Die Phosphorylierung von Signalproteinen bei der Elicitierung der Alkaloidbiosynthese in Eschscholzia californica

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften
der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
von
Herrn Diplompharmazeut Marcus Buchheim
geboren am 29. August 1977, in Frankfurt (Oder)

Gutachter: Prof. Dr. Werner Roos, Halle (Saale)
 Gutachter: Prof. Dr. Klaus Humbeck, Halle (Saale)
 Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Kreis, Erlangen

Halle (Saale), den 07.06.2012

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Mechanismen der Pathogenabwehr in Pflanzen	1
1.1.1 Mechanismen der Pathogenerkennung	1
1.1.2 Mechanismen der Signaltransduktion	3
1.1.3 Bildung von Phytoalexinen	5
1.2 Signalmechanismen für die Induktion der Phytoalexin-Biosynthese in Eschscholzia californica	7
1.3 Biosynthese der Benzo[c]phenanthridin-Alkaloide in Eschscholzia californ	ica10
1.4 "Moonlighting"- Proteine	13
1.5 Zielstellung der Arbeit	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Arbeiten mit Suspensionskulturen von Eschscholzia californica	15
2.1.1 Kultivierung der suspendierten Zellen	15
2.1.2 Auslösung der Alkaloid-Biosynthese	15
2.1.3 Bestimmung des Alkaloidzuwachses	16
2.2 Proteinbiochemische Methoden	17
2.2.1 Proteinextraktion	17
2.2.2 Proteinbestimmung	17
2.2.2.1 Proteinbestimmung mithilfe von 2D-Quant	17
2.2.2.2 Proteinbestimmung mit BCA-Assay	18
2.2.3 Anreicherung der Phosphoproteine	19
2.2.3.1 Anreicherung der Phosphoproteine mittels MOAC	19
2.2.3.2 Anreicherung der Phosphoproteine mittels "PhosphoProtein Purifi Kit" (Qiagen, Hilden)	
2.2.4 SDS-Gel-Elektrophorese	20
2.2.5 2D-Gel-Elektrophorese	21
2.2.5.1 Erste Dimension: IEF	22
2.2.5.2 Zweite Dimension: SDS-PAGE	23
2.2.6 Proteintransfer auf NC-Membran	24
2.2.7 Immundetektion spezieller Proteine auf Western Blots	25
2.2.8 Anfärbung der Proteine mithilfe der Fluoreszenzfarbstoffe "ProQ°-Diamond" und "Sypro°-Ruby"	25

	2.2.8.1 Fluoreszenzfärbung der PA-Gele	. 26
	2.2.8.2 Fluoreszenzfärbung der NC-Blotmembranen	. 26
	2.2.8.3 Optimierung der Färbe- und Detektionsprozedur	. 27
	2.2.9 Visualisierung und Digitalisierung der gefärbten Gele und Blots	. 29
	2.2.10 Analyse der durch 2D-Elektrophorese getrennten Proteinmuster mit "Delta2D 3.6"	. 30
	2.2.11 Identifizierung von Proteinspots mithilfe der Massenspektrometrie	. 37
	2.2.12 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	. 40
2.	3 Molekularbiologische Methoden	. 40
	2.3.1 Nukleinsäureextraktion	. 40
	2.3.1.1 DNA-Extraktion aus Eschscholzia californica	. 40
	2.3.1.2 DNA Extraktion aus <i>Escherichia coli</i>	. 41
	2.3.1.3 DNA Extraktion aus Agarose Gel Matrix	. 42
	2.3.1.4 RNA Extraktion aus <i>Eschscholzia californica</i> Keimwurzeln	. 42
	2.3.2 DNA Synthese mittels Reverser Transkriptase Reaktion (RT-Reaktion)	. 43
	2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	. 43
	2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	. 43
	2.3.5 Agarose-Gel-Elektrophorese	. 44
	2.3.6 cDNA-Bank-screening	. 45
	2.3.7 DNA Sequenzierung	. 47
2.	4 Methodenentwicklung: Assay zum gene-silencing mittels RNAi im Keimwurzelsystem	. 47
	2.4.1 Die Herstellung von RNAi-Vektoren zum silencing von GAPDH	. 47
	2.4.1.1 Klonierung mithilfe des GATEWAY™ - Systems	. 47
	2.4.1.2 Kultivierung der <i>Escherichia coli</i> Zellen	. 49
	2.4.1.3 Transformation der <i>Escherichia coli</i> Zellen	. 50
	2.4.2 Anzucht und Transformation von <i>Eschscholzia californica</i> Keimwurzeln	. 51
	2.4.2.1 Kultivierung und Anzucht der Keimwurzeln	. 51
	2.4.2.2 Biolistische Transformation der Keimwurzeln	. 51
	2.4.3 Überprüfung des Transformationserfolges und der Wirkung auf die Alkaloidbiosynthese	. 52
	2.4.3.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen	. 52
	2.4.3.2 Analyse transformierter Keimwurzeln mittels PCR	. 53

	2.5 Liste der verwendeten Chemikalien	55
	2.6 Liste der verwendeten Lösungen und Puffer	56
3 E	rgebnisse und Diskussion	61
	3.1 Validierung von Methoden zur Generierung artifizieller pH-shifts	61
	3.1.1 Die Nigericin-Methode	61
	3.1.2 Die Puffer-Methode	62
	3.2 Nachweis selektiver Proteinphosphorylierungen als Element des Signaltransf zur Auslösung der Alkaloidbiosynthese	
	3.2.1 Immunologischer Nachweis der Proteinphosphorylierung	64
	3.2.2 Nachweis von Proteinphosphorylierungen durch Fluoreszenzfärbung	66
	3.3 Änderung des Phosphoproteinmusters nach Elicitorkontakt oder pH-shifts	66
	3.4 Identifizierung ausgesuchter Phosphoproteine	72
	3.4.1 Anreicherung der Phosphorproteine vor der 2D-Trennung	72
	3.4.2 Aufladen der maximal möglichen Proteinmenge auf die IEF-Streifen und damit auf die Gele	
	3.4.3 "Poolen" ausgeschnittener Spots aus mehreren Gelen	75
	3.4.4 Die Identifizierung von pE1/E50u1	76
	3.4.5 Die Identifizierung von <i>pE50u1</i>	80
	3.5 Die Rolle der GAPDH im Elicitierungsprozess	83
	3.5.1 Die Funktion von GAPDH	83
	3.5.2 Gen-Silencing-des GAPDH-Gens in Eschscholzia californica	85
	3.5.2.1 Herstellung eines geeigneten RNAi-Vektors	86
	3.5.2.2 Überprüfung des Transformationserfolges	88
	3.5.3 Konsequenzen des silencing von GAPDH für die Alkaloidbiosynthese	90
4 Z	usammenfassung und Ausblick	95
5 Li	teraturverzeichnis	97
6 V	erzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Anglizismen	.108
7 V	erzeichnis der Abbildungen und Tabellen	.111
3 A	nhang	.114
	8.1 Danksagung	.114
	8.2 Eidesstattliche Erklärung	.114
	9.2 Laborelauf	115

1 Einleitung

1.1 Mechanismen der Pathogenabwehr in Pflanzen

Pflanzen kommen im Laufe ihres Lebens mit einer großen Zahl anderer Organismen in Kontakt, von denen ein beachtlicher Teil die Entwicklung und das Überleben der Pflanze z.T. erheblich beeinträchtigen kann. Auch wenn Pflanzen nicht über ein den Tieren vergleichbares adaptives Immunsystem verfügen, so haben sie doch im Laufe der Evolution ein nahezu ebenso komplexes und nicht minder effektives System der Pathogenerkennung, Signaltransduktion und Abwehrreaktion entwickelt (Nürnberger, et al., 2004; Postel, et al., 2009). Für die meisten Mikroorganismen stellen Pflanzen, u.a. aufgrund konstitutiver Abwehrmechanismen (wie z.B. die auf der Zellwand aufgelagerte Cuticula und konstitutive antimikrobielle Pflanzenstoffe), keinen Wirt dar. Zur Abwehr der spezifisch pflanzenpathogenen Mikroorganismen und Viren ist häufig die Aktivierung spezieller Reaktionen notwendig.

Im Laufe der Coevolution von Pathogen und Wirt haben sich komplementäre Avirulenz (*Avr*)- Resistenz (*R*)- Gensysteme entwickelt. Sind in Pathogen und Wirt jeweils korrespondierende *Avr*-Gene bzw. *R*-Gene präsent, so kommt es zu keiner (bzw. einer nur sehr schwachen) Infektion durch das Pathogen - die Pflanze ist resistent. Man spricht auch von einer inkompatiblen Interaktion. Sind jedoch entweder *Avr*-Gene oder *R*-Gene inaktiv oder fehlen, führt das zu einer erfolgreichen Infektion (kompatible Interaktion). Resistenz-Gene und ihre Homologen gehören zu den am weitesten verbreiteten Genen in pflanzlichen Genomen (Meyers, et al., 1999).

Die wohl bekannteste pflanzliche Abwehrreaktion ist die Hypersensitive Reaktion (HR), die meist als ein lokal begrenztes Absterben von infizierten Zellen beobachtet wird, was die weitere Ausbreitung des Pathogens verhindert oder stark verlangsamt. Diese Reaktion ist das Ergebnis eines komplexen Zusammenspiels von:

- lokalen Wandverdickungen (Papillen) u.a. durch Vernetzung Prolin-reicher Proteine (Grant, et al., 1999; Van Breusegem, et al., 2001; Nürnberger, et al., 2004),
- die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wie beispielsweise H₂O₂, O₂ oder Singulett-Sauerstoff (siehe 1.1.2),
- Apoptose-Mechanismen, analog denen tierischer Zellen (Lam, et al., 2002).

Eine pflanzentypische Abwehrreaktion ist die Expression der Biosynthese antimikrobieller Sekundärstoffe, der sog. Phytoalexine (siehe 1.1.3).

1.1.1 Mechanismen der Pathogenerkennung

Wichtige Vorausetzung für die Aktivierung der nicht-konstitutiven Abwehrreaktionen ist die spezifische Erkennung des Pathogens durch die Pflanze. Mit dem Pathogen assoziierte molekulare Strukturen (PAMPs: "pathogen associated molecular pattern") werden von der Pflanze durch entsprechende Rezeptoren (PRRs: "pattern recognition receptor") erkannt. Definiert sind PAMPs als für das Pathogen essentielle, strukturell konservierte und pathogenspezifische (also nicht im Wirt vorkommende) Strukturen. Sie

1 Einleitung

stellen (im Gegensatz zu den sehr spezifischen Avr-Genprodukten, siehe 1.1) unspezifische, d.h. allgemeine oder generelle Elicitoren dar. Zu den von PRRs erkannten PAMPs gehören u.a. Lipopolysaccharide (LPS) (Zeidler, et al., 2004; Newman, et al., 2002), das Strukturprotein Flagellin (Felix, et al., 1999), Glykoproteine (Angelova, et al., 2006) oder Peptidoglykane (Gust, et al., 2007). Solche vom Pathogen selbst stammenden Strukturen werden auch als MAMPs ("microbe associated molecular pattern") bezeichnet. Daneben können auch wirtseigene Moleküle (wie durch mikrobielle Lyse freigesetzte Zellwandoligomere) Auslöser von Abwehrreaktionen sein (Ebel, et al., 1998; Aziz, et al., 2007). Diese werden unter der Bezeichnung DAMPs ("danger associated molecular pattern") zusammengefasst.

Einer der ersten in Pflanzen identifizierte Pathogen-Rezeptoren ist der Flagellinrezeptor FLS2 ("flagellin sensitiv 2") aus *Arabidopsis thaliana*. Er gehört zur Klasse der RLKs ("receptor like kinase") und besteht aus einem N-terminalen Signalpeptid, einer extrazellulären LRR ("leucine rich repeat")-Domäne, einer Transmembran- sowie einer cytoplasmatischen Kinasedomäne (Gómez-Gómez, et al., 2000) und weist somit erstaunliche Ähnlichkeit zu tierischen PRRs wie beispielsweise dem TOLL-Rezeptor aus *Drosophila* (Lemaitre, et al., 1996) bzw. den TOLL-like Rezeptoren (TLR) der Wirbeltiere auf (Kiyoshi, et al., 2005).

FLS2 bindet über die LRR Domäne ein 22 Aminosäuren langes Motiv (flg22) bakteriellen Flagellinproteins. Innerhalb weniger Minuten kommt es dann zu einer Dimerisierung mit BAK1 ("BRI1 associated receptor kinase") einer weiteren LRR-RLK, die die Funktion von FLS2 positiv reguliert. BAK1 Mutanten zeigen eine normale flg22-Bindung, aber anormale Flagellin-induzierte Reaktionen (Chinchilla, et al., 2007).

Die meisten der bisher gefundenen RLKs gehören zur LRR-Klasse. Beispielsweise besitzen 216 der 417 in *Arabidopsis thaliana* identifizierten RLKs eine LRR-Domäne (Diévart, et al., 2003). Aber auch in einer Reihe anderer Pflanzenspezies, wie z.B. Reis (Xa21 (Song, et al., 1995)), Tomate (LeFLS2 (Robatzek, et al., 2007)) oder Kartoffel (StLRPK1 (Wu, et al., 2009)), wurden LRR-RLKs identifiziert.

Während die Erkennung von PAMPs in Pflanzen extrazellulär erfolgt, können Avr-Genprodukte, die vom Pathogen beispielsweise über das TTSS ("type III secretion system") in das Cytoplasma gelangen, dort von pflanzlichen R-Genprodukten erkannt werden (Boch, et al., 2009). Ein Beispiel hierfür ist die Erkennung des AvrPto-Produktes von Pseudomonas syringae durch eine in Tomate intrazellulär lokalisierte, Pto-codierte Serin/Threonin Kinase (Martin, et al., 1993; Sessa, et al., 2000). Aber auch die LRR-Rezeptoren spielen bei der intrazellulären Pathogenperzeption eine große Rolle. Die sogenannten NB ("nucleotid-binding") -LRR Gene bilden eine große Gruppe von pflanzlichen R-Genen. Zu diesen gehören das RPS2-Gen aus Arabidopsis thaliana (erkennt AvrRPt2 aus P. syringae pv. tomato) (Mindrinos, et al., 1994; Bent, et al., 1998), das Pita-Gen aus Reis (erkennt AvrPita aus Magnaporthe grisea) (Jia, et al., 2000), das L6-Gen aus Flachs (erkennt AvrL6 aus Melampsora lini) (Lawrence, et al., 1995) sowie das N-Gen aus Tabak (erkennt Replikase aus dem Tabakmosaikvirus) (Whitham, et al., 1994) um nur einige Beispiele zu nennen.

1.1.2 Mechanismen der Signaltransduktion

Signaltransduktionskaskaden verbinden über Signalproteine und sogenannte "second messenger" den Vorgang der Pathogenerkennung mit der Abwehrreaktion. Änderungen im Verteilungsmuster bestimmter Ionen (z.B. Ca²⁺ oder H⁺), die Produktion von ROS und Stickstoffmonoxid (NO) ebenso wie Phosphorylierungen im Zuge der Aktivierung von MAPK-Kaskaden gehören zu den prominentesten Ereignissen solcher Signalwege (Nürnberger, et al., 2001).

Ionenflüsse gehören zu den ersten messbaren Ereignissen nach Elicitorkontakt. In zahlreichen experimentellen Systemen wurde dabei ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, ein Efflux von K⁺- und Cl⁻-Ionen, sowie eine Alkalisierung des Außenmediums und Ansäuerung des Cytoplasmas festgestellt (Roos, 2000).

Es ist bereits seit einiger Zeit bekannt, dass in der Plasmamembran lokalisierte Calcium-kanäle auf verschiedene Elicitoren reagieren (Zimmermann, et al., 1997; Gelli, et al., 1997). Da Ca²⁺-Ionen auch in zahlreichen anderen Signalkaskaden (z.B. zur Öffnung und Schließung der Spaltöffnungen) eine Rolle spielen, ohne dass dabei eine Aktivierung der Pathogenabwehr erfolgt, sind offenbar für die korrekte zelluläre Interpretation des Ca²⁺-Signals seine Amplitude und Zeitdauer entscheidend. Moderate, länger anhaltende Anstiege des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels scheinen für die Pathogenabwehr typisch zu sein, weniger jedoch kurze oder oszillierende Signale (Nürnberger, et al., 2004).

Ähnlich verhält es sich mit transienten pH-shifts im Cytoplasma. Sie fungieren offenbar ebenfalls als intermediäres Signal der Pathogenabwehr (Roos, et al., 1998; Lapous, et al., 1998). Da der physiologische pH-Wert des Cytoplasmas in Pflanzenzellen einer präzisen Regulation unterliegt und durch mehrere Puffersysteme stabilisiert wird, erfolgen pH-shifts langsamer und haben eine geringere Amplitude als Ca²⁺-shifts (Viehweger, 2002). Aus diesem Grund sind wahrscheinlich cytosolische pH-shifts im Gegensatz zu Signaturen der Ca²⁺-Verteilung, erst einige Zeit später als "second messenger" charakterisiert worden (Sakano, 2001).

In einigen Testsystemen wurde gefunden, dass zur temporären Ansäuerung des Cytoplasmas, Protonen aus dem Außenmedium aufgenommen werden, was gleichzeitig zu dessen Alkalisierung führt. Jedoch müssen die Protonen zur Senkung des pH-Wertes des Cytoplasmas nicht in jedem Fall von außen aufgenommen werden. Für Zellkulturen von *Eschscholzia californica* ist gezeigt worden, dass diese Protonen aus der Vakuole stammen, und dass zur Auslösung der Phytoalexinbildung keine Alkalisierung des Außenmediums erforderlich ist (Roos, 2000). Ähnlich wie bei den Ca²⁺-Signalen ist auch bei den pH-shifts das räumliche und zeitliche Verteilungsmuster sowie das Ausmaß der Ansäuerung entscheidend für die Interpretation des Signals von der Zelle (Lapous, et al., 1998; Roos, et al., 2006).

Während über downstream-Ereignisse nach cytoplasmatischen H⁺-Peaks noch weitgehend Unklarheit herrscht, sind solche für Ca²⁺-transients z.T. sehr gut beschrieben. Neben einigen Phospholipasen (Munnik, et al., 1998) werden vor allem Ca²⁺-abhängige Kinasen (CDPK, "calcium dependent protein kinase") durch Ca²⁺-transients aktiviert.

1 Einleitung

CDPKs sind Ser/Thr Proteinkinasen die eine Ca²⁺-bindende "calmodulin like" Domäne besitzen. Sie spielen eine Rolle in vielen pflanzlichen Stoffwechselprozessen wie Wachstum und Entwicklung (Yoon, et al., 2006), Hormon-Antworten (Gargantini, et al., 2009) sowie in der Adaption von biotischem und abiotischem Stress (Freymark, et al., 2007). Während der Pathogenabwehr aktivieren CDPKs NADPH-Oxidasen durch Phosphorylierung der N-terminalen Region. Am besten untersucht sind RBOH-Enzyme ("respiratory burst oxidase homolog") (Kobayashi, et al., 2007), die Homologe zu den in Säugetieren vorkommenden NADPH-Oxidasen darstellen. RBOHs wurden in einer ganzen Reihe von Pflanzengenomen wie beispielsweise *Arabidopsis thaliana* (Torres, et al., 2005), *Oryza sativa* (Groom, et al., 1996), *Solanum lycopersicum* (Amicucci, et al., 1999), *Nicotiana tabacum* (Simon-Plas, et al., 2002) und *Nicotiana benthamiana* (Yoshioka, et al., 2003) gefunden. RBOH-Proteine sind in der Plasmamembran lokalisiert (Kobayashi, et al., 2006) und können außer durch Phosphorylierung zudem direkt durch Erhöhung der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration aktiviert werden (Sagi, et al., 2001).

RBOHs bewirken die *Bildung reaktiver Sauerstoffspezies* (ROS) wie H₂O₂ und O₂ durch Katalysierung der in Abb. 1-1 dargestellten Reaktion (Baker, et al., 1995). Die Dismutation der Sauerstoffradikale zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff kann dabei sowohl spontan ablaufen, als auch durch Superoxiddismutasen (SOD) katalysiert werden.

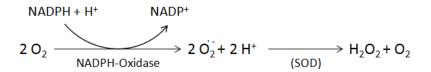


Abb. 1-1 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies nach Baker, et al., 1995.

Diese Produktion von ROS wird als "oxidative burst" (OB) bezeichnet und gliedert sich im typischen Fall in zwei Phasen: einen nach etwa 3 min einsetzenden kurzen Ausstoß von H_2O_2 , der nach etwa zwei bis drei Stunden von einer länger anhaltenden H_2O_2 -Ausscheidung gefolgt wird. Die ROS erfüllen in diesem Zusammenhang drei wichtige Funktionen: Zunächst einmal sind sie selbst direkt toxisch und können das eindringende Pathogen am Wachstum hindern. Gleichzeitig wird die pflanzliche Zellwand, durch oxidative Quervernetzung von Phenolen und Strukturproteinen verstärkt. Nicht zuletzt dienen ROS als Signalstoffe für die Auslösung weiterer Abwehrmaßnahmen wie der Biosynthese von Phytoalexinen (Yang, et al., 1997; Scheel, 1998; Bolwell, et al., 2002), beispielsweise über die Aktivierung von MAPK-Kaskaden.

MAPK ("mitogen activated protein kinase")-Kaskaden gehören zu den wichtigsten evolutionär konservierten Signalwegen, zur Transduktion extrazellulärer Stimuli in intrazelluläre Reaktionen in Eukaryoten. Dabei handelt es sich um Phosphorylierungskaskaden: MAPKS werden durch MAPK-Kinasen (MAPKKs) aktiviert, die ihrerseits von MAPKK-Kinasen (MAPKKKs) aktiviert wurden. In Pflanzen sind diese Kaskaden Bestandteil einer Reihe von Reaktionen auf biotischen und abiotischen Stress, Hormonen sowie Zellteilungs- und Entwicklungsprozessen (MAPK-Group, 2002). Allein das Genom von

Arabidopsis thaliana enthält 20 MAPKs, die von maximal 10 MAPKKs aktiviert werden können, welche wiederum unter Kontrolle von ungefähr 60 MAPKKKs stehen (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Im Zusammenhang mit Pathogenabwehrreaktionen ist gezeigt worden, dass exogen zugeführtes H₂O₂ zur Aktivierung von MAPKKKs wie beispielsweise "ANP1" oder "OMTK1" aus Arabidopsis thaliana bzw. Medicago sativa (Kovtun, et al., 2000; Nakagami, et al., 2004) und damit zur Auslösung entsprechender MAPK-Kaskaden führt. Jedoch gibt es bisher so gut wie keinen Hinweis darauf, dass diese Aktivierung durch H₂O₂ bedingte oxidative Modifikation der MAPKKKs selbst erfolgt. Es ist daher zu vermuten, dass in diesen Fällen noch wenigstens ein H₂O₂ Sensorprotein der Aktivierung vorangeschaltet ist (Hancock, et al., 2006).

Es existieren aber auch H₂O₂ unabhängige Signalwege, die MAPK-Kaskaden enthalten. Bindet beispielsweise der bereits unter 1.1.1 erwähnte Rezeptor FLS2 aus *Arabidopsis* das PAMP flg22, so wird die MAPKKK 'MEKK1' aktiviert, die ihrerseits die MAPKKs 'MKK4' und 'MKK5' phosphoryliert, was wiederum zur Aktivierung der MAPKs 'MPK3' und 'MPK6' führt. Am Ende dieses Signalwegs steht die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren 'WRKY29' und 'FRK1' die vermutlich über die Inaktivierung eines mutmaßlichen WRKY-Repressors durch Phosphorylierung erreicht wird (Asai, et al., 2002).

Es konnte gezeigt werden, dass in PAMP behandelten Petersilie-Zellen wenigstens eine der aktivierten MAPK in den Zellkern wandert (Ligterink, et al., 1997), wo sie an der OB-unabhängigen Aktivierung der Expression von Genen der Immunreaktion beteiligt ist (Kroj, et al., 2003), die wiederum ebenfalls von WRKY-Transkriptionsfaktoren reguliert werden (Eulgem, et al., 1999).

1.1.3 Bildung von Phytoalexinen

Neben der bereits beschriebenen, durch ROS und NO ausgelösten hypersensitiven Reaktion (HR), besitzen Pflanzenzellen mit der Fähigkeit zur Produktion von Phytoalexinen eine nicht selbst-zerstörende aber dennoch effektive Möglichkeit der antimikrobiellen Pathogenabwehr.

Als Phytoalexine fungieren niedermolekulare sekundäre Pflanzenstoffe verschiedenster Stoffklassen (z.B. Flavonoide, Terpenoide, Stilbenoide, Polyacetylene, Isoflavone oder Alkaloide) mit antimikrobiellen Eigenschaften (Paxton, 1981). Typisch für Phytoalexine ist die Induzierbarkeit ihrer Synthese, d.h. ihre Produktion bzw. Überproduktion erfolgt erst nach Infektion bzw. Elicitierung. Dies wird erreicht durch ein "Umschalten" der Genexpression zugunsten einer Bildung von Proteinen/Enzymen, die für die Phytoalexinsynthese notwendig sind. In Anbetracht der Toxizität der Phytoalexine ist zudem zu erwarten, dass außer den Biosyntheseenzymen Proteine zur Kompartimentierung, zum Transport und zur Detoxifikation coexprimiert werden müssen (Angelova, et al., 2010). Diese Genregulation erfolgt überwiegend mithilfe von Transkriptionsfaktoren. Allein im Genom von *Arabidopsis thaliana* wurden bisher 1922 solcher Transkriptionsfaktoren identifiziert, die 64 Familien zugeordnet werden können (Guo, et al., 2005), (http://datf.cbi.pku.edu.cn/; 15.11.2011). Obwohl nahezu alle großen Transkriptionsfaktor-Familien Mitglieder enthalten, die an der Regulation von Genen der Stressantwort

<u>1 Einleitung</u>

bzw. der Kontrolle des Sekundärstoffwechsels beteiligt sind, scheinen Mitglieder der AP2/ERF-, der bZIP- ("basic-domain leucine zipper"), der MYB-, sowie der WRKY-Familie bevorzugt an der Regulation des Sekundärstoffwechsels teilzuhaben (Singh, et al., 2002). Im Folgenden sollen Beispiele aus der AP2/ERF und der WRKY Familie angeführt werden. Die AP2/ERF Familie ist eine der größten Familien pflanzenspezifischer Transkriptionsfaktoren, mit mindestens 146 Vertretern in Arabidopsis thaliana (Riechmann, et al., 2000). Ihren Namen verdankt sie der Tatsache, dass ihr erster beschriebener Vertreter durch die Klonierung eines mutierten "apetala2"-Gens aus Arabidopsis thaliana gefunden wurde. Das in diesem Protein gefundene 59 AS-lange DNA-Bindungsmotiv wurde AP2-Domäne genannt (Jofuku, et al., 1994). Kurze Zeit später wurde diese Domäne in weiteren DNA-bindenden Proteinen gefunden. Diese binden an die GCC-Box, eine 11 bp lange konservierte Sequenz (TAAGAGCCGCC), in der Promotorregion von PR-Genen ("pathogen related") die durch Ethylen induziert werden (Ohme-Takagi, et al., 1995). Diese Proteine wurden schließlich als ERF ("ethylen response factor") bezeichnet. Die meisten bisher untersuchten ERF Proteine sind Aktivatoren der Transkription, aber es wurden auch Transkriptionsinhibitoren unter ihnen gefunden (Fujimoto, et al., 2000). Ebenfalls zur AP2/ERF-Familie gehören die ORCA-Proteine ("octadecanoid-derivate responsive Catharanthus AP2 domain"). Diese regulieren in Catharanthus roseus Gene der Synthese von monoterpenen Indolalkaloiden über Bindung an das ein GCC-Motiv enthaltende JERE ("jasmonate- and elicitor-responsive element") (Menke, et al., 1999a; Van der Fits, et al., 2001).

Bis auf wenige Ausnahmen kommen auch die Vertreter der WRKY Transkriptionsfaktoren ausschließlich in Pflanzen vor. Sie enthalten ein oder zwei WRKY-DNA-Bindedomänen, ein jeweils ca. 60 AS langes Motiv, das aus der hochkonservierten Sequenz WRKYGQK sowie einem zinkfingerähnlichen Motiv besteht. Die Regulation erfolgt über die DNA-Bindung an die sogenannte W-Box, eine DNA-Sequenz der Struktur (T)(T)TGAC(C/T) (Eulgem, et al., 2000), die in den Promotorregionen einiger pflanzlicher Resistenzgene vorkommt (Chen, et al., 2002; Maleck, et al., 2000). Auch diese Familie ist verhältnismäßig groß, so finden sich im *Arabidopsis* Genom beispielsweise mindestens 72 Vertreter. Die Mitglieder dieser Familie sind an der Regulation einer ganzen Reihe pflanzentypischer Prozesse beteiligt, wie z.B. der Pathogenabwehr, Alterungsprozessen oder der Trichomentwicklung (Eulgem, et al., 2000).

1.2 Signalmechanismen für die Induktion der Phytoalexin-Biosynthese in *Eschscholzia californica*

Kommt eine Kalluskultur des Kalifornischen Goldmohns (*Eschscholzia californica*, Cham., Papaveraceae), mit einem Pathogen in Berührung, so verfärbt sie sich an der Kontaktstelle rot [Abb. 1-2]. Diese eher zufällige Entdeckung zeigt, dass die Biosynthese von Phytoalexinen, in diesem Fall den rötlichen Benzo[c]phenanthridinen, in dieser Pflanze induzierbar ist (Schumacher, et al., 1987).



Abb. 1-2 Mit Pilz kontaminierte Kalluskultur von Eschscholzia californica.

Auch die in Suspension kultivierten Zellen reagieren auf den Kontakt mit biotischen und abiotischen Elicitoren mit der verstärkten Biosynthese von Benzo[c]phenanthridin-Alkaloiden z.B. Sanguinarin, Chelirubin, Chelerythrin, Chelilutin und Macarpin (Schumacher, et al., 1987; Weiss, 2004). Diese stellen äußerst potente Phytoalexine dar (Färber, 2002). Sie verhindern das Wachstum von phytopathogenen Bakterien und Pilzen aufgrund vielfältiger Wirkmechanismen:

- Als hydrophobe Kationen weisen sie eine deutliche Membrantoxizität auf. Die Störung der Membranpermeabilität und Depolarisation führen zu einer Entkopplung der ATP-Synthese und einer Inhibition von ATP-asen (Faddeeva, et al., 1997).
- Sie interkalieren in GC-reiche Bereiche doppelsträngiger Nukleinsäuremoleküle, was eine Hemmung der DNA-Polymerase und somit eine Störung der Transkription zur Folge hat (Schmeller, et al., 1997).
- Die Interaktion mit nucleophilen Gruppen (z.B. SH-Gruppen) kann zur Hemmung der Funktion einer Reihe von Proteinen und Enzymen (auch hier häufig ATP-asen) führen (Faddeeva, et al., 1997). Für Sanguinarin wurden antimitotische Effekte nachgewiesen, die vermutlich auf einer Hemmung der Tubulinpolymerisation, beruhen (Wolff, et al., 1993; Vollmer, 2006).

Die Auslösung der Biosynthese dieser Toxine erfolgt durch mindestens zwei konvergierende Signalwege (Roos, et al., 1998; Roos, et al., 1999; Viehweger, et al., 2002; Färber, et al., 2003; Roos, et al., 2006) (siehe Abb. 1-3):

1 Einleitung

Niedrige Elicitorkonzentrationen (1 µg/ml im Außenmedium) aktivieren über den "LPC-ΔpH-Weg" zunächst eine G-Protein-kontrollierte Phospholipase A2 (PLA2) (Roos, et al., 1999; Heinze, et al., 2007). Diese Ca2+-unabhängige Enzymaktivität kann nicht nur in intakten Zellen, sondern auch in Plasmamembran-Vesikeln gemessen werden und ist durch bekannte PLA₂-Inhibitoren, wie Aristolochiasäure oder Chlorpromazin hemmbar. Durch die gesteigerte Hydrolyse von Phospholipiden kommt es zu einem transienten Konzentrationsanstieg des Spaltproduktes Lysophosphatidylcholin (LPC), das seinerseits als "second messenger" fungiert. LPC erhöht die Na⁺-Sensitivität eines am Tonoplast lokalisierten Na⁺/H⁺-Austauschers (Roos, et al., 2006). Dies führt zum transienten Efflux von Protonen aus der Vakuole in das Cytoplasma und damit zu einem H⁺-Peak (Roos, et al., 1998; Roos, et al., 1999; Viehweger, 2002). Der cytoplasmatische pH-shift ist ein Teil der Signalkette zur Auslösung der Alkaloidbiosynthese: diese kann durch die künstliche Ansäuerung des Cytoplasmas ausgelöst und durch Neutralisierung des vakuolären pH-Wertes verhindert werden (Roos, et al., 1998). Die Signalereignisse nach dem pH-shift waren zu Beginn dieser Arbeit weitgehend unklar. Arbeiten von Evers (2003) weisen auf eine Beteiligung der Tyr-Phosphorylierung unbekannter Proteine hin: mithilfe Tyrosinphosphat-spezifischer Antikörper wurden nach Elicitorkontakt auftretende Proteinbanden detektiert, und spezifische Kinase- oder Phosphataseinhibitoren verhinderten die Auslösung der Alkaloidproduktion in elicitierten Zellkulturen.

Als Endergebnis des Signalweges wird interessanterweise nicht nur das ratelimitierende Protein der Alkaloid-Biosynthese, die 4-*O*-Methyltransferase überexprimiert, sondern auch eine Gruppe Stress-responsiver Proteine, d.h. GAPDH, Cyclophilin A und HSP 70. Offenbar erfordert die Alkaloid-Biosynthese Sicherheitsmaßnahmen ähnlich der Reaktion auf oxidativen Stress (Angelova, 2007; Angelova, et al., 2010).

Hohe Elicitorkonzentrationen (> 10 μg/ml im Außenmedium) lösen einen weiteren, pH-unabhängigen Signalmechanismus ("Jasmonat-Weg") aus (Färber, et al., 2003). Dieser führt zu einem Peak von Jasmonsäure, die seit längerem als Induktor von Enzymen der Phytoalexin-Biosynthese in *Eschscholzia* (Gundlach, et al., 1992; Müller, et al., 1993; Haider, et al., 2000) und anderen Pflanzen (Van der Fits, et al., 2001) bekannt ist. In *Eschscholzia* ist wahrscheinlich der Transkriptionsfaktor ERF2 an der Jasmonatabhängigen Induktion der Benzo[c]phenanthridin-Biosynthese beteiligt (Kurz, 2009). Neben der Phytoalexinbildung bewirken hohe Elicitorkonzentrationen eine Alkalisierung des Kulturmediums, Verlust von zellulären Kaliumionen, Polyphenolbildung ("browning") und hypersensitiven Zelltod.

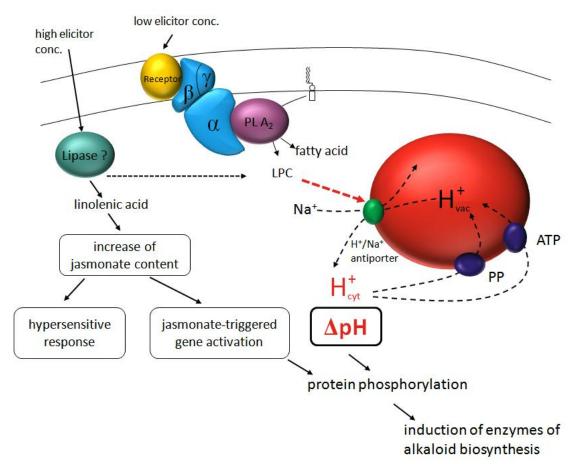


Abb. 1-3 Schematische Darstellung der durch Elicitorkontakt ausgelösten Signaltransferwege in suspensionskultivierten Zellen von *Eschscholzia californica* nach Roos, et al., 2006.

<u>1 Einleitung</u>

1.3 Biosynthese der Benzo[c]phenanthridin-Alkaloide in Eschscholzia californica

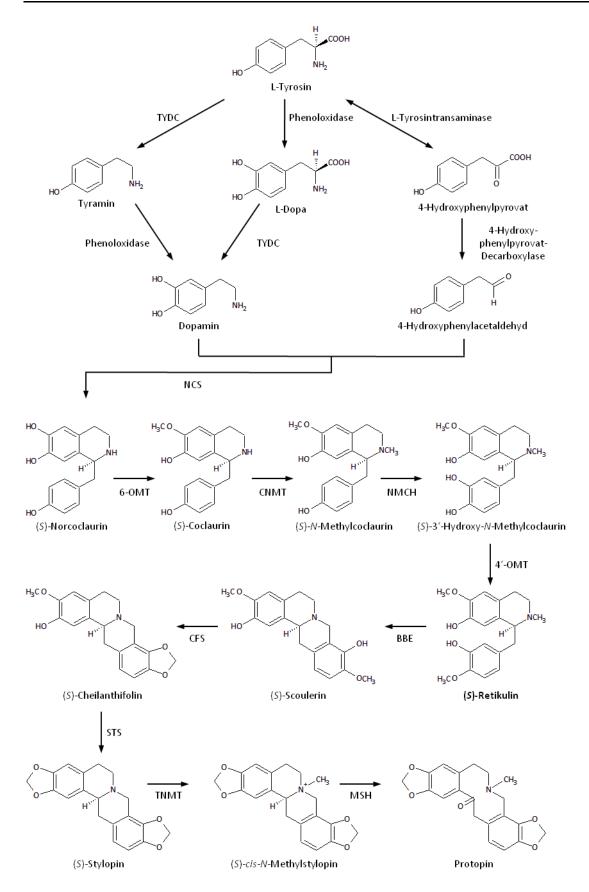
Mit mehr als 2500 bekannten Verbindungen stellen die Benzylisochinolinalkaloide eine recht große Gruppe innerhalb der Naturstoffe dar (Ziegler, et al., 2008). Einige der wichtigsten Arzneistoffe stammen aus dieser Gruppe. Allen voran das Morphin und dessen Derivate, die aus der modernen Medizin nicht wegzudenken sind.

Der komplexe Syntheseweg wurde wesentlich mithilfe von *Eschscholzia*-Suspensionskulturen aufgeklärt (Zenk, 1994).

Bis zu dem zentralen Intermediat (*S*)-Retikulin, das aus Tyrosin gebildet wird, verläuft die Biosynthese aller Benzylisochinoline identisch. Von da an verzweigen sich die Synthesewege in Richtung der Protoberberin-, Morphinan- und Benzo[*c*]phenanthridin-Alkaloide. Letztere werden vornehmlich von Mitgliedern der Papaveraceae, Rutaceae und Fumariaceae synthethisiert (Krane, et al., 1984). In Abb. 1-4 ist beispielhaft die Synthese von Sanguinarin, Chelirubin und Marcapin schematisch dargestellt. Zu den wichtigsten Enzymen, die die mehr als 20 Reaktionsschritte zu den Benzo[*c*]phenanthridinen katalysieren, gehören:

- die Methyltransferasen: 6-OMT, CNMT, 4'-OMT und TNMT,
- die Cytochrom-P450-abhängigen Hydrolasen: NMCH, MSH, P6H sowie die 10und 12-Hydrolase,
- das hochspezifische, FAD-abhängige Berberinbrückenenzym (BBE), das ausschließlich (S)-Retikulin als Substrat erkennt (Dittrich, et al., 1991), und dessen Produkt, (S)-Scoulerin, der gemeinsame Precurser der Benzo[c]phenanthridine und der Protoberberine (in z.B. *Berberis, Captis* und *Thalictrum*) ist,
- die beiden, ebenfalls Cytochrom-P450-abhängigen Enzyme CFS und STS, die die Dioxolan-Brücken an Ring D und A schließen und
- die Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase (DBOX), welche die weitgehend ungiftigen Dihydrobenzophenanthridine unter Bildung von H₂O₂ zu den wesentlich toxischeren (siehe 1.2) quartären Ammoniumverbindungen oxidiert.

Vor kurzem wurde zudem aus Suspensionskulturen von *Eschscholzia californica* ein Enzym charakterisiert, das die Reduktion des selbst produzierten, aber auch von außen zugesetztem Sanguinarin zu Dihydrosanguinarin katalysiert. Diese Sanguinarinreduktase (SR) fungiert als ein wichtiges Schutzenzym, das die Zellen vor der Vergiftung mit dem eigenen Phytoalexin bewahrt (Weiss, et al., 2006; Vogel, et al., 2010).



1 Einleitung

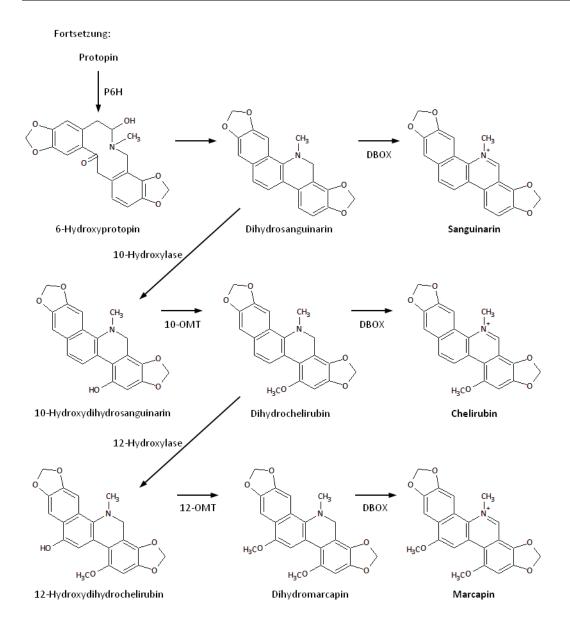


Abb. 1-4 Schema der Biosynthese der Benzo[*c*]phenanthridin-Alkaloide Sanguinarin, Chelirubin und Marcapin ausgehend von L-Tyrosin nach Zenk (1994) und Facchini & St.Pierre (2005). TYDC, Tyrosindecarboxylase; NCS, Norcolaurinsynthase; 6-OMT, Norcoclaurin-6-*O*-Methyltransferase; CNMT, Coclaurin-*N*-Methyltransferase; NMCH, *N*-Methylcoclaurin-3'-Hydroxylase; 4'-OMT, 3'-Hydroxy-*N*-Methylcoclaurin-4'-*O*-Methyltransferase; BBE, Berberinbrückenenzym; CFS, Cheilanthifolinsynthase; STS, Stylopinsynthase; TNMT, Tetrahydroprotoberberin-*cis-N*-Methyltransferase; MSH, *N*-Methylstylopinhydrolase; P6H, Protopin-6-Hydrolase; DBOX, Dihydrobenzophenanthridinoxidase; 10-OMT, Hydroxydhydrosanguinarin-10-*O*-Methyltransferase; 12-OMT, Hydroxydhydrochelirubin-12-*O*-Methyltransferase

1.4 "Moonlighting"- Proteine

Der Begriff "moonlighting" bedeutet frei übersetzt so viel wie Schwarzarbeit und wurde wahrscheinlich durch Gregory A. Petsko (Jeffery, 1999) geprägt, um Proteine zu bezeichnen, die neben ihrer katalytischen Aktivität weitere Funktionen besitzen, welche nicht katalytischer, sondern struktureller oder regulatorischer Natur sind (Copley, 2003; Moore, 2004).

Diese Funktionen werden bei unterschiedlichen zellulären Bedingungen sichtbar, z.B.:

- Veränderungen in der Lokalisation des Enzyms innerhalb oder außerhalb der Zelle
 Die Escherichia coli Phosphoglukoseisomerase (PutA) besitzt Prolindehydrogenaseund Pyrrolin-5-carboxylatdehydrogenaseaktivität, wenn sie mit Plasmamembranen
 assoziiert ist und fungiert als DNA-bindender Transkriptionsrepressor wenn sie im
 Cytoplasma vorliegt (Muro-Pastor, et al., 1997);
- Expression in verschiedenen Zelltypen
 An der Zelloberfläche von Endothelzellen ist Neuropilin ein Detektor für vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), während es an den Zelloberflächen von Axonen Semaphorin III erkennt, und so dabei hilft, die Axone in die richtige Richtung zu lenken (Soker, et al., 1998);
- Unterschiedliche Konzentrationen von Liganden, Cofaktoren, Substrat oder Produkt Die bereits erwähnte PutA bindet an Zellmembranen, wenn die Substratkonzentration (Prolin) hoch ist und dissoziiert bei sinkenden Konzentrationen (Ostrovsky de Spicer, et al., 1993).

Aber nicht nur in Bakterien und Säugetieren, auch in Pilzen (Gancedo, et al., 2008) und Pflanzen wurden moonlighting-Enzyme beschrieben, beispielsweise eine Nucleosid-diphosphatkinase (NDPK) aus *Arabidopsis thaliana*, die AtNDPK2. Die normale Funktion von Enzymen dieser Klasse ist der Phosphattransfer auf Nukleosiddiphosphate (NDPs) bzw. Desoxyribonukleosiddiphosphate (dNDPs) zur Bildung der entsprechenden Triphosphate (NTPs bzw. dNTPs), wobei keine Spezifitätsunterschiede zwischen den üblichen vier Basen bestehen. AtNDPK2 fungiert aber zusätzlich als Signaltransduktor im Zusammenhang mit oxidativem Stress indem es eine H₂O₂-abhängige MAPK-Kaskade aktiviert (Moon, et al., 2003).

Insgesamt ist die Anzahl der beschriebenen moonlighting-Proteine recht gering. Für Pflanzen waren es bis zum Jahr 2004 gerade einmal sieben (Moore, 2004). Erklären lässt sich diese Tatsache damit, dass es sich häufig um reine Zufallsentdeckungen handelt, u.a. weil derartige Zusatzfunktionen nicht ohne weiteres über Gensequenzen oder die bekannte katalytische Funktion vorhersagbar sind.

<u>1 Einleitung</u>

1.5 Zielstellung der Arbeit

Wie bereits erwähnt, ist der Signaltransfer zur Auslösung der Alkaloidbiosynthese über den LPC-ΔpH-Weg (siehe 1.2) bisher nur in seinem ersten Teil untersucht. Die downstream-Ereignisse nach dem pH-shift, einschließlich der beteiligten Gen-Kontroll-Proteine sind bisher unbekannt. Obwohl eine selektive Phosphorylierung von Proteinen nach allgemeiner Vorstellung und den Experimenten von Evers (2003) zu erwarten ist, konnten bisher keine konkreten Kandidaten isoliert werden. Die vorliegende Arbeit hatte deshalb zum Ziel:

- ein auf der 2D-Proteom-Analyse beruhendes Verfahren zum Nachweis von Phosphoproteinen in Eschscholzia-Zellkulturen zu etablieren,
- die mit der Auslösung der Alkaloidbiosynthese assoziierte Phosphorylierung von Proteinen zu untersuchen (dazu sollte der "LPC-ΔpH-Weg" mit dem "Jasmonat-Weg" verglichen werden), sowie
- ausgewählte Phosphoproteine zu identifizieren, durch RNAi auszuschalten und die resultierenden Phänotypen auf ihre Fähigkeit zur Alkaloidbiosynthese zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Arbeiten mit Suspensionskulturen von Eschscholzia californica

2.1.1 Kultivierung der suspendierten Zellen

Suspendierte Zellen von *Eschscholzia californica* wurden in *LS-Medium*¹ bei 23 °C bis 24 °C unter Dauerlicht (Photonendichte ca. 7 µmol/m²/s) auf einer Rundschüttelmaschine (100 rpm, Amplitude 50 mm) kultiviert. Zur Kultivierung wurde jeweils ein Teil neun bis zehn Tage alte Kultur mit drei Teilen frischem Nährmedium gemischt. Zur Herstellung von Versuchsansätzen wurde jeweils am 7. Tag des Kultivationszyklus eine Probe der Suspension entnommen. Die Zellen wurden durch Filtration mittels Gaze (Polyester, Fadenzwischenraum 50-55 µm, *Reichelt Chemietechnik GmbH & Co* Heidelberg, BRD) vom alten Medium getrennt und im fünffachen Volumen Sorbitlösung (100 mM) gewaschen. Nach erneuter Filtration erfolgte eine Resuspendierung in *LS-P 75 %* (Versuchssuspension). In dieser wurden die Zellen mindestens 1 h equilibriert.

2.1.2 Auslösung der Alkaloid-Biosynthese

Elicitorbehandlung:

Zum Startzeitpunkt (t = 0) wurden den in den Versuchsansätzen befindlichen Zellsuspensionen $1 \,\mu g/ml$ (niedrige Elicitorkonzentration) bzw. $50 \,\mu g/ml$ (hohe Elicitorkonzentration) *Elicitor* zugesetzt. Direkt im Anschluss wurden 10 ml der Suspension in ein weiteres Kultivierungsgefäß überführt. Diese dienten der Bestimmung des Alkaloidzuwachses innerhalb von 24 h (siehe 2.1.3).

Die verbleibenden Zellen des Versuchsansatzes wurden 20 min nach Elicitorzugabe (t = 20) durch Absaugen mit einer Wasserstrahlpumpe vom Kultivationsmedium getrennt und in N_2 liq. schockgefroren.

Auslösung künstlicher pH-shifts:

Nigericin-Methode: Die Zellen des Versuchsansatzes wurden wiederum durch Filtration mittels Gaze vom Medium getrennt und anschließend im gleichen Volumen Nigericin-puffer resuspendiert. Nach einer Inkubation für 3 min wurden die Zellen erneut vom Medium getrennt und für 10 min im fünffachen Volumen Nigericinwaschpuffer inkubiert. Abschließend erfolgte eine Filtration und die Resuspendierung in LS-P 75 % (t = 0). Es wurden 10 ml Suspension zur Bestimmung des Alkaloidzuwachses (siehe 2.1.3) abgenommen, und zum Zeitpunkt t = 20 die Zellen abgesaugt und schockgefroren.

Puffer-Methode: Die Zellen des Versuchsansatzes wurden zunächst durch Filtration mittels Gaze vom Medium getrennt und in *HEPES* pH 7,5 für 45 min inkubiert. Anschließend erfolgte wiederum eine Filtration und Resuspendierung in *LS-P 75 %.* (t = 0). Es wurden 10 ml Suspension zur Alkaloidbestimmung (siehe 2.1.3) abgenommen und zum Zeitpunkt t = 20 die Zellen abgesaugt und schockgefroren.

-

¹ für kursiv geschriebene Lösungen und Puffer siehe 2.6

2.1.3 Bestimmung des Alkaloidzuwachses

Bestimmung der Alkaloidkonzentration: 500 μ l Zellsuspension wurden mit 500 μ l Extraktionsmittel versetzt, 20 min bei 40 °C in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 1000 rpm (Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg, BRD) inkubiert und anschließend zentrifugiert (Hetterich EBA 21; 20 min, 12000 rpm). Der Überstand wurde zur Vermessung der Alkaloidkonzentration verwendet. Dazu wurden je Probe 100 μ l der Flüssigkeit in eine 96 well Microtiterplatte pipettiert. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe eines Fluoreszenz-Readers (Microplate Fluorescence Reader FL_X 800, BIO-TEK Instruments Inc., Bad Friedrichshall, BRD) bei λ_{Ex} = 485 nm, λ_{Em} = 580 nm und Sensitivity: 60. Jede Probe wurde sechsfach vermessen und der Mittelwert gebildet.

Bestimmung der Zellzahl: 0,1 ml Zellsuspension wurden mit einer NaCl-Lösung (0,9 %) zu 10 ml verdünnt. Es wurden 20 μl Mucasol[®] (Brand + Co., Wertheim, BRD) zugesetzt, um Verklumpungen der Zellen zu vermeiden. Jede Probe wurde mit einem Coulter Counter (Casy 1, CASY[®] Technology, Reutlingen, BRD) dreifach vermessen, und der Mittelwert verwendet. Die ermittelten Messwerte haben die Dimension Mio.Zellen/ml.

Verarbeitung der Rohdaten: Für die Ermittlung der Alkaloidkonzentration aus den Reader-Daten wurde mithilfe von Sanguinarinlösungen verschiedener Konzentrationen eine Kalibriergerade erstellt [Abb. 2-1], mit deren Hilfe die Fluoreszenz-Messwerte in Alkaloidkonzentrationen umgerechnet werden konnten.

Für die Auswertung der Versuche wurde für jede Probe der Quotient aus Alkaloid-konzentration und Zellzahl ermittelt (Dimension: μg/Mio. Zellen). Die sich innerhalb von 24 h ergebende Differenz dieser Größe entspricht dem Alkaloidzuwachs in der jeweiligen Probe. Diese Daten wurden normiert, wobei der Alkaloidzuwachs nach Zugabe niedriger Elicitorkonzentrationen 100 % gesetzt entsprach.

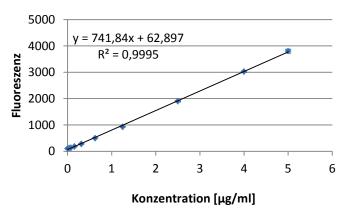


Abb. 2-1 Kalibriergerade für Microplate Fluorescence Reader FL_X 800 (λ_{Ex} = 485 nm, λ_{Em} = 580 nm, Sensitivity: 60).

2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.1 Proteinextraktion

Zur Gewinnung der löslichen Proteinfraktion wurden die suspensionskultivierten Zellen von Eschscholzia californica durch Absaugen mit einer Wasserstrahlpumpe zunächst vom Medium getrennt und sofort in N_2 liq. schockgefroren. 200 mg gefrorenes Zellpellet wurden in einem vorgekühlten Mörser in N_2 liq. gemahlen bis der Stickstoff verdampft war. Das erhaltene Zellmehl wurde in ein ebenfalls vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in 800 μ l Extraktionspuffer aufgetaut. Als Extraktionspuffer kamen hier je nach Anwendung frisch hergestellter Lysispuffer oder der Extraktionspuffer aus dem "PhosphoProtein Purification Kit" (siehe 2.2.3.2), der zusätzlich 1 %(m/V) Polyclar® AT enthielt, zum Einsatz.

Die Mischung wurde im Reaktionsgefäß mit einem PP-Pistill homogenisiert und 2× 5 s im Ultraschallbad (Sonorex TK524, Bandelin, Berlin, BRD) mit 100 % Leistung behandelt. Anschließend wurden die Gefäße 30 min bei 4 °C und 800 rpm (Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg, BRD) geschüttelt. Zur Abtrennung aller unlöslichen Bestandteile und der an das Polyclar® AT gebundenen phenolischen Sekundärstoffe, folgte eine mehrstufige Zentrifugation jeweils bei 4 °C. Zunächst wurde 45 min bei 1.000 g, der Überstand anschließend 15 min bei 10.000 g zentrifugiert (Centrifuge 5403, Eppendorf, Hamburg, BRD). Der so erhaltene Überstand wurde dann einer Ultrazentrifugation bei 100.000 g (TL-100, Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA, USA) unterzogen und so die lösliche Proteinfraktion gewonnen.

2.2.2 Proteinbestimmung

Die während der Arbeit mit Proteinen verwendeten Pufferlösungen enthielten zum Teil Substanzen, die eine Quantifizierung der Proteine erschweren, wie z.B. reduzierende Agenzien, Tenside, Chelatbildner oder hohe Konzentrationen Harnstoff. Aus diesem Grund wurden die im Folgenden beschriebenen Proteinquantifizierungsmethoden gewählt, die eine Bestimmung auch unter diesen Umständen zuverlässig gewährleisteten.

2.2.2.1 Proteinbestimmung mithilfe von 2D-Quant

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration vor der Trennung mittels 2D-Gel-Elektrophorese (siehe 2.2.5) wurde der Kit "2D Quant" (Cat. No. 80-6483-56, GE-Healthcare, Freiburg, BRD) verwendet. Der Bestimmung liegt die Bildung eines Protein-Cu-Komplexes zugrunde und oben beschriebene störende Substanzen werden durch Proteinfällung abgetrennt. Die Bestimmung erfolgte nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll. Zunächst wurde durch Mischen von 100 Teilen "color reagent A" mit einem Teil "color reagent B" eine ausreichende Menge "working color reagent" hergestellt (1 ml pro zu bestimmender Probe). Für die Konzentrationsbestimmung wurden je 15 μl Proteinextrakt (siehe 2.2.1) in 2 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg, BRD) gegeben und mit 500 μl "precipitant" versetzt. Nach kurzem Vortexen verblieb die Mischung 3 min bei RT. Anschließend wurden 500 μl "co-precipitant" zugesetzt, die

Lösung durchmischt und 5 min bei $10.000\,g$ zentrifugiert (Centrifuge 5403, Eppendorf, Hamburg, BRD). Direkt im Anschluss wurde der Überstand restlos entfernt und das gefällte Protein in $100\,\mu$ l "copper solution" und $400\,\mu$ l A.bd. durch Vortexen wieder gelöst. Nach dem Zusatz von 1 ml "working color reagent" und einer 20-minütigen Inkubation der Proben bei RT, wurden die Absorptionswerte der Lösungen bei $\lambda = 480\,\text{nm}$ mittels eines Spektrophotometers ("Ultrospec 3000", Pharmacia Biotech, Freiburg, BRD) bestimmt. Die Grundlage der Quantifizierung bildete eine Kalibriergerade, die mit der im Kit enthaltenen BSA-Lösung nach gleicher Vorschrift erstellt wurde [Abb. 2-2].

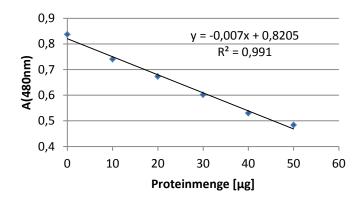


Abb. 2-2 Kalibriergerade für Ultrospec 3000 (Absorption 480 nm).

2.2.2.2 Proteinbestimmung mit BCA-Assay

Die BCA-Methode (Smith, et al., 1985) beruht auf dem Prinzip der Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺ durch die Proteine in der Lösung und der Bildung eines farbigen Komplexes der Bicinchoninsäure mit diesen einwertigen Kupferionen. Da diese Methode besonders empfindlich gegenüber reduzierenden Agenzien ist, wurde hier der "BCA Protein Assay -Reducing Agent Compatible Kit" (Cat. No. 23250, PIERCE, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA) verwendet. Auch hier erfolgte die Konzentrationsbestimmung nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll. Zunächst wurden 500 µl A.bd. zu der gleichen Menge "Reconstitution Buffer" gegeben und darin das "Compatibility Reagent" in einem mitgelieferten lichtundurchlässigen Gefäß gelöst ("Compatibility Reagent Stock Solution" - "CRS"). Zudem wurde noch vorbereitend eine ausreichende Menge "BCA-working reagent" ("BCA-WR") durch Mischen von 50 Teilen "reagent A" mit einem Teil "reagent B" hergestellt. Die zu bestimmenden Proben wurden in Extraktionspuffer so verdünnt, dass sich eine ungefähre Konzentration von 1 μg/μl einstellt. Jeweils 25 μl dieser Proben wurden mit 25 μl "CRS" in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, BRD) vermengt und 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Zusatz von 1 ml "BCA-WR" wurde für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine 10-minütige Abkühlphase bevor die Absorptionswerte der Lösungen bei $\lambda = 562 \text{ nm}$ mittels eines Spektrophotometers ("Ultrospec 3000", Pharmacia Biotech, Freiburg, BRD) bestimmt wurden. Eine Kalibriergerade, erstellt mit der im Kit enthaltenen BSA-Lösung, jeweils im selben Puffer verdünnt wie das zu quantifizierende Protein, bildete die Grundlage der Quantifizierung [Abb. 2-3].

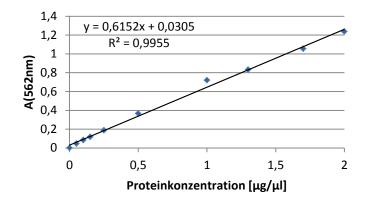


Abb. 2-3 Kalibriergerade für Ultrospec 3000 (Absorption 562 nm).

2.2.3 Anreicherung der Phosphoproteine

2.2.3.1 Anreicherung der Phosphoproteine mittels MOAC

Zur Anreicherung der Phosphoproteine mithilfe der "metal oxide/hydroxide affinity chromatography" (MOAC) wurde das Verfahren von Wolschin (Wolschin, et al., 2005) leicht modifiziert: 80 mg Al(OH)₃ wurden zunächst 5× je 1 min mit 1 ml *MOAC-Inkubationspuffer* gewaschen. Die Proteine eines Volumens Proteinextrakt (siehe 2.2.1) der ca. 1 mg Gesamtprotein enthielt, wurden mithilfe des "2D clean up" Kit (Cat. No. 80-6484-61, GE-Healthcare, Freiburg, BRD) gefällt (siehe 2.2.5.1), und das Pellet in 1,5 ml *MOAC-Inkubationspuffer* gelöst. Die Proteinlösung wurde dann 30 min mit dem gewaschenen Al(OH)₃ unter Schütteln bei RT inkubiert. Es folgten fünf Waschschritte mit je 1 ml *MOAC-Inkubationspuffer* bevor die Elution mit 2× je 400 μl *MOAC-Elutionspuffer* für je 20 min bei RT stattfand. Die eluierten Fraktionen wurden vereinigt und die Lösung ggf. aufkonzentriert. Dazu kamen *Vivaspin* Zentrifugalkonzentratoren (Cat. No. VS0112, Sartorius Stedim, Aubagne, Frankreich) zum Einsatz.

2.2.3.2 Anreicherung der Phosphoproteine mittels "PhosphoProtein Purification Kit" (Qiagen, Hilden)

Ein ähnliches Prinzip zur Aufreinigung von Phosphoproteinen machen sich auch kommerzielle Kits wie das "PhosphoProtein Purification Kit" (Cat. No. 37101; Qiagen, Hilden, BRD) zunutze. Hier werden Metallionen an einem Gel immobilisiert und die Trennung erfolgt mittels Säulenchromatographie (IMAC). Die Durchführung erfolgte nach beigefügtem Protokoll mit geringfügigen Modifikationen. Die Extraktion der Proteine aus dem Zellmaterial erfolgte wie unter 2.2.1 beschrieben. Die Proteinkonzentration des Extraktes wurde mithilfe der BCA-Methode (siehe. 2.2.2.2) bestimmt und die Lösung dann mit mitgeliefertem "PhosphoProtein Lysis Buffer", der 0,25 % CHAPS enthielt, auf 0,1 mg/ml verdünnt. Jeweils 2× 12,5 ml der so erhaltenen Proben wurden über eine zuvor mit 4 ml "PhosphoProtein Lysis Buffer" equilibrierten Säule gegeben. Die letzten 5 bis 6 ml Durchfluss wurden aufgefangen und mithilfe von *Vivaspin* Zentrifugalkonzentratoren (Cat. No. VS0227, Sartorius Stedim, Aubagne, Frankreich) auf ca. 0,5 ml eingeengt. Diese Probe diente zur Überprüfung der Bindung der Phospho-

proteine an das Säulenmaterial. So konnte ein eventuelles Überladen der Säule vermieden werden. Die Säulen wurden anschließend mit 6 ml "PhosphoProtein Lysis Buffer" gewaschen bevor die gebundenen Proteine mit 6× 500 µl "PhosphoProtein Elution Buffer", der ebenfalls 0,25 % CHAPS enthielt, eluiert wurden. Die Eluatfraktionen wurden vereint und unter Einsatz von *Vivaspin* Zentrifugalkonzentratoren (Cat. No. VS0227, Sartorius Stedim, Aubagne, Frankreich) ebenfalls auf ca. 0,5 ml eingeengt. Die Proteinkonzentrationen von Durchfluss und Eluat wurden mit der BCA-Methode

Die Proteinkonzentrationen von Durchfluss und Eluat wurden mit der BCA-Methode (siehe 2.2.2.2) bestimmt.

2.2.4 SDS-Gel-Elektrophorese

Die Auftrennung der Proteingemische durch Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) erfolgte, leicht modifiziert, nach Laemmli (Laemmli, 1970).

Es wurde das Minigelsystem "miniVE complete" (HOEFER, San Francisco, USA) verwendet. Für 12,5 %ige Trenngele wurden die Komponenten wie folgt gemischt und jeweils 5 ml zur Herstellung eines Gels (Gelstärke: 1 mm) sofort verwendet:

```
7 ml Rotiphorese®
```

4,4 ml Trenngelpuffer

5,2 ml A.bd.

16 μl TEMED

75 μl APS StLsq. (10 %)

Die Matrix wurde nach dem Gießen mit 50 %(V/V) iso-Propanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation (30 min bei RT) wurde die Flüssigkeit abgegossen, und das Sammelgel hinzugefügt. Diese Lösung war folgendermaßen zusammengesetzt:

1,12 ml Rotiphorese®

2 ml Sammelgelpuffer

4,8 ml A.bd.

16 μl TEMED

65 μl APS StLsg. (10 %)

Es wurden 1,5 ml pro Sammelgel verwendet. Die Polymerisation erfolgte ebenfalls 30 min bei RT.

Proteinproben, die etwa 10 μg Gesamtprotein enthielten, wurden mit dem entsprechenden Puffer auf 9 μl aufgefüllt, 3 μl *SDS-Probenpuffer* zugesetzt und bei 95 °C 3 min denaturiert. Das Gemisch wurde jeweils vollständig in eine Geltasche pipettiert. Als Größenstandards kamen der "PageRulerTM Prestained Protein Ladder (Cat. No. SM0671, Fermentas, St. Leon-Rot, BRD), der "peqGOLD Protein-Marker I" (Cat. No. 27-1010, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, BRD), der LMW-SDS Marker (Cat. No. 17-0446-01, GE-Healthcare, Freiburg, BRD) oder der "PeppermintStickTM Phosphoprotein Molecular Weight Standards" (Cat. No. P27167, Invitrogen, Karlsruhe, BRD) zum Einsatz. Der Gellauf erfolgte bei 110 V und 4 °C. Die Laufzeit betrug ca. 90 min. Direkt nach der

Trennung wurden die Proteine entweder gefärbt (siehe 2.2.8.1), oder zur weiteren Analyse auf NC-Membran transferiert (siehe 2.2.6).

2.2.5 2D-Gel-Elektrophorese

Eine schematische Übersicht der experimentellen Vorgehensweise, die bei der Erstellung und Analyse von 2D-Gel-Elektrophorese-Projekten Anwendung fand, zeigt Abb. 2-4.

Zunächst wurden die kultivierten Zellen (siehe 2.1.1) den verschiedenen Behandlungen (hohe/niedrige Elicitorkonzentrationen bzw. künstliche pH-shifts, siehe 2.1.2) unterzogen. Ein Teil jeder Kultur blieb dabei unbehandelt und diente als Kontrolle. Für jedes Projekt wurden dazu drei biologische Replikate angefertigt, d.h. dieselbe Behandlung wurde an drei unterschiedlichen Kulturen vorgenommen. Es kam je ein technisches Replikat dazu, indem aus einer der behandelten Kulturen je zwei Proben entnommen wurden. Es wurden 20 min nach der jeweiligen Behandlung Zellen der Suspension entnommen und schockgefroren. Ein Rest der jeweiligen Zellsuspension von 20 ml wurde für 24 h weiter kultiviert und diente zur Determinierung der Auslösung der Alkaloidbiosynthese (siehe 2.1.3).

Aus den gefrorenen Zellen wurden die löslichen Proteine extrahiert (siehe 2.2.1). Die Proteine wurden zunächst gereinigt und anschließend der zweidimensionalen Trennung unterzogen (siehe unten). Es folgte ein Elektrotransfer der Proteine auf NC-Membranen (siehe 2.2.6). Auf diesen Membranen wurden zunächst die Phosphoproteine mit "ProQ®Diamond" und nach der Digitalisierung (siehe 2.2.9) alle Proteine mit "Sypro® Ruby" angefärbt (siehe 2.2.8.2) und anschließend gescannt. Die so erzeugten Bilddateien wurden mithilfe der Software "Delta2D" Version 3.6 analysiert (siehe 2.2.10).

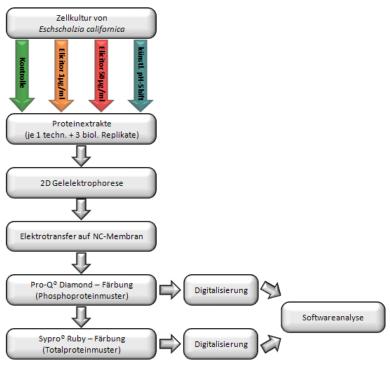


Abb. 2-4 Schema der experimentellen Vorgehensweis bei 2D-Elektrophorese-Projekten.

2.2.5.1 Erste Dimension: IEF

Um die Proteingemische gemäß ihrer isoelektrischen Punkte (Isoelektrische Fokussierung, IEF) auftrennen zu können, mussten die Proben zunächst entsprechend vorbereitet werden.

Probenvorbereitung: Der Proteinextrakt (siehe 2.2.1) wurde mithilfe des "2-D Clean-Up Kit" (Cat. No. 80-6484-51, GE-Healthcare, Freiburg, BRD) gereinigt. Die Reinigung erfolgte gemäß dem beigefügten Protokoll, wobei alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt wurden. Zu einem Volumen Proteinextrakt, das je nach beabsichtigtem IEF- Intervall die entsprechende Menge Protein (ca. 200 μg für pH-Intervall 3-10) enthielt, wurden 300 μl "precipitant" gegeben und die Mischung nach Vortexen für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 300 μl "co-precipitant" und kurzem Mischen erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 12.000 g und 4 °C (Centrifuge 5403, Eppendorf, Hamburg, BRD). Der erhaltene Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 40 μl "co-precipitant" 5 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert. Anschließend wurden 25 μl A.bd., 1 ml "wash buffer" (equilibriert bei -20 °C für mindestens 1 h) sowie 5 μl "wash additive" zugesetzt und die Mischung gevortext. Die Proben wurden dann über Nacht bei -20 °C gelagert, bevor wiederum bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert wurde. Auch hier wurde der Überstand verworfen und das Proteinpellet anschließend 5 min bei RT getrocknet.

Die Resolubilisierung erfolgte in 250 μ l *Rehydratationspuffer* mindestens 30 min bei RT durch mehrfaches Vortexen.

Isoelektrische Fokussierung (IEF): Für die IEF kamen "Immobiline™ DryStrips" der Firma GE-Healthcare, Freiburg, BRD zum Einsatz. Die Streifenlänge betrug 13 cm, die pH Intervalle 3-5,6 NL (Cat. No. 17-6003-55), 4-7 (Cat. No. 17-6001-13) sowie 3-10 NL (Cat. No. 17-6001-15). Die Bezeichnung "NL" steht für "non linear", der genaue pH-Verlauf der verwendeten Streifen geht aus Abb. 2-5 hervor.

Die IEF-Streifen (maximal zwölf gleichzeitig) wurden in einem austarierten "Immobiline™ DryStrip Reswelling Tray" (Cat. No. 80-6465-32, GE-Healthcare, Freiburg, BRD) mit 250 µl Rehydratationspuffer, in dem die Proteinprobe gelöst war, für mindestens 20 h bei RT rehydriert. Der Gellauf der 1. Dimension wurde in einer "Multiphor II" (GE-Healthcare, Freiburg, BRD) durchgeführt, die die parallele Verwendung von bis zu zwölf IEF-Streifen ermöglichte. Für eine bessere Wärmeleitung wurde die "Cooling plate" mit Kerosin überschichtet. Die IEF-Streifen wurden in der Gelkammer positioniert und auf die Enden, mit A.bd. leicht angefeuchtete, "IEF electrode strips" (Cat. No. 18-1004-40, GE-Healthcare, Freiburg, BRD) aufgebracht. Nach dem Anbringen der Elektroden wurden die Streifen mit "Immobiline™ DryStrip Cover Fluid" (Cat. No. 17-1335-01, GE-Healthcare, Freiburg, BRD) überschichtet und der Gellauf bei 20 °C gestartet. Dieser erfolgte in vier Stufen:

Stufe: 0,3 kV, 2 mA, 5 W für 1 h
 Stufe: 0,5 kV, 2 mA, 5 W für 1,5 h
 Stufe: 1,5 kV, 2 mA, 5 W für 2,5 h

4. Stufe: 3 kV, 2 mA, 5 W bis zum Erreichen von insgesamt 20 kVh.

Nach dem Lauf wurden die Streifen entweder für den Gellauf der zweiten Dimension vorbereitet (siehe 2.2.5.2) oder zunächst in verschlossen Glasgefäßen bei -80 °C gelagert.

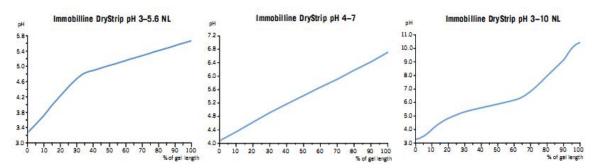


Abb. 2-5 pH Gradient Profile von Immobiline[™] DryStrips als Funktion der Streifenlänge bei 20 °C und 8 M Harnstoff (Quelle: GE-Healthcare).

2.2.5.2 Zweite Dimension: SDS-PAGE

Um die nach der IEF netto-ungeladenen Proteine in der 2. Dimension mittels SDS-PAGE weiter auftrennen zu können, mussten die IEF-Streifen zunächst entsprechend vorbereitet werden.

Probenvorbereitung: Die Equilibrierung der IEF-Streifen zur Vorbereitung auf die SDS-PAGE erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden die Streifen für 15 min in 10 ml Equilibrierungspuffer, in dem direkt vor der Nutzung 100 mg DTT gelöst wurden, bei RT und ca. 60 rpm geschüttelt. Dieser Schritt diente zur reduktiven Spaltung der Disuflidbrücken und sorgt für einen reduzierten Zustand der Proteine. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation in frischem Equilibrierungspuffer bei gleichen Bedingungen mit dem Unterschied, dass anstatt des DTT dem Puffer 250 mg IAA zugesetzt waren. Dieses Alkylans verhindert eine Reoxidation der Proteine während der Elektrophorese und alkyliert zudem überschüssiges DTT aus dem ersten Schritt. Direkt vor dem Aufbringen auf die Gele der zweiten Dimension wurden die Streifen kurz mit Laufpuffer gespült.

SDS PAGE: Für den Gellauf der zweiten Dimension kam eine "SE 660" (Cat. No. 80-6189-82, GE-Healthcare, Freiburg, BRD) Gelkammer zum Einsatz. Zur Vorbereitung eines Gellaufes wurde die untere Pufferkammer mit 5 l Laufpuffer gefüllt, und die Kühlung (15 °C) angestellt.

Die Apparatur ermöglicht den simultanen Lauf von zwei Gelen der Größe 18 × 24 cm. Für 12,5 %ige Gele wurden die Komponenten wie folgt gemischt und für jedes Gel (Gelstärke: 1 mm) 36 ml sofort verwendet:

42 ml Rotiphorese®
26 ml *Trenngelpuffer*32 ml A.bd.
100 μl TEMED
500 μl *APS StLsg. (10 %)*

Nach dem Gießen wurde die Matrix mit 50 %(V/V) *iso*-Propanol überschichtet und 30 min bei RT belassen. Anschließend wurde der *iso*-Propanol mit A.bd. abgewaschen und die Gele mit *Storage Solution* überschichtet. Um eine vollständige Polymerisation zu gewährleisten, wurden die Gele mindestens 8 h bei RT belassen. Sie wurden über Nacht bei 4 °C aufbewahrt, um ein Austrocknen zu vermeiden.

Nach Abgießen der *Storage Solution* wurden die equilibrierten Streifen mittig auf den Gelen so positioniert, dass sie blasenfreien Kontakt zur Geloberfläche hatten. An den Enden der Streifen wurden vorsichtig 5×10 mm große Stücke Blotting Papier (Whatman Schleicher & Schuell, Dassel, BRD) angebracht, die an der aciden Seite mit 5 μl "peqGOLD Protein-Marker I" (Cat. No. 27-1010, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, BRD) und an der basischen Seite mit 10 μl denaturiertem "PeppermintStick™ Phosphoprotein Molecular Weight Standard" (Cat. No. P27167, Invitrogen, Karlsruhe, BRD) getränkt waren. Im Anschluss wurde die gesamte Oberfläche mit *Agarose Sealing Solution* versiegelt. Nach Erstarren der Versiegelung wurden die Gele in die Kammer eingespannt, die obere Gelkammer mit 1,2 l frischem *Laufpuffer* gefüllt und der Gellauf gestartet. Dieser erfolgte in zwei Stufen:

1. Stufe: 600 V, 350 mA, 15 W für 1 h

2. Stufe: 600 V, 350 mA, 60 W bis zum Erreichen der Lauffront bei 20 cm Gellänge (ca. 4 h).

Direkt nach der Trennung wurden die Proteine entweder gefärbt (siehe 2.2.8.1) oder zur weiteren Analyse auf eine NC-Membran transferiert (siehe 2.2.6).

2.2.6 Proteintransfer auf NC-Membran

Der Transfer der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine (siehe 2.2.4 und 2.2.5.2) auf eine NC-Membran ("Hybond ECL", Cat. No. RPN203D, GE-Healthcare, Freiburg, BRD) erfolgte durch "Semi-dry-Blotting". Dies wurde in einer entsprechenden Blotting-Apparatur mit Graphit-Elektroden (20×20 cm) durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden 2× 9 Stücke Blotting Papier (Cat. No. 3030917, Whatman, Schleicher & Schuell, Dassel, BRD) und 1 Stück NC-Membran pro Gel jeweils auf Gelgröße geschnitten und 30 min in Blotting Puffer 1 bzw. Blotting Puffer 2 inkubiert. Die PA-Gele wurden direkt nach dem Lauf 10 min unter leichtem Schütteln (ca. 50 rpm) in Blotting Puffer 1 gewaschen. Der Transferstapel wurde aus den genannten Komponenten, nach Abtropfen, blasenfrei zusammengesetzt [Abb. 2-6]. Der Elektrotransfer wurde mit 110 V und 1 mA/cm² Gelfläche bei RT für ca. 2,5 h durchgeführt.

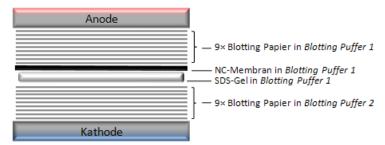


Abb. 2-6 Schematische Darstellung der Blotting Apparatur.

In der Regel wurden die Proteine zur Überprüfung der Transfereffizienz nach dem Blotting mit *Fast Green* gefärbt. Dazu wurde die Membran für 2 min bei RT in *Fast Green* Lösung (20 ml für 1D-Blots, 200 ml für 2D-Blots) unter leichtem Schütteln in abgedeckten PE-Schalen inkubiert. Anschließend wurde der Hintergrund durch fünfmaliges Waschen im doppelten Volumen A.bd. entfärbt.

Zum Entfernen des Farbstoffes wurden die Blots 10 min bei ansonsten gleichen Bedingungen wie zur Färbung in 0,02 M NaOH inkubiert und erneut fünf Waschschritten mit A.bd. unterzogen. Die Blots wurden dann zur Absättigung der freien Bindungsstellen über Nacht bei 4 °C und 50 rpm in 1× Roti®-Block (Cat. No. A151, Carl Roth, Karlsruhe, BRD) inkubiert.

2.2.7 Immundetektion spezieller Proteine auf Western Blots

Zur Beseitigung von Block-Puffer Resten, wurden die geblockten Blotmembranen (siehe 2.2.6) zunächst 2× mit A.bd. gespült, bevor Primärantikörper (0,2 µg/ml) in "LowCross-Buffer®" (Cat. No. 100500, CANDOR-Biosience, Weißensberg, BRD) zugesetzt wurde. Die Inkubation (90 min bei RT) erfolgte mit 15 ml in 9×9 cm großen PE-Schalen, bei ca. 50 rpm. Nachfolgend wurden die Membranen 4× für 10 min in TBS-T (20 ml in 9×9 cm Schalen) gewaschen, bevor die Inkubation mit Sekundärantikörper (0,08 µg/ml, goatanti-mouse-HRP, sc-2031, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) in "LowCross-Buffer®" in analoger Weise zur Primärantikörper-Inkubation erfolgte. Nach weiteren vier Waschschritten mit TBS-T, zwei Waschschritten mit TBS und zwei weiteren mit A.bd. erfolgte die Visualisierung der gebundenen Antikörper über eine Peroxidase-Reaktion. Dazu wurden die "detection reagents" 1 und 2 aus dem "ECLTM Western Blotting Detection Reagents" Kit (Cat. No. RPN2209, GE-Healthcare, Freiburg, BRD) zu gleichen Teilen gemischt und damit die Blotmembranen 1 min bei RT inkubiert. Nach Entfernen der Reaktionslösung mit Blotting Papier (Cat. No. 3030917, Whatman, Schleicher & Schuell, Dassel, BRD) wurden die Membranen in Klarsichtfolie verpackt und auf einem Fotofilm (Cat. No. 28-9068-35, GE-Healthcare, Freiburg, BRD) exponiert. Es wurden mehrere Filme pro Membran mit unterschiedlichen Expositionszeiten (10 s, 5 min, 20 min) belichtet. Die Filme wurden für 5 min in gebrauchsfertiger "Kodak® GBX developer/replenisher" (Cat. No. P7042, Sigma Aldrich, München, BRD) entwickelt und anschließend 10 min in ebenfalls gebrauchsfertiger "Kodak® GBX fixer/replenisher" (Cat. No. P7167, Sigma Aldrich, München, BRD) fixiert. Nach dem Waschen in A.bd. wurden die Filme an der Luft bei RT getrocknet.

2.2.8 Anfärbung der Proteine mithilfe der Fluoreszenzfarbstoffe "ProQ®-Diamond" und "Sypro®-Ruby"

Mit dem Fluoreszenzfarbstoff "ProQ® Diamond" von Molecular Probes (Invitrogen, Karlsruhe, BRD) ist es möglich, Phosphoproteine selektiv anzufärben. Laut Hersteller handelt es sich bei diesem Farbstoff um ein relativ kleines Molekül, das über nichtkovalente Wechselwirkungen an Phosphatreste der Proteine bindet, ohne diese zu ver-

ändern. Er erlaubt die Detektion von Phosphatgruppen an Serin, Threonin und Tyrosin mit nahezu gleicher Spezifität.

Der Fluoreszenzfarbstoff "Sypro® Ruby" desselben Herstellers ermöglicht in ähnlicher Weise eine Anfärbung aller Proteine mit einer Sensitivität, die nahezu der der Silberfärbung (Merril, et al., 1981) entspricht. Er ist jedoch im Gegensatz zu dieser kompatibel mit Methoden der Massenspektrometrie, und es gibt keine bekannten Komplikationen mit der Anfärbung von Glykoproteinen.

2.2.8.1 Fluoreszenzfärbung der PA-Gele

Färbung der Phosphoproteine: Zur selektiven Anfärbung der Phosphoproteine diente der Fluoreszenzfarbstoff "Pro-Q® Diamond" (Cat. No. P33300, Invitrogen, Karlsruhe, BRD). Direkt nach dem Lauf wurden die Gele in PP-Schalen überführt und in *Gel-Fixier-Puffer* inkubiert. Die Fixierung erfolgte bei RT unter leichtem Schütteln (ca. 50 rpm). Die Inkubationszeit betrug zunächst 30 min. Anschließend wurde der *Gel-Fixier-Puffer* erneuert und über Nacht inkubiert. Es folgten drei Waschschritte in A.bd. bevor die Gele für 2 h in abgedeckten Schalen mit unverdünnter Farbstofflösung behandelt wurden. Zur Reduzierung des Backgroundsignals und unspezifischer Farbstoffbindung folgten drei Entfärbeschritte für jeweils 30 min in "destaining solution" (Cat. No. P33310, Invitrogen, Karlsruhe, BRD). Danach wurde 2× für 10 min in A.bd. gewaschen, um korrosiven Schaden am Gel-Scanner (siehe 2.2.9) zu vermeiden.

Färbung aller Proteine: Zur Anfärbung der Totalproteine in den PA-Gelen kam der Fluoreszenzfarbstoff "Sypro® Ruby" (Cat. No. S12000, Invitrogen, Karlsruhe, BRD) zum Einsatz. Gele, deren Phosphoproteine bereits mit "Pro-Q® Diamond" angefärbt wurden, wurden nach dem Scannen erneut in A.bd. gewaschen und anschließend sofort über Nacht in unverdünnter Farbstofflösung inkubiert. Alle anderen Gele wurden direkt nach dem Lauf zunächst in *Gel-Fixier-Puffer* inkubiert. Die Fixierung erfolgte bei RT unter leichtem Schütteln (ca. 50 rpm). Die Fixierzeit betrug für mini-Gele (siehe 2.2.4) 2× 15 min und für 2D-Gele (siehe 2.2.5) 2× 30 min. Es folgte ein kurzer Waschschritt in A.bd. bevor die Gele ebenfalls über Nacht in abgedeckten PP-Schalen bei RT und ca. 50 rpm mit dem ca. zehnfachen Gelvolumen an unverdünnter Farbstofflösung inkubiert wurden. Zur Reduzierung der Backgroundfluoreszenz wurden die Gele nach der Färbung in saubere Schalen transferiert und darin 2× 30 min in *Gel-Wasch-Puffer* gewaschen. Es folgten zwei weitere Waschschritte in A.bd., um korrosiven Schaden am Gel-Scanner (siehe 2.2.9) zu vermeiden.

2.2.8.2 Fluoreszenzfärbung der NC-Blotmembranen

Färbung der Phosphoproteine: Zur selektiven Anfärbung der Phosphoproteine auf der NC-Membran diente der "Pro-Q® Diamond Phosphoprotein Blot Stain Kit" (Cat. No. P33356, Invitrogen, Karlsruhe, BRD). Direkt nach dem Blocken (siehe 2.2.6) wurden die Blots in PP-Schalen überführt und 10 min bei RT und 50 rpm in *Blot-Fixier-Puffer* inkubiert. In dieser Zeit wurde zur Vorbereitung der Färbelösung "Pro-Q Diamond blot stain

reagent" (Component A) 1000fach in "Pro-Q® Diamond blot stain buffer" (Component B) verdünnt (für einen 2D-Blot (18×20 cm) 200 μl Component A in 200 ml Component B). Vor der Inkubation in dieser Färbelösung wurden die Blots 4× 5 min in A.bd. gewaschen. Die Färbung wurde in abgedunkelten Schalen bei RT und ca. 50 rpm für 20 min durchgeführt. Der Hintergrund wurde im Anschluss durch dreimaliges Waschen für je 5 min in "destain solution" (Cat. No. P33310, Invitrogen, Karlsruhe, BRD) und dreimaliges Waschen für jeweils 5 min in A.bd. entfärbt. Vor der Visualisierung (siehe 2.2.9) wurden die Blots zwischen zwei Stücken Blotting Papier (Cat. No. 3030917, Whatman, Schleicher & Schuell, Dassel, BRD) auf einem Vakuum Gel Trockner (PH-t20, Biotec-Fischer, Reiskirchen, BRD) bei 40 °C 1 h lang getrocknet.

Färbung aller Proteine: Zur Anfärbung der Totalproteine auf den NC-Membranen kam der Fluoreszenzfarbstoff "Sypro® Ruby Protein Blot Stain" (Cat. No. S11791, Invitrogen, Karlsruhe, BRD) zum Einsatz. Die Blots wurden direkt nach dem Elektrotransfer bzw. nach Visualisierung der mit "Pro-Q® Diamond" gefärbten Phosphoproteine zunächst für 15 min bei RT und 50 rpm in Blot-Fixier-Puffer inkubiert. Es folgten fünf Waschschritte für je 5 min in A.bd. Anschließend wurde die Färbung in abgedunkelten Schalen in unverdünnter Farbstofflösung für 20 min bei RT durchgeführt. Überschüssiger Farbstoff wurde dann durch sechsmaliges Waschen in A.bd. für jeweils 5 min entfernt. Vor der Visualisierung (siehe 2.2.9) wurden die Blots zwischen zwei Stücken Blotting Papier (Cat. No. 3030917, Whatman, Schleicher & Schuell, Dassel, BRD) auf einem Vakuum Gel Trockner (PH-t20, Biotec-Fischer, Reiskirchen, BRD) bei 40 °C 1 h lang getrocknet.

2.2.8.3 Optimierung der Färbe- und Detektionsprozedur

Gelfärbung vs. Blotfärbung: Beide Fluoreszenzfarbstoffe sind sowohl als Gel- als auch als Blotfarbstoff erhältlich. Es galt also zunächst herauszufinden, welche qualitativen Unterschiede zwischen diesen Methoden bestehen. Dazu wurden unterschiedliche Mengen des "PeppermintStick™" Molekulargewichtsmarkers in zwei Gelen parallel per 1D SDS PAGE aufgetrennt (siehe 2.2.4) und anschließend zunächst mit ProQ® Diamond und im Anschluss mit Sypro® Ruby angefärbt. Die Proteine eines der Gele wurden vor der Anfärbung auf NC-Membran transferiert (siehe 2.2.6).

Aus Abb. 2-7, die das Ergebnis eines solchen Experimentes zeigt, geht hervor, dass tatsächlich Unterschiede bestehen. Es ist erkennbar, dass die Signalstärke auf den Blots in beiden Fällen deutlich höher ist, was höchstwahrscheinlich auf die höhere lokale Konzentration der Proteine an einer Membranoberfläche, verglichen mit der in einer 1 mm dicken Gelmatrix zurückzuführen ist. Zudem ist es vorstellbar, dass die Farbstoffmoleküle ihre auf einer Oberfläche immobilisierten Targets deutlich besser erreichen können, als wenn sie in eine Gelmatrix diffundieren müssen. Ein weiterer Vorteil der Blotfärbung ist der geringere Zeitaufwand verglichen mit den Gelfärbeprotokollen. Zudem sind die Blots keinen Größenschwankungen durch Aufquellen und Schrumpfen während dieser Prozeduren unterworfen (wie das bei den Gelen der Fall ist), was ein späteres Matching der images erleichtert. Nachteilig sind jedoch der höhere Material-

und damit Kostenaufwand der Blotfärbung und die Tatsache des ebenfalls höheren Backgroundsignals verglichen mit der Gelfärbung.

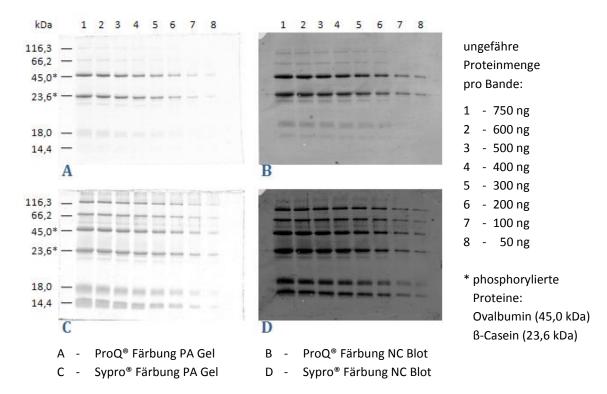
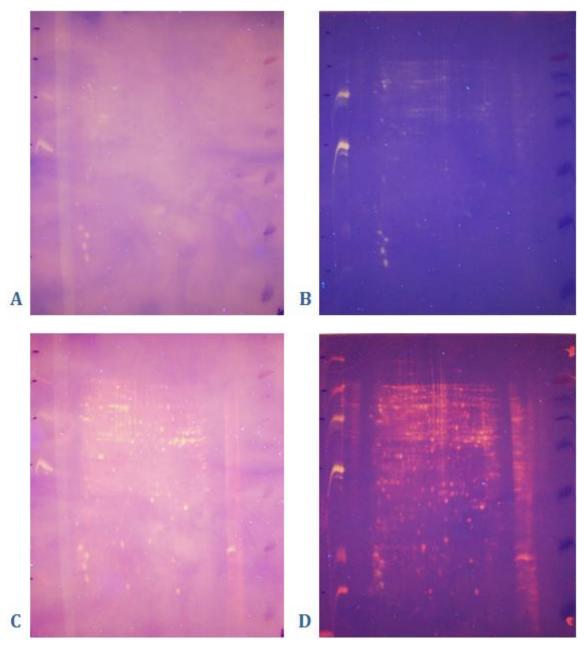


Abb. 2-7 Vergleich zwischen Gel- und Blotfarbstoffen bei der Fluoreszenzfärbung. Die Bilder zeigen die in das *.tif Format konvertierten, von den Scannern gelieferten images. Außer einer Größenanpassung wurden keine Manipulationen (wie z.B. Helligkeits- oder Kontrastveränderungen) vorgenommen.

Blocking: Eine Reduzierung des Hintergrundsignals wird bei dem Western-Blot-Verfahren vor allem durch das Blocken der freien Bindungstellen auf der Blotmembran erreicht. Da hier aber mit Proteinfarbstoffen gearbeitet wurde, kamen proteinhaltige Blockpuffer, z.B. BSA-, Magermilchpulver- oder Casein-haltige, nicht in Frage (letzterer enthält zudem phosphoryliertes Protein). Jedoch stehen in jüngerer Zeit auch proteinfreie Polymerblockierungslösungen zur Verfügung wie beispielsweise "Roti®-Block" (Cat. No. A151, Carl Roth, Karlsruhe, BRD). Abb. 2-8 zeigt die Fotos zweier NC-Blots, aufgenommen² jeweils nach der Anfärbung der Phosphoproteine mit "ProQ®-Diamond" (A und B) bzw. der Totalproteinfärbung mit "Sypro®-Ruby" (C und D), von denen ein Blot unbehandelt gefärbt wurde (A und C) während bei dem anderen eine nächtliche Inkubation in "Roti®-Block" (siehe 2.2.6) den Färbeprozeduren vorrausging (B und D). Es ist in beiden Fällen erkennbar, dass das Hintergrundsignal durch das Blocking tatsächlich reduziert werden konnte. Außerdem konnten keine Interaktionen des Blockingpolymers mit den Farbstoffen festgestellt werden.

-

 $^{^{2}}$ fotografiert mit einer Camedia E-10, Olympus, Hamburg, BRD unter UV Beleuchtung (λ = 365 nm)



2D-Auftrennung löslicher Proteine aus Eschscholzia californica geblottet auf NC-Membran.

- A ProQ[®] Färbung NC Blot ohne Blocking
- B ProQ® Färbung NC Blot geblockt
- C Sypro® Färbung NC Blot ohne Blocking
- D- Sypro® Färbung NC Blot geblockt

Abb. 2-8 Vergleich des Hintergrundsignals nach Fluoreszenzfärbung mit und ohne Blocking.

2.2.9 Visualisierung und Digitalisierung der gefärbten Gele und Blots

Zur Erstellung digitaler Bilddateien aus den gefärbten Gelen, Blots und Fotofilmen wurden verschiedene Geräte benutzt. Übersichtsfarbbilder wurden mit einer Digital-kamera (Camedia E-10, Olympus, Hamburg, BRD) aufgenommen, und im JPEG-Format gespeichert. Dateien dieses komprimierten Formates wurden nicht zur Analyse der Bildinformation, sondern lediglich zu Anschauungszwecken verwendet.

Belichtete Fotofilme (siehe 2.2.7) wurden mit einem Büroscanner (Scanjet 3400C, Hewlett-Packard, Böblingen, BRD) Auflösung: 600 dpi gescannt und unkomprimiert im 16 bit "Tagged Image File Format (TIF)" gespeichert.

Die mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbten Medien wurden mithilfe von Fluoreszenzimagern ("Storm™ 860" bzw. Typhoon 9200, GE-Healthcare, Freiburg, BRD) gescannt. Dazu wurden die getrockneten NC-Membranen (siehe 2.2.8.2) mit der Gelseite nach unten bzw. die in A.bd. inkubierten PA-Gele (siehe 2.2.8.1) direkt auf die Scanner-oberfläche gelegt und mit den in Tab. 2-1. angegebenen Einstellungen gescannt.

Farbstoff	Imager	Extinktion	Emission	Medium	Voltage	Pixelgröße
Sypro® Ruby	Storm	450 nm (blue)	520 nm LP	PA-Gel	1000 V	100 Mikrons
				NC-	700 V	
				Membran		
Pro-Q [®] Diamond	Typhoon	532 nm (green)	560 nm LP	PA-Gel	250 V	
				NC-	200 V	
				Membran		

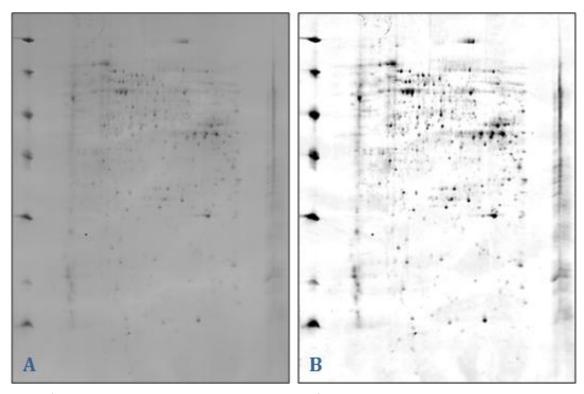
Tab. 2-1 Scaneinstellungen an Fluoreszenzimagern zur Digitalisierung gefärberter Gele und Blots.

Die von der Scannersoftware erzeugten digitalen Bilddateien wurden in einem softwareeigenen Format (*.gel) ausgegeben. Handelsübliche Grafikprogramme können dieses dekadisch scalierte Grafikformat i.d.R nicht darstellen, daher wurden die Dateien zu Darstellungszwecken mit der Software "ImageQuant 5.2" (GE-Healthcare, Freiburg, BRD) in das 8 bit "Tagged Image File Format (TIF)" umgewandelt. Diese Umwandlung stellt eine Manipulation der Rohdaten dar und ist zudem mit einem gewissen Datenverlust verbunden. Aus diesem Grund wurden zur quantitativen Analyse der Bilddaten ausschließlich die unveränderten GEL-Dateien (siehe 2.2.10) verwendet.

2.2.10 Analyse der durch 2D-Elektrophorese getrennten Proteinmuster mit "Delta2D 3.6"

Zur Analyse und Auswertung der durch 2D-Gel-Elektrophorese aufgetrennten Proteinmuster kam die Software "Delta2D" Version 3.6 (Decodon, Greifswald, BRD) zum Einsatz. Diese Software bietet in Funktionalität und Workflow entscheidende Vorteile gegenüber den meisten anderen auf dem Markt befindlichen Programmen dieser Art. Diese erhöhen deutlich die Verlässlichkeit der erhaltenen Ergebnisse.

Zunächst wurden die images der Gele bzw. Blots (siehe 2.2.9) in das Programm importiert und Replikate entsprechenden Gruppen zugeordnet (es wurden ausschließlich die unveränderten Rohdaten der von den Imagern gelieferten Dateien (*.gel) verwendet, lediglich "spiegeln", "drehen" und "invertieren" sind von der Software zugelassene Manipulationen der Rohdaten). Es war möglich, die images ohne Hintergrund und kontrastverstärkt darzustellen [Abb. 2-9], jedoch wurden diese Manipulationen bei der späteren Analyse nicht berücksichtigt, sie dienten lediglich der besseren Erkennung.



2D-Auftrennung löslicher Proteine aus Eschscholzia californica

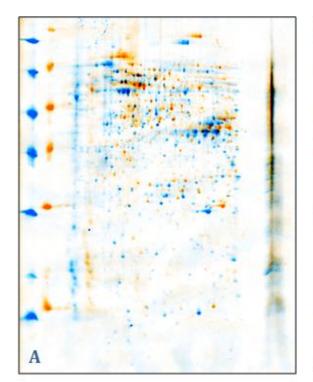
Behandlung: Kontrolle

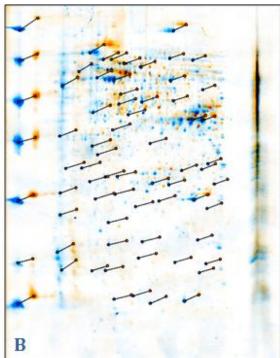
Medium: NC-Membran A - unverändertes image

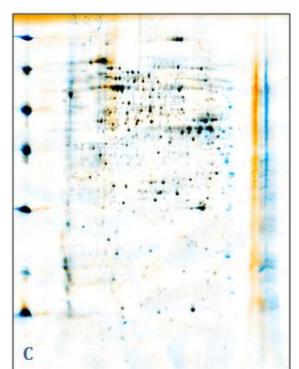
Färbung: Sypro® Ruby B - kontrastverstärktes image ohne Background

Abb. 2-9 Möglichkeiten der Darstellungsverbesserung unter Delta2D.

Den nächsten Arbeitsschritt stellt das sogenannte "warping" dar. Dabei wurden die Gelbilder gegenseitig durch Drehen, Schieben und Verzerren zur Deckung gebracht. Als Werkzeug dafür dienten die "Match-Vektoren". Diese wurden sowohl manuell als auch automatisch gesetzt, wobei jeder automatisch gesetzte Vektor nach visueller Prüfung verifiziert oder verworfen wurde. Das warping wird umso exakter, je mehr Vektoren vorhanden sind und je gleichmäßiger diese über das Gelbild verteilt sind [Abb. 2-10].







2D-Auftrennung löslicher Proteine aus

Eschscholzia californica

Medium: NC-Membran
Färbung: Sypro® Ruby

Master Gel Image: Kontrolle Sample 1
Sample Gel Image: Kontrolle Sample 2

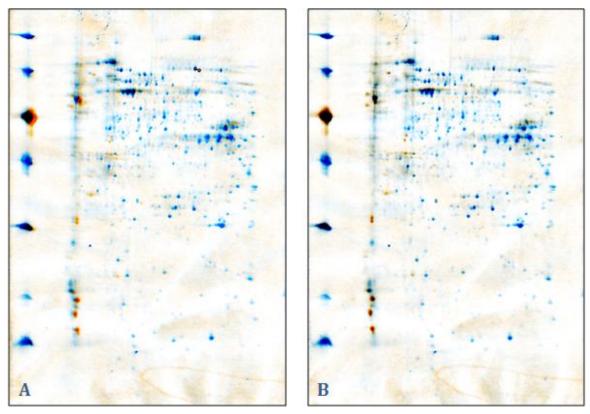
A - einfaches Overlay

B - Overlay mit gesetzten Match Vektoren

C - gewarptes Overlay

Abb. 2-10 Warping-Prozedur am Beispiel zweier biologischer Replikate.

Es war nicht notwendig, jedes image eines Projektes mit jedem anderen manuell zur Deckung zu bringen. Die Software ermöglichte durch die richtige "warp-Strategie" das automatische Überlagern von Gelen. Zunächst wurden jeweils die images des gleichen Blots (ProQ® Diamond- und Sypro® Ruby Färbung) manuell zur Deckung gebracht. Da in diesen Fällen eine Verschiebung lediglich durch die unterschiedliche Positionierung auf dem Scanner zustande kam, waren hier nur ein bis zwei Matchvektoren notwendig [Abb. 2-11].



2D-Auftrennung löslicher Proteine aus *Eschscholzia californica;* Medium: NC-Membran.

Master Gel Image: Kontrolle Sample 1, Färbung Sypro® Ruby Sample Gel Image: Kontrolle Sample 1, Färbung ProQ® Diamond

- A Overlay mit gesetztem Match Vektor
- B gewarptes Overlay

Abb. 2-11 Overlay und warping beider images desselben Blots.

Anschließend wurden alle Totalprotein-images (Sypro® Ruby Färbung) mit einem "Masterimage" aus dem Projekt ebenfalls manuell zur Deckung gebracht ("All-to-one Strategy") [Abb. 2-12]. Für diese manuellen Überlagerungen wurde der Modus "exact" gesetzt. Alle übrigen "warpings" wurden daraus von der Software über den Modus "implicid" berechnet [Abb. 2-13].

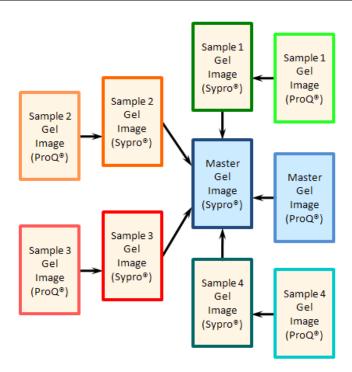
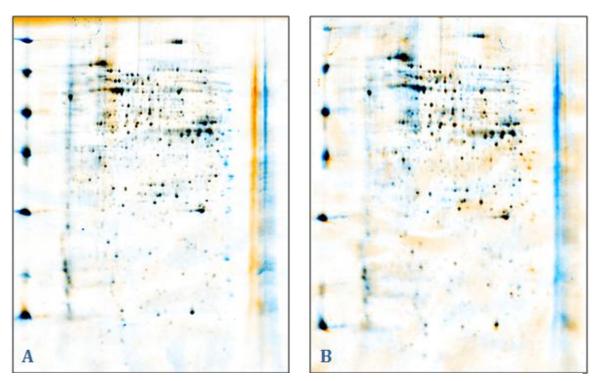


Abb. 2-12 "All-to-one" warp-Strategie.



2D-Auftrennung löslicher Proteine aus *Eschscholzia californica;* Medium: NC-Membran; Färbung Sypro® Ruby

- A Master Gel Image: Kontrolle Sample 1 Sample Gel Image: Kontrolle Sample 2 Warpmodus: "exact" (manuell)
- B Master Gel Image: Kontrolle Sample 2 Sample Gel Image: Kontrolle Sample 3 Warpmodus: "implicid" (automatisch)

Abb. 2-13 Vergleich von manuellem und automatischem warping.

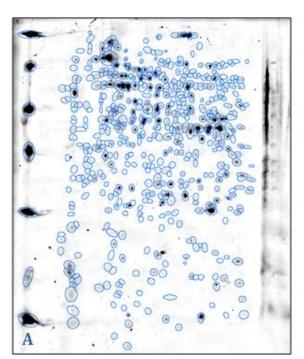
Nach dem warping konnte durch Übereinanderlegen aller ProQ® Diamond sowie aller Sypro® Ruby images jeweils ein sogenanntes "Fusion-image" erstellt werden. Dabei handelt es sich um ein fiktives Gelbild, das sämtliche Spots aller beteiligten Bilder enthält. Als "Fusion Type" wurde der Algorithmus "Union" gewählt. Dieser setzt das Fusionimage aus den Durchschnittswerten der Pixel der beteiligten Bilder zusammen, wobei dunklere Pixel stärker gewichtet werden. Auf diese Weise sind Spots die nur auf wenigen Bildern vorhanden sind, trotzdem auf dem Fusion-image präsent. Gleichzeitig resultieren leichte Abweichungen in der Spotposition dennoch in realistisch aussehenden Spots [Abb. 2-14].

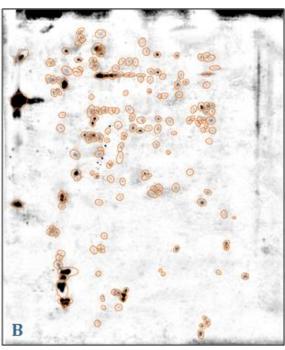
Der für eine korrekte Analyse wichtigste Arbeitsschritt, die Spotdetektion, wurde im Anschluss auf diesen Fusion-images vorgenommen. Die Detektion erfolgte automatisch,

mit folgenden Parametern: Sensitivität: 18 %

durchschnittliche Spotgröße: 15 lokale Background-Region: 60

Jeder Spot wurde anschließend der manuellen Prüfung unterzogen und so verifiziert oder verworfen. Für die visuelle Prüfung der Spots stand u.a. das Hilfsmittel "3D-Ansicht" zur Verfügung. Hiermit war es sehr gut möglich, Spots von Hintergrund und Färbeartefakten wie "speckles" zu differenzieren [Abb. 2-15].

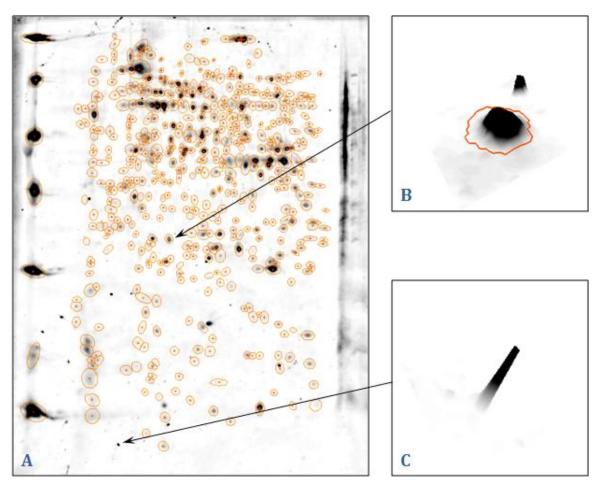




2D-Auftrennung löslicher Proteine aus Eschscholzia californica; Medium: NC-Membran

A - Färbung: Sypro® Ruby
B - Färbung: ProQ® Diamond

Abb. 2-14 Fusion-images mit detektierten Spots.



2D-Auftrennung löslicher Proteine aus *Eschscholzia californica;* Medium: NC-Membran;

Färbung: Sypro[®] Ruby

- A Fusion-image mit detektierten Spots
- B detektierter Spot in 3D-Ansicht
- C "Speckle" in 3D-Ansicht

Abb. 2-15 Spot Detektion, Verifizierung mithilfe der 3D-Ansicht.

Die so erhaltenen Spot-Muster wurden dann auf die Gel-images übertragen, die zuvor an der Erstellung des Fusion-images beteiligt waren. Auf diese Weise musste die Detektion selbst in jedem Projekt nur einmal pro Färbung durchgeführt werden, und es ergab sich ein 100 %iges matching (jeder Spot ist auf jedem image detektiert).

Für die quantitative Analyse berechnete die Software für jeden Spot auf jedem image sein "Volume" aus seiner Größe und Intensität. Damit jedoch Vergleiche zwischen verschiedenen images möglich sind, mussten diese "Volumes" relativiert werden, um Schwankungen durch kleine Unterschiede in der eingesetzten Proteinmenge, den Färbeund Entfärbezeiten sowie der Lichtexposition usw. auszugleichen. Das relative "Volume" ("%Volume") eines Spots wurde aus dem Quotienten aus seinem absoluten "Volume" und der Summe aller absoluten "Volumes" des images $\left(\text{%Volume(Spot)} = \frac{\text{Volume(Spot)}}{\sum \text{Volume(image)}}\right)$ gebildet. Da auch recht kleine Unterschiede besonders großer Spots einen großen Einfluss auf diese Normalisierung haben und somit die Änderungen bei schwächeren Spots verfälschen können, wurden jeweils die zehn Spots mit den größten Volumes von der Normalisierung ausgeschlossen, d.h. ihre Volumes wurden nicht in " \sum Volume (image)"

einbezogen. Die Markerproteinspots wurden ebenfalls von der Normalisierung ausgeschlossen.

Um Proteine aufzufinden, deren Phosphorylierungsgrad sich abhängig von den beschriebenen Behandlungen (niedrige/hohe Elicitorkonzentrationen bzw. künstliche pH-shifts siehe 2.1.2) ändert, wurden mithilfe der Filter-Funktionen der "Quantitation Table" nach Spots gesucht, die folgende Bedingungen erfüllen:

- 1. Die relative Standardabweichung der normalisierten Spotvolumina innerhalb einer Gruppe (*Kontrolle, Eli1, Eli50* bzw. *pH*) musste unter 35 % liegen ("rsd" < 35).
- 2. Die Signalstärke des Phosphorylierungssignals (Pro-Q® Färbung) musste sich in wenigstens einer Proben-Gruppe (Eli1, Eli50 oder pH) im Vergleich zur Kontrolle entweder mindestens verdoppeln (Verhältnis ≥ 2) oder halbieren (negativ reziprokes Verhältnis ≤ -2) (-2 ≥ "ratio" ≤ 2; wobei "ratio" = "median Proben-Gruppe" / "median Kontrolle").
- 3. Die Gruppe der Effektor-behandelten Proben musste sich von der Kontrollgruppe signifikant unterscheiden ("t-test" ≥ 90).
- 4. Die Spots, die Bedingungen 1. bis 3. erfüllen, mussten in drei unabhängigen 2D-Projekten auftauchen.

Diese Spots wurden markiert und gelabelt. Die Namen der Spots wurden mithilfe folgender Nomenklatur zusammengesetzt:

p zeigt an, dass es sich um die Änderung eines Phosphorylierungssignals handelt;

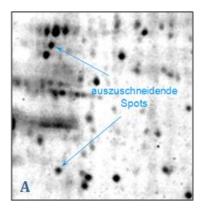
E1/E50/pH gibt an, bei welcher Behandlung die Parameter erfüllt wurden.

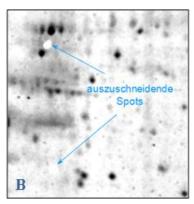
u/d gibt an, ob es sich um eine Signalverstärkung (u) oder -verringerung (d) handelt;

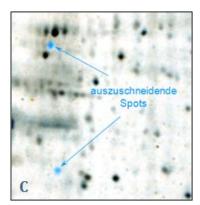
laufende Nummer (wenn mehrere Spots bei jeweils gleichen Behandlungen aufgefallen sind).

2.2.11 Identifizierung von Proteinspots mithilfe der Massenspektrometrie

Für die massenspektrometrische Identifizierung einzelner Proteinspots wurden diese aus mit Sypro® Ruby gefärbten Gelen zunächst ausgeschnitten. Um Kontaminationen z.B. mit Fremdprotein möglichst gering zu halten, wurde zu dieser Arbeit entsprechende Schutzkleidung getragen. Die ausgeschnittenen Gelstücke wurden in sterile 0,5 ml Reaktionsgefäße (Cat. No. 0030 124.502, Eppendorf, Hamburg, BRD) überführt. Um sicherzustellen, dass das richtige Gelstück ausgeschnitten wurde, wurden die Gele vor und nach dem Ausschneiden gescannt und die images verglichen [Abb. 2-16].







2D-Auftrennung löslicher Proteine aus *Eschscholzia californica;* Medium: PA-Gel;

Färbung: Sypro® Ruby

- A Ausschnitt aus Gelimage vor dem Ausschneiden
- B Ausschnitt aus Gelimage nach dem Ausschneiden
- C Overlay aus A und B

Abb. 2-16 Vergleich der images eines Gels vor und nach dem Ausschneiden von Spots.

In-Gel Trypsin Verdau:

Zur massenspektrometrischen Analyse der Proteine mussten diese zunächst in kleinere Peptide gespalten und aus der Gelmatrix eluiert werden. Sämtliche Arbeitsschritte wurden zur Vermeidung von Kontamination mit menschlichem Keratin unter einer Laminar Air Flow Box und mit entsprechender Schutzkleidung durchgeführt.

Zunächst wurden die Gelstücke $1 \times$ mit $20 \,\mu$ l A.bd., $4 \times$ mit $20 \,\mu$ l Waschlösung und $1 \times$ mit $20 \,\mu$ l ACN für jeweils $10 \,\mu$ l min unter leichtem Schütteln gewaschen und anschließend luftgetrocknet.

Während dieser Zeit wurden eine 10 mM DTT- und eine 55 mM IAA-Lösung in 25 mM NH_4HCO_3 in A.bd. frisch hergestellt. Die getrockneten Gelstücke wurden zunächst mit 25 μ l der DTT-Lösung für 1 h bei 56 °C inkubiert. Es folgte eine kurze Zentrifugation, nach der die Lösung entfernt wurde. Anschließend wurden die Gelstücke mit 25 μ l IAA-Lösung für 45 min bei RT in Dunkelheit inkubiert. Nach dem Entfernen der Lösung wurden die Gelstücke 1× mit 20 μ l 25 mM NH_4HCO_3 und 3× mit 20 μ l Waschlösung für jeweils 10 min unter leichtem Schütteln gewaschen und erneut luftgetrocknet.

Währenddessen wurde eine Lösung aus einem Teil *Trypsin-Puffer* und neun Teilen *Verdaupuffer* hergestellt. 10 µl dieser Lösung wurden zu den trockenen Gelstücken hinzugegeben und diese bei 4 °C für 45 min quellen gelassen. Nach der Zugabe von weiteren 15 µl *Verdaupuffer* erfolgte eine Inkubation bei 37 °C über Nacht. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und aus den Gelstücken die verbliebenen Peptide anschließend 2× mit je 15 µl *Elutionspuffer* für 10 min extrahiert. Alle abgenommenen Extrakte wurden in einem neuen Reaktionsgefäß vereint.

Für die massenspektrometrische Analyse war zunächst ein Aufkonzentrieren und Entsalzen der Probe notwendig. Dafür kamen ZipTip® (Cat. No. ZTC18S, Millipore, Schwalbach, BRD) Pipettenspitzen zum Einsatz. ZipTip $_{\text{C18}}$ Spitzen wurden zunächst 2× mit 10 μ l ACN befeuchtet und anschließend 2× mit 10 μ l 1 %iger TFA-Lösung equilibriert. Im Anschluss wurden die Peptide an die C18-Matrix der ZipTip® durch zehnmaliges Auf- und

Abpipettieren der Probe gebunden. Es folgten zwei Waschschritte mit je 10 μ l 1 %iger TFA-Lösung bevor die Peptide mit insgesamt 10 μ l einer Lösung aus gleichen Teilen 0,1 % TFA in A.bd. und ACN eluiert wurden.

Massenspektrometrische Analyse:

Für die MS und MS/MS Analysen wurde ein "Ultimate" Nano-HPLC-Systems (LC Packings/Dionex, Germering, BRD), mit einem qTOF Massenspektrometer "Q-TOF-2" (Waters/Micromass, Manchester, UK) gekoppelt. Dieses war neben der nanoESI-Z-Spray-Quelle mit einem Tipadapter für PicoTips® (New Objective, Woburn, MA, USA) ausgestattet. Für die Probenapplikation wurden "Distal Coated SilicaTips™" (Cat. No. FS360-20-10-D-5, New Objektiv, Woburn, MA, USA) verwendet. Zur chromatographischen Trennung der Peptide wurde eine "Acclaim PepMap100" Säule (C18, 3 μm, 100Å, 75 μm ID × 150mm; Dionex, Germering, BRD) mit 1 μl Probelösung (siehe oben) beladen. Für die Eluierung wurde folgender linearer, binärer Gradient verwendet: 5-65 % ACN in 0,1 % TFA in 35 min, für 10 min bei 65 % gehalten und von 65-5 % ACN in 0,1 % TFA in 10 min.

Der TOF Analysator wurde extern mithilfe einer Mischung aus NaI und CsI kalibriert. Die Arbeitseinstellungen für das Massenspektrometer waren: positiver Ionisationsmodus, Kapillarspannung: 1400 V bis 1800 V, Konusspannung: 35 V, Quellentemperatur: 80 °C. MS Experimente wurden über einen *m/z*-Bereich von 300 bis 2700 durchgeführt. Tandemmassenspektrometrische Untersuchungen wurden unter Nutzung von CID nach einem vollständigen Scan und der manuellen Auswahl der Peptide durchgeführt. Der Quadrupol-Massenfilter, der dem TOF Analysator vorgeschaltet war, wurde mit "low mass" (LM) und "high mass" (HM) Auflösungseinstellungen von 10 (willkürliche Einheit) justiert und die CID Kollisionsenergie wurde, abhängig vom Ladungsstatus und dem *m/z*-Verhältnis, zwischen 18 eV und 60 eV variiert.

Die von den qTOF-Experimenten gewonnenen MS/MS-Spektren wurden mithilfe der Software "MassLynx" Version 4.0 (Waters/Micromass, Milford, MA, USA) aufgenommen und anschließend mithilfe des MassLynx add-on's "Maximum Entropy 3" (MaxEnt3) prozessiert. Die Daten wurden in "SEQUEST"-Dateien (*.dta) konvertiert und standen so für weitere Analysen zur Verfügung.

Die Fragment-Ionen-Peaklisten wurden durch Suche in Sequenzdatenbanken mit Mascot-Software (Matrix Science, London, UK: http://www.matrixscience.com) analysiert. Für diese Suche wurden die Datenbanken "Mass Spectrometry protein sequence DataBase" (MSDB) sowie "SwissProt" verwendet. Die eingestellten Suchparameter lauteten:

Type of search : MS/MS Ion Search

Enzyme : Trypsin

Variable modifications : Acetyl (Protein N-term), Carbamidomethyl (C), Dioxidation

(M), Oxidation (M), Propionamide (C), Sulphone (M)

Mass values : Monoisotopic
Protein Mass : Unrestricted

Peptide Mass Tolerance : $\hat{A}\pm 0.3$ Da Fragment Mass Tolerance : $\hat{A}\pm 0.3$ Da

Max Missed Cleavages : 1

Instrument type : ESI-QUAD-TOF

Number of queries : 50

Automatische de novo-Sequenzierung der nanoESI-qTOF Daten und anschließender Datenbankabgleich mit "PEAKS Protein ID" und "SPIDER" (Han, et al., 2005) wurden mithilfe der "in-chorus" Suche der Software "PEAKS Studio" Version 4.5 (Bioinformatics Solutions) (Ma, et al., 2003) mit den gleichen Einstellungen für "enzyme" und Massenfehlertoleranzen für Precursor- und Fragmentionen wie bei der Mascot Suche durchgeführt.

2.2.12 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

"MICROLON® 600" Microtiter-Platten (Cat. No. 655080, Greiner Bio-One, Frickenhausen, BRD) wurden durch Zusatz von 100 µl Antigen-Lösung (in TBS) pro well und Inkubation bei RT, abgedeckt über Nacht beschichtet. Die beschichteten Platten wurden dreimal mit TBS-T gewaschen und die freien Bindungstellen der wells für 2 h bei RT mit 200 μl 1× "Roti®-Block" (Cat. No. A151, Carl Roth, Karlsruhe, BRD) abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wurden den wells 90 μl primärer Mausantikörper (0,2 μg/ml) in "LowCross-Buffer®" (Cat. No. 100500, CANDOR-Bioscience, Weißensberg, BRD) zugesetzt und für 90 min bei RT inkubiert. Es folgten fünf Waschschritte mit TBS-T, bevor jedem well 100 μl Sekundärantikörper (0,08 μg/ml, goat-anti-mouse-HRP, sc-2031, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) in "LowCross-Buffer®" zugesetzt wurde. Es folgte wiederum eine 90-minütige Inkubation bei RT. Anschließend wurde 5× mit TBS-T gewaschen. Für die Visualisierung wurde ein 11 ml Aliquot ABTS-Substrat aufgetaut und unmittelbar vor Benutzung mit 10 μl H₂O₂ (35 %) versetzt. Von dieser Detektionslösung wurden 100 µl pro well eingesetzt und die Farbreaktion für 30 min bei RT ablaufen gelassen, bevor sie durch Zusatz von 50 μl SDS/DMF-Lösung gestoppt wurde. Zur Quantifizierung wurde die Absorption bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ gemessen (MRX Microplate Reader, Dynatech Laboratories, Chantilly, USA).

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Nukleinsäureextraktion

2.3.1.1 DNA-Extraktion aus Eschscholzia californica

Zur Gewinnung von gDNA aus *Eschscholzia californica* kam das "Nucleon Phytopure Genomic DNA Extraction Kit" (Cat. No. RPN8511, GE-Healthcare, Freiburg, BRD) zum Einsatz. Zunächst wurden die suspensionskultivierten Zellen durch Absaugen mit einer Wasserstrahlpumpe vom Medium getrennt und sofort in N_2 liq. schockgefroren. 150 mg gefrorenes Zellpellet wurden in einem vorgekühlten Mörser in N_2 liq. gemahlen bis der Stickstoff verdampft war. Das erhaltene Zellmehl wurde in ein ebenfalls vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in 600 μ l "Reagent 1" aufgetaut. Die Mischung

wurde im Reaktionsgefäß mit einem PP-Pistill homogenisiert und anschließend RNase ("Ribouclease A from bovine pancreas", Cat. No. R5500, Sigma Aldrich, München, BRD) zu einer Endkonzentration von 20 μg/ml zugesetzt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 37°C. Danach wurden 200 µl "Reagent 2" hinzugefügt und der Inhalt des Reaktionsgefäßes durch mehrmaliges Invertieren vermischt. Darauf folgte zunächst eine 10minütige Inkubation bei 65 °C und ca. 500 rpm (Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg, BRD) und anschließend eine Inkubation auf Eis (≈0°C) für 20 min. Nach Zugabe von 500 μl vorgekühltem (-20 °C) Chloroform und 100 μl "Nucleon PhytoPure DNA extraction resin" wurde die Probe 10 min bei RT gelagert und während dieser Zeit mehrmals invertiert. Es folgte eine Zentrifugation mit 1300 g für 10 min (Centrifuge 5403, Eppendorf, Hamburg, BRD). Anschließend wurde die obere, DNA-haltige Phase vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die gleiche Menge iso-Propanol (4 °C) zugesetzt. Nach vorsichtigem Mischen folgte eine Zentrifugation mit 4000 g für 5 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit kaltem (4 °C) Ethanol p.a. (70 % (V/V)) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (4000 g, 5 min) und Entfernen des Überstandes wurde das Pellet an der Luft für 10 min bei RT getrocknet und die DNA anschließend in sterilisiertem A.bd. gelöst.

2.3.1.2 DNA Extraktion aus Escherichia coli

Zur Gewinnung der Plasmid-DNA aus 5 ml Suspensionskulturen transformierter E. coli (siehe 2.4.1.3) diente das "Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System" (Cat. No. A1330, Promega, Mannheim, BRD). Wie darin angegeben wurde 1 ml jeder Kultur in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, BRD) gegeben und 1 min mit 10.000 g zentrifugiert (Centrifuge 5403, Eppendorf, Hamburg, BRD). Nach vorsichtigem Entfernen des Überstandes wurden diese Schritte solange wiederholt, bis die Zellen der gesamten 5 ml Kultur pelletiert waren. Die Zellen wurden anschließend in 250 μl "Cell Resuspension Solution" durch Auf- und Abpipettieren und Vortexen resuspendiert. Nach Zusatz von 250 µl "Cell Lysis Solution" wurde vorsichtig durch viermaliges Invertieren gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Diese Schritte wurden nach Zusatz von 10 μl "Alkaline Protease Solution" wiederholt. Es wurden 350 µl "Neutralisation Solution" zugesetzt und nach sofortigem Durchmischen mit 14.000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand (gereinigtes Lysat) wurde vorsichtig in eine "Spin Column", die zuvor in einem 2 ml "Collection Tube" positioniert wurde, übertragen. Es folgte eine Zentrifugation der Säulen mit 12.000 g für 1 min. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 750 µl "Column Wash Solution" auf die gleiche Weise gewaschen. Der Waschschritt wurde mit 250 μl "Column Wash Solution" wiederholt. Anschließend wurde die "Spin Column" in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert und 50 µl Nuklease-freies A.bd. auf die Säule gegeben. Nach einer Inkubation bei RT für 10 min wurde 5 min mit 10.000 g zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend verworfen und das DNA-haltige Eluat verwendet bzw. bei -20 °C gelagert.

2.3.1.3 DNA Extraktion aus Agarose Gel Matrix

Um die mittels Agarose-Gel-Elektrophorese getrennte DNA (siehe 2.3.5) ggf. zurückzugewinnen, wurde das QIAquick® Gel Extraction Kit (Cat. No. 28704, Qiagen, Hilden, BRD) verwendet. Die DNA-Bande im Gel wurde kurz unter UV-Licht markiert, anschließend ausgeschnitten und das Gelstück in ein steriles, austariertes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Nach Zugabe des dreifachen Gelvolumens an "Buffer QG" wurde das Gel bei 50 °C für 10 min unter Schütteln (ca. 100 rpm, Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg, BRD) aufgeschmolzen. Anschließend wurde das einfache Gelvolumen an iso-Propanol zugesetzt und durch Schütteln gemischt. Die Probe wurde dann in eine "QIAquick spin column" überführt, die zuvor in einem 2 ml "collection tube" positioniert wurde. Nach einer Zentrifugation mit 10.000 g für 1 min wurde der Durchfluss verworfen und die Säule in gleicher Weise mit 500 µl "Buffer QG" gewaschen. Dieser Waschschritt wurde mit 750 µl "Buffer PE" wiederholt. Anschließend wurde die "QIAquick spin column" in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert und 50 μl Nuklease-freies A.bd. auf die Säule gegeben. Nach einer Inkubation bei RT für 10 min wurde 5 min mit 10.000 g zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend verworfen und das DNA-haltige Eluat verwendet bzw. bei -20 °C gelagert.

2.3.1.4 RNA Extraktion aus Eschscholzia californica Keimwurzeln

Für die Gewinnung und Aufreinigung der RNA aus Keimwurzeln von Eschscholzia californica wurde das NucleoSpin® RNA Plant Kit (Cat. No. 740949, Macherey-Nagel, Düren, BRD) verwendet: zunächt wurden ca. 100 mg frische Keimwurzeln in N₂ liq schockgefroren und gemörsert. Das gefrorene Gewebemehl wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß durch Zugabe von 350 μl "Buffer RA1" und 3,5 μl β-ME aufgetaut und die Mischung gevortext. Zur Reinigung des Lysates wurde die Mischung in "NucleoSpin® Filter" überführt und 1 min bei 11.000 g zentrifugiert. Nach der Überführung des gereinigten Lysates in ein neues Reaktionsgefäß wurden 350 μl Ethanol p.a. (70 % (V/V)) zugesetzt. Nach 2-maligem kurzen Vortexen wurde die Lösung auf eine "NucleoSpin® RNA Plant Column" gegeben und 30 s bei 11.000 g zentrifugiert. Zur Entsalzung der Membran kamen 350 µl "MDB (Membran Desalting Buffer)" zum Einsatz, der ebenfalls 1 min bei 11.000 g abzentrifugiert wurde. Für den Verdau der gebundenen DNA musste zunächst "DNase reaction mixture" zubereitet werden. Dazu wurden für jede Probe 10 μl "reconstituted rDNase" und 90 μl "Reaction Buffer for rDNase" in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorsichtig durch leichtes Anstoßen vermischt. Von dieser Mischung wurden 95 µl direkt auf das Zentrum der Membran pipettiert und 15 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 200 µl "Buffer RA2" erfolgte die Inaktivierung der rDNase. Der im Anschluss durchgeführten Zentrifugation für 30 s bei 11.000 g folgten zwei weitere Waschschritte mit 600 μl bzw. 250 μl "Buffer RA3". Zur Trocknung der Membran wurde erneut zentrifugiert für 2 min bei 11.000 g. Die Eluierung der RNA erfolgte mit 60 μl "RNase-free H₂O". Nach erfolgter Konzentrationsbestimmung (siehe 2.3.3) diente die Lösung als Template für die DNA Synthese mittels Reverser Transkriptase Reaktion (RT-Reaktion) (siehe 2.3.2). Reste wurden bei -80 °C gelagert.

2.3.2 DNA Synthese mittels Reverser Transkriptase Reaktion (RT-Reaktion)

Um aus der aus den Keimwurzeln extrahierten RNA ein für PCR nutzbares Template zu gewinnen, wurde unter Verwendung des "RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit" (Cat. No. K1631, Fermentas, St. Leon-Rot, BRD) mittels RT-Reaktion cDNA synthetisiert. Dazu wurden 1 μg RNA Template und 1 μl "oligo (dT)₁₈ primer" in einem 0,250 ml Reaktionsgefäß mit Nuklease-freiem A.bd. auf 12 μl aufgefüllt. Nach kurzer Zentrifugation erfolgte eine Inkubation bei 65 °C für 5 min. Nach Abkühlung auf 4 °C wurden 4 μl "5× Reaction Buffer", 1 μl "RiboLock™ RNase Inhibitor (20 u/μl)", 2 μl "10 mM dNTP Mix" sowie 1 μl "RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase (200 u/μl)" zugesetzt, vorsichtig gemischt und kurz zentrifugiert. Die Inkubation erfolgte für 60 min bei 42 °C bevor die Reaktion durch Erhitzen auf 70 °C für 5 min abgestoppt wurde. Die Lösung diente direkt als PCR Template. Reste wurden für kurze Zeit (max. eine Woche) bei -20°C gelagert.

2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Zur Bestimmung der Nucleinsäurekonzentration nach erfolgter Extraktion (siehe 2.3.1) wurden 5 μ l Lösung mit A.bd. auf 70 μ l verdünnt und die optische Dichte bei λ = 260 nm (OD₂₆₀) und λ = 280 nm (OD₂₈₀) mithilfe eines Spektrophotometers ("Ultrospec 3000", Pharmacia Biotech, Freiburg, BRD) bestimmt. Für die Messung wurden UV-durchlässige Quarzküvetten (Cat. No. 759230, Brand, Wertheim, BRD) verwendet. Die Konzentration in der ursprünglichen Lösung wurde mithilfe folgender Formel berechnet: $c[ng/\mu l] = OD_{260} \cdot F \cdot V$. Dabei wurde für den Korrekturfaktor (F) der Wert 50 (für dsDNA), bzw. 40 (für RNA) und für den Verdünnungsfaktor (V) der Wert 14 (70 : 5) eingesetzt. Mithilfe des Verhältnisses $\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$ wurde zudem die Qualität der Lösung überprüft. Es wurden nur Lösungen verwendet bei denen dieser Wert zwischen 1,5 und 2,2 lag.

2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Probenansätze für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden in 0,5 ml Reaktionsgefäßen vermischt und waren wie folgt zusammengesetzt:

Template DNA (bzw. A.bd. als negativ Kontrolle)	3 μΙ
4 dNTP mix (100 mM)	0,2 μΙ
Vorwärtsprimer (100 pmol/μl)	1 μΙ
Rückwärtsprimer (100 pmol/μl)	1 μΙ
Taq DNA Polymerase (1 u/μl)	1 μΙ
Taq DNA Polymerase Puffer (10×, +MgCl ₂)	2 μΙ
autoklaviertes A.bd.	zu 20 µl

Als Template wurden 100 ng cDNA (aus *Eschscholzia californica*-cDNA-Bank (Schwartze, 2006)) bzw. 250 ng gDNA (siehe 2.3.1.1), 20 ng gereinigtes PCR-Produkt (siehe 2.3.1.3), oder 100 ng gereinigte Plasmid-DNA (siehe 2.3.1.2) mit A.bd. auf 3 µl verdünnt und verwendet. Es kam der dNTP mix "dNTP Set" (Cat. No. R0181, Fermentas, St. Leon-Rot,

BRD) zum Einsatz. Taq DNA Polymerase und Puffer (Cat. No. SE1331A-w) wurden von der Firma Segenetic, Borken, BRD bezogen. Alle Primer wurden von der Firma biomers.net (Ulm, BRD) synthetisiert. Eine Aufstellung der verwendeten Primer zeigt Tab. 2-2.

Name	Art	Sequenz	Annealing- temperatur
Alu_for	vorwärts	5'-gaa ggt gct ctt gat aat ct-3'	E7.7°C
Alu_rev	rückwärts	5'-agc agt aac agc agt aat tt-3'	57,7 °C
GAPDH_for	vorwärts	5'-atg ggt tca gga aag a-3'	E1 7 °C
GAPDH_rev	rückwärts	5'-ttg gca aga gtg aac g-3'	51,7 °C
B1 GAPDH_for	vorwärts	5'-aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc tct cca acc [*] atg ggt tca gga aag a-3'	F1 7 °C
B2 GAPDH_rev	rückwärts	5'-tcc gcc acc acc aac cac ttt gta caa gaa agc tgg gta [*] ttg gca aga gtg aac g-3'	51,7 °C
asB2 GAPDH_for	vorwärts	5'-tcc gcc acc acc aac cac ttt gta caa gaa agc tgg gta* atg ggt tca gga aag a-3'	F1 7 °C
asB1 GAPDH_rev	rückwärts	5'-aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc tct cca acc* ttg gca aga gtg aac g-3'	51,7 °C
gap_for	vorwärts	5'-ctt gaa ggg agg tgc c-3'	L0 L °C
gap_rev	rückwärts	5'-gat gtt gaa gga agc g-3'	58,5 °C
B1 gap_for	vorwärts	5'-aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc tct cca acc* ctt gaa ggg agg tgc c-3'	58 E °C
B2 gap_rev	rückwärts	5'-tcc gcc acc acc aac cac ttt gta caa gaa agc tgg gta* gat gtt gaa gga agc g-3'	58,5 °C

Tab. 2-2 Verwendete PCR-Primer. (*attB-sites)

Zur Durchführung der PCR wurden die Reaktionsgefäße in einem "Mastercycler *Gradient"* (Eppendorf, Hamburg, BRD) Thermocycler positioniert und die Reaktion mit folgenden Einstellungen gestartet:

Initialdenaturierung	95 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	45 s)
Annealing	siehe Tab. 2-2	30 s	> 35×
DNA-Synthese	72 °C	2 min	J
abschließende DNA-Synt	these 72 °C	10 min	
Aufbewahrung	4 °C	∞ .	

2.3.5 Agarose-Gel-Elektrophorese

1 g (für 1 % Gele) bzw. 2 g (für 2 % Gele) Agarose (für Elektrophorese) wurde in 100 ml *TAE-Puffer* unter Aufkochen und Rühren gelöst. Nach Abkühlen auf 50 °C bis 60 °C wurden unter Rühren 1 μl *EtBr. StLsg.* zugesetzt und das Gel ausgegossen. Nach dem Erkalten wurde der Kamm entfernt und die Elektrophorese-Kammer (HE 33 Mini Submarine Unit Basic, Cat. No. 80-6052-64 GE-Healthcare, Freiburg, BRD) mit *TAE-Puffer*

gefüllt bis das Gel mit Puffer bedeckt war. Zu 20 μl Probe wurden 2 μl *DNA Ladepuffer* gegeben, vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren gemischt und das Gemisch komplett in die Geltasche gegeben. Als DNA-Referenz dienten 5 μl "SmartLadder" (Cat. No. MW-1700-10, Eurogentec, Seraing, Belgien). Der Gellauf wurde bei 120 V durchgeführt und dauerte ca. 50 min. Die Gele konnten durch den Ethidiumbromidzusatz anschließend auf einem UV-Tisch ausgewertet und mit einer Digitalkamera (Camedia E-10, Olympus, Hamburg, BRD) fotografiert werden. Zur Ermittlung der Bandenintensität wurden diese Bilder unverändert mithilfe der Software "Optimas Version 6.2" (Optimas Corporation, USA) digital analysiert. Für Gel zu Gel Vergleiche wurden die Bandenintensitäten mithilfe der 500 kb Bande des "GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder"-Markers normalisiert.

2.3.6 cDNA-Bank-screening

Um ein möglichst vollständiges Spektrum der in einer Eschscholzia californica-cDNA-Bank (Schwartze, 2006) vorliegenden DNA auf NC-Membran ("Hybond ECL", Cat. No. RPN203D, GE-Healthcare, Freiburg, BRD) zu fixieren, wurden verschiedene Verdünnungen dieser Bank (1-5 μl in 100 μl LB-Kan) auf Petrischalen (Ø 8 cm) mit Kanamycin-haltigem Festmedium ausgespatelt und für ca. 16 h bei 37 °C inkubiert. Für die Übertragung wurden NC-Membranstücke mit den exakten Maßen der Petrischalen zurecht geschnitten. Diese wurden für 1 min auf je eine der auf Raumtemperatur gebrachten cDNA-Bank-Kulturplatten aufgelegt. Während dieser Zeit wurde die exakte Position markiert. Die mit einer Pinzette verwischungsfrei von den Kulturplatten abgezogenen Membranen wurden jeweils für 3 Minuten (Kolonieseite nach oben) auf einen mit 10 % (m/V) SDS-Lösung getränkten Filterpapierstapel blasenfrei aufgelegt. Anschließend erfolgte die Behandlung analog und in folgender Reihenfolge auf weiteren Filterpapierstapeln, getränkt mit Denaturierungslösung (5 min) und Neutralisierungslösung (5 min). Schließlich wurden die Filter, Kolonieseite oben, für 5 min auf 2× SSPE zum Schwimmen gebracht und danach durch Schwenken des Gefäßes untergetaucht. Nachdem alle Filter derart behandelt waren, wurden sie der 2× SSPE-Lösung entnommen und für 1 h auf trockenem Filterpapier ausgelegt. Zum Fixieren der DNA auf den NC-Membranen wurden diese sowohl 1 h in einem Umluftofen bei 80 °C gebacken als auch einem UV-Crosslinking (Auto-Modus, Stratalinker, Stratagene, La Jolla, CA, USA) unterzogen. Derart behandelte Filter konnten, in Aluminiumfolie verpackt, einige Zeit bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Die abgezogenen Kulturplatten wurden, zum teilweisen Nachwachsen der Kolonien, für 7 h bei 37 °C inkubiert, anschließend bei 4 °C gelagert.

Zur Hybridisierung mit der auf den Membranen fixierten DNA wurde eine DNA-Sonde mit alkalischer Phosphatase (AP) gelabelt. Dazu wurde das "Gene Images AlkPhos Direct Labeling and Detection System" (Cat. No. RPN3690, GE-Healthcare, Freiburg, BRD) verwendet. Alle Arbeitsschritte erfolgten nach dem Protokoll des Herstellers. Zunächst wurde die zu markierende DNA in dem mitgelieferten Wasser zu einer Konzentration von 10 ng/ μ l gelöst und 10 μ l dieser Lösung in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß für 5 min bei 95 °C denaturiert. Sofort im Anschluss wurde die Lösung für 5 min auf Eis abgekühlt und

die Flüssigkeit durch kurzes Zentrifugieren am Boden des Reaktionsgefäßes gesammelt. Es folgte ein Zusatz von 10 μ l "reaction buffer" sowie 2 μ l "labeling reagent". Nach kurzem Mischen wurden zudem 2 μ l 5-fach, mit A.bd., verdünnte "crosslinker solution" zugegeben und die Inkubation für 30 min bei 37 °C nach kurzem Mischen und Zentrifugieren gestartet. Die so markierte Sonde wurde dann für maximal 2 h auf Eis gelagert. Nicht verwendeten Resten wurde Glycerol zu einer Endkonzentration von 50 %(V/V) zugesetzt und die Lösung bei 4 °C gelagert.

Zur Vorbereitung der Hybridisierungsreaktion wurde dem "hybridization buffer" NaCl zu einer Endkonzentration von 0,5 M und "blocking reagent" zu einer Endkonzentration von 4 %(m/V) zugesetzt und der Puffer anschließend auf 55 °C erwärmt. Außerdem wurden die trockenen Membranen (siehe oben) für 5 min in 2× SSC überführt, danach 30 min unter Bewegung in 6× SSC bei Raumtemperatur inkubiert. Die noch auf den Membranen befindlichen Kolonie-Reste wurden vorsichtig mit einem in 6× SSC getränkten Zellstofftuch abgewischt. Bis zur Vorhybridisierung wurden die Membranen weiterhin 6× SSC inkubiert. Zur Vorhybridisierung wuden die Membranen vorsichtig mit der Kolonieseite nach innen an der Innenfläche von 50 ml Falcon Tubes (Cat. No. 227270, Greiner Bio-One, Frickenhausen, BRD) positioniert und jeweils 4 ml "hybridization buffer" hinzugegeben. Die Tubes wurden horizontal in einem Hybridisierungsofen (Enviro-Genie, Scientific Industries, Bohemia, NY, USA) angebracht und während der Inkubation für 30 min bei 55 °C um die Horizontalachse mit ca. 30 rpm bewegt. Anschließend wurde die zuvor gelabelte Sonden-DNA dazu pipettiert (Endkonzentration ca. 12,5 ng/ml) und die Inkubation in gleicher Weise über Nacht fortgesetzt. Die Hybridisierungslösung wurde anschließend entfernt und für weitere Hybridisierungsschritte bei -20°C gelagert. Es folgten zwei Waschschritte für je 10 min bei 55 °C mit 20 ml primary wash buffer sowie zwei Waschschritte für je 5 min bei RT mit 20 ml 1× secondary wash buffer in dem kurz vor Benutzung noch MgCl₂ zu 2 mM gelöst wurde.

Für die Detektion wurden die Membranen blasenfrei auf einer austarierten, glatten Oberfläche mit der Kolonieseite nach oben positioniert und auf die Oberfläche 40 μl/cm² "CDP-Star detection reagent" aufgebracht. Nach einer Inkubation für 5 min wurde dieses mit Blotting Papier (Cat. No. 3030917, Whatman, Schleicher & Schuell, Dassel, BRD) entfernt, die Membranen in Klarsichtfolie verpackt und auf einem Fotofilm (Cat. No. 28-9068-35 GE-Healthcare, Freiburg, BRD) für ca. 1 h exponiert. Die Filme wurden für 5 min in gebrauchsfertiger "Kodak® GBX developer/replenisher" (Cat. No. P7042, Sigma Aldrich, München, BRD) entwickelt und anschließend 10 min in ebenfalls gebrauchsfertiger "Kodak® GBX fixer/replenisher" (Cat. No. P7167, Sigma Aldrich, München, BRD) fixiert. Nach dem Waschen in A.bd. wurden die Filme an der Luft bei RT getrocknet und die Positionsmarkierungen der Membranen auf den Fotofilm mit einem wasserfesten Stift übertragen.

Durch Auflegen der Kulturplatten auf die mit den Markierungen versehenen Filme konnten die Areale bzw. Spots, die ein positives Hybridisierungssignal verursacht hatten, identifiziert und mittels Impföse in eine *LB-Kan* Flüssigkultur übertragen werden. Es wurden mehrere Verdünnungen dieser Kultur erneut auf Petrischalen (Ø 8 cm) mit Kana-

mycin-haltigem *Festmedium* ausgespatelt, um nach 16-stündiger Inkubation bei 37 °C Agarplatten zu erhalten, auf denen die Koloniedichte gering genug ist, um einzelne Kolonien eindeutig zuordnen zu können. Um die positiven Signale zu überprüfen und mit Sicherheit Einzelklone zu erhalten, wurden alle Arbeitsschritte der Kultivierung, des Übertragens und Fixierens der DNA auf NC-Membran, die Hybridisierung (hier wurde die bereits benutzte Hybridisierungslösung mit markierter DNA-Sonde wiederverwendet) sowie das Waschen und Entwickeln wiederholt. Durch Plasmid-Sequenzierung der im zweiten Durchgang positiven Klone wurde das Ergebnis überprüft.

2.3.7 DNA Sequenzierung

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte nach dem von Sanger beschriebenen Prinzip (Sanger, et al., 1977) und wurde von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, BRD) durchgeführt. Zur Probenvorbereitung wurde die DNA zu 10 ng/ μ l bei gereinigtem PCR-Produkt bzw. zu 100 ng/ μ l im Falle gereinigter Plasmide in autoklaviertem A.bd. gelöst und jeweils 20 μ l Probe eingesandt. Die verwendeten Sequenzierprimer sind Tab. 2-3 zu entnehmen (bei der Sequenzierung von PCR-Produkten wurden die jeweiligen PCR-Primer verwendet). Proben wurden i.d.R. sowohl in "sense" als auch in "antisense" Richtung sequenziert.

zu sequenzierendes Plasmid	Primer	Sequenz	
pDONR™222	M13 for	5'-gta aaa cga cgg cca gt-3'	
PDONK 222	M13 rev	5'-gga aac agc tat gac cat g-3'	
MUELL CATE 12	P27-5	5'-ggg atg acg cac aat cc-3'	
pHELLGATE 12	P27-3	5'-gag cta cac atg ctc agg-3'	
~K7C\\/!\\/C2/!!\	4 F	5'-ttg cgg act cta gca tgg-3'	
pK7GWIWG2(II)	1 R	5'-aca tta caa ttt act att-3'	

Tab. 2-3 Verwendete Sequenzierprimer.

2.4 Methodenentwicklung: Assay zum gene-silencing mittels RNAi im Keimwurzelsystem

Zur Untersuchung der Funktion ausgewählter Zielgene bei der Expression der Alkaloidbiosynthese wurde ein System zur transienten Ausschaltung von mRNAs mittels RNAi etabliert. Dazu wurden Samen von *Eschscholzia* auf Agarmedien zur Keimung gebracht und die Keimwurzeln biolistisch mit RNAi Vektoren transformiert (siehe 2.4.2).

2.4.1 Die Herstellung von RNAi-Vektoren zum silencing von GAPDH

2.4.1.1 Klonierung mithilfe des GATEWAY™ - Systems

Die GATEWAY™ Technologie ist eine universelle Klonierungsmethode, die sich die speziellen Rekombinationseigenschaften des Lambdaphage zunutze macht. Mit ihr ist es möglich, schnell und effizient DNA-Abschnitte zwischen verschiedenen Vektoren auszutauschen. Voraussetzung für den Einsatz dieser Technologie ist das Vorhandensein

bestimmter DNA-Sequenzen, der sog. att-Sites. Ein Enzymmix ("BP-Clonase mix") aus der von der Lambdaphage codierten "Integrase" (Int) und dem von E. coli codierten "integration host factor" (IHF) katalysiert dabei die Reaktion $attB \times attP \rightarrow attL \times attR$ (BP-Reaktion). Die Reaktion in die entgegengesetzte Richtung ($attL \times attR \rightarrow attB \times attP$; LR-Reaktion) wird von dem Enzymmix "LR-Clonase mix" katalysiert, der außer "Int" und "IHF" noch das, ebenfalls von der Lambdaphage stammende, Enzym "Excisionase" (Xis) enthält.

Zudem enthalten unveränderte GATEWAY™-Vektoren das *ccd*B-Gen, dessen Produkt ein Toxin für die *E. coli* eigene DNA-Gyrase darstellt. Eine schematische Übersicht dieser Methode zeigt Abb. 2-17.

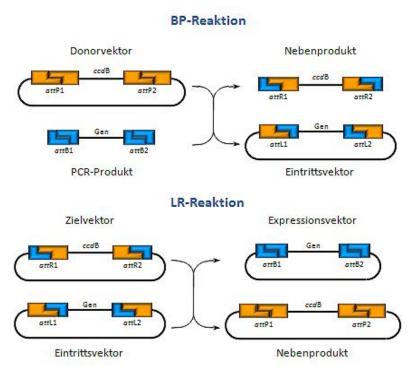


Abb. 2-17 Funktionsprinzip der GATEWAY™ Klonierungstechnologie.

Zunächst wurde der zu transferierende Genabschnitt mittels PCR (siehe 2.3.4) durch Verwendung entsprechender Primer mit "attB" Bindungsstellen versehen. Das PCR-Produkt wurde anschließend mittels Agarose-Gel-Elektrophorese (siehe 2.3.5) gereinigt und aus der Gelmatrix zurückgewonnen (siehe 2.3.1.3).

Für die *BP-Reaktion* wurden in einem autoklavierten 0,5 ml Reaktionsgefäß 150 ng PCR-Produkt sowie 150 ng Donorvektor-DNA (pDONR™222, Invitrogen, Karlsruhe, BRD, Abb. 2-18) mit A.bd. zu 8 μl aufgefüllt und vorsichtig vermischt. Der "BP Clonase™ II enzyme mix" (Cat. No. 11789-020, Invitrogen, Karlsruhe, BRD) wurde auf Eis aufgetaut und kurz gevortext, bevor 2 μl dem Ansatz hinzgefügt wurden. Nach vorsichtigem Mischen erfolgte eine Inkubation bei RT für 1 h. Nach dem Abstoppen der Reaktion durch Zusatz von 1 μl "Proteinase K" (in Cat. No. 11789-020 enthalten) und 10-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden 5 μl des Ansatzes zur Transformation von *E. coli*-Zellen des Stammes "TOP 10" verwendet (siehe 2.4.1.2). Nach Auswahl und Kultivierung der so erzeugten Bakterienklone erfolgte eine Plasmidextraktion aus je 5 ml Über-Nacht-Kultur (siehe

2.3.1.2). Zur Überprüfung des Klonierungserfolgs wurde der entsprechende Bereich der gewonnenen Plasmid-DNA sequenziert (siehe 2.3.7).

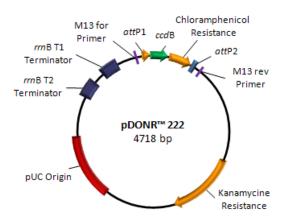


Abb. 2-18 Donorvektor pDONR™ 222.

Für die *LR-Reaktion* wurden in einem autoklavierten 0,5 ml Reaktionsgefäß 150 ng Eintrittsvektor-DNA sowie 150 ng Zielvektor-DNA (pHELLGATE 12; pK7GWIWG2(II), Abb. 2-19) mit A.bd. zu 8 μl aufgefüllt und vorsichtig vermischt. Der "LR Clonase™ II enzyme mix" (Cat. No. 11791-020, Invitrogen, Karlsruhe, BRD) wurde auf Eis aufgetaut und kurz gevortext bevor 2 μl dem Ansatz hinzugefügt wurden. Nach vorsichtigem Mischen erfolgte über Nacht eine Inkubation bei 25 °C. Nach dem Abstoppen der Reaktion durch Zusatz von 1 μl "Proteinase K" (in Cat. No. 11791-020 enthalten) und 10-minütiger Inkubation bei 37 °C, wurden 5 μl des Ansatzes zur Transformation von *E. coli*-Zellen des Stammes "TOP 10" oder "Stbl2™" bzw. 2 μl zur Transformation von Zellen des Stammes "XL-1 Blue" (siehe 2.4.1.3) verwendet. Nach Auswahl und Kultivierung der so erzeugten Bakterienklone erfolgte eine Plasmidextraktion aus je 5 ml Über-Nacht-Kultur (siehe 2.3.1.2). Zur Überprüfung des Klonierungserfolgs wurde der entsprechende Bereich der gewonnenen Plasmid-DNA sequenziert (siehe 2.3.7).

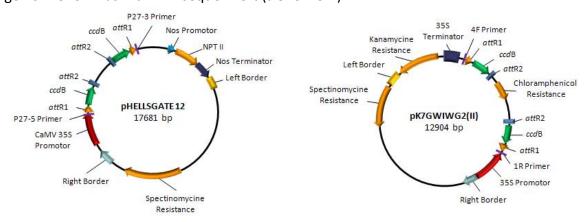


Abb. 2-19 Zielvektoren pHELSGATE 12 und pK7GWIWG2(II).

2.4.1.2 Kultivierung der Escherichia coli Zellen

Für die Klonierungsversuche zur Gewinnung eines RNAi-Vektors mithilfe des GATEWAY™ -Systems wurden Bakterien folgender Stämme verwendet:

TOP 10: F^- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80/acZ Δ M15 Δ /acX74 recA1

araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG λ -

MAX Efficiency® Stbl2™: F⁻ mcrA Δ(mcrBC-hsdRMS-mrr) recA1 endA1lon gyrA96 thi

 $supE44 \ relA1 \lambda^{-} \Delta (lac-proAB)$

XL-1 Blue: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB

lacIqZ∆M15 Tn10 (Tetr)]

Die Kultivierung in Suspension erfolgte in LB-Medium. Das Kulturvolumen betrug 5 ml bis 250 ml, die verwendeten Glasgefäße (Kolben) verfügten über das 4- bis 5-fache Volumen. Kultiviert wurde für ca. 16 h bei 37 °C (bzw. 30 °C bei Verwendung von Stbl2™ Zellen) auf einem Rundschüttler bei 160 rpm. Die Kulturmedien wurden jeweils durch Übertragung einiger Milliliter Vorkultur oder mit einer Impföse beimpft.

Die Kultivierung auf Festmedium erfolgte durch Ausspateln von 100 μl Bakterienkultur bzw. Bakterien in SOC-Medium (nach Transformation, siehe 2.4.1.3) auf Petrischalen (Ø 8 cm) mit Festmedium. Die Kultivierung erfolgte für ca. 16 h bei 37 °C (bzw. 30 °C bei Verwendung von Stbl2™ Zellen).

2.4.1.3 Transformation der Escherichia coli Zellen

Elektroporation:

Zu 50 μ l einer Suspension kompetenter *E. coli*-Zellen (XL-1 Blue, siehe 2.4.1.2) wurden auf Eis ca. 30 ng der zu transferierenden DNA (2 μ l LR-Reaktion siehe 2.4.1.1) zugesetzt, vorsichtig vermischt und in eine eisgekühlte 2 mm-Gap-Küvette gegeben. Die Elektroporation erfolgte mittels eines "ECM 600" (BTX/Harvard Bioscience, Holliston, USA) mit folgenden Einstellungen: U = 2,45 kV, t = 5-6 ms Pulse, R = 129 Ω . Nach Zusatz von 250 μ l *SOC-Medium* erfolgte eine Inkubation für 1 h bei 37 °C und 250 rpm (Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg, BRD). Der gesamte Ansatz wurde auf Selektionsmedium ausgespatelt und ca. 16 h bei 37 °C inkubiert (siehe 2.4.1.2).

Hitzeschocktransformation:

One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli (Cat. No. C4040-06, Invitrogen, Karlsruhe, BRD): Zu 50 μl einer zuvor für 30 min auf Eis aufgetauten Bakteriensuspension wurden ca. 75 ng der zu transferierenden DNA (5 μl BP- bzw. LR-Reaktion siehe 2.4.1.1) zugesetzt, vorsichtig vermischt und für 30 min eisgekühlt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 30 s bei 42 °C. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurden 250 μl SOC-Medium zugesetzt und die Suspension 1 h bei 37 °C mit 225 rpm geschüttelt (Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg, BRD). Der gesamte Ansatz wurde auf Selektionsmedium ausgespatelt und ca. 16 h bei 37 °C inkubiert (siehe 2.4.1.2).

MAX Efficiency® Stbl2™ Competent Cells (Cat. No. 10268-019, Invitrogen, Karlsruhe, BRD): Zu 100 μl einer zuvor für 30 min auf Eis aufgetauten Bakteriensuspension wurden ca. 75 ng der zu transferierenden DNA (5 μl BP- bzw. LR-Reaktion siehe 2.4.1.1) zugesetzt, vorsichtig vermischt und für 30 min eisgekühlt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 25 s bei 42 °C. Nach Abkühlen auf Eis für 2 min wurden 900 μl SOC-Medium

zugesetzt und die Suspension 1,5 h bei 30 °C mit 225 rpm geschüttelt (Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg, BRD). 200 μ l des Ansatzes wurden auf Selektionsmedium ausgespatelt und ca. 16 h bei 30 °C inkubiert (siehe 2.4.1.2).

2.4.2 Anzucht und Transformation von Eschscholzia californica Keimwurzeln

2.4.2.1 Kultivierung und Anzucht der Keimwurzeln

Sterilisation der Samen:

Zur Sterilisation der *Eschscholzia californica* Samen (Quedlinburg Saatgut GmbH, Quedlinburg, BRD) wurden ca. 100 Stück zunächst für 5 min in 10 ml Ethanol p.a., 70 %(V/V) geschwenkt. Nach Dekantierung des Ethanols und kurzem Waschen mit A.bd. wurden 10 ml einer NaOCl-Lösung, die ca. 4 % aktives Chlor enthielt, zugesetzt und erneut 5 min geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung abfiltriert und die Samen gründlich zweimal mit A.bd. gewaschen.

Anzucht der Keimwurzeln:

Die zuvor sterilisierten Samen wurden mit einer sterilen Metallpinzette, unter keimfreien Bedingungen einzeln im Zentrum der Petrischalen auf *Keimwurzelmedium* platziert und leicht angedrückt. Pro Schale wurden ca. 20 bis 25 Samen verwendet, der Abstand der Samen zueinander betrug ca. 5 mm. Die Schalen wurden mit "Parafilm® M" (Cat. No. H666, Carl Roth, Karlsruhe, BRD) versiegelt und aufrecht in einem dafür angefertigtem "Rack" platziert. Die Kultivation erfolgte bei 23 °C bis 24 °C unter Dauerlicht (Photonendichte ca. 7 µmol/m²/s). Das Anziehen der Keimlinge in senkrecht aufgestellten Petrischalen bewirkt, dass die Wurzeln dicht unter der Agaroberfläche nach unten wachsen. So lassen sie sich vor allem unter dem Mikroskop sehr gut beobachten. Desweiteren wachsen sie verhältnismäßig gerade und haben genug Platz, sich einige Tage zu entwickeln ohne an die Ränder der Schalen zu stoßen. Nicht zuletzt ist es möglich, die Wurzeln in diesen Schalen (im Gegensatz zur Suspensionskultur) direkt biolistisch zu transformieren. Diese Transformation erfolgte drei Tage nach Auslegen der Samen. Vor der Auswertung der Folgen dieser Transformation wurden die Keimwurzeln für weitere zwei bis vier Tage unter den gleichen Bedingungen kultiviert.

2.4.2.2 Biolistische Transformation der Keimwurzeln

DNA-Bindung an "Microcarrier" Gold Partikel:

Zunächst wurden 60 mg "Biolistic® 1.0 μm Gold Microcarriers" (Cat. No. 1652263, Bio-Rad, München, BRD) in ein sterilisiertes 1,8 ml Reaktionsgefäß eingewogen. Nach Zugabe von 1 ml Ethanol p.a. (96 % V/V) wurde die Mischung gevortext und anschließend 30 s im Ultraschallbad (Sonorex TK524, Bandelin, Berlin, BRD) mit 100 % Leistung behandelt. Nach kurzer Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Dieser Waschschritt wurde ein weiteres Mal mit Ethanol p.a. (96 % V/V), zweimal mit Ethanol p.a. (70 % V/V) und zweimal mit sterilem A.bd. durchgeführt. Von einer mit 1 ml A.bd. hergestellten Suspension dieser Partikel wurden 40 μl für ein "DNA-

Coating" verwendet (Reste wurden bei -20 °C gelagert). Dazu wurde nach erneuter Zentrifugation der Überstand verworfen und wässrige DNA-Lösung, die 5 μ g DNA enthielt, mit A.bd. zu 60 μ l verdünnt, zugegeben. Nach kurzem vortexen bei halber Maximalgeschwindigkeit erfolgte die vorsichtige Zugabe von 20 μ l *Spermidin-Lsg.* und 50 μ l *CaCl₂-Lsg.* Es wurde erneut vorsichtig gevortext und die Suspension anschließend 3 min bei 4 °C inkubiert, wobei immer wieder zwischendurch gevortext wurde. Nach erneuter Zentrifugation und Entfernung des Überstandes wurden die Partikel mit 200 μ l Ethanol p.a. (96 % V/V) gewaschen und danach in 85 μ l Ethanol p.a. (96 % V/V) resuspendiert und bei 4 °C aufbewahrt.

Durchführung des Partikelbeschusses:

Für die biolistische Transformation der Keimwurzeln wurde das "Biolistic® Particle Delivery System Model PDS_1000/He" der Firma Bio-Rad (München, BRD) verwendet. Zur Vorbereitung des Partikelbeschusses wurden diese autoklaviert. Die Kammer selbst wurde direkt vor und nach jeder Benutzung mit einem Ethanol (70 % V/V)-Spray desinfiziert.

Nach Positionierung einer "Macrocarrier"-Membran (Cat. No. 1652335) in einem "Macrocarrierholder" (Cat. No. 1652322) wurden auf diese 20 µl Goldsuspension (siehe oben) aufgebracht und trocknen gelassen. Währenddessen wurde eine 1100 psi "rupture disc" (Cat. No. 1652329) eingebaut sowie ein "stopping screen" (Cat. No. 1652336) in der Beschussanordnug positioniert. Nach Trocknung der Suspension wurde der Macrocarrier umgedreht (angetrocknete Partikel nach unten) und auf der Beschussanordnung positioniert. Nach Verschließen der Anordnung mit dem "Macrocarrier Cover Lid" wurde diese in den obersten Einschub der Kammer geschoben ("gap" 2,5 cm). Die geöffneten Petrischalen mit den Keimwurzeln wurden auf dem untersten Einschub der Kammer positioniert (Zielabstand 12 cm). Die Kammer wurde verschlossen und evakuiert (Vakuum 91.4 – 94.8 kPa). Der Heliumdruck wurde auf 1300 psi am Flaschenventil eingestellt. Sobald der erforderliche Unterdruck in der Kammer erreicht war, wurde der Vakuumschalter auf die "Hold" Position gestellt und das Bombardement ausgelöst ("Fire"-Schalter). Nach Belüftung der Kammer wurde die Petrischale mit den Proben sofort verschlossen und mit "Parafilm® M" (Cat. No. H666, Carl Roth, Karlsruhe, BRD) versiegelt. Alle Zubehörteile (bis auf den "Macrocarrier Cover Lid") wurden für einen weiteren Beschuss ausgetauscht.

2.4.3 Überprüfung des Transformationserfolges und der Wirkung auf die Alkaloidbiosynthese

2.4.3.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Zwei bis vier Tage nach der biolistischen Transformation wurden die Keimwurzeln in den verschlossenen Schalen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dazu kam ein Eclipse 50i Mikroskop (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA) mit Intensilight-Lichtquelle zum Einsatz. Es war mit einem Planchromat 4-fach Objektiv sowie den Fluoreszenzfilter-kombinationen:

a) λ_{Ex} : 482 nm; λ_{Em} : 520 nm und

b) λ_{Ex} : 472 nm; λ_{Em} : 496 nm LP ausgestattet.

Dabei wurde die Filterkombination b) für das Auffinden von GFP-typischer Fluoreszenz benutzt, während die Kombination a) zudem die Detektion von Benzo[c]phenanthridintypischer Fluoreszenz erlaubte. Mithilfe der Software "Image Pro Plus" Ver.: 6.2 (Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD, USA) konnten über eine angeschlossene CCD-Kamera (Progressive 3, SONY, Tokyo, Japan) mikroskopische Bilder aufgenommen, gespeichert und analysiert werden. Es fiel auf, dass auch bei unbehandelten Kontrollkulturen der Eschscholzia-Keimwurzeln teilweise eine grüne Fluoreszenz zu beobachten war. Diese konnte jedoch mithilfe der verwendeten Filterkombination b) von der genuinen GFP-Fluoreszenz getrennt dargestellt werden [Abb. 2-20].

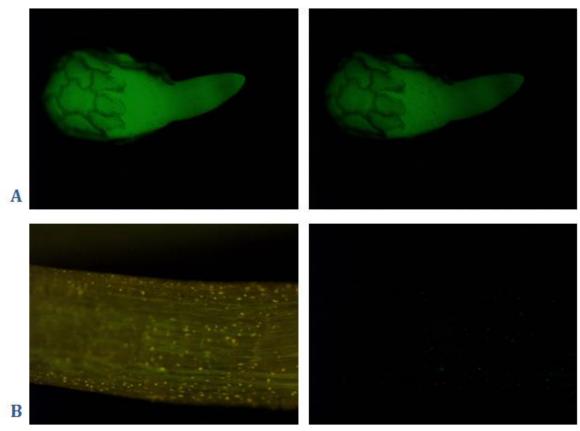


Abb. 2-20 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Keimlingen.

A: 7d alter Keimling von *Nicotiana benthamiana*, Mutante mit konstitutiver Expression von GFP (zur Verfügung gestellt von Fr. Dr. Hause, IPB Halle)

B: 7d - Keimling von Eschscholzia californica (WT, ohne GFP-Transformation)

Die linke Spalte zeigt die Aufnahme mit Filterkombination a) (siehe Text), rechte Spalte die gleiche Aufnahme mit Filterkombination b). Die Anzucht der Keimlinge erfolgte unter identischen Bedingungen (siehe 2.4.2.1).

2.4.3.2 Analyse transformierter Keimwurzeln mittels PCR

Als weitere Möglichkeit zur Untersuchung der genetischen Veränderungen in den Keimwurzeln nach biolistischer Behandlung (siehe 2.4.2.2) diente die PCR. Diese wurde im Prinzip wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben durchgeführt, jedoch mit einigen Abweichungen.

Aus den beschossenen Kulturen (mit und ohne RNAi-Konstrukt) wurden Wurzeln entnommen, schockgefroren und ihre RNA isoliert (siehe 2.3.1.4). Die isolierte RNA diente anschließend als Template für eine Reverse Transkriptase Reaktion (RT-Reaktion) (siehe 2.3.2). Dafür wurden vorher die Konzentrationen der isolierten RNA bestimmt (siehe 2.3.3) und jeweils gleiche RNA-Mengen für die RT-Reaktion eingesetzt. Die so erzeugte DNA wiederum diente dann als Template für die PCR. Jeweils gleiche Mengen RT-Reaktionsprodukt (enthält RNA/DNA-Hybrid) wurden als Template eingesetzt.

Um anschließend von der Stärke einer Bande im Agarosegel auf die zuvor vorhandene Templatemenge schließen zu können, musste eine Zyklenzahl für die PCR gewählt werden, die nicht im Sättigungsbereich liegt. Aus diesem Grund wurden die PCR-Experimente mit verschieden Zyklenzahlen (10 – 30) durchgeführt. Es wurden die in Tab. 2-4 aufgeführten Primer verwendet, die alle jeweils ein Produkt von 225 bp bis 262 bp liefern sollten. Die Probenansätze wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäßen vermischt und waren wie folgt zusammengesetzt:

Template (RT-Reaktionsprodukt, bzw. A.bd. als negativ Kontrolle	e) 1 µl
Vorwärtsprimer (10 pmol/μl)	2 μΙ
Rückwärtsprimer (10 pmol/μl)	2 μΙ
PCR Master Mix (Cat. No. M750B, Promega, Madson, WI, USA)	10 μΙ
autoklaviertes A.bd.	u 20 μl

Name	Sequenz
Gap_real_for	5'-acg aca gtg tcc acg gtc aat g-3'
Gap_real_rev	5'-aac atg ggt gca tcc ttg ctg-3'
actin_f4	5'-tgt tct cct cac tga agc ccc t-3'
actin_r2	5'-gca agg tcg aga cgt agg att gca-3'
tubulin_f5	5'-tgt ctt ccc atc acc caa ggt ttc tg-3'
tubulin_r3	5'-aca gcg agt ttc cgt agg tca gag-3'
BBE_f6	5'-act cgg att tac ggc tgg ttg g-3'
BBE_r15	5'-gca taa att gca ccc cag aca cca-3'

Tab. 2-4 Für die Analyse transformierter Keimwurzeln verwendete PCR-Primer.

Zur Durchführung der PCR wurden die Reaktionsgefäße in einem "Mastercycler Gradient" (Eppendorf, Hamburg, BRD) Thermocycler positioniert und die Reaktion mit folgenden Einstellungen gestartet:

Initialdenaturierung	95 °C	3 min		
Denaturierung	95 °C	30 s		
Annealing	60 °C	30 s	}	10-30×
DNA-Synthese	72 °C	30 s	J	
abschließende DNA-Synthese	72 °C	2 min		
Aufbewahrung	4 °C	∞.		

Die PCR-Versuche wurden für alle zu untersuchenden Gene simultan durchgeführt, d.h. bis auf Template (Kontrolle und RNAi-Konstrukt) und die jeweiligen Primerpaare [Tab.

2-4] wurden alle Reaktionsgefäße mit demselben "Mastermix" befüllt und die Reaktionen gleichzeitig durchgeführt. Das war möglich, da alle dafür nötigen Primer für die gleiche Annealingtemperatur designt waren und auch die zu erwartenden Produkte alle in etwa die gleiche Größe aufwiesen. Zur Auswertung wurden zu den 20 µl Proben jeweils 2 µl DNA Ladepuffer gegeben, vorsichtig vermischt und das Gemisch komplett in die Geltasche eines 2 % Agarosegeles (siehe 2.3.5) gegeben. Als Größenstandard dienten 6 µl "GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder" (Fermentas, St. Leon-Rot, BRD). Der Gellauf wurde bei 140 V für 30 min durchgeführt. Die Gele wurden anschließend auf einem UV-Tisch ausgewertet und mit einer Digitalkamera (Camedia E-10, Olympus, Hamburg, BRD) fotografiert. Zur Ermittlung der relativen Bandenintensität wurden diese Bilder unverändert mithilfe der Software "Optimas Version 6.2" (Optimas Corporation, USA) digital quantifiziert. Für Gel-zu-Gel-Vergleiche wurde jeweils mithilfe der 500 kb Bande des Markers ein Korrekturfaktor bestimmt.

2.5 Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Cat. No.	Lieferant
ABTS	A1888	Sigma
ACN	HN40	Roth
Agar	5210	Roth
Agarose	11397	Serva
Agarose (für	11404	Serva
Elektrophorese)	11404	Jerva
AI(OH) ₃	101091	Merck
APS	9592	Roth
Bromphenolblau	114391	Sigma
BSA	8076	Roth
CHAPS	A1099	AppliChem
Chloroform	3313	Roth
Citronensäure	6490	Roth
DTE	A1102	AppliChem
DTT	A2948	AppliChem
EDTA (als Na ₂ EDTA·2H ₂ O)	A2937	AppliChem
EGTA (als Na₄EGTA)	E8145	Sigma
Essigsäure	3738	Roth
Ethidiumbromid	331565	Merck
Fast Green	21295	Serva
Ficoll400	F-4375	Sigma
Glucose	8337	Merck
Glycerol	23176	Serva
Glycin	23390	Serva
GSH	6382	Roth
H ₂ O ₂	9683	Roth
Harnstoff	2317	Roth
Hefeextrakt	0127	Difco
HEPES	HN78	Roth

IAA	A1666	AppliChem
Imidazol	26081	Serva
<i>iso</i> -Propanol	6752	Roth
Kaliumaspartat	11240	Sigma
Kaliumpyrophosphat	4250	Sigma
KCI	3582	AppliChem
КОН	1575	AppliChem
MES	A0689	AppliChem
Methanol	4627	Roth
MgCl ₂	63068	Sigma
NaCl	3597	AppliChem
NaOH	9356	Roth
Natriumglutamat	A0443	AppliChem
Natriumhypochloridlösung	17159	Grüssing
NH ₄ HCO ₃	T871	Roth
Nigericin	N7143	Sigma
PMSF	6367	Roth
Polyclar [®] AT	33162	Serva
Rotiphorese® Gel 30	3029	Roth
SDS	39574	Serva
Spermidin	S 0266	Sigma
TEMED	2367	Roth
TFA	299537	Sigma
TRIS	37180	Serva
Trypsin	T6567	Sigma
Trypton	8952	Roth
Tween® 20	A4974	AppliChem
XylencyanolFF	42135	AppliChem
β-Mercaptoethanol	42271	Roth
γ-Aminocapronsäure	3113	Roth

Tab. 2-5 Verwendete Chemikalien und deren Bezugsquellen.

Sigma: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Eschenstr. 5, 82024 Taufkirchen bei München

Roth: Carl Roth GmbH + Co. KG, Schoemperlenstr. 3-5, 76185 Karlsruhe Serva: SERVA Electrophoresis GmbH, Carl-Benz-Str. 7, 69115 Heidelberg

Merck: Merck KGaA, Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt AppliChem: AppliChem GmbH, Ottoweg 4,64291 Darmstadt

Difco: Difco Laboratories GmbH, Ulmer Str. 160A, 86156 Augsburg Grüssing: Grüssing GmbH Analytika, An der Bahn 4, 26849 Filsum

2.6 Liste der verwendeten Lösungen und Puffer

ABTS-Substrat: Lösung von 150 mg ABTS in 0,5 l 0,1 M Citronensäure. Der pH-

Wert wurde mit NaOH auf 4,35 eingestellt, die Lösung zu 11 ml

aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Agarose Sealing

Solution: 0,5 % Agarose, 0,001 % Bromphenolblau in *Laufpuffer*

APS StLsg. 10 %: 100 mg APS in 1 ml A.bd.

Blot-Fixier-Puffer: 10 %(V/V) Methanol, 7 %(V/V) Essigsäure in A.bd.

Blotting Puffer 1: 0,3 M TRIS, 20 %(V/V) Methanol in A.bd., pH ≈ 10,4

Blotting Puffer 2: 25m M TRIS, 20 %(V/V) Methanol, 40 mM γ-Aminocapronsäure,

 $0.01 \% SDS in A.bd., pH \approx 10.4$

<u>Bromphenolblau</u>

StLsg. (1 %): 50 mg Bromphenolblau 5 ml A.bd.

CaCl₂-Lsg.: 2,5 M CaCl₂ in sterilem A.bd.

Denaturierungs-

<u>Lösung:</u> 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH in A.bd.

DNA Ladepuffer: 20 % Ficoll400, 0,1 M EDTA, 1 % SDS, 0,25 % Bromphenolblau,

0,25 % XylencyanolFF in A.bd. pH 8.

DTE StLsg. (0,5M): 39 mg DTE in 0,5 ml A.bd. Die Lösung wurde aliquotiert zu 50 μl

und bei -20 °C gelagert.

Elicitor: Bei dem "Hefe-Elicitor" handelt es sich um eine wässrige Lösung

einer Glycoprotein-Präparation aus Bäckerhefe (Schumacher, et al., 1987). Es wurde eine Stammlösung der Konzentration

1 mg/ml verwendet.

Elutionspuffer: 5 % TFA und 50 % ACN in A.bd.

EtBr. StLsg: 10 mg/ml EtBr. in A.bd.

Equilibrierungs-

puffer: 50 mM TRIS·HCl (pH 8,8), 30 % Glycerol, 2 % SDS, 6 M Harnstoff,

0,002 % Bromphenolblau in A.bd. Die Lösung wurde zu 10 ml

aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

<u>Extraktionsmittel:</u> 36 mM HCl in Methanol

Fast-Green: 0,01 % Fast Green, 50 %(V/V) Methanol, 12 %(V/V) Essigsäure in

A.bd.

Festmedium: 15 g Agar in 1 l LB-Medium

Gel-Fixier-Puffer: 40 %(V/V) Methanol, 7 %(V/V) Essigsäure in A.bd. Gel-Wasch-Puffer: 10 %(V/V) Methanol, 7 %(V/V) Essigsäure in A.bd.

HEPES: 60 mM HEPES in *LS-P 50 %*, angegebene pH-Werte wurden mit

KOH eingestellt. Die Lösungen wurden über einen Celluloseacetat-Membranfilter, Porengröße 0,2 μm (Sartorius Stedim, Aubagne, Frankreich) filtriert und 20 min bei 121 °C mit

gespanntem Wasserdampf sterilisiert.

Keimwurzelmedium: Der für die Anzucht der Keimwurzeln verwendete Agar modifi-

ziert nach Murashige & Skoog (1962) war wie folgt zusammen-

gesetzt:

KH ₂ PO ₄	170 mg/l	(1,25 mM)
H_3BO_3	6,2 mg/l	(100,0 μM)
MnSO ₄ ·H ₂ O	16,9 mg/l	(100,0 μM)
ZnSO ₄ ·7H₂O	8,6 mg/l	(30,0 μM)
KI	0,83 mg/l	(5,0 μM)
$Na_2MoO_4\cdot 2H_2O$	0,25 mg/l	(1,0 μM)
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025 mg/l	(0,1 μM)
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025 mg/l	(0,15 μM)
Na₂EDTA·2H₂O	74,4 mg/l	(0,2 mM)
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8 mg/l	(0,1 mM)
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25 mg/l	(1 μM)
Thiamin-HCl (Vitamin B1)	0,4 mg/l	(1,2 μM)
myo-Inosit	100,0 mg/l	(0,55 mM)
Agar	10,0 g/l	

Die Substanzen wurden in A.bd. gelöst. Der Lösung wurde zudem noch 1 μ g/l Endkonzentration *Elicitor* zugesetzt. Vor der Zugabe des Agars wurde die Lösung mit KOH auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt. Nach erfolgetem Agarzusatz wurde sie 20 min bei 121 °C mit gespanntem Wasserdampf sterilisiert. Das noch flüssige Medium wurde unter keimfreien Bedingungen in Petrischalen (Ø 8 cm) gegossen und diese nach Erkalten und Erhärten des Mediums mit "Parafilm® M" (Cat. No. H666, Carl Roth, Karlsruhe, BRD) versiegelt.

Laufpuffer:

Die Lösung aus 0,25 M TRIS, 2,5 M Glycin und 1 % SDS (pH \approx 8,8) wurde vor dem Gebrauch 10-fach mit A.bd. verdünnt.

LB-Medium:

10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, in A.bd. (zudem wurden u.U. die Antibiotika Kanamycin (LB-Kan) zu 50 μ g/ml bzw. Spectinomycin (LB-Spec) zu 100 μ g/ml zugesetzt, um entsprechende Selektionsmedien herzustellen).

LS-Medium:

Das Nährmedium modifiziert nach *Linsmaier & Skoog* (1965) war wie folgt zusammengesetzt:

1650 mg/l	(20,6 mM)
1900 mg/l	(18,8 mM)
439 mg/l	(3,0 mM)
370 mg/l	(1,5 mM)
170 mg/l	(1,25 mM)
6,2 mg/l	(100,0 μM)
16,9 mg/l	(100,0 μM)
8,6 mg/l	(30,0 μM)
0,83 mg/l	(5,0 μM)
0,25 mg/l	(1,0 μM)
0,025 mg/l	(0,1 μM)
0,025 mg/l	(0,15 μM)
74,4 mg/l	(0,2 mM)
	1900 mg/l 439 mg/l 370 mg/l 170 mg/l 6,2 mg/l 16,9 mg/l 8,6 mg/l 0,83 mg/l 0,25 mg/l 0,025 mg/l

27,8 mg/l	(0,1 mM)
0,4 mg/l	(1,2 μM)
0,22 mg/l	(1,0 μM)
0,186 mg/l	(1,0 μM)
100,0 mg/l	(0,55 mM)
30 g/l	(87,6 mM)
	0,4 mg/l 0,22 mg/l 0,186 mg/l 100,0 mg/l

Die Substanzen wurden in A.bd. gelöst. Die Lösung wurde mit KOH auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt und 20 min bei 121 °C mit gespanntem Wasserdampf sterilisiert.

<u>LS-P:</u> Die Zusammensetzung entspricht der des LS-Mediums, jedoch

ohne KH₂PO₄. Der pH-Wert wurde hier mit KOH auf einen Wert

von 5,5 eingestellt.

<u>LS-P 75 %:</u> 75 %ige Verdünnung von *LS-P* in A.bd. <u>LS-P 50 %:</u> 50 %ige Verdünnung von *LS-P* in A.bd.

Lysispuffer: 50 mM TRIS·HCl, 5 mM DTE, 10 mM GSH, 20 mM KCl, 2 mM

EDTA, 2 mM EGTA, 1 mM PMSF, 4 mM NaF, 4 mM NaVO₄, 15 %(m/V) Saccharose, 1 %(m/V) Polyclar® AT, 1× Protease Inhibitor Cocktail Set (Cat. No. 539131, Calbiochem) in A.bd. pH

7,5

MOAC-

<u>Elutionspuffer:</u> 100 mM Kaliumpyrophosphat, 8 M Harnstoff in A.bd.

MOAC-

<u>Inkubationspuffer:</u> 30 mM MES, 20 mM Imidazol, 0,2 M Kaliumaspartat, 0,2 M

Natriumglutamat und 0,25 % CHAPS in A.bd.

Neutralisierungs-

lösung: 1,5 M NaCl, 0,5 M TRIS·HCl pH 7,4

Nigericin StLsg.: 4 mM Nigericin in Ethanol p.a.

Nigericinpuffer: In eine Lösung von 20 mM Na·MES in A.bd. pH 5,5 wurde direkt

vor Benutzung Nigericin StLsg. zu einer Endkonzentration von

4 μM Nigericin gegeben.

Nigericinwasch-

puffer: 20 mM K·MES, 50 mM KCl in A.bd. pH 7,5

primary wash

buffer: 2 M Harnstoff, 0,1 %(m/V) SDS, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂,

0,2 %(m/V) "Blocking reagent" (aus Cat. No. RPN3681, GE-Healthcare, Freiburg, BRD), 50 mM Natriumphosphat pH 7,0 ein-

gestellt mit NaOH in A.bd.

Rehydratationspuffer: 8 M Harnstoff, 2 %(m/V) CHAPS, 1,5 %V/V Servalyte[™] (Cat. No.

42903, 42905, 42940, 42948 oder 42949 (je nach erforderlichem pH-Intervall), Serva, Heidelberg, BRD), 0,002 % Bromphenolblau in A.bd. Die Lösung wurde zu je 1 ml aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Direkt vor der Benutzung kamen noch 2,8 mg DTT pro 1 ml

hinzu.

Sammelgelpuffer: 0,5 M TRIS·HCL pH 6,8 und 0,4 % SDS in A.bd.

SDS/DMF-Lösung: Mischung aus gleichen Teilen 40 % SDS in A.bd. und DMF

SDS Probenpuffer: Eine Mischung aus 300 μl Sammelgelpuffer, 300 μl SDS-StLsg.

(20~%), 40 μl *DTE StLsg.* (0,5M), 400 μl Glycerol und 10 μl *Bromphenolblau StLsg.* (1~%) wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vermengt. Der Puffer wurde gekühlt (4°C) gelagert und nicht

länger als 1 Woche verwendet.

SDS StLsg. (20 %): 50 g SDS in 250 ml A.bd.

secondary wash

buffer (20×): 2 M NaCl, 1 M TRIS·HCl, pH 10,0 in A.bd.

SOC-Medium: Die Lösung von 20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 8,5 mM NaCl,

2,5 mM KCl, 10 mM MgCl $_2$ in A.bd. wurde 20 min bei 121 °C mit gespanntem Wasserdampf sterilisiert und 98 ml in keimfreier Umgebung mit 2 ml sterilfiltrierter 1 M Glucoselösung versetzt.

<u>Spermidin Lsg.:</u> 0,1 M Spermidine in sterilem A.bd.

SSC (20×): 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat in A.bd. pH 7,0 eingestellt mit HCl. SSPE (20×): 3 M NaCl, 0,2 M NaH₂PO₄, 0,02 M EDTA, pH 7,4 eingestellt mit

NaOH.

Storage Solution: 375 mM TRIS·HCl, 0,1 % SDS in A.bd. pH 8,8

<u>TAE-Puffer:</u> Die Lösung von 2 M TRIS und 100 mM EDTA wurde mit Essigsäure

auf einen pH von 8,5 eingestellt und vor der Benutzung 50-fach

verdünnt.

<u>TBS:</u> 20 mM TRIS·HCl pH 7,6, 0,65M NaCl in A.bd.

TBS-T: 0,05 % Tween® 20 in *TBS*

Trenngelpuffer: 1,5 M TRIS·HCl pH 8,8 in A.bd.

Trypsin-Puffer: 0,2 μg/μl in 1 mM HCl

<u>Verdaupuffer:</u> 9 % ACN in 25 mM NH₄HCO₃ in A.bd.

Waschlösung: 25 mM NH₄HCO₃ in A.bd. zu gleichen Teilen mit ACN gemischt

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Validierung von Methoden zur Generierung artifizieller pH-shifts

Wie unter 1.2 beschrieben, spielt der cytosolische pH-shift eine entscheidende Rolle im Signalweg zur Auslösung der Alkaloidbiosynthese. Es ist zudem gezeigt worden, dass bei solchen pH-Signalen das räumliche und zeitliche Verteilungsmuster sowie das Ausmaß der Ansäuerung entscheidend für die Interpretation des Signals von der Zelle sind (Lapous, et al., 1998; Roos, 2000; Roos, et al., 2006; Viehweger, et al., 2006). Um pH-Signale zur Genexpression reproduzierbar auslösen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Verfahren zur experimentellen Erzeugung solcher pH-shifts erarbeitet. Dabei sollten insbesondere Ausmaß und Dauer der cytosolischen Ansäuerung steuerbar sein. Zwei Methoden erwiesen sich für diese Zwecke als geeignet.

3.1.1 Die Nigericin-Methode

Das Polyether-Antibiotikum Nigericin ist in der Lage, lipophile, in Membranen inserierende Komplexe als "Carrier" für Alkali-Kationen zu bilden. Dabei besteht eine hohe Selektivität vor allem für K⁺ und für Protonen bzw. deren hydratisierte Spezies. Die Komplexbildung erfolgt durch Bindung des Kations an die freie Carboxylgruppe sowie durch elektrostatische Wechselwirkungen mit weiteren nucleophilen Zentren des Moleküls [Abb. 3-1]. Auf diese Weise bewirkt Nigericin einen Austausch von H⁺ und K⁺ durch biologische Membranen, gemäß ihres jeweiligen Konzentrationsgefälles (Schaller, et al., 2000).

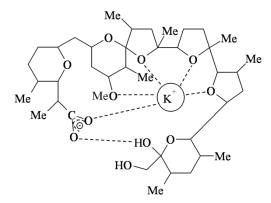
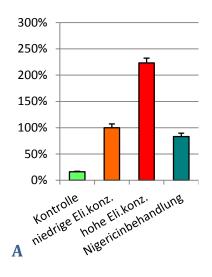
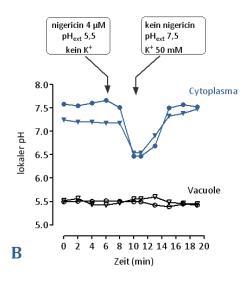


Abb. 3-1 Struktur des Nigericin-Kalium-Komplexes.

Aufgrund dieses Wirkmechanismusses war es möglich, in einem Zwei-Schritt-Verfahren die cytosolische Protonenkonzentration zunächst zu erhöhen und anschließend wieder zu normalisieren. Dazu wurde das an der Plasmamembran wirkende Konzentrationsgefälle von K⁺ und H⁺ jeweils umgekehrt und damit die Richtung der Protonenfluxe verändert. Geschwindigkeit und Ausmaß der pH-Änderung des Cytoplasmas konnten durch die Außenkonzentrationen dieser Kationen reguliert werden (Buchheim, 2004). Dabei spielte auch die eingesetzte Nigericinkonzentration (und die damit erzeugte Anzahl der Poren pro Zelle) eine wesentliche Rolle. Zur Überprüfung wurde der pH-shift mithilfe der konfokalen pH-Topografie verfolgt (Angelova, et al., 2010).





- A Alkaloidzuwachs in 24 h (100 % = 2,9 μ g/Mio Zellen)
- B pH Verteilung in Vakuole und Cytoplasma zweier Zellen während der Nigericinbehandlung (Quelle: Angelova, et al., 2010)

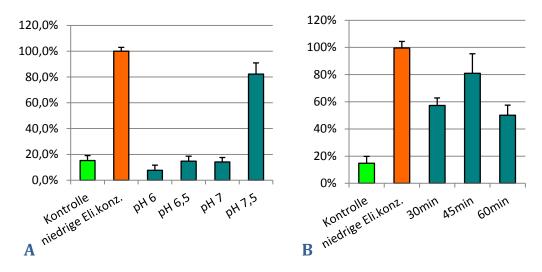
Abb. 3-2 Auslösung der Alkaloidbiosynthese in Kulturen von *Eschscholzia californica*; Vergleich Nigericin-Methode mit Hefeelicitor.

Der pH-Verlauf und die resultierende Überexpression der Alkaloidbiosynthese sind in Abb. 3-2 dargestellt. Daraus geht hervor, dass sich mithilfe der Nigericin-Methode in Zellsuspensionen von *Eschscholzia californica* Alkaloid-Antworten im Bereich von 75 % – 90 % der durch niedrige Elicitorkonzentrationen auslösbaren Alkaloidbildung erreichen lassen.

3.1.2 Die Puffer-Methode

Eine weitere Möglichkeit, die Protonenkonzentration im Cytoplasma zu erhöhen, besteht in der Behandlung der Zellen mit externen Puffern in hoher Konzentration (80 – 120 mM) und relativ basischen pH (Armero, et al., 2001). Bei dieser Methode wird die Tatsache ausgenutzt, dass die Zellen einen unphysiologisch hohen Umgebungs-pH-Wert durch Ansäuerung des Außenmediums auszugleichen versuchen. Da die dafür notwendigen Protonen aus der Vakuole stammen, müssen diese zunächst das Cytoplasma passieren, was zwischenzeitlich zu dessen Ansäuerung führt. Unter geeigneten Bedingungen wurde sowohl diese Ansäuerung mikroskopisch nachgewiesen als auch der Effekt auf die Alkaloidbildung in Suspensionskulturen gezeigt (Roos, et al., 2006; Viehweger, et al., 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass zur Auslösung gut messbarer Alkaloid-Antworten in den Suspensionskulturen noch wesentliche Optimierungsschritte erforderlich waren. Die Stärke des pH-Signals lässt sich hier über den pH-Wert des Puffers im Außenmedium steuern, und die Länge das Signals ist über die Inkubationszeit und Waschprozedur (siehe 2.1.2; [Abb. 3-3]) variierbar.

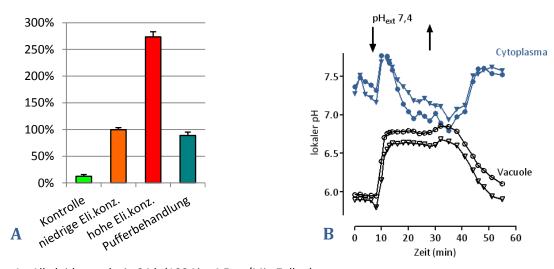
Das Ergebnis eines abschließend zur Validierung dieser Methode durchgeführten Experimentes zeigt Abb. 3-4. Mithilfe der Puffer-Methode konnte eine reproduzierbare Überproduktion von Alkaloiden im Ausmaß von 80 % – 95 % der Wirkung niedriger Elicitorkonzentrationen erreicht werden.



Alkaloidzuwachs in 24 h

- A Verwendung verschiedener pH-Werte (Inkubationszeit 45 min; 100 % = 4,8 μg/Mio Zellen)
- B unterschiedliche Inkubationszeiten (pH-Wert 7,5; 100 % = 4,6 μg/Mio Zellen)

Abb. 3-3 Optimierung der Parameter der Puffer-Methode.



- A Alkaloidzuwachs in 24 h (100 % = 4,5 μ g/Mio Zellen)
- B pH Verteilung in Vakuole und Cytoplasma zweier Zellen während der Pufferbehandlung (Quelle: Viehweger, et al., 2006)

Abb. 3-4 Auslösung der Alkaloidbiosynthese in Kulturen von *Eschscholzia californica*; Vergleich Puffer-Methode mit Hefeelicitor.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit beiden Methoden eine in etwa gleiche Qualität des künstlichen pH-Signals erreichbar ist. Der Vorteil der Nigericin-Methode besteht darin, dass sie etwas schneller durchzuführen ist und der cytosolische pH-Wert sich in alle Richtungen beeinflussen lässt. Die Puffer-Methode ist etwas einfacher in der Handhabung und mit geringeren Materialkosten verbunden. Aus diesem Grund wurde für die 2D-Elektrophorese-Projekte (siehe 2.2.5) diese Methode gewählt.

3.2 Nachweis selektiver Proteinphosphorylierungen als Element des Signaltransfers zur Auslösung der Alkaloidbiosynthese

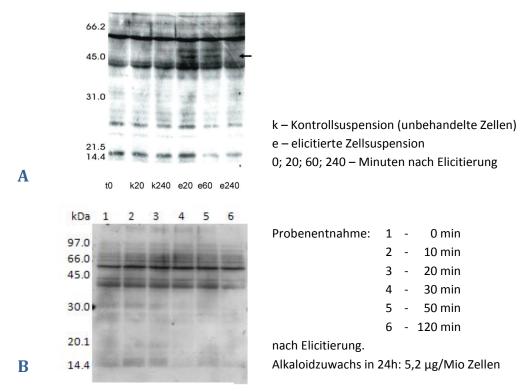
In der Vergangenheit fanden sich bereits Hinweise darauf, dass die selektive Phosphorylierung von Proteinen ein wesentlicher Schritt des Signaltransfers vor der Überproduktion der Benzo[c]phenanthridine in *Eschscholzia californica* ist (Evers, 2003). Zu Beginn der hier dargestellten Arbeiten boten sich mehrere experimentelle Methoden zum Nachweis von Veränderungen des Phosphorylierungsgrades bestimmter Proteine an. Die wesentlichen Alternativen waren:

- a) Der immunologische Nachweis phosphorylierter Aminosäuren innerhalb bestimmter Proteine und
- b) die selektive Anfärbung phosphorylierter Proteine mit niedermolekularen Fluoreszenz-Farbstoffen.

Im Folgenden wurden beide Verfahren auf ihre Anwendbarkeit im Rahmen der Expression des Alkaloidstoffwechsels in *Eschscholzia*-Kulturen geprüft.

3.2.1 Immunologischer Nachweis der Proteinphosphorylierung

Sven Evers (2003) hatte gezeigt, dass der Phosphorylierungsgrad bestimmter Proteinbanden an Tyrosin durch Elicitor-Einwirkung verändert wird [Abb. 3-5 A]. Der Nachweis der Protein-Tyrosin-Phosphorylierung erfolgte hier mithilfe des monoklonalen Antikörpers "PY99" (Cat.No. sc-7020, Santa Cruz Biotechnololgy, USA).



A – Quelle: Evers 2003 B – Buchheim 2004

Abb. 3-5 Nachweis der Protein-Tyr-Phosphorylierung nach Elicitierung. Westernblot auf NC-Membran nach mini SDS-PAGE der löslichen Proteinfraktion von *Eschscholzia californica* Kulturen.

Dieses Ergebnis ließ sich unter den Bedingungen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht reproduzieren [Abb. 3-5 B]. Es ist denkbar, dass

- a) Veränderungen des Phosphorylierungsmusters, die nicht direkt mit der Elicitierung der Alkaloidbiosynthese in der Zellkultur verbunden sind, für diesen Unterschied verantwortlich sind, oder
- b) Veränderungen der Epitop-Spezifität der verwendeten Antikörper-Charge, die seitens des Herstellers an einem Testantigen tierischen Ursprungs geprüft wird.

Für die unter a) gegebene Erklärung spricht, dass in den Arbeiten von Evers (2003) die o.g. Phosphorylierung auch unter Bedingungen detektiert werden konnte, die keine von der Vakuole ausgehenden pH-Signale ermöglichen, etwa nach Ausschaltung des H⁺-Gradienten am Tonoplasten mit Methylamin (siehe Dissertation S. Evers 2003, S. 63). Für die Variante b) spricht, dass auch in unserem Labor mehrere kommerzielle anti-TyrP-Antikörper verschiedene TyrP enthaltende Testpeptide [Abb. 3-6] nicht detektierten.

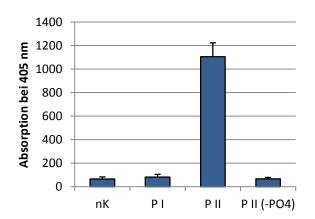
Ac-Ile-Tyr-Gly-Glu-Phe-NH₂ H-Thr-Ser-Thr-Glu-Pro-Gln-Tyr-Gln-Pro-Gly-Glu-Asn-Leu-OH

Peptid I (MW: 748,73 Da) Peptid II (MW: 1543,5 Da)

Abb. 3-6 Phosphotyrosin Testpeptide.

Zur Überprüfung der Spezifität von Antikörpern wurden diese Testpeptide, die sich in der Flankierung ihres TyrP-Restes unterscheiden, in ELISA Experimenten verwendet.

Für den Antikörper "PY-99" stellt der Tyrosinphosphatrest zwar eine notwendige jedoch keine hinreichende Voraussetzung für die Erkennung als Antigen dar. So ist er nicht in der Lage, das phosphathaltige Peptid I zu detektieren, bindet aber an das Peptid II nur wenn dieses auch den Tyrosinphosphatrest enthält. [Abb. 3-7].



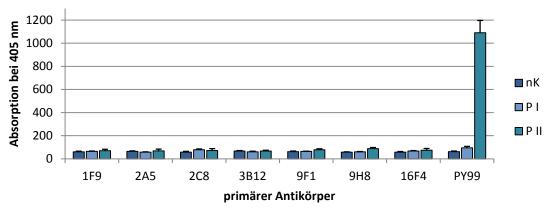
ELISA Platten, mit 3,5 μg/ml Testpeptid gecoatet prim. Antikörper: "PY99" (Cat.No. sc-7020) sek. Antikörper: goat anti-mouse IgG-HRP

(Cat.No. sc-2031) beide Santa Cruz Biotechnology, USA

Abb. 3-7 ELISA-Test der Spezifität das Antikörpers "PY-99". (nK: negativ-Kontrolle, P I: Peptid I, P II: Peptid II, P II (-PO4): phosphatfreies Peptid II)

Diese extrem hohe Spezifität ist ein bekanntes Problem besonders bei der Verwendung monoklonaler Antikörper. Vermindert bzw. vermieden werden kann es u.U. durch die gleichzeitige Verwendung mehrerer Antikörper mit leicht unterschiedlichen Spezifitäten. Das "Phosphotyrosine Detection Kit" (Cat.No. 0703/PTYR-KIT, nanoTools, Teningen, BRD) enthält sieben monoklonale Anti-TyrP-Antikörper verschiedener Spezifitäten. Das Resultat eines vergleichend zum "PY99" Klon durchgeführten ELISA Experimentes mit

diesen Antikörpern zeigt Abb. 3-8. Leider konnte auch hier nur festgestellt werden, dass keines der beiden Peptide I + II für diese Antikörper ein hinreichendes Antigen darstellt.



sek. Antikörper: goat anti-mouse IgG-HRP

Abb. 3-8 Grafische Darstellung der Absorptionswerte nach ELISA.

(nK: negativ-Kontrolle, PI: PeptidI, PII: PeptidII)

Offenbar spielt bei der immunologischen Detektion von Phosphoproteinen mit monoklonalen Antikörpern die jeweilige Umgebung der phosphorylierten Aminosäure (Tyr, Ser, Thr) eine entscheidende Rolle. Deshalb erschien die immunologische Detektion von Phosphoproteinen für die Zielstellungen dieser Arbeit als ungeeignet.

3.2.2 Nachweis von Proteinphosphorylierungen durch Fluoreszenzfärbung

Mit dem Fluoreszenzfarbstoff "ProQ® Diamond" von Molecular Probes (Invitrogen, Karlsruhe, BRD) ist es möglich, Phosphoproteine selektiv anzufärben. (siehe 2.2.8). Die so identifizierten Proteinspots können anschließend mit dem Fluoreszenzfarbstoff "Sypro® Ruby" desselben Herstellers gefärbt werden, um sie danach einer MS-basierten Sequenzierung zu unterziehen. Zur Anwendung dieses Verfahrens auf das Phosphorylierungsmuster der löslichen *Eschscholzia*-Proteine erwiesen sich im Rahmen dieser Arbeit einige Optimierungsschritte als notwendig. Das wesentliche Resultat des Optimierungsprozesses ist ein Verfahren zur Blotfärbung auf NC-Membran mit anschließender Blockierung der freien Proteinbindungsstellen (siehe 2.2.8.3).

3.3 Änderung des Phosphoproteinmusters nach Elicitorkontakt oder pH-shifts

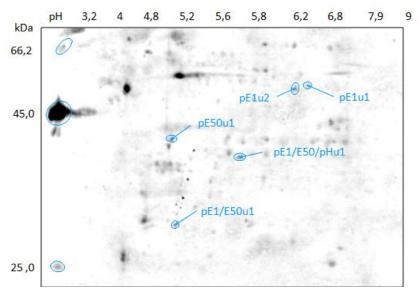
Die bisher beschriebenen Verfahren wurden bei der Analyse des Phosphorylierungszustandes der löslichen Proteine aus elicitierten Kulturen zusammengeführt. Die nach der 2D-Elektrophorese (siehe 2.2.5) erhaltenen Phosphoproteinmuster wurden digitalisiert und mithilfe der Software "Delta 2D" quantifiziert (siehe 2.2.10). Tab. 3-1 zeigt ein typisches Ergebnis dieses Verfahrens.

			Ko	ntrolle					
Spot		%Vol	ume		median	rsd	ratio	t-test	
	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Gel 4					
pE1u1	0,05923	0,07840	0,10349	0,13989	0,09095	31,67838			
pE1u2	0,18938	0,24407	0,31665	0,11091	0,21673	34,97314			
pE1/E50u1	0,20537	0,16270	0,10851	0,08432	0,13561	33,60130			
pE1/E50/pHu1	0,28703	0,17912	0,32747	0,46268	0,30725	32,31640			
pE50u1	0,31014	0,60920	0,53710	0,28100	0,42362	32,57370			
	niedrige Elicitor Konzentration								
	Gel 5	Gel 6	Gel 7	Gel 8					
pE1u1	0,35887	0,19686	0,45355	0,57151	0,40621	34,68296	4,4665	97,9781	
pE1u2	0,55257	0,42062	0,83329	0,89456	0,69293	28,95932	3,1973	96,2822	
pE1/E50u1	0,60546	0,48990	0,64375	0,24273	0,54768	31,59072	4,0388	97,9819	
pE1/E50/pHu1	1,51156	0,84452	0,65172	0,79743	0,82098	34,81300	2,6720	94,3127	
pE50u1	0,76884	0,65641	0,79100	0,92562	0,77992	12,17912	1,8411	92,7626	
		ı	hohe Elicito	r Konzentra	ation				
	Gel 9	Gel 10	Gel 11	Gel 12					
pE1u1	0,04019	0,18483	0,32403	0,05692	0,12088	75,41666	1,3291	53,4555	
pE1u2	0,08356	0,20555	0,51126	0,22293	0,21424	61,35013	0,9885	40,4019	
pE1/E50u1	0,70853	0,88766	0,78745	0,47088	0,74799	21,55994	5,5159	99,4701	
pE1/E50/pHu1	0,85734	0,75168	1,28831	0,82868	0,84301	22,50075	2,7437	98,4331	
pE50u1	0,78781	0,89040	1,40763	1,58818	1,14902	28,88160	2,7124	95,1977	
			künstlic	her pH-shif	it				
	Gel 13	Gel 14	Gel 15	Gel 16					
pE1u1	0,22606	0,16090	0,28141	0,09347	0,19348	36,95892	2,1274	83,6671	
pE1u2	0,46309	0,19877	0,66445	0,35309	0,40809	40,39077	1,8830	90,1836	
pE1/E50u1	0,24289	0,21546	0,43725	0,24798	0,24544	30,87002	1,8099	88,1342	
pE1/E50/pHu1	1,20275	1,79030	1,11862	1,19912	1,20094	20,27514	3,9087	98,4615	
pE50u1	1,18028	0,44391	0,80010	0,77452	0,78731	32,61185	1,8585	80,9667	

Tab. 3-1 Auszug aus der exportierten "Quantitation Table" eines 2D-Projektes.

Grau unterlegte Werte erfüllen die vorher festgelegten Kriterien für einen veränderten Phosphorylierungsstatus (siehe 2.2.10).

(%Volume: relatives Spotvolumen; median: Median der %Volumes eines Spots in der Gruppe; rsd: relative Standardabweichung; ratio: Verhältnis median Probengruppe / median Kontrolle; t-test: Irrtumswahrscheinlichkeit für die Annahme, dass die Stichproben aus der behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe sich nicht signifikant unterscheiden.



2D Auftrennung löslicher Proteine aus *Eschscholzia californica* (Ausschnitt). Medium: NC Membran Färbung: ProQ® Diamond Fusionsimage (Union)

Abb. 3-9 Proteinspots deren Phosphorylierungsmuster sich abhängig von Elicitor- bzw. pH-Behandlung ändert.

Insgesamt konnten so fünf Proteinspots gefunden werden, bei denen in drei unabhängigen Experimenten nach Behandlung mit niedrigen Elicitorkonzentrationen, hohen Elicitorkonzentrationen oder künstlichen pH-shifts bei mindestens einer Behandlung in jedem Experiment eine Erhöhung des Phosphorylierungssignals ("ratio" ≥ 2) sichtbar wurde [Tab. 3-1; Abb. 3-9]. Die elektrophoretischen Parameter dieser Proteine sind in Tab. 3-2 aufgeführt.

Keines der mit "ProQ® Diamond" detektierbaren Proteine zeigte jedoch einen deutlichen Abfall der Phosphorylierung. Geringere Veränderungen im Phosphorylierungsgrad sind mit dem verwendeten Verfahren nicht nachweisbar bzw. statistisch nicht reproduzierbar.

Protein/Spot	Mr	IEP
pE1u1	> 50 kDa	≈ 6,3
pE1u2	> 50 kDa	≈ 6,1
pE1/E50u1	< 30 kDa	≈ 5,1
pE1/E50/pHu1	> 35 kDa	≈ 5,7
pE50u1	< 40 kDa	≈ 5,1

 Tab. 3-2 Massen und IEP der ausgewählten Proteine mit ansteigendem Phosphorylierungsgrad (s. Text).

.

pE1u1 und pE1u2:

Sowohl die elektrophoretische Mobilität [Tab. 3-2] als auch die Phosphorylierungsprofile [Abb. 3-10; Abb. 3-11] dieser beiden Spots sind einander sehr ähnlich. Bei beiden Spots ist auffällig, dass ein deutlicher Anstieg des Phosphorylierungssignals nur bei geringen Elicitorkonzentrationen nachweisbar ist. Ein ähnlicher Anstieg war auch nach den künstlichen pH-shifts festzustellen, wenn auch mit geringerer statistischer Sicherheit. Dennoch lässt diese Übereinstimmung vermuten, dass die Phosphorylierung nach dem pH-Signal stattfindet. In beiden Fällen geschieht der Anstieg der Phosphorylierung vor dem Hintergrund einer sehr geringen Proteinmenge, was auf eine große Zahl von Phosphatgruppen pro Molekül hinweist.

Nach Behandlung mit hohen Elicitorkonzentrationen zeigen diese Proteine ein deutlich schwächeres Signal. Dies ist zunächst unerwartet, wenn man davon ausgeht, dass hohe Elicitorkonzentrationen beide Signalwege (siehe 1.2) auslösen und diese voneinander unabhängig ablaufen. Es ist jedoch bekannt, dass hohe Elicitorkonzentrationen zusätzlich Elemente der Hypersensitiven Reaktion (HR) auslösen, was durch den Verlust von K⁺, die Oxidation von Phenolen (Roos, et al., 1998) und den drastischen Abfall der mRNA Population (Angelova, et al., 2010) gezeigt wurde. Eine Einwirkung von Phosphatasen und/oder Proteasen im Zuge der HR kann daher nicht ausgeschlossen werden, lässt sich aber aufgrund der sehr geringen Proteinmengen in diesem Fall kaum belegen.

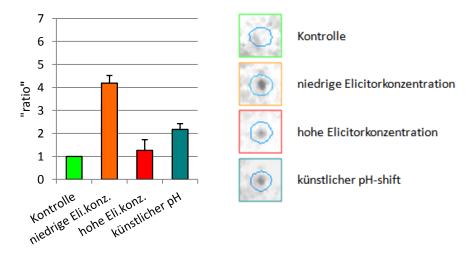


Abb. 3-10 Phosphorylierungsprofil von pE1u1.

Die Fehlerbalken stellen die SD der Quotienten ("ratios") aus den gemessenen Spotintensitäten dar (n = 3). Die SD der Intensitäten lag jeweils unter 35 %, Daten mit größerer Schwankungsbreite wurden von der Analyse ausgeschlossen.

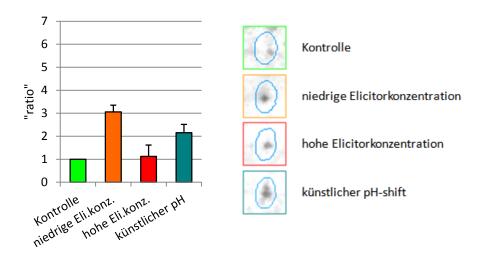


Abb. 3-11 Phosphorylierungsprofil von *pE1u2*.

Die Fehlerbalken stellen die SD der Quotienten ("ratios") aus den gemessenen Spotintensitäten dar (n = 3). Die SD der Intensitäten lag jeweils unter 35 %, Daten mit größerer Schwankungsbreite wurden von der Analyse ausgeschlossen.

pE1/E50u1:

Das Phosphorylierungssignal dieses Spots ist nach Einwirkung hoher Elicitor-konzentrationen stärker als bei den anderen Behandlungen [Abb. 3-12], wird also im Gegensatz zu *pE1u1* und *pE1u2* nicht durch HR-assoziierte Reaktionen unterdrückt. Da auch kleine Elicitorkonzentrationen, nicht aber künstliche pH-shifts, einen klaren Anstieg auslösen, erscheint dieses Protein nicht essentiell für den LPC-ΔpH-Weg, aber als ein Kandidat für Stress-Abwehr-Proteine, die gemeinsam mit den Alkaloidbiosynthesenzymen überexprimiert werden (Angelova, et al., 2010).

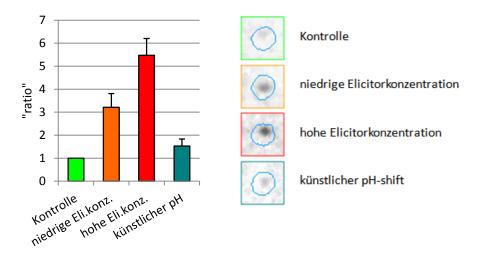


Abb. 3-12 Phosphorylierungsprofil von *pE1/E50u1*.

Die Fehlerbalken stellen die SD der Quotienten ("ratios") aus den gemessenen Spotintensitäten dar (n = 3). Die SD der Intensitäten lag jeweils unter 35 %, Daten mit größerer Schwankungsbreite wurden von der Analyse ausgeschlossen.

pE1/E50/pHu1 und *pE50u1*:

Beide Proteine zeigen etwa gleiche Reaktionen auf alle drei Behandlungen [Abb. 3-13, Abb. 3-14]. Damit entsprechen sie den Erwartungen für eine Phosphorylierung infolge

des LPC- Δ pH-Weges. Protein pE1/E50/pHu1 wird insgesamt stärker phosphoryliert als pE50u1. Bei Letzterem liegen die Anstiege des Phosphorylierungssignals nach Behandlung mit niedrigen Elicitorkonzentrationen und künstlichen pH-shifts nur geringfügig unter der hier vorgegebenen Schwelle von "ratio" ≥ 2 .

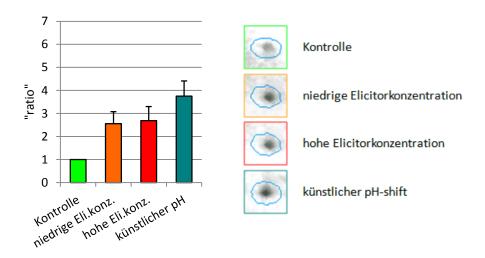


Abb. 3-13 Phosphorylierungsprofil von *pE1/E50/pHu1*.

Die Fehlerbalken stellen die SD der Quotienten ("ratios") aus den gemessenen Spotintensitäten dar (n = 3). Die SD der Intensitäten lag jeweils unter 35 %, Daten mit größerer Schwankungsbreite wurden von der Analyse ausgeschlossen.

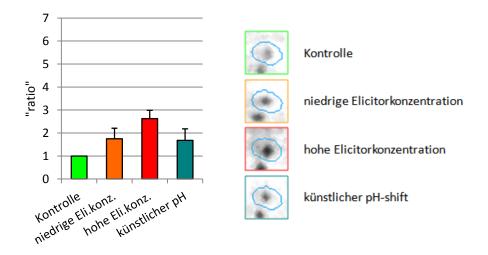


Abb. 3-14 Phosphorylierungsprofil von *pE50u1*.

Die Fehlerbalken stellen die SD der Quotienten ("ratios") aus den gemessenen Spotintensitäten dar (n = 3). Die SD der Intensitäten lag jeweils unter 35 %, Daten mit größerer Schwankungsbreite wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Die Stärke des durch den Farbstoff "ProQ® Diamond" messbaren Phosphorylierungssignals ist proportional zur Anzahl der vorhanden Aminosäurephosphate (Molekular Probes®, ProQ® Diamond Phosphoprotein Gel Stain, Data-sheet, Revised 18-May-2010). Diese Anzahl kann sowohl durch einen höheren Phosphorylierungsgrad des entsprechenden Proteins als auch durch die Erhöhung der Menge dieses Phosphoproteins (bei gleichbleibendem Phosphorylierungsgrad) gesteigert werden. Im Fall der fünf ausgewählten und beschriebenen Spots lässt sich eine Aussage, was tatsächlich zu der Erhöhung des Signals beigetragen hat, nur schwer treffen. Das liegt vor allem daran, dass

bei allen diesen Proteinen das Signal des Proteinfarbstoffs "Sypro® Ruby" sehr schwach bzw. gar nicht messbar war und somit (wie oben bereits beschrieben) eine statistisch gefestigte Aussage über die Zunahme der Proteinmenge mithilfe dieser Methode nicht getroffen werden kann. Dennoch ist eine Erhöhung der Proteinmenge durch eine gesteigerte Genexpression in diesen Fällen unwahrscheinlich, da die Proben bereits 20 min nach der Behandlung entnommen wurden. Eine messbare Auswirkung gesteigerter Genexpression liegt jedoch normalerweise im Bereich weniger Stunden. Zudem bedeutet eine höhere Proteinmenge an der Position eines Phosphoproteinspots nicht zwangsläufig, dass mehr Protein gebildet wurde, sondern lediglich, dass das Phosphorylierungsgleichgewicht (katalysiert von Kinase(n) und Phosphatase(n)) zur phosphorylierten Form verschoben wurde. Eine starke Phosphorylierung (eine solche ist anzunehmen bei starken "ProQ® Diamond"- und schwachen "Sypro® Ruby"-Signalen) führt aufgrund der Ladung der Phosphatreste zu einer Änderung des IEP und somit zu einer Positionsverschiebung des entsprechenden Spots.

Es ist also wahrscheinlicher, dass die erhöhten Phosphorylierungssignale tatsächlich auf gesteigerte Kinaseaktivitäten zurückzuführen sind.

3.4 Identifizierung ausgesuchter Phosphoproteine

Die Identifizierung der Proteine, die ihren Phosphorylierungsstatus nach Elicitierung bzw. künstlichem pH-shift ändern (siehe 3.3), sollte mit massenspektrometrischen Verfahren erfolgen (siehe 2.2.11). Damit diese Untersuchungen erfolgreich durchgeführt werden können, ist es erforderlich, eine ausreichende Proteinmenge für die Analysen zu gewinnen und zudem die Kontamination mit Fremdprotein so gering wie möglich zu halten. Da es sich bei Phosphoproteinen mit hoher Wahrscheinlichkeit um Signalproteine handelt, die häufig nur in sehr geringen Mengen vorhanden sind bzw. gebildet werden, stellte diese Gewinnung einer ausreichenden Proteinmenge eine ungewöhnlich starke Komplikation dar. Tatsächlich waren die "Sypro® Ruby" Signale aller fünf gefundenen Proteine (siehe 3.3) recht schwach (vergl. Abb. 3-16 A). Um dennoch eine ausreichende Proteinmenge gewinnen zu können, standen drei Möglichkeiten zur Erhöhung der Ausbeute zur Verfügung:

- 1. Anreichern der Phosphoproteine vor der 2D-Trennung,
- 2. Aufladen der maximal möglichen Proteinmenge auf die IEF-Streifen und damit auf die Gele sowie
- 3. "poolen" ausgeschnittener Spots aus mehreren Gelen.

3.4.1 Anreicherung der Phosphoproteine vor der 2D-Trennung

Die Anreicherung bzw. Abtrennung der Phosphoproteine aus komplexen Gemischen erfolgte in der Vergangenheit meist durch Immunopräzipitation. Dieses Verfahren hat jedoch zwei wesentliche Nachteile. Zum einen ist es recht teuer und zum anderen besteht wiederum das Problem der Antikörperspezifität (siehe 3.2.1).

In letzter Zeit stehen zur Aufreinigung der Phosphoproteine diverse kommerzielle Lösungen zur Verfügung. Auch beschrieben Wolschin, et al. (2005) eine relativ einfache und zudem kostengünstige Methode zur Anreicherung von Phosphoproteinen und -peptiden (MOAC) (siehe 2.2.3.1). Ein Vergleich dieser Methode sowie mehrerer kommerzieller Kits wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt (siehe 2.2.3), wobei die von Qiagen angebotene Lösung die beste Effizienz zeigte (vgl. z.B. [Abb. 3-15]).

Durch die Anwendung des "PhosphoProtein Purification Kit" (Qiagen, Hilden, BRD) ließen sich zumindest zwei (*pE50u1*, *pE1/E50u1*) der fünf unter 3.3 beschriebenen Proteine deutlich anreichern. Bei den restlichen drei Spots (*pE1u1*, *pE1u2*, *pE1/E50/pHu1*) fand keine ausreichende Anreicherung statt bzw. führte die Verwendung des Kits sogar zum Verlust des Signals [Abb. 3-16].

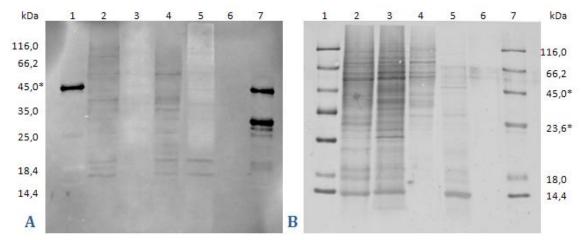


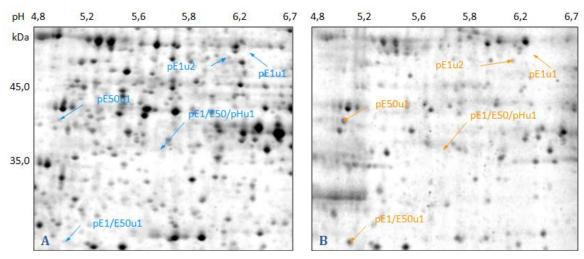
Abb. 3-15 SDS-PAGE zum Vergleich der Anreicherung von Phosphoproteinen durch MOAC und den "PhosphoProtein Purification Kit" (Qiagen, Hilden). Die getrennten Proteine wurden auf NC Membranen geblottet und gefärbt. A: mit "ProQ® Diamond, B: mit "Sypro® Ruby".

Spur 1,7: phosphorylierte Markerproteine: Ovalbumin (45,0 kDa) β-Casein (23,6 kDa)

Spur 2: Totalprotein

Spur 3, 4: Durchfluss und Eluat (Qiagen Kit) Spur 5, 6, : Durchfluss und Eluat (MOAC)

Die Ursache dafür ist höchstwahrscheinlich die extrem starke Bindung hochgradig phosphorylierter Proteine an das Säulenmaterial, was deren Eluierung problematisch macht. Hinweise darauf fanden sich bereits bei Wolschin, et al., 2005. Dort war gezeigt worden, dass das zweifach phosphorylierte Ovalbumin sich deutlich besser zurückgewinnen ließ als das α -Casein, das jeweils acht Phosphatreste trug. Da ein wesentlicher Nachteil der Kits darin besteht, dass die Herstellerfirmen keine (oder nur sehr begrenzt) Auskunft über die Funktionsprinzipien und die Chemikalienzusammensetzung geben, lassen sich die Protokolle leider nur schlecht bzw. gar nicht für spezielle Einzelfälle optimieren.



2D Auftrennung löslicher Proteine aus Eschscholzia californica (Ausschnitt).

Medium: PA Gel A - Totalprotein Färbung: Sypro® Ruby

B - Phosphoprotein (Eluat des "PhosphoProtein Purification Kit", Qiagen, Hilden, BRD)

Abb. 3-16 Anreicherung der Phosphoproteine

3.4.2 Aufladen der maximal möglichen Proteinmenge auf die IEF-Streifen und damit auf die Gele

Das Aufbringen einer maximalen Proteinmenge vor der 2D-Trennung zum Erreichen einer hohen Proteinausbeute erscheint zunächst trivial. Jedoch ist eine optimale Beladung der IEF-Streifen eine wichtige Voraussetzung für eine saubere Trennung. Ein Überladen führt zu einer Reihe von Komplikationen, wie z.B. Ausfällung und damit verbunder Copräzipitation von Proteinen und ihre daraus resultierende Immobilisierung. IEF-Streifen mit kleineren pH-Intervallen haben i.d.R. eine höhere Ladekapazität. Diese resultiert aus der simplen Tatsache, dass weniger Proteine einer komplexen Mischung ihren IEP innerhalb dieses kleineren Intervalls haben. Proteine, deren IEP außerhalb des Intervalls des Streifens liegt, bewegen sich an den Rand des Streifens. Auch hier können sie ggf. ausfallen und später "Streifen" auf dem Gel hinterlassen.

Es war also notwendig, ein pH-Intervall zu finden, in dem eine höhere Proteinbeladung möglich ist, in dem möglichst viele der gewünschten Proteine ihren IEP haben und das trotzdem eine saubere Trennung gewährleistet. Es stellte sich heraus, dass die Verwendung von IEF-Streifen mit einem Intervall von 4 - 7 mit einer Proteinbeladung von 450 µg diesen Anforderungen am besten gerecht wird [Abb. 3-17].

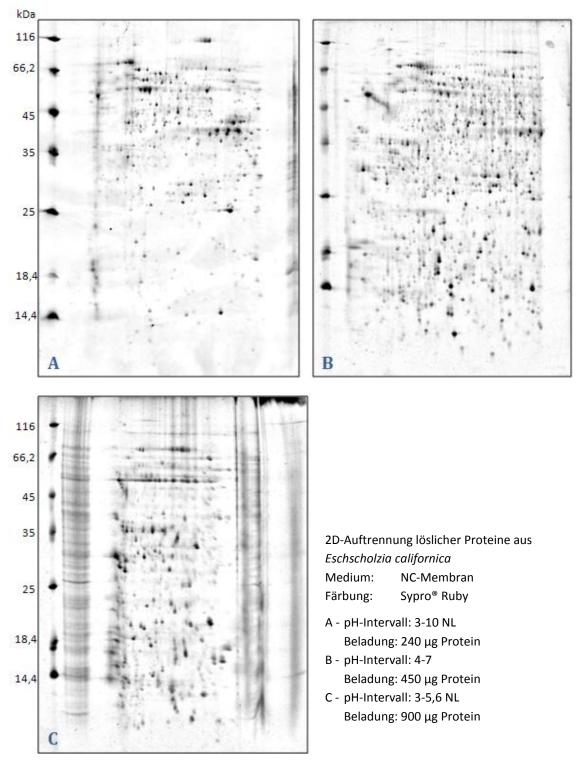


Abb. 3-17 Verwendung unterschiedlicher pH-Intervalle und Beladungen.

3.4.3 "Poolen" ausgeschnittener Spots aus mehreren Gelen

Die letzte Option, die Proteinmenge im Probenröhrchen für die Massenspektrometrie zu erhöhen, ist das Vereinen ausgeschnittener Spots aus mehreren Gelen. Auch hier besteht nicht die Möglichkeit, beliebig viele Gelstücke zu poolen um die gewünschte Proteinmenge zu erreichen, da mit jedem Gelstück das Probenvolumen zu- und somit

die Proteinkonzentration wieder abnimmt. Zudem wird die Kontaminationsgefahr mit Fremdprotein erhöht.

In der Praxis erwies sich die Vereinigung von Gelstücken aus drei bis maximal vier Gelen als praktikabel.

Durch die Kombination aller drei Methoden (3.4.1, 3.4.2 und 3.4.3) zur Anreicherung, gelang es, zumindest zwei der fünf Proteine in einer für massenspektrometrische Untersuchungen ausreichenden Menge zu gewinnen.

3.4.4 Die Identifizierung von pE1/E50u1

Durch massenspektrometrische Analysen, de novo-Sequenzierung und "Mascot" -Suche mithilfe der ermittelten MS-Daten (siehe 2.2.11) wurden aus dem Spot *pE1/E50u1* folgende Peptide identifiziert³:

Peptid I : DEIFCLFEGALDNLGSLK (Fragment von Peptid II)

 ${f Peptid}\; II$: sfavkdeifclfegaldnlgslk

Peptid III : SANEVMLVIEAYK

Peptid	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Score	Expect
I	1020,9039	2039,7933	2039,9874	-	0	70	7,6 · 10 ⁻⁵
				0,1941			
II	858,4052	2572,1938	2572,2883	-	1	22	3,2
				0,0945			
III	741,8718	1481,7290	1481,7435	-	0	92	6,2 · 10 ⁻⁶
				0,0145			

Tab. 3-3 Mascot Ergebnisse der gefundenen Peptide für *pE1/E50u1*.

(Observed: gemessenes Masse- Ladungsverhältnis, Mr (expt): um die Ladung bereinigte gefundene Masse, Mr (calc): theoretische Masse des angegebenen Peptids, Delta: Differenz aus Mr (expt) und Mr (calc), Miss: im Peptid noch vorhandene Trypsinspaltstellen, Score: Ionscore, gibt an wie gut ein experimentell ermitteltes Spektrum zu dem simulierten Spektrum des identifizierten Peptides passt, Expect: Wahrscheinlichkeit eines falsch positiven Treffers (Zufallstreffer))

Diese Peptide wurden in einer Reihe pflanzlicher Proteine gefunden. Die höchsten Übereinstimmungen traten mit einem "aluminium induced protein" in *Codonopsis lanceolata* (AY835928), *Avicennia marina* (AF363286) und *Gossypium hirsutum* (AY368487), sowie einem "hypothetical protein" in *Solanum tuberosum* (ABA46788) auf. Die Aminosäuresequenzen dieser Poteine im Vergleich zeigt Abb. 3-18.

Die Suche nach der Sequenz dieses "aluminium-induced-like proteins" in einer noch unvollständigen Datenbank, die ESTs aus *Eschscholzia californica* enthält (http://pgn.cornell.edu), blieb leider ohne Ergebnis. Daher wurde versucht, mittels PCR sowie durch ein cDNA-bank-screening das Gen und damit die AS-Sequenz dieses Proteins in *Eschscholzia californica* zu ermitteln.

-

³ durchgeführt von Dr. Christian Schmelzer et al., Institut für Phamazeutische Technologie und Biopharmazie, MLU Halle-Wittenberg

AY835928 AF363286 AY368487 ABA46788	.	35 45 55 VNRFLKS NASAVSMQVG DDVHLAYTHH .GEA .SVKIAQKET .S.GHI .H.QFS.	65 75 NESPSAPRSF AVKDEIFCLF .Q.ALR KLQ
AY835928 AF363286 AY368487 ABA46788	85 95 105 EGALDNLGSL KQQYGLSKSA NEVVLVIEAY KALE	115 125 135 RDRAPYP PNHVVGHLEG NFAFVVFDKSSQI I SI	145 155 TSTLFVATDQ AGKVPLYWGIE FAS. F
AY835928 AF363286 AY368487 ABA46788		195 205 215 TAVGELR CYENPKNKIT AVPATEEEIWI. SQG. SE	225 235 GAKFMVEGPG VLTATE MIA.SKKA .VA
AY835928 AF363286 AY368487 ABA46788	 245 FSSLSSEGKT RP		

Abb. 3-18 Vergleich der AS-Sequenzen von "aluminium induced proteins", bzw. einem "hypothetical protein" verschiedener Pflanzen nach Mascot-Suche mit MS-Daten.

("." = Übereinstimmung mit erster Sequenzzeile,"-" = Lücke, blau = homolge Bereiche zu via MS-identifizierten Peptiden)

Für die PCR wurden die Primer "Alu_for" und "Alu_rev" aus den stark homologen Bereichen der AS 81 bis 87 ("für Alu_for") und AS 208 bis 214 (für "Alu_rev") mithilfe des codon usage von *Eschscholzia californica* (http://www.kazusa.or.jp /codon/) abgeleitet [Tab. 2-2]. Der zu amplifizierende Bereich umfasst 133 AS und sollte mit cDNA template eine Bande von ca. 400 bp liefern. Erhalten wurde jedoch eine Bande von ca. 900 bp [Abb. 3-19] deren DNA-Sequenz nur eine sehr geringe Homologie zu der Gensequenz des "Al-inuced-protein" aus *Gossypium hirsutum* (< 40 %) und *Codonopsis lanceolata* (< 38 %) zeigte [Abb. 3-20].

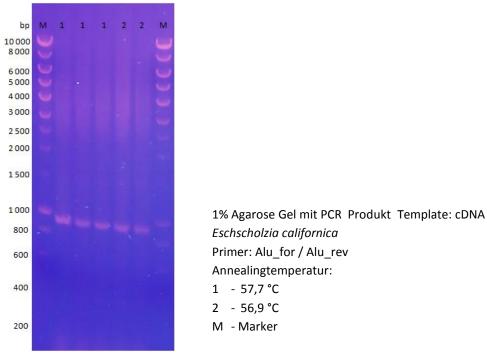


Abb. 3-19 Ergebnis der PCR zur Identifizierung der Sequenz des "Al-induced-like proteins" Gens in *Eschscholzia californica*.

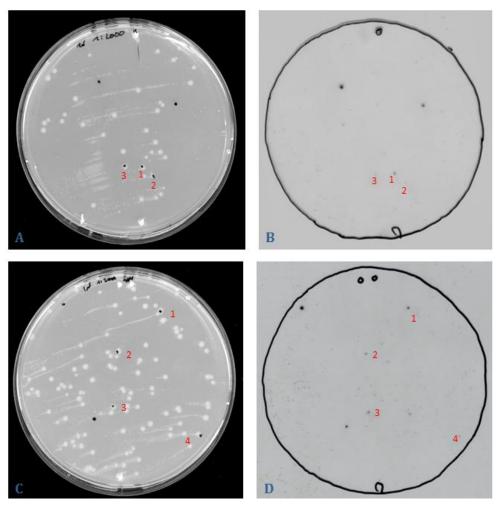
Gosyypium Codonopsis	5 	15 	 25 ATGTTGGG	35 AGT-ATTTAG	45 CAGTGCGATA	55 GTGTCTCCGC AGA.	65 CGGACGAGCT	75 GGTGGCGGCC
Seq. f.PCR	GGGTGCTTCT	TGATAATCTG	CGGCTAC	.T.AGC.G	.GTCTGCG.G	AA-ATTA.	GT.AA	ATAT.A
Gosyypium Codonopsis Seq. f.PCR	85 GGTTGCCG-A	95 ACTCCATCAC	105 CTAAGATAAC .GC TA.GA.AC.G	115 GGCGGACGCT ACGG	125 CTGGTGAAAC	135 GGTTCCTTGA CA.	145 GACGAACT AT.AG	155 CCTCCGGCGT .TG.CG
	1 1							
Gosyypium Codonopsis Seq. f.PCR	165 GTCCATGCAC	175 ATCGGAGACC GCTG	185 ATGTCCAATT .CTT CA.CAGT.G.	195 CGCTTATTCT GCA	205 CACCATAAAG	215 AGTCTCCTTTCG.C	225 ACAGCC-CAG CGCT	235 ATCATTTGCT
Gosyypium Codonopsis Seq. f.PCR	245 GTGAAAGACG TT.	255 AAATCTTCTG .GT	265 CTTGTTTGAG	275 GGAGCCCTTG	285 -ATAACTTGG CA.	295 GGAGTTTAAA .TC.G	305 GCAGCAATAT GC	315 GGTCTGGCAA CT.T.
Gosyypium Codonopsis Seq. f.PCR	325 AGTCAGC-AA	335 ATGAAGTGAT .CGCG.	345 ATTGGTCATT TGCAAAG	355 GAAGCTTACA	365 AGGCCCTTCG .AT	375 -TGACCGAGC -CG	385 ACCTTATCCT	395 CCAAACCATG C
Gosyypium Codonopsis Seq. f.PCR	405 TGGT	415 TGGCCATCTA GAG	425 ATTGGG-AGC GAA.AAT TCATTGAT	435 TTTGCTT	445 TCATTGTCTT .TG.G	455 TGATAAATCC	465 ACCTCCACTT	475 TGTTTGTGGC
Gosyypium Codonopsis Seq. f.PCR	485 TTCTGATCAA .A.CC	495 TTTGGTAAGG GC	505 TTCCTCTCTAGACGGCG	515 TTGGGGAATC	525 ACCGCCGACG TTT.	535 GATATGTGGC .G	545 CTTTGCTGAT AA	555 AATGCTGAAT GT.
Gosyypium Codonopsis Seq. f.PCR	565 TGCTGAAAGG	575 TGCCTGTGGC	585 AAATCTCTTGGAT.TGT.GA	595 CTTCTTTCC-	605 CTCAAGGCTG	615 TTTCTACTCC	625 ACAGCAGTAG	635 GAGGATTAAG A.C.T
Gosyypium Codonopsis Seq. f.PCR	645 AAGCTA T	655 TGAGAATCCT	665	675 TCACTGCAGT	685 GCCTGCT TC	695 GAAGAAGAGG ACTGA.	705 AGATATGGGG .AC	
Gosyypium Codonopsis Seq. f.PCR	725 AAGGTGGAAG .TT	735 GGCCAGCTGT	745 TGTTGCTGCC .CA.A CA.CAAA.GT	755 ACAGAGT	765 	775 	785 	795
Gosyypium	805	815	825	835	845	855	865	875
Codonopsis Seq. f.PCR			CGCGTAGTGC					AGCGAAATGA
Gosyypium Codonopsis	 885 	895	905	915	Johnson		113001010	
Seq. f.PCR	rgcaga'I'GAA	AATTAATAAT	T-GTCCATCT	GAGAC				

Abb. 3-20 Alignment der Gensequenzen der "Al-induced proteins" aus *Gossypium hirsutum* und *Codonopsis lanceolata* mit dem sequenzierten PCR Produkt aus *Eschscholzia californica*. ("." = Übereinstimmung mit erster Sequenzzeile,"-" = Lücke)

Nachdem die Gensequenz dieses Proteins mithilfe von PCR-Techniken nicht zu ermitteln war, wurde mithilfe des durch de novo-Sequenzierung bestätigten Peptid II (SFAVKDEIFCLFEGALDNLGSLK) wiederum unter Zuhilfenahme des codon usage von Eschscholzia californica (http://www.kazusa.or.jp/codon/) eine DNA-Sonde für ein cDNA-Bank-screening mit folgender Sequenz synthetisiert:

TCATTTGCTGTTAAAGATGAAATTTTTTTGTCTTTTTTGAAGGTGCTCTTGATAATCTTGGTTCACTTAAA

Das cDNA-Bank-screening erfolgte wie unter 2.3.6 beschrieben in einem Zwei-Schritt-Auswahlverfahren. Das Ergebnis des zweiten screening-Durchgangs zeigt Abb. 3-21. Die nummerierten Klone wurden gepickt und in 10 ml LB-Kan Medium über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die aus diesen Kulturen isolierte Plasmid-DNA (siehe 2.3.1.2) wurde zur Überprüfung sequenziert.



- A cDNA Bank Kulturen (Schale I)
- B entwickelter Fotofilm nach screening-Durchgang (Schale I)
- C cDNA Bank Kulturen (Schale II)
- D- entwickelter Fotofilm nach screening-Durchgang (Schale II)

Abb. 3-21 Ergebnisse des zweiten cDNA-Bank-screening-Durchgangs.

Auch diese Sequenzen wiesen nur wenig Homologien (durchschnittlich < 40 %) zu den Gensequenzen der "Al-induced proteins" aus den angegeben Pflanzen auf. Jedoch fanden sich Bereiche, die eine Ähnlichkeit zwischen 61 % (Klon I/1, Abb. 3-22 A) und 51 % (Klon I/3, Abb. 3-22 B) zu der eingesetzten DNA-Sonde aufwiesen. Damit ist die positive Selektion dieser Klone im screeening-Prozess zu erklären.

B

Abb. 3-22 Alignment homologer DNA Bereiche der Klone I/1 (A) und I/3 (B) zur DNA Sonde.

Ein zweites cDNA-Bank-screening, das zur Steigerung der Sondenselektivität mit einer erhöhten Hybridisierungstemperatur von 60 °C (statt der zuvor gewählten 55 °C) durchgeführt wurde, führte zu einem ähnlichen Resultat (Daten nicht gezeigt). Auch hier ließ sich die gesuchte Gensequenz in *Eschscholzia californica* nicht auffinden. Offenbar ist die benutzte Sonde für ein solches screening unzureichend selektiv.

3.4.5 Die Identifizierung von pE50u1

Durch wiederholte massenspektrometrische Analysen und "Mascot" Suche mithilfe der ermittelten MS-Daten (siehe 2.2.11), konnten folgende Peptide identifiziert werden⁴:

Peptid I : AASFNIIPSSTGAAK

Peptid II : GILGYTEDDVVSTDFVGDNR

Peptid III : DAPMFVVGVNEK
Peptid IV : VPTVDVSVVDLTVR

Peptid	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Score	Expect
I	717,8823	1433,7500	1433,7514	-	0	36	0,3
				0,0014			
II	1086,5197	2171,0248	2171,0019	0,0230	0	107	$2,1\cdot 10^{-7}$
III	661,3324	1320,6502	1320,6384	0,0119	0	15	6,4
IV	749,9348	1497,8550	1497,8403	0,0147	0	89	1,2 · 10 ⁻⁵

Tab. 3-4 Mascot Ergebnisse der gefundenen Peptide für pE50u1.

(Observed: gemessenes Masse- Ladungsverhältnis, Mr (expt): um die Ladung bereinigte gefundene Masse, Mr (calc): theoretische Masse des angegebenen Peptids, Delta: Differenz aus Mr (expt) und Mr (calc), Miss: im Peptid noch vorhandene Trypsinspaltstellen, Score: Ionscore, gibt an wie gut ein experimentell ermitteltes Spektrum zu dem simulierten Spektrum des identifizierten Peptides passt, Expect: Wahrscheinlichkeit eines falsch positiven Treffers (Zufallstreffer))

Diese vier Peptide konnten alle der "Glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase" (GAPDH) verschiedener Pflanzen zugeordnet werden. Die höchsten Übereinstimmungen traten in *Arabidopsis thaliana* (NP_172801), *Nicotiana tabacum* (CAB39974), sowie einer *Populus* Kreuzung (ABA03227) auf [Abb. 3-25].

•

⁴ Durchgeführt von Frau Dr. Angelika Schierhorn et al., Institut für Biochemie, MLU Halle-Wittenberg

Alle vier Peptide wurden in der o.g. EST - bank aus *Eschscholzia californica* (http://pgn. cornell.edu) gefunden und sind in dem durch das unigene 338158 kodierten Protein enthalten [Abb. 3-23].

>unigene 338158

Δ

APSKISISLYLLXIYSTIMGSGKIKIGINGFGRIGRLVARVALQRDDVELVAVNDPFITTDYMTYMFKYDSVHGQWKNHELKVKDSNTLLFGEKQVAVFGHRN
PEEIPWAETGAEYVVESTGVFTDKDKAAAHLKGGAKKVIISAPSKDAPMFVVGVNEKEYTSDINILSNASCTTNCLAPLAKVINDRFGIVEGLMTTVHAMTAT
QKTVDGPSSKDWRGGRAASFNIIPSSTGAAKAVGKVLPALNGKLTGMAFRVPTADVSVVDLTVRLEKKATYDEIKAAIKEESEGKLKGILGYTEDDLVSTDFI
GDNRSSIFDAKAGIALNDNFVKLVSWYDNEWGYSSRVIDLIVHVHSCQXACQAHXRNHGKEVGMITDLERXXIKXVVVIXPLEAWSSLFWVHKKRKGWVLVNK
KVTFSFCFEFYESFFMLLGKINXVGKTVLFQRWCLFLVPSXPNIYGWFFCVLMGIRLIRFXKKKKKKKNS

B

Abb. 3-23 Das unigene 338158 (DB: ESIA 200505; http://pgn.cornell.edu/; 12.03.2008). (grau: nicht codierende Bereiche; X: Stoppcodon; blau: Bereiche homolog zu den gefundenen Peptiden)

Zur Überprüfung dieser Gensequenz wurde *Eschscholzia californica* cDNA als Template für eine PCR eingesetzt. Als Primer dienten "GAPDH_for" und "GAPDH_rev" [Tab. 2-2], die mithilfe der unigene 338158 -Sequenz abgeleitet wurden. Es wurde eine DNA der erwarteten Größe amplifiziert [Abb. 3-24], die bei der Sequenzierung eine fast völlige Übereinstimmung mit der gefundenen DNA aus der EST-Bank ergab.

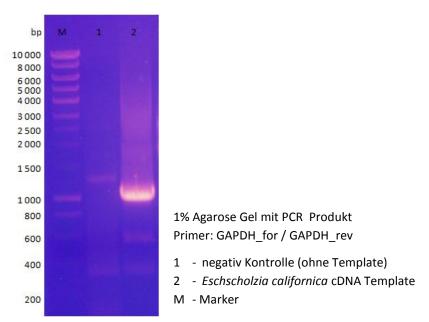


Abb. 3-24 Ergebnis der PCR zur Überprüfung der Sequenz des "GAPDH" Gens in Eschscholzia californica.

Lediglich an den Positionen 243, 435, 462, 609 und 708 wurden Abweichungen von der unigene-Sequenz festgestellt, die jedoch keine Auswirkungen auf die resultierende Aminosäuresequenz [Abb. 3-25] haben. Da diese Sequenzierung mehrmals und aus unterschiedlichen Proben mit jeweils demselben Ergebnis durchgeführt wurde, können Sequenzierfehler an dieser Stelle ausgeschlossen werden.

Eschscholzia NP_172801 CAB39974 ABA03227	.A.DKR .A.KV		v	VELVAVNDPF 	E .SVE		HDK HDK	P.T
Eschscholzia NP_172801 CAB39974 ABA03227	85 VFGHRNPEEI ID.	95 PWAETGAEYV G.ADF.	105 VESTGVFTDK	115 DKAAAHLKGG	125 AKKVIISAPS	135 KDAPMFVVGV	145 NEKEYTSDIN HKLD	155 ILSNASCTTN .V
Eschscholzia NP_172801 CAB39974 ABA03227	165 CLAPLAKVIN	175 DRFGIVEGLM	185 TTVHAMTATQ	195 KTVDGPSSKDMA.	205 WRGGRAASFN	215 IIPSSTGAAK	225 AVGKVLPALN	235 GKLTGMAFRV
Eschscholzia NP_172801 CAB39974 ABA03227	245 PTADVSVVDL V	255 TVRLEKKATYA	265 DEIKAAIKEE	275 SEGKLKGILGM	285 YTEDDLVSTDV	295 FIGDNRSSIF .V	305 DAKAGIALND S.	315 NFVKLVSWYD K
Eschscholzia NP_172801 CAB39974 ABA03227	325 NEWGYSSRVI V	335 DLIVHVHSCQMSKAK.MA.V.	- - -					

Abb. 3-25 Vergleich der AS-Sequenzen von GAPDH verschiedener Pflanzen nach Mascot-Suche mit MS-Daten.

Das hier identifizierte GAPDH-Protein enthält mit 23 Serin-, 22 Threonin- und neun Tyrosin-Bausteinen insgesamt 54 potentielle Phosphorylierungsstellen, was einen erheblichen Phosphorylierungsgrad vermuten lässt.

In Pflanzen existieren drei Formen der GAPDH: eine im Cytosol lokalisierte, die an der Glykolyse beteiligt ist, und zwei in den Chloroplasten lokalisierte Formen, die an Photosynthesereaktionen beteiligt sind. Um zu charakterisieren, zu welcher Form das hier gefundene Enzym gehört, wurde ein NCBI-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) mit der ermittelten FASTA-Sequenz des *Eschscholzia*-Proteins durchgeführt (Datenbank: UniProtKB/Swiss-Prot, Algorithmus: BLASTP). Die höchsten Übereinstimmungen zeigen Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenasen aus *Magnolia liliiflora* (P26518), *Antirrhinum majus* (P25861) und *Ranunculus acris* (P26521) auf [Abb. 3-26].

[&]quot;." = Übereinstimmung mit erster Sequenzzeile,"-" = Lücke, blau = homologe Bereiche zu via MS-identifizierten Peptiden

Eschscholzia P26518 P25861 P26521	5 1 MGSGKIKIGI NGFGR .GK	5 25 IGRLV ARVALQRDD	35 V ELVAVNDPFI	45 TTDYMTYMFK 	55 YDSVHGQWKN H	65 HELKVKDSNTK.	75 LLFGEKQVAV P.T.
Eschscholzia P26518 P25861 P26521	85 9 FGHRNPEEIP WAETG .VGRR.S	5 105 AEYVV ESTGVFTDK F	115 D KAAAHLKGGA	125 KKVIISAPSK	135 DAPMFVVGVN	145 EKEYTSDINI .HK.N.D.	155 LSNASCTINC V
Eschscholzia P26518 P25861 P26521	 165 17 LAPLAKVIND RFGIV K	5 185 EGLMT TVHAMTATQSI	195 K TVDGPSSKDW	205 RGGRAASFNI	215 IPSSTGAAKA	225 VGKVLPALNG	235 KLTGMAFRVP
Eschscholzia P26518 P25861 P26521	245 25 TADVSVVDLT VRLEK .V	5 265 KATYD EIKAAIKEE A.S.EVA.	275 S EGKLKGILGY	285 TEDDLVSTDFE.V	295 IGDNRSSIFD V.S	305 AKAGIALNDN	315 FVKLVSWYDN
Eschscholzia P26518 P25861 P26521	325 33 EWGYSSRVIDLIV LI V	5 HVHSC Q .MA .MA.V .					

Abb. 3-26 Vergleich verwandter GAPDH Sequenzen verschiedener Pflanzenspezies nach NCBI BLAST. ("." = Übereinstimmung mit erster Sequenzzeile,"-" = Lücke)

In allen Fällen handelt es sich um die cytosolische Form der GAPDH (GAPC). Aus diesem Ergebnis und der Tatsache, dass die Analysen der Phosphorylierungsmuster mit der löslichen Proteinfraktion aus *Eschscholzia* durchgeführt wurden (siehe 2.2.1), lässt sich schließen, dass es sich bei dem hier gefunden Protein ebenfalls um die cytosolische From der GAPDH handelt.

3.5 Die Rolle der GAPDH im Elicitierungsprozess

3.5.1 Die Funktion von GAPDH

Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase katalysiert die Reaktion des Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) zum 1,3-Bisphosphoglycerat [Abb. 3-27] und ist damit essentiell für den Ablauf der Glykolyse. Das Enzym ist daher hochkonserviert und kommt praktisch in allen Lebensformen mit geringen Spezies-zu-Spezies-Variationen vor (Sirover, 2011). GAPDH dient daher häufig als interner Standard ("housekeeping-protein") in Experimenten zur Genexpression. Die katalytische Funktion der GAPDH ist auch an der Abwehr gegen oxidativen Stress und der Generierung reaktiver Sauerstoffspezies bei der Pathogenabwehr (siehe 1.1) beteiligt (Nakajima, et al., 2009), sehr wahrscheinlich über die Regulation des NAD(P)-Spiegels. Dieses Nukleotid ist das Substrat der NADPH-Oxidase, die in tierischen und pflanzlichen Zellen eine entscheidende Rolle bei der Abwehr und Vernichtung pathogener Mikroorganismen spielt (Kobayashi, et al., 2006). In der Kartoffel ist die Expression von GAPDH infolge von biologischem Stress gesteigert (Laxalt, et al., 1996), und in *Arabidopsis thaliana* dient es als H₂O₂-Sensorenzym (Hancock, et al., 2006).

Abb. 3-27 Mechanismus der von GAPDH katalysierten Reaktion von Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat (nach: Alberts, et al., 1997).

HS~

GAPDH

1,3-Bisphosphoglycerat

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Befunde für Funktionen des GAPDH-Proteins erhalten, die neben der ursprünglich bekannten Rolle als Glykolyseenzym existieren. In tierischen Zellen gilt GAPDH inzwischen als ein Prototyp für "moonlighting", d.h. für die Existenz funktioneller Domänen eines Proteins, die unabhängig von seinem katalytischen Zentrum und den dort ablaufenden Reaktionen regulative Funktionen bei anderen zellulären Aktivitäten besitzen ((Sirover, 2011), siehe 1.4). So ist das GAPDH-Protein in Säugetieren beispielsweise an der transkriptionalen (McKnight, 2003) und posttranskriptionalen (Backlund, et al., 2009) Genregulation, dem vesikulären Proteintransport (Tisdale, et al., 2007), einigen rezeptorvermittelten Signalwegen (Raje, et al., 2007) sowie der Instandhaltung der DNA-Integrität (Azam, et al., 2008) beteiligt.

Obwohl die GAPDH normalerweise im Cytoplasma (dem Ort der Glykolyse) lokalisiert ist, wurde ihre Translokation in den Zellkern (Hara, et al., 2005; Zannat, et al., 2011), sowie (bei Bakterien) sogar an die Zelloberfläche bzw. in das Außenmedium, beschrieben (Matta, et al., 2010). Diese Translokation ist ganz offenbar Voraussetzung für die beschriebenen vielfältigen zusätzlichen Funktionen (siehe 1.4).

Auch die bisher bekannten Daten zur GAPDH in *Eschscholzia californica* legen eine "Doppelfunktion" dieses Proteins bei der Ausbildung der Alkaloid-Biosynthese nahe.

- a) Als Stress-protektives Enzym, in seiner katalytischen Funktion: GAPDH wird parallel mit dem ratelimitierenden Biosynthese-Enzym, 4'-OMT überexprimiert und zwar gemeinsam mit zwei anderen Stress-protektiven Proteinen (Angelova, et al., 2010). Diese Steigerung wurde sowohl auf mRNA- als auch auf der Protein-Ebene gezeigt.
- b) Als Gen-Kontroll Protein: Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte selektive Phosphorylierung ist kaum mit der katalytischen Funktion vereinbar; es gibt bisher keine Hinweise darauf, dass das GAPDH-Protein im Zusammenhang mit der Umsetzung des GAP phosphoryliert wird.

Für die Aufklärung einer potentiellen Funktion der GAPDH im Signaltransfer zur Expression der Alkaloidbiosynthese boten sich im Rahmen dieser Arbeit im Wesentlichen zwei experimentelle Optionen:

- die Ausschaltung der Elicitor-abhängigen Phosphorylierung des GAPDH Proteins,
- 2. die Verringerung der Menge des GAPDH-Proteins

und die Feststellung der jeweiligen Konsequenzen für die Alkaloid-Antwort der Zellen.

Option 1. erfordert umfangreiche Vorarbeiten zur Identifizierung der beteiligten Kinase(n), die im verfügbaren Zeitrahmen nicht realisierbar waren. Zudem ist anzunehmen, dass die GAPDH nicht das einzige Substrat dieser Kinase(n) ist, d.h. eine Hemmung ihrer Aktivität würde wahrscheinlich nicht exklusiv die Phosphorylierung des GAPDH-Proteins verhindern.

Die Option 2. bietet zwar keine Möglichkeit, zwischen der Bedeutung von GAPDH-Menge und dem Ausmaß ihrer Phosphorylierung zu unterscheiden, eröffnet aber die Chance, eine essentielle Rolle dieses Proteins am Signaltransfer zur Alkaloidproduktion überhaupt nachzuweisen. Eine solche Funktion des GAPDH-Proteins ist bisher nicht bekannt. Deshalb wurde dieser Ansatz weiter verfolgt (siehe 2.4).

3.5.2 Gen-Silencing-des GAPDH-Gens in Eschscholzia californica

Das "Ausschalten" des GAPDH-Zielgens sollte mithilfe des RNA-Interferenz (RNAi)-Mechanismus erfolgen. Dieses u.a. in Fadenwürmern (*Caenorhabditis elegans*) ent-deckte Phänomen (Fire, et al., 1998) wurde inzwischen als universeller Mechanismus im Bereich der Gen-Kontrolle in allen untersuchten Eukaryonten bestätigt. Auch in Pflanzen existieren dazu profunde Erfahrungen (Hamilton, et al., 1999). RNAi ist die experimentelle Anwendung des "post-transcriptional gene silencing" (PTGS) zur gezielten Ausschaltung einzelner oder Gruppen von mRNAs. Es ist davon auszugehen, dass das in der Vergangenheit oft verwendete Verfahren der antisense-Repression (in *Eschscholzia* bereits u.a. zur Verminderung der Expression des $G\alpha$ -Gens angewandt, (Viehweger, et al., 2006; Heinze, et al., 2007)) auf dem gleichen Grundmechanismus beruht.

Durch Transformation wird die Zelle veranlasst, eine spezifische doppelsträngige RNA (dsRNA) zu bilden, die Teile des Zielgens und damit Teile der zu erwartenden Ziel-RNA enthält. Diese wird von dsRNA-spezifischen Endoribonukleasen (wie z.B. "Dicer") in kleinere dsRNA-Stücke gespalten. Diese 20 - 25 nt langen Fragmente ("small interfering RNA" (siRNA)) binden an einen Enzymkomplex, den "RNA-induced silencing complex" (RISC). An diesem wird die dsRNA in ssRNA aufgespalten, wobei der sense-Strang abgebaut und der antisense-Strang am RISC verbleibt. Letzterer bindet komplementär an die Ziel-mRNA und der resultierende Doppelstrang wird durch RISC gespalten. Bruchstücke dieses Abbauvorgangs werden weiter abgebaut oder können ihrerseits eine RNA-abhängige RNA-Polymerase induzieren, die erneut die spezifische dsRNA synthetisiert und dadurch einen zyklischen Prozess ermöglicht. Zudem wird nach Spaltung der Ziel-RNA der RISC wieder frei und kann an weitere Ziel-RNA Stränge binden [Abb. 3-28].

Zur Auslösung des RNAi-Mechanismus in Pflanzen erwiesen sich Konstrukte, welche die Erzeugung von sogenannten "hairpin"-RNAs (hpRNA) bewirken, den klassischen einzelsträngigen RNA-Konstrukten (z.B. antisense-RNA) als überlegen (Waterhouse, et al., 1998; Smith, et al., 2000; Wesley, et al., 2001). Aus diesem Grund sollte das "Ausschalten" des GAPDH-Gens in *Eschscholzia californica* -Keimwurzeln mithilfe eines Vektors erfolgen, der über die Synthese von hpRNA ein RNAi vermitteltes PTGS auslöst.

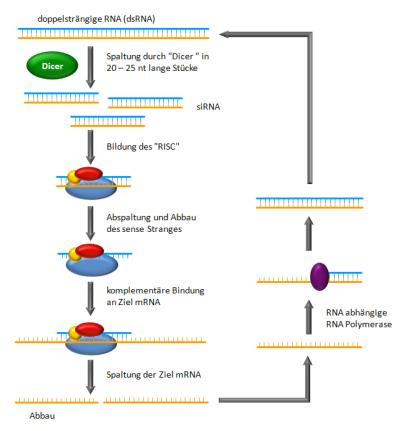


Abb. 3-28 Vereinfachte schematische Darstellung des RNAi-Mechanismus.

3.5.2.1 Herstellung eines geeigneten RNAi-Vektors

Zunächst wurde das bekannte GATEWAY™-System für diese Aufgabe angewendet (siehe 2.4.1.1). Dazu wurde ein Volllängeklon des GAPDH-Gens erfolgreich in den pDONR™ 222 Vektor [Abb. 2-18] kloniert. Die erwartete Sequenz wurde durch DNA-Sequenzierung (siehe 2.3.7) bestätigt [Abb. 3-29].

Abb. 3-29 DNA Sequenz Ausschnitt aus pDONR™222 mit eincloniertem GAPDH-Gen. (blau: Bereiche identisch mit GAPDH-Gen)

Die aufgereinigte pDONR™-Plasmid-DNA wurde dann zur Erzeugung eines entsprechenden Zielvektors im Zuge einer LR-Reaktion mit dem pHELLSGATE 12-Vektor [Abb. 2-19] umgesetzt. Dieser enthält je zwei att-sites (R1 und R2), die den Einbau der Ziel-DNA sowohl in sense- als auch in antisense- Orientierung ermöglichen, was die Grundvoraussetzung für die Bildung des "hairpins" ist. Wie bei dieser Klonierungsmethode üblich, ersetzt die Ziel-DNA dabei das ursprünglich vorhandene *ccd*B-Gen, so dass nur die korrekt transformierten Klone wachstumsfähig sein sollten. Obwohl solche wachsenden Klone erhalten wurden, ergab die anschließende Sequenzierung ein überraschendes Ergebnis: Aus einem sequenzierten, 868 bp-Bruchstück der Plasmid-DNA zeigten die Basenpaare 1-203 Übereinstimmung mit der Sequenz 13043-13245 des pHELLSGATE 12-Vektors, die Basenpaare 204-868 jedoch mit einer davon entfernten Sequenz (3015-3679) desselben Vektors. Eine ca. 7450 bp lange DNA-Sequenz wurde also entfernt, vermutlich während der LR-Reaktion [Abb. 3-30]. Das erklärte die Überlebensfähigkeit der Kulturen auf Spectinomycin-Medium, lieferte aber nicht den gewünschten Vektor.

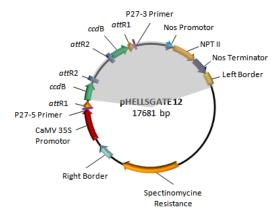


Abb. 3-30 pHELLSGATE 12 -Vektor nach LR-Reaktion. (grau unterlegt: fehlender Abschnitt (Erklärung im Text))

Entgegen den Empfehlungen des Herstellers (Invitrogen, Karlsruhe, BRD) konnte dieses Problem weder durch die drastische Verkleinerung des zu übertragenden DNA-Fragments (286 bp anstelle von 1017 bp), noch durch die Verwendung eines kleineren Zielvektors (pK7GWIWG2(II), [Abb. 2-19]), noch durch eine verlängerte Inkubationszeit (von 1 h auf 12 h) während der LR-Reaktion, gelöst werden. Es wird vermutet, dass sich in der Nähe der "Left Border" nicht dokumentierte bzw. (möglicherweise unter dem Einfluss der eingebrachten DNA) von den Restriktasen des "LR-Clonase-Mix" (siehe 2.4.1.1) fehlinterpretierte Schnittstellen befinden.

Die Generierung eines effektiven RNAi-Vektors, für das silencing des GAPDH-Gens in *Eschscholzia*, gelang schließlich mit einem von der Firma Icon Genetics GmbH (Halle (Saale), BRD) entwickelten Verfahren (Gleba, et al., 2004). In Zusammenarbeit mit Dr. Sylvestre Marillonnet, wurde der Vektor pICH66255 [Abb. 3-31] von dieser Firma hergestellt. Dieser enthält, außer dem gewünschten RNAi-Konstrukt, das Gen für das "Green-Fluorescent-Protein" (GFP), was eine spätere Überprüfung des Transformationserfolges bzw. eine Selektion der transformierten Kulturen erheblich erleichtert. Zudem

ist er trotz dieses zusätzlichen GFP-Gens kleiner als die o.g. ungeeigneten GATEWAY™ Vektoren, was für die vorgesehene biolistische Transformation (siehe 2.4.2.2) von Vorteil war.

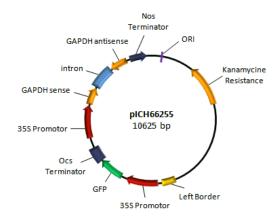
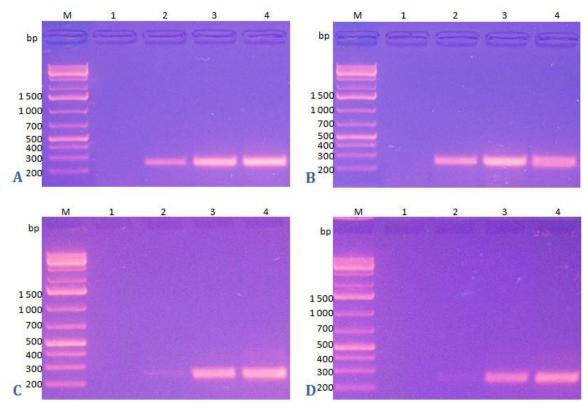


Abb. 3-31 RNAi -Vektor pICH66255.

3.5.2.2 Überprüfung des Transformationserfolges

Die biolistische Transformation von Keimwurzeln von *Eschscholzia californica* (siehe 2.4.2.2) mit dem vorgenannten Vektor führte zunächst zu keiner äußerlich erkennbaren Veränderung. Morphologie und Wachstumsgeschwindigkeit waren bei allen Proben (ohne Biolistik, RNAi-Konstrukt, Leervektor) augenscheinlich gleich. Der Erfolg der RNAi Strategie wurde auf zwei Wegen überprüft: über die Expression des GFP-Gens und über die verminderte Expression des GAPDH-Gens. Es zeigte sich, dass in den Keimwurzeln, die GFP exprimieren, die mRNA des GAPDH Gens erheblich, d.h. um ca. 50 % vermindert ist. Für die in Abb. 3-32, Abb. 3-33 und Abb. 3-34 dargestellten Analysen wurden Keimwurzeln mit mikroskopisch messbarer GFP-Expression ausgewählt und mit Keimwurzeln verglichen, die mit dem leeren Vektor (ohne RNAi-Konstrukt, ohne GFP-Gen) beschossen wurden. Letztere zeigten erwartungsgemäß keine GFP-typische Fluoreszenz.



2% Agarose Gele mit PCR Produkt

Template: A und C: RT-Reaktion aus RNAi-Probe;

B und D: RT-Reaktion aus Kontrolle (Leervektor)

Primer: A und B: Gap_real_for/Gap_real_rev;

C und D: actin_f4/actin_r2

Annealingtemperatur: 60 °C

M - Marker

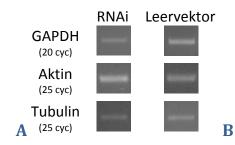
1 - 10 Reaktionszyklen

2 - 20 Reaktionszyklen

3 - 25 Reaktionszyklen

4 - 30 Reaktionszyklen

Abb. 3-32 RT-PCR von GAPDH und Aktin mit steigenden Zykluszahlen.



	Bande	enintensität	Expression
Gen	RNAi	Leervektor	(Leervektor =
			100 %)
GAPDH	9,6	17,8	54 %
Aktin	23,1	22,1	105 %
Tubulin	7,3	7,5	97 %

Abb. 3-33 Quantitative Analyse der Bandenintensität von GAPDH, Aktin und Tubulin nach PCR mit RT-Template.

A: Gelbanden aus 2 % Agarosegelen (cyc = Zykluszahl)

B: Expression der GAPDH in Bezug auf Aktin 51,4 %; in Bezug auf Tubulin 55,7 %

Es ist ein typisches Resultat dargestellt. Die Wiederholung dieses Experiments lieferte praktisch übereinstimmende Daten.

3.5.3 Konsequenzen des silencing von GAPDH für die Alkaloidbiosynthese

Sowohl die Expression von GFP (und damit das erfolgreiche silencing der GAPDH [Abb. 3-33]) als auch die Akkumulation der Benzo[c]phenanthridin-Alkaloide lässt sich durch Fluoreszenzmikroskopie (siehe 2.4.3.1) präzise nachweisen (Roos, et al., 2006). Damit konnte geprüft werden, welche Auswirkung das silencing des GAPDH-Gens auf die Ausprägung der Alkaloidsynthese in Keimwurzeln von *Eschscholzia californica* hat. Wie aus Abb. 3-35 und Abb. 3-36 hervorgeht, war die Alkaloid-Fluoreszenz nur in solchen Keimwurzeln erkennbar, die keine typische GFP-Fluoreszenz zeigten. In den Keimwurzeln mit GFP-Fluoreszenz war außerdem die Expression des BBE-Gens weitgehend oder vollständig ausgeschaltet [Abb. 3-34]. Dieses Gen kodiert das Berberinbrückenenzym, ein wichtiges Schlüsselenzym der Benzo[c]phenanthridin-Biosynthese (siehe 1.3).

		RNAi	Leervektor
	BBE		
	(25 cyc)		
A			1

	Bande	enintensität	Expression
Gen	RNAi	Leervektor	(Leervektor =
	INIVAL	Leervektor	100 %)
BBE	3,4	9,9	34 %

Abb. 3-34 Quantitative Analyse der Bandenintensität von BBE nach PCR mit RT-Template.

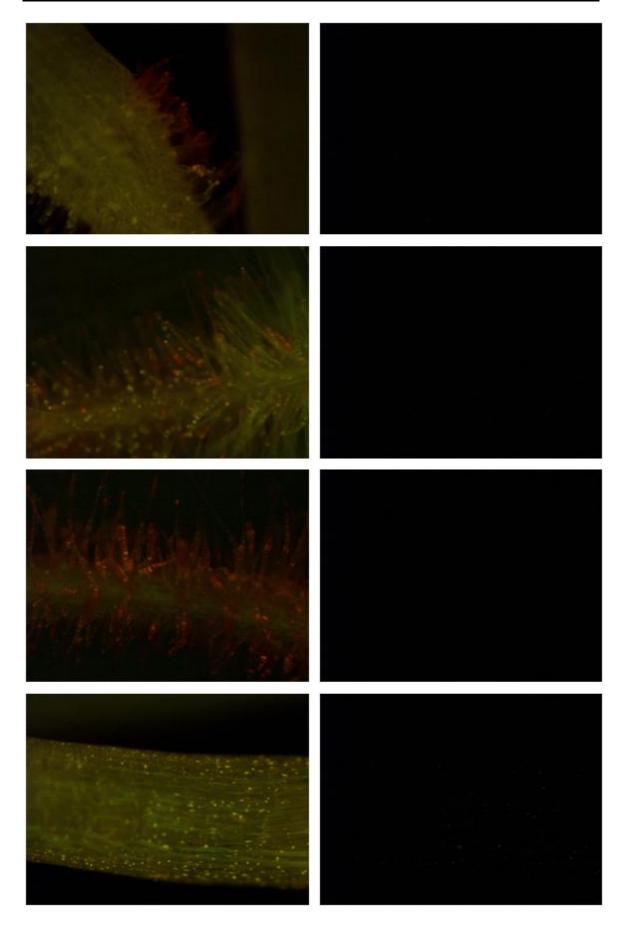
A: Gelbanden aus 2 % Agarosegelen (cyc = Zykluszahl)

B: Expression des BBE in Bezug auf Aktin 32,4 %; in Bezug auf Tubulin 35 %

Es ist das Resultat eines Experimentes dargestellt. Eine Wiederholung lieferte keine messbare Menge von BBE-RNA in der RNAi - Probe.

Die Ergebnisse der RNAi-silencing-Experimente lassen den Schluss zu, dass das "knockdown" der GAPDH die Expression der Alkaloidbiosynthese in den sich entwickelnden Wurzeln stark vermindert. Es ist bemerkenswert, dass obwohl die mRNA der GAPDH nur etwa auf die Hälfte vermindert wurde [Abb. 3-33], die Expression des BBE-Gens und die Ausbildung der Alkaloidbiosynthese fast vollständig verhindert wird. Auch wenn die tatsächliche Proteinmenge nicht gemessen wurde, lässt sich vermuten, dass diese kritisch für die Expression der Biosynthese ist, während sich ihre Verminderung nicht wesentlich auf Wachstum und Wurzeldifferenzierung auswirkt. Die essentielle Bedeutung des GAPDH-Proteins, auf die diese Ergebnisse hinweisen, bestätigt die o.g. Vermutungen und ist gut vereinbar mit seiner zweifachen Beziehung zur Elicitor-ausgelösten Alkaloid-Antwort:

Erstens gehört GAPDH zusammen mit einem Cyclophilin und dem HSP 70 zu einer Gruppe Stress-protektiver Proteine, welche die Überexpression der Alkaloide begleiten (Angelova, et al., 2010) und zweitens weist die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gefundene selektive Phosphorylierung auf eine zweite Funktion von GAPDH als Gen-Kontroll-Protein hin.



Fortsetzung:

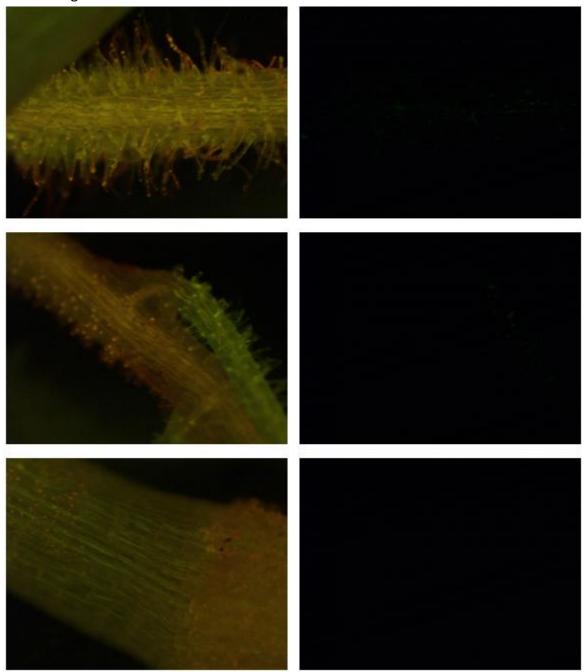


Abb. 3-35 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Eschscholzia*-Keimwurzeln aus Kontroll-Ansätzen bzw. von nicht transformierten Keimlingen.

Beide Spalten zeigen jeweils nebeneinander das gleiche Bild, aufgenommen mit gleicher Empfindlichkeit unter Verwendung unterschiedlicher Filterkombinationen

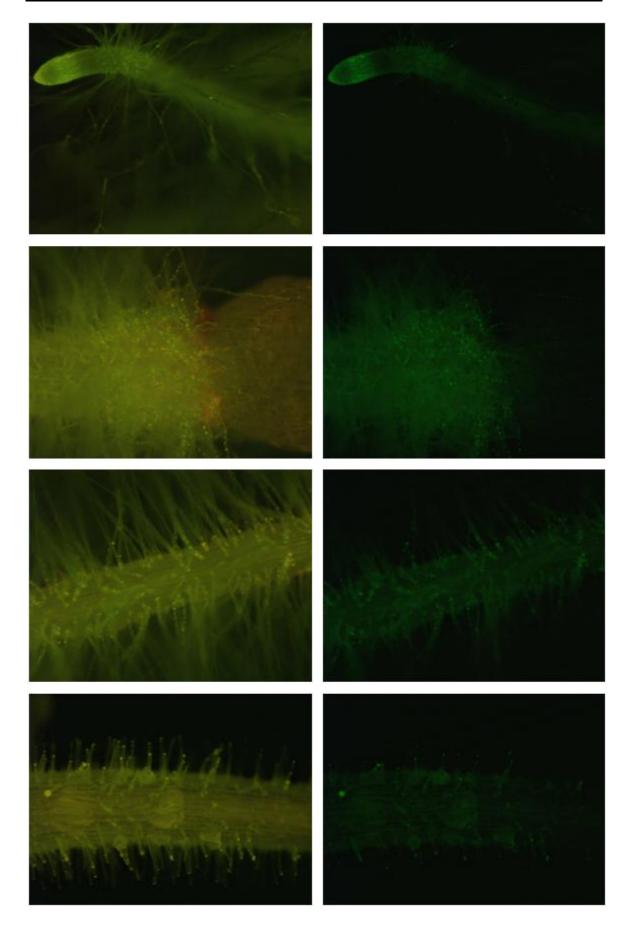
linke Spalte: Aufnahme mit Filterkombination λ_{Ex} : 482 nm; λ_{Em} : 520 nm (erlaubt sowohl die typische

orange-rote Fluoreszenz der Benzo[c]phenanthridine als auch die GFP-Fluoreszenz zu

detektieren)

rechte Spalte: Aufnahme mit Filterkombination λ_{Ex} : 472 nm; λ_{Em} : 496 nm (selektiver Nachweis von GFP-Fluoreszenz und damit erfolgreicher RNAi-Transformation) (siehe 2.4.3.1).

In den Wurzelhaaren bzw. Epidermiszellen der abgebildeten Keimwuzeln ist eine deutliche orange-rote Fluoreszenz erkennbar, welche die Akkumulation der Alkaloide in diesen Bereichen anzeigt.



Fortsetzung:

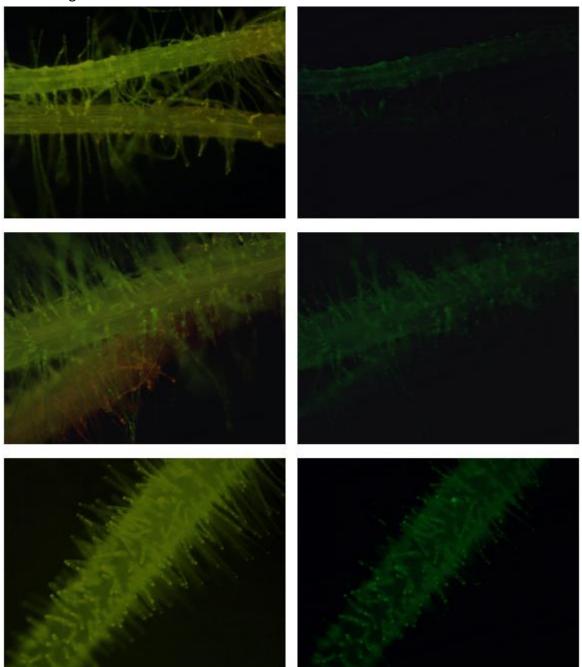


Abb. 3-36 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von RNAi-transformierten *Eschscholzia*-Keimwurzeln. Beide Spalten zeigen jeweils nebeneinander das gleiche Bild, aufgenommen mit gleicher Empfindlichkeit unter Verwendung unterschiedlicher Filterkombinationen.

linke Spalte: Aufnahme mit Filterkombination λ_{Ex} : 482 nm; λ_{Em} : 520 nm (erlaubt sowohl die typische

orange-rote Fluoreszenz der Benzo[c]phenanthridine als auch die GFP-Fluoreszenz zu

detektieren)

rechte Spalte: Aufnahme mit Filterkombination λ_{Ex} : 472 nm; λ_{Em} : 496 nm (selektiver Nachweis von GFP-

Fluoreszenz und damit erfolgreicher RNAi-Transformation) (siehe 2.4.3.1).

Es ist zu erkennen, dass in den Wurzelhaaren bzw. Epidermiszellen, in denen eine GFP-typische Fluoreszenz auftritt, keine orange-rote Fluoreszenz und somit auch keine Akkumulation von Benzo[c]phenanthridin-Alkaloiden nachweisbar ist. Umgekehrt ist in den Bereichen mit Alkaloid-fluoreszenz wiederum die GFP-Fluoreszenz nicht messbar.

4 Zusammenfassung und Ausblick

- 1. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, Proteine in *Eschscholzia californica* zu identifizieren, die bei der Auslösung der Phytoalexin-Antwort selektiv phosphoryliert werden. Dazu wurde ein Verfahren zum Nachweis der Phosphorylierung löslicher Proteine etabliert, welche aus Kulturen isoliert wurden, die unter dem Einfluss verschiedener Signale die Produktion toxischer Benzo[c]phenanthridine einschalten. Die Proteingemische wurden durch 2D-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und nach Elektroblotting auf Nitrocellulose mithilfe eines phosphatspezifischen Fluoreszenzfarbstoffes detektiert. Dieser Farbstoff erlaubt im Unterschied zur Immunodetektion den Nachweis phosphorylierter Aminosäuren in verschiedenen Umgebungen eines Proteins. Nachteilig ist die etwas geringere Sensitivität des Farbstoffes, wodurch nur relativ starke Änderungen der Phosphorylierung (Faktor 2 bzw. ½) analysierbar sind.
- 2. Unter dem Einfluss eines fungalen Elicitors entstehen spezifische Phosphorylierungsmuster. Um phosphorylierte Proteine mit unmittelbarem Bezug zur Induktion der Alkaloidbiosynthese zu erkennen, wurde von der Tatsache Gebrauch gemacht, dass zwei Signalwege zur Auslösung dieser Biosynthese führen: der "LPC-ΔpH-Weg" und der "Jasmonat-Weg". Letzterer erfordert hohe Elicitorkonzentrationen und schließt Elemente der hypersensitiven Reaktion ein. Proteine mit speziellem Bezug zur Alkaloid-Antwort wurden im Überlappungsbereich beider Phosphorylierungsmuster gefunden.
- 3. Um die Auslösung des Sekundärstoffwechsels ohne Beteiligung des Jasmonat-Weges zu charakterisieren, wurde auch das Phosphorylierungsmuster nach Einwirkung künstlicher pH-shifts untersucht. Zu diesem Zweck war die Etablierung eines Verfahrens zur kontrollierten Auslösung solcher pH-shifts erforderlich. Neben der Anwendung von Ionophoren erwies sich auch die Behandlung der Zellen mit starken Puffern bestimmter pH Werte als erfolgreich.
- 4. Es wurden fünf Proteine gefunden, deren Phosphorylierungsgrad durch die o.g. Behandlungen erhöht wurde. Zwei dieser Proteine, ein "aluminium-induced-like protein" und die cytosolische Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH), konnten mithilfe massenspektrometrischer Methoden identifiziert werden. Die Sequenz der beteiligten GAPDH aus *Eschscholzia* wurde komplett aufgeklärt.
- 5. Um die Rolle der GAPDH in der Expression der Alkaloid-Biosynthese in *Eschscholzia* zu prüfen, wurde die mRNA dieses Proteins durch RNAi-basiertes Gen-silencing ausgeschaltet. Dazu wurde ein neues Gen-Transformationssystem mithilfe von Keimwurzeln etabliert. Nach biolistischem Gentransfer wurden Keimwurzeln erhalten, in denen die Expression des GAPDH-Gens um ca. 50 % vermindert war. Diese Wurzeln zeigten im Unterschied zu den mit leerem Vektor transformierten keine erkennbare Alkaloidbildung und eine drastisch verminderte Expression des Berberinbrückenenzyms (BBE), eines Schlüsselenzyms der Benzo[c]phenanthridin-Biosynthese.

6. Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass das Protein der GAPDH – neben seiner bekannten Funktion als Stress-protektives Enzym – eine essentielle Aufgabe als Gen-Kontroll-Protein bei der Expression der Alkaloid-Biosynthese erfüllt. Funktionen "bekannter" Enzyme als Regulatorproteine in anderen Soffwechselbereichen werden als "moonlighting" bezeichnet und sind bisher für den pflanzlichen Sekundärstoffwechsel nicht bekannt.

Ausblick:

Die erhaltenen Ergebnisse werfen eine Reihe neuer Fragen auf, die im Rahmen weiterführender Arbeiten geklärt werden könnten:

Welche Kinase(n) ist/sind für die Phosphorylierung des GAPDH-Proteins verantwortlich?

An welchen Positionen/Aminosäuren wird das GAPDH-Protein phosphoryliert?

Welche Auswirkungen hat die Phosphorylierung auf die Konformation des Proteins, dessen Enzymaktivität und seine Rolle im Signaltransfer?

Wo ist die gefundene GAPDH-Spezies lokalisiert und gibt es einen Transport in den Zellkern?

Welcher Mechanismus liegt der postulierten Gen-Kontrolle zugrunde?

5 Literaturverzeichnis

Alberts, B., et al. 1997. *Molecular Biology of the Cell, Third Edition.* s.l.: Garland Publishing, Inc., 1997. S. 79. ISBN: 3-527-30055-4.

Amicucci, E., Gaschler, K. und Ward, J. M. 1999. NADPH Oxidase Genes from Tomato (Lycopersicon esculentum) and Curly-Leaf Pondweed (Potamogeton crispus). *Plant Biology.* 1999, 1, S. 524-528.

Angelova, S., et al. 2010. Overproduction of Alkaloid Phytoalexins in California Poppy Cells Is Associated with the Co-Expression of Biosynthetic and Stress-Protective Enzymes. *Molecular Plant.* 2010, 3, S. 927-939.

Angelova, Z. 2007. 2-D Proteome analysis of soluble proteins and mRNAs in elicited cells of Eschscholzia californica. *Dissertation*. MLU Halle-Wittenberg: s.n., 2007.

Angelova, Z., Georgiev, S. und Roos, W. 2006. Elicitation of plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* 2006, 20, S. 72-83.

Armero, J. und Tena, M. 2001. Possible role of plasma membrane H+-ATPase in the elicitation of phytoalexin and related isoflavone root secretion in chickpea (Cicer arietinum L.) seedlings. *Plant Science*. 2001, 161, S. 791-798.

Asai, T., et al. 2002. MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature.* 2002, 415, S. 977-983.

Azam, S., et al. 2008. Human Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Plays a Direct Role in Reactivating Oxidized Forms of the DNA Repair Enzyme APE1. *The Journal of Biological Chemistry.* 2008, 283, S. 30632-30641.

Aziz, A., et al. 2007. Elicitor and resistance-inducing activities of β -1,4 cellodextrins in grapevine, comparison with β -1,3 glucans and α -1,4 oligogalacturonides. *Journal of Experimental Botany.* 2007, 58, S. 1463-1472.

Backlund, M., et al. 2009. Posttranscriptional regulation of angiotensin II type 1 receptor expression by glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *Nucleic Acids Research.* 2009, 37, S. 2346-2358.

Baker, C. J. und Orlandi, E. W. 1995. Active Oxygen in Plant Pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology.* 1995, 33, S. 299-321.

Bent, A. F., et al. 1998. RPS2 of Arabidopsis thaliana: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science.* 1998, 265, S. 1439-1452.

Boch, J., et al. 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*. 2009, 326, S. 1509-1512.

Bolwell, G. P., et al. 2002. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of Experimental Botany.* 2002, 53, S. 1367-1376.

Buchheim, M. 2004. Ein Verfahren zur pH-abhängigen Auslösung der Alkaloidbiosynthese in Zellkulturen von Eschscholzia californica. *Diplomarbeit*. MLU Halle-Wittenberg: s.n., 2004.

Chen, W., et al. 2002. Expression Profile Matrix of Arabidopsis Transcription Factor Genes Suggests Their Putative Functions in Response to Environmental Stresses. *The Plant Cell.* 2002, 14, S. 559-574.

Chinchilla, D., et al. 2007. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence . *Nature.* 2007, 448, S. 497-500.

Copley, S. D. 2003. Enzymes with extra talents: moonlighting functions and catalytic promiscuity. *Current Opinion in Chemical Biology.* 2003, 7, S. 265–272.

Cotelle, V., et al. 2000. 14-3-3s regulate global cleavage of their diverse binding partners in sugar-starved Arabidopsis cells. *The EMBO Journal.* 2000, 19, S. 2869-2866.

Diévart, A. und Clark, S. E. 2003. Using mutant alleles to determine the structure and function of leucine-rich repeat receptor-like kinases. *Current Opinion in Plant Biology.* 2003, 6, S. 507-516.

Dittrich, H. und Kutchan, T. M. 1991. Molecular cloning, expression, and induction of berberine bridge enzyme, an enzyme essential to the formation of benzophenanthridine alkaloids in the response of plants to pathogenic attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* 1991, Bd. 88, S. 9969-9973.

Ebel, J. und Mithöfer, A. 1998. Early events in the elicitation of plant defence . *Planta.* 1998, 206, S. 335-348.

Eulgem, C., et al. 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science*. 2000, 5, S. 199-206.

Eulgem, T., et al. 1999. Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *The EMBO Journal*. 1999, 18, S. 4689-4699.

Evers, S. 2003. Protein-Phosphorylierungen im Signaltransfer zur Aktivierung des Alkaloidstoffwechsels in Eschscholzia californica. *Dissertation.* MLU Halle-Wittenberg: s.n., 2003.

Facchini, P. J. und St-Pierre, B. 2005. Synthesis and trafficking of alkaloid biosynthetic enzymes. *Current Opinion in Plant Biology.* 2005, 62, S. 657-666.

Faddeeva, M. D. und Beliaeva, T. N. 1997. Sanguinarine and ellipticine cytotoxic alkaloids isolated from well-known antitumor plants. Intracellular targets of their action. *Tsitologija*. 1997, 39, S. 181-208.

Färber, K. 2002. Alkaloide als Toxine und Signale bei der pathogenen Interaktion zwischen Pilz- und Pflanzenzelle. *Dissertation*. MLU Halle-Wittenberg: s.n., 2002.

Färber, K., et al. 2003. Selective desensitization of jasmonate- and pH-dependent signaling in the induction of benzophenanthridine biosynthesis in cells of Eschscholzia californica. *Phytochemistry.* 2003, 62, S. 491-500.

Felix, G., et al. 1999. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant Journal.* 1999, 18, S. 265-276.

Fernández-Cañón, J. M., et al. 1999. Gene Structure, Chromosomal Location, and Expression Pattern of Maleylacetoacetate Isomerase. *Genomics.* 1999, 58, S. 263-269.

Fire, A., et al. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. *Nature.* 1998, 391, S. 806-811.

Freymark, G., et al. 2007. Antagonistic Control of Powdery Mildew Host Cell Entry by Barley Calcium-Dependent Protein Kinases (CDPKs). *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2007, 20, S. 1213-1221.

Fujimoto, S. Y., et al. 2000. Arabidopsis Ethylene-Responsive Element Binding Factors Act as Transcriptional Activators or Repressors of GCC Box–Mediated Gene Expression. *The Plant Cell.* 2000, 12, S. 393-404.

Gancedo, C. und Flores, C.- L. 2008. Moonlighting Proteins in Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2008, 72, S. 197-210.

Gargantini, P. R., et al. 2009. Genomic and functional characterization of StCDPK1. *Plant Molecular Biology*. 2009, 70, S. 153-172.

Gelli, A., Higgins, V. J. und Blumwald, E. 1997. Activation of Plant Plasma Membrane Ca2+-Permeable Channels by Race-Specific Fungal Elicitors. *Plant Physiology.* 1997, 113, S. 269-279.

Gleba, Y., Marillonnet, S. und Klimyuk, V. 2004. Engineering viral expression vectors for plants: the 'full virus' and the 'deconstructed virus' strategies. *Current Opinion in Plant Biology.* 2004, 7, S. 182–188.

Gómez-Gómez, L. und Boller, T. 2000. FLS2: An LRR Receptor–like Kinase Involved in the Perception of the Bacterial Elicitor Flagellin in Arabidopsis. *Molecular Cell.* 2000, 5, S. 1003-1011.

Grant, M. und Mansfield, J. 1999. Early events in host-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology* . 1999, 2, S. 312-319.

Groom, Q. J., et al. 1996. rbohA, a rice homologue of the mammalian gp91phox respiratory burst oxidase gene. *The Plant Journal.* 1996, 10, S. 515-522.

Gundlach, H., et al. 1992. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 1992, 89, S. 2389-2393.

Guo, A., et al. 2005. DATF: a database of Arabidopsis transcription factors. *Bioinformatics*. 2005, 21, S. 2568-2569.

Gust, A. A., et al. 2007. Bacteria-derived Peptidoglycans Constitute Pathogen-associated Molecular Patterns Triggering Innate Immunity in Arabidopsis. *The Journal of Biological Chemistry.* 2007, 282, S. 32338-32348.

Haider, G., et al. 2000. Structure Activity Relationships of Synthetic Analogs of Jasmonic Acid and Coronatine on Induction of Benzo[c]phenanthridine Alkaloid Accumulation in Eschscholzia californica Cell Cultures. *Biol. Chem.* 2000, 381, S. 741-748.

Hamilton, A. J. und Baulcombe, D. C. 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*. 1999, 286, S. 950-952.

Han, Y., Ma, B. und Zhang, K. 2005. SPIDER: software for protein identification from sequence tags with de novo sequencing error. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology.* 2005, 3, S. 697-716.

Hancock, J., et al. 2006. Doing the unexpected: proteins involved in hydrogen peroxide perception . *Journal of Experimental Botany.* 2006, 57, S. 1711-1718.

Hara, M. R., et al. 2005. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nature Cell Biology.* 2005, 7, S. 665-674.

Heinze, M., et al. 2007. Regulatory interaction of the $G\alpha$ protein with phospholipase A2 in the plasma membrane of Eschscholzia californica. *Plant Journal.* 2007, 52, S. 1041-1051.

Jeffery, C. J. 1999. Moonlighting proteins. *Trends in Biochemical Sciences.* 1999, 24, S. 8-11.

Jia, Y., et al. 2000. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO Journal*. 2000, 19, S. 4004-4014.

Jofuku, K. D., et al. 1994. Control of Arabidopsis Flower and Seed Development by the Homeotic Gene APETALA2. *The Plant Cell.* 1994, 6, S. 1211-1225.

Khan, M., Hideji Karibe, A. J. und Komatsu, S. 2005. Identification of phosphoproteins regulated by gibberellin in rice leaf sheath. *Plant Molekular Biology.* 2005, 58, S. 27-40.

Kiyoshi, T. und Shizuo, A. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology.* 2005, 17, S. 1-14.

Kobayashi, M., et al. 2007. Calcium-Dependent Protein Kinases Regulate the Production of Reactive Oxygen Species by Potato NADPH Oxidase . *The Plant Cell.* 2007, 19, S. 1065-1080.

Kobayashi, M., et al. 2006. Subcellular localization of Strboh proteins and NADPH-dependent O2—generating activity in potato tuber tissues . *Journal of Experimental Botany.* 2006, 57, S. 1373-1379.

Kovtun, Y., et al. 2000. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogenactivated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2000, 97, S. 2940-2945.

Krane, B. D., et al. 1984. The benzophenanthridine. *Journal of Natural Products.* 1984, 47, S. 1-43.

Kroj, T., et al. 2003. Mitogen-activated Protein Kinases Play an Essential Role in Oxidative Burst-independent Expression of Pathogenesis-related Genes in Parsley. *The Journal of Biological Chemistry.* 2003, 278, S. 2256-2264.

Kurz, T. 2009. Genexpressionsanalysen in elicitierten Suspensionskulturzellen von Eschscholzia californica Cham. und Identifizierung von EcaERF2 als transkriptioneller Regulator der Alkaloidbiosynthese. *Dissertation*. MLU Halle-Wittenberg: s.n., 2009.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structual proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970, 227, S. 680-685.

Lam, E., Kato, N. und Lawton, M. 2002. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response . *Nature.* 2002, 411, S. 848-853.

Lapous, D., et al. 1998. Increase of defense gene transcripts by cytoplasmic acidification in tobacco cell suspensions. *Planta*. 1998, 205, S. 452-458.

Lawrence, G. J., et al. 1995. The L6 Gene for Flax Rust Resistance Is Related to the Arabidopsis Bacterial Resistance Gene RPS2 and the Tobacco Viral Resistance Gene N. *Plant Cell.* 1995, 7, S. 1195-1206.

Laxalt, A. M., et al. 1996. Accumulation of cytosolyc glycaraldehyd-3-phosphate dehydrogenase RNA under biological stress coditions and elicitor treatments in potato. *Plant Molekular Biology.* 1996, 30, S. 961-972.

Lemaitre, B., et al. 1996. The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette spätzle/Toll/cactus Controls the Potent Antifungal Response in Drosophila Adults. *Cell.* 1996, 86, S. 973-983.

Ligterink, W., et al. 1997. Receptor-Mediated Activation of a MAP Kinase in Pathogen Defense of Plants . *Science.* 1997, 276, S. 2054 - 2057.

Liu, L., White, M. J. und MacRae, T. H. 1999. Transcription factors and their genes in higher plants. *European Journal of Biochemistry.* 1999, 262, S. 247-257.

Ma, B., et al. 2003. PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* 2003, 17, S. 2337-2342.

Maleck, K., et al. 2000. The transcriptome of Arabidopsis thaliana during systemic acquired resistance. *Nature Genetics.* 2000, 26, S. 403-410.

MAPK-Group. 2002. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science.* 2002, 7, S. 301-308.

Martin, G. B., et al. 1993. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato . *Science.* 1993, 262, S. 1432-1436.

Matta, S. K., Agarwal, S. und Bhatnagar, R. 2010. Surface localized and extracellular Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Bacillus anthracis is a plasminogen binding protein. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010, 1804, S. 2111-2120.

McKnight, S. 2003. Gene Switching by Metabolic Enzymes—How Did You Get on the Invitation List? *Cell.* 2003, 114, S. 150-152.

Menke, F. L. H., et al. 1999a. A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene Str interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. *The EMBO Journal.* 1999a, 18, S. 4455–4463.

Menke, F. L. H., et al. 1999b. Involvement of the Octadecanoid Pathway and Protein Phosphorylation in Fungal Elicitor-Induced Expression of Terpenoid Indole Alkaloid Biosynthetic Genes in Catharanthus roseus. *info Plant Physiology*. 1999b, 119, S. 1289-1296.

Merril, C. R., et al. 1981. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science.* 1981, 211, S. 1437-1438.

Meyers, B. C., et al. 1999. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *The Plant Journal.* 1999, 20, S. 317-332.

Mindrinos, M., et al. 1994. The A. thaliana disease resistance gene RPS2 encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. *Cell.* 1994, 78, S. 1089-1099.

Moon, H., et al. 2003. NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic

plants . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2003, 100, S. 358-363.

Moore, B.d. 2004. Bifunctional and moonlighting enzymes: lighting the way to regulatory control. *Trends in Plant Science.* 2004, 9, S. 221-228.

Müller, M., et al. 1993. Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993, 90, S. 7490-7494.

Munnik, T., Irvine, R. F. und Musgrave, A. 1998. Phospholipid signalling in plants. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1998, 1389, S. 222-272.

Muro-Pastor, A. M., Ostrovsky, P. und Maloy, S. 1997. Regulation of gene expression by repressor localization: biochemical evidence that membrane and DNA binding by the PutA protein are mutually exclusive. *Journal of Bacteriology.* 1997, 179, S. 2788-2791.

Nakagami, H., Kiegerl, S. und Hirt, H. 2004. OMTK1, a Novel MAPKKK, Channels Oxidative Stress Signaling through Direct MAPK Interaction. *The Journal of Biological Chemistry.* 2004, 279, S. 26959-26966.

Nakajima, H., et al. 2009. Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Aggregate Formation Participates in Oxidative Stress-induced Cell Death . *The Journal of Biological Chemistry.* 2009, 284, S. 34331-34341.

Newman, MA., et al. 2002. Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of plant defenses in response to bacteria . *The Plant Journal.* 2002, 29, S. 487-495.

Nürnberger, T. und Scheel, D. 2001. Signal transmission in the plant immune response. *Trends in Plant Science.* 2001, 6, S. 372-379.

Nürnberger, T., et al. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews.* 2004, 196, S. 249-266.

Ohme-Takagi, M. und Shinshi, H. 1995. Ethylene-Inducible DNA Binding Proteins That Interact with an Ethylene-Responsive Element. *The Plant Cell.* 1995, 7, S. 173-182.

Ostrovsky de Spicer, P. und Maloy, S. 1993. PutA protein, a membrane-associated flavin dehydrogenase, acts as a redox-dependent transcriptional regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1993, 90, S. 4295-4298.

Paxton, J. D. 1981. Phytoalexins - A Working Redefinition. *Journal of Phytopathology.* 1981, 101, S. 106-109.

Postel, S. und Kemmerling, B. 2009. Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 2009, 20, S. 1025-1031.

Raje, C. I., et al. 2007. The Macrophage Cell Surface Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Is a Novel Transferrin Receptor . *The Journal of Biological Chemistry.* 2007, 282, S. 3252-3261.

Riechmann, J. L., et al. 2000. Arabidopsis transcription factors: genomewide. *Science*. 2000, 290, S. 2105-2110.

Robatzek, S., et al. 2007. Molecular identification and characterization of the tomato flagellin receptor LeFLS2, an orthologue of Arabidopsis FLS2 exhibiting characteristically different perception specificities. *Plant Molecular Biology.* 2007, 64, S. 539-547.

Roos, W. 2000. Ion mapping in plant cells - methods and applications in signal transduktion research. *Planta*. 2000, 210, S. 347-370.

Roos, W., et al. 1999. A redox-dependent, G-protein-coupled phospholipase A of the plasma membrane is involved in the elicitation of alkaloid biosynthesis in Eschscholzia californica. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1999, 1448, S. 390-402.

Roos, W., et al. 2006. Intracellular pH signals in the induction of secondary pathways - The case of Eschscholzia californica. *Journal of Plant Physiology.* 2006, 163, S. 369-381.

Roos, W., et al. 1998. Shifts of Intracellular pH Distribution as a Part of the Signal Mechanism Leading to the Elicitation of Benzophenanthridine Alkaloids. *Plant Physiology.* 1998, 118, S. 349-364.

Sagi, M. und Fluhr, R. 2001. Superoxide Production by Plant Homologues of the gp91phox NADPH Oxidase. Modulation of Activity by Calcium and by Tobacco Mosaic Virus Infection. *Plant Physiology.* 2001, 126, S. 1281-1290.

Sakano, K. 2001. Metabolic regulation of pH in plant cells: Role of cytoplasmic pH in defense reaction and secondary metabolism. *International Review of Cytology.* 2001, 206, S. 1-44.

Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1977, Bd. 12, 74, S. 5463-5467.

Schaller, A. und Frasson, D. 2000. Induction of wound response gene expression in tomato leaves by inonphores. *Planta*. 2000, 212, S. 431-435.

Scheel, D. 1998. Resistance response physiology and signal transduction. *Current Opinion in Plant Biology* . 1998, 1, S. 305-310.

Schmeller, T., Latz-Brüning, B. und Wink, M. 1997. Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores. *Phytochemistry.* 1997, 44, S. 257-266.

Schumacher, H. M., et al. 1987. Elicitation of benzophenanthridin alkaloid synthesis in Eschscholzia cell cultures. *Plant Cell Rep. 6.* 1987, S. 410-413.

Schwartze, W. 2006. Die zelluläre Kontrolle der PLA2-Aktivität - ein Element des Signaltransfers zur Auslösung der Alkaloid-Biosynthese in Eschscholzia californica. *Dissertation.* MLU Halle-Wittenberg: s.n., 2006.

Sessa, G. und Martin, G. B. 2000. Signal recognition and transduction mediated by the tomato Pto kinase: a paradigm of innate immunity in plants. *Microbes and Infection.* 2000, 2, S. 1591-1597.

Simon-Plas, F., Elmayan, T. und Blein, J.-P. 2002. The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *The Plant Journal.* 2002, 31, S. 137-147.

Singh, K. B., Foley, R. C. und Oñate-Sánchez, L. 2002. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology.* 2002, 5, S. 430-436.

Sirover, M. A. 2011. On the functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: biochemical mechanisms and regulatory control. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011, 1810, S. 741-751.

Smith, N. A., et al. 2000. Gene expression: Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature.* 2000, 407, S. 319-320.

Smith, P. K., et al. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry.* 1985, 150, S. 76-85.

Soker, S., et al. 1998. Neuropilin-1 Is Expressed by Endothelial and Tumor Cells as an Isoform-Specific Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor . *Cell.* 1998, 92, S. 735-745.

Song, W. Y., et al. 1995. A Receptor Kinase-Like Protein Encoded by the Rice Disease Resistance Gene, Xa21. *Science*. 1995, 270, S. 1804-1806.

Stadler, R., et al. 1987. Revision of the early steps of reticuline biosynthesis. *Tetrahedron Letters.* 1987, 28, S. 1251-1254.

Takeshita, N., et al. 1995. Molecular cloning and characterization of S-adenosyl-L-methionine:scoulerine-9-Omethyltransferase from cultured cells of Coptis japonica. *Plant Cell Physiology.* 1995, 36, S. 29-36.

The Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature.* 2000, 408, S. 796-815.

Tisdale, E. J. und Artalejo, C. R. 2007. A GAPDH Mutant Defective in Src-Dependent Tyrosine Phosphorylation Impedes Rab2-Mediated Events. *Traffic.* 2007, 8, S. 733-741.

Torres, M. A., Jones, J. D.G. und Dangl., J. L. 2005. Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in Arabidopsis thaliana. *Nature Genetics.* 2005, 37, S. 1130 - 1134.

Van Breusegem, F., et al. 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction . *Plant Science.* 2001, 161, S. 405-414 .

Van der Fits, L. und Memelink, J. 2001. The jasmonate-inducible AP2/ERF-domain transcription factor ORCA3 activates gene expression via interaction with a jasmonateresponsive promoter element. *Plant Journal*. 2001, 25, S. 43-53.

Viehweger, K. 2002. Der Protonentransport an der Vakuole - ein Signalschritt zur Auslösung der Biosynthese von Bonzophenanthridinalkaloiden in Eschscholzia californica. *Dissertation.* MLU Halle-Wittenberg: s.n., 2002.

Viehweger, K., Dordschbal, B. und Roos, W. 2002. Elicitor-Activated Phospholipase A2 Generates Lysophosphatidylcholines That Mobilize the Vacuolar H+ Pool for pH Signaling via the Activation of Na+-Dependent Proton Fluxes. *The Plant Cell.* 2002, 14, S. 1509-1525.

Viehweger, K., et al. 2006. The $G\alpha$ protein controls a pH dependent signal path to the induction of phytoalexin biosynthesis in Eschscholzia californica. *The Plant Cell.* 2006, 18, S. 1510-1523.

Vogel, M., et al. 2010. Structure and Mechanism of Sanguinarine Reductase, an Enzyme of Alkaloid Detoxification. *The Journal of Biological Chemistry.* 2010, 285, S. 18397-18406.

Vollmer, W. 2006. The prokaryotic cytoskeleton: a putative target for inhibitors and. *Applied Microbilogy and Biotechnology.* 2006, 73, S. 37-47.

Waterhouse, P. M., Graham, M. W. und Wang, M.- B. 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1998, 95, S. 13959-13964.

Weiss, D. 2004. Die Sanguinarin-Reduktase - ein neues Redoxenzym mit essentiellen Funktionen in Metabolismus und Kompartimentierung der Benzophenantridine in Zellsuspensionen von Eschscholzia californica. *Dissertation.* MLU Halle-Wittenberg: s.n., 2004.

Weiss, D., et al. 2006. Sanguinarine reductase, a key enzyme of benzophenanthridine detoxification. *Plant Cell and Environment*. 2006, 29, S. 291-302.

Wesley, S. V., et al. 2001. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal*. 2001, 27, S. 581-590.

Whitham, S., et al. 1994. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: Similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell.* 1994, 78, S. 1101-1115.

Wolff, J. und Knipling, L. 1993. Antimicrotubule properties of benzophenanthridine alkaloids. *Biochemistry.* 1993, 32, S. 13334–13339.

Wolschin, F., Wienkoop, S. und Weckwerth, W. 2005. Enrichment of phosphorylated proteins and peptides from complex mixtures using metal oxide/hydroxide affinity chromatography (MOAC). *Proteomics.* 2005, 5, S. 4389-4397.

Wu, T., et al. 2009. A novel leucine-rich repeat receptor-like kinase gene in potato StLRPK1, is involved in response to diverse stresses. *Molecular Biology Reports.* 2009, 36, S. 2365-2374.

Yang, Y., Shah, J. und Klessig, D. F. 1997. Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes & Development*. 1997, 11, S. 1621-1639.

Yoon, G. M., et al. 2006. Calcium-Dependent Protein Kinase Isoforms in Petunia Have Distinct Functions in Pollen Tube Growth, Including Regulating Polarity. *The Plant Cell.* 2006, 18, S. 867-878.

Yoshioka, H., et al. 2003. Nicotiana benthamiana gp91phox Homologs NbrbohA and NbrbohB Participate in H2O2 Accumulation and Resistance to Phytophthora infestans. *The Plant Cell.* 2003, 15, S. 706-718.

Zannat, Mst. T., Bhattacharjee, R. B. und Bag, J. 2011. In the absence of cellular poly (A) binding protein, the glycolytic enzyme GAPDH translocated to the cell nucleus and activated the GAPDH mediated apoptotic pathway by enhancing acetylation and serine 46 phosphorylation of p53. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011, 409, S. 171-176.

Zeidler, D., et al. 2004. Innate immunity in Arabidopsis thaliana: Lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004, 101, S. 15811–15816.

Zenk, M. H. 1994. The formation of benzophenanthridine alkaloids. *Pure and Applied Chemistry* . 1994, 66, S. 2023-2028.

Ziegler, J. und Facchini, P. J. 2008. Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Annual Review of Plant Biology.* 2008, 59, S. 735-769.

Zimmermann, S., et al. 1997. Receptor-mediated activation of a plant Ca2+-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1997, 94, S. 2751–2755.

6 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Anglizismen

°C Grad Celsius

A.bd. bidestilliertes Wasser

Abb. Abbildung

ABTS 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat)

ACN Acetonitril

APS Ammoniumperoxodisulfat

AS Aminosäure(n)

as antisense

BBE Berberinbrückenenzym

BCA Bicinchoninsäure bp Basenpaare

BSA Rinderserumalbumin

Cat. No. Katalognummer/Bestellnummer

cDNA copy DNA

CDPK calcium dependent protein kinase

CHAPS 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat

CID collision induced dissoziation

CsI Cäsiumiodid

DAMP danger associated molecular pattern
DBOX Dihydrobenzophenanthridinoxidase

DMF N,N-Dimethylformamid
DNA Desoxyribonukleinsäure

dNTP Desoxyribonukleosidtriphosphat

ds doppelsträngig
DTE Dithioerythritol
DTT Dithiothreitol

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

EGTA Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N'N'-tetraessigsäure

Eli.konz. Elicitorkonzentration
ESI Elektrosprayionisation
EST expressed sequence tag

et al. und andere EtBr. Ethidiumbromid

FAD Flavin-Adenin-Dinukleotid

ff und folgende gDNA genomische DNA

GFP green fluorescent protein

ggf. gegebenenfalls GSH Glutathion

HEPES 2-[4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl]-ethansulfonsäure

HPLC High Performance Liquid Chromatography

HR Hypersensitive Reaktion HSP heat shock protein

i.d.R. in der Regel

IAA Iodacetamid

ID Innendurchmesser

IEF isoelektrische Fokussierung

IEP isoelektrischer Punkt

IMAC immobilized metal ion affinity chromatography

LPC Lysophosphatidylcholin LRR leucine rich repeat

m Masse

MAMP microbe associated molecular pattern MAPK mitogen activated protein kinase

max. maximal

MES 2-Morpholinoethansulfonsäure

Mr molare Masse
mRNA messenger RNA
MS Massenspektrometer
N₂ liq flüssiger Stickstoff

NADP Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat

Nal Natriumiodid NC Nitrocellulose

NMT *N*-Methyltransferase

nt Nukleotide
o.g. oben genannt
OB oxidative burst
OMT O-Methyltransferase

p.a. Unvergällt (pro analysi)

PA Polyacrylamid

PAGE Polyacrylamid Gel-Elektrophorese
PAMP pathogen associated molecular pattern

PCR Polymerase-Kettenreaktion

PE Polyethylen

PLA₂ Phospholipase A₂ PM Plasmamembran

PMSF Phenylmethylsulfonylfluorid

PP Polypropylen

PRR pattern recognition receptor

psi Pfund pro Quadratzoll (pound force per square inch)

PTGS post transcriptional gene silencing

qTOF quadrupole TOF

RBOH Respiratory Burst Oxidase Homolog RISC RNA-Induced Silencing Complex

RLK receptor like kinase RNA Ribonukleinsäure RNAi RNA interference

ROS reaktive Sauerstoffspezies rpm Umdrehungen pro Minute

<u>6 Verzeichnis der Abkürzungen und Anglizismen</u>

RT Raumtemperatur

RT-PCR Reverse Transkriptase - PCR

SD Standardabweichung
SDS Natriumdodecylsulfat
SOD Superoxiddismutase

ss einzelsträngig StLsg. Stammlösung

Tab. Tabelle

TEMED N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-

ethan

TFA Trifluoressigsäure
TLR TOLL-like receptor
TOF time of flight

TRIS Tris(hydroxymethyl)aminomethan

TyrP Tyrosinphosphat

WT Wildtyp
z Ladungszahl
z.B. zum Beispiel

 $\begin{array}{lll} \beta\text{-ME} & \beta\text{-Mercaptoethanol} \\ \lambda_{\text{Em}} & \text{Emissionswellenlänge} \\ \lambda_{\text{Ex}} & \text{Extinktionswellenlänge} \end{array}$

Nukleinbasen:

A Adenin R Purin (A oder G) M Aminogruppe (A oder C)
G Guanin Y Pyrimidin (C oder T) K Ketogruppe (G oder T)
C Cytosin S strong (C oder G) H nicht G (A, C oder T)
T Thymin W weak (A oder T) B nicht A (C, G oder T)
V nicht T (A, C oder G) D nicht C (A, G oder T) N beliebig (A, C, G oder T)

Aminosäuren:

Α	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
С	Cys	Cystein	Ν	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	Р	Pro	Prolin
Ε	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
Н	His	Histidin	Т	Thr	Threonin
1	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
Κ	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Υ	Tyr	Tyrosin

Alle weiteren im Text verwendeten Abkürzungen werden dort erklärt bzw. als allgemein bekannt vorausgesetzt.

7 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1-1	Bildung reaktiver Sauerstoffspezies nach Baker, et al., 1995.	4
Abb. 1-2	Mit Pilz kontaminierte Kalluskultur von Eschscholzia californica.	7
Abb. 1-3	Schematische Darstellung der durch Elicitorkontakt ausgelösten	
	Signaltransferwege in suspensionskultivierten Zellen von Eschscholzia	
	californica nach Roos, et al., 2006.	9
Abb. 1-4	Schema der Biosynthese der Benzo[c]phenanthridin-Alkaloide Sanguinarin	,
	Chelirubin und Marcapin ausgehend von L-Tyrosin nach Zenk (1994) und	
	Facchini & St.Pierre (2005).	12
Abb. 2-1	Kalibriergerade für Microplate Fluorescence Reader FL $_{\rm X}$ 800 ($\lambda_{\rm Ex}$ = 485 nm,	
	λ_{Em} = 580 nm, Sensitivity: 60).	16
Abb. 2-2	Kalibriergerade für Ultrospec 3000 (Absorption 480 nm).	18
Abb. 2-3	Kalibriergerade für Ultrospec 3000 (Absorption 562 nm).	19
Abb. 2-4	Schema der experimentellen Vorgehensweis bei 2D-Elektrophorese-	
	Projekten.	21
Abb. 2-5	pH Gradient Profile von Immobiline TM DryStrips als Funktion der	
	Streifenlänge bei 20 °C und 8 M Harnstoff (Quelle: GE-Healthcare).	2 3
Abb. 2-6	Schematische Darstellung der Blotting Apparatur.	24
Abb. 2-7	Vergleich zwischen Gel- und Blotfarbstoffen bei der Fluoreszenzfärbung.	28
Abb. 2-8	Vergleich des Hintergrundsignals nach Fluoreszenzfärbung mit und ohne	
	Blocking.	29
Abb. 2-9	Möglichkeiten der Darstellungsverbesserung unter Delta2D.	31
Abb. 2-10	Warping-Prozedur am Beispiel zweier biologischer Replikate.	32
Abb. 2-11	Overlay und warping beider images desselben Blots.	33
Abb. 2-12	"All-to-one" warp-Strategie.	34
Abb. 2-13	Vergleich von manuellem und automatischem warping.	34
Abb. 2-14	Fusion-images mit detektierten Spots.	35
Abb. 2-15	Spot Detektion, Verifizierung mithilfe der 3D-Ansicht.	36
Abb. 2-16	Vergleich der images eines Gels vor und nach dem Ausschneiden	
	von Spots.	38
Abb. 2-17	Funktionsprinzip der GATEWAY™ Klonierungstechnologie.	48
Abb. 2-18	Donorvektor pDONR™ 222.	49
Abb. 2-19	Zielvektoren pHELSGATE 12 und pK7GWIWG2(II).	49
Abb. 2-20	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Keimlingen.	53
Abb. 3-1	Struktur des Nigericin-Kalium-Komplexes.	61
Abb. 3-2	Auslösung der Alkaloidbiosynthese in Kulturen von Eschscholzia californica	1;
	Vergleich NigericinMethode mit Hefeelicitor.	62
Abb. 3-3	Optimierung der Parameter der Puffer-Methode.	63
Abb. 3-4	Auslösung der Alkaloidbiosynthese in Kulturen von Eschscholzia californica	1;
	Vergleich PufferMethode mit Hefeelicitor.	63
Abb. 3-5	Nachweis der Protein-Tyr-Phosphorylierung nach Elicitierung.	64
Abb. 3-6	Phosphotyrosin Testpeptide.	65

Abb. 3-7	ELISA-Test der Spezifität das Antikörpers "PY-99".	65
Abb. 3-8	Grafische Darstellung der Absorptionswerte nach ELISA.	66
Abb. 3-9	Proteinspots deren Phosphorylierungsmuster sich abhängig von Elicitor- b	zw.
	pH-Behandlung ändert.	68
Abb. 3-10	Phosphorylierungsprofil von <i>pE1u1</i> .	69
Abb. 3-11	Phosphorylierungsprofil von <i>pE1u2</i> .	70
Abb. 3-12	Phosphorylierungsprofil von pE1/E50u1.	70
Abb. 3-13	Phosphorylierungsprofil von pE1/E50/pHu1.	71
Abb. 3-14	Phosphorylierungsprofil von <i>pE50u1</i> .	71
Abb. 3-15	SDS-PAGE zum Vergleich der Anreicherung von Phosphoproteinen durch	
	MOAC und den "PhosphoProtein Purification Kit" (Qiagen, Hilden).	73
Abb. 3-16	Anreicherung der Phosphoproteine	74
Abb. 3-17	Verwendung unterschiedlicher pH-Intervalle und Beladungen.	75
Abb. 3-18	Vergleich der AS-Sequenzen von "aluminium induced proteins", bzw. eine	m
	"hypothetical protein" verschiedener Pflanzen nach Mascot-Suche mit MS	,-
	Daten.	77
Abb. 3-19	Ergebnis der PCR zur Identifizierung der Sequenz des "Al-inducced-like	
	proteins" Gens in Eschscholzia californica.	77
Abb. 3-20	Alignment der Gensequenzen der "Al induced proteins" aus Gossypium	
	hirsutum und Codonopsis lanceolata mit dem sequenzierten PCR Produkt a	aus
	Eschscholzia californica.	78
Abb. 3-21	Ergebnisse des zweiten cDNA-Bank-screening-Durchgangs.	79
Abb. 3-22	Alignment homologer DNA Bereiche der Klone I/1 (A) und I/3 (B) zur DNA	
	Sonde.	80
Abb. 3-23	Das unigene 338158 (DB: ESIA 200505; http://pgn.cornell.edu/; 12.03.200	8).
		81
Abb. 3-24	Ergebnis der PCR zur Überprüfung der Sequenz des "GAPDH" Gens in	
	Eschscholzia californica.	81
Abb. 3-25	Vergleich der AS-Sequenzen von GAPDH verschiedener Pflanzen nach	
	Mascot-Suche mit MS-Daten.	82
Abb. 3-26	Vergleich verwandter GAPDH Sequenzen verschiedener Pflanzenspezies na	ach
	NCBI BLAST.	83
Abb. 3-27	Mechanismus der von GAPDH katalysierten Reaktion von Glycerinaldehyd	-3-
	phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat (nach: Alberts, et al., 1997).	84
Abb. 3-28	Vereinfachte schematische Darstellung des RNAi-Mechanismus.	86
Abb. 3-29	DNA Sequenz Ausschnitt aus pDONR™222 mit eincloniertem GAPDH-Gen.	86
Abb. 3-30	pHELLSGATE 12 -Vektor nach LR-Reaktion.	87
Abb. 3-31	RNAi -Vektor pICH66255.	88
Abb. 3-32	RT-PCR von GAPDH und Aktin mit steigenden Zykluszahlen.	89
Abb. 3-33	Quantitative Analyse der Bandenintensität von GAPDH, Aktin und Tubulin	
	nach PCR mit RT-Template.	89

Abb. 3-34	Quantitative Analyse der Bandenintensität von BBE nach PCR mit RT-	
	Template.	90
Abb. 3-35	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Eschscholzia-Keimwurzeln au	S
	Kontroll-Ansätzen bzw. von nicht transformierten Keimlingen.	92
Abb. 3-36	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von RNAi-transformierten	
	Eschscholzia-Keimwurzeln.	94
Tab. 2-1	Scaneinstellungen an Fluoreszenzimagern zur Digitalisierung gefärberter	
	Gele und Blots.	30
Tab. 2-2	Verwendete PCR-Primer.	44
Tab. 2-3	Verwendete Sequenzierprimer.	47
Tab. 2-4	Für die Analyse transformierter Keimwurzeln verwendete PCR-Primer.	54
Tab. 2-5	Verwendete Chemikalien und deren Bezugsquellen.	56
Tab. 3-1	Auszug aus der exportierten "Quantitation Table" eines 2D-Projektes.	67
Tab. 3-2	Massen und IEP ausgesuchter Proteinspots.	68
Tab. 3-3	Mascot Ergebnisse der gefundenen Peptide für pE1/E50u1.	76
Tab. 3-4	Mascot Ergebnisse der gefundenen Peptide für pF50u1.	80

8 Anhang

8 Anhang

8.1 Danksagung

Ganz herzlich danken möchte ich meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Werner Roos für die Überlassung des Themas und für unzählige Ideen und Hilfestellungen während der gesamten Zeit.

Bei Herrn Dr. Christian Schmelzer und Frau Dr. Angelika Schierhorn sowie ihren Mitarbeitern bedanke ich mich für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen.

Ganz besonderer Dank gilt der Firma Icon Genetics GmbH und hier Herrn Dr. Sylvestre Marillonnet für die Hilfe bei der Planung und die letztliche Herstellung eines zuverlässig funktionstüchtigen RNAi-Vektors.

Danken möchte ich auch Herrn "Professor" Dieter Reese für das Anfertigen und die Reparatur zahlloser nützlicher Laborgeräte, für seine endlose Geduld sowie für viele aufmunternde Gespräche.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für viele Tipps, Hilfestellungen und anregende Diskusionen und für das gute Arbeitsklima überhaupt.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und Freunden für ihre Geduld, ihre moralische Unterstützung und die Motivationshilfen bedanken.

8.2 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet zu haben. Mit dieser Arbeit bewerbe ich mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrades.

Halle (Saale), den

Marcus Buchheim

8.3 Lebenslauf

Marcus Buchheim
Martha-Brautzsch-Straße 2

06108 Halle (Saale)

Telefon: 0176 - 24371345

E-Mail: marcus_buchheim@yahoo.de

Persönliche Daten

29. August 1977 in Frankfurt (Oder) Geburtsdaten

ledig Familienstand

deutsch Staatsangehörigkeit

Beruflicher Werdegang

Avie Apotheke, Muldestausee / Gossa seit 10 | 2011

Apotheken-Filialleiter

Adler Apotheke, Halle 07 | 2008 – 10 | 2011

Apotheker

Martin-Luther-Universität, Halle (Saale) 04 I 2004 – 07 I 2008

Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Fachbereich pharmazeutische Biologie

Studium und Ausbildung

Fortbildung zum Fachapotheker seit 2011

Allgemeinpharmazie

Dauer voraussichtlich bis 2014

Approbation als Apotheker 2004

Martin-Luther Universität, Halle

Studium der Pharmazie 1998 – 2004

Martin-Luther-Universität, Halle Abschluss: Diplompharmazeut

Diplomthema: "Ein Verfahren zur pH-abhängigen Auslösung der Alkaloidbiosynthese in Zellkulturen von Eschscholzia californica"

Grundwehrdienst 1997 – 1998

3./Panzerbataillon 413

Schulausbildung in Frankfurt (Oder) 1984 – 1997

Abschluss: Abitur