

α -Dioxygenase aus Erbsen

Studien zu Expression
und Enzym-Substrat-Interaktion

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Anke Karla Meisner
aus Würzburg

Würzburg 2005

Eingereicht am:

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Denen die mir nahe stehen

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und am Institut für Biochemie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der wissenschaftlichen Leitung von Herrn Prof. Dr. Peter Schreier in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. Astrid Schön.

Herrn Prof. Dr. Schreier gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas und das mir entgegengebrachte Vertrauen, für die engagierte fachliche Betreuung der Arbeit und die Unterstützung, die er mir stets in jeglicher Hinsicht gewährt hat.

Frau Dr. Schön danke ich herzlich dafür, dass sie die Betreuung der molekularbiologischen Arbeiten übernommen hat und ich so viel bei ihr lernen konnte. An dieser Stelle möchte ich auch die gute Fernbetreuung nach ihrem Weggang nach Leipzig erwähnen.

Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Gross und Herrn Prof. Dr. Utz Fischer danke ich dafür, dass sie es mir ermöglichten, die molekularbiologischen Arbeiten am Institut für Biochemie der Universität Würzburg durchzuführen.

Bei Frau Prof. Dr. Hildburg Beier möchte ich mich besonders für die herzliche Aufnahme in das Labor B 103 bedanken sowie für viele hilfreiche Anregungen. Frau Prof. Dr. Beier und Herr Prof. Dr. Gross haben mir in jeder Hinsicht große Gastfreundschaft entgegengebracht.

Herrn Dr. Alexander Saffert gebührt mein Dank für die Betreuung während meines Fortgeschrittenen-Praktikums, bei dem ich mit diesem Thema zum ersten Mal in Berührung gekommen bin, sowie für die Einweisung in Methoden der Enzymisolierung.

Bei Frau Gudrun Grimmer möchte ich mich ganz herzlich für ihre große Hilfsbereitschaft und die schöne Zeit bedanken, die wir im Labor B 116 verbracht haben.

Herrn Heinrich Tomförde und Frau Stefanie Wirtz danke ich für ihren tatkräftigen Einsatz während des Fortgeschrittenen-Praktikums, die gute Zusammenarbeit und für so manche engagierte Diskussion.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei den ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern der Arbeitskreise Schreier, Schön und Beier für die sehr gute Zusammenarbeit bedanken. Euch allen vielen Dank für die Unterstützung! Auch wenn ich nicht alle namentlich erwähnen kann, möchte ich hier nennen: Diana Kemmer, Samira Labib, Dominique Kavvadias und Thomas Wickert, sie haben immer für eine gute Atmosphäre im „Keller“ gesorgt und standen mir bei kleineren und größeren Problemen mit Rat und Tat zur Seite; Angela Baljuls, mit ihr habe ich lange Arbeitstage am Institut für Biochemie verbracht; Markus Englert, er hat ausgeholfen, wenn's mal knapp wurde; Olaf Gimple, Christian Heubeck, Simon Otter und Nicolas Menzel, sie haben mich freundlich und freundschaftlich in den Arbeitskreis Schön aufgenommen. Olaf möchte ich einen ganz speziellen Dank aussprechen für seine hilfreiche Korrektur der Arbeit.

Bei Thomas Hupp bedanke ich mich für Praktisches und Spirituelles.

Meinen Eltern Maria und Hans und meiner Familie möchte ich für große Unterstützung und Rückhalt danken. Julian danke ich für seinen Blick für das Wesentliche.

Publikation

Meisner, A.K., Saffert, A., Schreier, P., Schön, A. (2005) Fatty acid α -dioxygenase from *Pisum sativum*: Temporal and spatial regulation of fatty acid metabolism during germination and plant development. *FEBS Journal*, eingereicht.

Inhaltsverzeichnis

Erläuterungen	1
Zusammenfassung	5
Summary	9
1 Einleitung	13
2 Kenntnisstand	15
2.1 α-Oxidation von Fettsäuren in Pflanzen	15
2.1.1 Vorkommen.....	15
2.1.2 Mechanismus.....	15
2.1.3 Substratspezifität	20
2.1.4 Synthetisches Potential.....	21
2.1.5 α -Dioxygenasen aus Pflanzen.....	21
2.1.5.1 Lokalisierung und Struktur.....	21
2.1.5.2 Aminosäuresequenzen und Sequenzhomologie	22
2.2 α-Dioxygenasen und Prostaglandin H Synthasen	26
2.2.1 Bedeutung, Struktur und Katalyse von PGHS	26
2.2.2 Homologie zwischen α -DOX aus Pflanzen und PGHS	31
2.3 α-Oxidation von Fettsäuren in Säugetieren.....	35
2.4 α-Oxidation von Fettsäuren in Bakterien	38
2.5 Physiologische Bedeutung oxygenierter Fettsäurederivate in Pflanzen.....	40
2.6 Physiologische Bedeutung der α-Oxidation und ihrer Produkte in Pflanzen.....	44

3	Experimentalteil.....	49
3.1	Material.....	49
3.1.1	Chemikalien.....	49
3.1.2	Nukleotide, Oligonukleotide und DNA-Standards.....	50
3.1.3	Enzyme, Proteine und Antikörper.....	52
3.1.4	Plasmide.....	53
3.1.5	Biologisches Material.....	53
3.1.5.1	Bakterienstämme.....	53
3.1.5.2	mRNA und λ -cDNA-Bibliothek aus Erbsen.....	54
3.1.5.3	Pflanzenmaterial.....	54
3.1.6	Chromatographiemedien.....	55
3.1.6.1	Lose Materialien.....	55
3.1.6.2	Fertige Säulen.....	55
3.1.7	Gebrauchsfertige Analyse-Reagentsätze (<i>Kits</i>).....	55
3.1.8	Sonstige Materialien.....	55
3.2	Geräte.....	56
3.2.1	Headspace-Kapillargaschromatographie.....	56
3.2.2	Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie.....	56
3.2.3	Hochleistungsflüssigchromatographie.....	57
3.2.4	Kernresonanzspektroskopie (NMR).....	58
3.2.5	Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC).....	59
3.2.6	Photometer.....	59
3.2.7	Elektrophorese-Apparaturen.....	59
3.2.8	Sonstige Geräte.....	59
3.3	Methoden.....	61
3.3.1	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren.....	61
3.3.1.1	Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung von DNA.....	61
3.3.1.2	Denaturierende Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung von RNA.....	62
3.3.1.3	Elution von Nukleinsäuren aus Agarosegelen.....	63
3.3.2	Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen durch Hybridisierung.....	63
3.3.2.1	Kapillar-Transfer von Nukleinsäuren aus Agarosegelen auf Membranfilter.....	63
3.3.2.2	Hybridisierung von immobilisierten Nukleinsäuren mit radioaktiv markierten Nukleinsäurefragmenten.....	64
3.3.2.3	Markierung von DNA-Fragmenten mit [α - 32 P]dCTP.....	66
3.3.3	Isolierung von Nukleinsäuren.....	66
3.3.3.1	Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren.....	66
3.3.3.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wässriger Lösung.....	67
3.3.3.3	Abtrennung von Proteinen aus wässrigen Nukleinsäurelösungen.....	68
3.3.3.4	Isolierung von Plasmid-DNA.....	68
3.3.3.5	Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen.....	69
3.3.4	Amplifizierung von DNA durch Polymerasekettenreaktion (PCR).....	69
3.3.4.1	Polymerasekettenreaktion zur Amplifizierung von DNA-Matrizen.....	70
3.3.4.2	Kombinierte Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	71
3.3.4.3	Kolonie-PCR.....	72
3.3.4.4	Oligodesoxynukleotid-vermittelte bidirektionale Mutagenese.....	72
3.3.4.5	Amplifizierung von DNA-Enden (RACE).....	74
3.3.4.6	Analyse und Aufreinigung von PCR-Produkten.....	74
3.3.5	Sequenzierung von DNA mit AmpliTaq Polymerase FS BigDye Terminator.....	74

3.3.6	Klonierung von Fremd-DNA in Plasmid-Vektoren	75
3.3.6.1	Präparation von Plasmidvektoren durch Restriktionshydrolyse.....	75
3.3.6.2	Dephosphorylierung linearisierter Plasmide mit Alkalischer Phosphatase (CIP oder SAP)	76
3.3.6.3	Erzeugung glatter Enden und 5'-Phosphorylierung von PCR-Produkten.....	77
3.3.6.4	Erzeugung von kohäsiven Enden	78
3.3.6.5	Ligation von PCR-Produkten	78
3.3.6.6	Präparation chemokompetenter Zellen (Hanahan, 1983).....	79
3.3.6.7	Hitzeschock-Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	80
3.3.7	Kultivierung von <i>E. coli</i>	80
3.3.7.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> in Flüssigkultur	80
3.3.7.2	Kultivierung von <i>E. coli</i> -Zellen als Plattenkultur.....	81
3.3.8	Verfahren mit λ -cDNA-Bibliotheken	82
3.3.8.1	Verwendung des <i>E. coli</i> -Stammes XL1-Blue MRF'	82
3.3.8.2	Vorbereitung einer <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'-Bakterienstamm-Suspension	82
3.3.8.3	Titerbestimmung von sekundären λ -cDNA-Bibliotheken	82
3.3.8.4	Bakteriophagen-Infektion und Ausplattieren	83
3.3.8.5	Induktion der Phagen-gekoppelten cDNA-Expression	84
3.3.8.6	Identifizierung spezifischer Phagen-Klone durch Protein-Protein-Interaktion	84
3.3.8.7	Identifizierung spezifischer Phagen-Klone durch DNA-Hybridisierung	84
3.3.8.8	Isolierung potentiell positiver Plaques	85
3.3.8.9	Überprüfung potentiell positiver Plaques.....	85
3.3.8.10	<i>In vivo</i> -Exzision von cDNA aus dem Uni-ZAP [®] XR Vektor-System	86
3.3.9	Charakterisierung von Proteinen	86
3.3.9.1	Konzentrieren und Umpuffern von Proteinlösungen	86
3.3.9.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	87
3.3.9.3	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	88
3.3.9.4	Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	90
3.3.9.5	Übertragung von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen (Western Blot)	91
3.3.9.6	Nachweis von Proteinen durch gekoppelte Immunreaktion.....	92
3.3.9.7	Aufreinigung von polyklonalen Antikörpern	95
3.3.10	Expression rekombinanter Proteine.....	96
3.3.10.1	Expressionssysteme auf Basis der <i>E. coli</i> RNA-Polymerase (pQE- und pGEX-Vektoren).....	97
3.3.10.2	Das T7-Expressionssystem (pET- und pRSET-Vektoren).....	98
3.3.10.3	Überexpression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> -Stämmen	99
3.3.11	Methoden zur Proteinaufreinigung.....	102
3.3.11.1	Präparative Gewinnung der α -Dioxygenase aus Erbsen	102
3.3.11.2	Herstellung eines Proteinrohextrakts aus keimenden Erbsen.....	103
3.3.11.3	Nicht-denaturierende Aufreinigung eines rekombinanten Proteins über Affinitätschromatographie an Ni ²⁺ -NTA-Agarose	103
3.3.12	Bestimmung der α -Dioxygenase-Aktivität	104
3.3.12.1	Qualitativer Nachweis der α -Dioxygenase-Aktivität.....	104
3.3.12.2	Spektralphotometrischer Nachweis der α -Dioxygenase-Aktivität.....	104
3.3.12.3	Polarographische Bestimmung der α -Dioxygenase-Aktivität.....	105
3.3.12.4	Nachweis der α -Dioxygenase-Aktivität mittels HPLC mit UV-Detektion.....	106
3.3.13	Darstellung von Pentadecanal	107
3.3.14	Bioinformatische Methoden	107
3.3.14.1	Datenbanksuche	107
3.3.14.2	Erstellung von <i>Alignments</i>	107

4	Ergebnisse und Diskussion	109
4.1	Isolierung der für α-Dioxygenase aus <i>P. sativum</i> codierenden cDNA	109
4.1.1	Immuno-Screening der <i>P. sativum</i> λ -cDNA-Bibliothek	109
4.1.1.1	Kontrolle der Antikörper-Spezifität	109
4.1.1.2	Titration der λ -cDNA-Bibliothek	111
4.1.1.3	Screening der λ -cDNA-Bibliothek	111
4.1.2	Isolierung eines für α -Dioxygenase aus <i>P. sativum</i> codierenden cDNA-Fragments	113
4.1.2.1	Konstruktion degenerierter Oligonukleotid-Startsequenzen	113
4.1.2.2	RT-PCR und Sequenzierung	115
4.1.3	Screening der <i>P. sativum</i> λ -cDNA-Bibliothek mit radioaktiv markiertem cDNA-Fragment	117
4.1.3.1	Titration der λ -cDNA-Bibliothek	117
4.1.3.2	Screening der λ -cDNA-Bibliothek mit DOX830	118
4.1.3.3	Exzision des <i>Phagemids</i> und Charakterisierung der klonierten cDNAs	119
4.1.4	Bestimmung der 5'-untranslatierten Region mittels RACE	122
4.2	Charakterisierung der <i>P. sativum</i> α-DOX cDNA	124
4.2.1	Homologie und Phylogenie von α -Dioxygenasen	124
4.2.2	Homologie zu PGHS	126
4.3	Expression in <i>E. coli</i> und Isolierung der <i>P. sativum</i> α-DOX	127
4.3.1	Expressionssysteme auf Basis der <i>E. coli</i> RNA-Polymerase	127
4.3.2	Expressionssysteme auf Basis des T7-Promotors	130
4.3.2.1	Expression von <i>P. sativum</i> α -DOX im analytischen Maßstab	130
4.3.2.2	Optimierung der Expressionsbedingungen	135
4.3.2.3	Überproduktion und Isolierung von <i>P. sativum</i> α -DOX im präparativen Maßstab	138
4.4	Untersuchungen zur Enzym-Substrat-Interaktion	142
4.4.1	Umsetzung von aus Erbsen aufgereinigter α -Dioxygenase mit derivatisierten Fettsäuren	142
4.4.1.1	Anreicherung der α -DOX aus keimenden Erbsen	142
4.4.1.2	Substrat-Screening	143
4.4.2	Aminosäureaustausch ausgewählter Arginin-Reste	144
4.4.2.1	Auswahl aufgrund von Vergleich mit PGHS-1	144
4.4.2.2	Mutagenesestudie	147
4.5	Expression der <i>P. sativum</i> α-DOX während Keimung und Entwicklung	152
4.5.1	Akkumulation von α -DOX mRNA	153
4.5.2	Akkumulation von α -DOX Protein	157
4.5.3	Analyse der α -Dioxygenase-Aktivität	161
4.5.4	Ergebnisse der Keimungsstudie	163
	Anhang	167
	Literatur	171
	Lebenslauf	

Erläuterungen

Die Namen von Gensequenzen sind in der vorliegenden Arbeit in kursiver, die der entsprechenden Proteine in normaler Schreibweise wiedergegeben.

Fettsäuren sind z.T. mit ihren Trivialnamen bezeichnet: Laurinsäure (Dodecansäure), Myristinsäure (Tetradecansäure), Palmitinsäure (Hexadecansäure), Stearinsäure (Octadecansäure), Ölsäure ((Z)-9-Octadecensäure), Linolsäure ((Z,Z)-9,12-Octadecadiensäure), Linolensäure ((Z,Z,Z)-9,12,15-Octadecatriensäure) und Arachidonsäure (*all*-(Z)-5,8,11,15-Eicosatetraensäure).

Bei Literaturhinweisen sind der Autor bzw. die beiden erstgenannten Autoren mit Erscheinungsjahr in Klammer angeführt. Die vollständigen Angaben finden sich im Literaturverzeichnis.

Verwendete Abkürzungen und Symbole:

A	Adenosin
A _x	Absorption bei einer Wellenlänge von X nm
AcOH	Essigsäure
ADAM	Anthryldiazomethan
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BCA	Bicinchoninsäure (<i>Bicinchoninic acid</i>)
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Albumin aus Rinderserum (<i>Bovine serum albumine</i>)
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA (<i>copy DNA</i>)
Ci	Curie
CIP	Alkalische Phosphatase (<i>Calf intestine phosphatase</i>)
CoA	Coenzym A
COX	Cyclooxygenase
cpm	<i>counts per minute</i>
CSPD	Dinatrium3-(4-methoxy Spiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-Chloro) Tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}] Decan}-4-yl Phenylphosphat
cv.	Cultivar (Kulturvarietät)

D	Dalton
d	Tag(e)
d_f	Filmstärke von Trennphasen
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEAE	Diethylaminoethyl (Anionenaustauscher-Gruppe)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuclease
DNPH	Dinitrophenylhydrazin
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DOX	Dioxygenase
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>Ethylene diamine tetraacetic acid</i>)
ELSD	Verdampfungs-Lichtstreu-Detektor (<i>Evaporative Light Scattering Detector</i>)
EPR	Elektronenparamagnetische Resonanz
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
g	Gramm
g_{max}	Erdbeschleunigung (9,81 m/sec ²)
G	Guanin
GC	Gaschromatographie
GPC	Gelpermeationschromatographie
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
² H	Deuterium
³ H	Tritium
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HRGC	Kapillargaschromatographie (<i>High Resolution Gas Chromatography</i>)
HS	<i>Headspace</i>
i. D.	innerer Durchmesser
IEC	Ionenaustausch-Chromatographie (<i>Ion Exchange Chromatography</i>)
IPTG	1-Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
I	Inosin
kb	Kilobase(n)
kbp	Kilobasenpaar(e)
kD	Kilodalton
λ	Bakteriophage Lambda
λ	Wellenlänge
l	Liter
LB	Luria-Bertani

M	molar (mol/l)
M	Molekulation
M_r	Molekulargewicht
MCS	multiple Klonierungsstelle (<i>Multiple cloning site</i>)
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
MS	Massenspektroskopie
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
NAD^+	Nicotinamidadenin dinukleotid (oxidierte Form)
NADH	reduzierte Form von NAD^+
n	Nano-, 10^{-9}
nm	Nanometer
NMR	Kernmagnetische Resonanz (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
nt	Nukleotid(e)
NTP	Nukleosid-5'-triphosphat
NZY	<i>Nitrogen Type A Caseinhydrolysate Yeast</i>
^{18}O	radioaktives Sauerstoffisotop
OAc	Acetat
OD_{580}	optische Dichte bei 580 nm
<i>orf</i>	offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
^{32}P	radioaktives Phosphorisotop
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
<i>pfu</i>	<i>Plaque forming unit</i>
PGG_2	Prostaglandin G_2
PGH_2	Prostaglandin H_2
PGHS	Prostaglandin Endoperoxid H Synthase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
PP	Polypropylen
PP	Probenpuffer
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
RP	<i>Reversed Phase</i>
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SM-Puffer	Natrium/Magnesium-Puffer (<i>Storage medium</i>)
ss	einzelsträngig (<i>single stranded</i>)
SSC-Puffer	Natriumcitrat-Puffer

Erläuterungen

T	Thymin
T _M	Schmelztemperatur
TAE-Puffer	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TBE-Puffer	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TBS-Puffer	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>Tris buffered saline</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TE-Puffer	Tris/EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
U	<i>International Unit</i> (μmol/min)
U	Uracil
u	Masseneinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
V _{max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit
VIS	sichtbarer Bereich
Vol	Volumen
% (v/v)	Volumenprozent (<i>volume per volume</i>)
% (w/v)	Gewichtsprozent (<i>weight per volume</i>)
X-Gal	5'-Brom-4'-chlor-3'-indolyl-β-D-galaktopyranosid

Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Enzym α -Dioxygenase (α -DOX) aus Erbsen (*Pisum sativum*) mit folgenden Zielsetzungen untersucht: Isolierung und Charakterisierung der für die *P. sativum* α -DOX codierenden cDNA, Überproduktion der *P. sativum* α -DOX in *Escherichia coli* und nachfolgende Isolierung, Untersuchung der Interaktion der *P. sativum* α -DOX mit Fettsäuresubstraten sowie systematische Studie der Expression der *P. sativum* α -DOX während der Keimung und Entwicklung von Erbsenpflanzen.

α -Dioxygenasen katalysieren in Pflanzen den Initialschritt der α -Oxidation von langkettigen Fettsäuren, die über die intermediäre Bildung von (*R*)-2-Hydroperoxyfettsäuren führt. Folgeprodukte dieser Reaktion sind die entsprechende (*R*)-2-Hydroxysäure sowie der um ein C-Atom kettenverkürzte Aldehyd.

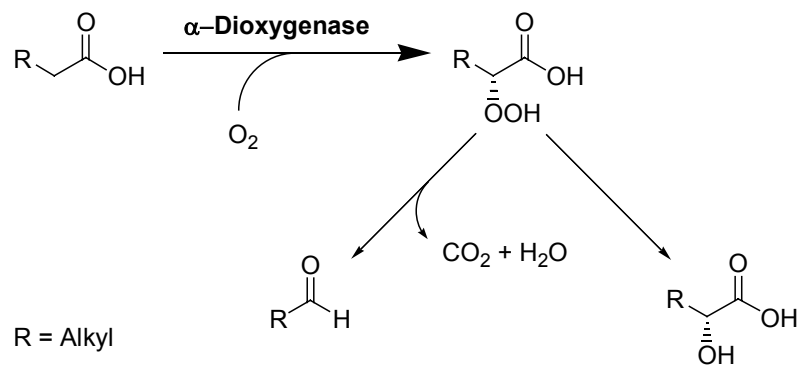


Abb.: α -Oxidation von Fettsäuren in Pflanzen.

In einer vorangegangenen Arbeit war eine α -Dioxygenase aus keimenden Erbsen isoliert und charakterisiert worden (Saffert, 2001).

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war die Isolierung und Charakterisierung der für die α -DOX aus Erbsen codierenden cDNA. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein Fragment dieser cDNA mittels RT-PCR (kombinierte Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion) isoliert: es wurden

Aminosäurepartialsequenzen der 70 kD-Untereinheit der aus Erbsen isolierten α -DOX mit Sequenzen aus anderen höheren Pflanzen verglichen und auf Grundlage dieses Vergleichs degenerierte Oligonukleotidstartsequenzen konstruiert; polyA⁺-RNA wurde aus keimenden Erbsen isoliert und hieraus der cDNA-Erststrang gebildet; die Startsequenzen und der cDNA-Erststrang wurden zur PCR eingesetzt. Auf diesem Weg gelang erstmals die Isolierung einer für die α -Dioxygenase aus Erbsen codierenden cDNA, nämlich eines 830 bp-langen Fragments (DOX830).

Zur Isolierung der vollständigen für die α -Dioxygenase aus Erbsen codierenden cDNA wurde dieses Fragment DOX830 nach radioaktiver Markierung für das *Screening* einer λ -cDNA-Bibliothek aus keimenden Erbsen eingesetzt. Es wurde so eine cDNA mit einer Gesamtlänge von 2132 bp isoliert, die ein offenes Leseraster von 1929 bp beinhaltet. Sie codiert für ein Protein mit 643 Aminosäuren und einem errechneten Molekulargewicht von ca. 73 kD. Die aus der cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz war in Übereinstimmung mit den Aminosäurepartialsequenzen der aus Erbsen isolierten α -Dioxygenase.

Beim Vergleich der ermittelten Aminosäuresequenz der α -DOX aus Erbsen mit den Aminosäuresequenzen von α -Dioxygenasen aus anderen höheren Pflanzen wurde eine ausgeprägte Homologie der Enzyme deutlich. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten konnte die α -DOX aus Erbsen in die Familie der α -Dioxygenasen eingeordnet und hierbei dem α -DOX1-Zweig zugeordnet werden.

Eine Homologie von α -Dioxygenasen zu tierischen Prostaglandin Endoperoxid H Synthasen (PGHS)-1 und -2 ist bekannt. Dies wurde hier auch für die α -Dioxygenase aus Erbsen gezeigt: der Vergleich der Aminosäuresequenz der *P. sativum* α -DOX mit PGHS-1 aus *Ovis aries* sowie mit PGHS-2 aus *Mus musculus* ergab, dass jeweils 21% identische Aminosäuren vorliegen. Die in PGHS-1 für die Katalyse relevanten Aminosäuren His-207, His-388 und Tyr-385 sind in der α -Dioxygenase aus Erbsen an äquivalenten Stellen konserviert (His-167, His-393 und Tyr-390).

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die *Pisum sativum* α -Dioxygenase in *E. coli* als Fusionsprotein mit einem 6 \times His-tag überproduziert und mittels Metallaffinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose isoliert. Hierzu wurden Versuche mit verschiedenen Expressionsvektoren und Bakterienstämmen bei unterschiedlichen Expressionsbedingungen durchgeführt. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität des isolierten Proteins erfolgte durch Quantifizierung der bei Umsetzung von Palmitinsäure gebildeten Menge an Pentadecanal (nach Derivatisierung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin) mittels HPLC (Hochleistungsflüssigchromatographie) und UV-Detektion. Nach Optimierung der Bedingungen von Expression und Aufreinigung wurde schließlich ein Protein mit einer spezifischen Aktivität von 25-30 nmol mg⁻¹ min⁻¹ isoliert.

Der folgende Teil der Arbeit umfasste Studien zur Interaktion der *P. sativum* α -Dioxygenase mit Fettsäuresubstraten. Es erfolgten sowohl Versuche zu Anforderungen auf Seiten des Substrats als auch zu potentiellen Interaktionspartnern auf Seiten des Enzyms: um Informationen über notwendige Voraussetzungen auf Seiten des Substrats zu erhalten, wurden Experimente zur Dioxygenierung von Fettsäuren mit derivatisierter Carboxylfunktion durchgeführt. Bei diesen Umsetzungen diente aus keimenden Erbsen isolierte α -Dioxygenase als Enzym. Als Substrate wurden – neben Palmitinsäure als Kontrolle – Palmitinsäuremethylester, Mono-, Di- und Tri-palmitoylglyceride, Palmitinsäureamid und Palmitinsäureethanolamid eingesetzt. Keines der Derivate wurde als Substrat akzeptiert. Dieses Ergebnis zeigt, dass für die Reaktion von α -Dioxygenasen mit Fettsäuren die freie Carboxylgruppe des Substrats unerlässlich ist.

Damit bestehen Parallelen zwischen pflanzlichen α -Dioxygenasen und PGHS-1, welche – wie bekannt ist – ausschließlich Fettsäuren mit freier Carboxylgruppe umsetzen. PGHS-2 hingegen sind in der Lage, auch die Umsetzung von Arachidonsäureethanolamid und 2-Arachidonylglycerid zu katalysieren. In PGHS-1 spielt der Arginin-Rest Arg-120 bei der Bindung von Fettsäuresubstraten eine entscheidende Rolle: es bilden sich ionische Wechselwirkungen zwischen der basischen Aminosäure Arginin und dem Fettsäurecarboxylat aus.

Für weitere Versuche wurde postuliert, dass die Substratbindung in pflanzlichen α -Dioxygenasen, analog zur Substratbindung in PGHS-1, über die Interaktion des Substrats mit einem Arginin-Rest erfolgt. Aufgrund eines Aminosäuresequenzvergleichs zwischen der α -Dioxygenase aus Erbsen und PGHS-1 aus *O. aries* wurden vier potentielle Interaktionspartner auf Seiten der α -Dioxygenase aus Erbsen ausgewählt. Es handelte sich um die Arginin-Reste Arg-87, Arg-391, Arg-569 und Arg-570. Um zu untersuchen, ob die ausgewählten Arginin-Reste eine Rolle bei der Interaktion des Enzyms mit Fettsäuren spielen, wurden mit Hilfe der ortsspezifischen Mutagenese die entsprechenden Arginin-Reste gegen Aminosäuren mit anderen Eigenschaften ausgetauscht, und zwar gegen Leucin (eine ungeladene unpolare Aminosäure), gegen Glutamin (eine ungeladene polare Aminosäure) und gegen Lysin (eine basische Aminosäure). Die entsprechenden Proteine wurden in *E. coli* als Fusionsprotein mit einem 6 \times His-tag überproduziert und mittels Metallaffinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose isoliert. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität erfolgte erneut mit Palmitinsäure als Substrat. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse konnte der Aminosäurerest Arg-570 als potentieller Interaktionspartner mit dem Fettsäuresubstrat identifiziert werden.

Um Informationen über die Expression von α -Dioxygenasen in Pflanzen zu erhalten, erfolgten im letzten Teil der Arbeit exemplarisch Untersuchungen zur Expression der *P. sativum* α -Dioxygenase in keimenden Erbsen und jungen Erbsenpflanzen. Es handelt sich um die erste systematische Studie dieser Art bei α -Dioxygenasen während Keimung und Entwicklung von Pflanzen. Die Expression wurde sowohl in ihrem zeitlichen Verlauf als auch hinsichtlich der Gewebespezifität betrachtet. Die Ergebnisse zeigten, dass Keimung zu einer deutlichen Akkumulation von α -Dioxygenase mRNA in Erbsen führte. Auch α -Dioxygenase Protein war in großer Menge in keimenden und jungen Erbsenpflanzen vorhanden. Ausgeprägte Gewebespezifität war festzustellen: α -DOX mRNA fand sich fast ausschließlich in Wurzeln von Erbsenpflanzen, in Sprossgewebe dagegen war sie kaum vorhanden. Im Gegensatz dazu lag α -DOX Protein gleichermaßen in Spross- und in Wurzelgewebe vor. Parallel zur Reifung der Pflanzen nahm die Menge an α -DOX mRNA ab, und auch der Anteil an detektiertem Protein ging mit zunehmender Reifung zurück.

Im Hinblick auf die α -Dioxygenase-Aktivität ergab sich folgendes Bild: sie war bereits in trockenen Samen detektierbar, während der Keimung nahm sie deutlich zu. Die höchste Aktivität – bezogen auf das Frischgewicht der Pflanzen – wurde am ersten Tag nach Beginn der Keimung in den Kotyledonen beobachtet. Im Vergleich von Spross- und Wurzelgewebe war die Aktivität in Wurzeln höher, bezogen sowohl auf das Frischgewicht der Pflanzen als auch auf die Menge an Gesamtprotein (spezifische Aktivität). Die Untersuchungen an Wurzeln zeigten, dass die Aktivität bezogen auf das Frischgewicht der Pflanzen über den betrachteten Zeitraum kaum variierte, während die spezifische Aktivität mit zunehmendem Alter der Pflanzen kontinuierlich zunahm. Dieser Anstieg korrelierte weder mit der vorhandenen Menge an α -DOX mRNA noch mit der an α -DOX Protein. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in Erbsen mehrere α -Dioxygenase-Isoenzyme vorhanden sind, so wie man dies für andere höhere Pflanzen bereits postuliert hat.

Ein zellprotektiver Effekt von α -Dioxygenasen auf Pflanzen während der Interaktion mit Pathogenen ist bekannt. Möglicherweise ist dies auch der Grund für eine verstärkte Expression während der Keimung von Pflanzen. Die bevorzugte Expression in Wurzeln könnte auf eine Funktion als permanentes Schutzsystem gegen Infektion hindeuten.

Summary

In the present work the enzyme α -dioxygenase (α -DOX) from pea (*Pisum sativum*) was examined with the following objectives: isolation and characterisation of the cDNA encoding the *P. sativum* α -DOX, expression of the *P. sativum* α -DOX in *Escherichia coli* and subsequent isolation, analysis of the interaction between the *P. sativum* α -DOX and fatty acid substrates, and systematic study of the expression of the *P. sativum* α -DOX during germination and development of pea plants.

α -Dioxygenases catalyse the initial step of the α -oxidation of long chain fatty acids in plants, which leads via the intermediary formation of a (*R*)-2-hydroperoxy fatty acid to the formation of the corresponding (*R*)-2-hydroxy fatty acid and the one C atom chain-shortened aldehyde.

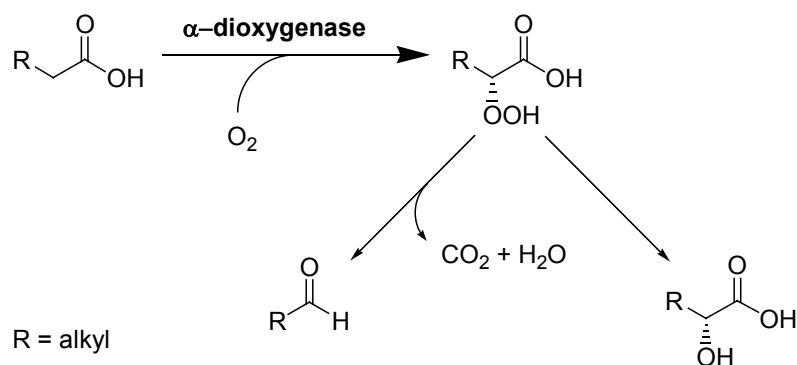


Fig.: Fatty acid α -oxidation in plants.

In previous works an α -dioxygenase from germinating pea seeds had been isolated and characterised (Saffert, 2001).

The first objective of the present work was to realise the isolation and characterisation of the cDNA encoding the α -DOX from pea. Initially a fragment of this cDNA was isolated using a combined reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Therefore, the partial amino acid sequences of the 70 kD subunit of the α -DOX isolated from pea seeds were compared to known sequences from other higher plants. Degenerate oligonucleotide primers were designed on the basis

of this comparison; polyA⁺ RNA was isolated from germinating pea seeds and used for the synthesis of the cDNA first strand; a PCR reaction was performed using the oligonucleotide primers and the cDNA first strand. Thereby, the cDNA, i.e. a 830 bp fragment (DOX830), encoding the α -dioxygenase from pea was isolated for the first time.

To isolate the complete cDNA encoding the α -dioxygenase from pea, the fragment DOX830 was radioactively labelled and used to screen a cDNA library from germinating pea seeds. Eventually, a cDNA of 2132 bp was isolated, comprising an open reading frame (orf) of 1929 bp. This cDNA encodes a polypeptide of 643 amino acids with a calculated molecular mass of about 73 kD. The amino acid sequence deduced from the isolated cDNA was in agreement with the partial amino acid sequences of the α -dioxygenase that had earlier been isolated from germinating pea seeds.

Comparison of the complete amino acid sequence of the α -DOX from pea, determined here, with amino acid sequences from α -dioxygenases from other higher plants revealed a marked homology between the enzymes. Due to these similarities, the α -DOX from pea is to be classified as a member of the family of plant α -dioxygenases and forms part of the α -DOX1 branch.

Homology is known to exist between plant α -dioxygenases and animal prostaglandin endoperoxide H synthases (PGHS)-1 and -2. This also was shown for the α -dioxygenase from pea: the amino acid sequence alignment of the *P. sativum* α -DOX with PGHS-1 from *Ovis aries* and PGHS-2 from *Mus musculus* revealed 21% identical amino acids with PGHS-1 and -2, respectively. The catalytically relevant amino acids in PGHS-1, i.e. His-207, His-388 and Tyr-385, are conserved at similar positions in the α -dioxygenase from pea, i.e. His-167, His-393 and Tyr-390.

In the further course of the work, the *Pisum sativum* α -dioxygenase was expressed in *E. coli* as a fusion protein with a 6 \times His tag and isolated by means of metal affinity chromatography using Ni²⁺-NTA agarose. Experiments were performed with various expression vectors and bacterial strains under varying expression conditions. The specific activity of the isolated protein was determined by quantification of pentadecanal, formed by conversion of palmitic acid, as its 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative using a HPLC method (High Performance Liquid Chromatography) and UV detection. After optimisation of the expression and purification procedure, a protein with a specific activity of 25-30 nmol mg⁻¹ min⁻¹ was isolated.

The following part of the work focussed on the interaction of the *P. sativum* α -dioxygenase with fatty acid substrates. Experiments regarding the necessary prerequisites of substrates, as well as a study on amino acid residues as potential interaction partners with substrates were performed. To obtain information about necessary prerequisites of substrates, the dioxygenation of fatty acids with derivatised carboxyl group was examined. α -Dioxygenase isolated from germinating pea seeds was used as enzyme in these experiments. Palmitic acid served as a control. The tested substrates were methyl palmitate, mono-, di- and tripalmitoylglycerol, palmitic acid amide and palmitoylethanolamide. None of these derivatives were accepted as a substrate. This result shows that the free carboxyl group of substrates is indispensable for the reaction of α -dioxygenases with fatty acids.

This implicates that parallels exist between plant α -dioxygenases and PGHS-1 which, as is known, only catalyse the conversion of fatty acids with a free carboxyl group. In contrast, PGHS-2 also catalyse the conversion of arachidonylethanolamide and 2-arachidonylglycerol. In PGHS-1, the arginine residue Arg-120 plays a vital role for the binding of fatty acid substrates: ionic interactions are formed between the basic amino acid arginine and the fatty acid carboxylate.

The following experiments were designed to test the hypothesis that the substrate binding in plant α -dioxygenases occurs, in analogy to PGHS-1, via interaction of the substrate with an arginine residue. On the basis of an alignment of the amino acid sequences of α -dioxygenase from pea and PGHS-1 from *O. aries*, four potential interaction partners were selected in the pea α -dioxygenase. These were the arginine residues Arg-87, Arg-391, Arg-569 and Arg-570. To determine whether the selected arginine residues play a role for the interaction of the enzyme with fatty acids, they were replaced by amino acids with distinct characteristics by means of site-directed mutagenesis. Arginine was replaced by leucine (a neutral non-polar amino acid), glutamine (a neutral polar amino acid) and lysine (a basic amino acid). The respective proteins were expressed in *E. coli* as fusion proteins with a 6 \times His tag and isolated by means of metal affinity chromatography using Ni²⁺-NTA agarose. The specific activity was determined with palmitic acid as substrate. The obtained results suggest that the arginine residue Arg-570 might play a role as a potential interaction partner with fatty acid substrates.

In the final part of the work an exemplary study on the expression of the *P. sativum* α -dioxygenase in germinating pea seeds and young pea plants was performed to gain insight into the expression of α -dioxygenases in plants. This is the first systematic study of this kind on α -dioxygenases during plant germination and development. The time course of expression and the tissue specificity were investigated. The obtained results show that germination leads to a pronounced accumulation of α -dioxygenase mRNA in peas. α -Dioxygenase protein is also present in a significant amount in germinating and young pea plants. A pronounced tissue specificity was observed: α -DOX mRNA was almost exclusively found in roots of pea plants, whereas in shoots only small amounts were detected. In contrast, α -DOX protein was equally detected in shoot and root tissue. Paralleling growth, the amount of α -DOX mRNA decreased, similarly the amount of detected protein also decreased with proceeding maturation.

Regarding the α -dioxygenase activity, the following results were obtained: α -dioxygenase activity is already detectable in dry seeds, during germination it increases markedly. The highest activity, with respect to the samples' fresh weight, was observed in the cotyledons on the first day after the start of imbibition. When comparing shoot and root tissue, the activity in roots was found to be higher with respect to the samples' fresh weight as well as to the amount of total protein (specific activity). In roots the activity with respect to the samples' fresh weight varied scarcely during the time observed, whereas the specific activity increased continuously with proceeding maturation of the plants. This increase can be correlated neither with the amount of α -DOX mRNA nor with the amount of α -DOX protein. These results indicate that further α -dioxygenase isoenzymes exist in pea plants, as had been postulated earlier for other higher plants.

It is known that α -dioxygenases exert a cell protective effect on plants during the interaction of plants with pathogens. Possibly this could be a reason for the enhanced expression during plant germination. The predominant expression in roots might indicate a function as a permanent protection system against infections.

1 Einleitung

Fettsäuren werden in Pflanzen auf unterschiedlichen Wegen metabolisiert. Die β -Oxidation ist der bekannteste Weg zum Abbau von Fettsäuren, sie können aber auch durch α -Oxidation metabolisiert werden.

Beim Initialschritt der α -Oxidation in Pflanzen wird durch α -Dioxygenasen molekularer Sauerstoff an das C-Atom in α -Position von langkettigen Fettsäuren übertragen. Dabei wird die entsprechende α -Hydroperoxyfettsäure gebildet. *In vitro* hat man nachgewiesen, dass aus dieser instabilen Verbindung durch Decarboxylierung der entsprechende um ein C-Atom kettenverkürzte Aldehyd sowie in geringerer Menge durch Reduktion die entsprechende α -Hydroxyfettsäure entsteht. *In vivo* werden als Produkte der α -Oxidation stereoselektiv (*R*)-2-Hydroxyfettsäuren mit unterschiedlicher Kettenlänge und unterschiedlichem Sättigungsgrad gebildet. Über die physiologische Bedeutung der Produkte der α -Oxidation im Stoffwechsel von Pflanzen können bislang keine abschließenden Aussagen gemacht werden.

Neben der physiologischen Bedeutung der α -Oxidation für den pflanzlichen Stoffwechsel ist auch das synthetische Potential von α -Dioxygenasen von wissenschaftlichem Interesse. Unter geeigneten Reaktionsbedingungen können α -Dioxygenasen zur Darstellung optisch aktiver 2-Hydroxyfettsäuren eingesetzt werden. So wurde bei Studien im Rahmen des Sonderforschungsbereichs (SFB) 347 gezeigt, dass außer natürlichen Fettsäuresubstraten zahlreiche Carbonsäuren mit Heteroatomen, wie Sauerstoff oder Schwefel, von einer α -Dioxygenase aus Erbsen (*Pisum sativum*) als Substrat akzeptiert und mit absoluter Enantioselektivität im präparativen Maßstab zu den entsprechenden (*R*)-2-Hydroxysäuren umgesetzt werden (Lazarus, 1998).

Weitere Arbeiten aus unserem Arbeitskreis zur präparativen Isolierung und Reinigung einer α -Dioxygenase aus Erbsenkeimlingen ermöglichten die biochemische Charakterisierung dieses Enzyms; es wurden die Reaktionsprodukte bestimmt und kinetische Untersuchungen zur Substratumsetzung sowie Studien zur Inhibierung durchgeführt. Anhand der Aminosäuresequenzierung von Fragmenten der 70 kD-Untereinheit der α -Dioxygenase aus Erbsenkeimlingen wurde gezeigt, dass signifikante Übereinstimmungen mit der Aminosäuresequenz einer

pathogen-induzierbaren Oxygenase aus Tabak existieren. Damit war das Enzym aus Erbsen in die Familie pflanzlicher α -Dioxygenasen einzuordnen (Saffert, 2001).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte zunächst die für die α -Dioxygenase aus Erbsen codierende cDNA isoliert und charakterisiert werden. Ein vorrangiges Ziel bestand sodann darin, die α -Dioxygenase aus Erbsen rekombinant in *E. coli* zu exprimieren und zu isolieren. Weiterhin sollten Untersuchungen zur Substratbindung des Enzyms durchgeführt werden: sie umfassten zum einen die Umsetzung derivatisierter Fettsäuren durch das aus Erbsen aufgereinigte Enzym, mit dem Ziel, Informationen zu erhalten über die für die enzymatische Umsetzung notwendigen funktionellen Gruppen auf Seiten des Substrats, und zum anderen eine Mutagenesestudie mit rekombinantem Enzym, mit dem Ziel, die an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren zu identifizieren. Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit bestand darin, die Bedeutung der Fettsäure- α -Oxidation während Keimung und Wachstum von Pflanzen zu untersuchen: es sollte die Expression der α -Dioxygenase hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs und der Gewebespezifität betrachtet werden, um weiteren Einblick in die physiologische Bedeutung der α -Oxidation und ihrer Produkte in Pflanzen zu erhalten.

2 Kenntnisstand

2.1 α -Oxidation von Fettsäuren in Pflanzen

2.1.1 Vorkommen

Die α -Oxidation von Fettsäuren in Pflanzen wurde erstmals 1952 von Newcomb und Stumpf für keimende Erdnüsse (*Arachis hypogea*) beschrieben. Inzwischen ist dieser Biogenese-Weg auch in anderen höheren Pflanzen nachgewiesen worden, wie z.B. Erbsenblättern (*Pisum sativum*) (Hitchcock und James, 1966) und keimenden Erbsen (Saffert *et al.*, 2000), Gurken (*Cucumis sativus*) (Galliard und Matthew, 1976), Kartoffeln (*Solanum tuberosum*) (Laties und Hoelle, 1967), Tabakblättern (*Nicotiana tabacum*) (Kawasaki *et al.*, 1998; Hamberg *et al.*, 1999) und Reis (*Oryza sativa*) (Kang *et al.*, 1986; Koeduka *et al.*, 2000). Einfachere Lebensformen, wie grüne Meeresalgen (*Ulva pertusa*) (Kajiwara *et al.*, 1988) oder auch Rot- und Braunalgen, sind ebenfalls in der Lage, Fettsäuren via α -Oxidation abzubauen (Kajiwara *et al.*, 1992).

2.1.2 Mechanismus

Eine erste Theorie über den Ablauf der α -Oxidation von Fettsäuren wurde 1959 für die α -Oxidation in Erdnüssen aufgestellt (Martin und Stumpf, 1959). Postuliert wurde ein elektrophiler Angriff eines Porphyrin-gebundenen Perferryl-Kations auf das α -Kohlenstoffatom von Fettsäuren, und es wurde angenommen, dass hierbei unter Decarboxylierung der um ein C-Atom kettenverkürzte Aldehyd gebildet wird.

Einige Jahre später hat man mit Extrakten aus Erbsenblättern nachgewiesen, dass Fettsäuren durch das α -Oxidationssystem nicht nur zu Kohlendioxid und dem entsprechenden kettenverkürzten Aldehyd abgebaut werden, sondern auch eine (*R*)-2-Hydroxysäure gebildet wird (Hitchcock und James 1964^{a,b}; Hitchcock *et al.*, 1968^b; Hitchcock und Rose, 1971). Unter der Annahme, es würden bei der α -Oxidation von Palmitinsäure beide Enantiomere der 2-Hydroxypalmitinsäure gebildet, und unter Berücksichtigung der Beobachtung, dass die α -Oxidation von (*R*)-[³H]-Palmitinsäure nicht zur Bildung von tritiummarkiertem Pentadecanal führt, wurde von Hitchcock und

Mitarbeitern postuliert, dass ein Abbau der Enantiomere der 2-Hydroxysäure auf unterschiedlichen Wegen erfolgt. Man nahm an, das (*R*)-Enantiomer werde langsam zu Kohlendioxid und Pentadecanal abgebaut (Weg A) (Abb. 2-1), das (*S*)-Enantiomer dagegen sehr schnell zu Pentadecansäure und Kohlendioxid (Weg B) (Hitchcock *et al.*, 1968^a; Morris und Hitchcock, 1968; Hitchcock und Morris, 1970).

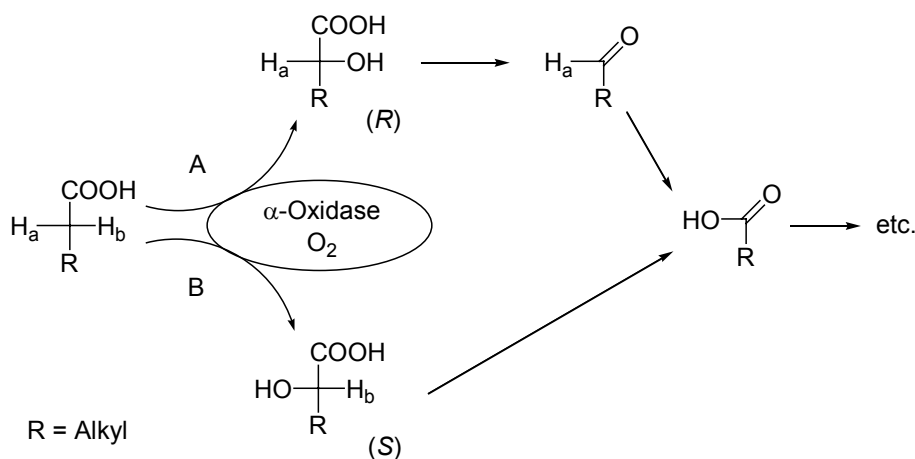


Abb. 2-1: Mechanismus der α -Oxidation, Postulat nach Hitchcock *et al.* (1968^a), Morris und Hitchcock (1968) und Hitchcock und Morris (1970).

Umfangreiche Studien belegten dann 1974, dass 2-Hydroxysäuren nicht als Intermediat der α -Oxidation von Fettsäuren in Erbsenblättern und Erdnüssen auftreten (Shine und Stumpf, 1974). Daraufhin hat man einen α -Oxidationsmechanismus postuliert, bei dem – Flavoprotein-katalysiert – eine instabile α -Hydroperoxyfettsäure als Zwischenprodukt der α -Oxidation auftritt. Die 2-Hydroperoxyfettsäure zerfällt nicht-enzymatisch in den kettenverkürzten Aldehyd und CO_2 oder wird zur (*R*)-2-Hydroxysäure reduziert (Abb. 2-2). Hierbei soll ein durch eine reaktive Sauerstoffspezies aktiviertes Flavoprotein ($\text{XH}\bullet$) ein Wasserstoffatom vom α -Kohlenstoffatom der Fettsäure abstrahieren, welche dann als freies Radikal zurückbleibt. Anschließend soll die reduzierte und mit molekularem Sauerstoff oxygenierte Form des Flavoproteins mit dem Radikal der Fettsäure unter Bildung einer α -Hydroperoxyfettsäure reagieren, wobei die oxidierte Form des Flavoproteins regeneriert wird. Es wurde angenommen, dass die H_2O_2 -generierenden Enzymsysteme, wie z.B. Glykolatoxidase/Glykolat, Glucoseoxidase/Glucose und L-Aminosäureoxidase/Leucin, die man in vorangegangenen Arbeiten für das α -Oxidationssystem in Erdnüssen als notwendig erachtet hatte (Stumpf, 1956), nicht der Bereitstellung von Wasserstoffperoxid als Oxidans dienen, sondern zur Aktivierung der α -Oxidation in pflanzlichen Geweben (Shine und Stumpf, 1974). Der bei der Decarboxylierung der 2-Hydroperoxyfettsäure

gebildete kettenverkürzte Aldehyd kann durch eine NAD^+ -abhängige Aldehyddehydrogenase zu der entsprechenden kettenverkürzten Fettsäure oxidiert werden. Diese kann dann wiederum als Substrat für einen weiteren Zyklus der α -Oxidation dienen.

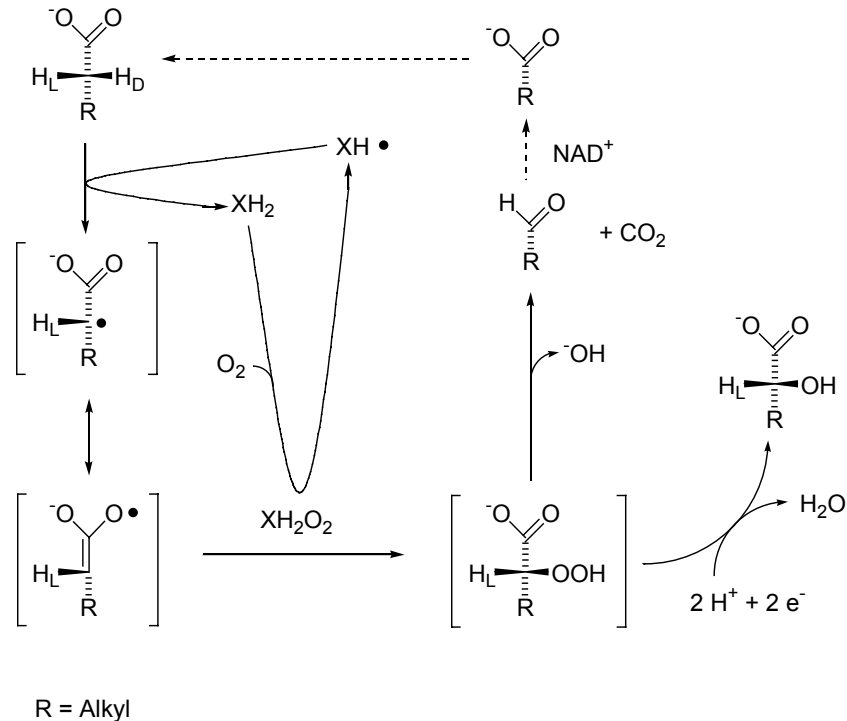


Abb. 2-2: Mechanismus der α -Oxidation, Postulat nach Shine und Stumpf (1974).

In nachfolgenden Studien wurde dieses Postulat bestätigt. Es konnte gezeigt werden, dass die Bildung des kettenverkürzten Aldehyds im Dunkeln zu photochemischen Prozessen führt (Salim-Hanna *et al.*, 1987; Campa *et al.*, 1989). Ein hypothetisches α -Peroxy lacton, das durch eine intramolekulare Ringschluss-Reaktion aus der α -Hydroperoxyfettsäure hervorgeht, tritt durch CIEEL-Prozesse (*chemical initiated electron exchange luminescence*) unter natürlichen Bedingungen mit Chlorophyll (Chl) in Wechselwirkung (Abb. 2-3) (Schuster, 1979; Schmidt und Schuster, 1980). Dabei wird Chlorophyll durch Übertragung elektronischer Energie angeregt, die Produkte der α -Oxidation liegen anschließend im Grundzustand vor.

Bei der Inkubation von Proteinrohextrakten aus keimenden Erbsen mit Fettsäuren unter reduktiven Bedingungen in Gegenwart von Zinnchlorid wurden primär enantiomerenrein (*R*)-2-Hydroxy-säuren gebildet (Adam *et al.*, 1998). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass bei der α -Oxidation von Fettsäuren 2-Hydroperoxyfettsäuren als Intermediat gebildet werden.

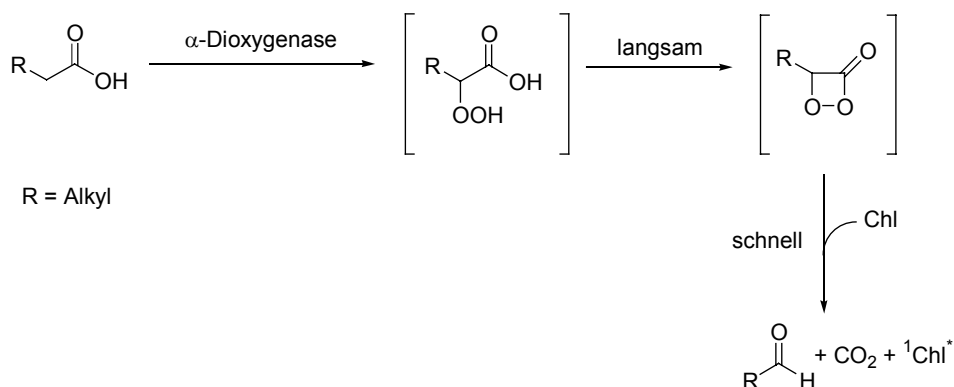


Abb. 2-3: Wechselwirkung zwischen einem Fettsäure-Peroxylacton und Chlorophyll über einen CIEEL-Mechanismus, Postulat nach Salim-Hanna *et al.* (1987) und Campa *et al.* (1989).

Anhand von Studien zur Stereoselektivität der α -Oxidation in Pflanzen ist belegt, dass sowohl die initiale Abstraktion des Wasserstoffatoms als auch die Anlagerung von molekularem Sauerstoff stereoselektiv erfolgen. Durch Umsetzungen von markierter 2-(S)-[^3H]- und 2-(R)-[^3H]-Palmitinsäure mit Enzymextrakten aus Erdnüssen und Erbsenblättern hat man gezeigt, dass das H^R -Wasserstoffatom von Palmitinsäure selektiv abstrahiert wird (Abb. 2-4) (Morris und Hitchcock, 1968; Salim-Hanna *et al.*, 1987). Auch die Anlagerung von molekularem Sauerstoff erfolgt stereoselektiv: nachgewiesen wurde ausschließlich das (R)-Enantiomer der 2-Hydroxysäure (Markovetz *et al.*, 1972; Shine und Stumpf, 1974; Adam *et al.*, 1998).

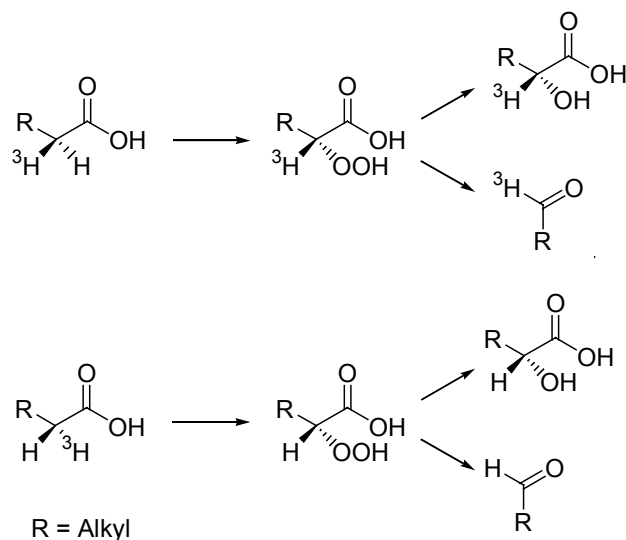


Abb. 2-4: Stereoselektive Abstraktion des H^R -Wasserstoffatoms bei der α -Oxidation.

Der direkte Nachweis einer α -Hydroperoxyfettsäure als Intermediat der α -Oxidation gelang 1999 nach Umsetzung von Palmitinsäure mit einem Homogenat aus grünen Meeresalgen (Akakabe *et al.*, 1999). Die labile Zwischenstufe hat man durch Derivatisierung mit Anthryldiazomethan (ADAM) *in situ* in den entsprechenden stabilen Anthrylester überführt und durch Vergleich mit der authentischen Referenzverbindung nachgewiesen. Die enantioselektive Bildung von (*R*)-2-Hydroperoxypalmitinsäure wurde belegt.

Eine rekombinante pathogen-induzierbare Oxygenase aus Tabak (PIOX, später umbenannt in α -DOX) und das in der Aminosäuresequenz homologe Protein aus *Arabidopsis thaliana* katalysierten ebenfalls die α -Dioxygenierung von langkettigen Fettsäuren (Hamberg *et al.*, 1999). Die Produktverteilung entsprach dabei dem Postulat von Shine und Stumpf (1974). Bei einer Umsetzungstemperatur von 0 °C gelang es, die entsprechenden 2-Hydroperoxysäuren als Methylester nachzuweisen. Mit einem Enzymextrakt aus Gurken wurden die gleichen Ergebnisse erzielt. Mit Inkubationen, die man unter Anwesenheit von $^{18}\text{O}_2$ -Gas durchgeführt hat, wurde nachgewiesen, dass $^{18}\text{O}_2$ wie erwartet in das Substrat inkorporiert wird und so mit je zwei Atomen ^{18}O markierte Hydroperoxyfettsäuren gebildet werden (Hamberg *et al.*, 1999). Ebenfalls nachgewiesen hat man die enantioselektive Bildung der (*R*)-2-Hydroperoxyfettsäure und (*R*)-2-Hydroxysäure (Hamberg *et al.*, 1999). Durch Umsetzungen von 2-(*S*)-[^2H]-Linolensäure mit den α -Dioxygenasen aus *Arabidopsis* und Gurken wurde erneut gezeigt, dass α -Dioxygenasen stereoselektiv das *pro(R)*-Wasserstoffatom in 2-Position des Fettsäuresubstrats abspalten (Hamberg *et al.*, 2002^b).

Saffert und Mitarbeiter (2000) konnten bei Umsetzung von Palmitinsäure mit gereinigter α -Dioxygenase aus keimenden Erbsen ebenfalls die Bildung von α -Hydroperoxypalmitinsäure nachweisen. Auch mit Präparationen einer in *E. coli* überexprimierten α -Dioxygenase aus Reis erfolgte die intermediäre Bildung von 2-Hydroperoxyfettsäuren, die dann spontan zu den entsprechenden um ein C-Atom kettenverkürzten Aldehyden decarboxylierten (Koeduka *et al.*, 2002).

So ergibt sich für die α -Oxidation von langkettigen Fettsäuren in Pflanzen ein Reaktionsweg, wie er in Abb. 2-5 zusammengefasst ist.

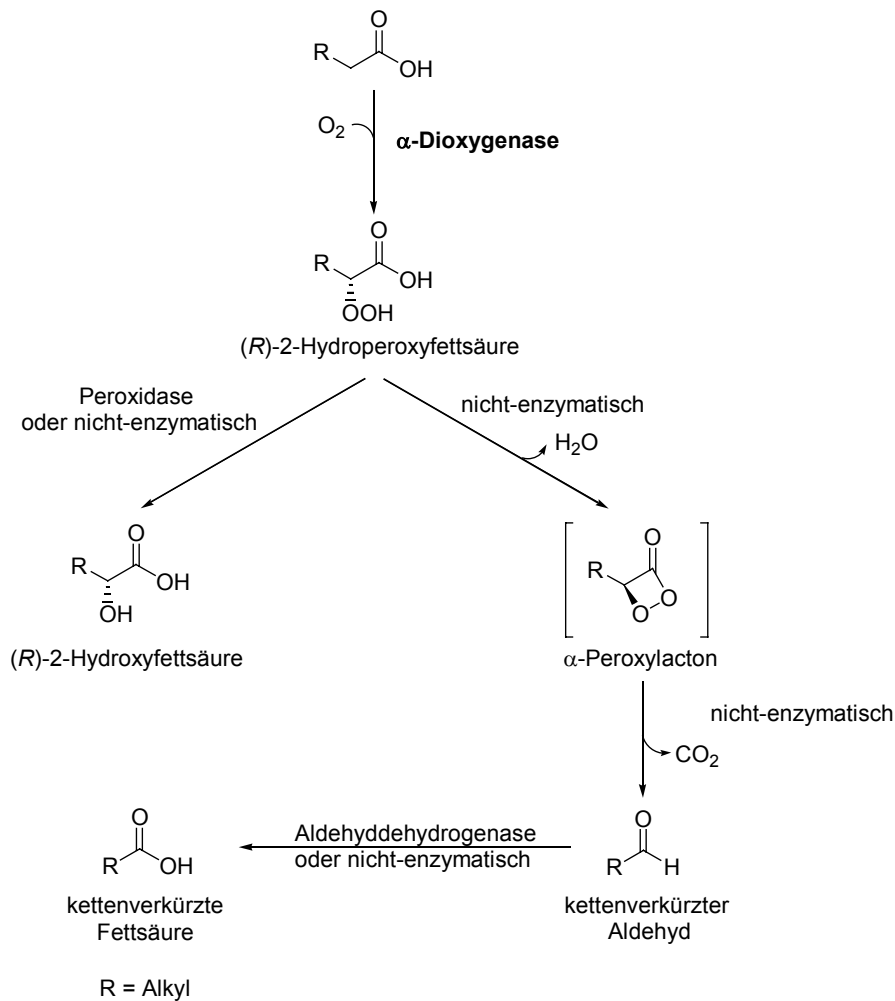


Abb. 2-5: α -Dioxygenierung von Fettsäuren in Pflanzen und Folgeprodukte der (*R*)-2-Hydroperoxyfettsäure.

2.1.3 Substratspezifität

Als Substrate für die α -Oxidation in Pflanzen dienen die freien gesättigten Fettsäuren der Kettenlängen von C₁₂ bis C₁₆ sowie die ungesättigten C₁₈-Fettsäuren Öl-, Linol-, und Linolensäure (Markovetz und Stumpf, 1972; Shine und Stumpf, 1974; Galliard und Matthew, 1976; Hamberg *et al.*, 1999; Saffert, 2001).

Mit einer partiell aufgereinigten α -Dioxygenase aus Gurken wurden auch Thiafettsäuren (Tetradecylthioessigsäure und Tetradecylthiopropionsäure) unter Abspaltung von Kohlendioxid zu den entsprechenden kettenverkürzten Aldehyden umgesetzt (Andersen Borge *et al.*, 1998).

Mit Enzymextrakten aus Erbsenblättern wurden von Adam *et al.* (1998) umfangreiche Studien zur Substratazeptanz des α -Oxidationssystems durchgeführt. Hierbei wurden gesättigte Fettsäuren mit 12 bis 16 Kohlenstoffatomen sowie ungesättigte Fettsäuren und Carbonsäuren mit Heteroatomen,

wie Sauerstoff oder Schwefel, mit absoluter (*R*)-Enantioselektivität zu den entsprechenden α -Hydroxysäuren umgesetzt (Lazarus, 1998). Für die enzymatische Umsetzung des Fettsäuresubstrats war ein Abstand von mindestens drei oder mehr Kohlenstoffatomen zwischen einer Doppel- oder Dreifachbindung oder einem Heteroatom und der Carboxylfunktion notwendig. Substrate ohne signifikanten hydrophoben Rest, wie kurzkettige Carbon- oder Dicarbonsäuren, wurden nicht umgesetzt (Adam *et al.*, 1998; Lazarus, 1998).

2.1.4 Synthetisches Potential

Optisch aktive 2-Hydroxysäuren stellen wichtige Bausteine in der asymmetrischen Synthese dar, da sie leicht racemisierungsfrei überführt werden können in Diole (Prolog *et al.*, 1954), Epoxide (Mori *et al.*, 1979), α -Halosäureester (Lee und Downie, 1967) und α -Aminosäuren (Marvel, 1955). Durch Verwendung dieser optisch aktiven Moleküle als Zwischenstufen oder chirale Auxiliare können wichtige Naturstoffe synthetisiert werden, wie Pheromone (Mori *et al.*, 1979), Sphingolipide (Sugai und Ohta, 1991) und Prostaglandine (Weinges *et al.*, 1983; Orito *et al.*, 1989).

In umfangreichen Studien hat Lazarus (1998) belegt, dass das α -Oxidationssystem aus Erbsen ein effizientes System zur präparativen Gewinnung optisch aktiver 2-Hydroxysäuren darstellt.

2.1.5 α -Dioxygenasen aus Pflanzen

2.1.5.1 Lokalisierung und Struktur

In der Literatur finden sich unterschiedliche Informationen über die Lokalisation des für die α -Oxidation verantwortlichen Enzymsystems. Die vermutlich membrangebundenen Enzyme werden je nach betrachteter Pflanzenart mit unterschiedlichen Bestandteilen der Zelle in Verbindung gebracht, wie z.B. dem endoplasmatischen Retikulum oder den Mitochondrien (Galliard und Matthew, 1976; Salim-Hanna *et al.*, 1987). Für Gurken und Rizinussamen haben mehrere Arbeitsgruppen ein entsprechendes Enzymsystem in der mitochondrialen Fraktion nachgewiesen (Hitchcock und James, 1966; Baardseth *et al.*, 1987), in den Kotyledonen keimender Erdnüsse dagegen sowohl in der mitochondrialen als auch in der microsomalen und der cytosolischen Fraktion (Martin und Stumpf, 1959). In Kartoffeln (Wu und Laties, 1983) und Erbsenblättern (Shine und Stumpf, 1974) wird die microsomale Fraktion diskutiert, in keimenden Erbsen die microsomale und lösliche Fraktion (Saffert, 2001).

Über die mögliche Struktur und den Aufbau der α -Dioxygenase aus Pflanzen existierten lange Zeit keine Angaben. Der Einfluss von Effektoren auf die Enzyme ließ lediglich Vermutungen zu.

Während zunächst von der Beteiligung eines Flavoprotein-katalysierten Peroxidasesystems in Erbsenblättern und Erdnüssen ausgegangen worden war (Markovetz und Stumpf, 1972; Shine und Stumpf, 1974) (vgl. 2.1.2), wiesen die Ergebnisse von Inhibierungsversuchen des α -Oxidationssystems in Gurken auf die Beteiligung eines Metalloproteins hin (Galliard und Matthew, 1976; Baardseth *et al.*, 1987). Versuche zum Einfluss von Effektoren auf die aus keimenden Erbsen aufgereinigte α -Dioxygenase ließen ebenfalls auf eine Metalloproteinstruktur schließen. So zeigten z.B. EDTA sowie Imidazol inhibierende Wirkung (Saffert, 2001). Cofaktoren sind für die enzymatische Aktivität von α -Dioxygenasen nicht erforderlich.

Mit der Anreicherung einer α -Oxidase aus Gurken war erstmals eine oligomere Struktur für das die α -Oxidation katalysierende Enzym nachgewiesen worden. Das Molekulargewicht des nativen Enzyms wurde mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) zu 240 kD bestimmt, für die Hauptuntereinheit wurde ein Molekulargewicht von 40 kD bestimmt (Andersen Borge *et al.*, 1997).

Das Molekulargewicht einer bis zur einheitlichen Form gereinigten α -Dioxygenase aus keimenden Erbsen wurde mittels GPC und nicht-denaturierender Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) zu ca. 240 kD bestimmt. Auch hier wurde eine oligomere Struktur des Enzyms nachgewiesen: mittels denaturierender SDS (*Sodium dodecyl sulfate*)-PAGE hat man als Untereinheit ein 70 kD-Protein ermittelt (Saffert *et al.*, 2000). Weiterhin wurde qualitativ eine Glykosylierung der aus Erbsen aufgereinigten α -Dioxygenase nachgewiesen (Saffert, 2001).

Die Entdeckung und Klonierung einer pathogen-induzierbaren Oxygenase (PIOX, später umbenannt in α -DOX) mit α -Dioxygenase-Eigenschaften aus Tabak ermöglichten schließlich weitere Aussagen anhand der Aminosäuresequenz (Sanz *et al.*, 1998) (vgl. 2.1.5.2 und 2.2.2).

2.1.5.2 Aminosäuresequenzen und Sequenzhomologie

Die Enzyme, die den Initialschritt der α -Oxidation, nämlich die stereoselektive Bildung der (*R*)-2-Hydroperoxyfettsäure, katalysieren, wurden erst vor wenigen Jahren näher charakterisiert.

1998 beschrieben Sanz *et al.* eine pathogen-induzierbare Oxygenase (PIOX, später umbenannt in α -DOX) aus Tabakblättern (*Nicotiana tabacum*) und das homologe Enzym aus *Arabidopsis thaliana* (α -DOX1). Der initiierte Zelltod durch Injektion des sogenannten harpin-Proteins HrpN (*hypersensitive response and pathogenicity*) aus *Erwinia amylovora* (Wei *et al.*, 1992) sowie die Behandlung der Tabakpflanzen mit Salicylsäure und Jasmonsäure – beide leiten als Signalmoleküle pflanzliche Abwehrreaktionen gegen pathogenen Befall ein (Chen *et al.*, 1995, Farmer und Ryan, 1990) – bewirkten in Tabakblättern die Akkumulation eines 73 kD-Proteins. Dieses Tabakprotein und das in der Aminosäuresequenz homologe *Arabidopsis*-Protein katalysierten die Oxygenierung

von mehrfach ungesättigten C₁₈-Fettsäuren. Es wurde enantioselektiv die (*R*)-2-Hydroperoxyfettsäure gebildet, die dann zu den typischen α -Oxidationsprodukten zerfiel (vgl. 2.1.2). Bei diesen Enzymen, die den Initialschritt der α -Oxidation in Pflanzen katalysieren, handelte es sich um eine neue, bisher nicht charakterisierte Klasse von α -Dioxygenasen (Hamberg *et al.*, 1999).

Das Vorkommen von α -Dioxygenasen wurde mittlerweile für verschiedene andere höhere Pflanzen beschrieben: *Nicotiana attenuata* (Hermsmeier *et al.*, 2001), *Lycopersicon esculentum* (Wei *et al.*, 2000), *Oryza sativa* (Koeduka *et al.*, 2000), *Capsicum annum* (Kim *et al.*, 2002) und *Citrus clementina* \times *Citrus reticulata* (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003).

Pis pep	1	MWSIVTDPDKDLISKVVXN-----TILDAFLFFIVHSIDKLGIXHRLPVDFGLL-----	49
Nt DOX	1	M-SLVVDSIKNLLSPLRGFIHKDLHDTEERMILLSKLFLFVHLDKLNLWHRLPVLLGLLYLGARRHLHQEYNLINVGKTPHGVRSNP	89
At DOX1	1	M-KVITSLISSILL---KFIHKDHEIYARMSLLDRFLLLIVHGVDKMVPWHKLVFVFLGLTYLEVRRHLHQYNLLNVGQTEFGIREDF	85
Os DOX	1	MG-----SGLFK---PRVHPDLRDVFSKMSFFDKIGFLFIHAFDRKRLNWHKVPVPIGLLYLNTRRITLERYNLLAVGRSSHGALFDP	79
Pis pep	49	-----VVKKLLMR-----	63
Nt DOX	90	ADHPYRTADGKYNDPFNEGAGSELFFF-GRNMLPVDQHNOLKPKDPMVVATKLLARRNFVDTGKQFNMAASWIQFMIHDWIDHLEDTKQ	178
At DOX1	86	ANPYRTADGKYNDPFNEGAGSELFFF-GRNCPVVDQSKLRPDPMVVATKLLCRKRFIDTGKQFNMAASWIQFMIHDWIDHLEDTKQ	174
Os DOX	80	KEELYRTADGKYNDPFNABGKPKHLFWGETWSRLINRNLMSPPDFVAVATKLLARREYKDTGKQFNMAASWIQFMIHDWIDHLEDTKQ	169
Pis pep	64	VELSAPSEVASQCPL-----	78
Nt DOX	179	IELKAAEEVASQCPLKSRFRFKTKENPTGFMEIKTGHNTNRPWWDGSAIYGSNAEVLKRVTEKDGKLIKLSAD-GLLEIDKNGKIIISGD	267
At DOX1	175	IELVAPKEVASQCPLSSFRFLKTKVPTGFEIKTGSNIRTPWWDSSVIYGSNSKTDVVRTYKDGKLIKISEETGLLLHDEDGLAISGD	264
Os DOX	170	IGITAPKEVANECPKSEKPHPTKELPTNSDGIKIKGHYNIPTAWWDGSAVYGNBERAEKRTYVDGKLVIGDD-GLLLHKENGVALISGD	258
Pis pep	78	-----RANWYGLLGK-----	88
Nt DOX	268	VRNWAGLSALQALFYQEHNSVCDALKREYFLEDEEDLYRHRARLVTSAVIAKVHTIDWTVVLLKTDTLLAGMRANWYGLLGKPKDFGFH	357
At DOX1	265	IRNSWAGVSALQALFYKEHNAVCDALKDEDDLEDEEDLYRYARLVTSAVIAKHHTIDWTVVLLKTDTLLAGMRANWYGLLGKPKDFGFH	354
Os DOX	259	IRNSWAGVSLQALFVKEHNAVCDALKREYFLEDEEDLYRYAKLVTSAVIAKVHTIDWTVVLLKTDTLLAGMRANWYGLLGKPKDFGFH	348
Pis pep	88	-----KQDENXGVVY-----	123
Nt DOX	358	VGGSIILGGVYGMKPKPENYGVVPSLTFEFTSVYRMHQLLDPKIQLRNIDATPGPNKSLPLTNEIPLLEDLIGKGEKNLSKIGFTKQMVSMG	447
At DOX1	355	AGSSIILGGVYGMKPKPNHGVVPSLTFEFTSVYRMHSLLPDQDHIIDDDVPGANKSLPLIQEISMRLIGKGEETSHIGFTKRLVSMG	444
Os DOX	349	IGGPILGGVYGMKPKNNHGVVPSLTFEFTSVYRMHSLPSTLKLDRPTGQDANNSPFCLEDIDIGEMIGLKGEELSKIGFTKQALSMG	438
Pis pep	124	HQACGALELWNYPSWLRNLVPHNIDGT-----	150
Nt DOX	448	HQACGALELWNYPVWRDLIPQDVCGTDRPDHIDLAALEIYRDRERSVPRYNEFRRCMLQIPISKWEDLTDDEEIVNIFLGEVYGDVVEEL	537
At DOX1	445	HQACGALELWNYPVWLRDLVPHDPNGQARPDHIDLAALEIYRDRERSVPRYNEFRRSMMFPIPKWEDLTDDEEAIEVLDVYGDVVEEL	534
Os DOX	439	YQACGALELWNYPSFRNLIQNDGDTNRSDRIDLAALEIYRDRERSVPRYNEFRRRIFLIPIKSWEDLTDKDAIETIRAIYGDVVEEL	528
Pis pep	150	-----AEKKIKGFAISETAFKIFLIMASRRLEADRFFTSN-----	185
Nt DOX	538	DLVVGMAAEKKIKGFAISETAFKIFLIMASRRLEADRFFTSNNEETYTKKGLEWVNTTESLKDVIDRHYPEITAKWMNSSSAFVWVSDT	627
At DOX1	535	DLVVGMAAEKKIKGFAISETAFKIFLIMASRRLEADRFFTSNNEETYTKKGLEWVNTTESLKDVIDRHYPEITAKWMNSSSAFVWVSDP	624
Os DOX	529	DLVVGMAAEKKIKGFAISETAFKIFLIMASRRLEADRFFTSNNEETYTKKGMQVVRKTEGLRDVINRHYPEITAKWMNSSSAFVWVWDAD	618
Pis pep	185	-----	185
Nt DOX	628	PPPHNPIPLYLRWPPQ	643
At DOX1	625	PLTKNPIPLYLRHPS-	639
Os DOX	619	Y-----	619

Abb. 2-6: Aminosäuresequenz-Alignment von α -Dioxygenasen aus *Nicotiana tabacum* (Nt) (GenBank Accession Nr.: AJ007630), *Arabidopsis thaliana* (At) (GenBank Accession Nr.: AF334402), *Oryza sativa* (Os) (GenBank Accession Nr.: AAF64042) und Peptidsequenzen der aufgereinigten α -Dioxygenase aus *Pisum sativum* (Ps). Aminosäuren, die nicht identifiziert werden konnten, sind durch X ersetzt. Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche grau hinterlegt.

Alle pflanzlichen α -Dioxygenasen zeigen ein hohes Maß an Übereinstimmung hinsichtlich der Aminosäuresequenz. Die partiellen Aminosäuresequenzen der 70 kD-Untereinheit der aus Erbsenkeimlingen aufgereinigten α -Dioxygenase zeigen ebenfalls signifikante Homologie zu den

α -Dioxygenasen aus anderen höheren Pflanzen (Saffert *et al.*, 2000; Saffert, 2001). Ein Aminosäuresequenz-Alignment ausgewählter α -Dioxygenase-Sequenzen ist in Abb. 2-6 dargestellt.

Ein geringeres Maß an Übereinstimmung hinsichtlich der Aminosäuresequenz ist mit zwei weiteren Pflanzenproteinen festzustellen. Es handelt sich hier um das FEEBLY-Protein, codiert durch das *feebly*-Gen in Tomaten (van der Biezen *et al.*, 1996), sowie um ein *Arabidopsis*-Protein, codiert durch den EST-Klon M22F11STM (GenBank Accession Nr.: BE521939), welches als α -DOX2 bezeichnet wird (Hamberg *et al.*, 2002^a).

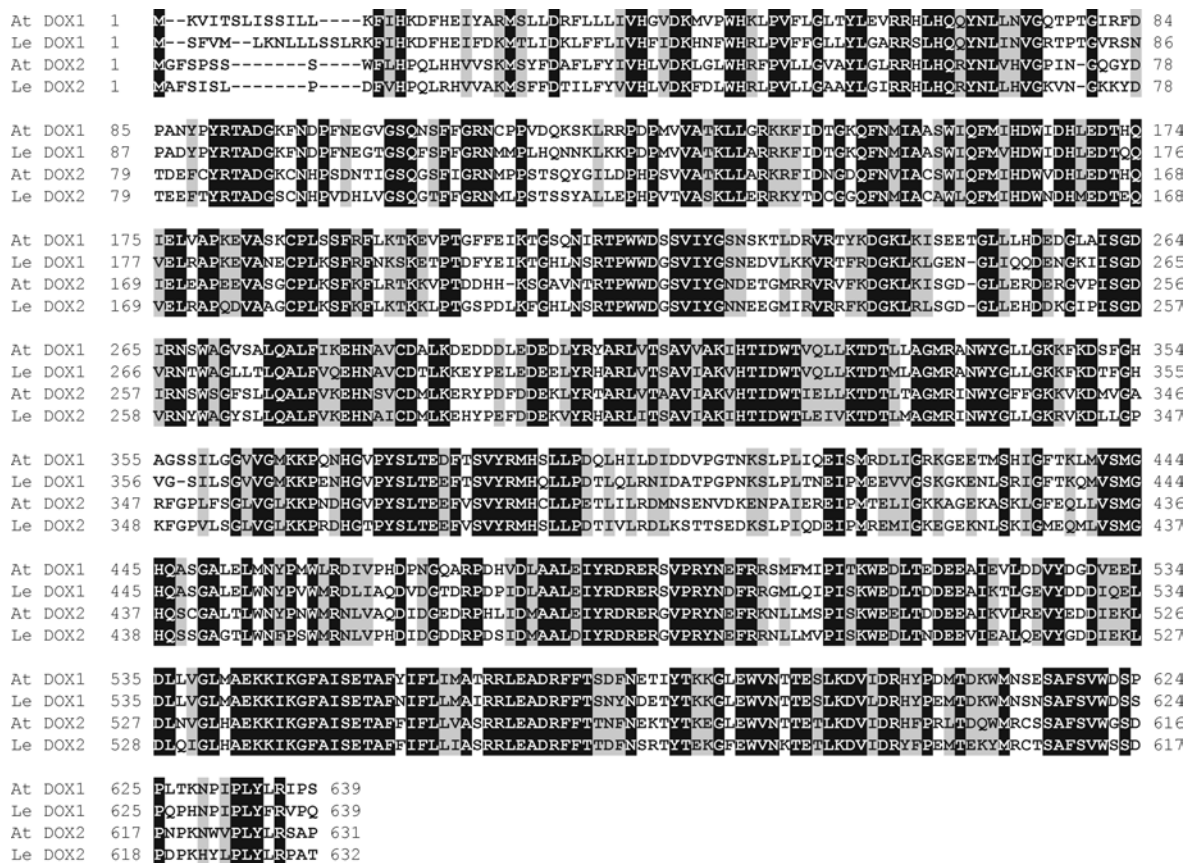


Abb. 2-7: Aminosäuresequenz-Alignment von α -DOX1 aus *Arabidopsis thaliana* (At) (GenBank Accession Nr.: AF334402) und *Lycopersicon esculentum* (Le) (GenBank Accession Nr.: AY344539) mit α -DOX2 aus *Arabidopsis thaliana* (At) (GenBank Accession Nr.: AAG52078) und *Lycopersicon esculentum* (Le) (GenBank Accession Nr.: BK001477). Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche grau hinterlegt.

Interessanterweise weisen das Protein aus Tomaten und das aus *Arabidopsis* höhere Homologie zueinander auf (73% identische Aminosäuren) als im Vergleich mit dem entsprechenden α -DOX1-Protein aus der jeweiligen Pflanze (jeweils nur 61% identische Aminosäuren) (Abb. 2-7).

Es könnte sich bei diesen beiden Proteinen um weitere α -Dioxygenase-Isoenzyme handeln. Funktionelle Analysen zum Nachweis der Dioxygenierung von Fettsäuresubstraten durch α -DOX2

stehen allerdings noch aus (Hamberg *et al.*, 2002^a). Die Ergebnisse aus Studien mit transgenen Tabakpflanzen lieferten einen weiteren Hinweis darauf, dass in Pflanzen mehrere α -Dioxygenase-Isoformen vorhanden sind: in Pflanzen, bei denen die Expression der α -DOX unterdrückt worden war, wurden nach wie vor eine niedrige α -Dioxygenase-Aktivität sowie geringe Mengen der α -Oxidations-Produkte 2-Hydroxylinolensäure und 8(Z),11(Z),14(Z)-Heptadecatriensäure nachgewiesen (Hamberg *et al.*, 2002^a). Für Tomaten hat man kürzlich die Existenz von zumindest drei unterschiedlichen α -Dioxygenase-Isoformen beschrieben (Tirajoh *et al.*, 2005).

Die Familie der α -Dioxygenasen ist neben Lipoxygenasen (LOX) und Prostaglandin Endoperoxid H Synthasen (PGHS) die dritte bekannte Gruppe von Enzymen, die eine Dioxygenierung von Fettsäuren katalysieren. Das Vorkommen von Lipoxygenasen ist sowohl für Pflanzen als auch für Säugetiere beschrieben. Für PGHS aus Säugetieren hingegen wurde bisher kein Äquivalent in Pflanzen charakterisiert. Interessanterweise zeigt die Tabak-PIOX (α -DOX aus Tabak) in der Aminosäuresequenz signifikante Homologie zu den tierischen Prostaglandin H Synthasen (PGHS)-1 und -2 (Sanz *et al.*, 1998). Weitere Ausführungen hierzu siehe Abschnitt 2.2.2.

2.2 α -Dioxygenasen und Prostaglandin H Synthesen

2.2.1 Bedeutung, Struktur und Katalyse von PGHS

Prostaglandin Endoperoxid H Synthesen katalysieren in Säugetieren die Konversion von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Arachidonsäure) zu Prostanoiden (Smith *et al.*, 2000; Smith und Song, 2002). Die Produkte des PGHS-katalysierten Arachidonsäure-Metabolismus spielen als hochwirksame Mediatoren bei Apoptose, Angiogenese, Atmung, Schmerz, Angst und Entzündungsprozessen sowie Fieber eine entscheidende Rolle (Smith *et al.*, 2000; Garavito *et al.*, 2002).

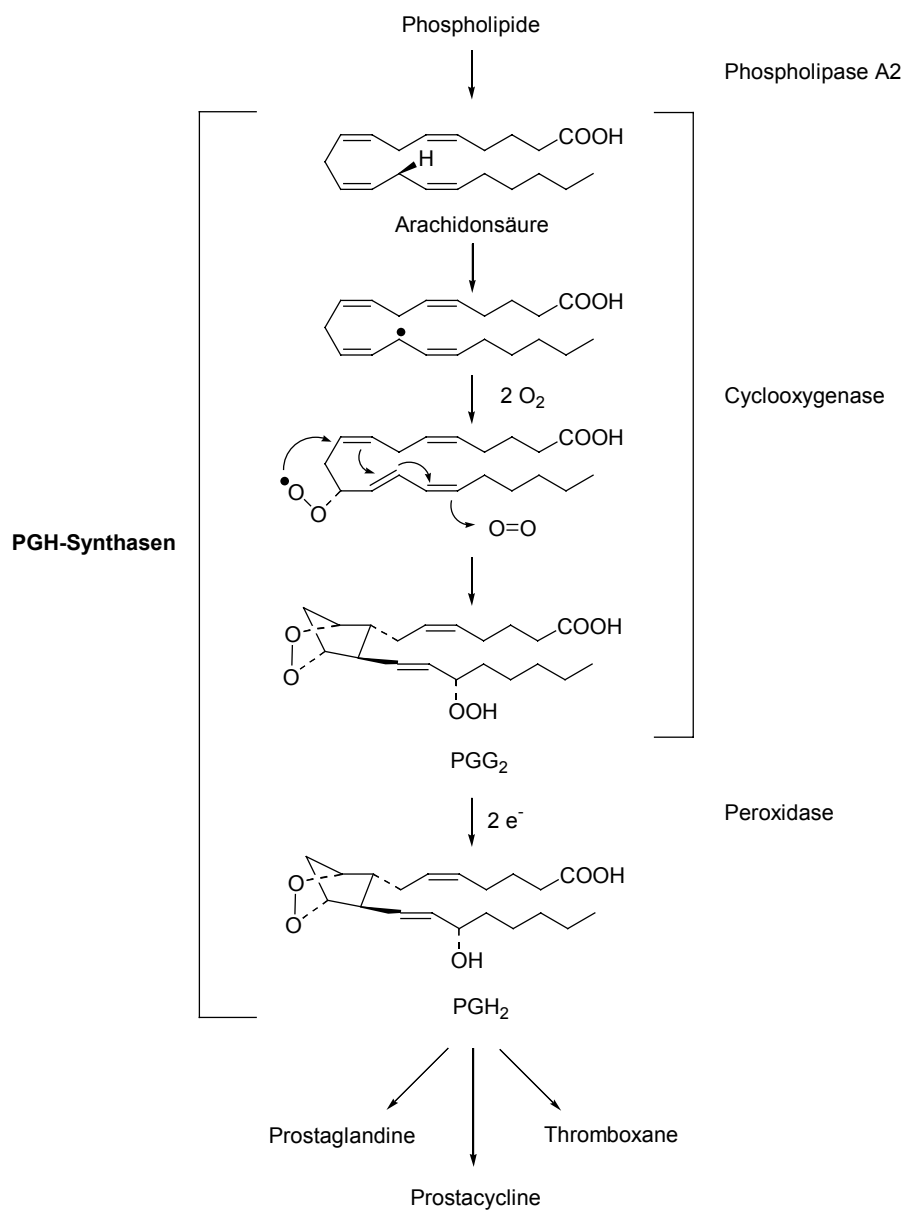


Abb. 2-8: Biosynthese von Prostaglandin H₂, modifiziert nach Smith und Song (2002).

Prostaglandin Endoperoxid H Synthasen katalysieren den Initialschritt der Biosynthese von Prostaglandinen, Prostacyclinen und Thromboxanen aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren: die Bildung von Prostaglandin H₂ (Smith und Song, 2002). Das wichtigste Substrat dieser Reaktion ist Arachidonsäure. Diese liegt als Bestandteil der Phospholipide gebunden im Organismus vor und wird durch Phospholipase A2 freigesetzt. Durch die Einführung von zwei Molekülen Sauerstoff in die freie Fettsäure durch die Cyclooxygenase (COX)-Aktivität von PGHS entsteht ein 15-Hydroperoxy-9,11-endoperoxid (PGG₂, Prostaglandin G₂) (Abb. 2-8). Gleichzeitig katalysiert COX den Ringschluss zur Bildung des charakteristischen Prostanoidfünfringes. PGHS katalysieren neben dieser Cyclooxygenase-Reaktion zusätzlich eine Peroxidase (POX)-Reaktion, in deren Verlauf das Produkt PGG₂ zum 15-Hydroxid (PGH₂, Prostaglandin H₂) reduziert wird.

Im Säugetier-Organismus existieren zwei Isoformen von PGHS. Die Isoenzyme PGHS-1 und -2 unterscheiden sich u.a. in Bezug auf ihre Expressionsmuster: PGHS-1 wird in den meisten Geweben gleichbleibend exprimiert, vermutlich um einen Mindestbedarf an Prostanoiden zu decken, PGHS-2 hingegen ist die induzierbare Form der PGHS (in einigen Geweben wie Gehirn und Nieren wird PGHS-2 allerdings auch konstitutiv exprimiert). Die Expression von PGHS-2 wird z.B. durch Wachstumsfaktoren, Cytokine und bakterielle Endotoxine ausgelöst (Capdevila *et al.*, 1995; Kulmacz und Wang, 1995; Kulmacz, 1998).

Strukturell sind sich die beiden Isoenzyme sehr ähnlich (Picot *et al.*, 1994, Kurumbail *et al.*, 1996, Luong *et al.*, 1996). PGHS-1 und -2 sind Homo-Dimere (M_r 72 kD je Monomer), jede Untereinheit ist aus drei strukturell unterschiedlichen Domänen aufgebaut, nämlich einer kurzen N-terminalen EGF (*epidermal growth factor*)-Domäne, einer aus α -Helices gebildeten Membranbindungs-Domäne (MBD) sowie der C-terminalen katalytischen Domäne (etwa 80% des Proteins) (Kurumbail *et al.*, 2001). Die Monomere sind Hämeisen-haltige Glykoproteine mit je einer Häm-Gruppe pro Monomer. Es handelt sich um bifunktionale Enzyme mit räumlich getrennten, aber mechanistisch interagierenden Peroxidase- und Cyclooxygenase-Aktivitätszentren (Dietz *et al.*, 1988, Smith *et al.*, 1996). PGHS-1 und -2 sind monotopische Membranproteine, die über die hydrophobe Umgebung ihrer amphipatischen Helices am endoplasmatischen Retikulum bzw. an der Membran des Zellkerns verankert sind (Otto und Smith, 1994; Spencer *et al.*, 1999). In Abb. 2-9 ist die dreidimensionale Struktur eines Monomers wiedergegeben.

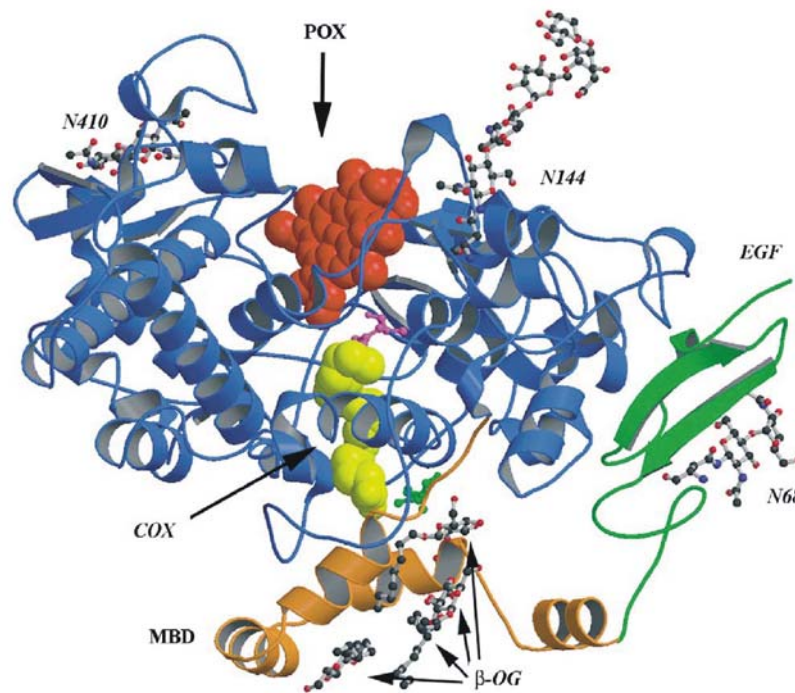


Abb. 2-9: Dreidimensionale Struktur eines PGHS-1 Monomers aus *Ovis aries* (entnommen aus Garavito *et al.*, 2002). Im COX-Aktivitätszentrum ist Arachidonsäure gebunden (gelb), das Peroxidase-Zentrum (POX) sowie N-Glykosylierungen sind ebenfalls gekennzeichnet. Die EGF-Domäne ist grün, die Membranbindungs-Domäne (MBD) braun und die katalytische Domäne blau dargestellt, die Häm-Gruppe ist rot eingefärbt.

PGHS-1 und PGHS-2 teilen etwa 60-65% identische Aminosäuren bei Vergleich der Enzyme sowohl aus der gleichen als auch aus unterschiedlichen Spezies. Für die Katalyse relevante Aminosäuren sind in beiden Isoformen konserviert. Hinsichtlich der Tertiärstruktur sind PGHS-1 und -2 nahezu identisch (Picot *et al.*, 1994; Kurumbail *et al.*, 1996; Luong *et al.*, 1996).

Die Erkenntnisse aus der klassischen Proteinchemie (Smith und DeWitt, 1996), ultraviolet-visuellen Spektroskopie (UV-Vis) (Lambeir *et al.*, 1985; Dietz *et al.*, 1988), elektronenparamagnetischen Resonanz (EPR)-Spektroskopie (Karthain *et al.*, 1988; DeGray *et al.*, 1992; Tsai *et al.*, 1992; Tsai *et al.*, 1994) und Röntgenstrukturanalytik (Picot *et al.*, 1994) lassen sich zu dem in Abb. 2-10 dargestellten Modell für das COX- und Peroxidase-Aktivitätszentrum von PGHS-1 zusammenfassen (Smith und Song, 2002). Die Nummerierung der Aminosäurereste orientiert sich im Folgenden an der Aminosäuresequenz von PGHS-1 aus *Ovis aries* (GenBank Accession Nr.: NM001009476). Der proximale Histidin-Rest His-388 ist als Ligand an der Bindung des Hämeisens beteiligt (Seibold *et al.*, 2000). Der nicht eisenbindende Histidin-Rest, das distale His-207, erleichtert die heterolytische Hydroperoxid-Spaltung, die zur Bildung des entsprechenden Alkohols führt sowie zur Oxidation des Hämeisens im Peroxidase-Aktivitätszentrum, der eigentlichen Aktivierung des ruhenden Enzyms (Landino *et al.*, 1997). Die

Peroxidase zeichnet sich durch geringe Substratspezifität aus, verschiedene Alkylhydroperoxide und auch hydrophile Peroxide wie Peroxynitrit werden akzeptiert (Landino *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 1999).

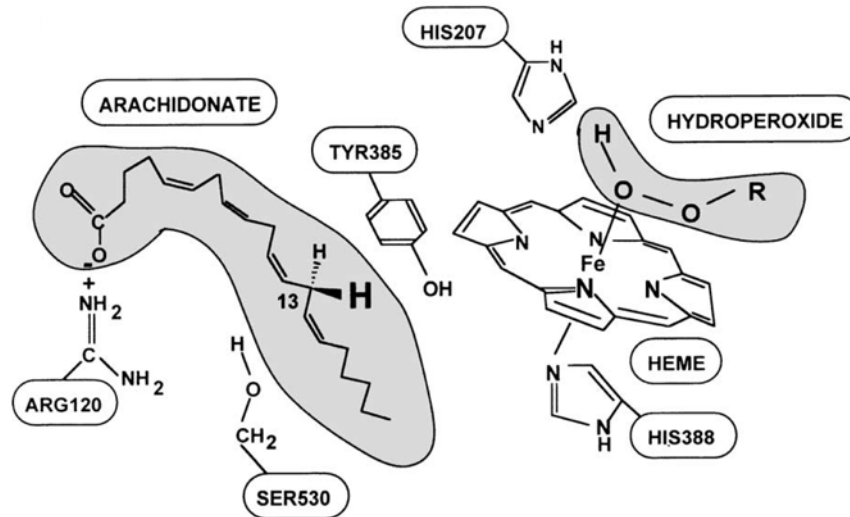


Abb. 2-10: Modell des aktiven Zentrums von PGHS-1 aus *Ovis aries* (entnommen aus Smith und Song, 2002).

Der Tyrosin-Rest Tyr-385 ist als intramolekularer Elektronendonator von großer Bedeutung für die COX-Reaktion. Das aus Tyr-385 gebildete Tyrosylradikal spaltet den 13-*pro(S)*-Wasserstoff von Arachidonsäure ab (Shimokawa *et al.*, 1990; Tsai *et al.*, 1995). Dieser Schritt leitet die initiale Reaktion der Prostaglandin-Biosynthese ein, die Einführung von zwei Sauerstoffmolekülen in das Arachidonsäureradikal (Dietz *et al.*, 1988; Koshkin und Dunford, 1999). Die Interaktion von Peroxidase und Cyclooxygenase zeigt Abb. 2-11. Der Bildung des Tyrosylradikals geht die Hydroperoxid-initiierte Oxidation der Häm-Gruppe im Peroxidase-Zentrum voraus. Diese 2-Elektronen-Oxidation führt zur Bildung des Intermediats I $\text{Fe(IV) = O [Porphyrin} \bullet]$ (Lambeir *et al.*, 1985; Dietz *et al.*, 1988). Aus Intermediat I wird wiederum durch Bildung des Tyrosylradikals aus dem Tyrosin-Rest Tyr-385 im Cyclooxygenase-Zentrum das Intermediat II gebildet (Karthein *et al.*, 1988).

PGG_2 muss, um zu PGH_2 reduziert zu werden, zum Peroxidase-Zentrum von PGHS migrieren. Durch Reduktion von PGG_2 können auch weitere PGHS-Moleküle aktiviert werden. Die Cyclooxygenase kann nach einmaliger Aktivierung eine Vielzahl von Cyclooxygenase-Reaktionen katalysieren, unabhängig von der Peroxidase-Reaktion. Sowohl die Peroxidase- als auch die Cyclooxygenase-Reaktion können durch Selbstinaktivierung zum Stillstand kommen. Auf welchen Reaktionen diese Inaktivierung beruht, ist bisher jedoch noch nicht eindeutig geklärt, es werden intramolekulare Vernetzungsreaktionen diskutiert (Smith und Song, 2002).

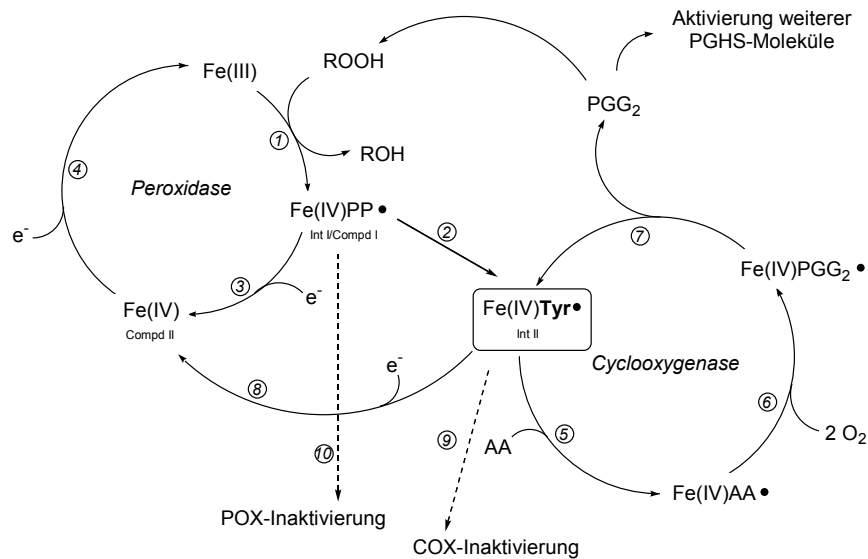


Abb. 2-11: Mechanismus von PGHS mit gekoppelter Peroxidase- und Cyclooxygenase-Reaktion, modifiziert nach Tsai *et al.* (2000). Die Schritte 1-8 basieren auf dem von Karthein *et al.* (1988) vorgeschlagenen Mechanismus, die Schritte 9 und 10 stellen die Selbstinaktivierung des Enzyms dar (R = Alkyl; AA = Arachidonsäure; PP = Protoporphyrin; Int = Intermediat; Compd = Compound).

Eine entscheidende Rolle für die Substratbindung spielt der Arginin-Rest Arg-120 (siehe Abb. 2-10) an der Öffnung des hydrophoben Kanals, der in das COX-Aktivitätszentrum von PGHS reicht. Bei PGHS-1 wird Arachidonsäure über die Guanidiniumgruppe von Arg-120 ionisch gebunden, daher die hohe Affinität von PGHS-1 gegenüber dem Substrat Arachidonsäure (Bhattacharyya *et al.*, 1996). PGHS-2 besitzt eine geringere Affinität zu Arachidonsäure; hier wird die Substratbindung lediglich über Wasserstoffbrückenbindung stabilisiert (Rieke *et al.*, 1999; Malkowski *et al.*, 2000). Durch PGHS-2 können neben freien Fettsäuren auch derivatisierte Fettsäuren umgesetzt werden, wie z.B. Anandamid (Arachidonsäureethanolamid) (Yu *et al.*, 1997) und 2-Arachidonsäureglycerid (Kozak *et al.*, 2000).

Die COX-Aktivität von PGHS stellt den Angriffspunkt von 2-Acetylsalicylsäure (Aspirin) und anderen nicht-steroiden entzündungshemmenden Medikamenten dar. Die Acetylierung des Serin-Restes Ser-530 durch Aspirin verhindert die Bindung von Arachidonsäure im aktiven Zentrum und führt zu irreversibler Inhibierung der COX-Aktivität (Loll *et al.*, 1995). Andere nicht-steroidale Verbindungen wie Flurbiprofen ($[\mu]$ -2-Fluor- α -methyl-4-biphenylessigsäure), Ibuprofen (α -Methyl-4-[isobutyl]phenylessigsäure) und Diclofenac (2-[(2,6-Dichlorphenyl)amino]phenylessigsäure) inhibieren die COX-Reaktion reversibel (Rome und Lands, 1977; Laneuville *et al.*, 1994; Picot *et al.*, 1994; Kurumbail *et al.*, 1996). Diese Substanzen treten mit ihren freien Carboxylgruppen in Wechselwirkung mit dem an der Substratbindung beteiligten Aminosäurerest Arg-120 und verhindern so die Bindung von Arachidonsäure (Picot *et al.*, 1994).

2.2.2 Homologie zwischen α -DOX aus Pflanzen und PGHS

Eine Homologie zwischen PGHS aus Säugetieren und α -Dioxygenasen aus Pflanzen wurde zum ersten Mal 1998 beschrieben (Sanz *et al.*, 1998). Die damals charakterisierte pathogen-induzierbare α -Dioxygenase aus Tabak wies beim Vergleich der Aminosäuresequenzen 22% bzw. 20% identische Aminosäuren mit PGHS-2 aus Maus bzw. PGHS-1 aus Schaf auf.

Die für PGHS katalytisch relevanten Aminosäurereste His-207, His-388 und Tyr-385 (Nummerierung wie unter 2.2.1) (Smith und Song, 2002) sind sowohl in der Tabak-PIOX als auch in dem homologen Protein aus *Arabidopsis* an entsprechenden Positionen konserviert (His-167, His-392, Tyr-389 der α -Dioxygenase aus Tabak) (Sanz *et al.*, 1998). Ein Aminosäuresequenz-Alignment der α -DOX1 aus *Arabidopsis* mit PGHS-1 und PGHS-2 ist in Abb. 2-12 dargestellt.

At DOX1	1	M-----KVITSLTSSIL-----LKFHKDFH-----ETVARMSLDRFLLLVHGVDKMVPWHK	49
PGHS-1	1	MSRQISLRFPLLLLLSPSPVFSADPGAPAVNPCOYPCOHOQCIQVRFGLDRYOCDCSTRTGYSGNCTIPEIWTWLRITLR	83
PGHS-2	1	LFRAVLLCAALGLSQAANPCNSPCNRGECMSTGCDQKDCDCTRTGTYGENTAPEFLTRKLLK	68
At DOX1	50	LVVFLGLTYH-----EVRRHLHQ-QYNLLNVGQTPGTGRFD--PANYPYRTADGKFN-DPENEGVGSONSFFGRNCPVDO-----K	122
PGHS-1	83	-PSPSFIHFMLTHGRWLWDFVNA-TEIRDTLMLRLVLTVRSNLIPSPPTYNIAHDIISWSEF-----SNVSYTRILPSVPRDCPTPMGTR	166
PGHS-2	68	-EPTNTVHYHLTHFKGVNIVNINIPFLRSLIMKYVLTSRSLIDSPPTYNVHYGKSWSEF-----SNLSYYTRALPPVADDCPTPMGVK	152
At DOX1	123	SKLRRPDPMVVATKDLGRKFIIDTGKQFNMIASWIDQFMHWDWIDHLEDTHQIELVAPKEVASKCPLSSFRFLKTKE-VPTGFFEIKTGS	211
PGHS-1	167	GKKQLPDAEFLSRRFLLRRKFIIDPQGNLIMFAFFAQHFTHQ-----FFKTSCKMGPGE--TRALG	225
PGHS-2	153	GKRELDPDSKEVLEKVLRLRRFIPDPQGSNMMFAFFAQHFTHQ-----FFKTDHRRGPGF--TRGLG	211
At DOX1	212	QNIPTFWWDSVVIYGSNSKTLDRVRTYKDGKLGK-----ISETGLLH-----DEDGLAISGDIRNSWAGVSAQALFIKHN	284
PGHS-1	226	HGV-----DLGHIYGNLBRQYQLRFLKDGKLYQMLNGEVYPPSVEEAPVLMHYPRCIPPPQSQAVGQEVFGLLPGLMAYATIWLREHN	310
PGHS-2	212	HGV-----DLNHIYGETLDRQHKLRFLKDGKLYQVIGSEVYPPVQKDTQVEMVYPPHIPENLQFAVGQEVFGLVPGMLMAYATIWLREHN	296
At DOX1	285	AVCDALKDDEDDLEDDLYRYARLVTSVAVKIHITIDWTVOI-----LKKDITLQAGMRANWYGLLKKKEDSFCHAGSSILGGVVMGKK	368
PGHS-1	311	RVCDLILKAEHPFWGDEQLFQIARLILIGETIKIVIEEYVQOLSGYFLQKFDPELL-----FGAQFYQNR	376
PGHS-2	297	RVCDLILKAEHPFWGDEQLFQIARLILIGETIKIVIEDYVQOLSGYFLQKFDPELL-----FNQGFQYQNR	362
At DOX1	369	PQNHGVPSYLTEDFTSVYRMHSLDLPDLHILIDDDVPGTNKSLPLIQEHSMDLIGRKGEEETMSHIGTKIMVSMGHQASCALELMNYPM	458
PGHS-1	376	IAMEFNOLYHWHPLMPDSERVGP-----QDYSYEQFLENAS--MLVDYGVAEALVDAFSROPAGRIG-----435	435
PGHS-2	362	IASEFNOLYHWHPLLPDENIED-----QEYSFKQFLYNS--ILLEHGLTQFVSEFTRQIAGRVA-----421	421
At DOX1	459	WLRDIVPHDPNGQARDHVDLAALEIYRD-RERSVPRYNEERRSMFMIPIIKWEDLTEDEPAIEVLDDVYDGDVEELDILLVGLMAEKKIK	547
PGHS-1	435	-----GGRNIDHHLHVAVDVIKESRVLRLQOPNEYRKRFGMKPYTSFQELTGEKEMAAELEELYGD-IDALEYFGLLLEKCHP	514
PGHS-2	421	-----GGRNVETIAVQAVAKASIDCSREMKYQSLNEYRKRRESLKPYSFEELTGEKEMAAELKALYSD-IDVMELYPALIVERPRP	500
At DOX1	548	GFAISETAFYIFLIMAT---RRLEADRFFTSDF-NETIYT-KKCLEWVNTTESLKDVIDRHPDMDTKWNSES-----RFSWDSPELT	627
PGHS-1	515	NSIFGSESM-----IEMGAPFSLKGLGNPICSPYWKASTFGGEVGFN-LVKTADLKKLVLC-----LNKTKCPVSSBHV--PDPRQ	587
PGHS-2	501	DAIFGETM-----VELGAPFSLKGLGNPICSPYWKASTFGGEVGFK-IINFASIOSLIC-----NNVKGCFETSENV--ODPOP	573
At DOX1	628	KNPIPLY-----LRIPS- 639	
PGHS-1	588	EDRPGVE-----RPPTEL 600	
PGHS-2	574	TKTATINASASHRLDDINPTVLIKRRSTEL 604	

Abb. 2-12: Aminosäuresequenz-Alignment von α -DOX1 aus *Arabidopsis thaliana* (At) (GenBank Accession Nr.: AF334402), PGHS-1 aus *Ovis aries* (GenBank Accession Nr.: NM001009476) und PGHS-2 aus *Mus musculus* (GenBank Accession Nr.: NM011198). Die konservierten proximalen und distalen Histidin-Reste, der konservierte Tyrosin-Rest sowie der Serin-Rest Ser-552 (α -DOX1) sind mit einem Stern gekennzeichnet. Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche grau hinterlegt.

Diese Aminosäurereste sind auch in allen anderen bekannten α -Dioxygenasen aus Pflanzen konserviert. Als Äquivalent zum Serin-Rest Ser-530 (Picot *et al.*, 1994) wird der Serin-Rest Ser-567 (in der Tabak- α -DOX) diskutiert, jedoch werden α -Dioxygenasen durch Aspirin nicht

inhibiert (Sanz *et al.*, 1998). Weitere nicht-steroidale Inhibitoren von Cyclooxygenase, wie Ibuprofen und Flurbiprofen, hatten keine inhibitorische Wirkung auf die α -Dioxygenase aus Reis (Koeduka *et al.*, 2002) oder Erbsen (Saffert, 2001).

Mit Hilfe der ortsspezifischen Mutagenese wurde gezeigt, dass die genannten Aminosäuren für die katalytische Aktivität von α -Dioxygenasen ebenfalls relevant sind. Ein Aminosäureaustausch von Tyr-380 zu Phenylalanin und von His-158 zu Glutamin bzw. Ser-558 zu Alanin führte zu Inaktivierung des Enzyms aus Reis (Koeduka *et al.*, 2002). Austausch von His-163 gegen Alanin, His-389 gegen Alanin sowie Tyr-386 gegen Phenylalanin in der α -Dioxygenase aus *Arabidopsis* führte ebenfalls zur Inaktivierung des Enzyms (Hamberg *et al.*, 2002^b).

Aufgrund der Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz zwischen α -Dioxygenasen aus Pflanzen und PGHS – wobei der in PGHS an der Häm-Bindung beteiligte proximale Histidin-Rest His-207 in α -Dioxygenasen an einer entsprechenden Position konserviert ist – wird davon ausgegangen, dass es sich bei α -Dioxygenasen aus Pflanzen ebenfalls um Häm-Proteine handelt (Sanz *et al.*, 1998). Da ein Austausch des vermutlich Häm-bindenden His-158 (Reis) bzw. His-163 (*Arabidopsis*) zur Inaktivierung der Enzyme führt, nimmt man an, dass die Häm-Gruppe für die katalytische Aktivität von α -Dioxygenasen essentiell ist (Koeduka *et al.*, 2002). Die spektralphotometrischen Eigenschaften des gereinigten, in *E. coli* überexprimierten Enzyms aus Reis sind in der nativen Form denen von PGHS sehr ähnlich, jedoch wurden bei Untersuchung der mit Dithionit reduzierten Form signifikante Unterschiede festgestellt. Der Koordinationszustand der Häm-Gruppe im Grundzustand hat offensichtlich große Ähnlichkeit zu dem in PGHS, während die reduzierte Form deutlich abweicht (Koeduka *et al.*, 2002).

Die Inaktivierung der α -Dioxygenase aus Reis durch Austausch des Aminosäurerests Ser-558 gegen Alanin deutet darauf hin, dass Ser-558 in einer Region liegt, die eine essentielle Bedeutung für die katalytische Aktivität pflanzlicher α -Dioxygenasen hat. In allen bekannten α -Dioxygenasen ist diese Region hochkonserviert (Koeduka *et al.*, 2002).

Weiterhin wird vermutet, dass die initiale H-Abstraktion vom Fettsäuresubstrat, die der Dioxygenierung am α -C-Atom vorausgeht, durch ein aus dem konservierten Tyrosin-Rest Tyr-386 (in *Arabidopsis* α -DOX1) gebildetes Tyrosyl-Radikal verursacht wird (Hamberg *et al.*, 2002^b). Der postulierte Mechanismus für die initiale H-Abstraktion ist in Abb. 2-13 dargestellt.

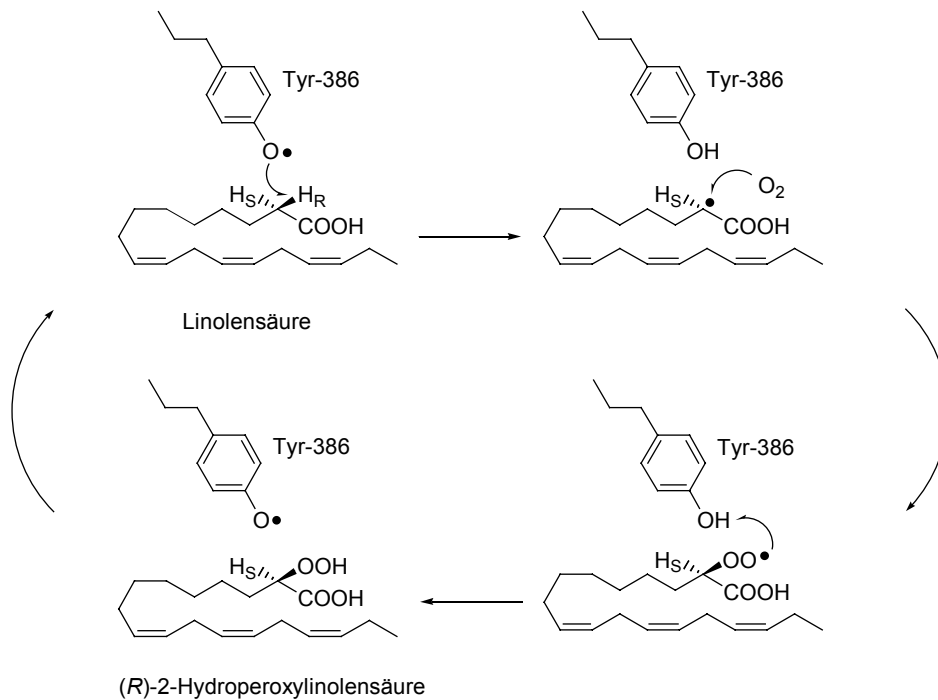


Abb. 2-13: H-Abstraktion von Linolensäure durch Tyr-386 der α -DOX1 aus *Arabidopsis*, Postulat nach Hamberg *et al.* (2002^b).

Im Gegensatz zu PGHS besitzen die α -Dioxygenasen aus Tabak und aus Reis keine gekoppelte Peroxidase-Aktivität (Hamberg *et al.*, 1999; Koeduka *et al.*, 2002): bei Umsetzung der in Insektenzellen überexprimierten α -Dioxygenase aus Tabak mit Fettsäurehydroperoxiden und bei Umsetzung der in *E. coli* überexprimierten α -Dioxygenase aus Reis mit Palmitinsäurehydroperoxid konnte keine Peroxidase-Aktivität nachgewiesen werden. Mit einer aus keimenden Erbsen aufgereinigten α -Dioxygenase hingegen wurde Peroxidase-Aktivität nachgewiesen (Saffert *et al.*, 2000).

Abb. 2-14 zeigt ein *Alignment* der anhand der Aminosäuresequenz vorausgesagten Sekundärstruktur der Tabak α DOX1 und der dreidimensionalen Struktur von PGHS-1 aus *Ovis aries* mit den entsprechenden katalytisch relevanten Aminosäureresten und dem Serin-Rest Ser-530 (Sanz *et al.*, 1998). Nahezu die gesamte katalytische Region weist eine signifikante Übereinstimmung hinsichtlich der Sekundärstruktur auf. Die Regionen in PGHS außerhalb der katalytischen Domäne, die EGF-Domäne und die Membranbindungs-Domäne, sind in dem Tabakprotein nicht vorhanden.

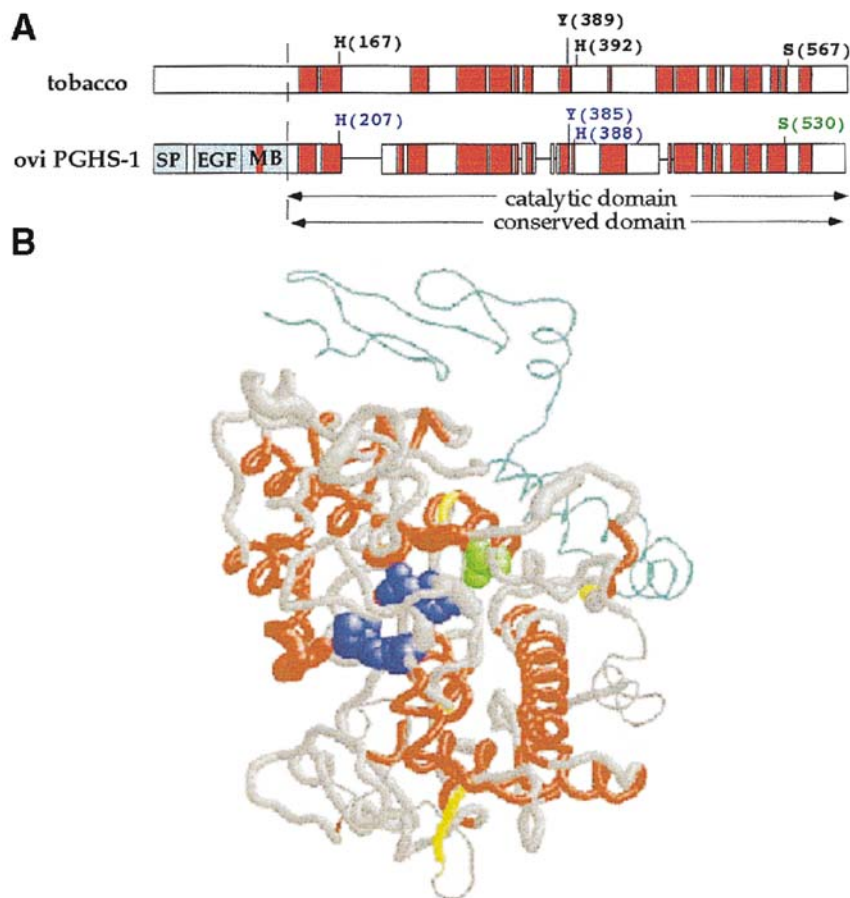


Abb. 2-14: Sequenzstruktur-*Alignment* von α -DOX aus Tabak und PGHS-1 aus *Ovis aries* (entnommen aus Sanz *et al.*, 1998).

(A) Schematische Darstellung. α -Helices sind rot, die EGF-Domäne, die Membranbindungs-Domäne und das Signalpeptid von PGHS-1 sind hellblau dargestellt.

(B) *Alignment* der berechneten Sekundärstruktur von α -DOX aus Tabak und der dreidimensionalen Struktur von PGHS-1. Homologe Regionen sind durch verstärkte Linien dargestellt, α -Helices sind rot dargestellt. Für die katalytische Aktivität wichtige Aminosäuren sind blau, der Serin-Rest Ser-530 ist grün gekennzeichnet. Zwei β -Faltblattregionen sind gelb dargestellt.

2.3 α -Oxidation von Fettsäuren in Säugetieren

Die α -Oxidation von Fettsäuren in Säugetieren wurde anhand des oxidativen Abbaus von Phytansäure (3,7,11,15-Tetramethylhexadecansäure) beschrieben, einer verzweigten Fettsäure, die am β -C-Atom eine Methylgruppe trägt und damit einem direkten Abbau durch β -Oxidation nicht zugänglich ist (Avigan *et al.*, 1966; Tsai *et al.* 1969). Die α -Oxidation von Phytansäure läuft bevorzugt in Leber und Nieren ab. Im Verlauf der Reaktion erfolgt zunächst der Abbau von Phytansäure zu Pristansäure (2,6,10,14-Tetramethylpentadecansäure). Pristansäure ist ein Substrat für die peroxisomale β -Oxidation und wird vollständig metabolisiert (Abb. 2-15).

Bei der α -Oxidation von Phytansäure in Säugetieren erfolgt zunächst die Aktivierung des Substrats zum CoA-Ester durch eine Acyl-CoA-Synthase, wodurch der Transport des Substrats in die Peroxisomen der Zelle ermöglicht wird (Watkins *et al.*, 1994), in denen die weiteren Reaktionen ablaufen (Mihalik *et al.*, 1995; Croes *et al.*, 1996; Jansen *et al.*, 1996^a). Eine Phytanoyl-CoA-Hydroxylase katalysiert die Bildung des intermediären 2-Hydroxyphytanoyl-CoA-Esters. Diese Hydroxylase gehört zur Klasse der Fe²⁺/Ketoglutarat-abhängigen Oxygenasen: molekularer Sauerstoff wird in Phytansäure und in das Cosubstrat α -Ketoglutarat eingeführt (Jansen *et al.*, 1997^b; Mihalik *et al.*, 1997). Durch anschließende Abspaltung des Formyl-CoA-Esters von der hydroxylierten Fettsäure durch eine 2-Hydroxyphytanoyl-CoA-Lyase (Foulon *et al.*, 1999; Jansen *et al.*, 1999^{a, b}) resultiert der um ein C-Atom kettenverkürzte Aldehyd Pristanal (2,6,10,14-Tetramethylpentadecanal) (Poulos *et al.*, 1993; Croes *et al.*, 1996 und 1997^{a, b}; Verhoeven *et al.*, 1997^{a, b, c}). Pristanal wird zu Pristansäure (2,6,10,14-Tetramethylpentadecansäure) oxidiert (Croes *et al.*, 1997^a; Verhoeven *et al.*, 1997^{b, c}), diese wird dann – nach Derivatisierung zum CoA-Ester (Steinberg *et al.*, 1999 und 2000) – durch peroxisomale β -Oxidation zu 4,8-Dimethylnonanoyl-CoA abgebaut. 4,8-Dimethylnonansäure wird als Carnitin-Ester in die Mitochondrien exportiert und dort durch β -Oxidation zu Acetyl-CoA und Propionyl-CoA abgebaut (Verhoeven *et al.*, 1998; Wierzbicki *et al.*, 2002). Die α -Hydroxylierung von Phytansäure verläuft stereoselektiv in Abhängigkeit von der Konfiguration der Methylgruppe in β -Position (Tsai *et al.*, 1973; Croes *et al.*, 1999). Die Hydroxylierung am α -C-Atom erfolgt aus sterischen Gründen immer auf der entgegengesetzten Seite der Methylgruppe.

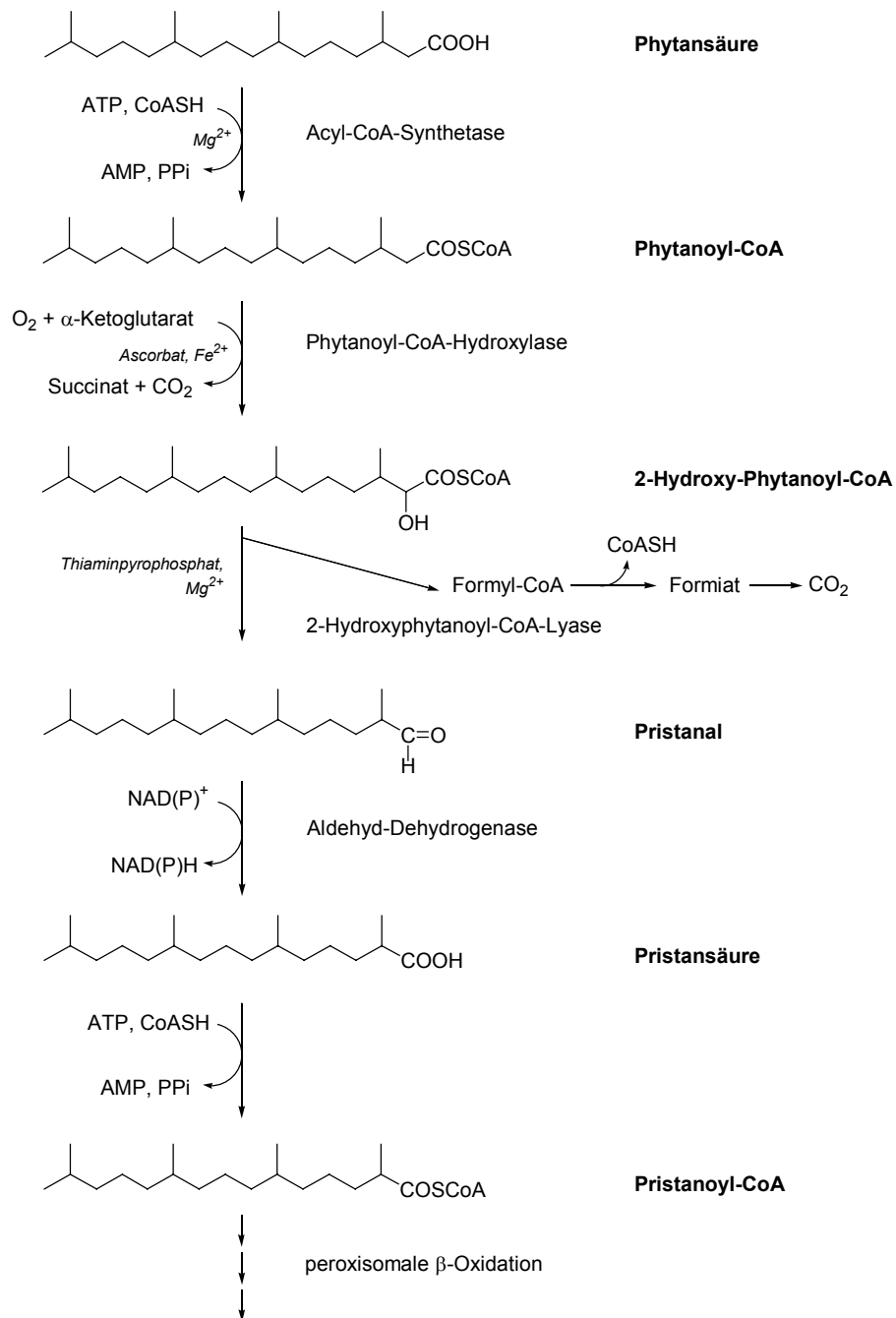


Abb. 2-15: Reaktionsverlauf der α -Oxidation von Phytansäure in Säugetieren, modifiziert nach Verhoeven und Jakobs (2001).

Die Untersuchungen zur α -Oxidation in Säugetieren konzentrierten sich auf β -methylverzweigte Fettsäuren, die nicht direkt β -oxidativ metabolisiert werden können. Als bekanntestes Beispiel sei erneut die β -methylverzweigte Phytansäure genannt. Phytansäure entsteht durch Oxidation von Phytol, einem mikrobiellen Abbauprodukt von Chlorophyll. In der menschlichen Nahrung ist Phytansäure vor allem in Milchprodukten und dem Fleisch von Wiederkäuern vorhanden. Bei einer

durchschnittlichen Ernährung werden täglich etwa 50-100 mg Phytansäure aufgenommen (Steinberg *et al.*, 1995). Die durch Enzymdefekt oder peroxisomale Störungen verursachte Anreicherung von Phytansäure im menschlichen Organismus führt zu schweren Krankheitsbildern, wie z.B. der Refsum-Krankheit oder dem Zellweger-Syndrom (Refsum, 1946; Klenk und Kahlke, 1963; Bowen *et al.*, 1964; Jansen *et al.*, 1996^a; Jansen *et al.*, 1999^b; Wanders *et al.*, 2000). Als Symptome der Refsum-Krankheit werden u.a. neurologische Störungen, Erblindung und Taubheit beobachtet (Mukherji *et al.*, 2003).

Die α -Oxidation unverzweigter Fettsäuren spielt insbesondere in Gehirn und Nervengewebe von Säugetieren eine Rolle. Langkettige 2-Hydroxyfettsäuren sind als Bestandteile von Sphingolipiden in Säugetieren vor allem im Gehirn vorhanden. Die Hauptlipide von Myelin, Galactosylceramide und -sulfatide, enthalten 2-Hydroxyfettsäuren. Die Biosynthese dieser langkettigen 2-Hydroxyfettsäuren erfolgt durch eine Fettsäure-2-Hydroxylase (Hoshi und Kishimoto, 1973; Singh und Kishimoto, 1979). Eine durch das *FA2H*-Gen codierte und kürzlich charakterisierte humane Fettsäure-2-Hydroxylase wird in hohem Maße in Gewebe aus Gehirn exprimiert (Alderson *et al.*, 2004). Der Abbau von 2-Hydroxyfettsäuren erfolgt – wie der α -oxidative Abbau von β -methylverzweigten Fettsäuren – in den Peroxisomen. Im ersten Schritt erfolgt die Aktivierung zu Acyl-CoA, anschließend wird der 2-Hydroxyfettsäure-CoA-Ester durch Phytanoyl-CoA Lyase zu Formyl-CoA und dem um ein C-Atom kettenverkürzten Aldehyd gespalten. Nach Oxidation des Aldehyds zur entsprechenden Fettsäure erfolgt der weitere Abbau durch β -Oxidation (Foulon *et al.*, 2005).

2.4 α -Oxidation von Fettsäuren in Bakterien

Die α -Oxidation von Fettsäuren hat man auch für Bakterien wie *Arthrobacter simplex* (Yano *et al.*, 1969 und 1971) und *Sphingomonas paucimobilis* (Matsunaga *et al.*, 1994) beschrieben. Die hierbei aus Fettsäuren hervorgehenden α -hydroxylierten Fettsäuren stellen in Gram-negativen Bakterien wie *Salmonella typhimurium* und *Pseudomonas aeruginosa* (Humphreys *et al.*, 1972) einen Bestandteil von Lipid-A-Molekülen dar.

Der Mechanismus der α -Oxidation in Bakterien ist nicht eindeutig geklärt, jedoch gelten α -Hydroxyfettsäuren als Endprodukte dieser Reaktion. Als katalysierende Enzyme werden in *Sphingomonas paucimobilis* eine Cytochrom P450-abhängige α -Hydroxylase (M_r 43 kD) (Matsunaga *et al.*, 1997) und in den Gram-negativen Bakterien *Salmonella typhimurium* eine Fe^{2+} / α -Ketoglutarat-abhängige Dioxygenase diskutiert (Gibbons *et al.*, 2000).

α -Hydroxyfettsäuren treten in Gram-negativen Bakterien als Komponenten von Lipid-A-Molekülen auf, den Membranankern der als Endotoxine wirksamen Lipopolysaccharide (LPS) (Humphreys *et al.*, 1972). Die α -Oxidation von Acylresten in den Gram-negativen Bakterien *Salmonella typhimurium* erfolgt ausschließlich unter aeroben Bedingungen und führt zur stereoselektiven Bildung der entsprechenden (*S*)-2-Hydroxyderivate (Guo *et al.*, 1997; Gibbons *et al.*, 2000). Die am häufigsten vorkommende Fettsäure in Lipid-A-Molekülen ist Myristinsäure, weitere Fettsäuren in Lipid-A-Molekülen sind Decan-, Laurin- und, in seltenen Fällen, Palmitinsäure (Towler *et al.*, 1987). Bei Infektion durch *Salmonella typhimurium* wird im Säugetier-Organismus unter anderem die sogenannte Acyloxyacyl-Hydrolase aktiviert, die zur Entgiftung der Lipopolysaccharide beiträgt (Erwin und Munford, 1990). Im Zuge dieser Entgiftung werden Hydrolase-katalysiert neben den Myristoylresten auch die entsprechenden 2-Hydroxyderivate abgespalten, die anschließend zum CoA-Ester derivatisiert werden können (Paige *et al.*, 1990). 2-Hydroxymyristoyl-CoA gilt als potenter Inhibitor der Myristoyl-CoA:Protein N-Myristoyltransferase (NMT), welche die Übertragung von Myristoylresten auf Proteine katalysiert. Die Inhibierung von NMT kann u.a. dazu führen, dass Proteine, welche Myristinsäurereste als Membrananker verwenden, in der Zelle nicht korrekt lokalisiert werden können, weshalb wiederum die Signaltransduktion zur Einleitung von Immunabwehrreaktionen beeinträchtigt sein kann (Paige *et al.*, 1990; Gibbons *et al.*, 2000).

Gut untersucht ist die α -Oxidation im Bodenbakterium *Sphingomonas paucimobilis*. Grundlage dieser Studien ist das Vorkommen von Sphingolipiden, die über hohe Anteile an 2-Hydroxysäuren verfügen, vor allem an 2-Hydroxymyristinsäure. Das aus *Sphingomonas paucimobilis* isolierte, die α -Oxidation katalysierende Enzym mit einem Molekulargewicht von 43 kD verfügt nicht über

Decarboxylaseaktivität (Matsunaga *et al.*, 1998^a und 2000). Inzwischen gelang auch die Klonierung des Gens und die Expression in *E. coli*. Die Aminosäuresequenz weist hochkonservierte Regionen auf, die typisch sind für Proteine der Cytochrom P450-Superfamilie (Matsunaga *et al.*, 1997).

Studien ergaben, dass das Enzym zur Katalyse NADH sowie molekularen Sauerstoff benötigt. Bei Anwesenheit von $^{18}\text{O}_2$ wird ein Atom des markierten Sauerstoffs in das Substrat eingeführt (Matsunaga *et al.*, 1994). Werden Sauerstoff und NADH durch H_2O_2 oder ein H_2O_2 -generierendes System ersetzt, steigt die α -Hydroxylase-Aktivität. In Gegenwart von H_2O_2 ist molekularer Sauerstoff für die Katalyse nicht notwendig (Matsunaga *et al.*, 1996).

Von der im Bakterium *Sphingomonas paucimobilis* identifizierten α -Hydroxylase werden gesättigte freie Fettsäuren, von Myristinsäure bis Stearinsäure, sowie die ungesättigten Fettsäuren Palmitoleinsäure und Ölsäure in Gegenwart von H_2O_2 umgesetzt (Matsunaga *et al.*, 1998). Das Aktivitätsoptimum liegt hierbei bei Myristinsäure. Methylmyristat sowie 1,14-Dicarboxytetradecansäure werden nicht als Substrat akzeptiert. Auch Fettsäureanaloga wie Tetradecan, 1-Tetradecanol und Tetradecanal werden nicht umgesetzt. Die partiell negativ geladene Carboxylgruppe ist für die Interaktion zwischen Substrat und Enzym unabdingbar. Auch das ω -Ende der Substrate muss gewisse Voraussetzungen erfüllen; eine weitere Carboxylfunktion am Kettenende verhindert die Substratbindung im aktiven Zentrum des Enzyms (Matsunaga *et al.*, 2000). Die Absolutkonfiguration von 2-Hydroxymyristinsäure wurde mittels HPLC nach entsprechender Derivatisierung bestimmt, es lagen ausschließlich die (*S*)-konfigurierten Produkte vor (Matsunaga *et al.*, 2000).

2.5 Physiologische Bedeutung oxygenierter Fettsäurederivate in Pflanzen

Phytooxylipine, eine Gruppe oxygenierter Fettsäurederivate, haben große Bedeutung in der Biologie von Pflanzen. Diese Metabolite werden in Pflanzen durch die Oxygenierung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren durch eine Vielzahl verschiedener Biosynthesewege gebildet. An der Biosynthese der strukturell sehr unterschiedlichen Moleküle sind Lipoxygenasen und mehrere unterschiedliche Cytochrom P450-Enzyme beteiligt; auch α -Dioxygenasen sind hierbei zu nennen (Abb. 2-16).

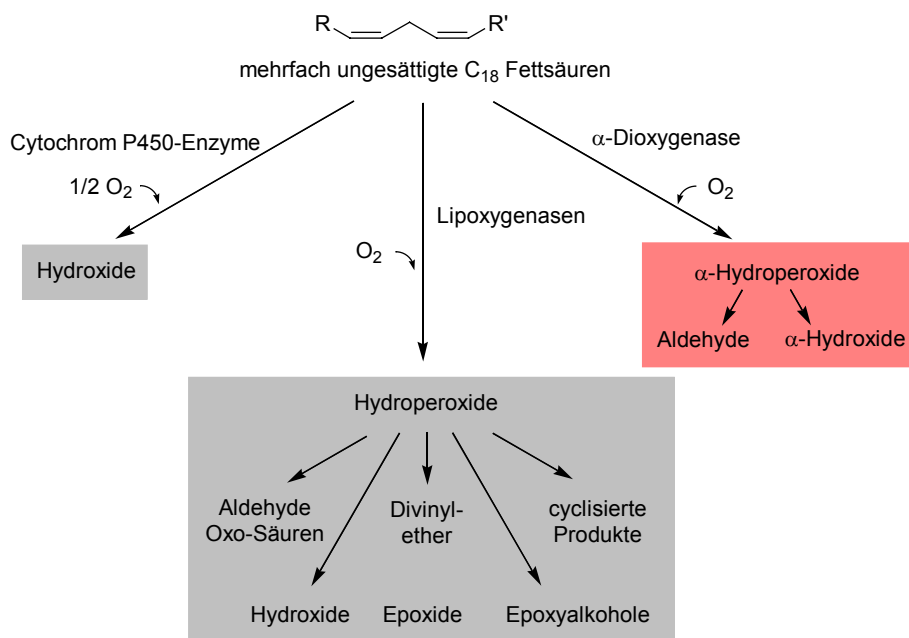


Abb. 2-16: Oxidativer Metabolismus mehrfach ungesättigter Fettsäuren in Pflanzen, modifiziert nach Blée (2002).

Oxylipine werden *de novo* als Antwort auf mechanische Verletzung, Herbivoren- und Pathogenbefall sowie andere biotische und abiotische Einflüsse und ebenso bei Entwicklungsprozessen gebildet (Howe und Schillmiller, 2002). Sie spielen eine wichtige Rolle in der Abwehrreaktion von Pflanzen gegen Pathogene (Hamberg und Gardner, 1992; Creelman und Mullet, 1997; Mueller, 1997; Blée, 1998). Einige Substanzen besitzen Signalaktivität; zu nennen sind hier in erster Linie Jasmonsäure und Aldehyde der Kettenlänge C₆. Sie vermitteln die Aktivierung von Genen, die für die Resistenz von Pflanzen gegen bestimmte Mikroorganismen und Insekten wichtig sind (Reinbothe *et al.*, 1994; Reymond und Farmer, 1998; Reymond *et al.*, 2000).

Ebenfalls bekannt sind Agenzien mit protektivem Effekt, die antibakteriell und antifungal wirken (Croft *et al.*, 1993; Blée, 1998; Weber *et al.*, 1999). Unter den ersten charakterisierten fungitoxischen Oxylipinen waren Epoxy- und Hydroxy-Derivate von Linolsäure. Oxylipine sind auch an pflanzlichen Entwicklungsprozessen beteiligt (Blée, 2002).

Die Biosynthese der meisten bekannten Oxylipine wird initial durch Lipoxygenasen (LOX) katalysiert, das sind Dioxygenasen, die ein nicht Häm-gebundenes Eisenatom als prosthetische Gruppe enthalten. Lipoxygenasen führen molekularen Sauerstoff in Fettsäuren mit einem 1,4-Pentadiensystem ein. Als Substrat dienen die mehrfach ungesättigten C₁₈-Fettsäuren Linol- und α -Linolensäure, die durch Lipasen aus Membranlipiden freigesetzt werden. In Pflanzen existiert eine Vielzahl von LOX-Isoenzymen, die sich im Expressionsmuster, in der subzellulären Lokalisation und auch in den Umsetzungsprodukten unterscheiden (Howe und Schillmiller, 2002). Die durch LOX gebildeten Fettsäurehydroperoxide sind Substrate für weitere Enzymsysteme, wie Allenoxidsynthase (AOS), Hydroperoxidlyase (HPL), Divinylethersynthase (DES), Epoxyalkoholsynthase, Peroxygenase, Alkylhydroperoxidreduktase und LOX selbst, die diese hochreaktiven Moleküle in eine Reihe von oxygenierten Fettsäuren umsetzen (Grechkin, 1998; Blée, 2002; Weber, 2002). Die Produkte der 9- oder 13-LOX Katalyse, die 9- oder 13-Hydroperoxyfettsäuren, werden hierbei auf unterschiedlichen Wegen umgesetzt. Lipoxygenasen werden in Pflanzen beispielsweise als Reaktion auf Stress und Pathogenbefall exprimiert. Es wurde gezeigt, dass die LOX-Expression für die Resistenz von Tabakpflanzen gegen Pilzbefall essentiell ist (Rancé *et al.*, 1998). Die Infektion von Blättern mit Pathogenen führt auch zu Aktivierung weiterer Enzyme, welche für die Oxylipin-Biosynthese notwendig sind, so z.B. Phospholipasen, Allenoxidsynthase und Divinylethersynthase. Die genaue Funktion der von den verschiedenen Zweigen des LOX-Weges abgeleiteten Produkte ist in vielen Fällen noch ungeklärt.

Das Interesse an pflanzlichen Oxylipinen hat sich in den letzten Jahren hauptsächlich auf einen Zweig des 13-LOX-Weges konzentriert, den sogenannten Octadecanoid-Weg, der in der Bildung von Jasmonsäure resultiert. Die Biosynthese von Jasmonsäure verläuft über die Bildung von 13-Hydroperoxylinolensäure durch 13-Lipoxygenase und die anschließende Umsetzung des Fettsäurehydroperoxids durch Allenoxidsynthase und Allenoxidcyclase zu 9(*S*),13(*S*)-Oxophytodiensäure (OPDA). Nach Reduktion dieses Vorläufers wird nach drei β -Oxidationszyklen Jasmonsäure gebildet (Abb. 2-17). Es wird angenommen, dass die Reaktionsschritte bis zur Bildung von 9(*S*),13(*S*)-OPDA in den Chloroplasten ablaufen und die Reduktion des Cyclopentenons sowie die anschließende β -Oxidation in den Peroxisomen stattfinden (Howe *et al.*, 2002). Die Rolle von Jasmonsäure beim Schutz vor Insekten ist seit langem bekannt und auch ihre Relevanz bei der Abwehrreaktion gegen Pathogene ist mittlerweile gesichert (Vijayan *et al.*, 1998).

Man geht davon aus, dass Jasmonsäure als Signalmolekül agiert, das sowohl in Monokotyledonen als auch in Dikotyledonen die Expression verschiedener Gene induziert. Auch der Vorläufer von Jasmonsäure (12-Oxophytodiensäure) (Howe, 2001; Stintzi *et al.*, 2001) und Jasmonsäure-Derivate wie der flüchtige Jasmonsäuremethylester und einige Aminosäurekonjugate wirken als effektive Regulatoren von Abwehrreaktionen in Pflanzen. Diese Komponenten werden auch als Jasmonate bezeichnet. Welche Funktion den einzelnen Substanzen jeweils zukommt, ist jedoch noch unklar. Die entscheidende Funktion von Methyljasmonat als intra- und interzellulär wirksames Signalmolekül wurde kürzlich bestätigt (Seo *et al.*, 2001). Jasmonsäure beeinflusst darüber hinaus in *Arabidopsis* u.a. die Pollenreifung, Keimung und Wurzelbildung (Hildebrand, 1998; Weber, 2002).

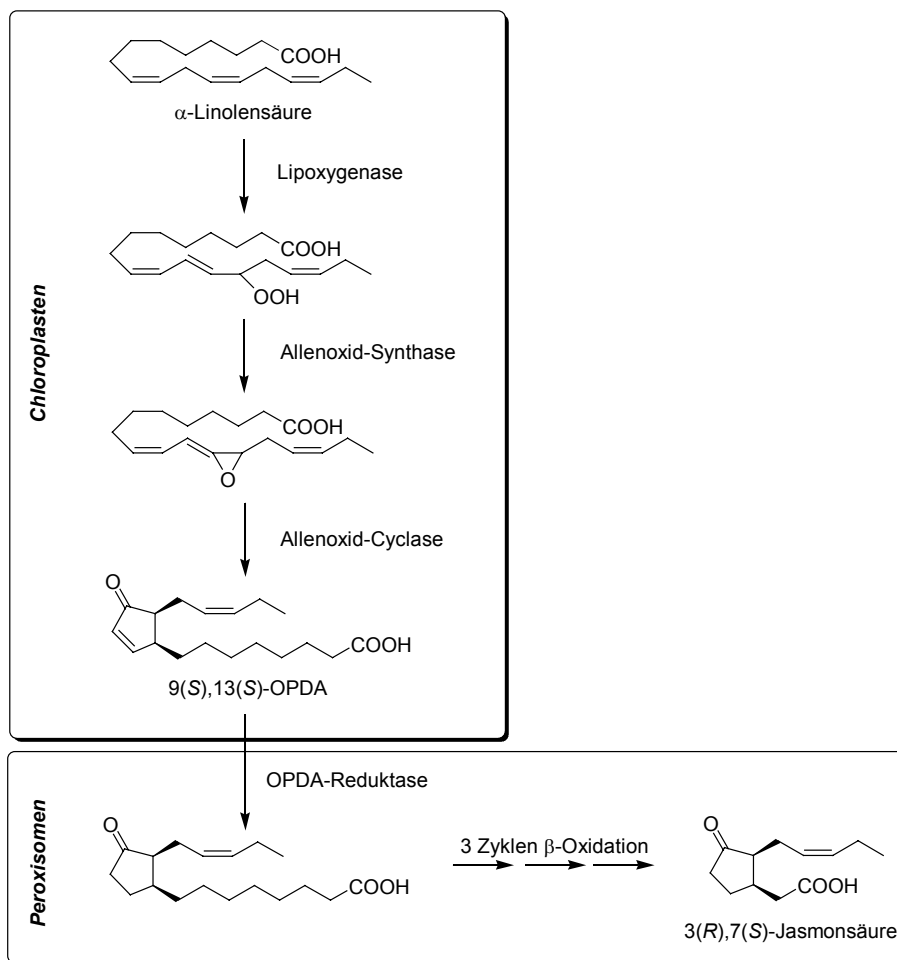


Abb. 2-17: Biosynthese von Jasmonsäure (OPDA = Oxophytodiensäure).

Im Gegensatz zu den vom Octadecanoid-Weg abgeleiteten Signalmolekülen wurde die physiologische Rolle von Oxylipinen, die sich von anderen Zweigen des LOX-Biosynthesewegs ableiten, wie Aldehyde, Ketole, Divinylether, Epoxy- und Hydroxy-Verbindungen, erst in jüngerer Zeit näher untersucht. Manche dieser Metaboliten wirken wie Methyljasmonat als Signalmoleküle wie z.B. die flüchtigen C₆-Produkte, die in beschädigtem oder verwundetem Pflanzengewebe durch Einwirkung von Hydroperoxidlyase auf 13-Hydroperoxylinolensäure gebildet werden. Es wird vermutet, dass die Signaltransduktion dieser Moleküle über einen anderen Mechanismus verläuft als die Signalwirkung der Methyljasmonate (Bate und Rothstein, 1998). Man hat ferner nachgewiesen, dass kurzkettige Aldehyde eine direkte antimikrobielle Wirkung haben und als Abwehrstoffe gegen Insekten wirken (Croft *et al.*, 1993; Blée, 2002).

2.6 Physiologische Bedeutung der α -Oxidation und ihrer Produkte in Pflanzen

Während man die physiologische Rolle der α -Oxidation im Stoffwechsel von Säugetieren in weiten Teilen kennt (vgl. 2.3), ist die Bedeutung der α -Oxidation im pflanzlichen Stoffwechsel nicht endgültig geklärt. Es ist jedoch davon auszugehen, dass der α -Oxidation in Pflanzen umfassendere Bedeutung als nur die des Fettsäureabbaus zukommt.

α -Dioxygenasen werden z.B. während der Pathogeninfektion in Pflanzen exprimiert, jedoch haben auch andere Prozesse, die mit Veränderung des Gewebes verbunden sind, Einfluß auf die Expression, wie z.B. Keimung, Wachstum, Seneszenz und mechanische Verletzung.

Es wurde gezeigt, dass die Expression von α -Dioxygenasen in Pflanzen als Antwort auf Stress erfolgt, so als Antwort auf bakterielle Infektion, Behandlung mit Signalmolekülen (Salicylsäure und Jasmonsäure), welche pflanzliche Abwehrreaktionen einleiten (Sanz *et al.*, 1998), und ebenso als Antwort auf unterschiedliche zelluläre Signale (intrazellulär generiertes Superoxid, Singulett-Sauerstoff sowie Stickstoffmonoxid), welche Zelltod vermitteln (Ponce de León *et al.*, 2002). Eine Expression erfolgt auch während der Interaktion von Pflanzen und Herbivoren (Hermsmeier *et al.*, 2001), nach mechanischer Verwundung (Laties *et al.*, 1972; Laties, 1978; Hamberg *et al.*, 2002^b), bei osmotischem Stress (Wei *et al.*, 2000; Tirajoh *et al.*, 2005) sowie bei Schäden, welche durch Kälte ausgelöst werden (Gosalbes *et al.*, 2004).

Die in Tabak charakterisierte pathogen-induzierbare Oxygenase (später umbenannt in α -DOX) wurde zuerst während der HR (*hypersensitive response*) der Pflanzen nachgewiesen (Sanz *et al.*, 1998). Die HR ist eine Abwehrreaktion von Pflanzen gegen eindringende Mikroorganismen, verbunden mit schnell eintretenden, lokal begrenzten Nekrosen an der Stelle des mikrobiellen Angriffs. Sie ist Teil einer induzierbaren Abwehrreaktion, die auch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, Zellwandmodifikationen, die Synthese antimikrobieller Substanzen (Phytoalexine), hydrolytischer Enzyme und antimikrobieller Enzyme umfasst (Hammond-Kosack und Jones, 1996). Salicylsäure spielt eine zentrale Rolle in der Aktivierung einer HR (Durner *et al.*, 1997). Studien über die Expression von α -DOX1 in Wildtyp-*Arabidopsis*-Pflanzen sowie in Mutanten, bei denen bestimmte Signal-Transduktionswege beeinträchtigt waren, zeigten, dass α -DOX1 Expression in *Arabidopsis* durch Salicylsäure induziert wird. Der Signal-Transduktionsweg, der die Expression von α -DOX vermittelt, unterscheidet sich damit von demjenigen, der die Expression von Lipoxygenasen kontrolliert: deren Expression wird durch Jasmonsäure induziert (Ponce de León *et al.*, 2002).

Untersuchungen an transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen mit veränderter α -Dioxygenase-Aktivität stützen die These, dass es eine Verbindung gibt zwischen α -DOX und HR. Transgene Pflanzen mit erhöhter bzw. verminderter α -Dioxygenase-Aktivität reagierten unterschiedlich bei Befall mit Bakterien, die eine HR auslösen. Reduktion der α -Dioxygenase-Aktivität führte, im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen, zu vermehrtem Bakterienwachstum sowie sich schneller manifestierenden und schwereren Nekrosen. Höhere α -DOX-Aktivität führte zu Reduktion des Bakterienwachstums und einer langsameren Manifestation der HR (Ponce de León *et al.*, 2002). Die erhöhte α -Dioxygenase-Aktivität hatte hier einen protektiven Effekt. Hieraus wurde geschlossen, dass diese Unterschiede entweder auf die Bildung eines antibakteriell wirkenden Produktes zurückzuführen sind oder darauf, dass eine der gebildeten Substanzen als Signalmolekül an der pflanzlichen Abwehr beteiligt ist, so z.B. als Modulator der HR (die mit dem Tod von Zellen verbunden ist).

Im Vergleich zu Blättern erwachsener Pflanzen ist die α -Dioxygenase-Aktivität in keimenden Erbsensamen deutlich erhöht (Saffert *et al.*, 2000). Man vermutet daher, dass die α -Oxidation auch während der Keimung von Pflanzen eine Rolle spielt. Die erhöhte α -Dioxygenase-Aktivität in Keimlingen, wie sie bei Erdnüssen und Erbsen beobachtet worden ist (Newcomb und Stumpf, 1952; Lazarus, 1998), könnte aufgrund einer *de novo*-Synthese während der Keimung erreicht werden. Von den Produkten der α -Oxidation könnte protektive Wirkung während der Keimung ausgehen. Weiterhin ist es denkbar, dass die vermutlich membrangebundene α -Dioxygenase – genauso wie pflanzliche Lipoxygenasen (LOX) – an der Mobilisierung von Lipiden in keimenden Samen beteiligt ist (Feussner *et al.*, 2001).

In Tabakblättern nimmt während der Entwicklung der Pflanze vom Beginn der Keimung bis zur Blüte die α -Oxidationsaktivität zu. Die höchste Aktivität hat man während der Blüte nachgewiesen. Daher wurde eine Bedeutung der α -Oxidation während des Wachstums und der Seneszenz von Pflanzen angenommen (Kawasaki *et al.*, 1998).

Untersuchungen an transgenen Tomatenpflanzen zeigten, dass sich bei Mutation des für α -DOX2 codierenden Gens ein spezieller Phänotyp ausbildet, genannt FEEBLY (van der Biezen *et al.*, 1996). Diese Pflanzen zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an Anthocyanen während der Keimung aus, die Pflanzen bleiben schwach, bilden blass-grüne Blätter und deformierte Früchte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass α -Dioxygenasen für die normale Entwicklung von Pflanzen bedeutsam sind.

Man hat beobachtet, dass α -Dioxygenasen auch während der Seneszenz von Pflanzen exprimiert werden (Obregón *et al.*, 2001). Seneszenz ist ein aktiver Prozess, der als Antwort auf hormonelle und äußere Einflüsse ausgelöst wird und mit Zellzerstörung einhergeht (Nam, 1997; Weaver *et al.*,

1998). Die Seneszenz von Zellen und Geweben wird häufig in Zusammenhang mit der Lipidperoxidation diskutiert, da von Alterungsprozessen vorwiegend biologische Membranen betroffen sind (Thomas und Stoddart, 1980). Die Zerstörung der zellulären Strukturen und der Zelltod korrelieren mit oxidativem Stress, der auch durch biotischen und abiotischen Stress ausgelöst werden kann. Oxidativer Stress ist damit eine Gemeinsamkeit zwischen Seneszenz und der Reaktion von Pflanzen z.B. auf Pathogen-Infektion. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, weshalb einige Gene bei beiden Prozessen gleichermaßen aktiviert werden (Greenberg, 1996).

Die instabilen und für die Pflanze toxischen Hydroperoxyfettsäuren, Intermediate der α -Oxidation, werden schnell abgebaut, weshalb die Bedeutung der α -Oxidation vermutlich in der Funktion der Folgeprodukte zu suchen ist.

Die Bedeutung von langkettigen aus Linolsäurehydroperoxiden hervorgehenden Hydroxysäuren als Phytoalexine mit fungizider und bakterizider Wirkung wird diskutiert (Blée, 1998).

Bei Inkubationen von Proteinextrakten aus pathogen-infizierten Pflanzen mit langkettigen Fettsäuren hat man langkettige Aldehyde nachgewiesen, während deren Bildung mit Proteinextrakten aus gesunden Pflanzen nicht zu beobachten war (Kato *et al.*, 1994). Langkettige Aldehyde können als Fungizide, Bakterizide sowie Insekten anziehende und abwehrende Stoffe wirken (Kemp, 1975, Galliard, 1980). Darüber hinaus tragen sie zu dem für die jeweilige Pflanze typischen Geruch bei.

In vivo wurden die Hauptprodukte der α -Oxidation in intakten Pflanzen als 2-Hydroxysäuren verschiedener Kettenlänge und mit unterschiedlicher Anzahl an Doppelbindungen identifiziert. Man hat gezeigt, dass diese Produkte während der Interaktion von Pflanzen mit Pathogenen eine zellprotektive Wirkung ausüben (Hamberg *et al.*, 2003). Die potentielle antibakterielle Aktivität der Produkte hat man mit verschiedenen Teststämmen untersucht, wobei festgestellt wurde, dass 2-Hydroxylinolensäure keine antibakterielle Wirkung auf die verwendeten Bakterienstämme hatte (Hamberg *et al.*, 2003). Jedoch waren Ausmaß und Schwere der durch Befall der Pflanzen mit Pathogenen ausgelösten nekrotischen Läsionen in Gegenwart von 2-Hydroxylinolensäure deutlich reduziert (Hamberg *et al.*, 2003).

Die Bedeutung der α -Oxidation in Pflanzen ist vermutlich nicht auf eine exakt definierbare Funktion festzulegen. Möglicherweise führt die α -Oxidation in Pflanzen zur Synthese von Signalmolekülen aus Membranlipiden, die als Mediatoren an der pflanzlichen Abwehr beteiligt sind (Sanz *et al.*, 1998). Auch eine Wirkung der Folgeprodukte der α -Oxidation als Phytoalexine ist nach wie vor denkbar. Gezeigt wurde, dass α -Dioxygenasen eine Funktion beim Schutz vor oxidativem Stress zukommt. Ebenso deutet die Expression von α -DOX in nicht beeinträchtigten

Pflanzen auf eine Rolle während der Entwicklung von Pflanzen hin. Die Expression von α -DOX in gesundem Gewebe (z.B. in Wurzeln, Blüten, alternden Blättern) könnte ein permanentes Schutzsystem gegen Infektion darstellen (Ponce de León *et al.*, 2002); die Produktion von Abwehrkomponenten während Keimung und Seneszenz könnte dazu beitragen, das defensive Potential von Pflanzen während dieser Prozesse zu erhöhen.

3 Experimentalteil

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen bezogen: Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Serva (Heidelberg), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Grüssing (Filsum), Amersham Biosciences (Freiburg), Riedel-de-Haën (Seelze) und Fluka (Neu-Ulm). Alle Chemikalien wurden in der Qualität p.a. oder in der Qualität für Molekularbiologie eingesetzt. Lösungsmittel wurden zum Teil zusätzlich über Füllkörperkolonnen rektifiziert. Die Identifizierung von Substanzen erfolgte anhand der authentischen Referenzverbindungen. Neben synthetisierten Verbindungen wurden die in der Referenzensammlung des Arbeitskreises von Prof. Dr. Schreier vorhandenen Vergleichsproben verwendet.

Produkte weiterer Hersteller:

Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Bacto-Yeast-Extract	Difco, Detroit, USA
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid (X-gal)	Roche Diagnostics, Mannheim
Casamino Säuren	Difco, Detroit, USA
CSPD (Dinatrium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-Chloro)Tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]Decan}-4-yl Phenylphosphat)	Roche, Penzberg
Leupeptin	Roche, Penzberg
Pepstatin	Roche, Penzberg
Pepton	Difco, Detroit, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche Diagnostics, Mannheim
Tetracyclin	Roche Diagnostics, Mannheim

3.1.2 Nukleotide, Oligonukleotide und DNA-Standards

Nukleotide

2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate

(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

Roche Diagnostics, Mannheim

Ribonukleosid-5'-triphosphate

(ATP)

Roche Diagnostics, Mannheim

Radiochemikalien

Adenosin-5' [α - 32 P]-triphosphat

(spezifische Aktivität: 400 Ci/mmol)

Hartmann, Braunschweig

Cytosin-5' [α - 32 P]-triphosphat

(spezifische Aktivität: 400 Ci/mmol)

Hartmann, Braunschweig

Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von den Firmen Eurogentec (Herstal) und Biomers (Ulm) bezogen.

Name	Oligonukleotidsequenz
Seq pQE30 QiaPROM	5'-CCC GAA AAG TGC CAC CTG-3'
Seq pQE30 QiaREV	5'-GTT CTG AGG TCA TTA CTG G-3'
Seq pQE30p2	5'-CAG ATT TCA TTA AAG AGG AGA AA-3'
Seq pUC19 - 40	5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3'
Seq pUC19 Rev	5'-AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA-3'
Seq BlueSK	5'-CGC TCT AGA ACT AGT GGA TC-3'
Seq pBluescribe T7PromSeq	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
Seq pBluescribe T7TermSeq	5'-CGT TTA GAG GCC CCA AGG-3'
Piox Gsp 1	5'-ACA CAA TGC TGT TTG TGA TGC-3'
Piox Gsp 2a	5'-CAT ACC AAT TGG C-3'
Piox Gsp 3a	5'-TGC ACT AAG TTC AAC CTG C-3'
Piox Gsp 4	5'-TTA GTA TCA ATG GGT CAC C-3'
Piox Gsp 5	5'-GTT GGA ATT AGG TCA AAT CC-3'
Piox Gsp 6a	5'-GTG TTA CCC ATT CTA AAC C-3'
Piox Gsp 7a	5'-GAT AAA GAT CTT CAT CTT CC-3'
Piox Gsp 8a	5'-ATG GTC ATT TTA GAG ACT GC-3'
Piox Gsp 9	5'-CTT CTC ATG GCA TCT AGG-3'

Piox Gsp 10a	5'-CCT TCA CTT CCA GCA CC-3'
PioxMut anti	5'-CTA TAG ACC ACA CGG ATC CGT GAT GGT GAT GGT GAT G-3'
PioxMut sense	5'-CAT CAC CAT CAC CAT CAC GGA TCC GTG TGG TCT ATA G-3'
PioxXma	5'-GCT ACC CGG GTT AAT TAG GAA CAC GAA AGT AAA TTG-3'
PioxXho	5'-CCG GTC GAG TTA ATT AGG AAC ACG AAA GTA AAT TC-3'
PioxBam	5'-CGG GAT CCG TGT GGT CTA TAG TAA CTG ATC C-3'
RACE Gsp 1a	5'-CAC TCA GTT CAA CCT GC-3'
RACE Gsp 2a	5'-GAG ACT GCA TCA TGG AAA TCA GG-3'
RACE Gsp 3a	5'-GAT GGG ATC AGT TAC TAT AGA CC-3'
Mutageneseprimer 87Leu-uni	5'-GGT ACA ACA CTT GTT GGA ATT CTG TCA AAT CCA TCT GAT TTT CC-3'
Mutageneseprimer 87Leu-rev	5'-GG AAA ATC TGA TGG ATT TGA CAG AAT TCC AAC AGG TGT TGT ACC-3'
Mutageneseprimer 87Gln-uni	5'-GGT ACA ACA CCT GTT GGA ATT CAG TCA AAT CCA TCT GAT TTT CC-3'
Mutageneseprimer 87Gln-rev	5'-GG AAA ATC AGA TGG ATT TGA CTG AAT TCC AAC AGG AGT AGT ACC-3'
Mutageneseprimer 391Leu-uni	5'-GAG TTT GCC ACT GTC TAT CTG ATG CAT CCA CTC TTA CC-3'
Mutageneseprimer 391Leu-rev	5'-GG TAA GAG TGG ATG CAT CAG ATA GAC AGT GGC AAA CTC-3'
Mutageneseprimer 391Gln-uni	5'-GAG TTT GCC ACT GTC TAT CAG ATG CAT CCA CTC TTA CC-3'
Mutageneseprimer 391Gln-rev	5'-GG TAA GAG TGG ATG CAT CTG ATA GAC AGT GGC AAA CTC-3'
Mutageneseprimer 569Leu-uni	5'-C CTT CTC ATG GCA TCT CTG AGA TTA GAG GCT GAT AG-3'
Mutageneseprimer 569Leu-rev	5'-CT ATC AGC CTC TAA TCT CAG AGA TGC CAT GAG AAG G-3'

3 Experimentalteil

Mutageneseprimer 569Gln-uni	5'-C CTT CTC ATG GCA TCT CAG AGA TTC GAG GCT GAT AG-3'
Mutageneseprimer 569Gln-rev	5'-CT ATC AGC CTC TAA TCT CTG AGA TGC CAT GAG AAG G-3'
Mutageneseprimer 570Leu-uni	5'-C CTT CTC ATG GCA TCT AGG CTG TTA GAG GCT GAT AGA TTT TTT AC-3'
Mutageneseprimer 570Leu-rev	5'-GT AAA AAA TCT ATC AGC CTC TAA CAG CCT AGA TGC CAT GAG AAG G-3'
Mutageneseprimer 570Gln-uni	5'-C CTT CTC ATG GCA TCT AGG CAG TTA GAG GCT GAT AGA TTT TTT AC-3'
Mutageneseprimer 570Gln-rev	5'-GT AAA AAA TCT ATC AGC CTC TAA CTG CCT AGA TGC CAT GAG AAG G-3'
Mutageneseprimer 570uniLys	5'-C CTT CTC ATG GCA TCT AGG AAA TTA GAG GCT GAT AGA TTT TTT AC-3'
Mutageneseprimer 570revLys	5'-GT AAA AAA TCT ATC AGC CTC GAA TTT CCT AGA TGC CAT GAG AAG G-3'

DNA-Längenstandards

1 kb DNA Ladder	NEB, Schwalbach
100 bp DNA Ladder	NEB, Schwalbach
2-Log DNA Ladder	NEB, Schwalbach
Lambda <i>Hind</i> III	eigener Ansatz

3.1.3 Enzyme, Proteine und Antikörper

Enzyme und Antikörper

Anti-Dioxygenase Antiserum	Eurogentec, Herstal
Anti-His Antikörper (Maus)	Amersham Biosciences, Freiburg
Anti-Kaninchen IgG Konjugat mit Alkalischer Phosphatase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-Kaninchen IgG Peroxidase-Konjugat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-Maus-IgG Peroxidase-Konjugat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-RGS(H) ₄ Antikörper (Maus)	Qiagen, Hilden
<i>Bam</i> HI	NEB, Schwalbach
CIP	Roche Diagnostics, Mannheim
DNaseI	Qiagen, Hilden
<i>Dpn</i> I	NEB, Schwalbach

<i>Eco</i> RI	NEB, Schwalbach
<i>Hind</i> III	NEB, Schwalbach
<i>Pfu</i> -Polymerase	NEB, Schwalbach
<i>Pvu</i> II	Pharmacia, Freiburg
Rinderserumalbumin (BSA)	Roche Diagnostics, Mannheim
RNase-Inhibitor (RNasin)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
SAP	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Sma</i> I	NEB, Schwalbach
Stratascript	Stratagene, Heidelberg
T4 DNA-Ligase	Roche Diagnostics, Mannheim
T4 Polynukleotidkinase (PNK)	NEB, Schwalbach
Thrombin	Amersham Biosciences, Freiburg
<i>Tth</i> -Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Xho</i> I	Pharmacia, Freiburg
<i>Xma</i> I	NEB, Schwalbach
<i>Protein-Molekulargewichtsstandards</i>	
High Molecular Weight Marker	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Prestained Protein Marker, Broad Range	NEB, Schwalbach

3.1.4 Plasmide

pUC19	Dr. A. Schön, Leipzig
pBluescribeTT	N. Menzel, Würzburg
pRSET A	Invitrogen, Karlsruhe
pQE30	Qiagen, Hilden
pGEX-4T-2	Amersham Biosciences, Freiburg

3.1.5 Biologisches Material

3.1.5.1 Bakterienstämme

Bakterienstämme zur Klonierung

<i>E. coli</i> DH5 α	Dr. A. Schön, Leipzig
<i>E. coli</i> JM109	Dr. A. Schön, Leipzig

Bakterienstämme zum Screening von λ -cDNA-Bibliotheken bzw. zur in vivo Exzision

<i>E. coli</i> XL1-Blue-MRF'	Stratagene, Heidelberg
<i>E. coli</i> SOLR	Stratagene, Heidelberg

Bakterienstämme zur Überexpression im T5-System

<i>E. coli</i> M15 [pREP4]	Qiagen, Hilden
<i>E. coli</i> SG13009 [pREP4]	Qiagen, Hilden
<i>E. coli</i> BL21	Dr. A. Schön, Leipzig

Bakterienstämme zur Überexpression im T7-System

<i>E. coli</i> BL21 Star TM (DE3)	Invitrogen, Karlsruhe
Rosetta (DE3)	Novagen, Schwalbach
Rosetta (DE3) [pLysS]	Novagen, Schwalbach
Origami B (DE3)	Novagen, Schwalbach

3.1.5.2 mRNA und λ -cDNA-Bibliothek aus Erbsen

Für cDNA-Erststrangsynthesen wurde polyA⁺-RNA aus keimenden Erbsen eingesetzt (G. Grimmer, Würzburg). Es wurde eine λ -cDNA-Bibliothek aus keimenden Erbsen verwendet (A. Saffert, Würzburg).

3.1.5.3 Pflanzenmaterial

Für die präparative Anreicherung von α -Dioxygenase aus Erbsen wurden trockene grüne Erbsen (*Pisum sativum*, var. *sativum*) im örtlichen Handel bezogen. Zur Gewinnung der α -Dioxygenase, wie unter 3.3.11.1 beschrieben, wurden die getrockneten Erbsen nach dreitägiger Keimung in Leitungswasser bei Raumtemperatur verwendet.

Für molekularbiologische Untersuchungen wurde *Pisum sativum* L. cv. Kleine Rheinländerin eingesetzt. Trockene Erbsen wurden 45 min in 4% NaOCl oberflächensterilisiert und 8 h in ½ Hoagland's No. 2 Basal Salt Mixture gequollen. Anschließend wurden die Pflanzen für drei Tage in einen Keimapparat überführt und dann in sterile Tontöpfe mit sterilem Blähton umpflanzt. Die Pflanzen wurden mit ½ Hoagland's No. 2 Basal Salt Mixture gegossen und bei einem 14 h Licht / 10 h Dunkel-Zyklus bei ca. 25 °C gehalten. Das Alter der Pflanzen wurde ab dem Beginn des Quellens bestimmt. Nach der Ernte wurde das Pflanzenmaterial sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.1.6 Chromatographiemedien

3.1.6.1 Lose Materialien

Ni ²⁺ -NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
Sephadex G-50	Pharmacia, Freiburg
DEAE-Sepharose FF	Pharmacia, Freiburg

3.1.6.2 Fertige Säulen

Sephacryl S-300 HR	Pharmacia, Freiburg
--------------------	---------------------

3.1.7 Gebrauchsfertige Analyse-Reagentsätze (*Kits*)

ABI PRISM Dye Terminator Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer, Foster City, CA, USA
Gigapack III Gold Cloning Kit	Stratagene, Heidelberg
Nucleobond [®] AX	Macherey und Nagel, Düren
NucleoSpin [®] Plasmid	Macherey und Nagel, Düren
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
5'/3' RACE Kit, 2nd Generation	Roche Diagnostics, Penzberg
Rapid-hyb Buffer	Amersham Biosciences, Freiburg
RNeasy Plant Mini Kit	Qiagen, Hilden
ZAP-cDNA Synthesis Kit	Stratagene, Heidelberg

3.1.8 Sonstige Materialien

Dialyseschläuche	Serva, Heidelberg
Econo Columns, diverse	BIO-RAD, München
Microcon [™] Mikrokonzentratoren	Amicon, Witten
Nitrocellulose-Membran, Protran (0,22 und 0,45 µm)	Schleicher und Schüll, Dassel
Nitrocellulose-Rundfilter (Ø 7 und 13,5 cm; 0,45 µm)	Schleicher und Schüll, Dassel
Nylon-Membran <i>Porablot NY plus</i>	Macherey und Nagel, Düren
Qiabrane	Qiagen, Hilden
Röntgenfilm Retina XBD	Photochemische Werke, Berlin
Verstärkerfolie Dr. Goos Spezial	Hartenstein, Würzburg

3.2 Geräte

3.2.1 Headspace-Kapillargaschromatographie

GC:	Fisons Instruments GC 8000 series (8530, Mega 2), Thermo Electron, Dreieich, Deutschland
Injektor:	Temperatur 120 °C
Detektor:	FID, Temperatur 240 °C
Trennsäule:	J&W DB-Wax (Megabore@; 30 m × 0,53 mm; d _f = 1 µm), J&W, Folsom, CA, USA
Trägergas:	20 kPa Stickstoff
Make-up-Gas:	65 kPa Stickstoff
Brenngase:	75 kPa Wasserstoff, 70 kPa Luft
Temperaturprogramm:	60 °C, 10 °C/min auf 200 °C, 2 min isotherm
Autosampler:	Headspace Autosampler HS 850
	Ofentemperatur: 60 °C
	Inkubationszeit: 20 min
	Schüttelzeit: 2 sec
	Nadeltemperatur: 70 °C
	Prefill: No
	Spritzenvolumen: 1 ml
	Probenanreicherung: 3 × 1 ml aufgezogen und injiziert
	Aufziehzeit: 3 sec
	Wartezeit vor und nach der Injektion: 1 sec
Kryostat:	MFA 815;
	Injektionsprogramm: -120 °C bis 180 °C in 56 sec

3.2.2 Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie

GC I

Gerät:	Fisons Instruments GC 8000 series, Thermo Electron, Dreieich, Deutschland
Autosampler:	Fisons Instruments AS 800
Injektor:	Split/Splitless-Injektor (1:20), Temperatur 250 °C
Trägergas:	90 kPa Helium 5.0, <i>constant pressure</i>

Trennsäule:	J&W DB-5 Kapillarsäule (30 m × 0,25 mm i. D.; $d_f = 0,25 \mu\text{m}$)
Temperaturprogramm:	60 °C, 5 °C/min, 310 °C (10 min isotherm)
Detektor:	Fisons Instruments MD 800
Massenbereich:	35-450 u
Ionisation:	Elektronenstoßionisation (EI), 70 eV
Quellendruck:	10^{-5} mbar
Multiplifier:	350 V

GC II

Gerät:	Agilent 6890 Series, Agilent Technologies, Wilmington, USA
Autosampler:	Agilent 7683 Serie Injector
Injektor:	Split/Splitless-Injektor (1:20), Temperatur 250 °C
Trägergas:	Helium 5.0, 1 ml/min konstanter Fluss
Trennsäule:	J&W DB-Wax (30 m × 0,25 mm i. D.; $d_f = 0,25 \mu\text{m}$), J&W, Folsom, CA, USA
Temperaturprogramm:	50 °C (3 min isotherm), 4 °C/min bis 250 °C (10 min isotherm)
Detektor:	Agilent 5973 MSD, Agilent, Technologies, Wilmington, USA
Massenbereich:	38-550 u
Ionisation:	Elektronenstoßionisierung (EI), 70 eV
Quellendruck:	10^{-5} mbar
Multiplifier:	1300 V

Datenaufnahme und

Datenauswertung: Xcalibur für Windows (Fisons Instruments, Mainz, Deutschland)

3.2.3 Hochleistungsflüssigchromatographie

HPLC I

Gerät:	Analytische HPLC Maxi-Star, Knauer, Berlin
Pumpensystem:	HPLC Maxi-Star Niederdruckpumpe mit analytischem Pumpenkopf, Degasser und Dynamic Mixing Chamber, Knauer, Berlin
Injektor:	Rheodyne Nr. 7125, Probenschleife 100 μl
Trennsäule:	Eurospher 100 C-18 (250 × 4,6 mm; 5 μm), Knauer, Berlin

Fließmittel: A: H₂O (0,05% Ameisensäure)
B: Acetonitril
C: 2-Propanol
Fluss: 1 ml/min

Gradient: 0-20 min: 95-0% A, 5-100% B; 20-30 min: 100-70% B, 0-30% C;
30-35 min: 70% B/30% C-0% B/C, 0-100% A; 35-40 min: 100% A

Detektor: UV-Detektor Nr. 29815 mit variabler Wellenlänge, Knauer, Berlin,
und/oder Verdampfungs-Licht-Streu-Detektor (ELSD, Evaporative Light
Scattering Detector), Modell Sedex 55, Sedere, Frankreich, Temperatur
45 °C, Druck 2,4 atm

Datenaufnahme
und Auswertung: Eurochrom 2000, Knauer, Berlin

HPLC II

Gerät: Analytische HPLC, Hewlett-Packard

Pumpensystem: HP 1100 Binäre Pumpe mit analytischem Pumpenkopf

Injektor: Rheodyne 7125, Probenschleife 100 µl

Trennsäule: Eurospher 100 C-18 (250 × 4,6 mm; 5 µm), Knauer, Berlin

Fließmittel: A: H₂O (0,05% TFA)
B: Acetonitril
Fluss: 1 ml/min

Gradient: 1-99% B in 40 min

Detektor und
Auswertung: HP 1100 Photodiodenarray-Detektor mit HP Chem-Station, Spektrenmodul
und 2D Chem-Station-Software

Spektralbereich: 200-600 nm

3.2.4 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Gerät: Bruker NMR (400/100 Hz)

Lösungsmittel: CDCl₃, Merck, Darmstadt, Deutschland

Standard: Tetramethylsilan (TMS) $\delta = 0,00$ ppm oder das jeweilige
NMR-Lösungsmittel

Zur Wiedergabe der Multiplizitäten werden folgende Abkürzungen verwendet:

s = Singulett, d = Duplett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett.

3.2.5 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

Pumpen:	2 Pumpen P-500, Pharmacia, Freiburg
Steuerung:	Controller LCC-500 Plus, Pharmacia, Freiburg
Fraktionssammler:	Multi Rac 2111 Controller, Pharmacia, Freiburg Frac 100, Fraction Collector, Pharmacia, Freiburg
Injektor:	Motor Valve MV 8
Detektor:	UV M (280 nm), Pharmacia, Freiburg Uvicord S (278 nm), Pharmacia, Freiburg
Schreiber:	Recorder Rec-482, Pharmacia, Freiburg

3.2.6 Photometer

Pharmacia LKB Ultraspec Plus Spektralphotometer	Pharmacia, Freiburg
Photometer Novaspec II	Pharmacia, Freiburg
Spektralphotometer Carl Zeiss 880608	
DMR 21, M4 QIII mit Trommelschieber	Carl Zeiss, Oberkochen

3.2.7 Elektrophorese-Apparaturen

Apparaturen für die vertikale Gelelektrophorese	Eigenbau des Instituts für Biochemie, Würzburg
Apparaturen für die horizontale Gelelektrophorese	Pharmacia, Freiburg
Spannungsgeräte	Pharmacia, Freiburg

3.2.8 Sonstige Geräte

Geltrockner Modell 223	BIO-RAD, München
Kolbenhubpipetten	Gilson, Langenfeld Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge Biofuge 28 RS	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge J2-21	Beckman Instruments, München
Rotoren SS34, GSA, GS-3	
Kühlzentrifuge J-6B	Beckman Instruments, München
Rotor JA10	
Kühlzentrifuge TJ-6	Beckman Instruments, München
Rotor JS 4.2	

Kühlzentrifuge Universal 16R Rotor 1614 und 1616	Hettich, Tuttlingen
Magnetrührer	IKA-Labortechnik, Staufen
Mikrowellenherd R-8200E	Sharp-Elektronik, Hamburg
pH-Meter	Knick, Berlin
PhosphoImager	Molecular Dynamics, Kent, GB
Rotavapor und Vakuum-System	Büchi, Konstanz
Rundschüttelinkubator HT	Infors, München
Sauerstoffelektrode Typ Clark	Bachofer, Reutlingen
Speed Vac Concentrator SVC 100	Savant Instruments, Farmingdale, USA
Sterilbank HA 2458 GS	Heraeus, Hanau
Sterilfilter, Porenweite 0,22 bzw. 0,45 µm	Schleicher und Schüll, Dassel
Szintillationszähler LS 5000 TD	Beckman Instruments, München
Tischschüttler Ika-Vibrax-VXR	IKA-Labortechnik, Staufen
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Mikroliter	Hettich, Tuttlingen
Transblot SD Semi-Dry Transfer-Cell	BIO-RAD, München
Transblot SD Semi-Dry Transfer-Cell Spannungsgerät	BIO-RAD, München
Ultrafiltrations-Apparatur	Amicon, Witten
Ultrafiltrationsmembranen YM 10 und YM 30	Amicon, Witten
Ultraschallbad Branson 32	Branson, Danbury, USA
Ultraschallsonde Branson Sonifier	Branson, Danbury, USA
Vortexgerät	Bachofer, Reutlingen
Waagen	Mettler, Gießen
Wasserbad	Ges. f. Laboratoriumsgeräte, Burgwedel

3.3 Methoden

Die aufgeführten molekularbiologischen Methoden beruhen weitgehend auf Sambrook und Russel (2001). Alle Konzentrationsangaben beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, auf die jeweilige Endkonzentration. Zur Sterilisation wurden Plastikgefäße autoklaviert und Lösungen autoklaviert (20 min, 120 °C) bzw. steril filtriert, Glasgeräte wurden mindestens 2 h bei 150 °C gebacken.

3.3.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

3.3.1.1 Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung von DNA

Zur Auftrennung doppelsträngiger DNA (linearisierte Plasmide sowie PCR-Produkte) dient die horizontale Agarosegel-Elektrophorese.

Bei neutralem pH-Wert wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle im Spannungsfeld in Richtung Anode, Agarosegele wirken dabei wie ein Molekularsieb. Die Trennleistung ist abhängig von der Konzentration an Agarose. Standardmäßig werden 0,6%, 0,8% und 2,0% (w/v) Agarose für Trennbereiche von 1-20 kbp, 0,7-9 kbp bzw. 0,1-2,0 kbp eingesetzt. Die Wanderungsgeschwindigkeit linearer doppelsträngiger DNA verhält sich bei einer angelegten Spannung von weniger als 5 V/cm Elektrodenabstand umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Anzahl der Basenpaare des Nukleinsäuremoleküls. Bei gleichzeitiger Auftrennung eines DNA-Längenstandards wird die Größe unbekannter Nukleinsäuren durch Vergleich mit dem Längenstandard bestimmt. Durch Zusatz von Ethidiumbromid zum Gel können Nukleinsäuren nach der Elektrophorese sichtbar gemacht werden: Ethidiumbromid interkaliert zwischen GC-Paare und fluoresziert nach Anregung im langwelligen UV-Bereich (302 nm). Die Nachweisgrenze für DNA liegt bei etwa 50-100 ng je Bande.

Agarose wird durch mehrmaliges Aufkochen in Elektrophorese-Puffer (1 × TBE) vollständig gelöst. Die auf 60 °C abgekühlte Gellösung wird mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) versetzt und in die abgedichtete Gelkammer mit eingesetztem Taschenformer gegossen. Nach Erstarren wird das Gel in die mit Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und mit Puffer überschichtet. Der Taschenformer wird entfernt und die Taschen mit Puffer ausgespült. Die Proben werden mit 5 × Agarosegel-Ladepuffer versetzt, in die Taschen gegeben und nach Anlegen einer Spannung von ca. 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Dauer der Elektrophorese richtet sich nach der Agarose-Konzentration des Gels und der Größe der erwarteten Fragmente.

10 × TBE			5 × Agarosegel-Ladepuffer		
	Konzentration	Einwaage [g/l]			Menge/10 ml
Tris	890 mM	107,8	Glycerin (86%)	50%	5,8 ml
H ₃ BO ₄	890 mM	55,02	Na ₂ EDTA (0,5 M)	25 mM	0,5 ml
Na ₂ EDTA	20 mM	7,44	XCFF (1%)	0,03%	300 µl
ddH ₂ O	ad 1000 ml		BPB (1%)	0,03%	300 µl
			ddH ₂ O	ad 10 ml	

3.3.1.2 Denaturierende Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung von RNA

Zur elektrophoretischen Auftrennung von RNA unter denaturierenden Bedingungen werden Agarosegele (1% Agarose) mit Formaldehyd verwendet. Die Gelkammer wird zunächst zur Entfernung von RNasen wie folgt behandelt: Kammer, Gelschlitten und Taschenformer werden mit Spülmittel und destilliertem Wasser gereinigt und mit 70% EtOH nachgespült, 30 min mit 0,2 N NaOH behandelt und anschließend mit DEPC-Wasser ausgespült. Die Agarose wird in 1 × FA-Gelpuffer mehrmals aufgekocht. Nach Abkühlen auf etwa 60 °C werden 37%iges Formaldehyd und Ethidiumbromid zugegeben und es wird, wie unter 3.3.1.1 beschrieben, ein Gel gegossen. Vor der Elektrophorese wird das Gel in 1 × FA-Laufpuffer für mindestens 30 min äquilibriert. Zur präparativen Auftrennung werden RNA-Proben, falls nötig, konzentriert und auf jeweils ein Volumen von 20 µl mit DEPC (Diethylpyrocarbonat)-Wasser aufgefüllt. Nach Zusatz von 1/5 des Volumens an 5 × RNA-Probenpuffer werden die Proben 3-5 min bei 65 °C inkubiert, kurz auf Eis abgekühlt, zentrifugiert (Tischzentrifuge, 30 sec) und auf das Agarosegel aufgetragen (Kammer mit Wasserwaage entsprechend ausrichten). Die Elektrophorese wird in 1 × FA-Gelpuffer bei 30 V so lange durchgeführt, bis Bromphenolblau (BPB) das untere Drittel des Gels erreicht hat (über Nacht). Die RNA wird im Anschluss unter UV-Licht durch das fluoreszierende Ethidiumbromid nachgewiesen.

Denaturierendes Agarosegel (1% Agarose)		5 × RNA-Probenpuffer	
	Menge/300 ml		
Agarose	3 g	10 × FA-Gelpuffer	4 ml
FA-Gelpuffer (10 ×)	30 ml	EDTA (500 mM, pH 8,0)	80 µl
Formaldehyd (37%)	5,4 ml	Glycerin (100%)	2 ml
EtBr (5 mg/ml)	30 µl	BPB-Lösung (gesättigt)	16 µl
DEPC ddH ₂ O	ad 300 ml	Formamid	3084 µl
		ddH ₂ O	ad 10 ml

10 × FA-Gelpuffer		1 × FA-Laufpuffer	
MOPS	0,2 M	10 × FA-Gelpuffer	100 ml
NaOAc	50 mM		
EDTA	10 mM	Formaldehyd 37%	20 ml
DEPC ddH ₂ O	ad 1 l		
pH 7,0 mit NaOH		DEPC ddH ₂ O	ad 1 l

RNasen sind resistent gegen Denaturierung durch Hitze oder Detergenzien und somit nur schwer inaktivierbar. Zur irreversiblen Inhibierung vieler RNasen wird Diethylpyrocarbonat (DEPC) verwendet. DEPC bindet kovalent an primäre und sekundäre Amine und damit auch an Histidin-Seitenketten im katalytischen Zentrum vieler RNasen. Da DEPC als Ethylierungsmittel kanzerogene Eigenschaften besitzt, werden alle Arbeiten mit DEPC unter einem Abzug ausgeführt. 1 ml DEPC wird mit 1000 ml ddH₂O in einer sauberen Glasflasche bei geöffnetem Schraubverschluss über Nacht gerührt. Anschließend wird autoklaviert, um überschüssiges DEPC zu hydrolysieren.

3.3.1.3 Elution von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Zur Isolierung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen werden die mit Hilfe von Ethidiumbromid unter UV-Licht der Wellenlänge 302 nm sichtbar gemachten Nukleinsäure-Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten. Die weitere Aufarbeitung erfolgt mit Hilfe des *Qiaquick Gel Extraction Kits* von *Qiagen* nach Anleitung des Herstellers. Dabei werden die Nukleinsäuren bei hoher Salzkonzentration an die Oberfläche einer Silica-Säule gebunden und, nach Waschen, bei niedriger Salzkonzentration wieder abgelöst.

3.3.2 Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen durch Hybridisierung

Mittels Gelelektrophorese aufgetrennte Nukleinsäuren werden zur weiteren Untersuchung zunächst auf eine Membran transferiert. Nach Fixierung können bestimmte Nukleinsäuren durch Hybridisierung mit entsprechend markierten Nukleinsäuren identifiziert werden.

3.3.2.1 Kapillar-Transfer von Nukleinsäuren aus Agarosegelen auf Membranfilter

Der hier beschriebene Kapillarblot wurde ursprünglich für die Übertragung von DNA entwickelt (Southern, 1975). Die Nukleinsäuren werden aus einem Agarosegel durch Kapillarkräfte auf eine

Membran übertragen. Dies geschieht, indem Blot-Puffer durch Auflegen einer dicken Schicht aus Papiertüchern durch das Gel auf die Membran gesaugt wird (Abb. 3-1). Der Kapillarblot wurde in dieser Arbeit ausschließlich für den Transfer von RNA verwendet (Northern Blot).

Vor dem Transfer wird ein Gel gemäß 3.3.1.2 unter UV-Licht photographiert, vermessen und zur Entfernung des Formaldehyds 10 min in DEPC ddH₂O gewaschen.

Als Transferbrücken dienende lange Streifen Filterpapier werden in 10 × SSC-Puffer getränkt, auf eine Glasplatte über dem 10 × SSC-Flüssigkeitsspiegel gelegt und zu beiden Seiten in das Reservoir aus 10 × SSC-Puffer getaucht. Der weitere Aufbau des Kapillar-Blots erfolgt wie in Abb. 3-1 gezeigt. Zwischen den einzelnen Schichten des Blots sollen keine Luftblasen zurückbleiben.

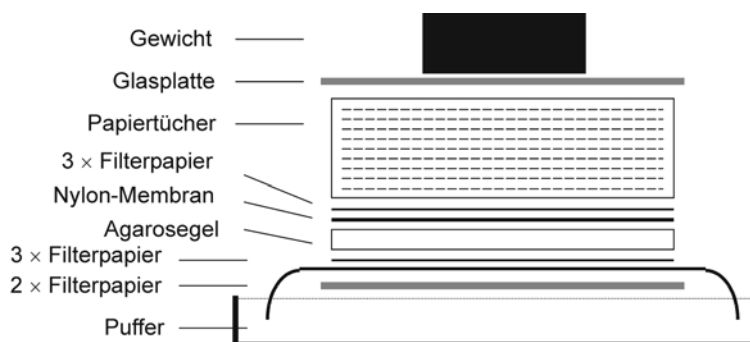


Abb. 3-1: Schematischer Aufbau des Kapillar-Blots.

Die Transferzeit beträgt 16-24 h. Es wurden positiv geladene Nylon-Membranen verwendet. Nach dem Transfer wird die Membran kurz in 2 × SSC-Puffer gewaschen, um noch anhaftende Agarose zu entfernen. Zur Fixierung der RNA wird die Membran 1 h im Vakuumofen (2 mbar, 80 °C) gebacken.

10 × SSC	
NaCl	1,5 M
Natriumcitrat	0,15 M
	pH 7,0

3.3.2.2 Hybridisierung von immobilisierten Nukleinsäuren mit radioaktiv markierten Nukleinsäurefragmenten

Lösliche komplementäre Nukleinsäuren binden unter bestimmten Bedingungen an immobilisierte RNA (3.3.2.1). Dabei ermöglicht die radioaktive Markierung der DNA-Sonde die Detektion der Nukleinsäure mittels Autoradiographie.

Vor Beginn der Hybridisierung wird die Schmelztemperatur (T_m) der Sonde bei optimaler Basenpaarung abgeschätzt (vgl. 3.3.4).

Die Membran wird in eine verschließbare Kunststoffschale gelegt und zur Vorhybridisierung 1 h bei 50 °C mit Vorhybridisierungslösung (40 ml pro 100 cm² Membran) unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Hybridisierung erfolgt unter gleichen Bedingungen wie die Vorhybridisierung. Der Hybridisierungspuffer enthält zusätzlich 50% Formamid sowie die radioaktiv markierte Sonde (3.3.2.3) in einer Konzentration von 10⁵ cpm/ml. Alternativ wird zur Vorhybridisierung und Hybridisierung *Rapid-hyb Buffer* von *Amersham Biosciences* nach Anleitung des Herstellers eingesetzt. Nach der Hybridisierung wird die Membran in Waschlösung gewaschen (nacheinander mit 5 × SSC, 0,1% (w/v) SDS; 1 × SSC, 0,1% (w/v) SDS; 0,1 × SSC, 0,1% (w/v) SDS). Man beginnt das Waschen bei 40 °C und erhöht dann die Temperatur in 5 °C-Schritten (bis maximal 5 °C unter die Hybridisierungstemperatur). Bei jeder Temperatur wird 10 min gewaschen. Die Temperatur wird so lange erhöht, bis das Signal mit dem Geigerzähler gerade noch detektierbar ist (2-5 cps). Die Membran wird noch feucht in stabile Folie eingeschweißt und ein Röntgenfilm mit Verstärkerfolie aufgelegt. Die Autoradiographie erfolgt bei -80 °C für mehrere Tage. Das Bandenmuster kann ebenfalls durch Exposition in einer PhosphoImager Kassette analysiert werden.

Vorhybridisierungspuffer		Hybridisierungspuffer	
20 × SSC	5 ×	Vorhybridisierungslösung +	
Na-Phosphat (pH 7,0)	20 mM	50% Formamid + 10 ⁵ cpm	
50 × Denhardts Reagenz	1 ×	[³² P]-markierte DNA-	
Lachs-DNA	100 µg/ml	Sonde/ml (3.3.2.3)	
SDS	0,1% (w/v)		
50 × Denhardts Reagenz		20 × SSC	
Ficoll 40	5% (w/v)	NaCl	3 M
Polyvinylpyrrolidon	5% (w/v)	Natriumcitrat	0,3 M
Rinderserumalbumin	5% (w/v)		pH 7,0

Die gebundene Sonde kann durch hohe Waschttemperaturen abgelöst werden. Hierzu wird die Membran in 0,1 × SSC, 0,1% (w/v) SDS aufgekocht, unter Rühren auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend direkt in Vorhybridisierungspuffer überführt. Die Membran kann so für weitere Hybridisierungsreaktionen verwendet werden.

3.3.2.3 Markierung von DNA-Fragmenten mit [α - 32 P]dCTP

Eine Möglichkeit der radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten ist die Methode des *Random Priming*. Hierbei hybridisieren hexamere Oligonukleotide quasi zufällig an die Templat-DNA. Diese Oligonukleotide dienen als *Primer* für DNA-Polymerasen, in Gegenwart eines oder mehrerer radioaktiv markierter Nukleotide wird dann radioaktiv markierte DNA generiert. Die Markierung wird mit Hilfe des *Ready-to-go DNA labelling Kits (-dCTP)* von *Amersham Biosciences* nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Zur Markierung werden je Ansatz 50 μ Ci [α - 32 P]dCTP eingesetzt. Nach Abschluss der Reaktion wird der Reaktionsansatz mittels Gelfiltration (Sephadex G-50) zur Entfernung nicht inkorporierter Nukleotide aufgereinigt. Hierzu wird 1 ml gequollenes, in TE-Puffer äquilibriertes und autoklaviertes Sephadex G-50 in eine mit Watte verschlossene 1 ml Spritze gefüllt. Überschüssiger Puffer wird abzentrifugiert. Auf die vorbereitete Säule wird der Reaktionsansatz (mit ddH₂O auf 100 μ l aufgefüllt) aufgetragen. Es wird zentrifugiert und einmal mit 100 μ l TE-Puffer nachgewaschen. Vom Zentrifugat wird 1 μ l zur Szintillationsmessung eingesetzt.

TE-Puffer	
Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM
	pH 7,5 bzw. 8,0

3.3.3 Isolierung von Nukleinsäuren

3.3.3.1 Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren

Durch Ethanolzugabe können Nukleinsäuren quantitativ aus wässrigen Lösungen ausgefällt werden. Dabei wird die Hydrathülle der Nukleinsäuren gestört, ihre Aggregation erleichtert und die Löslichkeit herabgesetzt. Die Gegenwart monovalenter Kationen (Li⁺, Na⁺, NH₄⁺) verstärkt diesen Effekt. Die Alkalisalze der Nukleinsäuren sind in 70%igem EtOH nahezu unlöslich.

Die Präzipitation erfolgt durch Zugabe von 0,1 Vol. 3 M NaOAc (pH 6,0) und 2,5 Vol. 96%igem EtOH. Der Ansatz wird mindesten 1 h bei -20 °C inkubiert. Nukleinsäuren werden durch Zentrifugation (Heraeus Biofuge 28 RS, 4 °C, 17 000 UpM, 30 min) sedimentiert. Das Sediment wird mit 1 Vol. kaltem (-20 °C) 70%igem EtOH gewaschen und abzentrifugiert (Heraeus Biofuge 28 RS, 4 °C, 17 000 UpM, 10 min). Nach quantitativem Entfernen des Überstands wird das Nukleinsäuresediment mittels Speed Vac getrocknet und anschließend in ddH₂O oder Puffer aufgenommen. Die Konzentration der Nukleinsäurelösung wird wie unter 3.3.3.2 bestimmt.

3.3.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wässriger Lösung

UV-Spektroskopische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Das Absorptionsmaximum der Purin- und Pyrimidinbasen von Nukleinsäuren liegt im UV-Bereich bei 260 nm. Durch den direkten Zusammenhang zwischen Absorption und Konzentration der Basen wird die Konzentrationsbestimmung durch Messung der Absorption bei 260 nm (A_{260}) möglich. Bedingt durch den Hypochromie-Effekt unterscheiden sich die Extinktionskoeffizienten für doppel- und einzelsträngige Nukleinsäuren. Die zusätzliche Messung der Absorption bei 280 nm (A_{280}), dem Absorptionsmaximum von aromatischen Aminosäureresten, ermöglicht eine Aussage über den Anteil an Protein in der Lösung. Der Quotient A_{260}/A_{280} soll für DNA bei 1,8 liegen bzw. für RNA bei 2,0. Dabei entspricht eine A_{260} -Einheit ca. 50 $\mu\text{g/ml}$ dsDNA bzw. 33 $\mu\text{g/ml}$ ssRNA.

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgt durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm und 280 nm gegen das Lösungsmittel als Referenz in einer 100 μl Küvette.

Quantifizierung von Nukleinsäuren durch Ethidiumbromidbindung

Bei Nukleinsäuremengen, die unterhalb des Messbereichs eines UV-Spektralphotometers liegen, können Ethidiumbromidplatten zur Konzentrationsbestimmung verwendet werden. Der Farbstoff Ethidiumbromid interkaliert dabei zwischen die GC-Paare von dsDNA. Mittels UV-Licht (302 nm) wird Ethidiumbromid zur Fluoreszenz angeregt. Dabei ist die Intensität der Fluoreszenz direkt abhängig von der Menge der vorhandenen DNA, weshalb eine Quantifizierung bei Vergleich mit einem Standard möglich ist.

Zur Durchführung wird eine 0,8%ige Agarose-Lösung in TBE-Puffer (vgl. 3.3.1.1) hergestellt, mit Ethidiumbromid (1 $\mu\text{g/ml}$ Endkonzentration) versetzt und in kleine PP-Petrischalen gegossen. Als Standard werden Verdünnungen (10-200 ng/ μl) einer Nukleinsäurelösung mit bekannter Konzentration vorbereitet und je 0,5 μl vorsichtig auf die Ethidiumbromidplatten aufgetragen. Von der untersuchten Nukleinsäurelösung werden ebenfalls 0,5 μl aufgetragen. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur ist die Flüssigkeit in die Platte eingezogen, die dann unter UV-Licht analysiert wird.

Die Ethidiumbromidplatten können unter Lichtausschluss bei 4 °C über mehrere Wochen gelagert werden.

3.3.3.3 Abtrennung von Proteinen aus wässrigen Nukleinsäurelösungen

Zum Entfernen von Proteinen aus wässrigen Protein-Nukleinsäurelösungen wird die Lösung mit 1 Vol. TE gesättigtem Phenol (pH 8,0) extrahiert. Nach Zentrifugation (Eppendorf 5415 C, 12000 UpM, Rotor F45-18-11, Raumtemperatur, 5 min) enthält die wässrige Phase die Nukleinsäuren und wird abgenommen. Die Phenolphase wird mit 1 Vol. TE gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden anschließend zweimal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert und die Nukleinsäuren abschließend mit EtOH gefällt (3.3.3.1).

3.3.3.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab

Nach Ligation eines PCR-Fragments in einen Vektor, Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen und Selektion durch Antibiotika auf LB-Platten werden einzelne Klone von der Agar-Platte abgenommen und in antibiotikahaltigem Nährmedium über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert (Infors Rundschüttler HT, 160 UpM).

Die Aufarbeitung der Kulturlösung (5 ml) zur Isolierung der Plasmid-DNA erfolgt mit dem *NucleoSpin® Plasmid Kit* von *Macherey und Nagel* nach Anleitung des Herstellers. Das Prinzip dieser Isolierung basiert auf alkalischer Lyse der Bakterien, Fällung verunreinigender Proteine und anschließender Bindung der Plasmid-DNA an eine Silicamatrix unter Hochsalzbedingungen. Nach mehrfachem Waschen erfolgt die Elution mit zweimal 30 µl ddH₂O. Die durchschnittliche Ausbeute beträgt 15-20 µg DNA pro Ansatz.

Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab

Wie bei der Plasmidisolierung im analytischen Maßstab werden die Nukleinsäuren im ersten Schritt durch alkalische Lyse freigesetzt, dann aber über Anionenaustauscher-Säulenchromatographie aufgereinigt. Hierzu werden Chromatographie-Säulen der Firma *Macherey und Nagel* (Nucleobond AX500, AX1000) nach Herstellervorschrift verwendet.

500 ml antibiotikahaltiges LB-Medium werden mit der Vorkultur eines Klons angeimpft und 15-20 h bei 37 °C geschüttelt (Infors Inkubationsrundschtüttler HT, 120 UpM). Nach Abzentrifugieren (Beckman Kühlzentrifuge J-6B, Rotor JA10, 4000 UpM, 4 °C, 10 min) wird der Überstand abgetrennt und das Bakteriensediment nach Anleitung des Herstellers weiterbehandelt.

Die isolierte Plasmid-DNA wird in 500 µl TE-Puffer (3.3.2.3) aufgenommen und die Konzentration spektralphotometrisch bestimmt (3.3.3.2).

3.3.3.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial erfolgt mit Hilfe des *RNeasy Plant Mini Kits* der Firma *Qiagen* nach Anleitung des Herstellers. Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Keimlingen, Wurzeln und Sprossmaterial von Pflanzen wird Puffer RLT (enthält Guanidiniumisothiocyanat) verwendet, für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Kotyledonen dagegen der Puffer RLC (enthält Guanidiniumhydrochlorid). Aufgrund der besseren Eigenschaften bezüglich der Denaturierung ist für die meisten Anwendungen Puffer RLT besser geeignet. Abhängig vom Gewebe, z.B. bei stärkehaltigem Endosperm, kann die Zugabe von Guanidiniumisothiocyanat zur Verfestigung der Probe führen. In solchen Fällen ist die Verwendung von Puffer RLC sinnvoll. Bei der Isolierung von RNA aus Kotyledonen ist rasches Aufarbeiten notwendig, um ein Quellen der Stärke zu verhindern. Zur vollständigen Entfernung von DNA erfolgt zusätzlich eine Behandlung mit RNase-freier DNase I nach Anleitung des Herstellers. Die Lösungen werden bei -80 °C aufbewahrt. Ein Aliquot der isolierten Gesamt-RNA in wässriger Lösung wird zur Konzentrationsbestimmung spektralphotometrisch vermessen.

3.3.4 Amplifizierung von DNA durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Durch die Verwendung thermostabiler DNA-Polymerasen kann eine DNA-Matrize in einer wiederholten Reaktion amplifiziert werden. Die Polymerasekettenreaktion besteht im Wesentlichen aus drei sich wiederholenden Schritten:

- 1) Denaturierung: Bei 94 °C wird die doppelsträngige DNA-Matrize in ihre beiden Einzelstränge getrennt.
- 2) Hybridisierung (Annealing): Beim Hybridisierungsschritt binden die beiden Startsequenzen (*Primer*) an die DNA-Matrize. Dabei wird eine Temperatur gewählt, die $3\text{-}5\text{ °C}$ unter der Schmelztemperatur (T_m) des Matrizen/Oligodesoxynukleotid-Hybrids liegt. Die *primerspezifische* Hybridisierungstemperatur kann nach der Formel zur Berechnung des Schmelzpunktes bestimmt werden. Für Oligonukleotide bis zu 25 Basenpaaren gilt (Sambrook und Russel, 2001):

$$T_m (\text{°C}) = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$$

- 3) Polymerase-Reaktion: Im Elongationsschritt werden die zuvor an die Matrize hybridisierten Oligodesoxynukleotide durch die DNA-Polymerase verlängert. Die verwendeten Polymerasen besitzen ein Temperaturoptimum von $72\text{-}78\text{ °C}$.

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Amplifizierung von DNA die hitzestabilen Enzyme *Tth*-DNA-Polymerase (aus dem Eubakterium *Thermus thermophilus*) und *Pfu*-DNA-Polymerase (aus dem Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus*) verwendet. Die PCR-Reaktionen erfolgten in

einem Thermocycler mit Heizdeckel (*Hybaid, Omnigene*). Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde ausschließlich mit aerosoldichten Pipettenspitzen gearbeitet.

3.3.4.1 Polymerasekettenreaktion zur Amplifizierung von DNA-Matrizen

Wird bei der Amplifizierung von DNA-Fragmenten eine hohe Genauigkeit angestrebt, so wird bevorzugt die *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet (Lundberg *et al.*, 1991; Cline *et al.*, 1996). Dieses Enzym verfügt zusätzlich über eine 3'→5' Exonucleaseaktivität, die sogenannte *proof-reading*-Funktion. Analytische PCR-Reaktionen erfolgen in einem Volumen von 20 µl, präparative Ansätze in 50 µl.

Amplifizierung von DNA mittels PCR	
Reaktionsansatz (20 µl)	Endkonzentration
1-10 µl Plasmid DNA (1 ng/µl)	0,1-1 ng/µl
1 µl 5'-Startoligonukleotid (10 µM)	0,5 µM (1,25 ng/µl)
1 µl 3'-Startoligonukleotid (10 µM)	0,5 µM (1,25 ng/µl)
0,5 µl dNTP-Mix (10 mM)	250 µM
2 µl 10 × <i>Pfu</i> -Puffer	1 ×
1 µl <i>Pfu</i> -Polymerase (2,5 U/µl)	125 mU/µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

Für eine Standardreaktion werden folgende Programmparameter gewählt:

PCR-Programm zur Amplifizierung von DNA				
	Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Stufe 1	Denaturierung	94 °C	120 sec	1
Stufe 2	Denaturierung	94 °C	30 sec	30-40
	Hybridisierung	T _m – (2-4 °C)	45 sec	
	Elongation	72 °C	je nach Länge des Produktes	
Stufe 3	Abschlussphase	72 °C	300 sec	1
		25 °C	Hold	

Als Faustregel für die Bestimmung der Elongationsdauer rechnet man 1 min je 1000 bp zu amplifizierender DNA für *Tth*-Polymerase und 2 min je 1000 bp für *Pfu*-Polymerase.

Nach der PCR wird zur Analyse jeweils ein Aliquot jedes Ansatzes (5-10 µl) mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt (3.3.1.1).

3.3.4.2 Kombinierte Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Durch die Kombination von reverser Transkription (RT) und anschließender PCR ist es möglich, aus RNA die entsprechende komplementäre DNA (cDNA) zu amplifizieren. Für die Synthese des cDNA-Erststrangs wird MMLV-Reverse Transkriptase (*Stratascript* von *Stratagene*) verwendet. Zur Denaturierung wird die RNA 5 min bei 70 °C gehalten und anschließend auf Eis abgeschreckt.

(RT-PCR)-RT-Reaktionsansatz	
Reaktionsansatz (50 µl)	Endkonzentration
(PolyA ⁺)-RNA 5-10 µg	0,1-0,2 µg/µl
5 µl 10 × MMLV-Puffer	1 ×
5 µl dNTP-Mix (10 mM)	1 mM
5 µl T-Mix (100 µM je <i>Primer</i>)	4 µM
0,5 µl DTT (100 mM)	1 mM
1 µl RNasin	
75 U <i>Stratascript</i> RT	1,5 U /µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

Die reverse Transkription erfolgt für 90 min bei 37 °C. Zur Kontrolle der Erststrangsynthese werden 5 µl des Reaktionsansatzes mit 0,5 µl [α -³²P]dATP versetzt und identisch behandelt. Der Kontrollansatz wird auf einem Agarosegel aufgetrennt, nach Trocknen des Gels wird ein Röntgenfilm bei -80 °C aufgelegt. Die Aufreinigung und Entsalzung des Reaktionsansatzes erfolgt, nach Auffüllen auf ein Volumen von 500 µl mit ddH₂O, mittels Ultrafiltration (*microcon-30*, Ausschlussgrenze 30 kD). Das Retentat (20 µl) wird zur Amplifikation eingesetzt. Die Auswahl des PCR-Programms erfolgt wie unter 3.3.4.1 dargestellt.

(RT-PCR)-PCR-Ansatz	
Reaktionsansatz (20 µl)	Endkonzentration
1 µl Retentat	
2 µl 5'-Oligonukleotid (10 µM)	1 µM
2 µl 3'-Oligonukleotid (10 µM)	1 µM
5 × <i>Tth</i> -Puffer	1 ×
2 µl dNTP-Mix (2 mM)	200 µM
ddH ₂ O	ad 20 µl

5 × <i>Tth</i>-Puffer	
	Endkonzentration
Tris-HCl pH 9,0	250 mM
MgCl ₂	7,5 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	100 mM

3.3.4.3 Kolonie-PCR

Durch Kolonie-PCR (Güssow und Clackson, 1989) ist es möglich, innerhalb kurzer Zeit eine große Zahl Bakterienkolonien auf das Vorhandensein eines klonierten *Inserts* hin zu untersuchen.

Für jede Kolonie werden 20 µl *Mastermix* vorbereitet und in einem PCR-Reaktionsgefäß vorgelegt. Eine Bakterienkolonie wird mit einer sterilen Ausstrichöse aufgenommen und an eine nummerierte Position auf einer frischen Agar-Platte übertragen, um eine Sicherungskopie des Klons anzulegen. Die Platte wird über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Ausstrichöse wird dann sofort in ein Aliquot PCR-*Mastermix* übertragen und die PCR-Reaktion gestartet (PCR-Programm, vgl. 3.3.4.1). Das Ergebnis der Kolonie-PCR wird mit einem Agarosegel analysiert (3.3.1.1).

<i>Mastermix</i> (20 µl/Kolonie)		
	Endkonzentration	Volumen
10 µM 5'-Oligonukleotid	1 µM	2 µl
10 µM 3'-Oligonukleotid	1 µM	2 µl
10 mM dNTP-Mix	200 µM	0,4 µl
5 × <i>Tth</i> -Puffer	1 ×	4 µl
5 U/µl <i>Tth</i> -Polymerase	25 mU/µl	0,1 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl	

3.3.4.4 Oligodesoxynukleotid-vermittelte bidirektionale Mutagenese

Durch PCR-gestützte bidirektionale Mutagenese können DNA-Sequenzen *in vitro* gezielt verändert werden. Dabei können eine oder mehrere Basen ausgetauscht, deletiert oder insertiert werden. Hierzu wird zirkuläre *dam*⁺-Plasmid-DNA, die das *Insert* trägt, in einer PCR-Reaktion zusammen mit zwei zueinander komplementären *Primern* eingesetzt, die jeweils in ihrer Mitte die Mutation enthalten, die eingeführt werden soll. Da die mutagenen Startsequenzen durch die DNA-Polymerase verlängert werden, entsteht eine lineare Kopie der Plasmid-DNA mit der entsprechenden Mutation. Durch anschließende Zugabe von *Dpn* I, einem Restriktionsenzym,

welches methylierte DNA hydrolysiert (Erkennungssequenz = 5'-G^{me6}ATC-3'), wird das Wildtyp-Plasmid abgebaut. Die verbleibenden linearen, zueinander komplementären DNA-Moleküle aus der PCR-Reaktion hybridisieren zu einem doppelsträngigen Molekül und werden direkt in kompetente Zellen transformiert. Durch den zelleigenen Reparaturmechanismus werden die hybridisierten Moleküle zum Plasmid ligiert. Mit dieser Methode erhält man Mutationsraten von über 80% (Picard *et al.*, 1994; Weiner *et al.*, 1994).

Die verwendeten Oligonukleotid-Startsequenzen müssen folgendermaßen beschaffen sein: die verwendeten *Primer* müssen zueinander komplementär sein. Die gewünschte Mutation sollte in der Mitte der Sequenz mit 10-15 Basen Wildtyp-Sequenz auf beiden Seiten liegen, die Sequenz sollte mit einer G- oder C-Base abschließen. Ihre Länge sollte zwischen 25-45 Basen liegen, der GC-Gehalt bei 40% und ihre $T_m \sim 10$ °C über der Elongationstemperatur der DNA-Polymerase.

Bidirektionale Mutagenese-PCR	
Reaktionsansatz (50 µl)	Endkonzentration
X µl Plasmid DNA (10-50 ng/µl)	0,2-1 ng/µl
1,25 µl 5'-Startoligonukleotid (10 µM)	0,25 µM
1,25 µl 3'-Startoligonukleotid (10 µM)	0,25 µM
1 µl dNTP-Mix (10 mM)	200 µM
5 µl 10 × <i>Pfu</i> -Puffer	1 ×
1 µl <i>Pfu</i> -Polymerase (2,5 U/µl)	0,05 U/µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

Die Zyklenzahl des PCR-Programms hängt von Templat und Startsequenzen ab. Für das Einfügen einer Punktmutation sind 12 PCR-Zyklen ausreichend, für den Austausch einer Aminosäure werden 16 PCR-Zyklen durchgeführt und für die Deletion oder Insertion mehrerer Aminosäuren 18 Zyklen.

PCR Programm				
	Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Stufe 1	Denaturierung	95 °C	120 sec	1
Stufe 2	Denaturierung	95 °C	30 sec	12-18
	Hybridisierung	$T_m - (3-5$ °C)	60 sec	
	Elongation	68 °C	120 sec/kb	
Stufe 3	Abschlussphase	68 °C	480 sec	1

Die Matrizen-DNA der Mutagenese-Ansätze wird durch 10 U *Dpn I* Restriktionsendonuklease hydrolysiert (3.3.6.1). Mit 1-5 µl dieses Ansatzes werden kompetente Zellen direkt transformiert (3.3.6.7). Die Plasmid-DNA (3.3.3.4) der transformierten Klone wird durch Sequenzierung (3.3.5) auf die entsprechende Mutation hin untersucht.

3.3.4.5 Amplifizierung von DNA-Enden (RACE)

Eine cDNA mit vollständigem 5'-Ende erhält man nur selten bei Herstellung und *Screening* von cDNA-Bibliotheken. Oft fehlt, vor allem bei großen Transkripten, das 5'-Ende mit möglichen nichttranslatierten Regionen (UTRs), da reverse Transkriptasen häufig nicht durch eine gesamte Gensequenz lesen können. Daher entwickelte man Methoden, mit denen es möglich ist, Abschnitte zwischen einer definierten internen Stelle und unbekanntem Sequenzen entweder am 3'- oder am 5'-Ende der mRNA zu amplifizieren. Diese Methoden werden auch als RACE bezeichnet (*rapid amplification of cDNA ends*) (Frohmann, 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde eine 5'-RACE durchgeführt. Hierzu fand der *5'/3' RACE Kit, 2nd Generation* der Firma *Roche* Verwendung. Für die Synthese des Erststrangs wurde Gesamt-RNA aus keimenden Erbsen eingesetzt. Als genspezifische *Primer* wurden RACE Gsp 1a, RACE Gsp 2a und RACE Gsp 3a (3.1.2) verwendet. Es wurde nach Anleitung des Herstellers verfahren.

3.3.4.6 Analyse und Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Reaktionen werden durch elektrophoretische Auftrennung auf einem Agarosegel analysiert (3.3.1.1). Soll ein spezielles DNA-Fragment aus dem PCR-Ansatz isoliert werden, wird die gesuchte Bande aus einem präparativen Agarosegel ausgeschnitten und die DNA mit dem *Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen)* nach Anleitung des Herstellers aus der Gelmatrix eluiert (3.3.1.3).

3.3.5 Sequenzierung von DNA mit AmpliTaq Polymerase FS BigDye Terminator

Die DNA-Sequenzierung mit dem *Abi PRISM Genetic Analyzer* beruht auf der Markierung der Terminationsbasen mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (*BigDye Terminator*). Die Fluoreszenzfarbstoffe besitzen eine unterschiedliche Emissionswellenlänge. Die Templat-abhängige Startsequenzverlängerung erfolgt mit AmpliTaq Polymerase FS im PCR-Block. Im Reaktionsansatz ist dGTP durch dITP ersetzt, um Gelkompression zu vermeiden.

Sequenzierreaktion mit AmpliTaq Polymerase FS BigDye	
Sequenzieransatz (10 µl)	Menge/10 µl
DNA	1-7 µl
Startsequenz (3,2 µM)	1 µl
BigDye-Terminator-Mix	2 µl
ddH ₂ O	ad 10 µl

Die entsprechende Menge an DNA (5-100 ng für PCR-Produkte, 100 ng ssDNA bzw. 500 ng dsDNA) wird mit 1 µl Startsequenz hybridisiert und mit 2 µl BigDye-Terminator-Mix versetzt. Anschließend wird die unidirektionale PCR-Reaktion gestartet:

PCR Programm zur Sequenzierung mit AmpliTaq Polymerase			
Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Denaturierung	96 °C	30 sec	25 ×
Hybridisierung	50 °C	15 sec	
Elongation	60 °C	240 sec	

Der Reaktionsansatz wird auf 100 µl mit ddH₂O aufgefüllt und mit Ethanol gefällt (3.3.3.1). Der Ansatz wird bei -20 °C gehalten, anschließend sedimentiert (Heraeus Biofuge 28 RS, 4 °C, 17 000 UpM, 20 min) und zweimal mit je 250 µl kaltem 70%igem EtOH gewaschen (Heraeus Biofuge 28 RS, 4 °C, 17 000 UpM, 20 min). Das Sediment wird mittels Speed-Vac getrocknet.

Das getrocknete Präzipitat wird in 15 µl TSR-Lösung aufgenommen, denaturiert (95 °C, 2 min), auf Eis abgeschreckt und bis zur Analyse bei 4 °C gelagert.

3.3.6 Klonierung von Fremd-DNA in Plasmid-Vektoren

3.3.6.1 Präparation von Plasmidvektoren durch Restriktionshydrolyse

Zur Präparation eines Klonierungsvektors linearisiert man 10 µg des entsprechenden Plasmids mit geeigneten Restriktionsendonukleasen. Die Vollständigkeit der Spaltung wird durch ein Agarosegel überprüft (3.3.1.1).

Die Mehrzahl der Restriktionsendonukleasen spaltet doppelsträngige DNA spezifisch innerhalb einer 4-8 Nukleotide langen palindromen Erkennungssequenz, wobei abhängig von der Nuklease kohäsive oder glatte Enden erzeugt werden.

Präparative Restriktionshydrolyse von DNA

Reaktionsansatz (100 µl)	Endkonzentration
25 µg Plasmid	0,25 µg/µl Plasmid
10 µl 10 × Reaktionspuffer	1 × Reaktionspuffer
10 U Restriktionsendonuklease	0,1 U/µl
ddH ₂ O	ad 100 µl

Temperatur und Dauer der Inkubation sowie die Reaktionspuffer hängen vom verwendeten Enzym ab und richten sich nach den Herstellerangaben. Bei der Hydrolyse mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen werden die Reaktionen nacheinander durchgeführt. Zum Wechseln des Reaktionspuffers wird der Ansatz einer Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-fällung unterworfen.

3.3.6.2 Dephosphorylierung linearisierter Plasmide mit Alkalischer Phosphatase (CIP oder SAP)

Eine Eigen-Ligation eines nur mit einem Restriktionsenzym linearisierten Vektors wird durch dessen Dephosphorylierung am 5'-Ende verhindert (Sambrook und Russel, 2001). Die Reaktion kann direkt im Plasmid-Linearisierungsansatz (3.3.6.1) erfolgen:

Dephosphorylierung von DNA durch CIP oder SAP

Reaktionsansatz	Endkonzentration
100 µl Linearisierungsansatz	0,25 µg/µl Plasmid-DNA
10 µl 10 × CIP- oder SAP-Reaktionspuffer	1 × Reaktionspuffer
0,5 µl CIP oder SAP (0,5 U/µl)	0,0025 U/µl CIP oder SAP (ca. 10 mU/pmol 5'-Enden)

Die Inkubation des Ansatzes erfolgt für 30 min bei 37 °C. Es wird dann ein weiteres Aliquot CIP (*Calf intestine phosphatase*) oder SAP (*Shrimp alkaline phosphatase*) zugesetzt und die Inkubation wiederholt. Zur Inaktivierung von CIP werden 25 µl 40 mM NTA (Nitrilotriacetat) zugegeben und der Reaktionsansatz anschließend für 15 min bei 68 °C inkubiert. SAP wird durch Erhitzen inaktiviert. Die Aufreinigung des hydrolysierten Vektors erfolgt mittels präparativem Agarosegel und anschließender Elution (3.3.1.3). Zur Überprüfung der Dephosphorylierung wird der Vektor in einem Ligationsansatz ohne DNA-Fragment eingesetzt.

3.3.6.3 Erzeugung glatter Enden und 5'-Phosphorylierung von PCR-Produkten

Während der PCR entstehen durch das Anhängen einzelner Nukleotide durch die DNA-Polymerase (*Tth*-Polymerase) 3'-überhängende Enden. Um eine erfolgreiche Ligation von Fragmenten mit glatten Enden (*blunt-end* Ligation) durchführen zu können, werden deshalb am 5'-Ende des komplementären Strangs mit Hilfe des Klenow-Fragments die entsprechenden Nukleotide angefügt. Davor wird der PCR-Ansatz zur Zerstörung der *Tth*-Polymerase 10 min bei 95 °C inkubiert.

Erzeugung glatter Enden mit dem Klenow-Fragment	
Reaktionsansatz	Endkonzentration
50 µl PCR-Ansatz	
MgCl ₂	7 mM
dNTP-Mischung (100 µM)	10 µM
1 µl Klenow-Fragment (5-10 U/µl)	0,1-0,5 U/µl

Die Reaktion erfolgt für 20 min bei Raumtemperatur. Anschließend wird das Enzym 10 min bei 74 °C hitzeinaktiviert.

Der Reaktionsansatz wird einer Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung unterworfen (3.3.3.1 und 3.3.3.3). Alternativ kann eine Aufreinigung mittels Agarosegel-Elektrophorese und nachfolgender Elution des Fragments aus dem Gel erfolgen (3.3.1.3).

Aufgrund der Synthesemethode der *Primer* besitzen PCR-Produkte kein 5'-Phosphat und müssen daher vor der Ligation in einen dephosphorylierten Vektor phosphoryliert werden.

Der Ansatz wird in 16 µl ddH₂O aufgenommen, mit Reaktionspuffer, rATP und T4-Polynukleotid-Kinase supplementiert und für 90 min bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wird für 10 min bei 68 °C inaktiviert und der Ansatz mittels präparativem Agarosegel und anschließender Gelelution (3.3.1.3) aufgereinigt.

Phosphorylierung glatter Enden mit PNK	
Reaktionsansatz (20 µl)	Endkonzentration
PCR-Ansatz	-
1 µl ATP (10 mM)	0,5 mM ATP
1 µl PNK (10 U/µl)	0,5 U/µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

3.3.6.4 Erzeugung von kohäsiven Enden

Die Einführung entsprechender Restriktionsschnittstellen bei PCR-Produkten und nachfolgende Erzeugung kohäsiver Enden mittels Restriktionshydrolyse (3.3.6.1) ermöglicht die gerichtete Klonierung von PCR-Produkten in einen entsprechenden Vektor.

Der PCR-Ansatz wird einer Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung unterworfen (3.3.3.1 und 3.3.3.3). Alternativ kann eine Aufreinigung mittels Agarosegel-Elektrophorese und nachfolgender Elution des Fragments aus dem Gel erfolgen (3.3.1.3). Die Restriktionshydrolyse wird wie unter 3.3.6.1 durchgeführt.

Abschließend erfolgt eine Aufreinigung mittels Agarosegel-Elektrophorese und nachfolgender Elution des Fragments aus dem Gel (3.3.1.3).

3.3.6.5 Ligation von PCR-Produkten

DNA-Fragmente können in einen linearisierten Vektor mit kompatiblen Enden ligiert werden. Die T4-DNA-Ligase katalysiert dabei die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphat- und der 3'-Hydroxylgruppe zweier benachbarter Nukleotide. Grundsätzlich werden zwei Arten der Ligation unterschieden: während bei der *blunt-end* Ligation DNA-Fragmente mit glatten Enden verknüpft werden, werden bei der *sticky-end* Ligation DNA-Fragmente mit komplementären 3'- bzw. 5'-kohäsiven Enden miteinander verknüpft. Ein experimenteller Vorteil der *sticky-end* Ligation liegt darin, dass die Spaltung des Vektors mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen und entsprechender Präparation der Fremd-DNA es ermöglicht, ein *Insert* gerichtet in ein Plasmid einzufügen.

Für eine effektive Ligation sollte das zu insertierende DNA-Fragment im 10-fachen molaren Überschuss zum Vektor vorliegen (ca. 0,05 pmol Vektor zu 0,5 pmol *Insert*).

Ligation von Fragmenten mit kohäsiven Enden	
Reaktionsansatz (10 µl)	Endkonzentration
X µl DNA-Fragment	ca. 100 ng bzw. 0,5 pmol
1 µl dephosphorylierter Vektor	ca. 100 ng bzw. 0,05 pmol
10 × T4 DNA-Ligase-Puffer	1 × T4 DNA-Ligase-Puffer
1 µl T4 DNA-Ligase (1 U/µl)	0,1 U/µl
ddH ₂ O	ad 10 µl

Für *blunt-end* Ligationen wird die 50-fache Enzymmenge zugefügt. Die Ligation von glatten Enden sollte in jedem Fall bei niedrigen Temperaturen über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden. Standard sind Inkubationszeiten von 24 h oder mehr bei 14 °C.

Der Ligationsansatz wird direkt zur Transformation chemokompetenter Zellen eingesetzt (3.3.6.7).

3.3.6.6 Präparation chemokompetenter Zellen (Hanahan, 1983)

Das Prinzip der Herstellung chemokompetenter Zellen besteht darin, die Zellwand der Bakterien durch Behandlung mit Ionen (Ca^{2+} , hier auch Rb^+) so weit durchlässig zu machen, dass die natürliche Aufnahme freier Plasmid-DNA auf ein Maximum gesteigert wird. Es ist wichtig, zur Präparation Bakterien zu verwenden, die die logarithmische Wachstumsphase noch nicht überschritten haben ($\text{OD}_{580} < 0,5$).

Ein Verdünnungsausstrich eines *E. coli*-Stammes wird 36 h bei 37 °C auf Minimalplatte inkubiert. 2 ml SOB-Medium werden mit einer der Bakterienkulturen angeimpft und unter Schütteln über Nacht inkubiert (Infors Rundschüttler HT, 180 UpM, 37 °C). Mit 1 ml dieser Vorkultur werden 100 ml SOC-Medium in einem 1 l Erlenmeyerkolben angeimpft und bis zu einer optischen Dichte $\text{OD}_{580} = 0,5$ weiterschüttelt. Um eine hohe Transformationsrate zu erreichen, ist es wichtig, für die folgenden Schritte die angegebenen Temperaturen einzuhalten und rasch zu arbeiten. Hat die Kultur die erforderliche Zelldichte erreicht, wird die Zellsuspension auf Eis abgekühlt, in zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, 15 min auf Eis gelagert und anschließend zentrifugiert (Beckman J6-B, Rotor JA-10, 2500 UpM, 4 °C, 10 min). Der Überstand wird verworfen und das Sediment vorsichtig in 33,3 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach 15 min auf Eis werden die Zellen erneut sedimentiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 8 ml eisgekühlter RF2-Lösung aufgenommen. Die Zellen werden in flüssigem Stickstoff zu 200 µl Aliquots schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

SOC-Medium		SOB-Medium	
NaCl	10 mM	NaCl	5 mM
KCl	2,5 mM	KCl	2,5 mM
Bacto-Trypton	2% (w/v)	Bacto-Trypton	2,0% (w/v)
Bacto-Hefe- Extrakt	0,5% (w/v)	Bacto-Hefe- Extrakt	0,5% (w/v)
<i>-autoklavieren-</i>			
<i>folgende Lösungen steril filtrieren, anschließend zugeben</i>			
MgSO ₄ (1 M)	10 mM	MgSO ₄ (1 M)	10 mM
MgCl ₂ (1 M)	10 mM	MgCl ₂ (1 M)	10 mM
CaCl ₂ (5 M)	50 mM		
Glucose (1 M)	20 mM		

RF1-Lösung		RF2-Lösung	
	Endkonzentration		Endkonzentration
RbCl	100 mM	RbCl	10 mM
MnCl ₂	50 mM	MOPS	10 mM
KOAc	30 mM	CaCl ₂	75 mM
CaCl ₂	10 mM	Glycerin	15% (v/v)
Glycerin	15% (v/v)	ddH ₂ O	pH 6,8 mit NaOH
ddH ₂ O	pH 5,8 mit 0,2 M AcOH		
<i>-steril filtrieren, nicht autoklavieren, Lagerung bei -20 °C-</i>		<i>-steril filtrieren, nicht autoklavieren, Lagerung bei -20 °C-</i>	

3.3.6.7 Hitzeschock-Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Zu 200 µl chemokompetenten Zellen (3.3.6.6), die auf Eis aufgetaut wurden, werden 1-10 ng Plasmid-DNA bzw. 2-8 µl eines Ligationsansatzes gegeben. Es wird vorsichtig gemischt und der Ansatz für 60 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (42 °C, 90 sec) werden die Zellen 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wird mit 800 µl SOB-Medium versetzt und 1 h bei 37 °C geschüttelt.

Es werden Aliquots zu 100 und 900 µl auf LB-Agar-Platten ausplattiert (3.3.7.2) und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.3.7 Kultivierung von *E. coli*

3.3.7.1 Kultivierung von *E. coli* in Flüssigkultur

Die Kultivierung von *E. coli*-Zellen erfolgt meist in LB-Medium. Die Bakterienkultur wird, soweit nicht anders angegeben, bei der für *E. coli*-Zellen optimalen Temperatur von 37 °C bei 160-180 Upm geschüttelt (Infors Inkubationsrundschtüttler HT). Zur Kontrolle des Wachstums wird die Zelldichte durch Messen der Absorption bei 580 nm (OD₅₈₀) bestimmt.

LB-Medium	
Bacto-Hefe-Extrakt	0,5% (w/v)
Bacto-Trypton	1,0% (w/v)
NaCl	0,5% (w/v)

Plasmid-transformierte *E. coli*-Zellen verfügen in Abhängigkeit vom Plasmid über Antibiotikaresistenz(en). Zur Selektion auf Plasmid-tragende Zellen werden der Kulturlösung daher die entsprechenden Antibiotika zugesetzt (Tab. 3-1).

Tab. 3-1: Zur Selektion verwendete Antibiotika.

Plasmid	codierte Antibiotikaresistenz	Endkonzentration in Kulturlösung ($\mu\text{g/ml}$)	Lösungsmittel für Zusatz
pUC19	Ampicillin	100	ddH ₂ O
pQE30	Ampicillin	100	ddH ₂ O
pRSETA	Ampicillin	100	ddH ₂ O
PGEX-4T-2	Ampicillin	100	ddH ₂ O
pRep-4	Kanamycin	25	ddH ₂ O
pLysS	Chloramphenicol	34	Ethanol
	Tetracyclin	12,5	Ethanol

3.3.7.2 Kultivierung von *E. coli*-Zellen als Plattenkultur

Zur Herstellung von LB-Agar-Platten wird LB-Medium vor dem Autoklavieren mit 1,5% (w/v) Bacto-Agar versetzt. Nach Abkühlen der Lösung auf 50 °C wird das entsprechende Antibiotikum (Tab. 3-1) zugesetzt, und die Platten werden unter sterilen Bedingungen gegossen. Nach dem Aushärten können die Platten über mehrere Wochen bei 4 °C gelagert werden.

E. coli-Zellen werden unter sterilen Bedingungen mittels Drygalski-Spatel bzw. Impföse ausgestrichen und bis zu 18 h bei 37 °C inkubiert. Die meisten Bakterienkulturen können bei 4 °C über mehrere Wochen als Plattenkultur gelagert werden.

Selektion durch α -Komplementierung

Die Verwendung von pUC-Vektoren ermöglicht es, transformierte *E. coli*-Zellen neben der Antibiotikaresistenz durch ein weiteres Kriterium zu selektieren. Die Polylinker-Region des Plasmids liegt im Leserahmen des α -Peptids der β -Galactosidase. Enthält das pUC-Plasmid kein *Insert*, bleibt das *lacZ α* -Gen, welches den N-Terminus der β -Galactosidase codiert, intakt. Das Bakterium kann nach IPTG-Induktion durch intraallelische Komplementierung der chromosomalen defizienten Kopie des *lacZ α* -Gens das Farbstoffvorläufermolekül X-Gal spalten. Die Bakterienkolonie färbt sich blau. Durch Ligation von Fremd-DNA in das *lacZ α* -Gen ist diese Komplementierung nicht mehr möglich und die Bakterienkolonie bleibt farblos. Zur Selektion durch α -Komplementierung werden LB-Agar IPTG (24 $\mu\text{g/ml}$) und X-Gal (40 $\mu\text{g/ml}$) zugesetzt.

3.3.8 Verfahren mit λ -cDNA-Bibliotheken

3.3.8.1 Verwendung des *E. coli*-Stammes XL1-Blue MRF'

Die Verwendung des *E. coli*-Wirtsstammes XL1-Blue MRF' ist für das Expressions-*Screening* einer Phagen-cDNA-Bibliothek eine unbedingte Notwendigkeit. Da dieser Bakterienstamm McrA- (Methylase C-Restriktion A), McrB- (Methylase C-Restriktion B) und RecA- (Rekombinase A) defizient ist, wird sowohl der Abbau methylierter Fremd-cDNA durch das *E. coli*-Reparatursystem als auch seine Integration ins Zellgenom verhindert. Das konjugative Plasmid (F'-Episom) dieses *E. coli*-Stammes bietet zudem eine Reihe weiterer wichtiger Vorteile:

Das *AM15 lacZ*-Gen, welches auf dem F'-Episom lokalisiert ist, kann nach dem Prinzip der α -Komplementierung zur Selektion von rekombinanten Klonen genutzt werden. Nichtrekombinante Klone lösen dabei nach Zugabe von X-Gal zum Plattenmedium eine blaue Farbreaktion aus. Durch Codierung für den *lac*-Repressor wird eine vorzeitige, unter Kontrolle des *lacZ*-Promotors stehende Transkription der cDNA Gene verhindert. Deren Transkription wird durch Zugabe von IPTG induziert. Zusätzlich codieren Gene des F'-Episoms für F-Pili, die für die Infektion der Zellen mit filamentösen Phagen essentiell sind (z.B. *ExAssist* Helfer-Phage). Da das Episom eine für die Prolinbiosynthese essentielle Region des *pro*-defizienten Wirts komplementiert, kann außerdem in Minimalmedium gegen den Verlust dieses Plasmids selektiert werden.

3.3.8.2 Vorbereitung einer *E. coli* XL1-Blue MRF'-Bakterienstamm-Suspension

Zur Bereitung der Bakteriensuspension wird ein Klon *E. coli* XL1-Blue MRF' einer frischen Plattenkultur (LB-Tet) in 50 ml LB-Medium, zusätzlich supplementiert mit Maltose (0,2% (w/v)), MgSO₄ (10 mM) und Tetracyclin (12,5 μ g/ml), unter ständiger Wachstumskontrolle bei 37 °C geschüttelt. Durch die Zugabe von Maltose wird in den Bakterien die Expression des *lamB*-Rezeptors induziert, der von infektiösen λ -Phagen in Gegenwart von Mg²⁺-Ionen zur Adsorption an das Wirtsbakterium verwendet wird. Nach etwa fünf Stunden hat die Suspension eine optische Dichte von 0,6-0,8 erreicht und die Zellen werden durch Zentrifugation geerntet (Beckman Kühlzentrifuge, 500 \times g_{max}, 4 °C, 10 min). Die Zellen werden in 10 mM MgSO₄ aufgenommen, vorsichtig resuspendiert, und es wird eine optische Dichte von 0,5 eingestellt. Die Bakteriensuspension ist bei 4 °C eine Woche haltbar.

3.3.8.3 Titerbestimmung von sekundären λ -cDNA-Bibliotheken

Zur Titerbestimmung werden zunächst 200 μ l *E. coli* XL1-Blue MRF' (3.3.8.2) zu 2,5 ml NZY-Top-Agar (45 °C) gegeben. Nach vorsichtigem Durchmischen wird die Suspension auf eine

vorgewärmte LB-Agar-Platte gegossen. Für die Titerbestimmung von Phagenlösungen werden Verdünnungen von 10^{-2} - 10^{-8} der entsprechenden Phagenlösungen hergestellt. Nach Aushärten der Agar-Platten werden jeweils 10 μ l der Verdünnungen auf die Platten aufgetropft, die dann bei 37 °C inkubiert werden. Nach Sichtbarwerden der Plaques werden sie gezählt, und es wird der Titer der cDNA-Bibliothek bestimmt, der unter Berücksichtigung des jeweiligen Verdünnungsfaktors in *pfu* pro ml (*plaque forming units*) angegeben wird.

NZY-Top-Agar	
	Einwaage/1000 ml
NZ Amin (Casein Hydrolysat)	10 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	5,0 g
MgSO ₄ × 7H ₂ O	2,0 g
Agarose (w/v)	7,0 g

3.3.8.4 Bakteriophagen-Infektion und Ausplattieren

Pro LB-Platte (\varnothing 13,5 cm) wird in einem Mikroreaktionsgefäß 1 ml der *E. coli* XL1-Blue MRF'-Stammlösung (3.3.8.2) mit 1 μ l Phagenlösung, die zuvor mit SM-Puffer auf 50 000 *pfu*/ μ l eingestellt wurde, gemischt und zur Adsorption der Phagen an die Bakterien für 15 min bei 37 °C inkubiert. Währenddessen werden pro LB-Platte 7,5 ml NZY-Top-Agar in Glasröhrchen gefüllt und im Heizblock bei 45 °C gehalten. Die getrockneten LB-Platten werden bei 37 °C im Brutschrank vorgewärmt. Die Phagen-Bakterien-Suspension wird nun zur vorgewärmten NZY-Top-Agar-Lösung gegeben, gut gemischt und auf den LB-Platten verteilt. Die Platten werden so lange bei 37 °C inkubiert, bis die Plaques gerade sichtbar werden (6-8 h).

SM (storage medium)-Puffer	
	Menge/1000 ml
NaCl	5,8 g
MgSO ₄ × 7H ₂ O	2,0 g
Tris-HCl (1 M), pH 7,5	50 ml
2% (v/v) Gelatine	5 ml
ddH ₂ O	ad 1000 ml

3.3.8.5 Induktion der Phagen-gekoppelten cDNA-Expression

Für das *Screening* der cDNA-Bibliothek mit Antikörpern wird das Plaque-Muster von der LB-Agar-Platte (die Bakterien-Phagen-Suspension wurde mit NZY-Top-Agar aufgebracht) auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen.

Vor ihrer Verwendung werden die Nitrocellulose-Membranen 10 min in ddH₂O geschwenkt und bei 110 °C für 20 min autoklaviert. Unmittelbar vor Auflegen auf die LB-Platten werden die Membranen mit Kugelschreiber nummeriert, für 10 min in 10 mM IPTG getränkt und unter der Sterilbank getrocknet. Zur Expression und Übertragung der rekombinanten Proteine werden die Membranen mit einer Pinzette luftblasenfrei auf die bei 4 °C vorgekühlten Platten aufgelegt. Ihre Position wird durch Einstechen mit einer sterilen Kanüle asymmetrisch markiert, um später eine Zuordnung von Autoradiogramm zu Plaque-Muster zu ermöglichen. Nach 3-4 h Inkubation bei 37 °C werden die Platten für 30 min bei 4 °C gekühlt. Die Filter werden vorsichtig abgezogen und zweimal je 10 min in 1 × TBS (pH 7,6) gewaschen. Die Platten werden mit Parafilm[®] verschlossen und bei 4 °C gelagert.

3.3.8.6 Identifizierung spezifischer Phagen-Klone durch Protein-Protein-Interaktion

Für das immunologische Expressions-*Screening* wird ein mit *E. coli* XL1-Blue MRF' vorbehandelter (3.3.9.7) polyklonaler Antikörper verwendet. Die Antikörper-Lösung wird mit Blockierlösung verdünnt (Endverdünnung 1:1000). Die Inkubation der Membranen in Blockier-, Antikörper- und Waschlösungen erfolgt wie unter 3.3.9.6. Dabei werden Arbeitsvolumina von 8 ml bzw. 20 ml für Membranen mit 8,5 bzw. 13,5 cm Ø benötigt. Zur Detektion mittels Chemilumineszenz werden 3 ml bzw. 7 ml Substratlösung eingesetzt. Es wurde CSPD als Substrat verwendet. Die Membranen werden einzeln in Haushaltsfolie verpackt, und es wird ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Dauer der Exposition ist abhängig vom verwendeten Substrat (3.3.9.6).

3.3.8.7 Identifizierung spezifischer Phagen-Klone durch DNA-Hybridisierung

Für das *Screening* der λ -cDNA-Bibliothek mit einem radioaktiv markierten DNA-Fragment wird das Plaque-Muster von der LB-Agar-Platte (3.3.8.4) auf sterile Nitrocellulose-Membranen übertragen (3.3.8.5). Autoklavierte Membranen werden direkt aufgelegt und die Platten anschließend für 5 min im Kühlschrank gelagert, um die Übertragung von Bakterien und Plaques zu gewährleisten. Die Membranen werden von den Platten entfernt und auf frische LB-Platten gelegt, wobei die Seite, auf die das Plaque-Muster übertragen wurde, nach oben weist. Diese Platten werden nun bei 37 °C für 5-12 h inkubiert, bis sich ein dichter Bakterienrasen ausgebildet hat. Die Master-Platten werden mit Parafilm[®] verschlossen und bei 4 °C aufbewahrt. Zur

Denaturierung der Bakterien werden die Nitrocellulose-Membranen mit der Plaque-Seite nach oben 5 min auf mit Denaturierungslösung getränktes Whatman-Papier aufgelegt (Sambrook *et al.*, 1989). Anschließend werden sie, wiederum mit der Plaque-Seite nach oben, auf mit Neutralisierungslösung getränktes Whatman-Papier aufgelegt, nach 5 min werden sie auf frisches Whatman-Papier mit Neutralisierungslösung transferiert und nach weiteren 5 min zum Trocknen auf Whatman-Papier gelegt (30-60 min bei Raumtemperatur). Zur kovalenten Fixierung der DNA auf die Membranen werden diese für 1 h im Vakuumofen (2 mbar) bei 80 °C gebacken. Die Hybridisierung erfolgt wie unter 3.3.2.2 beschrieben.

Denaturierungslösung		Neutralisierungslösung	
NaOH	0,5 N	NaCl	1,5 M
NaCl	1,5 M	Tris-HCl, pH 7,4	0,5 M

3.3.8.8 Isolierung potentiell positiver Plaques

Zur Isolierung potentiell positiver Plaques werden die Markierungen der Membranen auf den Röntgenfilm übertragen und die Signale den entsprechenden Membranen bzw. LB-Agar-Platten zugeordnet. Durch Übereinanderlegen von Röntgenfilm und LB-Platte auf einer Leuchtplatte ist es möglich, die Plattenbereiche zu lokalisieren, für die ein positives Signal vermutet wird. Diese Bereiche werden mit einer sterilen Ausstrichnadel isoliert und in Mikroreaktionsgefäße mit 500 µl SM-Puffer überführt. Während der Inkubation bei 4 °C über Nacht diffundieren die Phagenpartikel aus dem Agar in den Puffer. Nach kurzer Zentrifugation (Tischzentrifuge, $500 \times g_{\max}$, 10 min) wird der Überstand abgenommen und der Titer dieser Phagen-Suspension bestimmt (3.3.8.2). Ein Aliquot der Suspension wird zur Lagerung bei -80 °C mit DMSO (7% (v/v)) versetzt, während ein zweites Aliquot für eine weitere *Screening*-Runde verwendet wird.

3.3.8.9 Überprüfung potentiell positiver Plaques

Phagen, die das entsprechende Protein exprimieren bzw. das entsprechende *Insert* tragen, sollten in der Suspension angereichert vorliegen, welche wie unter 3.3.8.8 beschrieben gewonnen wurde. Durch weitere *Screening*-Runden sollen einzelne positive Klone isoliert werden. Dazu werden Bakterienzellen mit mehreren Verdünnungen (1:10 bis 1:1000) der erhaltenen Phagen-Suspension infiziert und auf LB-Platten ausplattiert (3.3.7.2). Es wird weiterverfahren wie unter 3.3.8.4, 3.3.8.5 und 3.3.8.7 beschrieben. Wird in der zweiten Runde ein positives Signal bestätigt, wird der entsprechende Phagenklon isoliert wie unter 3.3.8.8 beschrieben.

3.3.8.10 *In vivo*-Exzission von cDNA aus dem Uni-ZAP[®] XR Vektor-System

Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Uni-ZAP[®] XR Insertionsvektor wird das *Phagemid*-Prinzip verwendet. Die multiple Klonierungsstelle im Uni-ZAP[®]-Vektor befindet sich inmitten der pBluescript SK(-) *Phagemid*-DNA. Bei einer Coinfektion von *E. coli* XL-1 Blue MRF'-Zellen mit Uni-ZAP[®] Phagen und M13 Helfer-Phagen entstehen pBluescript SK(-)II-*Phagemids*, die in ihrer multiplen Klonierungsstelle die entsprechenden cDNA-Inserts tragen. Durch Hitzebehandlung werden die *E. coli*-Zellen und die Uni-ZAP[®]-Phagen inaktiviert. Die verbliebenen pBluescriptII-*Phagemids* und Helfer-Phagen werden mit einer frischen *E. coli*-Kultur in einem hohen Zell-Phagen-Verhältnis gemischt. Hierzu wird der *E. coli* SOLR-Bakterienstamm verwendet, der einerseits die Vermehrung und Zirkularisierung der pBluescriptII-*Phagemids* erlaubt, andererseits die Vermehrung der Helfer-Phagen unterdrückt. Die infizierten SOLR-Zellen werden auf Ampicillin-haltigen LB-Agar-Platten ausplattiert.

Die Vorbereitung der *E. coli*-Zellen erfolgt wie unter 3.3.8.2 beschrieben. In einem Polypropylen-Röhrchen werden 250 µl Phagen-Suspension mit 200 µl XL-1 Blue MRF'-Zellen und 10⁷ *ExAssist* Helfer-Phagen gründlich vermischt und 15 min bei 37 °C zur Adsorption der Phagenpartikel an die Bakterien inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml LB-Medium wird der Ansatz 2,5 h bei 37 °C geschüttelt (Infors Rundschüttler HT, 160 UpM). Zur Hitzeinaktivierung der Uni-ZAP[®]-Phagen und der Bakterien wird das Röhrchen 20 min bei 65-70 °C im Wasserbad inkubiert. Die Zelltrümmer werden durch Zentrifugation sedimentiert (Beckman J6-B, 1800 Upm, 10 min, 4 °C), und der Überstand wird in ein steriles PP-Röhrchen überführt. 10 bzw. 100 µl dieser Lösung werden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen zu 200 µl SOLR-Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 37 °C wird auf Ampicillin-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.3.9 Charakterisierung von Proteinen

3.3.9.1 Konzentrieren und Umpuffern von Proteinlösungen

Dialyse

Vor Gebrauch werden Dialyseschläuche einmal in 1% (w/v) Na₂CO₃-Lösung mit 1 mM Na₂EDTA aufgekocht und anschließend drei- bis viermal mit ddH₂O, bis ein annähernd neutraler pH-Wert erreicht ist. Die Dialyseschläuche werden in 0,1 mM Na₂EDTA-Lösung 15 min autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt. Die Dialyse wird im 100-fachen Volumen des gewünschten Puffers durchgeführt.

Konzentrieren oder Umpuffern von Proteinlösungen durch Ultrafiltration

In der vorliegenden Arbeit wurden Mikrokonzentratoren des Typs *microcon-30* der Firma *Amicon* mit einer Membranausschlußgrenze von 30 kD verwendet.

Die Mikrokonzentratoren werden verwendet, um kleinere Volumina an Proteinlösung umzupuffern oder zu konzentrieren. Die Probe wird nahezu bis zur Trockne zentrifugiert (siehe Herstellervorschrift) und durch mehrfachen Pufferauftrag direkt auf den Mikrokonzentrador gewaschen. Abschließend wird die Probe im gewünschten Puffer und Volumen aufgenommen.

3.3.9.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen*Konzentrationsbestimmung nach Bradford*

Bei der 1976 von Bradford veröffentlichten Methode zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen wird der blaue saure Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G250 verwendet. Im sauren Milieu verschiebt sich in Gegenwart von Proteinen das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 zu 595 nm aufgrund der Stabilisierung in der unprotonierten anionischen Sulfonat-Form durch Komplexbildung zwischen Protein und Farbstoff. Dabei bindet der Farbstoff eher unspezifisch an kationische und unpolare hydrophobe Seitenketten von Proteinen. Die wichtigste Rolle spielen Wechselwirkungen mit dem basischen, unter den Testbedingungen am terminalen Stickstoff protonierten Arginin. Weniger wichtig dagegen sind Wechselwirkungen mit Lysin, Histidin, Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin. Die Absorption der Lösung bei 595 nm ist proportional zur Proteinkonzentration in der Lösung. Die Vorteile der Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford liegen in der einfachen Durchführung und der Unempfindlichkeit gegenüber Reduktionsmitteln. Der wohl größte Nachteil besteht darin, dass bei gleicher Masse verschiedener Standardproteine aufgrund unterschiedlichen Arginingehalts erhebliche Differenzen in den Absorptionskoeffizienten auftreten können.

Bradford-Stammlösung

Coomassie Brilliant Blau G250	100 mg	Die Lösung wird durch drei Lagen Filterpapier filtriert und kann bei 4 °C über mehrere Monate gelagert werden.
EtOH (96%)	50 ml	
H ₃ PO ₄	100 ml	
ddH ₂ O	ad 1000 ml	

10 µl Proteinlösung werden mit 1 ml Bradford-Lösung gemischt und nach genau 5 min die Absorption bei 595 nm gegen einen entsprechenden Leerwert gemessen. Als Referenz wird mit

BSA-Lösungen bekannter Konzentration (bis 1 mg/ml) kalibriert. Bei der Auswertung ist zu beachten, dass nur im linearen Bereich der Eichkurve zuverlässige Werte erhalten werden.

Konzentrationsbestimmung mit BCA

Die Konzentrationsbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA)-Reagenz erfolgt nach Smith *et al.* (1985). Im alkalischen Milieu reduzieren Proteine Cu^{2+} zu Cu^+ , das mit BCA einen violetten Komplex bildet, der spektralphotometrisch vermessen werden kann. Das BCA-Reagenz besteht aus einer jeweils frisch hergestellten Mischung aus BCA-Fertiglösung (1% BCA, 2% $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,16% Natriumtartrat, 0,4% NaOH, 0,95% NaHCO_3 (pH 11,25)) und 4%iger $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung im Verhältnis 50:1. Zur Messung werden 10 μl gegebenenfalls verdünnter Proteinlösung (bis 2,5 mg/ml) mit 190 μl BCA-Reagenz versetzt und genau 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach 10 min Abkühlen auf Eis wird die Extinktion bei 570 nm gegen einen analog behandelten Blindwert gemessen. Der Proteingehalt wird mit Hilfe einer Kalibriergeraden bestimmt, die mit Rinderserumalbumin (BSA) als Standardprotein unter analogen Bedingungen aufgenommen wurde.

3.3.9.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese werden alle Proteine nach kompletter Denaturierung in einheitliche, vollständig entfaltete Polypeptidketten mit gleichen Ladungseigenschaften überführt (Laemmli, 1979). Um die Aggregation von Proteinen beim Eintritt ins Gel zu verhindern und eine größere Bandenschärfe zu erreichen, wird die Gelmatrix in zwei Bereiche eingeteilt, in das engporige Trenngel und das weitporige Sammelgel. Zugewetztes SDS (*Sodium dodecyl sulfate*, Natriumdodecylsulfat) überdeckt als anionisches Detergenz die Proteineigenladung, sodass sich Micellen mit einem konstanten Masse/Ladungsverhältnis ausbilden. Dabei ist die elektrophoretische Beweglichkeit der SDS-Polypeptid-Micellen dem Logarithmus ihrer Masse proportional. Das Molekulargewicht von Proteinen wird durch Vergleich mit entsprechenden Standards ermittelt.

Für ein Gel mit den Maßen $16 \times 14 \times 0,5$ cm werden 30 ml Gellösung benötigt. Unmittelbar nach Zugabe von SDS, TEMED und APS wird die Lösung luftblasenfrei zwischen zwei durch Siliconabstandshalter getrennte Platten bis zu einer Höhe von 2 cm unter dem oberen Rand gegossen. Die Gellösung wird sofort mit ddH_2O überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wird das H_2O vollständig entfernt und das Sammelgel (15 ml) nach Zugabe von SDS, TEMED und APS auf das Trenngel gegossen. Nach Einpassen des Taschenformers lässt man das Gel polymerisieren. Danach werden der untere Siliconstreifen und der Taschenformer entfernt, und das Gel wird in die Elektrophoreseapparatur eingespannt. Der zwischen den seitlichen Siliconstreifen

und der Gelmasse nach Polymerisation auftretende Spalt wird abgedichtet und die Apparatur mit Elektrophorese-Puffer befüllt. Vor dem Auftragen der Proben in die Geltaschen werden diese mit Elektrophorese-Puffer gespült.

Die Proben werden 1:1 mit dem 2 × Probenpuffer versetzt und unmittelbar vor dem Auftragen hitzedenaturiert (3 min, 95 °C). Die Elektrophorese beginnt bei 50 V. Die Spannung wird auf 150 V erhöht, sobald BPB das Trenngel erreicht hat. Die Elektrophorese wird beendet, unmittelbar nachdem BPB das Gel verlassen hat.

Zusammensetzung kontinuierlicher Trenngel zur SDS-PAGE Elektrophorese				
Material	12,5%	10%	8%	Endkonzentration
40% AA-BisAA (29:1)	9,5 ml	7,6 ml	6,1 ml	12,5, 10 bzw. 8% (w/v)
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	375 mM
ddH ₂ O	12,7 ml	14,6 ml	16,1 ml	-
20% SDS	150 µl	150 µl	150 µl	0,1% (w/v)
10% APS	200 µl	200 µl	200 µl	-
TEMED	20 µl	20 µl	20 µl	-
Gesamtvolumen	30 ml	30 ml	30 ml	

Zusammensetzung des Sammelgels		
Material	Menge	Endkonzentration
40% AA-BisAA (29:1)	1,875 ml	5% (w/v)
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	3,7 ml	123 mM
ddH ₂ O	9,125 ml	-
20% SDS	75 µl	0,1%
10% APS	200 µl	-
TEMED	10 µl	-
Gesamtvolumen	15 ml	

Für einige Trennungen ist die Verwendung eines PAA-Gradienten im Trenngel notwendig. Zur Herstellung eines 6-10%igen Gels werden je 10 ml 6, 8 und 10%ige Gellösung angesetzt. Diese Lösungen werden, beginnend mit der höchstkonzentrierten Lösung, überschichtend zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Wird nur 1%ige APS-Lösung verwendet, so bildet sich während der langsamen Polymerisation über Nacht ein annähernd linearer Gelgradient aus. Die

Ausbildung des Gradienten kann durch Zusatz von Bromphenolblau zu einer der Gellösungen visualisiert werden.

2 × Probenpuffer		Elektrophorese-Puffer	
Tris-HCl, pH 6,8	100 mM	Tris	44 mM
SDS (20% (w/v))	4% (w/v)	Glycin	200 mM
Glycerin (86% (w/v))	17% (w/v)	SDS (10% (w/v))	0,15% (w/v)
2-Mercaptoethanol	0,8 M		
Bromphenolblau	0,1% (w/v)		
ddH ₂ O	ad 1ml	ddH ₂ O	ad 1000 ml

3.3.9.4 Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Coomassie Brilliant Blau-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Coomassie Brilliant Blau-Färbung von Proteingelen ist eine schnelle und einfache Methode zum Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen. Der Farbstoff (Serva Blue R-250) ist unter sauren Bedingungen negativ geladen und lagert sich durch elektrostatische Wechselwirkungen an positiv geladene Aminosäurereste an. Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 100 ng Protein je Proteinbande.

Das Proteingel (3.3.9.3) wird nach der Elektrophorese mindestens 30 min bei Raumtemperatur in Färbelösung geschüttelt (IKA-Vibrax-VXR, 40 Upm). Anschließend wird das Gel unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung für mindestens 1 h entfärbt. Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine erscheinen im Gel als blaue Banden. Abschließend wird das Gel zwischen zwei Cellophanfolien bei 80 °C auf dem Geltrockner getrocknet.

Färbelösung		Entfärbelösung	
Coomassie Brilliant Blau	0,2% (w/v)	Methanol	35% (v/v)
Methanol	45% (v/v)	Essigsäure	1% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)		

Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Methode der Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen beruht auf der Bindung von Silberionen an die Seitenketten bestimmter Aminosäuren und der Reduktion der fixierten Metallionen zu elementarem Silber. Die Silberfärbung ist etwa um den Faktor 100 empfindlicher

als die Coomassie Brilliant Blau-Färbung. Ihre Nachweisgrenze liegt bei 0,1 ng Protein pro Gelbande.

Das Färbeverfahren wird in Anlehnung an Blum *et al.* (1987) durchgeführt. Die Färbereaktionen erfolgen unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur (Vibrax, 40 UpM). Dabei sind die angegebenen Reaktionszeiten, insbesondere für die Schritte 4 und 6, genau einzuhalten. Alle Lösungen (jeweils 200 ml) werden frisch hergestellt.

	Vorgang	Lösung	Inkubationszeit
1.	Fixieren	Methanol (50% (v/v)) Essigsäure (12% (v/v))	30 min
2.	Waschen	EtOH (50% (v/v))	3 × 15 min
3.	Imprägnieren	Na ₂ S ₂ O ₃ × 5 H ₂ O (0,22 g/l)	1 min
4.	Waschen	ddH ₂ O	3 × 20 sec
5.	Imprägnieren	AgNO ₃ (2 g/l) 37%iger Formaldehyd (500 µl/l)	20 min
6.	Waschen	ddH ₂ O	2 × 20 sec
7.	Reduzieren	Na ₂ CO ₃ (60 g/l) Na ₂ S ₂ O ₃ × 5 H ₂ O (4 mg/l) 37%iger Formaldehyd (500 µl/l)	1 bis 10 min
8.	Abstoppen	Methanol (50% (v/v)) Essigsäure (12% (v/v))	5 min
9.	Waschen	ddH ₂ O	2 × 2 min
10.	Konservieren	Methanol (50% (v/v)) Glycerin (10% (v/v))	30 min

Beim Schütteln in Reduzierlösung erscheinen die fixierten Proteine als rötlich-orange bis braunschwarze Banden. Nach dem Konservieren wird das Gel getrocknet.

3.3.9.5 Übertragung von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen (Western Blot)

Proteine, die gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden, können zur weiteren Charakterisierung auf eine Membran übertragen werden. Dieser Western Blot wurde erstmals von Towbin *et al.* 1979 beschrieben. Dabei wird senkrecht zur Elektrophoreserichtung des Gels ein elektrisches Feld angelegt, und die aufgetrennten Proteine wandern im Ionengradienten auf eine proteinbindende Membran aus Nitrocellulose oder Nylon.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Transfer im Semi-Dry-Verfahren durchgeführt, wie von Khyse-Andersen (1984) beschrieben. Er erfolgte in der *Transblot Semi-Dry Transfer Cell* der Firma *BIO-RAD* für 75 min bei einer konstanten Spannung von 25 V. Für das Elektroblothing wurde ein Aufbau wie in Abb. 3-2 verwendet.

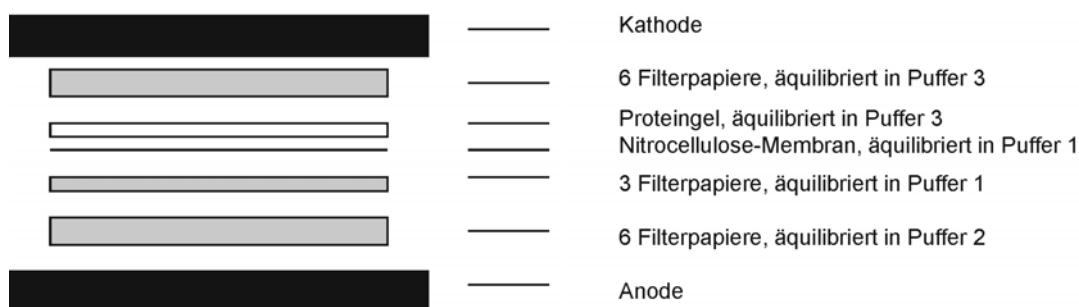


Abb. 3-2: Schematischer Aufbau des *Semi-Dry Western Blots*.

Vor dem Transfer wird das Proteingel (3.3.9.3) in Puffer 3 äquilibriert. Beim Zusammenbau des Western Blots ist unbedingt darauf zu achten, dass sich zwischen den puffergetränkten Filterpapieren, der Membran und dem Gel keine Luftblasen befinden, da im Bereich von Blasen kein Proteintransfer möglich ist. Vorhandene Luftblasen werden durch vorsichtiges Rollen mit einem angefeuchteten Glasstab entfernt.

Nach dem Blotvorgang wird die Membran einmal in 1 × TBS-Puffer gewaschen. Zur Kontrolle auf vollständigen Proteintransfer kann das SDS-Gel mit Commassie Brilliant Blau (3.3.9.4) nachgefärbt werden.

Western-Puffer 1	
Tris-HCl, pH 10,4	25 mM
Methanol	20% (v/v)

Western-Puffer 2	
Tris-HCl, pH 10,4	300 mM
Methanol	20% (v/v)

Western-Puffer 3	
Tris-HCl, pH 9,4	25 mM
Norleucin	40 mM
Methanol	20% (v/v)

10 × TBS	
Tris-HCl, pH 7,6	400 mM
NaCl	2,75 M

3.3.9.6 Nachweis von Proteinen durch gekoppelte Immunreaktion

Für die Immundetektion von Antigenen auf einer Membran (3.3.9.5) muss diese zunächst durch konzentrierte, immunologisch neutrale Proteinlösung (z.B. BSA-Lösung oder fettfreies

Milchpulver) blockiert werden. Dadurch werden unspezifische Bindungsstellen für Proteine abgesättigt und unspezifische Hintergrundfärbung vermindert. Die blockierte Membran wird dann mit dem gegen das gesuchte Protein gerichteten Primärantikörper inkubiert. Im nächsten Schritt wird ungebundener Primärantikörper abgewaschen und der Blot mit einem markierten Sekundärantikörper inkubiert, welcher spezifisch an den Primärantikörper bindet. Mit Hilfe der Markierung dieses Sekundärantikörpers wird der Antigen-Antikörper-Komplex nach dem Waschen sichtbar gemacht.

Die Spezifität der Immunfärbung hängt hauptsächlich von der Spezifität der Antikörper und deren Konzentration ab. Primärantikörper werden in Verdünnungen von 1:250 bis 1:10 000 eingesetzt.

Vorgang	Lösung	Inkubationszeit
Blockieren	1 × TBS mit 0,2% (w/v) I-Block evtl. 0,1% Tween-20	über Nacht (4 °C)
Waschen	1 × TBS	10 sec
1. Antikörper	verdünnt in 1 × TBS mit 0,2% (w/v) I-Block evtl. 0,1% Tween-20	mind. 1 h
Waschen	1 × TBS mit 0,2% (w/v) I-Block evtl. 0,1% Tween-20	2 × 10 min
2. Antikörper	verdünnt in 1 × TBS mit 0,2% (w/v) I-Block evtl. 0,1% Tween-20	1 h
Waschen	1 × TBS	2 × 10 sec

Alle Inkubationsschritte werden, soweit nicht anders angegeben, unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Membran muss dabei stets vollständig mit Flüssigkeit benetzt sein.

Die für die Immundetektion eingesetzten sekundären Antikörper können direkt markiert (fluoreszierend, radioaktiv, Biotin) oder mit Enzymen gekoppelt sein, die eine Farb- oder Fluoreszenzreaktion katalysieren.

Immundetektion durch Meerrettich-Peroxidase

Bei der Immundetektion durch Meerrettich-Peroxidase erfolgt der Proteinnachweis durch eine Peroxidasereaktion, bei der Luminol mit Wasserstoffperoxid zur Reaktion gebracht wird. Es entsteht ein elektronisch angeregtes Molekül, das beim Übergang in den Grundzustand einen Lichtquant aussendet. Diese Chemilumineszenz wird durch Schwärzung eines Röntgenfilms detektiert.

Zur Detektion werden 100 µl Lösung I und 44 µl Lösung II gemischt und mit 5,85 µl H₂O₂ zu 10 ml 1 × TBS (pH 7,4) gegeben. Nach Abtropfen des Waschpuffers von der Membran wird diese mit der proteintragenden Seite nach oben auf Frischhaltefolie gelegt und vollständig mit Substratlösung bedeckt. Nach 1 min Inkubation bei Raumtemperatur wird die Reaktionslösung entfernt und die Membran luftblasenfrei in Folie verpackt. Zur Detektion wird sofort für 2-300 sec ein Röntgenfilm aufgelegt. Durch Vergleich mit vorgefärbten Proteinstandards kann den spezifischen Signalen auf dem Röntgenfilm die entsprechende Protein-Masse in kD zugeordnet werden.

Peroxidase-Substratlösung		Lösung I		
	Volumen/10 ml		Konzentration	Menge/5 ml
Tris-HCl (1 M), pH 7,5	1 ml	Luminol	250 mM	224 mg
30%ige H ₂ O ₂ -Lösung	5,85 µl	DMSO		5 ml
Lösung I	100 µl	<i>-100 µl Aliquots bei -20 °C lagern-</i>		
Lösung II	44 µl			
<i>-Lösungen unmittelbar vor Verwendung herstellen-</i>		Lösung II		
			Konzentration	Menge/2,5 ml
		p-Cumarsäure	90 mM	37,1 mg
		DMSO		2,5 ml
		<i>-44 µl Aliquots bei -20 °C lagern-</i>		

Immundetektion durch Alkalische Phosphatase

Bei der Immundetektion durch Alkalische Phosphatase erfolgt die Proteindetektion über an den Sekundäntikörper gebundene Alkalische Phosphatase (AP) durch Umsetzung des Chemilumineszenz-AP-Substrats CSPD (Dinatrium 3-(4-methoxyspiro{I,2-dioxetan-3,2'-(5'-Chloro) Tricyclo [3.3.1.1^{3,7}] Decan}-4-yl Phenylphosphat). Durch die Dephosphorylierung von CSPD wird eine Lichtemission mit einem Maximum bei 477 nm bewirkt, welche mittels Röntgenfilm aufgezeichnet wird. Das CSPD-Chemilumineszenzsignal auf Nitrocellulose-Membranen ist über

mehrere Stunden beständig. Es verstärkt sich in den ersten Stunden nach dem Start der Detektionsreaktion, bis es ein Intensitätsplateau erreicht, das 24-48 h konstant bleibt. Um die gewünschte Signalintensität zu erreichen, können mehrere Aufnahmen gemacht werden.

Unmittelbar vor der Nachweisreaktion wird die Membran 2×2 min in *Assay*-Puffer äquilibriert und anschließend 5 min in AP-Substratlösung inkubiert. Überschüssige Flüssigkeit wird entfernt, die Membran in Haushaltsfolie eingeschlagen und ein Röntgenfilm aufgelegt.

AP-Substratlösung		Assay-Puffer	
	Volumen/2,12 ml	Tris-HCl, pH 9,8	200 mM
<i>Assay</i> -Puffer	2 ml	MgCl ₂	10 mM
CSPD	20 µl	ddH ₂ O	ad 100 ml
5% Nitroblock	100 µl		

3.3.9.7 Aufreinigung von polyklonalen Antikörpern

Die Reinheit und Spezifität polyklonaler Antikörper, wie man sie nach Immunisierung eines Tieres mit einem aufgereinigten Antigen erhält, sind für zahlreiche immunologische Anwendungen nicht ausreichend. Es existiert eine Reihe von Verfahren, die dazu dienen, Antikörper, welche einer bestimmten Immunglobulin-Klasse angehören, aus einem Antiserum aufzureinigen (Harlow und Lane, 1988). Die Spezifität solcher Antikörper-Präparationen kann sowohl durch Anreicherung spezifischer Komponenten als auch durch Abtrennung verunreinigender unspezifischer Komponenten weiter erhöht werden.

Reinigung von Antikörpern aus Kaninchenserum durch Ammoniumsulfatfällung

Um Antikörper aus Kaninchenserum zu reinigen, können – durch Zugabe von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bis zu 40%iger Sättigung – γ -Immunglobuline ausgefällt werden.

Dem Serum wird bei 4 °C über einen Zeitraum von 1 h langsam und unter leichtem Rühren $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zugegeben (2,43 g/10 ml Serum). Danach wird 1 h bei 4 °C weitergerührt. Das gefällte IgG wird abzentrifugiert (10 000 UpM, 15 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Sediment wird mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators vorsichtig in 10 ml 33%iger $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung (w/v) suspendiert und wie oben beschrieben zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird einmal wiederholt. Das Präzipitat wird in 4 ml 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) gelöst und unter mehrmaligem Pufferwechsel gegen 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) mindestens 12 h dialysiert. Abschließend wird die IgG-Konzentration bei 280 nm bestimmt ($\epsilon_{280}(0,1\%) = 1,3 \text{ cm}^2/\text{mg}$).

Entfernung von anti-E. coli-Antikörpern aus einer IgG-Präparation

Antiseren immunisierter Tiere enthalten oft Antikörper, die bakterielle Antigene erkennen und deshalb beispielsweise bei der Analyse von Expressions-Bibliotheken in *E. coli*-Zellen zu erhöhten Hintergrundsignalen führen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode von Gruber und Zignales (1995), abgewandelt nach Naß (1997), beruht auf der Inkubation der Antikörper-Lösung mit abgetöteten, unlöslichen *E. coli*-Zellfraktionen. Anti-*E. coli*-Immunglobuline lassen sich dann durch Zentrifugation leicht abtrennen.

Zur Gewinnung des *E. coli*-Zellmaterials werden 2,4 l LB-Medium (4 × 600 ml in 2,5 l Kolben) mit dem entsprechenden *E. coli*-Stamm angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt (Infors Inkubationsrundschtüttler HT, 110 UpM). Die eine Hälfte der Bakteriensuspension wird für 1 h bei 120 °C autoklaviert, die andere Hälfte mit 16,2 ml 37%iger (w/v) Formaldehyd-Lösung (Endkonzentration 0,5% (w/v)) versetzt und für weitere 2 h bei 37 °C geschüttelt. Nach Abkühlen der autoklavierten Lösung werden beide Suspensionen vereinigt und anschließend zentrifugiert (Rotor GSA, 5500 UpM, 10 min, 4 °C). Das Sediment wird zweimal mit je 250 ml 1 × PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Zellmaterial wird aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Um anti-*E. coli*-Immunglobuline zu binden und abzutrennen, werden zu 10 ml einer 1 × PBS-Lösung (mit 10 µg/ml BSA), die den aufzureinigenden Antikörper in einer 1:100 Verdünnung (v/v) enthält, 0,2 g der *E. coli*-Zelltrümmer gegeben. Diese Suspension wird 2 h bei 4 °C sanft geschüttelt und anschließend zentrifugiert (Beckman JS 13.1, 5700 UpM, 4 °C, 10 min). Der Überstand wird abgenommen und die Behandlung zweimal wiederholt. Abschließend wird die Antikörper-Lösung durch eine Membran (0,22 µm) steril filtriert. Die Antikörper-Lösung kann einige Tage bei 4 °C aufbewahrt werden.

1 × PBS	
	Endkonzentration
NaCl	140 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM

3.3.10 Expression rekombinanter Proteine

Zahlreiche Ansätze zur Proteinexpression beruhen auf dem Prinzip, das Zielprotein als rekombinantes Fusionsprodukt mit einer N- oder C-terminal eingeführten Aminosäuresequenz zu

exprimieren. Diese zusätzliche Amminosäuresequenz wird als Bindungsstelle (*tag*) bei einer Proteinaufreinigung verwendet. Der *tag* ermöglicht die spezifische reversible Bindung des Proteins an eine feste Phase und erleichtert damit die chromatographische Aufreinigung.

Das in der vorliegenden Arbeit exprimierte rekombinante α -Dioxygenase-Protein ist als Fusionsprodukt mit 6 aufeinanderfolgenden Histidin-Resten ($6 \times \text{His-tag}$) konzipiert. Die Aufreinigung des Zielproteins erfolgt durch reversible Bindung des *His-tags* an immobilisierte Ni^{2+} -Ionen. Der verwendete *His-tag* ist bei physiologischem pH-Wert ungeladen und bindet unabhängig von der Konformation der Proteine sehr stark an Ni^{2+} -Ionen. Weiterhin wurde versucht, das Protein als Fusionsprodukt mit einem GST (Glutathion-S-Transferase)-*tag* zu exprimieren. Das Fusionsprotein lässt sich hier aufgrund der hohen Affinität der GST zu Glutathion mittels Affinitätschromatographie aufreinigen.

3.3.10.1 Expressionssysteme auf Basis der *E. coli* RNA-Polymerase (pQE- und pGEX-Vektoren)

Die pQE-Expressionsvektoren (siehe Anhang, Abb. A-1) beruhen auf einem optimierten Transkriptions-Translations-System, welches vom frühen Promotor des Bakteriophagen T5 gesteuert wird. Der Vektor trägt ein optimiertes Promotor/Operator-Element, gebildet aus diesem starken Promotor und zwei *lac*-Operator-Sequenzen, das von der endogenen *E. coli* RNA-Polymerase erkannt wird. Die Expression des rekombinanten Proteins wird durch Zugabe von IPTG induziert. Durch eine optimierte synthetische ribosomale Bindungsstelle (RBS) wird eine hohe Translationsrate gewährleistet. Durch zwei Transkriptionsterminatoren wird eine effiziente Beendigung der Transkription vermittelt. Das Plasmid enthält das Ampicillin-Resistenzgen *bla*. Um die Expression rekombinanter Proteine ausreichend kontrollieren zu können, wird eine zusätzliche Kontrolle benötigt, die durch die *lac*-Operatorsequenzen bzw. das *lac*-Repressorprotein gewährleistet wird. Die für eine vollständige Repression der Expression erforderliche Menge *lac*-Repressor wird durch das Vorhandensein des zusätzlichen Plasmids pREP-4 in den Zellen bereitgestellt (Farabaugh, 1978). Das Plasmid codiert neben dem *lacI*-Gen für Neomycin-Phosphotransferase, die Kanamycin-Resistenz verleiht. Die in dieser Arbeit zur Proteinexpression im pQE-System verwendeten *E. coli*-Bakterienstämme M15 und SG13009 tragen das Plasmid pREP-4.

Die pGEX-Vektoren (siehe Anhang, Abb. A-2) wurden für die Expression von Proteinen als Fusionsprodukt mit Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* entwickelt. GST kommt natürlicherweise als Protein mit einem Molekulargewicht von 26 kD vor und wird in *E. coli* unter Erhaltung der enzymatischen Aktivität exprimiert. Fusionsproteine mit der kompletten

Aminosäuresequenz von GST zeigen ebenfalls GST-Aktivität. Aus bakteriellen Lysaten können diese Proteine daher mittels Glutathion-Sepharose aufgereinigt werden. Der Vektor trägt ein Promotor/Operator-Element, gebildet aus *tac*-Promotor und *lac*-Operator, das von der endogenen *E. coli* RNA-Polymerase erkannt wird. Die Expression wird durch Zugabe von IPTG induziert. Durch zwei Transkriptionsterminatoren wird eine effiziente Beendigung der Transkription vermittelt. Das Plasmid enthält das Ampicillin-Resistenzgen *bla*. Zur Kontrolle der Expression in *E. coli* ist ein internes *lacI*-Gen vorhanden. Der verwendete Bakterienstamm *E. coli* BL21 ist defizient bezüglich der Proteasen *lon* und *ompT*. Hierdurch wird die Stabilität von Fremdproteinen in der Bakterienzelle gefördert.

3.3.10.2 Das T7-Expressionssystem (pET- und pRSET-Vektoren)

Die *high-copy* pRSET-Vektoren (siehe Anhang, Abb. A-4) sind gekoppelte Transkriptions-Translationsvektoren und verfügen über einen Bakteriophagen T7-Promotor. Das zu exprimierende Gen befindet sich hier unter Kontrolle des späten Bakteriophagen T7-Promotors, der ausschließlich von der RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 erkannt und transkribiert wird. Eine Kopie des T7 RNA-Polymerase-Gens befindet sich als λ -Lysogen auf der chromosomalen DNA der verwendeten Bakterienstämme und steht unter Kontrolle des *lacUV5* Promotors. Durch Zugabe von IPTG kann die Synthese der T7 RNA-Polymerase induziert werden. Diese transkribiert dann ausschließlich die mRNA des Zielproteins.

Der im Rahmen dieser Arbeit zur Expression im T7-System verwendete Stamm *E. coli* BL21 StarTM (DE3) wurde entwickelt, um die Proteinausbeute bei Verwendung des T7-Systems zu optimieren. Die T7-Polymerase synthetisiert mRNA deutlich schneller als endogene *E. coli* Polymerasen, mit der Folge, dass zahlreiche Transkripte ungeschützt durch Ribosomen in der Zelle vorliegen und damit anfällig sind für den Abbau durch endogene RNasen. Durch eine Mutation im RNase E-Gen (*rne131*) wird in BL21 StarTM (DE3) die Stabilität von Transkripten wesentlich erhöht.

Beim Bakterienstamm Origami B (DE3) liegen Mutationen in der Thioredoxinreduktase (*trxB*) sowie Glutathionreduktase (*gor*) vor, was die Ausbildung von Disulfid-Brücken im Cytoplasma von Bakterienzellen fördert. Die beiden Mutationen werden über Kanamycin- und Tetracyclin-Resistenz selektiert.

Der *E. coli*-Stamm Rosetta (DE3) coexprimiert eine Reihe von in *E. coli* nur in geringer Menge vorkommenden tRNAs, die für das Lesen einiger in *E. coli* seltener Codons notwendig sind (CCU, UCU, UCG und CCG für Arginin, UAU für Isoleucin, UAG für Leucin, GGG für Prolin und UCC

für Glycin). Er bietet sich deshalb speziell zur Überexpression von Fremdproteinen an, die viele in *E. coli* nur selten auftretende Codons enthalten.

Rosetta (DE3) pLysS verfügt zusätzlich über das Plasmid pLysS, das eine effizientere Repression der Expression des Fremdproteins ermöglicht. Das Plasmid trägt eine Kopie des T7-Gens für Lysozym und zur Selektion eine Chloramphenicol-Resistenz (Tab. 3-1). Lysozym wird in der Zelle in geringem Maße exprimiert und hemmt die T7-RNA-Polymerase. Nach IPTG-Induktion wird dieser Effekt durch die dann in großen Mengen gebildete T7-RNA-Polymerase aufgehoben. *E. coli*-Stämme mit pLysS eignen sich besonders zur Expression von für *E. coli* toxischen Proteinen.

3.3.10.3 Überexpression rekombinanter Proteine in *E. coli*-Stämmen

Überexpression im analytischen Maßstab

Da die optimalen Expressionsbedingungen hinsichtlich Medienzusammensetzung, IPTG-Konzentration, Induktionstemperatur und Dauer für jedes rekombinante Protein bzw. für jeden Bakterienstamm unterschiedlich sind, werden vor einer präparativen Proteinexpression die optimalen Parameter im analytischen Maßstab bestimmt.

Nach der Transformation (3.3.6.7) eines *E. coli*-Überexpressionsstammes wird in 20 ml Medium unter ständiger Wachstumskontrolle bei 37 °C bis zu einer $OD_{580} = 0,5-0,8$ inkubiert. Nach Abnehmen einer Probe (1 ml) wird die Expression durch Zugabe von IPTG induziert (Endkonzentration 1,0 mM). Es werden weitere Proben (je 1 ml) in definierten Zeitabständen entnommen, abzentrifugiert (Hettich Tischzentrifuge, 5 min) und das Zentrifugat bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

Zur Analyse der Expression wird ein *E. coli*-Gesamtlysat hergestellt. Hierzu werden die sedimentierten Zellen in jeweils 50 µl 2 × SDS-Probenpuffer aufgenommen. Um einen besseren Übertritt der Proteinproben in die Gelmatrix zu gewährleisten, wird die chromosomale DNA vor der Hitzedenaturierung (95 °C, 5 min) durch Sonifizieren zerstört. Das Lysat wird mittels SDS-PAGE (3.3.9.3) und anschließender Coomassie Brilliant Blau-Färbung (3.3.9.4) analysiert.

Wenn keine oder nur eine schlechte Expression des Zielenzym erfolgt, können sowohl Vektor als auch *E. coli*-Expressionsstamm variiert werden. Weiterhin hat die Konzentration an IPTG (0,1-2,0 mM) Einfluss auf die Expression. Durch niedrige Konzentrationen an IPTG sowie durch eine Erniedrigung der Expressionstemperatur (16-25 °C) kann die Bildung unlöslicher *inclusion bodies* reduziert werden. Um die Ausbildung von *inclusion bodies* zu verhindern, ist ausserdem eine gute Sauerstoffzufuhr wichtig. Ein Zusatz der Spurenelement-Lösungen A, B oder C zum

Medium kann ebenfalls zur Verbesserung der Expression beitragen. Zur Induzierung von Stress wird die Kultur vor Induktion mit IPTG einem Hitzeschock (42 °C, 2 min) ausgesetzt bzw. wird 1% Ethanol direkt vor der Induktion zugegeben. Auch die Verwendung eines anderen Mediums kann erfolgreich sein (LB-Medium, Minimalmedium, TB-Medium, 2 × YT-Medium etc.). Die Expression von Fremdprotein vor Induktion wird durch Katabolitrepression reduziert (Zusatz von 1-2% (w/v) Glucose zum Medium). Bei der Überexpression von Häm-haltigen Proteinen ist ein Zusatz von δ-Aminolävulinat (2 mM) oder Hämin zum Medium sinnvoll.

Lösung A		
	Endkonzentration	Menge/100 ml
Fe(III)Cl ₃	7,5 mM	0,2 g
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	80 µM	0,03 g
MgSO ₄ × 7H ₂ O	230 mM	5,9 g
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	3,0 mM	0,088 g
MnSO ₄ × H ₂ O	3,2 mM	0,054 g
CuSO ₄ × 5H ₂ O	0,5 mM	0,013 g
CoCl ₂ × 6H ₂ O	0,5 mM	0,013 g
H ₃ BO ₃	0,6 mM	0,004 g
ddH ₂ O	ad 100 ml	
<i>-steril filtrieren-</i>		

Lösung B		
		Menge/100 ml
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	680 mM	10 g
α-Biotin	4,1 mM	100 mg
ddH ₂ O	ad 100 ml	
<i>-steril filtrieren-</i>		

Lösung C		
		Menge/10 ml
Thiamin	3 mM	10 mg
ddH ₂ O	ad 10 ml	
<i>-steril filtrieren-</i>		

10 × M9-Salz		Glucose-Vitamin-Zusatz	
Einwaage/1000 ml		Menge/500 ml Medium	
NH ₄ Cl	10 g	MgSO ₄ (1,0 M)	200 µl
Na ₂ HPO ₄	60 g	CaCl ₂ (0,5 M)	100 µl
NaH ₂ PO ₄	30 g	Glucose (40 % (w/v))	2,5 ml
NaCl	5 g	Vitamin B1 (10 mg/ml)	0,5 ml
ddH ₂ O	ad 1000 ml	<i>-Lösung jeweils frisch ansetzen und steril filtrieren-</i>	

1 × Minimalmedium mit Glucose-Vitamin-Zusatz	
Menge/500 ml	
10 × M9-Salz	50 ml
Trypton	5 g
ddH ₂ O	ad 500 ml
<i>-autoklavieren- dann Zugabe von</i>	
Glucose-Vitamin-Zusatz	3,3 ml

2 × YT-Medium	
Menge/1000 ml	
Bacto-Trypton	16 g
Bacto-Hefe-Extrakt	10 g
NaCl	5 g

Überexpression im präparativen Maßstab

5 ml bzw. 10 ml 2 × YT-Medium, supplementiert mit den Lösungen A, B, und C (3.3.10.3) sowie mit 1% Glucose und 2 mM δ -Aminolävulinat (Antibiotikazugabe entsprechend Tab. 3-1), werden mit einer frisch transformierten Bakterienkultur angeimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Aus dieser Vorkultur werden in einem 2 l bzw. 5 l Erlenmeyerkolben 500 ml bzw. 1 l supplementiertes Medium in einer 1:100 Verdünnung angesetzt. Unter Schütteln (Infors Inkubationsschüttler HT, 120 Upm) lässt man die Bakterienkultur bei 37 °C bis zu einer OD₅₈₀ von 0,6-0,8 heranwachsen und induziert nach Abkühlen der Kultur auf 16 °C die Proteinexpression durch IPTG-Zugabe (Endkonzentration 1,0 mM). Die Inkubation wird für 12 h bei 16 °C fortgesetzt. Die Zellen werden

durch Zentrifugation (Beckman J-6B, 4000 Upm, 4 °C, 15 min) abgetrennt und gewogen. Zur Analyse der Expression wird vor IPTG-Zugabe und vor der Zellernte jeweils 1 ml Kultur entnommen, sedimentiert und mittels SDS-Gel-Elektrophorese analysiert (3.3.9.3).

3.3.11 Methoden zur Proteinaufreinigung

3.3.11.1 Präparative Gewinnung der α -Dioxygenase aus Erbsen

Die präparative Anreicherung der α -Dioxygenase aus Erbsen erfolgte nach Saffert (2001).

Es werden 100 g Erbsenkeimlinge im Haushaltsmixer mit 500 ml 0,1 M Tris-HCl Puffer (pH 7,5) homogenisiert. Anschließend wird durch ein Nylonnetz (\varnothing 0,5 mm) filtriert und 30 min bei $14\,000 \times g_{\max}$ (Beckman J2-21) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird abgetrennt und als Rohextrakt weiterverwendet. Zu dem Rohextrakt wird festes Ammoniumsulfat bis zu 30%iger Sättigung unter Rühren langsam zugegeben (170 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pro 1 l Lösung). Die Lösung wird zur Fällung über Nacht bei 4 °C gerührt und anschließend 30 min bei $14\,000 \times g_{\max}$ zentrifugiert (Beckman J2-21). Der erhaltene Rückstand wird verworfen und zu der Lösung langsam festes Ammoniumsulfat bis zu 68%iger Sättigung zugesetzt (270 g zu 1 l einer bereits zu 30% gesättigten Lösung). Nach Rühren über Nacht bei 4 °C und Zentrifugation bei $14\,000 \times g_{\max}$ wird der Überstand verworfen und der Rückstand in 60 ml 20 mM Piperazin-Puffer (pH 5,6) gelöst. Der gelöste Niederschlag wird in einen sterilen Dialyseschlauch (Servapor, Serva) aus regenerierter Cellulose mit definierter Porengröße (\varnothing 29 mm, Ausschlussgrenze 12 bis 14 kDa) eingefüllt und unter Rühren gegen 3 l des gleichen Puffers über Nacht dialysiert. Anschließend wird die Lösung 30 min bei $14\,000 \times g_{\max}$ und 4 °C (Beckman J2-21) zentrifugiert. Der hieraus resultierende Rückstand wird verworfen und die klare Enzymlösung mit 1 N NaOH auf pH 7,5 eingestellt. Die Probenaufgabe auf die zuvor mit Laufmittel A äquilibrierte Ionenaustauscher-Chromatographiesäule (1,6 \times 70 cm, DEAE-Sepharose FF) erfolgt mit einer Peristaltikpumpe.

Die Chromatographie wird unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Flussrate:	1 ml/min
Fraktionierung:	11 ml
Elution:	A = 20 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,5) B = A + 0,5 M NaCl Linearer Gradient bis 25% B (400 ml), isokratisch (300 ml), linearer Gradient bis 100% B (150 ml)

Die erhaltenen α -Dioxygenase-aktiven Fraktionen werden vereinigt und mittels Ultrafiltration (30 kDa Ausschlussgrenze) auf ein Volumen von 3 ml eingengt. Das Konzentrat wird über eine mit 0,1 M Tris-HCl Puffer (pH 7,5) äquilibrierte Gelfiltrationssäule (1,6 × 60 cm, Sephacryl S-300 HR) unter folgenden Bedingungen weiter aufgereinigt:

Flussrate:	0,2 ml/min
Fraktionierung:	2 ml
Elution:	0,1 M Tris-HCl Puffer (pH 7,5)

Abschließend werden die α -Dioxygenase-aktiven Fraktionen vereinigt, mittels Ultrafiltration (Hettich 16R, 30 kDa Ausschlussgrenze) konzentriert und entsalzt.

3.3.11.2 Herstellung eines Proteinrohextrakts aus keimenden Erbsen

Gefrorenes Pflanzenmaterial wird mit Hilfe eines Mörsers in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver vermahlen. Zu diesem Material wird Extraktionspuffer (0,1 M Tris-HCl, pH 7,5) im Verhältnis 2 ml Extraktionspuffer je 1 g Frischgewicht des Pflanzenmaterials gegeben und gut homogenisiert. Die Suspension wird 10 min bei $3000 \times g_{\max}$ zentrifugiert. Der Überstand wird zur Untersuchung der zeitlichen Entwicklung der Expression von α -Dioxygenase während der Keimung und Entwicklung für Western Blots (3.3.9.5) und Aktivitäts-Assays (3.3.12.4) eingesetzt.

3.3.11.3 Nicht-denaturierende Aufreinigung eines rekombinanten Proteins über

Affinitätschromatographie an Ni^{2+} -NTA-Agarose

Die hier beschriebene Protein-Präparation findet bei 4 °C unter nicht-denaturierenden Bedingungen statt. Zur Aufreinigung wird das Bakteriensediment in Lysepuffer resuspendiert (5 ml/g Feuchtgewicht), es wird Lysozym in einer Endkonzentration von 1 mg/ml zugegeben und eine halbe Stunde vorsichtig bei 4 °C geschwenkt. Zur vollständigen Lyse wird 5 × 30 sec sonifiziert (Stufe 3, dazwischen Proben jeweils 1 min auf Eis halten) und 0,1% Triton-X 100 zugegeben, dann wird eine halbe Stunde bei 4 °C vorsichtig geschwenkt. Die Suspension wird zentrifugiert (Beckman J2-21, Rotor JA-20, 4 °C, 30 min, 10 000 Upm) und der proteinhaltige Überstand abgenommen. Das Pellet wird verworfen. Zum Überstand wird in Lyse-Puffer voräquilibrierte Ni^{2+} -NTA-Agarose gegeben (ca. 1,0 ml/1 l Bakterienkultur). Um ein möglichst vollständiges Binden des rekombinanten Proteins an die Ni^{2+} -NTA-Agarose zu gewährleisten, wird die Suspension anschließend 2 h durch langsames Rotieren am KPG-Rührer bei 4 °C gemischt und anschließend in eine 15 ml PP-Säule (1,6 × 7,5 cm) gegeben. Nach Absetzen des Säulenmaterials, wird der Überstand als Durchlauf aufgefangen. Die Säule wird nun 4 × mit je 10 ml Waschpuffer

gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgt mit 5-8 ml Elutionspuffer. Die Vollständigkeit der Elution wird durch einen parallel ausgeführten Bradford-Test (3.3.9.2) festgestellt.

Lyse-Puffer		Waschpuffer		Elutionspuffer	
NaCl	250 mM	NaCl	250 mM	NaCl	250 mM
NaH ₂ PO ₄	50 mM	NaH ₂ PO ₄	50 mM	NaOAc	50 mM
Glycerin	10% (v/v)	Glycerin	10% (v/v)	Glycerin	10% (v/v)
		Triton X-100	0,1% (v/v)	Triton X-100	0,1% (v/v)
	pH 8,0		pH 6,0		pH 5,0

3.3.12 Bestimmung der α -Dioxygenase-Aktivität

3.3.12.1 Qualitativer Nachweis der α -Dioxygenase-Aktivität

Der qualitative Nachweis der α -Dioxygenase-Aktivität in einem Enzymextrakt erfolgt unter Verwendung von Laurinsäure als Substrat mittels *Headspace*-HRGC-Analytik des gebildeten Undecanals. Zur Herstellung einer 10 mM Laurinsäurelösung werden 200 mg Laurinsäure in ca. 90 ml 0,1 M Tris (pH 10) gelöst. Anschließend wird unter Rühren der pH-Wert der Lösung mit 6 N Salzsäure auf pH 7,5 eingestellt und die Lösung mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Zur Durchführung des Aktivitätstests werden 100 μ l Substratstammlösung zu 200 μ l der Enzymlösung gegeben, die Mischung in ein Probengefäß eingefüllt und verschlossen. Nach 30-minütiger Inkubation der Lösung bei Raumtemperatur wird der gebildete Aldehyd durch *Headspace*-HRGC-Analytik anhand des chromatographischen Vergleichs mit einer authentischen Referenzsubstanz nachgewiesen.

3.3.12.2 Spektralphotometrischer Nachweis der α -Dioxygenase-Aktivität

Der spektralphotometrische Nachweis der α -Dioxygenase-Aktivität erfolgt gemäß Saffert (2001) bei 25 °C in 4 ml Kunststoffküvetten der Schichtdicke 1 cm an einem registrierenden Spektralphotometer. Die Messung des gebildeten Aldehyds nach Umsetzung von Laurinsäure erfolgt nach Yukawa *et al.* (1993). Undecanal wird als 2,4-Dinitrophenylhydrazinderivat bei 430 nm gemessen. Als Substrat dient wie unter 3.3.12.1 beschrieben 10 mM Laurinsäurelösung. Im Assay werden 100 μ l Substratstammlösung mit 200 μ l Enzymlösung 40 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wird mit Wasser auf 500 μ l aufgefüllt. Nach Zugabe von 500 μ l einer salzsauren gesättigten ethanolschen 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung (350 μ l konz. HCl je 10 ml Lösung) wird 30 min bei 50 °C temperiert. Abschließend wird nach Abkühlen mit 2,5 ml 10%iger KOH in

80%iger ethanolischer Lösung alkalisiert und die Extinktion bei 430 nm gegen einen Reagentienblindwert ohne Enzym gemessen. Die Undecanalkonzentration wird einer Kalibriergeraden entnommen, die mit Undecanal unter analogen Bedingungen aufgenommen wurde.

$$\text{Volumenaktivität [U/ml]} = \frac{c \cdot \text{Vol}}{M \cdot \text{vol} \cdot t}$$

wobei

c	=	Undecanalkonzentration [$\mu\text{g/ml}$]
Vol	=	Endvolumen in der Reaktionslösung [0,5 ml]
M	=	molare Masse von Undecanal [170,30 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$]
vol	=	eingesetzte Enzymmenge [ml]
t	=	Umsetzungsdauer [min]

1 Unit [U] ist der Stoffumsatz von 1 μMol pro Minute. Die spezifische Aktivität wird in U/mg Protein angegeben.

3.3.12.3 Polarographische Bestimmung der α -Dioxygenase-Aktivität

Die polarographische Bestimmung der α -Dioxygenase-Aktivität erfolgt mit einer Sauerstoffelektrode nach Clark (Delieu und Walker, 1972). Es wird unter intensivem, gleichmäßigem Rühren bei 25 °C gemessen. Als Standard-Substratlösung wird eine 10 mM Palmitinsäure-Stammlösung verwendet. Dazu werden 256 mg Palmitinsäure in 90 ml 0,1 M Tris (pH 10) gelöst und, wie unter 3.3.12.1 für Laurinsäure beschrieben, weiterbehandelt. Als Enzymlösung wird ein Konzentrat der aus Erbsen angereicherten α -Dioxygenase (3.3.11.1) verwendet. Das Volumen der Messzelle umfasst insgesamt 2 ml. Darin sind Substrat-Stammlösung und 200 μl Enzymlösung enthalten. Aufgefüllt wird mit 0,1 M Tris-HCl Puffer (pH 7,5). Die Reaktion wird nach dem Einstellen einer stabilen Grundlinie durch Zugabe der Enzymlösung gestartet. Die Umsetzung weiterer Substrate wird durchgeführt wie für Palmitinsäure beschrieben. Die Sauerstoffabnahme pro Minute im linearen Bereich der Kurve wird durch Anlegen einer Tangente bestimmt und dient zur Berechnung der enzymatischen Aktivität. Für die Bestimmung des Faktors der Sauerstoffelektrode wird mit N_2 -gesättigter Lösung der Nullpunkt am Schreiber eingestellt und mit luftsauerstoffgesättigter Lösung bei 25 °C der Wert für 240 μM O_2 -Konzentration abgelesen.

Die Berechnung erfolgt nach der Gleichung:

$$\text{Volumenaktivität [U/ml]} = \frac{\Delta O_2 \cdot \text{Vol} \cdot F}{\text{vol}}$$

wobei

ΔO_2 = Steigung der Tangente [cm]

Vol = Endvolumen in der Messzelle [ml]

F = aus der Kalibrierung erhaltener Faktor für O₂ [$\mu\text{mol/cm}$]

vol = eingesetzte Enzymmenge [ml]

3.3.12.4 Nachweis der α -Dioxygenase-Aktivität mittels HPLC mit UV-Detektion

Der Nachweis der α -Dioxygenase-Aktivität mittels HPLC mit UV-Detektion erfolgt durch Messung des gebildeten Aldehyds nach Umsetzung von Laurin- bzw. Palmitinsäure in Anlehnung an Yukawa *et al.* (1993). Als Substrat dient 10 mM Laurinsäurelösung bzw. 10 mM Palmitinsäure-Stammlösung. Es wird 1 mM Substrat mit Enzymlösung für 30 bzw. 40 min bei 30 °C inkubiert. Nach Zugabe des gleichen Volumens an salzsaurer gesättigter ethanolischer 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung (350 μl konz. HCl je 10 ml Lösung) wird 30 min bei 50 °C temperiert. Anschließend wird dreimal mit einem äquivalenten Volumen an Hexan ausgeschüttelt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird der Rückstand in 500 μl Chloroform aufgenommen und mittels *Reversed Phase*-HPLC mit UV-Detektion bei 430 nm analysiert. Die Aldehydkonzentration wird einer Kalibriergeraden entnommen, die unter analogen Bedingungen mit der authentischen Referenzverbindung aufgenommen wurde. Die Geräteparameter sowie Analysenbedingungen sind unter 3.2.3 aufgeführt.

$$\text{Volumenaktivität [U/ml]} = \frac{c \cdot \text{Vol}}{M \cdot \text{vol} \cdot t}$$

wobei

c = Aldehydkonzentration [$\mu\text{g/ml}$]

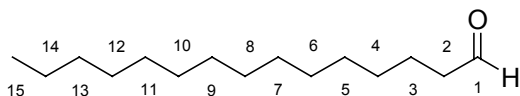
Vol = Endvolumen [0,5 ml]

M = molare Masse des Aldehyds [$\mu\text{g}/\mu\text{mol}$]

vol = eingesetzte Enzymmenge [ml]

t = Umsetzungsdauer [min]

3.3.13 Darstellung von Pentadecanal



Arbeitsvorschrift (Harwood und Moody, 1989):

16,2 g (75 mmol) Pyridiniumchlorochromat werden in 100 ml trockenem Dichlormethan unter Rückfluss und Rühren gelöst. Nach Zugabe von 5,81 g (25 mmol) Alkohol über den Kühler wird 1,5 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 100 ml trockenem Diethylether verdünnt und der resultierende Überstand abdekantiert. Der Rückstand wird dreimal sorgfältig mit je 25 ml warmem Diethylether gewaschen und mit der vorher abgetrennten organischen Phase vereinigt. Nach Aufreinigung über 5 g Kieselgel und Einengen des Filtrats auf ein Volumen von ca. 20 ml am Rotationsverdampfer wird der Aldehyd mittels fraktionierter Destillation (K_p^{25} 185 °C) gewonnen.

Ansatz: 5,81 g Pentadecanol

Ausbeute: 2,1 g (37%) Pentadecanal

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): δ 0.88 (t, $J = 7$ Hz, 3H, H-15), 1.26 (m, 20H, H-14 – H-5), 1.30 (m, 2H, H-4), 1.62 (m, 2H, H-3), 2.36 (m, 2H, H-2), 9.77 (s, 1H, H-1).

^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3): δ 14.0 (q, C-15), 22.7 (t), 24.8 (t), 29.2 (t), 29.4 (t), 29.7 (t), 33.8 (t), 64.4 (d, C-2), 178.4 (s, C-1).

3.3.14 Bioinformatische Methoden

3.3.14.1 Datenbanksuche

Alle Datenbanksuchen wurden unter <http://www.ncbi.nih.gov> mit den blast-Algorithmen durchgeführt.

3.3.14.2 Erstellung von *Alignments*

Die Erstellung aller *Alignments* erfolgte unter Verwendung des Programms ClustalW im Programm BioEdit oder unter <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>. Die Erstellung von Phylogrammen erfolgte unter Verwendung der Programme ClustalX (Version 1.81) und TreeView (Version 1.6.6).

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Isolierung der für α -Dioxygenase aus *P. sativum* codierenden cDNA

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war, die für die α -Dioxygenase (α -DOX) aus Erbsen codierende cDNA zu isolieren und zu charakterisieren. Hierzu wurde eine λ -cDNA-Bibliothek verwendet, die aus Erbsen nach dreitägiger Keimung erstellt worden war. In diesem Entwicklungsstadium hatte man eine besonders hohe α -Dioxygenase-Aktivität in den Pflanzen nachgewiesen (Saffert, 2001). Daher war zu erwarten, dass der Anteil der α -Dioxygenase mRNA ebenfalls hoch sein würde.

4.1.1 Immuno-Screening der *P. sativum* λ -cDNA-Bibliothek

In vorangegangenen Arbeiten hatte man eine α -Dioxygenase aus Erbsen isoliert und bis zur elektrophoretisch einheitlichen Form gereinigt. Gegen die 70 kD-Untereinheit dieses aufgereinigten Proteins waren in Kaninchen Antikörper produziert worden (Saffert, 2001).

Mit diesem Antiserum sollten nun durch immunologisches *Screening* der λ -cDNA-Bibliothek aus Erbsen durch Antigen-Antikörper-Reaktion Phagen-Klone mit dem für die α -Dioxygenase codierenden *Insert* nach induzierter Genexpression nachgewiesen und isoliert werden. Bei Erfolg des *Screenings* war vorgesehen, nach Vermehrung der entsprechenden Phagen-Klone die cDNA zu isolieren und zu sequenzieren.

4.1.1.1 Kontrolle der Antikörper-Spezifität

Das Antiserum gegen die 70 kD-Untereinheit der aufgereinigten α -Dioxygenase aus Erbsen war im Rahmen der Dissertation von A. Saffert hergestellt worden (Saffert, 2001).

Vor der Verwendung zur Immundetektion wurde das Antiserum aufgereinigt, da Antiseren immunisierter Tiere häufig einen hohen Anteil an Antikörpern enthalten, welche bakterielle Antigene erkennen. Bei der Analyse von Expressions-Bibliotheken in *Escherichia coli* kann dies zu

erhöhten Hintergrundsignalen führen. Daher wurden anti-*E. coli*-Immunglobuline, nach Inkubation einer Verdünnung des Antiserums mit abgetöteten, unlöslichen *E. coli*-Zellen, mittels Zentrifugation abgetrennt (nach Gruber und Zignales, 1995) (3.3.9.7).

Zur Spezifitätskontrolle der Antikörper wurden ein Protein-Rohextrakt (90 µg Gesamtprotein) aus Erbsen sowie Fraktionen (10 µg Gesamtprotein) aus der Gelpermeationschromatographie an Sephacryl S-300 HR mit unterschiedlicher α -Dioxygenase-Aktivität (3.3.11.1) in einem SDS-PAGE-Gel (10%) aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden sodann auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen (Western Blot, 3.3.9.5). Anschließend erfolgte die Durchführung eines Immunoassays gemäß 3.3.9.6. Der Primärantikörper (Antiserum) wurde in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt, als Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen) fand ein Konjugat mit Alkalischer Phosphatase in der Verdünnung 1:5000 Verwendung. Die Detektion erfolgte mit CSPD (*Tropix*) als Substrat. Durch die Chemilumineszenz des umgesetzten Substrats wurde ein Röntgenfilm geschwärzt. Wie aus Abb. 4-1 ersichtlich, nahm die Signalintensität und -spezifität mit dem Reinheitsgrad der *P. sativum* α -Dioxygenase bis hin zu den Fraktionen 44 und 46 (Bahn 5 und 6) mit der höchsten spezifischen Aktivität zu. Im Rohextrakt und in den Fraktionen 35, 40, 42 und 55 (Bahnen 2, 3, 4 und 9) sind unspezifische Signale geringerer Intensität zu erkennen. Abb. 4-2 zeigt das Ergebnis einer SDS-PAGE mit denselben Proben; zur Sichtbarmachung der Proteinbanden wurde mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt. Die mit dem Antiserum detektierte Proteinbande ist im Coomassie Brilliant Blau-gefärbten Gel kaum erkennbar (Abb. 4-2). In den Bahnen 3 und 4 (Fraktion 40 und 42) des gefärbten Gels tritt ein Protein bei ca. 97 kD deutlich hervor – es ruft im Western Blot (Abb. 4-1) ein schwaches unspezifisches Signal hervor –, bei dem es sich nicht um das Zielprotein handelt.

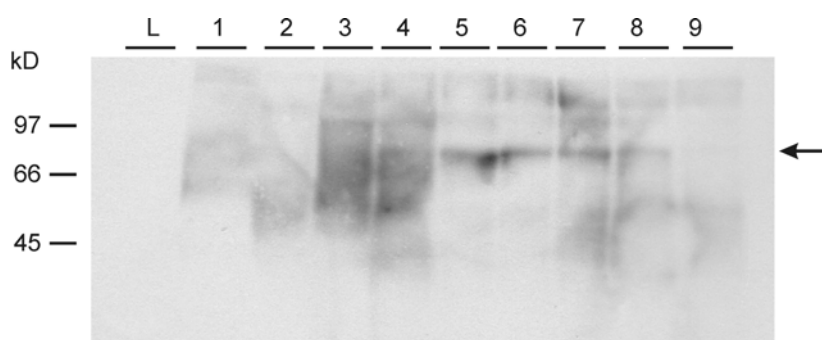


Abb. 4-1: SDS-PAGE (10%) von α -Dioxygenase-aktiven Fraktionen mit unterschiedlichem Reinheitsgrad. Die Immundetektion erfolgte nach Proteintransfer auf eine Nitrocellulose-Membran mit dem Antiserum gegen die 70 kD-Untereinheit der aus Erbsen aufgereinigten α -Dioxygenase. Links ist die Größe der Banden des Proteinlängenstandards angegeben. Die Position, an der die Bande der *P. sativum* α -Dioxygenase erwartet wird, ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Auftragsmuster: (L) Proteinlängenstandard; (1) Rohextrakt; (2) Fraktion 35 nach Sephacryl S-300 HR; (3) Fraktion 40; (4) Fraktion 42; (5) Fraktion 44; (6) Fraktion 46; (7) Fraktion 48; (8) Fraktion 50; (9) Fraktion 55.

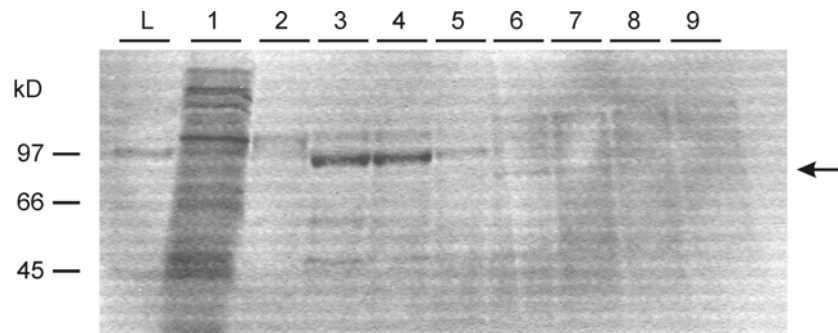


Abb. 4-2: SDS-PAGE (10%) von α -Dioxygenase-aktiven Fraktionen mit unterschiedlichem Reinheitsgrad. Die Anfärbung erfolgte mit Coomassie Brilliant Blau. Links ist die Größe der Banden des Proteinlängenstandards angegeben. Die Position, an der die Bande der *P. sativum* α -Dioxygenase erwartet wird, ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Das Auftragsmuster entspricht Abb. 4-1.

4.1.1.2 Titration der λ -cDNA-Bibliothek

Die verwendete λ -cDNA-Bibliothek aus keimenden Erbsen war im Rahmen der Dissertation von A. Saffert erstellt worden (Saffert, 2001).

Zur Bestimmung des Titers der λ -cDNA-Bibliothek wurden von den Ansätzen A_2 und B_2 Verdünnungen von 10^{-4} bis 10^{-8} in SM-Puffer hergestellt. 200 μ l einer *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellsuspension wurden zu NZY-Top-Agar gegeben und auf LB-Agarplatten (\varnothing 8,3 cm) gegossen. Nach Trocknen der Platten wurden jeweils 10 μ l der Phagen-Verdünnungen auf die LB-Agarplatte aufgetropft und die Platten anschließend bei 37 °C inkubiert (3.3.8.3). In Tab. 4-1 finden sich die Ergebnisse der Titerbestimmung.

Tab. 4-1: Titerbestimmung der Phagen-Suspensionen A_2 und B_2 .

Fraktionen	A_2	B_2
Phagentiter (<i>pfu/ml</i>)	$43,5 \times 10^6$	$68,5 \times 10^8$

4.1.1.3 Screening der λ -cDNA-Bibliothek

Im Western Blot konnte eine spezifische Bindung des Antiserums an die α -Dioxygenase aus Erbsen nachgewiesen werden (vgl. 4.1.1.1). Es wurde daher erwartet, dass es möglich wäre, im Rahmen eines Expressions-Screenings der *P. sativum* λ -cDNA-Bibliothek mit dem Antiserum gegen die 70 kD-Untereinheit der α -Dioxygenase aus Erbsen spezifische Signale zu erhalten und dann die entsprechenden cDNA-Klone zu isolieren.

Für das *Screening* der λ -cDNA-Bibliothek wurden *E. coli* XL1-Blue MRF' (3.3.8.4) mit 25 000 bzw. 50 000 *pfu* pro LB-Platte (\varnothing 13,5 cm) transfiziert. Durch das Auflegen von IPTG-getränkten Nitrocellulose-Membranen wurde die Expression induziert (3.3.8.5) und das Protein-Muster auf die Membranen übertragen. Nach Inkubation bei 37 °C wurden die Membranen von den Platten abgezogen und gewaschen. Die Immundetektion erfolgte über eine Antigen-Antikörper-Reaktion (3.3.9.6). Der Primäantikörper (Antiserum) wurde zur Entfernung von *E. coli*-Antigenen mit *E. coli*-Zellfragmenten vorbehandelt (3.3.9.7). Die Signale von potentiell positiven Phagen-Klonen wurden über die Reaktion von Alkalischer Phosphatase, die an den Sekundäantikörper gekoppelt ist, mit CSPD als Chemilumineszenz-Substrat auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

Insgesamt wurden 10^6 *pfu* mittels immunologischem *Screening* untersucht. In der ersten *Screening*-Runde wurden 21 Signale als potentiell positiv eingestuft. Den Signalen wurden anhand der vorher angebrachten Markierungen auf den LB-Agarplatten spezifische Phagen-Klone zugeordnet, die entsprechenden Plaques isoliert und in SM-Puffer resuspendiert (3.3.8.8). Es wurde der Titer der so erhaltenen Phagen-Suspensionen bestimmt und nach entsprechender Verdünnung eine weitere *Screening*-Runde durchgeführt. Bei der zweiten *Screening*-Runde fand als Kontrolle ein Phagen-Klon Einsatz, der nicht zur Expression von Fremd-Proteinen befähigt ist (λ pBR mit pBR322 Test-Insert). Hierbei zeigte sich, dass die Signale, die mit der Negativ-Kontrolle erhalten wurden, mit denen der Phagen-Klone vergleichbar waren, welche in der ersten *Screening*-Runde als potentiell positiv eingestuft worden waren (Abb. 4-3). Damit war eine Identifizierung positiver Phagen-Klone mit diesem System nicht möglich.

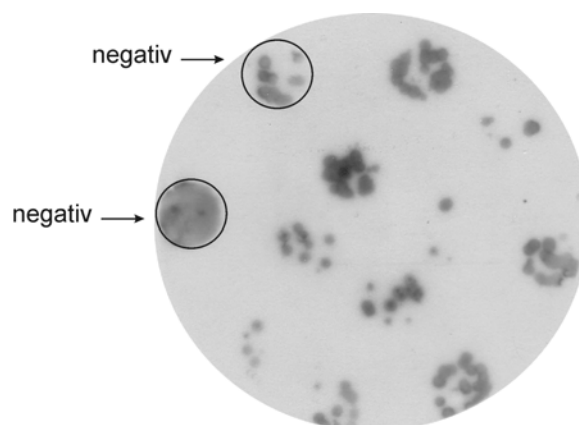


Abb. 4-3: Fluorographie einer Nitrocellulose-Membran mit Phagen-Klonen nach Inkubation mit dem Antiserum gegen die 70 kD-Untereinheit der α -Dioxygenase aus Erbsen. Die Bereiche der Negativ-Kontrolle sind schwarz umrandet. Die Plaques der Negativ-Kontrolle exprimieren nach IPTG-Induktion kein Fremdprotein. Ein Unterschied zwischen potentiell positiven Signalen und denen der Negativ-Kontrolle ist nicht erkennbar.

Auch durch Variation der Antikörper-Verdünnungen war es nicht möglich, das Signal-Hintergrund-Verhältnis zu verbessern. Möglicherweise war der verwendete polyklonale Primärantikörper in der Lage, ein Phagen-spezifisches Protein zu erkennen. Um Phagen-spezifische Antikörper abzutrennen, wäre es denkbar, die Antikörper-Lösung vor dem *Screening* – analog zur Behandlung mit abgetöteten *E. coli*-Zellen – mit einem Phagen-Lysat zu behandeln. Weiterhin ist bekannt, dass Antikörper zum Teil effektiver an Epitope des denaturierten Proteins binden als an Epitope des nativen Proteins (Harlow und Lane, 1988).

Die Versuche zum Immuno-*Screening* der *P. sativum* λ -cDNA-Bibliothek mit dem Antiserum gegen die α -Dioxygenase aus Erbsen wurden nicht weiterverfolgt.

4.1.2 Isolierung eines für α -Dioxygenase aus *P. sativum* codierenden cDNA-Fragments

Da es nicht möglich war, durch ein Immuno-*Screening* der *P. sativum* λ -cDNA-Bibliothek die für die α -DOX aus Erbsen codierende cDNA zu isolieren, wurde zunächst mittels RT-PCR und degenerierten *Primern* ein Fragment der entsprechenden cDNA isoliert.

4.1.2.1 Konstruktion degenerierter Oligonukleotid-Startsequenzen

Die Konstruktion von degenerierten Oligonukleotid-Startsequenzen erfolgte mit Hilfe der Aminosäuresequenzen von Peptid-Fragmenten der *P. sativum* α -Dioxygenase. Im Rahmen der Dissertation von A. Saffert waren durch Cyanbromid-Spaltung der 70 kD-Untereinheit der aufgereinigten α -Dioxygenase 15 Peptide erhalten und sequenziert worden (Saffert, 2001).

Es erfolgte nun ein Vergleich der Aminosäurepartialsequenzen der α -Dioxygenase aus Erbsen mit den bekannten Aminosäuresequenzen von α -Dioxygenasen aus anderen höheren Pflanzen. Zum Zeitpunkt der Durchführung waren dies die α -Dioxygenasen aus *Nicotiana tabacum* (Sanz *et al.*, 1998), *Nicotiana attenuata* (Hermsmeier *et al.*, 2001), *Arabidopsis thaliana* (Sanz *et al.*, 1998) und *Oryza sativa* (Koeduka *et al.*, 2000).

4 Ergebnisse und Diskussion

Es wurden zunächst Regionen ausgewählt, die sich durch große Homologie zwischen den einzelnen Aminosäuresequenzen auszeichnen (Abb. 4-4).

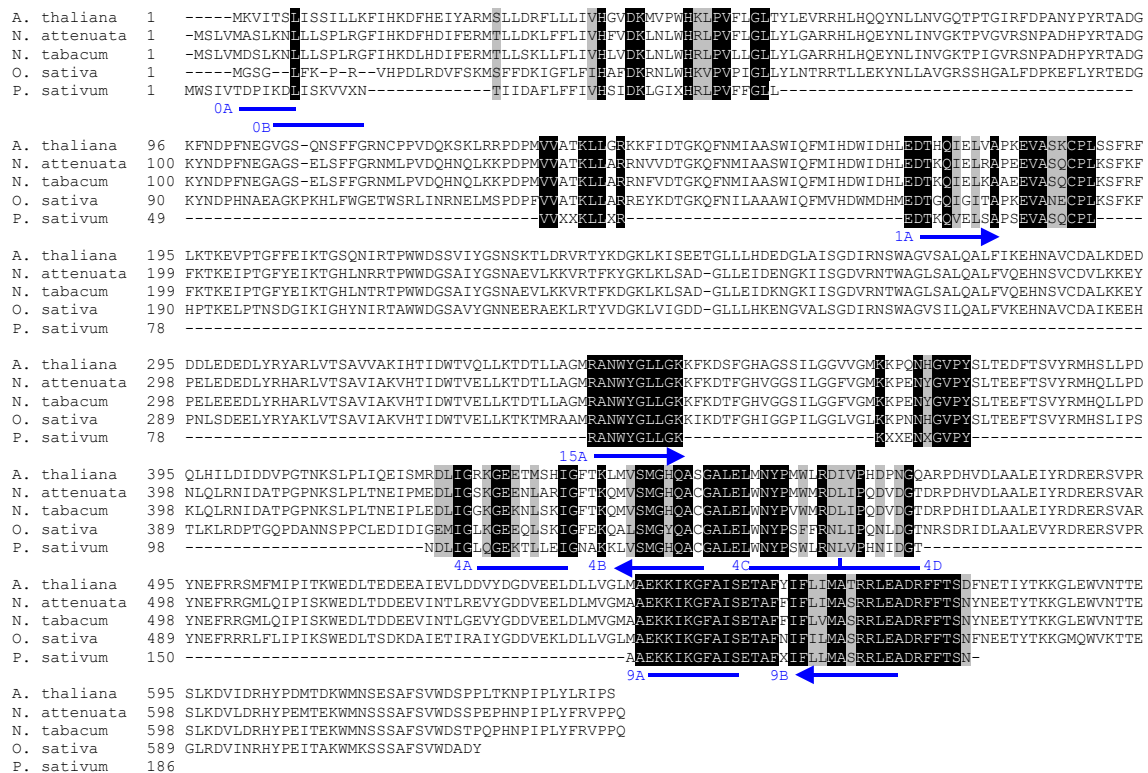


Abb. 4-4: Alignment der Aminosäurepartialsequenzen der 70 kD-Untereinheit der *P. sativum* α -Dioxygenase mit Aminosäuresequenzen bekannter α -Dioxygenasen aus anderen höheren Pflanzen. Verwendet wurden die Sequenzen der α -Dioxygenasen aus *O. sativa* (GenBank Accession Nr.: AAF64042), *N. attenuata* (GenBank Accession Nr.: AW191821), *N. tabacum* (GenBank Accession Nr.: AJ007630) sowie *A. thaliana* (GenBank Accession Nr.: AF334402). Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt, ähnliche grau. Bereiche großer Homologie sind mit blauen Balken und Pfeilen gekennzeichnet. Aminosäuren, die bei der Aminosäuresequenzierung nicht eindeutig identifiziert werden konnten, sind mit einem X dargestellt. Die Nummerierung entspricht derjenigen der Aminosäurepartialsequenzen nach Saffert (2001), die Pfeile kennzeichnen die für die Konstruktion der Oligonukleotidstartsequenzen ausgewählten Bereiche, wobei die Pfeilrichtung der Orientierung (5'→3') der Startsequenzen entspricht.

Anschließend wurden die DNA-Sequenzabschnitte betrachtet, die den Bereichen besonders hoher Homologie auf Proteinebene entsprechen, und vier Bereiche ausgewählt, in denen die Homologie auf DNA-Ebene ebenfalls besonders hoch ist.

Unter Berücksichtigung der Aminosäurepartialsequenzen der aufgereinigten α -Dioxygenase aus Erbsen wurden vier Startsequenzen konstruiert (Abb. 4-5). Kamen mehrere Nukleotide in Frage, wurden alle diese Nukleotide oder Inosin als Base gewählt, da Hypoxanthin mit Cytosin, Thymin und Adenin stabile Basenpaare ausbilden kann.

Auf diese Weise wurden die *Primer*-Paare 1A/4B und 15A/9B erhalten. Die Nummerierung entspricht derjenigen der Aminosäurepartialsequenzen (vgl. Saffert, 2001), von denen die Startsequenzen abgeleitet sind.

<p>1A: $T_m=68^\circ\text{C}$</p> <p>P. sativum: I K C V E L S A</p> <p>O. sativa: I G C I G I T A</p> <p>N. attenuata: I K C I E I R A</p> <p>N. tabacum: I K C I E I R A</p> <p>A. thaliana: I H C I E I V A</p> <p>O. sativa: ACC-GGA-CAG-ATT-GGA-ATC-ACA-GCT</p> <p>N. attenuat: ACT-AAG-CAG-ATT-GAG-CTT-AGG-GCA</p> <p>N. tabacum: ACT-AAG-CAG-ATT-GAG-CTT-AAG-GCA</p> <p>A. thaliana: ACT-CAC-CAG-ATC-GAA-CTT-GTC-GCT</p> <p>5'-ACT-AAG-CAG-GTT-GAR-CTT-AGY-GC-3'</p>	<p>4B: $T_m=68^\circ\text{C}$</p> <p>P. sativum: S M G H Q A C G</p> <p>O. sativa: S M G Y Q A C G</p> <p>N. attenuata: S M G H Q A C G</p> <p>N. tabacum: S M G H Q A C G</p> <p>A. thaliana: S M G H Q A S G</p> <p>O. sativa: TCA-ATG-GGA-TAT-CAA-GCT-TGT-GGT</p> <p>N. attenuata: TCA-ATG-GGT-CAC-CAA-GCC-TGT-GGA</p> <p>N. tabacum: TCA-ATG-GGT-CAC-CAA-GCC-TGT-GGA</p> <p>A. thaliana: TCA-ATG-GGT-CAC-CAA-GCA-AGT-GGT</p> <p>3'-AGT-TAC-CCA-GTG-GTT-CGI-ACA-CC-5'</p>
<p>15A: $T_m=80^\circ\text{C}$</p> <p>P. sat.: A N W Y G L L G K</p> <p>O. sat.: A N W Y G L L G K</p> <p>N. att.: A N W Y G L L G K</p> <p>N. tab.: A N W Y G L L G K</p> <p>A. thal.: A N W Y G L L G K</p> <p>O. sat.: GCA-AAT-TGG-TAT-GGA-TTA-TTG-GGT-AAG</p> <p>N. att.: GCC-AAT-TGG-TAT-GGA-TTA-CTA-GGG-AAG</p> <p>N. tab.: GCC-AAT-TGG-TAT-GGA-TTA-CTA-GGG-AAG</p> <p>A. thal.: GCA-AAT-TGG-TAC-GGA-CTA-CTA-GGA-AAG</p> <p>5'-GCM-AAT-TGG-TAT-GGA-TTA-CTA-GGG-AAG-3'</p>	<p>9B: $T_m=76^\circ\text{C}$</p> <p>P. sat.: F L L M A S R R L</p> <p>O. sat.: F I L M A S R R L</p> <p>N. att.: F L I M A S R R L</p> <p>N. tab.: F L V M A S R R L</p> <p>A. thal.: F L I M A T R R L</p> <p>O. sat.: TTC-ATT-TTA-ATG-GCA-TCA-AGG-AGG-CTC</p> <p>N. att.: TTC-CTC-ATC-ATG-GCA-TCA-AGG-AGG-CTA</p> <p>N. tab.: TTC-CTC-GTC-ATG-GCA-TCA-AGG-AGG-CTA</p> <p>A. thal.: TTC-CTC-ATC-ATG-GCC-ACA-AGG-CGA-TTA</p> <p>3'-AAG-GAG-AAT-TAC-CGT-AGT-TCC-TCC-GA-5'</p>

Abb. 4-5: Konstruktion der degenerierten Startsequenzen 1A/4B sowie 15A/9B. In der oberen Hälfte des jeweiligen Bereichs ist das Aminosäuresequenz-Alignment der ausgewählten Sequenzabschnitte dargestellt. Darunter sind die entsprechenden DNA-Sequenzen der α -Dioxygenasen aus *O. sativa* (GenBank Accession Nr.: AAF64042), *N. attenuata* (GenBank Accession Nr.: AW191821), *N. tabacum* (GenBank Accession Nr.: AJ007630) sowie *A. thaliana* (GenBank Accession Nr.: AF334402) angegeben. Die auf Grundlage des Vergleichs der DNA-Sequenzen unter Berücksichtigung der entsprechenden Aminosäuresequenz der *P. sativum* α -Dioxygenase konstruierten Startsequenzen sind blau wiedergegeben. Im Abschnitt oben links sind identische Aminosäuren und Nukleotide zur Verdeutlichung schwarz hinterlegt. R steht für A und G; Y steht für C und T; I steht für Inosin, und M steht für A und C.

4.1.2.2 RT-PCR und Sequenzierung

Zur Isolierung eines Fragments der *P. sativum* α -DOX cDNA erfolgte zunächst die Synthese des cDNA-Erststrangs mit polyA⁺-RNA aus keimenden Erbsen als Templat unter Verwendung von Oligo(dT)-Primern als Startsequenzen und MMLV-reverser Transkriptase (3.3.4.2). Zur qualitativen Kontrolle der Erststrang-Synthese wurde ein Aliquot des Ansatzes mit [α -³²P]dATP versetzt.

Der Amplifikationsschritt erfolgte dann mit den degenerierten Oligonukleotid-Startsequenzen 1A und 4B bzw. 15A und 9B wie unter 4.1.2.1 beschrieben (Durchführung gemäß 3.3.4.2).

Zur Optimierung der PCR-Reaktion wurden unterschiedliche Annealing-Temperaturen (60-70 °C) gewählt. Zur Kontrolle der PCR-Reaktionen wurden die Ansätze auf einem Agarosegel (1% Agarose) aufgetrennt (3.3.1.1). Es wurde erwartet, dass die Länge der PCR-Produkte ca. 830 bp für das *Primer*-Paar 1A/4B und ca. 690 bp für 15A/9B beträgt. Abb. 4-6 zeigt ein Agarosegel mit den entsprechenden aufgetrennten PCR-Ansätzen. Wie dort zu sehen, erfolgte mit dem *Primer*-Paar 1A/4B die Bildung eines PCR-Produkts (DOX830) der entsprechenden Länge, während mit dem *Primer*-Paar 15A/9B kein PCR-Produkt erhalten wurde.

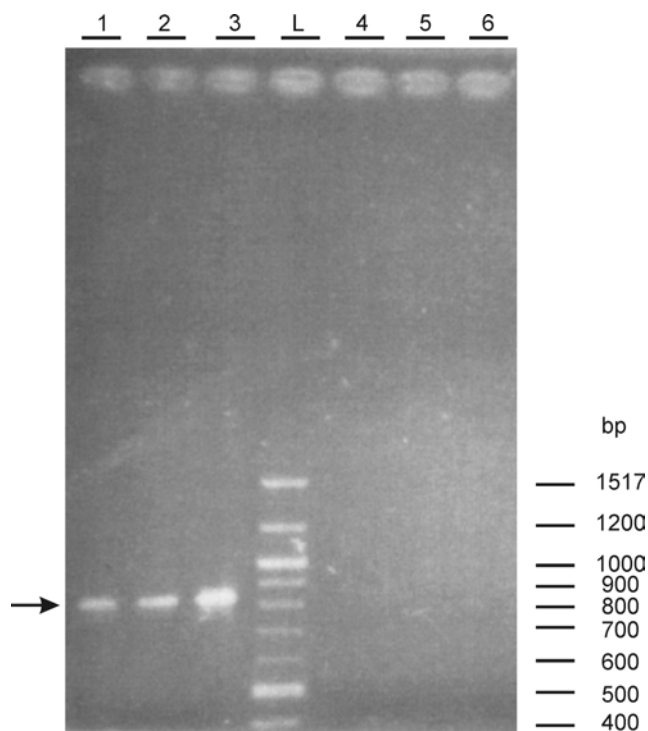


Abb. 4-6: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Ansätze zur Isolierung eines Fragments der *P. sativum* α -DOX cDNA. Als Templat wurde cDNA aus polyA⁺-RNA aus keimenden Erbsen verwendet, als Startsequenzen wurden die *Primer*-Paare 1A/4B und 15A/9B eingesetzt. Rechts ist die Größe des DNA-Standards angegeben. Die Position des PCR-Produkts DOX830 ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.
 Auftragsmuster: (1) 1A/4B, 66 °C; (2) 1A/4B, 68 °C; (3) 1A/4B, 70 °C; (L) DNA-Längenstandard; (4) 15A/9B, 66 °C; (5) 15A/9B, 68 °C; (6) 15A/9B, 70 °C.

Für die Amplifizierung und Sequenzierung des Fragments DOX830 erfolgte eine *blunt-end* Ligation in den Vektor pUC19 (3.3.6.5), um das Plasmid pDOX830 zu erhalten. Klone mit dem entsprechenden *Insert* wurden dann zur Sequenzierung eingesetzt (3.3.5). Die Sequenzierung des 830 bp langen *Inserts* ergab große Homologie zu den bekannten α -Dioxygenase-Sequenzen; die von dieser DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz war in Übereinstimmung mit den Aminosäurepartialsequenzen der aufgereinigten *P. sativum* α -Dioxygenase.

In Abb. 4-7 ist die DNA-Sequenz wiedergegeben, die jeweilige Position der für die Amplifikation verwendeten *Primer* 1A, 4B und 15A ist eingezeichnet. Aus der Sequenz wird deutlich, weshalb mit dem *Primer*-Paar 15A/9B kein PCR-Produkt erhalten wurde: am 3'-Ende der Startsequenz 15A ist keine Übereinstimmung mit der vorliegenden DNA-Sequenz gegeben.

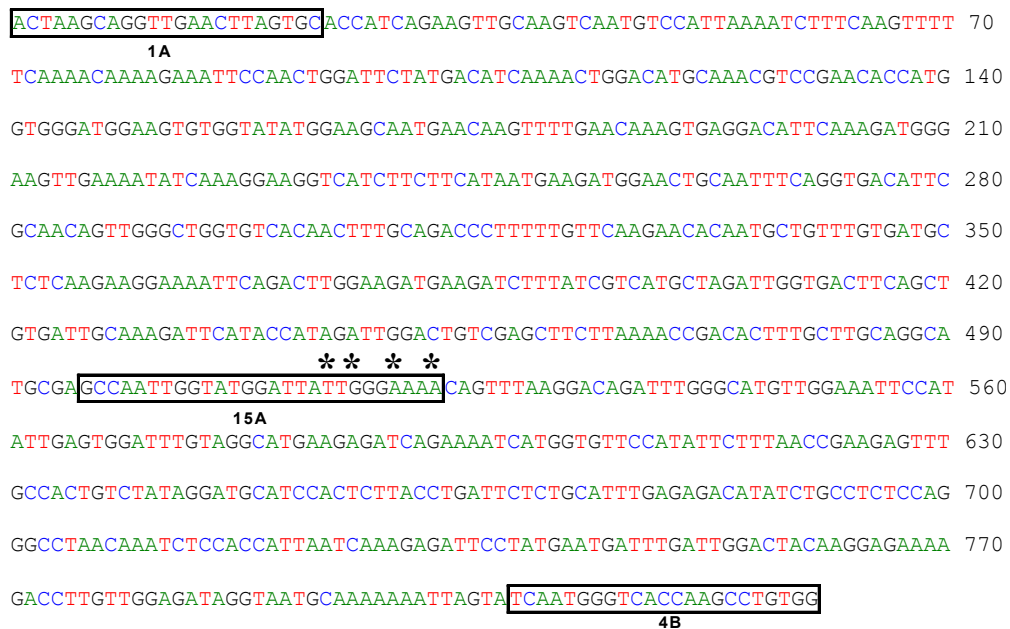


Abb. 4-7: cDNA-Sequenz des Fragments DOX830 der *P. sativum* α -Dioxygenase. Die Bereiche, in denen die Startsequenzen 1A, 15A sowie 4B liegen, sind schwarz umrandet. In der Startsequenz 15A abweichende Nukleotide sind mit einem Stern gekennzeichnet.

4.1.3 Screening der *P. sativum* λ -cDNA-Bibliothek mit radioaktiv markiertem cDNA-Fragment

Mit der für die α -Dioxygenase aus Erbsen spezifischen DNA-Sonde, die gemäß Darstellung in Abschnitt 4.1.2.2 erhalten wurde, wurde die *P. sativum* λ -cDNA-Bibliothek erneut durchsucht. Phagen-Klone mit der entsprechenden vollständigen cDNA als *Insert* wurden isoliert, das *Phagemid* ausgeschnitten und das *Insert* sequenziert.

4.1.3.1 Titration der λ -cDNA-Bibliothek

Die Bestimmung des Titers der λ -cDNA-Bibliothek erfolgte wie unter 4.1.1.2 beschrieben. Tab. 4-2 zeigt die Ergebnisse der zweiten Titerbestimmung.

Tab. 4-2: Titerbestimmung der Phagen-Suspensionen A₂ und B₂.

Fraktionen	A ₂	B ₂
Phagentiter (pfu/ml)	33 × 10 ⁶	97 × 10 ⁸

4.1.3.2 Screening der λ -cDNA-Bibliothek mit DOX830

Um das Fragment DOX830 als spezifische DNA-Sonde einsetzen zu können, wurde es zunächst aus dem Plasmid pDOX830 durch Restriktionshydrolyse mit den Endonukleasen *Eco* RI und *Hind* III isoliert. Die radioaktive Markierung von DOX830 erfolgte mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ und hexameren Startsequenzen (3.3.2.3).

Zur Durchsuchung der λ -cDNA-Bibliothek wurden wie unter 4.1.1.3 *E. coli* XL1-Blue MRF' mit 50 000 *pfu* pro LB-Platte (\varnothing 13,5 cm) transfiziert. Nach Ausbilden der Plaques im Bakterienrasen wurde das Plaque-Muster auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. Zur Denaturierung erfolgte eine Behandlung der abgezogenen Membran-Filter mit einer alkalischen Lösung und anschließend Neutralisierung (3.3.8.7). Die freigesetzte DNA wurde durch Backen im Vakuumofen auf den Membranen fixiert und mit der $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ -markierten DNA-Sonde hybridisiert (3.3.2.2). Auf diese Weise wurden etwa 10^9 Klone untersucht. Plaques, denen im Autoradiogramm ein positives Signal zugeordnet werden konnte, wurden isoliert und in SM-Puffer resuspendiert (3.3.8.8). In der ersten *Screening*-Runde erfolgte die Isolierung von 103 potentiell positiven Klonen; von diesen wurden 48, denen besonders starke Signale zugeordnet werden konnten, für eine zweite *Screening*-Runde ausgewählt. 17 der Phagen-Plaques wurden als positiv bestätigt. In einer dritten *Screening*-Runde wurden zum Vereinzeln der Phagen-Plaques 7 der Phagen-Suspensionen ausgewählt und 11 Phagen-Klone isoliert. Abb. 4-8 zeigt ein Beispiel zur Isolierung und Anreicherung potentiell positiver Phagen-Plaques.

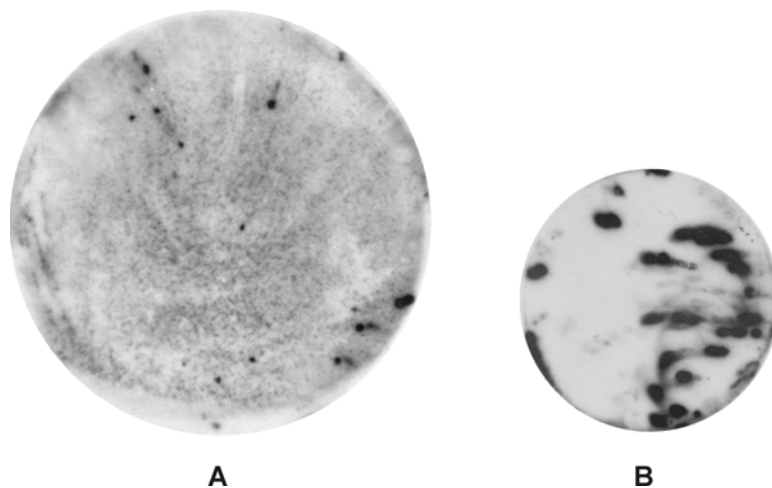


Abb. 4-8: Anreicherung und Isolierung positiver Phagen-Plaques beim *Screening* der *P. sativum* λ -cDNA-Bibliothek mit dem Fragment DOX830.
(A) Identifizierung potentiell positiver Phagen-Klone in der ersten *Screening*-Runde. Auf der gezeigten Platte (\varnothing 13,5 cm) waren etwa 50 000 Plaques ausplattiert worden. Positive Signale, die dann in weiteren *Screening*-Runden untersucht wurden, sind deutlich als schwarze Punkte erkennbar.
(B) Anreicherung und Vereinzeln der potentiell positiven Phagen-Klone in der dritten *Screening*-Runde. Die Signale sind deutlich als schwarze Flecken erkennbar.

4.1.3.3 Exzission des *Phagemids* und Charakterisierung der klonierten cDNAs

Die Isolierung der cDNA *Inserts* aus den als positiv eingestuften Phagen-Klonen wird dadurch ermöglicht, dass der verwendete λ ZAP ein *Phagemid* enthält. Aus den Suspensionen der 11 vereinzelt Phagen-Klone wurde das pBluescript SK *Phagemid* freigesetzt (*in vivo* Exzission), in *E. coli* SolR-Zellen transformiert und auf Ampicillin-haltigen LB-Platten selektiert (3.3.6.7). Mit diskreten Klonen dieser Ansätze erfolgte eine Plasmid-Präparation im analytischen Maßstab. Aliquots dieser Plasmidpräparationen wurden durch Spaltung mit *Eco* RI und nachfolgender Agarosegel-Elektrophorese analysiert (Abb. 4-9). Anschließend erfolgte die Sequenzierung der Klone mit den längsten *Inserts* (Klone 8-7/A, 8-7/B, 14-2/A und 14-2-B), ausgehend vom 5'- und vom 3'-Ende (3.3.5).

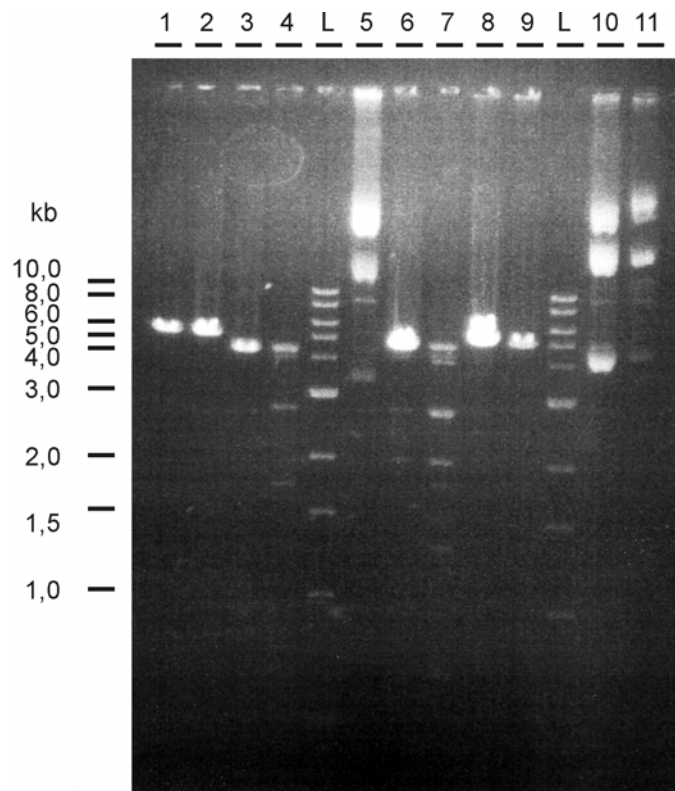


Abb. 4-9: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel von (mit *Eco* RI hydrolysierten) isolierten *Phagemids*. Am linken Rand sind die Größen der Banden des DNA-Längenstandards angegeben.

Auftragsmuster: (1) Klon 8-7/A; (2) Klon 8-7/B; (3) Klon 3-2/A; (4) Klon 3-2/B; (L) DNA-Längenstandard; (5) Klon 1-8; (6) Klon 14-1/A; (7) Klon 14-1/B; (8) Klon 14-2/A; (9) Klon 14-2/B; (L) DNA-Längenstandard; (10) Klon 1-10/A; (11) 1-10/B.

Alle Klone wiesen übereinstimmende Sequenzen unterschiedlicher Länge auf. Die inserierte cDNA der Klone 8-7/A und 8-7/B war identisch, sie beinhaltete bei einer Länge von 2132 bp ein offenes Leseraster (*open reading frame, orf*) von 1929 bp. Bei den Klonen 14-2/A und 14-2/B fehlten am 3'-Ende, im Vergleich zu 8-7/A und 8-7/B, 32 Nukleotide. Mit Klon 8-7/A erfolgte eine

Plasmidpräparation im präparativen Maßstab (3.3.3.4) und eine vollständige Sequenzierung der α -DOX cDNA. Der *orf* und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz sind in Abb. 4-11 wiedergegeben. Die vollständige cDNA-Sequenz ist unter der GenBank Accession Nr. AJ784963 registriert. Die beschriebene cDNA beinhaltet bei einer Länge von 2132 bp ein offenes Leseraster von 1929 bp. Dies entspricht einem Polypeptid von 643 Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht von 73,296 kD. Die Analyse der Aminosäuresequenz mit PROSITE (Bairoch *et al.*, 1997) zeigte, dass an den Positionen N595TTE und N617SSS mögliche N-Glykosylierungsstellen vorhanden sind. Eine Glykosylierung der aus Erbsen aufgereinigten α -Dioxygenase hat man bereits gezeigt (Saffert, 2001).

Die von der DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz war in Übereinstimmung mit den Aminosäurepartialsequenzen der aus keimenden Erbsen aufgereinigten *P. sativum* α -Dioxygenase (Abb. 4-10).

```

Ps pep 1  MWSIVTDPIKDLISKVVKX-----TIIDAFLEFFIVHSIDKLGIMHRLPVFFGLL----- 49
Ps DOX 1  MWSIVTDPIKDLISKVVKXSIHPDFHDAVSKMTIIDAFLEFFIVHSIDKLGIMHRLPVFFGLLVLAIRRHQHQEYNLLNVGTFVVGIRSNP 90

Ps pep 49 -----VXXKLLXR-----EDTKQV 64
Ps DOX 91  SDFPYRTADGRYNDPFNDGAGSQSGSFFGRNILEPVDQKNKLLKPDPMVVTKLLERKTYKDTGTQFNVIAASWIQFMIHDWIDHMEDTKQV 180

Ps pep 65  ELSAPSEVASQCPL----- 78
Ps DOX 181  ELSAPSEVASQCPLKSFKFFKTKEIPTGFYDIKTGHANVRTPWWDGSSVYGSNEQVLNKVRTFKDGKLIKISKEGHLLHNDGTAI SGDIR 270

Ps pep 78 -----RANWYGLLCK----- 88
Ps DOX 271  NSWAGVTTLQTLFVQEHNAVCDALKKENSDELEDEDLYRHARLVTSAVIAKIHTIDWTVELLKTDTLLAGMRANWYGLLCKQFKDRFGHVG 360

Ps pep 88 -----KXENMGVPY-----NDLIGLQGEKTLLEIGNAKKLVSMGHQ 125
Ps DOX 361  NSILSGFVGMKRSENEGVPYSLTEEFATVYRMHPLLPDSLHLRDISASPGPNKSPPLIKEIPMNDLIGLQGEKTLLEIGNAKKLVSMGHQ 450

Ps pep 126  ACGALELWNYPSWLRNRLVPHNIDGT----- 150
Ps DOX 451  ACGALELWNYPSWLRNRLVPHNIDGTERS DHVDLAALEVYDRERNVARYNQFRRGLLLIPI SKWEDLTDDEEAIKVLEEYGDVVEELD V 540

Ps pep 150 -----AEKKIKGFAISETAEVIFLLMASRRLEADRFFTSN----- 185
Ps DOX 541  LVGLMAEKKIKGFAISETAEVIFLLMASRRLEADRFFTSNFNEETYTKKGLEWVNTTESLKDVIDRHHPEMTHKWLNSSSAF SVWDTSPN 630

Ps pep 185 ----- 185
Ps DOX 631  KHNHIPIYFRVFN 643

```

Abb. 4-10: Aminosäuresequenz-Alignment der Aminosäurepartialsequenzen der aus keimenden Erbsen aufgereinigten α -Dioxygenase (Ps pep) und der von der cDNA-Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz (Ps DOX). Bei Ps pep wurden Aminosäuren, die bei der Aminosäuresequenzierung nicht eindeutig identifiziert werden konnten, mit einem X dargestellt. Identische Aminosäuren sind schwarz hinterlegt.

4.1 Isolierung der für α -Dioxygenase aus *P. sativum* codierenden cDNA

1	ATG TGG TCT ATA GTA ACT GAT CCC ATC AAA GAT CTT ATT TCA AAA	45	991	CTT AAA ACC GCA ACT TTG CTT GCA GGC ATG CGA GCC AAT TGG TAT	1035
	M W S I V T D P I K D L I S K	15	331	L K T D T L L A G M R A N W Y	345
46	GTT GTG AAA AAT TCC ATC CAT CCT GAT TCC CAT GAT GCA GTC TCT	90	1036	GGA TTA TTG GGA AAA CAG TTT AAG GAC AGA TTT GGG CAT GTT GGA	1080
16	V V K N S I H P D F H D A V S	30	346	G L L G G K Q F K D R F G H V G	360
91	AAA ATG ACC ATC ATT GAT GCT TTT CTC TTC TTT ATT ATG CAT TCC	135	1081	AAT TCC ATA TTG AGT GGA TTT GTA GGC ATG AAG ACA TCA GAA AAT	1125
31	K M T I I D A F L F F I V H S	45	361	N S I L S G F V G M K R S E N	375
136	ATT GAC AAG TTG GGA ATA TGG CAC CGT TTG CCT GTA TTC TTT GGG	180	1126	CAT GGT GTT CCA TAT TCT TTA ACC GAA GAG TTT GCC ACT GTC TAT	1170
46	I D K L G I W H R L P V F F G	60	376	H G V P A Y S L T E E F A T V Y	390
181	CTA TTG TAC TTA GCC ATA AGG CGT CAT CTT CAT CAA GAA TAC AAT	225	1171	AGG ATG CCA CAC CTC TTA CTT GAT TCT CTG CAT TTG AGA GAC ATA	1215
61	L L Y L A I R R H L L H Q E Y N	75	391	R M H P L L P D S L H L R D I	405
226	CTC TTA AAC GTT GGT ACA ACA CCT GTT GGA ATT AGG TCA AAT CCA	270	1216	TCT GCC TCT CCA GGG CCT AAC AAA TCT CCA CCA TTA ATC AAA GAG	1260
76	L L N V G T T P V G I R S N P	90	406	S A S P G P N K S P P L I K E	420
271	TCT GAT TTT CCA TAT AGA ACT GCT GAT GGA AGA TAT AAT GAT CCT	315	1261	AAT CCT ATG AAT GAT TTG ATT GGA CTA CAA GGA AAG ACC TTG	1305
91	S D F P Y R T A D G R Y N D P	105	421	I P M N D L I G L Q G E K T L	435
316	TTT AAT GAT GGT GCT GGA AGT CAA GGA TCT TTC TTT GGC AGA AAT	360	1306	TTG GAG ATA GGT AAT GCA AAA AAA TTA GTA TCA ATG GGT CAC CAA	1350
106	F N D G A G S Q G S F F G R N	120	436	L E I G N A K K L V S M G H Q	450
361	ATT CTT CCC GTT GAT CAG AAG AAT AAG TTG TTG AAG CCA GAT CCA	405	1351	GCT TGT GGA GCC CTA GAA CTT TGG AAC TAC CCA TCA TGG CTC AGA	1395
121	I L P V D Q K N K L L K P D P	135	451	A C G A L E L W N Y P S W L R	465
406	ATG GTG GTG ACA AAA CTT CTA GAG AGG AAA ACA TAC AAG GAC	450	1396	AAC TTA GTA CCA CAT AAT ATG GAT GGC ACA GAG AGA TCT GAT CAT	1440
136	M V V V T K L L E R K T Y K D	150	466	N L V P P H N I D G T E R S D H	480
451	ACT GGA ACA CAA TTC AAT GTG ATT GCA GCT TCT TGG ATT CAA TTT	495	1441	GTT GAC TTG GCT GCT CTT GAA GTT TAT AGG GAC AGA GAG AAT	1485
151	T G T Q F N V I A A S W I Q F	165	481	V D L A A L E V Y R D R E R N	495
496	ATG ATA CAT GAT TGG ATT GAT CAT ATG GAA GAC ACT AAG CAG GTT	540	1486	GTA GCA AGA TAT AAC CAA TTC AGG AGA GGA CTA TTG TTG ATA CCT	1530
166	M I H D W I D H M E D T K Q V	180	496	V A R Y N Q F R R G L L L I P	510
541	GAA CTG AGT GCA TCA GAA GTT GCA AGT CAA TGT CCA TTA AAA	585	1531	ATT TCT AAA TGG GAA GAT TTG ACG GAT GAT GAG GAA GCC ATT AAA	1575
181	E L S A P S E V A S Q C P L K	195	511	I S K W E D L T D D E E A I K	525
586	TCT TTC AAG TTT TTC AAA ACA AAA GAA ATT CCA ACT GGA TTC TAT	630	1576	TTA GAA GAG GTA TAT GGT GAT GAT GAT GAT GAG CTT GAT GTG	1620
196	S F K F F K T K E I P T G F Y	210	526	V L E E V Y G D D V E E L D V	540
631	GAC ATC AAA ACT GGA CAT GCA AAC GTC CGA ACA CCA TGG TGG GAT	675	1621	CTA GTA GGT CTC ATG GCA GAG AAG AAA ATA AAG GGT TTT GCA ATT	1665
211	D I K T G H A N V R T P W W D	225	541	L V G L M A E K K I K G F A I	555
676	GGA AGT GTG GTA TAT GGA AGC AAT GAA CAA GTT TTG AAC AAA GTG	720	1666	AGT GAG ACA GCT TTT GTG ATA TTC CTT CTC ATG GCA TCT AGG AGA	1710
226	G S V V Y G S N E Q V L N K V	240	556	S E T A F V I F L L M A S R R	570
721	AGG ACA TTC AAA GAT GGG AAG TTG AAA ATA TCA AAG GAA GGT CAT	765	1711	TTA GAG GCT GAT AGA TTT TTT ACA AGT AAT TTC AAC GAG GAG ACA	1755
241	R T F K D G K L K I S K E G H	255	571	L E A D R F F T S N F N E E T	585
766	CTT CTT CAT AAT GAA GAT GGA ACT GCA ATT TCA GGT GAC ATT CGC	810	1756	TAC ACT AAA AAG GGT TTA GAA TGG GTG AAC ACA ACT GAG AGC TTA	1800
256	L L H N E D G T A I S G D I R	270	586	Y T K K G L E W V N T E S L	600
811	AAC AGT TGG GCT GTC ACA ACT TTG CAG ACC CTT TTT GTT CAA	855	1801	AAG GAT GTG ATT GAT CGT CAC CAT CCA GAA ATG ACA CAC AAG TGG	1845
271	N S W A G V T T L Q I L F V Q	285	601	K D V I D R H H P E M T H K W	615
856	GAA CAC AAT GCT GTT TGT GAT GCT CTC AAG AAG GAA AAT TCA GAC	900	1846	TTG AAC TCT TCA AGT GCT TTT TCA GTT TGG GAC ACA TCC CCA AAC	1890
286	E H N A V C D A L K K E N S D	300	616	L N S S A F S V W D T S P N	630
901	TTG GAA GAT GAA GAT CTT TAT CGT CAT GCT AGA TTG GTG ACT TCA	945	1891	AAG CAC AAT CAT ATT CCA ATT TAC TTT CGT GTT CCT AAT TAA	1932
301	L E D E D L Y R H A R L V T S	315	631	K H N H I P I Y F R V P N *	
946	GCT GTG ATT GCA AAG ATT CAT ACC ATA GAT TGG ACT GTC GAG CTT	990			
316	A V I A K I T I D W T V E L	330			

Abb. 4-11: α -DOX cDNA-Sequenz und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz der α -Dioxygenase aus *P. sativum*.

4.1.4 Bestimmung der 5'-untranslatierten Region mittels RACE

Mit Northern Blot-Experimenten, bei denen Gesamt-RNA aus keimenden Erbsen in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und DOX830 als radioaktiv markierte Sonde Verwendung fand (vgl. 4.5.1), erfolgte der Nachweis, dass die für α -DOX codierende mRNA eine Gesamtlänge von ca. 2,9 kb aufweist (Abb. 4-12). Die Größe der α -DOX mRNA wurde mit Hilfe der Positionen der ribosomalen RNAs auf dem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel bestimmt. Da mittels *Screening* der λ -cDNA-Bibliothek mit DOX830 lediglich eine cDNA mit einer Gesamtlänge von 2132 bp isoliert werden konnte (4.1.3), sollte nun mit Hilfe von 5'-RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) die vollständige Nukleotidsequenz am 5'-Ende der cDNA bestimmt werden.

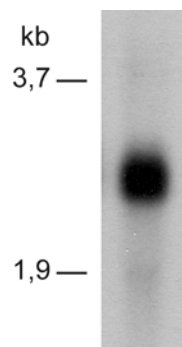


Abb. 4-12: Northern Blot mit Gesamt-RNA aus keimenden Erbsen. Zur Detektion der α -Dioxygenase mRNA wurde das Fragment DOX830 verwendet. Links sind die Positionen der 25S rRNA (ca. 3,7 kb) sowie der 18S rRNA (ca. 1,9 kb) angegeben.

Die Durchführung der 5'-RACE erfolgte mit dem 5'/3'-RACE Kit der Firma Roche. Es wurde zunächst ein cDNA-Erststrang mit Gesamt-RNA aus keimenden Erbsen als Templat und dem genspezifischen *Primer* RACE Gsp 1a synthetisiert (3.1.2). Nach Aufreinigung des cDNA-Erststrangs wurde an das 3'-Ende der cDNA mittels terminaler Transferase eine polyA-Verlängerung angehängt. Diese am 3'-Ende verlängerte cDNA wurde mittels PCR unter Verwendung eines oligo(dT)-Ankerprimers und des genspezifischen *Primers* RACE Gsp 2a amplifiziert. Mit dem erhaltenen PCR-Produkt erfolgte eine zweite PCR-Reaktion unter Verwendung des Ankerprimers und des genspezifischen *Primers* RACE Gsp 3a (3.1.2). Nach Aufreinigung der PCR-Produkte mittels Agarosegel-Elektrophorese und anschließender Elution wurden die Fragmente *blunt-end* in den Vektor pUC19 ligiert und in *E. coli* DH5 α transformiert. Es wurde auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten sowie durch α -Komplementierung selektiert (3.3.7 und 3.3.7.2). Mit diskreten Klonen erfolgte eine Plasmid-Präparation im analytischen Maßstab, die *Inserts* wurden anschließend sequenziert.

RACE2	1	----	T	A	T	A	T	C	A	C	A	T	T	T	C	A	T	A	A	A	A	T	C	A	A	A	C	C	A	T	G	T	G	G	35			
RACE5	1	-----	A	A	A	C	A	C	A	C	A	T	T	T	C	A	T	A	A	A	A	T	C	A	A	A	C	C	A	T	G	T	G	G	33			
RACE6	1	-----	A	A	A	C	A	C	A	C	A	T	T	T	C	A	T	A	A	A	A	T	C	A	A	A	C	C	A	T	G	T	G	G	33			
RACE9	1	-----	A	A	A	C	A	C	A	C	A	T	T	T	C	A	T	A	A	A	A	T	C	A	A	A	C	C	A	T	G	T	G	G	33			
RACE7	1	-----	A	A	A	C	A	C	A	C	A	T	T	T	C	A	T	A	A	A	A	T	C	A	A	A	C	C	A	T	G	T	G	G	33			
RACE4	1	T	A	A	T	A	T	C	A	A	A	C	A	C	A	C	A	T	T	T	C	A	T	A	A	A	T	C	A	A	A	C	C	A	T	G	G	40
RACE8	1	--	A	T	A	T	C	A	A	A	C	A	C	A	C	A	T	T	T	C	A	T	A	A	A	T	C	A	A	A	C	C	A	T	G	G	38	
RACE10	1	-A	A	T	A	T	C	A	A	A	C	A	C	A	C	A	T	T	T	C	A	T	A	A	A	T	C	A	A	A	C	C	A	T	G	G	39	
RACE12	1	---	C	A	A	A	C	A	C	A	T	T	T	C	A	T	A	A	A	A	T	C	A	A	A	T	C	A	A	A	C	C	A	T	G	G	34	
RACE11	1	---	C	A	T	C	A	A	A	C	A	C	A	T	T	T	C	A	T	A	A	A	T	C	A	A	A	C	C	A	T	G	T	G	G	37		
RACE3	1	---	C	A	T	C	A	A	A	C	A	C	A	T	T	T	C	A	T	A	A	A	T	C	A	A	A	C	C	A	T	G	T	G	G	37		
RACE1	1	C	T	T	C	A	T	C	A	A	A	C	A	C	A	T	T	T	C	A	T	A	A	A	T	C	A	A	A	C	C	A	T	G	G	40		
RACE13	1	---	G	A	T	C	A	A	A	C	A	C	A	T	T	T	C	A	T	A	A	A	T	C	A	A	A	C	C	A	T	G	T	G	G	37		
RACE14	1	---	G	A	T	C	A	A	A	C	A	C	A	T	T	T	C	A	T	A	A	A	T	C	A	A	A	C	C	A	T	G	T	G	G	37		
RACE15	1	---	G	A	T	C	A	A	A	C	A	C	A	T	T	T	C	A	T	A	A	A	T	C	A	A	A	C	C	A	T	G	T	G	G	37		

Abb. 4-13: Nukleotidsequenzen, die mittels 5'-RACE ermittelt wurden. Der Translationsstart ist mit einem schwarzen Pfeil markiert.

Wie aus Abb. 4-13 deutlich wird, konnten mittels 5'-RACE lediglich 34 Nukleotide der 5'-untranslatierten Region der α -DOX cDNA bestimmt werden. Ein Grund hierfür könnte der hohe Adenosin-Anteil in diesem Bereich sein. Es ist denkbar, dass an diese Adenosin-reiche Region der oligo(dT)-Ankerprimer ebenfalls hybridisieren kann, mit der Folge einer Amplifizierung verkürzter Produkte.

4.2 Charakterisierung der *P. sativum* α -DOX cDNA

4.2.1 Homologie und Phylogenie von α -Dioxygenasen

Die Aminosäuresequenz der *P. sativum* α -DOX weist Homologie zu den bereits von α -Dioxygenasen aus anderen höheren Pflanzen bekannten Aminosäuresequenzen auf (Abb. 4-14). Beim Vergleich mit der Aminosäuresequenz der α -DOX aus *N. tabacum* (GenBank Accession Nr.: AJ007630) wurden 75% identische Aminosäuren festgestellt, beim Vergleich mit der α -DOX1 aus *A. thaliana* (GenBank Accession Nr.: AF334402) 72%. Im Gegensatz dazu beträgt die Übereinstimmung zwischen der *P. sativum* α -DOX und dem als α -DOX2 bezeichneten Protein aus *A. thaliana* (GenBank Accession Nr.: AAG52078) lediglich 62%. Dies deutet darauf hin, dass die α -DOX aus *P. sativum* dem α -DOX1-Zweig der α -Dioxygenase-Familie zuzuordnen ist.

P _s DOX	1	MWSIVTDPKDLISKVVKNSIHPDHFDAVSKMTIIDAFLEFIVHSIDKLGITWHRLPVFFGLLYLAIRRHLLHQYNLNLNVGTFEIVGIRSNP	90
Nt DOX	1	M-SLVMDSLKNLLSPLRGFIHKDLHDIFERMILLSKLLFLIVHLDVKLNLWHRLPVLLGLLYLGARRHLLHQYNLNLNVGKTETIGVRSNP	89
At DOX1	1	M-KVITSLISSILL----KFIHKDFHEIYARMSLLDRFELLIVHCVDKMVFWHKLEVEGLTYLEVRRHLLHQYNLNLNVGQTFETGHRFDP	85
At DOX2	1	MGF-----SPSSS----WFTHPOLHHVSKMSYFDAFLEFIVHLDVKLGHWHRFPVLLGVAYLGLRRHLLHQYNLNLNVGQPTN-CGGYDT	79
P _s DOX	91	SDFPYRTADGRYNDPFNDGAGSQSFFGRNLLPVDQKNKLLKPDPMVVTKLLERKTYKDTGTQFNVIAASWIQFMIDHWIDHLEDTKQV	180
Nt DOX	90	ADHPYRTADGRYNDPFNDGAGSEISFFGRNMLPVDQHNQKPKPDPMVVATKLLARRNEVDGTQFNVIAASWIQFMIDHWIDHLEDTKQI	179
At DOX1	86	ANYPYRTADGRYNDPFNDGAGSQSFFGRNCPVDQSKLRRPDPVVATKLLERKTFEIDGTQFNVIAASWIQFMIDHWIDHLEDTHQI	175
At DOX2	80	DEFQYRTADGKQNHESDNTIGSQSFFGRNMPPTSQYGLDPEFSPVVATKLLARKRELDNGDQFNVIAASWIQFMIDHWIDHLEDTHQI	165
P _s DOX	181	EISAPSEVASQCPLKSEKFFKTKELIPTGFYDIKTGHANVRTPWWDGSSVYVGSNEQVLNKVRTFKDGKLIKISKE-CHLLHNEDECTAISGDI	269
Nt DOX	180	ELKAAEEVASQCPLKSEKFFKTKELIPTGFYDIKTGHANVRTPWWDGSAIYVGSNAEVKVKVRTFKDGKLIKISAD-GLLEIDKNGKIIISGDV	268
At DOX1	176	ELVAPKEVASQCPLKSEKFFKTKELIPTGFYDIKTGSONIRTPWWDSSVIYVGSNSKTLDRVRTKDKGKLIKISEETGLLLHDEEDGLAISGDI	265
At DOX2	170	ELEAPEEVASQCPLKSEKFLRTRKVPDTHH-KSCAVNTRTPWWDGSSVIYGNDETGMRRVRFKDGKLIKISGD-GLLERDERCVPIISGDI	257
P _s DOX	270	RNSWAGVITLQQLFVQEHNAVCDALKKENSLEDEDLRYRHLRVTSAVIKVIHTIDWTVELLKTDLLAGMRANWYGLLGGKFKDTRFGHV	359
Nt DOX	269	RNTWAGLSALQALFVQEHNSVCDALKKREYPELEDEDLRYRHLRVTSAVIKVIHTIDWTVELLKTDLLAGMRANWYGLLGGKFKDTRFGHV	358
At DOX1	266	RNSWAGVITLQQLFVQEHNAVCDALKKEDDLEDEDLRYRHLRVTSAVIKVIHTIDWTVELLKTDLLAGMRANWYGLLGGKFKDSFGHA	355
At DOX2	258	RNSWGSFSLQALFVQEHNSVCDMLKERYPDEDEKLYRHLRVTAAVIKVIHTIDWTVELLKTDLLTAGMRANWYGFEGKVKDVMGAR	347
P _s DOX	360	GNSILSGVGMKRSENHGVPYSLTEEFATVYRMHLLPDSIHLRDISASPGPNKSPPLIKEIPMNDLIGLQGEKTLLEIGNAKGLVSMGH	449
Nt DOX	359	GCSILCGVGMKKEPNYGVYSLTEEFATVYRMHLLPDKLQLRNDIATPGPNKSLPLTNEIPLLEDLIGGKGNLSKIGFTKQVSMGH	448
At DOX1	356	GSSILCGVGMKKNHGVYSLTEDEFATVYRMHLLPDLHLLDIDDPVGTNKSILPLICEISMRDLIGKKEETMSHIGFTKQLVSMGH	445
At DOX2	348	FGPLFSGLVGKKNHGVYSLTEEFVSVYRMHCLLPEITLILRDMNSENVKDNPAIEREIPMTEELIGKKEKASKIGFEQLVSMGH	437
P _s DOX	450	QACGALELWNYPSWIRNLVPHNIDGTERSDHVDLAALVYRDRERNVARYNQFRGLLIPIISKWEDLTDDEEAIKVLREVVYDDVEELD	539
Nt DOX	449	QACGALELWNYPSWIRNLVPHNIDGTERSDHVDLAALVYRDRERSVARYNEFRGMLIPIISKWEDLTDDEEIVNTLGEVYDDVEELD	538
At DOX1	446	QASGALELWNYPSWIRNLVPHNIDGTERSDHVDLAALVYRDRERSVARYNEFRSMFMPIPIKWEDETDDEEALVLDVYOGDVEELD	535
At DOX2	438	QSCGALTLWNYPSWIRNLVAGDIDGEDRPHLIDVAALVYRDRERGVPYNEFRKNLLMSPISKWEDLTDDEEAIKVLREVVYDDVEELD	527
P _s DOX	540	LVVGLMAEKKIKGFAISETAFVIFLVMASRRLEADRFFTSNFNEETYTKKGLEWVNTTESLKDVIDRHHPEMTHKWNSSSAFVWDSIP	629
Nt DOX	539	LVVGLMAEKKIKGFAISETAFVIFLVMASRRLEADRFFTSNFNEETYTKKGLEWVNTTESLKDVIDRHHPEITKWMNSSSAFVWDSIP	628
At DOX1	536	LVVGLMAEKKIKGFAISETAFVIFLVMASRRLEADRFFTSNFNETIYTKKGLEWVNTTESLKDVIDRHPDMTDKWMNSSAFVWDSIP	625
At DOX2	528	LVVGLHAEKKIKGFAISETAFVIFLVMASRRLEADRFFTSNFNEKTYTKKGLEWVNTTESLKDVIDRHHPEITDQWRGSSSAFVWGSIP	617
P _s DOX	630	NKHNHPIPLYRVPN	643
Nt DOX	629	QPHNPIPLYRVPQ	643
At DOX1	626	LTKNPIPLYLRHPS	639
At DOX2	618	NPKNVPPLYLRSA	631

Abb. 4-14: Aminosäuresequenz-Alignment der *P. sativum* α -DOX mit α -DOX aus *N. tabacum* (GenBank Accession Nr.: AJ007630), α -DOX1 aus *A. thaliana* (GenBank Accession Nr.: AF334402) und α -DOX2 aus *A. thaliana* (GenBank Accession Nr.: AAG52078). Identische Aminosäuren sind schwarz hinterlegt, ähnliche grau.

Die Aminosäuresequenz der *P. sativum* α -DOX zeigt 76% Aminosäure-Identität zu der α -DOX aus *N. attenuata* (GenBank Accession Nr.: AW191821), 63% zu der Reis- α -DOX (GenBank Accession Nr.: AAF64042), 73% zu α -DOX1 aus Tomaten (GenBank Accession Nr.: AY344539) und 60% zu α -DOX2 aus Tomaten (GenBank Accession Nr.: BK001477) sowie 73% zu der α -DOX aus *Capsicum annuum* (GenBank Accession Nr.: AAK85133).

Das Phylogramm in Abb. 4-15 wurde unter Verwendung des Programms ClustalX (Version 1.81) mit den Sequenzen der oben genannten α -Dioxygenasen erstellt, weiterhin wurden die PGHS-1 aus *O. aries* und PGHS-2 aus *M. musculus* berücksichtigt. Aus dieser Abbildung wird ebenfalls deutlich, dass die *P. sativum* α -DOX dem α -DOX1-Zweig der Familie der α -Dioxygenasen zuzuordnen ist.

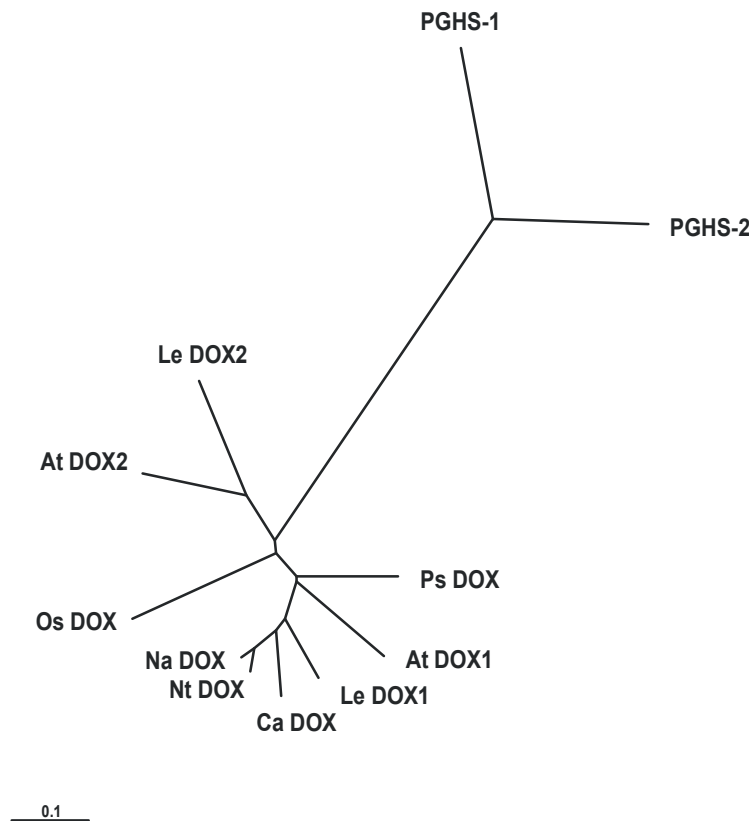


Abb. 4-15: Phylogramm pflanzlicher α -Dioxygenasen und PGHS aus Säugetieren. Zur Erstellung wurden folgende Aminosäuresequenzen verwendet: α -DOX aus *P. sativum* (Ps DOX), α -DOX aus *N. tabacum* (Nt DOX) (GenBank Accession Nr.: AJ007630), α -DOX aus *N. attenuata* (Na DOX) (GenBank Accession Nr.: AW191821), α -DOX aus *C. annuum* (Ca DOX) (GenBank Accession Nr.: AAK85133), α -DOX aus *O. sativa* (Os DOX) (GenBank Accession Nr.: AAF64042), α -DOX1 aus *A. thaliana* (At DOX1) (GenBank Accession Nr.: AF334402), α -DOX1 aus *Lycopersicon esculentum* (Le DOX1) (GenBank Accession Nr.: AY344539), α -DOX2 aus *A. thaliana* (At DOX2) (GenBank Accession Nr.: AAG52078), α -DOX2 aus *L. esculentum* (Le DOX2) (GenBank Accession Nr.: BK001477), PGHS-1 aus *O. aries* (GenBank Accession Nr.: NM001009476) und PGHS-2 aus *M. musculus* (GenBank Accession Nr.: NM011198).

4.2.2 Homologie zu PGHS

Eine Homologie der pflanzlichen α -Dioxygenasen mit Prostaglandin Endoperoxid H Synthasen hat man erstmalig für die α -DOX aus *N. tabacum* sowie für die α -DOX1 aus *Arabidopsis thaliana* beschrieben (Sanz *et al.*, 1998). Wie diese, hat auch die *P. sativum* α -DOX Sequenzähnlichkeit mit PGHS aus Säugetieren, nämlich jeweils 21% mit PGHS-1 aus *Ovis aries* (GenBank Accession Nr.: NM001009476) und PGHS-2 aus *Mus musculus* (GenBank Accession Nr.: NM011198).

Wie bei anderen bekannten α -Dioxygenasen aus Pflanzen, sind der proximale, an der Häm-Bindung beteiligte Histidin-Rest His-207 sowie der distale Histidin-Rest His-388 (Nummerierung entsprechend PGHS-1) in der Aminosäuresequenz der *P. sativum* α -Dioxygenase konserviert. Der Tyrosin-Rest Tyr-385, der bei der Cyclooxygenase-Reaktion von PGHS die initiale H-Abstraktion verursacht und für den man bei der Dioxygenierung von Fettsäuren durch pflanzliche α -Dioxygenasen die gleiche Funktion annimmt, ist ebenfalls in der Aminosäuresequenz der *P. sativum* α -Dioxygenase konserviert (Abb. 4-16).

P _s DOX	1	MW-----SIVTDPKDLI-----SKVVKNSIHDPFH-----DAVSKMTITDAFLFFIVHSIDKLG	50
PGHS-1	1	MSRQISLRFPPLLLLSPSPVFSADPGAPAPVNPCCYYPCOHOGLCV---RFGDDRQCDCCTRGTGYSQNPCTIPEIWIWLRRTLR---	83
PGHS-2	1	M-----LFRVLLCAALGLSQAANPCSNPCQNRGRCM---STGSDQYKDCCTRGTGFEYGENCTTPEFLTRIKLLIK---	68
P _s DOX	51	IWHRLVFFGLLYL-----AIRRHQ-EYNLLNVGTTTPVGRSN--PSDFPVRTADGRYN-DPNDGAGSQSGFGRNLPVQ-----	126
PGHS-1	83	-----PSPSFHFEMLTHGRWLWDFVNA-TEIRDTLRLVLTVRSNLIQSPPTYNIAHDVHSWSEF-----SNVSYTRILPSVPRDCPTF	162
PGHS-2	68	-----PTPTVHYHLLTHFKGVNIVANNIPRLSLIKYVLTSRSYLLDSEPTYNVHYGKSWEAF-----SNLSYYTRALPPVADDCPTF	148
P _s DOX	126	---KNKLLKPDPMVVTKLERKTYKDTGTQFNVAASWIOEMIHWDWIDHMDTKQVELSAPSEVASQCPLKSFKFFKTKK-IPTGFYDI	212
PGHS-1	163	MGTKGKQLPDAEFLSRRFLRRKFIIPDQGTNLMFAFFAQHFTHQ-----FFKTSGRKMGPGF--T	221
PGHS-2	149	MGVKGKRELPSKEVLEKVLRLREFIPDQGSNMMFAFFAQHFTHQ-----FFKTDHKKRPGF--T	207
P _s DOX	213	KTGHANVRTPWWDCSVVYGSNEQVLNKRIRFKDGKLG-----ISKK-GHLLH-----NEDGTAISGDIRNSWAGVITLQTLFV	284
PGHS-1	222	KALGHGV-----DLGHIYGNLBRQYQLRFLKDGKLYQMLNGEVYPSVEEAPVLMHYRGTIPQSQAVGQEVFGLPGLMAYATIWL	306
PGHS-2	208	RGLGHGV-----DLNHIYGETLDRQFKLRLFKDGKLYQVIGGEVYPPVTKDQVEMIIYPPHIPENLQAVGQEVFGLPGLMAYATIWL	292
P _s DOX	285	QEHNAVCDALKKENSDEDEDLRHRARLVTSAVIAKTHITIDWTVEL-----LKTDTLAGMRANWYGLLGKQFKDRFGHVNSILSGFV	368
PGHS-1	307	REHNRVCDLKAEPHWGDEQLFQTLRILIGETIKIVIEYVQOLSGYFLOLKFDPPELL-----FGAQFYQNRN-----	376
PGHS-2	293	REHNRVCDLKAEPHWGDEQLFQTLRILIGETIKIVIEDYVQHLGSHFKLKFDPPELL-----FNQOFYQNRN-----	362
P _s DOX	369	GMKRSENHGVPSLTFEFATVYRMHPLLPSLHLRDIISASPGPNKSPPLIKEIPMNDLIGLQGEKTLLEIGNAKKLVSQMGHQAACGALELW	458
PGHS-1	376	-----IAVEFNQLYHWHPLYPDSFRVGP-----QDYSEQFLNNTS--MLVDYGVREALVDAFSRQFAGRTG--	435
PGHS-2	362	-----IASEFNTLYHWHPLLPDITENIED-----QYSEKQFLMNS--ILLEHGLTQFVESFTROHAGRVA--	421
P _s DOX	459	NYPSWLRNLVPHNIDGTERSDFVLAALVYRD-RERNVARYNQFRGLLIIPIISKWEDLTDDEEAIKVLVEEYGDVVEELDVLVGLMAE	547
PGHS-1	435	-----GGRNIDHHLHVAVDVIKSRVLRLOPPNEYRKRFGMKPYTSFQELTGEKEMAAELEELYGD-IDALEFYPGLLDE	510
PGHS-2	421	-----GGRNVPIAVQAVAKASIDOSREMKYQSLNEYRKRFSLKPYTSFEELTGEKEMAAELKALYSP-IDVMELYPALVE	496
P _s DOX	548	KKIKGFAISETAFVIFLLMAS-----RRLEADRFFTSNF-NEEFTYTKKGLEWVNTTESLKVVIDRHHPEMTHKWLNSSS-----AFSVWDT	627
PGHS-1	511	KCHPNSIFGESSM-----IEMGAPFSLKGLLGNPICSPYWKASTFGGEVGEN-LVKTATLKKLYC-----LNTKICPYVSEFV--P	583
PGHS-2	497	KPRPDAIFGETM-----VEIGAPFSLKGLLGNPICSPQYWKPESTFGGEVGRK-IINTASTQSLIC-----NNMVKCPETSEFNV--Q	565
P _s DOX	628	SPNKHNIPIYFRVPI	643
PGHS-1	584	DPRQEDRPGVE-----RPPTTEL	600
PGHS-2	570	DEQPTKTATINASASHRLDDINPTVLIKRRSTEL	604

Abb. 4-16: Aminosäuresequenz-Alignment der *P. sativum* α -DOX mit PGHS-1 aus *O. aries* (GenBank Accession Nr.: NM001009476) und PGHS-2 aus *M. musculus* (GenBank Accession Nr.: NM011198). Identische Aminosäuren sind schwarz hinterlegt, ähnliche grau. Der distale und der proximale Histidin-Rest His-207 und His-388 (Nummerierung entsprechend PGHS-1) sowie der Tyrosin-Rest Tyr-385 sind mit einem Stern gekennzeichnet.

4.3 Expression in *E. coli* und Isolierung der *P. sativum* α -DOX

Als Grundlage für weitere Studien sollte die 70 kD-Untereinheit der *P. sativum* α -Dioxygenase in *E. coli* überproduziert und isoliert werden.

4.3.1 Expressionssysteme auf Basis der *E. coli* RNA-Polymerase

Zur heterologen Expression der α -Dioxygenase aus Erbsen in *E. coli* erfolgten zunächst Versuche mit Expressionssystemen auf Basis der *E. coli* RNA-Polymerase.

Die pQE-Vektoren beruhen auf einem optimierten Transkriptions-Translations-System, welches vom frühen Promotor des Bakteriophagen T5 gesteuert wird (3.3.10.1); das verwendete Promotor/Operator-Element wird von der endogenen *E. coli* RNA-Polymerase erkannt. Der Vektor pQE30 enthält eine Sequenz, die für einen N-terminalen $6 \times$ His-tag codiert, sodass bei erfolgreicher Expression ein Fusionsprotein mit N-terminalem $6 \times$ His-tag entsteht (Vektorkarte siehe Anhang, Abb. A-1). Der $6 \times$ His-tag ermöglicht eine einfache Aufreinigung von rekombinanten Proteinen mittels Metallaffinitätschromatographie. Um die für α -DOX aus Erbsen codierende Sequenz in den Vektor zu klonieren, wurde mittels PCR, unter Verwendung der Startsequenzen PioxBam und PioxXma (3.1.2), vor dem Startcodon eine Bam HI-Restriktionsschnittstelle und im Anschluss an das erste Stoppcodon eine Xma I-Schnittstelle angefügt. Nach Restriktionshydrolyse und Aufreinigung mittels Elution aus einem Agarosegel erfolgte die Ligation des PCR-Produkts in den entsprechend linearisierten Vektor pQE30. Zunächst wurden *E. coli* DH5 α mit dem Ligationsansatz transformiert, und es wurde Plasmid im analytischen Maßstab präpariert. Die für α -Dioxygenase codierende Sequenz sollte im gleichen Leseraster an die Sequenz anschließen, welche für die 6 konsekutiven Histidin-Reste codiert. Bei der Sequenzierung der in *E. coli* DH5 α amplifizierten Plasmide wurde festgestellt, dass bei keinem der untersuchten Plasmide die korrekte Sequenz vorlag: durch Insertionen zwischen der für den $6 \times$ His-tag codierenden Sequenz und dem Startcodon der für α -DOX aus Erbsen codierenden Sequenz resultierte eine Verschiebung im Leseraster. Bei allen sequenzierten Plasmiden lagen vergleichbare Fehler vor. Durch ortsspezifische Mutagenese (3.3.4.4) mit den Primern PioxMut anti und PioxMut sense (3.1.2) sollte bei einem der fehlerhaften Plasmide die Insertion entfernt werden. Ein Teil des Mutageneseansatzes wurde wie oben in *E. coli* DH5 α transformiert, ein weiterer Teil in *E. coli* JM109. Der Präparation von Plasmid aus Einzelkolonien folgte eine erneute Sequenzierung. Lediglich ein aus *E. coli* JM109 präpariertes Plasmid wies die korrekte Sequenz auf (pQE-DOX aus Klon J4), bei den anderen untersuchten Plasmiden lagen Insertionen wie oben beschrieben vor, welche eine Verschiebung des Leserasters bewirkten. Möglicherweise

war das Genprodukt toxisch für *E. coli*-Zellen, mit der Folge einer Selektion hin zu Klonen mit fehlerhafter Sequenz.

Wie aus Abb. 4-17 deutlich wird, ist der Klon (J4), der das Plasmid pQE-DOX mit korrekter Sequenz trug, nur sehr schlecht und deutlich langsamer angewachsen als diejenigen, die ein Plasmid mit Leserasterverschiebung im *Insert* trugen.

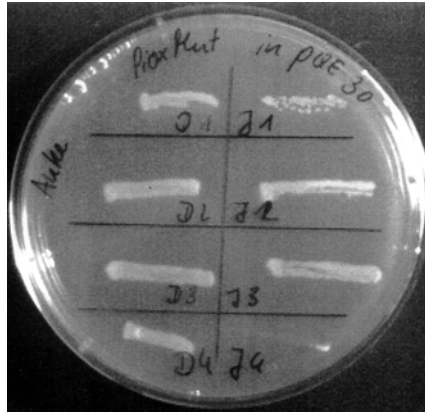


Abb. 4-17: Agarplatte mit Bakterienklonen, die das Plasmid pQE-DOX tragen. Auf der linken Seite sind *E. coli* DH5 α (D), auf der rechten Seite JM109 (J) aufgetragen. Ausschließlich Klon J4 in der unteren rechten Ecke trägt das korrekte Plasmid, bei allen anderen lagen Insertionen vor, die zu einer Verschiebung des Leserasters führten.

Zur Proteinexpression mit dem pQE-System fanden die *E. coli*-Stämme M15 und SG13009 Verwendung. Beide tragen das Plasmid pREP4, durch welches die für eine vollständige Repression der Expression des Fremdproteins erforderliche Menge an *lac*-Repressorprotein bereit gestellt wird (3.3.10.1). Ausgehend von pQE-DOX, konnte weder in *E. coli* M15 noch SG13009 eine Expression von α -DOX induziert werden (3.3.10.3). Nach Auftrennung von bakteriellen Gesamtllysaten mittels SDS-PAGE und Anfärbung der PAA-Gele mit Coomassie Brilliant Blau ließ sich keine entsprechende Proteinbande detektieren. Bei der Untersuchung der Gesamtlysate mittels Western Blot, unter Verwendung eines gegen den 6 \times His-tag gerichteten Primärantikörpers, wurde ebenfalls kein Signal detektiert. Die Expression konnte auch nicht durch Variation der Expressionsbedingungen hinsichtlich Induktionstemperatur sowie hinsichtlich der zur Induktion verwendeten Menge an IPTG induziert werden.

Vergleiche mit Kontrollansätzen mit dem Vektor pQE30 zeigten, dass sich Wachstumskurven von *E. coli* SG13009 mit dem Plasmid pQE-DOX deutlich von denen der analog behandelten Kontrollansätze mit pQE30 unterscheiden: nach Induktion der Expression war bei den Kontrollansätzen eine unverminderte Zunahme der OD₅₈₀ – und damit der Zellzahl – zu beobachten, während bei den Expressionsansätzen die optische Dichte nicht weiter zunahm bzw.

nach einiger Zeit sogar deutlich abnahm (Abb. 4-18). Wie oben bereits formuliert, legt dies nahe, dass das Genprodukt für *E. coli*-Zellen toxisch war.

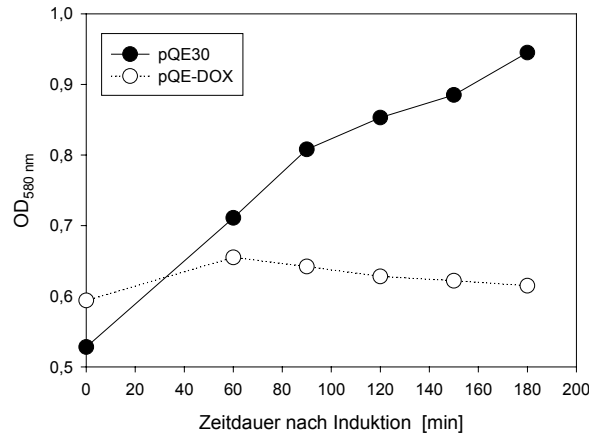


Abb. 4-18: Wachstumskurven von *E. coli* SG133009 mit dem Plasmid pQE-DOX (Kreis) und dem Vektor pQE30 (gefüllter Kreis) ab Induktion der Expression der α -DOX mit IPTG.

Da sich die α -DOX aus Reis unter Verwendung des Vektors pQE30 im Bakterienstamm *E. coli* M15 überexprimieren ließ (Koeduka *et al.*, 2000), war es überraschend, dass dies für die α -DOX aus Erbsen nicht möglich war. Eine Erklärung könnte in der Verteilung der in *E. coli* seltenen Codons für Arginin liegen. In der Sequenz der α -DOX aus Erbsen sind 31 Arginin-Reste vorhanden, von denen 23 durch die in *E. coli* besonders selten vorkommenden Codons AGA und AGG codiert werden; in der Sequenz der α -DOX aus Reis sind es 21 Arginin-Reste, die durch diese Codons codiert werden. Die Verteilung innerhalb der beiden Sequenzen unterscheidet sich jedoch deutlich, so liegt z.B. bei der *P. sativum* α -DOX eine relative Häufung dieser Codons im N-terminalen Bereich vor.

Die Versuche zur Überexpression der *P. sativum* α -DOX mit dem pQE-System wurden nicht weiterverfolgt.

Bei den pGEX-Vektoren wird der *tac*-Promotor verwendet (3.3.10.1), das Promotor/Operator-Element wird von der endogenen *E. coli* RNA-Polymerase erkannt. Der Vektor pGEX-4T-2 enthält eine Sequenz, die für einen N-terminalen GST-*tag* codiert, sodass bei erfolgreicher Expression ein Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase aus *Schistosoma japonica* entsteht (Vektorkarte siehe Anhang, Abb. A-2). Um die für α -DOX aus Erbsen codierende Sequenz in den Vektor zu klonieren, wurde mittels PCR, unter Verwendung der Startsequenzen PioxBam und PioxXho (3.1.2), vor dem Startcodon eine *Bam* HI-Restriktionsschnittstelle und im Anschluss an das erste Stoppcodon eine *Xho* I-Schnittstelle angefügt. Nach Restriktionshydrolyse und Aufreinigung

mittels Elution aus einem Agarosegel erfolgte die Ligation des PCR-Produkts in den entsprechend linearisierten Vektor pGEX-4T-2 (pGEX-DOX). Zunächst wurden *E. coli* DH5 α mit dem Ligationsansatz transformiert, und es wurde Plasmid im analytischen Maßstab präpariert. Durch Sequenzierung wurde bestätigt, dass die für α -Dioxygenase codierende Sequenz im richtigen Leseraster an die für die Glutathion-S-Transferase codierende Sequenz anschließt.

Zur Proteinexpression mit dem pGEX-System fand der *E. coli*-Stamm BL21 Verwendung. Dieser Bakterienstamm ist defizient bezüglich zweier Proteasen und eignet sich aus diesem Grund besonders gut zur Überexpression von Fremdproteinen. Ausgehend von pGEX-DOX konnte keine Expression von α -DOX in *E. coli* BL21 induziert werden. Auch eine Variation der Expressionsbedingungen blieb erfolglos.

Die Versuche zur Überexpression mit dem pGEX-System wurden nicht weiterverfolgt.

4.3.2 Expressionssysteme auf Basis des T7-Promotors

Da Versuche zur heterologen Expression der α -Dioxygenase aus Erbsen in *E. coli* mit Expressionssystemen auf Basis der *E. coli* RNA-Polymerase nicht erfolgreich waren, wurde auf Expressionssysteme auf Basis des T7-Promotors zurückgegriffen.

Dieses System zeichnet sich dadurch aus, dass hier die Transkription des Fremd-Gens unter Kontrolle des T7-Promotors aus dem Bakteriophagen T7 steht. Dieser wird ausschließlich von der RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 erkannt. Wie in Abschnitt 3.3.10.2 erläutert, befindet sich eine Kopie des T7 RNA-Polymerase-Gens als λ -Lysogen auf der chromosomalen DNA der verwendeten Bakterienstämme. Diese Kopie befindet sich unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors. Durch Zugabe von IPTG wird die Transkription der T7 RNA-Polymerase induziert, die dann ausschließlich die mRNA des Zielproteins transkribiert.

4.3.2.1 Expression von *P. sativum* α -DOX im analytischen Maßstab

Es fanden die Vektoren pBluescribeTT und pRSET A Verwendung (Vektorkarten siehe Anhang, Abb. A-3 und A-4).

Der Vektor pBluescribeTT verfügt über den T7 Promotor sowie eine T7-Terminatorsequenz, er enthält jedoch ursprünglich keine Sequenz, die für einen *tag* codiert. Um die α -DOX aus Erbsen als Fusionsprotein mit einem N-terminalen $6 \times$ His-*tag* überproduzieren zu können, wurde aus dem Plasmid pQE-DOX die komplette Sequenz, welche für das Fusionsprotein aus $6 \times$ His-*tag* und α -DOX codiert, mit den Restriktionsendonucleasen *Eco* RI und *Xma* I ausgeschnitten. Nach Aufreinigung des Fragments mittels Elution aus einem Agarosegel erfolgte Ligation in den

entsprechend linearisierten Vektor pBluescribeTT. Zunächst wurden *E. coli* DH5 α mit dem Ligationsansatz transformiert, und es wurde Plasmid (pBlue-DOX) im analytischen Maßstab präpariert. Durch Sequenzierung wurde bestätigt, dass die für das Fusionsprotein codierende Sequenz im richtigen Leseraster eingefügt worden war.

Der Vektor pRSET A enthält eine Sequenz, die für einen N-terminalen 6 \times His-tag codiert, weiterhin ist N-terminal eine Sequenz eingefügt, die eine höhere Stabilität der Proteine gewährleisten soll (3.3.10.2). Um die für α -DOX aus Erbsen codierende Sequenz in den Vektor zu klonieren, wurde diese durch Restriktionshydrolyse mit der Restriktionsendonuclease *Bam* HI aus dem Plasmid pBlue-DOX isoliert. Nach Aufreinigung des Fragments mittels Elution aus einem Agarosegel erfolgte Ligation in den entsprechend linearisierten Vektor pRSET A. *E. coli* DH5 α wurden mit dem Ligationsansatz transformiert, und es wurde Plasmid im analytischen Maßstab präpariert. Durch Sequenzierung wurde bestätigt, dass die für α -DOX codierende Sequenz im richtigen Leseraster an den tag anschließt.

Zur Proteinexpression mit dem T7-System fanden die *E. coli*-Stämme Rosetta (DE3), Rosetta (DE3) pLysS, BL 21 StarTM (DE3) und Origami B (DE3) Verwendung.

Da in der Sequenz der α -DOX 31 Arginin-Reste vorhanden sind, von denen 23 durch die in *E. coli* besonders selten vorkommenden Codons AGA und AGG codiert werden, wurden für weitere Expressionsversuche zunächst die Bakterienstämme Rosetta (DE3) und Rosetta (DE3) pLysS verwendet. Diese Stämme exprimieren zusätzlich in *E. coli* selten vorkommende tRNAs (3.3.10.2). Der Stamm Rosetta (DE3) pLysS ist darüber hinaus in der Lage, die nicht beabsichtigte Expression des rekombinanten Zielproteins vor der IPTG-Induktion durch Bereitstellung von Lysozym zu reprimieren. Besonders wichtig ist dies bei der Expression von Proteinen, von denen angenommen werden kann, dass sie den Stoffwechsel von Bakterien beeinträchtigen oder sogar toxische Wirkung haben.

Der Bakterienstamm *E. coli* BL 21 StarTM (DE3) zeichnet sich dadurch aus, dass durch Mutation in einem RNase-Gen die Stabilität von Transkripten erheblich erhöht ist. Um auch hier zu gewährleisten, dass die in *E. coli* seltenen tRNAs in ausreichender Menge zur Verfügung stehen, wurde das Plasmid pRARE, welches die Sequenzen trägt, die für die seltenen tRNAs codieren, aus Rosetta (DE3) isoliert und in *E. coli* BL 21 StarTM (DE3) transformiert. Aus mit pRARE transformierten *E. coli* BL 21 StarTM (DE3) wurden chemokompetente Zellen hergestellt (*E. coli* BL 21 StarTM (DE3) RARE). Das Plasmid pRARE verleiht Resistenz gegen Chloramphenicol.

Der Bakterienstamm Origami B (DE3) begünstigt die Ausbildung von Disulfid-Brücken im Cytoplasma der Zellen. Auch hier wurde wie oben beschrieben das Plasmid pRARE eingeführt (Origami B (DE3) RARE).

Ausgehend von pBlue-DOX, konnte in *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS sowie in *E. coli* BL 21 Star™ (DE3) und *E. coli* BL 21 Star™ (DE3) RARE eine Expression von α -DOX induziert werden. In den Stämmen Rosetta (DE3), Origami B (DE3) und Origami B (DE3) RARE dagegen ließ sich ausgehend von pBlue-DOX keine Expression induzieren. Abb. 4-19 zeigt ein mit Coomassie Brilliant Blau gefärbtes PAA-Gel, mit aufgetrennten bakteriellen Gesamtlysaten von Zeitreihen von *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS. Zur Expression fand mit Ampicillin und Chloramphenicol supplementiertes LB-Medium Verwendung, die Expression wurde bei einer OD₅₈₀ von ca. 0,6 mit 1 mM IPTG induziert, die Expressionstemperatur betrug 30 °C (3.3.10.3). Im Abstand von jeweils einer Stunde wurde je 1 ml der Kultur entnommen, abzentrifugiert und das Bakteriensediment in 50 μ l SDS-PAGE Probenpuffer aufgenommen. Im Vergleich mit den Gesamtlysaten aus dem gleich behandelten Kontrollansatz mit dem Vektor pBluescribeTT (rechte Gelhälfte) fällt in den Expressionsansätzen eine stärkere Proteinbande bei ca. 70 kD auf (linke Gelhälfte).

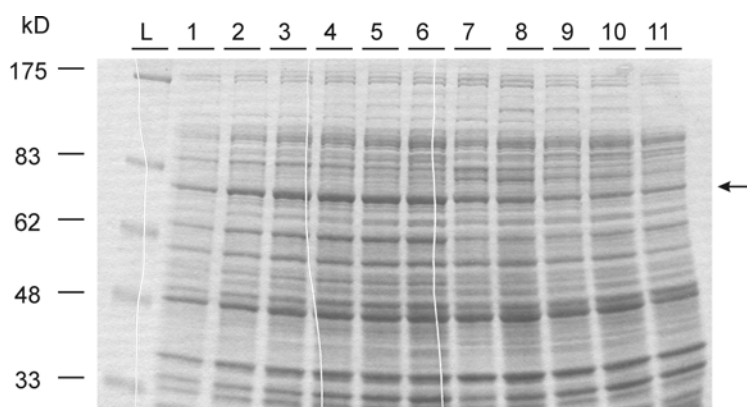


Abb. 4-19: SDS-PAGE (10%) von bakteriellen Gesamtlysaten von Zeitreihen mit *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS mit dem Plasmid pBlue-DOX bzw. mit dem Vektor pBluescribeTT. Das Bakteriensediment aus 1 ml Bakterienkultur wurde in 50 μ l Probenpuffer aufgenommen, hiervon wurden jeweils 5 μ l aufgetragen. Die Anfärbung erfolgte mit Coomassie Brilliant Blau. Links sind die Größen der Banden des Proteinlängenstandards angegeben. Die Position, an der die Bande der *P. sativum* α -Dioxygenase erwartet wird, ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Auftragsmuster: (L) Proteinlängenstandard; (1) pBlue-DOX vor Induktion; (2) pBlue-DOX 1 h nach Induktion mit IPTG; (3) pBlue-DOX 2 h nach Induktion mit IPTG; (4) pBlue-DOX 3 h nach Induktion mit IPTG; (5) pBlue-DOX 4 h nach Induktion mit IPTG; (6) pBlue-DOX 5 h nach Induktion mit IPTG; (7) pBluescribeTT vor Induktion; (8) pBluescribeTT 1 h nach Induktion mit IPTG; (9) pBluescribeTT 2 h nach Induktion mit IPTG; (10) pBluescribeTT 3 h nach Induktion mit IPTG; (11) pBluescribeTT 4 h nach Induktion mit IPTG.

Bei Untersuchung der Gesamtlysate mittels Western Blot (3.3.9.5, 3.3.9.6), unter Verwendung eines gegen den 6 \times His-tag gerichteten Primärantikörpers, war ein Signal zu detektieren, dem das erwartete Molekulargewicht zugeordnet werden konnte (Abb. 4-20). Nicht abgebildet sind Ergebnisse mit *E. coli* BL 21 StarTM (DE3) und BL 21 StarTM (DE3) RARE.

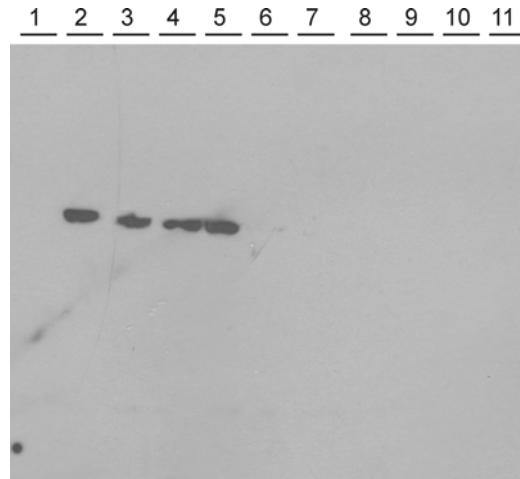


Abb. 4-20: SDS-PAGE (10%) von bakteriellen Gesamtlysaten von Zeitreihen von *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS mit dem Plasmid pBlue-DOX bzw. mit dem Vektor pBluescribeTT. Das Bakteriensediment aus 1 ml Bakterienkultur wurde in 50 μ l Probenpuffer aufgenommen, hiervon wurden jeweils 5 μ l aufgetragen. Die Immundetektion erfolgte mit einem gegen den 6 \times His-tag gerichteten Primärantikörper. Das Auftragsmuster entspricht Abb. 4-19 (abgesehen von Position (L)).

Im Vergleich zu den Versuchen mit LB-Medium resultierte die Verwendung von Minimalmedium zur Expression in der Bildung eines verkürzten Proteins von etwa 40 kD: mittels Western Blot war lediglich das verkürzte Protein zu detektieren. Das C-terminale Ende des verkürzten Proteins liegt augenscheinlich in einem Bereich, in dem sich gehäuft Aminosäuren finden, die durch die in *E. coli* selten vorkommenden Codons GGA (Glycin) und AGA (Arginin) codiert werden. Bei Minimalmedium handelt es sich um ein Magermedium mit eingeschränktem Nährstoffangebot, welches offensichtlich dazu führte, dass die *P. sativum* α -DOX nicht korrekt synthetisiert werden konnte. Damit eignete sich Minimalmedium nicht zur Überexpression der α -DOX aus Erbsen.

Ausgehend von pRSET-DOX, wurde in *E. coli* Origami B (DE3) sowie *E. coli* BL 21 StarTM (DE3) und BL 21 StarTM (DE3) RARE eine Expression von α -DOX induziert. *E. coli* Rosetta (DE3), Rosetta (DE3) pLysS und Origami B (DE3) RARE dagegen eigneten sich nicht für eine Expression ausgehend von pRSET-DOX.

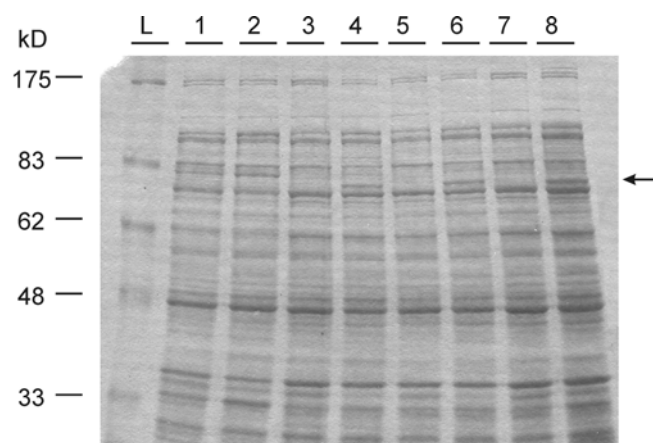


Abb. 4-21: SDS-PAGE (10%) von bakteriellen Gesamtlysaten von Versuchen mit *E. coli* BL21 StarTM (DE3) mit dem Plasmid pRSET-DOX bzw. mit dem Vektor pRSET A. Das Bakteriensediment aus 1 ml Bakterienkultur wurde in 50 μ l Probenpuffer aufgenommen, hiervon wurden jeweils 5 μ l aufgetragen. Die Anfärbung erfolgte mit Coomassie Brilliant Blau. Links sind die Größen der Banden des Proteinlängenstandards angegeben. Die Position, an der die Bande der *P. sativum* α -Dioxygenase erwartet wird, ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Auftragsmuster: (L) Proteinlängenstandard; (1) pRSET vor Induktion; (2) pRSET 12 h nach Induktion mit IPTG; (3) pRSET-DOX vor Induktion; (4) pRSET-DOX 12 h nach Induktion mit IPTG bei 16 $^{\circ}$ C; (5) pRSET-DOX vor Induktion; (6) pRSET-DOX 12 h nach Induktion mit IPTG bei 20 $^{\circ}$ C; (7) pRSET-DOX vor Induktion; (8) pRSET-DOX 12 h nach Induktion mit IPTG bei 25 $^{\circ}$ C.

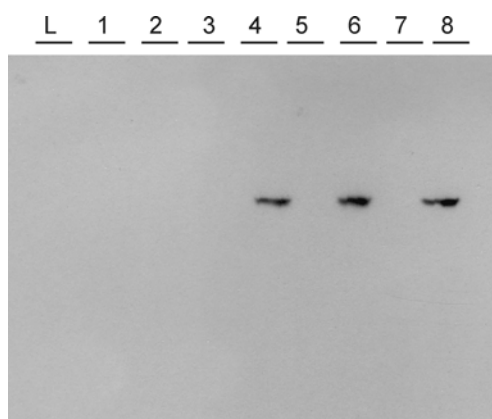


Abb. 4-22: SDS-PAGE (10%) von bakteriellen Gesamtlysaten von Versuchen mit *E. coli* BL21 StarTM (DE3) mit dem Plasmid pRSET-DOX bzw. mit dem Vektor pRSET A. Das Bakteriensediment aus 1 ml Bakterienkultur wurde in 50 μ l Probenpuffer aufgenommen, hiervon wurden jeweils 5 μ l aufgetragen. Die Immundetektion erfolgte mit einem gegen den 6 \times His-tag gerichteten Primärantikörper. Das Auftragsmuster entspricht Abb. 4-21.

Abb. 4-21 zeigt ein mit Coomassie Brilliant Blau gefärbtes PAA-Gel mit aufgetrennten bakteriellen Gesamtlysaten von Versuchen mit *E. coli* BL 21 StarTM (DE3). Zur Expression fand mit Ampicillin supplementiertes LB-Medium Verwendung, die Expression wurde bei einer OD₅₈₀ von ca. 0,6 mit 1 mM IPTG induziert, die Expressionstemperaturen betragen 16, 20 und 25 $^{\circ}$ C, die Expression

erfolgte über Nacht (3.3.10.3). Im Vergleich mit den Gesamtlysaten aus dem gleich behandelten Kontrollansatz mit dem Vektor pRSET A (links) fällt eine Proteinbande bei ca. 78 kD auf (das höhere Molekulargewicht ergibt sich aufgrund des N-terminalen *tags*). Bei Untersuchung der Gesamtlysate mittels Western Blot, unter Verwendung eines gegen den 6 \times His-*tag* gerichteten Primärantikörpers, war ein Signal zu detektieren, dem das erwartete Molekulargewicht zugeordnet werden konnte (Abb. 4-22). Nicht abgebildet sind Ergebnisse mit *E. coli* Origami B (DE3) und BL 21 StarTM (DE3) RARE.

4.3.2.2 Optimierung der Expressionsbedingungen

Zur Optimierung der Expressionsbedingungen wurden kompetente Bakterienzellen *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS, BL21 StarTM (DE3), BL21 StarTM (DE3) RARE sowie Origami B (DE3) mit den entsprechenden Expressionsplasmiden pBlue-DOX und pRSET-DOX transformiert. 5 ml Antibiotika-supplementiertes LB-Medium (100 mg/ml Ampicillin, ggf. 34 mg/ml Chloramphenicol, 12,5 mg/ml Tetracyclin, 25 mg/ml Kanamycin) wurden mit einem diskreten Klon angeimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. 500 ml Antibiotika-supplementiertes Bakterienmedium wurden aus einer entsprechenden Vorkultur angeimpft und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte bei 580 nm von 0,5-0,8 inkubiert. Die Expression wurde durch Zugabe von IPTG zur Kultur induziert (3.3.10.3).

Zur Optimierung erfolgten Versuche mit den unterschiedlichen Expressionsplasmiden und Bakterienstämmen in verschiedenen Bakterienmedien, dem Medium wurden zusätzlich Glucose, Spurenelemente, δ -Aminolävulinat, Hämin, Sorbit bzw. Ethanol zugesetzt, die Menge an IPTG zur Induktion wurde in einem Bereich von 0,5-2,0 mM Endkonzentration variiert, weiterhin wurde die Expressionstemperatur zwischen 16 und 37 °C variiert.

Die Bestimmung der α -Dioxygenase-Aktivität erfolgte zunächst im bakteriellen Rohextrakt: aus Laurinsäure gebildetes Undecanal wurde mittels *Headspace*-HRGC-Analytik halbquantitativ bestimmt (3.3.12.1). Die Ergebnisse dieser Studie sind in Tab. 4-3 dargestellt.

Die besten Ergebnisse wurden mit dem Bakterienmedium 2 \times YT erzielt, mit Zusätzen von 1% Glucose, 2 mM δ -Aminolävulinat und Spurenelement-Lösungen. Ebenfalls als positiv erwies sich eine eher geringe Expressionstemperatur.

Tab. 4-3: Optimierung der Expressionsbedingungen für die Überproduktion von *P. sativum* α -DOX in den *E. coli*-Stämmen.

Ausgangsbedingungen	Variation		Ergebnisse ^a
LB-Medium 25 °C 1,0 mM IPTG	Glucose	0%	–
		1%	+
		2%	+
LB-Medium 25 °C 1,0 mM IPTG 1% Glucose	Temperatur	18 °C	+
		20 °C	+
LB-Medium 20 °C 1,0 mM IPTG 1% Glucose	IPTG	0,5 mM	0
		2,0 mM	0
LB-Medium 20 °C 1,0 mM IPTG 1% Glucose	Medium	TB	–
		2 × YT	+
2 × YT-Medium 20 °C 1,0 mM IPTG 1% Glucose	Zusätze	Ethanol 1%	–
		Sorbit 1% / 5%	0 / –
		2 mM δ -Aminolävulinat	+
		Hämin	–
		Spurenelement-Lösungen A, B, C	+
		Hitzeschock (30 min, 42 °C)	–

^a Undecanal, aus Laurinsäure gebildet, wurde mittels *Headspace*-HRGC-Analytik halbquantitativ bestimmt, + steht für Verbesserung, – steht für Verschlechterung, 0 bedeutet keine Veränderung der α -Dioxygenase-Aktivität.

Die Aufreinigung von rekombinanter α -DOX erfolgte mit Hilfe der Metallaffinitätschromatographie. Das Fusionsprotein aus α -DOX und 6 × His-tag lässt sich aufgrund der hohen Affinität des His-tags zu Ni²⁺-Ionen von *E. coli*-Proteinen abtrennen: das rekombinante Protein wird an immobilisiertes Ni²⁺ gebunden, andere Proteine binden nicht und können durch Waschen entfernt werden (3.3.11.3). Die Durchführung der Expressionsversuche erfolgte wie oben beschrieben; es wurde 2 × YT-Medium mit Zusätzen von 1% Glucose, 2 mM δ -Aminolävulinat und Spurenelement-Lösungen verwendet, die Variationen hinsichtlich Expressionstemperatur und

IPTG-Konzentration sind in Tab. 4-4 angegeben. Nach Lyse der Zellen mit Lyse-Puffer wurde der Protein-Rohextrakt im *batch*-Verfahren mit Agarose-Matrix versetzt und diese Suspension nach Ablauf des Lysats mit Wasch-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit Elutions-Puffer (pH 5,0). Mittels Ultrafiltration und Pufferwechsel wurde der pH-Wert der vereinigten Eluate auf pH 7,0 eingestellt.

Diese Proteinlösung wurde zur Bestimmung der spezifischen α -Dioxygenase-Aktivität eingesetzt. Als Fettsäuresubstrat wurde Laurinsäure verwendet und gebildetes Undecanal mittels HPLC mit UV-Detektion quantifiziert (3.3.12.4). Die Ergebnisse dieser Studie finden sich in Tab. 4-4.

Die besten Ergebnisse sowohl hinsichtlich der spezifischen α -Dioxygenase-Aktivität als auch hinsichtlich der isolierbaren Gesamtaktivität wurden mit dem Plasmid pRSET-DOX und dem Bakterienstamm *E. coli* BL 21 StarTM (DE3) RARE erzielt. Es wurde eine Konzentration an IPTG von 1,0 mM zur Induktion und eine Inkubationstemperatur von 16 °C ausgewählt.

Der Zusatz von bis zu 2% Glucose zum Medium führt durch katabolische Repression zu Absenkung der basalen Expression des Zielproteins. Dies ist vor allem dann wichtig, wenn davon auszugehen ist, dass das Zielprotein den Stoffwechsel von Bakterien beeinträchtigt oder sogar toxische Wirkung hat. Bei α -Dioxygenasen aus Pflanzen handelt es sich um Häm-haltige Proteine, für die ein Zusatz von δ -Aminolävulinat, als Vorläufer der Häm-Biosynthese in Bakterien, sinnvoll ist. Durch die Spurenelement-Lösungen werden hier auch Eisen-Ionen zur Verfügung gestellt. Eine niedrige Expressionstemperatur war höheren Temperaturen vorzuziehen, da hierdurch die Menge an funktionell aktivem Protein gesteigert werden konnte. Bei niedrigen Temperaturen liegt aufgrund langsamerer Proteinbiosynthese mehr Protein in nativer und damit funktionell aktiver Konformation vor.

Hinsichtlich des Aufreinigungsprozesses wurden ebenfalls Variationen vorgenommen. Da es sich bei α -Dioxygenasen vermutlich um Membran-assoziierte Proteine handelt, erwies sich ein Zusatz von Triton-X 100 zu den Puffern bei der Aufreinigung als sinnvoll (ohne diesen Zusatz waren sowohl die isolierbare Gesamtaktivität als auch die spezifische Aktivität geringer), ein Zusatz von Hämin erbrachte keinerlei Verbesserung. Die Verwendung der Proteaseinhibitoren Leupeptin und PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) erwies sich nicht als positiv.

Tab. 4-4: Spezifische α -Dioxygenase-Aktivität der in *E. coli* überproduzierten und isolierten *P. sativum* α -DOX bei unterschiedlichen Expressionsbedingungen.

Vektor	Bakterienstamm	Temp.	IPTG / sonstiges	Gesamtaktivität ^a	Spez. Aktivität ^a
pBlue-DOX	Rosetta (DE3) pLysS	20 °C	1 mM	0,2 nmol min ⁻¹	0,3 nmol min ⁻¹ mg ⁻¹
	BL 21 Star TM (DE3)	20 °C	1 mM	1,4 nmol min ⁻¹	1,3 nmol min ⁻¹ mg ⁻¹
	BL 21 Star TM (DE3) RARE	20 °C	1 mM	2,0 nmol min ⁻¹	4,5 nmol min ⁻¹ mg ⁻¹
pRSET-DOX	Origami B (DE3)	20 °C	1 mM	0,36 nmol min ⁻¹	1,1 nmol min ⁻¹ mg ⁻¹
	BL 21 Star TM (DE3)	20 °C	1 mM	2,8 nmol min ⁻¹	12,0 nmol min ⁻¹ mg ⁻¹
	BL 21 Star TM (DE3) RARE	20 °C	1 mM	4,3 nmol min ⁻¹	12,1 nmol min ⁻¹ mg ⁻¹
	BL 21 Star TM (DE3) RARE	25 °C	1 mM	0,9 nmol min ⁻¹	0,5 nmol min ⁻¹ mg ⁻¹
	BL 21 Star TM (DE3) RARE	16 °C	1 mM	6,6 nmol min ⁻¹	23,2 nmol min ⁻¹ mg ⁻¹
	BL 21 Star TM (DE3) RARE	16 °C	0,5 mM	2,8 nmol min ⁻¹	8,5 nmol min ⁻¹ mg ⁻¹
	BL 21 Star TM (DE3) RARE	16 °C	2 mM	2,2 nmol min ⁻¹	6,6 nmol min ⁻¹ mg ⁻¹
	BL 21 Star TM (DE3) RARE	16 °C	1 mM / 1% Sorbit	1,9 nmol min ⁻¹	3,6 nmol min ⁻¹ mg ⁻¹

^a Die Aktivitätsbestimmung erfolgte anhand der Bestimmung des bei der Umsetzung von Laurinsäure gebildeten Undecanals mittels HPLC mit UV-Detektion als 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Derivat.

4.3.2.3 Überproduktion und Isolierung von *P. sativum* α -DOX im präparativen Maßstab

Für eine präparative Überproduktion und Isolierung der *P. sativum* α -DOX wurden 500 ml bzw. 1 l Antibiotika-supplementiertes 2 × YT-Medium (100 mg/ml Ampicillin, 34 mg/ml Chloramphenicol) mit 1% Glucose, 2 mM δ -Aminolävulinat und den Spurenelement-Lösungen A, B und C aus 10 ml

2 \times YT-Vorkultur von pRSET-DOX in *E. coli* BL 21 StarTM (DE3) RARE angesetzt und bei 37 °C inkubiert. Nach Erreichen einer optischen Dichte (OD₅₈₀) von 0,6-0,8 erfolgten Induktion und Expression unter optimierten Bedingungen (4.3.2.2). Nach der IPTG-Induktion (1 mM) erfolgte die Expression für 12 h bei 16 °C. Aus 1 l Kultur wurden durchschnittlich 3,5 g Zellsediment gewonnen.

Nach der Lyse der Zellen erfolgte die Aufreinigung des Protein-Rohextrakts über Ni²⁺-NTA-Agarose. Das Lysat wurde im *batch*-Verfahren an die Agarose-Matrix gebunden, nach Abfließen des Überstandes wurde die Matrix mit Wasch-Puffer (pH 6,0) gewaschen. Die Elution erfolgte mit Elutions-Puffer (pH 5,0) so lange, bis im Eluat durch Bradford-Analyse (3.3.9.2) kein Protein mehr detektierbar war. Die proteinhaltigen Eluate wurden vereinigt. Eine proteolytische Abspaltung des *tags* wurde nicht vorgenommen. Es wurde durchschnittlich 1 mg α -DOX-Protein aus 1 l Bakterienkultur isoliert. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte durch Umsetzung von Palmitinsäure und Quantifizierung des gebildeten Pentadecanals (nach Derivatisierung) mittels HPLC mit UV-Detektion (3.3.12.4). Die durchschnittliche spezifische Aktivität betrug 25-30 nmol min⁻¹ mg⁻¹. Mit der in *E. coli* M15 überexprimierten und isolierten α -DOX aus Reis hatte man nach Umsetzung von Palmitinsäure und Quantifizierung des gebildeten Pentadecanals eine spezifische α -Dioxygenase-Aktivität von 145 nmol min⁻¹ mg⁻¹ bestimmt (Koeduka *et al.*, 2002).

Die gelelektrophoretische Kontrolle einer Aufreinigung mittels SDS-PAGE ist in Abb. 4-23 dargestellt. Aliquots aller Reinigungsstufen wurden aufgetrennt. Es wurde ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von etwa 78 kD isoliert, das sich aus dem N-terminalen *tag* und der ca. 73 kD großen α -DOX zusammensetzt.

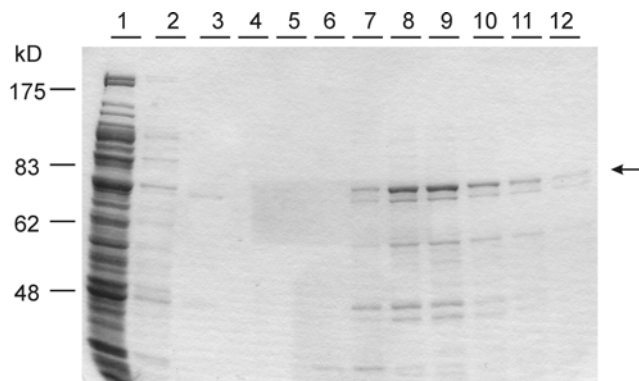


Abb. 4-23: SDS-PAGE (10%) einer Aufreinigung von rekombinanter *P. sativum* α -DOX an Ni²⁺-NTA-Agarose. Die Anfärbung erfolgte mit Coomassie Brilliant Blau. Links sind die Größen eines Proteinlängenstandards angegeben. Die Position, an der die Bande der *P. sativum* α -Dioxygenase erwartet wird, ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Auftragsmuster: (1) Rohextrakt; (2) erste Waschfraktion; (3) zweite Waschfraktion; (4) dritte Waschfraktion; (5) vierte Waschfraktion; (6) erste Elutionsfraktion; (7) zweite Elutionsfraktion; (8) dritte Elutionsfraktion; (9) vierte Elutionsfraktion; (10) fünfte Elutionsfraktion; (11) sechste Elutionsfraktion; (12) siebte Elutionsfraktion.

Western Blots mit einem gegen den 6 × His-tag gerichteten Primärantikörper sowie dem Antiserum gegen die 70 kD-Untereinheit der aus Erbsen aufgereinigten α-Dioxygenase sind in Abb. 4-24 dargestellt.

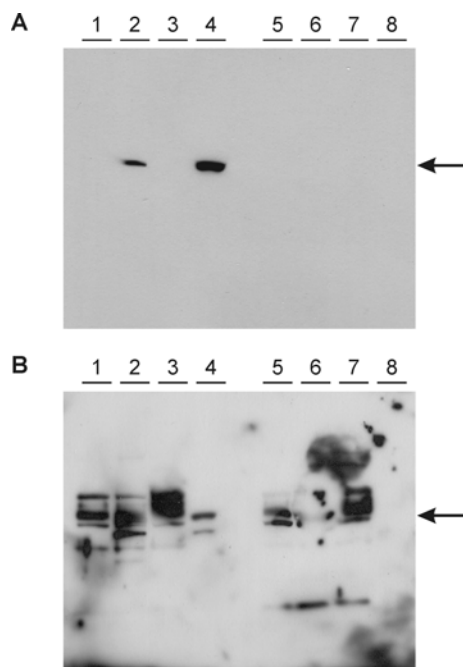


Abb. 4-24: Western Blots mit einem gegen den 6 × His-tag gerichteten Primärantikörper (A) und dem Antiserum (B) gegen die 70 kD-Untereinheit der aus Erbsen aufgereinigten α-Dioxygenase. Die Position, an der die Bande der *P. sativum* α-Dioxygenase erwartet wird, ist jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet.
 Auftragsmuster: (1) Gesamtlysate pRSET-DOX vor Induktion; (2) Gesamtlysate pRSET-DOX nach Induktion; (3) Rohextrakt pRSET-DOX; (4) Eluat pRSET-DOX nach Aufreinigung an Ni²⁺-Agarose; (5) Gesamtlysate pRSET A vor Induktion; (6) Gesamtlysate pRSET A nach Induktion; (7) Rohextrakt pRSET A; (8) Eluat pRSET A nach Aufreinigung an Ni²⁺-Agarose.

Es wurden Proben von pRSET-DOX und, zum Vergleich, Proben von pRSET A in *E. coli* BL21 StarTM (DE3) RARE aufgetragen. Mit dem gegen den 6 × His-tag gerichteten Primärantikörper wurde bei dem bakteriellen Gesamtlysate von pRSET-DOX in *E. coli* BL21 StarTM (DE3) RARE 12 h nach Induktion mit IPTG ein Signal detektiert, im Eluat war auf gleicher Höhe ebenfalls ein Signal zu beobachten. Interessanterweise war im bakteriellen Rohextrakt kein entsprechendes Protein nachweisbar; offensichtlich war hier die Konzentration an α-DOX zu gering. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass ein Teil des rekombinanten Proteins als unlösliche *inclusion bodies* in den Bakterienzellen vorliegt. Im Gesamtlysate werden diese miterfasst, können jedoch bei der Herstellung des bakteriellen Rohextrakts nicht in Lösung gebracht werden und werden somit abgetrennt. Protein, das als unlösliche *inclusion bodies* aggregiert, besitzt keine

enzymatische Aktivität. Bei Proben von pRSET A in *E. coli* BL21 StarTM (DE3) RARE war kein Signal detektierbar.

Mit dem Antiserum gegen die 70 kD-Untereinheit der aus Erbsen aufgereinigten α -Dioxygenase wurden in den Gesamtlysaten der Versuche mit pRSET A und pRSET-DOX vor Induktion und nach Induktion ebenso wie im bakteriellen Rohextrakt unspezifische Signale detektiert. Im Eluat der Versuche mit pRSET-DOX in *E. coli* BL21 StarTM (DE3) RARE ließ sich ein deutliches Signal detektieren, das bei den Eluaten der Versuche mit dem Vektor pRSET-DOX in *E. coli* BL21 StarTM (DE3) RARE nicht nachweisbar war. Antiseren immunisierter Tiere enthalten oft einen hohen Anteil an Antikörpern, welche bakterielle Antigene erkennen. Trotz der Behandlung des Antiserums mit abgetöteten, unlöslichen *E. coli*-Zellen war es nicht möglich, eine vollständige Abtrennung von anti-*E. coli*-Immunglobulinen zu erreichen. Nach Entfernung des größten Teils der bakteriellen Proteine bei dem Aufreinigungsprozess wurde jedoch die überexprimierte rekombinante *P. sativum* α -Dioxygenase spezifisch detektiert.

4.4 Untersuchungen zur Enzym-Substrat-Interaktion

Die zur Enzym-Substrat-Interaktion durchgeführten Untersuchungen umfassten zum einen eine Studie zur Umsetzung von Fettsäuresubstraten mit derivatisierter Carboxylgruppe, zum anderen wurden Aminosäuren in der α -Dioxygenase aus *P. sativum* als potentielle Interaktionspartner ausgewählt, mittels ortsspezifischer Mutagenese ausgetauscht und die entsprechenden in *E. coli* überexprimierten Proteine untersucht.

4.4.1 Umsetzung von aus Erbsen aufgereinigter α -Dioxygenase mit derivatisierten Fettsäuren

Die Versuche zur Umsetzung von Fettsäuren mit derivatisierter Carboxylgruppe erfolgten mit der aus keimenden Erbsen angereicherten α -Dioxygenase. Die Ergebnisse erlaubten Rückschlüsse auf den Interaktionspartner auf Seiten des Enzyms.

4.4.1.1 Anreicherung der α -DOX aus keimenden Erbsen

Die Anreicherung der α -DOX aus keimenden Erbsen erfolgte über mehrere Aufreinigungsschritte nach der von Saffert (2001) entwickelten Methode (3.3.11.1).

Nach Gewinnung des Proteinrohextrakts aus keimenden Erbsen mit Tris-Puffer (pH 7,5) wurde dieser Extrakt einer fraktionierten Ammoniumsulfat-Fällung unterworfen. Die erste Fällung diente zur Abtrennung von Begleitproteinen, im zweiten Schritt wurde auch die α -DOX präzipitiert. Das Präzipitat wurde in Puffer (pH 5,6) gelöst und die Proteinlösung gegen den gleichen Puffer dialysiert. Durch Absenken des pH-Werts wurden weitere Begleitproteine abgetrennt. Der Überstand wurde mittels Anionenaustauscherchromatographie fraktioniert. Fraktionen, in denen α -Dioxygenase-Aktivität nachweisbar war, wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration konzentriert. Abschließender Aufreinigungsschritt war die Gelpermeationschromatographie (GPC). Die Fraktionen mit α -Dioxygenase-Aktivität wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration konzentriert und entsalzt.

Die erhaltene Proteinlösung fand Verwendung für Substratstudien. Aus 100 g keimenden Erbsen ließen sich 2,9 mg eines Proteins mit einer spezifischen α -Dioxygenase-Aktivität von 120,9 nmol min⁻¹ mg⁻¹ isolieren.

4.4.1.2 Substrat-Screening

Die Aktivitätsbestimmung beim Substrat-Screening erfolgte mit Hilfe einer Clark-Sauerstoffelektrode (3.3.12.3). Da Sauerstoff ein Edukt der α -Dioxygenierung von Fettsäuren ist, kann über die Messung der Abnahme der Sauerstoffkonzentration in der Reaktionslösung in Abhängigkeit von der Reaktionsdauer eine direkte Bestimmung der Umsatzrate erfolgen.

Für die Studie über die Umsetzung von Substraten mit derivatisierter Carboxylgruppe durch die α -Dioxygenase aus Erbsenkeimlingen wurden verschiedene Palmitinsäurederivate eingesetzt (Abb. 4-25).

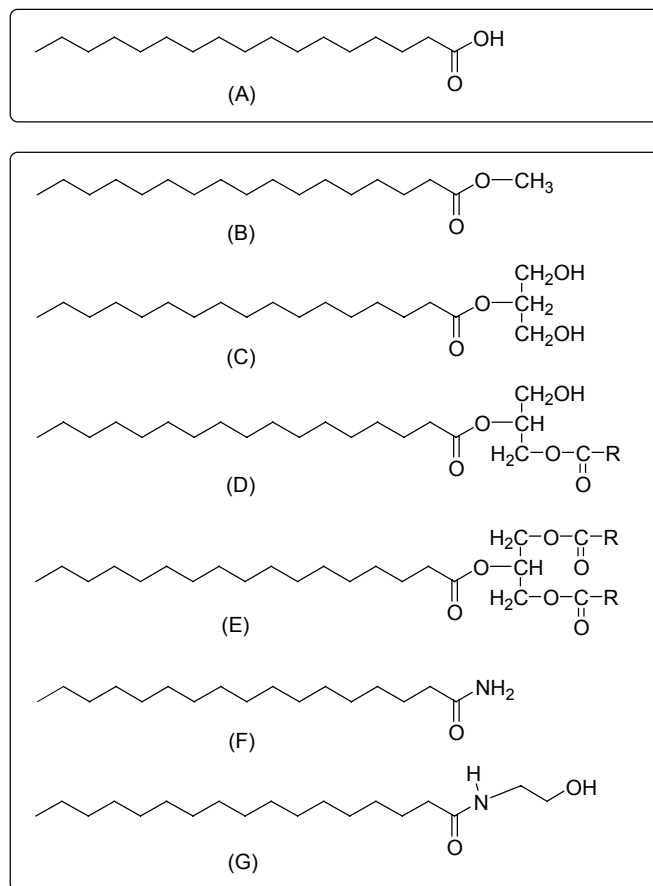


Abb. 4-25: Strukturformeln der eingesetzten Fettsäuresubstrate. (A) Palmitinsäure, (B) Methylpalmitat, (C) Monopalmitoylglycerid, (D) Dipalmitoylglycerid, (E) Tripalmitoylglycerid, (F) Palmitinsäureamid, (G) Palmitoylethanolamid (R = Alkyl).

Standardmäßig fanden die Substrate in einer Konzentration von 2 mM Verwendung. Im Unterschied zu nicht derivatisierter Palmitinsäure wurde keines der Derivate von der α -Dioxygenase aus Erbsen dioxygeniert.

Offensichtlich spielt die freie Carboxylgruppe der Substrate eine entscheidende Rolle für die Interaktion der Fettsäuresubstrate mit dem Enzym, da weder Fettsäureamid und Ethanolamid noch Fettsäuremethylester oder Mono-, Di- und Triglyceride als Substrate akzeptiert wurden. Dies lässt vermuten, dass es sich bei dem Interaktionspartner auf Seiten des Enzyms um eine Aminosäure mit einer basischen Seitenkette, wie Arginin oder Lysin, handelt.

In PGHS spielt der Arginin-Rest Arg-120 eine entscheidende Rolle bei der Substratbindung (vgl. 1.2.1). Arg-120 befindet sich an der Öffnung des hydrophoben Kanals, welcher in das COX-Aktivitätszentrum von PGHS reicht. Bei PGHS-1 wird das Substrat Arachidonsäure ionisch gebunden, was auch die hohe Affinität von PGHS-1 zu Arachidonsäure begründet (Bhattacharyya *et al.*, 1996). In PGHS-2 spielen andere Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminosäureresten Arg-120, Arg-513 und Glu-524, eine größere Rolle bei der Substratbindung (Rieke *et al.*, 1999; Malkowski *et al.*, 2000). Während von PGHS-1 nur Fettsäuren mit freier Carboxylgruppe als Substrate akzeptiert werden, werden von PGHS-2 auch Fettsäuren mit derivatisierter Carboxylgruppe umgesetzt, wie z.B. Arachidonsäureethanolamid (Anandamid) und 2-Arachidonylglycerid (Yu *et al.*, 1997; Kozak *et al.*, 2000).

Wie im Fall von PGHS-1, ist auch für die Umsetzung von Fettsäuren durch α -Dioxygenase offensichtlich eine freie COOH-Gruppe essentiell. Das Substrat wird möglicherweise in Analogie zu PGHS-1 über ionische Wechselwirkungen zwischen der Carboxylgruppe und der Guanidiniumgruppe eines Arginin-Rests gebunden.

4.4.2 Aminosäureaustausch ausgewählter Arginin-Reste

Die in Abschnitt 4.4.1 dargestellten Ergebnisse führten zu der Arbeitshypothese, die Substratbindung bei α -Dioxygenasen erfolge über eine ionische Wechselwirkung zwischen der freien Carboxylgruppe von Fettsäuren und der basischen Aminosäure Arginin. Die Überprüfung dieser Hypothese erfolgte durch Austausch ausgewählter Arginin-Reste gegen Aminosäuren mit anderen Eigenschaften in der *P. sativum* α -DOX und durch nachfolgende Aktivitätstests mit den überproduzierten und aufgereinigten Proteinen.

4.4.2.1 Auswahl aufgrund von Vergleich mit PGHS-1

Die Auswahl der als potentielle Interaktionspartner in Frage kommenden Arginin-Reste in der *P. sativum* α -DOX erfolgte durch Vergleich mit PGHS-1. Zur Illustration ist in Abb. 4-26 eine schematische Abbildung des katalytischen Zentrums von PGHS-1 wiedergegeben.

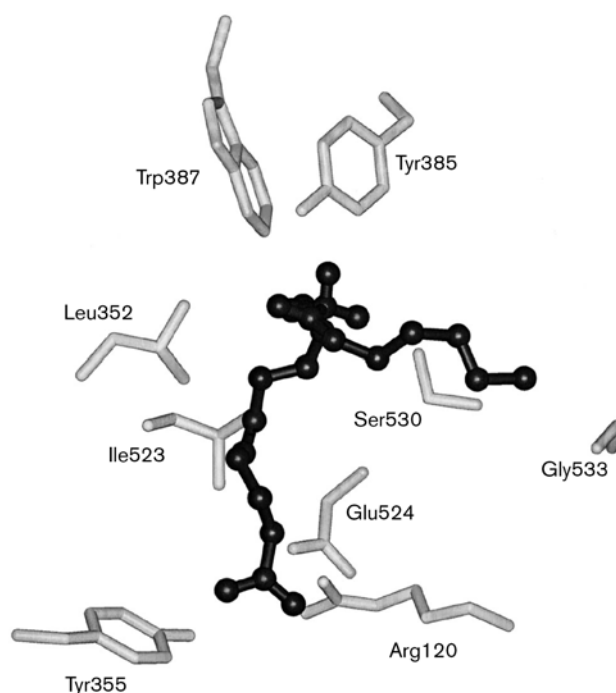


Abb. 4-26: Modell von PGHS-1 mit im COX-aktiven Zentrum gebundener Arachidonsäure (entnommen aus Marnett, 2000). Arachidonsäure ist schwarz dargestellt, Aminosäurereste aus COX-1 sind grau dargestellt. Arachidonsäure wird ionisch an Arg-120 gebunden, Tyr-385 grenzt an das 13-*pro(S)*-Wasserstoffatom von Arachidonsäure, Ser-530 ist der Aminosäurerest, der durch Aspirin acetyliert wird, und Gly-533 befindet sich am ω -Ende des Bindungskanals.

Zum einen wurde ein Arginin-Rest an Position 87 der α -Dioxygenase aus Erbsen ausgewählt. Diese Position entspricht dem für die Substratbindung in PGHS-1 bedeutsamen Arg-120. Es wurde erwartet, dass durch Austausch von Arginin gegen Leucin die spezifische Aktivität der *P. sativum* α -DOX nicht vermindert würde. Grund ist die unterschiedliche Position der initialen H-Abstraktion bei der Katalyse der beiden Enzyme. Bei PGHS-1 erfolgt die initiale H-Abstraktion vom Arachidonsäuresubstrat an C₁₃, bei α -Dioxygenasen dagegen an C₂. Da aufgrund von Mutagenesestudien (Hamberg *et al.*, 2002^b; Koeduka *et al.*, 2002) davon ausgegangen wird, dass der Tyrosin-Rest Tyr-390 (Position in *P. sativum* α -DOX, entspricht dem Tyrosin-Rest Tyr-385 in PGHS-1) in α -Dioxygenasen die H-Abstraktion katalysiert, kann – Ähnlichkeit des katalytischen Zentrums von α -DOX und PGHS vorausgesetzt – die Bindung des Substrats in α -DOX nicht über den Arginin-Rest an Position 87 der α -Dioxygenasen erfolgen, dessen Position der von Arg-120 in PGHS-1 entspricht.

Als weiterer potentieller Interaktionspartner wurde der Arginin-Rest an Position 391 ausgewählt. Dieser Arginin-Rest befindet sich in unmittelbarer Nähe zu Tyr-390. Wie oben bereits erläutert, wird dieser Tyrosin-Rest aufgrund der Ergebnisse von Mutagenesestudien als Äquivalent von

Tyr-385 in PGHS-1 diskutiert. Ein entsprechendes Tyrosyl-Radikal soll die initiale H-Abstraktion an C₂ von Fettsäuresubstraten verursachen (Hamberg *et al.*, 2002^b; Koeduka *et al.*, 2002). Aus diesem Grund wurde hier angenommen, dass der als Interaktionspartner fungierende Arginin-Rest in der Nähe von Tyr-390 liegt – zumindest, was die Tertiärstruktur betrifft.

In PGHS-1 liegt am Ende des hydrophoben Kanals, welcher in das COX-Aktivitätszentrum reicht, der Glycin-Rest Gly-533: Gly-533 ist damit sozusagen der Abschluss des hydrophoben Kanals. Der Serin-Rest an Position 530 ist der Angriffspunkt von Aspirin: durch Acetylierung von Ser-530 durch Acetylsalicylsäure wird COX inaktiviert. α -Dioxygenasen werden durch Acetylsalicylsäure nicht inaktiviert (Saffert, 2001; Koeduka *et al.*, 2002). Untersuchungen mit der α -DOX aus Reis zum Austausch des Serin-Rests Ser-558, welcher Ser-530 in PGHS-1 entspricht, hatten jedoch gezeigt, dass ein Austausch gegen Alanin das Enzym inaktiviert (Koeduka *et al.*, 2002). Dies deutet darauf hin, dass Ser-558 in einer Region liegt, die eine essentielle Bedeutung für die katalytische Aktivität von α -Dioxygenasen hat. An der Position, die dem des Glycin-Restes Gly-533 in PGHS-1 entspricht, ist in allen pflanzlichen α -Dioxygenasen ein Arginin-Rest konserviert. Dieser Arginin-Rest Arg-570 und der in unmittelbarer Nachbarschaft liegende Arginin-Rest Arg-569 wurden ebenfalls als potentielle Interaktionspartner für weitere Untersuchungen ausgewählt.

Ausschnitte aus einem Aminosäuresequenz-Alignment der *P. sativum* α -DOX und PGHS-1 aus *Ovis aries* sind in Abb. 4-27 dargestellt. Die Ausschnitte umfassen die Regionen, in denen sich die vier für die weiteren Untersuchungen ausgewählten Arginin-Reste befinden. Ein Aminosäuresequenz-Alignment über die gesamte Sequenz findet sich in Abb. 4-16.

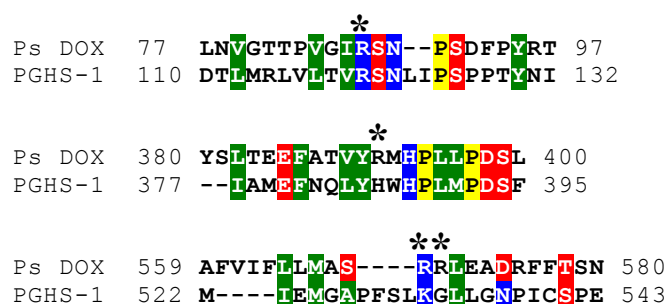


Abb. 4-27: Ausschnitte aus einem Aminosäuresequenz-Alignment der *P. sativum* α -DOX und PGHS-1 aus *Ovis aries* (GenBank Accession Nr.: NM001009476). Die für die Mutagenesestudie ausgewählten Arginin-Reste sind mit einem Stern gekennzeichnet.

4.4.2.2 Mutagenesestudie

Zur Untersuchung der ausgewählten Arginin-Reste im Hinblick auf eine Interaktion mit dem Fettsäuresubstrat erfolgte ein Aminosäureaustausch mit Hilfe der ortsspezifischen Mutagenese (3.3.4.4). Hierbei wurden aus dem Expressionsplasmid pRSET-DOX mittels PCR unter Verwendung von Startsequenzen, welche die jeweilige gewünschte Mutation enthielten, Plasmide generiert, die dann zur Überexpression der entsprechend mutierten Proteine eingesetzt wurden. Arginin, eine basische Aminosäure, wurde ausgetauscht gegen Leucin, eine unpolare ungeladene Aminosäure, sowie gegen Glutamin, eine polare ungeladene Aminosäure, und gegen Lysin, ebenfalls eine basische Aminosäure.

Die in Tab. 4-5 aufgeführten Plasmide wurden mittels bidirektioneller Mutagenese hergestellt.

Tab. 4-5: Plasmide zur Überexpression von α -DOX-Mutanten.

Plasmid	Ausgangsplasmid	Startoligonukleotide
pRSETDOX-R87L	pRSETDOX	Mutageneseprimer 87Leu-uni & 87Leu-rev
pRSETDOX-R391L	pRSETDOX	Mutageneseprimer 391Leu-uni & 391Leu-rev
pRSETDOX-R569L	pRSETDOX	Mutageneseprimer 569Leu-uni & 569Leu-rev
pRSETDOX-R570L	pRSETDOX	Mutageneseprimer 570Leu-uni & 570Leu-rev
pRSETDOX-R391Q	pRSETDOX	Mutageneseprimer 391Gln-uni & 391Gln-rev
pRSETDOX-R570Q	pRSETDOX	Mutageneseprimer 570Gln-uni & 570Gln-rev
pRSETDOX-R570K	pRSETDOX	Mutageneseprimer 570Lys-uni & 570Lys-rev

Überproduktion in *E. coli* und Aufreinigung der α -DOX-Mutanten erfolgten im präparativen Maßstab unter optimierten Bedingungen, wie unter Punkt 4.3.2.3 beschrieben. Die Proteinpräparationen wurden für Umsetzungen mit dem Substrat Palmitinsäure eingesetzt und der gebildete Aldehyd Pentadecanal (nach Derivatisierung) mittels HPLC mit UV-Detektion quantifiziert (3.3.12.4). Die spezifische Aktivität wurde als nmol gebildeter Aldehyd je min je mg Protein quantifiziert und jeweils auf die spezifische Aktivität des Wildtyps bezogen.

Die Ergebnisse der Mutagenesestudie sind in Abb. 4-28 zusammenfassend dargestellt.

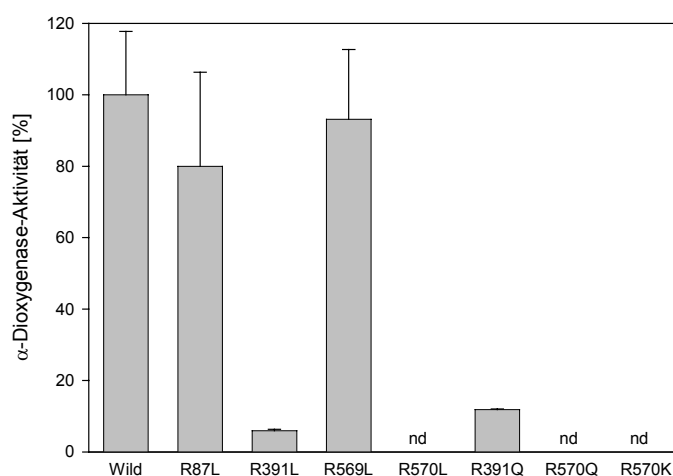


Abb. 4-28: α -Dioxygenase-Aktivität der in *E. coli* überproduzierten und isolierten *P. sativum* α -Dioxygenase und der Mutanten R87L, R391L, R569L, R570L, R391Q und R570K. Die spezifische α -Dioxygenase-Aktivität des Wildtyps wurde gleich 100% gesetzt, die spezifische Aktivität der Mutanten wurde auf die Aktivität des Wildtyps bezogen. Zur Aktivitätsbestimmung wurde aus Palmitinsäure gebildetes *n*-Pentadecanal als 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Derivat mittels HPLC (UV-Detektion) quantifiziert. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Bestimmungen dar, die Standardabweichung ist angegeben.

Zunächst erfolgte die Untersuchung derjenigen Mutanten, bei denen die ausgewählten Arginin-Reste gegen Leucin ausgetauscht worden waren: *P. sativum* α -DOX R87L, R391L, R569L und R570L. Leucin, eine unpolare ungeladene Aminosäure, kann keine Wechselwirkungen mit einer Carboxylgruppe ausbilden. Die Mutanten *P. sativum* α -DOX R87L und R569L hatten eine der Wildtyp-Aktivität vergleichbare spezifische Aktivität (siehe Abb. 4-28). Die spezifische Aktivität der *P. sativum* α -DOX R391L betrug ca. 6% der Wildtyp-Aktivität, mit der *P. sativum* α -DOX R570L war die Bildung von Pentadecanal nicht nachweisbar. Ausgehend von den mit den Mutanten α -DOX R87L und R569L erhaltenen Ergebnissen, wurden die Arginin-Reste Arg-87 und Arg-569 als mögliche Interaktionspartner mit der Carboxylgruppe von Substraten ausgeschlossen; auch ein Austausch gegen die unpolare Aminosäure resultierte nicht in einer Inaktivierung des Enzyms. Ausgehend von den mit der Mutante R391L erzielten Ergebnissen, kommt der Arginin-Rest Arg-391 ebenfalls nicht für eine ionische Interaktion mit der Carboxylgruppe in Frage, da hier eine Umsetzung des Fettsäuresubstrats, wenn auch in geringem Umfang, nachweisbar war. Vermutlich beruht die Verringerung der spezifischen Aktivität darauf, dass hier in direkter Umgebung des für die Katalyse bedeutsamen Tyrosin-Rests in Position 390 eine Veränderung vorgenommen worden war, die auch zu einer Veränderung der Ladungsverhältnisse führte. Für die

Mutante R570L war eine Umsetzung des Substrats nicht nachweisbar, Arg-570 könnte damit möglicherweise bei der Substratbindung eine Rolle spielen.

Die Arginin-Reste Arg-391 und Arg-570 wurden weitergehend betrachtet. Es wurden Mutanten untersucht, bei denen Arg-391 und Arg-570 gegen Glutamin ausgetauscht worden waren: *P. sativum* α -DOX R391Q und R570Q. Glutamin ist eine polare ungeladene Aminosäure, sie kann keine ionischen Wechselwirkungen mit einer Carboxylgruppe ausbilden. Die spezifische Aktivität der *P. sativum* α -DOX R391Q betrug etwa 12% der Wildtyp-Aktivität. Die Steigerung der spezifischen Aktivität im Vergleich zu der Mutante R391L deutet ebenfalls darauf hin, dass die Verringerung im Vergleich zur Wildtyp-Aktivität darauf beruht, dass hier in direkter Umgebung zum Tyrosin-Rest Tyr-390, der für die initiale H-Abstraktion vom Substrat verantwortlich sein soll (Hamberg *et al.*, 2002^b; Koeduka *et al.*, 2002), eine Veränderung vorgenommen worden war. Mit der *P. sativum* α -DOX R570Q war die Bildung von Pentadecanal aus Palmitinsäure erneut nicht nachweisbar.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde nur der Arginin-Rest Arg-570 weiteruntersucht. Es wurde eine Mutante betrachtet, bei der der Arginin-Rest Arg-570 gegen Lysin ausgetauscht worden war: *P. sativum* α -DOX R570K. Lysin ist wie Arginin eine basische Aminosäure, sie kann mit einer Carboxylgruppe ebenfalls ionische Wechselwirkungen ausbilden. Es wurde erwartet, dass unter bestimmten Voraussetzungen ein Austausch von Arginin gegen Lysin – eine Aminosäure mit ähnlichen Eigenschaften wie Arginin – nicht zu einer wesentlichen Verringerung der Enzymaktivität führt. Es war jedoch nicht möglich, die Dioxygenase-Aktivität durch Austausch von Arg-570 gegen Lysin aufrecht zu erhalten: auch mit der *P. sativum* α -DOX R570K war die Bildung von Pentadecanal nicht nachweisbar.

Eine Beteiligung von Arg-570 an der Substratbindung kann damit nicht ausgeschlossen werden. So kann sich z.B. zwischen der Guanidiniumgruppe von Arginin und einer Carboxylgruppe aufgrund des stärker basischen Charakters eine stärkere Wechselwirkung ausbilden als zwischen der Aminogruppe von Lysin und einem Carboxylat. Sollte Arg-570 an der Substratbindung beteiligt sein, und damit auch an der korrekten Präsentation des Substrats im Hinblick auf die initiale H-Abstraktion an C₂ durch das aus Tyr-390 gebildete Tyrosyl-Radikal, könnten schon geringe Änderungen in der Positionierung des Substrats dazu führen, dass eine enzymatische Umsetzung nicht mehr erfolgen kann.

Interessanterweise ist durch Röntgenkristallstruktur-Analysen bekannt, dass in PGHS-1 das Fettsäuresubstrat Arachidonsäure auf zwei unterschiedliche Weisen gebunden werden kann, wobei die Orientierungen des Substrats genau entgegengesetzt sind.

Beim sogenannten produktiven Bindungsmodus, der in der Bildung von PGG₂ aus Arachidonsäure resultiert, wird das Substrat so gebunden, dass sich zwischen dem Carboxylat der Fettsäure und Arg-120 eine ionische Wechselwirkung ausbilden kann, der hydrophobe Rest des Substrats reicht in den hydrophoben Kanal hinein und das Kohlenstoffatom C₁₃ wird so positioniert, dass durch das Tyrosylradikal an Position 385 ein H-Atom von C₁₃ abstrahiert werden kann (Malkowski *et al.*, 2000). Zur Illustration sind in Abb. 4-29 die Wechselwirkungen zwischen Arachidonsäure und den Aminosäureresten des COX-Bindungskanals von PGHS-1 wiedergegeben.

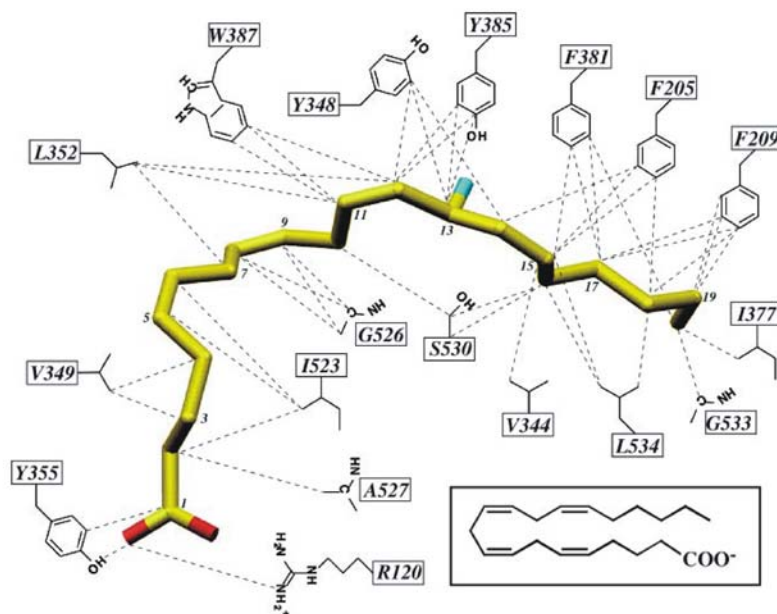


Abb. 4-29: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Arachidonsäure und Aminosäuren des COX-Bindungskanals von PGHS-1 (entnommen aus Malkowski *et al.*, 2000). Kohlenstoffatome des Arachidonsäure-Moleküls sind gelb, Sauerstoffatome rot und das 13-*pro(S)*-Wasserstoffatom ist blau dargestellt. Die gestrichelten Linien entsprechen Wechselwirkungen mit einem maximalen Abstand von 4,0 Ångström zwischen den entsprechenden Atomen der Seitenkette des Proteins und der Arachidonsäure. Es ergeben sich 49 Wechselwirkungen, von denen zwei hydrophiler Natur sind. Die Carboxylat-Gruppe bildet eine Salzbrücke zu der Guanidiniumgruppe von Arg-120 aus und eine Wasserstoffbrückenbindung zur OH-Gruppe von Tyr-355. Die Strukturformel von Arachidonsäure ist im Kästchen wiedergegeben.

Bei einem bekannten nicht-produktiven Bindungsmodus ist das Arachidonsäure-Molekül genau entgegengesetzt orientiert: das Carboxylat-Ende des Substrats reicht in den hydrophoben Kanal hinein und bildet mit den Seitenketten von Tyr-385 und Ser-530 Wasserstoffbrückenbindungen aus (Kiefer *et al.*, 2000). Zwischen der Seitenkette von Arg-120 und dem hydrophoben Ende von Arachidonsäure bilden sich van der Waals-Wechselwirkungen aus. Bei dieser Orientierung des Substrats erfolgt keine enzymatische Umsetzung.

Wie unter 4.4.2.1 bereits ausgeführt, entspricht die Position von Arg-570 in der *P. sativum* α -DOX etwa der Position von Gly-533 in PGHS-1. Gly-533 stellt in PGHS-1 den Abschluss des hydrophoben Kanals dar, der in das COX-Aktivitätszentrum reicht. Sollte Arg-570 an der Substratbindung beteiligt sein, würde das bedeuten: Bindung und Orientierung eines Fettsäuresubstrats in α -Dioxygenasen erfolgen in Analogie zu dem nicht-produktiven Bindungsmodus, der von PGHS-1 bekannt ist. Die Inaktivierung der α -Dioxygenase aus Reis durch Austausch des Serin-Rests Ser-558 (entspricht Ser-568 der *P. sativum* α -DOX) gegen Alanin (Koeduka *et al.*, 2002) deutet darauf hin, dass diese Region, die bei allen bekannten α -Dioxygenasen aus Pflanzen hochkonserviert ist, für die enzymatische Aktivität bedeutsam ist.

Eine abschließende Interpretation der Ergebnisse wird erst eine Röntgenkristallstruktur-Analyse einer α -DOX aus Pflanzen ermöglichen.

4.5 Expression der *P. sativum* α -DOX während Keimung und Entwicklung

Um Informationen über die Bedeutung der α -Dioxygenierung von Fettsäuren während der Keimung und Entwicklung von Pflanzen zu erlangen, wurde zunächst die Akkumulation von α -DOX mRNA, sodann die von α -DOX Protein und schließlich die α -Dioxygenase-Aktivität in verschiedenen Teilen keimender Erbsen und junger Erbsenpflanzen in ihrem jeweiligen zeitlichen Verlauf untersucht.

Die Keimung und das Wachstum von Erbsenpflanzen erfolgte unter standardisierten Bedingungen (3.1.5.3). Zu definierten Zeitpunkten wurde das Pflanzenmaterial geerntet und – nach Differenzierung in die entsprechenden Pflanzenteile – in flüssigem Stickstoff schockgefroren sowie bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. In Abb. 4-30 sind die entsprechenden Pflanzenteile beispielhaft abgebildet.



Abb. 4-30: Unterschiedliche Pflanzenteile, die für die Versuche zur Expression der α -Dioxygenase verwendet wurden. Es ist jeweils das Alter der Pflanzen nach Beginn der Keimung angegeben. Es sind ein trockener Samen (Tag 0), die Keimblätter und Keimachse nach dem ersten Tag der Keimung sowie 3 bis 28 Tage alte Erbsenpflanzen abgebildet. Die Differenzierung der 3 bis 28 Tage alten Pflanzen in Wurzeln und Spross ist durch einen weißen Balken dargestellt.

4.5.1 Akkumulation von α -DOX mRNA

Zur Untersuchung der mRNA Expression der *P. sativum* α -Dioxygenase während des Prozesses der Keimung wurde die Menge an α -Dioxygenase mRNA in Erbsenpflanzen zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Keimung und des Wachstums junger Erbsenpflanzen bestimmt. Um sowohl Unterschiede in Abhängigkeit vom Alter der Pflanzen als auch gewebespezifische Unterschiede aufzeigen zu können, wurden trockene Samen, die Embryonalachse und die Keimblätter während des ersten Tages nach Beginn der Keimung untersucht. Für Untersuchungen über die weitere Entwicklung der Pflanzen wurden Wurzel- und Sprossgewebe gesunder Pflanzen am dritten Tag nach Beginn der Keimung und an den nachfolgenden Tagen verwendet.

Die Northern Blot-Untersuchungen wurden mit Gesamt-RNA durchgeführt. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des *RNeasy Kits* der Firma *Qiagen* (3.3.3.5) mit je 100 mg Pflanzenmaterial. Zur Extraktion wurde Puffer RLC für Keimachse, Spross und Wurzeln verwendet, für Kotyledonen der Puffer RLT. Reste von DNA wurden durch den Zusatz von DNase I entfernt. Aus 100 mg Pflanzenmaterial wurden je nach Gewebe zwischen 5 μ g (Wurzeln) und 150 μ g (Keimachse und Spross) Gesamt-RNA isoliert. Zur Analyse der α -DOX mRNA wurden Northern Blots durchgeführt (3.3.2). Jeweils die gleiche Menge an Gesamt-RNA (10 μ g) wurde mit Hilfe eines 1%igen denaturierenden Agarosegels (3.3.1.2) aufgetrennt und das RNA-Muster im Anschluss an die Elektrophorese durch Kapillartransfer auf eine positiv geladene Nylon-Membran übertragen (3.3.2.1). α -DOX mRNA wurde durch Hybridisierung mit dem mit [α - 32 P]-markierten cDNA-Fragment DOX830 (4.1.2.2) und durch Nachweis mittels Autoradiographie bzw. PhosphoImager-Platten (3.3.2.2) detektiert. Die mengenmäßige Standardisierung der aufgetragenen RNA-Menge im Agarosegel erfolgte durch Bestimmung der Intensität der Fluoreszenz von eingelagertem Ethidiumbromid unter UV-Licht. Die radioaktiv markierte DNA-Sonde hybridisierte an eine RNA-Bande einer spezifischen Größe.

Wie aus Abb. 4-31 ersichtlich, war α -Dioxygenase Transkript während der Keimung von Erbsen in großer Menge in den Pflanzen vorhanden. Der zeitliche Verlauf der Akkumulation von α -DOX mRNA variierte jedoch stark in den verschiedenen untersuchten Pflanzenteilen. Generell war das mit DOX830 detektierte Signal in den RNA-Proben aus sehr jungen, nur wenige Tage alten Pflanzen besonders stark.

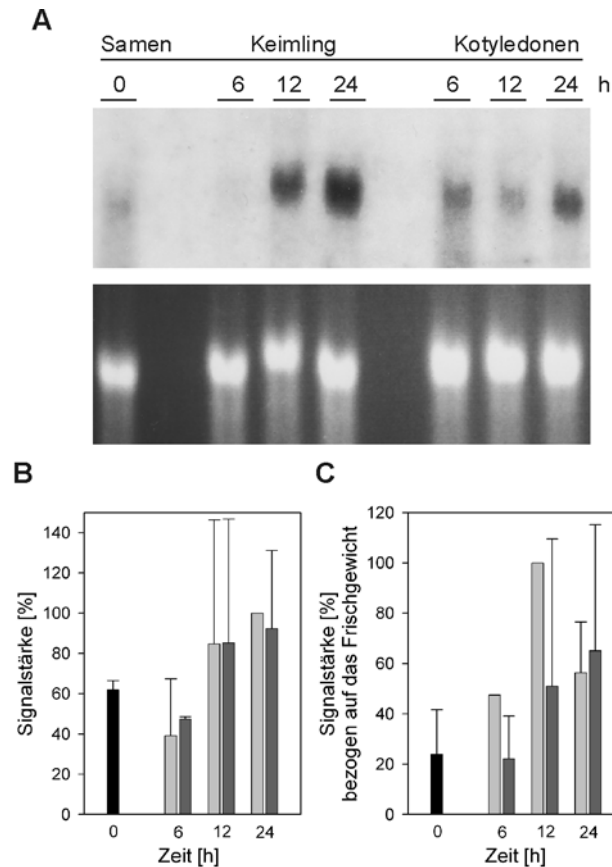


Abb. 4-31: Analyse der α -Dioxygenase mRNA-Expression in unterschiedlichen Teilen keimender Erbsen während des ersten Tages nach Beginn der Keimung. Es wurden Proben aus trockenen Samen (schwarze Balken), Keimlingen (hellgraue Balken) und Kotyledonen (dunkelgraue Balken) analysiert.

(A) Northern Blot mit Gesamt-RNA aus *P. sativum* (10 μ g), die zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert wurde. Zur Hybridisierung wurde das mit 32 P-markierte cDNA-Fragment DOX830 verwendet (oberes Bild). Im unteren Bild ist das Ethidiumbromid-gefärbte Gel vor Übertragung der RNA auf die Nylon-Membran dargestellt.

(B) Die Signalstärke auf Northern Blots wurde mit ImageQuant Version 3.3 analysiert. Das stärkste Signal wurde gleich 100% gesetzt, alle weiteren Signale wurden auf das jeweils stärkste Signal bezogen. Alle Werte wurden mit Hilfe der im Ethidiumbromid-gefärbten Gel vorhandenen Menge an 25S rRNA standardisiert.

(C) Die Signalstärke auf Northern Blots wurde wie unter (B) analysiert und ist angegeben bezogen auf das Frischgewicht der Proben in Gramm.

Jeder Datenpunkt entspricht dem aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten gebildeten Mittelwert, die Standardabweichung ist jeweils angegeben.

Die Quantifizierung der Signalstärken erfolgte mit Hilfe der Software ImageQuant Version 3.3. Zur Auswertung wurde in jedem Experiment das stärkste Signal gleich 100% gesetzt, alle weiteren Signale wurden auf das stärkste Signal bezogen. In jedem Experiment wurde die Signalstärke mit Bezug auf sowohl die Menge an Gesamt-RNA in μg als auch das Frischgewicht des Pflanzenmaterials in g betrachtet. Die Ergebnisse mit Proben aus Pflanzen, die am ersten Tag nach Beginn der Keimung geerntet worden waren, sind in Abb. 4-31 zusammengefasst. Es wird deutlich, dass die Menge an α -DOX mRNA, im Vergleich zu trockenen Samen ($\sim 60\%$ der maximalen Signalstärke), sowohl in der Embryonalachse als auch in den Keimblättern anstieg. Während des ersten Tages war der höchste Anteil an α -DOX mRNA 12 h und 24 h nach Beginn der Keimung in der Embryonalachse und in den Keimblättern detektierbar (85-100% der maximalen Signalstärke). Bei Bezug der Signalstärken auf das Frischgewicht der Pflanzen ergab sich ein vergleichbarer zeitlicher Verlauf (Abb. 4-31 C).

Nach dem ersten Tag der Keimung wurden ausschließlich Wurzeln und Spross der Pflanzen untersucht. Die Differenzierung in Wurzeln und Spross zeigte, dass das mit DOX830 detektierte Transkript hauptsächlich in Wurzelgewebe vorhanden war. Im Spross von Erbsenpflanzen war nur ein deutlich niedrigerer Anteil an α -DOX mRNA nachweisbar (Abb. 4-32 A). Die maximale Signalstärke wurde am dritten Tag nach Beginn der Keimung in Wurzeln beobachtet. Danach nahm die Menge an detektiertem α -DOX Transkript in Wurzelgewebe bis zum 16. Tag kontinuierlich ab, während der nachfolgenden 12 Tage blieb ein niedriges Niveau erhalten (5-18% der maximalen Signalstärke). In RNA-Proben aus dem Spross von 3 bis 28 Tage alten Pflanzen war nur wenig α -Dioxygenase Transkript detektierbar, die Menge variierte kaum im Verlauf des Untersuchungszeitraums (4-17% der maximalen Signalstärke) (Abb. 4-32 B). Bei Bezug der Signalstärken auf das Frischgewicht der Proben ergab sich ein ähnliches Bild (Abb. 4-32 C).

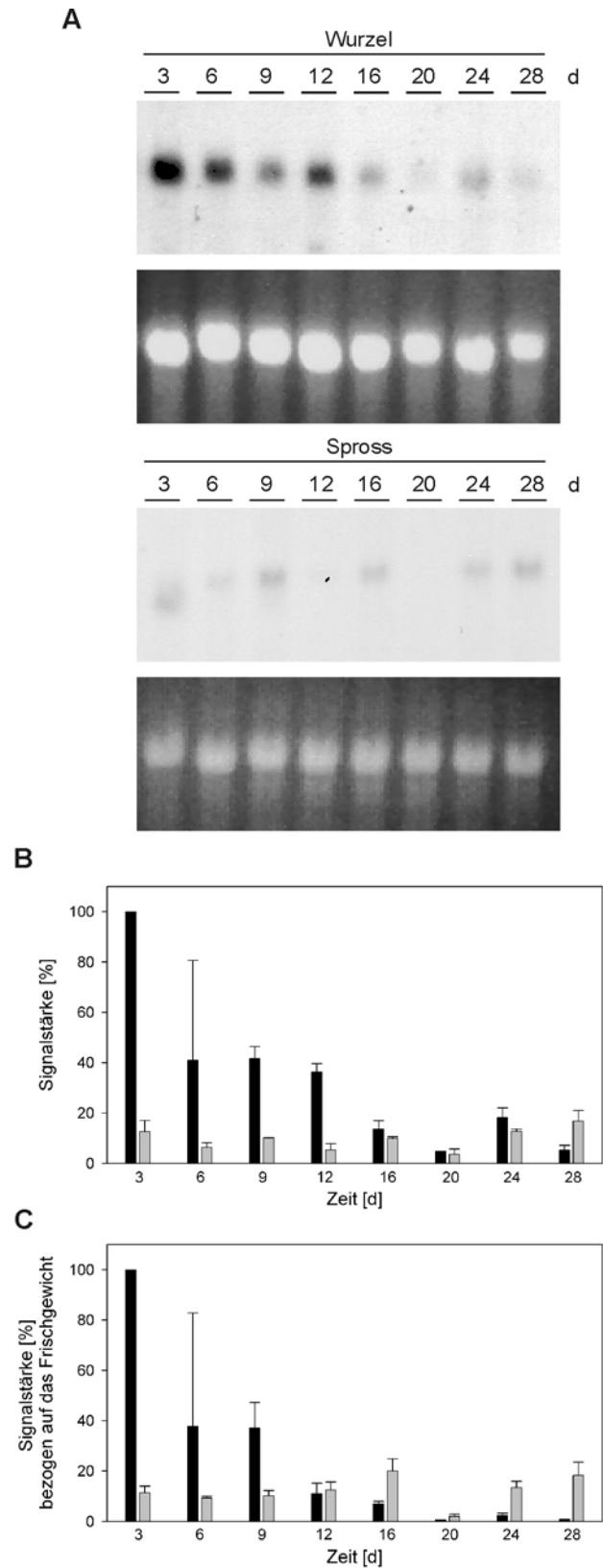


Abb. 4-32: Analyse der α -Dioxygenase mRNA-Expression in Erbsenpflanzen. Weitere Erläuterungen siehe folgende Seite.

Zu Abb. 4-32: Es wurden Proben aus Wurzelgewebe (schwarze Balken) und Sprossgewebe (hellgraue Balken) analysiert.
(A) Die Northern Blot-Analyse der *P. sativum* Gesamt-RNA erfolgte wie in Abb. 4-31 (A) dargestellt.
(B) Die Signalstärke auf Northern Blots wurde mit ImageQuant Version 3.3 analysiert. Das stärkste Signal wurde gleich 100% gesetzt, alle weiteren Signale wurden auf das stärkste Signal bezogen. Alle Werte wurden mit Hilfe der im Ethidiumbromid-gefärbten Gel vorhandenen Menge an 25S rRNA standardisiert.
(C) Die Signalstärke der Northern Blots wurde wie unter (B) analysiert und ist angegeben bezogen auf das Frischgewicht der Proben in Gramm.
Jeder Datenpunkt entspricht dem aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten gebildeten Mittelwert, die Standardabweichung ist jeweils angegeben.

4.5.2 Akkumulation von α -DOX Protein

Weiterhin wurde untersucht, ob der zeitliche Verlauf der Akkumulation von α -DOX Transkript in den untersuchten Pflanzenteilen während Keimung und Wachstum mit der Akkumulation von α -DOX Protein in den entsprechenden Proben korreliert. Hierzu erfolgte eine Untersuchung der Pflanzen mit Hilfe des Antiserums gegen die 70 kD-Untereinheit des aufgereinigten Enzyms aus keimenden Erbsen. Es wurden Western Blots mit Proteinproben aus dem jeweiligen Pflanzenmaterial durchgeführt (3.1.5.3). Hierfür wurden 50 μ g eines entsprechenden Proteinextrakts (3.3.11.2) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die Detektion erfolgte mit dem mit *E. coli*-Antigen aufgereinigten Antiserum (3.3.9.7) als Primärantikörper und einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper. Als Chemilumineszenz-Substrat fand Luminol Verwendung, die Detektion der Signale erfolgte durch Fluorographie.

Es wurde die Akkumulation eines immunreaktiven Proteins der entsprechenden Größe (etwa 70 kD) in Keimlingen nachgewiesen. α -Dioxygenase Protein war in allen untersuchten Proben nachweisbar. Ähnlich wie bei α -DOX mRNA wurden große Mengen an α -DOX Protein in jungen Pflanzen detektiert, während der weiteren Entwicklung der Pflanzen nahm diese Menge ab.

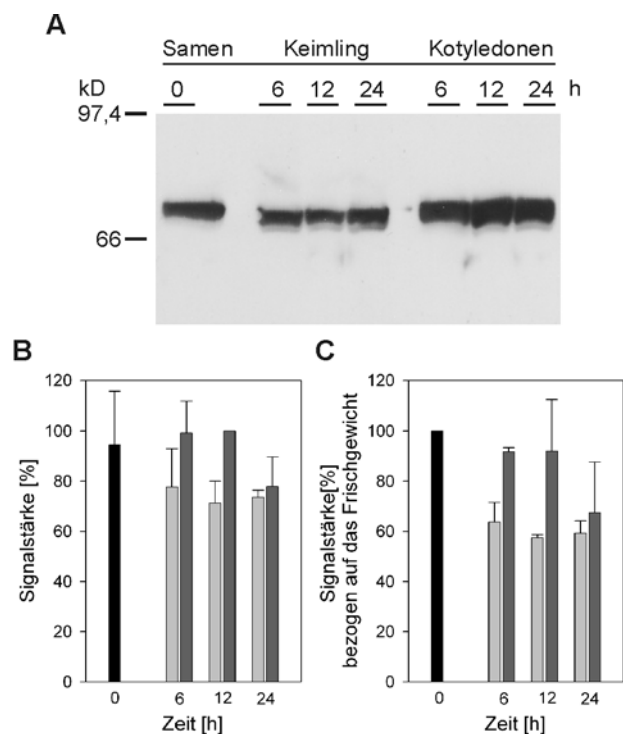


Abb. 4-33: Analyse der Akkumulation von α -Dioxygenase Protein in unterschiedlichen Pflanzenteilen während des ersten Tages nach Beginn der Keimung. Es wurden Proben aus trockenen Samen (schwarze Balken), Keimlingen (hellgraue Balken) und Kotyledonen (dunkelgraue Balken) analysiert.

(A) Immunoblot mit Proteinextrakten (50 μ g Gesamtprotein), die zu den entsprechenden Zeitpunkten gewonnen wurden. Es wurde das Antiserum gegen die 70 kD-Untereinheit der aus Erbsen aufgereinigten α -Dioxygenase als Primärantikörper verwendet. Der Molekulargewichtsstandard ist auf der linken Seite angegeben.

(B) Die Signalstärke auf Immunoblots wurde mit Hilfe von Quantity One Version 4.5.0 analysiert. Das stärkste Signal wurde gleich 100% gesetzt, alle weiteren Signale wurden auf das stärkste Signal bezogen.

(C) Die Signalstärke auf den Immunoblots wurde wie unter (B) analysiert und ist angegeben bezogen auf das Frischgewicht der Proben in Gramm.

Jeder Datenpunkt entspricht dem aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten gebildeten Mittelwert, die Standardabweichung ist jeweils angegeben.

Die quantitative Auswertung der Signalstärken erfolgte mit Hilfe der Software Quantity One Version 4.5.0. Das stärkste Signal der Western Blots wurde in jedem Experiment gleich 100% gesetzt, alle weiteren Signale wurden dann auf das stärkste Signal bezogen. In jedem Experiment erfolgte die Angabe der Signalstärke mit Bezug auf sowohl die Menge an Gesamtprotein in μ g als auch das Frischgewicht des Materials in g. Die größte Menge an α -Dioxygenase Protein wurde in trockenen Samen sowie in den Keimblättern 12 h nach Beginn der Keimung (95-100% der maximalen Signalstärke) beobachtet. Im Vergleich dazu schwächere Signale waren in Proteinproben aus der Embryonalachse am ersten Tag der Keimung detektierbar (~ 75% der maximalen Signalstärke) (Abb. 4-33 A, B). Bei Bezug der Signalstärken auf das Frischgewicht

ergab sich ein vergleichbarer zeitlicher Verlauf, die Unterschiede zwischen Embryonalachse und Kotyledonen wurden hier deutlicher (Abb. 4-33 C).

Nach Ablauf des ersten Tages der Keimung wurden, wie bei der Untersuchung des Transkripts mittels Northern Blot, ausschließlich Wurzeln und Spross betrachtet. Die größte Menge an α -Dioxygenase Protein war hier am 3. Tag nach Beginn der Keimung detektierbar. Im Unterschied zu den Ergebnissen aus den Northern Blot-Untersuchungen, wo Unterschiede zwischen Wurzeln und Spross vorlagen, war hier für die Akkumulation von α -Dioxygenase Protein ein ähnlicher zeitlicher Verlauf in beiden Pflanzenteilen zu beobachten.

Die Menge an α -Dioxygenase Protein, die in Sprossmaterial detektiert wurde, war im Vergleich zum Wurzelgewebe leicht erhöht. Sie nahm nach dem 3. Tag nach Beginn der Keimung kontinuierlich ab, bis etwa am 12. Tag nach Beginn der Keimung ein Niveau erreicht wurde, das über den verbleibenden Untersuchungszeitraum erhalten blieb (19-27% der maximalen Signalstärke). Die Abnahme an α -Dioxygenase Protein in Wurzelgewebe vollzog sich auf ähnliche Weise wie in Sprossmaterial, bis zu etwa 7-20% der maximalen Signalstärke (Abb. 4-34 A, B). Bei Bezug der Signalstärken auf das Frischgewicht ergab sich ein vergleichbarer zeitlicher Verlauf (Abb. 4-34 C).

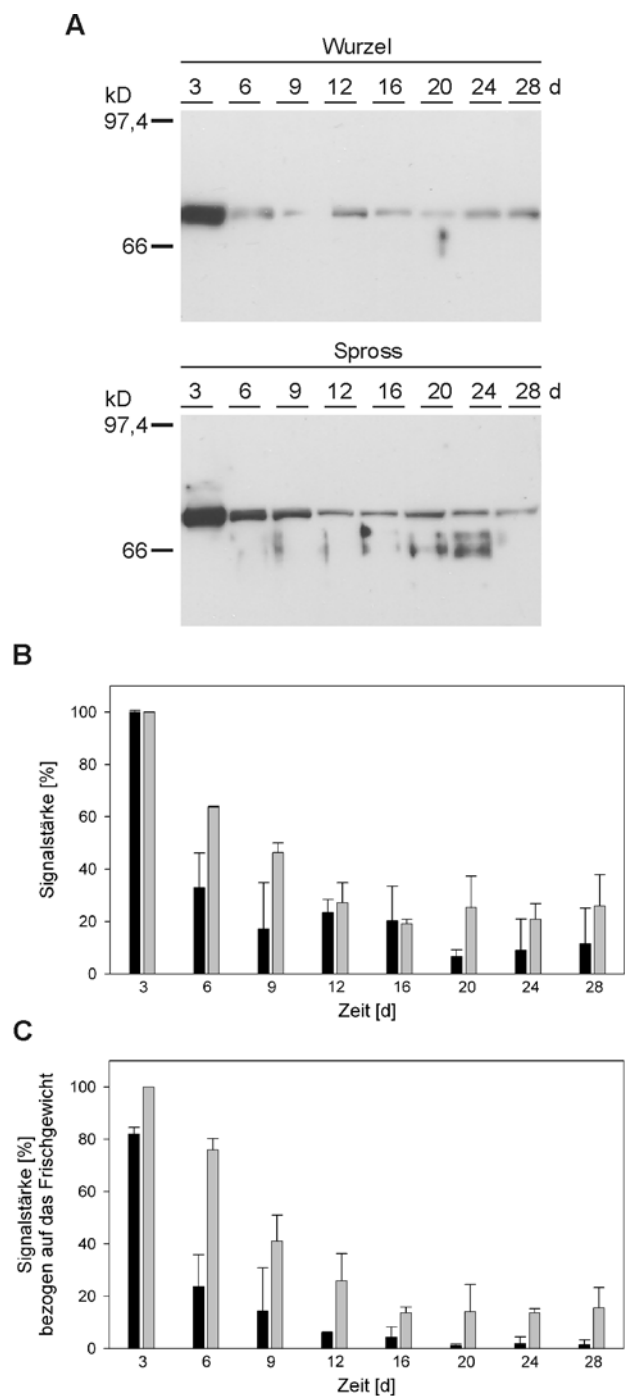


Abb. 4-34: Analyse der Akkumulation von α -Dioxygenase Protein in Erbsenpflanzen. Es wurden Proben aus Wurzelgewebe (schwarze Balken) und Sprossgewebe (hellgraue Balken) analysiert.

(A) Immunoblot mit Proteinextrakten (50 μ g Gesamtprotein), die zu den entsprechenden Zeitpunkten isoliert wurden. Die Durchführung erfolgte wie unter Abb. 4-33 (A) beschrieben.

(B) Die Signalstärke auf den Immunoblots wurde bestimmt wie unter Abb. 4-33 (B) beschrieben.

(C) Die Signalstärke auf den Immunoblots wurde wie unter (B) analysiert und ist angegeben bezogen auf das Frischgewicht der Proben in Gramm.

Jeder Datenpunkt entspricht dem aus drei unabhängigen Experimenten gebildeten Mittelwert, die Standardabweichung ist jeweils angegeben.

4.5.3 Analyse der α -Dioxygenase-Aktivität

Dass die α -Oxidation von Fettsäuren in keimenden Pflanzen zu beobachten ist, so z.B. in Erdnüssen (*Arachis hypogaea*), ist seit langem bekannt (Newcomb and Stumpf, 1952).

Um nun den zeitlichen Verlauf der α -Dioxygenase-Aktivität sowie die Verteilung auf einzelne Pflanzenteile während Keimung und Wachstum von Erbsenpflanzen zu untersuchen, wurde die α -Dioxygenase-Aktivität über die Umsatzrate von Palmitinsäure zu Pentadecanal durch Proteinextrakte (3.3.11.2) aus den entsprechenden Geweben von keimenden und jungen Pflanzen bestimmt. Enzymatisch aus Palmitinsäure gebildetes Pentadecanal wurde (nach Derivatisierung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin) mittels RP-HPLC mit UV-Detektion quantifiziert (3.3.12.4).

Die Angabe der α -Dioxygenase-Aktivität erfolgte als die Menge an Pentadecanal in nmol, die je min je mg Gesamtprotein bzw. je g Frischgewicht gebildet wurde. Es wurden wiederum trockene Samen, die Embryonalachse und die Keimblätter am ersten Tag der Keimung untersucht sowie Wurzeln und Spross vom 3. bis 28. Tag nach Beginn der Keimung.

Die höchste α -Dioxygenase-Aktivität je g Frischgewicht lag in den Keimblättern 24 h nach Beginn der Keimung vor: während des ersten Tages nach Beginn der Keimung nahm die α -Dioxygenase-Aktivität hier stetig zu, das Maximum wurde nach 24 h erreicht (~ 95 nmol Pentadecanal $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ Frischgewicht). Die Aktivität in der Embryonalachse hingegen betrug weniger als die Hälfte der Aktivität in den Keimblättern und blieb während des ersten Tages nach Beginn der Keimung konstant (~ 37 nmol Pentadecanal $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ Frischgewicht). Sowohl in der Embryonalachse als auch in den Kotyledonen lag die α -Dioxygenase-Aktivität höher als in trockenen Samen (~ 18 nmol Pentadecanal $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ Frischgewicht) (Abb. 4-35 B).

Die spezifische Aktivität betrug $\sim 0,5$ nmol Pentadecanal $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Protein in trockenen Samen und am ersten Tag nach Beginn der Keimung 4 nmol Pentadecanal $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Protein in den Kotyledonen (Abb. 4-35 A). Diese Ergebnisse stimmen mit den bei den Northern und Western Blot-Analysen erzielten Resultaten überein.

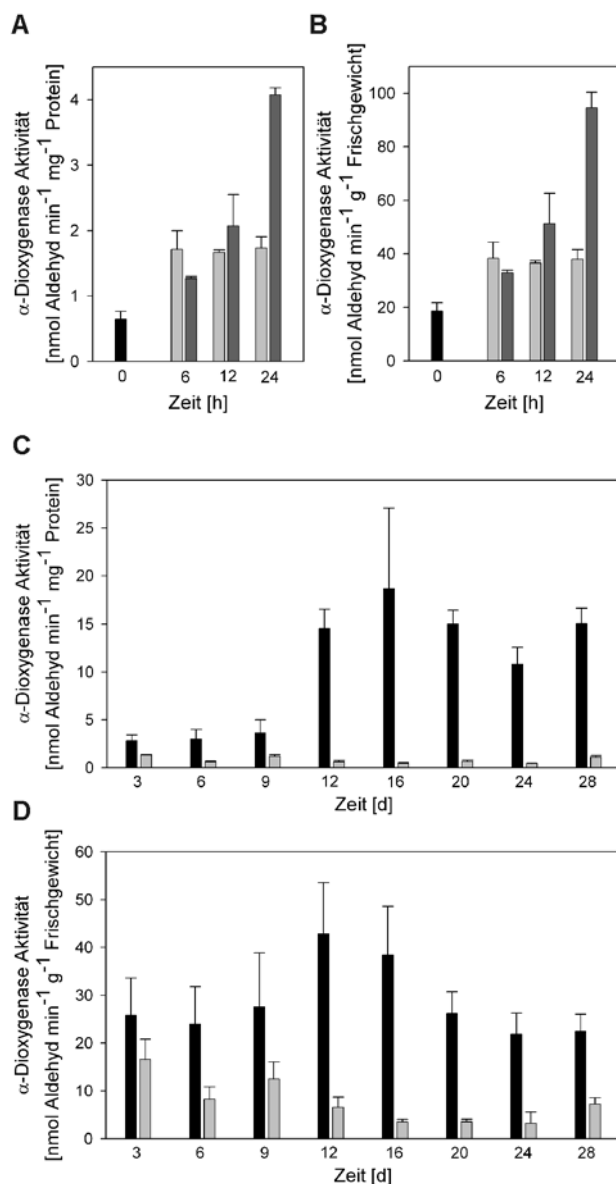


Abb. 4-35: Analyse der α -Dioxygenase-Aktivität in unterschiedlichen Pflanzenteilen von keimenden Erbsen und Erbsenpflanzen.

(A) Die α -Dioxygenase-Aktivität wurde während des ersten Tages nach Beginn der Keimung analysiert. Die Proben stammen aus trockenen Samen (schwarze Balken), Keimlingen (hellgraue Balken) und Kotyledonen (dunkelgraue Balken). Die Aktivität ist angegeben als gebildetes *n*-Pentadecanal in nmol pro Minute und pro Milligramm Gesamtprotein.

(B) Die α -Dioxygenase-Aktivität wurde wie unter (A) analysiert, jedoch angegeben als gebildetes *n*-Pentadecanal in nmol pro Minute und pro Gramm Frischgewicht der Proben.

(C) Die α -Dioxygenase-Aktivität wurde in Wurzelgewebe (schwarze Balken) und Sprossgewebe (hellgraue Balken) zu den angegebenen Zeitpunkten analysiert. Die Aktivität ist angegeben als gebildetes *n*-Pentadecanal in nmol pro Minute und pro Milligramm Gesamtprotein.

(D) Die α -Dioxygenase-Aktivität wurde wie unter (C) analysiert, jedoch angegeben als gebildetes *n*-Pentadecanal in nmol pro Minute und pro Gramm Frischgewicht der Proben. Jeder Datenpunkt entspricht dem aus vier unabhängigen Experimenten gebildeten Mittelwert, die Standardabweichung ist jeweils angegeben.

In jungen Pflanzen lag die α -Dioxygenase-Aktivität, bezogen auf das Frischgewicht, in Wurzeln generell höher als im Spross. Die Aktivität in Wurzeln variierte kaum im Verlauf des Untersuchungszeitraums, die höchste Aktivität, bezogen auf das Frischgewicht, war am 12. und 16. Tag nach Beginn der Keimung zu beobachten (~ 40 nmol Pentadecanal $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ Frischgewicht). In Sprossgewebe nahm die Aktivität während der ersten Tage geringfügig zu (~ 16 nmol Pentadecanal $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ Frischgewicht), um anschließend wieder auf das niedrige Niveau zu sinken, das für gesunde erwachsene Pflanzen typisch ist (3-7 nmol Pentadecanal $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ Frischgewicht) (Abb. 4-35 D).

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der spezifischen α -Dioxygenase-Aktivität, wird deutlich, dass in Sprossgewebe kaum eine Veränderung erfolgte (0,5-1 nmol Pentadecanal $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Protein), während in Wurzeln die spezifische Aktivität bis zum 9. Tag nach Beginn der Keimung kontinuierlich leicht anstieg, anschließend folgte hier ein deutlicher Anstieg der spezifischen Aktivität mit einem Maximum am 16. Tag bei ~ 18 nmol Pentadecanal $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Protein (Abb. 4-35 C). Dieser Anstieg der spezifischen α -Dioxygenase-Aktivität in Wurzeln korreliert weder mit den Ergebnissen der mRNA-Akkumulation noch mit den Ergebnissen der Immunoblot-Analysen.

4.5.4 Ergebnisse der Keimungsstudie

Mit den oben dargestellten Versuchen wurde gezeigt, dass die Keimung zu einer deutlichen Akkumulation von α -Dioxygenase mRNA in Erbsen führt und α -Dioxygenase Protein in hohem Maße in keimenden und jungen Erbsenpflanzen vorhanden ist.

Der Anstieg an α -Dioxygenase mRNA in embryonalem Gewebe weist auf *de novo* Transkription hin: α -Dioxygenase mRNA war in trockenen Samen nur in geringer Menge detektierbar, nahm jedoch nach Beginn der Keimung deutlich zu. Die Differenzierung der keimenden Samen in Embryonalachse und Keimblätter zeigte, dass α -Dioxygenase Transkript in beiden Pflanzenteilen vorhanden ist.

In Erbsenpflanzen war α -Dioxygenase Transkript fast ausschließlich in Wurzeln zu beobachten, in Sprossgewebe dagegen wurde nur ein schwaches Signal detektiert. Die Menge an α -Dioxygenase Transkript in Wurzelgewebe der Erbsenpflanzen nahm parallel zur Reifung ab. Diese Ergebnisse stimmen mit denjenigen überein, welche mit gesunden erwachsenen *Arabidopsis*-Pflanzen erzielt worden waren: α -Dioxygenase Transkript war in Wurzelgewebe der Pflanzen vorhanden, jedoch nicht in den Blättern und Stängeln (Ponce de León *et al.*, 2002).

Ein immunreaktives Protein wurde mit dem Antiserum gegen die 70 kD Untereinheit des aus Erbsen aufgereinigten Enzyms vornehmlich in Gewebe junger Pflanzen detektiert. Dieses Protein

war vor allem in trockenen Samen und Keimblättern vorhanden, aber auch in der Embryonalachse während des ersten Tages nach Beginn der Keimung sowie in Wurzel- und Sprossgewebe am 3. Tag nach Beginn der Keimung. Während der weiteren Entwicklung der Pflanzen nahm die Menge an α -DOX Protein ab, wie dies auch bei α -Dioxygenase Transkript zu beobachten war. Im Unterschied zur Transkript-Akkumulation, bei der ein deutlicher Unterschied zwischen Wurzeln und Spross detektiert wurde, war der zeitliche Verlauf der Protein-Akkumulation in Wurzeln und Spross ähnlich. Möglicherweise existieren mehrere α -Dioxygenase-Isoenzyme, die mit dem Antiserum detektiert werden. Denkbar ist auch eine unterschiedliche Regulation der Expression in Wurzelgewebe und Spross.

Die α -Dioxygenierung von Palmitinsäure war *in vitro* bereits mit Rohextrakten aus trockenen Samen detektierbar, während der Keimung nahm sie deutlich zu. Die höchste Aktivität, bezogen auf das Frischgewicht der Pflanzen, wurde in Kotyledonen detektiert. Bei Vergleich der Aktivität in Wurzeln und Spross (bezogen auf das Frischgewicht) wird deutlich, dass die Aktivität in Wurzelgewebe diejenige in Sprossgewebe um das 2- bis 8-fache übersteigt. Die α -Dioxygenase-Aktivität in Sprossgewebe war mit der Aktivität vergleichbar, die für gesunde erwachsene Tabakpflanzen beschrieben worden war ($\sim 2,5 \text{ nmol Pentadecanal min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ Frischgewicht) (Hamberg *et al.*, 2002^b). Die Ergebnisse bezüglich der α -Dioxygenase-Aktivität in keimenden Erbsenpflanzen kontrastieren mit den Ergebnissen von Koeduka *et al.* (2002) für die α -Dioxygenierung von Fettsäuren während der Keimung von Reissamen. In Reiskeimlingen war die α -Dioxygenierung von Fettsäuren bis zum 7. Tag nach Beginn der Keimung nicht detektierbar gewesen, und bei älteren Pflanzen hatte man nur geringe Aktivität in den Wurzeln detektiert, während die Aktivität in Sprossgewebe bis zum 10-fachen der Aktivität in Wurzelgewebe stetig zugenommen hatte (maximale Aktivität $\sim 45 \text{ nmol Pentadecanal min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ Frischgewicht) (Koeduka *et al.*, 2002). Diese Abweichungen könnten auf Unterschieden zwischen Mono- und Dikotyledonen beruhen, auch unterschiedliche Wachstumsbedingungen könnten sich in den Ergebnissen widerspiegeln.

Bei Bezug der α -Dioxygenase-Aktivität in Erbsen auf die Menge an Gesamtprotein war in Wurzelgewebe ein deutlicher Anstieg der spezifischen Aktivität während der Reifung der Pflanzen zu beobachten. Dieser Anstieg korreliert weder mit dem zeitlichen Verlauf der Transkript-Akkumulation noch mit der Akkumulation an immunreaktivem Protein. Für *A. thaliana* und *N. tabacum* hatte man die Existenz eines weiteren α -Dioxygenase-Isoenzyms angenommen (bezeichnet als α -DOX2 in *A. thaliana*) (Hamberg *et al.*, 2002^a; Hamberg *et al.*, 2003). Die für Erbsen diskutierten Ergebnisse lassen vermuten, dass in *P. sativum* ebenfalls weitere α -DOX Isoenzyme existieren. Möglicherweise findet nach den ersten Tagen der Keimung eine

Verschiebung statt von der Expression der α -DOX1 hin zur Expression eines anderen Isoenzym oder anderer Isoenzyme. Denkbar ist ebenfalls eine Modulation der Enzymaktivität durch Glykosylierung oder Phosphorylierung. Saffert (2001) hat gezeigt, dass das Enzym aus Erbsen *in vivo* glykosyliert ist, über weitere Proteinmodifikationen oder ihre regulatorische Funktion ist in diesem Fall jedoch nichts bekannt.

Die Expression von α -Dioxygenasen erfolgt als Antwort auf Situationen, die mit einem gewissen Grad an zellulären Schäden verbunden sind, wie z.B. Herbivorenbefall, Pathogeninfektion (Greenberg, 1997; Richberg *et al.*, 1998) und Seneszenz. Die Auflösung zellulärer Strukturen und Zelltod korrelieren mit oxidativem Stress, welcher Teil einer generellen Stressreaktion von Pflanzen ist, die bei biotischem und abiotischem Stress erfolgt und ebenso während unterschiedlicher pflanzlicher Entwicklungsprozesse, wie Seneszenz. Wurzeln bestehen zu einem großen Teil aus lignifizierten Zellen, wobei die Pflanzenzellen während der Lignifizierung absterben. Analogien zwischen dem Prozess der Lignifizierung des Xylems von *Zinnia elegans* und dem oxidativen Stress, der während der HR (*hypersensitive response*) von Pflanzenzellen auftritt, hatte man bereits aufgezeigt (Barcelo, 1999). In den Kotyledonen von Erbsen, in denen sowohl α -Dioxygenase Protein als auch mRNA in hohem Maße vorhanden sind und die α -Dioxygenase-Aktivität hoch ist, erlaubt die Auflösung zellulärer Strukturen die Mobilisierung von Nährstoffen, die von dem expandierenden Gewebe benötigt werden. Entsprechend sterben die Kotyledonen der hypogäischen *Vicia sativa* und *P. sativum* ab, sobald die gespeicherten Nährstoffe mobilisiert worden sind (Schmid *et al.*, 1999).

Wie in Abschnitt 2.6 beschrieben, hatte man als Hauptprodukte der α -Oxidation von Fettsäuren *in vivo* 2-Hydroxyfettsäuren mit unterschiedlichem Sättigungsgrad und unterschiedlicher Kettenlänge charakterisiert. Es wurde gezeigt, dass diese Produkte während der Interaktion von Pflanzen mit Pathogenen einen zellprotektiven Effekt ausüben (Hamberg *et al.*, 2003). Wurzeln sind kontinuierlich Bodenbakterien ausgesetzt und daher im Hinblick auf eine Infektion mit Pathogenen besonders gefährdet. Die α -Oxidation von Fettsäuren könnte als permanentes Schutzsystem gegen Infektion in Wurzeln wirken. Es ist bekannt, dass gesunde transgene Pflanzen, welche an der Abwehr beteiligte Gene exprimieren, bevor die Infektion mit Pathogenen stattfindet, resistenter sind gegen bestimmte Pathogene (Bowling *et al.*, 1994; Cao *et al.*, 1998; Clarke *et al.*, 1998). Die Expression während der Keimung könnte dazu beitragen, das defensive Potential der Pflanzen während der frühen Wachstumsprozesse zu verbessern, vor allem während der ersten Tage der Keimung, wenn das junge Gewebe Schutzmechanismen noch nicht vollständig ausgebildet hat.

Weitere pflanzliche Enzyme, die in der Lage sind, die Bildung von Fettsäurehydroperoxiden zu katalysieren, sind Lipoxygenasen. Lipoxygenasen und α -Dioxygenasen katalysieren nicht nur ähnliche Reaktionen, sie haben auch große Ähnlichkeit hinsichtlich der Expressionsmuster. So existieren Parallelen im Hinblick auf die Expression während der Interaktion zwischen Pflanzen und Pathogenen, während biotischer und abiotischer Stresssituationen und auch während Entwicklungsprozessen, wie Seneszenz, Blüte oder Keimung. Erst kürzlich wurden doppelt dioxygenierte Oxylipine in den Blättern infizierter Tabakpflanzen beschrieben, die aus der Umsetzung von Linolensäure durch Lipoxygenase und α -Dioxygenase resultierten (Hamberg *et al.*, 2003).

Wie für die Familie der α -Dioxygenasen postuliert, existieren in den meisten Pflanzen verschiedene Lipoxygenase-Isoenzyme. Junges, expandierendes Gewebe enthält üblicherweise große Mengen an LOX-Enzymen, aber auch während der Seneszenz von Pflanzen ist eine Zunahme bekannt (Siedow, 1991).

In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass α -Dioxygenase in keimenden Erbsen vorhanden ist. In ähnlicher Weise sind auch LOXs normalerweise in den Samen von Pflanzen vorhanden (Siedow, 1991). Der Anteil dieser Lipoxygenasen geht zurück, wenn neue Isoenzyme im wachsenden Gewebe gebildet werden. Zur Bedeutung von Lipoxygenasen während der Keimung existieren mehrere Hypothesen, wie Mobilisierung von Nährstoffen, Beteiligung an der Membrandegradation oder an Abwehrreaktionen gegen Pathogene (Rosahl, 1996). Ihre genaue Funktion ist jedoch noch nicht bekannt.

Einblick in die Bedeutung der α -DOX Expression für das Keimverhalten und die Entwicklung von Pflanzen könnten Versuche mit transgenen Pflanzen mit veränderter α -DOX Expression geben.

Anhang

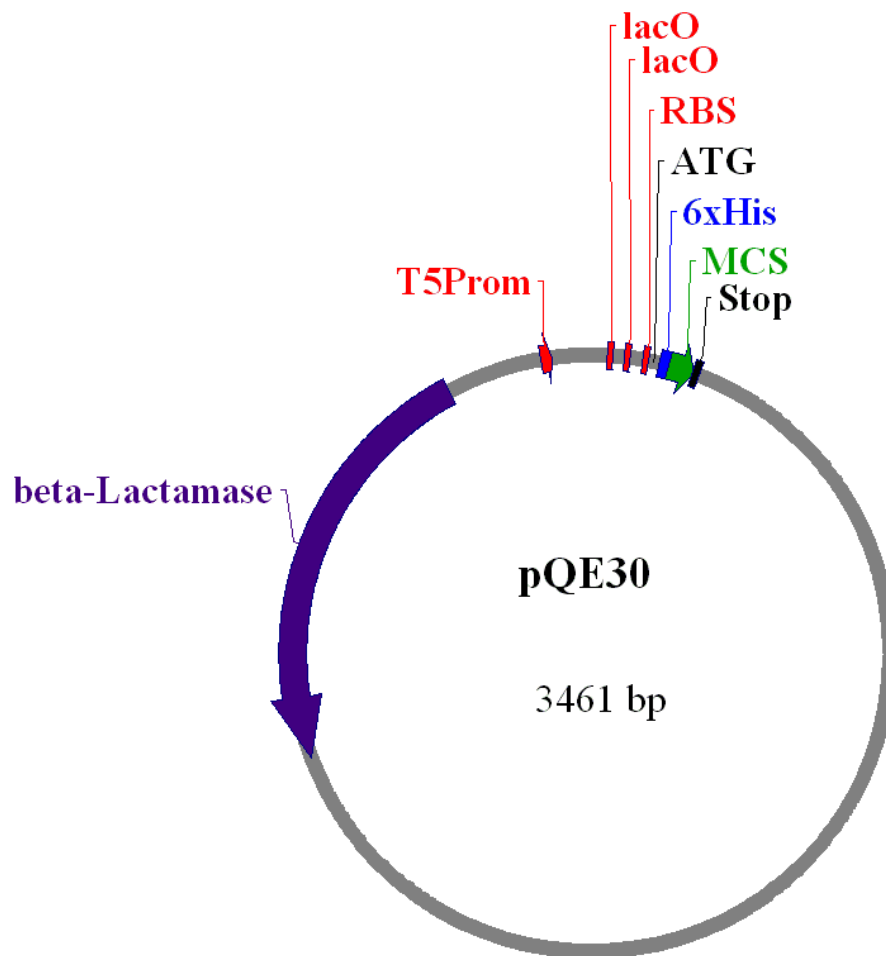


Abb. A-1: Expressionsvektor pQE30. (T5Prom: T5-Promotor; lacO: *lac*-Operatorsequenzen; RBS: ribosomale Bindungsstelle; 6xHis: für den 6 × His-*tag* codierende Sequenz; MCS: multiple Klonierungsstelle; Stop: Stop-Codon).

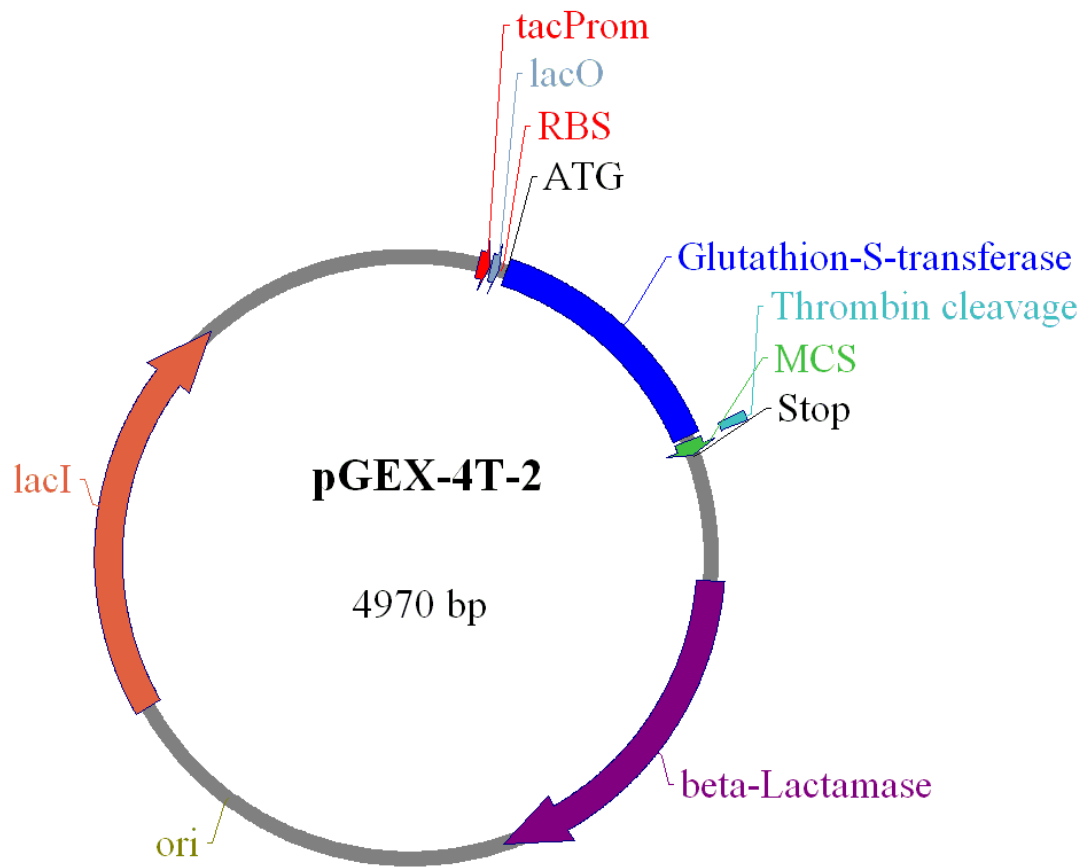


Abb. A-2: Expressionsvektor pGEX-4T-2 (tacProm: tac-Promotor; lacO: *lac*-Operatorsequenz; RBS: ribosomale Bindungsstelle; MCS: multiple Klonierungsstelle; Stop: Stop-Codons; ori: Replikationsursprung).

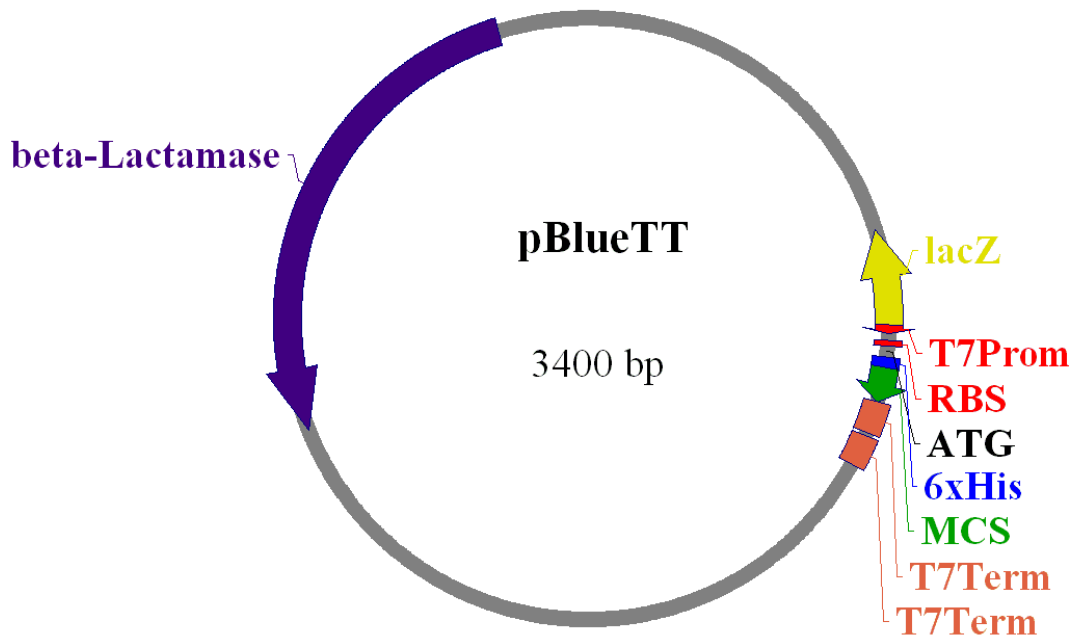


Abb. A-3: Expressionsvektor pBlueTT (T7Prom: T7-Promotor; RBS: ribosomale Bindungsstelle; 6xHis: für den 6 × His-tag codierende Sequenz; MCS: multiple Klonierungsstelle; T7Term: T7-Terminator).

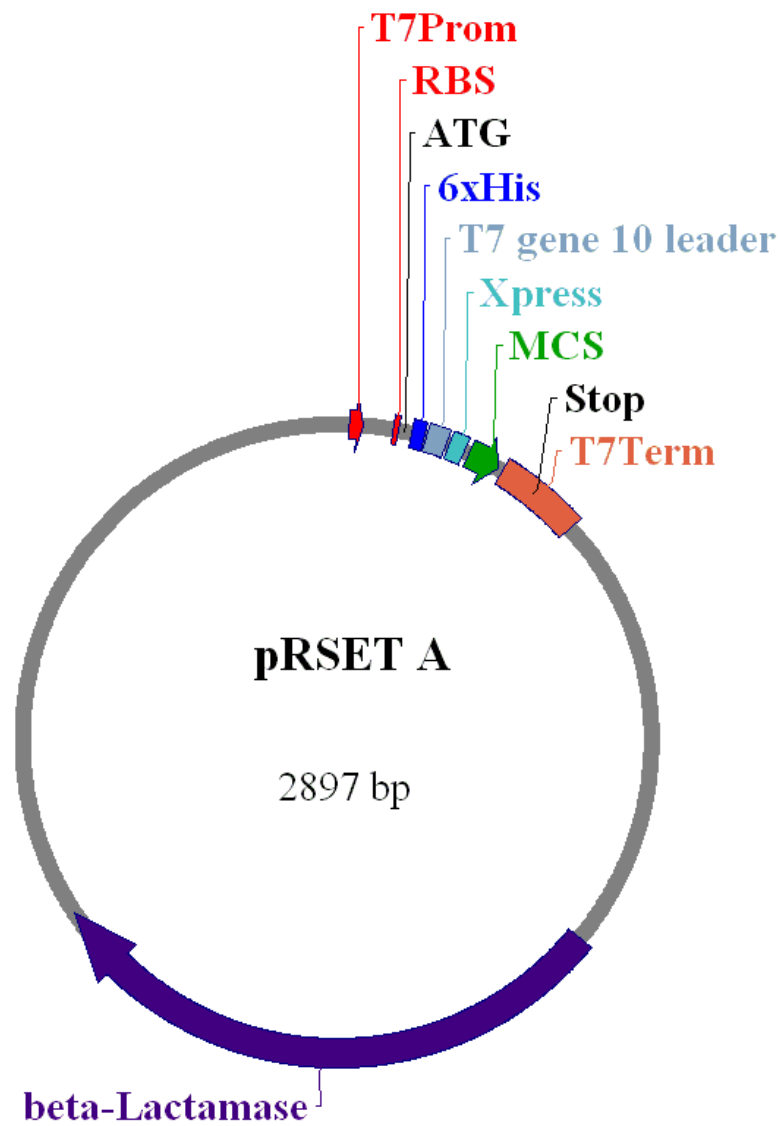


Abb. A-4: Expressionsvektor pRSET A (T7Prom: T7-Promotor; RBS: ribosomale Bindungsstelle; 6xHis: für den 6 × His-tag codierende Sequenz; MCS: multiple Klonierungsstelle; Stop: Stopcodon; T7Term: T7-Terminator).

Literatur

Adam, W., Boland, W., Hartmann-Schreier, J., Humpf, H.-U., Lazarus, M., Saffert, A., Saha-Möller, C.R. und Schreier, P. (1998) α -Hydroxylation of carboxylic acids with molecular oxygen catalyzed by the α -oxidase of peas (*Pisum sativum*): a novel biocatalytic system of enantiomerically pure (*R*)-2-hydroxy acids. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 11044-11048.

Akakabe, Y., Matsui, K. und Kajiwara, T. (1999) Enantioselective α -hydroperoxylation of long chain fatty acids with crude enzyme of marine green alga *Ulva pertusa*. *Tetrahedron Lett.*, **40**, 1137-1140.

Alderson, N.L., Rembiesa, B.M., Walla, M.D., Bielawska, A., Bielawski, J. und Hama, H. (2004) The human *FA2H* gene encodes a fatty acid 2-hydroxylase. *J. Biol. Chem.*, **279**, 48562-48568.

Andersen Borge, G.I., Slinde, E. und Nilsson, A. (1997) Long-chain saturated fatty acids can be α -oxidised by a purified enzyme (M_r 240000) in cucumber (*Cucumis sativus*). *Biochim. Biophys. Acta*, **1344**, 47-58.

Andersen Borge, G.I., Slinde, E. und Nilsson, A. (1998) Fatty acid α -oxidation of tetradecylthioacetic acid and tetradecylthiopropionic acid in cucumber (*Cucumis sativus*). *Biochim. Biophys. Acta*, **1394**, 158-168.

Avigan, J., Steinberg, D., Gutman, A., Mize, C.E. und Milne, G.W.A. (1966) α -Decarboxylation is an important pathway for the degradation of phytanic acid in animals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **24**, 838-844.

Baardseth, P., Slinde, E. und Thomassen, M.S. (1987) Studies on fatty acid α -oxidation in cucumber. *Biochim. Biophys. Acta*, **922**, 170-176.

Bairoch, A., Bucher, P. und Hofmann, K. (1997) The PROSITE database, its status in 1997. *Nucl. Acids Res.*, **25**, 217-221.

Barcelo, A.R. (1999) Some properties of the H_2O_2/O_2 -generating system from the lignifying xylem of *Zinnia elegans*. *Free Radic. Res.*, **31**, 147-154.

Bate, N.J. und Rothstein, S.J. (1998) C_6 -volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. *Plant J.*, **16**, 561-569.

- Bhattacharyya, D.K., Lecomte, M., Rieke, C.J., Garavito, R.M. und Smith, W.L.** (1996) Involvement of arginine 120, glutamate 524 and tyrosine 355 in the binding of arachidonate and 2-phenylpropionic acid inhibitors to the cyclooxygenase active site of ovine prostaglandin endoperoxide H synthase-1. *J. Biol. Chem.*, **271**, 2179-2184.
- Blée, E.** (1998) Phytooxylipins and plant defense reactions. *Prog. Lipid Res.*, **37**, 33-72.
- Blée, E.** (2002) Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in Plant Sci.*, **7**, 315-321.
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H.J.** (1987) Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **8**, 93-99.
- Bowen, P., Lee, C.S.N. und Zellweger, H.** (1964) A familial syndrome with multiple congenital defects. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **114**, 402-414.
- Bowling, S.A., Guo, A., Cao, H., Gordon, A.S., Klessig, D.F. und Dong, X.** (1994) A mutation in *Arabidopsis* that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. *Plant Cell*, **6**, 1845-1857.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Campa, A., Salim-Hanna, M. und Cilento, G.** (1989) α -Oxidase activity in plants as promotor of electronic energy. *Photochem. Photobiol.*, **49**, 349-354.
- Cao, H., Li, X. und Dong, X.** (1998) Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systematic acquired resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6531-6536.
- Capdevila, J.H., Morrow, J.D., Belosludtsev, Y.Y., Beauchamp, D.R., DuBois, R.N. und Falck, J.R.** (1995) The catalytic outcomes of the constitutive and the mitogen inducible isoforms of prostaglandin H₂ synthase are maredly affected by glutathione and glutathione peroxidase. *Biochemistry*, **34**, 3325-3337.
- Chen, Z., Malamy, J., Henning, J., Conrath, U., Sánchez-Casas, P., Silva, H., Ricigliano, J. und Klessig, D.F.** (1995) Induction, modification, and transduction of the salicylic acid signal in plant defense responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4134-4137.
- Clarke, J.D., Liu, Y., Klessig, D.F. und Dong, X.** (1998) Uncoupling PR gene expression from NPR1 and bacterial resistance: characterization of the dominant *Arabidopsis* cpr6-1 mutant. *Plant Cell*, **10**, 557-569.
- Cline, J., Braman, J.C. und Hogrefe, H.H.** (1996) PCR fidelity of *Pfu* DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucl. Acids Res.*, **24**, 3546-3551.
- Creelman, R.A. und Mullet, J.E.** (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **48**, 355-381.
- Croes, K., Casteels, M., De Hoffmann, E., Mannaerts, G.P. und Van Veldhoven, P.P.** (1996) α -Oxidation of 3-methyl-substituted fatty acids in rat liver. Production of formic acid instead of CO₂, cofactor requirements, subcellular localizations, and formation of 2-hydroxy-3-methylacyl-CoA intermediate. *Eur. J. Biochem.*, **240**, 674-683.

Croes, K., Casteels, M., Asselsberghs, S., Herdewijn, P., Mannaerts, G.P. und Van Veldhoven, P.P. (1997^a) Formation of 2-methyl-branched fatty aldehyde during peroxisomal α -oxidation. *FEBS Lett.*, **412**, 643-645.

Croes, K., Van Veldhoven, P.P., Mannaerts, G.P. und Casteels, M. (1997^b) Production of formyl-CoA during peroxisomal α -oxidation of 3-methyl-branched fatty acids. *FEBS Lett.*, **407**, 197-200.

Croes, K., Casteels, M., Dieuaide-Noubhani, M., Mannaerts, G.P. und Van Veldhoven, P.P. (1999) Stereochemistry of the α -oxidation of 3-methyl-branched fatty acids in rat liver. *J. Lipid Res.*, **40**, 601-609.

Croft, K.P.C., Jüttner, F. und Slusarenko, A.J. (1993) Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Plant Physiol.*, **101**, 13-24.

DeGray, J.A., Lassmann, G., Curtis, J.F., Kennedy, T.A., Marnett, L.J., Eling, T.E. und Mason, R.P. (1992) Spectral analysis of the protein-derived tyrosyl radicals from prostaglandin H synthase. *J. Biol. Chem.*, **267**, 23583-23588.

Delieu, T. und Walker, A. (1972) An improved cathode for the measurement of photosynthetic oxygen evolution by isolated chloroplasts. *New Phytol.*, **71**, 201-225.

Dietz, R., Nastainczyk, W. und Ruf, H.H. (1988) Higher oxidation states of prostaglandin H synthase. Rapid electronic spectroscopy detected two spectral intermediates during peroxidase reaction with prostaglandin G₂. *Eur. J. Biochem.*, **171**, 321-328.

Durner, J., Shah, J. und Klessing, D.F. (1997) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.*, **2**, 266-274.

Erwin, A.L. und Munford, R.S. (1990) The enzymic formation of long chain aldehydes and alcohols by α -oxidation of fatty acids in extracts of cucumber fruit (*Cucumis sativus*). *Biochim. Biophys. Acta*, **424**, 26-35.

Farabaugh, P.J., Schmeissner, U., Hofer, M. und Miller, J.H. (1978) Genetic studies of the lac repressor. VII. On the molecular nature of spontaneous hotspots in the *lacI* gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **126**, 847-857.

Farmer, E.E. und Ryan, C.A. (1990) Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 7713-7716.

Feussner, I., Kühn, H. und Wasternack, C. (2001) Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends Plant Sci.*, **6**, 268-273.

Foulon, V., Antonenkov, V.D., Croes, K., Waelkens, E., Mannaerts, G.P., Van Veldhoven, P.P. und Casteels, M. (1999) Purification, molecular cloning, and expression of 2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase, a peroxisomal thiamine pyrophosphate-dependent enzyme that catalyzes the carbon-carbon bond cleavage during α -oxidation of 3-methyl-branched fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 10039-10044.

- Foulon, V., Sniekers, M., Huysmans, E., Asselberghs, S., Mahieu, V., Mannaerts, G.P., Van Veldhoven, P.P. und Casteels, M.** (2005) Breakdown of 2-hydroxylated straight chain fatty acids via peroxisomal 2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase: a revised pathway for the α -oxidation of straight chain fatty acids. *J. Biol. Chem.*, in press.
- Frohman, M.A.** (1994) On beyond classic RACE (rapid amplification of cDNA ends). *PCR Methods Appl.*, **4**, 40-58.
- Galliard, T. und Matthew, J.A.** (1976) The enzymic formation of long chain aldehydes and alcohols by α -oxidation of fatty acids in extracts of cucumber fruit (*Cucumis sativus*). *Biochim. Biophys. Acta*, **424**, 26-35.
- Galliard, T.** (1980) Degradation of acyl lipids. In *The biochemistry of plant lipids: structure and function* (Stumpf, P.K., ed.). New York: Academic Press, pp. 107-116.
- Garavito, R.M., Malkowski, M.G. und DeWitt, D.L.** (2002) The structures of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins other Lipid Mediat.*, **68-69**, 129-152.
- Gibbons, H.S., Lin, S., Cotter, R.J. und Raetz, C.R.H.** (2000) Oxygen requirement for the biosynthesis of the *S*-2-hydroxymyristate moiety in *Salmonella typhimurium* Lipid A. *J. Biol. Chem.*, **275**, 32940-32949.
- Gosalbes, M.J., Zacarías, L. und Lafuente, M.T.** (2004) Characterization of the expression of an oxygenase involved in chilling-induced damage in citrus fruit. *Postharvest Biol. Technol.*, **33**, 219-228.
- Grechkin, A.** (1998) Recent development in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Progr. Lipid Res.*, **37**, 317-352.
- Greenberg, J.T.** (1996) Programmed cell death: a way of life for plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 12094-12097.
- Greenberg, J.T.** (1997) Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **48**, 525-545.
- Gruber, A. und Zignales, B.** (1995) Alternative method to remove antibacterial antibodies from antisera used for screening of expression libraries. *BioTechniques*, **19**, 28-30.
- Güssow, D. und Clackson, T.** (1989) Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. *Nucl. Acids Res.*, **17**, 4000.
- Guo, L., Lim, K.B., Gunn, J.S. Bainbridge, B., Darveau, R.P., Hackett, M. und Miller, S.I.** (1997) Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes *phoP-phoQ*. *Science*, **276**, 250-253.
- Hamberg, M. und Gardner, H.W.** (1992) Oxylin pathway to jasmonates: biochemistry and biological significance. *Biochim. Biophys. Acta*, **1165**, 1-18.
- Hamberg, M., Ponce de León, I., Sanz, A. und Castresana, C.** (2002^a) Fatty-acid α -dioxygenases. *Prostaglandins other Lipid Mediat.*, **68-69**, 363-374.

- Hamberg, M., Sanz, A. und Castresana, C.** (2002^b) α -Dioxygenase, a new enzyme in fatty acid metabolism. In *Oxygen and life - oxygenases, oxidases and lipid mediators* (Ishimura, Y., Yamamoto, S., Nozaki, M., Shimizu, T., Narumiya, S., Mitani, F., eds.). Amsterdam: Elsevier Press, pp. 307-317.
- Hamberg, M., Sanz, A. und Castresana, C.** (1999) α -Oxidation of fatty acids in higher plants. *J. Biol. Chem.*, **274**, 24503-24513.
- Hamberg, M., Sanz, A., Rodriguez, M.J., Calvo, A.P. und Castresana, C.** (2003) Activation of the fatty acid α -dioxygenase pathway during bacterial infection of tobacco leaves. *J. Biol. Chem.*, **278**, 51796-51805.
- Hammond-Kosack, K.E. und Jones, J.D.G.** (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, **8**, 1773-1791.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-580.
- Harlow, E. und Lane, D.** (1988) *Antibodies: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Harwood, L.M. und Moody, C.F.** (1989) Oxidation of 1-heptanol to heptanal using pyridinium chlorochromate. In *Experimental organic chemistry*. Great Britain: Blackwell scientific, pp. 520-522.
- Hermsmeier, D., Schittko, U. und Baldwin, I.T.** (2001) Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepitoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. I. Large-scale changes in the accumulation of growth- and defense-related plant mRNAs. *Plant Physiol.*, **125**, 683-700.
- Hildebrand, D.F., Fukushige, H., Afithile, M. und Wang, C.** (1998) Lipoxygenases in plant development and senescence. In *Eicosanoids and related compounds in plants and animals* (Rowley, A.F., Kühn, H., Schewe, T., eds.). London: Portland Press, pp. 151-181.
- Hitchcock, C. und James, A.T.** (1964^a) Degradation of fatty acids by plant tissue. *Biochem. J.*, **93**, 22-23.
- Hitchcock, C. und James, A.T.** (1964^b) Oxidation of unsaturated fatty acids by plant tissue. *J. Lipid Res.*, **5**, 593-599.
- Hitchcock, C. und James, A.T.** (1966) The mechanism of alpha-oxidation in leaves. *Biochim. Biophys. Acta*, **116**, 413-424.
- Hitchcock, C., Morris, L.J. und James, A.T.** (1968^a) The stereochemistry of α -oxidation of fatty acids in plants: isotope competition experiments. *Europ. J. Biochem.*, **3**, 419-421.
- Hitchcock, C., Morris, L.J. und James, A.T.** (1968^b) The stereochemistry of α -oxidation of fatty acids in plants: the configuration of biosynthetic long-chain 2-hydroxyacids. *Europ. J. Biochem.*, **3**, 473-475.
- Hitchcock, C. und Morris, L.J.** (1970) The stereochemistry of α -oxidation of fatty acids in leaves. The formation of carbonyl intermediates. *Europ. J. Biochem.*, **17**, 39-42.

Hitchcock, C. und Rose, A. (1971) The stereochemistry of α -oxidation of fatty acids in plants: the configuration of biosynthetic long-chain 2-hydroxyacids. *Biochem. J.*, **125**, 1155-1156.

Hoshi, M. und Kishimoto, Y. (1973) Synthesis of cerebronic acid from lignoceric acid by rat brain preparation. Some properties and distribution of the α -hydroxylation system. *J. Biol. Chem.*, **248**, 4123-4130.

Howe, G.A. (2001) Cyclopentenone signals for plant defense: Remodeling the jasmonic acid response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 12317-12319.

Howe, G.A. und Schillmiller, A.L. (2002) Oxylin metabolism in response to stress. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **5**, 230-236.

Humphreys, G.O., Hancock, I.C. und Meadow, P.M. (1972) Synthesis of the hydroxyacids in Lipid A of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.*, **71**, 221-230.

Jansen, G.A., Mihalik, S.J. und Watkins, P.A. (1996^a) Phytanoyl-CoA hydroxylase is present in human liver, located in peroxisomes, and deficient in Zellweger syndrome: direct, unequivocal evidence for the new, revised pathway of phytanic acid α -oxidation in humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **229**, 205-210.

Jansen, G.A., Wanders, R.J.A., de Groot, C.J., Moser, H.W., Mihalik, S.J. und Watkins, P.A. (1996^b) Phytanoyl-CoA hydroxylase deficiency: discovery of the long-sought enzyme defect in Refsum disease. *N. Eng. J. Med.*, **337**, 133-134.

Jansen, G.A., Wanders, R.J.A., Watkins, P.A. und Mihalik, S.J. (1997^a) Phytanoyl-Coenzyme A hydroxylase deficiency: the enzyme defect in Refsum's disease. *N. Engl. J. Med.*, **337**, 133-134.

Jansen, G.A., Ofman, R., Ferdinandusse, S., Ijlst, L., Muijsers, A.O., Skjeldahl, O.H., Stokke, O., Jakobs, C., Besley, G.T.N., Wraith, J.E. und Wanders, R.J.A. (1997^b) Refsum disease is caused by mutations in the phytanoyl-CoA hydroxylase gene. *Nat. Genet.*, **17**, 190-193.

Jansen, G.A., Verhoeven, N.M., Denis, S., Romeijn, G.-J., Jakobs, C., ten Brink, H.J. und Wanders, R.J.A. (1999^a) Phytanic acid α -oxidation: identification of 2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase in rat liver and its localisation in peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1440**, 176-182.

Jansen, G.A., Ofman, R., Denis, S., Ferdinandusse, S., Hogenhout, E.M., Jakobs, C. und Wanders, R.J.A. (1999^b) Phytanoyl-CoA hydroxylase from rat liver: protein purification and cDNA cloning with implications for the subcellular localization of phytanic acid α -oxidation. *J. Lipid Res.*, **40**, 2244-2254.

Kajiwara, T., Yoshikawa, H., Saruwatari, T., Hatanaka, A., Kawai, T., Ishihara, M. und Tsuneya, T. (1988) Enzymatic formation of unsaturated long chain fatty aldehydes in *Ulva pertusa*. *Phytochemistry*, **27**, 1643-1645.

Kajiwara, T., Hatanaka, A., Matsui, K., Tomoi, T., Fujimura, T. und Kawai, T. (1992) Distribution of long chain aldehyde-forming activity from fatty acids and changes in its activity with growth in marine algae. *Phytochemistry*, **31**, 2635-2639.

Kang, M.Y., Shimomura, S. und Fukui, T. (1986) Inactivation of alcohol dehydrogenase in rice seedlings is related to a microsomal fatty acid α -oxidation system. *J. Biochem.*, **99**, 549-559.

- Karthein, R., Dietz, R. Nastainczyk, W. und Ruf, H.H.** (1988) Higher oxidation states of prostaglandin H synthase. EPR study of a transient tyrosyl radical in the enzyme during the peroxidase reaction. *Eur. J. Biochem.*, **171**, 313-320.
- Kato, T., Moriokam, A., Yano, M., Hirukawa, T. und Namai, T.** (1994) Abnormal catabolites of unsaturated fatty acids by *in vitro* reaction of crude enzyme from infected higher plants. *Chem. Lett.*, **1**, 761-762.
- Kawasaki, W., Matsui, K., Akakabe, Y., Itai, N. und Kajiwara, T.** (1998) Long-chain aldehyde-forming activity in tobacco leaves. *Phytochemistry*, **49**, 1565-1568.
- Kemp, T.R.** (1975) Characterization of some new C₁₆ and C₁₇ unsaturated fatty aldehydes. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **52**, 300-302.
- Kiefer, J.R., Pawlitz, J.L., Moreland, K.T., Stegemann, R.A., Hood, W.F., Gierse, J.K., Stevens, A.M., Goodwin, D.C., Rowlinson, S.W., Marnett, L.J., Stallings, W.C. und Kurumbail, R.G.** (2000) Structural insights into the stereochemistry of the cyclooxygenase reaction. *Nature*, **405**, 97-101.
- Kim, Y.-C., Yi, S.-Y., Mang, H.G., Seo, Y.S., Kim, W.T. und Choi, D.** (2002) Pathogen-induced expression of cyclo-oxygenase homologue in hot pepper (*Capsicum annuum* cv. Pukang). *J. Exp. Bot.*, **53**, 383-385.
- Klenk, E. und Kahlke, W.** (1963) Über das Vorkommen der 3,7,11,15-Tetramethylhexadecansäure (Phytansäure) in den Cholesterinestern und anderen Lipidfraktionen der Organe bei einem Krankheitsfall unbekannter Genese (Verdacht auf Heredopathia Atactica Polyneuritiformis [Refsum Syndrom]). *Hoppe Zeilers Z. Physiol. Chem.*, **333**, 133-139.
- Koeduka, T., Matsui, K., Akakabe, Y. und Kajiwara, T.** (2000) Molecular characterization of fatty acid α -hydroperoxide-forming enzyme (α -oxygenase) in rice plants. *Biochem. Soc. Trans.*, **28**, 765-768.
- Koeduka, T., Matsui, K., Akakabe, Y. und Kajiwara, T.** (2002) Catalytic properties of rice α -oxygenase. *J. Biol. Chem.*, **277**, 22648-22655.
- Koshkin, V. und Dunford, H.B.** (1999) Coupling of the peroxidase and cyclooxygenase reactions of prostaglandin H synthase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1430**, 341-348.
- Kozak, K.R., Rowlinson, S.W. und Marnett, L.J.** (2000) Oxygenation of the edocannabinoid, 2-arachidonylglycerol, to glyceryl prostaglandins by cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.*, **275**, 33744-33749.
- Kulmacz, R.J.** (1998) Cellular regulation of prostaglandin H synthase catalysis. *FEBS Lett.*, **430**, 154-157.
- Kulmacz, R.J. und Wang, L.-H.** (1995) Comparison of hydroperoxide initiator requirements for the cyclooxygenase activities of prostaglandin H synthase-1 and -2. *J. Biol. Chem.*, **270**, 24019-24023.

Kurumbail, R.G., Stevens, A.M., Gierse, J.K., McDonald, J.J., Stegemann, R.A., Pak, J.Y., Gildehaus, D., Miyashiro, J.M., Penning, T.D., Seibert, K., Isakson, P.C. und Stallings, W.C. (1996) Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by antiinflammatory agents. *Nature*, **384**, 644-648.

Kurumbail, R.G., Kiefer, J.R. und Marnett, L.J. (2001) Cyclooxygenase enzymes: catalysis and inhibition. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **11**, 752-760.

Kyhse-Andersen, J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **10**, 203-209.

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

Lambeir, A.M., Markey, C.M., Dunford, H.B. und Marnett, L.J. (1985) Spectral properties of the higher oxidation states of prostaglandin H synthase. *J. Biol. Chem.*, **260**, 14894-14896.

Landino, L.M., Crews, B.C., Timmons, M.D., Morrow, J.D. und Marnett, L.J. (1996) Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 15069-15074.

Landino, L.M., Crews, B.C., Gierse, J.K., Hauser, S.C. und Marnett, L.J. (1997) Mutational analysis of the role of the distal histidine and glutamine residues of prostaglandin-endoperoxide synthase-2 in peroxidase catalysis, hydroperoxide reduction, and cyclooxygenase activation. *J. Biol. Chem.*, **272**, 21565-21574.

Laneuville, O., Breuer, D.K., DeWitt, D.L., Hla, T., Funk, C.D. und Smith, W.L. (1994) Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **271**, 927-934.

Laties, G.G. und Hoelle, C. (1967) The α -oxidation of long-chain fatty acids as a possible component of the basal respiration of potato slices. *Phytochemistry*, **6**, 49-57.

Laties, G.G., Hoelle, C. und Jacobsen, B.S. (1972) α -Oxidation of endogenous fatty acids in fresh potato slices. *Phytochemistry*, **11**, 3403-3411.

Laties, G.G. (1978) The development and control of respiratory pathways in slices of plant storage organs. In *Biochemistry of wounded plant tissues* (Kahl, G., ed.). Berlin: Walter de Gruyter, pp. 421-466.

Lazarus, M. (1998) α -Oxidase, Glykolatoxidase und Lipase – Biokatalysatoren zur Darstellung optisch aktiver α -Hydroxysäuren. *Dissertation*, Universität Würzburg.

Lee, J.B. und Downie, I.M. (1967) Sugar esters-IV: preparation of chloroesters under essentially-neutral conditions. *Tetrahedron*, **23**, 359-363.

Logemann, J., Schell, J. und Willmitzer, L. (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.*, **163**, 16-20.

Loll, P.J., Picot, D. und Garavito, R.M. (1995) The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H₂ synthase. *Nature Struct. Biol.*, **2**, 637-643.

- Lu, G.L., Tsai, A.-H., van Wart, H.E. und Kulmacz, R.J.** (1999) Comparison of the peroxidase reaction kinetics of prostaglandin H synthase-1 and -2. *J. Biol. Chem.*, **274**, 16162-16167.
- Lundberg, K.S., Shoemaker, D.D., Adams, M.W., Short, J.M., Sorge, J.A. und Mathur, E.J.** (1991) High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene*, **108**, 1-6.
- Luong, C., Miller, A., Barnett, J., Chow, J., Ramesha, C. und Browner, M.F.** (1996) Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 927-933.
- Malkowski, M.G., Ginell, S.L., Smith, W.L. und Garavito, R.M.** (2000) The productive conformation of arachidonic acid bound to prostaglandin synthase. *Science*, **289**, 1933-1937.
- Markovetz, A.J., Stumpf, P.K und Hammarström, S.** (1972) Fat metabolism in higher plants: LIII. Characterization of the product of the peanut α -oxidation system. *Lipids*, **7**, 159-164.
- Martin, R.O. und Stumpf, P.K.** (1959) Fat metabolism in higher plants: XII. α -Oxidation of long chain fatty acids. *J. Biol. Chem.*, **234**, 2548-2554.
- Marvel, C.S.** (1955) DL-valine (isovaleric acid, α -amino). *Org. Synth. Coll.*, **3**, 848-850.
- Matsunaga, I., Kusunose, E., Yano, I. und Ichihara, K.** (1994) Separation and partial characterization of soluble fatty acid α -hydroxylase from *Sphingomonas paucimobilis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **201**, 1554-1560.
- Matsunaga, I., Yamada, M., Kusunose, E., Nishiuchi, Y., Yano, I. und Ichihara, K.** (1996) Direct involvement of hydrogen peroxide in bacterial α -hydroxylation of fatty acid. *FEBS Lett.*, **386**, 252-254.
- Matsunaga, I., Yokotani, N., Gotoh, O., Kusunose, E., Yamada, M., und Ichihara, K.** (1997) Molecular cloning and expression of fatty acid α -hydroxylase from *Sphingomonas paucimobilis*. *J. Biol. Chem.*, **272**, 23592-23596.
- Matsunaga, I., Yamada, M., Kusunose, E., Miki, T. und Ichihara, K.** (1998) Further characterization of hydrogen peroxide-dependent fatty acid α -hydroxylase from *Sphingomonas paucimobilis*. *J. Biochem.*, **124**, 105-110.
- Matsunaga, I., Sumimoto, T., Ueda, A., Kusunose, E. und Ichihara, K.** (2000) Fatty acid-specific, regiospecific, and stereospecific hydroxylation by cytochrome P450 (CYP152B1) from *Sphingomonas paucimobilis*: Substrate structure required for α -hydroxylation. *Lipids*, **35**, 365-371.
- Mihalik, S.J., Rainville, A.M. und Watkins, P.A.** (1995) Phytanic acid α -oxidation in rat liver peroxisomes; production of α -hydroxyphytanoyl-CoA and formate is enhanced by dioxygenase cofactors. *Eur. J. Biochem.*, **232**, 545-551.
- Mihalik, S.J., Morrell, J.C., Kim, D., Sacksteder, K.A., Watkins, P.A. und Gould, S.J.** (1997) Identification of PAHX, a Refsum disease gene. *Nature Genetics*, **17**, 185-189.
- Mori, K., Takigawa, T. und Matsuo, T.** (1979) Synthesis of optically active forms of ipsdienol and ipsenol. The pheromone components of IPS bark beetles. *Tetrahedron*, **35**, 933-940.

- Morris, L.J. und Hitchcock, C.** (1968) The stereochemistry of α -oxidation of fatty acids in plants: the stereochemistry of biosynthesis of long-chain 2-hydroxyacids. *Eur. J. Biochem.*, **4**, 146-148.
- Mueller, M.J.** (1997) Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. *Physiol. Plant*, **100**, 653-663.
- Mukherji, M., Schofield, C.J., Wierzbicki, A.S., Jansen, G.A., Wanders, R.J.A. und Lloyd, M.D.** (2003) The chemical biology of branched-chain lipid metabolism. *Prog. Lipid Res.*, **42**, 359-376.
- Nam, H.G.** (1997) The molecular genetic analysis of leaf senescence. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **8**, 200-207.
- Naß, A.** (1997) Spleißen und Modifizieren von tRNA^{Tyr}-Vorläufermolekülen in Pflanzen. *Dissertation*, Universität Würzburg.
- Newcomb, E.H. und Stumpf, P.K.** (1952) Fatty acid synthesis and oxidation in peanut cotyledons. In *Phosphorus Metabolism* (McElroy, W.D., Glass, B., eds.). Baltimore: The John Hopkins Press, pp. 291-300.
- Obregón, P., Martín, R., Sanz, A. und Castresana, C.** (2001) Activation of defence-related genes during senescence: a correlation between gene expression and cellular damage. *Plant Mol. Biol.*, **46**, 67-77.
- Orito, K., Seki, Y., Suginome, H. und Iwadare, T.** (1989) Synthesis of *S*-methyl 2-hydroxyalkanethioates, 2-hydroxyalkanoic acids and related compounds via the addition reaction of tris(methylthio)methanide ion to alkanals. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **62**, 2013-2017.
- Otto, J.C. und Smith, W.L.** (1994) The orientation of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2 in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, **269**, 19868-19875.
- Paige, L.A., Zheng, G.-Q., DeFrees, S.A., Cassady, J.M. und Geahlen, R.L.** (1990) Metabolic activation of 2-substituted derivatives of myristic acid to form potent inhibitors of myristoyl CoA:protein N-myristoyltransferase. *Biochem.*, **29**, 10566-10573.
- Picard, V., Ersdal-Badju, E., Lu, A. und Bock, C.S.** (1994) A rapid and efficient one-tube PCR-based mutagenesis technique using *Pfu* DNA polymerase. *Nucl. Acids Res.*, **22**, 2587-2591.
- Picot, D., Loll, P.J. und Garavito, R.M.** (1994) The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H₂ synthase-1. *Nature*, **367**, 243-249.
- Ponce de León, I., Sanz, A., Hamberg, M. und Castresana, C.** (2002) Involvement of the *Arabidopsis* α -DOX1 fatty acid dioxygenase in protection against oxidative stress and cell death. *Plant J.*, **29**, 61-72.
- Poulos, A., Sharp, P., Singh, H., Johnson, D.W., Carey, W.F. und Easton, C.** (1993) Formic acid is a product of the α -oxidation of fatty acids by human skin fibroblasts: deficiency of formic acid production in peroxisome-deficient fibroblasts. *Biochem. J.*, **292**, 457-461.

Prolog, V., Wilhelm, M. und Bright, D.B. (1954) Untersuchungen über asymmetrische Synthesen (V.) Über den sterischen Verlauf der Reduktion von α -Ketosäureestern optisch aktiver Alkohole mit Lithiumaluminiumhydrid. *Helv. Chim. Acta*, **37**, 221-224.

Rancé, I., Fournier, J. und Esquerré-Tugayé, M.-T. (1998) The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotiana* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, 95, 6554-6559.

Refsum, S. (1946) Heredopathia atactica polyneuritiformis. *Acta Psychiatr. Neurol. Suppl.*, **38**, 1-303.

Reinbothe, S., Mollenhauer, B. und Reinbothe, C. (1994) JIPs and RIPs: the regulation of plant gene expression by jasmonates in response to environmental cues and pathogens. *Plant Cell*, **6**, 1197-1209.

Reymond, P. und Farmer, E.E. (1998) Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **1**, 404-411.

Reymond, P., Weber, H., Damond, M. und Farmer, E.E. (2000) Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **12**, 707-719.

Richberg, M.H., Aviv, D.H. und Dangl, J.L. (1998) Dead cells do tell tales. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **1**, 480-485.

Rieke, C.J., Mulichak, A.M., Garavito, R.M. und Smith, W.L. (1999) The role of arginine 120 of human prostaglandin endoperoxide H synthase-2 in the interaction with fatty acid substrates and inhibitors. *J. Biol. Chem.*, **274**, 17109-17114.

Rome, L.H. und Lands, W.E.M. (1977) Structural requirements for time-dependent inhibition of prostaglandin biosynthesis by anti-inflammatory drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 4863-4865.

Rosahl, S. (1996) Lipoxygenases in plants – their role in development and stress response. *Z. Naturforsch.*, **51**, 123-138.

Saffert, A. (2001) α -Oxidation von Fettsäuren – α -Dioxygenase aus Erbsen (*Pisum sativum*). *Dissertation*, Universität Würzburg.

Saffert, A., Hartmann-Schreier, J., Schön, A. und Schreier, P. (2000) A dual function α -dioxygenase-peroxidase and NAD⁺ oxidoreductase active enzyme from germinating pea rationalizing α -oxidation of fatty acids in plants. *Plant Physiol.*, **123**, 1545-1551.

Salim-Hanna, M., Campa, A. und Cilento, G. (1987) The α -Oxidase system in young pea leaves (*Pisum sativum*) as generator of electronically excited states. Excitation in the dark under natural conditions. *Photochem. Photobiol.*, **45**, 849-854.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd edn. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sambrook, J. und Russel, D. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd edn. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sanchez-Ballesta, M.T., Lluch, Y., Gosalbes, M.J., Zacarías, L., Granell, A. und Lafuente, M.T.** (2003) A survey of genes differentially expressed during long-term heat-induced chilling tolerance in citrus fruit. *Planta*, **218**, 65-70.
- Sanz, A., Moreno, J.I. und Castresana, C.** (1998) PIOX, a new pathogen-induced oxygenase with homology to animal cyclooxygenase. *Plant Cell*, **10**, 1523-1537.
- Schmid, M., Simpson, D. und Gietl, C.** (1999) Programmed cell death in castor bean endosperm is associated with the accumulation and release of a cysteine endopeptidase from ricinosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **96**, 14159-14164.
- Schmidt, S.P. und Schuster, G.B.** (1980) Anomalous metalloporphyrin and chlorophyll A activated chemiluminescence of dimethyldioxetane. Chemically initiated electron-exchange luminescence mechanism. *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 7100-7103.
- Schuster, G.B.** (1979) Chemiluminescence of organic peroxide. Conversion of ground-state reactants to excited-state products by chemically initiated electron-exchange luminescence mechanism. *Acc. Chem. Res.*, **12**, 366-373.
- Seibold, S.A., Cerda, J.F., Mulichak, A.M., Song, I., Garavito, R.M., Arakawa, T., Smith, W.L. und Babcock, G.T.** (2000) Peroxidase activity in prostaglandin endoperoxide H synthase-1 occurs with a neutral histidine proximal heme ligand. *Biochemistry*, **39**, 6616-6624.
- Seo, H.S., Song, J.T., Cheong, J.-J., Lee, Y.-H., Lee, Y.-W., Hwang, I., Lee, J.S. und Choi, Y.D.** (2001) Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**, 4788-4793.
- Shimokawa, T., Kulmacz, R.J., DeWitt, D.L. und Smith, W.L.** (1990) Tyrosine 385 of prostaglandin endoperoxide synthase is required for cyclooxygenase catalysis. *J. Biol. Chem.*, **265**, 20073-20076.
- Shine, W.E. und Stumpf, P.K.** (1974) Fat metabolism in higher plants: recent studies on plant α -oxidation systems. *Arch. Biochem. Biophys.*, **162**, 147-157.
- Siedow, J.N.** (1991) Plant lipoxygenase: structure and function. *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.*, **42**, 145-188.
- Singh, I. und Kishimoto, Y.** (1979) Alpha-hydroxylation of lignoceric acid in brain. Subcellular localization of alpha-hydroxylation and the requirement for heat-stable and heat-labile factors and sphingosine. *J. Biol. Chem.*, **254**, 7698-7704.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. und Klenk, D.C.** (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **150**, 76-85.
- Smith, W.L., Garavito, R.M., DeWitt, D.L.** (1996) Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.*, **271**, 33157-33160.
- Smith, W.L. und DeWitt, D.L.** (1996) Prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *Am. J. Physiol.*, **32**, 181-191.
- Smith, W.L., DeWitt, D.L. und Garavito, R.M.** (2000) Cyclooxygenases: Structural, cellular and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 145-182.

- Smith, W.L. und Song, I.** (2002) The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins other Lipid Mediat.*, **68-69**, 115-128.
- Southern, E.M.** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517.
- Spencer, A.G., Woods, J.W., Arakawa, T., Singer, I.I. und Smith, W.L.** (1999) Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J. Biol. Chem.*, **273**, 9886-9893.
- Steinberg, D.** (1995) Refsum disease. In *The metabolic and molecular bases of inherited disease* (Scriver, C.R., Beauder, A.L., Sly, W.S., Valle, D., eds.). New York: McGraw-Hill, pp. 2351-2369.
- Steinberg, S.J., Wang, S.J., Kim, D.G., Mihalik, S.J. und Watkins, P.A.** (1999) Human very-long-chain acyl-CoA synthetase: cloning, topography, and relevance to branched-chain fatty acid metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **257**, 615-621.
- Steinberg, S.J., Morgenthaler, J., Heinzer, A.K., Smith, K.D. und Watkins, P.A.** (2000) Very long-chain acyl-CoA synthetase: Human "bubblegum" represents a new family of proteins capable of activating very long-chain fatty acids. *J. Biol. Chem.*, **275**, 35162-35169.
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J. und Farmer, E.E.** (2001) Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 12837-12842.
- Stumpf, P.K.** (1956) Fat metabolism in higher plants: VIII. Saturated long chain fatty acid peroxidase. *J. Biol. Chem.*, **223**, 643-649.
- Sugai, T. und Ohta, H.** (1991) Lipase-mediated efficient preparation of both enantiomers of 2-acetoxy-tetracosanoic acid, an intermediate for sphingolipid synthesis. *Tetrahedron Lett.*, **32**, 7063-7064.
- Thomas, H. und Stoddart, L.J.** (1980) Leaf senescence. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **31**, 83-111.
- Tirajoh, A., Aung, T.S.T., Byun McKay, A. und Plant, A.L.** (2005) Stress-responsive α -dioxygenase expression in tomato roots. *J. Exp. Bot.*, **56**, 713-723.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354.
- Towler, D.A., Eubanks, S.R., Towery, D.S., Adams, S.P. und Glaser, L.** (1987) Amino-terminal processing of proteins by N-myristoylation. Substrate specificity of N-myristoyl-transferase. *J. Biol. Chem.*, **262**, 1030-1035.
- Tsai, S.-C., Avigan, J. und Steinberg, D.** (1969) Studies on the α -oxidation of phytanic acid by rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **244**, 2682-2692.
- Tsai, S.-C., Steinberg, D., Avigan, J. und Fales, H.M.** (1973) Studies on the stereospecificity of mitochondrial oxidation of phytanic acid and of α -hydroxyphytanic acid. *J. Biol. Chem.*, **248**, 1091-1097.

- Tsai, A.-L., Palmer, G. und Kulmacz, R.J.** (1992) Prostaglandin H synthase. Kinetics of tyrosyl radical formation and of cyclooxygenase catalysis. *J. Biol. Chem.*, **267**, 17753-17759.
- Tsai, A.-L., Hsi, L.C., Kulmacz, R.J., Palmer, G. und Smith, W.L.** (1994) Characterization of the tyrosyl radicals in ovine prostaglandin, endoperoxide H synthase-1 by isotope replacement and site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, **269**, 5085-5091.
- Tsai, A.-L., Kulmacz, R.J. und Palmer, G.** (1995) Spectroscopic evidence for reaction of prostaglandin H synthase-1 tyrosyl radical with arachidonic acid., *J. Biol. Chem.*, **270**, 10503-10508.
- Tsai, A.-L. und Kulmacz, R.J.** (2000) Tyrosyl radicals in prostaglandin H synthases-1 and -2. *Prostaglandins other Lipid Mediat.*, **62**, 231-254.
- van der Biezen, E.A., Brandwagt, B.F., van Leeuwen, W., Nijkamp, H.J.J. und Hille, J.** (1996) Identification and isolation of the *FEEBLY* gene by transposon tagging. *Mol. Gen. Genet.*, **251**, 267-280.
- Verhoeven, N.M., Schor, D.S.M., Roe, C.R., Wanders, R.J.A. und Jakobs, C.** (1997^a) Phytanic acid α -oxidation in peroxisomal disorders: studies in cultured human fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **1361**, 281-286.
- Verhoeven, N.M., Wanders, R.J.A., Schor, D.S.M., Jansen G.A. und Jakobs, C.** (1997^b) Phytanic acid α -oxidation: decarboxylation of 2-hydroxyphytanoyl-CoA to pristanic acid in human liver. *J. Lipid Res.*, **38**, 2062-2070.
- Verhoeven, N.M., Schor, D.S.M., ten Brink, H.J., Wanders, R.J.A. und Jakobs, C.** (1997^c) Resolution of the phytanic acid α -oxidation pathway: identification of pristanal as the product of the decarboxylation of 2-hydroxyphytanoyl-CoA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **237**, 33-36.
- Verhoeven, N.M., Schor, D.S.M., Previs, S.F., Brunengraber, H. und Jakobs, C.** (1997^d) Stable isotope studies of phytanic acid α -oxidation: in vivo production of formic acid. *Eur. J. Pediatr.*, **156**, 83-87.
- Verhoeven, N.M., Wanders, R.J.A., Poll-The, B.T., Saudubray, J.-M. und Jakobs, C.** (1998) The metabolism of phytanic acid and pristanic acid in man: A review. *J. Inher. Metab. Dis.*, **21**, 697-728.
- Verhoeven, N.M. und Jakobs, C.** (2001) Human metabolism of phytanic acid and pristanic acid. *Prog. Lipid Res.*, **40**, 453-466.
- Vijayan, P., Shockey, J., Lévesque, A., Cook, R.J. und Browse, J.** (1998) A role for jasmonate in pathogen defense in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 7209-7214.
- Wanders, R.J.** (2000) Peroxisomes, lipid metabolism, and human disease. *Cell Biochem. Biophys.*, **32**, 89-106.
- Watkins, P.A., Howard, A.E. und Mihalik, S.J.** (1994) Phytanic acid must be activated to phytanoyl-CoA prior to its α -oxidation in rat liver peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1214**, 288-294.

- Weaver, L.M., Gan, S., Quirino, B. und Amasino, R.M.** (1998) A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Mol. Biol.*, **37**, 455-469.
- Weber, H., Chételat, A., Caldelari, D. und Farmer, E.E.** (1999) Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves. *Plant Cell*, **11**, 485-493.
- Weber, H.** (2002) Fatty acid-derived signals in plants. *Trends Plant Sci.*, **7**, 217-224.
- Wei, Z.-M., Laby, R.J., Zumoff, C.H., Bauer, D.W., He, S.Y., Collmer, A. und Beer, S.V.** (1992) Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, **257**, 85-88.
- Wei, J.-Z., Tirajoh, A., Effendy, J. und Plant, A.L.** (2000) Characterization of salt-induced changes in gene expression in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots and the role played by abscisic acid. *Plant Sci.*, **159**, 135-148.
- Weiner, M.P., Costa, G.L., Schoettlin, W., Cline, J., Mathur, E. und Bauer, J.C.** (1994) Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene*, **151**, 119-123.
- Weinges, K., Braun, G. und Oster, B.** (1983) Chemie und Stereochemie der Iridoide, III. Über die Synthese von 12-epi-Prostaglandinen. *Liebigs Ann. Chem.*, 2197-2214.
- Wierzbicki, A.S., Lloyd, M.D., Schofield, C.J., Feher, M.D., Gibberd, F.B.** (2002) Refsum's disease: a peroxisomal disorder affecting phytanic acid α -oxidation. *J. Neurochem.*, **80**, 727-735.
- Wu, S.Y. und Laties, G.G.** (1983) A malate-oxaloacetate shuttle linking cytosolic fatty-acid alpha-oxidation to the mitochondrial electron-transport chain in uncoupled fresh potato slices. *Physiol. Plantarum*, **58**, 81-88.
- Yano, I., Furukawa, Y. und Kusunose, M.** (1969) Conversion of palmitic acid to α -hydroxypalmitic acid in *Corynebacterium simplex*. *Biochim. Biophys. Acta*, **187**, 166-168.
- Yano, I., Furukawa, Y. und Kusunose, M.** (1971) The α -oxidation of long-chain fatty acids in cell-free extracts of *Arthrobacter simplex*. *Biochim. Biophys. Acta*, **239**, 513-516.
- Yu, M., Ives, D. und Ramesha, C.S.** (1997) Synthesis of prostaglandin E₂ ethanolamide from anandamide by cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.*, **272**, 21181-21186.
- Yukawa, N., Tamura, H. und Matoba, T.** (1993) Determination of total carbonyl compounds in aqueous media. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **70**, 881-884.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name

Anke Karla Meisner

Geburtsdatum

02.04.1977

Geburtsort

Würzburg

Schulbildung

1983 - 1987

Schiller-Schule Würzburg

Friedrich-Fleischmann-Schule

Marktheidenfeld

1987 - 1996

Balthasar-Neumann-Gymnasium

Marktheidenfeld

06/1996

Allgemeine Hochschulreife

Studium und Ausbildung

1996 - 2000

Studium der Lebensmittelchemie an der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität
Würzburg

10/1998

Vorprüfung für Lebensmittelchemiker

11/2000

1. Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker

08/2004 - 01/2005

Praktikum für Lebensmittelchemie am

Landesamt für Gesundheit und

Lebensmittelsicherheit in Erlangen

01/2005

2. Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker

seit 04/2001

Promotionsstudium der Lebensmittelchemie an der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität
Würzburg

Industriepraktikum

08/1999 - 09/1999

Henkel KGaA Düsseldorf