolin	109
4.6.	Untersuchung der Proteinzusammensetzung der IWF	113
4.7.	Mögliche Funktionen von HL#2 und Horcolin bei der Signaltransduktion	115

Inhaltsverzeichnis

Literaturverzeichnis	118
Abbildungsverzeichnis	131
Tabellenverzeichnis	133
A. Anhang	134

Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure	h	Stunde
APS	Ammoniumsulfat	HEPES	N-2-Hydroxyethyl-Piperazin-N-2-Ethansulfonsäure
AS	Aminosäure		
ATP	Adenosintriphosphat	HL	Licht hoher Intensität
AWF	apoplastidäre Waschflüssigkeit	HSC	Heat Shock Cognate
BCA	Bicinchonininsäure	HSP	Heat Shock Protein
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat	IEF	Isoelektrische Fokussierung
BFA	Brefeldin A	IgG	Immunglobulin G
BLAST	Basic local alignment search tool des NCBI	inHg	Druckeinheit (1 inHg entspricht 0,033864 bar)
bp	Basenpaare	IPG	immobilized pH Gradient
BPB	Bromphenolblau	IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
Bq	Becquerel	IWF	Interstitielle Waschflüssigkeit
BSA	Rinderserumalbumin	JAM	Jasmonatmethylester
CBB	Coomassie-Brilliant-Blue CBB-G 250	JIP	jasmonatinduzierbares Protein
CDD	Conserved Domain Database	kb	10 ³ Basenpaare
cpm	Aktivität in Counts pro ml	kDa	10 ³ Dalton
d	Tag	Leader	hypothetische Signalsequenz des HL#2 (Intron 1)
Da	Dalton		
ddH ₂ O	doppelt destilliertes H ₂ O	Mb	10 ⁶ Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid	MCS	Multiple Cloning Site
DNA	Desoxyribonukleinsäure	min	Minuten
DNase	Desoxyribonuklease	MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
DTT	Dithiothreitol	MRL	mannose-binding rice lectin,
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	mRNA	Messenger RNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	NBT	Nitroblue Tetrazolium Salz
ELIP	Early Light Inducible Protein	NCBI	National Center of Biological Information
ELISA	Enzymgekoppelter Immunnachweis (Enzyme-linked immunosorbent assay)	OD	Optische Dichte
ER	Endoplasmatisches Reticulum	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
GLP	Germin-like Protein	PCI	Phenol Chloroform Isoamylalkohol
GSP	Genspezifische Primer	PCR	Polymerasekettenreaktion
GST	Glutathion-S-Transferase	Pfam	Datenbank mit Proteinfamilien basierend

Inhaltsverzeichnis

	auf einer Zusammenstellung von multiplen Sequenzvergleichen und "hidden Markov Models"
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
poly(A) ⁺ -RNA	polyadenylierte RNA
PR	Pathogenesis Related
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reversen Transkriptase Polymerasekettenreaktion
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase-Oxygenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Smart	Simple Modular Architecture Research Tool
T _m	Schmelztemperatur für die Trennung der Stränge der Doppelhelix der DNA
TAE	Tris-Acetat EDTA
Taq	hitzeresistente DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMN	Puffer aus Tris, MgCl ₂ und NaCl
TNE	Puffer aus Tris, NaCl und EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit, Enzymaktivität
URL	Uniform Resource Locator ("Internetadresse")
UTR	untranslatable region
UV	Ultraviolett
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
v/w	Volumeneinheit pro Gewichtseinheit
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
xg	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)

1. Einleitung

1.1. Einordnung der Gerste

Die Gerste ist eine der ältesten Kulturpflanzen, die sich durch eine kurze Reifezeit, ein hohes Ertragspotential und eine außerordentliche ökologische Anpassungsfähigkeit auszeichnet. Ein Vergleich der DNA-Muster heutiger Kulturgersten mit denen der Wildgerstenarten deutet daraufhin, dass Israel mit großer Wahrscheinlichkeit das Ursprungsland der Domestikation war. Heute ist die Gerste nach Weizen, Reis und Mais die am häufigsten angebaute Getreideart der Welt (Graner und Altschmied, 2001).

Zusammen mit Weizen (*Triticum*), Hafer (*Avena*), Roggen (*Secale*) und einiger weiterer Getreidearten gehört die Gattung *Hordeum* zum Tribus der Triticeae, also zur Familie der Poaceae (Süßgräser) und damit im Gegensatz zu Kartoffel, Zuckerrübe oder Raps zu den monokotylen Kulturpflanzen. Die wichtigen Kulturarten der Gerste sind die Zweizeilige (Sommer-) Gerste (*Hordeum distichon*), die auch Braugerste genannt wird und so die häufigste Verwendung anzeigt und die Mehrzeilige (Winter-) Gerste (*Hordeum vulgare*), die vornehmlich als Futtermittel eingesetzt wird.

Zur Zeit gibt es verschiedene europaweite Projekte zur Erforschung des Gerstengenoms, zu denen auch GABI (Projektseite in Tabelle A.1) gehört. GABI steht für die **Genomanalyse im biologischen System Pflanze** und ist ein Verbundvorhaben, das Projekte zur Analyse und Sequenzierung von Getreidegenomen durchführt. Leider sind zum jetzigen Zeitpunkt, bis auf die Einsicht in die EST-Klone, erst sehr wenige Daten aus dieser Datenbank erhältlich. In der nächsten Zeit ist jedoch zu erwarten, dass Zugang auch zu den genomischen Klonen erhältlich sein wird, wie es bereits für den vollständig sequenzierten Organismus *Arabidopsis thaliana* der Fall ist.

1.2. Stress in Pflanzen

Bedingt durch ihre Ortsgebundenheit müssen Pflanzen in der Lage sein, schnell und flexibel auf veränderte Umweltbedingungen zu reagieren und sich anzupassen. Über den Tag hinweg ver-

ändern sich Belichtungsverhältnisse, Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Windstärke. Zusätzlich treten Situationen auf, die nicht zu diesen regelmäßigen Schwankungen zählen, wie beispielsweise ein Pathogenbefall. Die Grenze zwischen "gutem" Stress, dem sogenannten Eustress, und dem Distress ist dabei fließend. Eustress wird als anregender und lebensnotwendiger Stress betrachtet, wohingegen Distress eine Form von Belastung bedeutet, die außerhalb tolerierbarer Grenzen liegt und in der Konsequenz Schädigungen hervorruft (Selye, 1956). Die Formen von Stress sind ebenso vielfältig wie die entsprechend entwickelten Abwehrmechanismen. Man unterscheidet im Allgemeinen zwischen biotischen Stressfaktoren, wie dem Befall mit Viren, Pilzen oder Insekten und abiotischen Stressfaktoren, wie Licht, Temperatur oder Salz.

1.2.1. Abwehrmechanismen gegen biotische Stressfaktoren

Abwehrmechanismen können sowohl konstitutiv, als auch induktiv sein. Konstitutiv sind verschiedene Strukturen, wie Stacheln, Dornen und Gift- oder Brennhaare zur Abwehr von Säugtieren und Vögeln, oder die Verdickung von Zellwänden durch Lignifizierung, Cutinisierung oder Auflagerungen von Wachsen zur Abwehr von Insekten. Solche Strukturen dienen beispielsweise auch der Anpassung an trockene oder heiße Standorte. Zudem werden Abwehrstoffe gegen Fraßfeinde, wie Terpene, Phenole und Alkaloide akkumuliert, die Ausgangsstoffe für verschiedene toxische Verbindungen sind (Hess, 2004).

Zu den früh induzierten Abwehrmechanismen gehört die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxid ($\bullet\text{O}_2^-$) und Peroxid (O_2^{2-}), aber auch von Stickstoffmonoxid (NO). ROS schädigen das Pathogen entweder direkt oder führen zur vermehrten Bildung von Ligninen, toxischen Phenolen und zur Vernetzung von hydroxyprolinreichen Glykoproteinen der Zellwand, wodurch diese stabilisiert wird (Otte und Barz, 2000). Außerdem werden Benzoesäure und die daraus gebildete Salizylsäure an den Stellen der Infektion angereichert, die wiederum die Bildung von "Pathogenesis Related"-Proteinen (PR-Proteine) induzieren (Hess, 2004).

PR-Proteine wurden ursprünglich als solche Proteine definiert, die von Genen der Wirtspflanzen kodiert und ausschließlich nach Pathogenbefall induziert werden (Antoniw et al., 1980). Daneben existieren jedoch auch verwandte Proteine, die bereits konstitutiv in uninfizierten Pflanzen oder Geweben auftreten und deren Expression unter Pathogenbefall verstärkt wird. Diese Proteine werden als "PR-like" Proteine bezeichnet. Die Grenzen zwischen beiden ist nicht immer eindeutig, da es auch Proteine gibt, die in einer Pflanzenart konstitutiv sind, in der zweiten jedoch erst induziert werden. Daher werden inzwischen beide Gruppen unter dem Begriff PR-Proteine zusammengefasst (Muthukrishnan et al., 2001).

Die ersten fünf PR-Proteine wurden aus Tabakblättern nach einer Infektion mit Tabakmosaikviren isoliert. Seitdem hat sich die Anzahl der sequenzierten und charakterisierten PR-Proteine sowohl aus dikotylen, als auch aus monokotylen Pflanzen stark erhöht, so dass mittlerweile 14 Gruppen unterschieden werden (Van Loon und Van Strien, 1999). Die Einteilung erfolgt nach Aminosäuresequenz und biochemischen Funktionen, wobei sich die Mitglieder einer Gruppe aber in Molekulargewicht, isoelektrischem Punkt (pI) und immunologischer Kreuzreaktivität unterscheiden können. Viele PR-Proteine mit saurem pI werden in den extrazellulären Raum abgegeben, wohingegen basische PR-Proteine meist in der Vakuole auftreten.

Die Funktionen der PR-Proteine sind vielfältig. Es gibt beispielsweise β -1,3-Glucanasen (PR-2) und Chitinasen (PR-3, PR-4, PR-8, und PR-11), die die Zellwandbestandteile verschiedener Pilze (Glucan und Chitin) zerstören können. Dabei werden zum einen Oligosaccharide freigesetzt, die wiederum die Expression weiterer PR-Proteine induzieren und zum anderen die Zellwandstrukturen der Pilzzellen selbst aufbrechen (Legrand et al., 1987). Weithin gibt es als "thaumatin-like" bezeichnete Proteine (TLPs, PR-5), die ebenfalls Pilzhyphen angreifen können. Proteine der Gruppe PR-6 inhibieren Proteasen von Insekten oder Mikroorganismen (Green und Ryan, 1972), Proteine der Gruppe PR-9 sind ligninbildende Peroxidasen (Johansson und Karlsson, 1996) und einige Proteine (PR-10) besitzen RNase-Aktivität (Moiseyev et al., 1994). Letztlich werden zudem auch Thionine (PR-13) und Lipidtransferproteine (PR-14) zu den PR-Proteinen gezählt (Van Loon und Van Strien, 1999). Die Hauptfunktion der PR-Proteine besteht also sowohl in der Erzeugung von Signalmolekülen als auch in der aktiven Abwehr von Pathogenen. Jedoch wird ihnen ebenfalls eine Rolle in der Pflanzenentwicklung zugesprochen.

Wichtige Signalstoffe bei der Pathogenabwehr sind Jasmonsäure und Ethylen (Wasternack und Hause, 2002). Jasmonsäuremethylester wurde zuerst in den ätherischen Ölen von Jasmin und Rosmarin gefunden und nach der Entdeckung der wachstumshemmenden und Seneszenz verursachenden Wirkung bei Pflanzen in die Klasse der Phytohormone aufgenommen. Bei der Pathogenabwehr ist Jasmonsäure ein sekundärer Botenstoff und akkumuliert nach mechanischer Verwundung, Pathogenbefall und osmotischem Stress, wodurch wiederum die Synthese von Ethylen stimuliert wird, welches auch in Zusammenhang mit der Förderung der Fruchtreife steht. Systemin, ein Peptidhormon, wird an der Stelle einer Verletzung gebildet und führt systemisch zur Expression verschiedener Abwehrgene, indem es über Jasmonsäure als Signalüberträger wirkt (Farmer, 1994).

1.2.2. Abwehrmechanismen gegen abiotische Stressfaktoren

Abiotische Stressfaktoren treten weit häufiger auf, als allgemein vermutet wird. Hitzeschock oder Lichtstress sind beispielsweise keine außergewöhnlichen Bedingungen an extremen Standorten

1. Einleitung

wie der Wüste, sondern betreffen auch Pflanzen in europäischen Breitengraden. So wird Hitzeschock als eine kurzfristige Temperaturerhöhung von ca. 10 °C und Hochlicht als eine Lichtintensität von über 1 500 μE definiert. Beide Bedingungen findet man bereits an einem klaren Sommertag um die Mittagszeit.

Während bei einem Hitzeschock die Synthese der meisten Haushaltsproteine reduziert wird, steigt die Expression der sogenannten Hitzeschockproteine ("Heat shock protein", HSP) an. HSPs bilden eine große Familie mit konservierten Sequenzen, die in allen Organismen vorkommen und in vielen verschiedenen Kompartimenten der Zelle, wie Kern, Cytosol, Mitochondrien, Chloroplasten und Endoplasmatischem Reticulum (ER) vertreten sind. Weiterhin gibt es verschieden zu den HSP hoch homologe Proteine ("Heat shock cognate", HSC), die jedoch konstitutiv bei gemäßigten Temperaturen auftreten und eine ähnliche Funktionen wie die HSP unter Nichtstressbedingungen ausüben. Die wichtigste Funktion ist die Stabilisierung zellulärer Proteine und die Unterstützung ihrer korrekten Faltung. HSCs werden daher auch als molekulare Chaperone bezeichnet, die ebenfalls beim intrazellulären Proteintransport und bei der Ausbildung von Multimeren helfen (Kruse et al., 1993; Chen et al., 1994). Chaperonine sind eine Gruppe strukturverwandter Proteine aus Bakterien, Mitochondrien oder Chloroplasten, zu denen beispielweise auch das RubisCO-bindende Protein und der GroEL/GroES-Komplex aus *E. coli* gehört (George et al., 2004).

Pflanzen verfügen zudem über eine Vielzahl von Mechanismen, die einer Schädigung durch Lichtstress entgegenwirken. Neben morphologischen (Haare), anatomischen (Epidermis und Cuticula) und zellulären (Anthocyane) Einrichtungen spielen Lichtschutzmechanismen im Chloroplasten eine besondere Rolle. Neben einer Umwandlung der überschüssigen Lichtenergie in Wärme und Fluoreszenz durch Carotinoide und die Chlorophyll-Fluoreszenz spielen enzymatische Reaktionen eine Rolle, die die entstandenen reaktiven Sauerstoffspezies unschädlich machen. Carotinoide wandeln bei der Inaktivierung von angeregtem Triplett-Chlorophyll und Singulett-Sauerstoff Anregungsenergie in Wärmeenergie um. Diese carotinoidvermittelte Energiedissipation ist um den Faktor fünf effektiver als die dem gleichen Zweck dienende Chlorophyll-Fluoreszenz. Eine besondere Rolle spielt der Xanthophyllzyklus. Zeaxanthin kann unter Lichtwirkung durch Deepoxidation aus Violaxanthin entstehen. Im Dunkeln erfolgt die Umkehrreaktion (Epoxidation). Violaxanthin fungiert somit als Puffer für die kurzfristige Reaktion auf Lichtstress (schnelle Umwandlung in Zeaxanthin), führt aber auch zur langfristigen Adaption durch eine gesteigerte Synthese. Die bei Lichtstress durch eine Elektronenübertragung von reduzierten Komponenten des Photosystems I auf Sauerstoff entstehenden Superoxidation-Radikale ($\bullet\text{O}_2^-$) werden durch Superoxid-Dismutase zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgesetzt. Das aus $\bullet\text{O}_2^-$ gebildete O_2^{2-} wird durch die Ascorbat-Glutathion-Redoxkette zu Wasser reduziert und dadurch unschädlich gemacht. Für das aus einer Reaktion $\text{O}_2^{2-} + \bullet\text{O}_2^-$ entstehende Hydroxylra-

1. Einleitung

dikal ($\bullet\text{OH}$) existieren keine spezifischen Abbaumechanismen. Im Chloroplasten liegen jedoch unspezifisch wirkende Radikalfänger (Ascorbat, α -Tocopherol, Glutathion) und Catalasen vor, die dieses Radikal abfangen können (Westhoff, 1996)

Neben den oben beschriebenen überwiegend kurzfristigen Strategien zum Schutz gegen Lichtstress kann bei Pflanzen eine langfristige Stressantwort auf der Ebene der Genexpression nachgewiesen werden. Zu diesen sogenannten Lichtstressproteinen zählen die ELIPs, HL#13 und HL#2 (Pötter et al., 1996).

ELIPs sind positiv unter Lichtstress regulierte Proteine und bisher sehr weitgehend untersucht. Sie wurden bei der Ergrünung etiolierter Gersten- und Erbsenpflanzen als schnell und transient exprimierte Proteine entdeckt und wurden daher "Early Light Inducible Proteins" genannt (Meyer und Kloppstech, 1984; Grimm und Kloppstech, 1987). Es handelt sich um kernkodierte, plastidäre Proteine mit drei Transmembrandomänen, die im Cytosol als Vorstufenproteine mit Transitsequenz translatiert und nachfolgend in den Chloroplasten importiert und in die Thylakoidmembran integriert werden. ELIPs zeigen Sequenzhomologien zu den Chlorophyll a/b-bindenden Proteinen des Lichtsammelkomplexes und sind möglicherweise selbst in der Lage, Chlorophyll a zu binden (Adamska et al., 2001). ELIPs treten nicht nur bei der Ergrünung in Erscheinung, sie werden auch bei grünen Pflanzen unter Hochlichteinfluss gebildet, wobei zusätzlicher Kältestress synergetisch wirkt (Adamska und Kloppstech, 1994; Montane et al., 1997). Neuere Untersuchungen zeigen, dass ELIPs entweder durch Bindung von Chlorophyllen, die unter Lichtstress von pigmentbindenden Proteinen freigegeben werden, oder durch Stabilisierung dieser Proteine vor photooxidativem Stress schützen (Hutin et al., 2003).

Auf der Suche nach weiteren Proteinen, die unter Lichtstress eine veränderte, positiv regulierte Expression zeigen, wurden durch eine Subtraktionsklonierung lichtstressinduzierbare cDNAs aus den Primärblättern der Gerste isoliert. Die Klone HL#2 und HL#13 ("High Light"-Klone Nummer 2 und 13) wurden nachfolgend genauer analysiert.

HL#13 entspricht der P-Untereinheit der Glycinecarboxylase. Dieses Enzym ist ein kernkodiertes, mitochondriales Protein, das in Zusammenhang mit der Photorespiration steht. HL#13 wird wie die ELIPs während der Ergrünung und unter Hochlicht akkumuliert, ist jedoch bereits konstitutiv in etiolierten Blättern enthalten. Der mRNA-Level steigt daher nicht so stark, wie der des LHC II (Light Harvesting Complex II) unter Ergrünungsbedingungen. Pötter et al. (1996) zeigen, dass nicht nur Chloroplastenproteine, sondern auch Proteine der Mitochondrien unter Lichteinfluss stehen.

Eine ähnliche transient erhöhte Expression während der Ergrünung wie die der ELIPs zeigt die mRNA des HL#2-Proteines, das Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist und deshalb im folgenden Abschnitt ausführlicher beschrieben wird.

1.3. HL#2 und Horcolin

Die nachfolgenden Daten fassen die wesentlichen, zu Beginn der vorliegenden Arbeit bekannten Ergebnisse der Untersuchungen zu HL#2 und Horcolin zusammen, die in der Vergangenheit veröffentlicht wurden (Pötter et al., 1996; Menhaj, 1998; Menhaj et al., 1999; Mishra et al., 1999; Rupprecht, 2001; Grunwald, 2002).

HL#2 wurde entsprechend einer Subtraktionsklonierung ebenfalls als eine durch Lichtstress induzierbare cDNA aus Gerstenblättern isoliert. Die folgenden Untersuchungen zeigten, dass HL#2 konstitutiv in etiolierten und ergrünten Primärblättern exprimiert wird, die mRNA jedoch unter Hochlichteinfluss und während der Ergrünung akkumuliert. Unter Lichtstress steigt der mRNA-Level innerhalb weniger Stunden an und verbleibt dann auf dem erhöhten Level, solange der Stress andauert. Je stärker der Lichtstress, desto mehr HL#2-mRNA akkumuliert (getestet bis 2000 μE). Bei einer anschließenden Erholungsphase nimmt die Transkriptmenge innerhalb weniger Stunden wieder ab. Die erhöhte Expression während der Ergrünung ist jedoch nur transient. Hierbei steigt der Transkriptlevel innerhalb von zwei Stunden um etwa das Zehnfache auf einen maximalen Wert, um dann während der nächsten 24 Stunden langsam wieder auf den Ausgangswert abzusinken. Die mRNA-Mengen von HL#2 schwanken leicht im Tagesverlauf, so dass von einer circadianen Rhythmik mit einem Maximum wenige Stunden nach dem Beginn der Lichtphase ausgegangen werden kann. Vergleiche auf der Nukleotidebene ergaben bereits erste Hinweise zur Verwandtschaft mit den cDNAs zu stressinduzierbaren Proteinen aus *Oryza sativa* (Pötter et al., 1996).

Durch die Überexpression und Aufreinigung des HL#2-Proteines durch Menhaj (1998) ist es gelungen, einen Antikörper gegen das Fusionsprotein aus HL#2 und Glutathion-S-Transferase (GST) herzustellen, der im Western Blot neben der Bande des HL#2 mit einem apparenten Molekulargewicht von 18 kDa eine zweite, 15,5 kDa große, kreuzreaktive Proteinbande erkennt. Dieses Protein wurde ursprünglich HL#2* oder "kleines" HL#2 genannt und unter diesem Namen auch erstmals veröffentlicht (Menhaj, 1998; Menhaj et al., 1999; Mishra et al., 1999). Beide Proteine sind löslich. Man ging davon aus, dass beide Proteine möglicherweise unterschiedliche Produkte des gleichen Genes seien, die sich im N-Terminus unterscheiden. Die Aufreinigung und Sequenzierung dieses zweiten Proteines (Grunwald, 2002) ergab schließlich, dass es sich zwar um ein eng verwandtes Protein handelt, doch dass es durch ein eigenes Gen kodiert wird, wobei beide Gene vermutlich in einfacher Kopie im Genom der Gerste vorliegen. Auch konnte gezeigt werden, dass HL#2* gewebespezifisch nur in den Koleoptilen auftritt, wohingegen HL#2 sowohl in Blatt, Koleoptile und in geringerer Konzentration auch in der Wurzel vorkommt (Menhaj et al., 1999; Rupprecht, 2001). Aufgrund der nachfolgenden Charakterisierung durch Sequenzvergleiche und biochemischer Eigenschaften wurde HL#2* Horcolin (**H**ordeum vulga-

re **coleoptile lectin**) genannt und tritt unter diesem Namen in den späteren Publikationen auf (Grunwald, 2002).

Für weitere Untersuchungen des HL#2 auf Proteinebene ist von Grunwald (2002) ein zweiter Antikörper gegen ein Peptid des HL#2 hergestellt worden, der spezifisch für HL#2 ist und andere verwandte Proteine, wie das Horcolin nicht erkennt. Die Untersuchungen zeigten, dass die HL#2-mRNA zwar nur bei Lichtstress akkumuliert, der Proteinlevel in allen Versuchen zur Hochlichtinduktion dagegen unverändert bleibt. In etiolierten Koleoptilen ist das Protein nicht nachweisbar und wird erst bei der Ergünung gebildet. Zudem konnte eine erhöhte Expression von HL#2 nach Jasmonatbehandlung sowohl auf mRNA, als auch auf Proteinebene gezeigt werden. Für Horcolin wurden bisher keine Untersuchungen zu Transkriptmengen vorgenommen.

Es handelt sich bei HL#2 und Horcolin um Proteine mit Lektineigenschaften. Sequenzhomologien zeigen eine Verwandtschaft mit den jacalinverwandten Lektinen aus verschiedenen Pflanzen, wie beispielsweise Calsepa aus *Calystegia sepium* (Peumans et al., 2000b), Heltuba aus *Helianthus tuberosus* (Van Damme et al., 1999) und Ipomoelin aus der Süßkartoffel (Imanishi et al., 1997).

1.4. Lektine in Pflanzen

Lektine sind kohlenhydratbindende lösliche Proteine ohne enzymatische Aktivität gegenüber den gebundenen Zuckerresten. Aufgrund des multimeren Aufbaus in Form von Di-, Tetra- oder Hexameren sind sie in der Lage, Glykoproteine und Glykolipide bzw. Zellen, die entsprechende Zuckerreste auf ihrer Oberfläche enthalten, zu vernetzen und dadurch zu fällen (agglutinieren). Lektine wurden erstmals durch die erythrozytenagglutinierenden Eigenschaften von Pflanzenextrakten entdeckt. Sie kommen aber auch bei Bakterien, Wirbellosen und Säugetieren vor. Bei Schnecken und Krebsen bauen sie ein primitives Abwehrsystem auf, bei Säugern hingegen dienen sie der Zell-Zell-Erkennung und der Bildung von Kontakten zwischen Tumor und Killerzellen oder Makrophagen. Außerdem wirken sie mitogen und stimulieren die interzelluläre Kommunikation durch die Freisetzung von Botenstoffen, wie z. B. den Interferonen.

Ihre biologischen Funktionen in Pflanzen sind bisher nicht geklärt. Man vermutet jedoch eine Rolle bei der Zellerkennung, wie z. B. bei der Erkennung der symbiontischen Knöllchenbakterien durch die Zellen der Wurzelhaare bei Leguminosen. Einige in Samen vorkommende Lektine sind für tierische Organismen hochgiftig, sie wirken gleichzeitig als Vorratsproteine und als Schutz vor Fraßfeinden.

Untersuchungen der Pflanzenlektine auf molekularbiologischer und biochemischer Ebene, einschließlich der Strukturanalyse erlaubte die Einteilung dieser heterogenen Gruppe in sieben

1. Einleitung

Familien mit strukturell und evolutionär verwandten Proteinen (Peumans et al., 2001). Neben den klassischen großen Familien der Lektine der Leguminosen, der chitinbindenden Lektine, der Typ-2-Ribosomen-inaktivierenden Proteine und der mannosebindenden Lektine der Monokotylen, betrachtet man die Amaranthine, die Phloemlektine der Cucurbitaceae und die jacalinverwandten Lektine als separate kleine Familien.

Während der letzten Jahre wurde der letztgenannten Familie viel Aufmerksamkeit gewidmet, da sie bei Höheren Pflanzen weit verbreitet ist und möglicherweise eine Rolle in der Pathogenabwehr spielt. Nach der ersten Isolierung des T-Antigen-spezifischen Agglutins Jacalin aus Samen des Jackfruchtbaumes (*Artocarpus integrifolia*) (Sastry et al., 1986), wurden Proteine ähnlicher Sequenz innerhalb weniger Gattungen der Familie der Maulbeergewächse (Moraceae) gefunden. Die Entdeckung weiterer jacalinähnlicher Lektine in *Calystegia sepium* (Convolvulaceae) (Van Damme et al., 1996), *Helianthus tuberosus* (Asteraceae) (Van Damme et al., 1999) und *Musa acuminata* (Musaceae) (Peumans et al., 2000a) zeigt jedoch, dass die jacalinverwandten Lektine keineswegs nur auf die Familie der Moraceae beschränkt sind (Zhang et al., 2000). Nach Peumans et al. (2000b) lässt sich die Gruppe der jacalinverwandten Lektine aufgrund ihrer Zuckerbindungseigenschaften weiter in zwei Untergruppen unterteilen: in die galaktosebindenden und die mannosebindenden Lektine.

Aufgrund neuester Untersuchungen mittels der Fluoreszenzmikroskopie wurde die Lokalisation des galaktosespezifischen Jacalin in der Vakuole der Samen des Jackfruchtbaumes und des mannosespezifischen Calsepa im Cytoplasma des Rhizoms von *Calystegia sepium* postuliert. Aufgrund dieser Erkenntnisse stellen Peumans et al. (2000b) die Hypothese auf, dass die beiden oben genannten Untergruppen der jacalinverwandten Lektine in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten lokalisiert sind.

In Reispflanzen induziert Salzstress (in Form von NaCl) die Synthese eines mannosebindenden Lectins, das in den zwei Isoformen Orysata 1 und Orysata 2 auftritt. Zhang et al. (2000) nehmen an, dass die nativen Proteine Dimere sind, die aus zwei identischen etwa 15 kDa großen Untereinheiten bestehen. Sequenzvergleiche bestätigen die Verwandtschaft von Orysata mit den Lektinen Calsepa (aus *Calystegia sepium*) und Heltuba (aus *Helianthus tuberosus*) aus der Familie der jacalinverwandten Lektine. Weiterhin ist die N-terminale Aminosäuresequenz nahezu identisch mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz der SalT-cDNA aus *Oryza sativa* (in Position 7 enthält SalT Leucin statt Prolin). Garcia et al. (1998) zeigen, dass *salT* ein salzinduziertes Protein kodiert, dessen mRNA bei Salzbehandlung mit 1 % NaCl in Wurzel und Blatt akkumuliert. Weiterhin wird die Expression positiv durch Jasmonat und ABA reguliert. Zhang et al. (2000) gehen aufgrund der 97 %igen Sequenzhomologie davon aus, dass SalT ebenfalls zu der Gruppe der Lektine gehört und beschreiben damit das erste Lektin, das speziell durch Salzstress induziert wird. Ein drittes Protein, welches ebenfalls im N-terminalen Bereich mit SalT und Ory-

sata beinahe identisch ist, wurde von Hirano et al. (2000) aus Reis isoliert und aufgrund seiner zuckerbindenden Eigenschaft MRL (mannose-binding rice lectin) genannt.

Im Gegensatz zu den verwandten Lektinen, die vorwiegend im Cytosol oder der Vakuole vorkommen, werden HL#2 und Horcolin als apoplastidäre Proteine diskutiert. So konnte Horcolin und in geringeren Mengen auch HL#2 in der Interstitiellen Waschflüssigkeit (IWF) nachgewiesen werden (Mishra et al., 1999). Immunlokalisationen mit den vorhandenen Antikörpern in der Elektronen- und Fluoreszenzmikroskopie bestätigen dies (Grunwald, 2002; Rupprecht, 2001).

1.5. Der Apoplast

Der Begriff Apoplast wurde zuerst 1930 von E. Münch verwendet. Er beschrieb den Apoplasten als einen wässrigen Raum, der die Protoplasten umschließt, wobei Interzellularräume dazu zählen, sofern auch sie Wasser enthalten. Heute wird die Gesamtheit aller Zellwände mit den Zellzwischenräumen allgemein als Apoplast bezeichnet und dem Symplasten als der Gesamtheit der durch Plasmodesmen verbundenen Protoplasten gegenübergestellt. Die apoplastidäre Matrix ist jedoch nicht gleichförmig, sondern lässt sich in bestimmte Bereiche unterteilen. So wird zwischen dem Xylem-Lumen-Apoplasten, dem Zellwand-Apoplasten und dem Interzellularraum-Apoplasten unterschieden. Für diese Unterbereiche gelten verschiedene Regeln und Umgebungsbedingungen. Im Xylem wird das Wasser aus den Wurzeln entweder passiv über den Transpirationsstrom, hervorgerufen durch das Wasserpotentialgefälle zwischen Pflanze und umgebender Atmosphäre, oder aktiv unter ATP-Verbrauch durch den Wurzeldruck in die oberirdischen Teile der Pflanze geleitet. Der Lumen-Apoplast ist daher vergleichsweise stabil aufgebaut, um den dort herrschenden Kräften widerstehen zu können. Im Zellwand-Apoplasten diffundieren Lösungen oder Wasser passiv. Interzellularräume sind wiederum oft gas- bzw. luftgefüllte Räume (Canny, 1995).

Neben der Abgabe von Wasserdampf kommt es ebenfalls zu einer Abgabe von Wassertropfen, die als Guttation bezeichnet wird. Nach der oben beschriebenen Einteilung muss diese aktive Wasserabgabe dem Xylem-Apoplasten zugeordnet werden. Durch Guttation wird die Versorgung der oberirdischen Pflanzenteile mit gelösten Nährstoffen gewährleistet, auch wenn das Wasserpotentialgefälle bei feuchter Umgebungsluft sinkt. Die Wasserabgabe selbst geschieht durch Hydathoden, die man wiederum in passive und aktive unterteilen kann. Passive Hydathoden scheiden Wasser infolge des Wurzeldruckes aus, bei aktiven liegen Wasserdrüsen vor, die vom Wurzeldruck unabhängig sind (Sitte et al., 1991).

Lange Zeit wurde dem Apoplasten geringe Funktionen zugesprochen. Spätere Untersuchungen zeigten jedoch, dass die extrazelluläre Matrix keineswegs ein reiner Speicher- und Trans-

1. Einleitung

portraum ist, sondern neben der Funktion des apoplastidären Wassertransportes und der Phloem-beladung mit Ionen und organischen Verbindungen auch das Kompartiment darstellt, das mit der Umwelt in Kontakt tritt. Im Apoplasten werden Veränderungen der Umwelt und Stressbedingungen, wie beispielsweise osmotischer Stress und Pathogenbefall erkannt und Signale über die Membran an die Zellen weitergeben. Die Abwehr- oder Anpassungsreaktion erfolgt dann entweder intrazellulär, oder wieder in der extrazellulären Matrix (Dietz, 2001; Hoson, 1998). Hierbei werden auch Proteine, meist über den vesikulären Transportweg des ER/Golgi, über die Plasmamembran in die apoplastidäre Matrix abgegeben. Diese zählen nicht nur zu den Proteinen der Zellwand, sondern haben verschiedene Funktionen. Zu diesen Proteinen gehören u. a. auch einige der in Abschnitt 1.2.1 beschriebenen PR-Proteine. Meist sind die Proteine des Apoplasten Enzyme, die im Zusammenhang mit der Abwehr von biotischem und abiotischem Stress gebildet werden, wie beispielsweise verschiedene Isoenzyme von Peroxidasen nach Mehltaubefall in Gerste (Scott/Craig et al., 1995), verschiedene PR-Proteine nach Aluminiumchlorid-, Phosphat- oder Salicylsäurebehandlung und Mehltaubefall in Gerste (Tamas et al., 1997; Tamas und Huttova, 1996; Tamas und Huttova, 1998) oder β -1,3-Glucanase- und Chitinase-Isoformen nach *Xanthomonas campestris*-Infektion von Paprika (Lee und Hwang, 1996).

Auch in der Guttationsflüssigkeit sind Proteine zu finden, die zu den PR-Proteinen gezählt werden. So können wiederum Peroxidasen, β -Glucanasen, Chitinasen und Proteasen nachgewiesen werden (Grunwald et al., 2003), die vermutlich zum Abwehrsystem der Pflanze beitragen und die Hydathoden vor dem Eindringen von Mikroorganismen schützen können (Fukui et al., 1999).

1.6. Arbeitsprogramm

HL#2 und Horcolin aus der Gerste sind eng miteinander verwandte Mitglieder einer weit verbreiteten Proteinfamilie mit Lektineigenschaften. Diese Familie umfasst jacalinverwandte Proteine, die in der Lage sind, spezifisch an verschiedene Zuckerreste wie Mannose oder Galaktose zu binden. HL#2 und Horcolin stellen hier eine Besonderheit dar, da sie, im Gegensatz zu den verwandten, cytoplasmatisch beschriebenen Proteinen mit großer Wahrscheinlichkeit apoplastidär lokalisiert sind. Dieses Vorkommen im Apoplasten soll durch die Isolierung der Interstitiellen Waschflüssigkeit (IWF) mit adäquaten Kontrollen untersucht werden. Auch ist die Art des Exportweges bisher ungeklärt, da weder HL#2 noch Horcolin über ein bekanntes N-terminales Signalpeptid für den vesikulären Transport über das ER/Golgi-Membransystem verfügen. Es wird daher von einem bislang unbekanntem Transportweg ausgegangen, der in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden soll.

Zudem konnten bislang aufgrund des Fehlens der genomischen Sequenzen weder die Strukturen der Gene von HL#2 und Horcolin bestimmt und Genkarten erstellt, noch eindeutige Aussagen über die Kopienzahl im Genom vorgenommen werden. Diese offenen Punkte sollen durch die Isolierung genomischer Klone für HL#2 und Horcolin geklärt werden. Dadurch werden auch Aussagen über Promotorregionen getroffen werden können. Da Horcolin nur in den Kuleoptilen der Gerste exprimiert wird, HL#2 jedoch sowohl in Blatt und Kuleoptile, kann von unterschiedlichen, bei Horcolin gewebespezifischen Promotoren ausgegangen werden. Die Promotoren beider Gene sollen miteinander verglichen und hinsichtlich ihrer Regulation analysiert werden. Diese Versuche sollen mittels Klonierung vor ein Reporter-gen und anschließender Transformation erfolgen.

Die für HL#2 bereits durchgeführten Versuche auf Protein- und mRNA- Ebene zum Einfluss verschiedener Umweltfaktoren auf die Genexpression sollen auf Horcolin ausgeweitet werden, um Rückschlüsse auf die mögliche koleoptilspezifische, stressinduzierte Regulation der Expression ziehen zu können.

Aufgrund der vermutlich apoplastidären Lokalisation beider Proteine und der Lektineigenschaften sind HL#2 und Horcolin Proteine mit besonderen biochemischen Eigenschaften. Diese sollen unter besonderer Berücksichtigung der spezifischen Zuckerbindungsfähigkeiten und Quartärstrukturen näher untersucht werden. Über die Funktionen von HL#2 und Horcolin, beispielsweise bei einer Bindung an Zellwandkomponenten zur Stabilisierung unter Stressbedingungen oder bei der Pathogenabwehr, kann bislang nur spekuliert werden. In der vorliegenden Arbeit soll es gelingen, der Funktionsaufklärung etwas näher zu kommen.

Weiterhin wurde bereits früher ein für HL#2 spezifischer Peptidantikörper hergestellt. Einen für Horcolin spezifischen gibt es jedoch noch nicht, so dass dieses Protein bisher nur über den

1. Einleitung

kreuzreaktiven Antikörper gegen das Fusionsprotein aus HL#2 und GST nachgewiesen werden kann. Dieser Antikörper erkennt jedoch auch weitere Mitglieder der jacalinverwandten Lektine. Es soll daher ein für Horcolin spezifischer Peptidantikörper hergestellt werden, der eine eindeutige Unterscheidung von HL#2 und Horcolin erlaubt.

Über die Zusammensetzung und Funktionen von Proteinen im Apoplasten ist bisher wenig bekannt. Proteine konnten ebenfalls in der Guttationsflüssigkeit der Gerste nachgewiesen werden. Um HL#2 und Horcolin als apoplastidäre Proteine im größeren Zusammenhang betrachten zu können, soll die Proteinzusammensetzung der IWF mittels 2D-Gelelektrophorese und Proteinsequenzierung (Massenspektrometrie) analysiert und mit den Daten der Versuche zur Guttationsflüssigkeit verglichen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial und -anzucht

Gerstensamen (*Hordeum vulgare*, cv. Apex, ungebeizt, der Firma CEBECO SAATEN GMBH) werden auf feuchtem Vermiculit (DEUTSCHE VERMICULITE GMBH) ausgesät, mit einer 2 bis 3 cm dicken Schicht Vermiculit bedeckt (Dunkelkeimer) und die Pflanzen in Klimakammern bei 24 °C im 12 h Licht / 12 h Dunkel - Rhythmus (Beginn der Lichtphase um 6.00 Uhr) und einer Lichtintensität von etwa 120 μ E (Leuchtstoffröhren PHILIPS TLD 36W / 33 oder SILVANIA GTE Standard F36W / 133 "Cool White") angezogen. Die Pflanzen werden mit Leitungswasser gegossen. Diese Parameter gelten im Weiteren für die Bezeichnung Anzucht oder Inkubation unter "Normalbedingungen".

Für etiolierte Pflanzen erfolgt die Anzucht in abgedunkelten Klimakammern bei 24 °C.

Nach 5 bis 6 Tagen erreichen die Primärblätter aus der Anzucht unter Normalbedingungen eine Länge von ca. 8 cm, die Koleoptile eine Länge von ca. 3 cm. Die Primärblätter aus Dunkelanzucht wachsen ebenso schnell, sind jedoch bis zum 5. Tag der Anzucht vollständig von der Koleoptile ummantelt (ca. 7 cm). Erst an Tag 6 stellt sich das Koleoptilwachstum langsam ein und die Spitze des Primärblattes schiebt sich aus der Koleoptile.

2.1.1. Behandlungen

2.1.1.1. Hochlicht

Für eine Hochlichtbehandlung bei 1 500 μ E (Metalldampf lampen [HQI-T 400 W / D] von OSRAM) in Klimakammern wurden 6 Tage alte und unter Normalbedingungen angezogene Gerstenpflanzen verwendet. Um ein zu starkes Erwärmen des Topfes zu vermeiden und eine optimale Ausleuchtung der Blätter zu erreichen, wird die Oberfläche des Vermiculits mit Perligran G (DEUTSCHE PERLITE GMBH) bestreut, so dass das eingestrahlte Licht zum Großteil reflektiert wird. Perligran G ist pH-neutral und salzfrei und hat auf das Pflanzenwachstum keinen Einfluss. Je nach Versuchansatz wurden 5 °C (Hochlicht und Kälte) oder 24 °C als Umgebungstemperatur (nur Hochlicht) gewählt (Montane et al., 1997).

2.1.1.2. Phytohormone

Die Behandlungen mit Jasmonat und Abscisinsäure (ABA) erfolgten entweder als Bad- oder Boxversuche. Bei den Boxversuchen werden ganze Pflanzen in Töpfen mit 45 μM Methyljasmonat (FIRMENICH) bzw. 100 μM ABA-Lösung (SIGMA, A-1049) (jeweils in Leitungswasser) sowohl gegossen, als auch besprüht. Um zu vermeiden, dass die leichtflüchtigen Hormone zu Reaktionen bei benachbart angezogenen Pflanzen führen, werden die Behandlungen in abgeschlossenen Plexiglascontainern durchgeführt. Da auf diese Weise im Vergleich zur Normalanzucht sowohl die Luftfeuchtigkeit steigt, als auch die Lichtverhältnisse variieren, werden Kontrollpflanzen auf dieselbe Art behandelt, jedoch nur mit Leitungswasser gegossen.

Bei den Badversuchen (Menhaj et al., 1999) werden die Primärblätter dicht an der Basis abgeschnitten, von den Koleoptilen getrennt und mit diesen schwimmend auf den Hormonlösungen in geschlossenen Glasgefäßen inkubiert. Kontrollpflanzen werden auch hier nur mit Leitungswasser behandelt.

2.1.1.3. Salz

Die Pflanzen werden zunächst unter Normalbedingungen angezogen, jedoch nach der Keimung nur noch wenig gegossen, so dass das Vermiculit zu Beginn der Salzbehandlung leicht trocken ist und die gewünschte Salzkonzentration nicht durch verbliebenes Gießwasser reduziert wird. Die Töpfe werden täglich mit der gleichen Menge der gewünschten Salzlösung (1,5 bis 3,0 % NaCl in Leitungswasser, je nach Versuchsanordnung) gegossen. Vergleichspflanzen werden hier wiederum nur mit Leitungswasser behandelt.

2.1.2. Aufbereitung des Pflanzenmaterials

Je nach Fragestellung wurden entweder Primärblätter mit den Koleoptilen knapp über dem Samen abgeschnitten und gemeinsam weiter behandelt oder die Primärblätter vorsichtig aus den Koleoptilen gezogen, die Koleoptile danach über dem Samen abgeschnitten und getrennt weiter behandelt.

Das Pflanzenmaterial wird bei der Probenahme sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zur Aufbereitung wird das gefrorenen Material in einer Planetenmühle (Pulverisette 5 von FRITSCH) 5 min bei 360 rpm gemahlen, wieder gekühlt und entweder bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert oder in Extraktionspuffer direkt suspendiert.

Für native Aufreinigungen wurde das Pflanzenmaterial nicht eingefroren, sondern direkt nach der Ernte in eisgekühltem Extraktionspuffer (siehe unter 2.3) mittels 10 ml-Glashomogenisator (B. BRAUN MELSUNGEN AG) homogenisiert.

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Isolierung von genomischer DNA aus Höheren Pflanzen

10 ml CTAB-Puffer werden kurz vor Gebrauch mit 20 µl β-Mercaptoethanol versetzt, darin 1 g bis 3 g unter flüssigem Stickstoff gemahlenes Pflanzenmaterial aufgenommen und 1 h bei 65 °C im Wasserbad inkubiert. Währenddessen wird die Suspension in kurzen Abständen geschüttelt. Die Zellbruchstücke werden dann 20 min bei 2 000 xg und RT (Raumtemperatur) abzentrifugiert und der Überstand mit dem gleichen Volumen Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) versetzt und gemischt, um Proteine zu denaturieren und aus der Lösung zu entfernen. Nach weiteren 30 min Zentrifugation (wie vor) wird zur Fällung der Nukleinsäuren der Überstand mit dem gleichen Volumen Isopropanol gemischt. Die hochmolekulare DNA fällt als gut sichtbare, fädige Struktur aus und wird mit einer zu einem Haken gebogenen Pasteurpipette ausgedreht. Um verbliebene Salze auszuwaschen und das restliche Isopropanol zu entfernen, wird die DNA in 70 % Ethanol gewaschen und an der Luft bei RT getrocknet. Je nach Größe des Pellets wird die DNA in 50 bis 200 µl ddH₂O gelöst und bei –20 °C gelagert (Doyle und Doyle, 1990). Zur photometrischen Bestimmung der Konzentration von DNA in µg / ml gilt folgende Beziehung:

$$C_{\text{DNA}} = 50 \cdot f_{\text{Verdünnung}} \cdot OD_{260\text{nm}}$$

Bei der Verwendung der genomischen DNA für besondere Methoden, bei denen eine Kontamination mit RNA störend ist, kann an die beschriebene Isolierung ein RNase A-Verdau angeschlossen werden. Hierfür wird die DNA-Lösung mit DNase-freier RNase A zu einer Endkonzentration von 50 µg / ml versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die so behandelte DNA läßt sich anschließend durch Behandlung mit PCI (pH 8,0) aufreinigen und durch einstündige Inkubation in 0,3 M Na-Acetat (pH 5,2) plus 2,5 Volumenanteilen 96 % Ethanol bei –70 °C fällen, in 70 % Ethanol waschen und nach kurzer Trocknung wiederum in ddH₂O lösen.

CTAB-Puffer 2 % CTAB, 100 mM Tris - HCl pH 8,0, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 2 % PVP 40

PCI pH 8,0 25 Teile 80 % Phenol pH 8,0, 24 Teile Chloroform, 1 Teil Isoamylalkohol (v / v / v)

2.2.2. Agarosegelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel wird Agarose (QA-Agarose™, QBIOGENE) in der gewünschten Konzentration (vgl. Tabelle 2.1) in 1×TAE-Puffer verwendet. DNA-Proben werden mit 6×Probenpuffer versetzt und mit 100 bzw. 300 ng (je nach Taschengröße) des gewünschten DNA-Markers auf das Gel aufgetragen und bei 80 bis 100 V (je nach Gelgröße) für ca. 45 min getrennt.

2. Material und Methoden

Tabelle 2.1.: Agarosekonzentrationen und die jeweiligen Fragmentlängen-Trennbereiche. Zur Orientierung sind die Längen der Fragmente angegeben, die mit den Farbstoffen Bromphenol und Xylencyanol komigrieren.

Fragmentlänge (kb)	Agarosekonzentration (w / v) in %	Bromphenol (bp)	Xylencyanol (kb)
1 bis 30	0,5	1 000	10
0,8 bis 12	0,7	700	6
0,5 bis 7	1,0	300	3
0,4 bis 6	1,2	200	1,5
0,2 bis 3	1,5	100	1
0,1 bis 2	2,0	< 100	0,8

10×TAE-Puffer 400 mM Tris-Acetat, 10 mM EDTA, pH 8,5

6×Probenpuffer 6×Loading buffer von FERMENTAS

2.2.3. PCR-basierte Methoden

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine Methode zur *in vitro*-Amplifikation eines definierten DNA-Fragments. Der Reaktion liegt folgendes Prinzip zugrunde:

DNA wird durch Hitze (94 °C) in ihre Einzelstränge geschmolzen (Melting). Durch Temperaturniedrigung auf ca. 50 bis 60 °C werden zwei spezifische Primer an die denaturierte DNA gebunden (Annealing) und bei 72 °C durch die hitzeresistente DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq-DNA-Polymerase) durch Anfügen von dNTPs verlängert (Extension). Es kommt zu einer Verdopplung der DNA-Fragmente. Durch ein Nacheinanderschalten mehrerer Zyklen kann so eine geringe Menge DNA effizient und hochspezifisch vermehrt werden.

Für einen 50 µl Ansatz werden 5 µl 10×Taq-Puffer, 4 µl dNTPs (2,5 mM je Nucleotid), je 1 µl der Primer (je 10 pmol), 1 µl Template (ca. 10 - 20 ng), 1 µl Taq-Polymerase (1 - 2 U) und 37 µl ddH₂O gemischt.

Für einfache PCR-Reaktionen, die nur zur Überprüfung der Fragmentgrößen dienten, deren Amplifikate aber nicht weiter für eine Klonierung oder Sequenzierung vorgesehen waren, wurde die REDTaq™ DNA-Polymerase von SIGMA verwendet. Für Reaktionen, bei denen ein Proof Reading notwendig war, wurde die Pwo DNA-Polymerase der Firma THERMO HYBAID eingesetzt.

Wenn nicht anders angegeben, wurde für eine PCR das folgende **Standard-Programm** verwendet:

1. 3 min 94 °C (initiale Denaturierung)
2. 30 s 94 °C
3. 75 s Annealingtemperatur
4. 70 s 72 °C
5. Durchlaufe 2 bis 4 35 mal
6. 10 min 72 °C (finale Elongation)
7. Konstante Temperatur von 4 °C

Das Kernstück des PCR-Cyclers ist ein Peltierelement. Der Peltiereffekt beruht auf der Umkehrung des thermoelektrischen Effektes, wobei ein Stromfluß durch eine Temperaturdifferenz zwischen zwei Berührungstellen unterschiedlicher Metalle herbeigeführt wird. Läßt man umgekehrt Strom in einer bestimmten Richtung durch die Metalle fließen, so kühlt sich die Stelle ab, die bei gleicher Richtung des Thermostromes erhitzt werden müßte (Kuchling, 1995). Die Verwendung dieses Bauteils erlaubt die Einstellung der verschiedenen Temperaturen innerhalb weniger Sekunden mit hoher Präzision.

In dieser Arbeit wurden folgende PCR-Cycler verwendet:

BIOZYM DNA Engine PTC-200

HYBAID PCR Express ThermalCycler

BIOMETRA T3 Thermocycler

Tabelle 2.2 enthält alle in dieser Arbeit verwendeten Primer mit Namen, Sequenz, der Schmelztemperatur T_m in °C und zusätzliche Angaben zu Modifikationen.

2.2.3.1. Gradienten-PCR

Die Gradienten-PCR wird verwendet, wenn die optimalen Annealingtemperaturen zur Primer-Hybridisierung nicht bekannt sind. Ein spezielles Programm des PCR-Cyclers legt einen Temperaturgradienten über die Breite des Heizblockes, so daß jeder PCR-Ansatz darin mit einer leicht verschobenen Annealingtemperatur amplifiziert wird. Dieser Gradient ist durch Angabe eines minimalen und eines maximalen Wertes frei wählbar. Die Effizienz der Amplifikationen kann durch Vergleich der Bandenstärke bei gleicher Auftragsmenge im Agarosegel überprüft werden.

2. Material und Methoden

Tabelle 2.2.: Verwendete Primer. Angegeben sind neben Name und Sequenz auch die T_m in °C. ^C bedeutet, dass der Primer innerhalb der cDNA Spleißingstellen überspannt und daher nicht mit genomischer DNA als PCR-Template verwendet werden kann. Primer mit der Kennzeichnung ^G binden außerhalb der cDNA in Introns oder Upstream-Regionen des Genes und können daher nur mit genomischer DNA verwendet werden. ^{C/G} kennzeichnet Primer, die innerhalb der cDNA nicht über Spleißingstellen liegen und daher sowohl mit cDNA als auch genomischer DNA verwendet werden können. ^V kennzeichnet Primer, die in einem Vektor binden. Eingefügte Schnittstellen als 5'-Extensionen sind fett gedruckt.

Name	Sequenz	Tm °C
HL2-fwd ^{C/G}	5'-TCT CCA TCT CGG CGC TTC GTT-3'	80 °C
HL2-rev ^{C/G}	5'-AGG CTG TAG TGC GTG CTG TCC A-3'	78 °C
Horcolin-fwd ^{C/G}	5'-GCA CGA GCT AAG TCA CTC TTC T-3'	69 °C
Horcolin-rev ^{C/G}	5'-CAA GCA GAC GCT GCC GGT AGT A-3'	78 °C
HL2-invers-fwd ^{C/G}	5'-GCT CCA TGA TAT GCT GTG CT-3'	69 °C
HL2-invers-rev ^{C/G}	5'-CGG AGT AAG GAC GGA CCA TT-3'	72 °C
Horcolin-invers-fwd ^{C/G}	5'-GGA TTT GGT AAA GCA GGA GC-3'	70 °C
Horcolin-invers-rev ^{C/G}	5'-GGC AGC AAC CTA TGT ATT GG-3'	69 °C
GSP1-HL2 ^{C/G}	5'-GTG ATG CAG TGC TCG ATC TCC TTG A-3'	80 °C
GSP2-HL2 ^{C/G}	5'-CAC CGA CCA GTC GAC CTG AGT TAT GTA-3'	80 °C
GSP1-Horcolin ^{C/G}	5'-CCG ATG ATC AAC ATA GTA TAG TGC AAG-3'	75 °C
GSP2-Horcolin ^{C/G}	5'-ATA GGT GAA TGC AAT AGC GTC AAC GAT AG-3'	80 °C
GSP3-Horcolin ^{C/G}	5'-ACT TGG TAG CAA TCT CAT TAC AGG CAC AT-3'	80 °C
GSP4-Horcolin ^{C/G}	5'-CTA TTG ACA GTT GTC TCC ATG CAA TGC T-3'	80 °C
Prom-HL2- EcoRI -fwd ^G	5'-GG G/AATTC - ACG AGA CAA GGA GGA TAC ACA TGC-3'	75 °C
Prom-HL2- BamHI -rev ^G	5'-CG G/GATCC - TAA CTC ACA ACG AAG CGC CGA GAT-3'	80 °C
Prom-Horcolin- EcoRI -fwd ^G	5'-GG G/AATTC - GCA TTG CAT GGA GAC AAC TG-3'	70 °C
Prom-Horcolin- BamHI -rev ^G	5'-CG G/GATCC - GGC AGC AAC CTA TGT ATT GG-3'	69 °C
HL2- NcoI -fwd ^C	5'-CTAG C/CATGG A - A ATG AGC AGC AGC CCG GTG-3'	77 °C
HL2- BglIII -rev ^C	5'-GA A/GATCT G - GA TGC GAG ACT GGT C-3'	54 °C
GFPbsfor ^V	5'-CTG GAG TTC GTG ACC GCC GCC GG-3'	72 °C
GFPbsrev ^V	5'-GCT TGC CGT AGG TGG CAT CGC CCT-3'	70 °C
Intron1-HL2-fwd ^G	5'-CTC GGC GCT TCG TTG TGA GTT A-3'	78 °C
Intron1-HL2-rev ^G	5'-AAC AGC AAC CTG CCA TGA GTC C-3'	77 °C
Exon1-HL2-rev ^{C/G}	5'-CGG TGT GCA GCT GGT TGT CCT T-3'	80 °C
Exon2-HL2-fwd ^{C/G}	5'-GTA CAT AAC TCA GGT CGA CTG G-3'	67 °C
Exon2-HL2-rev ^{C/G}	5'-TGG ACA GGA TCA ATG CAC ATG G-3'	77 °C
Exon2-Horcolin-fwd ^{C/G}	5'-TAG ACG CTA CGA ACT ACG TGA CC-3'	72 °C
Exon2-Horcolin-rev ^{C/G}	5'-ACT ACG CCA CCT CCT TCT TCC AG-3'	77 °C
Horcolin-fwd-neu ^{C/G}	5'-CTC TTC TAG ACC AAT ACA TAG G-3'	61 °C
Leader-HL2- NcoI -fwd ^G	5'-CATG C/CATGG - GT CCG TCC TTA CTT CGG CT-3'	70 °C
Leader-HL2- BglIII -rev ^G	5'-GA A/GATCTA - GC TCT GCA CGC GCA CAC AA-3'	78 °C
MT-EF-fwd ^{C/G}	5'-CAA TGT GAG AGG TGT GGC AAT C-3'	73 °C
MT-EF-rev ^{C/G}	5'-GGA GTG AAG CAG ATG ATC TGT TG-3'	72 °C

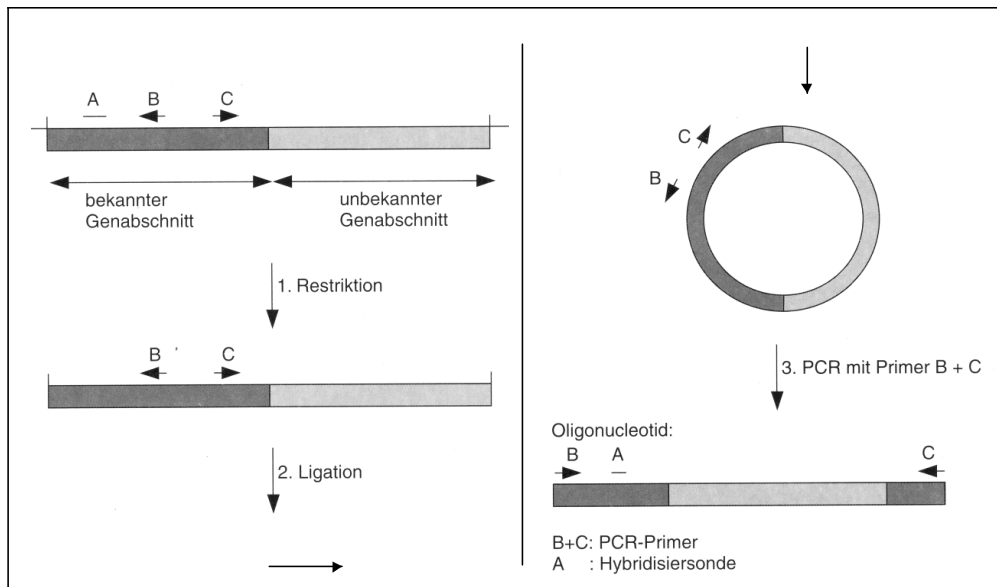


Abbildung 2.1.: Schema der Inversen PCR aus Gassen et al. (1994).

2.2.3.2. Inverse PCR

Die inverse PCR verwendet Primerpaare, bei denen der Forward- und Reverse-Primer vertauscht sind, bei linearer DNA also auseinanderlaufend wären und kein Fragment amplifiziert werden könnte. Bei dieser Methode wird jedoch genomische DNA nach der in Abschnitt 2.2.1 beschriebenen Methode isoliert und mit Restriktionsenzymen inkubiert, die eine 4 bp lange Erkennungssequenz besitzen und daher im Mittel alle 256 bp schneiden (4^n , wobei n die Länge der Erkennungssequenz ist). Die so fragmentierte DNA wird zu kleinen zirkulären DNA-Fragmenten ligiert. Auf diese Weise können unbekannte Regionen, die eine bekannte Sequenz flankieren, isoliert und kloniert werden (vgl. Abbildung 2.1).

2.2.3.3. "nested" PCR, GenomeWalker™ System

Über eine "nested" PCR, oder auch Doppel-PCR (D-PCR) wird ein erhaltenes PCR-Produkt für den Spezifitätsnachweis mit einer Kombination aus neuen, intern gelegenen Primern nochmals in der PCR amplifiziert. So wird sichergestellt, dass nur spezifische Produkte der ersten PCR als Substrat der zweiten dienen können, wobei die PCR-Produkt-Ausgangsmenge sehr gering (im pg-Bereich) gehalten werden sollte (Gassen et al., 1994).

Das von der Firma BD Biosciences CLONTECH angebotene Kit Universal GenomeWalker™ in Verbindung mit dem Advantage® Genomic Polymerase Mix nutzt das Prinzip der "Nested" PCR mit genomischer DNA in besonderer Weise und soll daher näher beschrieben werden (Siebert

2. Material und Methoden

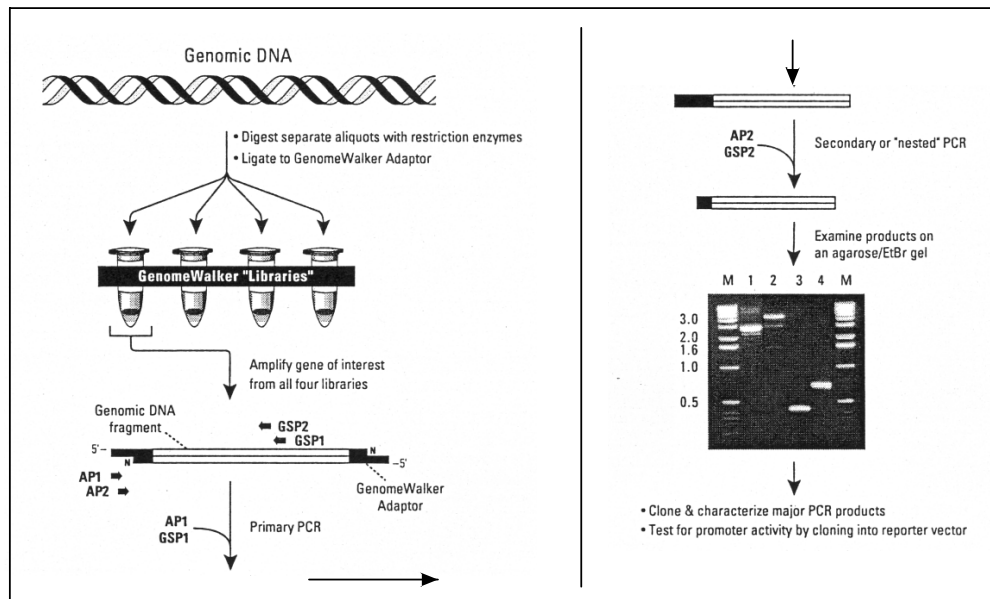


Abbildung 2.2.: Prinzip der Walk PCR (Clontech, 1999).

et al., 1995; Johansson und Karlsson, 1996; Barnes, 1994; Cheng et al., 1994; Veske et al., 1997; Sablowski und Meyerowitz, 1998; Yang et al., 1999; Mansfield et al., 1998).

Abbildung 2.2 zeigt das Prinzip der GenomeWalk-Methode. Zunächst werden adapterligierte, sogenannte Libraries hergestellt. Hierfür wird sehr saubere und hochmolekulare genomische DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut, die eine 6 bp lange Erkennungsstelle besitzen und blunt end schneiden. An die verdaute DNA wird ein spezieller GenomeWalker Adapter ligiert. Diese Libraries werden für eine erste PCR mit einem eigenen genspezifischen Primer und einem adapterspezifischen Primer (AP1) verwendet. In einer zweiten PCR werden die Produkte der ersten PCR mit intern gelegenen Adapter- (AP2) und genspezifischen Primern amplifiziert, wie bereits für die "nested PCR" beschrieben. Die adapterspezifischen Primer AP1 und AP2 (Sequenzen siehe in der Abbildung 2.3) sind im Kit enthalten, die genspezifischen Primer (GSP) werden anhand der bekannten Genabschnitte selbst gewählt und hergestellt.

Der mitgelieferte Adapter (vergleiche Abbildung 2.3) hat mehrere Besonderheiten, die helfen, unspezifische Amplifikationen zu vermindern bzw. zu eliminieren. Durch eine 5'-Verlängerung ist am Adapter keine Bindungsstelle für den Primer AP1 vorhanden. Diese kann erst durch die Extensionsreaktion ausgehend vom genspezifischen Primer erzeugt werden. Durch eine Blockierung des 3'-Endes mit einer Aminosäure wird zudem eine Extension verhindert, die eine AP1-Bindungsstelle bilden könnte. Zusätzlich wird ein Primer verwendet, der kürzer ist, als der Adapter selbst ("suppression PCR"). Dieser Effekt verhindert eine Amplifikation für den Fall, dass bei

2. Material und Methoden

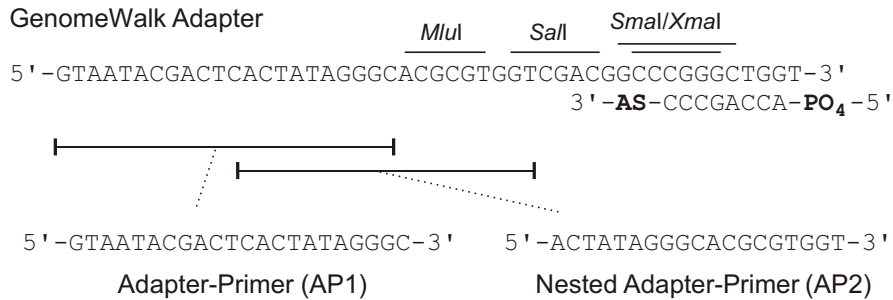


Abbildung 2.3.: Sequenz des Adapters und Bindungsstellen der Primer AP1 und AP2 aus dem Universal GenomeWalker™ Kit.

einer unzureichenden Blockierung der 3'-Endes am Adapter doch eine AP1-Bindungsstelle entstehen würde. Auf diese Art soll eine spezifische Amplifikation ohne Hintergrund sichergestellt werden (Clontech, 1999).

Zur Durchführung siehe GenomeWalker™ UserManual PT1116-1 (PR9Y596) (Clontech, 1999). Abweichungen von der Originalvorschrift sind im Ergebnisteil unter Abschnitt 3.1.1.2 auf Seite 50 beschrieben.

2.2.3.4. Two-Step RT-PCR

Bei einer RT-PCR wird ausgehend von Poly-A-RNA mit einer Reversen Transkriptase cDNA hergestellt, die für weitere PCR-Reaktionen mit DNA-Polymerase verwendet werden kann.

In der Two-Step-Reaktion wird im ersten Schritt 1 µg Gesamt-RNA mit 1 µl einer 10 mM dNTP-Mischung (je 2,5 mM pro Nucleotid) und 1 µl Oligo(dT)23-Primer (10pmol) in einem Gesamtvolumen von 10 µl 10 min bei 70 °C inkubiert. Der Ansatz wird auf 10 °C abgekühlt. Die cDNA-Erststrangsynthese erfolgt nach Zugabe von 10 µl RT-Mix im zweiten Schritt innerhalb einer Stunde bei 42 °C.

RT-Mix 200 U RevertAid™ M-MuLV RT (FERMENTAS) und 1 U RNase-Inhibitor (SIGMA) in 10 µl 1×Puffer für M-MuLV RT (FERMENTAS)

2.2.4. Restriktionsenzymverdau

In dieser Arbeit wurden die Restriktionsenzyme und das Puffersystem "Universal 10 × Y⁺ / Tango™" der Firma FERMENTAS verwendet. Hierfür werden in der Regel 0,2 bis 1 µg DNA mit den gewünschten Enzymen, 10×Puffer und ddH₂Oentsprechend verdünnt und 1 h bei 37 °C (selten andere Temperaturen - siehe Herstellerinformation) inkubiert. 1 U (Unit) Restriktionsenzym

spaltet 1 µg DNA pro Stunde. Die mittlere Häufigkeit der Schnittstellen verschiedener Enzyme im Genom entspricht 4^n , wobei n die Länge der Erkennungssequenz in bp und 4 die Anzahl der Basen (Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin) bezeichnet.

2.2.5. Dephosphorylierung und Ligation

Beim Verdau eines DNA-Moleküles mit Restriktionsenzymen verbleiben Phosphatreste an den DNA-Moleküleenden. Um zu verhindern, dass bei einer nachfolgenden Ligationsreaktion zwischen Vektor und zu klonierendem DNA-Stück die Enden des Vektors ohne Insertion geschlossen werden, können die phosphorylierten Enden des Vektors vor der Ligation dephosphoryliert werden. Soll dagegen ein PCR-Fragment in einen Vektor kloniert werden, darf dieser vorher nicht dephosphoryliert werden, da bei einer PCR keine phosphorylierten Enden entstehen, die für eine Ligation benötigt werden.

In dieser Arbeit wurden jeweils 48 µl eines 50 µl Restriktionsansatzes (mit ca. 2,5 µg Plasmid) mit 10 µl 10×CIAP-Puffer, 37 µl ddH₂O und 5 µl CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, 5 U) auf ein Gesamtvolumen von 100 µl gebracht und 30 min bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wird durch Erhitzen auf 85 °C für 15 min deaktiviert. Es wurden CIAP-Enzym und -Puffer der Firma FERMENTAS verwendet.

DNA-Ligase verbindet unter ATP-Verbrauch zwei DNA-Moleküle durch Phosphordiesterbindung. In der Regel werden für eine Ligation 30 µl Endvolumen angesetzt. Insert und Vektor werden für einen "Sticky-End"-Ansatz im Verhältnis 1 : 3 gemischt und mit 3 µl 10×Puffer, 0,6 µl DTT (50 mM), 0,6 µl ATP (50 mM) und 1 µl T4-DNA-Ligase versetzt und über Nacht bei RT inkubiert. Für einen "Blunt-End"-Ansatz werden Insert und Vektor im Verhältnis 1 : 10 mit 3 µl 5×Puffer, 0,6 µl DTT (50 mM) und 0,6 µl ATP (50 mM) versetzt. Es wurden Enzym und Puffer der Firma HYBAID verwendet.

2.2.6. Elektroporation

Eine Elektroporation muss in einer möglichst salzfreien Lösung vonstatten gehen, da es sonst beim Anlegen eines elektrischen Feldes zu einer schlagartigen Entladung der Kondensatorplatten kommt (Kurzschluß). Lediglich die rekombinante und zu transformierende DNA (negativ geladen) soll im Feld wandern. Beim kurzzeitigen Anlegen einer Spannung wird die DNA in Richtung Anode bewegt, wobei sie durch die Zellwände der Bakterien dringt. Die Überlebensrate der frisch transformierten Bakterien ist um so höher, je schneller sie mit Medium versorgt werden.

10 bis 50 ng Plasmid (bzw. 5 μ l eines üblichen Ligationsansatzes) werden in 100 μ l elektro-kompetenten Zellen* aufgenommen. Dieser Transformationsansatz wird in eisgekühlte Elektroporationsküvetten gegeben. Die Elektroporation erfolgt mittels BTX Elektro-Cell-Manipulator ECM 395 bei HV MODE 3 kV (25 μ F und 400 Ω). Die Küvette wird sofort mit 1 ml LB-Medium invertiert und der Ansatz in ein Eppendorfgefäß mit durchstochenenem Deckel (zur Belüftung) überführt. Es folgt eine Inkubation bei 37 °C für 1 h im Schüttler. Danach werden je 20 μ l, 75 μ l und der Rest (abzentrifugiert und das Pellet im Rücklauf resuspendiert) des Ansatzes auf den gewünschten Selektionsplatten ausgestrichen. Es wird über Nacht bei 37 °C inkubiert.

* *E. coli* DH5 α von INVITROGEN, Genotyp: F⁻, Φ 80*lacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*), U169, *recA1*, *endA1*, *hsdR17* (*r_k*⁻, *m_k*⁺), *phoA*, *supE44*, λ ⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*.

2.2.7. Blau-Weiß-Selektion

Einige der zur Klonierung verwendeten Vektoren (wie z. B. pBluescript[®]SK, siehe Abbildung A.3 auf Seite 138 im Anhang) können für eine Blau-Weiß-Selektion verwendet werden, da bei ihnen die Multiple Cloning Site innerhalb einer *LacZ'*-Region liegt. Bakterienkolonien, bei denen das *LacZ'*-Gen durch die Insertion des DNA-Fragments unterbrochen ist, bleiben nach der Inkubation mit IPTG und X-Gal weiß, während solche ohne Insertion β -Galaktosidase-Aktivität besitzen und sich blau färben.

Je 50 μ l IPTG (100 mM) und X-Gal (4 %) werden auf die Selektionsplatten (LB-Agar mit dem benötigten Antibiotikum in Petrischalen mit 9 cm Durchmesser) pipettiert und mit einem Glasspatel direkt vor dem Ausplattieren der Bakterien ausgestrichen (Antrocknen ist nicht nötig). Die blaue Färbung der Kolonien wird bei kurzer Lagerung der Platten im Kühlschrank intensiver.

2.2.8. Plasmidisolierung

Für Übernachtskulturen werden 10 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und eine einzelne Kolonie mittels steriler Spitze überimpft. Die Kultur wird über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Für eine Plasmidisolierung im größeren Maßstab (z. B. Midi-Präparation) kann diese Übernachtskultur wieder zum Animpfen größerer Volumina verwendet werden.

Zur schnellen Überprüfung der Klonierung empfiehlt sich eine Plasmidisolierung als HB-Lyse. Für weitergehende Versuche, bei denen reine Plasmide benötigt werden (wie z. B. Sequenzierung) sollte eine Präparationsmethode verwendet werden, bei der die Reinigung über eine Säule erfolgt. In dieser Arbeit wurde das MiniSpin oder Midi-Praep Kit der Firma QIAGEN (siehe in Abschnitt 2.4) verwendet.

HB-Lyse von *E. coli*

1. 1,5 ml Übernachtskultur werden 2 min bei 16 000 xg abzentrifugiert und das Pellet in 300 µl Puffer 1 aufgenommen,
2. 300 µl Puffer 2 werden hinzugefügt, gemischt und 5 min bei RT inkubiert,
3. 300 µl Puffer 3 werden hinzugefügt, gemischt und 10 min in Eis inkubiert,
4. es wird 10 min bei 16 000 xg bei RT zentrifugiert,
5. der Überstand wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 10 min bei 16 000 xg zentrifugiert,
6. 400 µl Überstand werden mit 700 µl Isopropanol versetzt, durch Invertieren gemischt und 30 min bei 16 000 xg zentrifugiert,
7. das Pellet wird mit 500 µl -20 °C kaltem, 70 % igem Ethanol versetzt, 2 min inkubiert und 10 min bei 16 000 xg zentrifugiert,
8. das Pellet wird bei 60 °C für etwa 10 min getrocknet und in 50 µl ddH₂O resuspendiert,
9. die Plasmid-DNA wird 10 min bei 50 °C gelöst und bei -20 °C gelagert.

Puffer 1 50 mM Tris - HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg / ml RNase A

Puffer 2 200 mM NaOH, 1 % SDS

Puffer 3 3 M K-Acetat pH 5,5 (mit Essigsäure)

2.2.9. Particle Gun Bombardment

Durch die Particle Gun Bombardment wurden in dieser Arbeit Epidermiszellen von Blattmaterial (meist Gerste) transient transformiert (Barcelo und Lazzeri, 1995; Rasco-Gaunt et al., 1999). Hierbei wird im Ölpumpenvakuum an Goldpartikel ("Microcarrier") gefällte Plasmid-DNA in die Epidermiszellen geschossen, wo sie im Cytoplasma transient exprimiert werden können. Ein Einbau in die chromosomale DNA der Epidermiszelle erfolgt nicht.

Vorbereiten der Goldpartikellösung 40 mg Goldpartikel ("Microcarrier" von BIORAD, 1 µm) werden in 1 ml 96 % Ethanol suspendiert und durch kurzes Zentrifugieren, Verwerfen der Überstandes und Resuspendieren (zweimal in Ethanol, zweimal in ddH₂O) gewaschen. Nach dem letzten, gründlichen Resuspendieren in 1 ml ddH₂O können Aliquots zu je 50 µl bei -20 °C gelagert werden.

Fällung der DNA an die Goldpartikel 50 µl Goldpartikellösung werden 10 min im Ultraschallbad (schwimmend im Styroporhalter) behandelt, bis eine Deagglomeration der Partikel erreicht ist und diese suspendiert sind. 2 - 5 µl Plasmid-DNA (ca. 1 µg / µl) werden zu den sonifizierten Goldpartikeln gegeben und sofort gevortext, um einen guten Kontakt der DNA mit den Partikeln zu erreichen. Während ständigem Vortexen werden tropfenweise 50 µl 0,3 M CaCl₂, dann zügig 20 µl 0,1 M Spermidin zugegeben und zur Fällung der DNA eine weitere Minute geschüttelt. Die Partikel werden dann durch kurzes Zentrifugieren (5-6 s bei ca. 3 000 rpm in der Tischzentrifuge), Verwerfen des Überstandes und Resuspendieren zweimal mit 250 µl 96 % Ethanol gewaschen. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt werden die pelletierten Partikel in 85 µl 96 % Ethanol aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

Vorbereitung der Macrocarrier Die gewünschte Anzahl an Macrocarriern und Metallhaltern werden mit 96 % Ethanol gespült, mit einer Pinzette auf eine möglichst fussselfreie Unterlage aus Papiertüchern gelegt und unter einem Petrischalendeckel getrocknet, um Verunreinigungen zu vermeiden. Die trockenen Macrocarrier werden vor dem Beschuss in die Metallhalter eingelegt und die Goldpartikellösung weitere 3 min sonifiziert. 5 µl des Überstandes werden in die Mitte der Macrocarrier pipettiert und getrocknet.

Particle Gun Bombardment Der Beschuss erfolgte mit dem Particle Delivery System (PDS-1000 / He Biolistic) der Firma BIORAD. Geschossen wurde in der Regel auf die Ober- und Unterseite ganzer Blätter, die kurz vor dem Beschuss an der Basis abgeschnitten und auf 0,5 % Pflanzenagar (DUCHEFA) in Petrischalen gelegt wurden. Hierbei wurde ein Vakuum von 27 - 28 inHg angelegt und durch Auswahl entsprechender Berstscheiben bei gewünschtem Druck geschossen. Die Parameter für den Beschuss verschiedener Pflanzenarten können variieren, daher sind in der Tabelle 2.3 diejenigen angegeben, die in dieser Arbeit verwendet worden sind. Die Dauer der Inkubation betrug in der Regel 2 Tage.

Mikroskopie Die Blätter werden auf einen Objektträger in 50 % Glycerin mit wenig Tween gelegt und mit einem entsprechend großen Deckelgläschen abgedeckt. Die Mikroskopie erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop "Axioskop" Routine-Mikroskop der Firma ZEISS und dem entsprechenden Filtersystem (siehe Tabelle 2.4).

2. Material und Methoden

Tabelle 2.3.: Parameter für den Beschuss verschiedener Pflanzenarten. Der Druck, bei dem geschossen wird, ist in PSI angegeben. Die Stufe gibt den Abstand des Pflanzenmaterials zu dem Macrocarrier an, wobei hier die Einschubleisten im verwendeten System (PDS-1000/HeBiolytic) gemeint sind und die Macrocarrier immer in die 1. Stufe geschoben werden. Weiterhin sind die Parameter zur nachfolgenden Inkubation des beschossenen Pflanzenmaterials angegeben.

Pflanze	Druck	Stufe	Inkubation
Gerste	900	4	24 °C 12 h / 12 h
Tomate	650	4	26 °C 12 h / 12 h
Tabak	450	3	26 °C 12 h / 12 h

Tabelle 2.4.: Filtersysteme zum Nachweis der Reporterproteine. Für die GFP-Fluoreszenz wurde das Filterset 09 (487909 - 0000) von ZEISS, für die DsRed-Fluoreszenz das Set 41021 von AFANALYSEN-TECHNIK verwendet.

Filtersystem	GFP	DsRed
Excitation Filter	BP 450 - 490	HQ 565 / 30
Beam Splitter	FT 510	Q 585 lp
Emission Filter	LP 520	GQ 620 / 60

2.2.10. Isolierung der Gesamt-RNA

Bei dieser Methode zur Isolierung der Gesamt-RNA wird ein Gemisch aus ribosomaler RNA, transfer-RNA und messenger-RNA erhalten, wobei die mRNA einen Anteil von etwa 2 % des Gemisches ausmacht (Mülhardt, 1999).

Alle Arbeitsschritte werden bis zur LiCl-Fällung bei RT durchgeführt.

0,33 g gemörsertes Pflanzenmaterial werden in einem 2 ml-Eppendorfgefäß mit 750 µl 2×Lysispuffer und 750 µl PCI (pH 4,0; bei diesem pH-Wert wird DNA denaturiert und kann somit aus der Lösung entfernt werden) versetzt, 30 min geschüttelt und 20 min bei 18 500 xg zentrifugiert. Es bilden sich zwei Phasen, wobei die untere die organische mit den Zellbruchstücken und Proteinen darstellt. Die obere, wässrige Phase wird ein zweites Mal mit 750 µl PCI gereinigt, 5 min geschüttelt und wiederum 15 min wie zuvor zentrifugiert. Die Fällung der RNA erfolgt durch Versetzen der oberen Phase mit 0,75 Volumeneinheiten 8 M LiCl über Nacht bei 4 °C („Aussalzen“).

2. Material und Methoden

Die folgenden Arbeitsschritte werden bei 4 °C durchgeführt.

Die ausgefallene RNA wird durch 20 min zentrifugieren bei 18 500 xg sedimentiert, in 500 µl ddH₂O resuspendiert und nochmals durch Zugabe von 50 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 1,25 ml 96 % Ethanol (-20 °C) 1 h bei -70 °C gefällt. Die RNA wird durch 20 min Zentrifugieren bei 18 500 g sedimentiert, mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen, im Vakuumrotor getrocknet, in 50 µl ddH₂O aufgenommen und bei -70 °C gelagert.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt am Photometer bei 260 nm. Sinnvoll ist eine 1 : 100 oder 1 : 200 Verdünnung, da nur die OD-Werte (Optische Dichte) zwischen 0,1 und 1 aussagekräftig sind. Zur Kontrolle der Reinheit der RNA wird zusätzlich die optische Dichte bei 280 nm (Proteinkontamination) gemessen. Das Verhältnis der OD-Werte bei 260 nm und 280 nm sollte 2 : 1 betragen.

Zur anschließenden Berechnung der RNA-Konzentration in µg / ml gilt folgende Beziehung:

$$C_{\text{RNA}} = 40 \cdot f_{\text{Verdünnung}} \cdot OD_{260\text{nm}}$$

Lysispuffer 100 mM Tris - HCl pH 8,0, 20 mM EDTA, 600 mM NaCl, 4 % SDS

PCI 25 : 24 : 1 Volumeneinheiten Phenol (80 %, pH 4,0), Chloroform und Isoamylalkohol

2.2.11. Northern-Blot-Verfahren

Beim Northern-Blot-Verfahren können RNA-Mengen sowohl qualitativ, als auch quantitativ untersucht werden.

Denaturierende Agarosegelelektrophorese Die elektrophoretische Trennung von RNA muß unter denaturierenden Bedingungen erfolgen, da der RNA-Einzelstrang zur Bildung von Sekundärstrukturen neigt, die die Laufeigenschaften im Gel beeinflussen können. Es werden denaturierende MOPS-Gele verwendet, die in der Regel aus 1,2 % Agarose in 1×MOPS-Puffer mit 1,2 % Formaldehyd bestehen.

Zur Auftrennung des RNA-Gemisches werden 10 µg Gesamt-RNA mit 3 Volumeneinheiten Northern Mix versetzt, 15 min bei 65 °C denaturiert, kurz in Eis gekühlt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt in 1×MOPS-Puffer für 10 min bei 80 V und weitere 90 bis 120 min bei 100 V.

Der gleichmäßige Auftrag und die Auftrennung der RNA wird unter UV-Licht mit einer Gel Doc 1000 von BIO-RAD überprüft. Im Northern Mix ist bereits Ethidiumbromid enthalten, so dass das Färben nach dem Lauf entfällt.

10×MOPS-Puffer 0,2 M MOPS (sterilfiltriert), 0,05 M Natriumacetat, 0,01 M EDTA, pH 7,0

2. Material und Methoden

Northern Mix 5 ml Lösung 1 + 1 ml Lösung 2 + 40 µl Ethidiumbromid (5 mg/ml); Lösung 1: 1×MOPS pH 7,0, 6,5 % Formaldehyd, 50 % Formamid; Lösung 2: 0,25 % BPB, 0,25 % Xylene Cyanol, 50 % Glycerin, 1 mM EDTA pH 8,0

Blotting Der Transfer der RNA auf eine PALL Biodyne B Nylonmembran erfolgt mittels Kapillarblot. Hierzu wird das Gel mit dem Gesicht nach unten auf einen an beiden Seiten in 20×SSC ragenden 15 cm breiten Whatman-Papierstreifen gelegt, die Membran luftblasenfrei aufgelegt, mit zwei weiteren Whatmanpapierstreifen und einem Stapel saugfähigen Zellstoffs bedeckt und mit 500 g beschwert. Das Blotten erfolgt über Nacht.

Die Nylonmembran wird nachfolgend zwischen Whatmanpapier getrocknet und 30 min bei 80 °C im Trockenschrank gebacken, um die RNA auf der Oberfläche zu fixieren. Der vollständige Transfer auf die Membran kann unter UV-Licht überprüft werden.

20×SSC 3 M NaCl, 0,3 M Na-citrat-2-hydrat, pH 7,0

Radioaktive Markierung von cDNA-Sonden Zur Markierung von cDNA mit ³²P wurde das Kit DecaLabelTM DNA Labeling Kit der Firma FERMENTAS verwendet und in der Regel der Vorschrift gefolgt.

Zur Trennung der markierten cDNA (Sonde) von freien Nucleotiden wird der Labeling-Ansatz mit 100 µl TNE-Puffer versetzt, auf eine mit TNE-Puffer äquilibrierte Sephadex-G-50-Säule gegeben und bei 4 000 rpm für 5 min in einer Biophuge A (Heraeus Christ) abzentrifugiert (Gelfiltration), wobei die ungebundenen Nucleotide im Säulenmaterial verbleiben. Die Sonde wird 5 min auf 95 °C erhitzt, um die DNA-Doppelstränge voneinander zu trennen, und mit Vorhybridisierungslösung verdünnt für die Hybridisierung verwendet.

Um die Einbaurate und die Counts pro ml Hybridisierungslösung bestimmen zu können, werden vor und nach der Gelfiltration je 1 µl des Labeling-Ansatzes auf ein Stück Whatmanpapier pipettiert und im Beckmann-Counter nach Cerenkov (Programm 3, ohne Scintillationsflüssigkeit) die Aktivität in Counts pro ml (cpm) gemessen.

³²P-dCTP der Firma HARTMANN ANALYTICS (FP-205)

TNE-Puffer 10 mM Tris - HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA

Sephadex-G-50-Säule Sephadex G-50 von PHARMACIA: Typ Dextran mit einem Fraktionierungsbereich von 1 bis 30 kDa

Hybridisierung Bei der Northern-Blot-Methode hybridisieren die auf der Membran gebundenen RNA-Einzelstränge und die Einzelstränge der cDNA-Sonde miteinander.

Um unspezifische Bindungen auf der Nylonmembran zu verhindern, wird diese nach der Fixierung für 2 h in Vorhybridisierungslösung (20 ml pro 100 cm²) bei 60 °C geschwenkt und freie Bindungstellen mit denaturierter Lachssperma-DNA abgesättigt. Für die Hybridisierung werden 15 ml Hybridisierungslösung pro 100 cm² verwendet. Sinnvoll ist hierbei eine Aktivität von 1 × 10⁶ cpm. Die Hybridisierung erfolgt bei 42 °C über Nacht. 42 °C ist die in der Regel verwendete Hybridisierungstemperatur, wenn die Lösung 50 % Formamid enthält. Die optimale Temperatur kann aber auch nach folgender Formel genau berechnet werden, was dann sinnvoll ist, wenn Sonden mit ungewöhnlicher Länge oder GC-Gehalt verwendet werden müssen.

$$T_m = 81,5^\circ\text{C} - 16,6 (\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,41 (\% \text{ G+C}) - 0,63 (\% \text{ Formamid}) - 600 / L,$$

wobei [Na⁺] die Natriumkonzentration in mol/l, L die Länge der Sonde in Basen und T_m die Temperatur in °C ist, bei der die Hälfte der Nucleotide in einer Doppelhelix dissoziiert sind. Die optimale Hybridisierungstemperatur liegt 25 °C unter T_m (Mülhardt, 1999).

Zum Entfernen unspezifischer Bindungen der Sonde an nicht homologe Sequenzen wird die Membran nach der Hybridisierung zweimal 15 min mit 2 × SSC, 0,1 % SDS bei RT und zweimal 15 min mit 0,1 × SSC, 0,1 % SDS bei 65 °C gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschritten kann die verbliebene Aktivität auf der Membran mit dem Geiger-Müller-Zähler gemessen werden. Die noch feuchte Membran wird in Folie eingeschweißt, ein Röntgenfilm (KODAK X-OMAT™ AR / XAR 5) aufgelegt und in einer Bleikassette bei -70 °C gelagert. Die Expositionszeit beträgt je nach Aktivität 1 bis 6 Tage. Alternativ kann die Exposition auch mit einem Phosphorimager (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH) gemessen werden. Das hat den Vorteil, dass die Daten durch Scannen der Imagerplatte gleich digitalisiert werden und die Auswertung der Signalstärken mit dem zugehörigen Programm Tina 2.09g erfolgen kann.

Die Hybridisierungslösung kann bei -20 °C gelagert und nach erneuter Hitzedenaturierung ein weiteres Mal verwendet werden. Die Halbwertszeit von ³²P beträgt 14 Tage.

Um eine Membran mit unterschiedlichen Sonden behandeln zu können, lassen sich gebundene cDNA-Sonden durch mehrmaliges Spülen mit 95 °C heißer 0,1 %iger SDS-Lösung entfernen. Dies kann ebenfalls mit dem Geiger-Müller-Zähler überprüft werden.

Vorhybridisierungslösung 50 % Formamid, 5 × Denhardt's, 5 × SSC (siehe unter 2.2.11), 1 % SDS, 100 µg / ml denaturierte Lachssperma-DNA

100 × Denhardt's 2 % Ficoll 400, 2 % Polyvinylpyrrolidin 25, 2 % BSA

2.2.12. Southern-Blot-Verfahren

Mit einem Southern Blot wird anders als beim Northern Blot nicht RNA, sondern DNA untersucht. Durch den Verdau genomischer DNA mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen, elektrophoretischer Auftrennung, Immobilisierung an eine Membran und Hybridisierung mit einer genspezifischen Sonde kann ermittelt werden, ob ein bestimmtes Gen in nur einer Kopie (single copy) oder in mehreren Kopien (multiple copy) im Genom der jeweiligen Spezies vorliegt.

Hierfür wird genomische DNA mit Restriktionsenzymen verdaut, die in der Regel eine 6 bp große Erkennungssequenz besitzen und daher im Mittel alle 4 000 bp schneiden (siehe unter Punkt 2.2.4), wie zum Beispiel EcoRI, BamHI, Hind III etc. und verschiedenen Kombinationen dieser.

10 µg der verdauten DNA (pro Spur) werden mit Probenpuffer versetzt und unter nicht denaturierenden Bedingungen in 0,8 % Agarose in 1×TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Die Doppelstränge der DNA werden vor dem Blotten auf die Nylonmembran durch Inkubieren des Geles in Denaturierungslösung (2×20 min) getrennt, damit eine nachfolgende Hybridisierung mit der Sonde möglich ist. Es schließt sich eine Inkubation in Neutralisierungslösung an (2×20 min), nach der, wie unter 2.2.11 bereits beschrieben, geblottet werden kann.

Denaturierungslösung 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH

Neutralisierungslösung 1 M Tris - HCl pH 8,0, 2 M NaCl

2.3. Proteinchemische Methoden

2.3.1. Isolierung von Proteinen

2.3.1.1. Isolierung von Gesamtproteinen

Zur Isolierung von Gesamtproteinen werden 100 mg unter flüssigem Stickstoff gemahlene Pflanzenmaterial in 300 µl 1×SDS-Probenpuffer suspendiert, 15 min bei 65 °C inkubiert, anschließend kurz aufgekocht und schnell in Eis abgekühlt. Durch zweimalige Zentrifugation (jeweils 20 min bei 12 000 xg) werden die Zellbruchstücke von den denaturierten, im Probenpuffer gelösten Proteinen getrennt. Die Proben können ohne weitere Behandlung für eine SDS-PAGE eingesetzt werden.

3×SDS-Probenpuffer 300 mM Tris - HCl pH 6,8, 6 % SDS, 30 % Glycerin, 7,5 mM EDTA, 0,01 % Bromphenolblau (Vor Gebrauch werden 1 ml 3×PP mit 30 µl 2,6 M DTT versetzt.)

2.3.1.2. Isolierung von löslichen und Membranproteinen

Mit der nachfolgenden Vorschrift läßt sich auf einfache Weise die Fraktion der löslichen Proteine von derjenigen der Membranproteine trennen. Dies ist besonders dann von Vorteil, wenn sich das gesuchte Protein nur in geringen Mengen und nur in einer dieser Fraktionen findet. Bei der oben beschriebenen Gesamtproteinisolierung kann es vorkommen, dass durch die Verdünnung die Nachweisgrenze unterschritten wird.

Weiterhin lässt sich durch die Wahl des pH-Wertes des Extraktionspuffers die Zusammensetzung der Fraktion der löslichen Proteine variieren, wenn zum Beispiel insbesondere die sauer extrahierbaren Proteine von Interesse sind.

Wenn nicht anders angegeben, werden alle Arbeiten bei 4 °C ausgeführt.

500 mg gemörstertes Pflanzenmaterial werden in 1,5 ml Extraktionspuffer (Zusatz von Proteaseinhibitoren ist empfehlenswert [1 % Inhibitorcocktail von SIGMA, oder PMSF]) aufgenommen, 10 min bei RT geschüttelt und 15 min bei 13 500 xg und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand (lösliche Proteinfraction) wird in neue Reaktionsgefäße überführt und das Pellet (Membranproteinfraction) zwei weitere Male mit je 1,5 ml Extraktionspuffer gewaschen. Der Überstand wird verworfen und die Zentrifugationszeit auf je 10 min verringert. Das Pellet aus dem letzten Zentrifugationsschritt wird in 200 µl 1×SDS-Probenpuffer resuspendiert, 5 min gekocht, in Eis gekühlt und ein weiteres Mal zentrifugiert. Der Überstand wird in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20 °C gelagert.

Aus dem Überstand des ersten Zentrifugationsschrittes lassen sich durch zwei weitere Zentrifugationsschritte die letzten unlöslichen Bestandteile entfernen. 1 Volumeneinheit Überstand wird mit 1/2 Volumeneinheit 3×SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min gekocht, in Eis gekühlt und bei -20 °C gelagert.

Bei geringer Proteinkonzentration empfiehlt sich eine Methanol / Aceton-Fällung bei -20 °C, wobei 1 Volumeneinheit Überstand mit 4 Volumeneinheiten Methanol / Aceton gemischt werden. Die gefällten Proteine lassen sich durch 30 min Zentrifugation bei 18 500 xg sedimentieren. Der Überstand wird gründlich abgesaugt, das Pellet 1 bis 2 min im Vakuum getrocknet, in 200 µl 1×reduzierendem Probenpuffer resuspendiert, 5 min gekocht, in Eis gekühlt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Extraktionspuffer Je nach Fragestellung und gewünschtem pH-Wert werden Tris - HCl-Puffer oder Citrat-Phosphat-Puffer mit 1 mM MgCl₂ und 100 mM NaCl verwendet.

Methanol / Aceton zur Fällung 2 : 7 (v / v), -20 °C

2.3.1.3. Isolierung der Proteine der IWF

Proteine des Apoplasten lassen sich nach der "Infiltration-Zentrifugation-Methode" isolieren (modifiziert nach Houge und Asselin, 1987). Hierbei wird der apoplastidäre Raum außerhalb der Plasmamembran, zu dem Zellwände und Interzellularen zählen, durch Infiltration mit einem Puffer und anschließender Zentrifugation "ausgewaschen". Daher spricht man von einer Isolierung der interstitiellen Waschflüssigkeit (IWF). Selten wird diese in der Literatur auch als AWF (apoplastidäre Waschflüssigkeit) bezeichnet. Voraussetzung ist, dass sich die Proteine im verwendeten Puffer lösen lassen. Membrangebundene Proteine werden hierbei nicht isoliert. Lösliche Proteine jedoch, die fest an Komponenten der Zellwand binden, können z. B. durch die Wahl eines geeigneten Puffers (z. B. mit saurem pH-Wert) zugänglich gemacht werden. Bei allen Variationen in Puffer und Zentrifugationskraft muss die Plasmamembran unversehrt bleiben, da sonst Proteine des Cytoplasma die IWF-Fraktion verunreinigen können. Um eine solche Verunreinigung bestimmen zu können, werden Kontrollen durchgeführt, bei denen die IWF auf bekannte und eindeutig intrazellulär lokalisierte Proteine hin untersucht wird. Häufig wird ein Enzymaktivitätstest mit der Malatdehydrogenase durchgeführt (Lohaus et al., 2001). Ein Nachweis mit spezifischen Antikörpern, der weniger pH-abhängig als eine Enzymtest ist, wird im Ergebnisteil unter Abschnitt 3.5.1 auf Seite 70 näher beschrieben.

80 bis 100 Primärblätter 7 Tage alter Gerste werden entweder vorsichtig aus den Koleoptilen gezogen oder mit den Koleoptile knapp über dem Samen abgeschnitten und in 100 ml Infil-

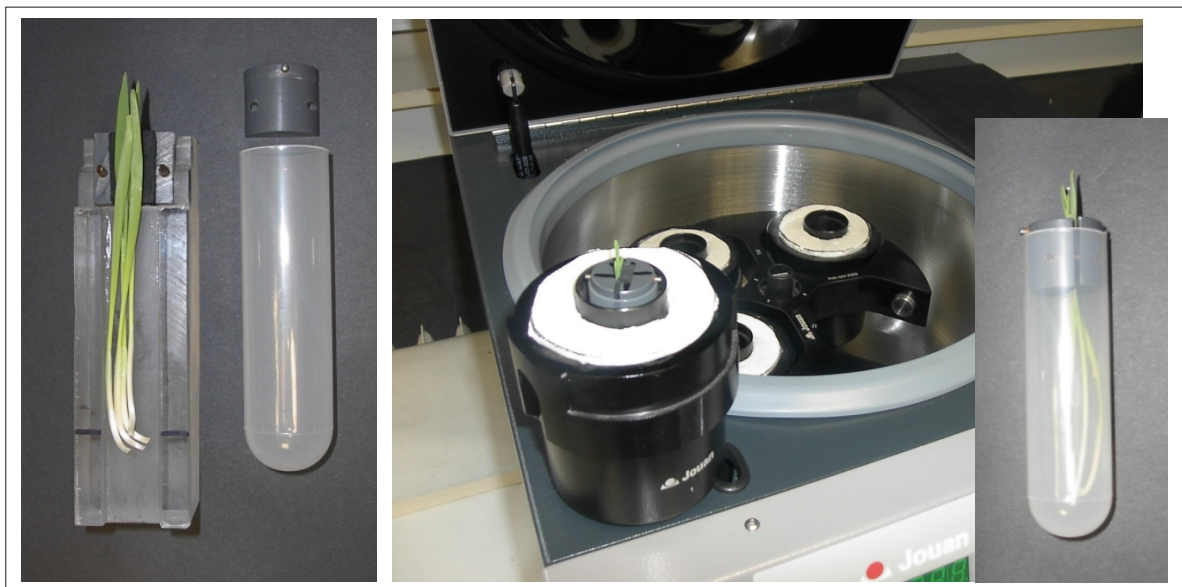


Abbildung 2.4.: Versuchsanordnung zur Isolierung der IWF.

trationspuffer in einer offenen Plastikbox mit einem Gitter so fixiert, dass die Blätter nicht aufschwimmen können. Die Infiltration erfolgt für 15 min unter Ölpumpenvakuum. Jeweils maximal 25 abgetropfte Blätter werden in eine Klemme eingespannt und in ein SS 34-Röhrchen gesteckt. Die Zentrifugationsschritte erfolgen in einer Zentrifuge Jouan CR 3i mit dem Ausschwingrotor T40. Im ersten Schritt werden die Blätter 1 min bei 1 000 rpm (ca. 130 xg) getrocknet und die IWF in einem zweiten Schritt bei 1 500 rpm (ca. 200 xg) in 15 min isoliert. Aus 100 Blättern erhält man so rund 1 ml IWF.

Die Klemmen und Adapter für die Benutzung von SS 34-Röhrchen im T40-Rotor wurden in der institutseigenen Werkstatt hergestellt. Die Versuchsanordnung ist in Abbildung 2.4 gezeigt.

Infiltrationspuffer Je nach Fragestellung und gewünschtem pH-Wert werden Tris - HCl-Puffer oder Citrat-Phosphat-Puffer mit 1 mM MgCl₂ und 100 mM NaCl und 0,005 % (v/v) Triton X-100 verwendet.

2.3.1.4. Isolierung der Proteine der Guttationsflüssigkeit

Als Guttation bezeichnet man die aktive Wasserabgabe der Pflanzen zur Aufrechterhaltung eines konstanten Stromes von den Wurzeln in die oberirdischen Teile, um eine ausreichende Nährstoffversorgung trotz hoher Luftfeuchtigkeit, bei der eine passive Verdunstung nur unzureichend stattfinden kann, zu gewährleisten.

Um Guttationsflüssigkeit sammeln zu können, müssen die Gerstenpflanzen unter hoher Luftfeuchtigkeit angezogen werden, in dem die Pflanzschalen mit einem lichtdurchlässigen Plastikdeckel mit wenigen Belüftungslöchern verschlossen werden. Ansonsten entsprechen die Anzuchtbedingungen den in Abschnitt 2.1 beschriebenen Normalbedingungen.

Die an den Spitzen der Primärblätter gebildeten Tropfen werden über eine Vakuumpumpe in einen eisgekühlten Sammelgefäß aufgefangen und bei -70 °C gelagert (Grunwald, 2002). Die Ernte der Guttationstropfen erfolgt mehrmals über den Tag verteilt, wobei die Proben vereinigt werden. Die Konzentration und Umpufferung der Proteine kann entweder in den Konzentratoren der Firma VIVASCIENCE oder durch Gefriertrocknung erfolgen (siehe Abschnitt 2.3.3).

2.3.2. Methoden zur Proteinkonzentrationsbestimmung

Nachfolgend werden drei Methoden zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen beschrieben, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Die beiden ersteren (Bestimmung mit BCA und nach Bradford) sind photometrische Messungen und liefern exakte Werte. Die zuletzt beschriebene Methode (nach Esen) ist lediglich eine näherungsweise Abschätzung, die jedoch den Vorteil besitzt, besonders schnell und einfach durchführbar zu sein, wenn genaue Werte nicht benötigt

werden. Die Proteinbestimmungen mit BCA und nach Bradford unterscheiden sich in der Wahl der Puffer und deren pH-Werte. Während bei der BCA-Bestimmung die Proteine mit Cu^{2+} -Ionen im alkalischen Milieu einen Komplex bilden, dessen Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen reduziert werden, die mit BCA einen violetten Farbkomplex bilden, bindet bei der Bestimmung nach Bradford der Farbstoff Coomassie in saurem Milieu an Proteine und verschiebt somit das Absorptionsmaximum der Farbe. Das führt zu zum Teil erheblich unterschiedlichen Konzentrationsbestimmungen von sauren und basischen Proteinen (Rehm, 2000). Je nach Anwendung und Fragestellung wurden daher beide Bestimmungen parallel oder nur eine der beiden durchgeführt.

2.3.2.1. Proteinbestimmung nach Smith

Die Bestimmung erfolgt mit Bicinchonininsäure (BCA; 4,4'-Dicarboxy-2,2'-Biquinoline von SIGMA) nach Smith et al. (1985):

Für die gebrauchsfertige Lösung C werden 100 Volumenteile Lösung A und 2 Volumenteile Lösung B gemischt (ca. 1 Woche haltbar). Je 100 μl der zu bestimmenden Proteinlösungen (meist 1:10 verdünnt) und je 100 μl einer Eichreihe mit 0, 0,25, 0,5, 0,75 und 1,0 mg/ml BSA in ddH_2O werden mit 2 ml Lösung C versetzt. Alle Proben werden für 30 min bei 37 °C inkubiert und nach Abkühlung auf RT die OD bei 582 nm mittels Photometer gemessen.

Lösung A 1 % BCA-Na_2 , 2 % $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$,

0,16 % Dinatriumtartrat, 0,4 % NaOH, 0,95 % NaHCO_3 , pH 11,25 mit NaOH oder NaHCO_3

Lösung B 4 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

2.3.2.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung erfolgt nach Bradford (1976) und Reisner et al. (1975).

100 μl der zu bestimmenden Proteinlösung bzw. je 100 μl BSA-Lösung mit bekannter Konzentration (0,25, 0,5 und 1 mg/ml) werden mit 5 ml Bradfordreagenz versetzt, gemischt und 5 min im Dunkeln inkubiert. Bei geringer Proteinkonzentration kann ein Mikroassay durchgeführt werden, wobei für 100 μl Proteinprobe nur 1 ml Bradfordreagenz verwendet wird. Die BSA-Eichreihe sollte dementsprechend verdünnt werden.

Bradfordreagenz 100 mg Coomassie Brilliant Blue G250 (SERVA) werden in 50 ml 96 % Ethanol gelöst und nach Zugabe von 100 ml 85 % Phosphorsäure mit ddH_2O auf 1 l aufgefüllt.

2.3.2.3. Esenfärbung

5 µl der zu bestimmenden Proteinlösung werden auf ein Stück Whatman-Papier getropft, dieses getrocknet, 10 min in der Esenlösung gefärbt und der Hintergrund durch Spülen mit Wasser reduziert. Parallel dazu wird eine BSA-Eichreihe aufgetragen und entsprechend behandelt. Die Konzentrationen lassen sich auf dem getrockneten Whatmanpapier durch den Vergleich mit der Eichreihe abschätzen.

Esenlösung 1 g Coomassie Brilliant Blue G 250, 250 ml Isopropanol, 100 ml Essigsäure in 1 l ddH₂O

2.3.3. Methoden zur Proteinkonzentrierung

Für die Konzentrierung von verdünnten Proteinlösungen oder einen Lösungspufferaustausch gibt es verschiedene Methoden. Während dieser Arbeit wurde hierfür entweder eine Dialyse über Nacht bei 4 °C gegen 10 mM Tris-HCl mit anschließender Gefriertrocknung (Gerät: Beta 1 - 16 von CHRIST, LMC-1), TCA- bzw. Acetonfällung oder die Konzentratoren der Firma VIVASCIENCE verwendet.

Für eine TCA-Fällung werden Proteine in 10 % Trichloressigsäure (TCA) präzipitiert, indem die verdünnte Proteinlösung mit einem Volumenviertel an 50 % TCA versetzt wird. Die Fällung erfolgt für 30 min in Eis, danach werden die Proteine bei 12 000 xg zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Proteinpellet mit eiskaltem 80 %igem Aceton gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wird kurz über Kopf getrocknet und in 1×SDS-Probenpuffer (siehe unter Abschnitt 2.3.1.1) aufgenommen. Die Acetonfällung wird entsprechend durchgeführt, wobei jedoch die Fällung in 80 % Aceton für ca. 2 h bei -20 °C erfolgt.

Für die Konzentrierung verdünnter Proteinlösungen in den Konzentratoren von VIVASCIENCE wurden entweder Vivaspin 20 (5,000 MWCO PES) oder Vivaspin 15 R (5,000 MWCO HY) verwendet, wobei in der Regel 15 min bei 6 000 xg zentrifugiert wurde.

2.3.4. SDS-PAGE

Zur Auftrennung von Proteinen wird die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (1970) verwendet. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein Detergenz, das an Proteine bindet (1,4 g SDS pro g Protein in 1 % SDS-Lösung) und diese in eine stabähnliche Form zwingt. Die negative Ladung des SDS überlagert die Netto-Ladung des Proteins. Proteine weisen daher in einem SDS-haltigen Gel ein nahezu identisches Ladungs-Masse-Verhältnis sowie ähnliche Formen auf und

können so aufgrund der Siebeffekte des Polyacrylamids nach ihrer molaren Massen aufgetrennt werden (Voet, 1994).

2.3.4.1. Tris-Glycin-Gele

Zur besseren Fokussierung der Banden wird mit einem diskontinuierlichen Laemmli-System mit Tris-Glycin-Puffern ((Laemmli, 1970)) gearbeitet. Das Trenngel, in dem die Proteine entsprechend ihrer molaren Massen aufgetrennt werden, wird mit einem Sammelgel überschichtet, das im Vergleich großporiger ist und auf einen niedrigeren pH-Wert eingestellt ist. Im Sammelgel werden die Proteinproben zu einer Linie konzentriert.

Zur Herstellung von 25 ml Trenngel (für vier 14 %ige Gele von 0,75 mm Dicke) werden

- 12,5 ml 30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid,
- 3,1 ml 3 M Tris / HCl pH 8,0,
- 9,1 ml ddH₂O,
- 250 µl 10 % SDS,
- 200 µl 10 % APS und
- 20 µl TEMED

verwendet und zur Polymerisierung bei RT mit ddH₂O (oder Butanol) überschichtet. Pro Trenngel wird 1 ml Sammelgellösung (6 %) mit 10 µl 10 % APS und 1 µl TEMED versetzt. Das Sammelgel wird mit eingesetztem Probenkamm ebenfalls bei RT polymerisiert. Zur Herstellung dieser Minigele wurde das Zubehör der Serie SE200 Multiple Gel Caster von HOEFER SCIENTIFIC verwendet.

Die mit Probenpuffer versetzten und durch Kochen denaturierten Proben aus der Proteinisolierung werden in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Die Elektrophorese wird in 1×Laemmli-Puffer 10 min bei 10 mA und weitere 30 bis 45 min bei 20 mA je Gel durchgeführt. Zur Größenbestimmung der Proteine kann parallel ein Protein-Marker (Seebblue™ Plus2 Pre-stained Standard) aufgetragen werden.

Sammelgellösung 25 ml 30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid, 38 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8,
78 ml ddH₂O

5×Laemmli-Puffer 72 g Glycin, 15 g Tris, 0,1 g SDS in 1 l ddH₂O

2.3.4.2. Tris-Tricin-Gele

Wie für die Tris-Glycin-Gele beschrieben, wurde auch bei der Tris-Tricin-Gelelektrophorese eine diskontinuierliche Variante mit Trenn- und Sammelgel verwendet.

Zur Herstellung von 20 ml Trenngel (für zwei 9 %ige Gele von 1,5 mm Dicke) werden

- 4,5 ml 40 % Acrylamid / 1,6 % Bisacrylamid,
- 6,6 ml 3×Gelpuffer,
- 2,67 ml 87% Glycerin,
- 6,05 ml ddH₂O,
- 100 µl 10 % APS und
- 10 µl TEMED

zusammengegeben und zur Polymerisierung bei RT mit ddH₂O(oder Butanol) überschichtet. Für jedes Trenngel werden 2,5 ml Sammelgellösung (3 %) benötigt. Nach dem Eingießen auf das Trenngel muss das Sammelgel mit eingesetztem Probenkamm ebenfalls bei RT polymerisieren. Zur Herstellung der Minigele wurde ebenfalls das Zubehör der Serie SE200 Multiple Gel Caster von HOEFER SCIENTIFIC verwendet.

Sammelgellösung 0,65 ml 30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid, 1,6 ml 3×Gelpuffer, 3,5 ml ddH₂O, 4 µl TEMED, 40 µl 10 % APS

3×Gelpuffer 3 M Tris, 0,3 % SDS, pH 8,45

2×Proben-Puffer 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 20 % Glycerin, 10 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 10 % SDS, 0,02 % Serva Blue G

10×Kathoden-Puffer 1 M Tris-HCl, 1 M Tricin, 1 SDS, pH 8,25

10×Anoden-Puffer 2 M Tris-HCl pH 8,9

2.3.5. 2D-Gelelektrophorese

In einer zweidimensionalen Gelelektrophorese werden Proteine nach ihrem isoelektrischem Punkt in der ersten und dem Molekulargewicht in der zweiten Dimension aufgetrennt. Für die erste Dimension, die isoelektrischen Fokussierung, wurden immobilisierten pH-Gradienten verwendet

2. Material und Methoden

(Cordwell et al., 2000; O'Farrell, 1975) und die zweite Dimension in einer Tris-Tricin-PAGE nach Schägger und von Jagow (1987) durchgeführt.

20 µl möglichst reine und salzarme Proteinlösung (hier ca. 4 µg / µl) werden mit 45 µl Lysispuffer versetzt und 1 h bei RT inkubiert, während der die Probe ab und zu gevortext werden sollte. Danach wird die Probe 10 min bei 15 000 xg bei RT zentrifugiert, um eventuelle Ausfällungen zu entfernen. 135 µl Rehydratationslösung werden zugegeben und die insgesamt 200 µl der Probe in eine Rehydratationskammer pipettiert. Ein IPG-Streifen (ReadyStrip™ IPG Strip mit immobilisiertem pH-Bereich von 3 bis 10, 11 cm lang, von BIORAD) wird mit der Gelseite nach unten luftblasenfrei aufgelegt, 20 min inkubiert und mit 1,5 ml Mineralöl überschichtet. Es folgt eine Inkubation über Nacht.

Der IEF-Streifen wird aus der Rehydratation genommen, abgetropft und in eine IEF-Kammer so gelegt, dass die Enden jeweils auf angefeuchtete Filterpapierstreifen über den Elektroden zu liegen kommen. Wiederum wird mit 1 ml Mineralöl überschichtet. Zur Fokussierung wurde folgendes Programm gewählt: 1 h 0 V, 6 h 30 V, 6 h 60 V, 1 h 500 V, 1 h 2 000 V, 4 h 8 000 V.

Für die Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension über eine Tris - Tricin - PAGE werden 2 Glasplatten (ca. A5-Format) und 1,5 mm breite Spacer mit Klemmen zusammengesetzt und die Ecken mit 1 % Agarose in Gelpuffer abgedichtet. Für 60 ml eines 10 %igen Trenngels werden

- 20 ml 3×Gelpuffer,
- 8 ml Glycerin,
- 15 ml Acrylamid / Bisacrylamid (40 % / 1,6 %),
- 16,6 ml ddH₂O,
- 300 µl 10 % APS und
- 30 µl TEMED

gemischt, zwischen die Glasplatten gegeben und für die Polymerisation mit n-Butanol oder ddH₂O überschichtet.

Der IEF-Streifen wird nach abgeschlossener Fokussierung in einer Rehydratationskammer in 4 ml Equilibrierungslösung plus 40 mg DTT für 15 min bei RT inkubiert. Dieser Schritt wird mit 4 ml Equilibrierungslösung plus 100 mg Jodacetamid (Görg et al., 2000) wiederholt. Abschließend wird mit 1×Gelpuffer gespült und nach Abgießen der Überschichtungslösung der IEF-Streifen auf das Trenngel gelegt. Dieser und ein kleiner Spacer für die Markerprobe werden

2. Material und Methoden

mit 1 % Agarose in Gelpuffer eingegossen. Der Gellauf erfolgt nach Erstarren der Agarose und dem Pipettieren der Markerprobe bei 22 mA über Nacht (für ca. 16 h).

Das 2D-Gel wird mit nachfolgender Methode silbergefärbt, wobei die unten angegebenen Volumina der Gelgröße angepasst wurden.

Lysispuffer 8 M Harnstoff, 4 % CHAPS, 40 mM Tris (vor Gebrauch 50 mM DTT zugeben)

Rehydratationslösung 8 M Harnstoff, 2 % Triton X-100, Bromphenolblau (vor Gebrauch mit 0,05 % (v/v) Bio-Lyte[®] 3/10 von BIORAD und 50 mM DTT versetzen)

Equilibrierungslösung 50 mM Tris - HCl pH 8,8, 6 M Harnstoff, 30 % Glycerin, 2 % SDS, Bromphenolblau

3×Gelpuffer 3 M Tris - HCl pH 8,45, 0,3 g SDS

10×Kathodenpuffer 1 M Tris - HCl pH 8,25 1 M Tricin, 1 % SDS

10×Anodenpuffer 2 M Tris - HCl pH 8,9

2.3.6. Färbung von Protein-Gelen

2.3.6.1. Coomassie-Colloidal-Färbung

Die Coomassiefärbung für Proteinnachweise über 200 ng Protein pro Bande wird in saurer Lösung durchgeführt, wobei die Proteine im Gel fixiert und mit einer positiven Ladung versehen werden. Diese positive Ladung ist für eine Bindung an den Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue (CBB-G 250) notwendig und auch der Grund, warum basische Proteine bei dieser Methode stärker gefärbt werden als saure. Pro Gramm Protein wird etwa ein Gramm Coomassie gebunden.

Pro Gel werden 80 ml Färbelösung, bestehend aus 78,4 ml Lösung A (98 % [v/v]) und 1,6 ml (2 % [v/v]) Lösung B für mehrere Stunden bzw. über Nacht geschüttelt.

Die Protein-Gele aus der Tris-Glycin- oder Tris-Tricin-PAGE werden 1 h in 100 ml Fixierungslösung geschwenkt. Pro Gel werden 80 ml Färbelösung mit 20 ml Methanol versetzt und die Proteine nach der Fixierung über Nacht gefärbt. Der Hintergrund wird mit ddH₂O reduziert.

Lösung A 2 % (w/v) *ortho*-Phosphorsäure (85 % H₃PO₄), 10 % (NH₄)₂SO₄

Lösung B 5 % CBB-G 250

Fixierungslösung 40 % Methanol, 10 % Essigsäure

2.3.6.2. Silberfärbung

Die Silberfärbung (modifiziert nach Blum et al. (1987)) empfiehlt sich bei Proteinmengen unterhalb von 200 ng pro Bande. Bei dieser Methode bildet das Ag^+ -Ion Komplexe mit den Glu-, Asp- und Cys-Resten der Proteine. Alkalisches Formaldehyd reduziert das Ag^+ der Komplexe zu Ag (Rehm, 2000).

Die Silberfärbung wird für Gele mit ca. 40 cm² Größe in jeweils 30 ml Lösung durchgeführt. Die Inkubationszeiten bei Punkt 3 und 4 sollten exakt eingehalten werden. Die Zugabe von Thiosulfat und Formaldehyd zu den entsprechenden Stammlösungen erfolgt unmittelbar vor Gebrauch. Ab Punkt 6 wird mit gekühlten Lösungen gearbeitet. Während der gesamten Prozedur wird das Gel auf einem Schüttler in Bewegung gehalten. Die Arbeiten werden mit Handschuhen ausgeführt!

1. Fixierung: 50 % Methanol, 12 % Essigsäure — über Nacht,
2. Waschen: 30 % Ethanol — dreimal 30 min,
3. Imprägnieren: 150 μl Na-Thiolsulfat (43 mg / ml), 200 μl Formaldehyd 37 % in 30 ml ddH₂O — 1 min,
4. Waschen: ddH₂O — dreimal 1 min,
5. Färben: 30 ml Silbernitrat (2 g / l), 20 μl Formaldehyd (37 %) — 20 bis 60 min,
6. Waschen: ddH₂O — zweimal 30 s,
7. Reduzieren: 30 ml Natriumcarbonat (60 g / l), 15 μl Formaldehyd (37 %), 3 μl Na-Thiosulfat (43 mg / ml) — bis zur gewünschten Schwärzung,
8. Stoppen der Reduktion: 7 % Essigsäure — zweimal 10 min,
9. Waschen: ddH₂O — zweimal 2 min,
10. Aufbewahren: 30 % Methanol — 20 min bis mehrere Tage,
11. Konservieren: 3 % Glycerin, 1 % Methanol — 30 min oder Trocknen.

2.3.7. Western-Blot-Verfahren

Blotting Der Western Blot ist eine Technik zum Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran. In dieser Arbeit wurde der Transfer mit dem Tank-Blot-Verfahren (Towbin et al., 1992) durchgeführt.

In dieser Arbeit erfolgt der Transfer über Tank-Elektroblotting mit der Apparatur von HOFER SCIENTIFIC mit angeschlossener Kühlung. Dazu werden das Gel und die Membran folgendermaßen zu einem Sandwich zusammengefügt: [Anode +] Gitterrahmen, Schwammtuch, Whatman-Papier, Membran, Gel, Whatman-Papier, Schwammtuch und Gitterrahmen [Kathode -]. Luftblasen sind zu vermeiden. Die Proteine wandern zur positiv geladenen Anode. Alle Komponenten werden vorher in Transferpuffer getränkt. Die hydrophoben PVDF-Membranen müssen vor dem Blotten etwa 3 s mit Methanol benetzt werden. Der Transfer erfolgt in Transferpuffer für 1 bis 1,5 h bei 400 mA und 10 bis 15 °C.

Transferpuffer 1×Laemmli-Puffer, 20 % Methanol (v/v), 0,02 % SDS

Membran SCHLEICHER UND SCHUELL, Protran - Nitrocellulose BA85, 0,45 µm

Enzymgekoppelter Immunnachweis (ELISA) ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) ist eine Methode zum spezifischen Nachweis eines Proteins. Dieser Nachweis erfolgt meist in vitro, wobei das Protein auf einer Membran immobilisiert wurde. Hierbei wird ein primärer und ein mit einem Enzym gekoppelter sekundärer Antikörper verwendet. Der primäre Antikörper ist spezifisch für das gesuchte Protein, der sekundäre ist spezifisch für alle Immunglobuline einer Tierart und muß demzufolge aus einer anderen Art stammen, als der primäre. Üblicherweise werden hierfür Antikörper aus Ziegen und Kaninchen verwendet. Das Protein wird indirekt über eine Enzymreaktion nachgewiesen. Als gekoppelte Enzyme können alkalische Phosphatase und Peroxidase fungieren. In Tabelle 2.5 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper zusammengefasst.

In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit einem Antikörper mit alkalischer Phosphatase (AP). AP katalysiert die Umsetzung von NBT und BCIP zu einem unlöslichen blau-violetten Farbkomplex (Formazan).

1. Blockieren der Proteinbindungsstellen mit Magermilchpuffer — 1 h,
2. Inkubieren mit dem primären Antikörper (15 ml) — über Nacht,
3. Waschen mit PBST — viermal 5 min,
4. Inkubieren mit dem sekundären Antikörper (15 ml) — 1,5 h,

2. Material und Methoden

Tabelle 2.5.: Verwendete Antikörper. Angegeben sind neben Name, Kopplungsfaktor und der üblicherweise verwendeten Verdünnung auch, aus welchem Tier und wogegen der Antikörper gewonnen wurde. AP: Alkalische Phosphatase.

Name	Gegen	Aus	Kopplung	Verdünnung
ZAK-HL#2	Fusion GST-HL#2	Ziege	keine	1:500
Peptid-HL#2	WGGDDGVAHDIT	Kaninchen	keine	1:1 000
Peptid-Horcolin	NGGSEKDVQPKPI	Huhn	keine	1:1 000
PR-Q	gereinigtes Protein	Kaninchen	keine	1:2 000
PR-S	gereinigtes Protein	Kaninchen	keine	1:2 000
PR-2	gereinigtes Protein	Kaninchen	keine	1:2 000
HSP 70	gereinigtes Protein	Kaninchen	keine	1:1 000
LSU RuBPCase	gereinigtes Protein	Ziege	keine	1:750
Anti-Ziege-IgG-AP	Ziegen-IgG	Kaninchen	AP	1:10 000
Anti-Kaninchen-IgG-AP	Kaninchen-IgG	Ziege	AP	1:10 000
Anti-Huhn-IgG-AP	Huhn-IgG	Kaninchen	AP	1:10 000

5. Waschen mit PBST — sechsmal 5 min,
6. Äquilibrieren mit TMN-Puffer — 2 min,
7. Farbreaktion mit NBT/BCIP-Lösung — im Dunkeln bis zur gewünschten Färbung,
8. Stoppen der Reaktion durch Spülen mit Wasser — 10 min,
9. Aufbewahren durch Trocknen zwischen Filterpapier, im Dunkeln.

Magermilchpuffer 4 % Magermilchpulver in PBST

20×PBS 160 g NaCl, 4 g KCl, 28,8 g Na₂HPO₄, 4,8 g KH₂PO₄ mit ddH₂O auf 1 l pH 9,5

PBST 1×PBS mit 0,1 % TWEEN 20

TMN-Puffer 100 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, pH 9,5

NBT/BCIP-Lösung 66 µl NBT (50 mg/ml in 70 % DMF), 33 µl BCIP (50 mg/ml in 100 % DMF) in 10 ml TMN-Puffer

2.3.8. Gelfiltration

Die Gelfiltration wird auch Ausschlusschromatographie genannt, wobei sich dieser Name auf den größenbedingten Ausschluss von Molekülen bei der Permeation in ein poröses Trägermaterial (meist ein Gel) während des Trennvorganges bezieht. Moleküle, die aufgrund ihrer Größe nicht in die Poren des Trägermaterials eindringen können, werden beim Durchlaufen nicht zurückgehalten und finden sich im Ausschlussvolumen ("void volume"). Kleinere Moleküle mit unterschiedlicher Größe können jedoch im Trägermaterial durch Eindringen in die Poren zurückgehalten werden, so dass eine Auftrennung nach Molekülgrößen erfolgt, wobei größere Moleküle schneller und kleiner langsamer wandern (Richter, 2003).

Die Gelfiltration wurde mit einer Superose™-Säule 12 der Firma PHARMACIA BIOTECH (Id/Code-Nr.: 17-0538-01, 9935149) mit Pumpen und "Liquid chromatograph controller" LCC-500 CI der gleichen Firma bei RT durchgeführt, wobei alle Lösungen vorher über einen Membranfilter (0,2 µm, Cellulose Acetat [11107-50-N] oder PTFE-Filter [11807-50-N] von SARTORIUS) sterilfiltriert wurden, um eine Verstopfung des Säulenmaterials mit Schwebstoffen zu verhindern.

Zu Beginn wird die gewünschte Säule und die Probenschleife in der Aparatur montiert und für ca. 30 min bis 1 h beide Pumpen und die Säule mit 20 % Ethanol gespült. Danach wird das Säulenmaterial mit dem Extraktionspuffer der Proteinlösung equilibriert, bis das Volumen der Säule komplett getauscht wurde (hier bei 0,5 ml/min ca. 1 h [30 ml]). Für die Erstellung einer Eichgeraden werden nacheinander je 100 µl der Eichproteine (je 1 mg/ml Cytochrom C [12,7 kDa], Myoglobin [17 kDa], Carboanhydrase [30 kDa], Ovalbumin [45 kDa], BSA [66 kDa], Catalase [240 kDa], Ferritin [400 kDa] und Bluedextran zur Ausschlussvolumenbestimmung) in die Probenschleife gespritzt und mit einer Laufgeschwindigkeit von 0,5 ml/min über die Säule getrennt. Am Auslauf der Säule ist ein Photometer angeschlossen, welches bei 280 nm die Proteine erfasst. Aus diesen Werten wird ein Chromatogramm des Durchflusses erstellt. Für den Probenlauf werden 100 µl der Proteinprobe (min. 1 mg/ml) verwendet. Der Säulendurchfluss wird in Aliquots gesammelt, nachfolgend mit TCA- oder Methanol/Aceton (siehe Abschnitt 2.3.3) gefällt und mittels SDS-PAGE und Western Blot auf das gewünschte Protein hin untersucht.

2.4. Verwendete Kits

CLONTECH Advantage® Genomic PCR Kit (K 1906-y)

CLONTECH Universal GenomeWalker™ Kit (K 1807-1)

FERMENTAS Decalabel™ DNA Labeling Kit (K 0622)

2. Material und Methoden

PEQLAB E.Z.N.A.[®]Cycle Pure Kit (12-6493-01)

QIAGEN QIAprep[®]Spin Miniprep Kit (27104)

QIAGEN Plasmid Midi Kit (tip-100, 12145)

QIAGEN QIAEX Gel Extraction Kit (20020)

SIGMA Genelute Agarose Spin Columns (5-6500)

SIGMA Enhanced Avian RT-PCR (A4464)

VIVASCIENCE Vivaspin 20 (5 000 MWCO PES, VS2011), Vivaspin 15 R (5 000 MWCO HY, VS15RH11)

3. Ergebnisse

3.1. Erweiterung der Sequenzdaten für HL#2 und Horcolin

HL#2 und Horcolin sind zwar in ihrer cDNA- und Aminosäuresequenz homolog aber doch im Detail so unterschiedlich, dass von zwei verschiedenen Genen ausgegangen werden kann. Zu Beginn dieser Arbeit waren sowohl die Aminosäuresequenzen unter den NCBI-Accessionnummern CAB40792 für HL#2 und AAK54458 für Horcolin, als auch die Sequenzen der cDNA unter AJ237754 für HL#2 und AY033628 für Horcolin bekannt.

Durch die Isolierung genomischer Klone sollten in der vorliegenden Arbeit die Lage und Sequenz der bisher nur vermuteten Introns bestimmt werden, um Genkarten beider Gene erstellen und die Vermutung überprüfen zu können, dass es sich um Gene in einfacher Kopie im Genom der Gerste handelt. Parallel sollte die Promotorregionen von HL#2 und Horcolin isoliert und hinsichtlich ihrer Regulation miteinander verglichen und analysiert werden.

3.1.1. Isolierung der Gene für HL#2 und Horcolin

3.1.1.1. Bestimmung der Sequenz und Lage der Introns

Um die genaue Lage und Sequenz des Introns im Gen des HL#2 bestimmen zu können, wurden anhand der bekannten cDNA-Sequenz Primer im 5'-untranslatierbaren Bereich (5'-UTR) (HL2-fwd) und im 3'-Bereich der cDNA, in der kein Intron vermutet wurde (HL2-rev), hergestellt. Nach der von Menhaj entwickelten, hypothetischen Genkarte für das Gen des HL#2 sollte nur im vorderen Bereich des Genes ein Intron mit der Länge von ca. 240 bp vorhanden sein (Abbildung 3.1).

Für das Gen des Horcolin gab es aus vorherigen Arbeiten keine Daten zur möglichen Intronlänge und -position. Ein Intron konnte daher auch im hinteren Bereich der cDNA liegen, so dass zu dem Horcolin-fwd-Primer in der 5'UTR auch der reverse Primer im nichttranslatierbaren 3'-Bereich (3'-UTR) (Horcolin-rev) gewählt wurde (vgl. Primersequenzen in Tabelle 2.2 auf Seite 18 und Abbildung 3.2).

3. Ergebnisse

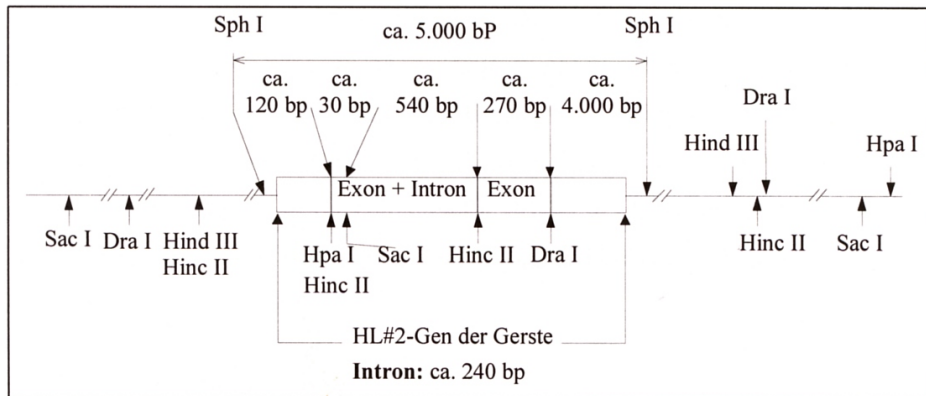


Abbildung 3.1.: Hypothetische Struktur des HL#2-Genes nach Menhaj, 1998.

HL#2 cDNA

TCTCCATCTCGGCGCTTCGTTGTGAGTTAACGAAATGAGCAGCAGCCCGGTGGTGAAGCTGGGGCC
 GTGGGGGGGCGACGACGGGGTGGCCACGACATCACGGTGGCGCCGACGCGCTGGAGAGCATCAC
 CATCCGCTGGGGCAAGGTCTGCACTCCGTGCGCTTACCTACAGGGACAAGGACAACCAGCTGCA
 CACCGCCGGGCCCTGGGGCGGCGCCGAGGGGAGAAGGAAGACCCGGACACGATCACGTTGGGCC
 CTCGGAGTACATAACTCAGGTCGACTGGTTCGGTGGGACCGTTCAAGCTCAAGGAGATCGAGCACTG
 CATCACCTCGCTCAAGTTTGTGACCAACCAGGCCAGCTACGGCCCGTTTCGGGTACGCGGTGGACAG
CACGCACTACAGCCTGCCCGTGCTCAACAACGGCAGCGTCGTCGGCATGTTTCGGCCGCGCCGGAGA
 CTACCTCCACGCCATCGGCTTCTACGTCCTCCAGAGACCAGTCTCGCATCTTGAGTTCCCATGTG
 CATTGATCCTGTCCATTGTTTAGCATTAAATAAATGGTTTCGCTTGATTTTTGAATATTACGAG
 TTCCTTTAATAAATGGTTTGTCTTGATTA

Horcolin cDNA

GCACGAGCTAAGTCACCTCTTCTAGACCAATACATAGGTTGCTGCCTTGGGTGGATTGTTAAAGCA
GGAGCCAAAATGAGCAAGCCTGTGAAGATTGGGCCATGGGGTGGGAATGGTGGCAGCGAGCGTGAT
 GTCCAGCCAAAGCCCATCCGTATGGTTAGTATGACCGTCAGTAGCGGAGCTATCGTTGACGCTATT
 GCATTCACCTATGTGGCACCATAACGTTCAACACTCTTCCGGCATCAAGTGGGTGGCACTGGC
 GGCACAGAAGATACGATTAATCTAGACGCTACGAACTACGTGACCGAAATCTCCGGGACAGTGGGT
 AAATTTGGGACCGACGACATCGTCACGTCTCTTAAATATCACCTCCAAGGGGTTACCAGGACA
 TACGGCTCAGGTACCGAATTCCATTCCGCGTCCCGGTGCTTGACGGGGTAAGATCGCCGGCTTC
 TTTGGACGGGCTGGTGCTTTCCTGGACGCGATTGGGTTCTACATTACTCCATGAATGGTTGGTTGA
TATCGGCCGGCCACCTCTCCTCTGGAGGAAGGAGGTGGCGTAGTACTACCGGCAGCGTCTGCTTGC
 TAGAATAAATAAATTTGTGAAGTGCCTTACATGGCACTTTAGCATATGTGTGGGATAATGTGTGAC
 GCTGC

Abbildung 3.2.: cDNA-Sequenzen von HL#2 (Accessionnr.: AJ237754) und Horcolin (AY033628) mit den Bindungsstellen der Primer HL2-fwd und -rev und Horcolin-fwd und -rev (unterstrichen, wobei die Pfeile die Orientierung angeben) zur Isolierung der Introns. Die untranslatierbaren Bereiche sind blau, die translatierbaren schwarz dargestellt. Start- und Stoppcodon sind jeweils fett gedruckt.

3. Ergebnisse

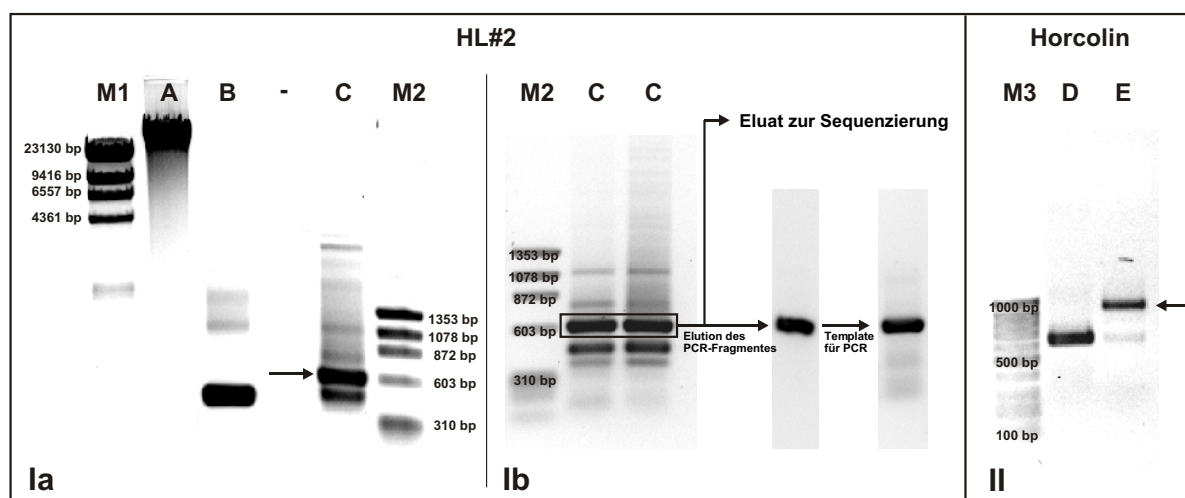


Abbildung 3.3.: Isolierung der Gene für HL#2 und Horcolin. Gezeigt sind 1 % ige Agarosegele nach Ethidiumbromidfärbung. Gel Ia: A, genomische DNA (ca. 800 ng); B, Ergebnisse der PCR für HL#2 mit cDNA und C, mit genomischer DNA. Gel Ib zeigt zusätzlich die Vorgehensweise zur Isolierung der genomischen Fragmente zur Intronbestimmung am Beispiel HL#2. Gel II: D, Ergebnisse der PCR für Horcolin mit cDNA und E, mit genomischer DNA. M1: Marker λ-DNA *Hind*III verdaut, 300 ng; M2: Marker Φ, 300 ng; M3: Marker GeneRuler™ 100 bp von FERMENTAS, 300 ng.

Genomische DNA wurde aus 7 Tage alten Gerstenblättern nach dem Protokoll in Abschnitt 2.2.1 auf Seite 15 mit einer Konzentration von 2 µg / µl isoliert und jeweils 1 µl einer 1:100 Verdünnung (20 ng) für eine PCR (50 µl Gesamt-Ansatz) eingesetzt. Die PCR mit der Pwo DNA-Polymerase (THERMO HYBAID, Proof-Reading-Aktivität) wurde nach den Standardprotokoll in Abschnitt 2.2.3 auf Seite 16 jeweils mit dem cDNA-Klon (HL#2-cDNA in pBluescript SK und Horcolin-cDNA in pT-Adv) und mit genomischer DNA durchgeführt. Die Annealingtemperaturen betragen für die HL2-Primer 60 °C, für die Horcolin-Primer 55 °C.

In Abbildung 3.3 (Ia) ist das Ergebnis der PCR mit HL#2 gezeigt. Im Vergleich zu den Banden der PCR mit cDNA (411 bp, Spur B) ist die Hauptbande der PCR mit genomischer DNA mit etwa 600 bp ca. 200 bp größer (Spur C). Dieses Ergebnis entspricht in etwa der von Menhaj vermuteten Intronlänge, so dass diese Bande aus dem Gel eluiert (Spur D) und nachfolgend für eine zweite, wie oben beschriebene PCR zur Überprüfung eingesetzt wurde (Spur E) (vgl. Abbildung 3.3 [Ib]).

Das Ergebnis der PCR mit cDNA und genomischer DNA und den Horcolin-Primern ist in Abbildung 3.3 (Gel II) gezeigt. Hier ist die Hauptbande der PCR mit genomischer DNA (Spur E) um ca. 300 bp größer, als die der PCR mit cDNA (Spur D). Zur Elution und Sequenzierung wurde verfahren wie für HL#2 beschrieben.

3. Ergebnisse

HL#2, genomische Sequenz

GTGAGTTAACGAA**ATG**GTCCGTCCTTACTCCGGCTCCCATGCATGAGCTCCATGATATGCTGTGCT
AGCATCTTCTTCACGGGACTCATGGCAGGTTGCTGTTTTGTGTGCGCGTGCAGAGCAGCAGCCCGG
TGGTGAAGCTGGGGCCGTGGGGGGGCGACGACGGGGTGGCCACGACATCACGGTGGCGCCGCAGC
GGCTGGAGAGCATCACCATCCGCTGGGGCAAGGTCCTCGACTCCGTCGCCTTACCTACAGGGACA
AGGACAACCAGCTGCACACCGCCGGGCCCTGGGGCGGCGCCGGAGGGGAGAAGGAAGACCCGGACA
CG**GTGAGCGATCGATCCGGTCCAGGCGGGCGCCTCTTGTGCATCGATCCTGCTTCTTTTCTTGGTCT**
GATGTATGCACATGTGTATCTACAGATCACGTTGGGCCCTCGGAGTACATAACTCAGGTGCGACTG
GTCGGTGGGACCGTTCAAGCTCAAGGAGATCGAGCACTGCATCACCTCGCTCAAGTTTGTGACCAA
CCAGGCCAGCTACGGCCCGTTCGGGTACGCG

Horcolin, genomische Sequenz

AGACCAATACATAGGTTGCTGCCTTGGGTGGATTTGGTAAAGCAGGAGCCAAA**ATGGTATGTGTTT**
GATCCACTTATGTAGCTCTTAGTTTTCTTTTCnTCAAAAGAGnGnnCGGCTTCAGACCAAnnATGG
AATGGTATGTGnTTAnAAAAnGGCnTCCCTCnAnCATTGGAGAAGATTGATGGTAATACTCTCCT
CTAATTAATTCAGAGCAAGCCTGTGAAGATTGGGCCATGGGGTGGGAATGGTGGCAGCGAGCGTGA
TGTCCAGCCAAAGCCCATCCGTATGGTTAGTATGACCGTCAGTAGCGGAGCTATCGTTGACGCTAT
TGCATTCACCTATGTGGGCACCGATAACGTTCAACACTCTTCCGGCATCAAGTGGGGTGGCACTGG
CGGCACAGAAGATACG**GTGCGTGGAAATGTTTTGTTTTCAAAATATATTTATTTTTCTTGCACATACTA**
TGTTGATCATCGGTTTTGATTATTGTTTTATCTGGATGGCTAGGGTTAGTAGTTCTCCTACATGTA
CTCATATACAAACCTCTTACATACATGACCTGATGATTGCCATCTCTTGCAGATTAATCTAGACGC
TACGAACTACGTGACCGAAATCTCCGGGACAGTGGGTAAATTTGGGACCGACGACATCGTCACGTC
TCTTAAATATACCTCCAAGGGGGTTACCAGGACATACGGCTCAGGTACCGGAATTCCATTCCG
CGTCCCGGTGCTTGACGGGGGTAAGATCGCCGGCTTCTTTGGACGGGCTGGTGTCTTCTTGGACGC
GATTGGGTCTACATTACTCCATGAATGGTTGGTTGATATCGGCCGGCCACCTCTCCTCTGGAAGA
AGAGGTGGCCGTA

Abbildung 3.4.: Sequenzen der Introns von HL#2 und Horcolin. Die bereits bekannten Abschnitte der cDNA sind schwarz, die Sequenzen der Introns blau dargestellt. Das putative Startcodon ist jeweils fett gedruckt.

Neben den Banden in den erwarteten Größen der genomischen Fragmente von HL#2 und Horcolin, die um die Intronlängen größer waren, zeigte sich in einigen Gelen eine Bande in der gleichen Größe wie die Amplifikationen der cDNA. Dieser Effekt lässt sich auf eine Verunreinigung der genomischen DNA mit RNA und eine geringe Reverse-Transcriptase-Aktivität der verwendeten DNA Polymerase zurückführen. Die Sequenzierung der PCR-Fragmente wurde mit den für die PCR verwendeten Primern durch die MWG AG BIOTECH (<http://www.mwg-biotech.com> und <https://ecom.mwgdna.com>) durchgeführt. Jeder Klon wurde je zweimal in Forward- und Revers-Richtung sequenziert. Die so erhaltenen 4 Sequenzen wurden assembliert und ergaben die in Abbildung 3.4 zusammengestellten Consensussequenzen.

Es zeigte sich, dass nicht nur ein, sondern zwei Introns im genomischen Klon vorhanden sind, und zwar sowohl bei HL#2, als auch bei Horcolin in ähnlicher Länge und Position.

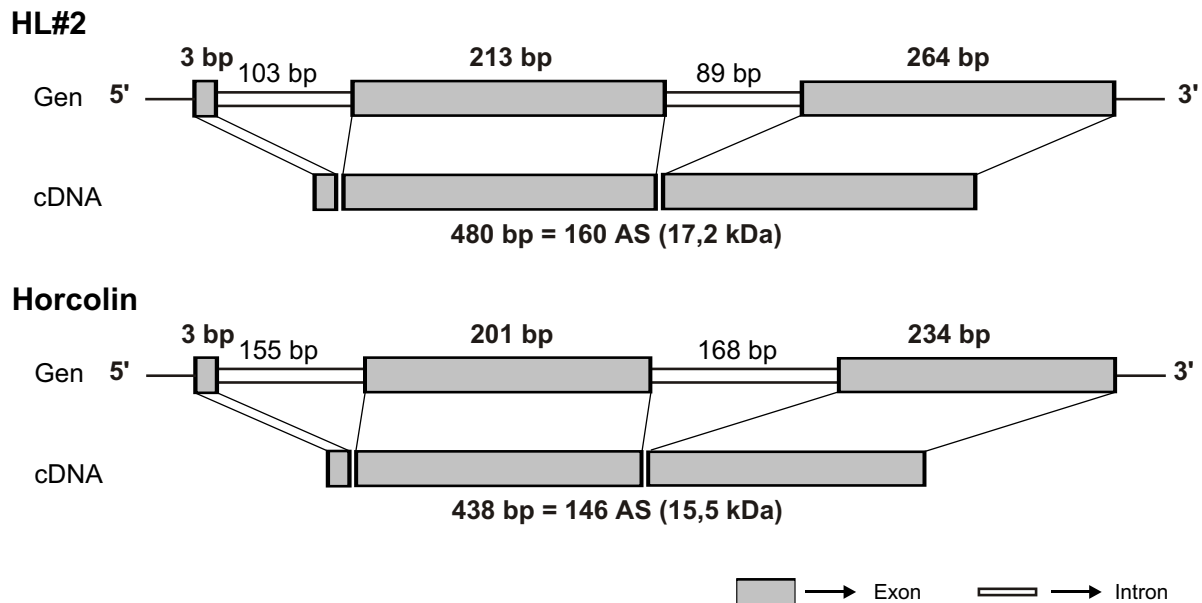


Abbildung 3.5.: Genkarten für HL#2 und Horcolin. Gezeigt sind die Positionen der Introns in den jeweiligen Genen mit Längenangaben in bp, bzw. den Spleißing-Stellen. Exons sind grau, Introns weiß hinterlegt. Das jeweils erste Exon mit 3 bp besteht nur aus dem Startcodon ATG.

Anhand der cDNA von HL#2 wurde ein Fragment in der Größe von 411 bp (inklusive Primerbindungsstellen) errechnet. Das sequenzierte genomische Fragment hat insgesamt eine Größe von 559 bp (ohne Primerbindungsstellen), wobei 367 bp zur bereits bekannten cDNA gehören und 192 bp die beiden Introns mit den Längen 103 und 89 bp darstellen.

Das cDNA-Fragment mit den Horcolin-Primern hat eine Größe von 593 bp, der genomische Klon 871 bp. Die Introns sind in diesem Fall 155 und 168 bp, insgesamt also 323 bp lang. Trotz der vier überlagerten Sequenzierungsreaktionen konnte hier die Sequenz des ersten Introns nicht einwandfrei gelesen werden, so dass einige nicht exakt bestimmbare Basen (n) verblieben. Diese konnten aber in Verbindung mit der Klonierung der Upstream-Regionen (siehe unter Abschnitt 3.1.1.2) ergänzt werden.

Aus den Sequenzen lassen sich die Genkarten von HL#2 und Horcolin in Abbildung 3.5 entwickeln. Auffallend ist hier die Position der ersten Introns in beiden Genen. Sie liegen direkt downstream des jeweiligen Startcodons. Auf diesen Sachverhalt wird in Abschnitt 3.5.2 gesondert eingegangen.

3.1.1.2. Isolierung der Upstream-Regionen

Zur Isolierung der Upstream-Regionen der Gene von HL#2 und Horcolin wurde mit drei verschiedenen Methoden gearbeitet.

Partielle Genbank Zur Isolierung der genomischen Klone, inklusive großer Bereiche der Promotoren, erschien das Anlegen einer Partiellen Genbank sinnvoll. Hierfür wurden Southern-Blot-Analysen für HL#2 und Horcolin durchgeführt, um herauszufinden, welche Restriktionsenzyme brauchbar große Fragmente liefern, in denen die Gene für HL#2 und Horcolin vorliegen. Laut Southern Blot hybridisiert die HL#2-cDNA-Sonde in *Bam*HI-verdauter DNA in Höhe von ca. 6 000 bp, die Horcolin-cDNA-Sonde in *Kpn*I-verdauter DNA in Höhe von 4 000 bp. Beide Enzyme wurden ausgewählt, da sie am Ende des jeweiligen Genes schneiden und so garantiert werden kann, dass der später isolierte Klon möglichst große Upstream-Regionen besitzt.

Nach dem parallelen Verdau des Klonierungsvektors pBluescript SK (mit anschließender De-phosphorylierung) und genomischer DNA wurden die entsprechend eluierten Fragmente (siehe Abbildung 3.6) ungerichtet in den Vektor ligiert und je 5 µl der Ligationsansätze in 100 µl des

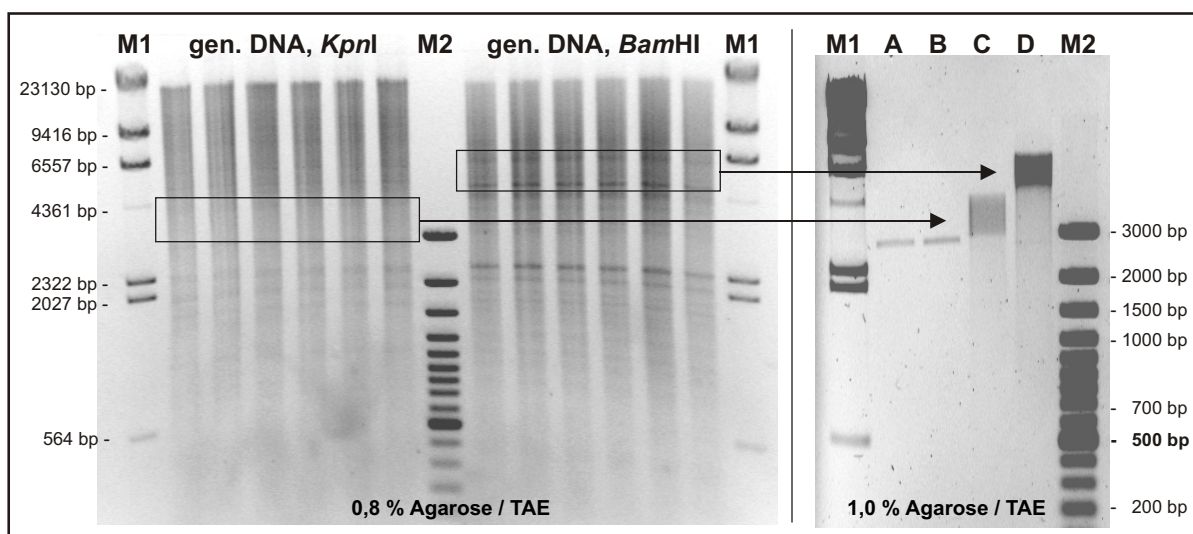


Abbildung 3.6.: Vorgehensweise zum Herstellen einer Partiellen Genbank. 5 µg genomische DNA wurde mit den Enzymen *Kpn*I und *Bam*HI vollständig verdaut, in 0,8 % Agarose in TAE elektrophoretisch aufgetrennt (links). Durch Southern Blot ermittelte Bereiche (ca. 6 kb des *Bam*HI-Verdau für HL#2 und ca. 4 kb des *Kpn*I-Verdau für Horcolin) wurden aus dem Gel eluiert und zur Kontrolle vor der Ligation mit dem *Bam*HI- und *Kpn*I-verdauten Vektor pBluescript SK in 1 % Agarose in TAE aufgetrennt (rechts, je 5 µl der Eluate). M1: Marker λ-DNA *Hind*III verdaut, 300 ng; M2: Marker GeneRuler™ 100 bp von FERMENTAS, 300 ng.

3. Ergebnisse

elektrokompetenten Bakterienstamm *E. coli* DH5 α transformiert. Die Klone wurden in Pools von 25 Kolonien durch Plasmidpräparation und PCR nach den Genen für HL#2 und Horcolin durchsucht. Die parallel durchgeführten und nachfolgend beschriebenen Methoden brachten schnellere Erfolge, daher wurde die Untersuchung der Partiellen Genbank nicht weiter fortgeführt.

Inverse PCR Für die inverse PCR, die in Abschnitt 2.2.3.2 auf Seite 19 näher beschrieben ist, wurden je 2 μ g genomische DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen vollständig verdaut und soweit verdünnt, dass sich in der nachfolgenden Ligationsreaktion bevorzugt einzelne DNA-Moleküle miteinander zu zirkulären Fragmenten ligierten. Für die PCR wurden die Primer HL2-invers-fwd, -rev (Annealing bei 56 °C) und Horcolin-invers-fwd, -rev (Annealing bei 53 °C) (Sequenzen siehe in Tabelle 2.2 auf Seite 18) verwendet.

In Abbildung 3.7 sind typische Ergebnisse der Inversen PCR gezeigt. Trotz Variieren der verwendeten Restriktionsenzyme und Versuchsbedingungen ergab die PCR entweder keine isolier- und klonierbare Banden oder nur vergleichsweise kleine Fragmente von 100 bis 300 bp. Je nach gewählten Primerbindungsstellen hätten nur wenige (unter 50 bp) Basenpaare upstream der bekannten Sequenzen bestimmt werden können.

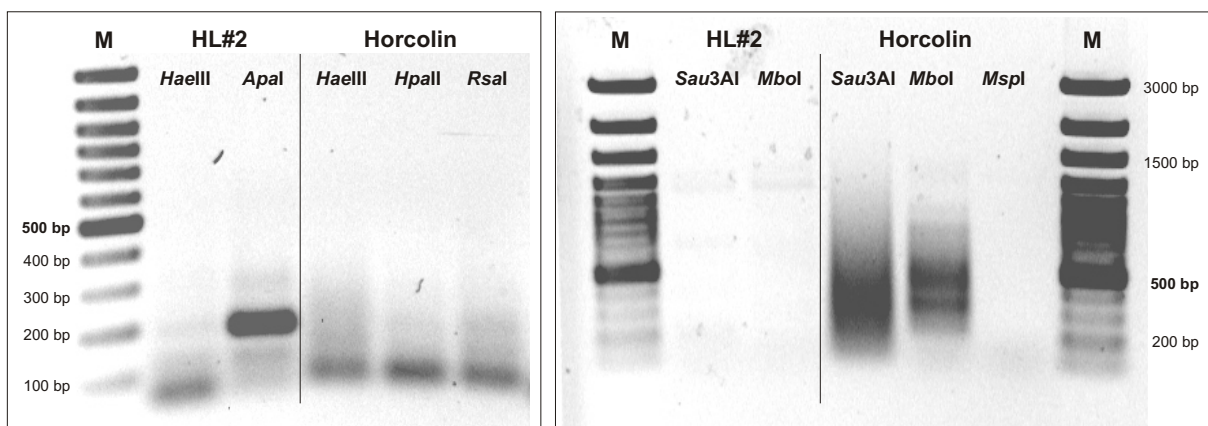


Abbildung 3.7.: Inverse PCR. Gezeigt sind typische Ergebnisse der Inversen PCR, aufgetrennt in 1 % Agarose in TAE nach Ethidiumbromidfärbung. M: Marker GeneRuler™ 100 bp von FERMENTAS, 300 ng.

GenomeWalker™ Das Universal GenomeWalker™ Kit der Firma CLONTECH in Verbindung mit dem Advantage® Genomic Polymerasemix verspricht eine schnelle und einfach anzuwendende Methode zur Klonierung unbekannter DNA-Abschnitte ohne das zeitaufwändige Screening von Genbanken. Das zugrundeliegende Prinzip dieser Methode ist in Abschnitt 2.2.3.3 auf Seite 19 beschrieben.

3. Ergebnisse

Die isolierte genomische DNA der Gerste ließ sich mit dem Restriktionsenzym *PvuII* nur unzureichend verdauen, so dass nur drei der vier mitgelieferten Enzyme (*EcoRV*, *DraI*, *PvuII* und *StuI*) zur Erstellung der Libraries verwendet werden konnten. Zusätzlich wurden weitere Restriktionsenzyme für die Erstellung der Libraries getestet: *NruI*, *SmaI* und *SspI*. Sie wurden ausgewählt, weil sie wie die Enzyme des Kits eine 6 bp lange Erkennungssequenz haben und blunt end schneiden. Mit *NruI* und *SmaI* ließ sich die genomische DNA, wie für *PvuI* beobachtet, ebenfalls nur unzureichend verdauen, so dass zur Ligation an den Adapter nur die *SspI*-Library eingesetzt wurde.

Zum Design der Primer wurde im Wesentlichen den Empfehlungen im mitgelieferten Handbuch (Clontech, 1999) gefolgt. Da die Upstream-Regionen kloniert werden sollten, wurden die genspezifischen Primer in reverser Orientierung gewählt. Die Primer GSP1-HL2 und GSP2-HL2 liegen nicht überlappend im zweiten Exon und sind mit 25 und 27 bp in etwa so lang, wie im Handbuch empfohlen (26 - 30 bp). Die Primer GSP1-Horcolin und GSP2-Horcolin sind 27 und 29 bp lang, wobei der erste Primer im zweiten Intron und der zweite Primer, ebenfalls nicht überlappend, im ersten Exon bindet. Zudem wurde beim Design der Primer darauf geachtet, dass eine Dimerbildung mit dem AP1- bzw. AP2-Primer des Kits unwahrscheinlich ist. Die Sequenzen sind der Tabelle 2.2 auf Seite 18 zu entnehmen.

Beide PCR-Reaktionen zeigten anfangs keine Amplifikationen. Daraufhin wurden verschiedene Parameter variiert. Die Annealing- und Extensiontemperaturen beider PCR-Protokolle wurden schrittweise verringert, die Zyklenzahl erhöht und die PCR-Reaktionen in verschiedenen PCR-Cyclern durchgeführt. Erfolg brachte letztendlich die folgende Kombination:

Erste PCR [25 s 94 °C, 3 min 70 °C]₇, [25 s 94 °C, 3 min 65 °C]₂₇ und 7 min 65 °C

Zweite ("nested") PCR [25 s 94 °C, 3 min 70 °C]₅, [25 s 94 °C, 3 min 65 °C]₂₅ und 7 min 65 °C

PCR-Cycler T3 Thermocycler von BIOMETRA

Die Wahl des PCR-Cyclers spielt hier eine besondere Rolle, denn dieselben Programme führten in den Cyclern DNA Engine PTC-200 (BIOZYM) und PCR Express ThermalCycler (HYBAID) zu keinen Amplifikationen. Alle drei Cycler nutzen dünnwandige 0,2 ml-PCR-Tubes, wobei jedoch im HYBAID-Cycler die Temperatur nicht anhand des Ansatzvolumens kalkuliert, sondern in einem mit Öl gefülltem Test-Tube direkt während des Programmschrittes gemessen wird. Zudem zeigt der Vergleich der Gesamtdauer der Programme Unterschiede. Das Modell T3 Thermocycler BIOMETRA braucht mit max. 1,5 °C/s im Vergleich zu den beiden anderen Cyclern (ca. 2 bis 3 °C/s) zum Einstellen der Temperaturen für jeden einzelnen Schritt etwas länger, so dass die praktisch erreichte Dauer jedes einzelnen Schrittes größer ist. Das führt vermutlich gerade bei Annealing und Extension zu verbesserten Amplifikationen.

3. Ergebnisse

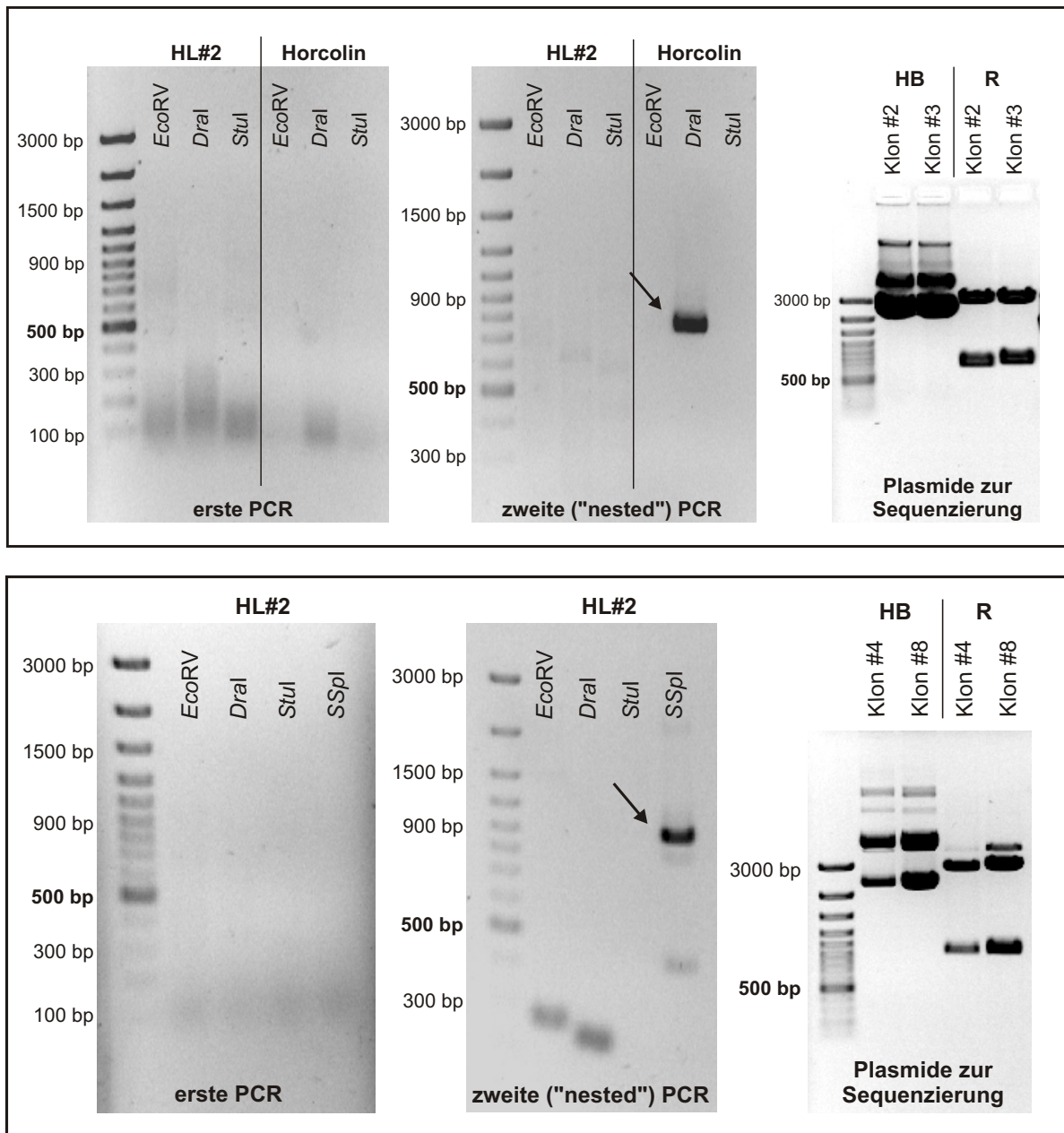


Abbildung 3.8.: Ergebnisse des PCR des GenomeWalk™ und anschließende Klonierung. Die Amplifikate der ersten und zweiten ("nested") PCR mit den verschiedenen Libraries (*EcoRV*, *DraI*, *StuI* und *SspI*) wurden in 1,5% Agarose in TAE elektrophoretisch aufgetrennt, die mit Pfeilen markierten PCR-Fragmente in den *SmaI*-geschnittenen Vektor pBluescript kloniert und die selektierten Klone #2 und #3 für Horcolin, #4 und #8 für HL#2 vor der Sequenzierung mittels HB-Lyse (HB) und Restriktion mit *SmaI* (R) auf korrekte Insertion hin überprüft. M: Marker GeneRuler™ 100 bp von FERMENTAS, 300 ng.

3. Ergebnisse

Die Abbildung 3.8 zeigt die Ergebnisse der erfolgreichen GenomWalker PCR-Reaktionen. Für Horcolin konnte ein ca. 800 bp großes PCR-Fragment der *DraI*-Library kloniert werden, für HL#2 ein ca. 900 bp PCR-Fragment nach dem Hinzufügen der eigenen *SspI*-Library. Die One-Step-Klonierung erfolgte jeweils als *SmaI*-Insert in den Vektor pBluescript SK (+/-) von STRATAGENE, der ein Ampicillinresistenzgen besitzt und die Multiple Cloning Site (MCS) in einer LacZ-Region vorliegt, was eine Blau-Weiß-Selektion erlaubt (Genkarte im Anhang unter A.3 auf Seite 138). Die erhaltenen Kolonien wurden über HB-Lyse und Restriktion auf Insertion hin überprüft und einzelne für eine Sequenzierung ausgewählt.

Horcolin Upstream-Klon #2

```
GGGCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCACTATAGGGC  
ACGCGTGGTCGACGGCCCGGGCTGGTAAATTACCAAGCATTGCATGGAGACAACTGTCAATAGAAT  
CTAGTAAAGCAAATTGAACTGGGATTAATCATTAGTCTTTATAACTGCTAAATTTTTAGAAGAGTT  
CACATGGACCCGTTACCACAATGTTACAAGAATGATATTCAGTAAAATGTGCCTGTAATGAGATTG  
CTACCAAGTTTTAGACATGTCTAATTAGACAAGAATGGTGTGCATTAATTAATCTTATCTTACAAC  
AGTCTCAATGACAGTGAGCGGTGTACTACTTTTTATGCTTATCAACTATCGGGAGCTGAGGTGTACG  
TACGGCTATATATAGGTGGCTTTTCGATCGATCAACGAAGCCATCCAGCAAACTAAGTCACTCTTCT  
AGACCAATACATAGGTTGCTGCCTTGGGTGGATTTGGTAAAGCAGGAGCCAAAATGGTATGTGTTT  
GATCCACTTATGTAGTTCTTAGTTTTCTTTTCTTCAAAGAGTGGACGAGTTTGACCAAATATGGA  
ATGGTATGTGTTTTAGATATTGTCAATATCTTCAATTTTGGAGTAGATTGATGGTAATACTCTCCTC  
TAATCAATTCAGAGCAAGCCTGTGAAGATTGGGCCATGGGGTGGGAATGGTGGCAGCGAGCGTGAT  
GTCCAGCCAAAGCCCATCCGTATGGTTAGTATGACCGTCAGTAGCGGAGCTATCGTTGACGCTATT  
GCATTCACCTATGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGGGGAGCTCCAG
```

Horcolin Upstream-Klon #3

```
CGGGCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCATAGGTGAAT  
GCAATAGCGTCAACGATTATAGGCCACGCGTGCCCTATAGTGGGCTGGTAAATTACCAAGCATTGC  
ATGGAGACAACTGTCAATAGAATCTAGTAAAGCAAATTGAACTGGGATTAATCATTAGTCTTTATA  
ACTGCTAAATTTTTAGAAGAGTTCACATGGACCCGTTACCACAATGTTACAAGAATGATATTCAGT  
AAAATGTGCCTGTAATGAGATTGCTACCAAGTTTTAGACATGTCTAATTAGACAAGAATGGTGTGC  
ATTAATTAATCTTATCTTACAACAGTCTCAATGACAGTGAGCGGTGTACTACTTTTTATGCTTATCA  
ACTATCGGGAGCTGAGGTGTACGTACGGCTATATATAGGTGGCTTTTCGATCGATCAACGAAGCCAT  
CCAGCAAACTAAGTCACTCTTCTAGACCAATACATAGGTTGCTGCCTTGGGTGGATTTGGTAAAGC  
AGGAGCCAAAATGGTATGTGTTTGATCCACTTATGTAGTTCTTAGTTTTCTTTCTTCAAAGAGT  
GGACGAGTTTGACTAAATATGGAATGGTATGTGTTTTAGATATTGTCAATATCTTCAATTTTGGAGT  
AGATTGATGGTAATACTCTCCTCTAATTAATTCAGAGCAAGCCTGTGAAGATTGGGCCATGGGGTG  
GGAAATGGTGGCAGCGAGCGTGATGTCCAGCCAAAGCCCATCCGTATGGTTAGTATGACCGTCAGTA  
GCGGAGCTATCGTTGACGCTTTCATTACCTATGGGCCGTCGACCACGCGTGCCCTATAGTGGGG  
GATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGGGGAGCTCCAG
```

Abbildung 3.9.: Sequenzen der Klone #2 und #3 für die Upstream-Region von Horcolin. Die Sequenz des flankierenden Vektors ist blau, die des Adapters blau und kursiv markiert. Die neu sequenzierten Upstream-Regionen sind fett, schwarz dargestellt. Zudem sind die Introns kursiv, schwarz und die Restriktionsenzymchnittstellen (*SmaI* und *DraI*), sowie die Startcodons durch Unterstreichung hervorgehoben.

3. Ergebnisse

HL#2 Upstream-Klon #8

```
GGAGCTCCCCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAAGTCTAGTGGATCCCCCACTATAGGGCACGCGTGGTCG  
ACGGCCCTGGCTGGTATTTCGAAACGAAGGTGTTTGTGGTCTCACACGAAGGCACGGCCCGGCAGT  
AGCTACGTAGCGTGGTTTCAAATCTAGCTCCACCATTTTTGGAGGCCACTAGTTAATTAAGCAAC  
GTTACAAAAACGTCAGAGTCGGGAATTATATCTGCGTCCAATAATTAATGGCAGAGCAAATCC  
TCATAAATCGAAGTTAGCCACGAGACCCACGAGACAAGGAGGATACACATGCATGGATGAGTTGGA  
GGACACGTGGAGGCTGCCCGTCCACCCGAGCCAACTACTCTCGTGTGTTTTGCATATGAAATTCCT  
TTTTTTTTCTCGCGTGAGTTTGCATATAAAATTCGTACAAGTGCCTGCCTGGTCAGCTCATCAGCC  
CTACTCTCCATCTCGGCGCTTCGTTGTGAGTTAACGAAATGGTCCGTCCTTACTCCGGCTCCCATG  
CATGAGCTCCATGATATGCTGTGCTAGCATCTTCTTACGGGACTCATGGCAGGTTGCTGTTTTGT  
GTGCGCGTGCAGAGCAGCAGCCCGGTGGTGAAGCTGGGGCCGTGGGGGGGCGACGACGGGGTGGCC  
CACGACATCACGGTGGCGCCGCAGCGGCTGGAGAGCATCACCATCCGCTGGGGCAAGGTCCCTCGAC  
TCCGTCGCCTTACCTACAGGGACAAGGACAACCAGCTGCACACCCGGGCCCTGGGGCGGCGCC  
GGAGGGGAGAAGGAAGACCCGGACACGGTGAGCGATCGATCCGGTCCAGGCGGGCGCCTCTTGTCA  
TCGATCCTGCTTCTTTTCTTGGTCTGATGTATGCACATGTGTATCTACAGATCACGTTGGGCCCT  
CGGAGTACATAACTCAGGTCGACTGGTCGGTGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATA  
CCGTCGACCTCGAGGG
```

Abbildung 3.10.: Sequenz des Klones #8 für die Upstream-Region von HL#2. Die Sequenz des flankierenden Vektors ist blau, die des Adapters blau und kursiv markiert. Die neu sequenzierte Upstream-Region ist fett, schwarz dargestellt. Zudem sind die Introns kursiv, schwarz und die Restriktionsenzymstellen (*SmaI* und *SspI*), sowie die Startcodons durch Unterstreichung hervorgehoben.

In den Abbildungen 3.9 und 3.10 sind die Consensussequenzen der Klone #2 und #3 für die Upstream-Region von Horcolin und #8 für die Upstream-Region von HL#2 dargestellt. Auch hier wurden die durch Sequenzierung mit den vektorspezifischen T3- und T7-Primern erhaltenen Einzelsequenzen assembliert. Die Sequenzierung der Klones #4 ergab keine auswertbaren Ergebnisse.

Die Klone #2 und #3 von Horcolin zeigten im Agarosegel in Abbildung 3.8 eine etwas unterschiedliche Größe des Inserts. Daher wurden beide Klone sequenziert. Dies ergab tatsächlich einen Unterschied von 50 bp und beruht auf einem Effekt der One-Step-Klonierung mit *SmaI* und einer solchen Schnittstelle im Adapter, bzw. den Primern AP1 und AP2. Kurze Adapterfragmente haben sich bei der Blunt-End-Ligation mit in den Vektor inseriert. Die von solchen Artefakten bereinigten Sequenzen der Klone #2 und #3 von Horcolin sind identisch. Auch konnte mit diesen Klonen für Horcolin die Sequenz des ersten Introns endgültig bestimmt werden, was in der oben beschriebenen Intronisolierung nicht zu 100 % gelungen war. Durch die Lage der GSP-Primer im zweiten Exon konnte durch diesen Klon die Sequenzen der Introns noch einmal bestätigt werden.

Anhand der nun bekannten Upstream-Regionen wurden neue Primer gewählt (GSP3 und 4). Die Versuche mit diesen neuen Primern blieben jedoch leider ohne Erfolg. Zudem erschwerte ein erhöhter GC-Gehalt der Upstream-Regionen die Wahl geeigneter Primerpaare. Trotz weiterer

Versuche der Optimierung der PCR-Parameter konnte nur noch ein Klon für Horcolin isoliert werden, der sich aber nur unzureichend sequenzieren ließ und hier deshalb nicht gezeigt wird.

Insgesamt konnten also 426 bp upstream des putativen Startcodons des Horcolin-Genes und 422 bp upstream des putativen Startcodons des HL#2-Genes kloniert und bestimmt werden.

3.1.1.3. Aktuelle, vollständige Version der Gene für HL#2 und Horcolin

Die vollständigen Sequenzen der Gene für HL#2 und Horcolin inklusive je ca. 400 bp der Upstream-Regionen sind in Abbildung A.1 und A.2 im Anhang gezeigt und wurden bei EMBL eingereicht (URL in Tabelle A.1). Sie sind dort und über das "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, URL in Tabelle A.1) unter den Accessionnummern AY336086 für HL#2 und AY770690 für Horcolin abrufbar.

3.1.2. Southern-Blot-Analyse

Menhaj (1998) und Grunwald (2002) haben zur Bestimmung der Kopienzahl der Gene zu HL#2 und Horcolin Southern-Blot-Untersuchungen vorgenommen. Bis auf jeweils eine Ausnahme zeigten die Hybridisierungen mit den einzelnen Verdauansätzen nur eine Bande. Es wurde daraus geschlossen, dass es sich um Gene in einfacher Kopie im Gerstengenom handelt, vorausgesetzt, dass es ein Introns mit den jeweiligen Schnittstellen gibt, die im Southern Blot mehrere Banden verursachen.

Mit der nun erhaltenen Sequenz der Introns für HL#2 ließen sich die im Southern Blot für HL#2 gezeigten drei Banden beim Verdau mit dem Restriktionsenzym *SacI* erklären. Die Schnittstelle *SacI* (GAGCT/C) ist im ersten Intron an Position 33 enthalten.

Der Southern Blot für Horcolin zeigte bei der Hybridisierung mit dem *BamHI*-Verdau drei Banden. Diese ließen sich jedoch mit den neu erhaltenen Sequenzdaten nicht erklären, eine *BamHI*-Schnittstelle ist weder in den beiden Introns, noch in der Upstream-Region enthalten. Um herauszufinden, ob es möglicherweise doch mehr als nur eine Kopie des Horcolin-Genes im Genom gibt, wurde der Southern Blot für Horcolin wiederholt und zusätzlich weitere Restriktionsenzyme für einfache und Doppelverdauansätze verwendet. Zur Herstellung einer Sonde wurde eine PCR mit der Horcolin-cDNA als Template und den Primern Horcolin-fwd und -rev durchgeführt und das erhaltene 593 bp große DNA-Fragment mit ³²P gelabelt. Die Abbildung 3.11 zeigt das Ergebnis.

Die Hybridisierung des *BamHI*-Ansatzes zeigt jetzt nur noch eine Bande, wie auch alle anderen getesteten Restriktionsansätze. Der Doppelverdau *EcoRV/DraI* kann als Kontrolle verwendet werden, da hier die Größe des DNA-Fragmentes eindeutig durch die vorhandenen Se-

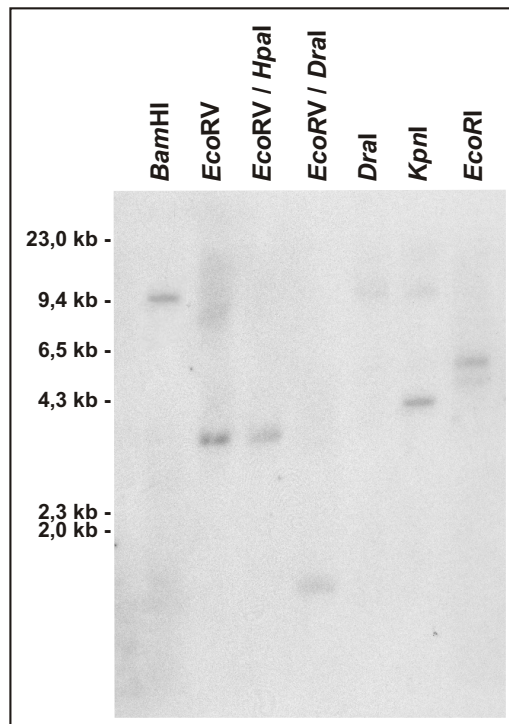


Abbildung 3.11.: Southern Blot für Horcolin. Je 10 µg genomische DNA wurde mit den genannten Restriktionsenzymen verdaut, in 0,8 % Agarose in TAE elektrophoretisch aufgetrennt und im Southern Blots analysiert. Die Hybridisierung erfolgte mit ³²P markierter Horcolin-cDNA bei 42 °C, in Anwesenheit von 50 % Formamid. Marker: λ-DNA *Hind*III verdaut.

quenzdaten bestimmt werden kann. *Dra*I schneidet an Position -423 und *EcoRV* an Position 774 bezogen auf das putative Startcodon, so dass sich eine Bande in der Größe von 1197 bp ergibt, die im Southern Blot zu erkennen ist. Somit konnte das Vorliegen des HL#2-Genes als einfache Kopie im Gerstengenom eindeutig gezeigt werden.

3.2. Sequenzvergleiche von HL#2 und Horcolin mit eng verwandten Proteinen

Die Erweiterung der genomischen Sequenzdaten erbrachte zwar für die cDNA und damit auch für die Proteinsequenzen von HL#2 und Horcolin nichts Neues, jedoch sind in den letzten Jahren die Einträge charakterisierter Proteine und EST-Daten in den Datenbanken umfangreicher geworden. Daher konnten die bisher durchgeführten Sequenzvergleiche um weitere "neue" Mitglieder der eng verwandten Proteine von HL#2 und Horcolin erweitert werden.

3. Ergebnisse

3.2.1. Proteinsequenzhomologien

Für die Erstellung der Sequenzvergleiche in Abbildungen 3.12, 3.13 und 3.14 wurden die Proteinsequenzen im FASTA-Format verwendet, die unter den NCBI-Accessionnummern CAB40792 (HL#2), AAK54458 (Horcolin), AAM46816 ("Hessian fly response", Hfr-1), AAF71261 (" β glucosidase aggregating factor precursor", BGAF), AAA87042 ("Jasmonat inducible protein of 32.7 kDa", JIP 32.7), AAA87041 (JIP 32.6), CAA36189 (GOS9), AAB53810 (Salt), NP908901 ("Mannose-binding rice lectin", MBRL), T10940 (Ipomoelin), AAC49564 (Calsepa) und AAD11575 (Heltuba) zugänglich sind.

Der Sequenzvergleich wurde mit Multialin (URL in Tabelle A.1) erstellt, das ebenfalls mit der ExPASy-Homepage verlinkt ist, und mit dem dort zur Verfügung stehenden ESPript 2.2 bearbei-

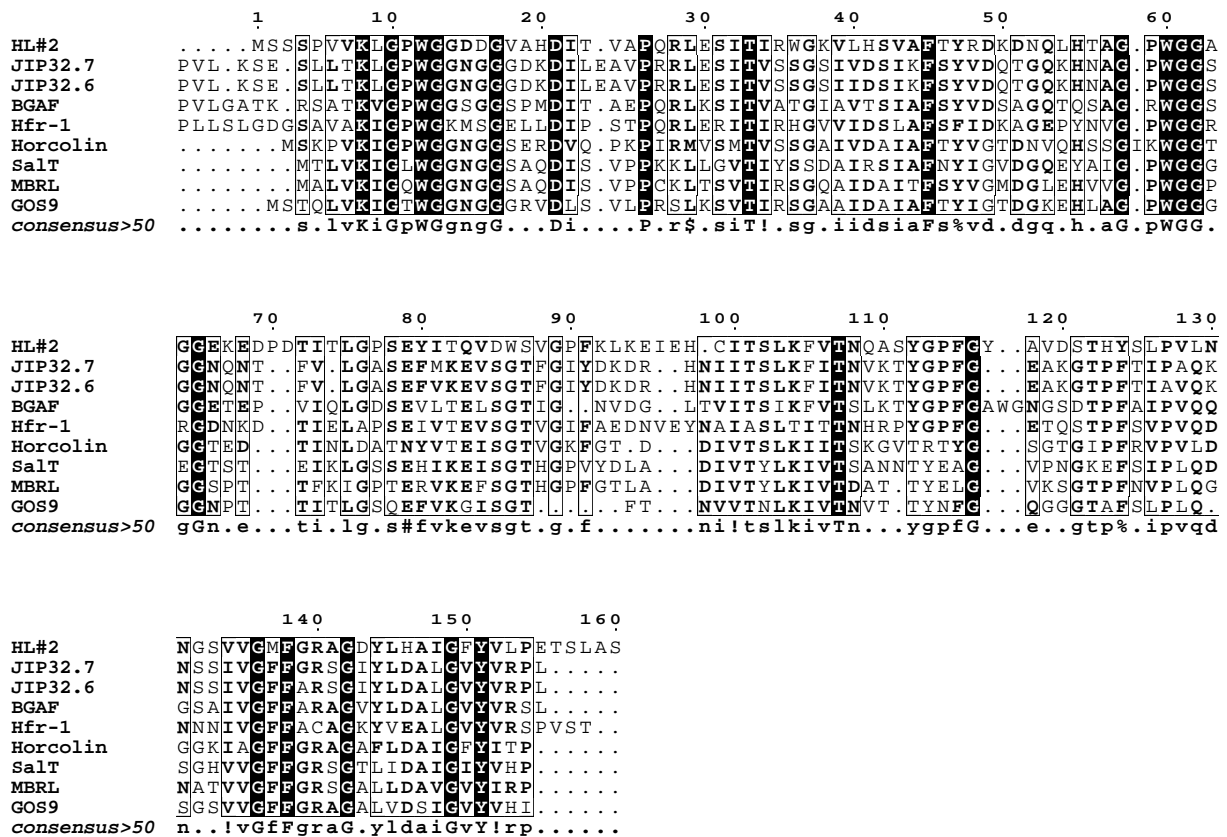


Abbildung 3.12.: Alignment mit den Programmen Multialin und ESPript 2.2 (URLs in Tabelle A.1). Die Consensus-Sequenz ist angegeben, wobei ! für die Aminosäuren I oder V, \$ für L oder M, % für F oder Y und # für N, D, Q, E, B oder Z steht. Die Nummerierung der Basenpaare bezieht sich auf HL#2. Es sind hier nur die homologen C-terminalen Bereiche der Sequenzen für JIP 32.6/32.7, BGAF und Hfr-1 gezeigt, beginnend an den Positionen 151/151, 151 und 185.

3. Ergebnisse

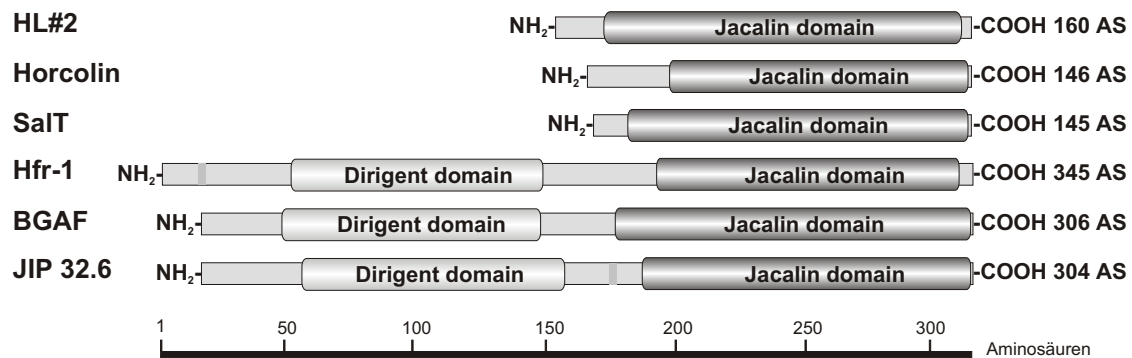


Abbildung 3.13.: Dirigent- und Jacalin-like Lektin-Domänen in der Proteinfamilie von HL2 und Horcolin. Ergebnisse des Sequenzvergleiches mit der "Conserved Domain Database" (CDD).

tet, wobei von den Proteinen JIP 32.6/32.7, BGAF und Hfr-1 nur die homologen C-terminalen Bereiche gezeigt sind (vgl. auch Abbildung 3.13). Gleichen oder ähnlichen Aminosäuren sind Boxen hinterlegt, um Cluster zu kennzeichnen.

Zu den in diesem Abschnitt beschriebenen Proteinen wurden bei einer BLAST-Suche ("Basic local alignment search tool") des NCBI eine ganze Reihe weiterer putativer Proteine gefunden, die von isolierten EST-Klonen (meist aus *Oryza sativa*, *Hordeum vulgare* und *Zea mays*) abgeleitet werden. Je nach verwendeten Isolierungsmethoden und aufgrund von Sequenzhomologien wurden so "putativ mannosebindende Lektine" (z. B. NP918855), "putative Lektine" (z. B. CAC19668) oder "putativ salzinduzierte" Proteine (z. B. XP470893) gefunden.

Bei der BLAST-Suche der NCBI-Seite können Proteinsequenzen mit der "Conserved Domain Database" (CDD) verglichen werden. Diese Datenbank enthält eine Zusammenstellung verschiedener funktioneller und/oder struktureller Domänen aus NCBI-Einträgen und zwei weiteren Sammlungen: Smart ("Simple Modular Architecture Research Tool") und Pfam. Pfam ist eine Datenbank mit Proteinfamilien basierend auf einer Zusammenstellung von multiplen Sequenzvergleichen und "Hidden Markov Models" (Marchler-Bauer und Bryant, 2004; Marchler-Bauer et al., 2003; Marchler-Bauer et al., 2002). Bei der Untersuchung der Proteinfamilie wurden 2 Elemente gefunden: erstens eine "Jacalin-like lectin"-Domäne (pfam01419) bei allen Mitgliedern und zweitens eine "Dirigent-like protein"-Domäne (pfam03018) bei den JIP-Proteinen, Hfr-1 und BGAF. Proteine, die eine "Jacalin-like lectin"-Domäne enthalten, werden zu den Lektinen gezählt. Proteine mit einer "Dirigent-like protein"-Domäne gehören zu einer Proteinfamilie, die bei Pathogenbefall induziert werden. Alle oben beschriebenen Proteine weisen eine "Jacalin-like lectin"-Domäne auf, der Übersichtlichkeit halber sind in Abbildung 3.13 aber nur 6 Mitglieder dargestellt.

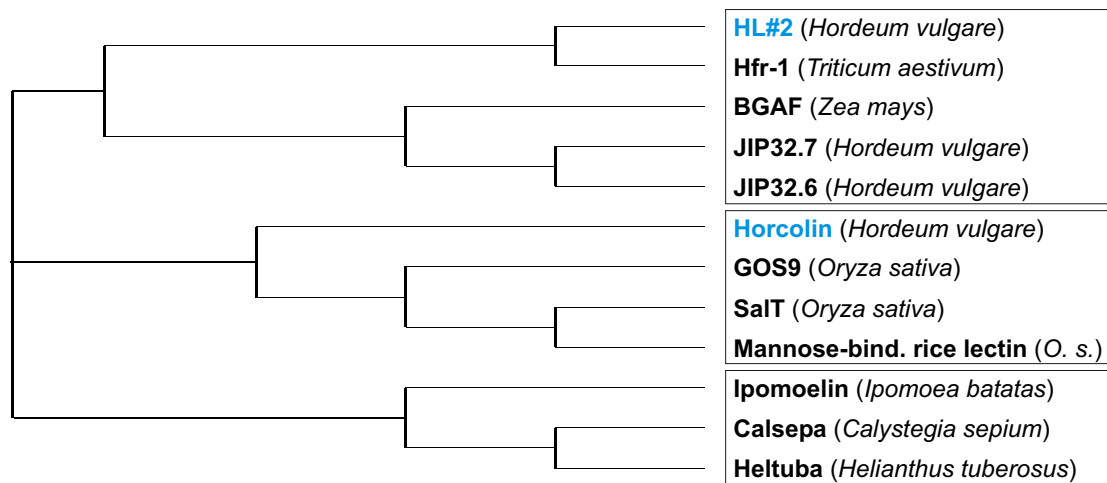


Abbildung 3.14.: Phylogenetischer Stammbaum von HL#2 und Horcolin mit eng verwandten Proteinen. Der Stammbaum wurde mit dem Programm ClustalW/EBI erstellt und zeigt ein Phylogramm. In Boxen sind jeweils die Mitglieder der 3 Hauptäste zusammengefasst.

3.2.2. Verwandtschaftsgrad von HL#2 und Horcolin

Der Stammbaum in Abbildung 3.14 zeigt den Verwandtschaftsgrad von HL#2 und Horcolin zueinander innerhalb der Proteinfamilie. Er wurde mit ClustalW/EBI (URL in Tabelle A.1) erstellt. Als Darstellung wurde ein Phylogramm gewählt, bei dem die Proteine aufgrund ihrer Sequenzhomologien gruppiert werden. Der errechnete Stammbaum lässt sich mit Treeview bearbeiten und ausdrucken.

In Abbildung 3.14 wird deutlich, dass HL#2 und Horcolin zwar nah verwandt sind, es aber dennoch Proteine mit größeren Homologien gibt. HL#2 ist so näher mit Hfr-1, BGAF und den beiden JIP-Proteinen verwandt, wobei Horcolin mit GOS9, SaIT und anderen Lektinen aus dem Reis (hier nur MBRL gezeigt) einen eigenen Ast bildet. Dennoch sind alle hier zusammengefassten Proteine Mitglieder einer Proteinfamilie, die sich nicht nur auf monokotyle Pflanzen beschränkt (siehe Calsepa, Heltuba und Ipomoelin).

3.2.3. EST-Klone der GABI-Datenbank

GABI ist ein BMBF gefördertes Projekt zur Analyse und Sequenzierung von Getreidegenomen. Auf der Projektseite (URL in Tabelle A.1) werden laufend neue Daten dieser Forschung und eine Möglichkeit zur Sequenzsuche zur Verfügung gestellt. Leider sind bisher nur EST-Datenbanken freigegeben. In der nächsten Zeit werden hier Daten des Genomes, wie für *Arabidopsis thaliana* bereits verfügbar, zugänglich sein.

Die Suche nach neuen EST-Einträgen in der GABI-Datenbank ergab nur zwei hohe Homologien für HL#2: die EST-Klone HO03C07S (Score [bits] 1065, E value 0.0) und HV10E23r (Score [bits] 817, E value 0.0) (Accessionnummern: CD053900 und CA018979). Der erste Klon stammt aus dem Kultivar Ingrid BC mlo-5 und wurde aus Blattepidermis 6 und 24 h nach Inokulation mit *Blumeria graminis* (Gerstenmehltau) isoliert. Der zweite Klon wurde aus dem Kultivar Barke aus Samen 48 bis 96 h nach der Keimung isoliert.

EST-Klone mit hoher Homologie zu Horcolin sind unter anderen HC09B21w (CB868692) und HC11J10w (CB869518) aus verschiedenen Kultivaren, jedoch immer isoliert aus 3 Tage alten Koleoptilen.

3.3. Promotoranalyse von HL#2 und Horcolin

Nachdem es gelungen war, jeweils ca. 400 bp der Upstream-Regionen der Gene von HL#2 und Horcolin zu isolieren, sollten diese miteinander verglichen und auf regulative Motive in der Sequenz hin untersucht werden.

3.3.1. Datenbankrecherche

Zur Bestimmung regulatorische Elemente in den genomischen Sequenzen wurden zunächst verschiedene, im Internet zur Verfügung gestellte Programme verwendet. Es gibt eine ganze Reihe solcher Werkzeuge zur Promotorbestimmung, die sich in der Art der hinterlegten Algorithmen und der Darstellung der Ergebnisse unterscheidet. So beschränken sich einige Programme auf die Angabe einer Promotorregion, andere zeigen einzelne regulatorische Motive an.

GenscanW GenscanW (URL in Tabelle A.1) gibt nur eine Promotor-Region an, ohne einzelne Motive zu benennen (Burge und Karlin, 1997; Burge und Karlin, 1998). Für Horcolin wurde so eine Promotorregion an Position -78 bis -117 bezogen auf das putative Startcodon (40 bp) bestimmt, sowie Angaben zu Exon- und Intronerkenung, die mit Abbildung 3.5 übereinstimmen. Für HL#2 konnte mit GenscanW kein Promotor erkannt werden.

Proscan Proscan 1.7 (URL in Tabelle A.1) bestimmt Promotorregionen anhand von Homologien mit dem putativen eukaryontischen Pol II-Promotor (Prestridge, 1995). Für HL#2 wird eine putative Promotorregion an Position -64 bis -314 erkannt, wobei der Translationsstart mit -50 in Bezug auf das Startcodon angegeben wird, was mit den experimentellen Daten gut übereinstimmt. Weiterhin werden auch einzelne Motive wie z. B. die TATA-Box an Position -80 gefunden. Für Horcolin konnte mit Proscan jedoch kein Promotor bestimmt werden.

PlantCARE PlantCARE ("Plant Cis-Acting Regulatory Element") ist eine referentielle Datenbank mit 435 verschiedenen Transkriptionsmotiven aus Pflanzen (149 Monokotyledonae, 281 Dikotyledonae und 5 Koniferen), die mehr als 159 Promotoren beschreiben (Lescot et al., 2002). Diese Datenbank stellt die mit Abstand umfangreichste Analyse von pflanzliche Promotoren zur Verfügung und soll daher näher beschrieben werden. Die wesentlichen Ergebnisse der Analyse der Umstream-Regionen der Gene von HL#2 und Horcolin sind in der Tabelle 3.1 zusammengefasst.

PlantCARE ist wie die anderen erwähnten Programme online im Internet erreichbar (URL in Tabelle A.1). Die angebotene Suchfunktion "Search for CARE" erlaubt einen Abgleich eigener DNA-Sequenzen mit dieser Datenbank, wobei nach Motiven bekannter regulatorischer Elemente gesucht wird. Die Ergebnisse werden auf einer interaktiven Seite präsentiert. Hier sind neben den Informationen über Art und Position des gefundenen Motives auch Angaben über die Güte des Ergebnisses ("Core-" und "Matrix-Similarity") und mögliche Funktionen zusammengestellt. Zu jedem Motiv werden zusätzlich Referenzen in Form von Daten über die Gene, in denen das Motiv beschrieben wurde, und Abstracts der veröffentlichten Artikel in Fachzeitschriften angegeben.

In der Tabelle 3.1 sind die Ergebnisse der Suche mit den genomischen Sequenzen von HL#2 und Horcolin zusammengestellt. Gezeigt sind mit einer Ausnahme (Nr. 5 der Motive für HL#2, "TGACG-motif") die Motive des "+"-Stranges mit einer "Core"- und "Matrix"-Übereinstimmung von 1,000 (100 % Übereinstimmung) aller in der Datenbank hinterlegten Arten. Zusätzlich sind die Motive gezeigt, die zwar eine "Core"-Übereinstimmung von 1,000, die der Matrix aber mindestens 0,800, wenn das Motiv bei einer monokotylen Pflanze beschrieben worden ist.

3.3.2. Funktionsanalyse der Promotorregionen von HL#2 und Horcolin

Nach der Analyse der Promotorregionen mit den oben genannten Programmen sollte die Aktivität der Promotoren auch experimentell durch Klonierung der Upstream-Regionen vor ein Reporter gen bestimmt werden.

Für diese Untersuchung wurde der Vektor pe35AscIoptRed von Prof. Maiß (Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, Universität Hannover) freundlicherweise zur Verfügung gestellt, der das Gen für ein rot fluoreszierendes Protein aus *Discosoma* sp., genannt DsRed enthält. Der Vektor DsRed1-C1, der für die Expression im humanen System erhältlich ist, war für die Expression in Höheren Pflanzen modifiziert worden. Hierbei war das Startcodon durch das Einfügen des Motives AACA direkt vor dem Startcodon optimiert und zur besseren Bindung an Pflanzenribosomen ein Shine-Dalgarno-Motiv (AGGA) an Position -9 eingefügt worden. Nach diesen Modifikationen und der Insertion eines doppelten CaMV-35S-Pro-

Tabelle 3.1.: "Cis-Acting Regulatory Elements" in den Upstream-Regionen der Gene von HL#2 und Horcolin (PlantCARE, Lescot et al. 2002, Stand der Daten in der Tabelle vom 25.09.2004)

Nr.	Motivname	Organismus	Position	"Core"	"Matrix"	Sequenz	Funktion	Referenzen
HL#2								
1	A-box	<i>Petrose linum crispum</i>	-153	1.000	1.000	CCGTcc	cis-acting regulatory element	(Logemann et al., 1995)
2	ABRE	<i>Hordeum vulgare</i>	-367	1.000	0.936	gctACGTagc	cis-acting element involved in ABResponse	(Straub et al., 1994; Shen und Ho, 1995)
	ABRE	<i>Hordeum vulgare</i>	-307	1.000	0.863	gcaACGTtac	cis-acting element involved in ABResponse	(Straub et al., 1994; Shen und Ho, 1995)
3	CAAT-box	<i>Pisum sativum</i>	-350, -243	1.000	1.000	CAAAAT	common cis-acting element in promoter and enhancer regions	(Cocherel et al., 1996)
4	CGTCA-motif	<i>Hordeum vulgare</i>	-292	1.000	1.000	CGTcA	cis-acting regulatory element involved in MeJAM response	(Rouster et al., 1997)
5	TGACG-motif	<i>Hordeum vulgare</i>	-292 (-)	1.000	1.000	TGACg	cis-acting regulatory element involved in MeJAM response	(Rouster et al., 1997)
6	G-box	<i>Pisum sativum</i>	-167	1.000	1.000	CACGtg	cis-acting regulatory element involved in light response	(Ito et al., 1997; An et al., 1993; Arguello-Astorga und Herrera-Estrella, 1996)
	G-box	<i>Hordeum vulgare</i>	-131	1.000	1.000	ctCGTG	cis-acting regulatory element involved in light response	(Arguello-Astorga und Herrera-Estrella, 1996; Rouster et al., 1997)
7	P-box	<i>Oryza sativa</i>	-107	1.000	0.857	CCTTtt	gibberellin-responsive element	(Kim et al., 1992; Washida et al., 1999)
8	TATA-box	<i>Hordeum vulgare</i>	-80	1.000	1.000	TATAaa	core promoter element around -30 of transcription start	(Shen und Ho, 1995; Rouster et al., 1997; Guilman et al., 1990)
Horcolin								
1	ABRE	<i>Hordeum vulgare</i>	-125	1.000	0.896	gctACGTtaca	cis-acting element involved in ABResponse	(Straub et al., 1994; Shen und Ho, 1995)
2	CAAT-box	<i>Hordeum vulgare</i>	-392, -49	1.000	1.000	CAAT	common cis-acting element in promoter and enhancer regions	(Straub et al., 1994)
3	GAG-motif	<i>Hordeum vulgare</i>	-135	1.000	0.857	GGAGctg	part of a light responsive element	(Arguello-Astorga und Herrera-Estrella, 1996)
4	GCN4-motif	<i>Oryza sativa</i>	-67	1.000	0.934	taaGTCA	cis-regulatory element involved in endosperm expression	?
5	MBS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-399	1.000	1.000	CAACtg	MYB Binding Site	(Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki, 1994)
6	TATA-box	<i>Oryza sativa</i>	-46	1.000	0.872	TACAatg	core promoter element around -30 of transcription start	(Washida et al., 1999; Lits et al., 1992)
7	TCT-motif	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-190	1.000	1.000	TCTTac	part of a light responsive element	(Arguello-Astorga und Herrera-Estrella, 1996)
8	WUN-motif	<i>Brassica oleracea</i>	-423	1.000	1.000	aAATTacca	wound-responsive element	(Pastuglia et al., 1997)

3. Ergebnisse

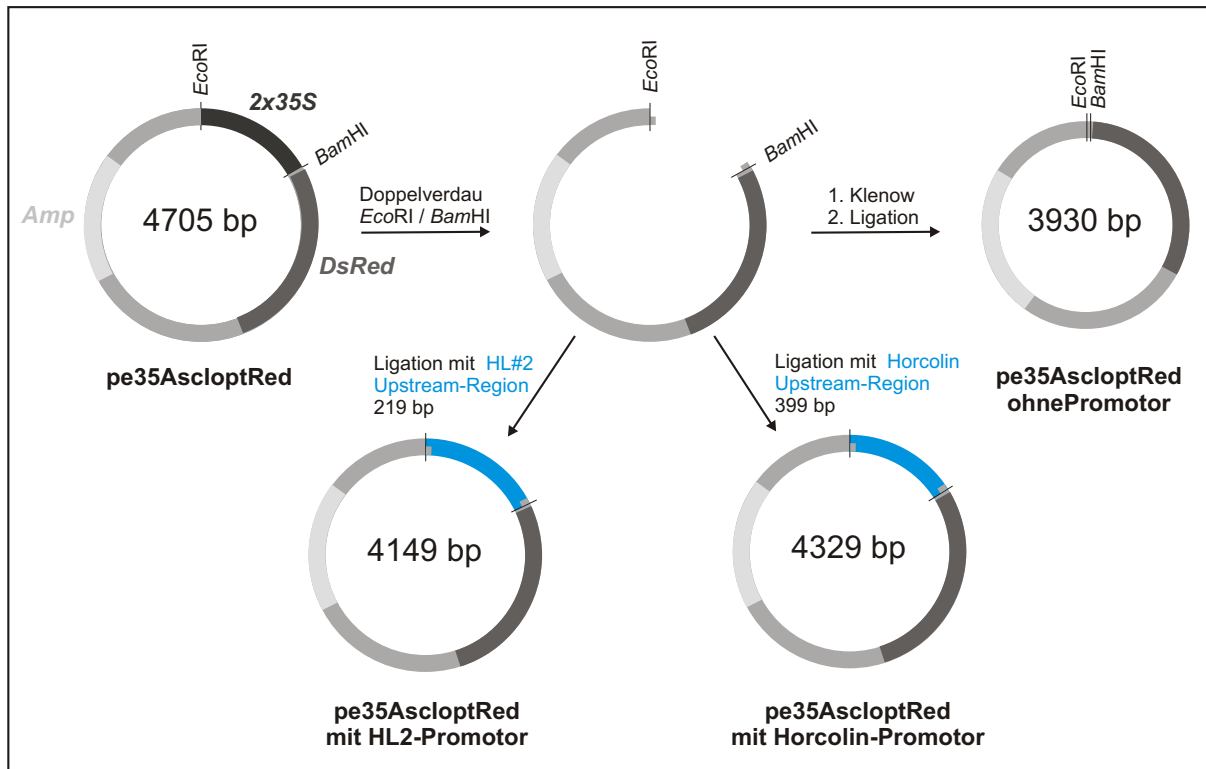


Abbildung 3.15.: Schema der Klonierung der Upstream-Regionen von HL#2 und Horcolin in den Vektor pe35AscIoptRed. Der doppelte CaMV-35S-Promotor des Vektors wurde mit *EcoRI* und *BamHI* ausgeschnitten und die Upstream-Regionen der Gene von HL#2 und Horcolin stattdessen inseriert. Als Negativ-Kontrolle wurde ein Vektor ohne Promotor hergestellt. Besondere Regionen des Vektors sind hellgrau (Ampicillinresistenz-Gen), dunkelgrau (DsRed-Gen), schwarz (35S-Promotor) und blau (Upstream-Regionen / Promotoren der zu untersuchenden Gene) hervorgehoben.

motor konnte 48 h nach Particle Bombardment in Tabakblättern ein Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden (Dietrich und Maiss, 2002).

Dieser Vektor war für die Untersuchung der Upstream-Regionen von HL#2 und Horcolin auf Promotoraktivität hin vielversprechend, weil sich dessen doppelter CaMV-35S-Promotor mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI* ausschneiden und an die Stelle eine mit entsprechenden Schnittstellen versehene Region gerichtet klonieren lässt (siehe Abbildung 3.15). Als Negativ-Kontrolle kann der Vektor ohne Promotor verwendet werden.

Für die gerichtete Klonierung der Upstream-Regionen von HL#2 und Horcolin wurden Primer mit den Restriktionsenzym-Schnittstellen für *EcoRI* und *BamHI* als 5'-Modifikationen hergestellt (siehe Abbildung 3.16). An die Schnittstellen wurden zusätzlich je 2 weitere Basen am 5'-Ende angefügt, um einen Verdau am Ende des DNA-Doppelstranges aus der PCR zu erleich-

3. Ergebnisse

HL#2

```
AATATTTTCAAACGAAGGTGTTTGTGGTCTCACACGAAGGCACGGCCCGGCAGTAGCTACGTAGCGTGGTTTCAAATCTAGC
TCCCACCATTTTTGGAGGCCACTAGTTAATTAAGCAACGTTACAAAAACGTCAGAGTCGGGAATTATATCTGCGTCCAAC
AATTAATGGCAGAGCAAATCCTCATAAATCGAAGTTAGCCACGAGACCCACGAGACAAGGAGGATACACATGCATGGATGA
5' - GGGAATTCACGAGACAAGGAGGATACACATGC - 3'
[EcoRI]
GTTGGAGGACACGTGGAGGCTGCCCGTCCACCCGAGCCAACACTCTCGTGTGTTTGCATATGAAATTCCTTTTTTTTTTCT
CGCG TGAGTTTGCATATAAAAATTCGTACAAGTGCCTGCCTGGTCA AGCTCATCAGCCCTACTCTCCATCTCGGCGCTTCGTTG
3' - TAGAGCCGCGAAGCAAC
TGAGTTAACGAAATGGTCCGTCCTTACTCCGGCTCCCAT. . . . .
ACTCAAT CCTAGGGC - 5'
[BamHI]
```

Horcolin

```
TTTAAATTACCAAGCATTGCATGGAGACAACACTGTCAATAGAATCTAGTAAAGCAAATTGAACTGGGATTAATCATTAGTCTT
5' - GGGAATTCGCATGGAGACAACACTG - 3'
[EcoRI]
TATAACTGCTAAATTTTTAGAAAGAGTTCACATGGACCCGTTACCACAATGTTACAAGAATGATATTCAGTAAAATGTGCCTG
TAATGAGATTGCTACCAAGTTTTAGACATGTCTAATTAGACAAGAATGGTGTGCATTAATTAATCTTATCTTACAACAGTCT
CAATGACAGTGAGCGGTGTACTACTTTTTATGCTTATCAACTATCGGGAGCTGAGGTGTA CGTACGGCTATATATAGGTGGCT
TTGCATCGATCAACGAA GCCATCCAGCAAACCTAAGTCACTCTTCTAGACCAATACATAGGTTGCTGCCTTGGGTGGATTGG
3' - GGTTATGTATCCAACGACGG CCTAGGGC - 5'
[BamHI]
TAAAGCAGGAGCCAAA ATGGTATGTGTTTGATC. . . . .
```

Abbildung 3.16.: Primerbindungsstellen zur Klonierung der Upstream-Regionen der Gene von HL#2 und Horcolin in den Vektor pe35AscIoptRed. Die eingefügte Schnittstellen sind blau/fett, die putative Promotorregion blau/kursiv, das Startcodon fett/kursiv gekennzeichnet.

tern. Wie zu sehen ist, wurde für HL#2 nicht die gesamte Upstream-Region kloniert, sondern nur die Region von -209 bis -6 (bezogen auf das Startcodon), die nach Abgleich mit den Sequenzen aus den Datenbanken (Proscan und GenscanW, siehe oben) mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Promotorregion beinhaltet (mit Schnittstellen 219 bp). Im Vergleich dazu wurde für Horcolin die gesamte bekannte Upstream-Sequenz von Position -414 bis -31 zur Klonierung verwendet (mit Schnittstellen 399 bp).

Die Plasmide A2 (Vektor mit HL#2-Promotor), B5 (Vektor mit Horcolin-Promotor) und C2 (Vektor ohne Promotor) (vgl. Abbildung 3.17) wurden über eine Säule gereinigt (QIAGEN QIA prep[®] Spin Miniprep Kit) und für das Particle Bombardment an Goldpartikel gefällt (siehe unter Abschnitt 2.2.9 auf Seite 24). Der Beschuss erfolgte mit den in Tabelle 2.3 auf Seite 26 angegebenen Parametern auf 7 Tage alte Gerstenblätter aus Anzucht unter Normalbedingungen. Die Inkubation erfolgte für 48 h ebenfalls unter Normalbedingungen. Die Ergebnisse der anschließenden Fluoreszenzmikroskopie sind in Abbildung 3.18 gezeigt.

In den Fotos A und B der Abbildung 3.18 sind die Ergebnisse der Positiv- und Negativkontrolle gezeigt. Als Positivkontrolle wurde der unveränderte Vektor pe35AscIoptRed für die transiente Expression verwendet. Dieser zeigte in allen Proben eine starke Expression in Cytoplasma und

3. Ergebnisse

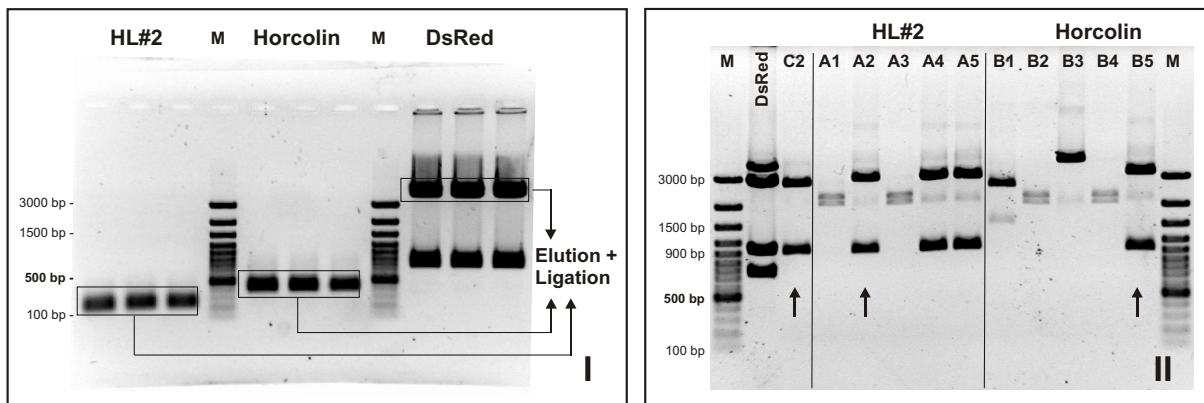


Abbildung 3.17.: Klonierung der Upstream-Regionen von HL#2 (219 bp) und Horcolin (399 bp) in den Vektor pe35AscIoptRed. Gezeigt sind 1 %ige Agarosegele nach Ethidiumbromidfärbung. Vektor und PCR-Fragmente wurden mit *EcoRI* und *BamHI* verdaut, aus dem Gel eluiert (Gel I) und die Ligationsansätze in *E. coli* DH5 α transformiert. Klone für HL#2 (A1-A5), Horcolin (B1-B5) und ohne Promotor (C2) wurden durch HB-Lyse und Restriktion mit *HindIII* auf korrekte Insertion hin überprüft (Gel II). Die mit Pfeilen markierten Klone wurden für den Beschuss ausgewählt. M: Marker GeneRuler™ 100 bp von FERMENTAS, 300 ng.

Zellkern. Wie für den Standardmarker GFP aus *Aequorea victoria* beschrieben, ist das DsRed-Protein klein genug, um neben seiner cytoplasmatischen Lokalisation auch durch die Kernporen in den Zellkern zu gelangen. Als Negativkontrolle wurde das Plasmid C2, also der Vektor pe35AscIoptRed ohne Promotor verwendet, wobei in allen untersuchten Proben nach Beschuss und 48 und 72 h Inkubation keine Expression nachzuweisen war.

Eine Expression von DsRed unter der Kontrolle der beiden klonierten Promotorbereiche von HL#2 und Horcolin ist nach 48 h in beiden Fällen nachweisbar. Auch hier ist das DsRed sowohl im Cytoplasma, als auch im Kern zu erkennen. Die Expression ist im Vergleich zur Positivkontrolle mit dem starken, doppelt inserierten CaMV-35S-Promotor etwas schwächer. Auch zeigen weniger Zellen eine Expression, was jedoch auch auf eine geringere Konzentration der für den Beschuss verwendeten Plasmidlösung zurückgeführt werden kann.

Aus den bisherigen Daten war bekannt, dass die Expression von HL#2 durch unterschiedliche Lichtflüsse reguliert wird. Daher wurden Versuche durchgeführt, bei denen nach Beschuss der Gerstenblätter nach 24 h Inkubation die Petrischalen für weitere 24 bis 48 h ins Hochlicht (1200 μ E) bei 24 °C oder bei 5 °C überführt wurden. Die Expression des DsRed unter der Kontrolle des HL#2-Promotors ließ sich jedoch nicht verstärken.

Das Protein Horcolin ist gewebespezifisch nur in den Koleoptilen zu finden. Daher war angenommen worden, dass eine Expression des DsRed-Markers in den Epidermiszellen der Blätter

3. Ergebnisse

nicht stattfindet, sondern nur in den Zellen der Koleoptile. Das ließ sich jedoch nicht zeigen. Im Gegenteil, bei Beschuss von Blättern und Koleoptilen konnte eine Expression in beiden Geweben nachgewiesen werden.

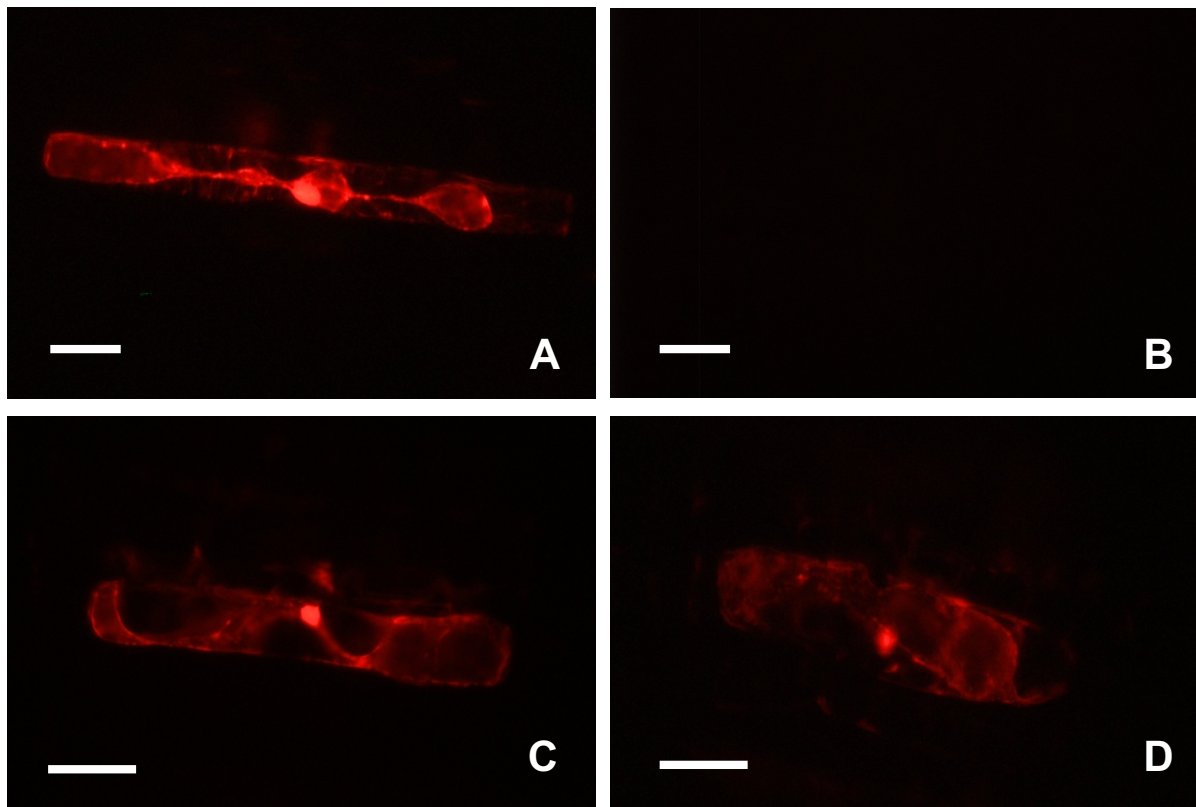


Abbildung 3.18.: Transiente Expression von DsRed unter der Kontrolle verschiedener Promotoren nach Particle-Bombardment-Transformation auf unter Normalbedingungen angezogene Gerstenblätter. Gezeigt sind digitale Bilder der Fluoreszenzmikroskopie mit dem Filtersystem Ex 565/30 nm, B 585 nm, Em 620/60nm (vergl.: 2.2.9 auf Seite 25). Parameter: Gain 16, Rot 0,602 s, Blau 2,080 s, Grün 2,475 s. Weiße Balken repräsentieren 10 μm . A, transiente Expression unter 35S-Promotor-Kontrolle; B, keine Expression mit dem Kontrollvektor ohne Promotor; C, transiente Expression unter HL#2-Promotor-Kontrolle; D, transiente Expression unter Horcolin-Promotor-Kontrolle.

3.4. Untersuchungen zur Genexpression von HL#2 und Horcolin auf mRNA-Ebene

In den Arbeiten von Menhaj (1999) und Pötter (1996) waren Untersuchungen zur Expression des HL#2 unter verschiedenen Lichtbedingungen und mit Jasmonatbehandlung durchgeführt worden. Um beide in dieser Arbeit behandelten Proteine hinsichtlich ihrer Regulation vergleichen zu können, wurden die genannten Untersuchungen auf Horcolin ausgeweitet, für das bisher solche Daten nicht vorlagen, sowie der Einfluss weiterer Umweltfaktoren getestet.

Die Northern-Blot-Analyse mit der Horcolin-cDNA-Sonde ergab keine Induktion bis zu Lichtflüssen von 1500 μE bei 5 °C und 24 °C. Die Hochlichtbehandlung wurde entsprechend Abschnitt 2.1.1 auf Seite 13 durchgeführt und die Gesamt-RNA nach 2 bis 72 h untersucht. Versuche zur Ergrünung wurden ebenfalls durchgeführt. Diese waren jedoch nicht eindeutig.

Auch eine Behandlung mit 45 μM Methyljasmonat, die bei HL#2 nachweislich sowohl die mRNA, als auch die Proteinmenge positiv reguliert (Menhaj et al., 1999), hatte auf die Expression von Horcolin keinen Einfluss (getestet 24, 48, und 72 h nach Behandlungsbeginn).

100 μM Abscisinsäure (ABA) bis zu 72 h führte weder bei HL#2, noch bei Horcolin zu einer Veränderung des mRNA- oder Proteinlevels.

Eine positive Antwort auf mRNA-Ebene konnte für Horcolin jedoch auf die Behandlung mit 1,5 % NaCl nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 3.19). Die Behandlung wurde wie in Abschnitt 2.1.1 auf Seite 13 durchgeführt, wobei die Gesamt-RNA nach 24, 48 und 72 h mit der Horcolin-cDNA-Sonde untersucht wurde. Die mRNA-Menge des Horcolin steigt mit der Salzbehandlung bis zu 24 h an und fällt in den nächsten Tagen trotz Weiterbehandlung langsam wieder ab. Für HL#2 ist eine Salzinduktion nicht nachweisbar (Rupprecht, 2001).

Weiterhin wurde eine mögliche Antwort auf eine Verwundung getestet. Hierfür wurden 6 Tage alte Gerstenpflanzen aus Normalanzucht verwendet und mit einer Pinzette das Primärblatt dreimal über die gesamte Länge und zusätzlich die Koleoptile einmal in der Mitte gequetscht. Die Gesamt-RNA wurde mit der HL#2- und der Horcolin-cDNA-Sonde untersucht. Diese Untersuchung ergab eine positive Regulation der HL#2-Expression, jedoch keine Änderung des mRNA-Levels für Horcolin. Abbildung 3.20 zeigt die Induktion der Transkription des HL#2-Genes nach der Verwundung. Die mRNA akkumuliert bis zu 4 h und fällt dann innerhalb der nächsten 24 h wieder ab.

3. Ergebnisse

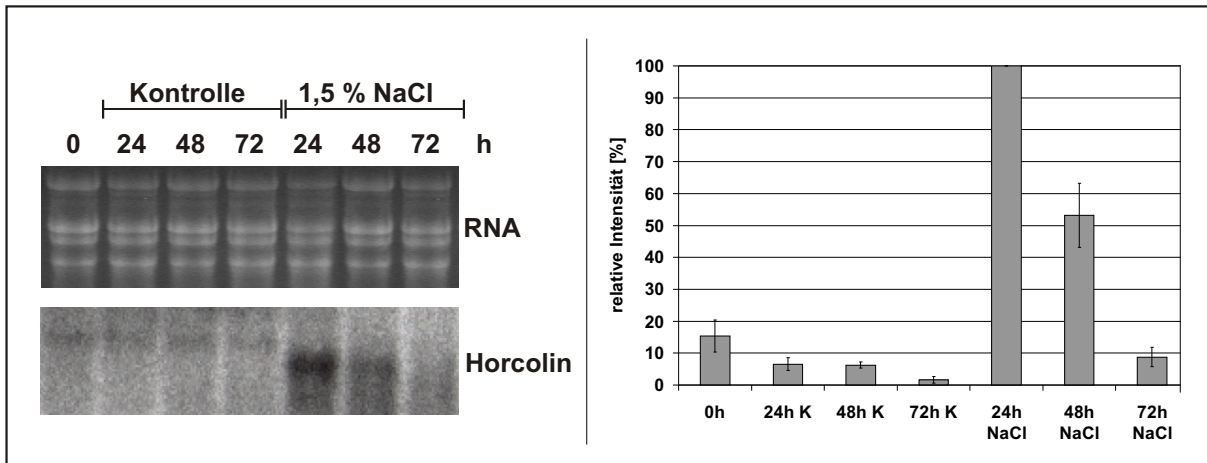


Abbildung 3.19.: Expression des Horcolin-Genes unter Salzbehandlung. 6 Tage alte Gerste aus Normalanzucht wurden mit 1,5 % NaCl behandelt oder nur mit Leitungswasser gegossen (Kontrolle, K) und Gesamt-RNA nach 24, 48 und 24 h isoliert, unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und in einem Northern Blot mit einer Horcolin-cDNA-Sonde analysiert. Gezeigt ist der gleichmäßige Auftrag der RNA-Proben im Agarosegel und der exprimierte Röntgenfilm nach der Hybridisierung. Die Signalstärken wurden mit dem Programm Tina 2.09g ausgewertet. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte, der eingezeichneten Fehlerindikatoren Minimal- und Maximalwerte.

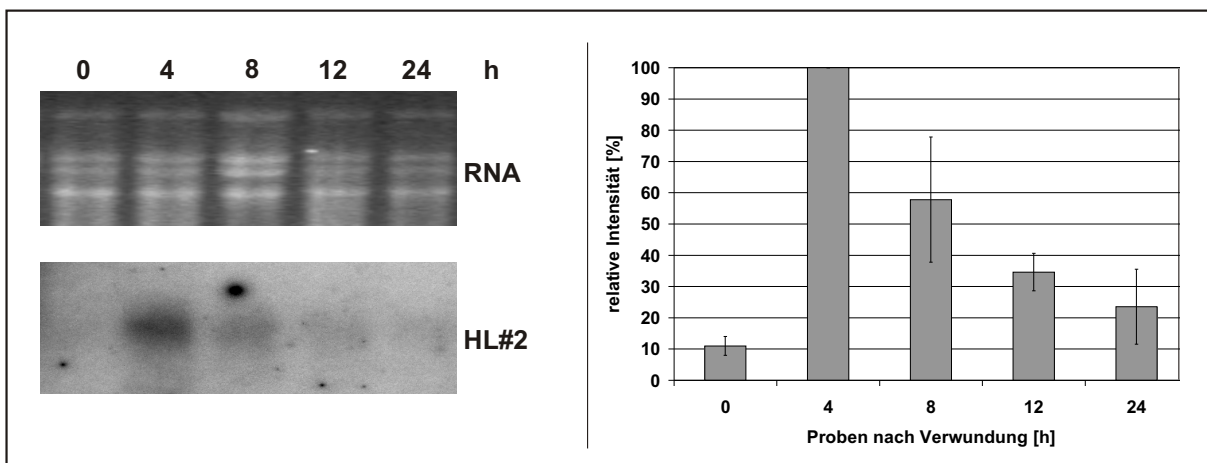


Abbildung 3.20.: Expression des HL#2-Genes nach Verwundung. 6 Tage alte Gerste aus Normalanzucht wurden mit einer Pinzette verletzt und Gesamt-RNA nach 4, 8, 12 und 24 h isoliert, unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und in einem Northern Blot mit einer HL#2-cDNA-Sonde analysiert. Gezeigt ist der gleichmäßige Auftrag der RNA-Proben im Agarosegel und der exprimierte Röntgenfilm nach der Hybridisierung. Die Signalstärken wurden mit dem Programm Tina 2.09g ausgewertet. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte, der eingezeichneten Fehlerindikatoren Minimal- und Maximalwerte.

3.5. Untersuchungen zu Lokalisation und Transport

Mit der Methode der "Infiltration-Zentrifugation" können Proteine des Apoplasten isoliert werden (vgl. Abschnitt 2.3.1.3 auf Seite 32). Mishra et al. (1999) haben in dieser Interstitiellen Waschflüssigkeit (IWF) durch Auftrennung über eine SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Analyse Horcolin und in geringeren Mengen auch HL#2 nachgewiesen (vgl. Abschnitt 3.6.1). D.h. es handelt sich bei HL#2 und Horcolin mit großer Wahrscheinlichkeit um extrazelluläre Proteine. Dennoch weisen die Proteine keine bekannten N-terminalen Signalsequenzen für einen Transport über das ER/Golgi-System auf. Daher wurden weitere Untersuchungen zur exakten Lokalisation und der Art des Transportes durchgeführt.

3.5.1. Nachweis von HL#2 und Horcolin in der IWF unter Verwendung geeigneter Kontrollen

Der in früheren Versuchen verwendete zu Horcolin kreuzreaktive Antikörper ZAK-HL#2 für den Nachweis von HL#2 und Horcolin in der IWF (Mishra et al., 1999; Menhaj, 1998), erkennt ebenfalls verwandte Proteine wie JIP 32.6 und 32.6. Um jedoch einen spezifischen Nachweis für HL#2 und Horcolin führen zu können, wurden für die Western Blots die nicht kreuzreaktiven Peptidantikörper für HL#2 und Horcolin verwendet (vgl. auch Abschnitt 3.6.1). Auf diese Weise kann sichergestellt werden, dass keine kreuzreaktiven, verwandten Proteine anstelle von HL#2 und Horcolin in der IWF nachgewiesen werden.

Um eine mögliche falschnegative Kontrolle auf Aktivität der cytosolischen Malatdehydrogenase durch eine saure Isolierung der IWF zu vermeiden, wurde nach weiteren Kontrollen gesucht, die unabhängig vom pH-Wert sowohl als Positiv-, als auch Negativkontrollen verwendet werden können.

Anstelle des Enzymtests wurde ein Nachweis mit verschiedenen Antikörpern getestet. In Abbildung 3.21 sind die Ergebnisse eines Versuches zur Bestimmung der optimalen Zentrifugationskräfte zum Trocknen der Blätter nach der Infiltration und zur Isolierung der IWF gezeigt. Die Analyse der Proben aus dieser Reihe in einer SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot ergab, dass das Protein HL#2 bereits bei der Kombination 1 000 / 1 500 rpm, was einer maximalen Zentrifugationskraft von 200 xg entspricht, gut isoliert werden kann und eine weitere Erhöhung der rpm-Werte (bis zu maximal getesteten 260 xg) zu keiner verbesserten Ausbeute führt. Daher wurden im Folgenden diese minimal notwendigen Parameter für die Zentrifugation verwendet, um möglichst viel apoplastidäre Proteine ohne signifikante cytosolische Verunreinigung isolieren zu können. Der erste Versuch des Nachweises cytosolischer Verunreinigungen mit einem Antikörper gegen die große Untereinheit der RubisCO zeigte allerdings auch, dass dieser Nach-

3. Ergebnisse

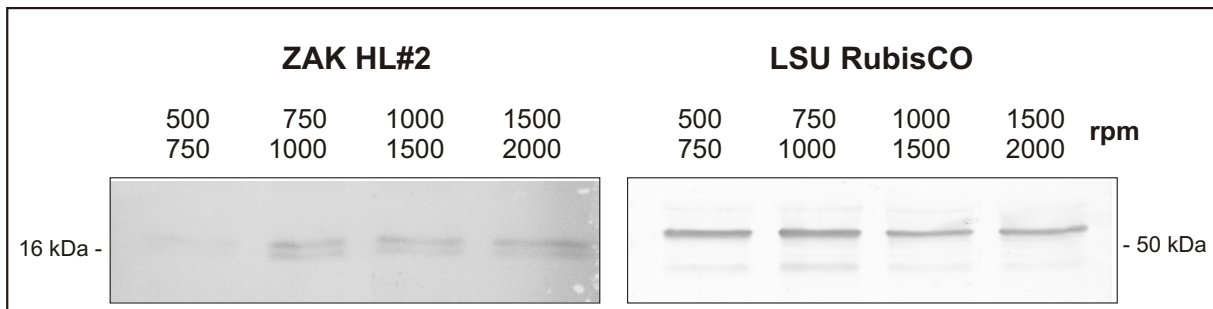


Abbildung 3.21.: Isolierung der IWF mit verschiedenen rpm-Werten. Gezeigt sind zwei Western Blots mit den Antikörpern Peptid-HL#2 (links) und LSU RuBPCase (rechts) und einer Alkalischen-Phosphatase-Reaktion. 5 Tage alte Primärblätter der Gerste wurden mit Phosphatpuffer pH 7,5 für 15 min infiltriert und in der Zentrifuge Jouan CR 3i, Ausschwingrotor (T 40) mit den angegebenen Umdrehungszahlen in rpm zuerst 1 min getrocknet (oberer Wert) und die IWF anschließend in 15 min isoliert (unterer Wert). Die Proben wurden denaturiert und über eine SDS-PAGE aufgetrennt.

weis in praktisch allen IWF-Proben selbst bei sehr geringen Kräften und mit stark verdünntem Antikörper gelang. Auf die möglichen Gründe hierfür wird in der Diskussion in Abschnitt 4.4 auf Seite 104 näher eingegangen.

Als Referenz für eine Kontamination mit cytosolischen Proteinen wurden letztlich ein Antikörper gegen HSP 70 ausgewählt. Dieser erkennt neben HSP 70 auch das lösliche Protein HSC 70 (Heat-shock cognate), das konstitutiv unter Normalbedingungen exprimiert wird.

Zusätzlich wurde eine Positivkontrolle mit einbezogen. Hierfür diente ein Antikörper gegen das apoplastidäre Protein PR-Q, welcher von Prof. Legrand freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. Dieses PR-Protein ist eine konstitutiv im Apoplasten exprimierte Chitinase (Legrand et al., 1987).

Abbildung 3.22 zeigt eine Isolierung der IWF aus Blatt und Koleoptile aus Normalanzucht-Bedingungen bei 1 000 rpm (Trocknen) und 1 500 rpm (IWF-Isolierung) mit den oben genannten Kontrollen. Zur Infiltration wurden Puffer mit zwei verschiedenen pH-Werten verwendet (pH 3,0 und 7,5). Die Proteine der IWF wurden unter denaturierenden Bedingungen in einer SDS-PAGE zusammen mit einem Gesamtproteinextrakt aufgetrennt und nachfolgend mit den Peptid-Antikörpern gegen HSP 70, PR-Q, HL#2 und Horcolin untersucht. Es wird deutlich, dass HSC 70 nur in der Gesamtproteinfraktion nachgewiesen werden kann, aber nicht in den IWF-Proben. Das Protein PR-Q lässt sich dagegen im Apoplasten nachweisen.

Mit diesen Versuchen kann sichergestellt werden, dass sowohl HL#2 als auch Horcolin in der IWF auftreten und nicht aufgrund einer unspezifischen Antikörpererkennung verwandter Proteine oder cytoplasmatischer Verunreinigung nachgewiesen werden.

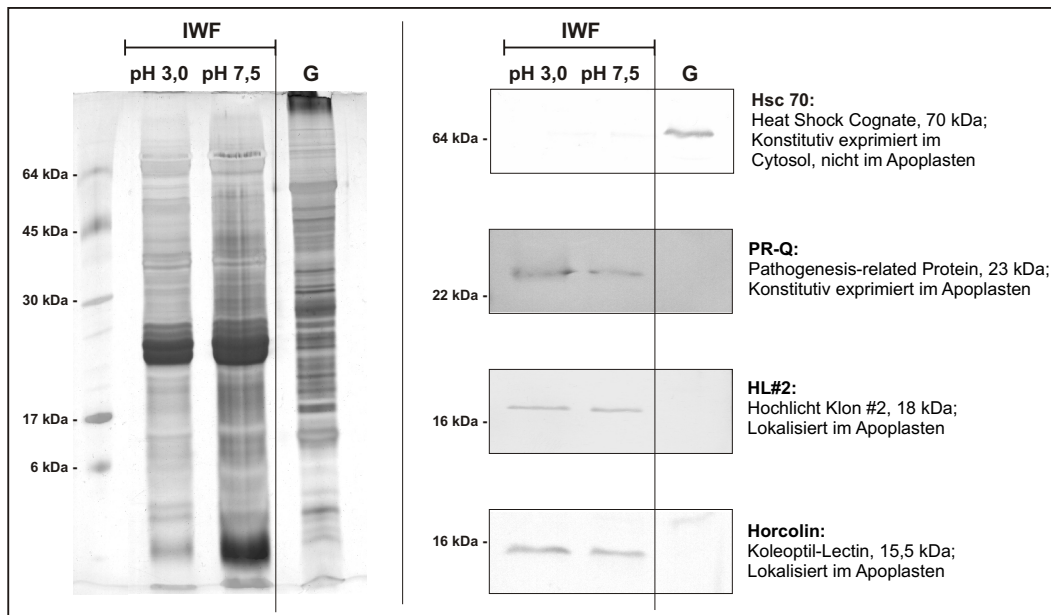


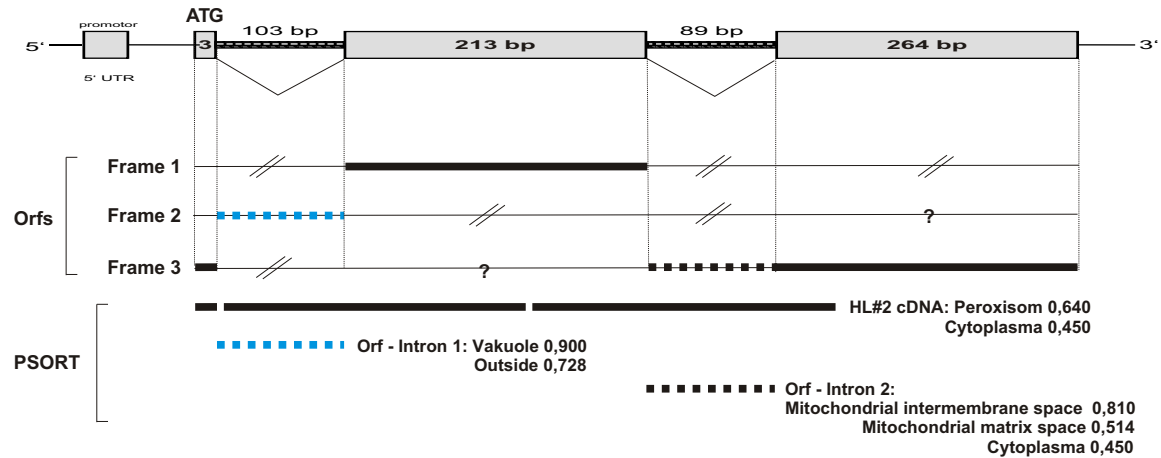
Abbildung 3.22.: Kontrollen zur Isolierung der IWF aus Gerstenblättern und Koleoptilen. Gezeigt ist ein silbergefärbtes Tris-Glycin-Gel (links) und vier Western Blots (rechts) mit Antikörpern gegen die angegebenen Proteine (für HL#2 und Horcolin die spezifischen Peptid-AK) mit der Alkalischen-Phosphatase-Reaktion. Apoplastidäre Proteine wurde aus 6 Tage alten Primärblättern inklusive der Koleoptilen mit Citrat-Phosphat-Puffer pH 3,0 und Phosphat-Puffer pH 7,5 isoliert und gegen einen Gesamtproteinextrakt (G) unter denaturierenden Bedingungen über eine SDS-PAGE (14 % Tris-Glycin) aufgetrennt. Auftrag: 2 µg Protein pro Spur (Bradford-Bestimmung), Marker: SeeBlue™ Plus2 (NOVEX).

3.5.2. Überprüfung möglicher Signalsequenzen für HL#2 und Horcolin

Auffällig war nach der Sequenzierung der genomischen Klone, dass das jeweils erste Intron direkt nach dem jeweiligen putativen Startcodon lokalisiert ist. Daher wurde vermutet, dass möglicherweise durch stressinduziertes alternatives Spleißing eine Signalsequenz an die cDNA gefügt wird. PSORT (URL in Tabelle A.1) erkennt für die Sequenzen von HL#2 und Horcolin keine N-terminalen Signalsequenzen und gibt eine vergleichsweise unspezifische Lokalisation im Cytoplasma (mit der Wahrscheinlichkeit von 0,450) und Peroxisom (0,640) an. Wie in der Abbildung 3.23 schematisch dargestellt, lässt sich die Sequenz des ersten Introns im HL#2-Gen, das direkt nach dem Start-ATG liegt, in einem der möglichen Leserahmen ohne Unterbrechung (Stoppcodon) translatieren. Diese kurze hypothetische Peptidsequenz bestimmt PSORT mit hoher Wahrscheinlichkeit als eine N-terminale Signalsequenz für die extrazelluläre Lokalisation (Outside 0,728; Vakuole 0,900).

3. Ergebnisse

HL#2 Gen



Horcolin Gen

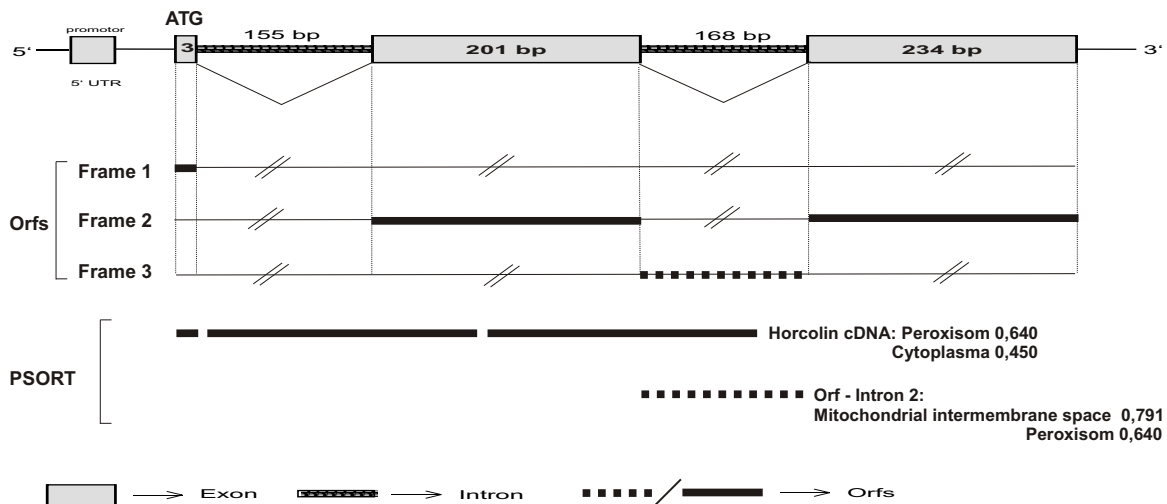


Abbildung 3.23.: Untersuchung der genomischen Sequenzen von HL#2 und Horcolin mit dem Programm PSORT (URL in Tabelle A.1). Abgeleitet von den Genkarten sind die bekannten cDNA-Sequenzen von HL#2 und Horcolin als durchgezogene, schwarze Linien gezeigt, wobei der jeweilige Leserahmen angegeben ist. Außerdem sind offene Leserahmen als gestrichelte Linien dargestellt, wobei das im Text besprochene erste Intron als hypothetisches Signalpeptid blau markiert ist. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die Bestimmung der Lokalisation mit PSORT und repräsentieren Wahrscheinlichkeiten.

3.5.3. Untersuchungen zum Transport durch Klonierung in den Vektor pGFP

Um der Frage nach der Art des Transportweges nachzugehen, wurde sowohl die cDNA des HL#2, als auch das oben besprochene erste Intron des HL#2-Genes als hypothetische Signalsequenz vor und hinter das Reporterogen für GFP (Grün-fluoreszierendes Protein aus *Aequorea victoria*) kloniert. Diese hypothetische Signalsequenz wird im Folgenden Leader bzw. Leadersequenz genannt. Die Vektoren pGFP-N und pGFP-C für die N- und C-terminale Klonierung an das Reporterogen wurden von freundlicherweise von Dr. Haensch (Institut für Pflanzenbiologie, TU Braunschweig) zur Verfügung gestellt (siehe in Abbildung A.4 auf Seite 138 im Anhang). In Abbildung 3.24 sind die hergestellten Klone zusammengestellt. Zur Überprüfung, ob in diesem System überhaupt ein Fusionsprotein transportiert wird, wurde als Kontrolle ein Konstrukt verwendet, in dem die Transitsequenz der RubisCO N-terminal vor das GFP kloniert wurde. Das exprimierte GFP soll so in die Plastiden der Epidermiszellen transportiert werden.

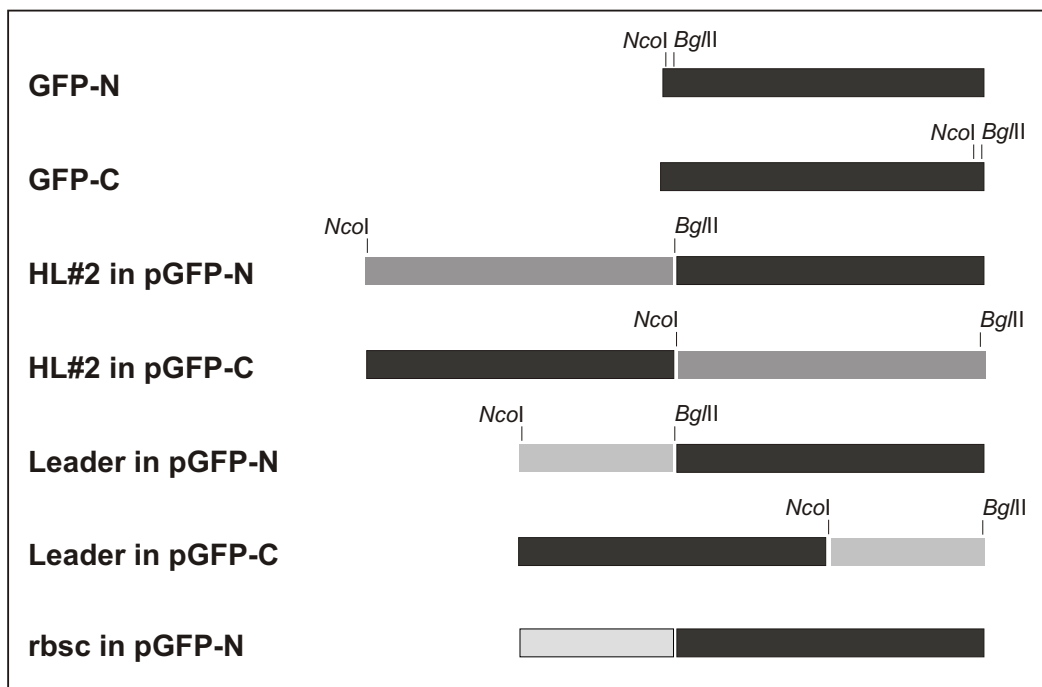


Abbildung 3.24.: Übersicht über die klonierten GFP-Konstrukte zur transienten Expression der GFP-Fusionsproteine. Das GFP ist als schwarzer, HL#2 als dunkelgrauer Balken dargestellt. Das hypothetische Signalpeptid (Leader) für HL#2 ist hellgrau und das bekannte Transitpeptid der RubisCO (rbsc) hellgrau mit Rahmen markiert.

3. Ergebnisse

Für die gerichtete Klonierung mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *BgIII* wurden Primer mit den entsprechenden Schnittstellen als 5'-Modifikation hergestellt. Um einen Verdau am Ende des DNA-Doppelstranges aus der PCR zu erleichtern, wurden an die Schnittstellen zusätzlich 2 bzw. 4 weitere Basen dem 5'-Ende zugefügt. Die Primer HL2-*NcoI*-fwd und HL2-*BgIII*-rev für die Klonierung der HL#2-cDNA und Leader-*NcoI*-fwd und Leader-*BgIII*-rev für die Klonierung der hypothetischen Leadersequenz (Sequenzen siehe in Tabelle 2.2 auf Seite 18) sind so gewählt, dass die Klonierung jeweils in das entsprechende Leseraster des GFPs erfolgte. Um eine 8 bp lange komplementäre Sequenz der beiden Primer zu unterbrechen und so eine Dimerbildung während der PCR zu vermindern, wurde in der Sequenz des Leader-*NcoI*-fwd an Position 14 die Base Cystein gegen Thymin ausgetauscht. Das mutierte Triplet CTT kodiert jedoch für die gleiche Aminosäure (Leucin) wie das ursprüngliche CTC ("Kazusa-codon-usage"-Tabelle für Gerste), so dass die Mutation nicht in der Aminosäuresequenz auftritt. Da das Primerpaar sowohl für die N-, als auch die C-terminale Klonierung verwendet wurde, besitzen die Rev-Primer kein Stoppcodon. Der Vektor pGFP-C enthält unmittelbar nach der MCS ein Stoppcodon, das anstelle dessen verwendet werden kann.

Die Abbildung 3.25 zeigt die Ansequenzierung der Plasmide aus der beschriebenen Klonierung. Durch die Sequenzierung mit den Primern GFPbsfor für die pGFP-C-Plasmide und GFPbsrev für die pGFP-N-Plasmide (Primer in Tabelle 2.2 auf Seite 18) wurde die Klonierung in den Leserahmen des GFPs überprüft.

Für die transiente Expression wurden die sequenzierten Plasmide an Goldpartikel gefällt und zunächst für eine Particle-Bombardment-Transformation nach der Vorschrift in Abschnitt 2.2.9 auf Seite 24 der Epidermiszellen von Primärblättern der Gerste aus Normalanzucht verwendet.

In Abbildung 3.26 sind die Ergebnisse der Transformation nach 48 h zusammengestellt. Das unveränderte GFP ohne Signalsequenz wird im Cytoplasma exprimiert und ist zudem so klein, dass es durch die Kernporen in den Nucleus dringen kann. Das mit dem Transitpeptid der RubisCO versehene GFP ist nach 48 h in den Plastiden der Epidermiszellen nachzuweisen.

Die Fusion mit dem Protein HL#2 hat sowohl als N-, als auch C-terminale Fusion keinen Einfluss auf den Transport, so dass in allen Fällen ausschließlich eine cytoplasmatische Lokalisation nachgewiesen werden kann, die cDNA allein also scheinbar keine Information für einen Transport enthält. Auch das als hypothetische Signalsequenz klonierte Intron des HL#2-Genes führte nicht zu einem Export des GFPs aus der Zelle. Wie in den anderen Präparaten auch, kann ausschließlich cytoplasmatische Expression nachgewiesen werden.

Um herauszufinden, ob möglicherweise Umwelteinflüsse oder Stressbedingungen einen Transport induzieren können, wurde die Blätter nach dem Beschuss mit den verschiedenen Plasmiden mit Jasmonat, ABA oder 1,5 % NaCl-Lösung durch Einsprühen 24 h nach dem Beschuss behandelt, bzw. unter Hochlicht gestellt oder der Beschuss auf mit Mehltau befallene Blätter vorge-

3. Ergebnisse

HL#2-cDNA in GFP-N:

```
5'-[...]GAATTCGCCCTTATCCATGGAAATGAGCAGCAGCCCGGTGGTGAAGCTGGGGCCGTGGGGGGG
      N S P L S M E M S S S P V V K L G P W G G
CGACGACGGGGTGGCCACGACATCAG [...] ATGTTGGCCGCGCCGAGACTACCTCCACGCCATC
      D D G V A H D I T [...] M F G R A G D Y L H A I
GGCTTCTACGCTCTCCAGAGACCAGTCTCGCATCCAGATCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG[...] -3'
      G F Y V L P E T S L A S R S M V S K G E E
```

HL#2-cDNA in GFP-C:

```
5'-[...]AATGAGCAGCAGCCCGGTGGTGAAGCTGGGGCCGTGGGGGGCGACGACGGGGTGGCCACGA
      M S S S P V V K L G P W G G D D G V A H D
CATCACGGTGGCCGCGCAGCGCTGG [...] ATGTTGGCCGCGCCGAGACTACCTCCACGCCATCGG
      I T V A P Q R L [...] M F G R A G D Y L H A I G
CTTCTACGCTCTCCAGAGACCAGTCTCGCATCCAGATCTTAAAAAGGGCGAA[...] -3'
      F Y V L P E T S L A S R S Z K G R
```

Leader in GFP-N:

```
5'-[...]TCGCCCTTATCCATGGGTCCTCCTTACTTCCGGCTCCCATGCATGAGCTCCATGATATGCTGT
      S P L S M G P S L L R L P C M S S M I C C
GCTAGCATCTTCTTACGGGACTCATGGCAGGTTGCTGTTTTGTGTGCGCGTGAGAGCTAGATTCTATGGT
      A S I F F T G L M A G C C F V C A C R A R S M V
GAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCTCGGTCGAGC[...] -3'
      S K G E E L F T G V V P I L V E
```

Leader in GFP-C:

```
5'-[...]CCGTCCTTACTTGGCTCCCATGCATGAGCTCCATGATATGCTGTGCTAGCATCTTCTTACG
      P S L L R L P C M S S M I C C A S I F F T
GGACTCATGGCAGGTTGCTGTTTTGTGTGCGCGTGAGAGCTAGATCTTAAAAAGGGCGAATT[...] -3'
      G L M A G C C F V C A C R A R S Z K G R I
```

Abbildung 3.25.: Überprüfung der GFP-Fusionskonstrukte durch Sequenzierung. Gezeigt sind jeweils die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz (blau) der Insertionen im Leserahmen des GFP (fett, schwarz). Die Schnittstellen von *NcoI* und *BglIII* sind kursiv und fett markiert. Leader bezeichnet die hypothetische Signalsequenz für HL#2.

nommen. Die Behandlung mit ABA, Salz und Hochlicht führte ebenfalls zu keinem Export des GFPs. Die Versuche mit Jasmonat und Mehltau-Befall ließen sich nicht eindeutig auswerten. Abbildung 3.27 zeigt eine oft beobachtete sporadische, lokal begrenzte Fluoreszenz der Zellwand, die neben der beschriebenen cytoplasmatischen Fluoreszenz auftritt. Diese Fluoreszenz tritt meist in den Zellwänden mehrerer benachbarter Zellen auf. Sie ist möglicherweise eine unspezifische Fluoreszenz, die durch Schädigung der Epidermis hervorgerufen werden kann. Gerade bei Mehltau-Befall besitzen die Läsionen in der Epidermisschicht eine starke Eigenfluoreszenz, die eine Unterscheidung von GFP- und Eigenfluoreszenz erschwert.

3. Ergebnisse

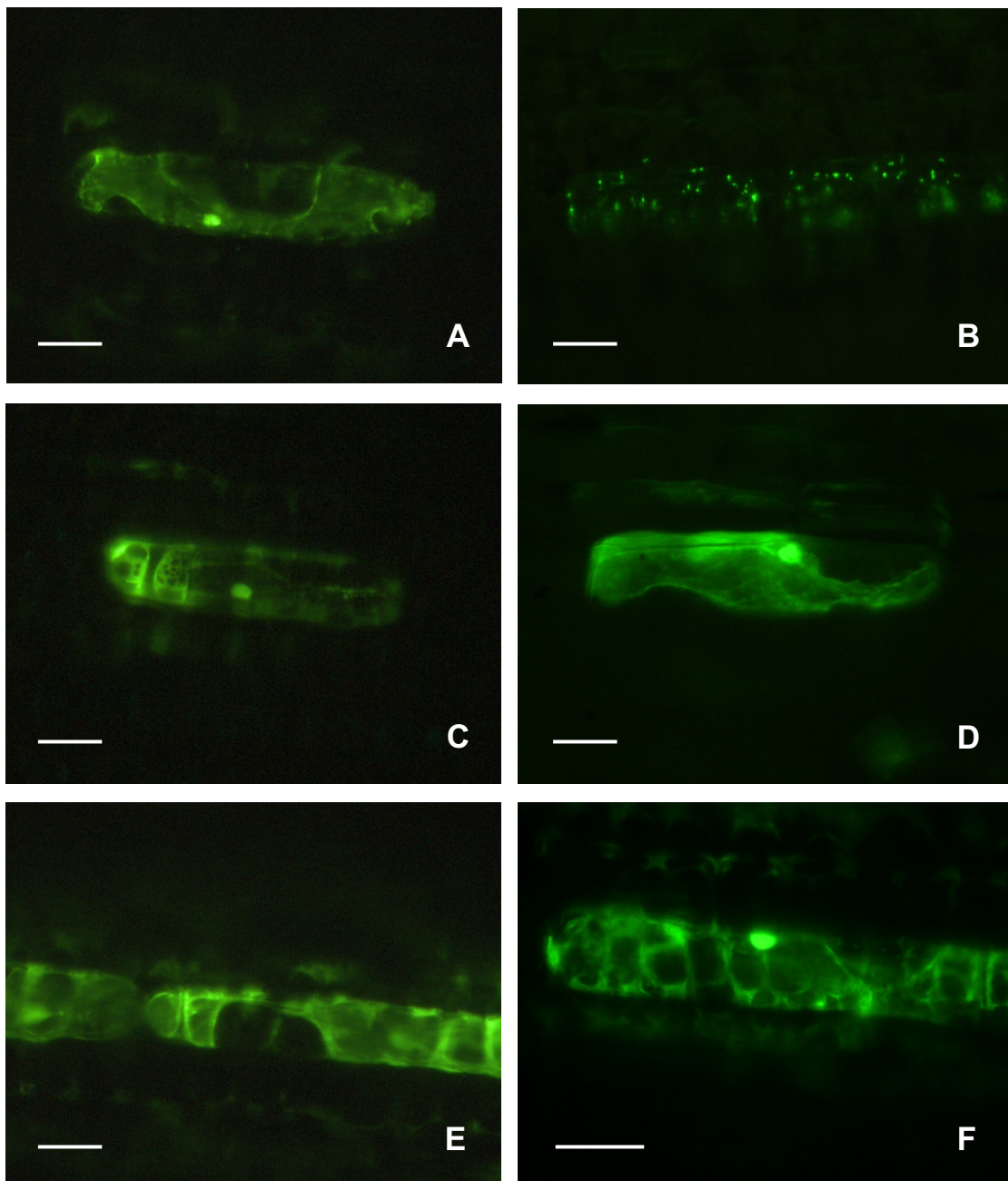


Abbildung 3.26.: Transiente Expression der GFP-Fusionsproteine nach Particle-Bombardment-Transformation auf Gerstenblätter (Oberseite, aus Anzucht unter Normalbedingungen, 7 Tage alt). Gezeigt sind digitale Bilder der Fluoreszenzmikroskopie mit dem Filtersystem Excitation 450 - 490 nm, Beam Splitter 510 nm, Emission 520 nm (vergl.: Abschnitt 2.2.9 auf Seite 25). Parameter: Rot 0,602 s, Blau 2,080 s, Grün 2,475 s, Gain 16. Weiße Balken repräsentieren 10 μm . A, transiente Expression des GFP der unveränderten pGFP-N und pGFP-C-Vektoren ohne Fusion; B, transiente Expression des Fusionsproteins *rbsc* und GFP (N-terminale Fusion an GFP, Transport in Plastiden); C-F, transiente Expression der Fusionsproteine aus HL#2 und GFP N-terminal (C) und C-terminal (D); Leader und GFP N-terminal (E) und C-terminal (F). Leader bezeichnet das hypothetische Signalpeptid für HL#2.

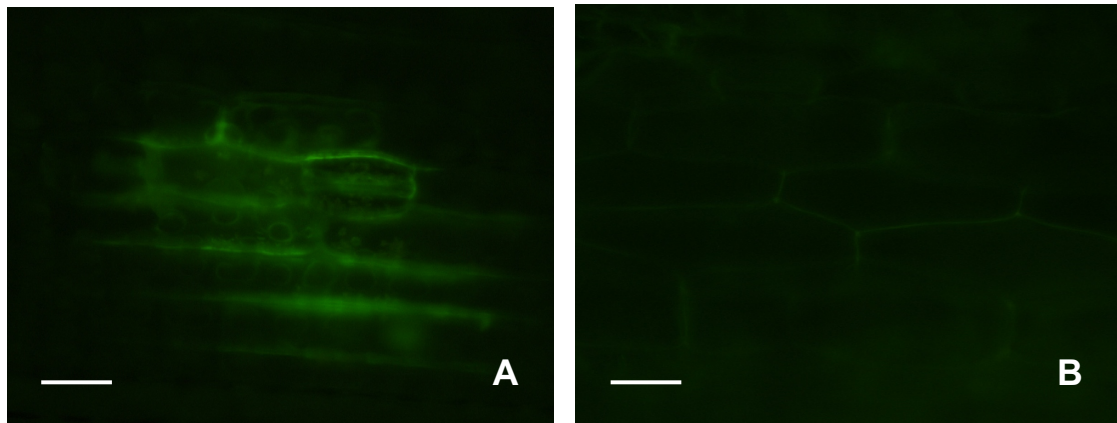


Abbildung 3.27.: Fluoreszenz in gestresstem Gewebe (Gerstenblätter, Oberseite). Gezeigt sind digitale Bilder der Fluoreszenzmikroskopie mit dem Filtersystem Excitation 450 - 490 nm, Beam Splitter 510 nm, Emission 520 nm (vergl.: 2.2.9 auf Seite 25). Parameter: Rot 0,602 s, Blau 2,080 s, Grün 2,475 s, Gain 16. Weiße Balken repräsentieren 10 μm . A, Fluoreszenz nach Particle-Bombardment-Transformation Mehltauinfizierter Gerstenblätter; B, Fluoreszenz nach Particle-Bombardment-Transformation von Gerstenblättern mit Jasmonatbehandlung.

3.5.4. Nachweis der hypothetischen HL#2-Leadersequenz durch RT-PCR

Da die Aussagen aus den GFP-Bildern nicht eindeutig waren, wurde mit einer RT-PCR überprüft, ob das erste Intron als alternative Signalsequenz des HL#2-Genes in der Fraktion der RNA nachgewiesen werden kann. Wenn diese hypothetische Signalsequenz unter bestimmten Bedingungen, möglicherweise stressinduziert, aus der Prä-mRNA nicht durch Spleißing entfernt würde, sollte es in einer RNA-Extraktion nachweisbar sein. Das Ergebnis dieser RT-PCR ist in Abbildung 3.28 dargestellt. Für diesen Test wurden Gerstenpflanzen sowohl etioliert (A), als auch unter Normalbedingungen (C) angezogen. Etiolierte Pflanzen wurden 4 h (B) belichtet, ergrünte Pflanzen jeweils 8 h nach Verwundung (D), Hochlicht bei 25 °C (E) und Hochlicht bei 5 °C (F) geerntet, Gesamt-RNA nach der Vorschrift isoliert und nachfolgend mit DNase verdaut. Die RT-PCR wurde semiquantitativ nach der Vorschrift in Abschnitt 2.2.3.4 auf Seite 21 mit gleichen RNA-Mengen durchgeführt, wobei 3 μg DNase-verdaute Gesamt-RNA für eine cDNA-Synthese und 150 ng der cDNA für die nachfolgende PCR eingesetzt wurde. Für letztere wurden zwei Primerpaare verwendet: Intron1-HL2-fwd und -rev, die innerhalb des Introns binden und HL2-fwd und -rev (siehe in Tabelle 2.2 auf Seite 18). Das erste Primerpaar dient zum Nachweis der Intronsequenz, das zweite, cDNA-spezifische Primerpaar zur Kontrolle auf Reste genomischer DNA. Die mit diesem Primerpaar amplifizierten PCR-Fragmente sind ca. 400 bp groß, was

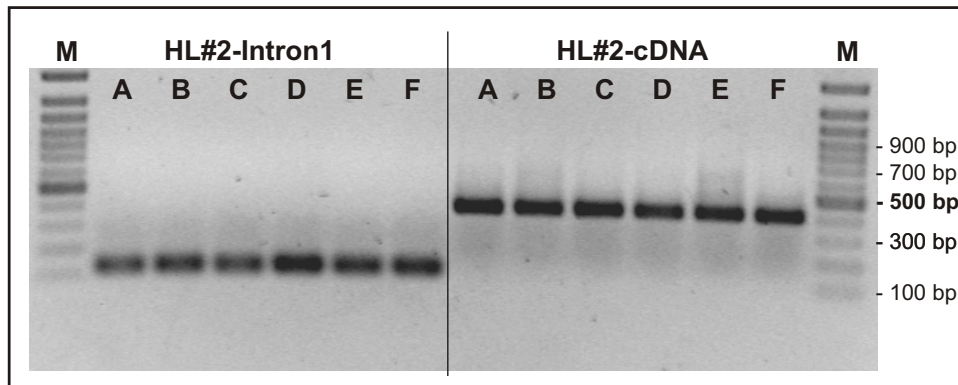


Abbildung 3.28.: Nachweis der hypothetischen Leadersequenz von HL#2 in der RNA durch RT-PCR. Gezeigt sind die Ergebnisse der PCR mit 150 ng cDNA aus etiolierten (A) und unter Normalbedingungen angezogen (C) Gerstenblättern. Etiolierte Pflanzen wurden 4 h (B) belichtet, ergrünte Pflanzen jeweils 8 h nach Verwundung (D), Hochlicht bei 25 °C (E) und Hochlicht bei 5 °C (F) geerntet. M: Marker GeneRuler™ 100 bp von FERMENTAS, 300 ng.

der cDNA-Größe von 411 bp entspricht. Amplifikate der genomischen DNA sollten ca. 200 bp größer sein. Diese sind hier nicht nachweisbar. In allen untersuchten Proben A bis F kann das Intron mit spezifischen Primern mit einer Größe von 117 bp nachgewiesen werden.

3.6. Biochemische Eigenschaften der Proteine HL#2 und Horcolin

Viele der isolierten Proteine der Apoplastenflüssigkeit gehören zu den PR-Proteinen, möglicherweise gilt das auch für HL#2 und Horcolin, die nachweisbar Lektineigenschaften besitzen (vgl. Kapitel 1 auf Seite 1). Beide Proteine wurden deshalb hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften (spezifische Zuckerbindung und Quartärstrukturen) näher untersucht, um ihre möglichen Funktionen besser verstehen zu können, z. B. bei einer Bindung an Zellwandkomponenten zur Stabilisierung unter Stressbedingungen oder bei der Pathogenabwehr.

3.6.1. Herstellung eines Peptid-AK für Horcolin

Wie in der Einleitung beschrieben, zeigte der erste gegen das aufgereinigte Fusionsprotein GST-HL#2 erhaltene Antikörper (ZAK-HL#2) im Western Blot eine Kreuzreaktivität mit einem zweiten Protein, das deshalb zunächst HL#2* und nach weiterer Charakterisierung Horcolin genannt wurde. Um beide Proteine eindeutig voneinander unterscheiden zu können, wurde zu dem bereits

3. Ergebnisse

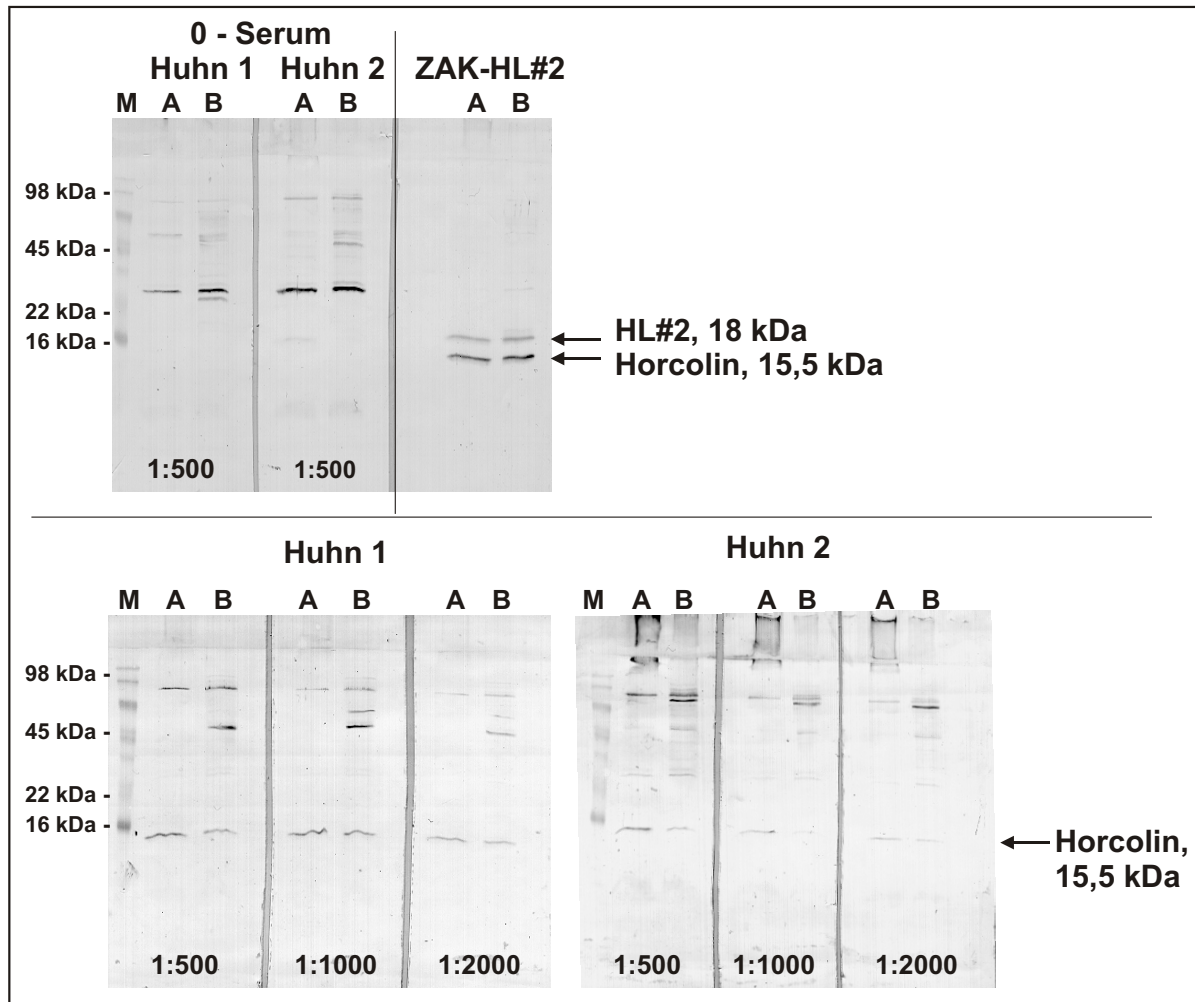


Abbildung 3.30.: Qualität des Peptid-Horcolin-Antikörpers. 5 µg lösliche Proteine aus den basalen Abschnitten 6 Tage alter Primärblätter inklusive der Koleoptilen wurden bei pH 3,0 (A) und 7,5 (B) isoliert, in einem 14 %igen Tris-Glycin-Gel aufgetrennt und anschließend im Western Blot analysiert. Der immunologische Nachweis erfolgte mit unterschiedlichen Verdünnungen der Antikörper aus beiden Hühnern und dem sekundären Antikörper Anti-Huhn-IgG-AP in der Verdünnung 1:10 000. Parallel wurden die Nullseren der Tiere auf bereits vorhandene Reaktivität mit Gerstenproteinen getestet. M: Marker SeeBlue™ Plus2, NOVEX.

3. Ergebnisse

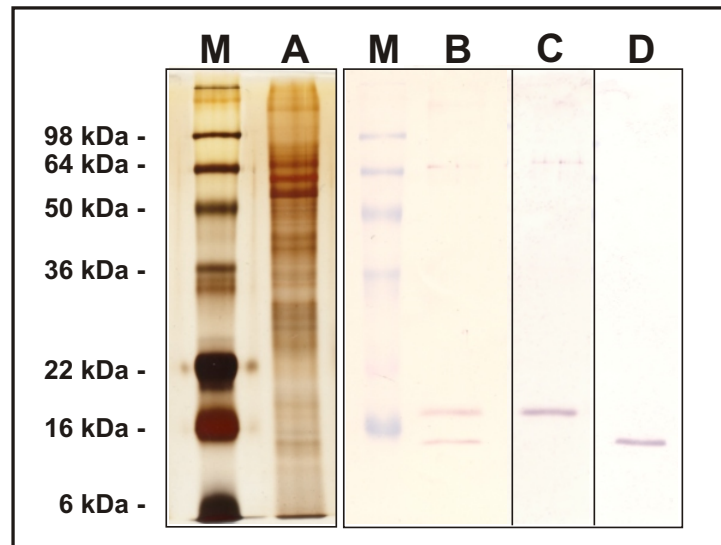


Abbildung 3.31.: Vergleich der verschiedenen Antikörper gegen HL#2 und Horcolin. 5 µg Gesamtprotein aus den basalen Abschnitten 6 Tage alter Primärblätter inklusive der Koleoptilen wurden in einem 14 %igen Tris-Glycin-Gel aufgetrennt und anschließend entweder silbergefärbt oder im Western Blot analysiert. A: silbergefärbtes Gel, B-D: Western Blots mit den Antikörpern ZAK-HL#2 (B, 1:500), Peptid-HL#2 (C, 1:1 000) und Peptid-Horcolin (D, 1:1 000) und den entsprechenden sekundären Antikörpern Anti-Ziege/Kaninchen/Huhn-IgG-AP in der Verdünnung 1:10 000. M: Marker SeeBlue™ Plus2, NOVEX.

der sauren Extraktion auf die Bindungsfähigkeit wird hier in einem Bindungsversuch mit Mannose, Maltose und Galaktose untersucht.

Die Ergebnisse der in in Abbildung 3.32 zusammengefassten Bindungstests zeigen Folgendes: Horcolin besitzt nicht nur eine Affinität für Mannose, wie bereits früher nachgewiesen werden konnte, sondern auch für Maltose, jedoch nicht für Galaktose. Letzterer Versuch stellt somit auch sicher, dass die Bindungen tatsächlich mit den untersuchten Zuckern stattfanden und nicht mit der Agarosematrix. Weiterhin zeigte sich, dass der pH-Wert des Extraktionspuffers bei der Isolierung der Proteine tatsächlich eine Rolle spielt. Erfolgte die Extraktion im neutralen Milieu, zeigte Horcolin keine aktive Bindungsfähigkeit. Anders bei der sauren Extraktion mit anschließender Neutralisierung mit 0,1 M NaOH auf pH 7,5, hier kann eindeutig eine reversible Bindung an Mannose und Maltose nachgewiesen werden.

3. Ergebnisse

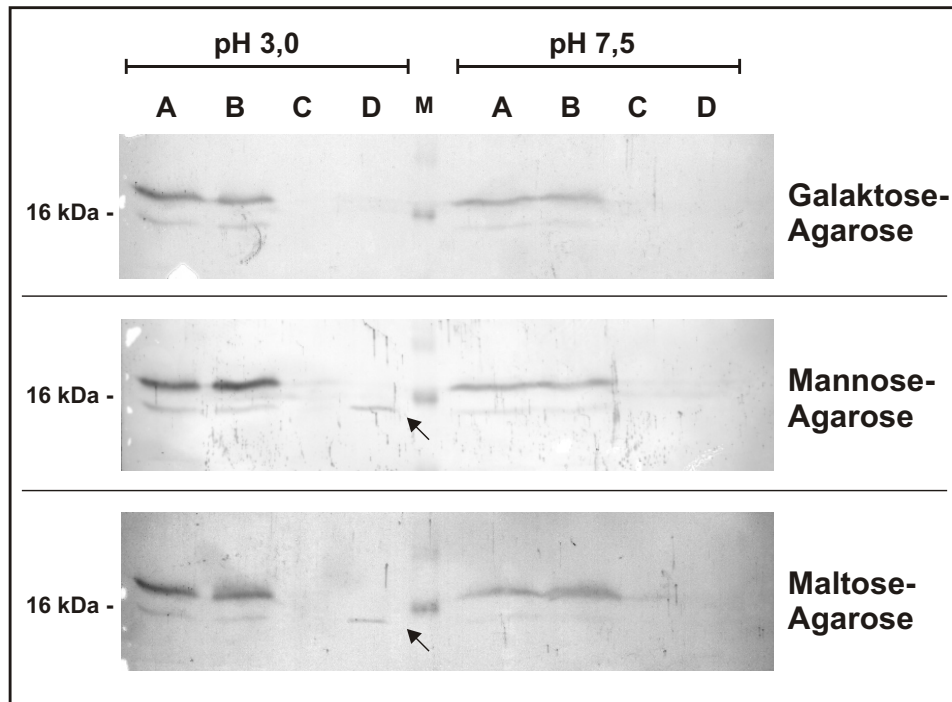


Abbildung 3.32.: Bindungsfähigkeit von HL#2 und Horcolin an verschiedene Zucker. Für diesen Test wurden 2 g Primärblätter (6 Tage alt, Normalanzucht) inklusive Koleoptilen in 6 ml Extraktionspuffer, pH 3,0 bzw. pH 7,5 homogenisiert, zentrifugiert und der Überstand mit der löslichen Proteinfraction für den Bindungstest bei pH 7,5 an Galaktose-, Mannose- und Maltose-Agarose im Batchversuch verwendet. Gezeigt sind Western Blots der in SDS-PAGE (14 %) aufgetrennten Proteinfractionen mit dem Antikörper ZAK-HL#2 und Anti-Ziegen-IgG-AP. In Spur A ist die Proteinlösung vor der Bindung an die Zucker aufgetragen. Die Proteinlösungen wurden mit den entsprechenden Zuckern inkubiert, danach wieder zentrifugiert und der Überstand in Spur B aufgetrennt. Die Zucker-Matrizes wurden zweimal mit dem zur Proteinisolierung verwendeten Extraktionspuffer durch Schütteln, Zentrifugieren und Verwerfen des Überstandes gewaschen und der Überstand nach dem letzten Waschschrift in Spur C überprüft. Die gebundenen Proteine (Spur D) wurden durch Inkubation mit 0,1 M Citronensäure (pH 2,3) mit je 0,1 M Mannose und Maltose von der Matrix eluiert. M: Marker SeeBlue™ Plus2, NOVEX.

3.6.3. Papainverdau von HL#2 und Horcolin

Durch den Verdau der Proteine aus IWF und löslicher Proteinfraction mit der Protease Papain, die nach einer bestimmten, kurzen Aminosäuresequenz schneidet, sollten gelegentlich auftretende Banden im Western Blot mit den HL#2 und horcolinspezifischen Antikörpern im Bereich von 50 bis 90 kDa untersucht werden. Hierbei wurde untersucht, ob diese Banden eventuell unzureichend denaturierte Multimere der Proteine repräsentieren.

IWF und lösliche Proteine wurden aus 6 Tage alten Gerstenblättern aus Normalanzucht isoliert, zur Konzentration der Proteine und Puffertausch dialysiert, gefriergetrocknet und in 150 mM NaCl in einer Konzentration von 4 mg/ml aufgenommen. Der Verdau wurde durch Verdünnung von 10 µl Protein in 60 µl Verdaupuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0 mit 5 mM CaCl₂) und Zugabe von 10 ml Papain (1:50 in Verdaupuffer verdünnt, SIGMA, P3125) bei 37 °C verdaut. Der Verdau wurde nach 5, 10 und 20 min durch Zugabe von einem Volumendrittel 3×SDS-Probenpuffer (vgl. Abschnitt 2.3 auf Seite 30) und 5 minütigem Kochen gestoppt. Die Proben wurden nachfolgend in einem 14 %igen Tris-Glycin-Gel aufgetrennt und in einem Western Blot analysiert (siehe Abbildung 3.33).

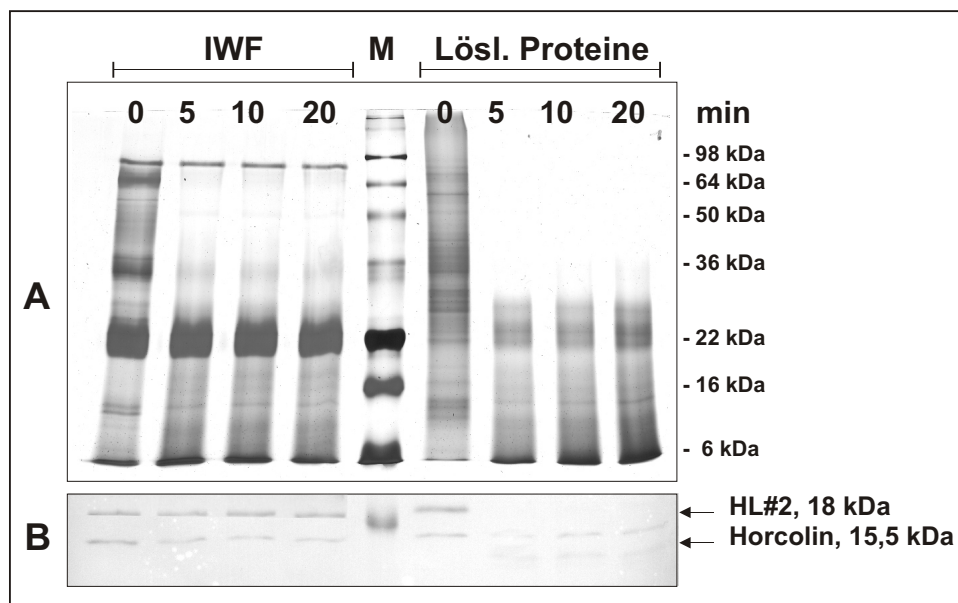


Abbildung 3.33.: Proteaseverdau von HL#2 und Horcolin in der IWF und löslichen Proteinfraction. Proteine der IWF und der löslichen Fraktion wurden mit Papain behandelt und der Verdau nach 5, 10 und 20 min gestoppt. Gezeigt sind die denaturierten Proteine in einem 14 %igen Tris-Glycin-Gel nach Silberfärbung (A) und der entsprechende Western Blot (B) mit dem zu Horcolin kreuzreaktiven primären Antikörper ZAK-HL#2 (1:500) und dem Sekundären Anti-Ziegen-IgG-AP-Antikörper (1:10 000). M: Marker SeeBlue™ Plus2, NOVEX.

3. Ergebnisse

Die oben beschriebenen Proteinbanden bleiben auch nach dem Verdau bestehen, jedoch zeigte sich bei der Auswertung ein anderer interessanter Sachverhalt: Beide Proteine weisen Papainschnittstellen auf. HL#2 hat drei an den Positionen 92 (FKL), 94 (LKE) und 104 (LKF), so dass bei einem vollständigen Verdau neben kleinen Fragmenten zwei Peptide mit den Massen 9,8 kDa und 6,1 kDa entstehen. Horcolin besitzt eine Papainschnittstelle an der Position 97 (LKI), so dass das 15,5 kDa große Protein in zwei Peptide der Größen 10,1 kDa und 5,4 kDa fragmentiert wird. Um auch diese kleineren Peptide im Western Blot nachweisen zu können, wurde der zu Horcolin kreuzreaktive ZAK-HL#2-Antikörper verwendet.

In Abbildung 3.33 zeigt sich folgendes Bild: die HL#2-Bande verschwindet in der löslichen Fraktion nach Papainverdau und es treten die Banden der Peptide von ca. 6 und 9 kDa auf. Die HL#2-Bande bleibt aber in der IWF unverändert. Horcolin lässt sich hingegen sowohl in der IWF, als auch in der löslichen Fraktion nicht verdauen. Möglicherweise überdecken verschiedene Glykosylierungen oder andere posttranslationelle Modifikationen die Papainschnittstellen oder die Quartärstruktur verhindert einen Verdau.

3.6.4. Untersuchung der Quartärstruktur des Horcolin

HL#2 und Horcolin sind durch Sequenzvergleiche und Zuckerbindungstests als Proteine mit Lektineigenschaften bestimmt worden. Das wiederum gibt einen Hinweis auf die möglichen Quartärstrukturen, da nur multimere Proteine in der Lage sind, zu agglutinieren. Um die Anzahl der Monomere zu bestimmen, wurde eine Gelfiltration mit nativ aufgereinigtem Horcolin durchgeführt. Durch die Verwendung eines sauren Proteinextraktes aus etiolierten Koleoptilen konnte Horcolin in der Proteinlösung angereichert werden.

Hierfür wurden 2 g Koleoptilen 6 Tage alter Pflanzen aus Dunkel-Anzucht mit 6 ml Citrat-Phosphat-Puffer pH 3,0 mit 0,1 M NaCl und 1 mM MgCl₂ homogenisiert, im Vivaspin-Konzentrator (5,0 MWCO PES) konzentriert und mit Phosphatpuffer pH 7,6 umgepuffert (vgl. Abschnitt 2.3.3 auf Seite 35). Zur Erstellung einer Proteineichgerade wurde neben den im Methodenteil beschriebenen einzelnen Proteinen auch ein Mix aus Catalase (240 kDa), Ovalbumin (45 kDa) und Myoglobin (17 kDa) zusammen aufgetragen (vgl. Abbildung 3.34, A). 100 µl des umgepufferten Koleoptilextraktes mit einer Konzentration von 1 mg/ml wurde für die Gelfiltration nach der Vorschrift in Abschnitt 2.3.8 auf Seite 43 eingesetzt. Die Proteine der während der Gelfiltration gesammelten 0,5 ml-Fractionen wurden in 10 % TCA gefällt, denaturiert, über eine SDS-PAGE (14 %) aufgetrennt und im Western Blot mit dem spezifischen Peptid-Horcolin-Antikörpers untersucht.

Abbildung 3.34 zeigt ein Chromatogramm des oben beschriebenen Eichproteinmixes (A) und die aus allen Retentionszeiten der Eichproteine erstellte Eichfunktion (B, die Proteine des Mixes

3. Ergebnisse

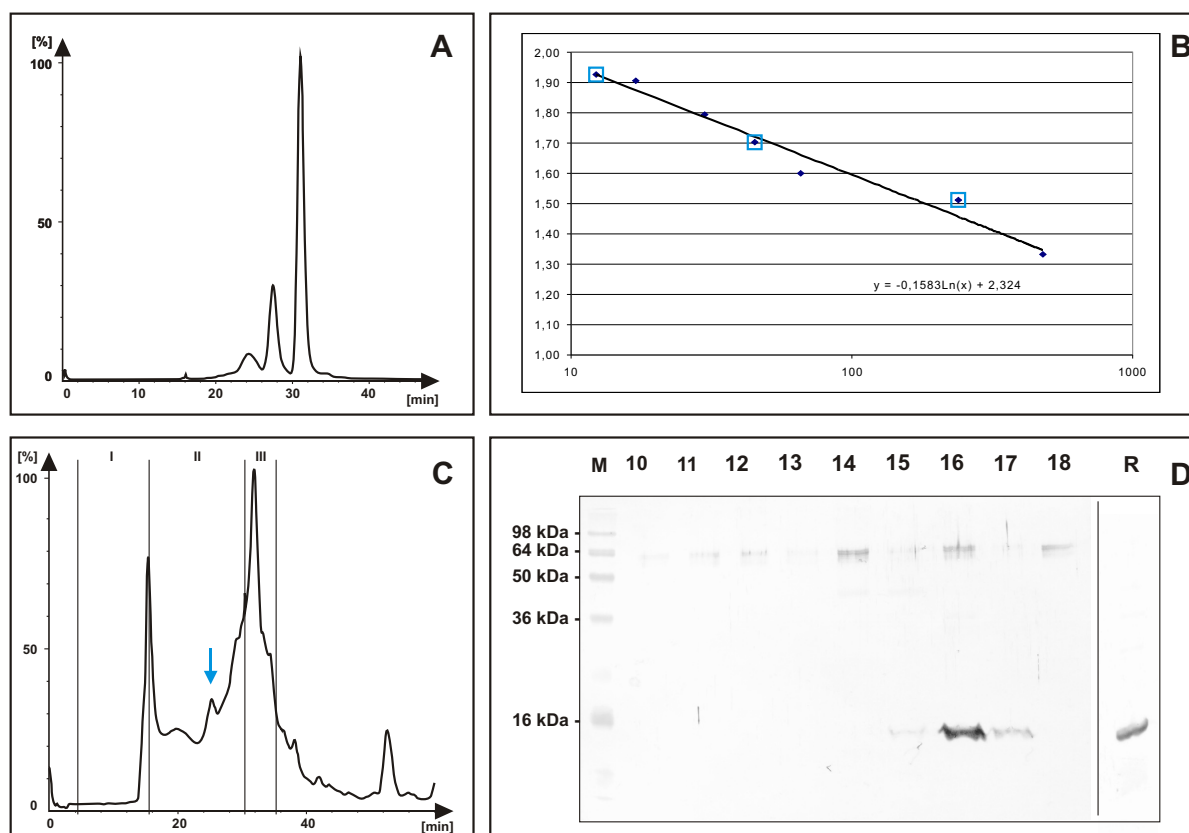


Abbildung 3.34.: Bestimmung der Quartärstruktur des Horcolin durch Gelfiltration mit einem nativen, sauer isolierten Koloptilproteinextrakt. Gezeigt ist in A das Chromatogramm des oben beschriebenen Eichproteinmixes, in B die aus den Werten aller Eichproteine erstellte Eichfunktion, in C das Chromatogramm des Koloptilextraktes und in D der Western Blot mit den während der Filtration gesammelten und TCA-gefällten Proteinfractionen 10 bis 18 mit den Antikörpern Peptid-Horcolin (primärer) und Anti-Ziegen-IgG-AP (sekundärer). R, Rohextrakt (der Koloptilproteine) vor dem Auftrag auf die Säule; M, Marker SeeBlue™ Plus2, NOVEX.

sind blau markiert). Teil C der Abbildung zeigt das gesamte Chromatogramm der Gelfiltration mit dem sauren Koloptilextrakt. Die Bereiche I, II und III zeigen, welche Fraktionen untersucht wurden. In den Bereichen I und III wurden 1 ml-Fractionen, im Bereich II 0,5 ml-Fractionen gesammelt, die im Western Blot analysiert wurden.

Fraktion 16 in Abbildung 3.34, Teil D weist die stärkste Horcolinerkennung auf und repräsentiert die aus der Matrix tretenden Proteine nach 27 min. Rechnerisch ergibt sich somit aus der Beziehung der Eichfunktion eine native Molekülgröße von 57,25 kDa. Da ein Monomer des Horcolin 15,5 kDa groß ist, liegt das native Protein mit großer Wahrscheinlichkeit in tetramerer Form vor.

3.7. Untersuchung der Proteinzusammensetzung der IWF

Um HL#2 und Horcolin als extrazelluläre Proteine im größeren Zusammenhang betrachten zu können, wurde die Proteinzusammensetzung der IWF als apoplastidäre Proteinfraction genauer untersucht. Eine weitere extrazelluläre Proteinfraction war durch die Untersuchung der Proteine in der Guttationsflüssigkeit aus *Hordeum vulgare* (Grunwald et al., 2003) beschrieben worden, so dass hier die Proteinfractionen der IWF nicht nur allein, sondern im Vergleich zu der Guttationsflüssigkeit untersucht wurde.

3.7.1. Massenspektrometrische Bestimmung einiger IWF-Proteine

Die Zusammensetzung der Proteine der IWF ist abhängig von der Wahl des verwendeten Infiltrationspuffers und dessen pH-Wert. Um beide Proteinfractionen besser vergleichen zu können, wurde der pH-Wert der isolierten Guttationsflüssigkeit bestimmt und ergab pH 5. Zur Isolierung der IWF wurde deshalb ein Phosphat-Puffer mit dem gleichen pH-Wert verwendet und die IWF aus den guttierenden Pflanzen isoliert. Zur Konzentration der Proteine wurden die Konzentratoren von VIVASCIENCE (Vivaspin 20, 5 000 MWCO, PES) verwendet. Abbildung 3.35, A zeigt die eindimensionale Auftrennung der Proteine aus IWF und Guttationsflüssigkeit.

Einer der prägnantesten Unterschiede zwischen IWF und Guttation besteht in dem Auftreten einer prominenten Doppelbande mit ca. 25 kDa Molekulargewicht in der IWF. Die höhermolekularen Bereiche sind sich ähnlicher. Die Proteine der Doppelbande und eine weitere nur in der IWF vorhandene Bande bei ca. 10 kDa wurden aus einem 9 %igen Tris-Tricin-Gel nach einer Coomassie-Colloidal-Färbung ausgeschnitten und für eine Proteinsequenzierung mit einer ESI Q-TOF Massenspektrometrie mit Trypsin verdaut. Die Massenspektrometrie wurde freundlicherweise von Dr. Piotrowski am Lehrstuhl für Zellphysiologie, Bochum durchgeführt. Die erhaltenen Peptidsequenzen wurden für einen Abgleich mit Einträgen bekannter Proteinsequenzen bei NCBI verwendet. Nachfolgend sind die Proteine mit der jeweils höchsten Homologie zu allen Peptiden einer Bande angegeben.

I	HvGLP 1 "Germin-like" Protein			
Organismus:	<i>Hordeum vulgare</i>			
NCBI-Accession-Nr.:	CAA75907			
Molekulargewicht:	22 und 23 kDa			
sequenziertes Peptide:	VTFLDDAQVKK	Charge 2+	Masse 1262.46	
	NPAYSTYLNPNAR	Charge 2+	Masse 1566.44	

3. Ergebnisse

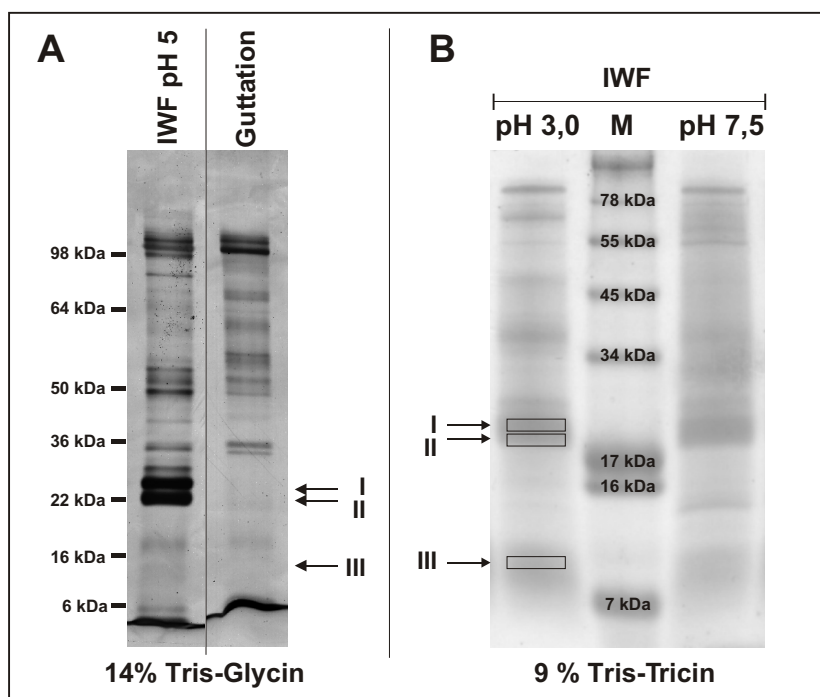


Abbildung 3.35.: Vergleich der Proteine aus IWF und Guttationsflüssigkeit. Guttationsflüssigkeit wurde von 6 bis 8 Tage alte Gerstenpflanzen in Normalanzucht gesammelt und die IWF bei pH 5 aus einigen der 6 Tage alten Blätter isoliert. Jeweils 2 µg Protein wurde in einem 14 %iges Tris-Glycin-Gel aufgetrennt und silbergefärbt (A). B zeigt die Auftrennung der Proteine aus der IWF bei pH 3,0 und 7,5 in einem 9 % Tris-Tricin-Gel nach Coomassie-Colloidal-Färbung. Sequenzierte Banden sind mit Rahmen versehen und römisch durchnummeriert. M: Marker SeeBlue™ Plus2, NOVEX.

II	HvGLP 1 "Germin-like" Protein		
Organismus:	<i>Hordeum vulgare</i>		
NCBI-Accession-Nr.:	CAA75907		
Molekulargewicht:	22 und 23 kDa		
sequenzierte Peptide:	LKSVLGGSG	Charge 2+	Masse 816.30
	VTFLDDAQVKK	Charge 2+	Masse 1262.46
III	Lipid-Transfer Protein 7a2b		
Organismus:	<i>Hordeum vulgare</i>		
NCBI-Accession-Nr.:	CAA65680		
Molekulargewicht:	9 kDa		
sequenzierte Peptide:	SGVQGLDGLAR	Charge 3+	Masse 1961.51
	LAYLVAYVTGR	Charge 2+	Masse 1224.36
	DQPPAATCSGVQVG	Charge 3+	Masse 1495.36

3. Ergebnisse

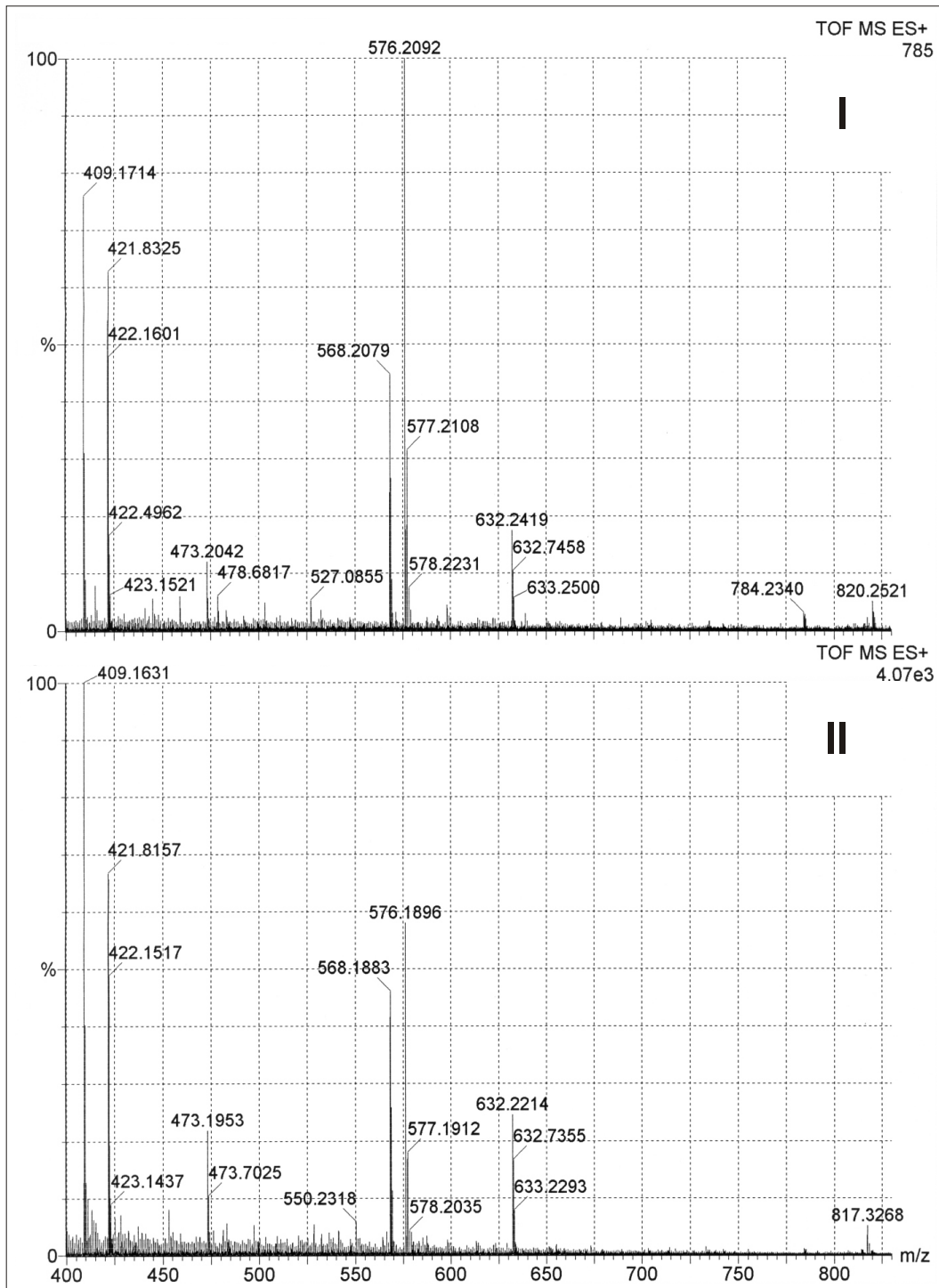


Abbildung 3.36.: Massenspektren der HvGLP-Banden der IWF. Die römische Nummerierung entspricht der Bandenbezeichnung in Abbildung 3.35: I ist die Bande mit dem höheren apparenten Molekulargewicht, II die mit dem geringeren.

3. Ergebnisse

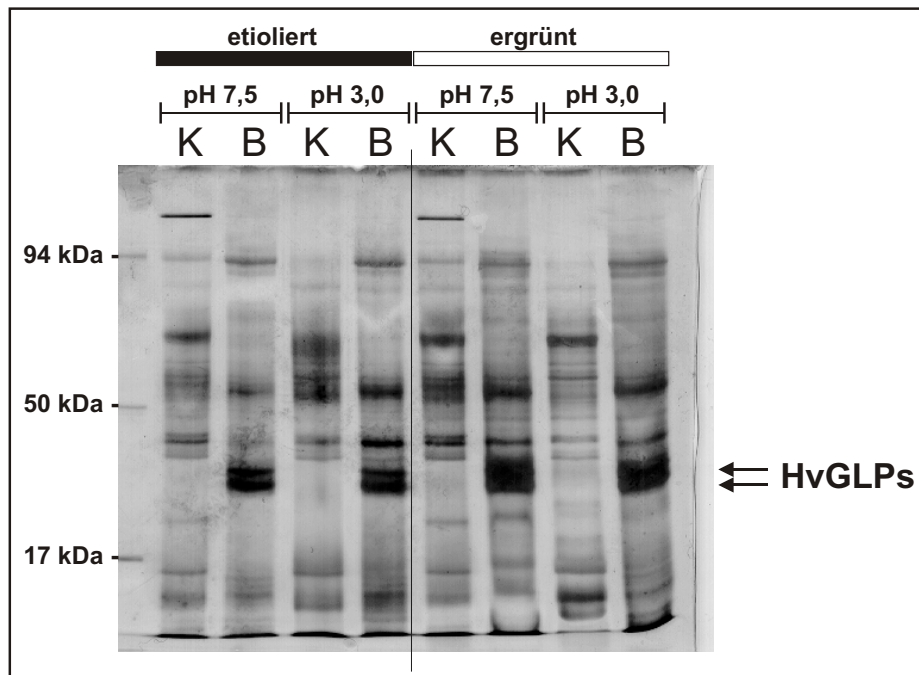


Abbildung 3.37.: Expression der HvGLPs in der IWF. Die IWF wurde bei pH 3,0 und 7,5 aus 6 Tage alten Primärblättern (B) und Koleoptilen (K) jeweils aus Dunkel- und Normalanzucht isoliert. Jeweils 2 µg Protein (Bestimmung nach Bradford) wurden in einem 14 % SDS-Gel (Tris-Glycin) aufgetrennt und silbergefärbt. Marker: Eichproteinmix aus Phosphorylase (94 kDa), Alkoholdehydrogenase (50 kDa) und Myoglobin (17 kDa).

Die einzeln sequenzierten Proteinbanden der Doppelbande sind sich im Massenspektrum sehr ähnlich (vgl. Abbildung 3.36) und das Peptid VTFLDDAQQVKK taucht in beiden Sequenzierungen auf, dass zu 100 % in die Sequenz des HvGLP 1 passt. Dennoch ist das apparente Molekulargewicht eines Proteins wenige kDa größer. Das in Klammern gesetzte Peptid der Bande I ist jedoch nicht in HvGLP 1 enthalten und gehört möglicherweise in einen nichthomologen, kurzen Sequenzabschnitt der GLP-Proteine, der den Unterschied im Molekulargewicht ausmacht.

Eine zu allen identifizierten Peptiden der Bande III (Abbildung 3.35) zu 100 % identische Proteinsequenz gibt es nicht, jedoch ist das Lipid-Transfer Protein 7a2b nah verwandt, dass zu beinahe 100 % identisch ist mit dem Lipid-Transfer Protein 3 aus *Triticum aestivum* (NCBI-Accessionnummer: AAP23941). Auch die ähnliche Größe der LTPs von 9 kDa spricht dafür.

Die beschriebenen "Germin-like" Proteine sind nicht in allen IWF-Proben gleichermaßen verteilt, sondern von der Art der Isolierung und dem verwendeten Pflanzenmaterial abhängig. So sind GLPs im Apoplasten von Koleoptilen weder aus Dunkel- noch aus Normalanzucht zu isolieren (siehe Abbildung 3.37). Im Blatt hingegen lassen sich die GLPs sowohl in etiolierten, als

auch ergrünten Pflanzen nachweisen, wobei jedoch die relative Menge in der Gesamtmenge der IWF-Proteine bei ergrünten Primärblättern größer ist als in etiolierten. Der pH-Wert des Infiltrationspuffers spielt nur eine untergeordnete Rolle, die Unterschiede in der Bandenstärke sind gering.

3.7.2. Vergleich der IWF und Guttationsproteine in der 2D-Gelelektrophorese

Nach dem eindimensionalen Vergleich der IWF und der Guttationsflüssigkeit wurde die Proteinzusammensetzung auch in einer 2D-Gelelektrophorese untersucht. Hierfür wurden die Proben aus der in Abschnitt 3.7.1 beschriebenen eindimensionalen Auftrennung verwendet. Damit die Proteinmuster beider 2D-Gele vergleichbar sind, wurden sowohl gleiche pH-Werte zur Isolierung der IWF- und Guttationsprobe, als auch IPG-Strips mit immobilisiertem pH-Gradient von BIORAD für die Isoelektrische Fokussierung (IEF) verwendet.

Für die 2D-Gelelektrophorese wurden je 100 µg Protein verwendet, wobei hierfür die Proteinbestimmungsmethode nach Bradford (vgl. Abschnitt 2.3.2.2 auf Seite 34) verwendet wurde. Parallel durchgeführte Bestimmungen nach Smith (vgl. Abschnitt 2.3.2.1 auf Seite 34) ergaben im Mittel eine Proteinkonzentration, die um das fünf- bis zehnfache über den Werten der Bradfordmessung lagen. Da letztere in saurem Milieu abläuft, können Proteine ausfallen, die in der Messung dann nicht mehr erfasst werden.

Die IEF wurde nach der Vorschrift in Abschnitt 2.3.5 auf Seite 37 durchgeführt. Die Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgte in einer SDS-PAGE (9 % Tris-Tricin). Abbildung 3.38 zeigt die silbergefärbten 2D-Gele der IWF und Guttation, wobei die Fixierung, abweichend von der Vorschrift in Abschnitt 2.3.6.2 auf Seite 40, nicht über Nacht, sondern nur 2 h durchgeführt wurde.

3.7.3. Konzentrationsbestimmung von PR-Q in IWF und Guttation

In Abschnitt 3.5.1 ist gezeigt worden, dass sich das Protein PR-Q als konstitutiv exprimierte, extrazelluläre Chitinase in der IWF nachweisen lässt. Auch in der Guttationsflüssigkeit ist dieses Protein neben anderen PR-Proteinen vertreten (Grunwald, 2002). Um einen Hinweis zu erhalten, in welchen Mengen diese Proteine, die im Zusammenhang mit einer Pathogenabwehr diskutiert werden, selbst in augenscheinlich ungestressten Pflanzen vorkommen, wurde die Konzentration des PR-Q in quantitativen Western Blots mit einer Verdünnungsreihe von rekombinantem PR-Q und dem spezifischen Anti-PR-Q-Antikörper untersucht.

3. Ergebnisse

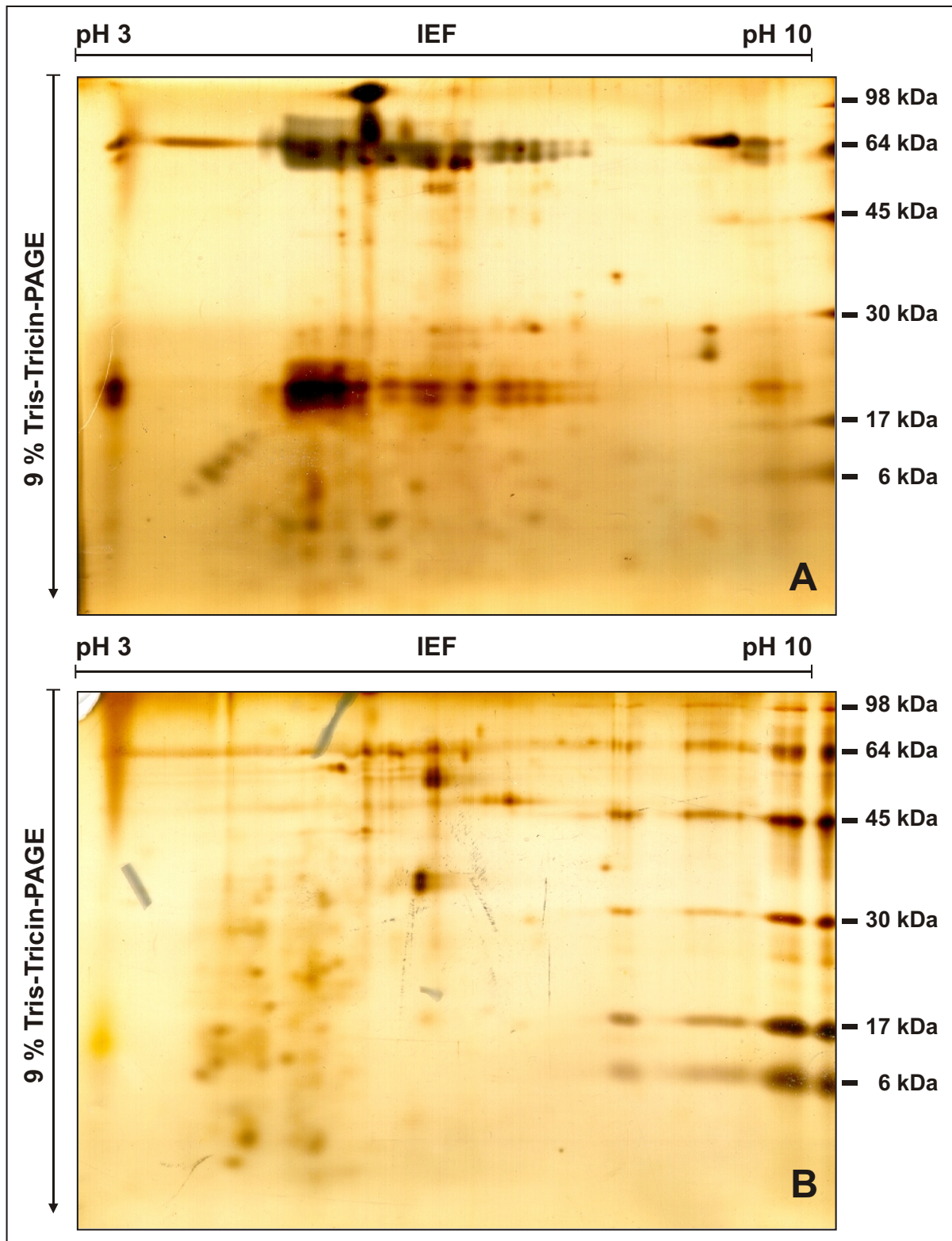


Abbildung 3.38.: 2D-Gelelektrophorese der Proteine aus IWF (A) und Guttationsflüssigkeit (B). Jeweils 100 µg Protein (Bestimmung nach Bradford) wurden für eine Isoelektrische Fokussierung von pH 3 bis 10 und eine anschließende PAGE in 9 % Tris-Tricin verwendet. Die Gele wurden silbergefärbt.

3. Ergebnisse

Zur quantitativen Bestimmung von PR-Q in der Guttationsflüssigkeit und IWF aus ungestressten Gerstenblättern wurden die Protein-Konzentrationen nach Bradford bestimmt. Die im Western Blot der Abbildung 3.39 angegebenen Mengen an Protein in der jeweiligen Probe wurde in einem 17 %igem SDS-Gel (Tris-Glycin) elektrophoretisch getrennt und im Western Blot mit dem spezifischen Antikörper Anti-PR-Q analysiert. Parallel dazu wurde eine Verdünnungsreihe von rekombinantem Protein PR-Q auf das Gel aufgetragen und die Konzentrationen an PR-Q in der Guttationsflüssigkeit und IWF durch Abgleich der Signalintensitäten mit einer Eichfunktion aus den Signalen der Verdünnungsreihe bestimmt. Die Intensität der Banden wurde mit Multi-Analyst (von BIORAD) gemessen.

Um zu verlässlichen Daten zu kommen, wurden die Versuche mehrere Male mit verschiedenen IWF- und Guttationsproben durchgeführt. Die konzentrierten Proteine wurde jeweils in mehreren Verdünnungstufen im Western Blot neben der gleichen Eichreihe (48, 24, 12, 6, 3 und 1,5 ng) an rekombinantem PR-Q aufgetrennt. Jeder Blot wurde einzeln mit einer Eichfunktion ausgewertet und die relativen Bandenintensitäten der PR-Q-Reihe und der Proteinprobe verglichen. Die Mengen an PR-Q wurden dann jeweils auf 1 µg Protein bezogen. Alle Einzelauswertungen sind nachfolgend zur Erstellung des Säulendiagrammes verwendet worden.

Für die IWF ergibt sich für 1 µg Protein im Mittel 9,5 ng PR-Q. Dies entspricht also etwa 1 % der Gesamtproteine. Die Konzentration der Proteine in der IWF nach der hier beschriebenen Isolierungsmethode beträgt durchschnittlich 450 µg / ml, so dass sich eine Konzentration von 4,5 µg / ml für PR-Q in der IWF aus ungestressten Primärblättern ergibt.

Im Mittel sind in 1 µg der Guttationsproteine 36 ng PR-Q enthalten. Dies entspricht damit etwa 3,6 % der Gesamtproteinfraktion. Da die gesammelte Guttationsflüssigkeit vor der Konzentrierung für die Analyse eine Proteinkonzentration von durchschnittlich 4,2 µg / ml aufweist, ergibt sich eine mittlere Konzentration von PR-Q in der Guttationsflüssigkeit von 150 ng / ml.

3. Ergebnisse

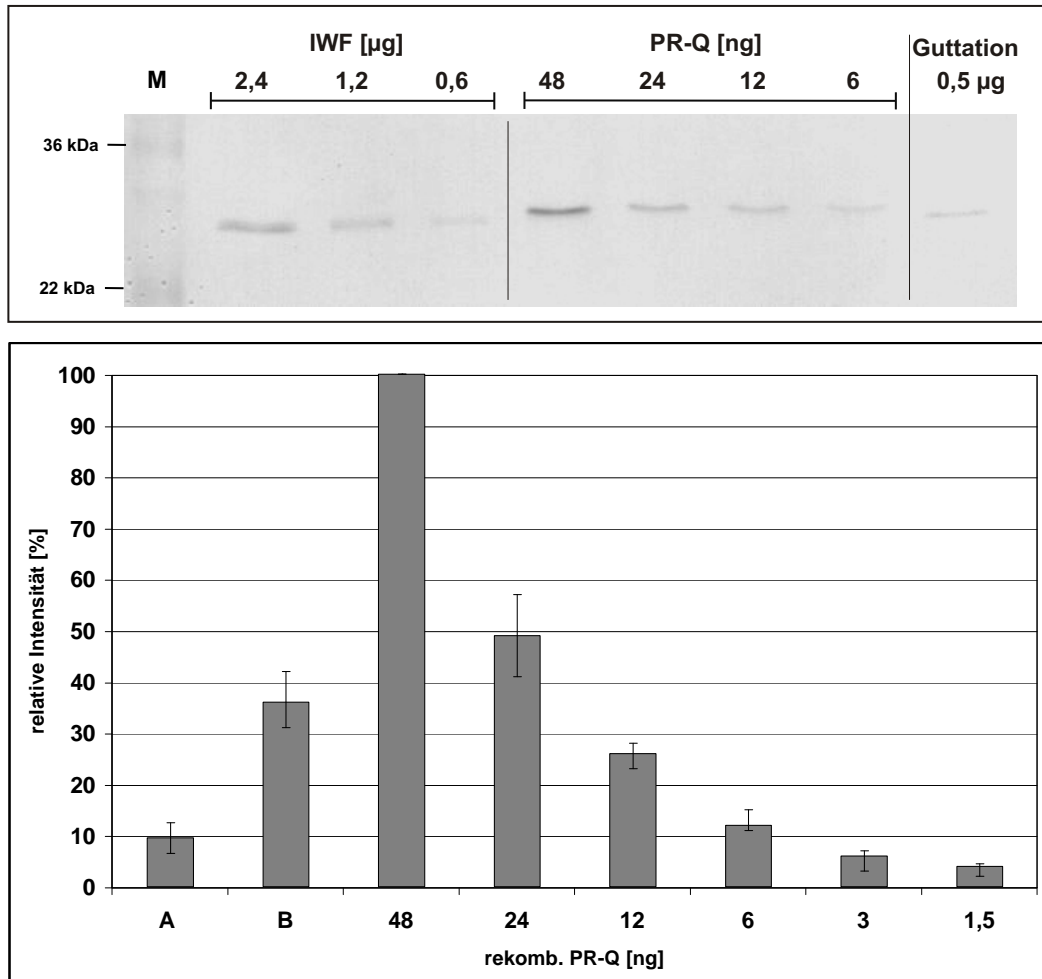


Abbildung 3.39.: Konzentrationsbestimmung von PR-Q in IWF und Guttationsflüssigkeit. Gezeigt ist oben ein typischer Western Blot mit dem spezifischen Antikörper gegen PR-Q. Rekombinantes PR-Q wurde in einer Verdünnungsreihe auf 17 %ige Tris-Glycin-Gele aufgetragen und aus den Signalstärken auf der entwickelten Membran eine Eichfunktion erstellt. Die Proteine der IWF (A) und der Guttation (B) wurden ebenfalls in Verdünnungstufen aufgetragen. Die Bestimmung des PR-Q in den jeweiligen Proben erfolgte durch Abgleich der Signalstärken mit der Eichfunktion. Das Diagramm enthält die Daten aller Versuche, wobei für A (IWF) und B (Guttation) die Säule jeweils 1 µg Protein entspricht. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte, der eingezeichneten Fehlerindikatoren Minimal- und Maximalwerte.

4. Diskussion

Die Daten aus dem Ergebnisteil sind im Folgenden kurz zusammengefasst aufgelistet, bevor sie in den nächsten Abschnitten im Zusammenhang diskutiert werden.

In dieser Arbeit wurden die vollständigen Sequenzen der Gene von HL#2 und Horcolin mit 422 bzw. 426 bp upstream des jeweiligen putativen Startcodons isoliert. Mit diesen Daten konnten die Genkarten beider Gene mit Intron- und Exonpositionen bestimmt und Untersuchungen zu cis-regulatorischen Elementen durchgeführt werden. Beide Gene liegen in einfacher Kopie im Genom der Gerste vor, sind aufgrund ihrer ähnlichen Struktur vermutlich durch Genverdopplung entstanden und stellen Mitglieder einer Genfamilie dar. Durch Klonierung vor das Reporterogen für DsRed konnte gezeigt werden, dass die isolierten Bereiche der Upstream-Regionen der Gene von HL#2 und Horcolin Promotoraktivität aufweisen.

Weiterhin konnten transient erhöhte Transkriptlevel unter Stressbedingungen für beide Gene nachgewiesen werden. HL#2-mRNA akkumuliert nach mechanischer Verwundung mit einem Maximum innerhalb von 4 h, während die mRNA des Horcolin verstärkt in den ersten 24 bis 48 h unter Salzstress gebildet wird.

Durch die Verwendung adäquater Kontrollen bei der Isolierung der IWF wurde gezeigt, dass sowohl HL#2 als auch Horcolin Proteine des Apoplasten darstellen. Da weder HL#2 noch Horcolin über ein bekanntes N-terminalen Signalpeptid für den Transport über das ER/ Golgi-System verfügen, wurde der Transportweg und die Möglichkeit alternativen Spleißings mit transienter Expression von GFP-Fusionsproteinen und RT-PCR untersucht.

HL#2 und Horcolin weisen hohe Sequenzhomologien zu solchen Proteinen auf, die sich durch biotische und abiotische Stressbedingungen induzieren lassen. Sie sind in der Lage, pH-abhängig spezifisch an Zucker zu binden, wie im Fall des Horcolin an Maltose und Mannose. Für Horcolin konnte eine tetramere Struktur gezeigt werden, für HL#2 wird von einer tetrameren oder dimere Struktur ausgegangen. Weiterhin ist es gelungen, einen für Horcolin spezifischen Peptid-Antikörper herzustellen, der eine eindeutige Unterscheidung beider hier untersuchter Proteine und anderer nah verwandter Proteine erlaubt.

In einem zweiten Teil wurden die Proteine der IWF im Allgemeinen als Fraktion der apoplastidären Proteine durch ein- und zweidimensionale Gelelektrophorese und Teilsequenzierung

dominanter Proteinbanden näher untersucht und den Proteinen der Guttationsflüssigkeit gegenübergestellt.

4.1. Isolierung der Gene für HL#2 und Horcolin

Zu Beginn dieser Arbeit wurden die genomischen Sequenzen zu HL#2 und Horcolin aus dem Gerstengenom isoliert, um durch die Bestimmung der Introns und upstream gelegener regulatorischer Elemente beide Gene hinsichtlich ihrer Verwandtschaft und Regulation miteinander vergleichen zu können.

Um die genomischen Klone von HL#2 und Horcolin zu erhalten, war zu Anfang mit dem Anlegen einer partiellen Genbank begonnen worden (vgl. Abschnitt 3.1.1.2 auf Seite 50). Mit dieser Methode hätten jeweils 4 bis 6 kb große DNA-Abschnitte isoliert und sequenziert werden können, in denen sowohl Informationen zu den Introns der Gene, als auch die Promotoren enthalten gewesen wären. Das Genom der Gerste ist mit 5 000 Mb allerdings sehr groß. Es übersteigt bei weitem das von *Arabidopsis thaliana* (130 Mb), aber auch das anderer Kulturarten, wie z. B. der Kartoffel (1 000 Mb). Allein der Saatweizen (*Triticum aestivum*) mit rund 16 000 Mb überragt die Genomgröße der Gerste noch. Gerste ist diploid, wobei die DNA in sieben Chromosomen ($2n = 14$) vorliegt. 70 bis 80 % der chromosomalen DNA besteht aus repetitiven Sequenzen (Graner und Altschmied, 2001). Die Wahrscheinlichkeit, Gene in diesem Pool durch das Screening einer Genbank zu finden, die in einfacher Kopie im Genom vorliegen, wie dies bei HL#2 und Horcolin der Fall ist (vgl. Abschnitt 3.1.2 auf Seite 56), ist sehr gering. Selbst bei der Verwendung von Fragmenten von etwa 6 000 bp Länge und einer Verringerung der zu screenenden Klone durch eine partielle Genbank mit einem Zehntel des Genomes ist der gesuchte Klon in 100 000 anderen versteckt. Das parallel durchgeführte Screening wurde daher nach Erfolg der anderen Methoden zur Isolierung der Introns und Upstream-Regionen nicht weiter verfolgt.

Die Introns beider hier untersuchter Gene konnten mit spezifischen, die cDNA flankierenden Primern durch PCR mit genomischer DNA isoliert werden. Anhaltspunkt für die zu erwartenden Größenfragmente war die hypothetische HL#2-Genkarte von Menhaj (1998) (siehe Abbildung 3.1 auf Seite 46). Neben den dominanten PCR-Fragmenten, die sequenziert wurden, traten einige Banden im Agarosegel auf, die um wenige 100 bp größer waren. Diese sehr viel schwächeren Banden wurden nicht näher untersucht, da HL#2 und Horcolin als Einzelkopien im Genom vorliegen. Betrachtet man die Ähnlichkeiten der beiden Gene, die sich nicht nur in der Nukleotidsequenz, sondern auch in der Lage der jeweiligen Introns zeigt, liegt die Vermutung nahe, dass es sich hier um Mitglieder einer Genfamilie handelt, die ursprünglich durch Genverdopplung entstanden ist (Zhu et al., 1996; Churin et al., 1999). Möglicherweise sind die schwachen

Banden der PCR mit genomischer DNA auf vergleichsweise unspezifische Bindungen an weitere Mitglieder der Genfamilie zurückzuführen. Auch im Southern Blot sind zum Teil zusätzliche, schwache Signale auf der Membran zu erkennen, die sich aber durch stringendere Waschbedingungen entfernen lassen. Auf diese Art lassen sich auch die von Grunwald (2002) im Southern Blot für Horcolin gezeigten zusätzlichen Banden erklären (vgl. Abschnitte 3.1.2 auf Seite 56). Diese traten in der vorliegenden Arbeit nicht mehr auf, so dass gezeigt werden konnte, dass auch das Gen für Horcolin, wie bereits von Menhaj (1998) für HL#2 gezeigt, in einer Kopie im Genom der Gerste vorliegt.

Durch Verwendung der Primer in der 5'- und 3'-UTR der cDNA konnte die Isolierung des richtigen Genes anhand der Erkennung bereits bekannter Exonsequenzen bestätigt werden. Es fällt jedoch auf, dass die einzelnen Exons in unterschiedlichen Leserahmen liegen. Abbildung 3.23 auf Seite 73 zeigt, dass entweder das putative Startcodon bei Horcolin um einen Frame verschoben ist oder eines der Exons bei HL#2. Fehlende Basenpaare durch fehlerhafte Sequenzierungen, die zu einer Verschiebung des Leserasters führen, können ausgeschlossen werden, da alle Sequenzen mehrfach mit dem gleichen Ergebnis sequenziert wurden. Auch die Position des ersten Introns direkt nach dem putativen Startcodon wurde so mehrmals bestätigt. Proscan und GenescanW erkennen ebenfalls die experimentell bestimmten Spleißingstellen. Homologe Proteine zu HL#2 und Horcolin sind in den Datenbanken des NCBI gut beschrieben, die Gene jedoch sehr selten. Eines der wenigen Beispiele ist das Gen GOS9, das ein wurzelspezifisches Protein aus *Oryza sativa* kodiert und zu Horcolin hoch homolog ist. Auch dieses Gen besitzt zwei Introns, wobei das erste ebenfalls direkt nach dem putativen Startcodon beginnt (de Pater und Schilperoort, 1992). Auch dies ist ein Hinweis dafür, dass es sich hier um eine Genverdopplung noch vor der evolutiven Trennung von Gerste und Reis handelt (Van Damme et al., 2004b).

4.2. Verwandtschaft zu anderen Proteinen

Proteine mit Lektineigenschaften wurden in den letzten Jahren immer häufiger isoliert und besser charakterisiert (vgl. Abschnitt 1.4 auf Seite 7). So findet sich bei NCBI eine große Zahl homologer Proteine zu HL#2 und Horcolin. Die zu HL#2 am nächsten verwandten sind die Proteine Hfr-1 ("Hessian fly response") und BGAF (" β -glucosidase aggregating factor precursor"). Die Hfr-1 mRNA ist in Weizenpflanzen, wie die des HL#2 in Gerste, konstitutiv exprimiert, steigt aber nach einem Befall mit Larven der Hessenfliege (*Mayetiola destructor*) innerhalb zwei Tagen an und fällt dann bis zu Tag fünf wieder auf den normalen mRNA-Level zurück (Williams et al., 2002). BGAF wiederum wurde aus Mais isoliert und stellt ein 35 kDa großes Protein dar, das spezifisch an β -Glucosidase bindet (Esen und Blanchard, 2000). Die Homologie zu den jasmonatin-

4. Diskussion

duzierbaren Proteinen JIP 32.6 und JIP 32.7 (Lee et al., 1996) wurde bereits früher beschrieben (Mishra et al., 1999). Es zeigt sich jetzt, dass sich HL#2 und Horcolin in der Proteinfamilie nicht am nächsten stehen, sondern zwei getrennte Arme im Stammbaum (siehe Abbildung 3.14 auf Seite 60) darstellen. HL#2 scheint, auch wenn die Daten zur Expression unter Jasmonat und Verwundung mit einbezogen werden (vgl. Abschnitt 4.3.2 auf Seite 101), mit Hfr-1, BGAF und den JIPs eine Untergruppe zu bilden, die in Zusammenhang mit Pathogenbefall, Verwundung und Jasmonatinduktion steht. Horcolin dagegen bildet mit seinen nächsten Verwandten SalT, GOS9 und anderen Proteinen aus *Oryza sativa* eine eigene Gruppe. SalT ist ein Protein, dessen mRNA hauptsächlich in jungen Geweben exprimiert ist und durch Salzstress und Behandlung mit ABA induziert werden kann (Claes et al., 1990; Garcia et al., 1998). Zhang et al. (2000) beschreiben ein zu SalT zu 97 % identisches Protein als mannosebindendes, salzinduziertes Lektin mit den zwei Isoformen Orysata 1 und 2. Die beschriebenen Proteine aus den Monokotylen sind diejenigen mit den höchsten Homologien zu HL#2 und Horcolin. Daneben gibt es jedoch eine ganze Reihe weiterer, wie z. B. das MRL, ein mannosebindendes Reislektin, das durch Infektion mit *Magnaporthe grisea* induziert wird (Qin et al., 2003). Das Vorkommen dieser Proteine ist jedoch nicht auf die Monokotylen Pflanzen beschränkt. Es gibt ebenfalls zahlreiche, bereits bekannte, homologe Beispiele aus Dikotylen Pflanzen, wie Heltuba aus *Helianthus tuberosus* (Van Damme et al., 1999), Calsepa aus *Calystegia sepium* (Peumans et al., 2000b) und Ipomoelin aus der Süßkartoffel (Imanishi et al., 1997). Weiterhin interessant ist die Verwandtschaft zu den myrosinasebindenden Proteinen aus *Arabidopsis thaliana* und *Brassica napus* (Geshi und Brandt, 1998; Taipalensuu et al., 1997), die einen Hinweis auf die Funktion von HL#2 und Horcolin geben und in Abschnitt 4.7 auf Seite 115 näher diskutiert werden.

Alle hier beschriebene Proteinen weisen eine "Jacalin-like lectin"-Domäne auf, die auf die Zugehörigkeit zu den Pflanzenlektinen hinweist (Marchler-Bauer et al., 2003; Sankaranarayanan et al., 1996). Die früher gebrauchte Definition eines Lektines aufgrund der Fähigkeit zur Agglutination von Erythrozyten ist im pflanzlichen System wenig sinnvoll, so dass nun das Vorhandensein von ein oder mehreren Zuckerbindungsdomänen im Protein als einziges Kriterium zur Bestimmung eines Lektines vorgeschlagen wird (Peumans und Van Damme, 1995).

Hfr-1, BGAF und die JIP 32.6 und 32.7 besitzen neben der "Jacalin-like lectin"-Domäne im C-Terminus, der auch zu den anderen soeben beschriebenen Proteinen homolog ist, eine "Dirigent"-Domäne nach Marchler et al. 2003. Alle Proteine mit dieser Domäne gehören zu einer Proteinfamilie, die bei einem Pathogenbefall induziert werden und bei der Lignifikation beteiligt sind. Auf die Bedeutung der Verwandtschaft zu diesen Proteinen für die möglichen Funktionen von HL#2 und Horcolin wird in Abschnitt 4.7 eingegangen.

4.3. Promotoranalyse

Promotoren sind diejenigen Sequenzelemente, die sich in unmittelbarer Nähe des Transkriptionsstartpunktes befinden und deren Reihenfolge und Abstände zueinander relativ fixiert sind. In den meisten Genen enthält die kurze Sequenz des Kernpromotors, der den Transkriptionsstart vermittelt, eine TATA-Box, eine GC-reiche Region und eine CAAT-Box. Diese Elemente sind an der Bindung der RNA-Polymerase II beteiligt. Sequenzelemente, deren Position und Polarität in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt nicht festgelegt sind und ihre Wirkung aus der Ferne entfalten können, werden unter der Bezeichnung Enhancer zusammengefaßt. Sie können direkt upstream des Kernpromotors liegen (proximal) oder auch einige hundert bis tausend Basenpaare entfernt (distal) sein. Enhancer enthalten kurze DNA-Sequenzen, die Response-Elemente genannt werden und Transkriptionsfaktoren binden, die die Bildung des Initiationskomplexes unterstützen (Westhoff et al., 1996). Promotoren und Enhancer werden so auch cis-acting, DNA-bindende Faktoren trans-acting genannt.

HL#2 wurde in früheren Arbeiten als ein licht- und jasmonatreguliertes Gen beschrieben, das sowohl in Blatt und Koeoptile, als auch in geringem Maß in der Wurzel exprimiert wird (Pötter et al., 1996; Rupprecht, 2001). Horcolin dagegen ist auf die Koeoptile beschränkt (Menhaj, 1998). Um die Gene von HL#2 und Horcolin in Bezug auf ihre Regulation und gewebespezifischen Promotoren hin vergleichen zu können, wurden innerhalb dieser Arbeit upstream gelegene Bereiche beider Gene kloniert. Mit der beschriebenen GenomWalkerTM-Methode zur Isolierung dieser Bereiche konnten jedoch nur ca. 400 bp upstream des putativen Startcodons bestimmt werden. Die Methode steht und fällt mit der Qualität und Länge der genspezifischen Primer. Der GC-Gehalt steigt jedoch in den Upstream-Bereichen von HL#2 und Horcolin an, was die Bindungsfähigkeit von Primern stark beeinflusst. Der ideale GC-Gehalt in Primern liegt zwischen 40 und 60 % (Chen et al., 2003a). Hohe GC-Gehalte lassen sich oft in Promotorbereichen nachweisen, wo sie als GC-Doublets methyliert vorliegen (Lewin, 1994; Janousek et al., 2002). DNA-Methylierungen sind wichtige Modifikationen, die eine Rolle bei verschiedenen zellulären Prozessen, wie z. B. der Regulation der Genexpression bei der Entwicklung spielen (Finnegan und Kovac, 2000).

4.3.1. Promotorbestimmung und -aktivität

Die Analyse der "cis-acting" regulativen Elemente wurde auf der Ebene von Datenbanken begonnen, wie ausführlich in Abschnitt 3.3.1 auf Seite 61 beschrieben. Bekannte und experimentell belegte Motive sind in der Datenbank des PlantCARE gefunden worden, wobei in der Tabelle 3.1 auf Seite 63 nur diejenigen Elemente mit den höchsten Übereinstimmungen in der Motivsequenz

und mit näher charakterisierten Funktionen aufgeführt sind. Daneben wurde auch eine Reihe von Motiven gefunden, die zum Promotorkern gehören, wie beispielsweise die TATA-Box, die also in jedem pflanzlichen Promotor zur konstitutiven Expression enthalten sind (Xu et al., 2004). Der Vergleich beider Gene zeigt, dass sich in beiden Promotorregionen zwar z. T. gleiche Motive finden, wie z. B. Motive der Lichtregulation (Arguello-Astorga und Herrera-Estrella, 1996), die auch als molekulare "Lichtschalter" bezeichnet werden (Westhoff et al., 1996), aber auch durchaus Unterschiede. Diese werden im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Expression unter verschiedenen Stressbedingungen in Abschnitt 4.3.2 diskutiert. Mit keinem der verwendeten Programme zur Promotorbestimmung konnten Motive in den Promotorbereichen von HL#2 und Horcolin gefunden werden, die in Zusammenhang mit einer gewebespezifischen Expression stehen.

In der folgenden experimentellen Analyse der putativen Promotorregionen der Gene von HL#2 und Horcolin wurden die klonierten Bereiche auf eine Promotoraktivität hin untersucht. Üblicherweise wird ein solcher Test durch die Klonierung der entsprechenden regulativen Elemente vor das Reportergen GUS mit anschließender T-DNA-vermittelten stabilen Transformation durch Agrobakterien durchgeführt. Im Fall von *Arabidopsis thaliana*, dessen Genom vollständig sequenziert ist, verwendet man die gesamte Sequenz bis zum nächsten Gen. Mit diesem System kann sowohl qualitativ die gewebespezifische Expression, als auch quantitativ die Regulation durch verschiedene Induktoren bestimmt werden. Im vorliegenden Fall standen jedoch nur je ca. 400 bp der Upstream-Regionen zur Verfügung. Außerdem wurde die Gewebespezifität bereits durch Western-Blot-Analysen der verschiedenen Pflanzenteile nachgewiesen (vgl. Abschnitt 1.3 auf Seite 6). Die Regulation dagegen kann in quantitativen Northern und Western Blots gemessen werden. Da eine stabile Transformation in Getreide nach wie vor schwierig ist, wurde nach einem alternativen und vergleichsweise einfachen System zum Test der isolierten Upstream-Regionen auf regulative Elemente gesucht.

So wurde in der vorliegenden Arbeit ein Testsystem entwickelt, bei dem eine transiente Transformation durch Particle Bombardment durchgeführt wurde. Die transiente Transformation hat generell die Vorteile, dass sie einfacher und schneller Ergebnisse als die stabile Transformation erzielt, und dass die transferierte DNA extrachromosomal bleibt. Somit können Sekundäreffekte ausgeschlossen werden, die beispielsweise durch eine Integration der Fremd-DNA in das Genom hervorgerufen werden (Dekeyser et al., 1990).

Für die transiente Expression wurde der Vektor pe35AscIoptRed verwendet, der das Gen für ein rot fluoreszierendes Protein aus *Discosoma* sp., genannt DsRed enthält (vgl. Abschnitt 3.3.2 auf Seite 62). Der enthaltene doppelte CaMV-35S-Promotor wurde ausgeschnitten und an dessen Stelle die zu untersuchenden putativen Promotorbereiche von HL#2 und Horcolin kloniert. Ein ähnliches System wird von PROMEGA für die Transfektion von Säugetierzellen angeboten. Darin

enthält der Vektor pGL3-Control einen SV40-Promotor und eine Luziferase als Reporterprotein zur Kontrolle der Transfektionseffizienz, wohingegen der Vektor pGL3-Basic weder Promotor noch Enhancer aufweist. Durch Klonierung der eigenen putativen Promotoren und Enhancer in den Vektor pGL3-Basic, kann deren Aktivität untersucht werden (Promega, 2002). Dieses System wurde in der vorliegenden Arbeit erfolgreich auf das pflanzliche System übertragen.

Die Ergebnisse zeigen, dass in beiden Fällen (HL#2 und Horcolin) die isolierten Regionen Elemente der konstitutiven Promotoren enthalten. In Abbildung 3.18 auf Seite 67 wird deutlich, dass die Aktivität im Vergleich zur Kontrolle geringer ist (die Belichtungszeiten sind zur besseren Vergleichbarkeit der Fluoreszenzstärke identisch). Der Grund dafür ist eine deutliche Verstärkung des CaMV-35S-Promotor durch eine doppelte Insertion (Kay et al., 1987), die bei HL#2 und Horcolin nicht gegeben ist. Elemente, die Informationen für die Koleoptilspezifität von Horcolin enthalten, sind entweder nicht in den klonierten 399 bp upstream des putativen Startcodons enthalten, oder reichen allein nicht aus, da die Promotoraktivität sowohl in Koleoptilen, als auch in den Epidermiszellen der Primärblätter nachgewiesen werden kann. Auch eine Veränderung der Inkubationsbedingungen nach der Transformation hatte, trotz erkannter entsprechender Motive durch PlantCARE keinen Einfluss auf die Promotoraktivität bzw. die Stärke der DsRed-Fluoreszenz. Dies bestätigt, dass die cis-regulativen Elemente in der Promotorregion nur als Teil eines kompletten Regulationsapparates inklusive Enhancer und "trans-acting regulatory" Elementen funktionieren.

In folgenden Untersuchungen, wenn mehr Sequenzinformationen zur Verfügung stehen, beispielsweise aus Genomprojekten, kann das hier entwickelte System auch zur Bestimmung von einzelnen Promotormotiven durch sukzessives Abtrennen von Basenpaaren und nachfolgende Promotoraktivitätsmessung durch DsRed-Expression verwendet werden.

4.3.2. Expression

Mit der Isolierung der Horcolin-cDNA durch Grunwald (2002) bestand die Möglichkeit, die Expression unter verschiedenen Umwelt- und Stressbedingungen auf mRNA-Ebene im Northern Blot zu untersuchen. Bisherige Arbeiten waren nur zum Proteinlevel auf der Basis des kreuzreaktiven Antikörpers durchgeführt worden, der allein jedoch für eine Betrachtung der Expression nicht ausreicht, da Protein- und mRNA-Menge nicht direkt miteinander korreliert sind (Gygi et al., 1999). Dies ist auch für HL#2 der Fall, welches auf der Basis der mRNA durch verschiedene Lichtflüsse positiv reguliert ist, der Proteinlevel jedoch eine gleichbleibende, konstitutive Expression zeigt (Menhaj et al., 1999).

Für die Horcolin mRNA wurde in dieser Arbeit eine positive Regulation der mRNA unter Salzstress in Form von 1,5 % NaCl nachgewiesen, wobei innerhalb von 24 h ein Maximum er-

reicht wird und die mRNA-Menge danach langsam wieder abnimmt. Untersuchungen zu Salt, das große Homologien zu Horcolin und eine ähnliche NaCl-Antwort aufweist (vgl. Abschnitt 4.2 auf Seite 97) haben gezeigt, dass das Gen sowohl durch NaCl-Stress, als auch durch ABA-Behandlung induziert wird (Garcia et al., 1998). Solche osmotisch regulierten Gene werden durch verschiedene interagierende Signaltransduktionswege induziert. Das Gen *rab16* aus Reis beispielsweise wird entweder durch NaCl oder durch ABA maximal induziert, da hier der gleiche Signaltransduktionsweg verwendet wird (Mundy und Chua, 1988). Bei anderen Genen erfolgt die NaCl-Induktion sowohl in ABA-abhängiger, als auch -unabhängiger Weise, so dass zur maximalen Antwort beide Stimuli benötigt werden (Bostock und Quatrano, 1992). Eine ABA-Induktion des Horcolin-Genes konnte bisher nicht nachgewiesen werden, sie ist jedoch nicht auszuschließen, zumal entsprechende Motive in der Upstream-Region des Genes auftreten. Möglicherweise werden für diese Induktion andere als die verwendeten Versuchsparameter benötigt. Bis zu einem solchen Nachweis muss die Salzantwort des Horcolin-Genes jedoch als ABA-unabhängig betrachtet werden.

Im Zuge der Untersuchungen zu Horcolin wurden auch für HL#2 weitere Versuche zur Expression durchgeführt. Die Sequenzvergleiche ergaben unter anderem Homologien zu pathogen-induzierten Proteinen (vgl. z. B. Hfr-1 in Abschnitt 3.2.1 auf Seite 58). Die Reproduzierbarkeit eines Schädlingsbefalls bzw. Raupenfrass im Modellversuch ist schwierig, da sowohl mechanische Reizungen, als auch chemische Verbindungen aus den Ausscheidungen des Insekts möglicherweise eine Reaktion in der befallenen Pflanze auslösen können. Um dieses System dennoch untersuchen zu können, wird versucht, die einzelnen Einflussfaktoren zu trennen. Eine rein mechanischen Verletzung wird daher meist durch das Quetschen des Pflanzenmaterials mit einer Pinzette simuliert. Hierbei werden sonstige, vom Pathogen abgegebene chemische Stoffe außer Acht gelassen.

Es konnte hier gezeigt werden, dass die HL#2-mRNA nach Verwundung durch Pinzettenquetschung innerhalb von 4 h auf einen maximalen Wert ansteigt und dann wieder absinkt. Nach etwa 24 h wird der Transkriptlevel zu Beginn des Experimentes erreicht. Der Proteinlevel ändert sich während dieser Zeit und auch später (bis zu 72 h untersucht) nicht. Eine ähnliche, transiente Antwort auf eine Verwundung ist für das HL#2-Homolog Ipomoelin aus *Ipomoea batatas* beschrieben worden. In diesem Fall liegt das Maximum der Antwort auf mRNA-Ebene bei 6 h und neben der lokalen Antwort in den verwundeten Blättern konnte eine systemische, ebenfalls transiente Antwort in benachbarten, nicht verwundeten Blättern gezeigt werden. Diese tritt mit einer Verzögerung von etwa 10 bis 12 h ein (Chen et al., 2003b; Jih et al., 2003).

Weiterhin wurden Untersuchungen zur Lichtregulation des Horcolin unternommen. Anders als bei HL#2 ist eine Hochlichtinduktion weder auf mRNA, noch auf Proteinebene nachzuweisen. Die Daten zur Ergrünung sind nicht eindeutig und auch zusätzlich durchgeführte semi-

quantitative Messungen der mRNA mit RT-PCR brachten keine weiteren Ergebnisse. Es scheint jedoch, als ob die mRNA kurzfristig innerhalb 2-4 h leicht akkumuliert, um danach wieder auf etwa den gleichen Wert wie vor Versuchsbeginn abzufallen. Eine ähnliche Regulation ist auch für HL#2 gezeigt worden (Pötter et al., 1996), allerdings mit einer deutlicheren Erhöhung als es sich hier für Horcolin andeutet. Grunwald (2002) hatte gezeigt, dass die mRNA des Horcolin in etiolierten Koleoptilen stärker als in ergrünten Koleoptilen vertreten ist. Dies konnte hier jedoch nicht bestätigt werden.

In Tabelle 4.1 auf der nächsten Seite sind die Ergebnisse dieser Arbeit zusammen mit den Daten aus den früheren Arbeiten zu HL#2 und Horcolin (Pötter et al., 1996; Menhaj, 1998; Menhaj et al., 1999; Rupprecht, 2001; Grunwald, 2002) zusammengefasst. Es handelt sich um eine vereinfachte Darstellung, denn die Ergebnisse gelten nur unter den jeweilig veröffentlichten Versuchsbedingungen. Die Tabelle verdeutlicht, dass es trotz der engen Verwandtschaft von HL#2 und Horcolin durchaus Unterschiede in der Regulation gibt. Vergleicht man dies mit der Tabelle 3.1 auf Seite 63 so fällt auf, dass die experimentell nachgewiesenen Daten nicht direkt mit den theoretischen korreliert sind, die aufgrund von Motivhomologien in der Promotorregion bestimmt wurden. Im Fall der Jasmonatinduktion stimmen zwar theoretische und experimentelle Daten überein (Rouster et al., 1997), doch werden z. B. Motive zur Regulation durch Verwundung bei Horcolin gefunden, nicht aber bei HL#2 (Pastuglia et al., 1997). Die Experimente zeigen jedoch den umgekehrten Fall. Das Argument eines nicht gezeigten Motives greift hier jedoch vor allem deshalb nicht, weil hier nicht die vollständigen Promotorsequenzen zur Verfügung standen. Aber auch der Nachweis einzelner Motive reicht nicht aus. Motive der Lichtregulation lassen sich in beiden Promotorregionen finden, diese Motive sind jedoch jeweils nur Teil eines lichtregulierten Komplexes (Arguello-Astorga und Herrera-Estrella, 1996). Der Nachweis von Homologien einzelner charakterisierter Motive, selbst in nah verwandten oder identischen Spezies, hat also für eine experimentell nachweisbare Regulation keine wesentliche Bedeutung. Die Daten können nur Hinweise zu einer möglichen Regulation liefern.

Van Damme et al. (2004b) haben ein mannosebindendes Protein aus den Koleoptilen mit Jasmonat behandelte Gerstenpflanzen isoliert, das nach Peptidsequenzierung als Horcolin identifiziert wurde. Sie weisen nach, dass nach Jasmonatbehandlung die relative Menge der Lektine in den untersuchten Pflanzen ansteigt, indem Agglutinierungsversuche mit den Extrakten mit Jasmonat behandelte und unbehandelte Pflanzen durchgeführt wurden. Dieser Versuch impliziert eine Jasmonatinduktion von Horcolin, doch lässt sich dabei im speziellen Fall von Horcolin nicht eindeutig nachweisen, ob es konstitutiv in den Koleoptilen exprimiert ist, oder erst durch Induktion mit Jasmonat, auch wenn die relative Menge aller Pflanzenlektine nach der Behandlung ansteigt. In den unternommenen Versuchen der vorliegenden Arbeit konnte, im Gegensatz zu HL#2, keine solche Regulation gezeigt werden.

4. Diskussion

Tabelle 4.1.: Unterschiede der stressregulierten Expression von HL#2 und Horcolin. Induktionen gelten unter den jeweiligen beschriebenen Versuchsrandbedingungen. Der Versuch mit Prolin für Horcolin auf mRNA-Ebene wurde nicht durchgeführt und daher mit Fragezeichen versehen. Die Versuche zur Ergrünung bei Horcolin sind nicht eindeutig und daher in Klammern gesetzt. ABA: Abscisinsäure.

	Hochlicht	Ergrünung	Jasmonat	ABA	Salz	Verwundung	Prolin
HL#2							
mRNA	+	+	+	-	-	+	-
Protein	-	+	+	-	-	-	-
Horcolin							
mRNA	-	(+)	-	-	+	-	?
Protein	-	(-)	-	-	-	-	+

HL#2 ist durch Jasmonat induzierbar, jedoch nicht durch ABA. Frühere Untersuchungen zu JIPs der Gerste haben ursprünglich eine gemeinsame Regulation durch Jasmonat und ABA nachgewiesen (Reinbothe et al., 1992; Lehmann et al., 1995), so dass zunächst von einem gekoppelten Signaltransduktionsweg ausgangen worden war. In Tomate und Kartoffel ist eine solche Signalkaskade beschrieben, bei der ein Verwundungssignal über Systemin zu einem Anstieg von ABA und Jasmonat führt, wobei letzteres zur Induktion von Pin 2 (Proteinase-Inhibitor II) führt (Pena-Cortes et al., 1995). Lee et al. (1996) jedoch konnten in Gerste weitere jasmonatinduzierbare Gene zeigen, die wie HL#2 ebenfalls nicht auf ABA antworten. Daraus wurde geschlossen, dass der Signaltransduktionsweg für Jasmonat in der Gerste unabhängig von ABA ist, im Gegensatz zur Signalkaskade von Pin 2 in Tomate und Kartoffel.

4.4. Extrazelluläre Lokalisation und Transport

Mishra et al. (1999) haben nachgewiesen, dass sich Horcolin und in geringerer Menge auch HL#2 mit der Interstitiellen Waschflüssigkeit (IWF) isolieren lassen und daher mit großer Wahrscheinlichkeit Proteine des Apoplasten darstellen. Die Art des Transportweges über das Plasmalemma in den extrazellulären Raum ist jedoch nicht geklärt. Weder HL#2 noch Horcolin verfügen im N-terminalen Bereich über bekannte Signalpeptide für einen Transport über das ER / Golgi-System. Daher wurde in dieser Arbeit der Frage nach dem Transportweg durch GFP-Fusions-Versuche nachgegangen.

4. Diskussion

Zunächst wurde jedoch geprüft, ob das Auftreten der beiden Proteine in der IWF möglicherweise nur auf eine Verunreinigung mit Proteinen des Cytoplasmas zurückgeführt werden kann.

Die Methode der Infiltrations-Zentrifugation (vgl. Abschnitt 2.3.1.3 auf Seite 32) ist ein oft angewandtes und anerkanntes Verfahren zur Isolierung von Proteinen aus dem Apoplasten (Rohringer et al., 1983; Hogue und Asselin, 1987; Ramanjulu et al., 1999). Die Variabilität der Versuchsanordnungen, vor allem bei der Zentrifugation ist jedoch groß. Bislange gibt es keine allgemein verwendbaren Apparaturen, so dass jede Arbeitsgruppe eine proprietäre Apparatur verwendet. Entsprechend gering ist die Reproduzier- bzw. Vergleichbarkeit von Ergebnissen unterschiedlicher Arbeitsgruppen. Auch werden die Pflanzen einer vergleichsweise rabiaten Behandlung unterzogen, bei der die Gefahr besteht, dass Zellen platzen und Cytoplasma austritt. Daher wurden Untersuchungen zur Bestimmung allgemein gültiger, geeigneter Versuchsparameter durchgeführt, unter denen keine Zellschädigung eintritt und die IWF frei von Cytoplasmafraktionen ist. So gilt z. B. nach Lohaus et al. (2001), dass bei Verwendung isotoner Infiltrationspuffer, bezogen auf das Cytosol, und einer Unterschreitung von 1 000 xg bei der Zentrifugation die IWF ausschließlich Proteine des Apoplasten enthält. Zur Kontrolle wird dabei die IWF auf Aktivität der cytosolischen Malatdehydrogenase getestet.

Im vorliegenden Fall wurden zur Isolierung maximal 200 xg verwendet, was die empfohlenen Maximalwerte stark unterschreitet. Da HL#2 und Horcolin gut bei sauren pH-Werten isoliert werden können (Grunwald, 2002), wurden Infiltrationspuffer mit saurem und neutralem pH-Wert zur Isolierung der IWF getestet (Deutscher, 1990; Kaneko et al., 2000). Bei der Verwendung saurer pH-Werte ist jedoch die Verwendbarkeit der Malatdehydrogenase als Kontrolle in Frage gestellt, da deren Aktivität pH abhängig ist. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit die Intaktheit der Zellen durch die Verwendung pH-unabhängiger Kontrollen auf der Basis von Antikörpernachweisen sichergestellt (vgl. Abschnitt 3.5.1 auf Seite 70).

Der zuerst verwendete Antikörper gegen die große Untereinheit der RubisCO zum Nachweis dieses Proteines in der IWF zeigte in allen Proben Spuren dieses Enzymes aus dem Calvinzyklus, sogar bei sehr geringen Zentrifugationskräften. Mengenmäßig macht RubisCO die mit Abstand größte Proteinfraktion in grünen Blättern aus (Hess, 2004), so dass schon kleinste Verletzungen dazu führen, dass das Protein in der IWF nachgewiesen werden kann. Eine Aussage über signifikante Mengen cytosolischer Verunreinigungen kann auf diese Art nicht getroffen werden. Als Alternative wurde das cytosolische und konstitutiv exprimierte HSC 70 (Neumann et al., 1987) verwendet. Dieses Protein kann in den IWF-Proben nicht nachgewiesen werden, wohl aber die apoplastidäre Chitinase PR-Q (Legrand et al., 1987), wie auch HL#2 und Horcolin. Theoretisch sind in den Gesamtproteinfraktionen ebenfalls die apoplastidären Proteine enthalten, doch machen sie darin einen verschwindend geringen Teil aus.

4. Diskussion

Damit konnte in der vorliegenden Arbeit eindeutig gezeigt werden, dass nicht nur Horcolin, sondern auch HL#2 in der IWF und damit im Apoplasten vertreten und durch die Verwendung adäquater Kontrollen eine Verunreinigung der IWF mit cytoplasmatischen Proteinen ausgeschlossen ist.

Wie bereits beschrieben, besitzen die isolierten cDNAs von HL#2 und Horcolin keine bekannten Signalsequenzen für den Transport in das ER. Ein neues Programm zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von Proteinen, Proteome Analyst (URL in Tabelle A.1 auf Seite 134), bestimmt als einziges der in dieser Arbeit verwendeten Programme zur Lokalisationsbestimmung (neben PSORT und SignalP auch TargetP (Emanuelsson et al., 2000)) HL#2 und Horcolin als extrazellulär mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,382 %, ohne jedoch ein mögliches Signalpeptid nachweisen zu können. Neben reinen Sequenzinformationen werden zur Bestimmung auch Kommentare und Texteingänge der Datenbankeinträge und ein "machine-learning"-System verwendet (Lu et al., 2004).

Da es also anscheinend keine Signalsequenz in der cDNA von HL#2 und Horcolin gibt, war vermutet worden, dass möglicherweise eine solche durch alternatives Spleißing angefügt wird. Alternatives Spleißing ist bei Säugetieren weit verbreitet und oft beschrieben (Clark und Thanaraj, 2002; Modrek et al., 2001), aber auch in Pflanzen wird Alternatives Spleißing neuerdings eine bedeutende Rolle in der Erzeugung von Proteomdiversität zugesprochen (Kazan, 2003; Small et al., 1998). Beispielsweise sind in *Arabidopsis thaliana* zwei Spleißingformen des *SOS4*-Genes ("salt overly sensitive 4") beschrieben, die durch Salzstress reguliert werden (Shi et al., 2002). *OsIM* aus *Oryza sativa* wiederum kodiert eine Alternative Oxidase, die bei der Abwehr stressabhängig gebildeter reaktiver Sauerstoffspezies eine Rolle spielt. Die Prä-mRNA dieses Genes wird unter Salzstress alternativ gespleißt, wobei sich das Verhältnis zwischen den Spleißingformen *OsIM1* und *OsIM2* in salztoleranten und salzempfindlichen Varietäten unterscheidet (Kong et al., 2003). Möglicherweise liegt auch HL#2 in zwei Formen vor: eine cytosolische und eine apoplastidäre. Der Versuch zum Proteaseverdau von HL#2 und Horcolin in IWF und löslicher Proteinfraktion (vgl. Abschnitt 3.6.3 auf Seite 84) deutet so etwas an, da HL#2 in der löslichen Fraktion verdaut wird, jedoch nicht in der IWF. Es kann sein, dass die in der IWF erkannte HL#2-Form, wie andere apoplastidäre Proteine auch, durch Glykosylierungen oder andere posttranslationelle Modifikationen vor einem Proteaseverdau geschützt ist, die cytosolische Form jedoch nicht. Horcolin wird jedoch in beiden Fraktionen nicht verdaut. Es ist hier möglich, dass nur eine posttranslationell modifizierte Form im Apoplasten vorliegt und dort in so großer Menge, dass es auch in der löslichen Fraktion, die beide Fraktionen darstellt, nachgewiesen werden kann.

Aus diesen Überlegungen heraus wurden die genomischen Sequenzen dahingehend untersucht, ob es alternative offene Leseraster gibt. Bei der Bestimmung der Introns war zuvor auf-

gefallen, dass das erste Intron jeweils direkt nach dem putativen Startcodon beginnt. Es wurde als möglich erachtet, dass dieses Intron unter bestimmten Bedingungen nicht aus der Prä-mRNA gespleißt wird und einen Transport in das ER vermittelt. Diese Intronsequenz wurde daraufhin in allen Leserahmen übersetzt und bei HL#2 ein solcher gefunden, der ohne Unterbrechung (ohne Stopp) in ein hypothetisches Peptid übersetzt werden kann. Eine Untersuchung dieses 37 Aminosäure langen Peptides PSLRLPCMSSMICCASIFFTGLMAGCCFVCACRARS mit PSORT (Nakai und Kanehisa, 1992; Horton und Nakai, 1997) ergab, dass es sich hierbei vermutlich um ein N-terminales Signalpeptid für den vesikulären Transportweg handelt und an Position 26 eine Schnittstelle zur Entfernung des Signalpeptides nach dem Transport in das ER vorhanden ist. Als subzelluläre Lokalisation wird die Vakuole mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,900 und der Apoplast mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,728 angegeben (vgl. Abbildung 3.23 auf Seite 73). Betrachtet man außerdem den Sequenzvergleich der homologen Proteine in Abbildung 3.12 auf Seite 58, so fällt auf, dass HL#2 am C-terminalen Ende die kurze Aminosäuresequenz ETSLAS besitzt, die den anderen Proteinen fehlt. Bis auf Horcolin sind alle dort aufgeführten Proteine als cytoplasmatisch beschrieben, soweit sie charakterisiert sind. Ähnlich der KDEL-Sequenz zur Rückführung von Proteinen aus dem Golgi in das ER könnte auch diese kurze Sequenz eine Bedeutung für den Transport bzw. die Lokalisation haben.

Um diese theoretischen Überlegungen experimentell zu analysieren, wurden zwei Wege eingeschlagen. Zum einen wurden sowohl die cDNA des HL#2, als auch die Sequenz des ersten Introns als hypothetisches Signalpeptid N- und C-terminal mit GFP fusioniert und transient in Epidermiszellen von Gerstenblättern exprimiert. Zum anderen wurde nach den alternativen Spleißingformen mit spezifischen Primern und RT-PCR in der Gesamt-RNA von gestressten und ungestressten Pflanzen gesucht.

Untersuchungen zum Transport mit GFP Die Expression des GFPs als Fusion mit den beschriebenen Proteinen bzw. Peptiden wurde in transient transformierten Epidermiszellen von Primärblättern und Koleoptilen untersucht. Eine Transformation in Protoplasten von Gerste oder BY2-Zellen aus Tabak (Okushima et al., 2000) erschien wenig sinnvoll, da die in das Kultivierungsmedium sekretierten Proteine aufgrund der Verdünnung kaum nachweisbar sind. Auch ist hier die Gefahr der Zerstörung einzelner Protoplasten sehr groß, so dass cytosolische Proteine im Medium zu falsch positiven Ergebnissen führen können.

Die Transformation der Epidermiszellen wurde durch Particle Bombardment durchgeführt und die Epidermiszellen nach mindestens 48 h Inkubation unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Es wurde erwartet, dass wenigstens eines der Fusionsproteine aus HL#2 bzw. hypothetischem Signalpeptid und GFP im Apoplasten nachzuweisen ist. Daraufhin hätte sich durch Inhibition des Vesikeltransportweges mit Brefeldin A (Boevink et al., 1999) zeigen lassen können, ob das Pro-

4. Diskussion

tein HL#2 trotz fehlendem Signalpeptid auf diesem Wege transportiert, oder ein alternativer Weg genutzt wird (Batoko et al., 2000).

Wie in Abbildung 3.26 auf Seite 77 zu sehen, kann jedoch ein Transport aus der Zelle heraus für keines der beschriebenen Konstrukte gezeigt werden, da in allen Fällen nur eine cytoplasmatische Fluoreszenz auftritt. Auch sind die Fusionsproteine, wie das GFP allein, noch klein genug, um durch die Kernporen in den Nukleus zu dringen. Damit konnte zwar die korrekte Klonierung in den Leserahmen des GFP neben der Sequenzierung noch einmal bestätigt werden, denn anderenfalls hätte gar keine Expression auftreten dürfen, doch ausschließlich das zur Kontrolle verwendete GFP mit dem Transitpeptid der RubisCO für den Transport in Plastiden wurde korrekt transportiert und ist in den Plastiden nachweisbar.

Es gibt eine Reihe von Faktoren, welche die Fluoreszenz des GFP beeinflussen können, Dazu gehört beispielsweise H_2O_2 , das bei einer Verletzung des Blattgewebes (hier durch Partikelbeschuss) als Verwundungssignal gebildet wird, aber auch ein niedriger pH-Wert die GFP-Fluoreszenz nachweislich verringert (Tsien, 1998). Zudem sind HL#2 und Horcolin löslich, so dass es denkbar wäre, dass keine lokale Fluoreszenz an der Zellwand der Ursprungszelle zu erkennen ist, sondern dass die Proteine von der Stelle des Ausschleusens aus der Zelle diffundieren und so schwerer nachzuweisen sind. Es ist jedoch eine deutliche Fluoreszenz erkennbar, diese aber nur im Cytosol. Dies muss wiederum nicht bedeuten, dass HL#2 doch ausschließlich cytoplasmatisch vorliegt, sondern nur, dass ein Transport nicht stattgefunden hat. Möglicherweise ist das hypothetische Signalpeptid nicht ausreichend für einen Transport und nur in Verbindung mit weiteren Sequenzinformationen in der HL#2-cDNA funktionsfähig, wie beispielsweise die ETSLAS-Sequenz am C-terminalen Ende. So haben beispielsweise Neuhaus et al. (1991) in Tabak die Lokalisation zweier Isoformen der Chitinase A untersucht, wobei eine sieben Aminosäure lange C-terminale Sequenz für den Transport in die Vakuole verantwortlich ist. Wird diese entfernt, kann die Chitinase dagegen in hoher Konzentration in der IWF nachgewiesen werden. Um zu prüfen, ob dieses System auf HL#2 übertragbar ist, kann ein Konstrukt hergestellt werden, das sowohl das erste Intron, als auch die bekannte cDNA des HL#2 mit und ohne C-terminale Aminosäuresequenz enthält. Zusätzlich muss in diese Versuche auch Horcolin mit einbezogen werden, dass ebenfalls im Apoplasten nachzuweisen ist, jedoch anders als HL#2 kein mögliches Signalpeptid aufweist. Das erste Intron liegt zwar bei Horcolin an der gleichen Position direkt nach dem Startcodon, doch gibt es hier keinen offenen Leserahmen. Spleißing kann jedoch über viele Basenpaare hinweg erfolgen, so dass das Vorhandensein einer Signalsequenz weiter upstream des Genes nicht ausgeschlossen ist. Diese Untersuchungen konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht durchgeführt werden.

Untersuchungen zum Transport mit RT-PCR In den zu den GFP-Versuchen mit HL#2 parallel durchgeführten RT-PCR-Ansätzen wurde Gesamt-RNA aus gestressten und ungestressten Gerstenpflanzen isoliert und auf alternative Spleißingformen des HL#2 hin untersucht. Hierfür wurden verschiedene Primerkombinationen verwendet. Zum einen wurden Primer für die Amplifizierung der Intronsequenz verwendet, die das hypothetische Signalpeptid kodiert, zum anderen die cDNA des HL#2 flankierende Primer. Die Ergebnisse zeigen, dass in allen untersuchten Proben das hypothetische Signalpeptid nachgewiesen werden kann. Die Abbildung 3.28 auf Seite 79 einer semi-quantitativen RT-PCR zeigt zudem eine leicht erhöhte Amplifikation in Gerstenblättern nach Verwundung. Wie in Abschnitt 3.4 auf Seite 68 gezeigt wurde, lässt sich die HL#2-Expression unter Verwundung verstärken. Dies ist ein Hinweis dafür, dass es tatsächlich zwei alternativ gespleißte Formen des HL#2 gibt, deren Verhältnis zueinander, wie für *OsIMI* und *OsIM2* beschrieben (Kong et al., 2003), unter verschiedenen Umweltbedingungen variiert. Andererseits sollte in diesem Fall bei den Ansätzen mit den Primern die außerhalb des Genes in den untranslatierbaren Bereichen binden, zwei Banden mit verschiedenen Größen nachzuweisen sein: eine Bande, die der bekannten mRNA ohne Signalpeptid entspricht und eine zweite ca. 100 bp größere Bande mit dieser Sequenz. Zu sehen sind jedoch ausschließlich Fragmente in der Größe der bekannten mRNA des HL#2. Möglicherweise ist der Anteil der mRNA mit Signalpeptid zu klein, um in Konkurrenz mit der mRNA ohne Signalpeptid ausreichend amplifiziert zu werden. Ein Nachweis des Introns in der Gesamt-RNA aufgrund der Amplifikation von ungespleißter Prä-mRNA, die die Introns noch enthält, wurde wegen der Unterschreitung der Nachweisgrenze mit der RT-PCR im vorliegenden Fall ausgeschlossen, da die Prä-mRNA im Mittel nur maximal einen Anteil von 6 % der Gesamt-RNA ausmacht.

Der Transportweg des HL#2 konnte trotz der beschriebenen Versuche nicht geklärt werden, möglich ist jedoch beides: zum einen, dass der Transport über den bekannten Weg des ER / Golgi mit einem N-terminalen Signalpeptid, dass durch stressinduziertes alternatives Spleißing angefügt wird, und zum anderen die Nutzung eines neuen und bisher nicht beschriebenen Transportweges.

4.5. Biochemische Eigenschaften von HL#2 und Horcolin

Zum Nachweis der Proteine HL#2 und Horcolin sind bereits in früheren Arbeiten Antikörper hergestellt worden (Menhaj, 1998; Grunwald, 2002). Der erste Antikörper gegen das aufgereinigte Fusionsprotein aus HL#2 und Glutathion-S-Transferase (GST) aus der Ziege (ZAK-HL#2) zeigte im Western Blot eine Kreuzreaktivität mit Horcolin, das zu dem Zeitpunkt noch unbekannt

4. Diskussion

und nicht charakterisiert war und deshalb als HL#2* oder kleines HL#2 bezeichnet und veröffentlicht wurde (Mishra et al., 1999; Menhaj et al., 1999). Mit diesem Antikörper lassen sich auch in anderen Getreidearten HL#2-homologe Proteine nachweisen, beispielsweise in Mais, Weizen und Roggen (Grunwald, 2002) oder auch die JIP 32.6 und 32.7 (Menhaj et al., 1999). Um einen spezifischen Nachweis für HL#2 führen zu können, wurde von Grunwald (2002) ein Peptidantikörper (Peptid-HL#2) aus Kaninchen gewonnen, der gegen ein 12 Aminosäure langes Peptid im N-terminalen Bereich gerichtet ist (vgl. Abbildung 3.29 auf Seite 80). Dieser Antikörper erkennt HL#2, jedoch nicht Horcolin. In der vorliegenden Arbeit gelang es, das Gegenstück dazu, also einen für Horcolin spezifischen Peptidantikörper aus dem Huhn zu gewinnen (Peptid-Horcolin, vgl. Abschnitt 3.6.1 auf Seite 79). Zur Immunisierung wurde ein 13 Aminosäuren langes Peptid verwendet, das an einer ähnlichen Position wie das entsprechende Peptid für die HL#2-Antikörpergewinnung liegt. Die Sequenzvergleiche der homologen Proteine zu HL#2 in der Abbildung 3.12 auf Seite 58 und HL#2 mit Horcolin in der Abbildung 3.29 auf Seite 80 zeigen, dass die Peptide zur Antikörperherstellung einen kleinen Bereich überspannen, der vergleichsweise geringe Homologien aufweist. Somit kann gewährleistet werden, dass die Peptidantikörper tatsächlich spezifisch für HL#2 bzw. Horcolin sind. HL#2 und Horcolin können so klar voneinander und von anderen Mitgliedern der homologen Proteinfamilie der lektinähnlichen Proteine getrennt werden. Gleichzeitig steht mit dem ursprünglichen Antikörper eine Möglichkeit zur Verfügung, verwandte Proteine in anderen Spezies zu untersuchen.

Die spezifischen Peptidantikörper wurden für den Nachweis von HL#2 und Horcolin auch in der IWF verwendet, um ausschließen zu können, dass statt HL#2 und Horcolin kreuzreaktive homologe Proteine des Apoplasten nachgewiesen werden.

Wie bereits durch Sequenzhomologien gezeigt, gehören HL#2 und Horcolin zu den jacalin-verwandten Proteinen und stellen Lektine dar. Peumans et al. (1995) haben vorgeschlagen, dass das einzige Kriterium für diese Einordnung das Vorhandensein von ein oder mehreren Zucker- bzw. Kohlenhydratbindungsdomänen sei. Die Aminosäuren, die an der Bindungsdomäne beteiligt sind, liegen sowohl im N-terminalen, als auch im C-terminalen Bereich und bilden nach der korrekten Faltung in der Tertiärstruktur eine Bindungsstelle. Abbildung 4.1 zeigt die Position der an der Bindung beteiligten Aminosäuren nach VanDamme et al. (2004b) in einem Sequenzvergleich verwandter Proteine.

In Zusammenarbeit mit Grunwald (2002) konnte gezeigt werden, dass HL#2 und Horcolin in der Lage sind, an Zucker zu binden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die Vermutung bestätigt werden, dass die Bindungsfähigkeit von Horcolin an Mannose pH-abhängig ist. Bei einer Extraktion im neutralen Milieu scheinen die Bindungsstellen für Zucker gesättigt zu sein, denn eine Bindung an den matrixgebundenen Zucker erfolgt nicht. Wird dagegen bei pH 3 extrahiert und erst der Bindungstest bei neutralem pH durchgeführt, ist eine Bindungsfähigkeit nachzuwei-

4. Diskussion

HL#2	--MSS--SPVVKLGPGWGGDDGVAHDIT-VAPQRLESITIRWGKVLHSAFTYRDKDNQL	54
Horcolin	-----MSKPVKIGPWGGNGGSSERDVQ-PKPIRMVSM TVSSGAIVDIAFTYVGTDNVQ	52
Hfr-1	PLLSLGDGSAVAKIGPWGKMSGELLDIP-STPQRLEIRITIRHGVIDSLAFSFDKAGEP	243
JIP32.6	PVLKS--ESLLTKLGPWGGNGGDKDILEAVPRRLESITVSSGSIIDSIFSYVDQTGQK	208
BGAF	PVLGAT-KRSATKVGPGWGGSGGSPMDIT-AEPQRLKSITVATGIAVTSIAFSYVDSAGQT	208
SalT	-----MTLVKIGLWGGNGGSAQDIS-VPPKLLGVTTIYSSDAIRSI AFNYIGVDGQE	51
GOS9	-----MSTQLVKIGTWGGNGGGRVDLS-VLPRSLKSVTIRSGAAIDIAFTYIGTDGKE	53
g		
HL#2	HTAG-PWGGAGGEKEDPDITITLGPSEYITQVDWSVGPFFKLKEIEH-CITSLKFVTNQASY	112
Horcolin	HSSGIKWGGTGGTED---TINLDATNYVTEISGTVG---KFGTDDIVTSLKIITSKQVT	105
Hfr-1	YNVG-PWGGRRGDNK--DTIELAPSEIVTEVSGTVGIFAEDNVEYNAIASLTITTNHRPY	300
JIP32.6	HNAG-PWGGSGG-NQN--TFVLGASEFVKEVSGTFGIYDKDRHNI--ITSLKFITNVKTY	262
BGAF	QSAG-RWGGSGGETEP--VIQLGDSEVLTELSGTIG--NVDGLTV--ITSLKFVTSLKTY	261
SalT	YAI G-PWGGEGTST---EIKLGSSEHIKEISGTHGP---VYDLADIVTYLKIVTSANNT	104
GOS9	HLAG-PWGGGGGNPT---TITLGSQEFVKIGISGT-----FTNVVTNLKIVTNVT-T	99
HL#2	GPFGY--AVDSTHYSPLVLNNGSVVGMFGFRAGDYLLHAIGFYVLPETSLAS	160
Horcolin	RTYG---SGTGIPFRVPLVDGGKIAGFFGRAGFLDAIGFYITP-----	146
Hfr-1	GPFG---ETQSTPFSVPVQDNNNIVGFFACAGKYVDALGVYVRSVPST--	345
JIP32.6	GPFG---EAKGTPFTIAVQKNSSIVGFFAFARSGIYLDALGVYVRL-----	304
BGAF	GPFGAWNGSDTPFAIPVQGSIAIVGFFAFARAGVYLDALGVYVRSL-----	306
SalT	YEAG---VPNGKEFSIPLQDSGHVVGFFGRSGTLIDAIGIYVHP-----	145
GOS9	YNFG---QGGGTAFSLPLQ-SGSVVGFFGRAGALVDSIGVYVHI-----	139
G f g G d		

Abbildung 4.1: Zuckerbindungsdomänen der jacalinverwandten Lektine. Gezeigt ist ein Sequenzvergleich mit ClustalW, wobei die Aminosäuren, die an der Zuckerbindung beteiligt sind, mit blauen Rahmen markiert sind. Von Hfr-1, BGAF und JIP 32,6 sind nur die C-terminalen Bereiche dargestellt (NCBI-Accessionnummern siehe in Abschnitt 3.2.1 auf Seite 58).

sen. Eine solche pH-Abhängigkeit der Lektinbindung bzw. einer Agglutinationsfähigkeit wurde auch in anderen Spezies von Nagakawa et al. (1996) beschrieben, wie für ein Lektin aus *Helianthus tuberosus*, das bei pH 5 seine Fähigkeit zur Hämagglutination verliert, dennoch aber an Zucker binden kann. Peumans et al. (2000) konnten ebenfalls eine pH-abhängige Zuckerbindung bei zwei Lektinen aus Bananenfrüchten zeigen.

In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass Horcolin neben einer Affinität zu Mannose auch eine solche zu Maltose besitzt. Diese kombinierte Mannose / Maltosespezifität ist auch für das zu HL#2 bzw. Horcolin homologe Calsepa aus *Calystegia sepium* beschrieben (Van Damme et al., 1996). HL#2 dagegen besitzt eine Affinität zu Mannan, aber weder zu Mannose noch zu Maltose (Grunwald, 2002). Betrachtet man die Zuckerbindungsdomänen in Abbildung 4.1, so fällt auf, dass bei HL#2 die an der Bindung beteiligten Aminosäuren an zwei Positionen von den Anderen abweichen. Einmal steht an der entsprechenden Stelle ein Methionin (M) anstelle eines Phenylalanin (F), wobei beides jedoch neutrale, hydrophobe Aminosäuren sind. Beim zweiten Mal ersetzt jedoch ein basisches Histidin (H) die sauren Aminosäuren (Asparaginsäure [D] und Glutaminsäure [E]) der anderen Proteine. Dies ist sehr wahrscheinlich die Ursache der von den verwandten Proteinen abweichende Zuckerspezifität.

4. Diskussion

Geht man auf die ursprüngliche Definition der Lektine zurück, so ist ein Protein dann ein Lektin, wenn es in der Lage ist, Erythrozyten zu agglutinieren (Sharon und Lis, 1989). Trotz der von Van Damme et al. (2004) vorgeschlagenen Definition, nach der nur ein oder zwei Zuckerbindungsdomänen im Protein vorliegen müssen, wird dieser Hämagglutinationstest nach wie vor zur Überprüfung der Lektineigenschaften bzw. zur Bestimmung der Zuckerspezifität durch Hemmung der Agglutination durch Zugabe des spezifischen Zuckers verwendet (Peumans und Van Damme, 1998). Agglutinierung funktioniert jedoch nur, wenn es mindestens zwei Bindungsstellen am Protein gibt, da sonst keine Vernetzung auftreten kann. Die in Abbildung 4.1 gezeigten Aminosäuren bilden bei der Ausbildung der Tertiärstruktur nur eine Bindungsstelle. Daher wird bei allen Lektinen von einer mindestens dimeren Quartärstruktur ausgegangen. Diese konnte für verschiedene Proteine gezeigt werden: Calsepa ist ein Homodimer aus 16 kDa großen Untereinheiten (Peumans et al., 1997), Heltuba ein Homotetramer (Van Damme et al., 1999) und für die Isoformen Orysata 1 und 2 konnten ebenfalls ein dimere Struktur nachgewiesen werden (Zhang et al., 2000). Das Lektin Jacalin, das die Grundlage für die Klassifizierung der jacalinähnlichen Lektine bildet, wird dagegen als Präproprotein translatiert und posttranslational modifiziert, wobei das reife Protein ein heteromeres Protein darstellt (Sastry et al., 1986; Kabir, 1995). In der vorliegenden Arbeit konnte nun für Horcolin eine tetramere Struktur aus identischen Untereinheiten gezeigt werden. Für diesen Nachweis durch eine Gelfiltration wurde ein saurer Proteinextrakt aus etiolierten Koleoptilen verwendet, da Horcolin in dieser Fraktion angereichert ist und in nativer Form vorliegt. Für HL#2 wird aufgrund der Ähnlichkeiten zu Horcolin und den anderen Lektinen mit experimentell bestimmter Quartärstruktur eine homodimere bzw. homotetramere Struktur angenommen.

Eine posttranslationelle Modifikation konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt werden, diese wird jedoch als wahrscheinlich erachtet, da HL#2 und Horcolin extrazellulär im Apoplasten vorkommen und in der IWF durch Proteasen nicht verdaut werden können (vgl. Papainverdau in Abschnitt 3.6.3 auf Seite 84). Wie für die PR-Proteine beschrieben, müssen apoplastidäre Proteine physicochemische Eigenschaften aufweisen, die es ihnen ermöglichen, in diesem speziellen Milieu zu überstehen (vgl. Abschnitt 1.5 auf Seite 9). Proteine, die über den sekretorischen Transportweg durch das ER und Golgi exportiert werden, liegen unter anderem glykosyliert vor. Die Programme zur Bestimmung von möglichen Glykosylierungsstellen NetNGlyc 1.0 und NetOGlyc 3.1 der Technischen Universität Dänemark (URL in Tabelle A.1) erkennen bei HL#2 mögliche Stellen zur Verknüpfung mit Oligosacchariden an den Positionen 2 (S), 3 (S), 4 (S), 72 (T) und 74 (T) (O-verknüpfte Oligosaccharide an den Hydroxylgruppen der Seitenketten von Serin und Threonin) und 131 (N) (N-verknüpfte Oligosaccharide an der freien Aminogruppe des Asparagin). Horcolin besitzt dagegen nur zwei mögliche O-Glykosylierungsstellen an Position 2 (S) und 31 (T). Da aber auch hier keine Signalsequenzen erkannt werden, wird eine Glykosylier-

rung von diesen Programmen als unwahrscheinlich betrachtet. Wie in Abschnitt 4.4 beschrieben, ist es jedoch möglich, dass eine Signalsequenz durch alternatives Spleißing angefügt wird.

4.6. Untersuchung der Proteinzusammensetzung der IWF

Um HL#2 und Horcolin als apoplastidäre Proteine in einem größeren Zusammenhang betrachten zu können, wurde die gesamte Proteinfraktion untersucht, die sich mit Hilfe der IWF aus dem Apoplasten isolieren lässt.

In der vorliegenden Arbeit wurden einzelne Proteine der IWF durch Massenspektrometrie untersucht und in einer 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Für den direkten Vergleich wurde die Proteinfraktion der IWF derjenigen der Guttationsflüssigkeit der Gerste (vgl. Abschnitt 1.5 auf Seite 9 und Grunwald et al. (2003)) gegenübergestellt. Hierbei wurde der pH-Wert der Guttationsflüssigkeit (pH 5) auch für die Isolierung der IWF verwendet, um beide Proteinfraktionen besser vergleichen zu können.

Unterschiede zwischen beiden Proteinzusammensetzungen zeigen sich sowohl in der eindimensionalen, als auch der zweidimensionalen Auftrennung. Besonders auffällig ist die prägnante Doppelbande bei ca. 25 kDa in der IWF, die offenbar in verschiedenen Isoformen auftritt und in der Guttationsflüssigkeit vollkommen fehlt. Die Massenspektren beider Proteine sind beinahe identisch und die durch Q-TOF-Massenspektrometrie bestimmten Peptiden ergeben dieselben Sequenzen. Der Abgleich mit der EMBL-Datenbank ergab, dass es sich hierbei um Isoformen des HvGLP1 ("Germin-like" Protein) aus *Hordeum vulgare* handelt (Vallelian-Bindschedler et al., 1998).

Germine werden während der Samenkeimung und in sehr jungen Sämlingen von Gerste und Weizen exprimiert, aber auch in älteren Pflanzen unter Pathogenbefall induziert und besitzen eine Oxalatoxidase-Aktivität. Dieses Enzym setzt H_2O_2 frei, das zum einen selbst toxisch gegen mikrobiellen Eindringlinge wirkt und zum anderen zur vermehrten Bildung von Ligninen, toxischen Phenolen und zur Vernetzung von Zellwandproteinen beitragen (Baker und Orlandi, 1995; Low und Merida, 1996).

"Germin-like" Proteine (GLPs) zeigen hohe Homologien zu den Germinen und gehören zu einer weit verbreiteten, homogenen Familie von Proteinen mit verschiedenen Funktionen in Pro- und Eukaryoten (Heintzen et al., 1994; Dunwell et al., 2000). Sie sind wasserlösliche Glykoproteine mit einer monomeren molekularen Masse von ca. 25 kDa und kommen sowohl in Vakuole, Cytoplasma und Golgi als auch in der Plasmamembran und der Zellwand vor. GLPs besitzen,

4. Diskussion

anders als die Germinine keine Oxidase-Aktivität. Sowohl Germinine, als auch GLPs bestehen aus Oligomeren und werden in denaturierender SDS-PAGE in eine Doppelbande getrennt.

HvGLP-1 selbst ist ein apoplastidäres Homooligomer, dessen Bande aus der IWF-Fraktion verschwindet, wenn die Pflanze unter Stress steht (Vallelian-Bindschedler et al., 1998). Rodriguez-Lopez et al. (2001) konnten zeigen, dass die von ihnen isolierten Isoformen einer ADP-Glucose Pyrophosphatase / Phosphodiesterase (AGPPase) verschiedene Oligomere von HvGLP1 darstellen, so dass hiermit erstmals eine Enzymaktivität von GLPs nachgewiesen wurde. Sie zeigen zudem, dass eine der Isoformen stärker glykosyliert ist und deshalb vermutlich langsamer in der Elektrophorese läuft, was das Auftreten der Doppelbande erklärt.

In der vorliegenden Arbeit konnte nun zudem gezeigt werden, dass die Isoformen des HvGLP1 lichtinduziert sind und gewebespezifisch im Blatt, jedoch nicht in der Koleoptile auftreten.

Eine weitere ansequenzierte Proteinbande der IWF ergab keine hundertprozentige Übereinstimmung mit einem bekannten Protein in der EMBL-Datenbank. Es scheint sich jedoch um ein verwandtes Protein des 9 kDa großen Lipidtransfer-Proteins 7a2b aus der Gerste zu handeln. Auch die Lipidtransfer-Proteine kommen in verschiedenen Isoformen in verschiedenen Spezies vor und sind an der Abwehr von Pathogenen beteiligt (Molina und Garcia-Olmedo, 1993; Molina et al., 1993).

Beide extrazelluläre Proteinfractionen aus IWF und Guttation zeigen sowohl Ähnlichkeiten, beispielsweise in dem vorwiegenden Auftreten von Proteinen mit einem pI im sauren Bereich, aber auch große Unterschiede. Die durchschnittliche Proteinkonzentration in der Guttation (4,2 µg / ml) ist weit geringer als die der IWF (450 µg / ml), da durch die Infiltrierung des Apoplasten bei der Isolierungsmethode der IWF ein zusätzlicher Verdünnungsfaktor vorliegt. Dieser Unterschied zeigt sich auch in der Chitinase PR-Q, deren Konzentration sowohl in der Guttationsflüssigkeit, als auch in der IWF aus ungestressten Pflanzen bestimmt wurde, jedoch ist der relative Anteil an PR-Q in der Proteinfraction der IWF geringer. Beide Fraktionen enthalten ähnliche Enzyme, die in Zusammenhang mit der Stressabwehr stehen, wie verschiedene Peroxidasen, Glucanasen oder Chitinasen. Dennoch ist die vornehmliche Aufgabe der Guttation eher die Aufrechterhaltung der Nährstoffversorgung durch aktive Wasserabgabe auch bei hoher Luftfeuchtigkeit der Umgebung, auch wenn eine gewisse konstitutive Abwehr gegen mögliche Pathogene an bzw. in den Hydathoden von Nutzen ist. Der Apoplast ist jedoch der Ort, der direkt mit der Umgebung Kontakt aufnimmt, Veränderungen misst und Signale weiterleitet. HL#2 und Horcolin werden daher im letzten Abschnitt als Proteine des Apoplasten auch in diesem Zusammenhang der Signalerkennung, -erzeugung oder -weiterleitung diskutiert.

4.7. Mögliche Funktionen von HL#2 und Horcolin bei der Signaltransduktion

Werden alle hier diskutierten Daten zu HL#2 und Horcolin im Zusammenhang betrachtet, ergeben sich weitere Hinweise für ihre mögliche Funktion in der Pflanze im Allgemeinen und im Apoplasten im Besonderen. Bisher war aufgrund der Sequenzhomologien zu den jacalin-verwandten Lektinen verschiedener Pflanzen und ihrer Zuckerbindungseigenschaften vermutet worden, dass HL#2 und Horcolin eine Rolle bei der Pathogenabwehr spielen (möglicherweise als Toxin) oder stabilisierende Faktoren durch Quervernetzungen in der Zellwand darstellen (Grunwald, 2002).

Zuckerreste kommen in der Pflanze in verschiedenen Formen vor. Viele Proteine, vor allem in den Apoplasten exportierte, liegen in glykosylierter Form vor. Je nach Modifikation in ER und Golgi gibt es Proteine mit N-gebundenen mannosereichen oder komplexen Oligosacchariden. In der Zelle sind diese Proteine selten, doch es gibt Zuckerreste beispielsweise an den Oberflächen von Vesikeln. Durch Agglutinationsversuche mit isolierten Tabak-Protoplasten konnten ebenfalls auf der Oberfläche der Plasmamembran Galaktosereste nachgewiesen werden (Gruber et al., 1984; Fenton und Labavitch, 1980).

Das zu HL#2 am nächsten verwandte Protein der aktuellen Einträge in den Datenbanken ist Hfr-1 aus Weizen. Wie bereits in Abschnitt 4.2 beschrieben, wird dessen mRNA unter Verwundung bzw. nach Befall mit den Larven der Hessenfliege (*Mayetiola destructor*) induziert. Wie HL#2 wird Hfr-1 jedoch konstitutiv exprimiert, so dass die mRNA sowohl in befallenen, als auch in unbefallenen Pflanzen nachzuweisen ist. Eine Induktion durch Larvenfrass führt nur zu einer transient verstärkten Expression, die nach wenigen Tagen auf das ursprüngliche Niveau zurückgeht. Entsprechende Daten zur Proteinebene sind hier nicht vorhanden. Auch die HL#2-mRNA lässt sich durch verschiedene Faktoren, wie Hochlicht, Verwundung und Jasmonat induzieren, doch die erhöhte Expression ist nur transient auf der mRNA-Ebene nachzuweisen, wobei sich der Proteinlevel, außer bei einer Jasmonatbehandlung, nicht verändert. Würden Hfr-1 und HL#2 bei der Abwehr in Form einer toxischen Verbindung und Zellwandstabilisierung eine Rolle spielen, sollte die Expression jedoch nicht transient sein und die Proteinmenge sich erhöhen. Vor allem bei sehr kurzen transienten Antworten innerhalb weniger Stunden nach Stressbeginn ist eine solche Funktion fraglich. Daher wurde eine mögliche Funktion bei der Signaltransduktion vermutet.

Die Indizien, die für eine solche Funktion sprechen, sind folgende: Zum einen wurde das ebenfalls zu HL#2 nah verwandte Protein BGAF in Mais beschrieben, das an β -Glucosidase bindet und durch Vernetzung agglutiniert. Eine Blockierung des aktiven Zentrums tritt hier jedoch nicht

auf, und es scheint, als ob die Enzymaktivität durch die Bindung an BGAF nicht beeinflusst wird (Esen und Blanchard, 2000). Eine ähnliche Bindung an Enzyme wird für die myrosinasebindenden Proteinen aus *Arabidopsis thaliana* beschrieben (Geshi und Brandt, 1998; Taipalensuu et al., 1997). Auch diese zählen zu den jacalinverwandten Proteinen, sind daher mit HL#2 und Horcolin verwandt, werden ebenfalls durch Verwundung und Jasmonat induziert und sind z. T. mannosebindend. Myrosinasen spalten Glucosereste von Glucosinolaten, wobei beispielsweise in *Brassica*-Arten aus dem nichtaktiven Senfölglycosid Sinigrin ein für viele Schmetterlingsraupen toxisches Allylisothiocyanat entsteht. Enzym und Substrat liegen in verschiedenen Zellkompartimenten vor und werden erst bei einer Zerstörung der Zellen durch Raupenfrass zusammengebracht (Hess, 2004; Andreasson et al., 2001).

Zum anderen konnte von Dietz et al. (2000) eine Aktivität einer apoplastidären β -Glucosidase nachgewiesen werden, die ABA-Glucokonjugate durch Abspaltung des Glucoserestes hydrolysiert, wobei freies ABA entsteht. ABA-Konjugate sind physiologisch inaktiv (Boyer und Zeevaart, 1982) und so ebenfalls nicht in der Lage, über die Membran zu gelangen, um eine Signalkette in Gang zu setzen. Freies, protoniertes ABA ist jedoch hoch hydrophob und gelangt durch den Protonengradient, bedingt durch den pH-Unterschied von Apoplast und Cytoplasma (Pfanzen und Dietz, 1987), problemlos über die Plasmamembran in die Zelle (Slovik et al., 1992). Die Aktivität der β -Glucosidase im Apoplasten ist stressreguliert. Dietz et al. (2002) haben eine erhöhte Enzymaktivität und Konzentrationen von freiem ABA im Apoplasten unter Salzstress nachweisen können. Glucokonjugate von Jasmonat sind ebenfalls beschrieben (Westhoff et al., 1996) und ein extrazelluläres Vorkommen wird beispielsweise in Tomate nachgewiesen (Bücking et al., 2004).

Möglicherweise besitzen HL#2 und Horcolin eine Funktion in der Signaltransduktionskette bei der Regulation der Genexpression durch ihre Fähigkeit, an Enzyme zu binden, die für die Freisetzung von Botenstoffen in Form von Phytohormonen aus ihren Glucokonjugaten zuständig sind. Wie dieses Zusammenspiel aus Enzym, Phytohormon und Lektin im Detail aussieht, kann nur vermutet werden. Möglicherweise binden die Lektine durch ihre Zuckerbindungsdomäne an Zuckerreste auf der Plasmamembran und an anderer Seite an Enzyme, die damit zwar löslich und aktiv, aber ortgebunden sind. Ebenfalls möglich ist, dass die Lektine direkt bei der Bindung des Enzymes an das Phytohormon in seiner konjugierten Form eine Rolle spielen. Neben Mannose und diversen anderen Zuckerspezifitäten von jacalinverwandten Lektinen sind auch Glucosespezifitäten beschrieben (Mann et al., 2001).

Auch Van Damme et al. (2004a) vermuten eine Rolle einiger jacalinverwandter Lektine bei der Zellregulation und Signaltransduktionskette. Sie diskutieren diese jedoch intrazellulär bei den zu HL#2 und Horcolin verwandten Proteinen SalT und Nictaba, deren Expression ebenfalls durch Stress reguliert wird. Sie gehen davon aus, dass solche stressinduzierten Lektine mit gerin-

4. Diskussion

gen Konzentrationen eine Rolle bei endogenen Protein-Kohlenhydrat-Interaktionen spielen und neben den "klassischen" Lektinen mit Speicher- und Abwehrfunktion eine eigene Gruppe mit Signaltansduktionsfunktion bilden.

Damit entwickelt sich in der letzten Zeit ein neues Konzept der Unterscheidung und physiologischen Funktionen der Pflanzenlektine. HL#2 und Horcolin sind geeignete Vertreter dieser Gruppe, an denen sich bisher nicht charakterisierte Mechanismen gut untersuchen lassen. Zudem stellen sie apoplastidäre Mitglieder stressinduzierter Lektine dar, die in diesem Kompartiment wahrscheinlich an der Erkennung oder Erzeugung von Signalen beteiligt sind, die dann an die Zelle weitergegeben werden.

Literaturverzeichnis

- Adamska, I. und Kloppstech, K.: 1994, Low-temperature increases the abundance of early light-inducible transcript under light stress conditions, *Journal of Biological Chemistry* **269(48)**, 30221, Article DEC 2
- Adamska, I., Kruse, E., und Kloppstech, K.: 2001, Stable insertion of the early light-induced proteins into etioplast membranes requires chlorophyll a, *J Biol Chem* **276(11)**, 8582
- An, C., Ichinose, Y., Yamada, T., Tanaka, Y., Shiraishi, T., und Oku, H.: 1993, Organization of the genes encoding chalcone synthase in *Pisum sativum*, *Plant Mol Biol* **21(5)**, 789
- Andreasson, E., Bolt Jorgensen, L., Hoglund, A. S., Rask, L., und Meijer, J.: 2001, Different myrosinase and idioblast distribution in *Arabidopsis* and *Brassica napus*, *Plant Physiol* **127(4)**, 1750
- Antoniw, J. F., Ritter, C. E., Pierpoint, W. S., und Vanloon, L. C.: 1980, Comparison of 3 pathogenesis-related proteins from plants of 2 cultivars of tobacco infected with Tmv, *Journal of General Virology* **47(MAR)**, 79, Article
- Arguello-Astorga, G. R. und Herrera-Estrella, L. R.: 1996, Ancestral multipartite units in light-responsive plant promoters have structural features correlating with specific phototransduction pathways, *Plant Physiol* **112(3)**, 1151
- Baker, C. J. und Orlandi, E. W.: 1995, Active oxygen in plant pathogenesis, *Annual Review of Phytopathology* **33**, 299, Review
- Barcelo, P. und Lazzeri, P. A.: 1995, Transformation of cereals by microprojectile bombardment of immature inflorescence and scutellum tissues, *Methods Mol Biol* **49**, 113
- Barnes, W. M.: 1994, PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates, *Proc Natl Acad Sci U S A* **91(6)**, 2216
- Batoko, H., Zheng, H. Q., Hawes, C., und Moore, I.: 2000, A rab1 GTPase is required for transport between the endoplasmic reticulum and golgi apparatus and for normal golgi movement in plants, *Plant Cell* **12(11)**, 2201
- Bücking, H., Förster, H., Stenzel, I., Miersch, O., und Hause, B.: 2004, Applied jasmonates accumulate extracellularly in tomato, but intracellularly in barley, *FEBS Lett* **562(1-3)**, 45

- Blum, H., Beier, H., und Gross, H. J.: 1987, Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, *Electrophoresis* **8(2)**, 93, FEB
- Boevink, P., Martin, B., Oparka, K., Cruz, S. S., und Hawes, C.: 1999, Transport of virally expressed green fluorescent protein through the secretory pathway in tobacco leaves is inhibited by cold shock and brefeldin A, *Planta* **208(3)**, 392, Article MAY
- Bostock, R. M. und Quatrano, R. S.: 1992, Regulation of Em gene-expression in rice - interaction between osmotic-stress and abscisic-acid, *Plant Physiology* **98(4)**, 1356, Article APR
- Boyer, G. L. und Zeevaart, J. A. D.: 1982, Isolation and quantitation of Beta-D-Glucopyranosyl abscisate from leaves of xanthium and spinach, *Plant Physiology* **70(1)**, 227
- 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
- Burge, C. und Karlin, S.: 1997, Prediction of complete gene structures in human genomic DNA, *J Mol Biol* **268(1)**, 78
- Burge, C. B. und Karlin, S.: 1998, Finding the genes in genomic DNA, *Curr Opin Struct Biol* **8(3)**, 346
- Canny, M. J.: 1995, Apoplastic water and solute movement - new rules for an old space, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**, 215, Review
- Chen, F., Hayes, P. M., Mulrooney, D. M., und Pan, A.: 1994, Nucleotide sequence of a cDNA encoding a heat-shock protein (HSP70) from barley (*Hordeum vulgare* L.), *Plant Physiol* **106(2)**, 815, Journal Article
- Chen, S. H., Lin, C. Y., Cho, C. S., Lo, C. Z., und Hsiung, C. A.: 2003a, Primer Design Assistant (PDA): A web-based primer design tool, *Nucleic Acids Res* **31(13)**, 3751
- Chen, Y. C., Tseng, B. W., Huang, Y. L., Liu, Y. C., und Jeng, S. T.: 2003b, Expression of the ipomoelin gene from sweet potato is regulated by dephosphorylated proteins, calcium ion and ethylene, *Plant Cell and Environment* **26(8)**, 1373, AUG
- Cheng, S., Fockler, C., Barnes, W. M., und Higuchi, R.: 1994, Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA, *Proc Natl Acad Sci U S A* **91(12)**, 5695
- Churin, Y., Schilling, S., und Borner, T.: 1999, A gene family encoding glutathione peroxidase homologues in *Hordeum vulgare* (barley), *Febs Letters* **459(1)**, 33, OCT 1
- Claes, B., Dekeyser, R., Villarroel, R., Van den Bulcke, M., Bauw, G., Van Montagu, M., und Caplan, A.: 1990, Characterization of a rice gene showing organ-specific expression in response to salt stress and drought, *Plant Cell* **2(1)**, 19
- Clark, F. und Thanaraj, T. A.: 2002, Categorization and characterization of transcript-confirmed constitutively and alternatively spliced introns and exons from human, *Hum Mol Genet* **11(4)**, 451

- Clontech: 1999, *GenomeWalker Kits, User Manual (PT1116-1 [PR9Y596])*
- Cocherel, S., Perez, P., Degroote, F., Genestier, S., und Picard, G.: 1996, A promoter identified in the 3' end of the Ac transposon can be activated by cis-acting elements in transgenic *Arabidopsis* lines, *Plant Mol Biol* **30(3)**, 539
- Cordwell, S. J., Nouwens, A. S., Verrills, N. M., Basseal, D. J., und Walsh, B. J.: 2000, Subproteomics based upon protein cellular location and relative solubilities in conjunction with composite two-dimensional electrophoresis gels, *Electrophoresis* **21(6)**, 1094
- de Pater, B. S. und Schilperoort, R. A.: 1992, Structure and expression of a root-specific rice gene, *Plant Mol Biol* **18(1)**, 161
- Dekeyser, R. A., Claes, B., De Rycke, R., Habets, M. E., Van Montagu, M. C., und Caplan, A. B.: 1990, Transient gene expression in intact and organized rice tissues, *Plant Cell* **2(7)**, 591
- Deutscher, P. M.: 1990, *Guide to protein purification. Methods in enzymology*, Vol. 182, Academic press
- Dietrich, C. und Maiss, E.: 2002, Red fluorescent protein DsRed from *Discosoma* sp. as a reporter protein in higher plants, *Biotechniques* **32(2)**, 286, 288
- Dietz, K. J.: 2001, in *Progress in Botany*, Vol. 62, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- Dietz, K. J., Sauter, A., Wichert, K., Messdaghi, D., und Hartung, W.: 2000, Extracellular beta-glucosidase activity in barley involved in the hydrolysis of ABA glucose conjugate in leaves, *J Exp Bot* **51(346)**, 937
- Doyle, J. J. und Doyle, J. L.: 1990, Isolation of plant DNA from fresh tissue, *Focus* **12**, 13
- Dunwell, J. M., Khuri, S., und Gane, P. J.: 2000, Microbial relatives of the seed storage proteins of higher plants: conservation of structure and diversification of function during evolution of the cupin superfamily, *Microbiol Mol Biol Rev* **64(1)**, 153
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., und von Heijne, G.: 2000, Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence, *J Mol Biol* **300(4)**, 1005
- Esen, A. und Blanchard, D. J.: 2000, A specific beta-glucosidase-aggregating factor is responsible for the beta-glucosidase null phenotype in maize, *Plant Physiol* **122(2)**, 563
- Farmer, E. E.: 1994, Fatty-acid signaling in plants and their associated microorganisms, *Plant Molecular Biology* **26(5)**, 1423, Article DEC
- Fenton, C. A. L. und Labavitch, J. M.: 1980, Lectin-mediated agglutination of plant-protoplasts, *Physiologia Plantarum* **49(4)**, 393, Article
- Finnegan, E. J. und Kovac, K. A.: 2000, Plant DNA methyltransferases, *Plant Mol Biol* **43(2-3)**, 189
- Fukui, R., Fukui, H., und Alvarez, A. M.: 1999, Suppression of bacterial blight by a bacterial community isolated from the guttation fluids of anthuriums, *Appl Environ Microbiol* **65(3)**,

1020

- Garcia, A. B., Engler Jde, A., Claes, B., Villarroel, R., Van Montagu, M., Gerats, T., und Caplan, A.: 1998, The expression of the salt-responsive gene salt from rice is regulated by hormonal and developmental cues, *Planta* **207(2)**, 172
- Gassen, H. G., Sachse, G. E., und Schulte, A.: 1994, *PCR Grundlagen und Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York
- George, R., Kelly, S. M., Price, N. C., Erbse, A., Fischer, M., und Lund, P. A.: 2004, Three GroEL homologues from *Rhizobium leguminosarum* have distinct in vitro properties, *Biochem Biophys Res Commun* **324(2)**, 822
- Geshi, N. und Brandt, A.: 1998, Two jasmonate-inducible myrosinase-binding proteins from *Brassica napus* L. seedlings with homology to jacalin, *Planta* **204(3)**, 295
- Graner, A. und Altschmied, L.: 2001, *Gerste - Ein Modell zur Erforschung komplexer Getreidegenome. Die vier GABI Gerstenverbände stellen sich vor*, Genomxpress 3/01 (Bericht 1), Gatersleben
- Green, T. R. und Ryan, C. A.: 1972, Wound induced proteinase inhibitor in tomato leaves - evidence for a proteinase inhibitor inducing factor, *Federation Proceedings* **31(2)**, A862, Meeting Abstract
- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., und Weiss, W.: 2000, The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients, *Electrophoresis* **21(6)**, 1037
- Grimm, B. und Kloppstech, K.: 1987, The family of early light-induced proteins of barley - molecular-cloning and investigation of their properties, *European Journal of Cell Biology* **43**, 21, Meeting Abstract Suppl. 17
- Gruber, P. J., Glimelius, K., Eriksson, T., und Frederick, S. E.: 1984, Interactions of galactose-binding lectins with plant-protoplasts, *Protoplasma* **121(1-2)**, 34, Article
- Grunwald, I.: 2002, Molekularbiologische und biochemische Analyse der Lektine Horcolin und HL#2 und weiterer apoplastidärer Proteine von *Hordeum vulgare*, Dissertation, Universität Hannover
- Grunwald, I., Rupprecht, I., Schuster, G., und Kloppstech, K.: 2003, Identification of guttation fluid proteins: the presence of pathogenesis-related proteins in non-infected barley plants, *Physiologia Plantarum* **119(2)**, 192, OCT
- Guiltinan, M. J., Marcotte, W. R., J., und Quatrano, R. S.: 1990, A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element, *Science* **250(4978)**, 267
- Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R., und Aebersold, R.: 1999, Correlation between protein and mRNA abundance in yeast, *Mol Cell Biol* **19(3)**, 1720

- Heintzen, C., Fischer, R., Melzer, S., Kappeler, K., Apel, K., und Staiger, D.: 1994, Circadian oscillations of a transcript encoding a germin-like protein that is associated with cell walls in young leaves of the long-day plant *Sinapis alba* L., *Plant Physiol* **106(3)**, 905
- Hess, D.: 2004, *Allgemeine Botanik*, UTB basics Ulmer
- Hirano, K., Teraoka, T., Yamanaka, H., Harashima, A., Kunisaki, A., Takahashi, H., und Hosokawa, D.: 2000, Novel mannose-binding rice lectin composed of some isolectins and its relation to a stress-inducible salt gene, *Plant Cell Physiol* **41(3)**, 258
- Hogue, R. und Asselin, A.: 1987, Detection of 10 additional pathogenesis-related (B) proteins in intercellular fluid extracts from stressed Xanthi-Nc tobacco leaf tissue, *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **65(3)**, 476, MAR
- Horton, P. und Nakai, K.: 1997, Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier, *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **5**, 147
- Hoson, T.: 1998, Apoplast as the site of response to environmental signals, *J Plant Res* **111(1101)**, 167
- Hutin, C., Nussaume, L., Moise, N., Moya, I., Kloppstech, K., und Havaux, M.: 2003, Early light-induced proteins protect *Arabidopsis* from photooxidative stress, *Proc Natl Acad Sci U S A* **100(8)**, 4921
- Imanishi, S., Kito-Nakamura, K., Matsuoka, K., Morikami, A., und Nakamura, K.: 1997, A major jasmonate-inducible protein of sweet potato, ipomoelin, is an ABA-independent wound-inducible protein, *Plant Cell Physiol* **38(6)**, 643
- Ito, M., Ichinose, Y., Kato, H., Shiraishi, T., und Yamada, T.: 1997, Molecular evolution and functional relevance of the chalcone synthase genes of pea, *Mol Gen Genet* **255(1)**, 28
- Janousek, B., Matsunaga, S., Kejnovsky, E., Ziuvoval, J., und Vyskot, B.: 2002, DNA methylation analysis of a male reproductive organ specific gene (MROS1) during pollen development, *Genome* **45(5)**, 930
- Jih, P. J., Chen, Y. C., und Jeng, S. T.: 2003, Involvement of hydrogen peroxide and nitric oxide in expression of the ipomoelin gene from sweet potato, *Plant Physiology* **132(1)**, 381, MAY
- Johansson, M. und Karlsson, A.: 1996, Cloning and expression of human deoxyguanosine kinase cDNA, *Proc Natl Acad Sci U S A* **93(14)**, 7258
- Kabir, S.: 1995, The isolation and characterisation of jacalin [*Artocarpus heterophyllus* (jackfruit) lectin] based on its charge properties, *Int J Biochem Cell Biol* **27(2)**, 147
- Kaneko, T., Takahashi, S., und 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(5)**, 940, MAY
- Kay, R., Chan, A., Daly, M., und McPherson, J.: 1987, Duplication of amv-35s promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes, *Science* **236(4806)**, 1299, JUN 5

- Kazan, K.: 2003, Alternative splicing and proteome diversity in plants: the tip of the iceberg has just emerged, *Trends Plant Sci* **8(10)**, 468
- Kim, J. K., Cao, J., und Wu, R.: 1992, Regulation and interaction of multiple protein factors with the proximal promoter regions of a rice high pI alpha-amylase gene, *Mol Gen Genet* **232(3)**, 383
- Kong, J., Gong, J. M., Zhang, Z. G., Zhang, J. S., und Chen, S. Y.: 2003, A new AOX homologous gene OsIM1 from rice (*Oryza sativa* L.) with an alternative splicing mechanism under salt stress, *Theor Appl Genet* **107(2)**, 326
- Kruse, E., Liu, Z., und Kloppstech, K.: 1993, Expression of heat shock proteins during development of barley, *Plant Mol Biol* **23(1)**, 111
- Kuchling, H.: 1995, *Taschenbuch der Physik*, Fachbuchverlag Leipzig GmbH, Köln
- Laemmli, U. K.: 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227(259)**, 680
- Lee, J., Parthier, B., und 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(4)**, 625
- Lee, Y. K. und Hwang, B. K.: 1996, Differential induction and accumulation of beta-1,3-glucanase and chitinase isoforms in the intercellular space and leaf tissues of pepper by *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* infection, *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift* **144(2)**, 79, FEB
- Legrand, M., Kauffmann, S., Geoffroy, P., und Fritig, B.: 1987, Biological function of pathogenesis-related proteins - 4 tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84(19)**, 6750, OCT
- Lehmann, J., Atzorn, R., Bruckner, C., Reinbothe, S., Leopold, J., Wasternack, C., und Parthier, B.: 1995, Accumulation of jasmonate, abscisic-acid, specific transcripts and proteins in osmotically stressed barley leaf segments, *Planta* **197(1)**, 156, Article AUG
- Lescot, M., Dehais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., Rouze, P., und Rombauts, S.: 2002, PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences, *Nucleic Acids Res* **30(1)**, 325
- Lewin, B.: 1994, *Genes V*, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo
- Litts, J. C., Erdman, M. B., Huang, N., Karrer, E. E., Noueiry, A., Quatrano, R. S., und Rodriguez, R. L.: 1992, Nucleotide sequence of the rice (*Oryza sativa*) Em protein gene (Emp1), *Plant Mol Biol* **19(2)**, 335
- Logemann, E., Parniske, M., und Hahlbrock, K.: 1995, Modes of expression and common structural features of the complete *phenylalanine ammonia-lyase* gene family in parsley, *Proc Natl*

Acad Sci U S A **92(13)**, 5905

- Lohaus, G., Pennewiss, K., Sattelmacher, B., Hussmann, M., und Hermann Muehling, K.: 2001, Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplastic fluid? A critical evaluation with different plant species, *Physiol Plant* **111(4)**, 457
- Low, P. S. und Merida, J. R.: 1996, The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction, *Physiologia Plantarum* **96(3)**, 533, Review MAR
- Lu, Z., Szafron, D., Greiner, R., Lu, P., Wishart, D. S., Poulin, B., Anvik, J., Macdonell, C., und Eisner, R.: 2004, Predicting subcellular localization of proteins using machine-learned classifiers, *Bioinformatics* **20(4)**, 547, Article MAR 1
- Mann, K., Farias, C. M., Del Sol, F. G., Santos, C. F., Grangeiro, T. B., Nagano, C. S., Cavada, B. S., und Calvete, J. J.: 2001, The amino-acid sequence of the glucose/mannose-specific lectin isolated from *Parkia platycephala* seeds reveals three tandemly arranged jacalin-related domains, *Eur J Biochem* **268(16)**, 4414
- Mansfield, S. G., Cammer, S., Alexander, S. C., Muehleisen, D. P., Gray, R. S., Tropsha, A., und Bollenbacher, W. E.: 1998, Molecular cloning and characterization of an invertebrate cellular retinoic acid binding protein, *Proc Natl Acad Sci U S A* **95(12)**, 6825
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., DeWeese-Scott, C., Fedorova, N. D., Geer, L. Y., He, S., Hurwitz, D. I., Jackson, J. D., Jacobs, A. R., Lanczycki, C. J., Liebert, C. A., Liu, C., Madej, T., Marchler, G. H., Mazumder, R., Nikolskaya, A. N., Panchenko, A. R., Rao, B. S., Shoemaker, B. A., Simonyan, V., Song, J. S., Thiessen, P. A., Vasudevan, S., Wang, Y., Yamashita, R. A., Yin, J. J., und Bryant, S. H.: 2003, CDD: a curated Entrez database of conserved domain alignments, *Nucleic Acids Res* **31(1)**, 383
- Marchler-Bauer, A. und Bryant, S. H.: 2004, CD-Search: protein domain annotations on the fly, *Nucleic Acids Res* **32**, W327
- Marchler-Bauer, A., Panchenko, A. R., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Geer, L. Y., und Bryant, S. H.: 2002, CDD: a database of conserved domain alignments with links to domain three-dimensional structure, *Nucleic Acids Res* **30(1)**, 281
- Menhaj, A. R.: 1998, Untersuchungen zur Expression und Funktion zweier pflanzlicher Streßproteine unter Licht- und Temperaturstreß, Dissertation, Universität Hannover
- Menhaj, A. R., Mishra, S. K., Bezhani, S., und Kloppstech, K.: 1999, Posttranscriptional control in the expression of the genes coding for high-light-regulated HL2 proteins, *Planta* **209(4)**, 406
- Meyer, G. und Kloppstech, K.: 1984, A rapidly light-induced chloroplast protein with a high turnover coded for by pea nuclear-DNA, *European Journal of Biochemistry* **138(1)**, 201, Article

- Mishra, S. K., Menhaj, A. R., Bezhani, S., und Kloppstech, K.: 1999, in J. H. Argyroudi und S. H. (eds.), *The Chloroplast: From Molecular Biology to Biotechnology*, pp 107–112, Kluwer Academic Publishers, Netherlands
- Mülhardt, C.: 1999, *Der Experimentator: Molekularbiologie*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm
- Münch, E.: 1930, *Die Stoffbewegungen in der Pflanze.*, Fischer Verlag, Jena
- Modrek, B., Resch, A., Grasso, C., und Lee, C.: 2001, Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes, *Nucleic Acids Res* **29(13)**, 2850
- Moiseyev, G. P., Beintema, J. J., Fedoreyeva, L. I., und Yakovlev, G. I.: 1994, High sequence similarity between a ribonuclease from ginseng calluses and fungus-elicited proteins from parsley indicates that intracellular pathogenesis-related proteins are ribonucleases, *Planta* **193(3)**, 470, Note APR
- Molina, A. und Garcia-Olmedo, F.: 1993, Developmental and pathogen-induced expression of three barley genes encoding lipid transfer proteins, *Plant J* **4(6)**, 983
- Molina, A., Segura, A., und Garcia-Olmedo, F.: 1993, Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens, *FEBS Lett* **316(2)**, 119
- Montane, M. H., Dreyer, S., Triantaphylides, C., und Kloppstech, K.: 1997, Early light-inducible proteins during long-term acclimation of barley to photooxidative stress caused by light and cold: High level of accumulation by posttranscriptional regulation, *Planta* **202(3)**, 293, JUL
- Mundy, J. und Chua, N. H.: 1988, Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene, *Embo J* **7(8)**, 2279
- Muthukrishnan, S., Liang, G. H., Trick, H. N., und Gill, B. S.: 2001, Pathogenesis-related proteins and their genes in cereals, *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **64(2-3)**, 93, Review
- Nakagawa, R., Yasokawa, D., Ikeda, T., und Nagashima, K.: 1996, Purification and characterization of two lectins from callus of *Helianthus tuberosus*, *Biosci Biotechnol Biochem* **60(2)**, 259
- Nakai, K. und Kanehisa, M.: 1992, A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells, *Genomics* **14(4)**, 897
- Neuhaus, J. M., Sticher, L., Meins, F. J., und 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(22)**, 10362
- Neumann, D., Nieden, U. Z., Manteuffel, R., Walter, G., Scharf, K. D., und Nover, L.: 1987, Intracellular-localization of heat-shock proteins in tomato cell-cultures, *European Journal of Cell Biology* **43(1)**, 71, FEB

- Nowak, K., Luniak, N., Meyer, S., Schulze, J., Mendel, R. R., und Hansch, R.: 2004, Fluorescent proteins in poplar: a useful tool to study promoter function and protein localization, *Plant Biol (Stuttg)* **6(1)**, 65
- O'Farrell, P. H.: 1975, High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *J Biol Chem* **250(10)**, 4007
- Okushima, Y., Koizumi, N., Kusano, T., und Sano, H.: 2000, Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins, *Plant Mol Biol* **42(3)**, 479
- Otte, O. und Barz, W.: 2000, Characterization and oxidative in vitro cross-linking of an extensin-like protein and a proline-rich protein purified from chickpea cell walls, *Phytochemistry* **53(1)**, 1
- Pastuglia, M., Roby, D., Dumas, C., und Cock, J. M.: 1997, Rapid induction by wounding and bacterial infection of an S gene family receptor-like kinase gene in *Brassica oleracea*, *Plant Cell* **9(1)**, 49
- Pena-Cortes, H., Fisahn, J., und Willmitzer, L.: 1995, Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants, *Proc Natl Acad Sci U S A* **92(10)**, 4106
- Peumans, W. J., Barre, A., Derycke, V., Rouge, P., Zhang, W., May, G. D., Delcour, J. A., Van Leuven, F., und Van Damme, E. J.: 2000a, Purification, characterization and structural analysis of an abundant beta-1,3-glucanase from banana fruit, *Eur J Biochem* **267(4)**, 1188
- Peumans, W. J., Hause, B., und Van Damme, E. J.: 2000b, The galactose-binding and mannose-binding jacalin-related lectins are located in different sub-cellular compartments, *FEBS Lett* **477(3)**, 186
- Peumans, W. J. und Van Damme, E. J.: 1995, Lectins as plant defense proteins, *Plant Physiol* **109(2)**, 347
- Peumans, W. J. und Van Damme, E. J.: 1998, Plant lectins: specific tools for the identification, isolation, and characterization of O-linked glycans, *Crit Rev Biochem Mol Biol* **33(3)**, 209
- Peumans, W. J., Van Damme, E. J., Barre, A., und Rouge, P.: 2001, Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins, *Adv Exp Med Biol* **491**, 27
- Peumans, W. J., Winter, H. C., Bemer, V., Van Leuven, F., Goldstein, I. J., Truffa-Bachi, P., und Van Damme, E. J.: 1997, Isolation of a novel plant lectin with an unusual specificity from *Calystegia sepium*, *Glycoconj J* **14(2)**, 259
- Pfanz, H. und Dietz, K. J.: 1987, A fluorescence method for the determination of the apoplastic proton concentration in intact leaf tissues, *Journal of Plant Physiology* **129(1-2)**, 41, Article JUL

- Prestridge, D. S.: 1995, Predicting Pol II promoter sequences using transcription factor binding sites, *J Mol Biol* **249(5)**, 923
- Promega: 2002, *pGL3 luciferase reporter vectors, technical manual no. 033*
- Pötter, E., Beator, J., und Klopstech, K.: 1996, The expression of mRNAs for light-stress proteins in barley: inverse relationship of mRNA levels of individual genes within the leaf gradient, *Planta* **199(2)**, 314
- Qin, Q. M., Zhang, Q., Zhao, W. S., Wang, Y. Y., und Peng, Y. L.: 2003, Identification of a lectin gene induced in rice in response to *Magnaporthe grisea* infection, *Acta Botanica Sinica* **45(1)**, 76, JAN
- Ramanjulu, S., Kaiser, W., und Dietz, K. J.: 1999, Salt and drought stress differentially affect the accumulation of extracellular proteins in barley, *Zeitschrift für Naturforschung C-a Journal of Biosciences* **54(5-6)**, 337, MAY-JUN
- Rasco-Gaunt, S., Riley, A., Barcelo, P., und Lazzeri, P. A.: 1999, Analysis of particle bombardment parameters to optimise DNA delivery into wheat tissues, *Plant Cell Reports* **19(2)**, 118, DEC
- Rehm, H.: 2000, *Der Experimentator: Proteinbiochemie / Proteomics*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin
- Reinbothe, S., Reinbothe, C., Lehmann, J., und Parthier, B.: 1992, Differential accumulation of methyl jasmonate-induced messenger-RNAs in response to abscisic-acid and desiccation in barley (*Hordeum-vulgare*), *Physiologia Plantarum* **86(1)**, 49, Article SEP
- Reisner, A. H., Nemes, P., und 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(2)**, 509
- Richter, G.: 2003, *Praktische Biochemie, Grundlagen und Techniken*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Rodriguez-Lopez, M., Baroja-Fernandez, E., Zanduetta-Criado, A., Moreno-Bruna, B., Munoz, F. J., Akazawa, T., und Pozueta-Romero, J.: 2001, Two isoforms of a nucleotide-sugar pyrophosphatase/phosphodiesterase from barley leaves (*Hordeum vulgare* L.) are distinct oligomers of HvGLP1, a germin-like protein, *FEBS Lett* **490(1-2)**, 44
- Rohringer, R., Ebrahimnesbat, F., und Wolf, G.: 1983, Proteins in Intercellular Washing Fluids from Leaves of Barley (*Hordeum vulgare* L), *Journal of Experimental Botany* **34(149)**, 1589
- Rouster, J., Leah, R., Mundy, J., und Cameron-Mills, V.: 1997, Identification of a methyl jasmonate-responsive region in the promoter of a lipoxygenase 1 gene expressed in barley grain, *Plant J* **11(3)**, 513
- Rupprecht, I.: 2001, Charakterisierung der HL#2-Genexpression in *Hordeum vulgare*, Diplomarbeit, Universität Hannover

- Sablowski, R. W. und Meyerowitz, E. M.: 1998, A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes APETALA3/PISTILLATA, *Cell* **92(1)**, 93
- Sankaranarayanan, R., Sekar, K., Banerjee, R., Sharma, V., Surolia, A., und Vijayan, M.: 1996, A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a moraceae plant lectin with a beta-prism fold, *Nat Struct Biol* **3(7)**, 596
- Sastry, M. V., Banarjee, P., Patanjali, S. R., Swamy, M. J., Swarnalatha, G. V., und 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(25)**, 11726
- Schägger, H. und von Jagow, G.: 1987, Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal Biochem* **166(2)**, 368
- ScottCraig, J. S., Kerby, K. B., Stein, B. D., und Somerville, S. C.: 1995, Expression of an extracellular peroxidase that is induced in barley (*Hordeum vulgare*) by the powdery mildew pathogen (*Erysiphe graminis* f sp hordei), *Physiological and Molecular Plant Pathology* **47(6)**, 407, DEC
- Selye, H.: 1956, *Stress of life.*, McGraw-Hill., New York
- Sharon, N. und Lis, H.: 1989, *Lectins*, Chapman and Hall, New York
- Shen, Q. und Ho, T. H.: 1995, Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel cis-acting element, *Plant Cell* **7(3)**, 295
- Shi, H., Xiong, L., Stevenson, B., Lu, T., und Zhu, J. K.: 2002, The *Arabidopsis* salt overly sensitive 4 mutants uncover a critical role for vitamin B6 in plant salt tolerance, *Plant Cell* **14(3)**, 575
- Siebert, P. D., Chenchik, A., Kellogg, D. E., Lukyanov, K. A., und Lukyanov, S. A.: 1995, An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA, *Nucleic Acids Res* **23(6)**, 1087
- Slovik, S., Baier, M., und Hartung, W.: 1992, compartmental distribution and redistribution of abscisic-acid in intact leaves .1. mathematical formulation, *Planta* **187(1)**, 14, Article APR
- Small, I., Wintz, H., Akashi, K., und Mireau, H.: 1998, Two birds with one stone: genes that encode products targeted to two or more compartments, *Plant Mol Biol* **38(1-2)**, 265
- 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., und Klenk, D. C.: 1985, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal Biochem* **150(1)**, 76
- Straub, P. F., Shen, Q., und Ho, T. D.: 1994, Structure and promoter analysis of an ABA- and stress-regulated barley gene, HVA1, *Plant Mol Biol* **26(2)**, 617

- Taipalensuu, J., Eriksson, S., und Rask, L.: 1997, The myrosinase-binding protein from *Brassica napus* seeds possesses lectin activity and has a highly similar vegetatively expressed wound-inducible counterpart, *Eur J Biochem* **250(3)**, 680
- Tamas, L. und Huttova, J.: 1996, Accumulation of pathogenesis-related proteins in barley induced by phosphate and salicylic acid, *Biologia* **51(4)**, 479, AUG
- Tamas, L. und Huttova, J.: 1998, Accumulation of pathogenesis-related proteins in barley induced by powdery mildew infection in the late stage of compatible and incompatible interaction, *Biologia* **53(3)**, 309, JUN
- Tamas, L., Mistrik, I., und Huttova, J.: 1997, Accumulation of apoplasmic proteins in barley primary leaves induced by aluminium and pathogen treatment, *Biologia* **52(4)**, 585, AUG
- Towbin, H., Staehelin, T., und Gordon, J.: 1992, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979, *Biotechnology* **24**, 145
- Tsien, R. Y.: 1998, The green fluorescent protein, *Annu Rev Biochem* **67**, 509
- Vallelian-Bindschedler, L., Mosinger, E., Metraux, J. P., und Schweizer, P.: 1998, Structure, expression and localization of a germin-like protein in barley (*Hordeum vulgare* L.) that is insolubilized in stressed leaves, *Plant Mol Biol* **37(2)**, 297
- Van Damme, E. J., Barre, A., Mazard, A. M., Verhaert, P., Horman, A., Debray, H., Rouge, P., und Peumans, W. J.: 1999, Characterization and molecular cloning of the lectin from *Helianthus tuberosus*, *Eur J Biochem* **259(1-2)**, 135
- Van Damme, E. J., Barre, A., Rouge, P., und Peumans, W. J.: 2004a, Cytoplasmic / nuclear plant lectins: a new story, *Trends Plant Sci* **9(10)**, 484
- Van Damme, E. J., Barre, A., Verhaert, P., Rouge, P., und Peumans, W. J.: 1996, Molecular cloning of the mitogenic mannose/maltose-specific rhizome lectin from *Calystegia sepium*, *FEBS Lett* **397(2-3)**, 352
- Van Damme, E. J., Lannoo, N., Fouquaert, E., und Peumans, W. J.: 2004b, The identification of inducible cytoplasmic/nuclear carbohydrate-binding proteins urges to develop novel concepts about the role of plant lectins, *Glycoconj J* **20(7-8)**, 449
- Van Damme, E. J., Zhang, W., und Peumans, W. J.: 2004c, Induction of cytoplasmic mannose-binding jacalin-related lectins is a common phenomenon in cereals treated with jasmonate methyl ester, *Comm Appl Biol Sci, Ghent University* **69(1)**, 23
- Van Loon, L. C. und Van Strien, E. A.: 1999, The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins, *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55(2)**, 85, Review AUG
- Veske, A., Nilsson, S. E., und Gal, A.: 1997, Characterization of canine rod photoreceptor cGMP-gated cation channel alpha-subunit gene and exclusion of its involvement in the hereditary

- retinal dystrophy of Swedish Briards, *Gene* **202(1-2)**, 115
- Voet, D. u. J. G.: 1994, *Biochemie*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
- Washida, H., Wu, C. Y., Suzuki, A., Yamanouchi, U., Akihama, T., Harada, K., und Takaiwa, F.: 1999, Identification of cis-regulatory elements required for endosperm expression of the rice storage protein glutelin gene GluB-1, *Plant Mol Biol* **40(1)**, 1
- Wasternack, C. und Hause, B.: 2002, Jasmonates and octadecanoids: Signals in plant stress responses and development, *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Vol 72 **72**, 165
- Westhoff, P., Jeske, H., Jürgens, G., Kloppstech, K., und Link, G.: 1996, *Molekulare Entwicklungsbiologie. Vom Gen zur Pflanze.*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Williams, C. E., Collier, C. C., Nemacheck, J. A., Liang, C., und Cambron, S. E.: 2002, A lectin-like wheat gene responds systemically to attempted feeding by avirulent first-instar Hessian fly larvae, *J Chem Ecol* **28(7)**, 1411
- Xu, Y. Z., You, R. L., und Wu, N. H.: 2004, Structural analysis and identification of cis-elements of rice osRACD gene, *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **36(3)**, 191
- Yamaguchi-Shinozaki, K. und Shinozaki, K.: 1994, A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress, *Plant Cell* **6(2)**, 251
- Yang, W. C., Ye, D., Xu, J., und Sundaresan, V.: 1999, The SPOROCTELESS gene of *Arabidopsis* is required for initiation of sporogenesis and encodes a novel nuclear protein, *Genes Dev* **13(16)**, 2108
- Zhang, W., Peumans, W. J., Barre, A., Astoul, C. H., Rovira, P., Rouge, P., Proost, P., Truffa-Bachi, P., Jalali, A. A., und Van Damme, E. J.: 2000, Isolation and characterization of a jacalin-related mannose-binding lectin from salt-stressed rice (*Oryza sativa*) plants, *Planta* **210(6)**, 970
- Zhu, K. Y., Huesing, J. E., Shade, R. E., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M., und Murdock, L. L.: 1996, An insecticidal N-acetylglucosamine-specific lectin gene from griffonia simplicifolia (Leguminosae), *Plant Physiology* **110(1)**, 195, JAN

Abbildungsverzeichnis

2.1. Schema der Inversen PCR	19
2.2. Prinzip der Walk PCR	20
2.3. Sequenz des Adapters und der Primer Ap1 und AP2.	21
2.4. Versuchsanordnung zur Isolierung der IWF	32
3.1. Hypothetische Struktur des HL#2-Genes nach Menhaj, 1998	46
3.2. cDNA-Sequenzen von HL#2 und Horcolin mit den Bindungstellen der Primer zur Isolierung der genomischen Klone	46
3.3. Isolierung der Gene für HL#2 und Horcolin	47
3.4. Sequenzen der Introns von HL#2 und Horcolin	48
3.5. Genkarten für HL#2 und Horcolin	49
3.6. Vorgehensweise zum Herstellen einer Partiellen Genbank	50
3.7. Inverse PCR	51
3.8. Ergebnisse der PCR des GenomeWalk™ mit anschließender Klonierung	53
3.9. Sequenzen der Klone #2 und #3 für die Upstream-Region von Horcolin	54
3.10. Sequenz des Klones #8 für die Upstream-Region von HL#2	55
3.11. Southern Blot für Horcolin	57
3.12. Aligment	58
3.13. Dirigent- und Jacalin-like Lektin-Domänen in der Proteinfamilie	59
3.14. Phylogenetischer Stammbaum	60
3.15. Schema der Klonierung der Upstream-Regionen von HL#2 und Horcolin in den Vektor pe35AscIoptRed	64
3.16. Primerbindungsstellen zur Klonierung der Upstream-Regionen der Gene von HL#2 und Horcolin in den Vektor pe35AscIoptRed.	65
3.17. Klonierung der Upstream-Regionen von HL#2 und Horcolin	66
3.18. Transiente Expression von DsRed unter der Kontrolle verschiedener Promotoren	67
3.19. Expression des Horcolin-Genes unter Salzbehandlung	69

Abbildungsverzeichnis

3.20. Expression des HL#2-Genes nach Verwundung	69
3.21. Isolierung der IWF mit verschiedenen rpm-Werten	71
3.22. Kontrollen zur Isolierung der IWF aus Gerstenblättern und Koleoptilen	72
3.23. Untersuchung der genomischen Sequenzen von HL#2 und Horcolin mit dem Programm PSORT	73
3.24. Übersicht über die klonierten GFP-Konstrukte	74
3.25. Überprüfung der GFP-Fusionskonstrukte durch Sequenzierung	76
3.26. Transiente Expression der GFP-Fusionsproteine	77
3.27. Fluoreszenz in gestresstem Gewebe	78
3.28. Nachweis der hypothetischen Leadersequenz von HL#2 in der RNA	79
3.29. Zur Herstellung des horcolinspezifischen Antikörpers verwendete Peptidsequenz	80
3.30. Qualität des Peptid-Horcolin-Antikörpers	81
3.31. Vergleich der verschiedenen Antikörper gegen HL#2 und Horcolin	82
3.32. Bindungsfähigkeit von HL#2 und Horcolin an verschiedene Zucker	83
3.33. Proteaseverdau von HL#2 und Horcolin	84
3.34. Bestimmung der Quartärstruktur des Horcolin durch Gelfiltration	86
3.35. Vergleich der Proteine aus IWF und Guttationsflüssigkeit	88
3.36. Massenspektren der beiden GLP-Banden der IWF	89
3.37. Expression der HvGLPs in der IWF	90
3.38. 2D-Gelelektrophorese der Proteine aus IWF und Guttationsflüssigkeit	92
3.39. Konzentration von PRQ in IWF und Guttation	94
4.1. Zuckerbindungsdomänen der Lektine	111
A.1. Vollständige Sequenz von HL#2	135
A.2. Vollständige Sequenz von Horcolin	136
A.3. Genkarte des Vektors pBluescript SK	138
A.4. Genkarte des Vektors pGFP	138

Tabellenverzeichnis

2.1. Agarosekonzentrationen und die jeweiligen Fragmentlängen-Trennbereiche	16
2.2. Verwendete Primer	18
2.3. Parameter für den Beschuss verschiedener Pflanzenarten des Particle Bombardment	26
2.4. Filtersysteme zum Nachweis der Reporterproteine	26
2.5. Verwendete Antikörper	42
3.1. "Cis-Acting Regulatory Elements" in den Upstream-Regionen der Gene von HL#2 und Horcolin	63
4.1. Unterschiede der stressregulierten Expression von HL#2 und Horcolin	104
A.1. URL-Adressen der verwendeten Online-Programme und Datenbanken	134
A.2. Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeter bzw. hergestellter Plasmide	137
A.3. Ein- und Dreibuchstaben-Code für Aminosäuren	139

A. Anhang

Tabelle A.1.: URL-Adressen der verwendeten Online-Programme und Datenbanken.

Programm	URL
ClustalW	http://www.ebi.ac.uk/clustalw/
EMBL	http://www.ebi.ac.uk/embl/
ESPrict 2.2	http://prodes.toulouse.inra.fr/ESPrict/cgi-bin/ESPrict.cgi
Expasy	http://us.expasy.org/tools/
GABI	http://www.gabi.de/gabineu/homeflash.html
GenscanW	http://genes.mit.edu/cgi-bin/genscanw.cgi
Multialign	http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
NCBI BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
NetNGlyc 1.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/
NetOGlyc 3.1	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/
PlantCARE	http://intra.psb.ugent.be:8080/PlantCARE/
Proscan	http://bimas.dcert.nih.gov/cgi-bin/molbio/proscan
Proteom Analyst	http://www.cs.ualberta.ca/bioinfo/PA
PSORT	http://psort.nibb.ac.jp/form.html

A. Anhang

```

LOCUS      AY336086                1203 bp    DNA        linear    PLN 20-JUL-2003
DEFINITION Hordeum vulgare high light protein (HL#2) gene, complete cds.
ACCESSION  AY336086
VERSION    AY336086.1  GI:32765706
KEYWORDS   .
SOURCE     Hordeum vulgare
  ORGANISM Hordeum vulgare
            Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
            Spermatophyta; Magnoliophyta; Liliopsida; Poales; Poaceae;
            Pooideae; Triticeae; Hordeum.
REFERENCE  1 (bases 1 to 1203)
  AUTHORS  Rupprecht, I. and Kloppstech, K.
  TITLE    Hordeum vulgare high light protein (HL#2) gene
  JOURNAL  Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 1203)
  AUTHORS  Rupprecht, I. and Kloppstech, K.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL  Submitted (04-JUL-2003) Institute of Botany, University of
            Hannover, Herrenhaeuser Str. 2, Hannover 30419, Germany
FEATURES   Location/Qualifiers
  source   1..1203
            /organism="Hordeum vulgare"
            /mol_type="genomic DNA"
            /db_xref="taxon:4513"
  gene   375..1203
            /gene="HL2"
            /note="HL#2"
  mRNA   join(375..425,529..741,831..1203)
            /gene="HL2"
            /product="high light protein"
  CDS   join(423..425,529..741,831..1097)
            /gene="HL2"
            /note="HL#2; putative lectin"
            /codon_start=1
            /product="high light protein"
            /protein_id="AAP87359.1"
            /db_xref="GI:32765707"
            /translation="MSSSPVVKLGFWGGDDGVAHDITVAPQRLESITIRWGVLDLSVA
            FTYRDKDNQLHTAGPWGGAGGKEDPDTITLGPSEYITQVDWSVGFPLKEIEHCITS
            LKFVTNQASYPFGYAVDSTHYSPLVNLNNGSVVGMFGRAGDYLHAIGFYVLPETSLAS
            "
ORIGIN
1  aatatttcga aacgaaggtg tttgtggtct cacacgaagg cacggcccgg cagtagctac
61  gtagcgtggt ttcaaactca gtcgccacca tttttggagg ccactagtta attaagcaac
121  gttacaaaaa cgtcagagtc ggggaattata ttctgcgtcc aactaattaa atggcagagc
181  aaatcctcat aaatcgaagt tagccaagag acccacgaga caaggaggat acacatgcat
241  ggatgagttg gaggacacgt ggaggctgcc cgtccaccgg agccaactac tctcgtgtgt
301  tttgcatatg aaattccttt ttttttctcg cgtgagtttg catataaaat tcgtacaagt
361  gcctgcctgg tcagctcatc agccctactc tccatctcgg cgcttcgttg tgagttaacg
421  aaatggtccg tccttactcc ggctcccatt catgagctcc atgatatgct gtgctagcat
481  cttcttcacg ggactcatgg caggttgctg tttttgtgtg gcgtgcagag cagcagcccg
541  gtggtgaagc tggggccgtg ggggggcgac gacggggtgg cccacgacat cacggtggcg
601  ccgcagcggc tggagagcat caccatccgc tggggcaagg tcctcgactc cgtcgcttc
661  acctacaggg acaaggaaa ccagctgcac accgccgggc cctggggcgg cggccgaggg
721  gagaaggaag acccggacac ggtgagcgat cgatccggtc caggcggggc cctcttgtca
781  tcgactcctg ttcttttctt ggtctgatgt atgcacatgt gtatctacag atcacgttgg
841  gccctcggga gtacataact caggtcgact ggtcggtggg accgttcaag ctcaaggaga
901  tcgagcactg catcacctcg ctcaagtttg tgaccaacca ggccagctac ggcccgttcg
961  ggtacgcggt ggacagcacg cactacagcc tgcccgtgct caacaacggc agcgtcgtcg
1021  gcatgttcgg ccgcgccgga gactacctcc acgccatcgg ctctacgtc ctcccagaga
1081  ccagctctgc atcttgagtt cccatgtgca ttgatcctgt ccattgttta gcatttaaaa
1141  taaatggttc gtcttgattt ttgaatatta cgagttcctt taataaatgg tttgtcttga
1201  tta

```

Abbildung A.1.: Vollständige Sequenz von HL#2.

A. Anhang

LOCUS **AY770690** 1338 bp DNA linear PLN 02-NOV-2004
DEFINITION Hordeum vulgare **Horcolin** gene, complete cds.
ACCESSION AY770690
VERSION AY770690.1 GI:54778541
KEYWORDS .
SOURCE Hordeum vulgare
ORGANISM Hordeum vulgare
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
 Spermatophyta; Magnoliophyta; Liliopsida; Poales; Poaceae;
 Pooideae; Triticeae; Hordeum.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1338)
AUTHORS Rupprecht, I. and Kloppstech, K.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (04-OCT-2004) Institute of Botany, University of
 Hannover, Herrenhaeuser Str. 2, Hannover 30419, Germany
FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1338
 /organism="Hordeum vulgare"
 /mol_type="genomic DNA"
 /db_xref="taxon:4513"
 mRNA join(<427..429,584..784,953..>1189)
 /product="horcolin"
 CDS join(427..429,584..784,953..1189)
 /note="coleoptile lectin"
 /codon_start=1
 /product="horcolin"
 /protein_id="AAV39531.1"
 /db_xref="GI:54778542"
 /translation="MSKPVKIGPWGGNGGSEKRDVQPKPIRMVSMVTSSGAIVDAIAFT
 YVGTDNVQHSSGIKWGGTGGTEDITINLDATNYVTEISGTVGKFGTDDIVTSLKIITSK
 GVTRTYGSGTGIPFRVPLDGGKIAGFFGRAGAFDLAIGFYITP"
ORIGIN
 1 tttaaattac caagcattgc atggagacaa ctgtcaatag aatctagtaa agcaaattga
 61 actgggatta atcattagtc tttataactg ctaaattttt agaagagttc acatggacc
 121 gttaccacaa tgttacaaga atgatattca gtaaaatgtg cctgtaatga gattgctacc
 181 aagttttaga catgtctaata tagacaagaa tgggtgtgcat taattaatct tatcttaca
 241 cagtctcaat gacagtgagc ggtgtactac ttttatgctt atcaactatc gggagctgag
 301 gtgtacgtac ggctatataat aggtggcttt cgatcgatca acgaagccat ccagcaaact
 361 aagtcactct tctagaccaa tacataggtt gctgccttgg gtggatttgg taaagcagga
 421 gccaaaatgg tatgtgtttg atccacttat gtagttctta gttttctttt cttcaaaaga
 481 gtggacgagat ttgactaaat atggaatggt atgtgtttag atattgtcaa tatcttcaat
 541 tttggagtag attgatggta atactctcct ctaattaatt cagagcaagc ctgtgaagat
 601 tgggccatgg ggtgggaatg gtggcagcga gcgtgatgac cagccaaagc ccatccgtat
 661 ggtagtatg accgtcagta gcggagctat cgtagcagct attgcattca cctatgtggg
 721 caccgataac gttcaacact cttccggcat caagtggggg ggcactggcg gcacagaaga
 781 tacgggtgctg ggaatgttg tttcaaaata tttttattt cttgcactat actatgttga
 841 tcatcggttt tgattattgt tttatctgga tggctagggt tagtagttct cctacatgta
 901 ctcatataca aacctcttac atacatgacc tgatgattgc catctcttgc agattaatct
 961 agacgctacg aactacgtga ccgaaatctc cgggacagtg ggtaaatttg ggaccgacga
 1021 catcgtcacg tctcttaaaa ttatcacctc caaggggggt accaggacat acggctcagg
 1081 tacgggaatt ccattccgag tcccgggtgct tgacgggggt aagatcgccg gcttcttggg
 1141 acgggctggt gctttcctgg acgcgattgg gttctacatt actccatgaa tggttggtg
 1201 atacgggccg gccacctctc ctctggaaga aggaggtggc gtagtactac cggcagcgtc
 1261 tgcttgctag aataaataaa cttgtgaagt gccttacatg gcacttttagc atatgtgtgg
 1321 gataatgtgt gacgctgc

Abbildung A.2.: Vollständige Sequenz von Horcolin.

Tabelle A.2.: Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeter bzw. hergestellter Plasmide. Alle Plasmide liegen sowohl als säulengereinigte Plasmidpräparationen, als auch als Glycerinkulturen in *E. coli* DH5 α vor.

Nr.	Name des Klones	Markerprotein	Plasmidgröße	Insertionsort	Insertgröße	Selektionsmarker
1	pBluescript SK (+/-)	-	2958 bp	-	-	Amp ^R 100
2	HL#2-cDNA in pBluescript SK (+/-)	-	3604 bp	<i>EcoRI</i>	646 bp	Amp ^R 100
3	Horcolin-cDNA in pTAdv	-	3815 bp	<i>EcoRI</i>	665 bp	Amp ^R 100
4	Walk-Klon #2 in pBluescript SK (+/-)	-	3706 bp	<i>SmaI</i>	748 bp	Amp ^R 100
5	Walk-Klon #3 in pBluescript SK (+/-)	-	3756 bp	<i>SmaI</i>	798 bp	Amp ^R 100
6	Walk-Klon #4 in pBluescript SK (+/-)	-	3858 bp	<i>SmaI</i>	900 bp	Amp ^R 100
7	Walk-Klon #8 in pBluescript SK (+/-)	-	3869 bp	<i>SmaI</i>	911 bp	Amp ^R 100
8	pe35AscIoptRed nach Maß	DsRed	4705 bp	-	-	Amp ^R 100
9	pe35AscIoptRed ohne Promotor	DsRed	3930 bp	-	-	Amp ^R 100
10	HL#2 Promotor in pe35AscIoptRed	DsRed	4149 bp	<i>EcoRI</i> / <i>BamHI</i>	219 bp	Amp ^R 100
11	Horcolin Promotor in pe35AscIoptRed	DsRed	4329 bp	<i>EcoRI</i> / <i>BamHI</i>	399 bp	Amp ^R 100
12	pGFP-N nach Hänsch	GFP	5000 bp	-	-	Amp ^R 100
13	pGFP-C nach Hänsch	GFP	5000 bp	-	-	Amp ^R 100
14	HL#2-cDNA in pGFP-N	GFP	5500 bp	<i>NcoI</i> / <i>BgIII</i>	500 bp	Amp ^R 100
15	HL#2-cDNA in pGFP-C	GFP	5500 bp	<i>NcoI</i> / <i>BgIII</i>	500 bp	Amp ^R 100
16	Leader in pGFP-N	GFP	5125 bp	<i>NcoI</i> / <i>BgIII</i>	125 bp	Amp ^R 100
17	Leader in pGFP-C	GFP	5125 bp	<i>NcoI</i> / <i>BgIII</i>	125 bp	Amp ^R 100
18	rbspGFP	GFP		?	?	Amp ^R 100

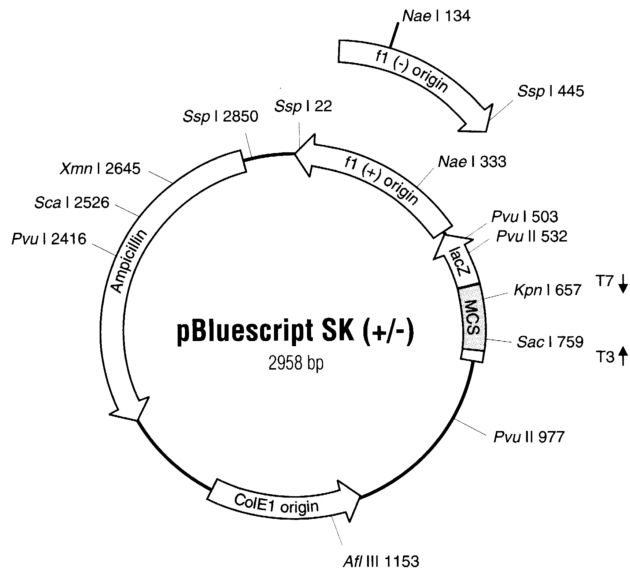


Abbildung A.3.: Die Genkarte des Klonierungsvektors pBluescript SK von STRATAGENE.

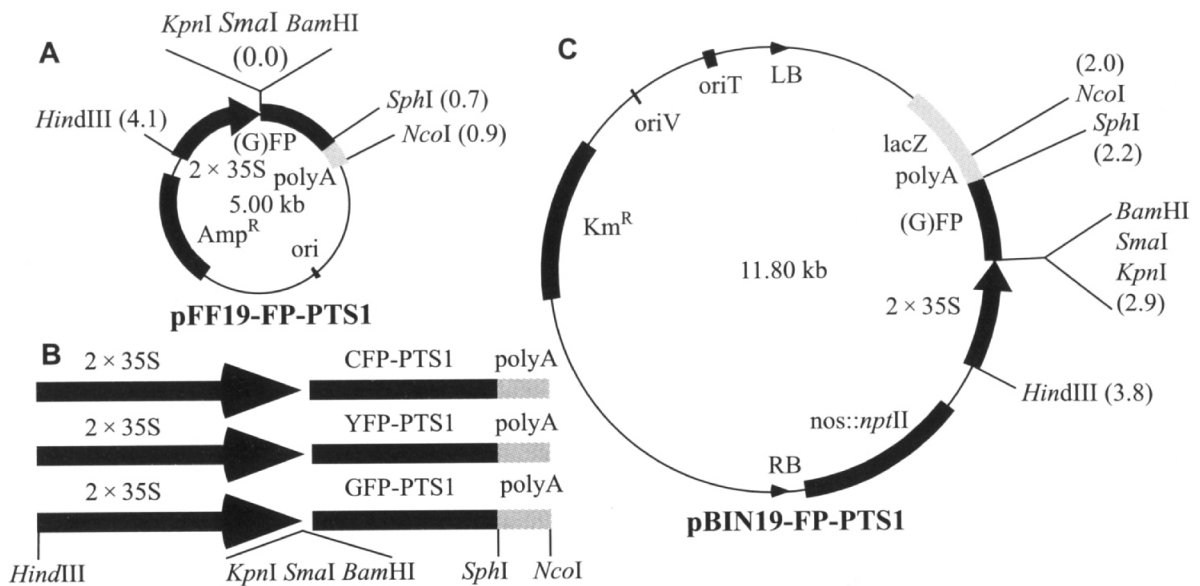


Abbildung A.4.: Die Genkarte des Klonierungsvektors GFP von Hänsch (Nowak et al., 2004).

Tabelle A.3.: Ein- und Dreibuchstaben-Code für Aminosäuren

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

Danksagung

Zuerst und vor allem gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Klaus Kloppstech für seine ständige Bereitschaft zur Hilfestellung und Diskussion, seine wertvollen Ratschläge und seine herzliche Art während der Zeit, die ich am Institut für Botanik mit Diplom- und Doktorarbeit verbracht habe, sowie für die Bereitstellung des Themas und die Korrekturen meiner Arbeiten.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Achim Gau für seine Hilfsbereitschaft bei allen Tücken des Laboralltages zu allen Zeiten und Unzeiten, die Korrektur meiner Arbeit und die vielen hilfreichen Diskussionen.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Kloppstech danke ich neben ihrer Hilfsbereitschaft und Unterstützung vor allem für die freundliche und angenehme Atmosphäre im Labor. Dr. Ingo Grunwald danke ich für die Einarbeitung in die Thematik des HL#2 und Horcolin.

Frau Dr. habil. Jutta Papenbrock vom Institut für Botanik der Universität Hannover und Herrn Dr. Haensch vom Institut für Pflanzenbiologie der TU Braunschweig gilt mein Dank für die Bereitstellung der GFP-Vektoren, bei Herrn Prof. Legrand bedanke ich mich für Antikörper und das rekombinante PR-Q.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Maiß und Herrn Dr. Dietrich vom Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz der Universität Hannover für die Bereitstellung des DsRed-Klons, Frau Ilona Rolfes für Ihre freundliche Einführung in die Methode des Particle Bombardment.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer unterstützt haben und vor allem meiner besseren Hälfte, ohne dessen Hilfe, Ratschläge, Kritik und Unterstützung diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre.