

**Isolierung und Sequenzierung des Ribosomen-inaktivierenden Proteins Agrostin aus**

***Agrostemma githago* L.**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Joachim Schrot

aus Heide

2017

Die vorliegende Arbeit wurde vom 01.11.2012 bis 25.01.2017 unter der Leitung von Prof. Dr. Matthias F. Melzig am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Erster Gutachter: Prof. Dr. Matthias. F. Melzig

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Hendrik Fuchs

Datum der Disputation: 16.07.2018

*„Die Zeit, die du für deine Rose verloren hast, sie macht deine Rose so wichtig.“*

ANTOINE DE SAINT-EXUPÉRY

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen .....	IV
1 Einleitung .....	1
1.1 Ribosomen-inaktivierende Proteine.....	1
1.2 Agrostin aus <i>Agrostemma githago</i> L. (Kornrade).....	23
1.3 Zielsetzung.....	25
2 Materialien.....	27
2.1 Chemikalien .....	27
2.2 Geräte .....	28
2.3 Verbrauchsmaterialien .....	30
2.4 Kits .....	31
2.5 Molekulargewichtsmarker.....	31
2.6 RIPs .....	31
2.7 Antikörper.....	31
2.8 Enzyme.....	32
2.9 Primer .....	32
2.10 Pufferlösungen, Reagenzien .....	33
3 Methoden .....	35
3.1 Sonstige Methoden .....	35
3.1.1 Extraktherstellung .....	35
3.1.2 Echtzeit-Untersuchung der Zytotoxizität des isolierten Agrostins .....	35
3.2 Proteinbiochemische Methoden.....	36
3.2.1 Dialysieren von Proteinlösungen .....	36
3.2.2 Aufkonzentrieren von Proteinlösungen.....	36
3.2.3 Proteingehaltsbestimmungen mittels BCA- und Bradford-Assay.....	37
3.2.4 SDS-PAGE.....	38
3.2.5 Fixieren, Anfärben und Trocknen von Polyacrylamidgelen .....	39
3.2.6 Western Blot.....	40
3.2.7 Dot Blot.....	41
3.2.8 Aufreinigung von Antikörpern aus Kaninchenserum .....	41
3.2.9 Bindung von Proteinen an <i>N</i> -Hydroxysuccinimid (NHS) als Säulenmatrix zur Herstellung einer Affinitätschromatographie-Säule.....	43

3.2.10	In-Gel-Verdau mit Trypsin und AspN .....	47
3.2.11	MALDI-TOF .....	48
3.3	Molekularbiologische Methoden .....	49
3.3.1	RNA-Extraktion .....	49
3.3.2	RNA-Seq und bioinformatische Auswertung der Rohdaten .....	51
3.3.3	Umschreibung der extrahierten RNA in cDNA mittels Reverse Transkriptase ..	56
3.3.4	Agarose-Gelelektrophorese .....	58
3.3.5	Primerdesign .....	59
3.3.6	DNA-Amplifizierung durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	59
3.3.7	3'RACE- und 5'RACE-PCR.....	60
3.3.8	DNA-Extraktion aus einem Agarose-Gel .....	65
3.3.9	Ligation eines DNA-Abschnittes in den pJET1.2-Klonierungsvektor .....	65
3.3.10	Plasmid-Aufreinigung aus kultivierten Bakterienzellen .....	66
3.3.11	Enzymatischer Verdau des in den pJET1.2-Vektor ligierten Inserts mit Restriktionsenzymen.....	66
3.4	Mikrobiologische Methoden .....	67
3.4.1	Transformation von DNA in kompetente Bakterienzellen und anschließende Kultivierung dieser Bakterien.....	67
4	Ergebnisse und Diskussion .....	69
4.1	Aufreinigung der Antikörper und Isolierung des Agrostins.....	69
4.1.1	Aufreinigung der anti-Agrostin- und anti-Peptid-Antikörper aus den entsprechenden Kaninchenseren .....	69
4.1.2	Western Blots mit den aufgereinigten Antikörpern .....	71
4.1.3	Isolierung des Agrostins .....	74
4.2	Zytotoxizitätsuntersuchung des isolierten Agrostins in Kombination mit dem Saponin SO1861.....	76
4.3	Ergebnisse der MALDI-TOF-Untersuchungen.....	77
4.3.1	Gesamtmasse .....	77
4.3.2	Fingerprint.....	78
4.3.3	MS/MS-Spektrum Analyse am Beispiel des Peptidfragmentes m/z = 1462.77 .	80
4.3.4	Aminosäuresequenzen der untersuchten Peptidfragmente .....	84
4.4	RNA-Isolierung .....	87
4.4.1	Untersuchung verschiedener Entwicklungsstadien der Blüten und Samenanlagen von <i>Agrostemma githago</i> .....	87

---

4.4.2	Isolierte RNA aus dem Pflanzenmaterial des Entwicklungsstadiums I .....	89
4.5	Ergebnisse der Auswertungen der RNA-Seq-Rohdaten .....	91
4.5.1	Vergleich der Konsensussequenz mit den Sequenzen der Peptidfragmente aus der MALDI-TOF-Untersuchung .....	93
4.5.2	Vergleich der RNA-Seq-Sequenz mit den Aminosäuresequenzen anderer Typ 1 RIPs .....	100
4.6	Ergebnisse der RACE-PCR .....	104
4.7	Ergebnisse der Klonierungs-PCR.....	108
5	Zusammenfassung .....	113
6	Anhang .....	116
7	Literaturverzeichnis .....	125
8	Abbildungsverzeichnis .....	150
9	Tabellenverzeichnis.....	154
10	Danksagung .....	156
11	Eidesstattliche Erklärung.....	157

## Abkürzungen

Ak	Antikörper
AP	Ankerprimer
AS	Aminosäure
BAZ	Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen
BCA	Bicinchoninsäure
cDNA	complementary DNA
CDS	Coding DNA sequence
CHCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytidintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
FBS	Fetal Bovine Serum
GSP	Genspezifischer Primer
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
LAF	Laminar air flow
MALDI-TOF	Matrix-assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
MWCO	Molecular weight cut-off

---

NCI	Normalized cell-index
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
PBS	Phosphate-buffered saline
PBSB	Phosphate-buffered saline for blotting
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglykol
RACE-PCR	Rapid amplification of cDNA-ends with polymerase chain reaction
RIP	Ribosomen-inaktivierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TdT	terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
UTR	Untranslated region



# 1 Einleitung

## 1.1 Ribosomen-inaktivierende Proteine

Ribosomen-inaktivierende Proteine (RIPs) können aufgrund ihrer *N*-Glykosidase Aktivität einen spezifischen Adenin-Rest (A<sup>4324</sup>) der ribosomalen 28S RNA von der großen 60S Untereinheit der Ribosomen von Ratten abspalten. Dadurch wird die Translation in der Zelle inhibiert, wodurch die Proteinsynthese zum Erliegen und es somit zum Zelltod kommt [1]. Manche RIPs können außerdem Adenin von DNA und anderen Polynukleotiden abspalten, weshalb sie auch als „polynucleotide:adenosine glycosylases“ bezeichnet werden [2]. Von PAP, ein RIP aus *Phytolacca americana*, ist zusätzlich bekannt, dass es nicht nur Adenin, sondern auch einen Guanin-Rest der RNA von *Escherichia coli* abspalten kann [3].

Es gibt zwei unterschiedliche Typen von RIPs: Typ 1 RIPs (RIP 1) und Typ 2 RIPs (RIP 2). Typ 1 RIPs sind einkettige Proteine, wohingegen Typ 2 RIPs aus zwei Polypeptidketten bestehen (A- und B-Kette), die für gewöhnlich durch eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind. Die A-Kette enthält dabei die enzymatische Funktion und die B-Kette weist Lektineigenschaften auf, wodurch es diesen Proteinen ermöglicht wird an den Zuckerresten von Zelloberflächen zu binden. Dadurch kann die enzymatisch aktive A-Kette leichter in das Zytosol gelangen, weshalb Typ 2 RIPs in der Regel um ein Vielfaches zytotoxischer sind als Typ 1 RIPs.

Des Weiteren wird eine zusätzliche Gruppe von RIPs diskutiert, die als Typ 3 RIPs bezeichnet werden soll, zu denen b-32, ein Protein aus *Zea mays*, sowie JIP60 aus *Hordeum vulgare* zählen sollen. Beide Proteine weisen hinsichtlich ihrer Struktur deutliche Unterschiede zu den Typ 1 und Typ 2 RIPs auf. b-32 wird als inaktives Proenzym in der Pflanze synthetisiert und wird erst durch das Entfernen eines internen Peptidsegmentes aktiviert, wodurch zwei Peptidsegmente mit einer Größe von 16.5 kDa und 8.5 kDa entstehen, die zusammen als *N*-Glykosidase fungieren sollen [4]. Die N-terminale Domäne von JIP60 ähnelt der von Typ 1 RIPs, jedoch zeigt die C-terminale Domäne eher Gemeinsamkeiten mit eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E) [5,6]. Trotz dieser strukturellen Unterschiede ist es unrealistisch eine neue Gruppe RIPs für lediglich diese beiden Proteine zu benennen. Stattdessen wurde der Vorschlag gemacht diese beiden Proteine als „besondere Typ 1 RIPs“ (engl.: peculiar type 1 RIPs) zu bezeichnen [7,8].

Neben den *N*-Glykosidasen gibt es eine weitere Art von RIPs, die zu den RNA Hydrolasen gehört [9,10]. Beide Arten der RIPs inhibieren die Proteinsynthese mit einem unterschiedlichen Wirkmechanismus. Die RNA Hydrolasen, wie  $\alpha$ -Sarcin als bekanntester Vertreter, spalten katalytisch eine Phosphodiesterbindung zwischen dem Guanin-Rest G<sup>4325</sup> und dem Adenin-Rest A<sup>4326</sup> der ribosomalen 28S RNA von Ratten. Mit Ausnahme von Croton II, ein weiterer Vertreter der RNA Hydrolasen wird diese Art von RIPs im Weiteren jedoch nicht näher beschrieben und das Hauptaugenmerk richtet sich hier auf die *N*-Glykosidasen.

RIPs wurden hauptsächlich in Pflanzen entdeckt, aber die Hypothese, dass RIPs ubiquitär vorkommen, musste verworfen werden, da in dem Genom von *Arabidopsis thaliana* kein Gen gefunden wurde, welches für ein RIP codiert [11]. Andererseits gibt es Pflanzen, in denen mehrere verschiedene RIPs bzw. Isoformen eines RIPs gleichzeitig vorkommen. In dem Genom von *Oryza sativa* z.B. wurden 31 Gene entdeckt, die für Typ 1 RIPs codieren [12]. Neben den pflanzlichen RIPs, wurde zudem ein Typ 1 RIP in einer Algenspezies *Saccharina japonica* entdeckt, welches als Lamjapin bezeichnet wurde [13]. Außerdem wurden auch in manchen Pilzen Typ 1 RIPs entdeckt wie Pleuteregine in *Pleurotus tuberregium* [14], Lyophyllin in *Lyophyllum shimeji* [15], Flammulin und Velutin in *Flammulina velutipes* [16], Hypsin und Marmorin in *Hypsizygus marmoreus* [17,18] und Volvarin in *Volvariella volvaceae* [19]. Es gibt ebenfalls bakterielle Typ 1 RIPs: Shiga-Toxine aus *Shigella dysenteriae* [20] und Verotoxin 1, welches auch als „shiga-like toxin“ bekannt ist, aus *Escherichia coli* [21]. Auch in einigen Geweben von Säugetieren wurde eine Glykosylase Aktivität ausfindig gemacht [2] und somit ist festzuhalten, dass RIPs von Pflanzen über Algen, Pilze, Bakterien bis hin zu Säugetieren sehr weit verbreitet sind.

RIPs zeigen neben der *N*-Glykosidase Aktivität weitere enzymatische Aktivitäten wie Chitinase Aktivität [22], Superoxiddismutase Aktivität [23], DNase Aktivität [24] und Lipase Aktivität [25]. Sie können aufgrund der *N*-Glykosidase Aktivität gegenüber viraler RNA einen antiviralen Effekt ausüben, welcher als die physiologische Funktion der RIPs vermutet wird. Jedoch kann diese enzymatische Aktivität genauso gut eine Rolle bei der Verteidigung der Pflanze gegenüber Fressfeinden oder Pilzen spielen [7,8,26]. Da die genomische DNA von Pflanzen ebenfalls aufgrund der *N*-Glykosidase Aktivität angegriffen werden kann, wird außerdem eine gewisse Rolle der RIPs bei der Pflanzenalterung diskutiert [27]. Es ist auch denkbar, dass den Pflanzen durch die RIPs ein evolutionärer Vorteil gegeben wird, wodurch die Pflanze

eine Art Schutz unter schwierigen Wachstumsbedingungen erfährt [28]. Jedoch würde dies die Frage aufwerfen, warum sich die Verbreitung der RIPs nicht in alle Pflanzen durchsetzen konnte. Somit ist bis heute keine präzise Rolle den RIPs zugeschrieben [29], jedoch wird die antivirale Funktion von den meisten Autoren favorisiert. Daher wurde für den Anbau mancher Pflanzenarten in der Landwirtschaft die Forschungsarbeit dahingehend betrieben, dass durch den Einsatz der DNA-Rekombinationstechnik ein Genabschnitt, der für ein bestimmtes RIP codiert, in diese Pflanzen übertragen wurde, wodurch die Pflanze widerstandsfähiger gegenüber Viren werden sollte [11]. Im medizinischen Bereich wurde unter anderem die Wirkung des Trichosanthin, ein RIP 1 aus *Trichosanthes kirilowii*, auf HIV infizierte Zellen untersucht, wodurch es sogar zu einer klinischen Phase-II-Studie kam, die jedoch aufgrund schwerwiegender Nebenwirkungen des Trichosanthins sowie Antikörperbildung gegen das Protein nicht weiter fortgeführt wurde [30]. Der Schwerpunkt der Forschung richtet sich heutzutage jedoch auf die Krebstherapie, indem versucht wird, die RIPs selektiv zu malignen Tumorzellen zu steuern, um diese zu eliminieren. Dafür werden Typ 1 RIPs oder die A-Ketten von Typ 2 RIPs an Antikörper, Wachstumshormone, andere Hormone oder andere kleine Peptide gebunden, die zielgerichtet diese Tumorzellen ansteuern können und somit entstehen zielorientierte Toxine („targeted toxins“) [31-33]. Dabei ist zu bedenken, dass diese Konjugate hochpotente Toxine enthalten, die zum Teil unspezifisch von Macrophagen und anderen somatischen Zellen aufgenommen werden und somit ein hohes Potential an Nebenwirkungen beinhalten. Ein weiteres Problem hinsichtlich der Applikation dieser Konjugate in einer möglichen Krebstherapie ist, dass diese Konjugate vom Körper als Fremdproteine erkannt werden und dagegen Antikörper produziert, wodurch eine erneute Applikation unwirksam werden könnte. Um zumindest das hohe Potential der Nebenwirkungen reduzieren zu können, ist es notwendig die Dosierung der Konjugate so gering wie möglich zu halten. Das scheint besonders nach der Entdeckung eines synergistischen Effektes der Typ 1 RIPs in Kombination mit Saponinen möglich, wodurch die toxische Wirkung der Typ 1 RIPs drastisch erhöht wird [34-36]. Dafür müssen die Saponine jedoch bestimmte strukturelle Merkmale aufweisen [37] und es konnte gezeigt werden, dass der synergistische Effekt nicht auf einer stimulierten Phagozytose basiert wie anfangs angenommen [38], sondern auf einer erhöhten und erleichterten Freisetzung der RIPs aus den Endosomen ins Zytosol [39,40].

Im letzten Jahrzehnt wurden einige Reviews über RIPs veröffentlicht, in denen der Fokus auf die chemischen sowie biologischen Eigenschaften und Aktivitäten, der Verteilung in der Na-

tur oder mögliche Verwendungsgebiete der RIPs gesetzt wurde [7,8,11,41-44]. Aufgrund der Vielzahl der sich mit RIPs beschäftigenden Wissenschaftler kam es im Laufe der Zeit immer wieder zu Verwechslungen bzw. Unstimmigkeiten, was die Nomenklatur einzelner Proteine anbelangte. So kam es vor, dass manche Proteine mit unterschiedlichen Namen versehen wurden wie z.B. Nigrin b aus *Sambucus nigra*, welches ebenfalls als SNA-V bezeichnet wurde, oder Sieboldin-b aus *Sambucus sieboldiana*, das auch als SSA-b-2 benannt wurde. Des Weiteren wurde in manchen Fällen derselbe Begriff für unterschiedliche Proteine verwendet wie z.B. Momordin II, das sowohl ein Protein aus *Momordica balsamina* als auch aus *Momordica charantia* charakterisiert, oder MAP, welches für ein Protein (MAP 30) aus *Momordica charantia* und für ein Protein aus *Mirabilis jalapa* (MAP = *Mirabilis* antiviral protein) verwendet wurde. Diese Beispiele sollen verdeutlichen, dass bis heute keine einheitliche Nomenklatur für RIPs existiert. Die meisten RIPs werden im Allgemeinen unter der Verwendung des Namens der Gattung oder Spezies gefolgt von der Endung „-in“ bezeichnet wie z.B. Agrostin aus *Agrostemma githago* oder Ocymoidin aus *Saponaria ocymoides*. Für den Fall, dass mehrere RIPs von derselben Spezies synthetisiert werden folgt der Bezeichnung eine arabische oder römische Zahl wie z.B. in Asparin 1 und Asparin 2 aus *Asparagus officinalis* oder Pulchellin PI, Pulchellin PII und Pulchellin P3 aus *Abrus pulchellus*. Die Nummern können jedoch beispielsweise auch in einem anderen Kontext verwendet werden wie z.B. die Peak-Nummer, in der die Proteine bei der Isolierung eluiert wurden wie z.B. Agrostin 2, Agrostin 5 und Agrostin 6 [45]. Manche Proteine wurden unter zusätzlicher Angabe ihrer Molekülmasse bezeichnet wie z.B. Dianthin29 aus *Dianthus barbatus* mit einer Masse von 29 kDa. Auch das Pflanzengewebe, aus dem die Proteine isoliert wurden, wurde bei der Namensgebung verwendet wie z.B. Nigrin b aus der Rinde (engl.: bark) von *Sambucus nigra*. Außerdem gibt es eine Vielzahl von Proteinen, die unter Verwendung von Abkürzungen benannt wurden, wobei meistens die Initialen der Gattung und Spezies verwendet wurden wie z.B. bei SEA (= *Sambucus ebulus* agglutinin) aus *Sambucus ebulus*. Als letzten Punkt bezüglich der Nomenklatur sind Modeccin 4B und Modeccin 6B aus *Adenia digitata* zu erwähnen, die nach dem Material, mit dem sie isoliert wurden, bezeichnet wurden. So wurde Modeccin 4B durch Affinitätschromatographie unter Verwendung von Sepharose 4B isoliert und Modeccin 6B wurde mit Säure behandelte Sepharose 6B aufgereinigt

Außerdem gibt es Unstimmigkeiten über die Klassifizierung einiger Proteine, ob es sich dabei um ein Typ 2 RIP oder lediglich ein Lektin handelt, da entweder keine Versuche über die en-

zymatische Aktivität und deren Toxizität unternommen oder keine weiteren Angaben über die Struktur gemacht wurden wie bei SGSL aus *Trichosanthes anguina*, TCSL aus *Trichosanthes cucumerina*, TKL-1 aus *Trichosanthes kirilowii*, TDSL aus *Trichosanthes dioica* oder BDA aus *Bryonia dioica*. Insbesondere seit der Erkenntnis, dass RIPs und Lektine aus einem gemeinsamen Ur-Gen abstammen [29], ist es sehr wahrscheinlich, dass einige Typ 2 RIPs aufgrund des Ausbleibens einer enzymatischen Aktivitätsbestimmung und/oder Strukturaufklärung nicht als solche identifiziert und lediglich als Lektin deklariert wurden. Diese Annahme wird durch die Untersuchung verschiedener *Adenia*-Arten unterstützt, in der manche neu entdeckten Lektine als Typ 2 RIPs klassifiziert wurden [46]. Eigens für diese Arbeit wurde ein Review angefertigt, in dem auf die eben genannten Unstimmigkeiten eingegangen wurde und alle bis *dato* bekannten RIPs und RIPs ähnlichen Proteine mit allen verwendeten Bezeichnungen in einer Übersichtstabelle (Tabelle 1) dargestellt sind [47]. Zusätzlich wurden für die Pflanzenfamilien, in denen mindestens eine Spezies ein RIP produziert, alle bekannten Lektine einschließlich deren Produzenten mit aufgeführt. Um als klassisches Typ 1 RIP oder Typ 2 RIP klassifiziert zu werden, muss das Protein sowohl die entsprechende Struktur als auch die enzymatische *N*-Glykosidase Aktivität einschließlich der konservierten Aminosäuren aufweisen, von den vermutet wird, dass sie in allen RIPs vorkommen und das enzymatische Aktivitätszentrum bilden [48-51], welches ebenfalls als „Shiga/Ricin toxische Domäne“ bekannt ist [52]. Tabelle 1 zeigt, dass es nach eben genannter Definition 193 Typ 1 RIPs sowie 88 Typ 2 RIPs gibt. Zusätzlich wird neben den bereits oben erwähnten „besonderen Typ 1 RIPs“ wie b-32 und JIP60 eine gewisse Anzahl weiterer Proteine aufgelistet, die aufgrund struktureller und funktioneller Abweichungen nicht den klassischen Typ 1 und Typ 2 RIPs zugeordnet werden können und in der Tabelle als small RIPs, RIP Kandidaten und RIP-ähnliche Proteine bezeichnet werden (für eine detailliertere Erklärung s. Schrot *et al.* [47]).

**Tabelle 1.** Übersichtstabelle der RIPs und RIP ähnlichen Proteine

Familie	Spezies <sup>1</sup>	Protein	Klassifiz.	Mw <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>3</sup>	Gewebe	Literatur
Adoxaceae	<i>Sambucus ebulus</i> L.	Ebulitin α	RIP 1	32 kDa	10 ng/mL	Blätter	[53]
		Ebulitin β	RIP 1	29 kDa	10 ng/mL	Blätter	[53]
		Ebulitin γ	RIP 1	29 kDa	10 ng/mL	Blätter	[53]
		Ebulin f	RIP 2	56 kDa	96 ng/mL; 0.3 nM (A) <sup>5</sup>	unreife Früchte	[29,54]
		Ebulin l	RIP 2	56 kDa	8.5 ng/mL; 0.15 nM (A) <sup>5</sup>	Blätter	[29,55,56]
		Ebulin r1	RIP 2	56 kDa	2.3 ng/mL	Rhizom	[56]
		Ebulin r2	RIP 2	56 kDa	2.3 ng/mL	Rhizom	[56]
		SEA	RIP 2	135630 Da	1 nM	Rinde	[57]
		SEAI	Lektin	33.5 kDa	-	Rhizom	[56]
		SElfd	Lektin	68 kDa	820 ng/mL	unreife Früchte	[54]
		SElId	Lektin	67906 Da	-	Blätter	[58,59]
		SElIm	Lektin	34239 Da	-	junger Spross	[60]
	<i>Sambucus nigra</i> L.	α-Nigritin	RIP 1	29 kDa	2.44–34 ng/mL	Blätter	[61]
		β-Nigritin	RIP 1	40 kDa	2.44–34 ng/mL	Blätter	[61]
		γ-Nigritin	RIP 1	27.5 kDa	2.44–34 ng/mL	Blätter	[61]
		Nigritin f1	RIP 1	24095 Da	100 ng/mL	unreife und reife Früchte	[62]
		Nigritin f2	RIP 1	23565 Da	100 ng/mL	reife Früchte	[62]
		basic Nigrin b	RIP 2	63469 Da	18 pg/mL; 0.3 pM (A) <sup>5</sup>	Rinde	[63]
		Nigrin b = SNA-V	RIP 2	120 kDa	261 pM; 0.03 nM (A) <sup>5</sup>	Rinde	[29,64-66]
		Nigrin f = SNA-Vf	RIP 2	120 kDa	1.9 ng/mL; 1.8 ng/mL; 0.03 nM (A) <sup>5</sup>	Früchte	[29,67-69]
		Nigrin l1	RIP 2	k.A. <sup>4</sup>	k.A. <sup>4</sup>	Blätter	[70]
		Nigrin l2	RIP 2	k.A. <sup>4</sup>	k.A. <sup>4</sup>	Blätter	[70]
		Nigrin s	RIP 2	57 kDa	~ 1 µg/mL	Samen	[71]
		SNA-I	RIP 2	240 kDa	150 ng/mL; 600 pM	Rinde	[65,72-75]
		SNA-I'	RIP 2	120 kDa	150 ng/mL	Rinde	[73,76]
		SNA-If	RIP 2	240 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Früchte	[76,77]
SNAflu-I	RIP 2	30–33 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Blütenstand	[78,79]		

Tabelle 1. Fortsetzung

Familie	Spezies <sup>1</sup>	Protein	Klassifiz.	Mw <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>3</sup>	Gewebe	Literatur
Adoxaceae	<i>Sambucus nigra</i> L.	SNLRP1	RIP 2	62 kDa	0.5 µg/mL; 5.74 nM (A) <sup>5</sup>	Rinde	[29,80,81]
		SNLRP2	RIP 2	60–62 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Rinde	[81]
		SNA-Id	Lektin	k.A. <sup>4</sup>	-	Blätter	[70]
		SNA-Im	Lektin	k.A. <sup>4</sup>	-	Blätter	[70]
		SNA-II	Lektin	60 kDa	-	Rinde	[65,75,82]
		SNA-III	Lektin	50 kDa	-	Samen	[65,83]
		SNA-IV = SNA-IVf	Lektin	60 kDa	-	Früchte	[65,69,84,85]
		SNA-IVI	Lektin	k.A. <sup>4</sup>	-	Blätter	[70]
		SNAPol-I	Lektin	26 kDa	-	Pollen	[78]
		SNAPol-II	Lektin	20 kDa	-	Pollen	[78]
		TrSNA-I	Lektin	22 kDa	-	Rinde	[77]
		TrSNA-If	Lektin	22 kDa	-	Früchte	[77]
	<i>Sambucus racemosa</i> L.	basic racemosin b	RIP 2	k.A. <sup>4</sup>	k.A. <sup>4</sup>	Rinde	[79]
		SRA	RIP 2	120 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Rinde	[79,86]
		SRLbm = SRAbm	Lektin	30 kDa	-	Rinde	[79,87]
	<i>Sambucus sieboldiana</i> (Miq.) Blume ex Graebn.	SSA = SSA-b-1	RIP 2	160 kDa	985 ng/mL; 16.4 nM (A) <sup>5</sup>	Rinde	[88-90]
		Sieboldin-b = SSA-b-2	RIP 2	59.4 kDa	0.9 ng/mL; 0.015 nM (A) <sup>5</sup>	Rinde	[29,90,91]
SSA-b-3		Lektin	34262 Da	20–30 µg/mL	Rinde	[90]	
SSA-b-4		Lektin	32333 Da	20–30 µg/mL	Rinde	[90]	
Aizoaceae	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i> L.	RIP1	RIP 1	31.6 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Blätter	[92]
Amaranthaceae	<i>Amaranthus caudatus</i> L.	Amaranthin = ACA	Lektin	63.5 kDa	-	Samen	[93-95]
	<i>Amaranthus cruentus</i> L.	ACL	Lektin	66 kDa	-	Samen	[96]
	<i>Amaranthus hypochondriacus</i> L. [Syn.: <i>Amaranthus leucocarpus</i> S. Watson]	<i>A. leucocarpus</i> lectin	Lektin	45 kDa	-	Samen	[97]
	<i>Amaranthus mangostanus</i> L.	Amaramangin	RIP 1	29 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[98]
	<i>Amaranthus tricolor</i> L.	AAP-27	RIP 1	27 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Blätter	[99]

Tabelle 1. Fortsetzung

Familie	Spezies <sup>1</sup>	Protein	Klassifiz.	Mw <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>3</sup>	Gewebe	Literatur
Amaranthaceae	<i>Amaranthus viridis</i> L.	Amaranthin	RIP 1	30 kDa	25 pM	Blätter	[48,100]
	<i>Beta vulgaris</i> L.	Beetin-27 = BE27	RIP 1	27592 Da	1.15 ng/mL	Blätter	[101-103]
		Beetin-29 = BE29	RIP 1	29 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Blätter	[101-103]
		Betavulgin	RIP 1	30 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Setzlinge	[104]
	<i>Celosia argentea</i> L. [Syn.: <i>Celosia cristata</i> L.]	CCP-25	RIP 1	25 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Blätter	[105,106]
		CCP-27	RIP 1	27 kDa	25 ng/mL	Blätter	[49,105,106]
	<i>Chenopodium album</i> L.	CAP30	RIP 1	30 kDa	2.26 pM	Blätter	[107,108]
<i>Spinacia oleracea</i> L.	SoRIP1 = BP31	RIP 1	31 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Zellkulturen	[52,109-111]	
	SoRIP2	RIP 1 Kandidat	36 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Zellkulturen	[52,111]	
Araliaceae	<i>Aralia elata</i> (Miq.) Seem.	Aralin	RIP 2	62 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Spross	[112,113]
	<i>Panax ginseng</i> C.A.Mey	Panaxagin	peculiar RIP 1 Kandidat/ RNase	52 kDa	0.28 nM	Wurzeln	[114]
	<i>Panax quinquefolius</i> L.	Quinqueginsin	peculiar RIP 1 Kandidat/ RNase	53 kDa	0.26 nM	Wurzeln	[115]
Asparagaceae	<i>Asparagus officinalis</i> L.	Asparin 1	RIP 1	30.5 kDa	0.27 nM	Samen	[45,116]
		Asparin 2	RIP 1	29.8 kDa	0.15 nM	Samen	[45,116]
	<i>Drimia maritima</i> (L.) Stearn [Syn.: <i>Charybdis maritima</i> (L.) Speta]	Charybdin	RIP 1	29 kDa	27.2 nM	Zwiebeln	[117]
	<i>Muscari armeniacum</i> Leichtlin ex Baker	Musarmin 1	RIP 1	28708 Da	7 ng/mL	Zwiebeln	[118]
		Musarmin 2	RIP 1	30003 Da	9.5 ng/mL	Zwiebeln	[118]
		Musarmin 3	RIP 1	27626 Da	4 ng/mL	Zwiebeln	[118]
		Musarmin 4	RIP 1	28 kDa	1.4–8.2 ng/mL; 50–280 nM	rekomb. <sup>6</sup>	[119]
	<i>Polygonatum multiflorum</i> (L.) All.	PMRIPm	RIP 2	60 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Blätter	[120]
		PMRIPt	RIP 2	240 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Blätter	[120]
<i>Yucca gloriosa</i> var. <i>tristis</i> Carrière [Syn.: <i>Yucca recurvifolia</i> Salisb.]	Yucca leaf protein = YLP	RIP 1	23 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Blätter	[121,122]	
Basellaceae	<i>Basella rubra</i> L.	Basella RIP 2a	RIP 1	30.6 kDa	1.70 ng/mL	Samen	[123]
		Basella RIP 2b	RIP 1	31.2 kDa	1.70 ng/mL	Samen	[123]
		Basella RIP 3	RIP 1	31.2 kDa	1.66 ng/mL	Samen	[123]



Tabelle 1. Fortsetzung

Familie	Spezies <sup>1</sup>	Protein	Klassifiz.	Mw <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>3</sup>	Gewebe	Literatur
Caryophyllaceae	<i>Agrostemma githago</i> L.	Agrostin 2	RIP 1	30.6 kDa	0.6 nM	Samen	[124,125]
		Agrostin 5	RIP 1	29.5 kDa	0.47 nM	Samen	[124,125]
		Agrostin 6	RIP 1	29.6 kDa	0.57 nM	Samen	[124,125]
		Agrostin	RIP 1	27 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[126]
	<i>Dianthus barbatus</i> L.	Dianthin 29	RIP 1	29 kDa	1.5 nM	Blätter	[127]
	<i>Dianthus caryophyllus</i> L.	Dianthin 30	RIP 1	29.5 kDa	9.15 ng/mL; 0.3 nM	Blätter	[125,128,129]
		Dianthin 32	RIP 1	31.7 kDa	3.6 ng/mL;	Blätter	[128,129]
	<i>Dianthus chinensis</i> L. [Syn.: <i>Dianthus sinensis</i> Link]	<i>D. sinensis</i> RIP	RIP 1	k.A. <sup>4</sup>	k.A. <sup>4</sup>	rekomb. <sup>6</sup>	[130]
	<i>Gypsophila elegans</i> M.Bieb.	Gypsophilin	RIP 1	28 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Blätter	[131]
	<i>Silene chalcedonica</i> (L.) E.H.L.Krause [Syn.: <i>Lychnis chalcedonica</i> L.]	Lychnin	RIP 1	26131 Da	0.17 nM	Samen	[116,132,133]
	<i>Silene glaucifolia</i> Lag. [Syn.: <i>Petrocoptis glaucifolia</i> (Lag.) Boiss.]	Petroglaucin 1	RIP 1	26.7 kDa	6 ng/mL	ganze Pflanze	[134]
		Petroglaucin 2	RIP 1	27.5 kDa	0.7 ng/mL	ganze Pflanze	[135]
	<i>Silene laxipruinosa</i> Mayol & Rosselló [Syn.: <i>Petrocoptis grandiflora</i> Rothm.]	Petrograndin	RIP 1	28.6 kDa	6.6 ng/mL	ganze Pflanze	[134]
	<i>Saponaria ocymoides</i> L.	Ocymoidin	RIP 1	30.2 kDa	46 pM; 4.8 ng/mL	Samen	[136,137]
	<i>Saponaria officinalis</i> L.	Saporin-L1 = SO-L1	RIP 1	31.6 kDa	0.25 nM	Blätter	[138-141]
		Saporin-L2 = SO-L2	RIP 1	31.6 kDa	0.54 nM	Blätter	[138]
		Saporin-L3 = SO-L3	RIP 1	k.A. <sup>4</sup>	k.A. <sup>4</sup>	Blätter	[138]
		Saporin-l = SO-l = SO-4	RIP 1	k.A. <sup>4</sup>	k.A. <sup>4</sup>	Blätter	[142]
Saporin-R1 = SO-R1		RIP 1	30.2 kDa	0.86 nM	Wurzeln	[138]	
Saporin-R2 = SO-R2		RIP 1	30.9 kDa	0.47 nM	Wurzeln	[138]	

Tabelle 1. Fortsetzung

Familie	Spezies <sup>1</sup>	Protein	Klassifiz.	Mw <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>3</sup>	Gewebe	Literatur
Caryophyllaceae	<i>Saponaria officinalis</i> L.	Saporin-R3 = SO-R3	RIP 1	30.9 kDa	0.48 nM	Wurzeln	[138]
		SO3a	RIP 1	22.5 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[143]
		SO3b	RIP 1	19.4 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[143]
		Saporin-S5 = Saporin 5 = SO-S5	RIP 1	30.5 kDa	0.05 nM; 10.3 ng/mL	Samen	[45,138,144]
		Saporin-S6 = Saporin 6 = SO-6 = SO-S6	RIP 1	28577 Da	0.06 nM; 0.6 ng/mL	Samen	[45,138,142,144-148]
		Saporin-S8 = SO-S8	RIP 1	k.A. <sup>4</sup>	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[138]
		Saporin-S9 = Saporin 9 = SO-S9	RIP 1	28495 Da	0.037 nM	Samen	[45,125,149]
		SAP-C	RIP 1	28.5 kDa	125 pM	rekomb. <sup>6</sup>	[150]
		SAP-S	RIP 1	28560 Da	12 pM	Samen	[150]
	<i>Myosoton aquaticum</i> (L.) Moench [Syn.: <i>Stellaria aquatica</i> (L.) Scop.]	Stellarin	RIP 1	25 kDa	0.04 nM	Blätter	[151]
	<i>Stellaria media</i> (L.) Vill.	RIP Q3	RIP 1	28.2 kDa	k.A. <sup>4</sup>	rekomb. <sup>6</sup>	[152]
	<i>Vaccaria hispanica</i> (Mill.) Rauschert [Syn.: <i>Vaccaria pyramidata</i> Medik.]	Pyramidatin	RIP 1	28.0 kDa	89 pM; 3.6 ng/mL	Samen	[136]
	Cucurbitaceae	<i>Benincasa hispida</i> (Thunb.) Cogn.	Hispin	RIP 1	21 kDa	165 pM	Samen
α-Benincasin			sRIP 1	12 kDa	20 pM; 0.22 ng/mL	Samen	[154]
β-Benincasin			sRIP 1	12 kDa	320 pM; 3.4 ng/mL	Samen	[154]
<i>Bryonia cretica</i> subsp. <i>dioica</i> (Jacq.) Tutin. [Syn.: <i>Bryonia dioica</i> L.]		Bryodin 1 = BD1	RIP 1	29 kDa	0.12 nM; 3.6 ng/mL; 7 pM	Wurzeln	[155,156]
		Bryodin 2	RIP 1	27 kDa	9 pM	Wurzeln	[156]
		Bryodin-L	RIP 1	28.8 kDa	0.09 nM	Blätter	[116]
		Bryodin-R	RIP 1	k.A. <sup>4</sup>	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[157,158]
		BDA	Lektin/ RIP 2 ähnlich	61 kDa	>1500 nm	Wurzeln	[80,159]

Tabelle 1. Fortsetzung

Familie	Spezies <sup>1</sup>	Protein	Klassifiz.	Mw <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>3</sup>	Gewebe	Literatur
Cucurbitaceae	<i>Citrullus colocynthis</i> (L.) Schrad.	Colocin 1	RIP 1	26.3 kDa	0.04 nM	Samen	[116]
		Colocin 2	RIP 1	26.3 kDa	0.13 nM	Samen	[116]
	<i>Cucurbita foetidissima</i> Kunth	Foetidissimin	peculiar RIP 2	63 kDa	25.9 nM	Wurzeln	[160]
		Foetidissimin II	RIP 2	61 kDa	251.6 nM	Wurzeln	[161]
	<i>Cucumis ficifolius</i> A.Rich. [Syn.: <i>Cucumis figarei</i> Delile ex Naudin]	<i>Cucumis figarei</i> RIP = CF-RIP	RIP 1 Kandidat	k.A. <sup>4</sup>	k.A. <sup>4</sup>	rekomb. <sup>6</sup>	[162]
	<i>Cucurbita maxima</i> Duchesne	Cucurmoschin	sRIP 1 Kandidat	9 kDa	1.2 µM	Samen	[163]
	<i>Cucurbita moschata</i> Duchesne [Syn.: <i>Cucurbita moschata</i> (Duchesne ex Lam.) Duchesne ex Poir.]	Cucurmosin	RIP 1	27–28 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Sarkokarp	[164-166]
		Cucurmosin 2	RIP 1	27183 Da	k.A. <sup>4</sup>	Sarkokarp	[167,168]
		<i>C. moschata</i> RIP	RIP 1	30665 Da	0.035 nM; 1.08 ng/mL	Früchte	[158]
		Moschatin	RIP 1	29 kDa	0.26 nM	Samen	[169]
		PRIP 1	RIP 1	31 kDa	0.82 nM	Blätter	[170]
		PRIP 2	RIP 1	30.5 kDa	0.79 nM	Blätter	[170]
		α-Moschin	sRIP 1 Kandidat	12 kDa	17 µM	Samen	[171]
	β-Moschin	sRIP 1 Kandidat	12 kDa	300 nM	Samen	[171]	
	<i>Cucurbita pepo</i> L.	Pepocin	RIP 1	26 kDa	15.4 pM	Sarkokarp	[172]
	<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>texana</i> (Scheele) D.S.Decker [Syn.: <i>Cucurbita texana</i> (Scheele) A. Gray]	Texanin	RIP 1	29.7 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Früchte	[161]
	<i>Gynostemma pentaphyllum</i> (Thunb.) Makino	Gynostemmin	RIP 1	27 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Blätter und Stängel	[173]
	<i>Lagenaria siceraria</i> (Molina) Standl.	Lagenin	RIP 1 Kandidat	20 kDa	0.21 nM	Samen	[174]
	<i>Luffa acutangula</i> (L.) Roxb.	Luffaculin-1	RIP 1	28 kDa	3.6 ng/mL; 124 pM	Samen	[175,176]
		Luffaculin-2	RIP 1	28 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[176]
Luffangulin		sRIP 1	5.6 kDa	3.5 nM	Samen	[177]	
<i>Luffa acutangula</i> fruit lectin		Lektin	48 kDa	-	Früchte	[178]	

Tabelle 1. Fortsetzung

Familie	Spezies <sup>1</sup>	Protein	Klassifiz.	Mw <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>3</sup>	Gewebe	Literatur
Cucurbitaceae	<i>Luffa cylindrica</i> (L.) M. Roem [Syn.: <i>Luffa aegyptiaca</i> Mill.]	Luffin	RIP 1	26 kDa	0.42 ng/mL	Samen	[179]
		Luffin-a	RIP 1	27021 Da	1.64 ng/mL	Samen	[180,181]
		Luffin-b	RIP 1	27275 Da	0.84 ng/mL	Samen	[180,181]
		α-Luffin	RIP 1	28 kDa	10 ng/mL; 34.1 pM	Samen	[182-184]
		β-Luffin	RIP 1	29 kDa	50 ng/mL	Samen	[183,185]
		LRIP	RIP 1	30 kDa	8 pM	Samen	[186]
		Luffacylin	sRIP 1	7.8 kDa	0.14 nM	Samen	[187]
		Luffin P1	sRIP 1	5226.1 Da	0.88 nM	Samen	[188]
		Luffin-S	sRIP 1 Kandidat	10 kDa	0.34 nM	Samen	[189]
		LuffinS(1)	sRIP 1 Kandidat	8 kDa	130 nM	Samen	[190]
		LuffinS(2) = luffin S2	sRIP 1 Kandidat	7.8 kDa	10 nM	Samen	[190,191]
		LuffinS(3)	sRIP 1 Kandidat	8 kDa	630 nM	Samen	[190]
	<i>Marah oreganus</i> (Torr. & A. Gray) Howell	MOR-I	RIP 1	27989 Da	0.063 nM	Samen	[192]
		MOR-II	RIP 1	27632 Da	0.071 nM	Samen	[192]
	<i>Momordica balsamina</i> L.	Balsamin	RIP 1	28.6 kDa	90.6 ng/mL	Samen	[193]
		MbRIP-1	RIP 1	30 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[194,195]
		Momordin II	RIP 1	k.A. <sup>4</sup>	k.A. <sup>4</sup>	rekomb. <sup>6</sup>	[196]
	<i>Momordica charantia</i> L.	MAP 30	RIP 1	30 kDa	3.3 nM	Samen und Früchte	[197,198]
		α-Momorcharin = α-MC = α-MMC	RIP 1	28625– 28795 Da	0.23 nM	Samen	[199-207]
		β-Momorcharin = β-MC = β-MMC	RIP 1	29074– 29076 Da	0.19 nM	Samen	[199-201,203- 206]
		γ-Momorcharin = γ-MMC	sRIP 1	11.5 kDa	55 nM	Samen	[208]
		δ-Momorcharin = δ-MMC	RIP 1	30 kDa	0.15 nM	Samen	[206]
		ε-Momorcharin	RIP 1 Kandidat	24 kDa	170 nM	Früchte	[206]
		Momordin	RIP 1	31 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[209]
		Momordin = <i>Momordica charantia</i> inhibitor	RIP 1	23–24 kDa	1.8 ng/mL	Samen	[210-215]
		Momordin II	RIP 1	k.A. <sup>4</sup>	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[216]

Tabelle 1. Fortsetzung

Familie	Spezies <sup>1</sup>	Protein	Klassifiz.	Mw <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>3</sup>	Gewebe	Literatur
Cucurbitaceae	<i>Momordica charantia</i> L.	Momordin-a	RIP 1	29.4 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[217,218]
		Momordin-b	RIP 1	29.4 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[217]
		Charantin	sRIP 1	9.7 kDa	400 nM	Samen	[219]
		MCL = <i>M. charantia</i> lectin	Lektin	12.4 kDa	-	Samen	[220]
		MCL = <i>Momordica charantia</i> seed lectin = <i>Momordica charantia</i> lectin	RIP 2	115– 124 kDa	1.74 µg/mL; 5 µg/mL	Samen	[210,221-223]
		MCL1	RIP 2	60993 Da	1.9 nM	Samen	[224]
		anti-H Lektin	Lektin	150 kDa	-	Samen	[225]
		Momordica agglutinin	Lektin	30 kDa	-	Samen	[226]
		Momordin	Lektin	22–23 kDa	-	Samen	[226]
		protein fraction 1	Lektin	49 kDa	-	Samen	[227]
	protein fraction 2	Lektin	49 kDa	-	Samen	[227]	
	<i>Momordica cochinchinensis</i> Spreng.	Cochinin B	RIP 1	28 kDa	0.36 nM	Samen	[228]
		Momorcochin	RIP 1	32 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Knollen	[203,229]
		Momorcochin-S	RIP 1	30 kDa	0.12 nM	Samen	[228,230]
	<i>Siraitia grosvenorii</i> (Swingle) C.Jeffrey ex A.M.Lu & Zhi Y.Zhang [Syn.: <i>Momordica grosvenorii</i> Swingle]	Momorgrosvin	RIP 1	27.7 kDa	0.3 nM	Samen	[231]
		<i>Sechium edule</i> (Jacq.) Sw.	Sechiumin	RIP 1	27 kDa	0.7 nM	Samen
	<i>Sechium edule</i> fruit lectin		Lektin	44 kDa	-	Früchte	[233]
	<i>Trichosanthes anguina</i> L.	Trichoanguin	RIP 1	35 kDa	0.08 nM	Samen	[234]
		SGSL	Lektin/ RIP 2 ähnlich	62 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[235-237]
	<i>Trichosanthes cordata</i> Roxb.	TCA-I	Lektin	59 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[238]
		TCA-II	Lektin	52 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[238]

Tabelle 1. Fortsetzung

Familie	Spezies <sup>1</sup>	Protein	Klassifiz.	Mw <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>3</sup>	Gewebe	Literatur
Cucurbitaceae	<i>Trichosanthes cucumerina</i> L.	TCSL	Lektin/ RIP 2 Kandidat	69 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[239]
	<i>Trichosanthes cucumeroides</i> (Ser.) Maxim.	β-Trichosanthin = β-TCS	RIP 1	28 kDa	2.8 ng/mL; 0.1 nM	Knollen	[203,240,241]
	<i>Trichosanthes kirilowii</i> Maxim.	α-Kirilowin	RIP 1	28.8 kDa	1.2-1.8 ng/mL; 0.044– 0.066 mM	Samen	[242]
		β-Kirilowin	RIP 1	27.5 kDa	1.8 ng/mL	Samen	[243]
		TAP 29	RIP 1	29 kDa	3.7 nM	Knollen	[244,245]
		TK-35	RIP 1	35117 Da	2.45 nM	Zellkulturen	[246]
		Trichobitacin	RIP 1	27228 Da	k.A. <sup>4</sup>	Knollen	[247-249]
		Trichokirin	RIP 1	27 kDa	0.06–0.13 nM	Samen	[250]
		Trichomislin = TCM	RIP 1	27211 Da	2.26 nM	rekomb. <sup>6</sup>	[251]
		Trichosanthin = Trichosanthes antiviral protein = TAP = TCS = α-Trichosanthin = α-TCS = GLQ223	RIP 1	26–28 kDa	6.1 ng/mL; 0.23 nM; 0.36 ng/mL; 1.31 nM	Knollen	[201,203,241,2 51-259]
		Trichosanthin	RIP 1	25 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Knollen	[260]
		β-Trichosanthin = β-TCS	RIP 1	26 kDa	7 ng/mL	Knollen	[258]
		γ-Trichosanthin = γ-TCS	RIP 1	26 kDa	12 ng/mL	Knollen	[258]
		Trichokirin S1	sRIP 1	11426 Da	0.7 nM	Samen	[261]
		S-Trichokirin	sRIP 1	8 kDa	115 pM	Samen	[262]
		Trichosanthrop	sRIP 1	10964 Da	1.6 ng/mL	Samen	[259]
		TKL-1 = <i>Trichosanthes kirilowii</i> lectin-1	Lektin/ RIP 2 Kandidat	60 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Knollen	[263,264]
		TK-I	Lektin	k.A. <sup>4</sup>	-	Knollen	[265,266]
		TK-II	Lektin	k.A. <sup>4</sup>	-	Knollen	[265,266]
		TK-III	Lektin	k.A. <sup>4</sup>	-	Knollen	[265,266]
<i>Trichosanthes kirilowii</i> lectin	Lektin	57 kDa	-	Samen	[267]		

Tabelle 1. Fortsetzung

Familie	Spezies <sup>1</sup>	Protein	Klassifiz.	Mw <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>3</sup>	Gewebe	Literatur
Cucurbitaceae	<i>Trichosanthes kirilowii</i> Maximovicz	Karasurin-A	RIP 1	27215 Da	0.1–0.3 ng/mL	Knollen	[268-271]
	var. <i>japonica</i> (Miquel) Kitamura	Karasurin-B	RIP 1	27214 Da	0.1–0.3 ng/mL	Knollen	[270]
		Karasurin-C	RIP 1	27401 Da	0.1–0.3 ng/mL	Knollen	[270]
	<i>Trichosanthes lepiniata</i>	Trichomaglin	RIP 1	24673 Da	10.1 nM	Knollen	[272]
	<i>Trichosanthes dioica</i> Roxb.	TDSL	Lektin/ RIP 2 Kandidat	55 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[273]
	<i>Trichosanthes</i> sp. Bac Kan 8-98	Trichobakin	RIP 1	27 kDa	3.5 pM	Blätter	[274]
Cupressaceae	<i>Thuja occidentalis</i> L.	Arborvitae RIP	RIP Kandidat	k.A. <sup>4</sup>	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[275]
Euphorbiaceae	<i>Croton tiglium</i> L.	Croton I	RIP 1 Kandidat	40 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[276-278]
		Croton 2	RIP 1	k.A. <sup>4</sup>	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[279-281]
	<i>Euphorbia characias</i> L.	<i>E. characias</i> lectin	Lektin	80 kDa	-	Milchsaft	[282]
	<i>Suregada multiflora</i> (A.Juss.) Baill. [Syn.: <i>Gelonium multiflorum</i> A.Juss.]	Gelonin = GAP 31	RIP 1	30–31 kDa	0.406 ng/mL; 0.32 nM	Samen	[129,283-286]
	<i>Hura crepitans</i> L.	<i>Hura crepitans</i> RIP	RIP 1	28 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Milchsaft, Blätter	[27,45]
		<i>Hura crepitans</i> RIP-5	RIP 1	k.A. <sup>4</sup>	k.A. <sup>4</sup>	Milchsaft	[287]
		<i>Hura crepitans</i> latex lectin	RIP 2	112 kDa	-	Milchsaft	[282]
		Crepitin	Lektin	k.A. <sup>4</sup>	k.A. <sup>4</sup>	Milchsaft	[288,289]
		Hurin	Lektin	70 kDa	-	Samen	[290,291]
		<i>Hura crepitans</i> seed lectin	Lektin	120 kDa	-	Samen	[289]
	<i>Jatropha curcas</i> L.	Curcin	RIP 1	28.2 kDa	0.42 nM	Samen	[276,292]
		Curcin 2	RIP 1	30.1 kDa	k.A. <sup>4</sup>	rekomb. <sup>6</sup>	[293,294]
		Curcin-L	RIP 1	32 kDa	4 µg/mL	Blätter	[295,296]
		Jc-SCRIP	RIP 1	38938 Da	k.A. <sup>4</sup>	Samenschale	[297]
	<i>Manihot palmata</i> Müll. Arg.	Mapalmin	RIP 1	32.3 kDa	0.05 nM	Samen	[116]

Tabelle 1. Fortsetzung

Familie	Spezies <sup>1</sup>	Protein	Klassifiz.	Mw <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>3</sup>	Gewebe	Literatur
Euphorbiaceae	<i>Manihot esculenta</i> Crantz. [Syn.: <i>Manihot utilissima</i> Pohl]	Manutin 1	RIP 1	k.A. <sup>4</sup>	0.05 nM	Samen	[287,298]
		Manutin 2	RIP 1	k.A. <sup>4</sup>	0.12 nM	Samen	[298]
	<i>Ricinus communis</i> L.	Ricin = crystalline Ricin = Ricin D	RIP 2	62.8 kDa	0.14 nM (A) <sup>5</sup> ; 814 pM; 5.5 ng/mL	Samen	[66,284,299-312]
		Ricin E	RIP 2	64 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[313-315]
		RCA = <i>Ricinus communis</i> agglutinin = RCA <sub>I</sub> = RCA <sub>120</sub> = <i>R. communis</i> hemagglutinin = RCB-PHA I	RIP 2	118– 130 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[306,316-324]
		RCA <sub>II</sub> = RCA <sub>60</sub> = RCB-PHA II	RIP 2	60 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[316,317,319,320]
	<i>Ricinus communis</i> , USA	Ricin 1	RIP 2	66 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[306,325]
		Ricin 2	RIP 2	66 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[306,325]
		Ricin 3	RIP 2	66 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[306,325]
	<i>Ricinus communis</i> , India	Ricin I	RIP 2	64 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[325,326]
		Ricin II	RIP 2	64 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[325,326]
		Ricin III	RIP 2	64 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[325,326]
	<i>Ricinus sanguienus</i> , France	Ricin <sub>11</sub>	RIP 2	57805 Da	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[325,327]
		Ricin <sub>12</sub>	RIP 2	62163 Da	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[325,327]
		Ricin <sub>2</sub>	RIP 2	63116 Da	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[325,327]
Fabaceae	<i>Abrus precatorius</i> L.	Abrin	RIP 2	260 kDa	0.5 nM (A) <sup>5</sup>	Samen	[29,310,318,326,328-333]
		Abrin-a = Abrin C = Abrin-III	RIP 2	63– 65.5 kDa	60 pM (A) <sup>5</sup>	Samen	[334-343]
		Abrin-b	RIP 2	67 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[336-338,341]
		Abrin-c = Abrin = Abrin-I	RIP 2	60.1– 62.5 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[334-337,339,340]
		Abrin-d	RIP 2	67 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[336,337,341]
		Abrin-II	RIP 2	63 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[340]



Tabelle 1. Fortsetzung

Familie	Spezies <sup>1</sup>	Protein	Klassifiz.	Mw <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>3</sup>	Gewebe	Literatur
Fabaceae	<i>Abrus precatorius</i> L.	APA = <i>Abrus precatorius</i> agglutinin = Abrus lectin = AAG	RIP 2	126– 134 kDa	3.5 nM	Samen	[318,336,344- 348]
		APA-I	RIP 2	130 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[340,349]
		APA-II	RIP 2	128 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[340]
	<i>Abrus pulchellus</i> Thwaites	Pulchellin	RIP 2	62 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[350-352]
		Pulchellin PI	RIP 2	61.5– 63 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[353]
		Pulchellin PII	RIP 2	61.5– 63 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[353]
		Pulchellin PIII	RIP 2	61.5– 63 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[353]
	<i>Pisum sativum</i> subsp. <i>sativum</i> L. [Syn.: <i>Pisum sativum</i> var. <i>arvense</i> (L.) Poir.]	α-Pisavin	RIP 1	20.5 kDa	0.5 nM	Samen	[354]
		β-Pisavin	RIP 1	18.7 kDa	0.5 nM	Samen	[354]
	<i>Pisum sativum</i> var. <i>macrocarpon</i>	Sativin	RIP 1 Kandidat	38 kDa	14 μM	Hülsen- früchte	[355]
Iridaceae	<i>Iris hollandica</i> var. Professor Blaauw	IrisRIP = IRIP	RIP 1	28 kDa	0.1–0.16 nM	Zwiebeln	[356,357]
		IrisRIP.A1	RIP 1	29 kDa	0.16 nM	Zwiebeln	[356]
		IrisRIP.A2	RIP 1	29 kDa	0.12 nM	Zwiebeln	[356]
		IrisRIP.A3	RIP 1	29 kDa	0.10 nM	Zwiebeln	[356]
		IRA	RIP 2	60.4 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Zwiebeln	[358]
		IRAb	RIP 2	65 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Zwiebeln	[359,360]
		IRAr	RIP 2	65 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Zwiebeln	[359]
Lamiaceae	<i>Clerodendrum</i> <i>aculeatum</i> (L.) Schltdl.	CA-SRI	RIP 1 Kandidat	34 kDa	<0.01 nM	Blätter	[361,362]
	<i>Clerodendrum</i> <i>inerme</i> (L.) Gaertn.	CIP-29	RIP 1	29 kDa	0.548 nM; 16 ng/mL	Blätter	[363,364]
		CIP-34	RIP 1 Kandidat	34 kDa	87.4 nM; 3 μg/mL	Blätter	[363,364]
	<i>Leonurus japonicus</i> Houtt.	Leonurin	RIP Kandidat	k.A. <sup>4</sup>	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[365]
Lauraceae	<i>Cinnamomum</i> <i>bodinieri</i> H. Lévl.	Bodinierin	RIP 2	65 kDa	1.2 nM (A) <sup>5</sup>	Fruchtkerne	[366]

Tabelle 1. Fortsetzung

Familie	Spezies <sup>1</sup>	Protein	Klassifiz.	Mw <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>3</sup>	Gewebe	Literatur	
Lauraceae	<i>Cinnamomum camphora</i> (L.) J.Presl	Camphorin	RIP 1	23 kDa	0.098 nM	Samen	[367,368]	
		Cinnamomin	RIP 2	61 kDa	9.7 nM (A) <sup>5</sup>	Samen	[367-370]	
		Cinnamomin 1	RIP 2	61 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[367]	
		Cinnamomin 2	RIP 2	k.A. <sup>4</sup>	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[367]	
		Cinnamomin 3	RIP 2	k.A. <sup>4</sup>	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[367]	
		Cinphorin	sRIP 2	46 kDa	1.2 nM	Samen	[370,371]	
	<i>Cinnamomum parthenoxylon</i> (Jack) Meisn. [Syn.: <i>Cinnamomum porrectum</i> (Roxb.) Kosterm.]	Porrectin	RIP 2	64.5 kDa	0.11 µM	Samen	[372]	
Malvaceae	<i>Abelmoschus esculentus</i> (L.) Moench	Abelesculin	RIP 1	30 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[373]	
Nyctaginaceae	<i>Boerhaavia diffusa</i> L.	<i>Boerhaavia</i> inhibitor	RIP 1 Kandidat	16–20 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Wurzeln	[374-376]	
	<i>Bougainvillea spectabilis</i> Willd.	BAP I	RIP 1	28 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Wurzeln	[377]	
		Bouganin = <i>Bougainvillea</i> RIP I	RIP 1	26.2 kDa	10.5 ng/mL	Blätter	[123,378]	
	<i>Bougainvillea × buttiana</i> cv. Enid Lancaster	BBP-24	RIP 1	24 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Blätter	[379,380]	
		BBP-28	RIP 1	28 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Blätter	[379,380]	
	<i>Bougainvillea × buttiana</i> cv. Mahara	BBAP1	RIP 1	35.49 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Blätter	[381,382]	
	<i>Mirabilis expansa</i> (Ruiz & Pav.) Standl.	ME1	RIP 1	29208 Da	k.A. <sup>4</sup>	Wurzeln	[383,384]	
		ME2	RIP 1	27 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Wurzeln	[384]	
	<i>Mirabilis jalapa</i> L.	MAP	RIP 1	27788 Da	5.4 ng/mL	Wurzeln, Samen	[376,385,386]	
		MAP-2	RIP 1	30412 Da	41.4 ng/mL	Samen	[386]	
		MAP-3	RIP 1	29771 Da	13.3 ng/mL	Samen	[386]	
		MAP-4	RIP 1	29339 Da	15.3 ng/mL	Samen und Blätter	[386]	
		MAP-5	RIP 1	27789 Da	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[149]	
	Olacaceae	<i>Malania oleifera</i> Chun & S. K. Lee	Malanin	Lektin/ RIP 2 Kandidat	61875 Da	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[387]

Tabelle 1. Fortsetzung

Familie	Spezies <sup>1</sup>	Protein	Klassifiz.	Mw <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>3</sup>	Gewebe	Literatur
Olacaceae	<i>Ximenia americana</i> L.	Riproximim = Rpx	RIP 2	56 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Fruchtkerne	[388,389]
		Rpx-I	RIP 2	50 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Fruchtkerne	[389]
		Rpx-II	RIP 2	53 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Fruchtkerne	[389]
Passifloraceae	<i>Adenia digitata</i> (Harv.) Engl.	Modeccin = Modeccin 4B	RIP 2	57–63 kDa	4 µg/mL; 2.52 µg/mL; 66 ng/mL (A) <sup>5</sup>	Wurzeln	[390-393]
		Modeccin 6B	RIP 2	57 kDa	0.31 µg/mL	Wurzeln	[393]
	<i>Adenia ellenbeckii</i> Harms	<i>A. ellenbeckii</i> lectin	RIP 2 Kandidat	60 kDa	10.1 µg/mL; 1.2 µg/mL (A) <sup>5</sup>	Caudex	[46]
	<i>Adenia fruticosa</i> Burt Davy	<i>A. fruticosa</i> lectin	Lektin	30 kDa	>100 µg/mL	Caudex	[46]
	<i>Adenia glauca</i> Schinz	<i>A. glauca</i> lectin	RIP 2 Kandidat	k.A. <sup>4</sup>	>10 µg/mL; >5 µg/mL (A) <sup>5</sup>	Caudex	[46]
	<i>Adenia goetzei</i> Harms (unresolved name)	<i>A. goetzei</i> lectin	RIP 2	60 kDa	55.1 µg/mL; 0.7 µg/mL (A) <sup>5</sup>	Caudex	[46]
	<i>Adenia keramanthus</i> Harms	<i>A. keramanthus</i> lectin	RIP 2 Kandidat	60–65 kDa	10.0 µg/mL; 1.1 µg/mL (A) <sup>5</sup>	Caudex	[46]
	<i>Adenia lanceolata</i> Engl.	Lanceolin	RIP 2	60 kDa	5.2 µg/mL; 1.1 µg/mL (A) <sup>5</sup>	Caudex	[46,394,395]
	<i>Adenia racemosa</i> W. J. de Wilde	<i>A. racemosa</i> lectin	Lektin	30 kDa	>400 µg/mL	Caudex	[46]
	<i>Adenia spinosa</i> Burt Davy	<i>A. spinosa</i> lectin	RIP 2 Kandidat	k.A. <sup>4</sup>	4.7 µg/mL; 0.8 µg/mL (A) <sup>5</sup>	Caudex	[46]
	<i>Adenia stenodactyla</i> Harms	Stenodactylin	RIP 2	60 kDa	5.6 µg/mL; 0.5 µg/mL (A) <sup>5</sup>	Caudex	[46,394,395]
	<i>Adenia venenata</i> Forssk.	<i>A. venenata</i> lectin	RIP 2 Kandidat	60 kDa	2.4 µg/mL; 0.4 µg/mL (A) <sup>5</sup>	Caudex	[46]
	<i>Adenia volkensii</i> Harms	Volkensin	RIP 2	62 kDa	5 µg/mL; 84 nM; 0.37 nM (A) <sup>5</sup> 22 ng/mL (A) <sup>5</sup> ; 7.5 µg/mL; 0.6 µg/mL (A) <sup>5</sup>	Wurzeln	[46,396-398]

Tabelle 1. Fortsetzung

Familie	Spezies <sup>1</sup>	Protein	Klassifiz.	Mw <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>3</sup>	Gewebe	Literatur
Phytolaccaceae	<i>Phytolacca americana</i> L.	α-PAP	RIP 1	33068 kDa	k.A. <sup>4</sup>	rekomb. <sup>6</sup>	[399,400]
		PAP = <i>Phytolacca americana</i> protein = pokeweed antiviral protein	RIP 1	29–30 kDa	0.29 nM	Blätter	[29,401-406]
		PAP-I	RIP 1	30 kDa	2 pM	Blätter	[407]
		PAP-II	RIP 1	30–31 kDa	4 pM	Blätter	[401,404,407,408]
		PAP-III	RIP 1	30 kDa	3 pM	Blätter	[407]
		PAP-C	RIP 1	29 kDa	0.062 nM; 2 ng/mL	Zellkulturen	[409]
		PAP-H	RIP 1	29.5 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Wurzeln	[410]
		PAP-R	RIP 1	29.8 kDa	0.05 nM	Wurzeln	[116]
		PAP-S	RIP 1	30 kDa	36-83 nM; 1.09– 2.5 ng/mL	Samen	[401,411]
		PAP-S1	RIP 1	k.A. <sup>4</sup>	k.A. <sup>4</sup>	rekomb. <sup>6</sup>	[400]
		PAP-S2	RIP 1	k.A. <sup>4</sup>	k.A. <sup>4</sup>	rekomb. <sup>6</sup>	[400]
	<i>Phytolacca dioica</i> L.	Diocin 1	RIP 1	30047 Da	19.74 ng/mL; 0.658 nM	Blätter	[412]
		Diocin 2	RIP 1	29910 Da	6.85 ng/mL; 0.229 nM	Blätter	[412]
		PD-L1	RIP 1	32715 Da	102 pM; 3.32 ng/mL; 8.5 pM	Blätter	[413,414]
		PD-L2	RIP 1	31542 Da	110 pM; 3.46 ng/mL	Blätter	[413,415]
		PD-L3	RIP 1	30356 Da	228 pM; 6.93 ng/mL	Blätter	[413,415]
		PD-L4	RIP 1	29185 Da	134 pM; 3.92 ng/mL	Blätter	[413,416]
		PD-S1	RIP 1	30.9 kDa	0.12 nM	Samen	[417]
		PD-S2	RIP 1	29586 Da	0.06 nM	Samen	[417,418]
PD-S3	RIP 1	32 kDa	0.08 nM	Samen	[417]		

Tabelle 1. Fortsetzung

Familie	Spezies <sup>1</sup>	Protein	Klassifiz.	Mw <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>3</sup>	Gewebe	Literatur
Phytolaccaceae	<i>Phytolacca dodecandra</i> L'Hér.	Dodecandrin	RIP 1	29 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Blätter	[419,420]
		Dodecandrin C	RIP 1	31–32 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Zellkulturen	[420]
	<i>Phytolacca heterotepala</i> H. Walter	Heterotepalin 4	RIP 1	29326 Da	82 pM	Blätter	[421]
		Heterotepalin 5b	RIP 1	30477 Da	52 pM	Blätter	[421]
	<i>Phytolacca insularis</i> Nakai	Insularin = PIP = <i>Phytolacca insularis</i> antiviral protein	RIP 1	31 kDa	k.A. <sup>4</sup>	rekomb. <sup>6</sup>	[7,422]
		PIP2 = <i>P. insularis</i> antiviral protein 2	RIP 1	29.6 kDa	0.04 nM	rekomb. <sup>6</sup>	[423]
Poaceae	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Barley toxin = Barley translation inhibitor = Barley Protein Synthesis Inhibitor = BPSI = RIP 30	RIP 1	30 kDa	0.47 nM	Samen	[284,424-427]
		Barley toxin I = Barley translation inhibitor I	RIP 1	30 kDa	25 ng/mL	Samen	[425]
		Barley toxin II = Barley translation inhibitor II = Barley Protein Synthesis Inhibitor II = BPSI II	RIP 1	29836 Da	25 ng/mL	Samen	[284,424,425,428]
		Barley toxin III = Barley translation inhibitor III	RIP 1	30 kDa	15 ng/mL	Samen	[284,425]
		JIP60	RIP 3/ peculiar RIP 1	60 kDa	k.A. <sup>4</sup>	rekomb. <sup>6</sup>	[5,429]

Tabelle 1. Fortsetzung

Familie	Spezies <sup>1</sup>	Protein	Klassifiz.	Mw <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>3</sup>	Gewebe	Literatur	
Poaceae	<i>Oryza sativa</i> L.	<i>Oryza sativa</i> RIP	RIP 1	27 kDa	k.A. <sup>4</sup>	rekomb. <sup>6</sup>	[430]	
	<i>Secale cereale</i> L.	RPSI	RIP 1	30171 Da	0.42 µg/mL	Samen	[424,431]	
	<i>Triticum aestivum</i> L.	Tritin	RIP 1	RIP 1	30 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Keimlinge	[424,432-434]
		Tritin 1	RIP 1	RIP 1	30 kDa	250 ng/mL	ganze Pflanze	[435]
		Tritin 2	RIP 1	RIP 1	30 kDa	250 ng/mL	ganze Pflanze	[435]
		Tritin 3	RIP 1	RIP 1	30 kDa	250 ng/mL	ganze Pflanze	[435]
		Tritin-S	RIP 1	RIP 1	32.1– 32.8 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Samen	[436]
	Tritin-L	RIP 1	RIP 1	37.0– 37.9 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Blätter	[436]	
	<i>Zea mays</i> L.	b-32 = maize RIP = maize proRIP1	RIP 3/ peculiar RIP 1	RIP 3/ peculiar RIP 1	34 kDa	28–60 pM; 0.7–1.5 ng/mL; 0.065 nM	Samen	[4,437-441]
Maize proRIP2		RIP 3/ peculiar RIP 1	RIP 3/ peculiar RIP 1	31.1 kDa	k.A. <sup>4</sup>	rekomb. <sup>6</sup>	[439,440]	
Ranunculaceae	<i>Eranthis hyemalis</i> (L.) Salisb.	EHL	RIP 2	62 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Knollen	[442,443]	
Santalaceae	<i>Phoradendron californicum</i> Nutt.	PCL	RIP 2	69 kDa	k.A. <sup>4</sup>	n.n	[444]	
	<i>Viscum album</i> L. (Himalayan mistle- toe)	HmRip	RIP 2	RIP 2	65 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Blätter	[445-447]
		HmRip 1	RIP 2	RIP 2	65 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Blätter	[445-447]
		HmRip 2	RIP 2	RIP 2	65 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Blätter	[445-447]
		HmRip 3	RIP 2	RIP 2	65 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Blätter	[445-447]
		HmRip 4	RIP 2	RIP 2	65 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Blätter	[445-447]
	<i>Viscum album</i> L. (European mistle- toe)	ML-I = Mistletoe lectin I = Viscumin = Eu-ML = EML-1 = VAA-I	RIP 2	RIP 2	115– 125 kDa	2.6 µg/mL; 0.21 µg/mL (A) <sup>5</sup> ; 3.7 pM (A) <sup>5</sup>	Blätter	[237,448-457]
		ML-II = Mistletoe lectin II = VAA-II	RIP 2	RIP 2	60–64 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Blätter	[449,453-455]
		ML-III = Mistletoe lectin III = VAA-III	RIP 2	RIP 2	50–61 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Blätter	[449,453-455]

Tabelle 1. Fortsetzung

Familie	Spezies <sup>1</sup>	Protein	Klassifiz.	Mw <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>3</sup>	Gewebe	Literatur
Santalaceae	<i>Viscum articulatum</i> Burm. f.	Articulatin-D	RIP 2	66 kDa	k.A. <sup>4</sup>	ganze Pflanze	[458]
	<i>Viscum coloratum</i> (Kom.) Nakai [Syn.: <i>Viscum album</i> subsp. <i>coloratum</i> Kom.]	KML	RIP 2	k.A. <sup>4</sup>	k.A. <sup>4</sup>	Blätter	[459]
		KML-C	RIP 2	59.5 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Blätter	[457,460]
	<i>Viscum album</i> subsp. <i>coloratum</i> Kom.]	KML-III	RIP 2	60 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Blätter	[460]
		KML-IIU	RIP 2	64 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Blätter	[460]
	VCA	RIP 2	60 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Blätter	[461,462]	
Solanaceae	<i>Nicotiana</i> <i>tabacum</i> L.	CIP31	RIP-ähnliches Protein	31 kDa	k.A. <sup>4</sup>	Blätter	[463]
		TRIP	RIP 1 Kandidat	26 kDa	100 ng/mL	Blätter	[464]
Thymelaeaceae	<i>Phaleria macrocarpa</i> (Scheff.) Boerl.	<i>P. macrocarpa</i> RIP	RIP Kandidat	k.A. <sup>4</sup>	k.A. <sup>4</sup>	Blätter	[465]

<sup>1</sup> Für den botanischen Namen der Pflanze wurde der aktuell akzeptierte Name angegeben, der unter [www.theplantlist.org](http://www.theplantlist.org) gelistet ist. In manchen Fällen wurde zusätzlich ein Synonym mit angegeben, weil das Protein, welches aus der entsprechenden Pflanze stammt, von diesem Synonym abgeleitet wird; <sup>2</sup> Für die Molekülmasse (Mw = molecular weight) wurde der aktuellste Wert des nativen, nicht reduzierten Proteins angegeben, der durch Gelfiltration oder SDS-PAGE erhalten wurde. Für den Fall, dass für dasselbe Protein eine Vielzahl unterschiedlicher Werte existiert, wurde eine Spannweite angegeben. Für den Fall, dass ein exakter Wert existiert, der durch Massenspektrometrie erhalten wurde, wurde dieser angegeben; <sup>3</sup> Der IC<sub>50</sub>-Wert gibt die halbe minimal inhibierende Konzentration (50%) des Proteins an, welche die Translation in einem zellfreien System unter Verwendung eines Kaninchen Retikulozyten Lysats inhibiert. Für die IC<sub>50</sub>-Werte wurden die Werte der molaren Masse oder die Konzentration angegeben. In manchen Fällen waren zu viele unterschiedliche Werte zu finden, sodass eine Spannweite angegeben wurde; <sup>4</sup> k.A. = keine Angabe. Im Fall der IC<sub>50</sub>-Werte gab es mehrere Gründe für k.A.: 1. Der zellfreie Kaninchen Retikulozyten Lysat Assay zur Quantifizierung der inhibierenden Wirkung wurde nicht durchgeführt, 2. Es wurde ein anderer Assay als der zellfreie Kaninchen Retikulozyten Lysat Assay durchgeführt, z.B. unter Verwendung von Krebszellen, 3. Der IC<sub>50</sub>-Wert wurde in der Literatur unter Verwendung einer anderen Einheit angegeben, z.B. mg/kg; <sup>5</sup> (A) = A-Kette. Der IC<sub>50</sub>-Wert, der mit einem (A) versehen wurde, repräsentiert den Wert für die A-Kette des entsprechenden reduzierten Typ 2 RIPs; <sup>6</sup> rekomb. = rekombinant. Für Proteine, die durch einen biotechnologischen Prozess erhalten wurden.

## 1.2 Agrostin aus *Agrostemma githago* L. (Kornrade)

Die Kornrade ist eine einjährige krautige Pflanze mit einer Wuchshöhe von 60-90 cm und zählt zu der Familie der Nelkengewächse (Caryophyllaceae). 1753 wurde sie von Carl von Linné in seinem Werk „Species Plantarum“ als *Agrostemma githago* L. beschrieben. Als ein Vertreter der Ackerbegleitflora ist es in der Vergangenheit oft vorgekommen, dass die Samen der Kornrade mit zu Mehl verarbeitet wurden, wodurch es zu Vergiftungserscheinungen bei Mensch und Tier kam. Nicolai Kraskal hat 1891 in seiner Dissertationsarbeit die Toxizität der Kornrade untersucht, nachdem es im russischen Heer zu massiven Vergiftungen, die sich u.a. als Brechdurchfall, später Schwindel, Kopfschmerzen, Krämpfen, Atemlähmung und Kreislaufstörungen äußerten und heutzutage als Githagismus bezeichnet werden, gekommen war [466]. Durch ihn wurden daraufhin neue Grenzwerte für den Gehalt von Kornradesamen im Mehl festgelegt, wodurch die Ackerbauwirtschaft neue Methoden des Anbaus und der Saatgutreinigung anwandte. Durch den zusätzlichen Gebrauch von Herbiziden im 20. Jahrhundert verschwand die Kornrade immer mehr von den Ackerfeldern und gilt heute als

eine vom Aussterben bedrohte Art. 2003 wurde die Kornrade von der Stiftung Naturschutz Hamburg und Stiftung zum Schutze gefährdeter Pflanzen („Loki-Schmidt-Stiftung“) zur Blume des Jahres gekürt.

Hauptinhaltsstoffe der Samen sind die Triterpensaponine Githagosid, Agrostemmasaponin 1 und Agrostemmasaponin 2. Alle enthalten Gypsogenin als Aglykon. Außerdem sind ca. 6% fettes Öl und das RIP 1 Agrostin enthalten. Bis zum Ende des 20. Jahrhunderts wurden die Vergiftungserscheinungen alleine den in den Samen enthaltenen Saponinen zugesprochen, weshalb auch von einem sogenannten Sapotoxin die Rede war [467]. Da mit der Modernisierung der Ackerbauwirtschaft immer weniger Fälle des Githagismus auftauchten, verlor man auch das naturwissenschaftliche Interesse zur Aufklärung der Toxizität [468]. Erst 1998 wurden die Saponine aus der Kornrade erneut untersucht [469], wobei Zytotoxizitätsuntersuchungen der isolierten Saponine durchgeführt wurden. M.F. Melzig und P. Hebstreit erkannten daraufhin, dass nicht die Saponine alleine für die Toxizität verantwortlich sein konnten, indem sie die Zytotoxizitätsuntersuchungen der isolierten Saponine mit denen des wässrigen Extraktes der Kornradesamen in Korrelation setzten und zu dem Ergebnis kamen, dass die Toxizität des wässrigen Extraktes um ein Vielfaches höher war als die der isolierten Saponine, die mit Methanol extrahiert wurden. Dieses Ergebnis wurde weiterhin untersucht bis die Hypothese aufgestellt wurde, dass die Toxizität durch ein synergistisches Zusammenwirken der Saponine mit dem in den Samen enthaltenen Agrostin herrührt [126]. Diese Hypothese wurde in der Dissertationsarbeit von P. Hebestreit untersucht, in der er die synergistischen Effekte von verschiedenen Saponinen mit verschiedenen Toxinen, die meist strukturell oder funktionell mit dem Agrostin verwandt waren, gegenüber stellte [468]. Durch die Wahl geeigneter Kombinationen von bestimmten Saponinen und Toxinen konnte die toxische Wirkung der Toxine so reguliert werden, dass diese in solch niedrigen Konzentrationen eingesetzt wurden, in denen sie alleine *in vitro* nicht toxisch wirksam waren, jedoch durch den synergistischen Effekt mit den Saponinen eine beachtliche Toxizität zeigten.

Das Agrostin wurde 1983 erstmals von Stirpe *et al.* isoliert [45]. Dabei wurde mit dem wässrigen Extrakt der Kornradesamen eine Kationenaustauschchromatographie mit Carboxymethylcellulose durchgeführt, wobei mehrere Fraktionen eluiert wurden und auf Absorption bei 280 nm photometrisch untersucht wurden. Jede Fraktion, die bei 280 nm absorbierte, wurde im Anschluss auf den inhibierenden Effekt der Proteinsynthese in einem zellfreien



Kaninchen Retikulozyten Lysat untersucht. Es wurden drei Fraktionen erhalten, bei denen die inhibierende Aktivität im Verhältnis zu den anderen Fraktionen am größten war, die entsprechend ihrer Reihenfolge der Elution als „Peak 2, Peak 5 und Peak 6“ bezeichnet wurden und in einer späteren Arbeit von F. Stirpe und L. Barbieri [125] als Agrostin 2, Agrostin 5 und Agrostin 6 benannt wurden. Durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) konnten die Molekülmassen dieser drei Proteine bestimmt werden: 30.6 kDa (Agrostin 2), 29.5 kDa (Agrostin 5) und 29.6 kDa (Agrostin 6), wobei das Agrostin 5 das am stärksten exprimierte Protein zu sein schien. Zusätzlich wurden die Molekülmassen durch eine Gelfiltration ermittelt: 29.2 kDa (Agrostin 2), 25.5 kDa (Agrostin 5) und 27 kDa (Agrostin 6). Außerdem konnten der isoelektrische Punkt (pI) dieser Proteine ermittelt werden:  $pI_{\text{Agrostin 2}} = 7.7$ ,  $pI_{\text{Agrostin 5}} = 8.7$  und  $pI_{\text{Agrostin 6}} = 8.75$ . In einer späteren Arbeit von P. Hebestreit & M.F. Melzig [126], in der mit dem wässrige Extrakt der Kornradesamen ebenfalls eine Kationenaustauschchromatographie und Größenausschlusschromatographie durchgeführt wurde, konnte lediglich ein Protein isoliert werden, welches nach erfolgter SDS-PAGE eine Größe von 27 kDa zeigte.



**Abb. 1:** Foto von *Agrostemma githago* im Juni. Standort: Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, HU Berlin.

### 1.3 Zielsetzung

Der Einsatz von RIPs als zielgerichtete Toxine gegen Krebszellen insbesondere unter Verwendung von bestimmten Saponinen, die zu einem synergistischen Effekt verhelfen, stellt

einen interessanten Ansatz zur Krebstherapie dar. Dementsprechend sind solche Pflanzen von großem Interesse, in denen sowohl Saponine als auch RIPs vorkommen. Von daher fiel das Hauptaugenmerk auf Vertreter der Familie der Nelkengewächse (Caryophyllaceae), die besonders bekannt für die Synthese von Saponinen sind. Tabelle 1 zeigt, dass es 13 Caryophyllaceae-Arten gibt, die ein oder mehrere RIPs produzieren, von denen bisher lediglich Dianthin 30 aus *Dianthus caryophyllus*, Lychnin aus *Silene chalcedonica*, Saporin aus *Saponaria officinalis*, Stellarin aus *Myosoton aquaticum* und RIP Q3 aus *Stellaria media* hinsichtlich der Aminosäuresequenz vollständig charakterisiert sind. Teilweise sequenziert sind Petroglaucin 1 aus *Silene glaucifolia* und Petrograndin aus *Silene laxipruinosa*. Da vom Agrostin aus *Agrostemma githago* nur die Molekülmasse sowie der isoelektrische Punkt bekannt sind und da in der nahen Vergangenheit bereits zytotoxische Untersuchungen mit dem Agrostin durchgeführt wurden ohne strukturelle Vergleiche mit anderen Typ 1 RIPs ziehen zu können, war das Ziel dieser Arbeit das Protein aus den Samen zu isolieren und zu sequenzieren, um die Sequenz anschließend mit den Sequenzen der RIPs der anderen Caryophyllaceae-Arten zu vergleichen.

## 2 Materialien

### 2.1 Chemikalien

- 2-Mercaptoethanol; Sigma-Aldrich
- Acrylamid Rotiphorese® Gel 30; Carl Roth
- Agarose Roti®garose; Carl-Roth
- Ammoniumhydrogencarbonat  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ; Carl Roth
- Ammoniumsulfat  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; Carl Roth
- Ammoniumperoxodisulfat (APS); Merck
- Ampicillin; Sigma-Aldrich
- Brij® 58; AppliChem
- Bromphenolblau; Serva
- Citronensäure-Monohydrat; Carl Roth
- cComplete™ Protease Inhibitor Cocktail; Roche
- Coomassie® Brillantblau G-250; AppliChem
- Cumarinsäure; Sigma-Aldrich
- Dimethylsulfoxid (DMSO); Carl Roth
- di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; Carl Roth
- Dithiothreitol (DTT); Carl Roth
- Ethylendiamintetraacetat (EDTA); Carl Roth
- Eisessig; Merck
- Ethanol 100%; HERBETA Arzneimittel
- Ethanolamin ROTIPURAN®; Carl Roth
- Ethidiumbromidlösung 0.5%; Carl Roth
- Formaldehyd ROTIPURAN® 32%; Carl Roth
- Glutardialdehyd 25%; Carl Roth
- Glycin; Carl Roth
- Heringsperma DNA UltraPure™ Herring Sperm DNA Solution; Thermo Fisher Scientific
- Iodacetamid; Sigma-Aldrich
- Isopropanol ROTIPURAN® 99.8%; Carl Roth
- Kaliumchlorid; Merck
- Kaliumdihydrogenphosphat  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; Merck

- LB Medium (Luria/Miller); Carl Roth
- LB Medium mit Agar (Lennox); Sigma-Aldrich
- Luminol; Carl Roth
- Natriumacetat; Carl Roth
- Natriumazid  $\text{NaN}_3$ ; Carl Roth
- Natriumchlorid; Carl Roth
- Natriumcitrat; Carl Roth
- Natriumhydrogencarbonat  $\text{NaHCO}_3$ ; Merck
- Natriumdodecylsulfat (SDS); MP Biomedicals
- Natriumhydroxid 1 N; Carl Roth
- *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) Pierce<sup>®</sup> NHS-Activated Agarose Slurry; Thermo Fisher Scientific
- *N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin (TEMED); AppliChem
- Petrolether ROTISOLV<sup>®</sup>; Carl Roth
- Protein A Pierce<sup>®</sup> Protein A Agarose; Thermo Fisher Scientific
- Röntgenfilmentwickler Unimatic D; Calbe Chemie
- Salzsäure ROTIPURAN<sup>®</sup> 37%; Carl Roth
- Silbernitrat; Carl Roth
- TRIS-HCL PUFFERAN<sup>®</sup>; Carl Roth
- TRIS PUFFERAN<sup>®</sup>; Carl Roth
- Wasserstoffperoxid 35%; Merck
- Xylencyanol FF; Sigma-Aldrich

## 2.2 Geräte

### Geräte zur Polyacrylamidgel-Elektrophorese:

- Netzgerät EV261; Consort BVBA
- Thermoblock Grant QBT1; Grant Instruments
- Vertikal-Elektrophorese-System MGV-202; C.B.S. Scientific

### Geräte zur Agarosegel-Elektrophorese:

- Elektrophoresekammer und Zubehör Mini-Sub<sup>®</sup> Cell GT System; Bio-Rad
- Netzgerät Biometra<sup>®</sup> Standard Power Pack P25; Biometra

**Geräte zum Western Blot:**

- Blottkammer Trans-Blot Cell, Bio-Rad
- Netzgerät Standard Power Pack P25; Biometra GmbH
- Umwältzthermostat MultiTemp® III; Pharmacia Biotech

**Geräte zur Massenspektrometrie:**

- Kühlfalle Unicryo MC2 L-60.0C; UniEquip
- Massenspektrometer Ultraflex II TOF/TOF; Bruker
- Pumpe Chemie-Hybrid Pumpe RC5; vacuubrand
- Vakuum-Zentrifuge Univapo 150 H; UniEquip

**Zentrifugen:**

- Medium Tischzentrifuge Megafuge2.0 R; Heraeus
- Mikrozentrifuge Centrifuge 5415 R; Eppendorf
- Tischzentrifuge Spectrafuge™ Mini Centrifuge; Labnet
- Tischzentrifuge Hettich Mikro 20; Hettich
- Tischzentrifuge himac CT6E; Hitachi
- Ultrazentrifuge Optima™ L-90K; Beckmann Coulter

**Sonstige Geräte:**

- Analysenwaage BP 211 D; Sartorius
- Dunkelhaube Dark Hood DH-10; Biostep
- Gefriertrockner Alpha 2-4 D; Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen
- Magnetrührer Heidolph MR 3000; Heidolph
- Mikroplattenphotometer SpectraMax® 340PC384 Microplate Reader; Molecular Devices
- Mikroplattenphotometer Tecan Infinite® 200; Tecan Group
- pH-Meter pH 526 Multical®; Wissenschaftlich-Technische Werkstätten
- Pipette Eppendorf Reference® 10 µL, 200 µL, 1000 µL; Eppendorf
- Pipette 0.1 – 2 µL, 0.5 – 10 µL, 2 – 20 µL; Kinesis (vormals ABIMED)
- Präzisionswaage Kern PFB; Kern und Sohn
- Vortexer REAX top; Heidolph

- Röntgenfilmentwicklungsmaschine Optimax® TR; MS-L
- Röntgenfilmkassette Kodak Lanex; Siemens
- Rotor für Ultrazentrifuge Type 45 Ti; Beckmann Coulter
- Schüttler MaxQ 5000; Thermo Fisher Scientific
- Schüttelapparat GFL-3016; Gesellschaft für Labortechnik
- Schüttel- und Wipptisch VWR Rocking Platform; VWR
- Spektralphotometer Eppendorf BioSpectrometer® basic; Eppendorf
- Spektralphotometer NanoDrop™ 1000; Thermo Fisher Scientific
- Thermocycler T1; Biometra
- Trockenschrank B6060; Heraeus
- UV-Transilluminator BIO View USDT-20SL-8E; Biostep
- Wipptisch Rocky® RT-LS/GR; Labortechnik Fröbel
- Wipptisch Rocky® 1000; Labortechnik Fröbel
- xCELLigence RTCA System; ACEA Biosciences (vormals Roche Applied Science)

### 2.3 Verbrauchsmaterialien

- 16-Well-Modul Nunc-Immuno™ Module; Nunc
- 96-Well E-Plates®; ACEA Biosciences (vormals Roche Applied Science)
- Blotting-Membran Amersham Hybond™ ECL; GE Healthcare Lifesciences
- Chromatographie-Säule Econo-Pac 10 mL; Bio-Rad
- Dialysiermembran ZelluTrans MWCO 12000-14000; Carl Roth
- Eppendorfgefäße Safe-Lock Gefäße™ 1.5 u. 2.0 mL; Eppendorf
- Filterpapier; VWR
- Glaspipette 5 mL, 10 mL, 20 mL; Brand
- NHS-Mini-Säulen Pierce® NHS-Activated Agarose Spin Columns, 2 mL; Thermo Fisher Scientific
- PCR-Gefäße 0.2 mL DNA-, DNase-, RNase-free; Brand
- Pipettenspitzen; Carl Roth
- Serologische Einwegpipette Falcon™ 10 mL, 25 mL; BD
- Sterilfilter Fisherbrand® Spritzenvorsatzfilter 0.45 µm; Thermo Fisher Scientific
- Tygon®-Schlauch; ProLiquid
- Zellglasfolie Einmachfix folia Paper® Bringmann; Max Bringmann
- Zentrifugen-Filtereinheiten Amicon® Ultra-15 5000 MWCO, 30000 MWCO; Millipore

- Zentrifugenröhrchen Falcon™ 15 mL, 50 mL; BD

#### 2.4 Kits

- CloneJET PCR Cloning Kit; Thermo Fisher Scientific
- Direct-zol™ RNA MiniPrep; Zymo Research
- Library Efficiency® DH5α™ Competent Cells, Invitrogen
- MAX Efficiency® DH10B™ Competent Cells; Invitrogen
- NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up; Machery-Nagel
- Pierce™ BCA Protein Assay Kit; Thermo Fisher Scientific
- RNeasy® Mini Kit; Qiagen
- Zippy™ Plasmid Miniprep Kit; Zymo Research
- Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit; Zymo Research

#### 2.5 Molekulargewichtsmarker

- 2-Log DNA Ladder; New England BioLabs
- 500 bp Molecular Ruler; Bio-Rad
- PageRuler™ Prestained Protein Ladder; Thermo Fisher Scientific
- Unstained Protein MW Marker; Thermo Fisher Scientific

#### 2.6 RIPs

- Agrostin; Sigma-Aldrich
- Gelonin; Enzo Life Sciences
- Ricin A-Kette; Sigma-Aldrich
- Saporin rekombinant (zur Verfügung gestellt vom Arbeitskreis Prof. Dr. H. Fuchs, Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum)

#### 2.7 Antikörper

- anti-Agrostine Antikörper (s. Kap. 3.3.8)
- anti-Peptid Antikörper (s. Kap. 3.3.8)
- anti-Saporin Antikörper (zur Verfügung gestellt vom Arbeitskreis Prof. Dr. H. Fuchs, Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum)
- Goat Anti-Rabbit IgG, H & L Chain Specific Peroxidase Conjugate, Merck

## 2.8 Enzyme

- EcoRI HF<sup>®</sup> (20 U/μL); New England BioLabs
- Phusion<sup>™</sup> High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/μL); Thermo Fisher Scientific
- Pierce<sup>™</sup> Asp-N Protease, MS Grade; Thermo Fisher Scientific
- Pierce<sup>™</sup> Trypsin Protease, MS Grade; Thermo Fisher Scientific
- RevertAid<sup>™</sup> H Minus Reverse Transcriptase (200 U/μL); Thermo Fisher Scientific
- RNase H (5 U/μL); Thermo Fisher Scientific
- SacII (20 U/μL); New England BioLabs
- T4 DNA Ligase (400 U/μL); New England BioLabs
- Terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) (20 U/μL); Thermo Fisher Scientific

## 2.9 Primer

- OdT<sub>18</sub>P: 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3' (Thermo Fisher Scientific)
- GSP\_RT: 5'-TACTCAAGGGCATCATCAACTTC-3'
- KlonPCR\_P1: 5'-CATCCGCGGGTATGGCCTCCTTAAGAAAAGAAC-3'
- KlonPCR\_P2: 5'-GACAAAGGTGAATTCCTTAGCTAGCCTCAAGG-3'
- GSP\_3R1: 5'-AGTAAGGTTCAACAATACGGGCAG-3'
- GSP\_3R2: 5'-TTAAGAAAAGAACTCGGTGCCACC-3'
- GSP\_3R3: 5'-GCCTTGCGAAAATCCAACGTCTAT-3'
- GSP\_3R4: 5'-TTAACTGCCTTGGAGCGGACTCAA-3'
- GSP\_5R1: 5'-TTGTGGCTTAATATCAGTCCACGC-3'
- GSP\_5R2: 5'-TCCCCAGTTAGTCTCCAACCTAAT-3'
- GSP\_5R3: 5'-CCCCTGTTTCAACACAATCTCCGA-3'
- GSP\_5R4: 5'-CTGTCTGGACTTGCTATAATCCGC-3'
- OdTAP: 5'-GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
- AP: 5'-GACCACGCGTATCGATGTCGAC-3'
- GSP\_RT, KlonPCR\_P1, KlonPCR\_P2, GSP\_3R1, GSP\_3R2, GSP\_3R3, GSP\_3R4, GSP\_5R1, GSP\_5R2, GSP\_5R3, GSP\_5R4: metabion international AG
- OdTAP, AP: Zur Verfügung gestellt von Dr. Alexis Kasaras, Institut für Biologie – Angewandte Genetik, Abteilung Molekulare Pflanzengenetik, FU Berlin



## 2.10 Pufferlösungen, Reagenzien

- 10x PBS: 1500 mM NaCl, 83.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, 16.7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4
- 1x PBS: 150 mM NaCl, 8.33 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, 1.67 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4

### Reagenzien für die Zytotoxizitätsbestimmung mit dem xCELLigence System

- Medium: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific), 1% Penicillin/Streptomycin

### Puffer für die SDS-PAGE:

- 4x Trenngelpuffer: 1.5 M TRIS-HCl, 0.4% (w/v) SDS, pH 8.8
- 4x Sammelgelpuffer: 50 mM TRIS-HCl, 0.4% (w/v) SDS, pH 6.8
- 10x Elektrodenpuffer: 3.8 M Glycin, 0.4 M TRIS, 0.5% (w/v) SDS
- 4x Probenpuffer<sub>reduzierend</sub>: 25 mM TRIS-HCl, 8% (w/v) SDS, 40% (v/v) Glycerin, 0,04% (w/v) Bromphenolblau, 7.4% (v/v) 2-Mercaptoethanol, pH 6.8
- 4x Probenpuffer<sub>nicht reduzierend</sub>: 25 mM TRIS-HCl, 8% (w/v) SDS, 40% (v/v) Glycerin, 0.04% (w/v) Bromphenolblau, pH 6.8

### Puffer/Reagenzien für die Agarosegel-Elektrophorese:

- **Methode 1:**
  - 50x Tris/Acetic Acid/EDTA (TAE); Bio-Rad
  - Probenpuffer: Gel Loading Dye, Purple (6x); New England BioLabs
  - Färbelösung: Roti®-GelStain; Carl Roth
- **Methode 2:**
  - 10x MOPS Puffer: 0.2 M MOPS (pH 7.0, 20 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA (pH 8.0)
  - Probenpuffer: 2 µL 10x MOPS, 4 µL Formaldehyd, 10 µL Formamid, 0.1 µL EtBr (200 µg/mL), 0.9 µL H<sub>2</sub>O
  - Loading-Puffer: 50% Glycerol, 10 mM EDTA (pH 8.0), 0.25% (w/v) Bromphenolblau, 0.25% (w/v) Xylencyanol FF

### Puffer/Reagenzien für den Western Blot:

- Blot-Puffer: 25 mM TRIS, 191.8 mM Glycin, 10% (v/v) Ethanol, 4 °C
- PBSB<sub>0.2</sub>: 1x PBS, 0.2% (w/v) Brij® 58

- ECL-Reagenz: 1000 Teile Lösung A + 100 Teile Lösung B + 1 Teil Lösung C
  - Lösung A: 50 mg Luminol in 200 mL TRIS-HCL, pH 8.6
  - Lösung B: 11 mg Cumarinsäure in 10 mM DMSO
  - Lösung C: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35%

**Puffer für die Antikörperaufreinigung mit Protein A:**

- Waschpuffer 1: 1x PBS, 4 °C
- Waschpuffer 2: 20 mM Glycin, pH 5.0; 4 °C
- Elutionspuffer: 0.1 M Glycin, pH 2.5, 4 °C
- Neutralisierungspuffer: 1.0 M TRIS, pH 9.0, 4 °C
- Natriumazidpuffer: 1x PBS, 2 mM NaN<sub>3</sub>, 4 °C

**Puffer für die Affinitätschromatographie mit NHS:**

- Bindungs- und Waschpuffer: 1x PBS, 4 °C
- Quenching-Puffer: 1.0 M Ethanolamin, pH 7.4, 4 °C
- Elutionspuffer: 0.1 M Glycin, pH 2.5, 4 °C
- Neutralisierungspuffer: 1.0 M TRIS, pH 9.0, 4 °C
- Natriumazidpuffer: 1x PBS, 2 mM NaN<sub>3</sub>, 4 °C

**Puffer/Reagenzien für die Massenspektrometrie:**

- Ammoniumhydrogencarbonatpuffer: 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 7.9 – 8.5
- Verdaupuffer: 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 7.9 – 8.5
- Reduktionslösung: 100 mM DTT in Ammoniumhydrogencarbonatpuffer
- Carbamidomethylierungsreagenz: 55 mM Iodacetamid in Ammoniumhydrogencarbonatpuffer
- Trypsin-Stammlösung: Trypsin (1 µg/µL) in 1 mM HCl
- AspN-Stammlösung: AspN (40 ng/µL) in H<sub>2</sub>O

## 3 Methoden

### 3.1 Sonstige Methoden

#### 3.1.1 Extraktherstellung

Um das Agrostin aus den Samen isolieren zu können, wurden zunächst die wasserlöslichen Bestandteile der Samen mit PBS extrahiert. Dabei bediente man sich anfangs an den Samen (*Agrostemmae semen*, AGRO 26/80), die von der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen (BAZ) in Gatersleben bezogen wurden, und später an Samen, die am Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften unter der Leitung von Frau Dr. Regina Schenk gezüchtet wurden. Dazu wurden Samen vom BAZ Anfang März ausgesät und im August wurden die reifen Samen geerntet. Für die Extraktherstellung wurden 200 g Samen zunächst gemahlen und anschließend in einer Soxhletapparatur mit Petrolether entfettet. Das gemahlene, entfettete Samenmaterial wurde unter Rühren mit 500 mL PBS (1x PBS, 4 °C) unter Zugabe von Proteaseinhibitoren (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail; Roche) zur Extraktion 12 Std. stehen gelassen. Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugieren (himac CT6E, Hitachi; 6000 g, 20 Min.) vom Überstand abzentrifugiert. Die leichte Trübung des Extraktes wurde durch Ultrazentrifugation (Optima™ L-90K, Beckmann Coulter; 30000 rpm, 30 Min., 4 °C) beseitigt. Der klare, bernsteinfarbene Extrakt wurde zum Schluss sterilfiltriert und ggf. bis zum Gebrauch bei – 20 °C eingefroren.

#### 3.1.2 Echtzeit-Untersuchung der Zytotoxizität des isolierten Agrostins

Die Zytotoxizität des isolierten Agrostins wurde mit dem xCELLigence System RTCA (ACEA Biosciences) untersucht. Dieses System basiert auf einer kontinuierlichen Impedanz-Messung, die je nach Zellviabilität unterschiedlich stark ist. Die Impedanz-Messung wird mit Hilfe von 96-Well E-Plates® (ACEA Biosciences) durchgeführt, die mit Goldelektroden ausgestattet sind. Dabei gilt: Je höher die Zellviabilität, desto höher die Impedanz.

Zu Beginn des Experimentes wurden 50 µL Medium (DMEM + 10% FBS + 1% Penicillin/Streptomycin) in jedes Well pipettiert und die Impedanz wurde auf Null gesetzt. Anschließend wurden 50 µL/Well Medium mit 5000 ECV-304 Zellen (zur Verfügung gestellt von Dr. R. Gilibert-Oriol, Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum) hinzugegeben und für 20 Min. stehen gelassen, damit sich die Zellen absetzen konnten. Nachdem die E-Plate® im

xCELLigence System eingespannt wurde, wurde die Impedanz-Messung gestartet. Die Zellen wurden zunächst 24 Std. inkubiert und anschließend wurden 100  $\mu\text{L}$ /Well Medium (Kontrolle) und 100  $\mu\text{L}$ /Well Medium, welches SO1861 enthielt (Endkonzentration: 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) zugegeben – SO1861 ist ein aus *Saponaria officinalis* isoliertes Saponin (noch nicht veröffentlicht). Zur Untersuchung der Zytotoxizität des Agrostins wurde jeweils ein Gemisch aus 50  $\mu\text{L}$  dieses Proteins in verschiedenen Konzentrationen (0.1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM) und 50  $\mu\text{L}$  Medium bzw. Medium, welches SO1861 (Endkonzentration: 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) enthielt, zugegeben. Die Zellen wurden dann für weitere 72 Std. überwacht (Gesamtdauer des Experimentes: 96 Std.)

## 3.2 Proteinbiochemische Methoden

### 3.2.1 Dialysieren von Proteinlösungen

Mit der Dialyse können Proteinlösungen entsalzt, umgepuffert und von anderen, kleineren Proteinen getrennt werden. Dabei gelangen Salze und kleinere Proteine aufgrund eines hinreichend großen Konzentrationsgefälles durch eine semipermeable Membran aus der zu dialysierenden Proteinlösung. Da alle in dieser Arbeit verwendeten Proteine eine Größe von  $> 27$  kDa hatten, wurde eine Dialysiermembran mit einem MWCO-Wert (molecular weight cut off) von 12000 – 14000 Da verwendet (ZelluTrans MWCO 12000 – 14000, Carl Roth). Dabei wurde die zu dialysierende Proteinlösung in den Dialysierschlauch pipettiert, anschließend in vier bis fünf Liter 1x PBS getaucht und mindestens 12 Std. bei mehrfachem Pufferwechsel unter Rühren stehen gelassen.

### 3.2.2 Aufkonzentrieren von Proteinlösungen

In der Regel wurden bei Bedarf die Proteinlösungen mit Hilfe von Zentrifugenfiltern (Amicon® Ultra MWCO 15000 bzw. 30000, Millipore) aufkonzentriert. Dabei wurden die Proteinlösungen in die Zentrifugenfilter pipettiert, auf einer Waage austariert und in einer Kühlzentrifuge (Megafuge2.0 R, Heraeus) auf das gewünschte Volumen eingengt (4000 g, 4 °C).

In manchen Fällen wurden Proteinlösungen mit Hilfe von PEG 20000 (Polyethylenglykol) aufkonzentriert. Dazu wurde zunächst 250 mL einer 20%igen Lösung von PEG 20000 hergestellt. In diese Lösung wurde dann der Dialysierschlauch, der die Proteinlösung enthielt, einge-

taucht. Aufgrund der Hygroskopizität der PEG-Lösung wurde der Proteinlösung Wasser entzogen, sodass die Proteinkonzentration erhöht wurde. Dabei wurde in regelmäßigen Abständen mittels Bradford-Assay kontrolliert, wie weit die Proteinlösung aufkonzentriert wurde.

### 3.2.3 Proteingehaltsbestimmungen mittels BCA- und Bradford-Assay

Zur Bestimmung der Protein-Konzentration in Lösungen wurde größtenteils ein BCA-Assay herangezogen. Der BCA-Assay beruht auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  im alkalischen Milieu zu  $\text{Cu}^+$  durch Proteine. Die  $\text{Cu}^+$ -Ionen bilden mit Bicinchonsäure (BCA) einen violetten Komplexfarbstoff, dessen Absorption bei 562 nm gemessen werden kann. In manchen Fällen konnte jedoch kein BCA-Assay durchgeführt werden, da bestimmte in der Lösung enthaltene Bestandteile die Reduktion störten wie z.B. *N*-Hydroxysuccinimid (NHS), welches für die Herstellung einer Affinitätschromatographie-Säule in dieser Arbeit verwendet wurde (Kap. 3.2.9). Daher wurde in diesen Fällen ein Bradford-Assay durchgeführt, der auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie brilliant blue G-250 an Proteine im sauren Milieu beruht. Durch Komplexierung der unprotonierten Sulfonat-Ionen mit Proteinen wird dabei das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm auf 595 nm verschoben, wobei die Zunahme der Absorption bei 595 nm als Maß für die Proteinkonzentration dient.

Zur Durchführung des **BCA-Assays** wurde ein BCA-Kit (Pierce® BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific) verwendet, welches aus einem BCA-Reagenz A, einem BCA-Reagenz B und einer Albumin-Standard-Ampulle ( $c = 2 \text{ mg/mL}$ ) zusammengesetzt war. Auf einem 16-Well-Modul wurden 25  $\mu\text{L}$  Proteinlösung mit 200  $\mu\text{L}$  des BCA-Arbeitsreagenzes (50 Teile BCA-Reagenz A + 1 Teil BCA-Reagenz B) versetzt und für 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption mit Hilfe des Mikroplattenphotometers (SpectraMax®, Molecular Devices) gemessen. Zur Herstellung der Kalibrierkurve aus dem Albumin-Standard wurde das vom Hersteller vorgeschlagene Pipettierschema verwendet.

Zur Durchführung des **Bradford-Assays** wurden auf einem 16-Well-Modul 10  $\mu\text{L}$  Proteinlösung mit 200  $\mu\text{L}$  Farbreagenz (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad) versetzt und die Absorption wurde nach zwei Minuten bei 595 nm mit dem Mikroplattenphotometer (SpectraMax®, Molecular Devices) gemessen. Zum Vergleich wurden bei jeder Messung fünf verschiedene Konzentrationen eines Bovine Serum-Albumin-Standards gemessen.

### 3.2.4 SDS-PAGE

Das Prinzip der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese beruht auf dem unterschiedlichen Laufverhalten von negativ geladenen Proteinen durch eine Gelmatrix in einem elektrischen Feld. Dabei bindet das SDS an die Proteine und verleiht diesen durch Bildung eines Protein-SDS-Komplexes eine negative Ladung. Da somit alle Proteine eine negative Ladung aufweisen, erfolgt die Auftrennung eines Proteingemisches aufgrund des unterschiedlich starken Widerstandes, den die Proteine mit unterschiedlichen Molekülmassen bzw. Molekülgrößen beim Laufen in Richtung Anode aufgrund des Molekularsiebeffektes durch die Polyacrylamidgelmatrix erfahren. Kleinere und leichtere Proteine legen somit eine längere Distanz zurück als größere und schwerere.

Die SDS-PAGE wurde in dieser Arbeit u.a. zum Aufzeigen der Reinheit von Protein-Lösungen, zum Nachweis bestimmter Proteine oder zur Durchführung eines Western Blots herangezogen. Dabei wurde zum größten Teil unter diskontinuierlichen, denaturierenden Bedingungen nach Lämmli gearbeitet [470]. Mit diskontinuierlichen Bedingungen ist der unterschiedliche pH-Wert von Gelpuffer und Elektrodenpuffer sowie die unterschiedliche Porengrößen von Sammelgel und Trenngel gemeint. Denaturierende Bedingungen erhält man, indem im Probenpuffer 2-Mercaptoethanol als reduzierende Substanz enthalten ist und die Proben vor dem Auftragen auf das Gel bei 95 °C erhitzt werden (Thermoblock Grant QBT1, Grant Instruments; 5 Min.). In manchen Fällen wurde die SDS-PAGE unter diskontinuierlichen, nicht-denaturierenden Bedingungen durchgeführt, wobei dementsprechend 2-Mercaptoethanol weggelassen und die Probe nicht erhitzt wurde.

Die Gele für die SDS-PAGE wurden unter Anwendung des „Vertical Electrophoresis System MGV-202“ (C.B.S. Scientific) selbst hergestellt und waren wie in Tabelle 2 beschrieben zusammengesetzt. Dabei wurde zunächst das Trenngel (12% Acrylamid-Anteil) in die Glaskassette gefüllt und nach abgeschlossener Polymerisation (20 – 30 Min.) mit dem Sammelgel (4.5% Acrylamid-Anteil) abgedeckt, in welches ein Taschenkamm mit zehn Aussparungen gesteckt wurde (Volumen der Geltaschen: 20 µL).

In der Regel wurden 15 µL der zu untersuchenden Protein-Lösung zusammen mit 5 µL des Probenpuffers (4 x Probenpuffer, reduzierend oder nicht-reduzierend) in die Geltaschen pipettiert und die Elektrophorese wurde anschließend gestartet (220 V, 40 mA, 45 Min.).

**Tabelle 2.** Zusammensetzung des Polyacrylamidgels

Reagenz	4.5% Sammelgel	12% Trenngel
Wasser	800 $\mu\text{L}$	1770 $\mu\text{L}$
Trenngelpuffer	-	1062 $\mu\text{L}$
Sammelgelpuffer	333 $\mu\text{L}$	-
Acrylamidmix	200 $\mu\text{L}$	2124 $\mu\text{L}$
10% APS	10 $\mu\text{L}$	30 $\mu\text{L}$
TEMED	3 $\mu\text{L}$	3 $\mu\text{L}$

Auf jedes Gel wurde ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen (Unstained Protein MW Marker, Thermo Fischer Scientific), der folgende Proteine enthielt:  $\beta$ -Galaktosidase 116.0 kDa, Bovine Serum Albumin 66.2 kDa, Ovalbumin 45.0 kDa, Lactatdehydrogenase 35.0 kDa, REase Bsp98I 25.0 kDa,  $\beta$ -Lactoglobulin 18.4 kDa und Lysozym 14.4 kDa.

### 3.2.5 Fixieren, Anfärben und Trocknen von Polyacrylamidgelen

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Gel der Elektrophorese-Apparatur entnommen und in einer Fixierungslösung (Ethanol (100%):Eisessig:Wasser 40:10:50) auf einem Schüttelapparat für mind. 30 Min. inkubiert. Dabei fielen die im Gel enthaltenen Proteine aus und waren somit im Gel fixiert und konnten nicht mehr aus dem Gel diffundieren. In der Fixierungslösung war zusätzlich der Farbstoff Coomassie® Brilliantblau G-250 enthalten (0.1% (w/v)), mit dem die Gele angefärbt wurden. Zum Entfärben wurden die Gele in einer Entfärbungslösung (Ethanol (100%):Eisessig:Wasser 40:10:50) unter mehrfachem Wechsel dieser Lösung so lange auf einem Schüttelapparat inkubiert, bis die blaue Hintergrundfarbe weitgehend verschwunden war (min. 30 Min.) und lediglich die Proteinbanden blau gefärbt waren.

Nach abgeschlossener Coomassiefärbung wurden die Gele in einem Ethanol (100%)-Eisessig-Wasser-Gemisch (60:10:30) für mind. 30 Min. inkubiert und anschließend zwischen zwei in Wasser eingeweichten Zellglasfolien (Einmachfix folia Paper®, Max Bringmann) auf einer Glasplatte mit Klammern fest gespannt und zum Trocknen über Nacht stehen gelassen. Somit konnten die Gele eingescannt und digitalisiert werden.

### 3.2.6 Western Blot

Beim Western Blot werden die Proteine aus einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch auf eine spezielle Membran transferiert. Somit sind die Proteine nicht mehr von einer Gelmatrix umgeben und können ungehindert weiteren Reaktionen wie Anfärben, Ansequenzierungen, Kupplungen mit Antikörpern oder enzymatischen Umsetzungen ausgesetzt werden.

In dieser Arbeit wurde ein Western Blot zum Nachweis spezifischer Antigen-Antikörper-Reaktionen herangezogen. Dazu wurde nach Beendigung der SDS-PAGE das Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham Hybond™ ECL, GE Healthcare Lifesciences) gelegt und anschließend mit einem Filterpapier und einem Glasvlies von beiden Seiten bedeckt. Dieses „Sandwich“ bestehend aus Glasvlies, Filterpapier, Nitrozellulosemembran, Polyacrylamidgel, Filterpapier und zuletzt wieder Glasvlies wurde luftblasenfrei gepresst und in einer speziellen Blot-Kassette fixiert. Diese Blot-Kassette wurde in eine Blot-Kammer (Trans-Blot Cell, Bio-Rad) gesetzt, wobei darauf zu achten war, dass die Nitrozellulosemembran auf der Seite der Anode sein musste, damit die durch das SDS negativ geladenen Proteine in Richtung Anode auf die Nitrozellulosemembran gelangen konnten. Nach Befüllung der Blot-Kammer mit dem Blot-Puffer wurde der Blotting-Prozess gestartet (50 V, 45 Min., Wasserkühlung bei 15 °C). Ob das Übertragen der Proteinbanden funktioniert hat, wurde durch einen Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific) sichtbar, der bei der SDS-PAGE mit aufgetragen wurde und dessen farbige Proteinbanden bei erfolgreicher Durchführung auf der Nitrozellulosemembran zu sehen waren.

Im direkten Anschluss des Blottings wurde die Nitrozellulosemembran für zehn Minuten in eine Magermilchpulver-Emulsion (5% Magermilchpulver (w/v) in 1x PBS) überführt, wodurch die restlichen Bindungsstellen auf der Membran blockiert wurden. Anschließend wurde die Membran drei Mal kurz mit PBSB<sub>0,2</sub> gewaschen und danach mit einem Primärantikörper geeigneter Konzentration in 10 mL PBSB<sub>0,2</sub> für 30 Min. auf einem Wipptisch inkubiert. Nach dieser Kupplungsreaktion mit dem Primärantikörper an das Antigen auf der Membran wurde sechs Mal je fünf Minuten mit PBSB<sub>0,2</sub> gewaschen. Danach wurde die Membran mit einem Sekundärantikörper (Goat Anti-Rabbit IgG, H & L Chain Specific Peroxidase Conjugate, Merck) in einer Verdünnung von 1:2000 in 10 mL PBSB<sub>0,2</sub> für 30 Min. inkubiert, wobei eine spezifische Bindung des Sekundärantikörpers an den Fc-Teil des Primärantikörpers stattfand. Zum Schluss wurde erneut mit PBSB<sub>0,2</sub> gewaschen (60 Min., alle fünf Minuten Puffer-



Wechsel). Zur Detektion wurde die Membran mit dem ECL-Reagenz (ECL = enhanced chemiluminescence) beträufelt und unmittelbar danach in eine Röntgenfilmkassette gelegt. In einer Dunkelkammer wurde der Film i.d.R. eine Minute mit der Membran belichtet, wobei durch Interaktion der an dem Sekundäntikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase mit dem ECL-Reagenz eine Chemielumineszenz entstand, die als Schwärzung auf dem Röntgenfilm sichtbar wurde. Der Röntgenfilm wurde mit Hilfe einer Rontgenfilmentwicklungsmaschine (Optimax<sup>®</sup> TR, MS-L) entwickelt.

### 3.2.7 Dot Blot

Beim Dot Blot wurde das Volumen, welches 1  $\mu\text{g}$  eines bestimmten Proteins bzw. Peptids entsprach, direkt auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham Hybond<sup>™</sup> ECL, GE Healthcare Lifesciences) punktuell pipettiert und eintrocknen gelassen. War die Konzentration der Proteinlösung nicht bekannt, wurden maximal 5  $\mu\text{L}$  auf die Membran pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung durch eine SDS-PAGE und die Übertragung auf die Membran entfielen beim Dot Blot. Anschließend wurde wie beim Western Blot beschrieben mit einem Primantikorper mit einer geeigneten Verdünnung inkubiert. Ein Dot Blot wurde in dieser Arbeit herangezogen, um diese eben genannte geeignete Verdünnung des Primantikorpers ermitteln zu können. Dazu wurden mehrere Membranstreifen mit demselben Pipettierschema des entsprechenden Proteins bzw. Peptids hergestellt und mit einer unterschiedlichen Verdünnung des Primantikorpers inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde wie beim Western Blot bereits beschrieben gewaschen, mit dem Sekundäntikörper (Goat Anti-Rabbit IgG, H & L Chain Specific Peroxidase Conjugate, Merck) inkubiert und mit dem ECL-Reagenz entwickelt.

### 3.2.8 Aufreinigung von Antikorpren aus Kaninchenserum

In dieser Arbeit wurden für die Aufreinigung des Agrostins sowohl Antikörper (Ak) gegen das Agrostin (= anti-Agrostin Ak), als auch Antikörper gegen ein Peptid (= anti-Peptid Ak) verwendet. Dieses Peptid, bestehend aus 15 Aminosäuren, dessen Sequenz aus den Ergebnissen der MS-MALDI-TOF-Analyse (s. Kap. 4.3.4) abgeleitet wurde, existiert als ein Teil in der kompletten Aminosäuresequenz des Agrostins. Das Serum, das die anti-Agrostin Ak enthielt, lagerte seit 2002 bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Dazu wurde das Agrostin, welches für die Immunisierung des Kaninchens verwendet wurde, wie in Stirpe *et al.* 1983 [45] und in der Dissertation von P. Hebestreit [468] beschrieben isoliert und zur Immunisierung der Fa. Pineda (Pineda Antikor-

per-Service, Berlin) übergeben. Das Serum, welches die anti-Peptid Ak enthielt, wurde von der Fa. BioGenes (BioGenes GmbH, Berlin) produziert. Um diese Antikörper aus den Seren zu isolieren, wurde Protein A verwendet. Protein A ist ein bakterielles Protein aus *Staphylococcus aureus* und kann spezifisch am Fc-Teil von Antikörpern (IgG) binden [471].

Für die Aufreinigung der anti-Agrostin Ak wurde zunächst eine Ammoniumsulfatfällung durchgeführt, um die in dem Serum enthaltenen Proteine von anderen Bestandteilen abzutrennen. Dazu wurden zu 40 mL Serum zunächst Proteaseinhibitoren (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail; Roche) zugegeben und anschließend mit 40 mL einer 50%igen Ammoniumsulfatlösung unter Rühren inkubiert (1.5 Std., 4 °C). Die gefällten Proteine wurden im Anschluss durch Zentrifugieren pelletiert (4000 g, 20 Min., 4 °C). Die vereinigten Pellets wurden in 40 mL PBS (1x PBS, 4 °C) gelöst und dialysiert. Zu dieser Proteinlösung wurden 3.0 mL Protein A Suspension (Pierce® Protein A Agarose, Thermo Fischer Scientific) pipettiert und auf einem Wipptisch inkubiert (24 Std., 4 °C). Bei der Aufreinigung der anti-Peptid Ak wurde auf eine Ammoniumsulfatfällung verzichtet und zu 10 mL Serum, welches mit 10 mL PBS (1x PBS, 4 °C) verdünnt wurde, wurden unter Zugabe von Proteaseinhibitoren (s.o.) direkt 2 mL Protein A Suspension pipettiert und unter gleichen Bedingungen inkubiert. Da die folgenden Arbeitsschritte sowohl für die Aufreinigung der anti-Agrostin Ak als auch für die Aufreinigung der anti-Peptid Ak identisch waren, wird im Folgenden die Durchführung ohne Angabe der genauen Volumina der entsprechenden Puffer beschrieben - die eingesetzten Volumina können Tabelle 3 entnommen werden. Nach erfolgter Inkubation mit Protein A wurde der dabei entstandene Protein A-Antikörper-Komplex abzentrifugiert (4000 g, 20 Min., 4 °C) und in eine Chromatographie-Säule (Econo-Pac® 10 mL, Bio-Rad) überführt. Das Säulenbett wurde mit PBS (1x PBS, 4°C) und anschließend mit dem Waschpuffer 2 gewaschen. Danach wurde mit dem Elutionspuffer eluiert und das Eluat unverzüglich mit dem Neutralisierungspuffer neutralisiert. Zur Regenerierung der Säule, wurde mit PBS (1x PBS, 4 °C) gewaschen und mit dem Natriumazidpuffer equilibriert. Im Allgemeinen war darauf zu achten, dass das Säulenbett zu keinem Zeitpunkt trocken lief. Die Antikörperlösungen (Antikörper-Pools) wurden unter mehrfachem Pufferwechsel gegen PBS (1x PBS, > 12 Std., 4 °C) dialysiert.

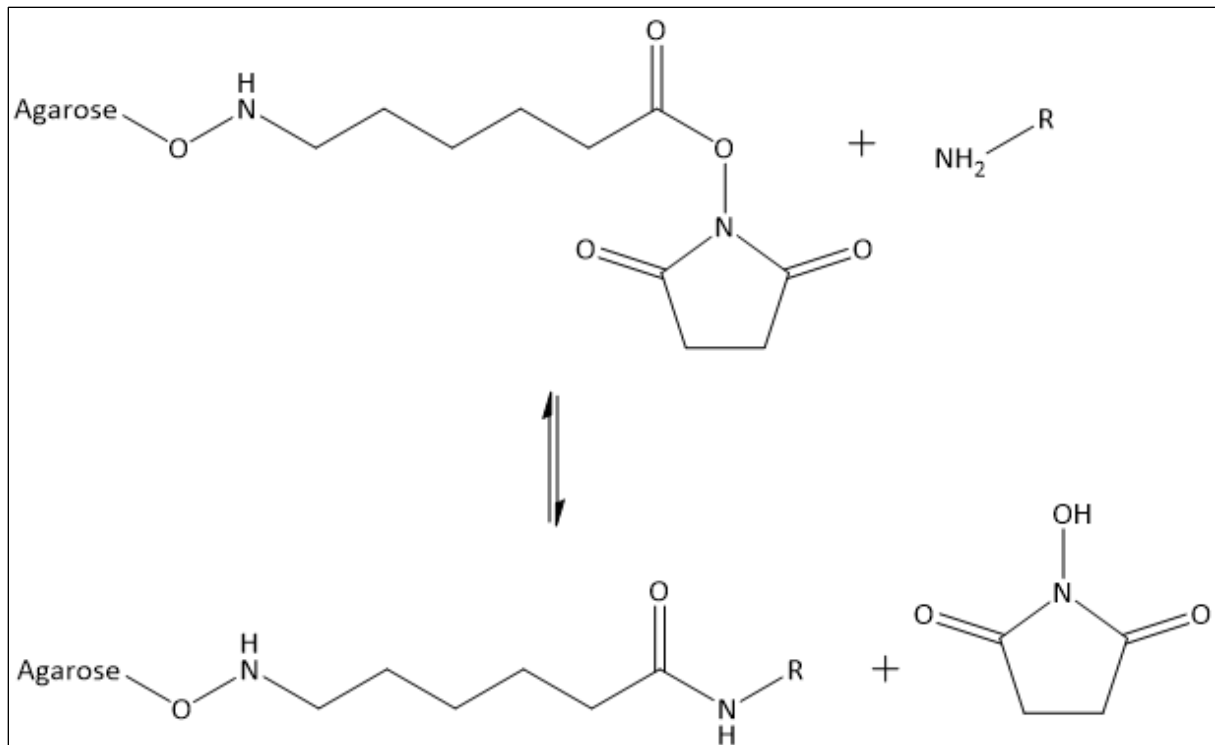
**Tabelle 3.** Eingesetzte Volumina der Puffer für die Antikörper-Isolierung mit Protein A

Reagenzien	Anti-Agrostin Ak	Anti-Peptid Ak
Protein A Suspension	3.0 mL (= 1.5 mL Säulenbett)	2.0 mL (= 1.0 mL Säulenbett)
PBS (Waschpuffer 1) (1x PBS, 4 °C)	15 mL	10 mL
Waschpuffer 2 (20 mM Glycin, pH 5.0, 4 °C)	15 mL	10 mL
Elutionspuffer (0.1 M Glycin, pH 2.5, 4 °C)	15 mL	10 mL
Neutralisierungspuffer (1.0 M TRIS, pH 9.0, 4 °C)	3.75 mL	2.5 mL
Natriumazidpuffer (1x PBS, 2 mM NaN <sub>3</sub> , 4 °C)	10 mL	10 mL

### 3.2.9 Bindung von Proteinen an *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) als Säulenmatrix zur Herstellung einer Affinitätschromatographie-Säule

Bei der Affinitätschromatographie wird die spezifische, reversible Bindung zwischen zwei Bindungspartnern ausgenutzt. Solche Bindungspartner können z.B. Substrat und Enzym, Ligand und Rezeptor, Lektin und Glykoprotein oder Antigen und Antikörper sein. Dabei wird der eine Bindungspartner irreversibel an eine Säulenmatrix immobilisiert, wodurch der andere Bindungspartner aus einem Gemisch vieler verschiedener Moleküle isoliert werden kann.

In dieser Arbeit wurde die Affinitätschromatographie für die Isolierung der anti-Agrostin und anti-Peptid Antikörper aus den Antikörperlösungen (Antikörper-Pools), die durch Anwendung von Protein A aus Kaninchenseren erhalten wurden (Kap. 3.2.8), und für die Isolierung des Agrostins aus einem wässrigen Samenextrakt (Kap. 3.1.1) herangezogen. Dabei wurde für die Antikörper-Isolierung das entsprechende Antigen bzw. für die Agrostin-Isolierung die entsprechenden Antikörper an eine Säulenmatrix gebunden. Als Säulenmatrix diente in allen Fällen NHS-aktivierte Agarose (Pierce® NHS-Activated Agarose, Thermo Fisher Scientific), die mit primären Aminen eine kovalente Bindung eingeht (Abb. 2).



**Abb. 2:** Reaktion der NHS-aktivierten Agarose mit primären Aminen. Entstehung einer kovalenten Bindung der Säulenmatrix mit primären Aminen unter Abspaltung des *N*-Hydroxysuccinimids.

### Isolierung der anti-Agrostin Antikörper

Für die Isolierung der anti-Agrostin Antikörper wurde kommerziell erhältlich Agrostin (Sigma-Aldrich), welches im Folgenden als Agrostin<sub>Sigma</sub> bezeichnet wird, als Antigen verwendet. Dazu wurden 333  $\mu\text{L}$  (entsprechend 100  $\mu\text{g}$ ) Agrostin<sub>Sigma</sub> mit 999  $\mu\text{L}$  PBS (1x PBS, 4 °C) verdünnt. Von dieser Lösung wurden 100  $\mu\text{L}$  entnommen, um später die Bindungskapazität bestimmen zu können. Die restlichen 1222  $\mu\text{L}$  wurden zur Inkubation mit dem Säulenmaterial verwendet. Dazu wurde eine Minisäule (Pierce® NHS-Activated Agarose Spin Column, 33 mg, Thermo Fisher Scientific) verwendet, die den Vorteil hatte, dass sie bereits fertig präpariert war und die Chromatographie mit Hilfe einer Zentrifuge durchgeführt werden konnte. Da die Säule jedoch nur ein Volumen von 1.0 mL fassen konnte, wurde die Inkubation in zwei Durchgängen durchgeführt. Dafür wurden in dem ersten Durchgang 700  $\mu\text{L}$  in die Säule pipettiert und auf einem Wipptisch inkubiert (4 Tage, 4 °C). Zum Abtrennen der Flüssigkeit wurde die Säule auf ein leeres Eppendorf-Gefäß (2.0 mL) gesetzt und zentrifugiert (1000 g, 1 Min., 4 °C). Das Zentrifugat wurde aufgefangen und aufbewahrt. Die Säule wurde anschließend zwei Mal mit 400  $\mu\text{L}$  PBS (1x PBS, 4 °C) gewaschen (1000 g, 1 Min., 4 °C). Diese Proze-

dur wurde mit den restlichen 522  $\mu\text{L}$  wiederholt, wobei das Zentrifugat nach der Inkubation mit dem Zentrifugat der ersten Inkubation vereinigt wurde, um die Bindungskapazität abschätzen zu können. Zur Blockierung der restlichen aktiven NHS-Gruppen wurde die Säule mit 400  $\mu\text{L}$  Quenching-Puffer auf einem Wipptisch inkubiert (4 Std., 4 °C) und anschließend zentrifugiert (1000 g, 1 Min., 4 °C). Zum Schluss wurde die Säule fünf Mal mit PBS (1x PBS, 4 °C) gewaschen (1000 g, 1 Min., 4 °C). Auf die so präparierte Säule wurden 0.5 mL Antikörper-Pool pipettiert und auf einem Wipptisch inkubiert (2 Std., 4 °C). Anschließend wurde zentrifugiert (1000 g, 1 Min., 4 °C) und das Zentrifugat zwecks Konzentrationsbestimmung und wiederholter Inkubation aufgefangen und aufbewahrt. Direkt im Anschluss der Inkubation wurde mit dem Elutionspuffer eluiert, was in vier Mal 0.5 mL-Fractionen durchgeführt wurde (1000 g, 1 Min., 4 °C). Jede Fraktion wurde unverzüglich mit 125  $\mu\text{L}$  Neutralisierungspuffer neutralisiert und anschließend wurden alle vier Fraktionen gepoolt. Die Säule wurde so oft mit dem Antikörper-Pool inkubiert, bis die Proteinkonzentration nach der Inkubation weitestgehend konstant blieb, also nahezu alle anti-Agrostin Antikörper aus dem Antikörper-Pool isoliert wurden. Zur Regenerierung der Säule wurde die Säule mit 8 mL PBS (1x PBS, 4 °C) gewaschen und mit dem Natriumazidpuffer equilibriert. Die Eluate wurden gepoolt und unter mehrmaligem Pufferwechsel dialysiert (5 L 1x PBS, > 12 Std., 4 °C). Die Aufkonzentrierung der Antikörperlösung geschah mit Hilfe einer 20%igen PEG-Lösung (Kap. 3.2.2) und es wurde erneut gegen PBS (1x PBS, 4 °C) dialysiert.

### **Isolierung der anti-Peptid Antikörper**

Die Isolierung der anti-Peptid Antikörper lief prinzipiell genauso ab wie die Isolierung der anti-Agrostin Antikörper, nur dass eine andere Chromatographie-Säule und andere Volumina der entsprechenden Puffer verwendet wurden. Dabei wurden 5.0 mL (= 2.5 mL Säulenbett) der NHS-aktivierten Agarose Suspension (Pierce® NHS-Activated Agarose Slurry, Thermo Fisher Scientific) in eine leere Chromatographie-Säule (Econo-Pac® 10 mL, Bio-Rad) überführt und mit 5.0 mL PBS (1x PBS, 4 °C) equilibriert. Anschließend wurde mit der Peptidlösung, die aus 3 mg Peptid (synthetisiert von Biosyntan, Berlin) gelöst in 5.0 mL PBS (1x PBS, 4 °C) bestand, inkubiert (Wipptisch, 2 Std., 4 °C). Vor der Inkubation wurden 10  $\mu\text{L}$  Peptidlösung zwecks Bindungskapazität entnommen. Die Bindungskapazität wurde mittels Bradford-Assay durchgeführt, indem die Peptidkonzentration sowohl vor, als auch nach der Inkubation – also in dem Durchfluss – bestimmt und ins Verhältnis gesetzt wurde. Danach wurde die Säule

mit 5.0 mL PBS (1x PBS, 4 °C) gewaschen und der Durchfluss wurde aufbewahrt, um die Peptidreste, die nicht am Säulenmaterial gebunden haben, nicht zu verwerfen. Anschließend wurden die restlichen Bindungsstellen des Säulenmaterials durch Hinzugeben von 5.0 mL Quenching-Puffer blockiert (Wipptisch, 40 Min., 4 °C). Der Durchfluss konnte entsorgt werden und die Säule wurde dann mit 15 mL PBS (1x PBS, 4 °C) gewaschen. Auf diese Säule wurden die entsprechenden Antikörper-Pools, die die anti-Peptid Antikörper enthielten aufgetragen und inkubiert (Wipptisch, 4 Std., 4 °C). Der Durchfluss wurde für weitere Inkubationen aufgefangen und aufbewahrt. Die Säule wurde mit 7.5 mL PBS (1x PBS, 4 °C) gewaschen und anschließend wurde mit 10 mL Elutionspuffer eluiert, wobei das Eluat unverzüglich mit dem Neutralisierungspuffer neutralisiert wurde. Die Säule wurde dann mit 15 mL PBS (1x PBS, 4 °C) gewaschen und so oft mit den Antikörper-Pools inkubiert bis die Proteinkonzentration nach der Inkubation ähnlich hoch war wie vor der Inkubation und somit nahezu alle anti-Peptid Antikörper aus den Pools isoliert wurden. Zur Regenerierung wurde die Säule mit 20 mL PBS (1x PBS, 4 °C) gewaschen und mit dem Natriumazidpuffer equilibriert. Die Eluate wurden unter mehrfachem Pufferwechsel gegen PBS (1x PBS, > 12 Std., 4 °C) dialysiert und anschließend mit Hilfe einer 20%igen PEG-Lösung (Kap. 3.2.2) aufkonzentriert und erneut gegen PBS (1x PBS, 4 °C) dialysiert.

### **Isolierung des Agrostins aus einem wässrigen Extrakt**

Zur Isolierung des Agrostins direkt aus einem wässrigen Extrakt wurden sowohl die isolierten anti-Agrostins als auch die anti-Peptid Antikörper für die Herstellung von jeweils einer Affinitätssäule verwendet. Bei beiden Säulen wurde gleich verfahren, sodass sich im Folgenden die Beschreibung der Säulenherstellung und der Elution des Agrostins auf beide Affinitätssäulen bezieht.

Dazu wurde das Säulenmaterial aus zwei NHS-Minisäulen (Pierce® NHS-Activated Agarose Spin Column, 33 mg, Thermo Fisher Scientific) in eine leere Chromatographie-Säule (EconoPac® 10 mL, Bio-Rad) überführt (Säulenbettvolumen: 0.4 mL) und mit der entsprechenden Antikörperlösung inkubiert (Wipptisch, 8 Std., 4 °C). Zur Ermittlung der Bindungskapazität wurden vor der Inkubation 10 µL der Antikörperlösung entnommen und mit der Konzentration nach erfolgter Inkubation verglichen. Der Durchfluss der Säule wurde aufgefangen und aufbewahrt (- 20 °C). Die Säule wurde drei Mal mit 1 mL PBS (1x PBS, 4 °C) gewaschen und anschließend wurde zur Blockierung der übrigen Bindungsstellen mit 2 mL Quenching-Puffer

inkubiert (Wipptisch, 4 Std., 4 °C). Zum Ende der Säulenpräparation wurde mit drei Mal 5 mL PBS (1x PBS, 4 °C) gewaschen. Anschließend wurden 200 mL des Samenextraktes (Kap. 3.1.1) kontinuierlich tropfenweise auf die Säule aufgetragen, wobei der Durchfluss aufgefangen und aufbewahrt wurde. Danach wurde die Säule mit 5 mL PBS (1x PBS, 4 °C) gewaschen und anschließend wurde mit 5.0 mL Elutionspuffer eluiert, wobei das Eluat in zehn Fraktionen zu je 0.5 mL aufgefangen wurde. Jede Fraktion wurde unverzüglich mit dem Neutralisierungspuffer neutralisiert. Zur Regenerierung der Säule wurde mit 10 mL PBS (1x PBS, 4 °C) gewaschen und mit dem Natriumazidpuffer zur Aufbewahrung equilibriert.

Die Inkubation mit dem Extrakt und die anschließende Elution wurden so oft wiederholt bis eine ausreichende Menge an Agrostin vorhanden war. Dabei wurden die Eluate gepoolt und anschließend unter mehrfachem Pufferwechsel gegen PBS dialysiert (1x PBS, > 12 Std, 4 °C). Die Aufkonzentrierung geschah mit Hilfe von Zentrifugenfiltern.

### **3.2.10 In-Gel-Verdau mit Trypsin und AspN**

Damit das Agrostin massenspektrometrisch untersucht werden konnte, musste das Protein vorher in kleinere Peptidfragmente geschnitten werden. Dazu wurde jeweils ein In-Gel-Verdau mit Trypsin und AspN durchgeführt [472,473]. Dabei spaltete Trypsin das Protein C-terminal nach Lysin- und Arginin-Resten, jedoch schlecht bzw. nicht vor Prolin-Resten, während AspN hauptsächlich N-terminal vor Aspartat, aber auch vor Glutamat spaltete. Die Agrostinbande, die bei der SDS-PAGE nach erfolgter Elution (Kap. 4.1.3) zu sehen war, wurde unter einer LAF-Bank scharfkantig ausgeschnitten. Die ausgeschnittene Bande wurde dann weiter zerstückelt. Die Gelstücke wurden in einem kleinen Eppendorfgefäß (500 µL) mit 20 µL eines 1:1-Gemisches aus 100% Acetonitril und 100 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung unter Schütteln inkubiert (15 Min., 25 °C). Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und durch das gleiche Volumen 100% Acetonitril ersetzt. Die Gelstücke wurden so lange darin inkubiert, bis sie milchig weiß wurden. Danach wurde das Acetonitril entfernt und die Gelstücke wurden lyophilisiert (Speedvac, 10 Min.). Im Anschluss wurden 20 µL eines Gemisches aus 100 mM DTT (Dithiothreitol) in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung inkubiert (30 Min., 56 °C), wodurch die Disulfidbrücken reduziert wurden. Die Probe wurde daraufhin kurz zentrifugiert und der Überstand wurde dann abpipettiert, wobei das abpipettierte Volumen für spätere Zwecke genau bestimmt wurde. Die Gelstücke wurden dann mit 20 µL 100% Acetonitril weiter eingesschrumpft bis sie milchig weiß waren, wodurch der

Überschuss an DTT entfernt wurde. Der Überstand wurde abgenommen und durch 20  $\mu\text{L}$  eines Gemisches aus 55 mM Iodacetamid in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung ersetzt, was anschließend im Dunkeln ohne Schütteln inkubiert wurde (20 Min.). Durch das Iodacetamid sollte verhindert werden, dass die durch das DTT zuvor reduzierten Disulfidbrücken erneut ausgebildet wurden. Die Probe wurde dann mit 20  $\mu\text{L}$  100 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung inkubiert, zentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen. Die Gelstücke wurden dann erneut mit 20  $\mu\text{L}$  100% Acetonitril inkubiert (5 Min., 25 °C), was anschließend ein weiteres Mal wiederholt wurde. Im Anschluss wurden die Gelstücke lyophilisiert (Speedvac, 10 Min.). In der Zwischenzeit wurde ein Aliquot Trypsin-Stammlösung bzw. AspN-Stammlösung auf Eis aufgetaut, welches dann mit 25 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung verdünnt wurde (Endkonzentration Trypsin: 12.5 ng/ $\mu\text{L}$ ; Endkonzentration AspN: 10 ng/ $\mu\text{L}$ ). Zu den lyophilisierten Gelstücken wurde das Volumen der präparierten Enzymlösung gegeben, welches bei der Reduktion mit DTT ermittelt wurde, und zusätzlich weitere 3  $\mu\text{L}$  Enzymlösung, um einen abnehmbaren Überstand zu gewährleisten. Die Gelstücke mit dem entsprechenden Volumen Enzymlösung wurden dann auf Eis gestellt (30 Min.) und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das Eppendorfgefäß kurz zentrifugiert und bei 37 °C geschüttelt (30 Min.). Nachdem erneut zentrifugiert wurde, wurde für die Messung 1  $\mu\text{L}$  des Verdauüberstandes entnommen und mit  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxizimtsäure (CHCA) als Matrix auf einer speziellen Metallplatte kokristallisiert, welche dann ins Massenspektrometer eingesetzt wurde.

### 3.2.11 MALDI-TOF

MALDI-TOF ist die Abkürzung für Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight und ist eine Methode der Massenspektrometrie. Das eigentliche grundlegende Prinzip der Massenspektrometrie beruht auf der Fragmentierung von Molekülen durch Elektronen, wodurch unterschiedlich große bzw. schwere Molekülfragmente entstehen, die in einem homogenen Magnetfeld proportional zu ihrer Masse aufgetrennt werden. Prinzipiell lässt sich ein Massenspektrometer in vier Funktionsabschnitte unterteilen: Probenzufuhr, Ionen-Erzeugung, Massentrennung und Ionen-Nachweis. Bei der MALDI-TOF erfolgt die Auftrennung der Moleküle jedoch nicht in einem Magnetfeld, sondern in einem elektrischen Feld, in welchem die unterschiedlich großen Fragmente unterschiedlich stark in Richtung Detektor beschleunigt werden. Dazu wurde das Massenspektrometer Ultraflex-II TOF/TOF (Bruker Daltonics, Bremen) im Institut für Chemie und Biochemie an der FU Berlin unter der Leitung



von Dr. Christoph Weise verwendet. Dieses Gerät verfügte als Probenzufuhr über einen Direkt-Einlass, bei dem die mit Trypsin behandelte Probe auf einer Metallplatte zunächst mit  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizinsäure (CHCA) kokristallisiert wurde (Kap. 3.2.10) und dann in die Schleusenkammer gebracht wurde, in der zunächst ein Vakuum entstand. Alle weiteren Schritte erfolgten im Hochvakuum, um unfreiwillige Zusammenstöße zwischen Ionen und Molekülen zu vermeiden. Als Ionisationsverfahren diente die bereits erwähnte Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization, bei dem die Probe mit einem Smart beam<sup>TM</sup> Laser bestrahlt wurde, wobei die Energie des Laser so hoch war, dass die Absorptionskapazität der bestrahlten Moleküle überschritten wurde und es zur Ionisierung der Moleküle kam (Photoionisation). Um eine Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wurden die zu untersuchende Probe mit CHCA als Matrix innigst vermischt, da die Aufgabe hatte die Energie des Lasers aufzunehmen und diese rasch, ohne dass thermische Zersetzung eintrat, auf die Untersuchungsmoleküle zu übertragen, wodurch diese ionisiert und durch äußere elektrische Felder aus dem Gemisch abgezogen wurden [474]. Als Analysator diente ein TOF-Analysator, wobei für die Flugzeit in Abhängigkeit von Masse ( $m$ ) und Ladungszahl ( $z$ ) folgender Zusammenhang besteht:  $\text{TOF} \propto \sqrt{\frac{m}{z}}$ . Aus der Ankunftszeit am Detektor und der Startzeit kann auf die Masse aller Ionen geschlossen werden. Durch Einbau eines sogenannten Reflektrons (Reflektron-Modus) zwischen Ionenerzeugung und -detektion wurden Energieunterschiede von Ionen gleicher Masse kompensiert, wodurch diese zeitgleich am Detektor auftrafen und somit zur besseren Auflösung führte [474]. Dadurch wurde zunächst ein Fingerprint der Peptidfragmente erhalten. Die Analyse einzelner Peptidfragmente wurde im LIFT-Modus durchgeführt [475], wobei eine zweite Beschleunigungsplatte dazugeschaltet wurde (TOF-TOF-Analyse). Dadurch wurden die Spektren der einzelnen Peptidfragmente erhalten, aus denen durch Analyse der Massedifferenzen der einzelnen Peaks die Aminosäuresequenzen abgeleitet werden konnten.

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1 RNA-Extraktion

Für die molekularbiologischen Arbeiten wurde zunächst die RNA aus einem relativ jungen Pflanzenmaterial von *Agrostemma githago* (Entwicklungsstadium I, Abb. 22, Kap. 4.4.1, ca.

drei Monate nach der Aussaat) extrahiert. Dazu standen zwei verschiedene Kits zur Verfügung: Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research) und RNeasy® Mini Kit (Qiagen) in Kombination mit TRIsure™ (Bioline). Da noch keine Erfahrungen mit der RNA-Extraktion aus *Agrostemma githago* bekannt waren, wurden beide Kits ausprobiert, wobei die Durchführung in manchen Punkten von dem Protokoll des Kits abwich, weshalb im Folgenden die Arbeitsschritte im Einzelnen aufgeführt werden. Beide Kits beruhten auf dem Prinzip der sauren Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktion [476]. Dabei wurde ein Zwei-Phasen-System ausgebildet, bei dem sich die Proteine, DNA und RNA in unterschiedlichen Schichten absetzten. In der unteren organischen Phase waren die denaturierten Proteine zu finden, die DNA befand sich an der Phasengrenze und die RNA war in der oberen wässrigen Phase gelöst.

Von der RNA-Extraktion wurden etwa 100 mg Pflanzenmaterial eingewogen und mit Hilfe der Schwingmühle MM400 (Retsch) homogenisiert (Frequenz 30.0%, 1.5 Min.), wobei darauf zu achten war, dass das Pflanzenmaterial stets Kontakt mit flüssigem Stickstoff hatte.

#### **RNA-Extraktion mit Direct-zol™ RNA MiniPrep**

Zu der Probe wurden 1.0 mL TRIsure™ und 1.0 mL 100% Ethanol gegeben. Dieses Gemisch wurde auf die Säule Zymo-Spin™ IIC gegeben und zentrifugiert (13000 rpm, 1 Min.). Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule wurde auf ein neues Collection Tube gesetzt. Anschließend wurde die Säule mit 400 µL Waschpuffer gewaschen (13000 rpm, 30 s). Der Durchfluss wurde entsorgt und die Säule wurde mit 80 µL DNase I Reaktions-Mix inkubiert (15 Min., 25 °C) und dann zentrifugiert (13000 rpm, 30 s), um die DNA aus der Probe zu entfernen. Danach wurde die Säule mit 400 µL Direct-zol™ RNA PreWash Puffer gewaschen und zentrifugiert (13000 rpm, 1 Min.). Dieser Vorgang wurde ein Mal wiederholt und im Anschluss wurde mit 700 µL Waschpuffer gewaschen (13000 rpm, 1 Min.) und der Durchfluss entsorgt. Um sicher zu gehen, dass der Puffer vollständig entfernt wurde, wurde die Säule auf ein leeres Collection Tube gesetzt und für weitere zwei Minuten zentrifugiert (13000 rpm), wobei der Durchfluss aufbewahrt wurde. Die Säule wurde auf ein RNase-freies Tube gesetzt und anschließend wurde mit 50 µL Nuklease-freiem Wasser eluiert (13000 rpm, 1 Min.). Die extrahierte RNA wurde bei – 80 °C aufbewahrt.

### RNA-Extraktion mit RNeasy® Mini Kit

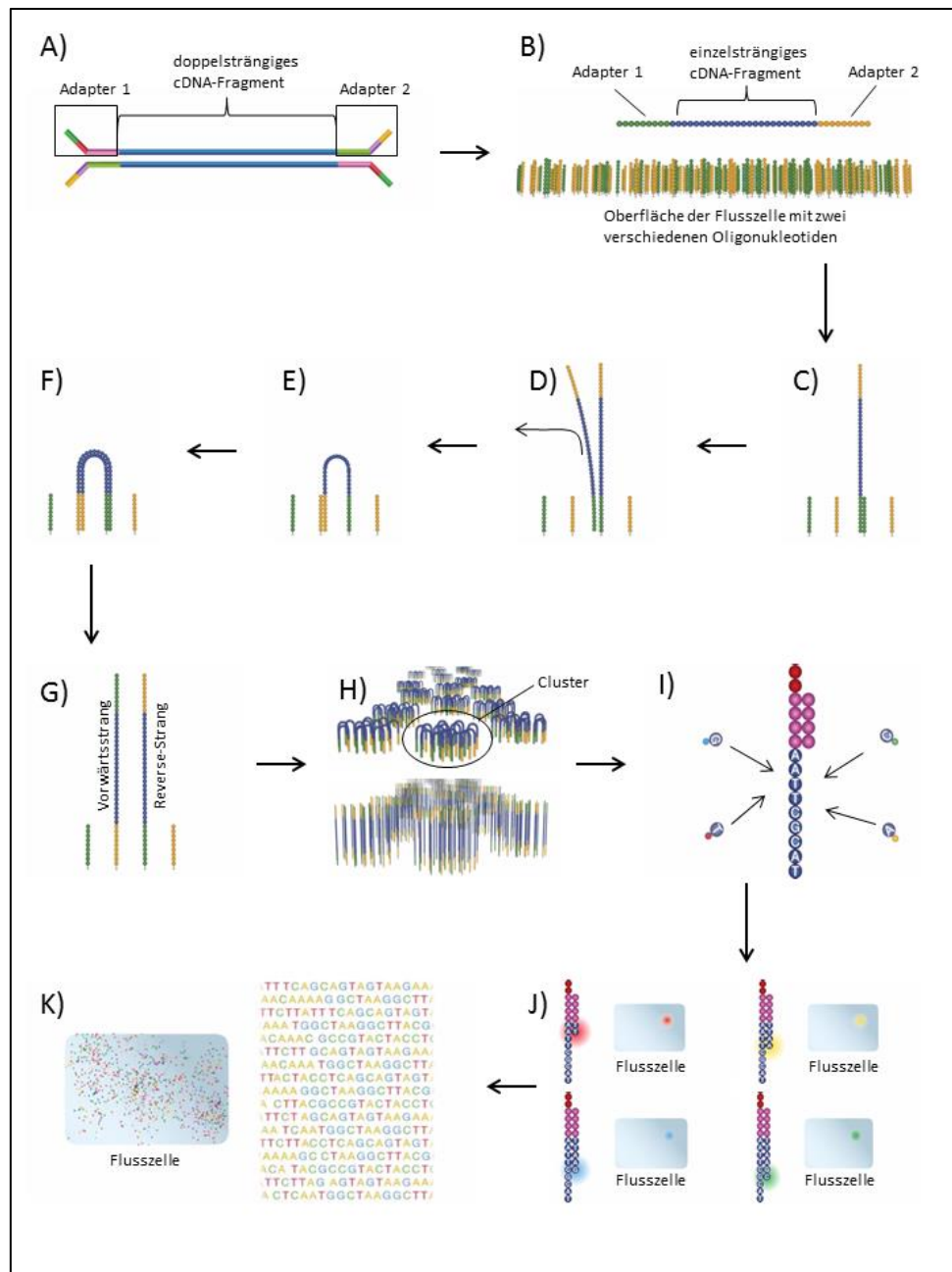
Die Probe wurde in einem Eppendorfgefäß mit 1.0 mL TRIsure™ durchmischt und inkubiert (15 Min., 25 °C). Nach Zugabe von 250 µL Chloroform wurde auf Eis inkubiert (5 Min.) und anschließend zentrifugiert (13000 rpm, 10 Min., 4 °C). Die obere Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 900 µL 2-Propanol versetzt, invertiert und inkubiert (20 Min., 25 °C). Der entstandene Niederschlag wurde pelletiert (13000 rpm, 10 Min., 4 °C) und der Überstand wurde entsorgt. Das Pellet wurde mit 1 mL 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (13000 rpm, 10 Min., 4 °C) und mittels Speedvac getrocknet (10 Min.). Anschließend wurde das Pellet in 87.5 µL RNase-freiem Wasser gelöst. Zu der Lösung wurden 10 µL RDD Puffer und 2.5 µL DNase I Lösung gegeben und inkubiert (10 Min., 25 °C). Danach wurde mit RNase-freiem Wasser auf 100 µL ergänzt und nach Zusetzen von 350 µL RLT Puffer wurde mit der Pipette vorsichtig durchmischt. Anschließend wurden 250 µL 100% Ethanol zugegeben und erneut mit der Pipette durchmischt. Dieses Gemisch wurde auf eine Säule (RNeasy Mini spin column) gegeben und zentrifugiert (13000 rpm, 15 s). Der Durchfluss wurde entsorgt und die Säule wurde mit 500 µL RPE Puffer gewaschen (13000 rpm, 15 s). Es folgte ein weiterer Waschprozess mit 500 µL RPE Puffer (13000 rpm, 2 Min.). Zum Schluss wurde die Säule auf ein RNase-freies Tube gesetzt und die RNA wurde mit 50 µL RNase-freiem Wasser eluiert (13000 rpm, 1 Min.). Die extrahierte RNA wurde bei – 80 °C aufbewahrt.

Auf diese Weise wurde die „total RNA“ erhalten, die neben mRNA weitere RNA-Moleküle wie z.B. tRNA, rRNA und miRNA enthielt. Im Anschluss der RNA-Extraktionen wurde die jeweilige RNA-Konzentration mit dem NanoDrop Spektralphotometer (NanoDrop™ 1000; Thermo Fisher Scientific) bestimmt.

### 3.3.2 RNA-Seq und bioinformatische Auswertung der Rohdaten

Die RNA-Seq bezeichnet die Sequenzierung der Nukleotidsequenz der RNA, die auf der Hochdurchsatz-Methode der DNA-Sequenzierung basiert. Die Hochdurchsatz-Sequenzierung (high-throughput sequencing) oder auch „next-generation sequencing“ (NGS) genannt wurde in Folge des „Human Genome Project“ [477] entwickelt, wobei mehrere unterschiedliche Methoden zu Tage gebracht wurden, die angesichts des hohen Durchsatzes, der parallelen Analyse vieler Basen und reduzierten Kosten [478] der Kettenabbruchmethode nach Sanger, die unter anderem bis *dato* der Goldstandard der DNA-Sequenzierung war, den Rang abgelaufen haben. Eine dieser Methoden ist die „sequencing by synthesis“ von Illumina, die mit

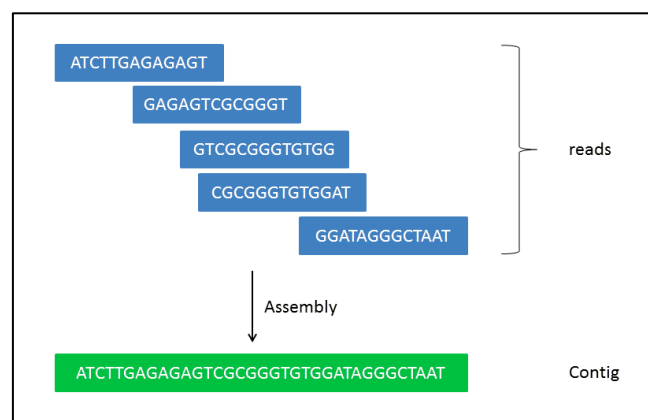
den entsprechenden Geräten u.a. von LGC (LGC Genomics GmbH, Berlin) angeboten wird. Eine Probe der isolierten total RNA (Kap. 3.3.1) wurde an LGC gegeben, die die Sequenzierung mit einem Illumina MiSeq<sup>TM</sup> V3 durchgeführt haben. Dazu wurde die Probe nach erfolgter Qualitätskontrolle zunächst in cDNA umgeschrieben und anschließend in kleinere DNA-Fragmente geschnitten, wobei an den Enden jedes Fragmentes zwei unterschiedliche Adapter angelagert wurden. Diese Adapter bestanden aus einer bekannten Sequenz von Nukleotiden. Dabei waren eine Region, an dem die für die Sequenzierung notwendigen Primer binden konnten, ein Index, mit dessen Hilfe die Sequenzierungsergebnisse der richtigen Probe zugeordnet werden konnten, sowie eine Region, die komplementär zu bestimmten Oligonukleotiden war, in dieser Adaptersequenz integriert. Die zuletzt genannten Oligonukleotide waren überall auf der Oberfläche der Flusszelle des Illumina MiSeq, in der die Sequenzierung stattfand, fest verankert und an diesen Oligonukleotiden konnten nun die Fragmente mit den Adaptern binden. Nach erfolgter Denaturierung der cDNA-Fragmente zu Einzelsträngen, wurden durch bestimmte Polymerase-, isothermischer Brückenamplifizierungs- und Waschprozesse zunächst Cluster – eine durch Amplifizierung entstandene Ansammlung identischer DNA-Stränge – auf der Glasoberfläche der Flusszelle generiert, von denen nacheinander zuerst der Vorwärtsstrang und dann der Reverse-Strang sequenziert wurde (Abb. 3). Dabei wurde jeweils der Gegenstrang am Template-Strang durch Heranziehen der Adaptersequenz-Primer, Index-Primer, sowie fluoreszenzmarkierter Nukleotide komplettiert. Die 3'-OH-Gruppe der Nukleotide (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) war zusätzlich durch eine abtrennbare Gruppe blockiert, wodurch gewährleistet wurde, dass immer nur eine Base pro Durchgang eingebaut und detektiert werden konnte (sequencing by synthesis) [478,479]. Nach jedem Einbau-Zyklus wurden die Cluster mit einem Laser bestrahlt, wodurch ein für jedes eingebaute Nukleotid charakteristisches Fluoreszenz-Signal emittiert und detektiert wurde. Anschließend wurden die Gruppe am 3'-Ende und die Fluorophore entfernt, sodass das nächste Nukleotid eingebaut und detektiert werden konnte. Dadurch wurde letztendlich eine kurze DNA-Sequenz erhalten, die man als read bezeichnet. Dieser Prozess konnte parallel für mehrere Millionen Fragmente ablaufen, sodass eine dementsprechend hohe Anzahl von reads bzw. Daten generiert wurde. LGC versprach dabei eine Anzahl von  $2 \times 10$  Millionen reads mit einer durchschnittlichen Länge von  $2 \times 300$  bp („2 x“ bedeutet, dass die Fragmente von beiden Enden sequenziert wurden).



**Abb. 3:** Darstellung der Sequenzierungsprozesse im Illumina MiSeq™ V3. Bilder stammen aus dem Video „Illumina Sequencing Technology“ Illumina Inc. [480]. **A)** cDNA-Fragment mit Adaptern; pink = Bindungsstelle für Sequenzierungsprimer 1; hellgrün = Bindungsstelle für Sequenzierungsprimer 2; rot = Index 1; violett = Index 2; orange = komplementäre Sequenz zum Oligonukleotid 1 der Oberfläche der Flusszelle; dunkelgrün = komplementäre Sequenz zum Oligonukleotid 2 der Oberfläche der Flusszelle. **B)** Einzelsträngiges cDNA-Fragment nach Denaturierung. **C)** Bindung des cDNA-Fragmentes an einem der zwei verschiedenen Oligonukleotide an der Oberfläche der Flusszelle. **D)** Ergänzung des komplementären Stranges am Templatestrang, der anschließend durch einen Waschprozess entfernt wird. **E) + F)** Brückenamplifizierung. **G)** Denaturierung des Brückenstranges zum einzelsträngigen Vorwärtsstrang und Reverse-Strang. **H)** Mehrfache Wiederholung der Prozesse E – G), wodurch Cluster entstehen; obere Hälfte: Brückenstränge; untere Hälfte: Vorwärtsstränge und Reverse-Stränge nach Denaturierung. **I)** Einbau der fluoreszenzmarkierten Nukleotide; pink: Sequenzierungsprimer **J)** Detektion der eingebauten Nukleotide, wodurch die Sequenz des cDNA-Fragmentes abgeleitet werden kann; jedes Nukleotid emittiert nach dem Einbau bei Bestrahlung mit einem Laser eine andere Wellenlänge; rot: Einbau von ddTTP; gelb: Einbau von ddATP; blau: Einbau von ddGTP; grün: Einbau von ddCTP. **K)** Simultane Sequenzierung vieler verschiedener Cluster.

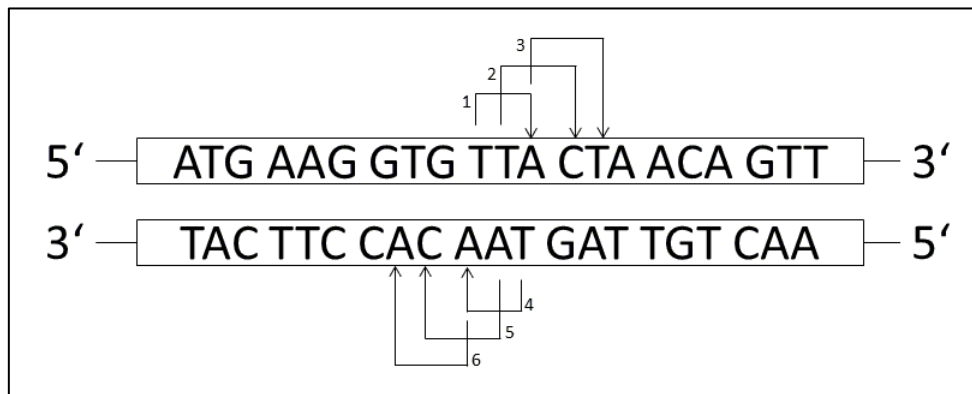
Die Daten wurden im FASTQ-Format geliefert, also in einem Datei-Format, in dem sowohl die Sequenz eines reads als auch die dazugehörigen Qualitätskriterien wie z.B. der Phred Score, der GC-Anteil oder die read-Länge gespeichert waren. Insbesondere der Phred Score ( $q$ ) wurde für die Auswertung der Rohdaten herangezogen, da er die Wahrscheinlichkeit ( $p$ ) repräsentiert, mit der das Signal beim sogenannten „base call“ – also bei der Detektion der emittierten Wellenlänge und Intensität beim Einbau eines fluoreszenzmarkierten Nukleotids – falsch interpretiert werden könnte:  $q = -10 \times \log_{10}(p)$  [481]. Ein Phred Score von z.B. 10 bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit eines inkorrekten base calls 1:10 beträgt und dementsprechend die Genauigkeit des base calls 90%. Ein Phred Score von 20 bedeutet eine Wahrscheinlichkeit eines inkorrekten base calls von 1:100 (Genauigkeit: 99%), ein Phred Score von 30 stellt eine entsprechende Wahrscheinlichkeit von 1:1000 (Genauigkeit: 99.9%) dar usw. Somit konnte mit dem Phred-Score direkt auf die Qualität der Rohdaten geschlossen werden und die Daten konnten dementsprechend gefiltert werden, sodass dem Ergebnis der Auswertung eine entsprechend hohe qualitative Aussagekraft beiwohnte.

**Bioinformatische Auswertung:** Ziel der Auswertung war es, die reads und Contigs mit den Ergebnissen der Aminosäuresequenzen der Peptidfragmente aus der MALDI-TOF Untersuchung (Kap. 4.3.4) abzugleichen, sodass letztendlich eine Nukleotidsequenz abgeleitet werden konnte, die die CDS (coding sequence) des Agrostins repräsentierte. Ein Contig stellt eine Nukleinsäuresequenz dar, die durch Überlappung mehrerer reads zustande kommt und dementsprechend eine längere Sequenz des gesuchten DNA-Abschnittes wiedergeben kann als ein einzelner read (Abb. 4).



**Abb. 4:** Schematische Gegenüberstellung von reads und Contig. Die reads, die mit einer bestimmten Sequenzlänge übereinanderlappen, werden durch einen Assembler (z.B. Velvet, GNU GPL) zu einem Contig zusammengefügt.

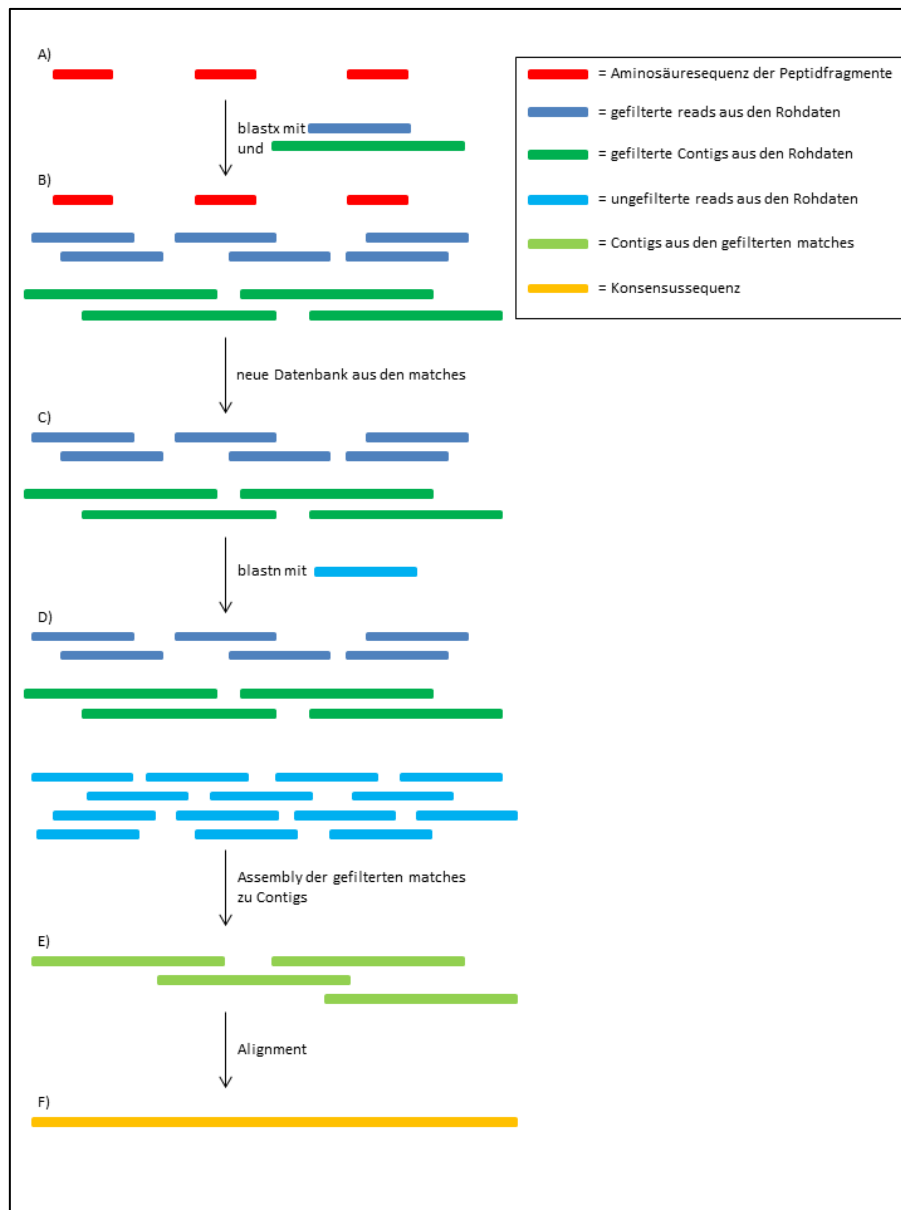
Um die Datenmenge bearbeiten zu können, wurden die Rohdaten in Soroban – ein Intel-basiertes System der Firma ClusterVision mit mehreren Rechenkernen [482] – eingespeist. Dabei wurden zunächst die FASTQ-Dateien unter Berücksichtigung entsprechender Qualitätsmerkmale gefiltert und die gefilterten Dateien wurden mit dem FASTX-Toolkit (fastx\_toolkit-0.0.14, GNU GPL) in FASTA-Dateien umgeschrieben, wodurch in diesem Format lediglich die Nukleinsäuresequenzen gespeichert waren. Die gefilterten reads und Contigs wurden dann gegen eine Datenbank, die aus den Peptidfragmenten der MALDI-TOF Ergebnisse kreiert worden ist, geblastet. Dabei wurde blastx (BLAST 2.2.29+, NCBI) verwendet, also eine Methode, bei der die Nukleinsäuresequenz mit allen sechs Möglichkeiten der Translation („Six-frame translation“, Abb. 5) mit der vorgegebenen Proteinsequenz verglichen wurde.



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der sechs verschiedenen Möglichkeiten des reading frames einer DNA-Sequenz. Frame 1: TTA CTA ACA GTT → AS: Leu-Leu-Thr-Val; Frame 2: TAC TAA CAG TT → AS: Tyr-\*-Gln; Frame 3: ACT AAC AGT T → AS: Thr-Asn-Ser; Frame 4: TAA CAC CTT CAT → AS: \*-His-Leu-His; Frame 5: AAC ACC TTC AT → AS: Asn-Thr-Phe; Frame 6: ACA CCT TCA T → Thr-Pro-Ser; AS = resultierende Aminosäuresequenz \* = Resultat eines Stopcodons, daher keine Aminosäure.

Aus den geblasteten reads und Contigs, die eine komplette oder anteilige Übereinstimmung (match) aufwiesen, wurde eine neue Datenbank kreiert, gegen die mit blastn (BLAST 2.2.29+, NCBI) alle reads geblastet wurden, ohne die reads vorher nach bestimmten Qualitätsmerkmalen zu filtern. Erst im Anschluss wurden die matches gefiltert und die entsprechenden reads wurden mit Velvet (Velvet\_1.2.10, GNU GPL) zu Contigs assembliert. Diese Contigs wurden dann aligniert, aus der dann mit Hilfe von Geneious (Version 8.1.5) [483] die Konsensussequenz extrahiert und dargestellt wurde. Somit konnte die CDS des Agrostins mit

dem entsprechenden Start- und Stopcodon abgelesen werden, die für alle hier verwendeten molekularbiologischen Arbeiten als Vorlage diente.



**Abb. 6:** Schematische Darstellung der Abläufe bei der bioinformatischen Auswertung der RNA-Seq-Rohdaten. **A)** Datenbank der Aminosäuresequenzen der Peptidfragmente. **B)** Gegenüberstellung der gefilterten reads und Contigs mit der Datenbank aus A), nachdem geblastet wurde. **C)** Erstellen einer neuen Datenbank aus den matches von B). **D)** Gegenüberstellung der ungefilterten reads mit der Datenbank aus C), nachdem geblastet wurde. **E)** assemblierte Contigs aus den matches aus D). **F)** Extrahierte Konsensussequenz aus dem Alignment von den Contigs aus E).

### 3.3.3 Umschreibung der extrahierten RNA in cDNA mittels Reverse Transkriptase

Die extrahierte RNA wurde mit Hilfe der Reverse Transkriptase (RevertAid™ H Minus Reverse Transcriptase, Thermo Fisher Scientific) in cDNA umgeschrieben. Dabei handelte es sich



um eine genetisch modifizierte Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV) Reverse Transkriptase, bei der die RNase H Aktivität ausgeschaltet wurde, wodurch der RNA-Anteil der entstandenen Erstrang cDNA (first strand cDNA), ein Hybrid aus DNA und mRNA, nicht abgebaut wurde.

**Tabelle 4.** Reverse Transkriptase zur Generierung von Oligo(dT)-cDNA und GSP-cDNA

Inkubation: 1.) 65 °C, 5 Min.; 2.) Auf Eis kühlen				
Reagenzien	Oligo(dT)-cDNA		GSP-cDNA	
	Volumen	Endkonzentration	Volumen	Endkonzentration
Template DNA	1 µL	0.16 µg/µL	1 µL	0.16 µg/µL
Primer <sup>1</sup>	OdT <sub>18</sub> P 1 µL	100 pM	GSP_RT 1 µL	20 pM
Nuklease-freies Wasser	ad 12.5 µL	-	ad 12.5 µL	-
Reverse Transkriptase-Reaktion: 1.) 42 °C, 60 Min.; 2.) 70 °C, 10 Min				
Reagenzien	Oligo(dT)-cDNA		GSP-cDNA	
	Volumen	Endkonzentration	Volumen	Endkonzentration
5 x Reaktionspuffer	4 µL	1 x	4 µL	1 x
RiboLock™ RNase Inhibitor	0.5 µL	1 U/µL	0.5 µL	1 U/µL
dNTP Mix (10 mM)	2 µL	1 mM pro dNTP	2 µL	1 mM pro dNTP
RevertAid™ H Minus Reverse Transcriptase	1 µL	10 U/µL	1 µL	10 U/µL
	<u>20 µL Endvolumen</u>		<u>20 µL Endvolumen</u>	

<sup>1</sup> Die exakte Angabe und die Erklärung der verwendeten Primer sind im Ergebnis-Teil (Kap. 4.6) zu finden; OdT<sub>18</sub>P = Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primer; GSP\_RT = Genspezifischer Primer für die Reverse Transkriptase

Durch Anwendung von zwei unterschiedlichen Primern wurden dementsprechend unterschiedliche cDNAs erhalten. Zum einen wurde ein Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primer (OdT<sub>18</sub>P) verwendet, der am Poly(A)-Schwanz der mRNA band, und zum anderen wurde ein genspezifischer Primer (GSP) verwendet, der am 3'-Ende der durch die *in silico*-Auswertung der RNA-Seq-Daten (Abb. 38, Kap. 4.6) bekannten Nukleotidsequenz band. Dazu wurden in zwei Ansätzen jeweils 1 µL total RNA-Lösung (c = 2093.3 ng/µL; s. Kap. 4.4.2) mit 1 µL Primer (20 pmol GSP bzw. 100 pmol OdT<sub>18</sub>P) und 10.5 µL RNase-freiem Wasser inkubiert (5 Min., 65 °C) und anschlie-

ßend auf Eis gekühlt. Zu diesem Gemisch wurden der Reihe nach 4 µL 5 x Reaktionspuffer, 0.5 µL RiboLock™ RNase Inhibitor, 2 µL dNTP-Mix (10 mM von jeder Base) und 1 µL RevertAid™ H Minus Reverse Transkriptase hinzugegeben, sodass sich ein Endvolumen von 20 µL ergab. Dieses Gemisch wurde zunächst inkubiert (60 Min., 42 °C) und anschließend wurde die Reverse Transkriptase terminiert (10 Min., 70 °C). Diese so erhaltenen Erststrang-cDNAs wurden als Oligo(dT)-cDNA und GSP-cDNA bezeichnet und bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C aufbewahrt.

### 3.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden Nukleinsäure-Stränge durch ein Agarose-Gelgerüst ihrer Größe nach aufgetrennt, wobei kleinere Stränge weniger stark von der Agarose-Matrix zurückgehalten werden als größere. Da in zwei verschiedenen Laboren gearbeitet wurde, wurden der Ausstattung des jeweiligen Labores entsprechend zwei unterschiedlich hergestellte Agarose-Gele zur Auftrennung und Bestimmung der Nukleinsäuren herangezogen. Dazu wurde ein 1%iges (Methode 1) bzw. 1.5%iges (Methode 2) (w/v) Agarose-Gel in einem bestimmten Puffer hergestellt, in welchem das Zucker-Phosphat-Rückgrat (Backbone) des Nukleinsäure-Stranges negativ geladen wurde und die DNA- und RNA-Proben somit in Richtung Anode wandern konnten.

**Methode 1** (1%iges Agarose-Gel in TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)): 0.5 g Agarose wurden in 50 mL 1x TAE-Puffer in einer Mikrowelle aufgeköcht. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C wurden wahlweise (je nach Konzentration der RNA/DNA-Probe) 2.5 µL Roti®-GelStain oder 2.5 µL Ethidiumbromidlösung (bei geringen RNA/DNA-Konzentrationen) zugegeben und mit der Agaroselösung durchmischt. Diese Lösung wurde dann in die Elektrophoreseapparatur gegossen und mit einem Taschenkamm für die Probenaschen zum Aushärten stehen gelassen. Für die Proben wurden 1 µL RNA/DNA-Lösung mit 2 µL Probenpuffer versetzt, mit 9 µL RNase- und DNase-freiem Wasser ergänzt, in die Geltasche pipettiert und die Elektrophorese wurde gestartet (100 V, 45 Min.).

**Methode 2** (1.5%iges Agarose-Gel in MOPS-Acetat-EDTA-Puffer): 1.2 g Agarose wurden in 57.6 mL H<sub>2</sub>O in einer Mikrowelle aufgeköcht und anschließend auf 55 °C abgekühlt. An dem Punkt wurden 8 mL 10x MOPS-Puffer und 14.4 mL Formaldehydlösung hinzugegeben, durchmischt und in die Elektrophorese-Apparatur gegossen und mit einem Taschenkamm für die Probenaschen zum Aushärten stehen gelassen. In der Zwischenzeit wurde 1 µL RNA-

haltige Probenlösung mit 17  $\mu\text{L}$  Probenpuffer erhitzt (10 Min., 85 °C) und anschließend kurz zentrifugiert. Zum Schluss wurden 2  $\mu\text{L}$  Loading-Puffer zugegeben und die Probe wurde in eine Geltasche pipettiert und die Elektrophorese wurde gestartet (100 V, 2 Std.).

### 3.3.5 Primerdesign

Alle für diese Arbeit verwendeten Primer wurden mit Hilfe des Programms OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies) designt. Dabei wurde insbesondere darauf geachtet, dass für eine PCR das Primer-Paar sehr ähnliche Schmelztemperaturen  $T_m$  aufwies ( $\Delta T_m \leq 1$  °C). Außerdem wurde beim Design darauf geachtet, dass der GC-Anteil zwischen 40% und 60% lag und keine Selbst- bzw. Homodimerisierung der Primer auftreten konnte. Die Primer wurden bei metabion (metabion international AG, Planegg) bestellt.

### 3.3.6 DNA-Amplifizierung durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Eine PCR wurde angewandt, um bestimmte DNA-Abschnitte zu amplifizieren und diese dann zwecks Sequenzierung und Weiterverarbeitung in den pJET1.2-Vektor zu ligieren (Kap. 3.3.9). In dieser Arbeit kam die PCR bei der 3′-/5′-RACE-PCR (Kap. 3.3.7) und bei einer Klonierungs-PCR zum Einsatz. Dafür wurde die PCR mit der Phusion<sup>TM</sup> High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. In Tabelle 5 und Tabelle 6 sind lediglich die eingesetzten Volumina und die Reaktionsbedingungen der Klonierungs-PCR aufgelistet. Die Volumina und Reaktionsbedingungen der 3′-/5′-RACE-PCR sind in Kap. 3.3.7 zu finden.

**Tabelle 5.** Eingesetzte Volumina der Reaktionspartner der Klonierungs-PCR

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
5x Phusion HF Puffer	10 $\mu\text{L}$	1x
10 mM dNTPs	1 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{M}$ pro dNTP
Primer A (10 $\mu\text{M}$ ) <sup>1</sup>	2.5 $\mu\text{L}$	0.5 $\mu\text{M}$
Primer B (10 $\mu\text{M}$ ) <sup>1</sup>	2.5 $\mu\text{L}$	0.5 $\mu\text{M}$
Template DNA <sup>1</sup>	1 $\mu\text{L}$	90 $\text{pg}/\mu\text{L}$
Phusion DNA Polymerase	0.5 $\mu\text{L}$	0.02 U/ $\mu\text{L}$
Nuklease-freies Wasser	<i>ad</i> 50.0 $\mu\text{L}$	-

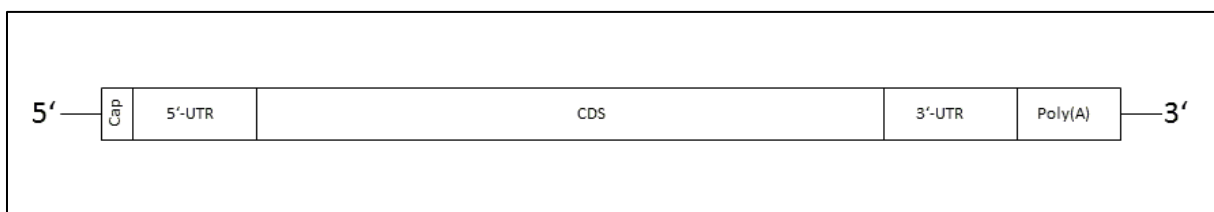
<sup>1</sup> Die exakte Angabe und die Erklärung der verwendeten Primer und der Template DNA sind im Ergebnis-Teil (Kap. 4.7) zu finden

**Tabelle 6.** Reaktionsbedingungen der Klonierungs-PCR im T1 Thermocycler

Vorgang	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
1.) Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1
2.) Denaturierung	98 °C	10 s	2.) - 4.): 35
3.) Annealing	76 °C	30 s	
4.) Extension	72 °C	15 s	
5.) Finale Extension	72 °C	300 s	1
	4 °C	hold	

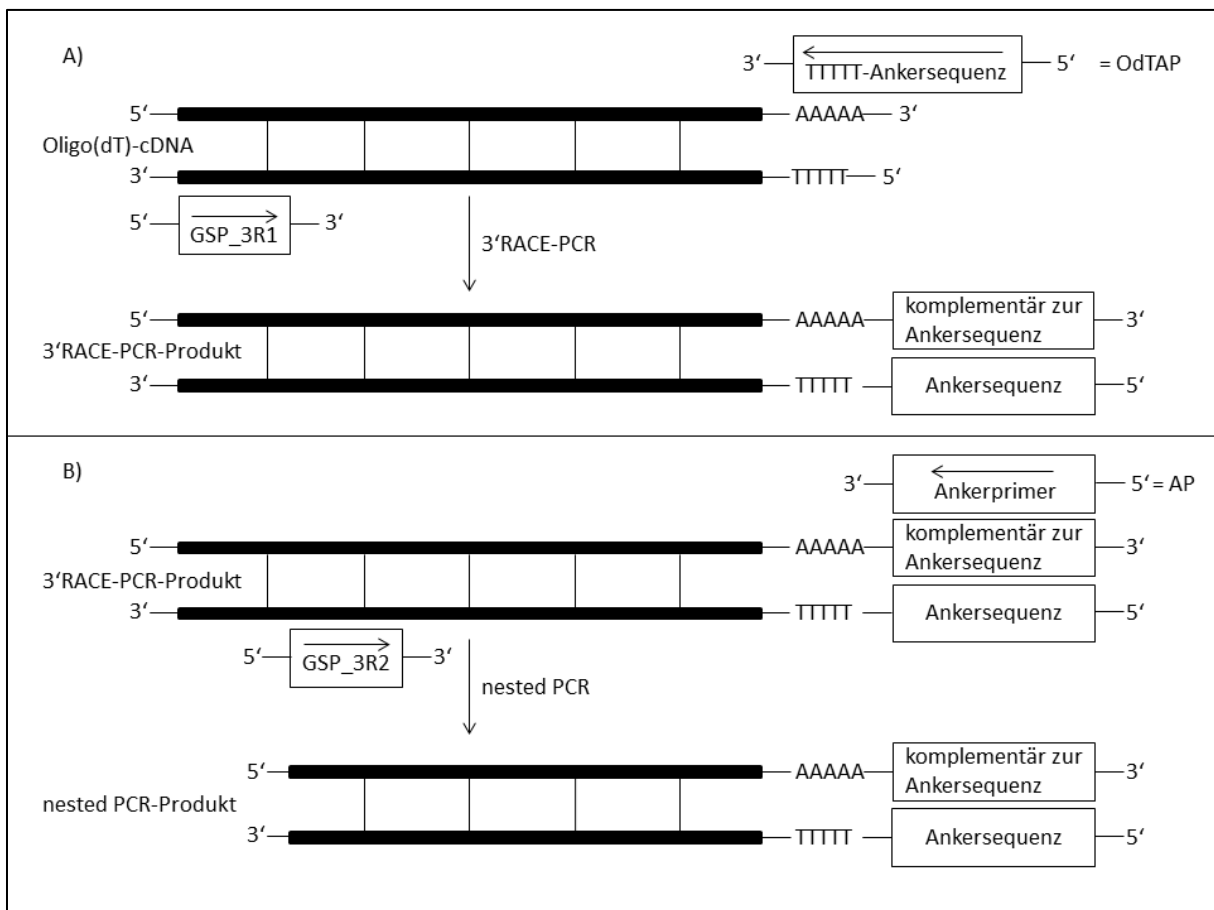
### 3.3.7 3'RACE- und 5'RACE-PCR

Die mRNA eines Gens besteht neben der für ein bestimmtes Protein codierenden Region (CDS = coding sequence) aus nicht-translatierten Regionen (UTR = untranslated region), die die CDS sowohl vom 5'- als auch vom 3'-Bereich flankieren, sowie aus dem 5'-Cap und einem Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende (Abb. 7). Mit der RACE-PCR (rapid amplification of cDNA ends with polymerase chain reaction) können die Sequenzen der UTRs ermittelt werden. In dieser Arbeit wurde die RACE-PCR hinzugezogen, um experimentell die Nukleotidsequenz, die durch die *in silico* Analyse der RNA-Seq-Daten (Abb. 25, Kap. 4.5 und Abb. 38, Kap. 4.6) erhalten wurde, in der isolierten mRNA zu verifizieren. Dazu wurden zunächst ausgehend von der bekannten *in silico*-Sequenz bestimmte Primer designt, mit denen zusammen mit einem Anker-Primer in einer PCR ein bestimmter DNA-Abschnitt amplifiziert wurde. Das Amplifikat wurde anschließend in den pJET1.2-Vektor kloniert (Kap. 3.3.9), in kompetente DH10B-Zellen transformiert (Kap. 3.4.1) und nach erfolgter Plasmidaufreinigung (Kap. 3.3.10) wurde der DNA-Abschnitt von LGC (LGC Genomics GmbH, Berlin) sequenziert.

**Abb. 7:** Schematische Darstellung einer mRNA. UTR = Untranslated Region; CDS = coding sequence

### 3'RACE-PCR

Für die 3'RACE-PCR wurde die durch die Reverse Transkriptase erhaltene Oligo(dT)-cDNA (Kap. 3.3.3; Kap. 4.6) als Template verwendet. Dabei wurde der Poly(A)-Schwanz ausgenutzt, indem ein Oligo(dT)-Ankerprimer (OdTAP) verwendet wurde, der komplementär zum Poly(A)-Schwanz war und an dem zusätzlich eine Ankersequenz angebracht war, die 5' überstand. Zusammen mit einem genspezifischen Primer (GSP) wurde in einer ersten PCR (3'RACE-PCR) also ein PCR-Produkt erhalten, in dem am Poly(A)-Ende eine bekannte Sequenz integriert wurde. Somit war die 3'-UTR und der angrenzende Poly(A)-Teil des PCR-Produktes von zwei DNA-Abschnitten mit bekannter Nukleotidsequenz flankiert.



**Abb. 8:** Schematische Darstellung der 3'RACE-PCR. **A)** 3'RACE-PCR mit Oligo(dT)-cDNA (Kap. 3.3.3) als Template, Oligo(dT)-Ankerprimer (OdTAP) als Reverse Primer und einem genspezifischen Primer (GSP\_3R1) als Forward Primer. Durch den OdTAP wird eine Ankersequenz mit bekannter Nukleotidsequenz eingebaut. **B)** nested PCR mit dem 3'RACE-PCR-Produkt als Template, Ankerprimer (AP) als Reverse Primer und einem etwas weiter innen liegenden genspezifischen Primer (GSP\_3R2) als Forward Primer. Die Erklärung und die Sequenzen der Primer sind in Kap. 4.6 zu finden.

Da nach dieser 3'RACE-PCR noch weitere, unspezifische PCR-Produkte erhalten wurden, wurde der Anteil spezifischer PCR-Produkte durch eine weitere PCR erhöht, indem weiter innen liegende sequenzspezifische Primer (z.B. GSP\_3R2) und ein Ankerprimer (AP), der an der Ankersequenz des 3'RACE-PCR-Produktes band, verwendet wurden (nested PCR).

**Tabelle 7.** Eingesetzte Volumina der Reaktionspartner der 3'RACE-PCR und nested PCR

Reagenzien	Volumen				Endkonzentration
	3'RACE-PCR	nested PCR 1	nested PCR 2	nested PCR 3	
5x Phusion HF Puffer	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	1x
10 mM dNTPs	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	200 µM pro dNTP
Forward Primer <sup>1</sup>	GSP_3R1 2.5 µL	GSP_3R2 2.5 µL	GSP_3R3 2.5 µL	GSP_3R4 2.5 µL	0.5 µM
Reverse Primer <sup>1</sup>	OdTAP 2.5 µL	AP 2.5 µL	AP 2.5 µL	AP 2.5 µL	0.5 µM
Template DNA	Oligo(dT)-cDNA 2.5 µL	3'RACE-PCR-Produkt 0.5 µL	3'RACE-PCR-Produkt 0.5 µL	3'RACE-PCR-Produkt 0.5 µL	n.b.
Phusion DNA Polymerase	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.02 U/µL
Nuklease-freies Wasser	<i>ad</i> 50.0 µL	<i>ad</i> 50.0 µL	<i>ad</i> 50.0 µL	<i>ad</i> 50.0 µL	-

<sup>1</sup> Die exakte Angabe und die Erklärung der verwendeten Primer sind im Ergebnis-Teil (Kap. 4.6) zu finden; GSP = genspezifischer Primer; OdTAP = Oligo(dT)-Ankerprimer; AP = Ankerprimer; n.b. = nicht bestimmt, eine Konzentrationsmessung wurde nicht durchgeführt.

**Tabelle 8.** Reaktionsbedingungen der 3'RACE-PCR, 5'RACE-PCR und nested PCR im T1 Thermocycler

Vorgang	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
1.) Initiale Denaturierung	98 °C	120 s	1
2.) Denaturierung	98 °C	30 s	2). – 4.): 34
3.) Annealing	55 °C	30 s	
4.) Extension	72 °C	40 s	
5.) Finale Extension	72 °C 8 °C	120 s hold	1

**5'RACE-PCR**

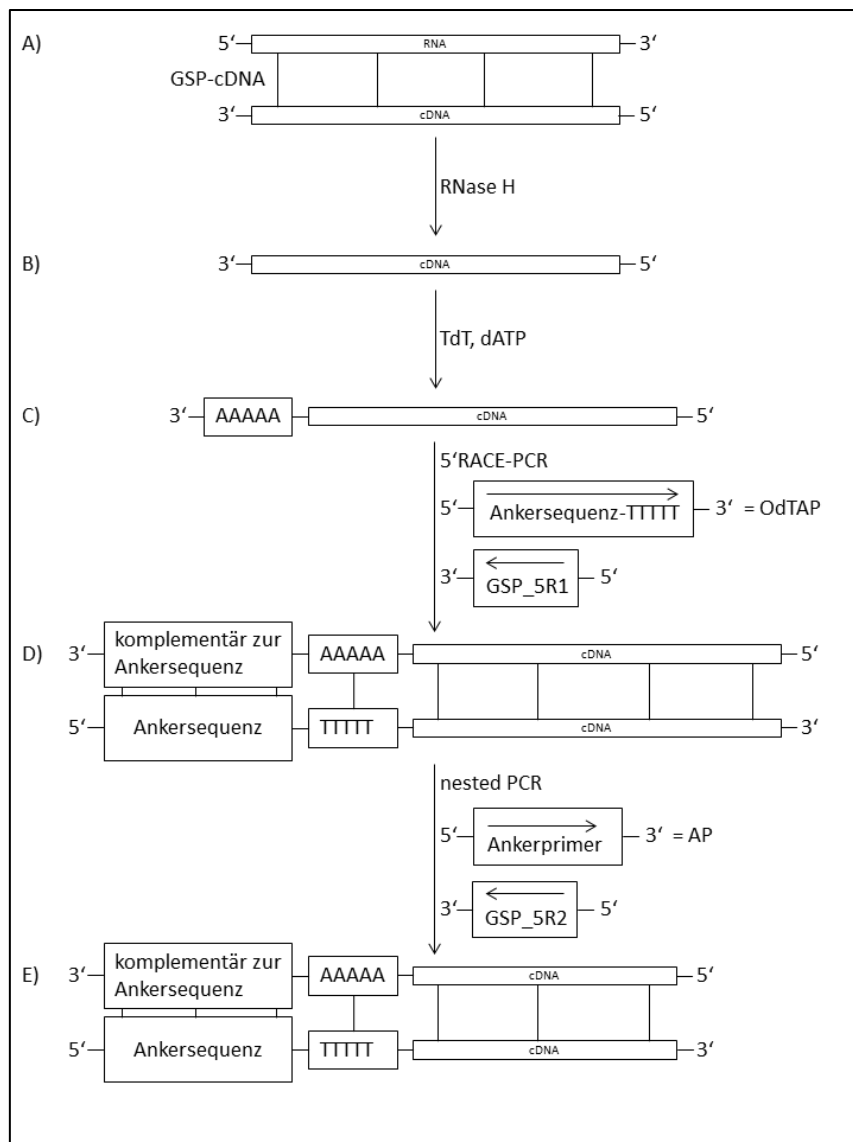
Für die 5'RACE-PCR wurde die GSP-cDNA (Kap. 3.3.3; Kap. 4.6) als Template verwendet, wobei zunächst der RNA-Anteil des RNA-DNA-Hybrides durch eine RNase H-Behandlung abgebaut wurde. Dazu wurden 30 µL GSP-cDNA mit 0.5 µL RNase H (Thermo Fisher Scientific) inkubiert [1.) 37 °C, 25 Min.; 2.) 70 °C, 10 Min.] und die dabei entstandene einsträngige cDNA wurde aufgereinigt (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, Machery-Nagel). Dazu wurden 61 µL NTC-Puffer zugegeben und in eine Säule (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column) überführt und zentrifugiert (11000 g, 30 s). Anschließend wurde zwei Mal mit 700 µL NT3-Puffer gewaschen (11000 g, 30 s). Nach dem Waschprozess wurde die Membran in der Säule trocken zentrifugiert, um sicher zu stellen, dass der Waschpuffer komplett entfernt wurde (11000 g, 1 Min.). Zum Schluss wurden 18 µL Nuklease-freies Wasser auf die Säule gegeben, für eine Minute inkubiert und anschließend eluiert (11000 g, 1 Min.).

**Tabelle 9.** Eingesetzte Volumina der Reaktionspartner der 5'RACE-PCR und nested PCR

Reagenzien	Volumen				Endkonzentration
	5'RACE-PCR	nested PCR 1	nested PCR 2	nested PCR 3	
5x Phusion HF Puffer	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	1x
10 mM dNTPs	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	200 µM pro dNTP
Forward Primer <sup>1</sup>	GSP_5R1 2.5 µL	GSP_5R2 2.5 µL	GSP_5R3 2.5 µL	GSP_5R4 2.5 µL	0.5 µM
Reverse Primer <sup>1</sup>	OdTAP 2.5 µL	AP 2.5 µL	AP 2.5 µL	AP 2.5 µL	0.5 µM
Template DNA	GSP-cDNA 2.5 µL	5'RACE-PCR-Produkt 0.5 µL	5'RACE-PCR-Produkt 0.5 µL	5'RACE-PCR-Produkt 0.5 µL	n.b.
Phusion DNA Polymerase	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.02 U/µL
Nuklease-freies Wasser	<i>ad</i> 50.0 µL	<i>ad</i> 50.0 µL	<i>ad</i> 50.0 µL	<i>ad</i> 50.0 µL	-

<sup>1</sup> Die exakte Angabe und die Erklärung der verwendeten Primer sind im Ergebnis-Teil (Kap. 4.6) zu finden; GSP = genspezifischer Primer; OdTAP = Oligo(dT)-Ankerprimer; AP = Ankerprimer; n.b. = nicht bestimmt, eine Konzentrationsmessung wurde nicht durchgeführt.

Anschließend an die RNase H-Behandlung sollte an den cDNA-Strang ein Poly(A)-Ende angehängt werden (Poly(A)-Tailing). Dazu wurde die terminale Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT; Thermo Fisher Scientific) verwendet, die die Aufgabe hatte dATP am 3'-OH katalytisch zu substituieren. Somit sollte also am 3'-Ende ein Poly(A)-Schwanz entstehen, der dann wie bei der 3'-RACE-PCR ausgenutzt werden konnte, um mit einem Oligo(dT)-Ankerprimer eine Ankersequenz anzuhängen, mit der in einer weiteren PCR-Reaktion eine Bindungsstelle für einen Ankerprimer geschaffen werden sollte.



**Abb. 9:** Schematische Darstellung der 5'RACE-PCR. **A)** GSP\_cDNA (Kap. 3.3.3) als Template. **B)** Aufgereinigter cDNA-Strang nach dem RNA-Abbau durch RNase H. **C)** Durch TdT ergänzter Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende des cDNA-Stranges. **D)** 5'RACE-PCR-Produkt nach der 5'RACE-PCR mit dem Oligo(dT)-Ankerprimer (OdTAP) als Forward Primer und einem genspezifischen Primer (GSP\_5R1) als Reverse Primer. **E)** nested PCR-Produkt mit dem 5'RACE-Produkt als Template, Ankerprimer (AP) als Forward Primer und einem etwas weiter innen liegenden genspezifischen Primer (GSP\_5R2) als Reverse Primer. Die Erklärung und die Sequenz der Primer sind in Kap. 4.6 zu finden.



Für das Poly(A)-Tailing wurden folgende Reagenzien zusammengegeben: 18 µL Eluat (aufgereinigte einsträngige cDNA nach RNase H-Behandlung), 5 µL 5x Reaktionspuffer (Endkonzentration: 1x), 1 µL dATP (Endkonzentration: 100 µM) und 1 µL TdT (Endkonzentration: 1 U/µL). Diese Mischung wurde zuerst für 25 Minuten bei 37 °C und dann für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Danach wurde die cDNA wie bereits bei der RNase H-Behandlung beschrieben mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up System (Machery-Nagel) aufgereinigt, wobei zum Schluss mit 30 µL Nuklease-freiem Wasser eluiert wurde. Dieses Eluat diente dann als Template für die anschließende 5'RACE-PCR und nested PCR, wobei derselbe Oligo(dT)-Ankerprimer und derselbe Ankerprimer wie bei der 3'RACE-PCR, jedoch unterschiedliche genspezifische Primer (GSP) verwendet wurden.

### **3.3.8 DNA-Extraktion aus einem Agarose-Gel**

In manchen Fällen musste die durch eine Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigte DNA-Probe weiterverarbeitet werden. Dazu musste die Gelbande zunächst aus dem Gel extrahiert werden, was mit Hilfe von ZymoClean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research) durchgeführt wurde. Dazu wurde die Gelbande mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Das Gelstück wurde mit dem dreifachen Volumen ADB Puffer inkubiert (mind. 15 Min., 45 °C) bis es vollständig gelöst war. Die Lösung wurde dann auf die Minisäule ZymoSpin™ Column übertragen und zentrifugiert (10000 rpm, 60 s). Der Durchfluss wurde entsorgt und die Säule wurde mit 200 µL Waschpuffer gewaschen (10000 rpm, 30 s), wobei dieser Waschprozess einmal wiederholt wurde. Der Durchfluss wurde entsorgt und die Säule wurde auf ein leeres, RNase- und DNase-freies Eppendorfgefäß gesetzt und mit 6 µL DNA Elutionspuffer eluiert (10000 rpm, 60 s). Die Konzentration wurde mit dem Spektralphotometer Eppendorf BioSpectrometer® bestimmt.

### **3.3.9 Ligation eines DNA-Abschnittes in den pJET1.2-Klonierungsvektor**

Die bei der Klonierungs-PCR (Kap. 3.4.6) und 3'RACE-PCR (Kap. 3.4.7) entstandenen PCR-Produkte wurden zwecks Sequenzierung oder Weiterverarbeitung in den Klonierungsvektor pJET1.2/blunt (CloneJET PCR Cloning Kit, Thermo Fisher Scientific) ligiert. Dazu wurden 1 µL des PCR-Produktes nacheinander mit 10 µL 2 x Reaktionspuffer, 7 µL Nuklease-freiem Wasser, 1 µL pJET1.2/blunt Klonierungsvektor (50 ng/µL) und 1 µL T4 DNA Ligase versetzt, kurz geschüttelt und zentrifugiert. Anschließend wurde bei Raumtemperatur inkubiert (5 Min.). Dabei entstand ein ringförmiger Vektor, der zwecks Vervielfältigung in Bakterienzellen trans-

formiert werden konnte (Kap. 3.4.1). Das optimale Insert:Vektor-Verhältnis wurde mit 3:1 angegeben. Daher wurde die Konzentration des Inserts vor dem Zugeben der anderen Komponenten dementsprechend eingestellt.

### **3.3.10 Plasmid-Aufreinigung aus kultivierten Bakterienzellen**

Das bei der Kultivierung von Bakterien (Kap. 3.4.1) vervielfältigte Plasmid, welches die DNA-Abschnitte, die bei der 3'RACE-PCR und Klonierungs-PCR vervielfältigt wurden, enthielt, wurde mit Hilfe des Zyppy™ Plasmid Miniprep Kits (Zymo Research) isoliert. Dazu wurden 600 µL Bakterien-Kultur entnommen und in einem Eppendorfgesäß mit 100 µL 7x Lyse-Puffer vermischt. Anschließend wurde mit 350 µL Neutralisierungspuffer unter Mischen neutralisiert und zentrifugiert (13000 rpm, 4 Min.). Der Überstand wurde in die Zymo-Spin™ IIN Säule pipettiert und zentrifugiert (13000 rpm, 15 s). Der Durchfluss wurde entsorgt und die Säule wurde mit 200 µL Endo-Waschpuffer gewaschen (13000 rpm, 30 s). Anschließend wurde mit 400 µL Zyppy™-Waschpuffer gewaschen (13000 rpm, 1 Min.) und zum Schluss wurde mit 30 µL Zyppy™ Elutionspuffer in ein Nuklease-freies Eppendorfgesäß eluiert (13000 rpm, 30 µL). Die Konzentration wurde mit dem Spektralphotometer Eppendorf BioSpectrometer® bestimmt.

### **3.3.11 Enzymatischer Verdau des in den pJET1.2-Vektor ligierten Inserts mit Restriktionsenzymen**

Der pJET1.2-Vektor wurde nach der Ligation (Kap. 3.4.9) mit dem Klonierungs-PCR-Produkt (Kap. 3.3.6) mit den Restriktionsenzymen EcoRI-HF® und SacII verdaut. Die entsprechenden Schnittstellen für diese Enzyme (EcoRI-HF®: 5'-G↓AATTC-3'; SacII: 5'-CCGC↓GG-3') wurden mit den Primern bei der Klonierungs-PCR eingebaut. Für den Verdau wurden 3 µL Klonierungs-PCR-Produkt zunächst mit 40 µL Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Zu diesen 43 µL DNA-Probe wurden dann 5 µL 10x CutSmart® Puffer (Endkonzentration: 1x), 1 µL SacII (1:1 mit H<sub>2</sub>O verdünnt; Endkonzentration: 200 U/mL) und 1 µL EcoRI-HF® (1:1 mit H<sub>2</sub>O verdünnt; Endkonzentration: 200 U/mL) zugegeben. Dieses Gemisch wurde dann im T1 Thermocycler inkubiert [1.): 37 °C, 7 Std.; 2.): 4 °C, hold].

## 3.4 Mikrobiologische Methoden

### 3.4.1 Transformation von DNA in kompetente Bakterienzellen und anschließende Kultivierung dieser Bakterien

Die in den pJET1.2-Vektor ligierten Inserts (Kap. 3.3.9) wurden als rekombinante DNA in kompetente, modifizierte *E. coli* Zellen transformiert. Wie bereits in Kap. 3.3.4 erwähnt, wurde für manche Methode in zwei unterschiedlichen Laboren gearbeitet, sodass für die Transformation des 3'RACE-PCR-Produktes und des Klonierungs-PCR-Produktes jeweils verschiedene kompetente Zellen zur Verfügung standen. Dabei wurde das 3'RACE-PCR-Produkt in kompetente DH10B-Zellen (MAX Efficiency® DH10B™ Competent Cells, Invitrogen) und das Klonierungs-PCR-Produkt in kompetente DH5α-Zellen (Library Efficiency® DH5α™ Competent Cells, Invitrogen) transformiert. Die Durchführung war dabei für beide Zelltypen gleich. Dazu wurde ein Aliquot (20 µL) kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und das Volumen, das 10 ng der DNA-Probe entsprach, wurde zu den Zellen gegeben und für 30 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Hitze-Schock-Behandlung für 90 Sekunden bei 42 °C durchgeführt. Danach wurde für zwei Minuten auf Eis inkubiert. Nachdem 180 µL S.O.C. Medium zugegeben wurde, wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 50 µL und 100 µL auf jeweils einer Agar-Platte ausplattiert und erneut über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Herstellung der LB Agar Ampicillin-Platten (500 mL):

1. 17.5 g pulverisiertes Medium (LB Broth with agar (Lennox), Sigma-Aldrich) in 400 mL Wasser unter Rühren und Erhitzen lösen.
2. pH-Wert auf 7.0 einstellen und mit Wasser auf 500 mL ergänzen.
3. Autoklavieren (15 Min., 121 °C).
4. Auf 55 °C abkühlen und 1 mL sterilfiltrierte Ampicillin-Stammlösung (25 mg/mL) hinzugeben (Endkonzentration des Ampicillins: 50 µg/mL).
5. Gründlich durchmischen und im LAF-Abzug in Petrischalen ausgießen.

Nach dem Inkubieren wurden einzelne Kolonien mit einer Pipettenspitze gepickt, in 4 mL flüssigem LB Ampicillin-Medium getaucht und für 8 Std. bei 37 °C im Schüttler (200 rpm) inkubiert. Aus dieser entstandenen getrübbten Bakterienkultur konnte anschließend das Plasmid isoliert werden (Kap. 3.3.10).

Herstellung LB Ampicillin-Medium (50 mL):

1. 1.25 g pulverisiertes LB-Medium (Luria/Miller; Carl Roth) in 40 mL Wasser unter Rühren lösen.
2. pH-Wert auf 7.0 einstellen und mit Wasser auf 50 mL ergänzen.
3. Autoklavieren (15 Min., 121 °C).
4. Auf 55 °C abkühlen und 0.1 mL sterilfiltrierte Ampicillin-Stammlösung (25 mg/mL) hinzugeben (Endkonzentration des Ampicillins: 50 µg/mL).

## 4 Ergebnisse und Diskussion

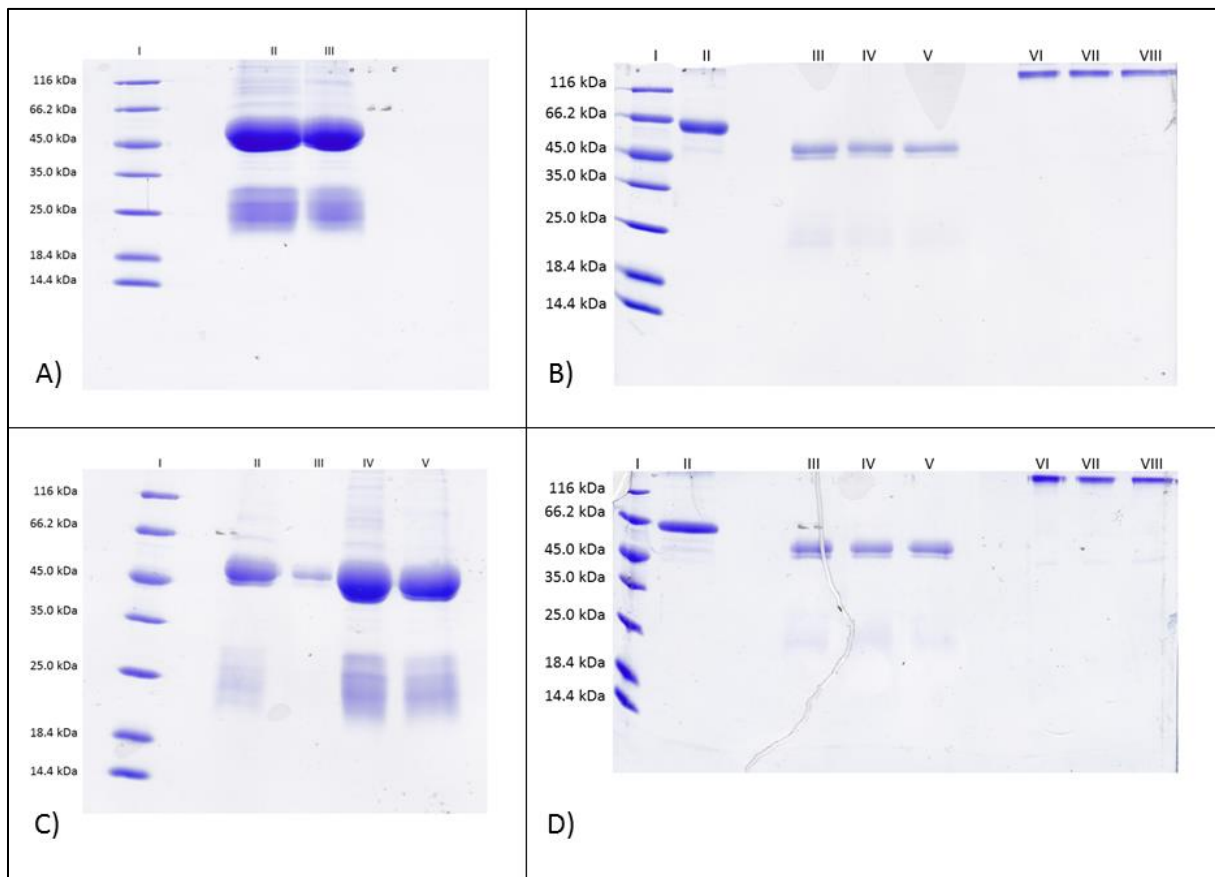
### 4.1 Aufreinigung der Antikörper und Isolierung des Agrostins

Um das Agrostin aus den Samen von *Agrostemma githago* isolieren zu können, wurde der Plan aufgestellt eine Affinitätschromatographie-Säule mit entsprechenden Antikörpern zu präparieren. Das entsprechende Serum, die diese Antikörper enthielt, war aufgrund der Promotions-Arbeit von Dr. P. Hebestreit bereits vorrätig [468]. Für die Isolierung dieser Antikörper wurde wie in Kap. 3.3.8 und Kap. 3.3.9 beschrieben verfahren, wobei an dieser Stelle ausdrücklich die Funktion des Agrostin<sub>Sigma</sub>, welches bereits in Kap. 3.3.9 erwähnt wurde, näher erklärt werden sollte. Zu Beginn dieser Arbeit war es möglich eine geringe Menge an Agrostin bei Sigma-Aldrich kommerziell zu erwerben (in dieser Arbeit als Agrostin<sub>Sigma</sub> bezeichnet). Es hat sich jedoch herausgestellt, dass die Produktion bzw. Isolierung und damit auch das Angebot dieses Agrostin<sub>Sigma</sub> bereits kurz nach Beginn dieser Arbeit außerplanmäßig eingestellt wurde, sodass die Menge an Agrostin<sub>Sigma</sub> für sämtliche anstehende Untersuchungen dieser Arbeit wie z.B. die Isolierung der anti-Agrostin Antikörper, Western Blots, zytotoxische Untersuchungen und erste MALDI-TOF Untersuchungen als ein gravierender limitierender Faktor angesehen werden musste. Daher war es unbedingt nötig dieses Agrostin<sub>Sigma</sub> dementsprechend einzuteilen, sodass zunächst für die Isolierung der anti-Agrostin Antikörper lediglich eine entsprechend kleine Chromatographie-Säule mit NHS hergestellt wurde. Dadurch bedingt war die Ausbeute an isolierten anti-Agrostin Antikörpern relativ gering, wodurch ebenfalls nur eine kleine Affinitätschromatographie-Säule für die Isolierung des Agrostins präpariert werden konnte.

#### 4.1.1 Aufreinigung der anti-Agrostin- und anti-Peptid-Antikörper aus den entsprechenden Kaninchenseren

Abb. 10 zeigt ein SDS-PAGE-Gel der aufgereinigten anti-Agrostin-Antikörper [A) und B)] und anti-Peptid-Antikörper [C) und D)], die an späterer Stelle näher erklärt werden. Dabei sind in A) und C) sämtliche Antikörper, die im Serum enthalten waren, zu sehen, die mit Hilfe des Protein A aus dem Serum isoliert wurden, was durch die dicken, unscharfen Banden zu erkennen ist. In B) und D) sind die entsprechenden aufgereinigten und spezifischen Antikörper abgebildet, was durch dünnere und schärfere Banden zu erkennen ist. Dass es sich um Antikörper handelt, wird durch die Höhe der Banden dargestellt, wobei die Banden bei 50 kDa

die schwere Kette und die Banden bei 25 kDa die leichte Kette der Antikörper repräsentieren [484].



**Abb. 10:** SDS-PAGE-Gel der aufgereinigten Antikörper. **A)** Antikörper-Pool inkl. anti-Agrostin Antikörper nach Isolierung mit Protein A; I: Marker; II + III: Eluate; **B)** aufgereinigte anti-Agrostin Ak; I: Marker; II: BSA (1 mg/mL); III – V: Eluate mit reduzierendem Probenpuffer; VI – VIII: Eluate mit nicht-reduzierendem Probenpuffer; **C)** Antikörper-Pool inkl. anti-Peptid Ak nach Isolierung mit Protein A; I: Marker; II – V: Eluate; **D)** aufgereinigte anti-Agrostin Ak; I: Marker; II: BSA (1 mg/mL); III – V: Eluate mit reduzierendem Probenpuffer; VI – VIII: Eluate mit nicht-reduzierendem Probenpuffer.

Die Banden unter VI – VIII in B) und D) repräsentieren Antikörper, die in ihrer unreduzierten Form vorliegen und mit einer Größe von 150 kDa bei der SDS-PAGE dementsprechend oben im Gel verweilen. Die Schärfe dieser Banden zeigt außerdem, dass die Aufreinigung relativ sauber verlaufen sein musste.

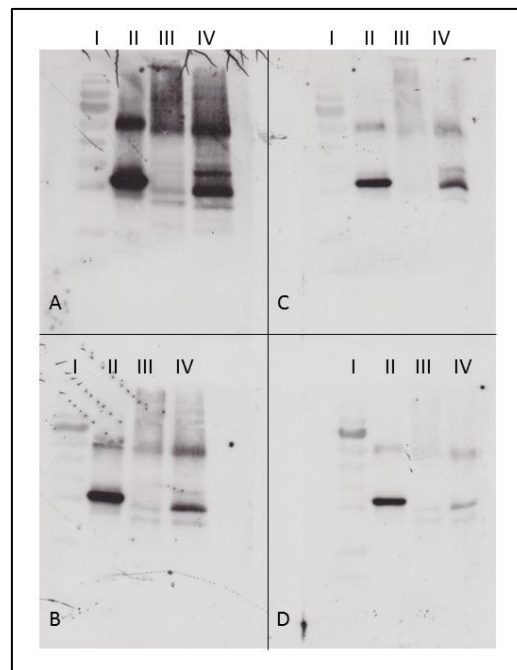
Die Produktion der anti-Peptid Ak beruhen auf den ersten Ergebnissen der MALDI-TOF-Untersuchungen, die an dieser Stelle vorweggenommen werden. Dabei wurde das Agrostin, welches mit den anti-Agrostin Ak aus einem Extrakt isoliert wurde (Abb. 15) massenspektrometrisch untersucht, wodurch zunächst fünf Peptidfragmente sequenziert werden konn-

ten (s. Kap. 4.3). Das längste sequenzierte Fragment mit der Masse  $m/z = 1997.12$  (SPNF-PAWSDLQPQVGLLK) wurde für die Produktion von anti-Peptid Ak herangezogen, die von BioGenes (BioGenes GmbH, Berlin) durchgeführt wurde. Dazu wurde unter Berücksichtigung der Sequenz des Fragmentes  $m/z = 1997.12$  ein Peptid synthetisiert und anschließend einem Kaninchen injiziert, aus dessen Serum dann die Antikörper aufgereinigt wurden. Das Peptid hat eine Länge von 15 Aminosäuren und enthält am C-Terminus ein Amid: SPNF-PAWSDLQPQV-Amid. Das Fragment  $m/z = 1997.12$  enthält interessanterweise ein Tryptophan (W), was relativ selten in Proteine eingebaut wird und oftmals funktionelle Eigenschaften übernimmt. Auch das in der Einleitung erwähnte enzymatische Aktivitätszentrum [48-51] der RIPs weist ein Tryptophan auf – ob es sich beim Fragment  $m/z = 1997.12$  um einen Teil des Aktivitätszentrums handelte, konnte jedoch erst nach der Auswertung der RNA-Seq-Rohdaten (Kap. 4.5.2) geklärt werden. Jedenfalls war man mit Hilfe der anti-Peptid Ak und des Peptides nicht mehr vom Agrostin<sub>Sigma</sub> als limitierenden Faktor für weitere Untersuchungen abhängig.

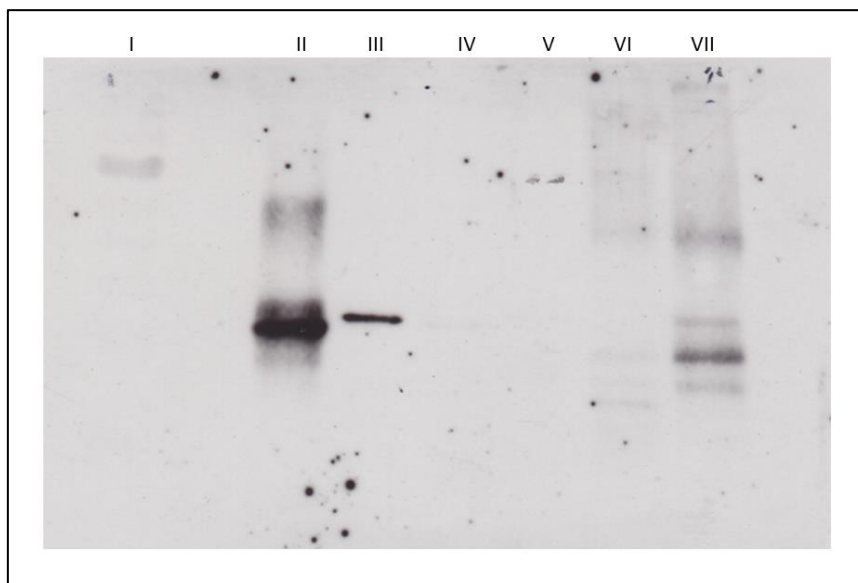
#### 4.1.2 Western Blots mit den aufgereinigten Antikörpern

Um zu testen, ob die aufgereinigten Antikörper für die Agrostin-Isolierung verwendet werden konnten, wurde über einen Western Blot (Kap. 3.2.6) untersucht, ob eine Bindung zwischen den Antikörpern und dem in dem Extrakt enthaltenen Agrostin zustande kam. Dazu wurde zunächst die entsprechende Verdünnung der Primärantikörper (anti-Agrostin Ak und anti-Peptid Ak) über einen Dot Blot (Kap. 3.2.7) ermittelt (Abb. A1 und Abb. A2 im Anhang). Für die anti-Agrostin Ak wurde zusätzlich derselbe Ansatz von Proteinproben in vier Blots untersucht, wobei während der Entwicklung der Blots jeweils eine unterschiedliche Konzentration der anti-Agrostin Ak verwendet wurde. In Abb. 11 ist zu erkennen, dass bei D) mit einer Verdünnung von 1:7500 die Banden des Agrostin<sub>Sigma</sub> (II) und die Bande im 1:1-Extrakt (IV) (Extrakt, der 1:1 mit PBS verdünnt wurde) nicht zu stark und nicht zu schwach ausgeprägt waren und damit die ideale Verdünnung der Antikörper darstellte. Abb. 12 zeigt das Ergebnis des Western Blots verschiedener Proteinproben mit den anti-Agrostin Antikörpern in der Verdünnung 1:7500. In beiden Abbildungen ist zu erkennen, dass die Bande des Agrostin<sub>Sigma</sub> (jeweils die Bande unter II) etwas oberhalb der Hauptbande (die am stärksten sichtbare Bande) des 1:1-Extraktes (Abb. 11: IV; Abb. 12: VII) liegt, was darauf hindeutet, dass das Agrostin<sub>Sigma</sub> größer sein muss als das Protein, was durch die Hauptbande repräsentiert wird,

und dementsprechend ein anderes Laufverhalten während der SDS-PAGE aufweist. Diese Vermutung wird an späterer Stelle bestätigt.



**Abb. 11:** Western Blot der anti-Agrostin Antikörper in unterschiedlichen Verdünnungen mit Agrostin<sub>Sigma</sub> (1 mg/mL) (II), 1:10-Extrakt (III) und 1:1-Extrakt (IV). **A)** 1:500; **B)** 1:2000; **C)** 1:5000; **D)** 1:7500; I: Marker; Verdünnung Sekundärantikörper: 1:2000; Inkubationszeit anti-Agrostin Antikörper: 30 Min.; Inkubationszeit Sekundärantikörper: 30 Min.; Belichtungszeit des Films: 30 s.

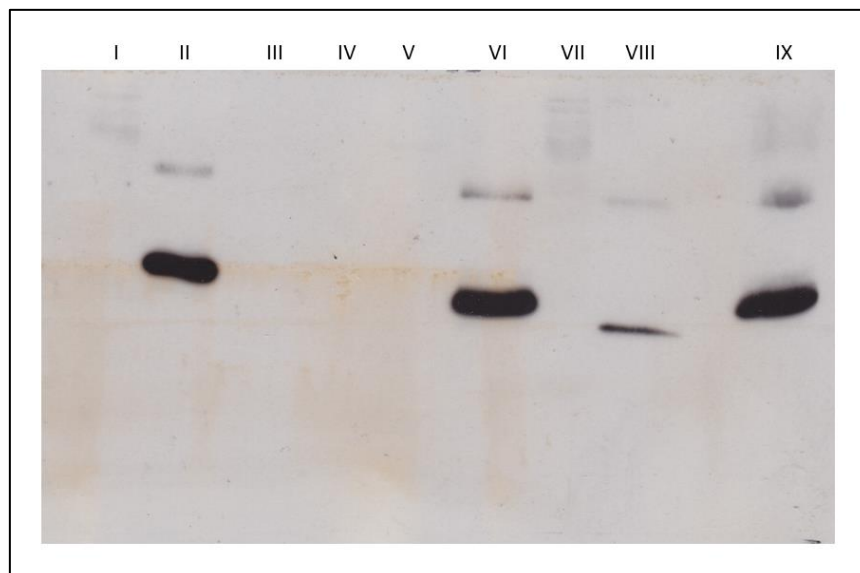


**Abb. 12:** Western Blot der anti-Agrostin Ak mit diversen Proteinproben. I: Marker; II: Agrostin<sub>Sigma</sub> (1 mg/mL); III: Gelonin (1 mg/mL); IV: Saporin (1 mg/mL); V: Ricin A-Kette (1 mg/mL); VI: 1:10-Extrakt; VII: 1:1-Extrakt; Verdünnung anti-Agrostin Ak: 1:7500; Verdünnung Sekundärantikörper: 1:2000; Inkubationszeit anti-Agrostin Ak: 30 Min.; Inkubationszeit Sekundärantikörper: 30 Min.; Belichtungszeit des Films: 30 s.



Außerdem ist in Abb. 12 eine deutliche Bindung mit dem Gelonin (aus *Suregada multiflora*, Euphorbiaceae) zu erkennen, jedoch keine Bindung mit Saporin oder Ricin A-Kette. Insbesondere das Ausbleiben der Bindung zu Saporin ist erwähnenswert, da zum einen Saporin von *Saponaria officinalis* – also ebenfalls von einer Caryophyllaceae-Art – produziert wird und zum anderen es zu einer Bindung von anti-Saporin Ak mit Agrostin<sub>Sigma</sub> kommt (Abb. A3 im Anhang), was vermuten lässt, dass es ebenfalls zu einer Kreuzreaktivität zwischen Saporin und anti-Agrostin Ak kommen würde.

Abb. 13 zeigt einen Western Blot diverser Proteinproben mit den aufgereinigten anti-Peptid Ak. Für diesen Western Blot stand bereits isoliertes Agrostin (VI) zur Verfügung, welches mit Hilfe der anti-Agrostin Ak aus einem Extrakt aufgereinigt werden konnte (s. Abb. 14). Auch hier kann man die unterschiedliche Bandenhöhe des Agrostin<sub>Sigma</sub> (II) und des isolierten Agrostins (VI) bzw. des Agrostins im Extrakt (IX) erkennen. Zusätzlich ist hier das isolierte Agrostin ohne reduzierenden Probenpuffer und ohne vor der SDS-PAGE aufgekocht zu werden mit aufgetragen (VIII). Dadurch bleiben intramolekulare Disulfidbrücken intakt, wodurch das Protein in seiner geknäulten Form bleibt, dadurch weniger Widerstand während der SDS-PAGE leistet und somit das unterschiedliche Laufverhalten im Vergleich zu VI und IX erklärt wird.



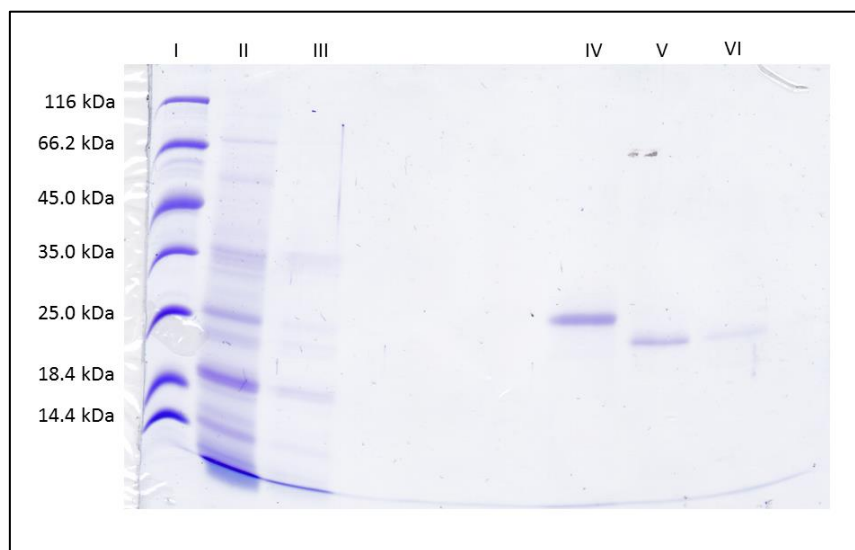
**Abb. 13:** Western Blot diverser Proteinproben mit den anti-Peptid Ak. I: Marker; II: Agrostin<sub>Sigma</sub> (1 mg/mL); III: Gelonin (1 mg/mL); IV: Saporin (1 mg/mL); V: Ricin A-Kette (1 mg/mL); VI: isoliertes Agrostin (1 mg/mL); VII: Marker; isoliertes nicht-reduziertes Agrostin; IX: 1:1-Extrakt; Verdünnung anti-Peptid Ak: 1:2000; Verdünnung Sekundärantikörper: 1:2000; Inkubationszeit anti-Peptid Ak: 30 Min.; Inkubationszeit Sekundärantikörper: 30 Min.; Belichtungszeit des Films: 30 s.

Im Gegensatz zu den anti-Agrostin Ak binden die anti-Peptid Ak nicht am Gelonin (III), da die anti-Peptid Ak lediglich gegen 15 Aminosäuren aus dem Agrostin-Fragment gerichtet sind und somit wesentlich spezifischer sind als die polyvalenten anti-Agrostin Ak, die an mehreren Stellen des Proteins binden und somit auch proteinfremde Bindungsstellen erkennen können.

Die Abbildungen Abb. 11, Abb. 12 und Abb. 13 zeigen, dass die aufgereinigten Antikörper am Agrostin binden und somit für die Präparation einer Affinitätschromatographie-Säule verwendet werden konnten.

#### 4.1.3 Isolierung des Agrostins

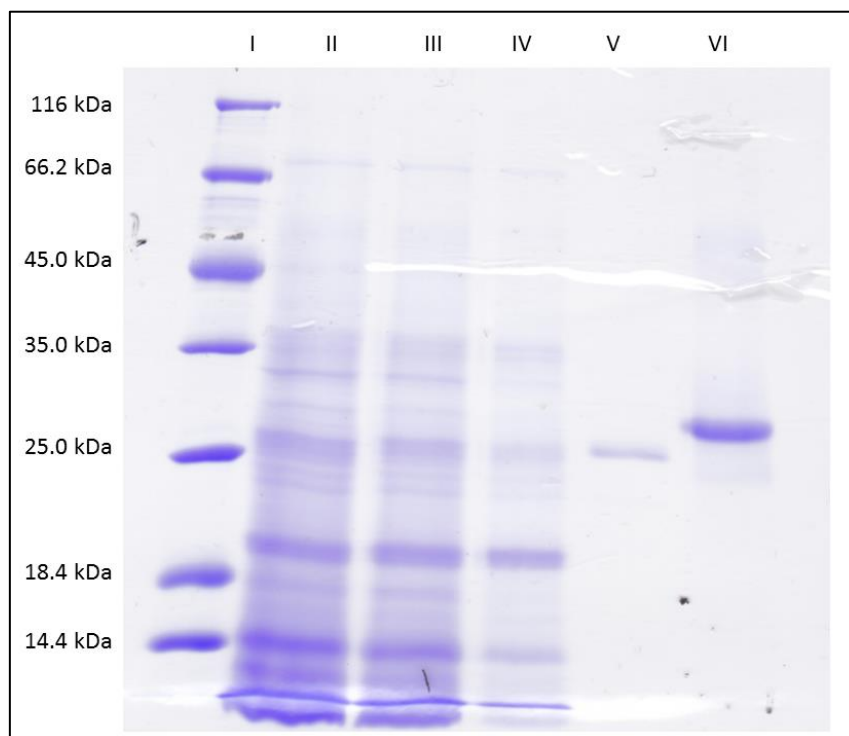
Zunächst wurde eine Affinitätschromatographie-Säule mit den aufgereinigten anti-Agrostin Ak präpariert, die jedoch wie oben erwähnt nicht sehr ergiebig war und die Elution (Kap. 3.2.9) mind. 30 Mal wiederholt wurde. Wie in Abb. 14 zu sehen ist, konnte mit dieser Säule ein Protein (VI und VII) direkt aus dem Extrakt (Kap. 3.1.1) isoliert werden, ohne durch z.B. Größenausschlusschromatographie vorgereinigt zu werden.



**Abb. 14:** SDS-PAGE-Gel des isolierten Proteins aus einem wässrigen Extrakt mit den anti-Agrostin Ak. I: Marker; II: Extrakt (1:10 verdünnt mit PBS); III: PBS-Wäsche der Säule nach dem Auftragen des Extraktes; IV: Agrostin<sub>Sig-ma</sub> (1 mg/mL); V: erste Fraktion des eluierten Agrostins; VI: zweite Fraktion des eluierten Agrostins

Dieses isolierte Agrostin wurde für erste MALDI-TOF-Untersuchungen verwendet und darauf folgend konnten anhand dieser Ergebnisse die anti-Peptid Ak produziert und aufgereinigt werden. Mit diesen anti-Peptid Ak wurde zunächst für die Herstellung der Affinitätschroma-

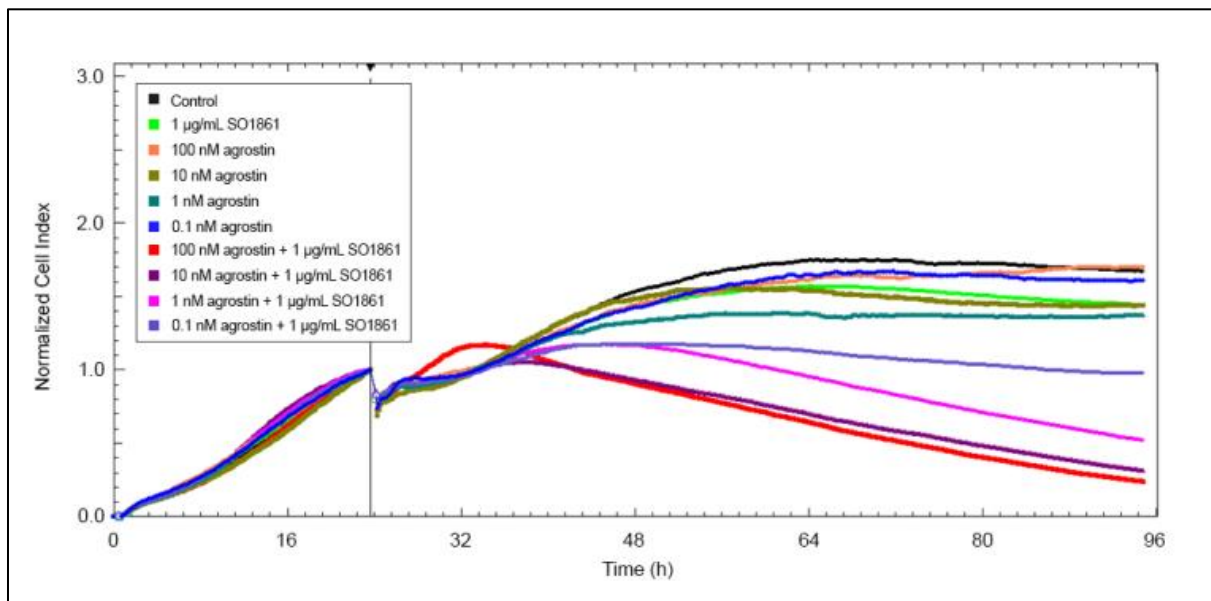
tographie-Säule die gleiche Menge Säulenmaterial verwendet wie für die Affinitäts-Säule mit den anti-Agrostin Ak. Jedoch konnte die Affinitäts-Säule mit den anti-Peptid Ak mit einer größeren Menge Antikörper beladen werden um im Bedarfsfall konnte eine neue, größere Säule präpariert werden. Abb. 15 zeigt, dass auch mit den anti-Peptid Ak ein Protein aus dem Extrakt isoliert werden konnte (V). Außerdem ist in Abb. 14 und Abb. 15 das bereits in Kap. 4.1.2 erwähnte unterschiedliche Laufverhalten des Agrostin<sub>Sigma</sub> und des isolierten Agrostins zu erkennen, wobei jedoch im Extrakt (Abb. 14 II; Abb. 15 II, III, IV) nur in Höhe des isolierten Agrostins eine Bande zu erkennen ist, nicht aber in Höhe des Agrostin<sub>Sigma</sub>. Das deutet darauf hin, dass sich das Agrostin<sub>Sigma</sub> strukturell von dem isolierten Agrostin unterscheiden muss. Da jedoch keine weiteren Informationen über das Agrostin<sub>Sigma</sub> hinsichtlich der Produktion bzw. Isolierung ermittelt werden konnten, wurde dieser strukturelle Unterschied nicht weiter beachtet und stattdessen wurden alle weiteren Untersuchungen mit dem durch die anti-Peptid Ak isolierten Agrostin durchgeführt.



**Abb. 15:** SDS-PAGE-Gel des isolierten Proteins aus einem wässrigen Extrakt mit den anti-Peptid Ak. I: Marker; II: Extrakt (1:1 verdünnt mit PBS); III: Extrakt (1:5 verdünnt mit PBS); IV: Extrakt (1:10 verdünnt mit PBS); V: isoliertes Agrostin; VI: Agrostin<sub>Sigma</sub> (1 mg/mL).

#### 4.2 Zytotoxizitätsuntersuchung des isolierten Agrostins in Kombination mit dem Saponin SO1861

Die Zytotoxizitätsuntersuchung wurde wie in Kap. 3.1.2 beschrieben in Echtzeit mit dem xCELLigence System RTCA (ACEA Biosciences) durchgeführt. Abb. 16 zeigt einen nahezu linearen Anstieg der Kurven bis der normalized cell index (NCI) von 1.00, der bei einer Zeit von etwa 24 Std. erreicht wurde. Das zeigt, dass die unbehandelten ECV-304 Zellen in dieser Zeit wachsen konnten und die Impedanz somit stetig anstieg. Bei 24 Std. wurden die Indizes normalisiert und die restlichen Komponenten (SO1861, Agrostin oder eine Kombination von beiden) wurden zugegeben, wobei die Kurve für „Control“ die Zugabe von frischem Medium ohne weitere Zusätze repräsentiert. Für diese Kurve ist ein stetiger Anstieg zu erkennen mit einem Maximum nach 65 Std. bei einem NCI von 1.75. Anschließend erreicht die Kurve eine Plateauphase und zeigt am Ende der Untersuchung einen NCI von 1.66. Einen ähnlichen Verlauf zeigt die Kurve des SO1861 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) mit einem Maximum von  $\text{NCI} = 1.57$  und einem Endwert von  $\text{NCI} = 1.48$ .



**Abb. 16:** Echtzeit-Untersuchung der Zytotoxizität des isolierten Agrostins in Kombination mit dem Saponin SO1861. Konzentrationen: 0.1 nM, 1 nM, 10 nM und 100 nM Agrostin  $\pm$  1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  SO1861.

Abb. 16 zeigt, dass das Agrostin ohne den Zusatz von SO1861 auch in einer Konzentration von 100 nM keine Zytotoxizität aufweist, da der NCI nicht sinkt, sondern wie die Kurve der Kontroll-Probe und der Probe, die lediglich SO1861 enthielt, stetig ansteigt. In Kombination mit SO1861 wurde jedoch eine deutliche Abnahme des NCI und damit der Zellviabilität auf-

gezeichnet. Insbesondere für die Konzentrationen 100 nM (Endwert NCI = 0.22) und 10 nM (Endwert NCI = 0.31) ist eine deutliche Zytotoxizität zu erkennen, die auch bei der Konzentration von 1 nM zu erkennen ist (Endwert NCI = 0.51), jedoch setzt die Abnahme des NCI im Vergleich zu 100 nM (33 Std.) und 10 nM (37 Std.) etwas später ein (48 Std.). Für die Kurve, die die Konzentration von 100 nM Agrostin + SO1861 repräsentiert, ist außerdem zu erkennen, dass diese Kurve nach der Zugabe der Komponenten am stärksten steigt, obwohl die Kombination von 100 nM Agrostin + SO1861 am zytotoxischsten ist (Maximum des NCI bei 1.19). Für die Kurve, die die Kombination aus 0.1 nM Agrostin + SO1861 repräsentiert, ist lediglich eine relativ geringe Zytotoxizität auszumachen (Maximum NCI = 1.16; Endwert NCI = 1.02).

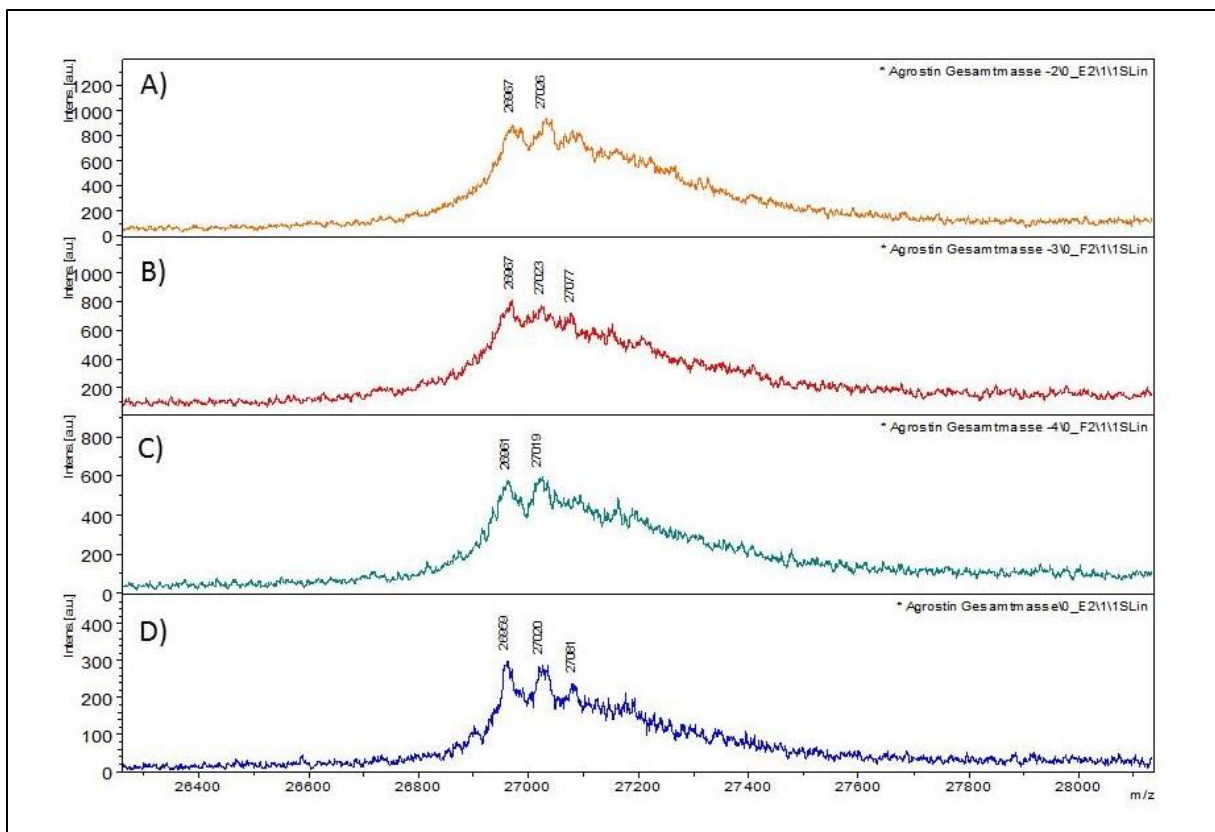
Mit dieser Untersuchung konnte der in der Einleitung bereits erwähnte synergistische Effekt von Saponinen mit RIPs [39,40] gezeigt werden, der an dieser Stelle jedoch nicht näher erläutert wird. Für diese Arbeit war lediglich die Tatsache von Interesse, dass ein Protein mit zytotoxischer Aktivität aus dem Extrakt isoliert werden konnte, wobei es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um das Agrostin handeln musste. Mit diesem Protein konnte also nun die Sequenzierungsarbeit beginnen.

### 4.3 Ergebnisse der MALDI-TOF-Untersuchungen

#### 4.3.1 Gesamtmasse

Die Daten der MALDI-TOF-Untersuchungen wurden in einer Kooperation mit Herrn Dr. Christoph Weise (Institut für Chemie und Biochemie – Biochemie, FU Berlin) ausgewertet. Dabei wurde zunächst die Gesamtmasse des isolierten Proteins bestimmt. Wie in Abb. 17 zu sehen ist, ist in allen vier Spektren ein deutlicher Peak zu erkennen [in A):  $m/z = 26967$ , in B):  $m/z = 26967$ , in C):  $m/z = 26961$ , in D):  $m/z = 26959$ ], woraus sich ein Mittelwert von 26963 Da ergibt. Außerdem ist ein weiterer Peak [ A):  $m/z = 27026$ , B):  $m/z = 27023$ , C):  $m/z = 27019$ , D):  $m/z = 27020$ ] zu sehen und in B) ( $m/z = 27077$ ) und D) ( $m/z = 27081$ ) ist sogar ein dritter Peak angedeutet. Vergleicht man diese Werte mit den Angaben aus Stirpe *et al.* von 1983 [45], wo drei Proteine, die in Stirpe & Barbieri 1986 als Agrostin 2, Agrostin 5 und Agrostin 6 bezeichnet wurden [125], mit unterschiedlicher Masse beschrieben wurden, wird der Verdacht erweckt, dass es sich bei dem isolierten Protein ebenfalls um drei Isoformen des Agrostins handeln könnte. Allerdings unterscheiden sich die Massen der hier gemessenen Da-

ten mit den Angaben von Agrostin 2 (30600 Da), Agrostin 5 (29500 Da) und Agrostin 6 (26600 Da) um jeweils ca. 2.5 – 3.5 kDa. Hierbei ist allerdings festzuhalten, dass diese Massendifferenz bereits in den oben gezeigten Blots und SDS-PAGE-Gelen zu beobachten war (Abb. 11 – Abb. 15). Dabei kommt die Frage auf, ob bei der Herstellung des Extraktes, aus dem das Agrostin für diese Arbeit isoliert wurde, evtl. ein Peptid-Fragment mit einer Größe von 2.5 – 3.5 kDa abgespalten wurde. Diese Frage konnte jedoch erst nach der RNA-Seq und RACE-PCR zumindest teilweise beantwortet werden (Kap. 4.6).

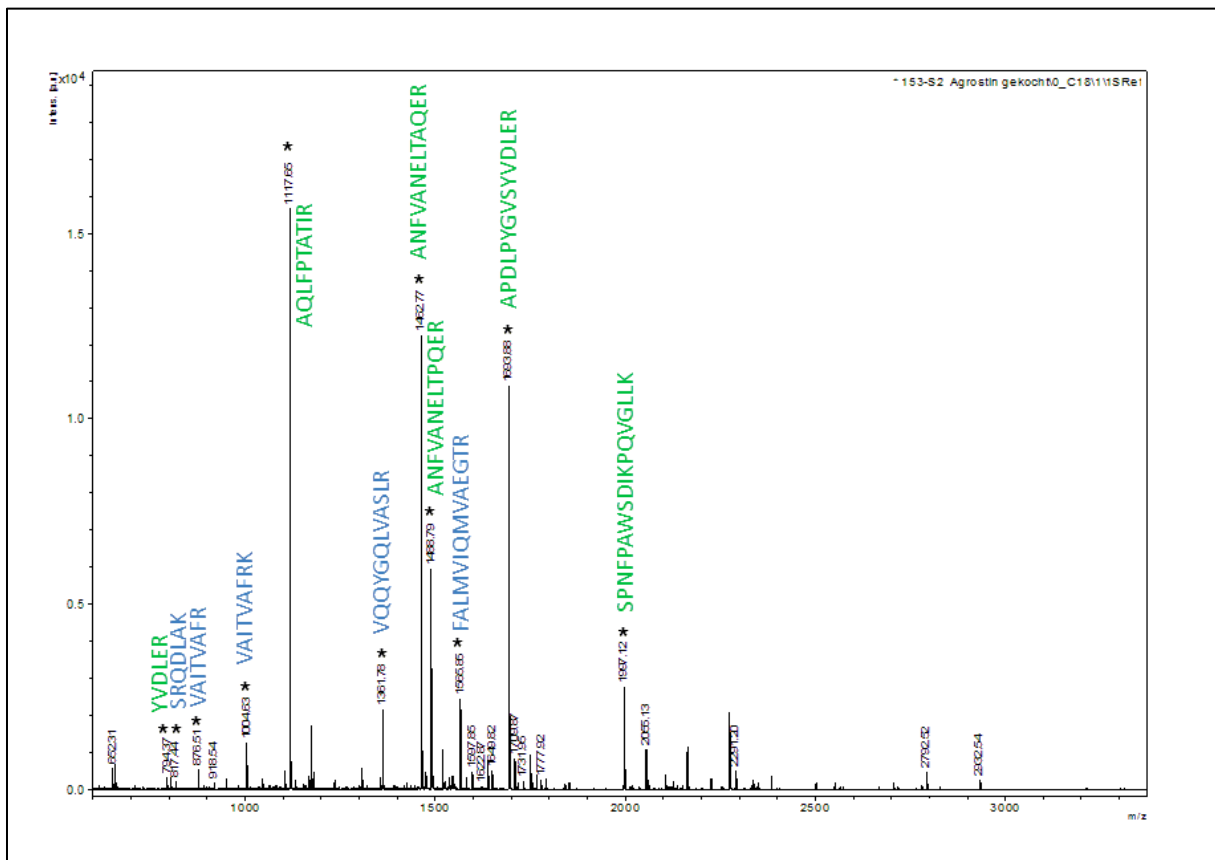


**Abb. 17:** Gesamtmasse des isolierten Agrostins in vier Messungen. Mittelwert des Hauptpeaks (jeweils der linke Peak): 26963 Da.

### 4.3.2 Fingerprint

Das nach dem tryptischen Verdau aufgenommene MS-Spektrum wird als Fingerprint bezeichnet (Abb. 18) und zeigt die Peaks der Peptidfragmente, die bei dem Verdau entstanden sind. In Abb. 18 sind die Peaks, die sequenziert werden konnten, mit \* markiert und zusätzlich ist die jeweilige daraus abgeleitete Sequenz notiert. Die Sequenzen, die grün markiert sind, konnten vor der RNA-Seq ermittelt werden, die in blau dementsprechend im Anschluss an die RNA-Seq und wurden mit Hilfe der RNA-Seq-Ergebnisse in den einzelnen MS/MS-

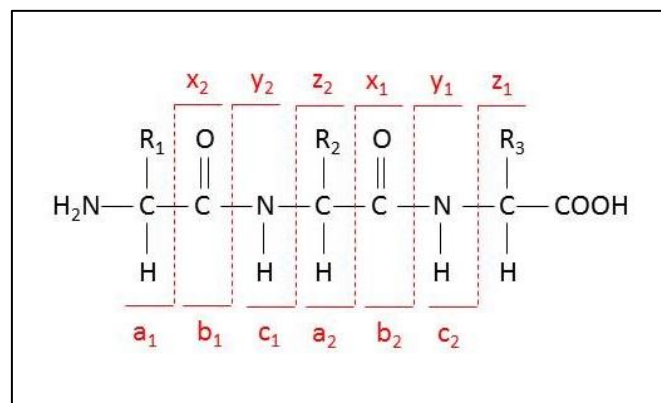
Spektren abgeleitet. Die Untergliederung in „MALDI-TOF-Ergebnisse vor der RNA-Seq“ und „MALDI-TOF-Ergebnisse nach der RNA-Seq“ ist dahingehend wichtig zu erwähnen, da lediglich die Ergebnisse der Sequenzen aus den „MALDI-TOF-Ergebnissen vor der RNA-Seq“ für die Erstellung der Datenbank mittels der bioinformatischen Auswertung der RNA-Seq Rohdaten (s. Kap. 3.3.2, Abb. 6) verwendet wurden. Für den Verdau mit AspN wird hier kein Fingerprint dargestellt, da lediglich die Sequenz von zwei Peaks bestimmt werden konnte. Der AspN-Verdau wurde vor der RNA-Seq durchgeführt, aber die Sequenzen wurden nicht für die Datenbank der bioinformatischen Auswertung herangezogen.



**Abb. 18:** MS Fingerprint Trypsin-Verdau. \* = sequenzierte Peaks: 794.37; 817.44; 876.51; 1004.63; 1117.65; 1361.78; 1428.77; 1488.79; 1565.85; 1693.88; 1997.12; grün markiert = Sequenzen, die vor der RNA-Seq ermittelt werden konnten; blau markiert = Sequenzen, die nach der RNA-Seq ermittelt wurden.

Ein erster Abgleich dieses Fingerprints mit den gängigen Protein-Datenbanken (NCBI Datenbanken, UniProt) ergab keine plausiblen Ergebnisse (nicht gezeigt), weshalb eine *De-Novo*-Sequenzierung dringend erforderlich war. Dabei wurden die in Abb. 18 mit \* markierten Peaks näher analysiert (LIFT-Modus) und man erhielt die jeweiligen MS/MS-Spektren. Die Peptidfragmente werden bevorzugt an den Peptidbindungen gespalten, weshalb sich die

Masse einzelner Fragmente um die Masse einzelner oder mehrerer Aminosäuren unterscheidet. Dementsprechend wird bei der Auswertung eines MS/MS-Spektrums nach zwei Peaks gesucht, deren  $m/z$ -Differenz der Masse einzelner oder mehrerer Aminosäuren entspricht. Dabei muss insbesondere die Masse für die verschiedenen Arten der bei der Fragmentierung entstandenen Ionen berücksichtigt werden, die in Abb. 19 schematisch dargestellt sind. Nach der Terminologie von Roepstorff und Fohlmann [485] werden die N-terminalen Fragmente als a-, b- und c-Ionen bezeichnet und die C-terminalen als x-, y- und z-Ionen. Am häufigsten kommt es zu einer Spaltung der Amidbindung, weshalb die Peaks der b- und y-Ionen am stärksten ausgeprägt sind und für die *De-Novo*-Sequenzierung herangezogen werden.



**Abb. 19:** Schematische Darstellung eines Peptids bestehend aus drei Aminosäuren und die möglichen Ionen, die bei der Fragmentierung daraus entstehen könnten. N-terminale Ionen: a-, b- und c-Ionen; C-terminale Ionen: x-, y- und z-Ionen. Beispiel: Das Fragment, das nur die erste N-terminale Aminosäure enthält wird b<sub>1</sub>-Ion genannt und das Fragment, was nur die erste C-terminale Aminosäure enthält wird als y<sub>1</sub>-Ion bezeichnet.

### 4.3.3 MS/MS-Spektrum Analyse am Beispiel des Peptidfragmentes $m/z = 1462.77$

Beim Trypsin-Verdau wird ein Protein wie bereits in Kap. 3.2.10 erwähnt C-terminal nach Lysin und Arginin gespalten, weshalb die Fragmente dementsprechend am C-Terminus ein Arginin (R) oder ein Lysin (K) aufweisen müssen. Also müsste im Spektrum ein Peak mit der Masse dieser Aminosäuren ( $M_{\text{Arginin}} = 174 \text{ g/mol}$ ;  $M_{\text{Lysin}} = 146 \text{ g/mol}$ ) + 1 ( $H^+$ ) auftreten (Struktur von y<sub>1</sub>-Ionen:  $H_3N^+-CRH-COOH$ ). Somit muss entweder ein Peak bei  $m/z = 175$  bzw.  $m/z = 147$  im Spektrum zu finden sein. Für das y<sub>2</sub>-Ion (Struktur:  $H_3N^+-CR^1H-CO-NH-CR^2H-COOH$ ) muss ein Peak bei einer Masse zu sehen sein, die der Masse einer weiteren Aminosäure plus 175 bzw. 147 minus 18 ( $H_2O$ ) entspricht, da Wasser bei der Synthese einer



Amidbindung abgespalten wird. Oder anders ausgedrückt: Die Differenz zwischen zwei y-Ion-Peaks muss der Masse einer Aminosäure abzüglich 18 entsprechen.

Ähnliches gilt für die Fragmente bei einem AspN-Verdau, wobei hier berücksichtigt werden muss, dass AspN Proteine N-terminal hauptsächlich vor Aspartat, aber auch vor Glutamat spaltet. Dementsprechend müssten die Fragmente mit Aspartat (D) oder Glutamat (E) beginnen. Die Vorgehensweise zur Interpretation dieser Spektren wird an dieser Stelle jedoch nicht weiter erläutert, da der Fokus der Sequenzierung für diese Arbeit auf dem Trypsin-Verdau lag. Unter Beachtung mehrerer weiterer Regeln, auf die hier ebenfalls nicht näher eingegangen wird, wird letztendlich eine Sequenz erhalten, wobei während der Sequenzierung insbesondere darauf zu achten ist, dass sowohl vom N-terminalen Ende (b-Ionen) als auch vom C-terminalen Ende (y-Ionen) sich dieselbe Sequenz des Peptidfragmentes ergibt.

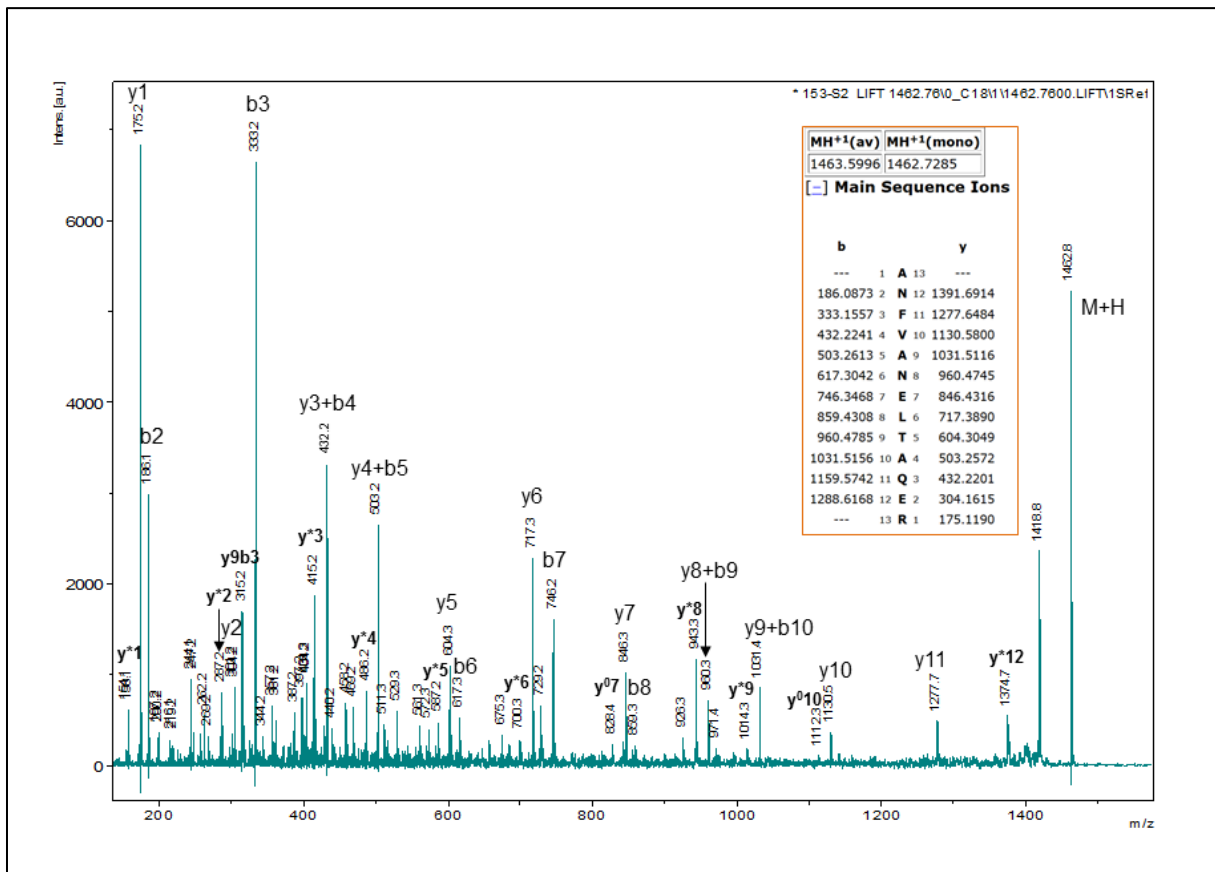


Abb. 20: MS/MS-Spektrum des Peptidfragmentes m/z = 1462.77. Sequenz: ANFVANE(I/L)TAQER.

Abb. 20 zeigt das MS/MS-Spektrum des Fragmentes m/z = 1462.77, welches hier exemplarisch zur Veranschaulichung der Sequenzierung aller gemessenen Peptidfragmente dient – die

Spektren der anderen Fragmente sind im Anhang zu finden sind (Abb. A4 – Abb. A16). In Abb. 20 ist ein Peak bei  $m/z = 175.2$  zu sehen, der wie eben beschrieben als  $y_1$ -Ion vom Arginin herrührt. Der nächste Peak, der das  $y_2$ -Ion darstellt und mit einer entsprechenden Masse einer Aminosäure auf den  $m/z$ -Wert dieses Peaks passt, ist bei  $m/z = 304.2$  zu sehen. Die Differenz zwischen  $y_1$ -Ion und  $y_2$ -Ion beträgt 129, wodurch ein fragmentiertes Glutamat (E) – also die Masse des Glutamats abzüglich der Masse von Wasser – charakterisiert wird. Der nächste Peak, auf den eine weitere Aminosäure passt ist bei 432 zu sehen und die Differenz zum  $y_2$ -Ion beträgt 128, was für ein Lysin (K) oder Glutamin (Q) steht. Nimmt man hier jedoch, die genaueren Zahlen, die in der Tabelle in Abb. 20 zu sehen sind, dann ergibt sich eine Differenz von  $432.2201 - 304.1615 = 128.0586$ , was für ein Q steht.

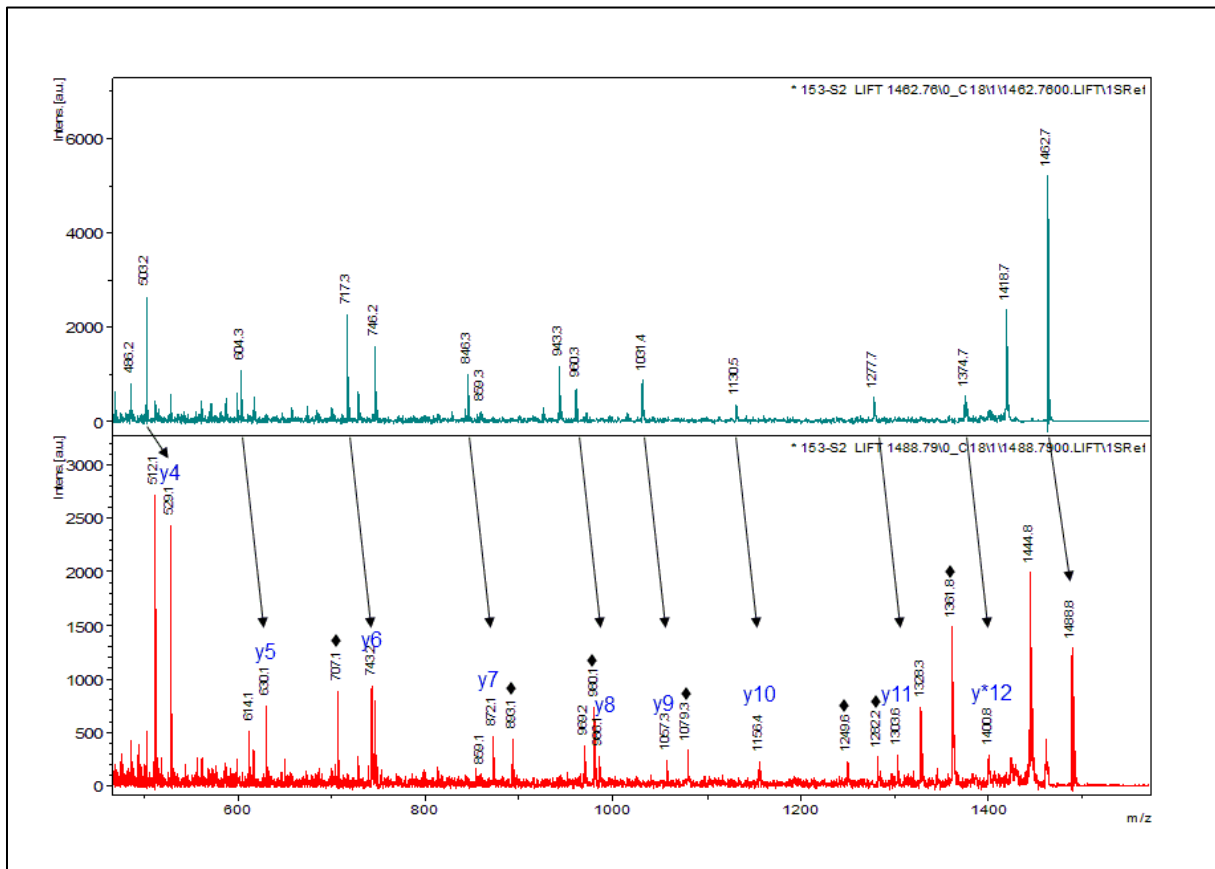
**Tabelle 10:** b-Ionen und y-Ionen des Peptidfragmentes  $m/z = 1462.77$  und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz

m/z y-Ion	Differenz der y-Ionen	Resultierende Aminosäure	Differenz der b-Ionen	b-Ion
$y_1$ 175.1190	-	Arginin (R)	-	-
$y_2$ 304.1615	$y_2 - y_1 = 129.0425$	Glutamat (E)	$b_{12} - b_{11} = 129.0426$	$b_{12}$ 1288.6168
$y_3$ 432.2201	$y_3 - y_2 = 128.0586$	Glutamin (Q)	$b_{11} - b_{10} = 128.0586$	$b_{11}$ 1159.5742
$y_4$ 503.2572	$y_4 - y_3 = 71.0371$	Alanin (A)	$b_{10} - b_9 = 71.0371$	$b_{10}$ 1031.5156
$y_5$ 604.3049	$y_5 - y_4 = 101.0477$	Threonin (T)	$b_9 - b_8 = 101.0477$	$b_9$ 960.4785
$y_6$ 717.3890	$y_6 - y_5 = 113.0841$	Leucin (L)/Isoleucin (I)	$b_8 - b_7 = 113.0840$	$b_8$ 859.4308
$y_7$ 846.4316	$y_7 - y_6 = 129.0426$	Glutamat (E)	$b_7 - b_6 = 129.0426$	$b_7$ 746.3468
$y_8$ 960.4745	$y_8 - y_7 = 114.0429$	Asparagin (N)	$b_6 - b_5 = 114.0429$	$b_6$ 617.3042
$y_9$ 1031.5116	$y_9 - y_8 = 71.0371$	Alanin (A)	$b_5 - b_4 = 71.0372$	$b_5$ 503.2613
$y_{10}$ 1130.5800	$y_{10} - y_9 = 99.0684$	Valin (V)	$b_4 - b_3 = 99.0684$	$b_4$ 432.2241
$y_{11}$ 1277.6484	$y_{11} - y_{10} = 147.0684$	Phenylalanin (F)	$b_3 - b_2 = 147.0684$	$b_3$ 333.1557
$y_{12}$ 1391.6914	$y_{12} - y_{11} = 114.0430$	Asparagin (N)	-	$b_2$ 186.0873
-	$1462.7285$ (MH) – $y_{12}$ $= 71.0371$	Alanin (A)	-	-

In Tabelle 10 sind die Werte für die b- und y-Ionen aus Abb. 20 übernommen worden und zusätzlich sind die Differenzen ermittelt worden, um die Sequenzierung anhand dieses Beispiels zu verdeutlichen. Für das  $y_{12}$ -Ion ist kein Peak zu sehen, jedoch kann man einen Peak bei 1374.7 erkennen, der das  $y_{12}^*$ -Ion darstellt und nach einer Übersicht von Papayannopou-

los *et al.* [486] die Masse des  $\gamma$ -Ions minus 17 ( $\text{NH}_3$ ) aufweist. Somit ergibt sich für das  $\gamma_{12}$ -Ion ein Wert von 1391, was bei Vergrößerung des Spektrums auch im Spektrum zu finden war (hier nicht gezeigt). Die daraus resultierende Aminosäuresequenz wird vom N-Terminus in Richtung C-Terminus aufgeschrieben: ANFVANE(I/L)TAQER.

In Abb. 21 ist das MS/MS-Spektrum des Peptidfragmentes  $m/z = 1488.79$  zu sehen. Bei der Auswertung der Sequenz ist aufgefallen, dass sie nahezu identisch mit der Sequenz des Peptidfragmentes  $m/z = 1462.77$  ist, allerdings ist im Spektrum von 1488.79 ab dem  $\gamma_4$ -Ion ein Shift von 26 zu beobachten, der sich bis zum Ende bzw. Anfang der Sequenz fortsetzt. Dieser Shift von 26 lässt an Stelle des Alanins (A) auf ein Prolin (P) schließen, sodass sich folgende Sequenz ergibt: ANFVANE(I/L)TPQER.



**Abb. 21:** Vergleich der MS/MS-Spektren von den Peptidfragmenten  $m/z = 1462.77$  und  $m/z = 1488.79$ . Oberes Spektrum: MS/MS-Spektrum des Peptidfragmentes  $m/z = 1462.77$  ab dem  $\gamma_4$ -Ion ( $m/z = 503.2$ ). Unteres Spektrum: MS/MS-Spektrum des Peptidfragmentes  $m/z = 1488.79$  ab dem  $\gamma_4$ -Ion. Shift von 26 ab dem  $\gamma_4$ -Ion:  $\gamma_4$  ( $503.2 \rightarrow 529.1$ ),  $\gamma_5$  ( $604.3 \rightarrow 630.1$ ),  $\gamma_6$  ( $717.3 \rightarrow 743.2$ ),  $\gamma_7$  ( $846.3 \rightarrow 872.1$ ),  $\gamma_8$  ( $960.3 \rightarrow 986.1$ ),  $\gamma_9$  ( $1031.4 \rightarrow 1057.3$ ),  $\gamma_{10}$  ( $1130.5 \rightarrow 1156.4$ ),  $\gamma_{11}$  ( $1277.7 \rightarrow 1303.6$ ),  $\gamma_{12}^*$  ( $1374.7 \rightarrow 1400.8$ ). ♦ = zusätzlich auftretende Peaks. Sequenz: ANFVANE(I/L)TPQER.

Außerdem sind in Abb. 21 im unteren Spektrum zusätzliche Peaks (mit ♦ markiert) zu erkennen, die eventuell von einem anderen Peptid herrühren könnten. Diese beiden Auffälligkeiten lassen darauf schließen, dass sehr wahrscheinlich eine Isoform des isolierten Agrostins existiert und hier zumindest ein Peptidfragment dieser Isoform detektiert und sequenziert wurde. Das unterstützt den bei der Ermittlung der Gesamtmasse des isolierten Agrostins (Abb. 17) aufgestellten Verdacht, dass es sich bei dem isolierten Agrostin nicht um ein einziges Protein handelt.

#### 4.3.4 Aminosäuresequenzen der untersuchten Peptidfragmente

Insgesamt wurden 13 Sequenzen mit einer Länge von 6 – 18 Aminosäuren ermittelt, die in folgender Tabelle zusammengefasst sind.

**Tabelle 11:** Zusammenfassung der ermittelten Aminosäuresequenzen

<b>Trypsin-Verdau</b>		
<b>m/z</b>	<b>Aminosäuresequenz</b>	<b>Anzahl der Aminosäuren</b>
794.37	YVD(I/L)ER	6
817.44	SRQD(I/L)AK	7
876.51	VA(I/L)TVAFR	8
1004.63	VA(I/L)TVAFRK	9
1117.65	AQ(I/L)FPTAT(I/L)R	10
1361.78	VQQYGQ(I/L)VAS(I/L)R	12
1462.77	ANFVANE(I/L)TAQER	13
1488.79	ANFVANE(I/L)TPQER	13
1565.85	FA(I/L)MV(I/L)QMVAEGTR	14
1693.88	APD(I/L)PYGVSYVD(I/L)ER	15
1997.12	SPNFPAWSD(I/L)QPQVG(I/L)(I/L)K	18
<b>AspN-Verdau</b>		
<b>m/z</b>	<b>Aminosäuresequenz</b>	<b>Anzahl der Aminosäuren</b>
853.4	DYG(K/Q)SR(K/Q)	7
1570.9	ERAQ(I/L)FPTAT(I/L)RAP	14

Neben den nahezu identischen Sequenzen der eben besprochenen Fragmente  $m/z = 1462.77$  und  $m/z = 1488.79$  gibt es weitere Sequenzen, die sich sehr ähneln bzw. in anderen Sequenzen enthalten sind. So unterscheiden sich die Sequenzen der Fragmente  $m/z = 876.51$  und  $m/z = 1004.63$  nur durch ein zusätzliches Lysin (K), welches am C-Terminus der Sequenz von  $m/z = 1004.63$  enthalten ist. Die Sequenz des Fragmentes  $m/z = 794.37$  ist komplett C-terminal in der Sequenz des Fragmentes von  $m/z = 1693.88$  enthalten. Ähnliches gilt für die Sequenz des Fragmentes  $m/z = 1117.65$  (Trypsin-Verdau), die in der Sequenz des Fragmentes  $m/z = 1570.9$  (AspN-Verdau) wieder zu finden ist. Die letzten zwei C-terminalen Aminosäuren (AP) des Fragmentes  $m/z = 1570.9$  sind die ersten beiden N-terminalen Aminosäuren des Fragmentes  $m/z = 1693.88$ , was jedoch erst durch spätere Untersuchungen festgestellt wurde (s. Alignments in Kap. 4.5.1 und Abb. 36 in Kap. 4.5.2). Ebenfalls in den Alignments aus Kap.4.5.1 und in Abb. 36 zu sehen ist, dass die letzten C-terminalen Aminosäuren (SRQ) von Fragment  $m/z = 853.4$  die ersten drei N-terminalen Aminosäuren des Fragmentes  $m/z = 817.44$  sind. Die Sequenz des Fragmentes  $m/z = 1997.12$  wurde wie bereits in Kap. 4.1.1 diskutiert für die Synthese eines Peptids und für die Produktion von Antikörpern verwendet.

**Tabelle 12:** Theoretisch ermittelte Massen der Typ 1 RIPs mit bekannter Sequenz von Caryophyllaceae-Arten

RIP 1	Anzahl der Aminosäuren	Mw (theoretisch) <sup>1</sup>	Datenbank <sup>2</sup>	Literatur
Dianthin 30	293	32775 Da	CAA41953.1	[487]
Lychnin	234	26131 Da	2G5X_A	[116]
RIP Q3	259	28164 Da	ADK47974.1	unveröffentlicht
Saporin	292	32810 Da	CAA41948.1	[488]
Stellarin 1	285	30947 Da	ADB83313.1	unveröffentlicht

<sup>1</sup> Der theoretische Mw-Wert wurde mit ExPASy Compute pI/Mw bestimmt. <sup>2</sup> Für Dianthin 30, RIP Q3, Saporin und Stellarin 1 wurde die „Accession Number“ der GenBank angegeben, für Lychnin die von PDB.

Klammert man die Sequenzen aus, die in anderen Sequenzen zu finden sind, dann ergibt sich eine Anzahl von: 7 (817.44) + 9 (1004.63) + 12 (1361.78) + 13 (1462.77/1488.79) + 14 (1565.85) + 15 (1693.88) + 18 (1997.12) + 7 (853.4) + 14 (1570.9) = 109 Aminosäuren.

Unter Berücksichtigung der Massen und Anzahl der Aminosäuren der in Tabelle 12 aufgelisteten Typ 1 RIPs der Caryophyllaceae-Arten (s. auch Tabelle 1) und der daraus resultierenden Annahme, dass das Agrostin mit einer Masse von 26963 Da (s. Abb. 17) aus etwa 240 Aminosäuren zusammengesetzt ist, wurden dementsprechend  $(109/240) \times 100\% = 45\%$  der Sequenz ermittelt. Hierbei muss erwähnt werden, dass für diesen geschätzten Wert auch die MALDI-TOF-Sequenzen, die erst nach der RNA-Seq ermittelt werden konnten, herangezogen wurden. Berücksichtigt man nur die MALDI-TOF-Sequenzen, die vor der RNA-Seq ermittelt wurden, verringert sich die Anzahl der ermittelten Aminosäuren auf  $13 (1462.77/1488.79) + 15 (1693.88) + 18 (1997.12) + 7 (853.4) + 14 (1570.9) = 67$  und dementsprechend der Anteil auf etwa 28%.

Die Sequenzen der Fragmente, die vor der RNA-Seq ermittelt werden konnten wurden gegen die NCBI Protein-Datenbanken geblastet. Die BLAST-Untersuchungen blieben jedoch ohne plausible Ergebnisse (nicht gezeigt). Wie in Tabelle 13 zu sehen ist, zeigen die Typ 1 RIPs der Caryophyllaceae-Arten untereinander eine Sequenzhomologie von mind. 30%. Saporin und Dianthin 30 zeigen eine Homologie von 77.7%, während Stellarin 1 und RIP Q3 eine Sequenzhomologie von sogar 90.7% zeigen. Dementsprechend wurde für die BLAST-Untersuchungen erwartet, dass zumindest ein Protein der Caryophyllaceae-Arten mit bekannter Sequenz bei der Auflistung der aufgezeigten BLAST-Ergebnisse auftrat.

**Tabelle 13:** Sequenzhomologien der Typ 1 RIPs der Caryophyllaceae-Arten

RIP 1 <sup>1</sup>	Dianthin 30	Lychnin	RIP Q3	Saporin	Stellarin 1
Dianthin 30	---	30.7%	48.4%	77.7%	45.9%
Lychnin	30.7%	---	30.8%	32%	33.9%
RIP Q3	48.4%	30.8%	---	51.9%	90.7%
Saporin	77.7%	32%	51.9%	---	48%
Stellarin 1	45.9%	33.9%	90.7%	48%	---

<sup>1</sup> Die Sequenzen für die Typ 1 RIPs wurden den Quellen und Datenbanken aus Tabelle 12 entnommen. Die Sequenzhomologien wurden mit Clustal Omega [489] ermittelt.

## 4.4 RNA-Isolierung

### 4.4.1 Untersuchung verschiedener Entwicklungsstadien der Blüten und Samenanlagen von *Agrostemma githago*

Bevor die RNA aus der Pflanze isoliert wurde, wurde untersucht, ab wann das Agrostin während des Pflanzenwachstums produziert wurde, da im differenzierten Samengewebe nicht mehr alle Gene transkribiert werden und zumeist auch keine eigene Biosynthese von Sekundärstoffen erfolgt. Dazu wurden Extrakte von sieben verschiedenen Entwicklungsstadien der Blüten und Samenanlagen (Abb. 22) hergestellt. Bei der Ernte der einzelnen Stadien wurde das Pflanzenmaterial direkt in flüssigen Stickstoff getaucht und bis zur Verwendung bei – 80 °C gelagert. Für die Extrakte wurde eine gewisse Menge des gefrorenen Pflanzenmaterials eines bestimmten Entwicklungsstadiums in flüssigem Stickstoff gemahlen, anschließend in einer Soxhlet-Apparatur mit Petrolether entfettet und mit dem zehnfachen Volumen PBS (1 x PBS, 4 °C; vgl. Tabelle 14) unter Zusatz von Proteaseinhibitoren (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail; Roche) unter Rühren extrahiert (12 Std., 4 °C). Im Anschluss wurden die Pflanzenbestandteile abzentrifugiert (6000 g, 20 Min.) und sterilfiltriert. Hierbei ist zu erwähnen, dass für die Extrakterstellung für die Entwicklungsstadien I und II das komplette Pflanzenmaterial verwendet wurde, für die Stadien III, IV und V wurden die Samenkapseln verwendet und für die Stadien VI und VII wurden lediglich die Samen verwendet. Dementsprechend waren die Extrakte der Stadien I – V aufgrund der chlorophyllhaltigen Pflanzenteile mehr oder weniger grünlich gefärbt, der Extrakt von Stadium VI war dagegen farblos, während der Extrakt von Stadium VII bernsteinfarben war.

**Tabelle 14:** Eingesetzte Mengen des Pflanzenmaterials der verschiedenen Entwicklungsstadien für die Extrakterstellung

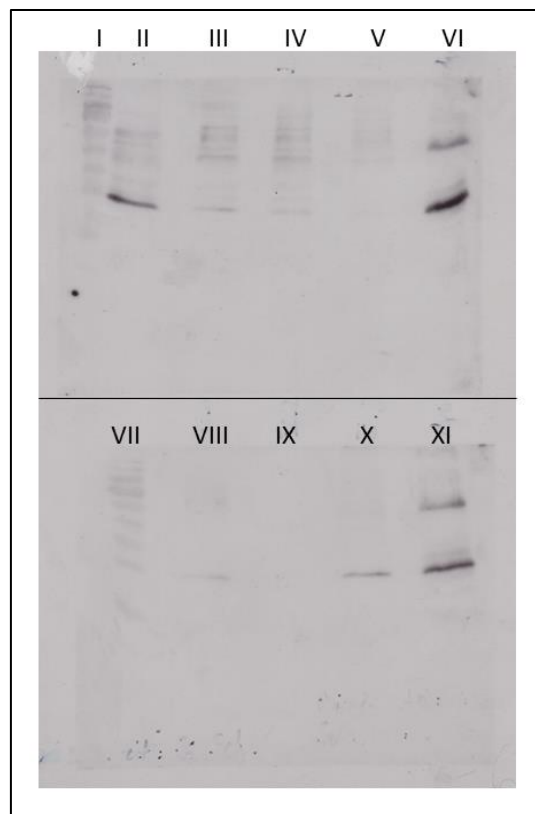
Entwicklungsstadium	gemahlene Menge des Pflanzenmaterials	Volumen PBS
I	0.51 g	5.1 mL
II	0.50 g	5.0 mL
III	0.42 g	4.2 mL
IV	1.08 g	10.8 mL
V	2.21 g	22.1 mL
VI	1.96 g	19.6 mL
VII	1.14 g	11.4 mL



**Abb. 22:** Blüten und Samenanlagen von *Agrostemma githago* zu verschiedenen Entwicklungsstadien. **A)** Stadium I: Die ersten Kelchblätter sind zu erkennen; **B)** Stadium II: Die ersten Kronblätter (1) sind zu erkennen, Kronblätter noch gelblich weiß und von den verwachsenen Kelchblättern verdeckt; **C)** Stadium III: Samenkapsel (2) ist zu erkennen, Kronblätter immer noch gelblich weiß, aber nicht mehr von den verwachsenen Kelchblättern verdeckt; **D)** Stadium IV: Kronblätter (3) violett und voll entwickelt, Samen (4) noch verhältnismäßig klein und gelblich weiß; **E)** Stadium V: Kronblätter verdorrt, Samen und Samenkapsel gewachsen; **F)** Stadium VI: Samen und Samenkapsel deutlich gewachsen, Samen immer noch gelblich weiß; **G)** Stadium VII: Oberer Teil der Kelchblätter abgefallen, übrig gebliebener Teil der Kelchblätter und Samenkapsel (5) verdorrt, Samenkapsel geöffnet, reife Samen sind schwarz-braun. Maßstab in cm.



Diese Extrakte wurden dann hinsichtlich der Anwesenheit des Agrostins mit einem Western Blot untersucht (Abb. 23). Wie in Abb. 23 zu sehen ist, ist in allen Stadien auf Höhe des Agrostins eine Bande zu erkennen, die im Stadium I am stärksten und im Stadium VI am schwächsten ausgeprägt ist. Die Anwesenheit der Agrostinbande im Stadium I zeigt, dass das Protein bereits in diesem jungen Entwicklungsstadium produziert wird und daher wurde für die RNA-Isolierung aus den bereits erwähnten Gründen die RNA aus dem Pflanzenmaterial dieses frühen Entwicklungsstadiums extrahiert.

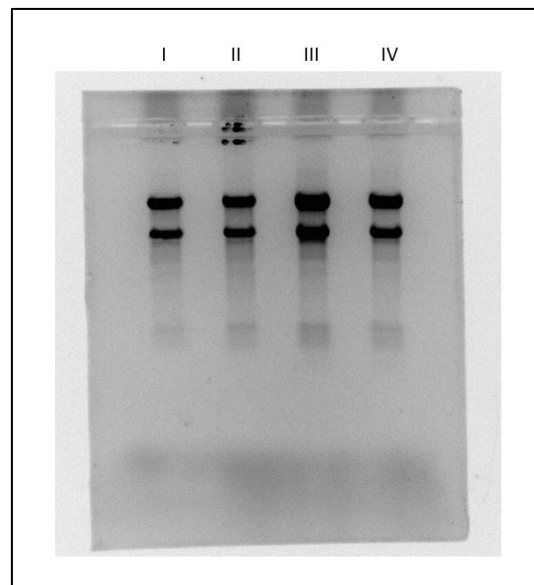


**Abb. 23:** Western Blot der Extrakte der verschiedenen Entwicklungsstadien mit anti-Agrostin Ak zur Detektion des Agrostins. I: Marker; II: Stadium I; III: Stadium II; IV: Stadium III; V: Stadium IV; VI: isoliertes Agrostin; VII: Marker; VIII: Stadium V; IX: Stadium VI; X: Stadium VII; XI: isoliertes Agrostin. Verdünnung anti-Agrostin Ak: 1:7500; Verdünnung Sekundärantikörper: 1:2000; Inkubationszeit anti-Agrostin Ak: 30 Min.; Inkubationszeit Sekundärantikörper: 30 Min.; Belichtungszeit des Films: 30 s.

#### 4.4.2 Isolierte RNA aus dem Pflanzenmaterial des Entwicklungsstadiums I

Die RNA wurde wie in Kap. 3.3.1 unter Verwendung zweier verschiedener Kits extrahiert. Abb. 24 zeigt das Agarosegel (nach Methode 2, s. Kap. 3.3.4) von vier Proben, von denen Bande I und II aus der RNA-Extraktion mit RNeasy® Mini Kit (Qiagen) und Bande III und IV aus

der RNA-Extraktion mit Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research) herrühren (Einwaagen des Pflanzenmaterials: I: 92 mg; II: 93 mg; III: 102 mg; IV: 104 mg).



**Abb. 24:** Agarosegel der isolierten RNA. I und II: RNA-Extraktion mit RNeasy® Mini Kit (Qiagen); III und IV: RNA-Extraktion mit Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research).

Die Banden repräsentieren die 18S (untere Bande) und 28S (obere Bande) rRNA, wobei hier kein Marker aufgetragen worden ist, da lediglich die Qualität der isolierten RNA aufgezeigt werden sollte. Die Schärfe dieser beiden Banden zeigt, dass die isolierte RNA nicht abgebaut wurde und für weitere Untersuchungen verwendet werden konnte.

**Tabelle 15:** Konzentrationen der RNA-Proben

RNA-Probe	Eingesetzte Menge Pflanzenmaterial	Konzentration <sup>1</sup>
I	92 mg	1780.7 ng/μL
II	93 mg	2407.7 ng/μL
III	102 mg	2504.4 ng/μL
IV	104 mg	2093.3 ng/μL

<sup>1</sup> Die Konzentration wurde mit dem Spektralphotometer NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Exemplarisch ist die Grafik, die das Absorptionsmaximum zeigt, für Probe I im Anhang abgebildet (Abb. A17).

### 4.5 Ergebnisse der Auswertungen der RNA-Seq-Rohdaten

Für die Sequenzanalyse mittels RNA-Seq wurde die RNA-Probe mit der höchsten Konzentration (Probe III) an LGC (LGC Genomics GmbH, Berlin) übergeben und die Auswertung der Rohdaten wurde wie in Kap. 3.3.2 beschrieben durchgeführt. Abb. 25 zeigt die Sequenz des resultierenden Contigs, das am Ende der Auswertung erhalten wurde.

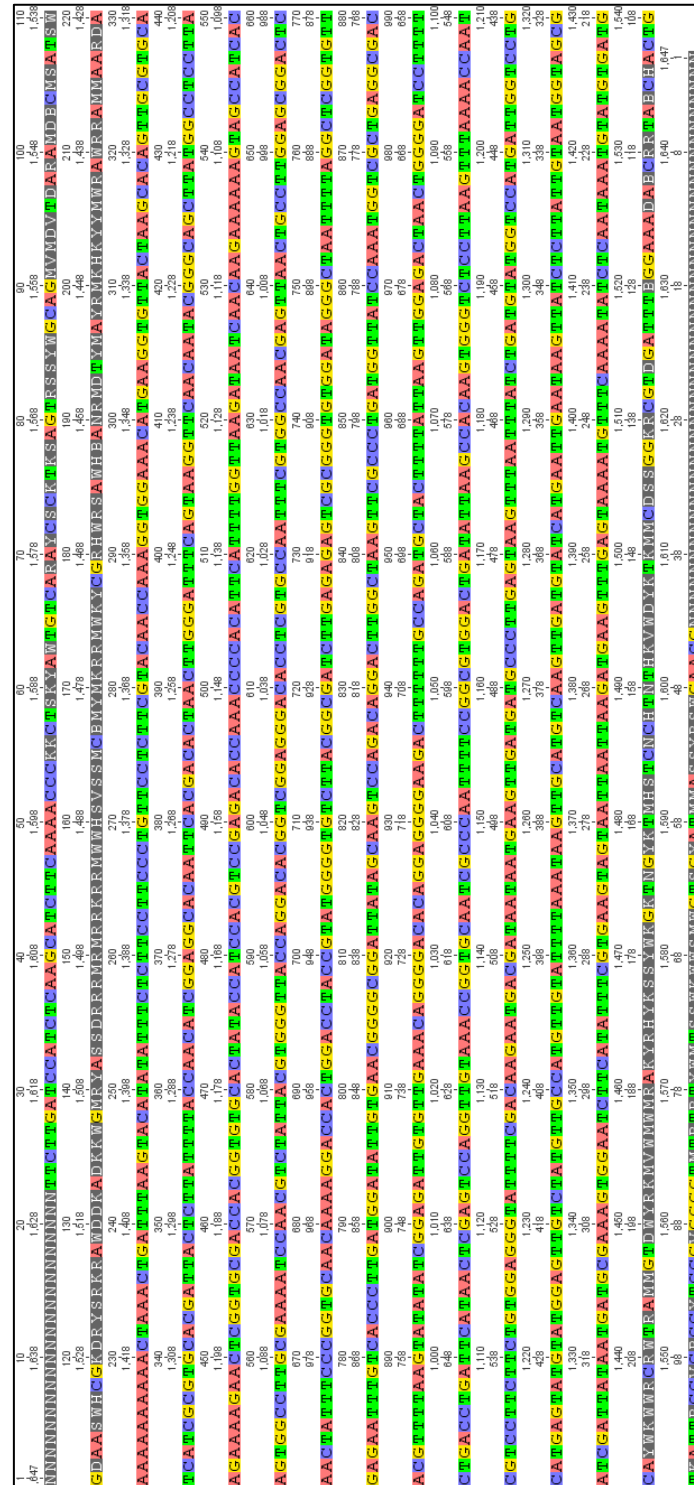


Abb. 25: Contig nach der bioinformatischen Auswertung für die Agrostin-Sequenz in Geneious (Version 8.1.5).

Unter Abgleich der Peptidsequenzen  $m/z = 794.37$ ,  $m/z = 1117.65$ ,  $m/z = 1462.77$ ,  $m/z = 1693.88$  und  $m/z = 1997.12$ , die vor der RNA-Seq durch die MALDI-TOF-Untersuchungen sequenziert werden konnten und für die bioinformatische Auswertung herangezogen wurden, wurde der Leserahmen festgelegt. Unter der Annahme, dass entsprechend der Masse des Agrostins von 26963 Da aus etwa 240 Aminosäuren aufgebaut sein musste, wurde in diesem Contig nach einem Startcodon (ATG) und einem Stopcodon (TAA, TAG, TGA) gesucht, die der Länge von 240 Aminosäuren entsprechend einen Abstand von ca. 720 bp hatten. Das Startcodon war an der Stelle 429-431 (ATG) und das Stopcodon an der Stelle 1170-1172 (ATG) zu finden, wodurch eine erste Konsensussequenz erhalten wurde (Abb. 26).

1	ATGGCCTCCT	TAAGAAAAGA	ACTCGGTGCG	ACCACGGTGT	GCACTATACC
51	ATCCACGTCC	GAGACACCAA	ACCCACATT	CATTTTGGTT	AAGATAATCA
101	ACAAGAAAAA	AGTAGCCATC	ACAGTGGCCT	TGCGAAAAATC	CAACGTCTAT
151	TACGTGGGTT	ACCAGGACAC	GGTCGGAGGG	ACACCTCGTG	CCAATTTTCGT
201	GGCCAACGAG	TTAACTGCCT	TGGAGCGGAC	TCAACTATTT	CCCGGTGCAA
251	CAAAAGGACC	ACTGGACCTA	CCGTATGGGG	TGTCTTACGG	CGATCTTGAG
301	AGAGTCGCGG	GTGTGGATAG	GGCTAATTTT	AGGCTCGGTG	TTGAGAATTT
351	GTCACCCTTG	ATGGATATTG	TGAACGGGGC	GGATTATAGC	AAGTCCAGAC
401	AGGACTTGGC	TAAGTTCGCC	CTGATGGTTA	TCCAAATGGT	CGCTGAGGCG
451	ACACGTTTTA	AGTATATATC	GGAGATTGTG	TTGAAACAGG	GGACACAGGA
501	GGGGAAGACT	TTTTTGCCAG	ATGCTACTTT	TATTAAGTTG	GAGACTAACT
551	GGGGATCCTT	TTCTGACCTG	ATTCATAACT	CGAGTCCAGG	TTGTAAACCG
601	GTGCAATCGC	CCAATTTTCC	GGCGTGGACT	GATATTAAGC	CACAAGTGGG
651	TCTCCTTAAG	TTTAAACCA	ATCGTCCTTC	TTCTGTGGAG	GGTATTTTCG
701	ACAAGAAATGA	CGATAATAAT	GAAGTTGATG	ATGCCCTTGA	GTAA
751					

**Abb. 26:** Erste Konsensussequenz für das Agrostin. Screenshot; dargestellt mit PlasmaDNA [490]. Länge der Nukleotidsequenz: 744 bp.

Diese Nukleotidsequenz von 744 bp codiert für ein Protein aus 247 Aminosäuren (TAA codiert für keine Aminosäure):

10	20	30	40	50	60
MASLRKELGÄ	TTVCTIPSTŠ	ETPNPTFILV	KIINKKKVAI	TVALRKSNVY	YVGYQDITVGG
70	80	90	100	110	120
TPRANFVANE	LTALERTQLF	PGATKGPLDL	PYGVSYGDLĒ	RVAGVDRANF	RLGVENLSPL
130	140	150	160	170	180
MDIVNGADYS	KSRQDLAKFA	LMVIQMVAEA	TRFKYISEIV	LKQGTQEGKT	FLPDATFIKL
190	200	210	220	230	240
ETNWSGFSDL	IHNSSPGCKP	VQSPNFPAWT	DIKPQVGLLĒ	FKTNRPSSVE	GIFDKNDNN
EVDDALE					
Theoretical pI/Mw: 6.62 / 27140.95					

**Abb. 27:** Aminosäuresequenz der ersten Konsensussequenz für das Agrostin. Screenshot, dargestellt mit ExPASy.

Wie in Abb. 27 zu sehen ist, zeigt das Protein einen theoretischen Wert der Masse von 27140.95 Da, was jedoch nicht mit dem bei der MALDI-TOF-Untersuchung ermittelten Wert der Gesamtmasse von 26963 Da übereinstimmt. Das deutet darauf hin, dass es sich um zwei unterschiedliche Sequenzen handeln musste, weshalb die Konsensussequenz genauer betrachtet werden musste.

#### 4.5.1 Vergleich der Konsensussequenz mit den Sequenzen der Peptidfragmente aus der MALDI-TOF-Untersuchung

Zunächst wurde die Konsensussequenz gegen die gängigen NCBI-Proteindatenbanken gelistet, wobei bestätigt wurde, dass es sich bei dem 247 Aminosäure langen Protein um ein RIP handelte (s. Abb. 28).

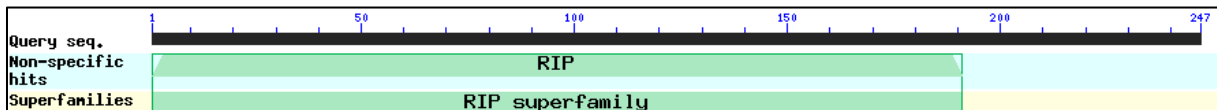


Abb. 28: Zuordnung der Konsensussequenz zur RIP-Superfamilie. Screenshot, BLAST.

Jedoch wurde kein RIP von Caryophyllaceae-Arten bei dem BLAST-Ergebnis angezeigt, sondern das Typ 1 RIP Bouganin aus *Bougainvillea spectabilis* (Nyctaginaceae) als das Protein, das die höchste Sequenzhomologie mit der Konsensussequenz aufweist (Abb. 29).

bouganin [*Bougainvillea spectabilis*]  
 Sequence ID: [AAL35962.1](#) Length: 305 Number of Matches: 1

Range 1: 44 to 276 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
137 bits(345)	1e-35	Compositional matrix adjust.	90/239(38%)	132/239(55%)	20/239(8%)
Query 1	MASLRKELG-ATVCTIPSTSET--PNPTFILVKIINKKKVAITVALRKSNNVYVGYQDT				57
Sbjct 44	+ LR EL T VC +P T +T + F+LV I K + VA+ ++VY VGYQD				
Query 58	VGGTFRANFVANELTALERTQLFPGATKGPLDLPGVSYGDLERVAGVDRANFRIGVENL				117
Sbjct 104	G RA F+ +++ + ++LFPG T + L + SY L A VDR + LGV L				
Query 118	WDGKDRAVFL-DKVPTVATSKLFPVGT-NRVTLTFDGSYQKLVNAAKVDRKDLGLGVYKL				161
Sbjct 162	SPLMDIVNGADYSKSRQDLAKFALMVIQMVAEATRFKYI SEIVLKQGTQEGKTF L P D A T F				177
Query 178	++ ++G + + Q++AKF L+VIQMV+EA R F K Y I V + + G + F P +				217
Sbjct 218	EFSIEAIHGK--TINGQEIAKFFLIVIQMVSEARFKYIETEVVDRGLY--GSFKPNFKV				
Query 178	IKLETNWGFSFDLIHNSSPGCKPVQ-----SPNFPW-----TDIKPQVGLLKFKTNR				225
Sbjct 218	+ LE NWG SD IH SSP C + SP+ W + I P +G+LRFK+++				276
Query 178	LNLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWWVNVKVSQISPDMGILKFKSSK				276

Abb. 29: BLAST-Ergebnis der ersten Konsensussequenz. 38% Homologie mit Bouganin aus *Bougainvillea spectabilis*. Query = Konsensussequenz, Sbjct = Referenzsequenz des Bouganin. Screenshot, BLAST.

Zusätzlich konnten mit Hilfe der Konsensussequenz weitere Peaks der Peptidfragmente untersucht werden, indem nach bestimmten m/z-Differenzen im Spektrum gesucht wurde, die durch Aminosäuren der Konsensussequenz vorgegeben waren. Dabei wurde nicht nach der komplett identischen Sequenz im Spektrum gesucht, sondern die Konsensussequenz diente vielmehr als eine Vorlage, mit dessen Hilfe man sich im Spektrum orientieren konnte. Dadurch wurden fünf weitere Sequenzen erhalten (vgl. Kap. 4.3.2 und Kap. 4.3.4), von denen sich manche Aminosäuren von denen der Konsensussequenz unterscheiden (Abb. 30).

A)	Konsensussequenz_(132-138) Peptidfragment_817.44_(Trypsin)	SRQDLAK SRQDLAK *****
B)	Konsensussequenz_(38-46) Peptidfragment_1004.63_(Trypsin)	VAITVALRK VALTVAFRK **.*.*.*.*
C)	Konsensussequenz_(64-76) Peptidfragment_1462.77_(Trypsin)	ANFVANELTALER ANFVANELTAQER ***** **
D)	Konsensussequenz_(64-76) Peptidfragment_1488.79_(Trypsin)	ANFVANELTALER ANFVANELTPQER ***** **
E)	Konsensussequenz_(139-152) Peptidfragment_1565.85_(Trypsin)	FALMVIQMVAEATR FALMVLQMVAEGTR ***** **
F)	Konsensussequenz_(87-101) Peptidfragment_1693.88_(Trypsin)	PLDLPYGVSYGDLER APDLPYGVSYVDLER ***** **
G)	Konsensussequenz_(203-220) Peptidfragment_1997.12_(Trypsin)	SPNFPAWTDIKPQVGLLK SPNFPAWSDLQPQVGLLK *****.*.*.*.*
H)	Konsensussequenz_(128-134) Peptidfragment_853.4_(AspN)	DYSKSRQ DYGKSRQ **.*.*.*
I)	Konsensussequenz_(75-88) Peptidfragment_1570.9_(AspN)	ERTQLFPGATKGPL ERAQLFPTATLRAP **.*.*.* **

**Abb. 30:** Alignments der Peptidfragmente mit der ersten Konsensussequenz. Hinter „Konsensussequenz“ steht jeweils in Klammern die Position der Aminosäure (vgl. dazu Abb. 27), mit der der Bereich der Konsensussequenz beginnt und endet, der mit der entsprechenden Fragment-Sequenz übereinstimmt. Screenshots; Alignment durchgeführt mit Clustal Omega. **A)** m/z = 817.44; **B)** m/z = 1004.63; **C)** m/z = 1462.77; **D)** m/z = 1488.79; **E)** m/z = 1565.85; **F)** m/z = 1693.88; **G)** m/z = 1997.12; **H)** m/z = 853.4; **I)** m/z = 1570.9.

Den Alignments aus Abb. 30 der Peptidfragmente mit dem jeweiligen Bereich der Konsensussequenz ist zu entnehmen, dass die Sequenz des Fragmentes  $m/z = 817.44$  komplett in der Konsensussequenz zu finden ist. Alle anderen Sequenzen unterscheiden sich in mindestens einer Aminosäure, wobei der Unterschied zwischen Leucin (L) und Isoleucin (I) nicht weiter betrachtet wird, da beide fragmentierten Ionen eine identische Masse aufweisen und dementsprechend bei der Auswertung der MS/MS-Spektren nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob die Massedifferenz zweier Peaks von 113.0841 einem Leucin oder Isoleucin zuzuordnen war. Ähnliches gilt für Glutamin (Q) und Lysin (K), deren fragmentierte Ionen eine ähnliche Masse aufweisen. Alle weiteren Sequenzunterschiede sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

**Tabelle 16:** Zusammenfassung der Sequenzunterschiede der Peptidfragmente und Konsensussequenz

Peptidfragment	Länge des Peptidfragmentes	Unterschied zur Konsensussequenz <sup>1</sup>	$\Delta M_w^2$
$m/z = 1004.63$	9	7: F $\rightarrow$ L	34.02 Da
$m/z = 1462.77$	13	11: Q $\rightarrow$ L	14.97 Da
$m/z = 1488.79$	13	10: P $\rightarrow$ A; 11: Q $\rightarrow$ L	41.01 Da
$m/z = 1565.85$	14	12: G $\rightarrow$ A	14.03 Da
$m/z = 1693.88$	15	1: A $\rightarrow$ P; 2: P $\rightarrow$ L; 11: V $\rightarrow$ G	0 Da
$m/z = 1997.12$	18	8: S $\rightarrow$ T	14.07 Da
$m/z = 853.4$	7	3: G $\rightarrow$ S	30.03 Da
$m/z = 1570.9$	14	3: A $\rightarrow$ T; 8: T $\rightarrow$ G; 11: L $\rightarrow$ K; 12: R $\rightarrow$ G; 13: A $\rightarrow$ P; 14: P $\rightarrow$ L	56.07 Da

<sup>1</sup> Die Zahl steht für die Position der Aminosäure im Peptidfragment; der Buchstabe vor dem Pfeil gibt die Aminosäure des Peptidfragmentes an, die sich von der Aminosäure der Konsensussequenz (hinter dem Pfeil) unterscheidet. <sup>2</sup> Differenz der mit ExPASy Compute pI/Mw theoretisch ermittelten Massen aus den Fragmenten und den entsprechenden Abschnitten in der Konsensussequenz.

Dass das Peptidfragment  $m/z = 1693.88$  keine Massedifferenz zum entsprechenden Abschnitt der Konsensussequenz zeigt, rührt daher, dass das Prolin (P) in beiden Sequenzen vorkommt, jedoch an anderer Position, und die Aminosäuren Alanin (A) und Valin (V) zufällig

dieselbe Masse zeigen wie Leucin (L) und Glycin (G). Die Peptidfragmente  $m/z = 794.37$ ,  $m/z = 876.51$  und  $m/z = 1117.65$  sind in Abb. 30 und Tabelle 16 nicht extra berücksichtigt, da deren Sequenz in der Sequenz  $m/z = 1004.63$ ,  $m/z = 1693.88$  bzw.  $m/z = 1570.9$  enthalten sind. Besonders interessant ist die Sequenz des Fragmentes  $m/z = 1361.78$ , die in der Konsensussequenz nicht zu finden ist. Betrachtet man jedoch erneut die Nukleotidsequenz (Abb. 25), ist ein weiteres ATG (300-302) zu erkennen, was für ein Methionin (M) codiert und damit den neuen Start der Proteinsequenz darstellen könnte. Die daraus resultierende zweite Konsensussequenz, die im Folgenden als RNA-Seq-Sequenz bezeichnet wird, ist in Abb. 31 dargestellt.

10	20	30	40	50	60
MKVL <sup>1</sup> STVAC	IIACTITLIL	PTSEAQFTTL	TWDFSKVQQY	GQLMASLRKE	LGATTVCTIP
70	80	90	100	110	120
STSETPNPTF	ILVKIINKKK	VAITVALRKS	NVYYVGYQDT	VGGTPRANFV	ANELTALERT
130	140	150	160	170	180
QLFPGATKGP	LDLPYGVSYG	DLERVAGVDR	ANFRLGVENL	SPLMDIVNGA	DYSKSRQDLA
190	200	210	220	230	240
KFALMVIQMV	AEATRFKYIS	EIVLKQGTQE	GKTFLPDATF	IKLETNWGSF	SDLIHNSSPG
250	260	270	280	290	
CKPVQSPNFP	AWTDIKPQVG	LLKFKTNRPS	SVEGIFDKND	DNNEVDDALE	
Theoretical pI/Mw: 6.62 / 31900.61					

**Abb. 31:** Zweite Konsensussequenz = RNA-Seq-Sequenz. Screenshot, dargestellt mit ExPASy Compute pI/Mw. Sequenzlänge: 290 Aminosäuren. Das Methionin (M) der ersten Konsensussequenz aus Abb. 27 ist an Position 44 zu finden.

Die Masse des in Abb. 31 dargestellten Proteins weist eine theoretische Masse von 31900 Da auf und unterscheidet sich daher von der gemessenen Masse des isolierten Proteins von 26963 Da um 4937 Da. Allerdings können in dieser längeren Sequenz nicht nur die Sequenzen der Peptidfragmente wiedergefunden werden, sondern auch die des Fragmentes  $m/z = 1361.78$  (Abb. 32).

Konsensussequenz_neu_(37-48)	VQQYGQLMASLR
Peptidfragment_1361.78_(Trypsin)	VQQYGQLVASLR
	*****:****

**Abb. 32:** Alignment des Peptidfragmentes  $m/z = 1361.78$  mit der neuen Konsensussequenz. Hinter „Konsensussequenz“ steht jeweils in Klammern die Position der Aminosäure (vgl. dazu Abb. 27), mit der der Bereich der Konsensussequenz beginnt und endet, der mit der entsprechenden Fragment-Sequenz übereinstimmt. Screenshots; Alignment durchgeführt mit Clustal Omega.



Die Sequenz des Peptidfragmentes  $m/z = 1361.78$  erstreckt sich also über den anfangs vermuteten Startpunkt der ersten Konsensussequenz aus Abb. 27 und unterscheidet sich von der Konsensussequenz dadurch, dass sie an Stelle des Methionins (M) ein Valin (V) enthält und damit eine theoretische Massendifferenz von 32.06 Da. Damit wird gezeigt, dass das isolierte Protein nicht bei diesem Methionin beginnen kann und dementsprechend die RNA-Seq-Sequenz als die Sequenz des Agrostins favorisiert wird.

Die in Tabelle 16 aufgezeigten Sequenzunterschiede der Fragmente und der entsprechenden Abschnitte der RNA-Seq-Sequenz und die daraus resultierenden Massedifferenzen zeigen, dass die Sequenz des isolierten Proteins nicht zu 100% mit der Sequenz aus den RNA-Seq-Rohdaten übereinstimmt. Damit wird der Verdacht bestätigt, dass mindestens zwei Isoformen vorliegen müssen, von denen die eine isoliert und teilweise über MALDI-TOF-MS sequenziert werden konnte und die andere wurde anhand der RNA-Seq Daten vollständig sequenziert. Die Fragmente  $m/z = 1462.77$ ,  $m/z = 1488.79$  und die RNA-Seq-Konsensussequenz lassen sogar mit ihren drei unterschiedlichen Sequenzen darauf schließen, dass es tatsächlich drei Isoformen geben könnte wie bereits in Kap. 4.3.1. vermutet wurde. Zur Überprüfung, ob auch die Sequenzen der Peptidfragmente in den RNA-Seq-Daten zu finden waren, wurden diese gegen die reads und Contigs geblastet. In den folgenden Alignments sind die Treffer (Hits) der reads der RNA-Seq-Rohdaten aufgezeigt, in denen die Sequenzen bestimmter Peptidfragmente enthalten sind. Dabei stellt die Query-Sequenz die Sequenz des reads und die Sbjct-Sequenz die Referenzsequenz – also die RNA-Seq-Sequenz – dar, wobei hier zu erwähnen ist, dass in manchen Fällen die RNA-Seq-Sequenz der Sequenz des gesuchten Peptidfragmentes angepasst wurde, um die Chance zu erhöhen, dieses Peptidfragment in den Rohdaten zu finden.

$m/z = 794.37$ :

```
Identities = 132/139 (95%), Positives = 134/139 (96%), Gaps = 0/139 (0%)
Frame = +1

Query    4   DLPYGVSYVDLERVAGVDRANFRLGVENLSPLMDIVNGADYGKSRQDLAKFALMVIQMVA 183
        DLPYGVSYVDLERVAGVDRANFRLGVENLSPLMDIVNGADY KSRQDLAKFALMVIQMVA
Sbjct   132 DLPYGVSYVDLERVAGVDRANFRLGVENLSPLMDIVNGADYSKSRQDLAKFALMVIQMVA 191

Query   184 EGTRFKYISDIVLKQGTQEGKTFPLPDATFIKLETNWGSFSDLIHNSSPSCPVPKSPNFPA 363
        E TRFKYIS+IVLKQGTQEGKTFPLPDATFIKLETNWGSFSDLIHNSSP C PV+SPNFPA
Sbjct   192 EATRKYISEIVLKQGTQEGKTFPLPDATFIKLETNWGSFSDLIHNSSPGCKPVQSPNFPA 251

Query   364 WTDIKPQVGLLKFKTTRPS 420
        WTDIKPQVGLLKFKT RPS
Sbjct   252 WTDIKPQVGLLKFKTNRPS 270
```

**m/z = 1117.65, m/z = 1488.79, m/z = 1570.9 und m/z = 1693.88**

Identities = 72/79 (91%), Positives = 74/79 (94%), Gaps = 0/79 (0%)  
Frame = +3

```
Query 3   RANFVANELTPOERAQLFPTATIRAPDLPGVSYVDLERVAGVDRANFRLGVEDLSPLMD 182
          RANFVANELT ERAQLFPTAT+R DLPYGVSY DLERVAGVDRANFRLGVE+LSPLMD
Sbjct 106 RANFVANELTALERAQLFPTATLRPLDLPGVSYGDLERVAGVDRANFRLGVENLSPLMD 165

Query 183 IVNGADYSKSRQDLAKFAL 239
          IVNGADYSKSRQDLAKFAL
Sbjct 166 IVNGADYSKSRQDLAKFAL 184
```

**m/z = 1462.77:**

Identities = 116/123 (94%), Positives = 119/123 (97%), Gaps = 0/123 (0%)  
Frame = -2

```
Query 369 MKVLLSTIACIIACTITLILPTSEAQFTTLTWDFSKVQQYQQLMASLRKELGATTVCTIP 190
          MKVLLST+ACIIACTITLILPTSEAQFTTLTWDFSKVQQYQQLMASLRKELGATTVCTIP
Sbjct 1    MKVLLSTVACIIACTITLILPTSEAQFTTLTWDFSKVQQYQQLMASLRKELGATTVCTIP 60

Query 189 ATSETPSPTFILVKIINKKKVAITVAFRKSNVYVGYQDTVGGKIRANFVANELTAQERA 10
          +TSETP+PTFILVKIINKKKVAITVA RKSNVYVGYQDTVGG RANFVANELTAQER
Sbjct 61  STSETPNPTFILVKIINKKKVAITVALRKSNVYVGYQDTVGGTPRANFVANELTAQERT 120

Query 9    QLF 1
          QLF
Sbjct 121  QLF 123
```

**m/z: 1565.85:**

Identities = 78/81 (96%), Positives = 79/81 (98%), Gaps = 0/81 (0%)  
Frame = -1

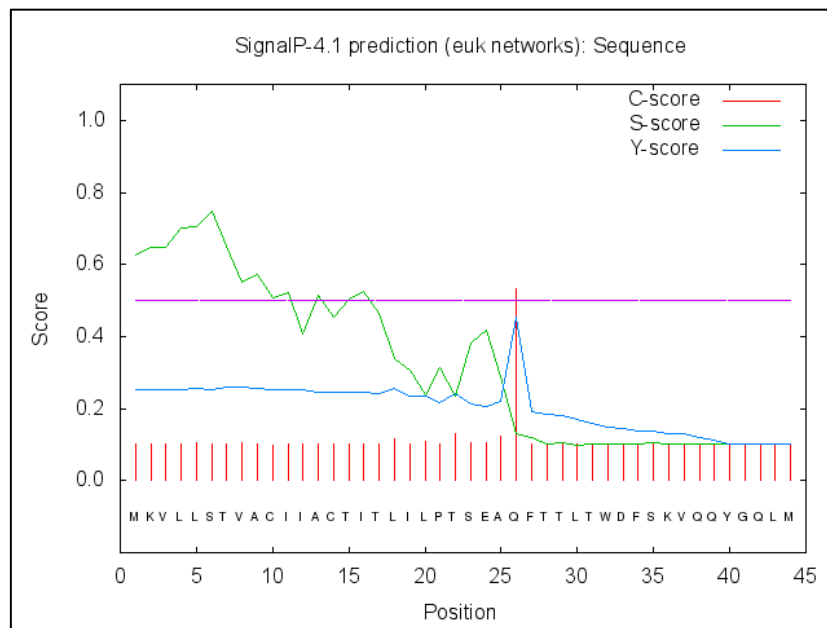
```
Query 244 VENLSPLMDIVNGADYGKSRQDLAKFALMVIQMVAEGTRFKYISDIVLKQGTQEGKTFLP 65
          VENLSPLMDIVNGADY KSRQDLAKFALMVIQMVAE TRFKYIS+IVLKQGTQEGKTFLP
Sbjct 157 VENLSPLMDIVNGADYSKSRQDLAKFALMVIQMVAEATRFKYISEIVLKQGTQEGKTFLP 216

Query 64  DATFIKLETNWGSFSDLIHNS 2
          DATFIKLETNWGSFSDLIHNS
Sbjct 217 DATFIKLETNWGSFSDLIHNS 237
```

Es konnten also die Sequenzen der Peptidfragmente (im Alignment unterstrichen) m/z = 794.37, m/z = 1117.65, m/z = 1462.77, m/z = 1488.79, m/z = 1565.85, m/z = 1570.9 und m/z = 1693.88 in den RNA-Seq-Daten bestätigt werden, was die Existenz mindestens einer Isoform abschließend verifizierte. Besonders der read des zweiten Alignments ist interessant, da er die Sequenzen von gleich vier verschiedenen Peptidfragmenten lückenlos hintereinander enthält. Hierbei gilt das Hauptaugenmerk der enthaltenen Sequenz des Peptidfragmentes m/z = 1488.79, wodurch zusammen mit der Sequenz des Fragmentes m/z = 1462.77 die Anwesenheit von drei Isoformen bestätigt wird. Die vollständigen Sequenzen dieser Isoformen konnten allerdings nicht ermittelt werden. Dass für die anderen Fragmente keine reads gefunden wurden heißt nicht, dass diese nicht existieren. Es mag sein, dass bestimmte Infor-

mationen, die diese Sequenzen belegen könnten, bei dem Merge (Zusammenführen) der reads verloren gegangen sind.

Außerdem wurde die RNA-Seq-Sequenz (Abb. 31) gegen die RNA-Seq-Rohdaten geblastet und es wurde somit bestätigt, dass diese Sequenz zu 100% in den Daten zu finden war. Bei einer weiteren Untersuchung mit SignalP4.1, mit dem die Anwesenheit und Lage von Spaltstellen für Signalpeptide in Aminosäuren aufgezeigt werden kann, konnte zudem ein Signalpeptid bei der RNA-Seq-Sequenz ausgemacht werden Abb. 33.



**Abb. 33:** Theoretische Spaltstelle einer Signalsequenz von der neuen Konsensussequenz. Ermittelt und Dargestellt mit SignalP4.1 [491].

Damit wird für die Sequenz des isolierten Agrostins folgender Sequenzvorschlag aufgestellt:

```

MKVLLSTVACIIACTITLILPTSEAQFTLLTWDFSKVQQYGQLMASLRKELGATTVCTIPSTETPNPTF
ILVKIINKKKVAITVALRKSNNVYVGYQDTVGGTPRANFVANELTALERTQLFPGATKGPLDLPYGVS
YGLERVAGVDRANFRLGVENLSPLMDIVNGADYSKSRQDLAKFALMVIQMVAEATRFKYISEIVLK
QGTQEGKTFLPDATFIKLETNWGFSFDLIHNSSPGCKPVQSPNFPAWTDIKPQVGLLKFKTNRPSV
EGIFDKNDDNNEVDDALE
    
```

**Abb. 34:** Aminosäuresequenz des Agrostins. schwarz: Vorhergesagte Signalsequenz, 25 Aminosäuren, Mw = 2605 Da; rot: Reife Agrostin-Sequenz, 244 Aminosäuren, Mw = 27007 Da; blau: Sequenz, die theoretisch abgeschnitten werden müsste, damit die Masse dieser Sequenz mit der des isolierten Agrostins etwa übereinstimmt, 21 Aminosäuren, Mw = 2325 Da.

Und damit ergibt sich folgende Aminosäurezusammensetzung:

**Tabelle 17:** Aminosäurezusammensetzung der Agrostin-Sequenz

AS <sup>1</sup>	1-BC <sup>2</sup>	3-BC <sup>3</sup>	Anzahl	%	AS <sup>1</sup>	1-BC <sup>2</sup>	3-BC <sup>3</sup>	Anzahl	%
Alanin	A	Ala	21	7.2	Leucin	L	Leu	28	9.7
Arginin	R	Arg	10	3.4	Lysin	K	Lys	20	6.9
Asparagin	N	Asn	15	5.2	Methionin	M	Met	5	1.7
Asparaginsäure	D	Asp	16	5.5	Phenylalanin	F	Phe	14	4.8
Cystein	C	Cys	4	1.4	Prolin	P	Pro	16	5.5
Glutamin	Q	Gln	12	4.1	Serin	S	Ser	19	6.6
Glutaminsäure	E	Glu	14	4.8	Threonin	T	Thr	26	9.0
Glycin	G	Gly	18	6.2	Tryptophan	W	Trp	3	1.0
Histidin	H	His	1	0.3	Tyrosin	Y	Tyr	8	2.8
Isoleucin	I	Ile	17	5.9	Valin	V	Val	23	7.9

<sup>1</sup> AS = Aminosäure; <sup>2</sup> 1-BC = Einbuchstabencode; <sup>3</sup> 3-BC = Dreibuchstabencode

Die Massedifferenz von 4937 Da zwischen der RNA-Seq-Sequenz und der des isolierten Agrostins konnte nur dadurch erklärt werden, dass N-terminal eine Signalsequenz abgeschnitten und C-terminal ein weiterer Teil der Sequenz mit einer Länge von 21 Aminosäuren abgeschnitten wurde. Während die N-terminale Signalsequenz *in silico* mit SignalP4.1 nachgewiesen werden konnte, konnte für den C-terminalen Teil nur vermutet werden, dass dieser bereits während der Proteinextraktion aus den gemahlene Samen proteolytisch abgespalten wurde. Möglich wäre aber auch, dass das isolierte Protein eine Isoform darstellt, dessen Nukleotidsequenz entsprechend kürzer ist als die Nukleotidsequenz, die aus den RNA-Seq-Daten ermittelt wurde. Dementsprechend wurde in diesem Bereich nach einem Stopcodon in den RNA-Seq-Rohdaten gesucht, was jedoch nicht aufgezeigt werden konnte.

#### 4.5.2 Vergleich der RNA-Seq-Sequenz mit den Aminosäuresequenzen anderer Typ 1 RIPs

Die RNA-Seq-Sequenz wurde zunächst wie die erste Konsensussequenz (Abb. 28) gegen die gängigen Proteindatenbanken geblastet. Auch hier wurde die Zugehörigkeit der 290 Aminosäure langen RNA-Seq-Sequenz zur RIP-Superfamilie bestätigt (Abb. 35) und Bouganin wurde erneut als das Protein angezeigt, dessen Sequenz am ähnlichsten mit der RNA-Seq-Sequenz ist (Abb. 36).

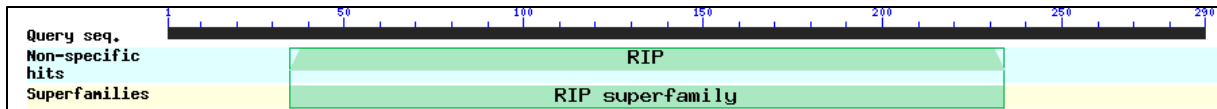


Abb. 35: Zuordnung der RNA-Seq-Sequenz zur RIP-Superfamilie. Screenshot, BLAST.

bouganin [*Bougainvillea spectabilis*]  
 Sequence ID: [AAL35962.1](#) Length: 305 Number of Matches: 1

Range 1: 22 to 276 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
145 bits(365)	6e-38	Compositional matrix adjust.	93/261(36%)	143/261(54%)	20/261(7%)
Query 22	TSEAQFTTLTWDFSKVQQYGQLMASLRKELG-ATTVCTIPSTSET--PNPTFILVKIINK				78
Sbjct 22	TTSLGYNVTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNLAKGTPVCQLPVTLQTIADDKRFVLVDITTT				81
Query 79	KKVAITVALRRSNVYVGYQDTVGGTFRANFVANELTALERTQLFPGATKGPLDLPYGV				138
Sbjct 82	SKKTVKVAIDVTDVYVGYQDKWDGKDRAVFL-DKVPTVATSKLFPVGT-NRVTLTFDGS				139
Query 139	YGDLELVAGVDRANFRGLGVENLSPLMDIVNGADYSKSRDLAKFALMVIQMVAEATRFY				198
Sbjct 140	YQKLVNAKVDRKDLGLGVYKLEFSIEAIGHK--TINGQETAKFFLIVIQMVSEARFFY				197
Query 199	ISEIVLKGQTQEGKTFLLPDATPIKLETNWSGSDLIHNSSPGCKPVQ-----SPNFP				252
Sbjct 198	IETEVVDRGLY--GSFRPNFKVLNLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPW				255
Query 253	-----TDIKPQVGLLKFKTNR 268				
Sbjct 256	VVNKVSQISPDGMGILKFKSSK 276				

Abb. 36: BLAST-Ergebnis der neuen Konsensussequenz. 36% Homologie mit Bouganin aus *Bougainvillea spectabilis*. Query = RNA-Seq-Sequenz, Sbjct = Referenzsequenz des Bouganin. Screenshot, BLAST.

Die Abbildungen Abb. 29 und Abb. 36 unterscheiden sich dahingehend, dass in Abb. 36 das Alignment bereits ab der Position 22 der Bouganin-Sequenz gezeigt wird und nicht erst ab Position 44 wie in Abb. 29. Dadurch werden insgesamt 261 Aminosäuren der beiden Sequenzen verglichen im Vergleich zu 239 aus Abb. 29. Der längere Sequenzabgleich bedingt jedoch eine geringere Sequenzhomologie von 36% (Identities: 93/261) im Vergleich zu 38% (Identities: 90/239). An dieser Stelle ist erneut festzuhalten, dass bei dem BLAST-Ergebnis kein Typ 1 RIP von Produzenten der Caryophyllaceae-Familie aufgelistet wurde. Daher wurde ein „multiple Alignment“ mit allen Typ 1 RIPs aus Caryophyllaceae-Arten (s. Tabelle 12 + Tabelle 13), Bouganin und Agrostin (= RNA-Seq-Sequenz) durchgeführt, um die Gemeinsamkeiten der Sequenzen aufzuzeigen (Abb. 37).

In Abb. 36 ist zu erkennen, dass das Agrostin in folgenden Aminosäuren mit den Sequenzen der anderen Typ 1 RIPs übereinstimmt: Tyr40, Arg48, Phe70, Tyr93, Val95, Ala107, Phe123, Tyr139, Ala146, Arg150, Leu155, Gly156, Leu160, Ala180, Phe182, Leu184, Ile187, Gln188, Met189, Glu192, Arg195, Phe196, Tyr198, Ile199, Val203, Phe142, Trp227 und Ser231.



**Abb. 37:** Multiple Alignment der Typ 1 RIPs der Caryophyllaceae-Arten, Agrostin (= RNA-Seq-Sequenz) und Bouganin. Erstellt mit Clustal Omega; die farbig markierten Bereiche sind die Abschnitte der MALDI-TOF-Fragmente, von denen die Aminosäuren, die sowohl in der Agrostin-Sequenz als auch in den jeweiligen Fragment-Sequenzen übereinstimmen, unterstrichen sind: hellgrün: m/z = 1361.78, hellblau: m/z = 1004.63, orange: m/z = 1462.77, violett: m/z = 1117.65, rot: m/z = 1693.88, dunkelblau: m/z = 853.4, dunkelrot: m/z = 817.44 (zusätzlich SRQ aus dem dunkelblauen Bereich des Fragmentes m/z = 853.4), dunkelgrün: m/z = 1565.85, orangebraun: m/z = 1997.12. Die gelb markierten Aminosäuren stellen die Aminosäuren des Aktivitätszentrums dar (s. Text).

Davon sind Tyr93, Tyr139, Glu192, Arg195 und Trp227 von besonderem Interesse, da dies die fünf konservierten Aminosäuren des in der Einführung erwähnten Aktivitätszentrums sind, die u.a. in einer Kristallstrukturanalyse für das Ricin (A-Kette), Trichosanthin, Saporin SO6, Dianthin 30, PAP, Bouganin und Gelonin gezeigt werden konnten [51]. Zudem bestätigt die Art der Aminosäuren an diesen bestimmten Positionen das BLAST-Ergebnis (vgl. Abb. 35), dass es sich bei dem Protein um ein RIP 1 mit *N*-Glukosidase Aktivität handeln musste und damit wurde endgültig bestätigt, dass es sich hierbei um das Agrostin handelt. Tyr139 ist ebenfalls im MALDI-TOF-Peptidfragment  $m/z = 1693.88$  enthalten. Glu192 und Arg 195 sind auch in dem Peptidfragment  $m/z = 1565.85$  enthalten. Diese beiden Beispiele verdeutlichen also, dass sowohl in der RNA-Seq-Sequenz als auch in den Isoformen diese Aminosäuren konserviert sind. Der Bereich der Agrostin-Sequenz, der mit der Sequenz des Peptidfragmentes  $m/z = 1997.12$  übereinstimmt, wird in dem Alignment etwas auseinandergezogen. Es zeigt allerdings auch, dass es sich bei dem in dem Sequenzabschnitt enthaltenen Tryptophan (W) nicht um das Tryptophan des Aktivitätszentrums handelt, wie anfangs vermutet wurde (s. Kap. 4.1.1).

Abschließend werden die Sequenzhomologien der Typ 1 RIPs der Caryophyllaceae-Arten und des Bouganins mit der Agrostin-Sequenz in Tabelle 18 gegenübergestellt (vgl. dazu auch Tabelle 13).

**Tabelle 18:** Sequenzhomologien der Typ 1 RIPs der Caryophyllaceae-Arten mit Agrostin und Bouganin

RIP 1 <sup>1</sup>	Dianthin 30	Lychnin	RIP Q3	Saporin	Stellarin 1	Agrostin/ Bouganin
<b>Agrostin</b>	28%	36.8%	29.8%	27.6%	29.9%	34.2%
<b>Bouganin</b>	25.6%	36.9%	30.7%	26.3%	31.6%	

<sup>1</sup> Die Sequenzen für die Typ 1 RIPs Dianthin 30, Lychnin, RIP Q3, Saporin und Stellarin 1 wurden den Quellen und Datenbanken aus Tabelle 12 entnommen, die Sequenz des Bouganin stammt von GenBank (AAL35962.1). Die Sequenzhomologien wurden mit Clustal Omega [489] ermittelt.

In Tabelle 18 ist zu erkennen, dass sowohl Agrostin als auch Bouganin die größte Sequenzhomologie mit Lychnin aufweist, die sogar noch größer ist als die Sequenzhomologie zwischen Agrostin und Bouganin selbst. Dass die Sequenzhomologie von Agrostin und Bouganin

hier mit 34.2% angegeben wird und damit fast zwei Prozent geringer ausfällt als im Alignment in Abb. 36, lässt sich dadurch erklären, dass in dem Alignment für die Tabelle 18, welches mit Clustal Omega durchgeführt wurde, alle Aminosäuren einer Sequenz berücksichtigt werden, während bei dem Alignment, das durch BLAST resultierte (Abb. 36), die Sequenzen erst ab der Position 22 der Bouganin-Sequenz gegenübergestellt wurden. Die höheren Sequenzhomologien mit Lychnin können daher resultieren, dass die Sequenz von Lychnin mit 234 Aminosäuren im Vergleich zu den anderen Sequenzen im Durchschnitt um 51 Aminosäuren kürzer ist. Im Allgemeinen ist hier festzuhalten, dass weder zwischen Agrostin und Bouganin noch zwischen Agrostin und einem Typ 1 RIP einer anderen Caryophyllaceae-Art solch große Sequenzhomologien wie zwischen Stellarin 1 und RIP Q3 (90.7%) oder Dianthin 30 und Saporin (77.7%) (s. Tabelle 13) zu erkennen sind. Damit wird gezeigt, dass nicht angenommen werden kann, dass Typ 1 RIPs innerhalb einer Pflanzenfamilie stets eine relativ hohe Sequenzhomologie zeigen. Das Beispiel von Agrostin zeigt sogar die höchste Sequenzhomologie mit einem RIP 1 von einer Spezies einer anderen Pflanzenfamilie (Nyctaginaceae).

#### 4.6 Ergebnisse der RACE-PCR

Die Ergebnisse der Auswertungen der MALDI-TOF-Spektren und der RNA-Seq-Rohdaten lieferten eine Aminosäuresequenz für das Agrostin, dessen theoretische Masse sich um 4937 Da von der gemessenen Masse des isolierten Agrostins unterscheidet. Mit SignalP konnte zwar gezeigt werden, dass N-terminal eine Signalsequenz mit einer Größe von 2605 Da abgeschnitten wird, dennoch bleibt nach der Abspaltung des Signalpeptides eine Massendifferenz von 2332 Da. Da die Sequenzen der MALDI-TOF-Fragmente und die Sequenz des Agrostins aus den RNA-Seq-Rohdaten sich an manchen Positionen unterscheiden, wurde damit gezeigt, dass es sich mindestens um zwei Isoformen handeln muss. Da ein eventuell in der Isoform auftretendes Stopcodon, welches entsprechend der Massendifferenz von 2332 Da etwa 54 bp ( $\pm 14$  bp) vor dem Stopcodon der Agrostin-Sequenz aus den RNA-Seq-Rohdaten vorkommen müsste, *in silico* nicht nachgewiesen werden konnte, wurde nun *in vitro* untersucht, ob die entsprechende mRNA für die Agrostin-Sequenz tatsächlich so in der Pflanze enthalten ist, wie sie in den RNA-Seq-Rohdaten gefunden wurde.



Dazu wurden für die Reverse Transkriptase (s. Kap. 3.3.3) und die anschließende RACE-PCR (s. Kap. 3.3.7) anhand der Nukleotidsequenz des Agrostins (Abb. 38) zunächst Primer designt, die 24 bp lang waren und einen ähnlichen Schmelzpunkt (T<sub>m</sub>) hatten.



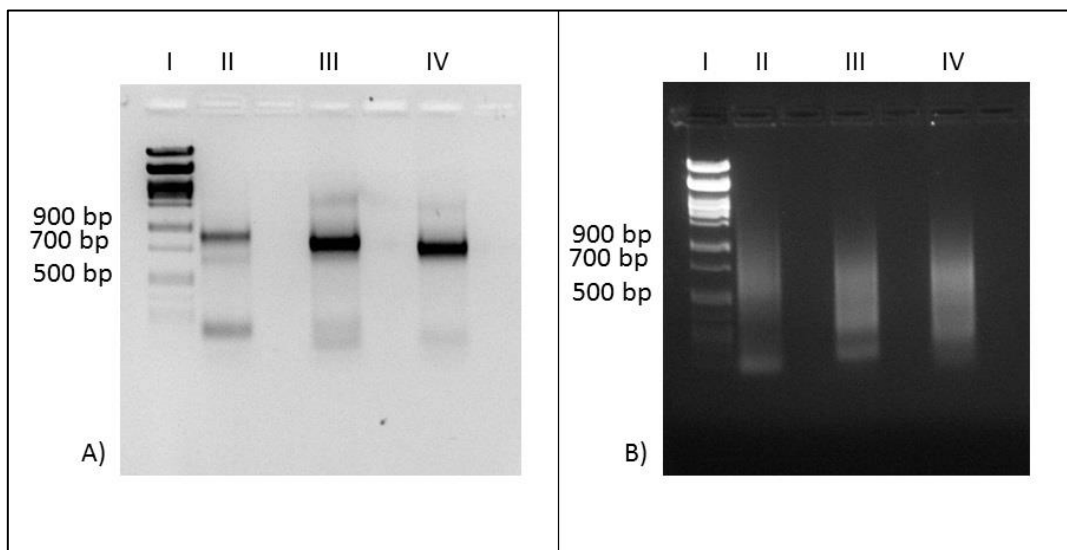
**Abb. 38:** Nukleotidsequenz des Agrostins als Vorlage für die bei der Reverse Transkriptase und RACE-PCR verwendeten Primer.

Für die Reverse Transkriptase wurden zwei Primer verwendet, die zur Synthese von zwei cDNA führte. Zum einen wurde ein Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primer (OdT<sub>18</sub>P) (nicht in Abb. 38 gezeigt) für die Herstellung der Oligo(dT)-cDNA und zum anderen wurde ein genspezifischer Primer (GSP\_RT = Gensspezifischer Primer für die Reverse Transkriptase) für die Herstellung der GSP\_cDNA verwendet. Für die anschließende 3'RACE bzw. 5'RACE-PCR wurde ein genspezifischer Primer in Kombination mit einem Oligo(dT)-Ankerprimer (OdTAP) verwendet. Dabei wurden GSP\_3R1 bzw. GSP\_5R1 verwendet: 3R1 = 3RACE, Primer 1; 5R1 = 5RACE, Primer 1. Für die darauf folgenden nested PCRs kamen die genspezifischen Primer 3R2, 3R3 und 3R4

bzw. 5R2, 5R3 und 5R4 in Kombination mit einem Ankerprimer (AP) zum Einsatz. Im Folgenden sind alle verwendeten Primer zur Übersicht aufgelistet.

- GSP\_RT: 5'-TTACTCAAGGGCATCATCAACTTC-3'
- GSP\_3R1: 5'-AGTAAGGTTCAACAATACGGGCAG-3'
- GSP\_3R2: 5'-TTAAGAAAAGAACTCGGTGCCACC-3'
- GSP\_3R3: 5'-GCCTTGCGAAAATCCAACGTCTAT-3'
- GSP\_3R4: 5'-TTAACTGCCTTGGAGCGGACTCAA-3'
- GSP\_5R1: 5'-TTGTGGCTTAATATCAGTCCACGC-3'
- GSP\_5R2: 5'-TCCCCAGTTAGTCTCCAACCTAAT-3'
- GSP\_5R3: 5'-CCCCTGTTTCAACACAATCTCCGA-3'
- GSP\_5R4: 5'-CTGTCTGGACTTGCTATAATCCGC-3'
- OdTAP: 5'-GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTV-3'
- AP: 5'-GACCACGCGTATCGATGTCGAC-3'

Da nach der 3'RACE bzw. 5'RACE-PCR jeweils drei nested PCR durchgeführt wurden, war für das Agarose-Gel zu erwarten, dass in jeder Probe jeweils eine Bande zu sehen sein sollte, von denen aufgrund der unterschiedlich langen PCR-Produkte die Bande der nested PCR mit dem GSP\_3R2 bzw. GSP\_5R2 am höchsten und die Bande von GSP\_3R4 bzw. GSP\_5R4 am niedrigsten verlief. In Abb. 39 ist dieses erwartete Ergebnis zumindest für die 3'RACE-PCR zu sehen. Bei der 5'RACE-PCR sind auch nach mehreren Versuchen und Austausch der TdT keine einzelnen, scharfen Banden zu beobachten gewesen, sodass die Durchführung eingestellt wurde und ein endgültiges Resultat der 5'RACE-PCR ausblieb.



**Abb. 39:** Agarose-Gele der 3'RACE-PCR-Produkte (A) und 5'RACE-Produkte (B). **A)** I: Marker; II: GSP\_3R2; III: GSP\_3R3; IV: GSP\_3R4; **B)** I: Marker; II: GSP\_5R1; III: GSP\_5R2; IV: GSP\_5R4.

Agrostin 3'-RACE-Produkt_pJET	340	TTAACTGCCTTGGAGCGGACTCAA	CTATTTC	CCGGTGCAACAAAAGGACCACTGGACCTA
Agrostin 3'-RACE-Produkt_pJET		CCGTATGGGGTGTCTTACGGCGATCTTGAGAGAGTCGCGGGTGTGGATAGGGCTAATTTT		CCGTATGGGGTGTCTTACGGCGATCTTGAGAGAGTCGCGGGTGTGGATAGGGCTAATTTT
Agrostin 3'-RACE-Produkt_pJET		AGGCTCGGTGTTGAGAATTTGTCAACCTTGATGGATATTGTGAACGGGGCGGATTATAGC		AGGCTCGGTGTTGAGAATTTGTCAACCTTGATGGATATTGTGAACGGGGCGGATTATAGC
Agrostin 3'-RACE-Produkt_pJET		AAGTCCAGACAGGACTTGGCTAAGTTCGCCCTGATGGTTATCCAAATGGTCGCTGAGGCG		AAGTCCAGACAGGACTTGGCTAAGTTCGCCCTGATGGTTATCCAAATGGTCGCTGAGGCG
Agrostin 3'-RACE-Produkt_pJET		ACACGTTTTAAGTATATATCGGAGATTGTGTTGAAACAGGGGACACAGGAGGGGAAGACT		ACACGTTTTAAGTATATATCGGAGATTGTGTTGAAACAGGGGACACAGGAGGGGAAGACT
Agrostin 3'-RACE-Produkt_pJET		TTTTTGCCAGATGCTACTTTTATTAAGTTGGAGACTAACTGGGGATCCTTTTCTGACCTG		TTTTTGCCAGATGCTACTTTTATTAAGTTGGAGACTAACTGGGGATCCTTTTCTGACCTG
Agrostin 3'-RACE-Produkt_pJET		ATTCATAACTCGAGTCCAGGTTGTAACCGGTGCAATCGCCCAATTTCCGGCGTGGACT		ATTCATAACTCGAGTCCAGGTTGTAACCGGTGCAATCGCCCAATTTCCGGCGTGGACT
Agrostin 3'-RACE-Produkt_pJET		GATATTAAGCCACAAGTGGGTCTCCTTAAGTTTAAAACCAATCGTCCTTCTTCTGTGGAG		GATATTAAGCCACAAGTGGGTCTCCTTAAGTTTAAAACCAATCGTCCTTCTTCTGTGGAG
Agrostin 3'-RACE-Produkt_pJET		GGTATTTTCGACAAGAATGACGATAATAATGAAGTTGATGATGCCCTTGAGTAA		GGTATTTTCGACAAGAATGACGATAATAATGAAGTTGATGATGCCCTTGAGTAA
Agrostin 3'-RACE-Produkt_pJET		TTTATCTGATGTATGGTCCATGATTGGTCTGCATGAGTATGTATGGAGTTGTCTATGTT		TTTATCTGATGTATGGTCCATGATTGGTCTGCATGAGTATGTATGGAGTTGTCTATGTT
Agrostin 3'-RACE-Produkt_pJET		GCCATGTTGATTTTAAATAAGTTGCATGTCAAGTTGATGTATCATGAATGAATAAGTT		GCCATGTTGATTTTAAATAAGTTGCATGTCAAGTTGATGTATCATGAATGAATAAGTT
Agrostin 3'-RACE-Produkt_pJET		ATCTCTTATTG	AAAAA	AAAAA
Agrostin 3'-RACE-Produkt_pJET		AAGATCTCTACAATATTTCTCAGCTGCCATGGAAAATCGATGTTCTTCTTTATCTCTC		AAGATCTCTACAATATTTCTCAGCTGCCATGGAAAATCGATGTTCTTCTTTATCTCTC
Agrostin 3'-RACE-Produkt_pJET		AAGATTTTCAGGTCGCATATTA	AACTCATATTACGA	ACTATGCTAACCACTCATCAGG
Agrostin 3'-RACE-Produkt_pJET		AACCGTTGTAGGTGGCGTGGG		

**Abb. 40:** Alignment der Agrostin-Sequenz mit dem 3'RACE-PCR Produkt. Als 3'RACE-Produkt wurde das Produkt, welches mit dem Primer GSP\_3R4 durchgeführt wurde, verwendet; die Agrostin-Sequenz beginnt hier ab der Nukleotidposition 340, welches den Anfang des GSP\_3R4 darstellt; orange: GSP\_3R4; rot: 3'-UTR; grün: Poly(A)-Schwanz; blau: komplementäre Sequenz zum Ankerprimer.

Die Banden der 3'RACE-PCR-Produkte wurden ausgeschnitten und anschließend wurde die DNA aus den Gelstücken extrahiert (Kap. 3.3.8), in den pJET-Vektor kloniert (Kap. 3.3.9), in kompetente DH10B-Zellen transformiert (Kap. 3.4.1) und zum Schluss wurde der pJET-Vektor mit dem 3'RACE-PCR-Produkt als Insert extrahiert (Kap. 3.3.10) und zwecks Sequenzierung an LGC (LGC Genomics GmbH, Berlin) übergeben. In Abb. 40 wird exemplarisch die resultierende Sequenz des 3'RACE-PCR-Produktes, welches mit dem Primer GSP\_3R4 durchgeführt wurde, mit der Nukleotidsequenz des Agrostins in einem Alignment gegenübergestellt. Die Sequenz des 3'RACE-Produktes fängt ab dem letzten Basentriplet der Primersequenz an und ist bis zum Ende der Agrostin-Sequenz zu 100% mit dieser Sequenz identisch. Außerdem ist in Abb. 40 im Anschluss an die Agrostin-Sequenz eine 138 bp lange Nukleotidsequenz zu erkennen (rot), welche die 3'-UTR darstellt. Nach der 3'-UTR ist eine Poly(A)-Sequenz zu erkennen (grün), an die sich die Sequenz des Ankerprimers (blau) anschließt. Nach der Ankerprimersequenz beginnt eine Nukleotidsequenz, die von dem pJET-Vektor herrührt.

Die Sequenzierung des 3'RACE-Produktes zeigt, dass die mRNA, die für die 290 Aminosäuren lange RNA-Seq-Sequenz codiert, im Pflanzengewebe existiert, wodurch der Verdacht bestätigt wird, dass vom isolierten Agrostin wahrscheinlich beim Prozess der Proteinextraktion C-terminal ein gewisser Teil abgespalten wurde.

#### **4.7 Ergebnisse der Klonierungs-PCR**

Zum Abschluss dieser Arbeit wurde als Vorbereitung anschließender Untersuchungen ein DNA-Konstrukt designt, welches die Agrostin-Sequenz beinhaltet, an der zusätzlich die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme SacII, EcoRI und NheI angebracht sind, um dieses Konstrukt zwecks Expression in den Vektor pET11d zu klonieren. Die Ligation von Typ 1 RIPs in diesen Vektor ist u.a. bereits für das Dianthin und Saporin durchgeführt worden [492] und mit den Schnittstellen SacII und EcoRI kann das DNA-Konstrukt (Abb. 41) ebenfalls in den pET11d-Vektor ligiert werden. Die Schnittstelle NheI dient zusammen mit der Schnittstelle SacII dazu, um das DNA-Konstrukt in den pET11d-Vektor zu klonieren, in dem zusätzlich eine DNA-Sequenz für einen EGF-Adapter integriert ist, welcher zusammen mit dem RIP ein zielgerichtetes anti-Tumor Toxin bildet [493]. Das 892 bp lange DNA-Konstrukt wurde von der Firma eurofins (eurofins Genomics, Ebersberg) synthetisiert und zwecks Transport und Aufbewahrung in ein Plasmid (pMini-T-Gen) ligiert. Somit war dieses Konstrukt fertig präpariert,

um mit den Restriktionsenzymen verdaut und anschließend in den pET11d-Vektor kloniert zu werden (nicht in dieser Arbeit gezeigt).

```

1 5' – CCGCGGGGAA GGTGTTACTA AGCACAGTTG CGTGCATCAT CGCGTGCACG
51  ATTACTCTTA TTTTACCAAC ATCGGAGGCA CAATTCACGA CACTAATTG
101 GGATTCAGT AAGGTTCAAC AATACGGGCA GCTTATGGCC TCCTTAAGAA
151 AAGAACTCGG TGCGACCACG GTGTGCACTA TACCATCCAC GTCCGAGACA
201 CCAAACCCCA CATTCATTTT GGTTAAGATA ATCAACAAGA AAAAAGTAGC
251 CATCACAGTG GCCTTGCGAA AATCCAACGT CTATTACGTG GGTTACCAGG
301 ACACGGTCCG AGGGACACCT CGTGCCAATT TCGTGGCCAA CGAGTTAACT
351 GCCTTGAGC GGACTIONACT ATTTCCCGGT GCAACAAAAG GACCACTGGA
401 CCTACCGTAT GGGGTGTCTT ACGGCGATCT TGAGAGAGTC GCGGGTGTGG
451 ATAGGGCTAA TTTTAGGCTC GGTGTTGAGA ATTTGTCACC CTTGATGGAT
501 ATTGTGAACG GGGCGGATTA TAGCAAGTCC AGACAGGACT TGGCTAAGTT
551 CGCCCTGATG GTTATCCAAA TGGTCGCTGA GGCGACACGT TTTAAGTATA
601 TATCGGAGAT TGTGTTGAAA CAGGGGACAC AGGAGGGGAA GACTTTTTTG
651 CCAGATGCTA CTTTTATTAA GTTGAGACT AACTGGGGAT CCTTTTCTGA
701 CCTGATTCAT AACTCGAGTC CAGGTTGTAA ACCGGTGCAA TCGCCCAATT
751 TTCCGGCGTG GACTGATATT AAGCCACAAG TGGGTCTCCT TAAGTTTAA
801 ACCAATCGTC CTTCTTCTGT GGAGGGTATT TTCGACAAGA ATGACGATAA
851 TAATGAAGTT GATGATGCC TTAGAGGCTAG CTAAGGAAT TC – 3'

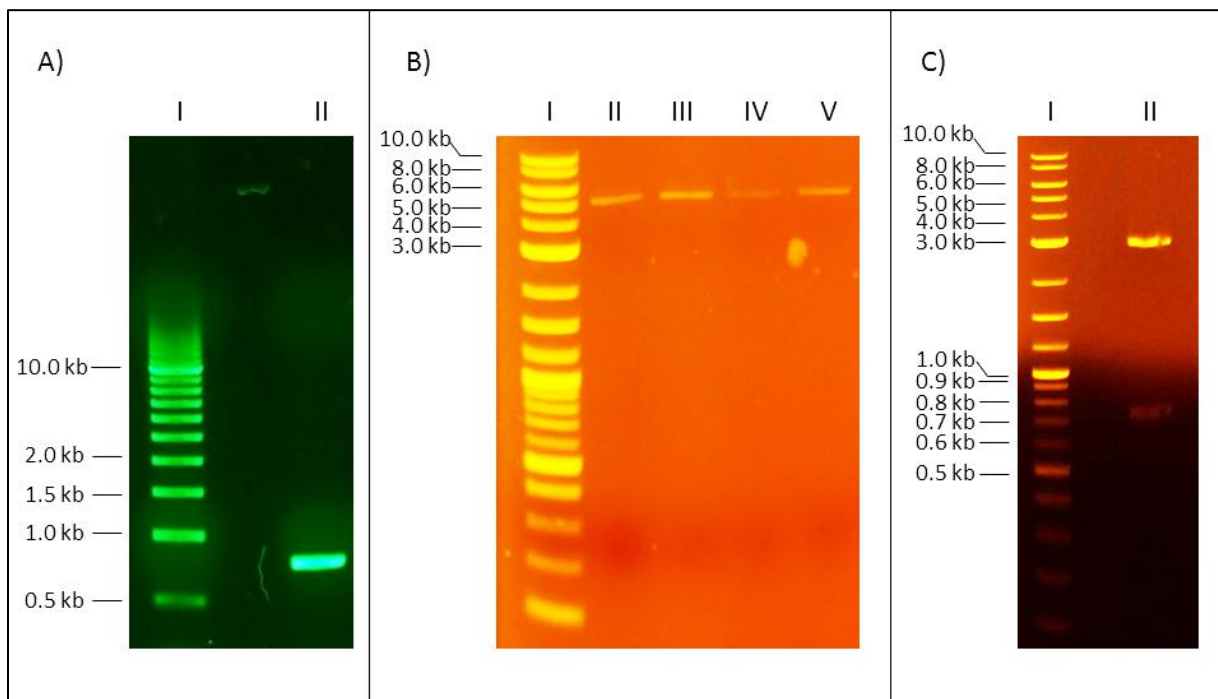
```

**Abb. 41:** DNA-Konstrukt des Agrostins. rot: SacII-Schnittstelle; grün: NheI-Schnittstelle; blau: EcoRI-Schnittstelle; orange: zusätzliche Basen, die eingebaut wurden, um nach erfolgter Ligation in den pET11d-Vektor einen Frame-Shift zu verhindern. Unterstrichenes Basentriplett an Position 135-137: Startcodon der ersten Konsensussequenz aus Abb. 26.

An der Position 135-137 in dem DNA-Konstrukt ist ein ATG zu erkennen, welches für ein Methionin (M) codiert und damit das Startcodon der ersten Konsensussequenz aus den RNA-Seq-Rohdaten (vgl. Abb. 26 und Abb. 27) darstellt. Da durch diese Sequenz ein Protein resultiert, welches eine Masse von 27140 Da aufweist und damit der Masse des isolierten Proteins von 26963 ziemlich nahe kommt, wurde die Sequenz ab dieser Stelle untersucht, um zu überprüfen, ob dies den Start einer Isoform dieses Proteins repräsentieren kann. Dazu wurde die Nukleotidequenz mit einer Klonierungs-PCR amplifiziert (Kap. 3.3.6). Als Template diente der pMini-T-Gen-Vektor mit dem enthaltenen DNA-Konstrukt und als Primer wurde ein Primer verwendet, der die Schnittstelle SacII (5'-CCGC<sup>↓</sup>GG-3') enthielt (KlonPCR\_P1), und ein Primer, der die Schnittstelle EcoRI (5'-G<sup>↓</sup>AATTC-3') enthielt (KlonPCR\_P2):

- KlonPCR\_P1: 5'-CATCCGCGGGTATGGCCTCCTTAAGAAAAGAAC-3'
- KlonPCR\_P2: 5'-GACAAAGGTGAATTCCCTTAGCTAGCCTCAAGG-3'

Das resultierende PCR-Produkt wurde aus dem Agarose-Gel extrahiert (Kap. 3.3.8), in den pJET-Vektor kloniert (Kap. 3.3.9), der Vektor wurde in kompetente DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert (Kap. 3.4.1) und das Plasmid wurde dann extrahiert (Kap. 3.3.10). Als in-Prozess-Kontrolle wurde das Plasmid mit den Restriktionsenzymen EcoRI-HF<sup>®</sup> und SacII verdaut, um zu überprüfen, ob das PCR-Produkt auch tatsächlich in dem Vektor erhalten war, welches nach erfolgtem enzymatischem Verdau im Agarose-Gel bei einer Höhe von 756 bp zu sehen sein musste. Zusätzlich sollte eine Bande bei ungefähr 3000 bp zu sehen sein, die den pJET-Vektor repräsentiert.



**Abb. 42:** Agarosegele des PCR-Klonierungs-Produktes (A), der Plasmid-Aufreinigung nach Ligation in den pJET-Vektor (B) und des Verdaus des aufgereinigten Vektors (C). **A)** I: Marker (500 bp Molecular Ruler; Bio-Rad); II: Klonierungs-PCR-Produkt; Farbstoff: Roti<sup>®</sup>-GelStain; **B)** I: Marker (2-Log DNA Ladder; New England BioLabs); II: Kolonie 1; III: Kolonie 2; IV: Kolonie 3; V: Kolonie 4; Farbstoff: EtBr; **C)** I: Marker (2-Log DNA Ladder; New England BioLabs); II: Produkt aus dem Verdau des aufgereinigten Vektors mit SacII und EcoRI; Farbstoff: EtBr.

In Abb. 42 ist in A) das PCR-Produkt der Klonierungs-PCR zu erkennen, dessen Bande ungefähr bei 750 bp zu sehen ist und damit die erwartete Größe von 756 bp bestätigt. In B) sind nach erfolgter Plasmidaufreinigung die Klone aufgetragen, dessen Kolonien durch ein Wachstum auf der Agarplatte (s. Abb. A18) zu sehen waren. Zu erwarten war jeweils eine

Bande auf Höhe von 3730 bp [pJET-Vektor (2974 bp) + Klonierungs-PCR-Produkt (756 bp)]. Die vier Banden auf Höhe von etwa 5 kb entsprechen somit nicht dem erwarteten Ergebnis, was durch eine veränderte Konformation der DNA zu erklären ist, die nach der Ligation des Klonierungs-PCR-Produktes mit dem pJET-Vektor zum Ringschluss zustande gekommen ist, und dadurch ein anderes Laufverhalten im Agarosegel zeigt als in linearer Form. Hierbei ist zu erwähnen, dass lediglich von zwei Kolonien die Plasmid-Konzentration ermittelt werden konnte (Abb. A18). Einen Tag später wurde erneut versucht, das Plasmid aus den Kolonien zu extrahieren, wobei zwar eine deutliche Trübung nach erfolgter Plasmid-Aufreinigung zu erkennen war, was auf ein Bakterienwachstum schließen ließ, allerdings konnte für keine Kolonie weder eine Bande im Agarosegel ausgemacht noch eine Konzentration ermittelt werden. Das ließ darauf schließen, dass die Zellen aus noch unbekanntem Grund zugrunde gingen. Diese Tatsache wurde daraufhin mehrfach beobachtet. In C) ist nach erfolgtem Verdau mit den Restriktionsenzymen SacII und EcoRI eine Bande auf Höhe des Klonierungs-PCR-Produktes und eine Bande bei ungefähr 3000 bp zu erkennen. Die erwarteten Banden wurden also bestätigt und eine Probe des Plasmids aus Kolonie 3 wurde zwecks Sequenzierung an LGC (LGC Genomics GmbH, Berlin) gegeben. Das Sequenzierungsergebnis wurde in einem Alignment mit der entsprechenden Sequenz des Klonierungs-PCR-Produktes gegenübergestellt (Abb. 43) und damit konnte gezeigt werden, dass die Sequenz des Klonierungs-PCR-Produktes in den pJET-Vektor ligiert werden konnte. Dieser Vektor war somit für weitere Untersuchungen wie z.B. eine Expression präpariert.

Klonierungs-PCR-Produkt Kolonie3	-----CATCCGCGGGTATGGCCTCCTTAAGAAAAGAACTCGGTG GTAGGAGATCTTCTAGAAGATCATCCGCGGGTATGGCCTCCTTAAGAAAAGAACTCGGTG *****
Klonierungs-PCR-Produkt Kolonie3	CGACCACGGTGTGCACTATACCATCCACGTCCGAGACACCAACCCACATTCATTTTGG CGACCACGGTGTGCACTATACCATCCACGTCCGAGACACCAACCCACATTCATTTTGG *****
Klonierungs-PCR-Produkt Kolonie3	TTAAGATAATCAACAAGAAAAAGTAGCCATCACAGTGGCCTTGCGAAAATCCAACGTCT TTAAGATAATCAACAAGAAAAAGTAGCCATCACAGTGGCCTTGCGAAAATCCAACGTCT *****
Klonierungs-PCR-Produkt Kolonie3	ATTACGTGGGTTACCAGGACACGGTCCGAGGACACCTCGTGCCAATTCGTGGCCAACG ATTACGTGGGTTACCAGGACACGGTCCGAGGACACCTCGTGCCAATTCGTGGCCAACG *****
Klonierungs-PCR-Produkt Kolonie3	AGTTAACTGCCTTGGAGCGGACTCAACTATTTCCCGGTGCAACAAAAGGACCACTGGACC AGTTAACTGCCTTGGAGCGGACTCAACTATTTCCCGGTGCAACAAAAGGACCACTGGACC *****
Klonierungs-PCR-Produkt Kolonie3	TACCGTATGGGGTGTCTTACGGCGATCTTGAGAGAGTCGCGGGTGTGGATAGGGCTAATT TACCGTATGGGGTGTCTTACGGCGATCTTGAGAGAGTCGCGGGTGTGGATAGGGCTAATT *****
Klonierungs-PCR-Produkt Kolonie3	TTAGGCTCGGTGTTGAGAATTTGTCACCCCTTGATGGATATTGTGAACGGGGCGGATTATA TTAGGCTCGGTGTTGAGAATTTGTCACCCCTTGATGGATATTGTGAACGGGGCGGATTATA *****
Klonierungs-PCR-Produkt Kolonie3	GCAAGTCCAGACAGGACTTGGCTAAGTTCGCCCTGATGGTTATCCAATGGTCGCTGAGG GCAAGTCCAGACAGGACTTGGCTAAGTTCGCCCTGATGGTTATCCAATGGTCGCTGAGG *****
Klonierungs-PCR-Produkt Kolonie3	CGACACGTTTTAAGTATATATCGGAGATTGTGTTGAAACAGGGGACACAGGAGGGGAAGA CGACACGTTTTAAGTATATATCGGAGATTGTGTTGAAACAGGGGACACAGGAGGGGAAGA *****
Klonierungs-PCR-Produkt Kolonie3	CTTTTTTGCCAGATGCTACTTTTATTAAGTTGGAGACTAACGGGGATCCTTTTCTGACC CTTTTTTGCCAGATGCTACTTTTATTAAGTTGGAGACTAACGGGGATCCTTTTCTGACC *****
Klonierungs-PCR-Produkt Kolonie3	TGATTCATAACTCGAGTCCAGGTTGTAAACCGGTGCAATCGCCCAATTTCCGGCGTGGA TGATTCATAACTCGAGTCCAGGTTGTAAACCGGTGCAATCGCCCAATTTCCGGCGTGGA *****
Klonierungs-PCR-Produkt Kolonie3	CTGATATTAAGCCACAAGTGGGTCTCCTTAAGTTTAAAACCAATCGTCCTTCTTCTGTGG CTGATATTAAGCCACAAGTGGGTCTCCTTAAGTTTAAAACCAATCGTCCTTCTTCTGTGG *****
Klonierungs-PCR-Produkt Kolonie3	AGGGTATTTTCGACAAGAATGACGATAATAATGAAGTTGATGATGCCCTTGAGGCTAGCT AGGGTATTTTCGACAAGAATGACGATAATAATGAAGTTGATGATGCCCTTGAGGCTAGCT *****
Klonierungs-PCR-Produkt Kolonie3	AAGGGAATTCACCTTTGTC----- AAGGGAATTCACCTTTGTCATCTTGCTGAAAACCTCGAGCCATCCGGAAGATCTGGCGGC *****
Klonierungs-PCR-Produkt Kolonie3	----- CGCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCCGGATGGATATGGTGTTCAAGCACAAAGTGT

**Abb. 43:** Alignment des Sequenzierungsergebnisses des pJET-Vektors aus Kolonie 3 mit der Sequenz des Klonierungs-PCR-Produktes.



## 5 Zusammenfassung

Seit der Entdeckung der RIPs und der Aufklärung der enzymatischen Aktivität dieser Proteine sind einige Reviews veröffentlicht worden. Jedoch kam es im Laufe der Zeit zu Unstimmigkeiten bezüglich der Nomenklatur und Definition mancher RIPs. Für diese Arbeit wurde eine Übersichtstabelle erstellt, die diese Unstimmigkeiten beseitigen sollte und es konnte gezeigt werden, dass aktuell 193 Typ 1 RIPs und 88 Typ 2 RIPs existieren. Daneben existieren Proteine, die den klassischen RIPs sehr ähnlich sind, aber aufgrund struktureller oder funktioneller Unterschiede nicht als solche klassifiziert werden können und dementsprechend wurde ein Vorschlag unterbreitet wie diese Proteine klassifiziert und benannt werden könnten.

Durch eine Affinitätschromatographie, bei der aufgereinigte Antikörper verwendet wurden, konnte ein Protein aus *Agrostemma githago* isoliert werden, welches in einer Echtzeit-Untersuchung eine gewisse Toxizität zeigte, die in Kombination mit dem Saponin SO1861 verstärkt wurde.

Die Aminosäuresequenzen von fünf Peptidfragmenten wurden durch MALDI-TOF MS erhalten. Dadurch war zum einen die Produktion von anti-Peptid Antikörpern möglich, mit deren Hilfe eine größere Menge Protein isoliert werden konnte. Zum anderen konnte eine Datenbank kreiert werden, um die Rohdaten der RNA-Seq auszuwerten. Darüber hinaus konnte die Masse des isolierten Proteins von 26963 Da ermittelt werden und aufgrund des Spektrums wurde die Vermutung aufgestellt, dass es sich bei dem isolierten Protein um drei Isoformen handeln könnte.

Nach der bioinformatischen Auswertung der RNA-Seq-Rohdaten wurde eine erste Konsensussequenz erhalten, die eine Länge von 247 Aminosäuren und eine theoretische Masse von 27140 Da aufzeigte. Anhand dieser Sequenz konnten fünf weitere Peptidfragmente der MALDI-TOF Untersuchung sequenziert werden.

Durch einen Vergleich der MALDI-TOF-Sequenzen mit der Konsensussequenz wurde aufgrund von Sequenzunterschieden einzelner Aminosäuren der Verdacht bestätigt, dass es sich bei dem isolierten Protein um drei Isoformen handeln musste. Außerdem wurde die erste Konsensussequenz revidiert und es wurde eine zweite Konsensussequenz erhalten mit einer Länge von 290 Aminosäuren und einer theoretischen Masse von 31900 Da. Durch *in silico* Untersuchungen konnte ein N-terminales Signalpeptid ausfindig gemacht werden, jedoch

konnte die Massedifferenz der zweiten Konsensussequenz und des isolierten Proteins nicht im Detail erklärt werden und stattdessen wurde lediglich der Verdacht aufgestellt, dass bei der Isolierung des Proteins ein Peptid proteolytisch abgespalten wurde.

Durch Vergleich der zweiten Konsensussequenz mit den Aminosäuresequenzen von anderen RIPs konnte gezeigt werden, dass die Konsensussequenz die konservierten Aminosäuren enthält, die für die enzymatische *N*-Glukosidase Aktivität verantwortlich sind. Damit wurde endgültig geklärt, dass es sich bei dem isolierten Protein um das Typ 1 RIP Agrostin handeln musste.

Durch eine RACE-PCR konnte gezeigt werden, dass die mRNA für das Agrostin nicht nur *in silico* durch Auswertung der RNA-Seq-Rohdaten aufgezeigt werden konnte, sondern auch *in vitro*.

Abschließend wurde für zukünftige Untersuchungen nicht nur die zweite, sondern auch die erste Konsensussequenz so weit präpariert, um eine Fremdexpression durchführen zu können. Dadurch soll unter anderem untersucht werden, ob es sich bei der ersten Konsensussequenz um eine Isoform des Agrostins handeln könnte.

## Summary

Since the discovery of the RIPs and the elucidation of the enzymatic activity of these proteins, some reviews have been published. However, over time, there have been inconsistencies in the nomenclature and definition of some RIPs. For this work, an overview table was created to eliminate these inconsistencies, and it was shown that there are currently 193 type 1 RIPs and 88 type 2 RIPs. In addition, there are proteins which are very similar to the classical RIPs, but can not be classified as such due to structural or functional differences and accordingly a suggestion was made how to classify and designate these proteins.

By affinity chromatography using purified antibodies, a protein of *Agrostemma githago* could be isolated, which in a real-time assay showed some toxicity enhanced in combination with the saponin SO1861.

The amino acid sequences of five peptide fragments were obtained by MALDI-TOF MS. Thus, on the one hand, the production of anti-peptide antibodies was possible, by means of which a larger amount of protein could be isolated. On the other hand, a database could be created to evaluate the raw data of the RNA-Seq. In addition, the mass of the isolated protein of 26963 Da could be determined and the spectrum suggested that the isolated protein could be three isoforms.

After the bioinformatic evaluation of the RNA-Seq raw data, a first consensus sequence was obtained, which showed a length of 247 amino acids and a theoretical mass of 27140 Da. Using this sequence, five additional peptide fragments of the MALDI-TOF investigations could be sequenced.

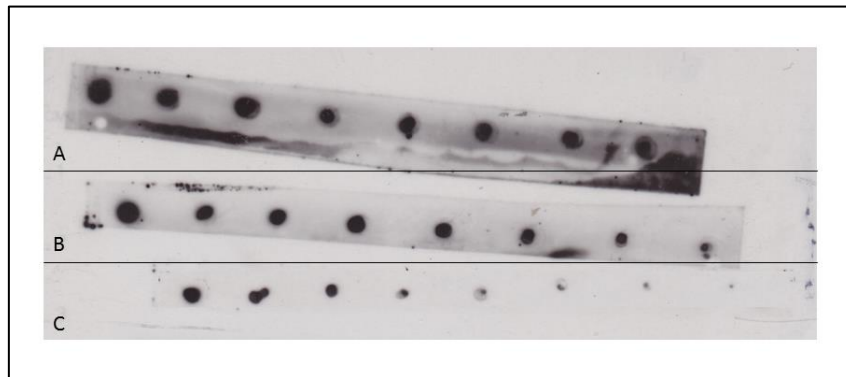
By comparing the MALDI-TOF sequences with the consensus sequence, the suspicion that the isolated protein had to be three isoforms was confirmed on the basis of sequence differences of individual amino acids. In addition, the first consensus sequence was revised and a second consensus sequence was obtained with a length of 290 amino acids and a theoretical mass of 31900 Da. An N-terminal signal peptide could be detected by *in silico* investigations, but the mass difference between the second consensus sequence and the isolated protein could not be explained in detail. Instead, only the suspicion that a peptide was proteolytically cleaved during the isolation of the protein could be explained.

By comparing the second consensus sequence with the amino acid sequences of other RIPs, it was shown that the consensus sequence contains the conserved amino acids responsible for the enzymatic *N*-glucosidase activity. This finally clarified that the isolated protein had to be the type 1 RIP agrostin.

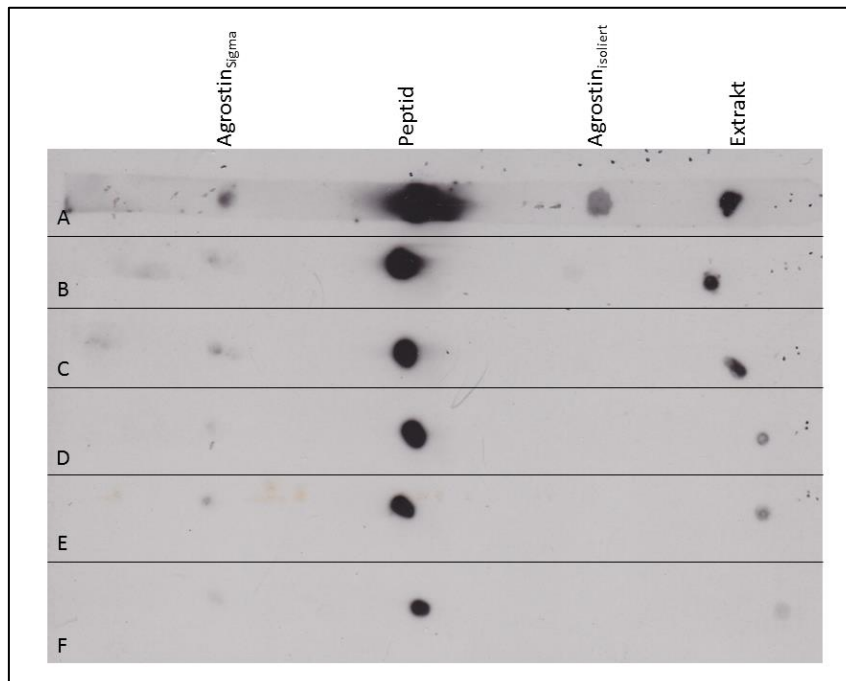
By means of a RACE PCR, it was shown that the mRNA for the agrostin could be demonstrated not only *in silico* by evaluation of the RNA-Seq raw data but also *in vitro*.

Finally, for future investigations, not only the second, but also the first consensus sequence was prepared so far as to be able to carry out an expression. The aim is to investigate whether the first consensus sequence could be an isoform of agrostin.

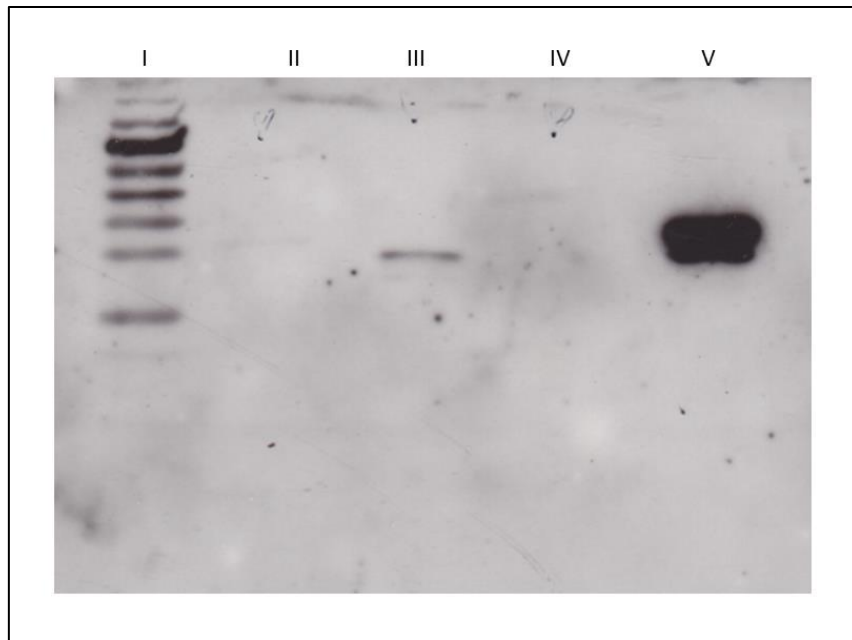
## 6 Anhang



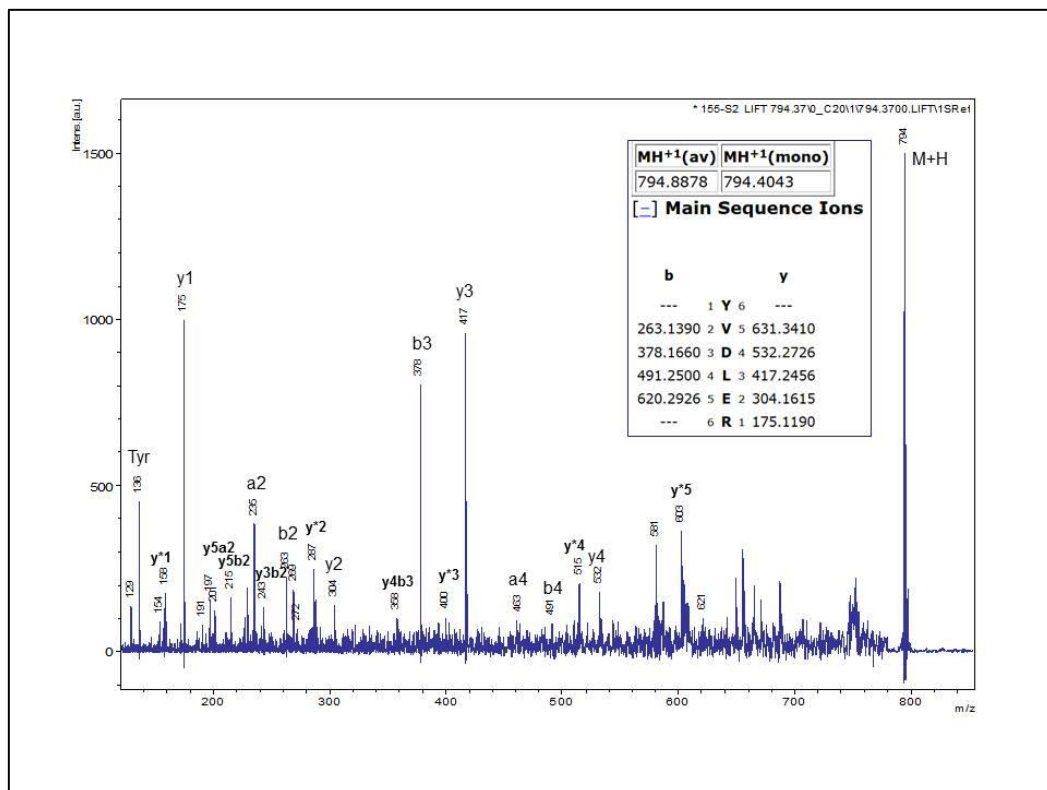
**Abb. A1:** Dot Blot einer Verdünnungsreihe von Agrostin<sub>Sigma</sub> mit drei unterschiedlichen Verdünnungen der anti-Agrostine Ak. Ausgehend von 1 µg Agrostin<sub>Sigma</sub> sind auf jedem Streifen von links nach rechts folgende Verdünnungen punktuell aufgetragen: 1:10, 1:50, 1:100, 1:200, 1:300, 1:500, 1:750, 1:1000. Verdünnung anti-Agrostine Ak: A: 1:500, B: 1:2000, C: 1:5000; Verdünnung Sekundärantikörper: 1:2000; Inkubationszeit anti-Agrostine Ak: 30 Min.; Inkubationszeit Sekundärantikörper: 30 Min.; Belichtungszeit des Films: 30 s.



**Abb. A2:** Dot Blot von Agrostin<sub>Sigma</sub>, Peptid, isoliertes Agrostin und Extrakt mit unterschiedlichen Verdünnungen der anti-Peptid Ak. Auftragsmenge von Agrostin<sub>Sigma</sub>, Peptid und Agrostin<sub>isoliert</sub>: 1 µg; Auftragsmenge vom Extrakt: 5 µL; Verdünnung anti-Peptid Ak: A: 1:100, B: 1:500, C: 1:1000, D: 1:2000, E: 1:5000, F: 1:10000; Verdünnung Sekundärantikörper: 1:2000; Inkubationszeit anti-Peptid Ak: 30 Min.; Inkubationszeit Sekundärantikörper: 1:2000; Belichtungszeit des Films: 30 s.



**Abb. A3:** Western Blot von anti-Saporin Ak mit diversen Proteinen. I: Marker; II: Gelonin (1 mg/mL); III: Agrostin (1 mg/mL); IV: Ricin A-Kette (1 mg/mL); V: Saporin (1 mg/mL). Verdünnung anti-Saporin Ak: 1:2000; Verdünnung Sekundärantikörper: 1:2000; Inkubationszeit anti-Saporin Ak: 30 Min.; Inkubationszeit Sekundärantikörper: 30 Min.; Belichtungszeit des Films: 30 s.



**Abb. A4:** MS/MS-Spektrum des Peptidfragmentes  $m/z = 794.37$ , Trypsin-Verdau. Sequenz: YVD(I/L)ER.

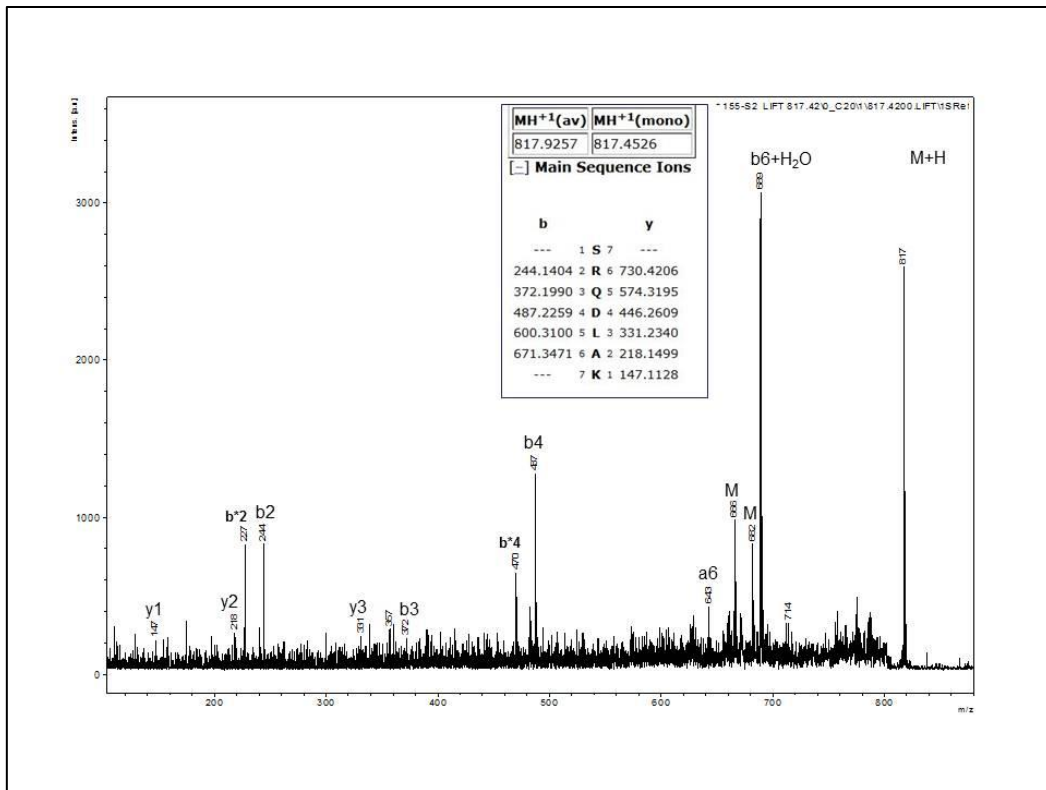


Abb. A5: MS/MS-Spektrum des Peptidfragmentes m/z = 817.44, Trypsin-Verdau. Sequenz: SRQD(I/L)AK.

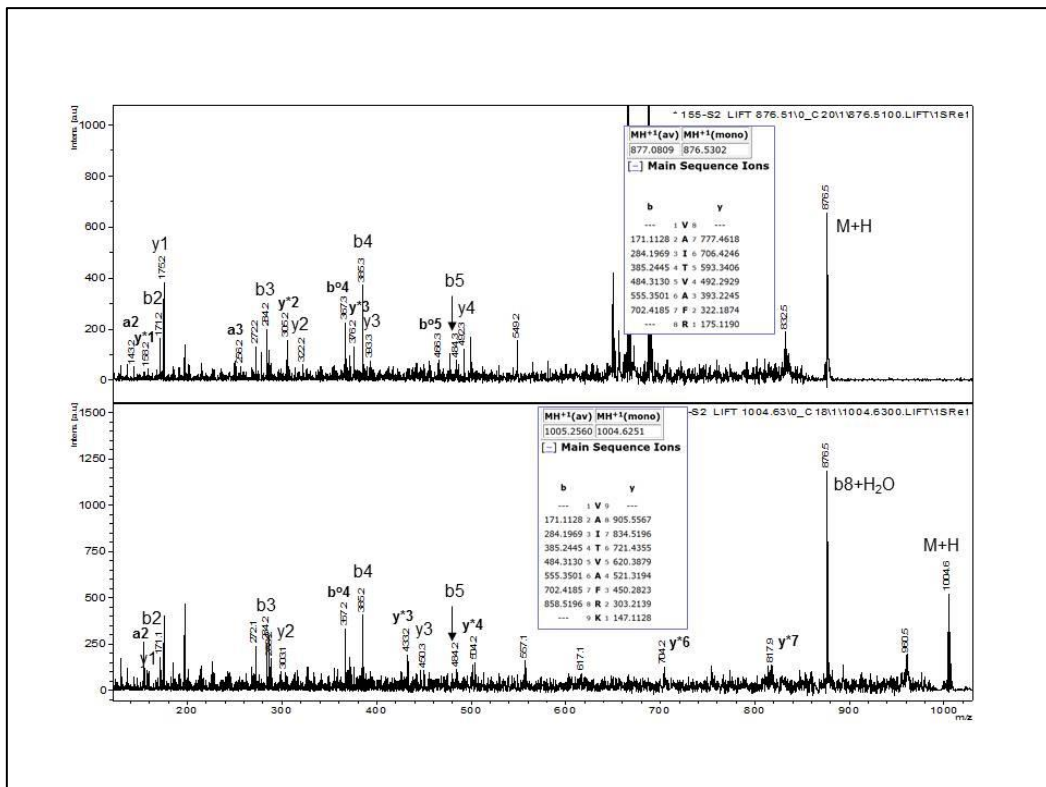


Abb. A6: MS/MS-Spektren der Peptidfragmente m/z = 876.51 (oberes Spektrum) und m/z = 1004.63 (unteres Spektrum), Trypsin-Verdau. Sequenzen: VA(I/L)TVAFR (876.51), VA(I/L)TVAFRK (1004.63).

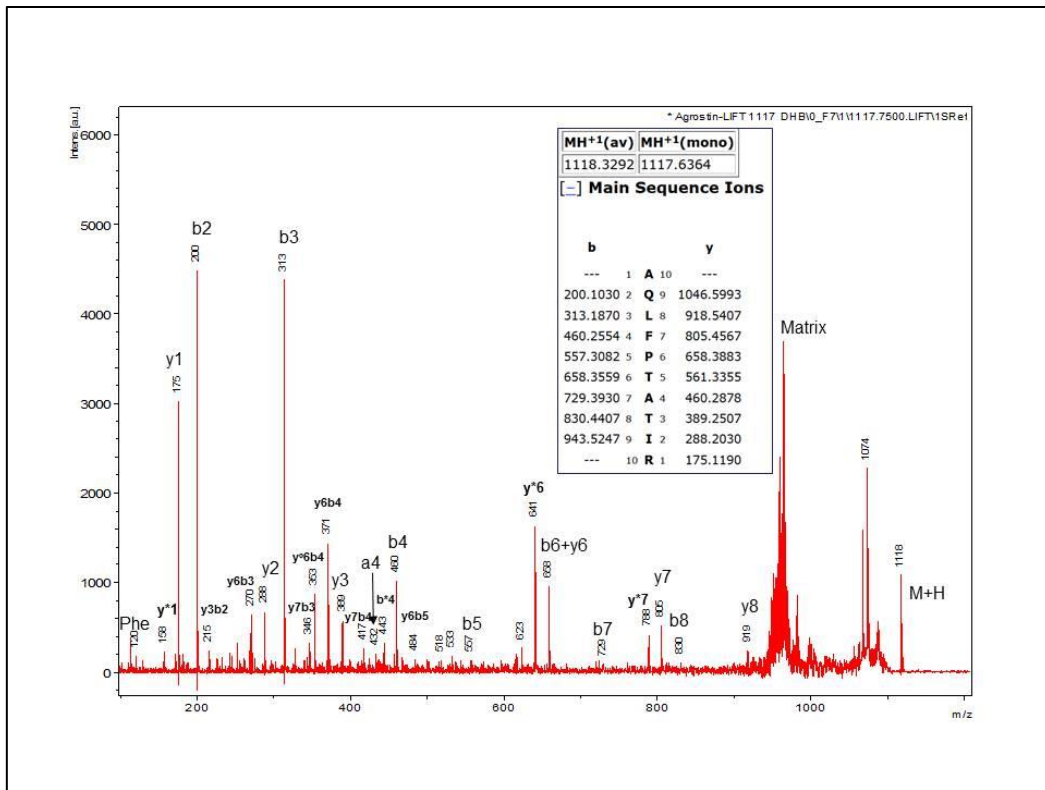


Abb. A7: MS/MS-Spektrum des Peptidfragmentes m/z = 1117.65, Trypsin-Verdau. Sequenz: AQ(I/L)FPTAT(I/L)R.

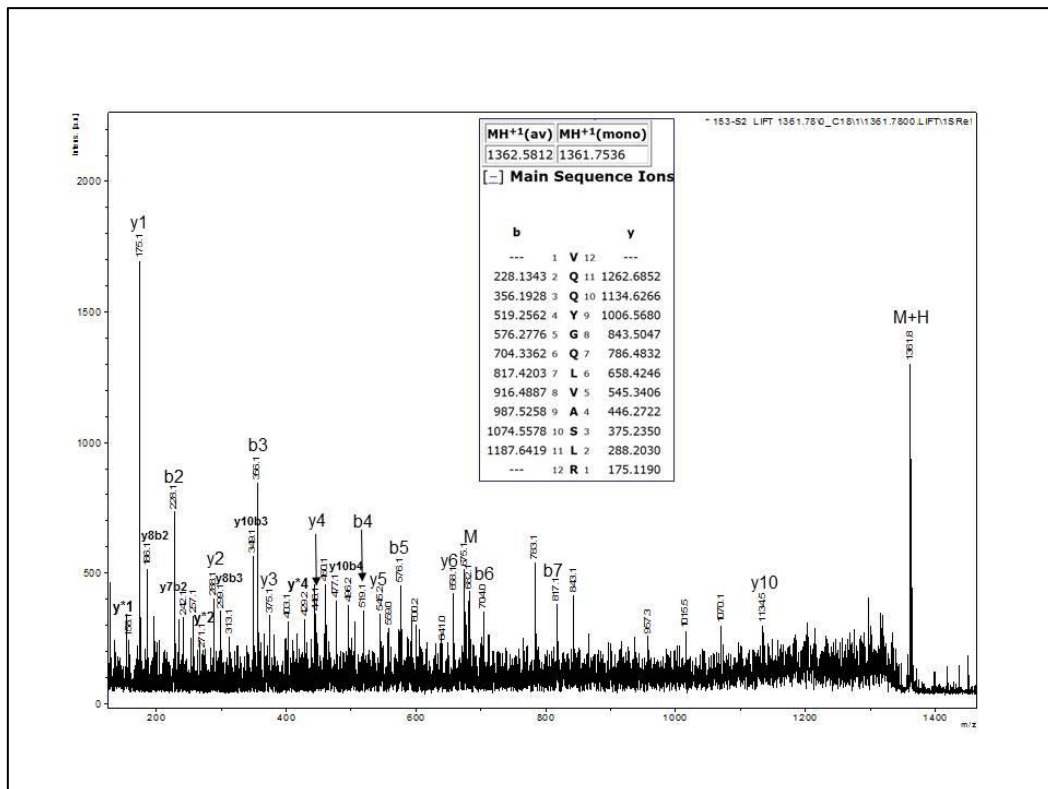


Abb. A8: MS/MS-Spektrum des Peptidfragmentes m/z = 1361.78, Trypsin-Verdau. Sequenz: VQQYQG(I/L)VAS(I/L)R.

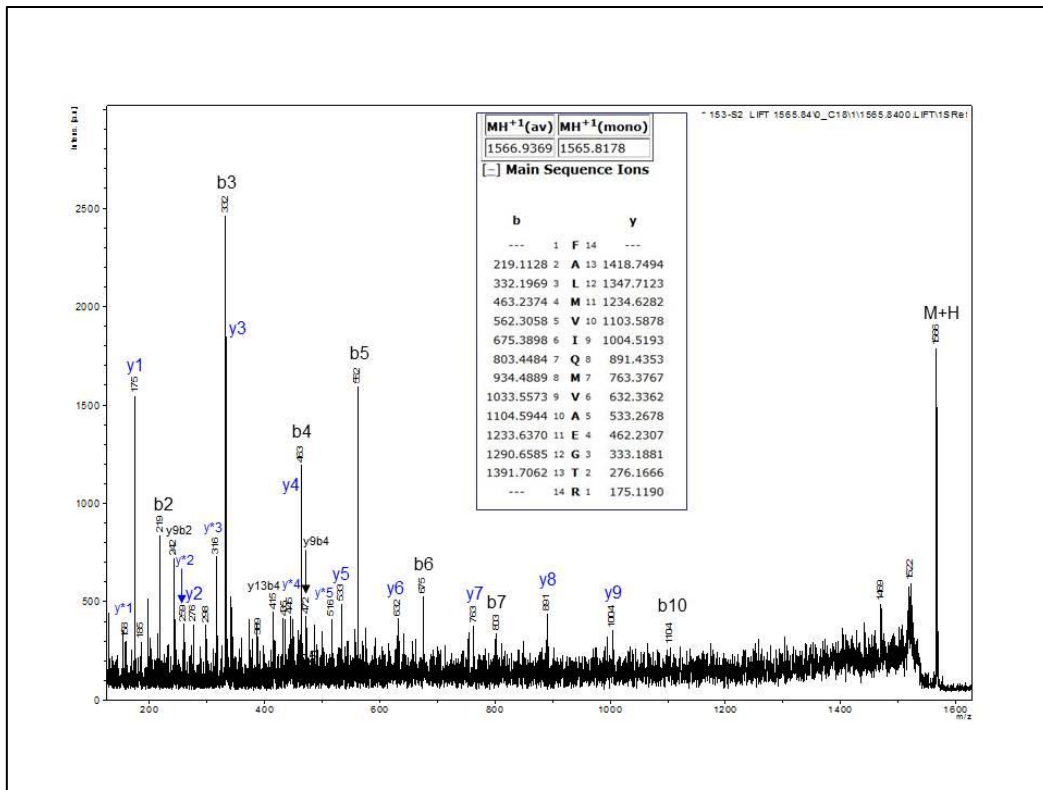


Abb. A9: MS/MS-Spektrum des Peptidfragmentes  $m/z = 1565.85$ , Trypsin-Verdau. Sequenz: FA(I/L)MV(I/L)QMVAEGTR.

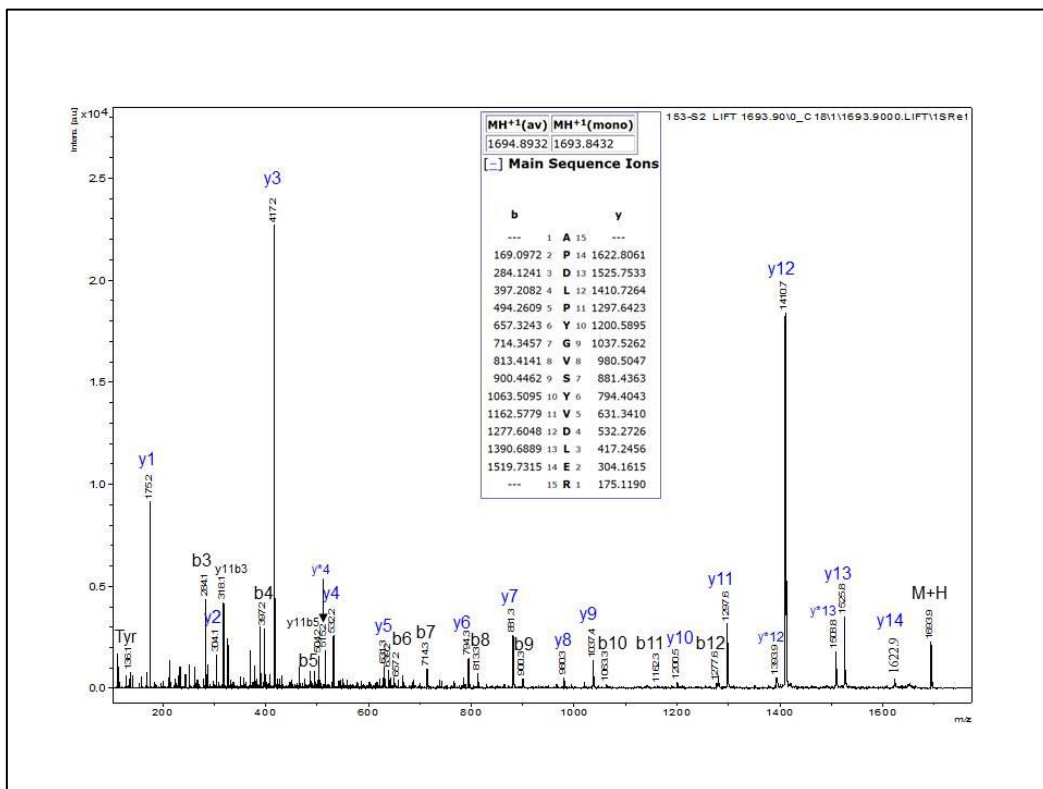
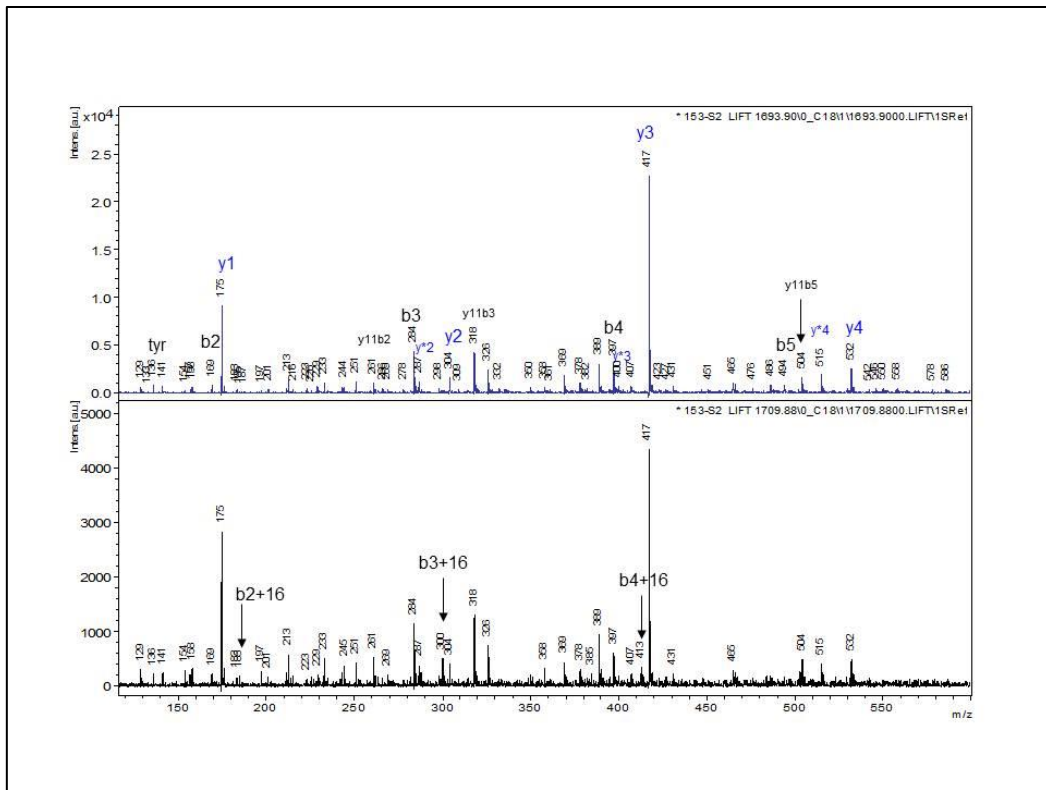
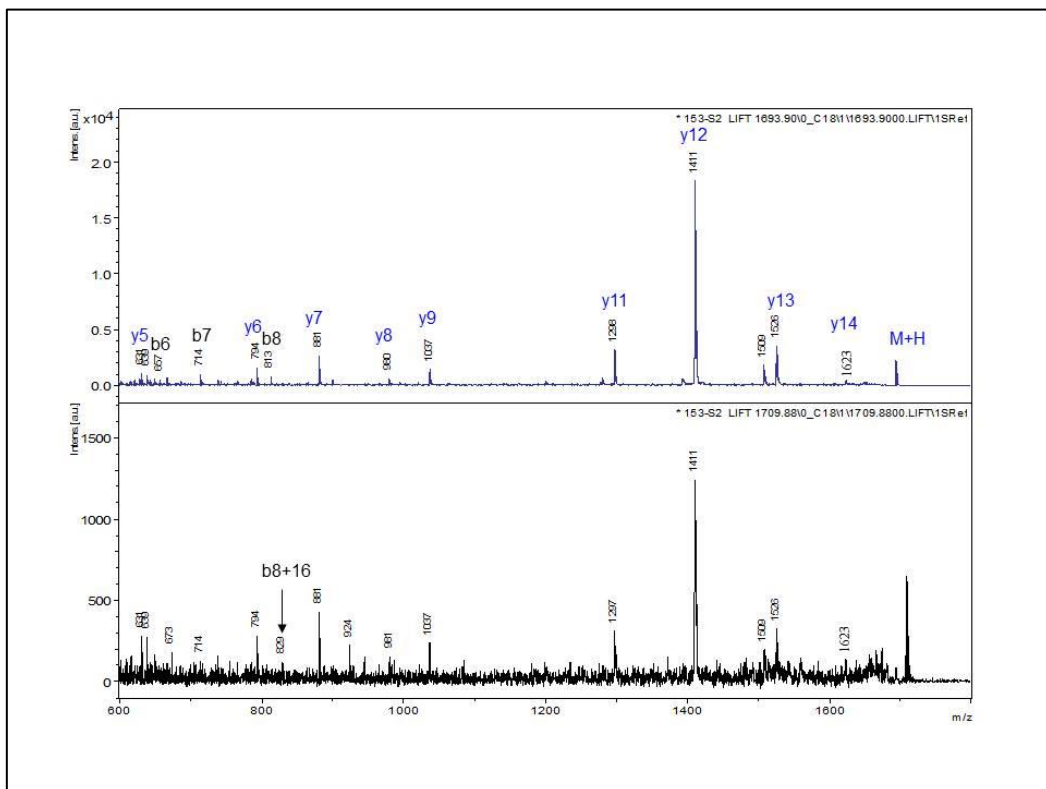


Abb. A10: MS/MS-Spektrum des Peptidfragmentes  $m/z = 1693.88$ , Trypsin-Verdau. Sequenz: APD(I/L)PYGVSYVD(I/L)ER.

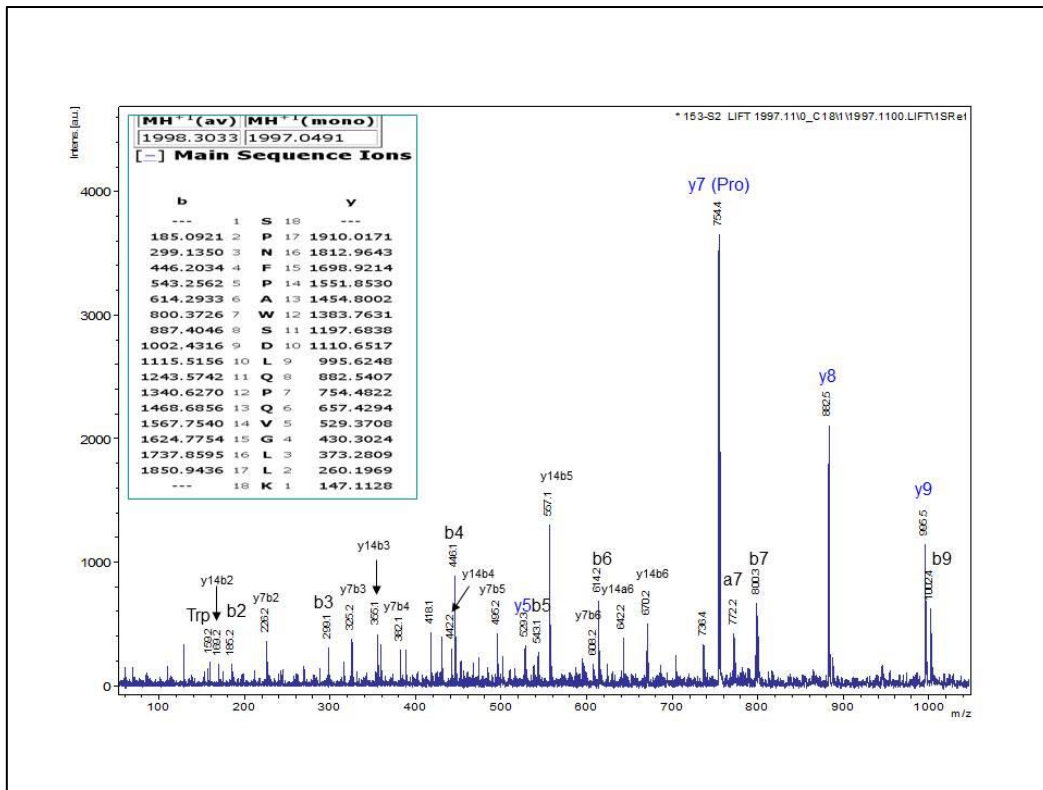




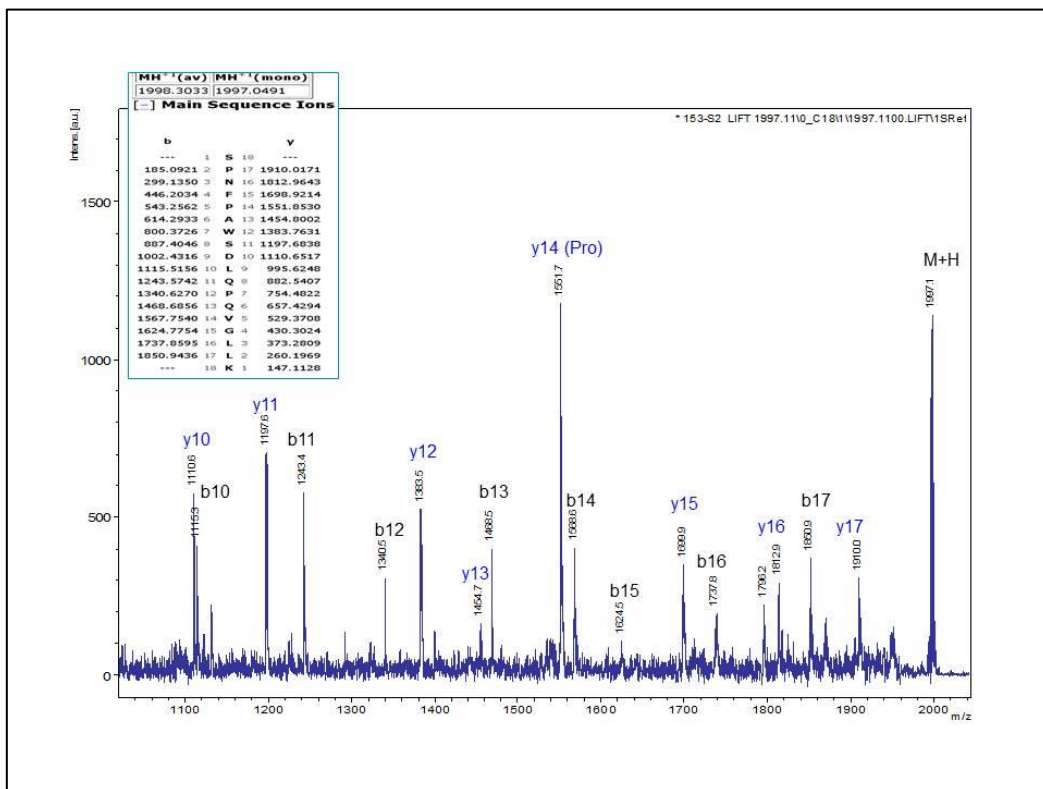
**Abb. A11:** Vergleich der MS/MS-Spektren der Peptidfragmente  $m/z = 1693.88$  und  $m/z = 1709.87$ , Teil 1. Differens der beiden Fragmente: 16, beginnend vom N-Terminus. Alanin (A)  $\rightarrow$  Serin (S).



**Abb. A12:** Vergleich der MS/MS-Spektren der Peptidfragmente  $m/z = 1693.88$  und  $m/z = 1709.87$ , Teil 2. Differens der beiden Fragmente: 16, beginnend vom N-Terminus. Alanin (A)  $\rightarrow$  Serin (S).



**Abb. A13:** MS/MS-Spektrum des Peptidfragmentes m/z = 1997.12, Trypsin-Verdau, Teil 1 (bis 1050). Sequenz: SPNFPAWS(I/L)QPQVG(I/L)(I/L)K.



**Abb. A14:** MS/MS-Spektrum des Peptidfragmentes m/z = 1997.12, Trypsin-Verdau, Teil 2 (ab 1050). Sequenz: SPNFPAWS(I/L)QPQVG(I/L)(I/L)K.

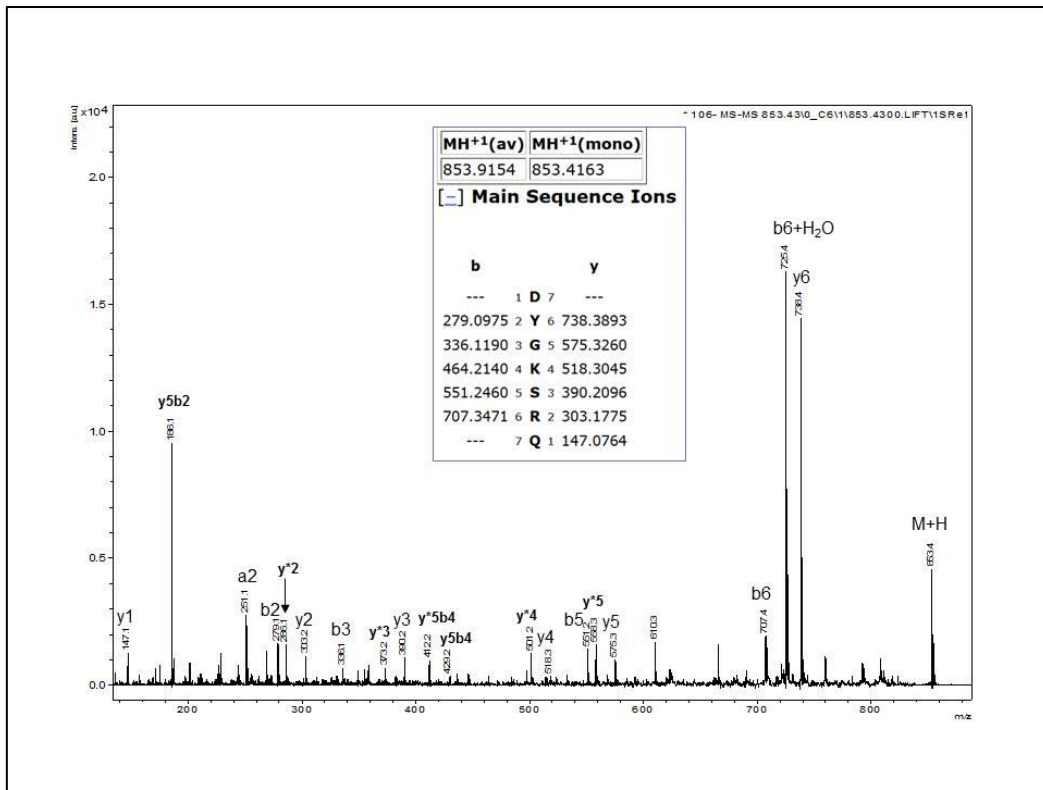


Abb. A15: MS/MS-Spektrum des Peptidfragmentes m/z = 853.42, AspN-Verdau. Sequenz: DYGKSQRQ.

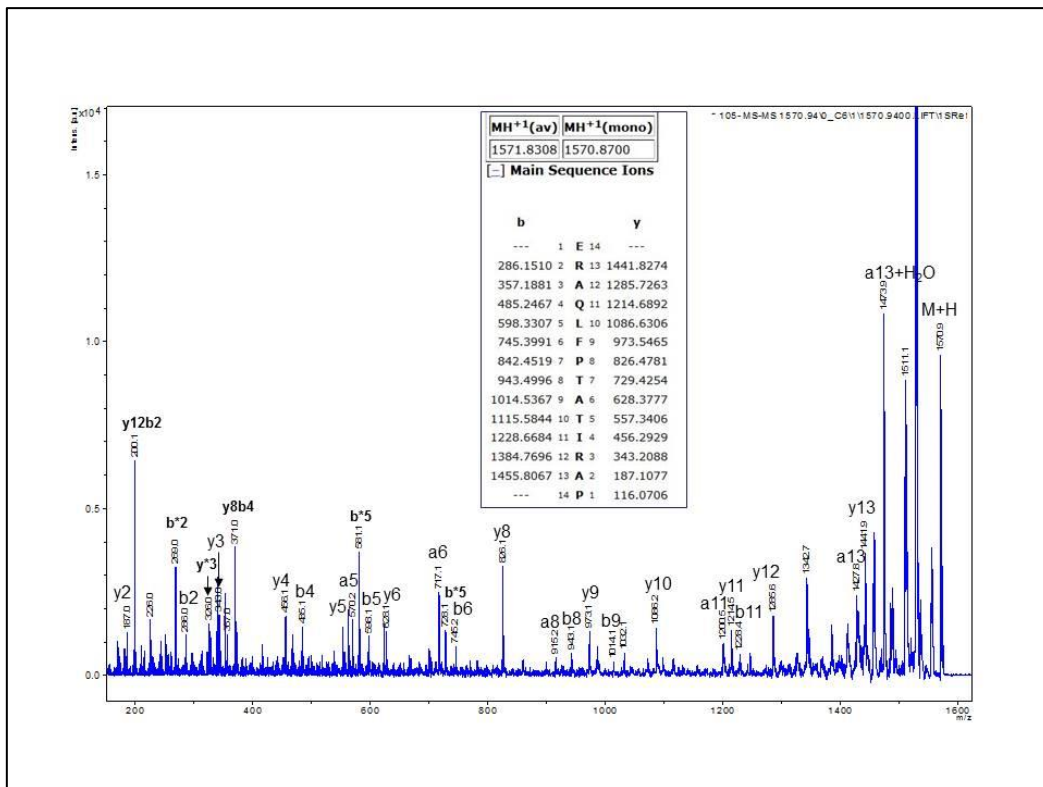
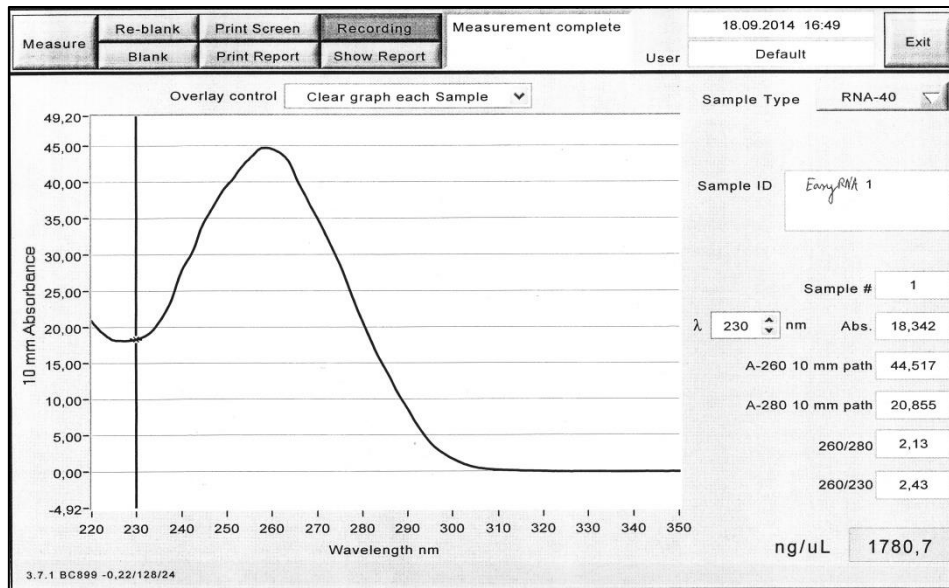
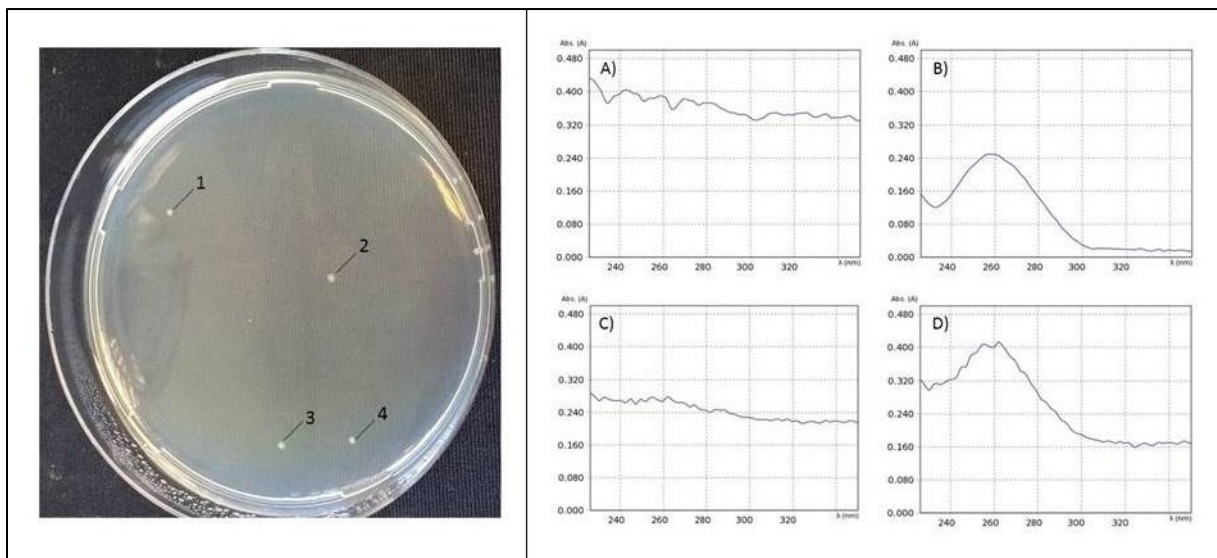


Abb. A16: MS/MS-Spektrum des Peptidfragmentes m/z = 1570.91, AspN-Verdau. Sequenz: ERAQ(I/L)FPTAT(I/L)RAP. Peaks bei 199 (y<sub>8</sub>b<sub>2</sub>) und 270 (y<sub>8</sub>b<sub>3</sub>) sind vorhanden, aber nicht abgebildet.



**Abb. A17:** Absorptionskurve der RNA-Probe I aus Kap. 4.4.2 für die Konzentrationsbestimmung.  $c = 1780 \text{ ng}/\mu\text{L}$ .



**Abb. A18:** Kolonien der Klone nach Ligation des Klonierungs-PCR-Produktes in den pJET-Vektor. Linke Hälfte: Agarplatte mit den Kolonien 1 – 4. Rechte Seite: Absorptionsspektren zur Konzentrationsbestimmung nach Plasmid-Aufreinigung der einzelnen Kolonien; A) Kolonie 1; B) Kolonie 2; C) Kolonie 3; D) Kolonie 4; lediglich von Kolonie 2 und Kolonie 4 konnte die Konzentration bestimmt werden:  $c_{(\text{Kolonie 2})} = 123 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ;  $c_{(\text{Kolonie 4})} = 200 \text{ ng}/\mu\text{L}$ .

## 7 Literaturverzeichnis

1. Endo, Y.; Mitsui, K.; Motizuki, M.; Tsurugi, K. *J Biol Chem* **1987**, *262*, 5908-5912.
2. Barbieri, L.; Valbonesi, P.; Bondioli, M.; Alvarez, M.L.; Dal Monte, P.; Landini, M.P.; Stirpe, F. *FEBS Lett* **2001**, *505*, 196-197.
3. Kurinov, I.V.; Rajamohan, F.; Venkatachalam, T.K.; Uckun, F.M. *Protein Sci* **1999**, *8*, 2399-2405.
4. Walsh, T.A.; Morgan, A.E.; Hey, T.D. *J Biol Chem* **1991**, *266*, 23422-23427.
5. Reinbothe, S.; Reinbothe, C.; Lehmann, J.; Becker, W.; Apel, K.; Parthier, B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, *91*, 7012-7016.
6. Rustgi, S.; Pollmann, S.; Buhr, F.; Springer, A.; Reinbothe, C.; von Wettstein, D.; Reinbothe, S. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**, *111*, 14181-14186.
7. Girbés, J.T.; Ferreras, J.M.; Arias, F.J.; Stirpe, F. *Mini Rev Med Chem* **2004**, *4*, 461-476.
8. Stirpe, F. *Toxicon* **2004**, *44*, 371-383.
9. Zhang, J.-S.; Liu, W.-Y. *Prog Biochem Biophys* **1994**, *21*, 113-117.
10. Zhou, K.-J.; Fu, Z.-J.; Chen, M.-H.; Qiu, W.; Pan, K.-Z. *Chin J Struct Chem* **1997**, *21*, 23-27.
11. Stirpe, F. *Toxicon* **2013**, *67*, 12-16.
12. Jiang, S.-Y.; Ramamoorthy, R.; Bhalla, R.; Luan, H.-F.; Venkatesh, P.N.; Cai, M.; Ramachandran, S. *Plant Mol Biol* **2008**, *67*, 603-614.
13. Liu, R.S.; Yang, J.H.; Liu, W.Y. *Eur J Biochem* **2002**, *269*, 4746-4752.
14. Wang, H.X.; Ng, T.B. *Biochem Biophys Res Commun* **2001**, *288*, 718-721.
15. Lam, S.K.; Ng, T.B. *Arch Biochem Biophys* **2001**, *393*, 271-280.
16. Wang, H.X.; Ng, T.B. *Biochem Cell Biol* **2000**, *78*, 699-702.
17. Lam, S.K.; Ng, T.B. *Biochem Biophys Res Commun* **2001**, *285*, 1071-1075.
18. Wong, J.H.; Wang, H.X.; Ng, T.B. *Appl Microbiol Biotechnol* **2008**, *81*, 669-674.
19. Yao, Q.Z.; Yu, M.M.; Ooi, L.S.; Ng, T.B.; Chang, S.T.; Sun, S.S.; Ooi, V.E. *J Agric Food Chem* **1998**, *46*, 788-792.
20. Brown, J.E.; Ussery, M.A.; Leppla, S.H.; Rothman, S.W. *FEBS Lett* **1980**, *117*, 84-88.
21. Hauf, N.; Chakraborty, T. *J Immunol* **2003**, *170*, 2074-2082.
22. Shih, N.R.; McDonald, K.A.; Jackman, A.P.; Girbés, T.; Iglesias, R. *Plant Science* **1997**, *130*, 145-150.
23. Li, X.D.; Chen, W.F.; Liu, W.Y.; Wang, G.H. *Protein Expr Purif* **1997**, *10*, 27-31.

24. Ruggiero, A.; Chambery, A.; Di Maro, A.; Mastroianni, A.; Parente, A.; Berisio, R. *Protein Pept Lett* **2007**, *14*, 407-409.
25. Lombard, S.; Helmy, M.E.; Pieroni, G. *Biochem J* **2001**, *358*, 773-781.
26. Barbieri, L.; Battelli, M.G.; Stirpe, F. *Biochim Biophys Acta* **1993**, *1154*, 237-282.
27. Stirpe, F.; Barbieri, L.; Gorini, P.; Valbonesi, P.; Bolognesi, A.; Polito, L. *FEBS Lett* **1996**, *382*, 309-312.
28. Jiang, S.Y.; Bhalla, R.; Ramamoorthy, R.; Luan, H.F.; Venkatesh, P.N.; Cai, M.; Ramachandran, S. *Transgenic Res* **2012**, *21*, 785-795.
29. Ferreras, J.M.; Citores, L.; Iglesias, R.; Jiménez, P.; Girbés, T. Sambucus Ribosome-Inactivating Proteins and Lectins. In *Toxic Plant Proteins*, Lord, J.M.; Hartley, M.R., Eds. Springer Berlin Heidelberg: 2010; Vol. 18, pp 107-131.
30. Byers, V.S.; Levin, A.S.; Waites, L.A.; Starrett, B.A.; Mayer, R.A.; Clegg, J.A.; Price, M.R.; Robins, R.A.; Delaney, M.; Baldwin, R.W. *Aids* **1990**, *4*, 1189-1196.
31. Fracasso, G.; Bellisola, G.; Castelletti, D.; Tridente, G.; Colombatti, M. *Mini Rev Med Chem* **2004**, *4*, 545-562.
32. Kreitman, R.J. *Aaps j* **2006**, *8*, E532-551.
33. Gilibert-Oriol, R.; Weng, A.; von Mallinckrodt, B.; Melzig, M.F.; Fuchs, H.; Thakur, M. *Curr Pharm Des* **2014**, *20*, 6584-6643.
34. Hebestreit, P.; Weng, A.; Bachran, C.; Fuchs, H.; Melzig, M.F. *Toxicol* **2006**, *47*, 330-335.
35. Heisler, I.; Sutherland, M.; Bachran, C.; Hebestreit, P.; Schnitger, A.; Melzig, M.F.; Fuchs, H. *J Control Release* **2005**, *106*, 123-137.
36. Bachran, C.; Durkop, H.; Sutherland, M.; Bachran, D.; Muller, C.; Weng, A.; Melzig, M.F.; Fuchs, H. *J Immunother* **2009**, *32*, 713-725.
37. Bottger, S.; Westhof, E.; Siems, K.; Melzig, M.F. *Toxicol* **2013**, *73*, 144-150.
38. Weng, A.; Jenett-Siems, K.; Gorick, C.; Melzig, M.F. *J Pharm Pharmacol* **2008**, *60*, 925-930.
39. Weng, A.; Bachran, C.; Fuchs, H.; Melzig, M.F. *Chem Biol Interact* **2008**, *176*, 204-211.
40. Weng, A.; Thakur, M.; von Mallinckrodt, B.; Beceren-Braun, F.; Gilibert-Oriol, R.; Wiesner, B.; Eichhorst, J.; Bottger, S.; Melzig, M.F.; Fuchs, H. *J Control Release* **2012**, *164*, 74-86.
41. Nielsen, K.; Boston, R.S. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **2001**, *52*, 785-816.

42. Peumans, W.J.; Hao, Q.; Van Damme, E.J. *FASEB J* **2001**, *15*, 1493-1506.
43. Stirpe, F.; Battelli, M.G. *Cell Mol Life Sci* **2006**, *63*, 1850-1866.
44. Puri, M.; Kaur, I.; Perugini, M.A.; Gupta, R.C. *Drug Discov Today* **2012**, *17*, 774-783.
45. Stirpe, F.; Gasperi-Campani, A.; Barbieri, L.; Falasca, A.; Abbondanza, A.; Stevens, W.A. *Biochem J* **1983**, *216*, 617-625.
46. Pelosi, E.; Lubelli, C.; Polito, L.; Barbieri, L.; Bolognesi, A.; Stirpe, F. *Toxicon* **2005**, *46*, 658-663.
47. Schrot, J.; Weng, A.; Melzig, M.F. *Toxins (Basel)* **2015**, *7*, 1556-1615.
48. Kwon, S.Y.; An, C.S.; Liu, J.R.; Kwak, S.S.; Lee, H.S.; Kim, J.K.; Paek, K.H. *Mol Cells* **2000**, *10*, 8-12.
49. Begam, M.; Kumar, S.; Roy, S.; Campanella, J.J.; Kapoor, H.C. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 2441-2449.
50. Funatsu, G.; Islam, M.R.; Minami, Y.; Sung-Sil, K.; Kimura, M. *Biochimie* **1991**, *73*, 1157-1161.
51. de Virgilio, M.; Lombardi, A.; Caliandro, R.; Fabbrini, M.S. *Toxins (Basel)* **2010**, *2*, 2699-2737.
52. Kawade, K.; Ishizaki, T.; Masuda, K. *Physiol Plant* **2008**, *134*, 270-281.
53. de Benito, F.M.; Citores, L.; Iglesias, R.; Ferreras, J.M.; Soriano, F.; Arias, J.; Mendez, E.; Girbes, T. *FEBS Lett* **1995**, *360*, 299-302.
54. Citores, L.; de Benito, F.M.; Iglesias, R.; Ferreras, J.M.; Argueso, P.; Jimenez, P.; Mendez, E.; Girbes, T. *Planta* **1998**, *204*, 310-319.
55. Pascal, J.M.; Day, P.J.; Monzingo, A.F.; Ernst, S.R.; Robertus, J.D.; Iglesias, R.; Perez, Y.; Ferreras, J.M.; Citores, L.; Girbes, T. *Proteins* **2001**, *43*, 319-326.
56. Citores, L.; De Benito, F.M.; Iglesias, R.; Ferreras, J.M.; Argueso, P.; Jimenez, P.; Testera, A.; Camafeita, E.; Mendez, E.; Girbes, T. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **1997**, *43*, 485-499.
57. Iglesias, R.; Citores, L.; Ferreras, J.M.; Perez, Y.; Jimenez, P.; Gayoso, M.J.; Olsnes, S.; Tamburino, R.; Di Maro, A.; Parente, A., *et al.* *Biochimie* **2010**, *92*, 71-80.
58. Benitez, J.; Rojo, M.A.; Munoz, R.; Ferreras, J.M.; Jiménez, P.; Girbés, T. *Lett Drug Des Discov* **2004**, *1*, 361-367.
59. Rojo, M.A.; Citores, L.; Arias, F.J.; Ferreras, J.M.; Jimenez, P.; Girbes, T. *Int J Biochem Cell Biol* **2003**, *35*, 1061-1065.

60. Citores, L.; Rojo, M.A.; Jimenez, P.; Ferreras, J.M.; Iglesias, R.; Aranguéz, I.; Girbes, T. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 857-864.
61. Girbés, J.T.; De Benito, F.M.; Citores, L.; Iglesias, R.; Ferreras, J.M. Patent No. ES 2095190 A1, 1997.
62. de Benito, F.M.; Iglesias, R.; Ferreras, J.M.; Citores, L.; Camafeita, E.; Mendez, E.; Girbes, T. *FEBS Lett* **1998**, *428*, 75-79.
63. de Benito, F.M.; Citores, L.; Iglesias, R.; Ferreras, J.M.; Camafeita, E.; Mendez, E.; Girbes, T. *FEBS Lett* **1997**, *413*, 85-91.
64. Girbés, J.T.; Citores, L.; Ferreras, J.M.; Rojo, M.A.; Iglesias, R.; Muñoz, R.; Arias, F.J.; Calonge, M.; García, J.R.; Mendez, E. *Plant Mol Biol* **1993**, *22*, 1181-1186.
65. Van Damme, E.J.; Barre, A.; Rouge, P.; Van Leuven, F.; Peumans, W.J. *Eur J Biochem* **1996**, *237*, 505-513.
66. Battelli, M.G.; Citores, L.; Buonamici, L.; Ferreras, J.M.; de Benito, F.M.; Stirpe, F.; Girbes, T. *Arch Toxicol* **1997**, *71*, 360-364.
67. Citores, L.; de Benito, F.M.; Iglesias, R.; Ferreras, J.M.; Jiménez, P.; Argüeso, P.; Farias, G.; Méndez, E.; Girbés, T. *J Exp Bot* **1996**, *47*, 1577-1585.
68. Girbés, T.; Citores, L.; de Benito, F.M.; Iglesias, R.; Ferreras, J.M. *Biochem J* **1996**, *315*, 343-344.
69. Van Damme, E.J.; Roy, S.; Barre, A.; Rouge, P.; Van Leuven, F.; Peumans, W.J. *Plant J* **1997**, *12*, 1251-1260.
70. Ferreras, J.M.; Citores, L.; de Benito, F.M.; Arias, F.J.; Rojo, M.A.; Muñoz, R.; Iglesias, R. *Current Topics in Phytochemistry* **2000**, *3*, 113-128.
71. Citores, L.; Iglesias, R.; Muñoz, R.; Ferreras, J.M.; Jimenez, P.; Girbes, T. *J Exp Bot* **1994**, *45*, 513-516.
72. Broekaert, W.F.; Nsimba-Lubaki, M.; Peeters, B.; Peumans, W.J. *Biochem J* **1984**, *221*, 163-169.
73. Van Damme, E.J.; Roy, S.; Barre, A.; Citores, L.; Mostafapous, K.; Rouge, P.; Van Leuven, F.; Girbes, T.; Goldstein, I.J.; Peumans, W.J. *Eur J Biochem* **1997**, *245*, 648-655.
74. Van Damme, E.J.; Barre, A.; Rouge, P.; Van Leuven, F.; Peumans, W.J. *Eur J Biochem* **1996**, *235*, 128-137.



75. Shahidi-Noghabi, S.; Van Damme, E.J.; De Vos, W.H.; Smagghe, G. *Arch Insect Biochem Physiol* **2011**, *76*, 211-222.
76. Chen, Y.; Peumans, W.J.; Van Damme, E.J. *FEBS Lett* **2002**, *516*, 27-30.
77. Peumans, W.J.; Roy, S.; Barre, A.; Rouge, P.; van Leuven, F.; van Damme, E.J. *FEBS Lett* **1998**, *425*, 35-39.
78. Karpova, I.S.; Korets'ka, N.V.; Pal'chykovs'ka, L.H.; Nehruts'ka, V.V. *Ukr Biokhim Zh* **2007**, *79*, 145-152.
79. Ferreras, J.M.; Citores, L.; Iglesias, R.; Jimenez, P.; Girbes, T. *Toxins (Basel)* **2011**, *3*, 420-441.
80. Battelli, M.G.; Barbieri, L.; Bolognesi, A.; Buonamici, L.; Valbonesi, P.; Polito, L.; Van Damme, E.J.; Peumans, W.J.; Stirpe, F. *FEBS Lett* **1997**, *408*, 355-359.
81. Van Damme, E.J.; Barre, A.; Rouge, P.; Van Leuven, F.; Peumans, W.J. *J Biol Chem* **1997**, *272*, 8353-8360.
82. Kaku, H.; Peumans, W.J.; Goldstein, I.J. *Arch Biochem Biophys* **1990**, *277*, 255-262.
83. Peumans, W.J.; Kellens, J.T.; Allen, A.K.; Van Damme, E.J. *Carbohydr Res* **1991**, *213*, 7-17.
84. Mach, L.; Scherf, W.; Ammann, M.; Poetsch, J.; Bertsch, W.; Marz, L.; Glossl, J. *Biochem J* **1991**, *278 ( Pt 3)*, 667-671.
85. Mach, L.; Kerschbaumer, R.; Schwihla, H.; Glossl, J. *Biochem J* **1996**, *315 ( Pt 3)*, 1061.
86. Nsimba-Lubaki, M.; Peumans, W.J.; Allen, A.K. *Planta* **1986**, *168*, 113-118.
87. Rojo, M.A.; Citores, L.; Jimenez, P.; Ferreras, J.M.; Arias, F.J.; Mendez, E.; Girbes, T. *Protein Pept Lett* **2003**, *10*, 287-293.
88. Tazaki, K.; Shibuya, N. *Plant Cell Physiol* **1989**, *30*, 899-903.
89. Kaku, H.; Tanaka, Y.; Tazaki, K.; Minami, E.; Mizuno, H.; Shibuya, N. *J Biol Chem* **1996**, *271*, 1480-1485.
90. Rojo, M.A.; Kaku, H.; Ishii-Minami, N.; Minami, E.; Yato, M.; Hisajima, S.; Yamaguchi, T.; Shibuya, N. *J Biochem* **2004**, *135*, 509-516.
91. Rojo, M.A.; Yato, M.; Ishii-Minami, N.; Minami, E.; Kaku, H.; Citores, L.; Girbes, T.; Shibuya, N. *Arch Biochem Biophys* **1997**, *340*, 185-194.
92. Rippmann, J.F.; Michalowski, C.B.; Nelson, D.E.; Bohnert, H.J. *Plant Mol Biol* **1997**, *35*, 701-709.

93. Rinderle, S.J.; Goldstein, I.J.; Matta, K.L.; Ratcliffe, R.M. *J Biol Chem* **1989**, *264*, 16123-16131.
94. Rinderle, S.J.; Goldstein, I.J.; Remsen, E.E. *Biochemistry* **1990**, *29*, 10555-10561.
95. Boland, C.R.; Chen, Y.F.; Rinderle, S.J.; Resau, J.H.; Luk, G.D.; Lynch, H.T.; Goldstein, I.J. *Cancer Res* **1991**, *51*, 657-665.
96. Koeppe, S.J.; Rupnow, J.H. *J Food Sci* **1988**, *53*, 1412-1417.
97. Zenteno, E.; Ochoa, J.-L. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 313-317.
98. Chen, M.-H.; Wang, Y.-Q.; Wang, Z. Patent No. CN 1491961 A, 2004.
99. Roy, S.; Sadhana, P.; Begum, M.; Kumar, S.; Lodha, M.L.; Kapoor, H.C. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 1865-1873.
100. Kwon, S.Y.; An, C.S.; Liu, J.R.; Paek, K.H. *Biosci Biotechnol Biochem* **1997**, *61*, 1613-1614.
101. Girbés, T.; de Torre, C.; Iglesias, R.; Ferreras, J.M.; Méndez, E. *Nature* **1996**, *379*, 777-778.
102. Girbés, J.T.; Citores, L.; De Benito, F.M.; Iglesias, R.; Ferreras, J.M. Patent No. ES 2115520 A1, 1998.
103. Iglesias, R.; Perez, Y.; de Torre, C.; Ferreras, J.M.; Antolin, P.; Jimenez, P.; Rojo, M.A.; Mendez, E.; Girbes, T. *J Exp Bot* **2005**, *56*, 1675-1684.
104. Hornung, E.; Wajant, H.; Jeske, H.; Mundry, K.W. *Gene* **1996**, *170*, 233-236.
105. Balasubrahmanyam, A.; Baranwal, V.K.; Lodha, M.L.; Varma, A.; Kapoor, H.C. *Plant Sci* **2000**, *154*, 13-21.
106. Gholizadeh, A.; Kapoor, H.C. *Protein Pept Lett* **2004**, *11*, 551-561.
107. Cho, K.-J.; Lee, S.-M.; Kim, Y.-T.; Hwang, Y.-S. *Agr Chem Biotechnol* **2000**, *43*, 125-130.
108. Park, J.S.; Hwang, D.J.; Lee, S.M.; Kim, Y.T.; Choi, S.B.; Cho, K.J. *Mol Cells* **2004**, *17*, 73-80.
109. Prestle, J.; Schonfelder, M.; Adam, G.; Mundry, K.W. *Nucleic Acids Res* **1992**, *20*, 3179-3182.
110. Ishizaki, T.; Megumi, C.; Komai, F.; Masuda, K.; Oosawa, K. *Physiol Plant* **2002**, *114*, 109-115.
111. Kawade, K.; Masuda, K. *Plant Physiol Biochem* **2009**, *47*, 327-334.
112. Tomatsu, M.; Ohnishi-Kameyama, M.; Shibamoto, N. *Cancer Lett* **2003**, *199*, 19-25.

113. Tomatsu, M.; Kondo, T.; Yoshikawa, T.; Komeno, T.; Adachi, N.; Kawasaki, Y.; Ikuta, A.; Tashiro, F. *Biol Chem* **2004**, *385*, 819-827.
114. Ng, T.B.; Wang, H. *Life Sci* **2001**, *68*, 739-749.
115. Wang, H.X.; Ng, T.B. *Biochem Biophys Res Commun* **2000**, *269*, 203-208.
116. Bolognesi, A.; Barbieri, L.; Abbondanza, A.; Falasca, A.I.; Carnicelli, D.; Battelli, M.G.; Stirpe, F. *Biochim Biophys Acta* **1990**, *1087*, 293-302.
117. Touloupakis, E.; Gessmann, R.; Kavelaki, K.; Christofakis, E.; Petratos, K.; Ghanotakis, D.F. *FEBS J* **2006**, *273*, 2684-2692.
118. Arias, F.J.; Antolin, P.; de Torre, C.; Barriuso, B.; Iglesias, R.; Rojo, M.A.; Ferreras, J.M.; Benvenuto, E.; Mendez, E.; Girbes, T. *Int J Biochem Cell Biol* **2003**, *35*, 61-78.
119. Girbés, J.T.; Barriuso, B.; Antolin, P.; Arias, F.J.; Munoz, R. Patent No. WO 2004106522 A1, 2004.
120. Van Damme, E.J.; Hao, Q.; Charels, D.; Barre, A.; Rouge, P.; Van Leuven, F.; Peumans, W.J. *Eur J Biochem* **2000**, *267*, 2746-2759.
121. Osawa, N.H., A. *Agric Biol Chem* **1987**, *51*, 891-896.
122. Hayashi, K.; Nishino, H.; Niwayama, S.; Shiraki, K.; Hiramatsu, A. *Antivir Res* **1992**, *17*, 323-333.
123. Bolognesi, A.; Polito, L.; Olivieri, F.; Valbonesi, P.; Barbieri, L.; Battelli, M.G.; Carusi, M.V.; Benvenuto, E.; Del Vecchio Blanco, F.; Di Maro, A., et al. *Planta* **1997**, *203*, 422-429.
124. Takayama, S.; Misawa, M.; Ko, K.; Misato, T. *Physiologia Plantarum* **1977**, *41*, 313-320.
125. Stirpe, F.; Barbieri, L. *FEBS Lett* **1986**, *195*, 1-8.
126. Hebestreit, P.; Melzig, M.F. *Planta Med* **2003**, *69*, 921-925.
127. Prestle, J.; Hornung, E.; Schonfelder, M.; Mundry, K.W. *FEBS Lett* **1992**, *297*, 250-252.
128. Stirpe, F.; Williams, D.G.; Onyon, L.J.; Legg, R.F.; Stevens, W.A. *Biochem J* **1981**, *195*, 399-405.
129. Falasca, A.; Gasperi-Campani, A.; Abbondanza, A.; Barbieri, L.; Stirpe, F. *Biochem J* **1982**, *207*, 505-509.
130. Cho, H.J.; Lee, S.J.; Kim, S.; Kim, B.D. *Mol Cells* **2000**, *10*, 135-141.
131. Yoshinari, S.; Koresawa, S.; Yokota, S.; Sawamoto, H.; Tamura, M.; Endo, Y. *Biosci Biotechnol Biochem* **1997**, *61*, 324-331.

132. Fermani, S.; Tosi, G.; Farini, V.; Polito, L.; Falini, G.; Ripamonti, A.; Barbieri, L.; Chambery, A.; Bolognesi, A. *J Struct Biol* **2009**, *168*, 278-287.
133. Chambery, A.; de Donato, A.; Bolognesi, A.; Polito, L.; Stirpe, F.; Parente, A. *Biol Chem* **2006**, *387*, 1261-1266.
134. Arias, F.J.; Rojo, M.A.; Ferreras, J.M.; Iglesias, R.; Munoz, R.; Soriano, F.; Mendez, E.; Barbieri, L.; Girbes, T. *Planta* **1994**, *194*, 487-491.
135. Arias, F.J.; Rojo, M.A.; Ferreras, J.M.; Iglesias, R.; Munoz, R.; Rocher, A.; Mendez, E.; Barbieri, L.; Girbes, T. *Planta* **1992**, *186*, 532-540.
136. Bolognesi, A.; Olivieri, F.; Battelli, M.G.; Barbieri, L.; Falasca, A.I.; Parente, A.; Del Vecchio Blanco, F.; Stirpe, F. *Eur J Biochem* **1995**, *228*, 935-940.
137. Di Massimo, A.M.; Di Loreto, M.; Pacilli, A.; Raucci, G.; D'Alatri, L.; Mele, A.; Bolognesi, A.; Polito, L.; Stirpe, F.; De Santis, R. *Br J Cancer* **1997**, *75*, 822-828.
138. Ferreras, J.M.; Barbieri, L.; Girbes, T.; Battelli, M.G.; Rojo, M.A.; Arias, F.J.; Rocher, M.A.; Soriano, F.; Mendez, E.; Stirpe, F. *Biochim Biophys Acta* **1993**, *1216*, 31-42.
139. Barbieri, L.; Gorini, P.; Valbonesi, P.; Castiglioni, P.; Stirpe, F. *Nature* **1994**, *372*, 624.
140. Ho, M.C.; Sturm, M.B.; Almo, S.C.; Schramm, V.L. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 20276-20281.
141. Sturm, M.B.; Tyler, P.C.; Evans, G.B.; Schramm, V.L. *Biochemistry* **2009**, *48*, 9941-9948.
142. Soria, M.R.; Benatti, L.; Nitti, G.; Ceriotti, A.; Solinas, M.; Lappi, D.A.; Lorenzetti, R. *Targeted Diagn Ther* **1992**, *7*, 193-212.
143. Yang, Y.-D.; Zhou, K.-J.; Pan, K.-Z.; Zhang, R.-Z.; Chen, R.-M.; Rao, P.-F. *Prog Biochem Biophys* **2000**, *27*, 57-61.
144. Ghosh, P.; Batra, J.K. *Biochem J* **2006**, *400*, 99-104.
145. Lappi, D.A.; Esch, F.S.; Barbieri, L.; Stirpe, F.; Soria, M. *Biochem Biophys Res Commun* **1985**, *129*, 934-942.
146. Benatti, L.; Nitti, G.; Solinas, M.; Valsasina, B.; Vitale, A.; Ceriotti, A.; Soria, M.R. *FEBS Lett* **1991**, *291*, 285-288.
147. De Angelis, F.; Di Tullio, A.; Spano, L.; Tucci, A. *J Mass Spectrom* **2001**, *36*, 1237-1239.
148. Lombardi, A.; Marshall, R.S.; Savino, C.; Fabbrini, M.S.; Ceriotti, A. *Toxic Plant Proteins, Plant Cell Monographs*. Springer Verlag: Heidelberg, 2010; Vol. 18, p 55-78.

149. Di Maro, A.; Ferranti, P.; Mastronicola, M.; Polito, L.; Bolognesi, A.; Stirpe, F.; Malorni, A.; Parente, A. *J Mass Spectrom* **2001**, *36*, 38-46.
150. Fabbrini, M.S.; Rappocciolo, E.; Carpani, D.; Solinas, M.; Valsasina, B.; Breme, U.; Cavallaro, U.; Nykjaer, A.; Roviola, E.; Legname, G., et al. *Biochem J* **1997**, *322* ( Pt 3), 719-727.
151. Yoshinari, S.; Tamura, M.; Endo, Y. *Viva Origino* **1996**, *24*, 225-236.
152. Zheng, Y.-H.; Zhao, H.-G.; Shan, Y.; Zhou, J.-J.; He, S.-I. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica* **2010**, *1*, 14-20.
153. Ng, T.B.; Parkash, A. *Protein Expr Purif* **2002**, *26*, 211-217.
154. Ng, T.B.; Parkash, A.; Tso, W.W. *Peptides* **2003**, *24*, 11-16.
155. Stirpe, F.; Barbieri, L.; Battelli, M.G.; Falasca, A.I.; Abbondanza, A.; Lorenzoni, E.; Stevens, W.A. *Biochem J* **1986**, *240*, 659-665.
156. Siegall, C.B.; Gawlak, S.L.; Chace, D.; Wolff, E.A.; Mixan, B.; Marquardt, H. *Bioconjug Chem* **1994**, *5*, 423-429.
157. Montecucchi, P.C.; Lazzarini, A.M.; Barbieri, L.; Stirpe, F.; Soria, M.; Lappi, D. *Int J Pept Protein Res* **1989**, *33*, 263-267.
158. Barbieri, L.; Polito, L.; Bolognesi, A.; Ciani, M.; Pelosi, E.; Farini, V.; Jha, A.K.; Sharma, N.; Vivanco, J.M.; Chambery, A., et al. *Biochim Biophys Acta* **2006**, *1760*, 783-792.
159. Peumans, W.J.; Nsimba-Lubaki, M.; Carlier, A.R.; Van Driessche, E. *Planta* **1984**, *160*, 222-228.
160. Zhang, D.; Halaweish, F.T. *Plant Science* **2003**, *164*, 387-393.
161. Zhang, D.; Halaweish, F.T. *Chem Biodiv* **2007**, *4*, 431-442.
162. Yamada, T.; Ohki, S.T.; Osaki, T. *Plant Biotechnology* **2000**, *17*, 337-340.
163. Wang, H.X.; Ng, T.B. *Peptides* **2003**, *24*, 969-972.
164. Chen, M.; Ye, X.; Cai, J.; Lin, Y. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2000**, *56*, 665-666.
165. Shi, X.-L.; Zhou, E.X.; Ye, X.-M.; Meehan, E.J.; Chen, M.-H.; Liqing, C. *Chin J Struct Chem* **2003**, *22*, 165-168.
166. Hou, X.; Meehan, E.J.; Xie, J.; Huang, M.; Chen, M.; Chen, L. *J Struct Biol* **2008**, *164*, 81-87.
167. Hou, X.-M.; Chen, M.-H.; Xie, J.-M.; Peng, Q.; Chen, L.-Q.; Huang, M.-D. *Chin J Struct Chem* **2009**, *28*, 215-217.
168. Chen, M.-H. Patent No. CN 101386644 A, 2009.

169. Xia, H.C.; Li, F.; Li, Z.; Zhang, Z.C. *Cell Res* **2003**, *13*, 369-374.
170. Cho, K.-J.; Lee, S.-M.; Kim, Y.-T.; Hwang, Y.-S. *Journal of the Korean Agricultural Chemical Society* **1997**, *40*, 375-379.
171. Ng, T.B.; Parkash, A.; Tso, W.W. *Protein Expr Purif* **2002**, *26*, 9-13.
172. Yoshinari, S.; Yokota, S.; Sawamoto, H.; Koresawa, S.; Tamura, M.; Endo, Y. *Eur J Biochem* **1996**, *242*, 585-591.
173. Lin, Y.; Chen, G.-Q.; Wu, Z.-J.; Lin, Q.-Y.; Xie, L.-H. *Journal of Agricultural Biotechnology* **2003**, *4*, 365-369.
174. Wang, H.X.; Ng, T.B. *Life Sci* **2000**, *67*, 2631-2638.
175. Yeung, H.W.; Li, W.W.; Ng, T.B. *Int J Pept Protein Res* **1991**, *38*, 15-19.
176. Lin, J.-K.; Chen, M.-H.; Xie, J.-M.; Zhao, R.; Ye, X.-M.; Shi, X.-L.; Wang, Z.-R. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **2002**, *18*, 609-613.
177. Wang, H.; Ng, T.B. *Life Sci* **2002**, *70*, 899-906.
178. Anantharam, V.; Patanjali, S.R.; Swamy, M.J.; Sanadi, A.R.; Goldstein, I.J.; Surolia, A. *J Biol Chem* **1986**, *261*, 14621-14627.
179. Kishida, K.; Masuho, Y.; Hara, T. *FEBS Lett* **1983**, *153*, 209-212.
180. Kamenosono, M.; Nishida, H.; Funatsu, G. *Agric Biol Chem* **1988**, *52*, 1223-1227.
181. Ng, T.B.; Wong, R.N.; Yeung, H.W. *Biochem Int* **1992**, *27*, 197-207.
182. Kataoka, J.; Habuka, N.; Miyano, M.; Masuta, C.; Koiwai, A. *Plant Mol Biol* **1992**, *18*, 1199-1202.
183. Guo, F.; Liu, D. *Prog Biochem Biophys* **1995**, *22*, 464-468.
184. Liu, L.; Wang, R.; He, W.; He, F.; Huang, G. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **2010**, *42*, 585-592.
185. Kataoka, J.; Habuka, N.; Miyano, M.; Masuta, C.; Koiwai, A. *Plant Mol Biol* **1992**, *19*, 887-889.
186. Ramakrishnan, S.; Enghlid, J.J.; Bryant, H.L., Jr.; Xu, F.J. *Biochem Biophys Res Commun* **1989**, *160*, 509-516.
187. Parkash, A.; Ng, T.B.; Tso, W.W. *Peptides* **2002**, *23*, 1019-1024.
188. Li, F.; Yang, X.X.; Xia, H.C.; Zeng, R.; Hu, W.G.; Li, Z.; Zhang, Z.C. *Peptides* **2003**, *24*, 799-805.
189. Gao, W.; Ling, J.; Zhong, X.; Liu, W.; Zhang, R.; Yang, H.; Cao, H.; Zhang, Z. *FEBS Lett* **1994**, *347*, 257-260.

190. Xiong, C.Y.; Zhang, Z.C. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **1998**, *30*, 142-146.
191. Li, F.; Hu, W.; Tai, N.; Zhang, Z. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q7XBB8>
192. Shih, N.J.; McDonald, K.A.; Girbes, T.; Iglesias, R.; Kohlhoff, A.J.; Jackman, A.P. *Biol Chem* **1998**, *379*, 721-725.
193. Kaur, I.; Yadav, S.K.; Hariprasad, G.; Gupta, R.C.; Srinivasan, A.; Batra, J.K.; Puri, M. *Amino Acids* **2012**, *43*, 973-981.
194. Kushwaha, G.S.; Pandey, N.; Sinha, M.; Singh, S.B.; Kaur, P.; Sharma, S.; Singh, T.P. *Biochim Biophys Acta* **2012**, *1824*, 679-691.
195. Kushwaha, G.S.; Yamini, S.; Kumar, M.; Sinha, M.; Kaur, P.; Sharma, S.; Singh, T.P. *Proteins* **2013**, *81*, 896-905.
196. Ortigao, M.; Better, M. *Nucleic Acids Res* **1992**, *20*, 4662.
197. Lee-Huang, S.; Huang, P.L.; Nara, P.L.; Chen, H.C.; Kung, H.F.; Huang, P.; Huang, H.I.; Huang, P.L. *FEBS Lett* **1990**, *272*, 12-18.
198. Lee-Huang, S.; Huang, P.L.; Chen, H.C.; Huang, P.L.; Bourinbaiar, A.; Huang, H.I.; Kung, H.F. *Gene* **1995**, *161*, 151-156.
199. Yeung, H.W.; Li, W.W.; Chan, W.Y.; Law, L.K.; Ng, T.B. *Int J Pept Protein Res* **1986**, *28*, 518-524.
200. Yeung, H.W.; Ng, T.B.; Li, W.W.; Cheung, W.K. *Planta Med* **1987**, *53*, 164-166.
201. Yeung, H.W.; Li, W.W.; Feng, Z.; Barbieri, L.; Stirpe, F. *Int J Pept Protein Res* **1988**, *31*, 265-268.
202. Feng, Z.; Li, W.W.; Yeung, H.W.; Chen, S.Z.; Wang, Y.P.; Lin, X.Y.; Dong, Y.C.; Wang, J.H. *J Mol Biol* **1990**, *214*, 625-626.
203. Ng, T.B.; Chan, W.Y.; Yeung, H.W. *Gen Pharmacol* **1992**, *23*, 579-590.
204. Fong, W.P.; Poon, Y.T.; Wong, T.M.; Mock, J.W.; Ng, T.B.; Wong, R.N.; Yao, Q.Z.; Yeung, H.W. *Life Sci* **1996**, *59*, 901-909.
205. Ye, G.-J.; Qian, R.-Q.; Lu, B.-Y.; Gu, Z.-W.; Jin, S.-W.; Wang, Y. *Acta Chim Sinica* **1998**, *56*, 1135-1144.
206. Tse, P.M.F.; Ng, T.B.; Fong, W.P.; Wong, R.N.S.; Wan, C.C.; Mak, N.K.; Yeung, H.W. *Int J Biochem Cell B* **1999**, *31*, 895-901.
207. Zhu, F.; Zhang, P.; Meng, Y.F.; Xu, F.; Zhang, D.W.; Cheng, J.; Lin, H.H.; Xi, D.H. *Planta* **2013**, *237*, 77-88.
208. Pu, Z.; Lu, B.Y.; Liu, W.Y.; Jin, S.W. *Biochem Biophys Res Commun* **1996**, *229*, 287-294.

209. Endo, Y.; Tsurugi, K.; Lambert, J.M. *Biochem Biophys Res Commun* **1988**, *150*, 1032-1036.
210. Barbieri, L.; Zamboni, M.; Lorenzoni, E.; Montanaro, L.; Sperti, S.; Stirpe, F. *Biochem J* **1980**, *186*, 443-452.
211. Takemoto, D.J.; Jilka, C.; Rockenbach, S.; Hughes, J.V. *Prep Biochem* **1983**, *13*, 371-393.
212. Stirpe, F.; Bailey, S.; Miller, S.P.; Bodley, J.W. *Nucleic Acids Res* **1988**, *16*, 1349-1357.
213. Cunnick, J.E.; Sakamoto, K.; Chapes, S.K.; Fortner, G.W.; Takemoto, D.J. *Cell Immunol* **1990**, *126*, 278-289.
214. Husain, J.; Tickle, I.J.; Wood, S.P. *FEBS Lett* **1994**, *342*, 154-158.
215. Wang, Q.-H.; Ren, H.; Yu, C. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* **1996**, *27*, 441-442.
216. Valbonesi, P.; Barbieri, L.; Bolognesi, A.; Bonora, E.; Polito, L.; Stirpe, F. *Life Sci* **1999**, *65*, 1485-1491.
217. Minami, Y.; Nakahara, Y.; Funatsu, G. *Biosci Biotechnol Biochem* **1992**, *56*, 1470-1471.
218. Minami, Y.; Funatsu, G. *Biosci Biotechnol Biochem* **1993**, *57*, 1141-1144.
219. Parkash, A.; Ng, T.B.; Tso, W.W. *J Pept Res* **2002**, *59*, 197-202.
220. Wang, H.; Ng, T.B. *Biochem Biophys Res Commun* **1998**, *253*, 143-146.
221. Barbieri, L.; Lorenzoni, E.; Stirpe, F. *Biochem J* **1979**, *182*, 633-635.
222. Ng, T.B.; Wong, C.M.; Li, W.W.; Yeung, H.W. *Int J Pept Protein Res* **1986**, *28*, 163-172.
223. Sultan, N.A.; Swamy, M.J. *Arch Biochem Biophys* **2005**, *437*, 115-125.
224. Tanaka, H.; Toyama, J.; Akashi, R. *Asian J Plant Sci* **2009**, *8*, 544-550.
225. Toyama, J.; Tanaka, H.; Horie, A.; Uchiyama, T.; Akashi, R. *Asian J Plant Sci* **2008**, *7*, 647-653.
226. Lin, J.Y.; Hou, M.J.; Chen, Y.C. *Toxicon* **1978**, *16*, 653-660.
227. Li, S.S. *Experientia* **1980**, *36*, 524-527.
228. Chuethong, J.; Oda, K.; Sakurai, H.; Saiki, I.; Leelamanit, W. *Biol Pharm Bull* **2007**, *30*, 428-432.
229. Yeung, H.W.; Ng, T.B.; Wong, N.S.; Li, W.W. *Int J Pept Protein Res* **1987**, *30*, 135-140.
230. Bolognesi, A.; Barbieri, L.; Carnicelli, D.; Abbondanza, A.; Cenini, P.; Falasca, A.I.; Dinota, A.; Stirpe, F. *Biochim Biophys Acta* **1989**, *993*, 287-292.
231. Tsang, K.Y.; Ng, T.B. *Life Sci* **2001**, *68*, 773-784.
232. Wu, T.H.; Chow, L.P.; Lin, J.Y. *Eur J Biochem* **1998**, *255*, 400-408.



233. Vozari-Hampe, M.M.; Viegas, C.; Saucedo, C.; Rosseto, S.; Manica, G.G.; Hampe, O.G. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 1477-1480.
234. Chow, L.P.; Chou, M.H.; Ho, C.Y.; Chuang, C.C.; Pan, F.M.; Wu, S.H.; Lin, J.Y. *Biochem J* **1999**, *338* ( Pt 1), 211-219.
235. Komath, S.S.; Nadimpalli, S.K.; Swamy, M.J. *Biochem Mol Biol Int* **1996**, *39*, 243-252.
236. Manoj, N.; Jeyaprakash, A.A.; Pratap, J.V.; Komath, S.S.; Kenoth, R.; Swamy, M.J.; Vijayan, M. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2001**, *57*, 912-914.
237. Sharma, A.; Pohlentz, G.; Bobbili, K.B.; Jeyaprakash, A.A.; Chandran, T.; Mormann, M.; Swamy, M.J.; Vijayan, M. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2013**, *69*, 1493-1503.
238. Sultan, N.A.; Kavitha, M.; Swamy, M.J. *IUBMB Life* **2009**, *61*, 457-469.
239. Padma, P.; Komath, S.S.; Nadimpalli, S.K.; Swamy, M.J. *Phytochemistry* **1999**, *50*, 363-371.
240. Yeung, H.W.; Li, W.W. *Int J Pept Protein Res* **1987**, *29*, 289-292.
241. Ng, T.B.; Feng, Z.; Li, W.W.; Yeung, H.W. *Int J Biochem* **1991**, *23*, 561-567.
242. Wong, R.N.; Dong, T.X.; Ng, T.B.; Choi, W.T.; Yeung, H.W. *Int J Pept Protein Res* **1996**, *47*, 103-109.
243. Dong, T.X.; Ng, T.B.; Yeung, H.W.; Wong, R.N. *Biochem Biophys Res Commun* **1994**, *199*, 387-393.
244. Lee-Huang, S.; Huang, P.L.; Kung, H.F.; Li, B.Q.; Huang, P.L.; Huang, P.; Huang, H.I.; Chen, H.C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**, *88*, 6570-6574.
245. Thorup, J.E.; McDonald, K.A.; Jackman, A.P.; Bhatia, N.; Dandekar, A.M. *Biotechnol Progr* **1994**, *10*, 345-352.
246. Remi Shih, N.J.; McDonald, K.A.; Dandekar, A.M.; Girbés, T.; Iglesias, R.; Jackman, A.P. *Plant Cell Reports* **1998**, *17*, 531-537.
247. Jin, S.-W.; Xiang, B.-P.; Cao, B.-X.; Wang, Y. *Chinese Journal of Chemistry* **1997**, *15*, 160-168.
248. Xiang, B.-P.; Jin, S.-W.; Cao, B.-X.; Fu, G.-X.; Wang, Y. *Acta Chim Sinica* **1998**, *56*, 302-307.
249. Zheng, Y.T.; Ben, K.L.; Jin, S.W. *Acta Pharmacol Sin* **2000**, *21*, 179-182.
250. Casellas, P.; Dussossoy, D.; Falasca, A.I.; Barbieri, L.; Guillemot, J.C.; Ferrara, P.; Bolognesi, A.; Cenini, P.; Stirpe, F. *Eur J Biochem* **1988**, *176*, 581-588.

251. Mi, S.L.; An, C.C.; Wang, Y.; Chen, J.Y.; Che, N.Y.; Gao, Y.; Chen, Z.L. *Arch Biochem Biophys* **2005**, *434*, 258-265.
252. Gu, Z.-W.; Jin, S.-W.; Qian, W.-W.; Zhang, X.-L.; Cao, B.-X.; Wang, Q.-H.; Fu, Y.-H.; Xu, S.-Z.; Yao, Y.-Z.; Liu, Y.-F., *et al.* *Acta Chim Sinica* **1983**, *41*, 1190-1192.
253. Gu, Z.-W.; Qian, R.-R.; Jin, S.-W.; Qian, W.-W.; Liu, Y.-F.; Zhu, S.-Q.; Cao, B.-S.; Wang, S.-F.; Xu, S.-Z.; Zhang, L.-Q., *et al.* *Acta Chim Sinica* **1984**, *42*, 943-945.
254. McGrath, M.S.; Hwang, K.M.; Caldwell, S.E.; Gaston, I.; Luk, K.C.; Wu, P.; Ng, V.L.; Crowe, S.; Daniels, J.; Marsh, J., *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A* **1989**, *86*, 2844-2848.
255. Collins, E.J.; Robertus, J.D.; LoPresti, M.; Stone, K.L.; Williams, K.R.; Wu, P.; Hwang, K.; Piatak, M. *J Biol Chem* **1990**, *265*, 8665-8669.
256. Shaw, P.C.; Chan, W.L.; Yeung, H.W.; Ng, T.B. *Life Sci* **1994**, *55*, 253-262.
257. Bhatia, N.; McDonald, K.A.; Jackman, A.P.; Dandekar, A.M. *Protein Expr Purif* **1996**, *7*, 143-146.
258. Narayanan, P.; Mak, N.K.; Luong, P.B.; Wong, R.N.S. *Plant Science* **2002**, *162*, 79-85.
259. Shu, S.H.; Xie, G.Z.; Guo, X.L.; Wang, M. *Protein Expr Purif* **2009**, *67*, 120-125.
260. Maraganore, J.M.; Joseph, M.; Bailey, M.C. *J Biol Chem* **1987**, *262*, 11628-11633.
261. Li, F.; Yang, X.X.; Hu, W.G.; Xia, H.C.; Li, Z.; Zhang, Z.C. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **2003**, *35*, 841-846.
262. Tai, N.W.; Li, F.; Li, Z.; Zhuang, D.H.; Zhang, Z.C. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **2000**, *32*, 495-498.
263. Li, M.; Wang, Y.P.; Chai, J.J.; Wang, K.Y.; Bi, R.C. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2000**, *56*, 1073-1075.
264. Li, M.; Chai, J.-J.; Wang, X.-P.; Wang, R.-Y.; Bi, R.-C. *Protein Pept Lett* **2001**, *8*, 81-87.
265. Yeung, H.W.; Ng, T.B.; Wong, D.M.; Wong, C.M.; Li, W.W. *Int J Pept Protein Res* **1986**, *27*, 208-220.
266. Yeung, H.W.; Wong, D.M.; Ng, T.B.; Li, W.W. *Int J Pept Protein Res* **1986**, *27*, 325-333.
267. Falasca, A.I.; Abbondanza, A.; Barbieri, L.; Bolognesi, A.; Rossi, C.A.; Stirpe, F. *FEBS Lett* **1989**, *246*, 159-162.
268. Toyokawa, S.; Takeda, T.; Kato, Y.; Wakabayashi, K.; Ogihara, Y. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **1991**, *39*, 1244-1249.
269. Toyokawa, S.; Takeda, T.; Ogihara, Y. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **1991**, *39*, 716-719.
270. Kondo, T.; Mizukami, H.; Takeda, T.; Ogihara, Y. *Biol Pharm Bull* **1996**, *19*, 1485-1489.

271. Kondo, T.; Kurihara, S.; Yoshikawa, T.; Mizukami, H. *Biotechnol Lett* **2004**, *26*, 1873-1878.
272. Chen, R.; Xu, Y.Z.; Wu, J.; Pu, Z.; Jin, S.W.; Liu, W.Y.; Xia, Z.X. *Biochem Mol Biol Int* **1999**, *47*, 185-193.
273. Sultan, N.A.; Kenoth, R.; Swamy, M.J. *Arch Biochem Biophys* **2004**, *432*, 212-221.
274. Chi, P.V.; Truong, H.Q.; Ha, N.T.; Chung, W.I.; Binh, L.T. *Biotechnol Appl Biochem* **2001**, *34*, 85-92.
275. Si, Y.-X.; Liu, W.-Y.; Qian, K.-X. *Journal of Zhejiang University (Engineering)* **2005**, *39*, 423-426.
276. Stirpe, F.; Pession-Brizzi, A.; Lorenzoni, E.; Strocchi, P.; Montanaro, L.; Sperti, S. *Biochem J* **1976**, *156*, 1-6.
277. Sperti, S.; Montanaro, L.; Mattioli, A.; Testoni, G.; Stirpe, F. *Biochem J* **1976**, *156*, 7-13.
278. Chen, M.H.; Zhou, K.J.; Fu, Z.J.; Pan, K.Z. *J Mol Biol* **1993**, *234*, 908-909.
279. Iglesias, R.; Escarmis, C.; Alegre, C.; Ferreras, J.M.; Girbes, T. *FEBS Lett* **1993**, *318*, 189-192.
280. Ferreras, J.M.; Alegre, C.; Iglesias, R.; Girbes, T. *Biosci Biotechnol Biochem* **1994**, *58*, 1458-1462.
281. Alegre, C.; Iglesias, R.; Ferreras, J.M.; Citores, L.; Girbes, T. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **1996**, *42*, 151-158.
282. Barbieri, L.; Falasca, A.; Franceschi, C.; Licastro, F.; Rossi, C.A.; Stirpe, F. *Biochem J* **1983**, *215*, 433-439.
283. Stirpe, F.; Olsnes, S.; Pihl, A. *J Biol Chem* **1980**, *255*, 6947-6953.
284. Ebert, R.F.; Spryn, L.A. *Bioconjug Chem* **1990**, *1*, 331-336.
285. Rosenblum, M.G.; Kohr, W.A.; Beattie, K.L.; Beattie, W.G.; Marks, W.; Toman, P.D.; Cheung, L. *J Interferon Cytokine Res* **1995**, *15*, 547-555.
286. Singh, V.; Singh, R.C.; Dubey, R.K.; Alam, A. *Indian J Biochem Biophys* **1999**, *36*, 258-265.
287. Ferreras, J.M.; Iglesias, R.; Barbieri, L.; Alegre, C.; Bolognesi, A.; Rojo, M.A.; Carbajales, M.L.; Escarmis, C.; Girbes, T. *Biochim Biophys Acta* **1995**, *1243*, 85-93.
288. Jaffe, W.G.; Seidl, D. *Experientia* **1969**, *25*, 891-892.

289. Falasca, A.; Franceschi, C.; Rossi, C.A.; Stirpe, F. *Biochim Biophys Acta* **1980**, *632*, 95-105.
290. Kaufman, S.J.; McPherson, A. *Cell* **1975**, *4*, 263-268.
291. McPherson, A.; Hoover, S. *Biochem Biophys Res Commun* **1979**, *89*, 713-720.
292. Lin, J.; Zhou, X.; Wang, J.; Jiang, P.; Tang, K. *Prep Biochem Biotechnol* **2010**, *40*, 107-118.
293. Qin, W.; Ming-Xing, H.; Ying, X.; Xin-Shen, Z.; Fang, C. *J Biosci* **2005**, *30*, 351-357.
294. Huang, M.-X.; Hou, P.; Wei, Q.; Xu, Y.; Chen, F. *Plant Growth Regulation* **2008**, *54*, 115-123.
295. Qin, X.; Shao, C.; Hou, P.; Gao, J.; Lei, N.; Jiang, L.; Ye, S.; Gou, C.; Luo, S.; Zheng, X., et al. *Z Naturforsch C* **2010**, *65*, 355-362.
296. Qin, X.; Zheng, X.; Shao, C.; Gao, J.; Jiang, L.; Zhu, X.; Yan, F.; Tang, L.; Xu, Y.; Chen, F. *Planta* **2009**, *230*, 387-395.
297. Nuchasuk, C.; Wetprasit, N.; Roytrakul, S.; Choowongkomon, K.; N, T.T.; Yokthongwattana, C.; Arpornsuwan, T.; Ratanapo, S. *Chem Biol Drug Des* **2013**, *82*, 453-462.
298. Carnicelli, D.; Brigotti, M.; Alvergnà, P.; Pallanca, A.; Sperti, S.; Montanaro, L. *J Exp Bot* **1997**, *48*, 1519-1523.
299. Osborne, T.B.; Mendel, L.B.; Harris, I.F. *Am J Physiol* **1905**, *14*, 259-286.
300. Kabat, E.A.; Heidelberger, M.; Bezer, A.E. *J Biol Chem* **1947**, *168*, 629-639.
301. Kunitz, M.; McDonald, M.R. *J Gen Physiol* **1948**, *32*, 25-31.
302. Ishiguro, M.; Funatsu, G.; Funatsu, M. *Agric Biol Chem* **1971**, *35*, 724-728.
303. Ishiguro, M.; Takahashi, T.; Funatsu, G.; Hayashi, K.; Funatsu, M. *J Biochem* **1964**, *55*, 587-592.
304. Ishiguro, M.; Takahashi, T.; Hayashi, K.; Funatsu, M. *J Biochem* **1964**, *56*, 325-327.
305. Funatsu, M.; Funatsu, G.; Ishiguro, M.; Nanno, S.; Hara, K. *Proc Japan Acad* **1971**, *47*, 718-723.
306. Cawley, D.B.; Hedblom, M.L.; Houston, L.L. *Arch Biochem Biophys* **1978**, *190*, 744-755.
307. Fulton, R.J.; Blakey, D.C.; Knowles, P.P.; Uhr, J.W.; Thorpe, P.E.; Vitetta, E.S. *J Biol Chem* **1986**, *261*, 5314-5319.
308. Endo, Y.; Tsurugi, K. *J Biol Chem* **1987**, *262*, 8128-8130.

309. Citores, L.; Ferreras, J.M.; Iglesias, R.; Carbajales, M.L.; Arias, F.J.; Jimenez, P.; Rojo, M.A.; Girbes, T. *FEBS Lett* **1993**, *329*, 59-62.
310. Olsnes, S. *Toxicon* **2004**, *44*, 361-370.
311. Sehgal, P.; Rao, M.K.; Kumar, O.; Vijayaraghavan, R. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **2010**, *56 Suppl*, O1385-1399.
312. Sehgal, P.; Khan, M.; Kumar, O.; Vijayaraghavan, R. *Food Chem Toxicol* **2010**, *48*, 3171-3176.
313. Mise, T.; Funatsu, G.; Ishiguro, M.; Funatsu, M. *Agric Biol Chem* **1977**, *41*, 2041-2046.
314. Araki, T.; Funatsu, G. *Biochim Biophys Acta* **1987**, *911*, 191-200.
315. Ladin, B.F.; Murray, E.E.; Halling, A.C.; Halling, K.C.; Tilakaratne, N.; Long, G.L.; Houston, L.L.; Weaver, R.F. *Plant Mol Biol* **1987**, *9*, 287-295.
316. Nicolson, G.L.; Blaustein, J. *Biochim Biophys Acta* **1972**, *266*, 543-547.
317. Lugnier, A.; Dirheimer, G. *FEBS Lett* **1973**, *35*, 117-120.
318. Olsnes, S.; Saltvedt, E.; Pihl, A. *J Biol Chem* **1974**, *249*, 803-810.
319. Nicolson, G.L.; Blaustein, J.; Etzler, M.E. *Biochemistry* **1974**, *13*, 196-204.
320. Nicolson, G.L.; Lacorbriere, M.; Hunter, T.R. *Cancer Res* **1975**, *35*, 144-155.
321. Harley, S.M.; Beevers, H. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1982**, *79*, 5935-5938.
322. Roberts, L.M.; Lamb, F.I.; Pappin, D.J.; Lord, J.M. *J Biol Chem* **1985**, *260*, 15682-15686.
323. Sweeney, E.C.; Tonevitsky, A.G.; Temiakov, D.E.; Agapov, I.I.; Saward, S.; Palmer, R.A. *Proteins* **1997**, *28*, 586-589.
324. Hegde, R.; Podder, S.K. *Eur J Biochem* **1998**, *254*, 596-601.
325. Helmy, M.; Piéroni, G. *J Plant Physiol* **2000**, *156*, 477-482.
326. Hegde, R.; Podder, S.K. *Eur J Biochem* **1992**, *204*, 155-164.
327. El-Nikhely, N.; Helmy, M.; Saeed, H.M.; Abou Shama, L.A.; Abd El-Rahman, Z. *Protein J* **2007**, *26*, 481-489.
328. Lin, J.Y.; Lei, L.L.; Tung, T.C. *J Formos Med Assoc* **1969**, *68*, 518-521.
329. Olsnes, S.; Pihl, A. *Eur J Biochem* **1973**, *35*, 179-185.
330. McPherson, A., Jr.; Rich, A. *FEBS Lett* **1973**, *35*, 257-261.
331. Olsnes, S.; Pihl, A. Abrin, Ricin, and their Associated Agglutinins. In *The Specificity and Action of Animal, Bacterial and Plant Toxins*, Cuatrecasas, P., Ed. Springer US: 1977; pp 129-173.
332. Olsnes, S.; Heiberg, R.; Pihl, A. *Mol Biol Rep* **1973**, *1*, 15-20.

333. Kumar, O.; Kannoji, A.; Jayaraj, R.; Vijayaraghavan, R. *Journal of Cell and Tissue Research* **2008**, *8*, 1243-1248.
334. Wei, C.H.; Hartman, F.C.; Pfuderer, P.; Yang, W.K. *J Biol Chem* **1974**, *249*, 3061-3067.
335. Wei, C.H.; Einstein, J.R. *J Biol Chem* **1974**, *249*, 2985-2986.
336. Lin, J.Y.; Lee, T.C.; Hu, S.T.; Tung, T.C. *Toxicon* **1981**, *19*, 41-51.
337. Lin, J.Y.; Lee, T.C.; Tung, T.C. *Cancer Res* **1982**, *42*, 276-279.
338. Lin, J.Y.; Lee, T.C.; Tung, T.C. *Int J Pept Protein Res* **1978**, *12*, 311-317.
339. Herrmann, M.S.; Behnke, W.D. *Biochim Biophys Acta* **1981**, *667*, 397-410.
340. Hegde, R.; Maiti, T.K.; Podder, S.K. *Anal Biochem* **1991**, *194*, 101-109.
341. Hung, C.H.; Lee, M.C.; Lee, T.C.; Lin, J.Y. *J Mol Biol* **1993**, *229*, 263-267.
342. Tahirov, T.H.; Lu, T.H.; Liaw, Y.C.; Chen, Y.L.; Lin, J.Y. *J Mol Biol* **1995**, *250*, 354-367.
343. Li, X.-B.; Xie, G.-H.; Zhou, C.-F.; Zhang, Z.-G.; Song, W.-X.; Zhou, X.-C.; Zhang, N.-S.; Wang, X.-L.; Gao, H.-W.; Wang, Z. *Chinese Journal of Veterinary Science* **2008**, *28*, 310-313.
344. Wei, C.H.; Koh, C.; Pfuderer, P.; Einstein, J.R. *J Biol Chem* **1975**, *250*, 4790-4795.
345. Roy, J.; Som, S.; Sen, A. *Arch Biochem Biophys* **1976**, *174*, 359-361.
346. Murray, D.R.; Vairinhos, F. *Z Pflanzenphysiol* **1982**, *108*, 471-476.
347. Liu, C.L.; Tsai, C.C.; Lin, S.C.; Wang, L.I.; Hsu, C.I.; Hwang, M.J.; Lin, J.Y. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 1897-1901.
348. Panneerselvam, K.; Lin, S.C.; Liu, C.L.; Liaw, Y.C.; Lin, J.Y.; Lu, T.H. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2000**, *56*, 898-899.
349. Bagaria, A.; Surendranath, K.; Ramagopal, U.A.; Ramakumar, S.; Karande, A.A. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 34465-34474.
350. Ramos, M.V.; Mota, D.M.; Teixeira, C.R.; Cavada, B.S.; Moreira, R.A. *Toxicon* **1998**, *36*, 477-484.
351. Silva, A.L.; Goto, L.S.; Dinarte, A.R.; Hansen, D.; Moreira, R.A.; Beltramini, L.M.; Araujo, A.P. *FEBS J* **2005**, *272*, 1201-1210.
352. Silva, A.L.; Horta, A.C.; Moreira, R.A.; Beltramini, L.M.; Araujo, A.P. *Toxicon* **2003**, *41*, 841-849.
353. Castilho, P.V.; Goto, L.S.; Roberts, L.M.; Araujo, A.P. *FEBS J* **2008**, *275*, 948-959.
354. Lam, S.S.; Wang, H.; Ng, T.B. *Biochem Biophys Res Commun* **1998**, *253*, 135-142.
355. Ye, X.Y.; Wang, H.X.; Ng, T.B. *Life Sci* **2000**, *67*, 775-781.

356. Van Damme, E.J.; Barre, A.; Barbieri, L.; Valbonesi, P.; Rouge, P.; Van Leuven, F.; Stirpe, F.; Peumans, W.J. *Biochem J* **1997**, *324 ( Pt 3)*, 963-970.
357. Desmyter, S.; Vandebussche, F.; Hao, Q.; Proost, P.; Peumans, W.J.; Van Damme, E.J. *Plant Mol Biol* **2003**, *51*, 567-576.
358. Mo, H.; Van Damme, E.J.; Peumans, W.J.; Goldstein, I.J. *J Biol Chem* **1994**, *269*, 7666-7673.
359. Hao, Q.; Van Damme, E.J.; Hause, B.; Barre, A.; Chen, Y.; Rouge, P.; Peumans, W.J. *Plant Physiol* **2001**, *125*, 866-876.
360. Vandebussche, F.; Peumans, W.J.; Desmyter, S.; Proost, P.; Ciani, M.; Van Damme, E.J. *Planta* **2004**, *220*, 211-221.
361. Verma, H.N.; Srivastava, S.; Varsha; Kumar, D. *Phytopathology* **1996**, *86*, 485-492.
362. Kumar, D.; Verma, H.N.; Tuteja, N.; Tewari, K.K. *Plant Mol Biol* **1997**, *33*, 745-751.
363. Olivieri, F.; Prasad, V.; Valbonesi, P.; Srivastava, S.; Ghosal-Chowdhury, P.; Barbieri, L.; Bolognesi, A.; Stirpe, F. *FEBS Lett* **1996**, *396*, 132-134.
364. Prasad, V.; Srivastava, S.; Varsha; Verma, H.N. *Plant Science* **1995**, *110*, 73-82.
365. Yang, X.-Y.; Xiao, Y.-H.; Pei, Y. Patent No. CN 1563381 A, 2005.
366. Hou, F.-J.; Wang, B.-Z.; Liu, W.-Y. *Protein Pept Lett* **2001**, *8*, 193-200.
367. Ling, J.; Liu, W.Y.; Wang, T.P. *Biochim Biophys Acta* **1995**, *1252*, 15-22.
368. Ling, J.; Liu, W.Y. *Cell Biochem Funct* **1996**, *14*, 157-161.
369. He, W.J.; Liu, W.Y. *Int J Biochem Cell Biol* **2003**, *35*, 1021-1027.
370. Xu, H.; Liu, W.Y. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **2004**, *36*, 169-176.
371. Hou, F.-J.; Liu, R.-S.; Liu, W.-Y. *Prog Biochem Biophys* **2002**, *29*, 531-532.
372. Li, X.D.; Liu, W.Y.; Niu, C.L. *Biol Chem* **1996**, *377*, 825-831.
373. Kondo, T.; Yoshikawa, T. *Journal of Natural Medicines* **2007**, *61*, 170-174.
374. Verma, H.N.; Awasthi, L.P. *Can J Bot* **1979**, *57*, 926-932.
375. Verma, H.N.; Awasthi, L.P.; Saxena, K.C. *Can J Bot* **1979**, *57*, 1214-1217.
376. Kubo, S.; Ikeda, T.; Imaizumi, S.; Takanami, Y.; Mikami, Y. *Japanese Journal of Phytopathology* **1990**, *56*, 481-487.
377. Balasaraswathi, R.; Sadasivam, S.; Ward, M.; Walker, J.M. *Phytochemistry* **1998**, *47*, 1561-1565.
378. den Hartog, M.T.; Lubelli, C.; Boon, L.; Heerkens, S.; Ortiz Buijsse, A.P.; de Boer, M.; Stirpe, F. *Eur J Biochem* **2002**, *269*, 1772-1779.

379. Narwal, S.; Balasubrahmanyam, A.; Lodha, M.L.; Kapoor, H.C. *Indian J Biochem Biophys* **2001**, *38*, 342-347.
380. Narwal, S.; Balasubrahmanyam, A.; Sadhna, P.; Kapoor, H.; Lodha, M.L. *Indian J Exp Biol* **2001**, *39*, 600-603.
381. Choudhary, N.; Kapoor, H.C.; Lodha, M.L. *J Biosci* **2008**, *33*, 91-101.
382. Choudhary, N.L.; Yadav, O.P.; Lodha, M.L. *Biochemistry (Moscow)* **2008**, *73*, 273-277.
383. Vepachedu, R.; Bais, H.P.; Vivanco, J.M. *Planta* **2003**, *217*, 498-506.
384. Vivanco, J.M.; Savary, B.J.; Flores, H.E. *Plant Physiol* **1999**, *119*, 1447-1456.
385. Habuka, N.; Murakami, Y.; Noma, M.; Kudo, T.; Horikoshi, K. *J Biol Chem* **1989**, *264*, 6629-6637.
386. Bolognesi, A.; Polito, L.; Lubelli, C.; Barbieri, L.; Parente, A.; Stirpe, F. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 13709-13716.
387. Yuan, Y.; Dai, X.; Wang, D.; Zeng, X. *Toxicon* **2009**, *54*, 121-127.
388. Voss, C.; Eyol, E.; Frank, M.; von der Lieth, C.W.; Berger, M.R. *FASEB J* **2006**, *20*, 1194-1196.
389. Bayer, H.; Ey, N.; Wattenberg, A.; Voss, C.; Berger, M.R. *Protein Expr Purif* **2012**, *82*, 97-105.
390. Olsnes, S.; Haylett, T.; Refsnes, K. *J Biol Chem* **1978**, *253*, 5069-5073.
391. Refsnes, K.; Haylett, T.; Sandvig, K.; Olsnes, S. *Biochem Biophys Res Commun* **1977**, *79*, 1176-1183.
392. Stirpe, F.; Gasperi-Campani, A.; Barbieri, L.; Lorenzoni, E.; Montanaro, L.; Sperti, S.; Bonetti, E. *FEBS Lett* **1977**, *85*, 65-67.
393. Barbieri, L.; Zamboni, M.; Montanaro, L.; Sperti, S.; Stirpe, F. *Biochem J* **1980**, *185*, 203-210.
394. Stirpe, F.; Bolognesi, A.; Bortolotti, M.; Farini, V.; Lubelli, C.; Pelosi, E.; Polito, L.; Dozza, B.; Strocchi, P.; Chambery, A., et al. *Toxicon* **2007**, *50*, 94-105.
395. Monti, B.; D'Alessandro, C.; Farini, V.; Bolognesi, A.; Polazzi, E.; Contestabile, A.; Stirpe, F.; Battelli, M.G. *Neurotoxicology* **2007**, *28*, 637-644.
396. Barbieri, L.; Falasca, A.I.; Stirpe, F. *FEBS Lett* **1984**, *171*, 277-279.
397. Stirpe, F.; Barbieri, L.; Abbondanza, A.; Falasca, A.I.; Brown, A.N.; Sandvig, K.; Olsnes, S.; Pihl, A. *J Biol Chem* **1985**, *260*, 14589-14595.



398. Chambery, A.; Di Maro, A.; Monti, M.M.; Stirpe, F.; Parente, A. *Eur J Biochem* **2004**, *271*, 108-117.
399. Kataoka, J.; Habuka, N.; Masuta, C.; Miyano, M.; Koiwai, A. *Plant Mol Biol* **1992**, *20*, 879-886.
400. Honjo, E.; Dong, D.; Motoshima, H.; Watanabe, K. *J Biochem* **2002**, *131*, 225-231.
401. Irvin, J.D. *Pharmacol Ther* **1983**, *21*, 371-387.
402. Irvin, J.D.; Robertus, J.D.; Monzingo, A.F. *Biochem Biophys Res Commun* **1977**, *74*, 775-779.
403. Irvin, J.D.; Uckun, F.M. *Pharmacol Ther* **1992**, *55*, 279-302.
404. Bjorn, M.J.; Larrick, J.; Piatak, M.; Wilson, K.J. *Biochim Biophys Acta* **1984**, *790*, 154-163.
405. Lin, Q.; Chen, Z.C.; Antoniw, J.F.; White, R.F. *Plant Mol Biol* **1991**, *17*, 609-614.
406. Poyet, J.L.; Hoeveler, A. *FEBS Lett* **1997**, *406*, 97-100.
407. Rajamohan, F.; Venkatachalam, T.K.; Irvin, J.D.; Uckun, F.M. *Biochem Biophys Res Commun* **1999**, *260*, 453-458.
408. Irvin, J.D.; Kelly, T.; Robertus, J.D. *Arch Biochem Biophys* **1980**, *200*, 418-425.
409. Barbieri, L.; Bolognesi, A.; Cenini, P.; Falasca, A.I.; Minghetti, A.; Garofano, L.; Guicciardi, A.; Lappi, D.; Miller, S.P.; Stirpe, F. *Biochem J* **1989**, *257*, 801-807.
410. Park, S.W.; Lawrence, C.B.; Linden, J.C.; Vivanco, J.M. *Plant Physiol* **2002**, *130*, 164-178.
411. Barbieri, L.; Aron, G.M.; Irvin, J.D.; Stirpe, F. *Biochem J* **1982**, *203*, 55-59.
412. Parente, A.; Conforto, B.; Di Maro, A.; Chambery, A.; De Luca, P.; Bolognesi, A.; Iriti, M.; Faoro, F. *Planta* **2008**, *228*, 963-975.
413. Di Maro, A.; Valbonesi, P.; Bolognesi, A.; Stirpe, F.; De Luca, P.; Siniscalco Gigliano, G.; Gaudio, L.; Delli Bovi, P.; Ferranti, P.; Malorni, A., *et al.* *Planta* **1999**, *208*, 125-131.
414. Severino, V.; Chambery, A.; Di Maro, A.; Marasco, D.; Ruggiero, A.; Berisio, R.; Giansanti, F.; Ippoliti, R.; Parente, A. *Mol Biosyst* **2010**, *6*, 570-579.
415. Di Maro, A.; Chambery, A.; Carafa, V.; Costantini, S.; Colonna, G.; Parente, A. *Biochimie* **2009**, *91*, 352-363.
416. Ruggiero, A.; Chambery, A.; Di Maro, A.; Parente, A.; Berisio, R. *Proteins* **2008**, *71*, 8-15.

417. Parente, A.; De Luca, P.; Bolognesi, A.; Barbieri, L.; Battelli, M.G.; Abbondanza, A.; Sande, M.J.; Gigliano, G.S.; Tazzari, P.L.; Stirpe, F. *Biochim Biophys Acta* **1993**, *1216*, 43-49.
418. Del Vecchio Blanco, F.; Bolognesi, A.; Malorni, A.; Sande, M.J.; Savino, G.; Parente, A. *Biochim Biophys Acta* **1997**, *1338*, 137-144.
419. Ready, M.P.; Adams, R.P.; Robertus, J.D. *Biochim Biophys Acta* **1984**, *791*, 314-319.
420. Thomsen, S.; Hansen, H.S.; Nyman, U. *Planta Med* **1991**, *57*, 232-236.
421. Di Maro, A.; Chambery, A.; Daniele, A.; Casoria, P.; Parente, A. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 767-776.
422. Moon, Y.H.; Song, S.K.; Choi, K.W.; Lee, J.S. *Mol Cells* **1997**, *7*, 807-815.
423. Song, S.K.; Choi, Y.; Moon, Y.H.; Kim, S.G.; Choi, Y.D.; Lee, J.S. *Plant Mol Biol* **2000**, *43*, 439-450.
424. Coleman, W.H.; Roberts, W.K. *Biochim Biophys Acta* **1982**, *696*, 239-244.
425. Asano, K.; Svensson, B.; Poulsen, F.M. *Carlsberg Res Commun* **1984**, *49*, 619-626.
426. Endo, Y.; Tsurugi, K.; Ebert, R.F. *Biochim Biophys Acta* **1988**, *954*, 224-226.
427. Leah, R.; Tommerup, H.; Svendsen, I.; Mundy, J. *J Biol Chem* **1991**, *266*, 1564-1573.
428. Asano, K.; Svensson, B.; Poulsen, F.M.; Nygård, O.; Nilsson, L. *Carlsberg Res Commun* **1986**, *51*, 75-81.
429. Chaudhry, B.; Muller-Uri, F.; Cameron-Mills, V.; Gough, S.; Simpson, D.; Skriver, K.; Mundy, J. *Plant J* **1994**, *6*, 815-824.
430. Salehzadeh, A.; Arasteh, A.; Shafighi, T.; Ranjee, N. *Afr J Agric Res* **2011**, *6*, 4941-4946.
431. Minami, Y.; Yamaguchi, K.; Yagi, F.; Tadera, K.; Funatsu, G. *Biosci Biotechnol Biochem* **1998**, *62*, 1152-1156.
432. Stewart, T.S.; Hruby, D.E.; Sharma, O.K.; Roberts, W.K. *Biochim Biophys Acta* **1977**, *479*, 31-38.
433. Roberts, W.K.; Stewart, T.S. *Biochemistry* **1979**, *18*, 2615-2621.
434. Coleman, W.H.; Roberts, W.K. *Biochim Biophys Acta* **1981**, *654*, 57-66.
435. Reisbig, R.R.; Bruland, O. *Biochem Biophys Res Commun* **1983**, *114*, 190-196.
436. Massiah, A.J.; Hartley, M.R. *Planta* **1995**, *197*, 633-640.
437. Di Fonzo, N.; Hartings, H.; Brembilla, M.; Motto, M.; Soave, C.; Navarro, E.; Palau, J.; Rhode, W.; Salamini, F. *Mol Gen Genet* **1988**, *212*, 481-487.
438. Di Fonzo, N.; Manzocchi, L.; Salamini, F.; Soave, C. *Planta* **1986**, *167*, 587-594.

439. Bass, H.W.; Krawetz, J.E.; OBrian, G.R.; Zinselmeier, C.; Habben, J.E.; Boston, R.S. *J Exp Bot* **2004**, *55*, 2219-2233.
440. Bass, H.W.; OBrian, G.R.; Boston, R.S. *Plant Physiol* **1995**, *107*, 661-662.
441. Hey, T.D.; Hartley, M.; Walsh, T.A. *Plant Physiol* **1995**, *107*, 1323-1332.
442. Cammue, B.P.; Peeters, B.; Peumans, W.J. *Biochem J* **1985**, *227*, 949-955.
443. Kumar, M.A.; Timm, D.E.; Neet, K.E.; Owen, W.G.; Peumans, W.J.; Rao, A.G. *J Biol Chem* **1993**, *268*, 25176-25183.
444. Endo, Y.; Oka, T.; Tsurugi, K.; Franz, H. *FEBS Lett* **1989**, *248*, 115-118.
445. Mishra, V.; Bilgrami, S.; Sharma, R.S.; Kaur, P.; Yadav, S.; Krauspenhaar, R.; Betzel, C.; Voelter, W.; Babu, C.R.; Singh, T.P. *J Biol Chem* **2005**, *280*, 20712-20721.
446. Mishra, V.; Ethayathulla, A.S.; Sharma, R.S.; Yadav, S.; Krauspenhaar, R.; Betzel, C.; Babu, C.R.; Singh, T.P. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2004**, *60*, 2295-2304.
447. Mishra, V.; Sharma, R.S.; Yadav, S.; Babu, C.R.; Singh, T.P. *Arch Biochem Biophys* **2004**, *423*, 288-301.
448. Ziska, P.; Franz, H.; Kindt, A. *Experientia* **1978**, *34*, 123-124.
449. Franz, H.; Ziska, P.; Kindt, A. *Biochem J* **1981**, *195*, 481-484.
450. Stirpe, F.; Legg, R.F.; Onyon, L.J.; Ziska, P.; Franz, H. *Biochem J* **1980**, *190*, 843-845.
451. Luther, P.; Theise, H.; Chatterjee, B.; Karduck, D.; Uhlenbruck, G. *Int J Biochem* **1980**, *11*, 429-435.
452. Olsnes, S.; Stirpe, F.; Sandvig, K.; Pihl, A. *J Biol Chem* **1982**, *257*, 13263-13270.
453. Franz, H. *Oncology* **1986**, *43 Suppl 1*, 23-34.
454. Jung, M.L.; Baudino, S.; Ribereau-Gayon, G.; Beck, J.P. *Cancer Lett* **1990**, *51*, 103-108.
455. Sweeney, E.C.; Tonevitsky, A.G.; Palmer, R.A.; Niwa, H.; Pfueller, U.; Eck, J.; Lentzen, H.; Agapov, I.I.; Kirpichnikov, M.P. *FEBS Lett* **1998**, *431*, 367-370.
456. Eck, J.; Langer, M.; Mockel, B.; Baur, A.; Rothe, M.; Zinke, H.; Lentzen, H. *Eur J Biochem* **1999**, *264*, 775-784.
457. Yoon, T.J.; Yoo, Y.C.; Kang, T.B.; Shimazaki, K.; Song, S.K.; Lee, K.H.; Kim, S.H.; Park, C.H.; Azuma, I.; Kim, J.B. *Cancer Lett* **1999**, *136*, 33-40.
458. Das, M.K.; Sharma, R.S.; Mishra, V. *Int J Biol Macromol* **2011**, *49*, 1096-1103.
459. Park, C.H.; Lee, D.W.; Kang, T.B.; Lee, K.H.; Yoon, T.J.; Kim, J.B.; Do, M.S.; Song, S.K. *Mol Cells* **2001**, *12*, 215-220.

460. Kang, T.B.; Song, S.K.; Yoon, T.J.; Yoo, Y.C.; Lee, K.H.; Her, E.; Kim, J.B. *J Biochem Mol Biol* **2007**, *40*, 959-965.
461. Park, W.B.; Han, S.K.; Lee, M.H.; Han, K.H. *Arch Pharm Res* **1997**, *20*, 306-312.
462. Lyu, S.Y.; Park, S.M.; Choung, B.Y.; Park, W.B. *Arch Pharm Res* **2000**, *23*, 592-598.
463. Li, Y.; Jia, Y.; Zhang, Z.; Chen, X.; He, H.; Fang, R.; Hao, X. *J Integr Plant Biol* **2007**, *49*, 1327-1333.
464. Sharma, N.; Park, S.W.; Vepachedu, R.; Barbieri, L.; Ciani, M.; Stirpe, F.; Savary, B.J.; Vivanco, J.M. *Plant Physiol* **2004**, *134*, 171-181.
465. Sismindari. *Majalah Farmasi Indonesia* **2004**, *15*, 44-49.
466. Kraskal, N. Ueber *Agrostemma githago*. Dissertation Universität Dorpat, 1891.
467. Lewin, L. *Agrostemma githago* L. Gifte und Vergiftungen. In *Lehrbuch der Toxikologie*, Karl F. Haug Verlag Ulm: 1928; Vol. 5, pp 649-650.
468. Hebestreit, P. Untersuchungen zum Synergismus von Saponinen und Toxinen bei in vitro kultivierten Säugetierzellen. Humboldt-Universität Berlin, Berlin, 2004.
469. Siepmann, C.; Bader, G.; Hiller, K.; Wray, V.; Domke, T.; Nimtz, M. *Planta Med* **1998**, *64*, 159-164.
470. Laemmli, U.K. *Nature* **1970**, *227*, 680-685.
471. Bjork, I.; Petersson, B.A.; Sjoquist, J. *Eur J Biochem* **1972**, *29*, 579-584.
472. Rosenfeld, J.; Capdevielle, J.; Guillemot, J.C.; Ferrara, P. *Anal Biochem* **1992**, *203*, 173-179.
473. Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mann, M. *Anal Chem* **1996**, *68*, 850-858.
474. Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B. Massenspektren. In *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 2005; Vol. 7, p 242 ff.
475. Suckau, D.; Resemann, A.; Schuerenberg, M.; Hufnagel, P.; Franzen, J.; Holle, A. *Anal Bioanal Chem* **2003**, *376*, 952-965.
476. Chomczynski, P.; Sacchi, N. *Anal Biochem* **1987**, *162*, 156-159.
477. Collins, F.S.; Morgan, M.; Patrinos, A. *Science* **2003**, *300*, 286-290.
478. Liu, L.; Li, Y.; Li, S.; Hu, N.; He, Y.; Pong, R.; Lin, D.; Lu, L.; Law, M. *J Biomed Biotechnol* **2012**, *2012*, 251364.
479. Mardis, E.R. *Trends Genet* **2008**, *24*, 133-141.
480. <http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html>
481. Ewing, B.; Green, P. *Genome Res* **1998**, *8*, 186-194.

482. <https://www.zedat.fu-berlin.de/HPC/Soroban>
483. Kearse, M.; Moir, R.; Wilson, A.; Stones-Havas, S.; Cheung, M.; Sturrock, S.; Buxton, S.; Cooper, A.; Markowitz, S.; Duran, C., *et al. Bioinformatics* **2012**, *28*, 1647-1649.
484. Hersh, R.T.; Kubo, R.T.; Leslie, G.A.; Benedict, A.A. *Immunochemistry* **1969**, *6*, 762-765.
485. Roepstorff, P.; Fohlman, J. *Biomed Mass Spectrom* **1984**, *11*, 601.
486. Papayannopoulos, I.A. *Mass Spectrometry Reviews* **1995**, *14*, 49-73.
487. Legname, G.; Bellosta, P.; Gromo, G.; Modena, D.; Keen, J.N.; Roberts, L.M.; Lord, J.M. *Biochim Biophys Acta* **1991**, *1090*, 119-122.
488. Fordham-Skelton, A.P.; Taylor, P.N.; Hartley, M.R.; Croy, R.R. *Mol Gen Genet* **1991**, *229*, 460-466.
489. Goujon, M.; McWilliam, H.; Li, W.; Valentin, F.; Squizzato, S.; Paern, J.; Lopez, R. *Nucleic Acids Res* **2010**, *38*, W695-699.
490. Angers-Loustau, A.; Rainy, J.; Wartiovaara, K. *BMC Molecular Biology* **2007**, *8*, 77.
491. Petersen, T.N.; Brunak, S.; von Heijne, G.; Nielsen, H. *Nat Meth* **2011**, *8*, 785-786.
492. Weng, A.; Thakur, M.; Beceren-Braun, F.; Bachran, D.; Bachran, C.; Riese, S.B.; Jenett-Siems, K.; Gilabert-Oriol, R.; Melzig, M.F.; Fuchs, H. *Mol Oncol* **2012**, *6*, 323-332.
493. Heisler, I.; Keller, J.; Tauber, R.; Sutherland, M.; Fuchs, H. *Int J Cancer* **2003**, *103*, 277-282.

## 8 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Foto von <i>Agrostemma githago</i> im Juni.	25
<b>Abb. 2:</b> Reaktion der NHS-aktivierten Agarose mit primären Aminen.	44
<b>Abb. 3:</b> Darstellung der Sequenzierungsprozesse im Illumina MiSeq™ V3.	53
<b>Abb. 4:</b> Schematische Gegenüberstellung von reads und Contig.	54
<b>Abb. 5:</b> Schematische Darstellung der sechs verschiedenen Möglichkeiten des reading frames einer DNA-Sequenz.	55
<b>Abb. 6:</b> Schematische Darstellung der Abläufe bei der bioinformatischen Auswertung der RNA-Seq-Rohdaten.	56
<b>Abb. 7:</b> Schematische Darstellung einer mRNA.	60
<b>Abb. 8:</b> Schematische Darstellung der 3'RACE-PCR.	61
<b>Abb. 9:</b> Schematische Darstellung der 5'RACE-PCR.	64
<b>Abb. 10:</b> SDS-PAGE-Gel der aufgereinigten Antikörper.	70
<b>Abb. 11:</b> Western Blot der anti-Agrostin Antikörper in unterschiedlichen Verdünnungen mit Agrostin <sub>sigma</sub> (1 mg/mL) (II), 1:10-Extrakt (III) und 1:1-Extrakt (IV).	72
<b>Abb. 12:</b> Western Blot der anti-Agrostin Ak mit diversen Proteinproben.	72
<b>Abb. 13:</b> Western Blot diverser Proteinproben mit den anti-Peptid Ak.	73
<b>Abb. 14:</b> SDS-PAGE-Gel des isolierten Proteins aus einem wässrigen Extrakt mit den anti-Agrostin Ak.	74
<b>Abb. 15:</b> SDS-PAGE-Gel des isolierten Proteins aus einem wässrigen Extrakt mit den anti-Peptid Ak.	75
<b>Abb. 16:</b> Echtzeit-Untersuchung der Zytotoxizität des isolierten Agrostins in Kombination mit dem Saponin SO1861.	76
<b>Abb. 17:</b> Gesamtmasse des isolierten Agrostins in vier Messungen.	78

<b>Abb. 18:</b> MS Fingerprint Trypsin-Verdau.	79
<b>Abb. 19:</b> Schematische Darstellung eines Peptids bestehend aus drei Aminosäuren und die möglichen Ionen, die bei der Fragmentierung daraus entstehen könnten.	80
<b>Abb. 20:</b> MS/MS-Spektrum des Peptidfragmentes $m/z = 1462.77$ .	81
<b>Abb. 21:</b> Vergleich der MS/MS-Spektren von den Peptidfragmenten $m/z = 1462.77$ und $m/z = 1488.79$ .	83
<b>Abb. 22:</b> Blüten und Samenanlagen von <i>Agrostemma githago</i> zu verschiedenen Entwicklungsstadien.	88
<b>Abb. 23:</b> Western Blot der Extrakte der verschiedenen Entwicklungsstadien mit anti-Agrostin Ak zur Detektion des Agrostins.	89
<b>Abb. 24:</b> Agarosegel der isolierten RNA.	90
<b>Abb. 25:</b> Contig nach der bioinformatischen Auswertung für die Agrostin-Sequenz in Genious (Version 8.1.5).	91
<b>Abb. 26:</b> Erste Konsensussequenz für das Agrostin.	92
<b>Abb. 27:</b> Aminosäuresequenz der ersten Konsensussequenz für das Agrostin.	92
<b>Abb. 28:</b> Zuordnung der Konsensussequenz zur RIP-Superfamilie.	93
<b>Abb. 29:</b> BLAST-Ergebnis der ersten Konsensussequenz.	93
<b>Abb. 30:</b> Alignments der Peptidfragmente mit der ersten Konsensussequenz.	94
<b>Abb. 31:</b> Zweite Konsensussequenz = RNA-Seq-Sequenz.	96
<b>Abb. 32:</b> Alignment des Peptidfragmentes $m/z = 1361.78$ mit der neuen Konsensussequenz.	96
<b>Abb. 33:</b> Theoretische Spaltstelle einer Signalsequenz von der neuen Konsensussequenz.	99
<b>Abb. 34:</b> Aminosäuresequenz des Agrostins.	99
<b>Abb. 35:</b> Zuordnung der RNA-Seq-Sequenz zur RIP-Superfamilie.	101

<b>Abb. 36:</b> BLAST-Ergebnis der neuen Konsensussequenz.	101
<b>Abb. 37:</b> Multiple Alignment der Typ 1 RIPs der Caryophyllaceae-Arten, Agrostin (= RNA-Seq-Sequenz) und Bouganin.	102
<b>Abb. 38:</b> Nukleotidsequenz des Agrostins als Vorlage für die bei der Reverse Transkriptase und RACE-PCR verwendeten Primer.	105
<b>Abb. 39:</b> Agarose-Gele der 3'RACE-PCR-Produkte (A) und 5'RACE-Produkte (B).	106
<b>Abb. 40:</b> Alignment der Agrostin-Sequenz mit dem 3'RACE-PCR Produkt.	107
<b>Abb. 41:</b> DNA-Konstrukt des Agrostins.	109
<b>Abb. 42:</b> Agarosegele des PCR-Klonierungs-Produktes (A), der Plasmid-Aufreinigung nach Ligation in den pJET-Vektor (B) und des Verdau des aufgereinigten Vektors (C).	110
<b>Abb. 43:</b> Alignment des Sequenzierungsergebnisses des pJET-Vektors aus Kolonie 3 mit der Sequenz des Klonierungs-PCR-Produktes.	112
<b>Abb. A1:</b> Dot Blot einer Verdünnungsreihe von Agrostin <sub>Sigma</sub> mit drei unterschiedlichen Verdünnungen der anti-Agrostin Ak.	116
<b>Abb. A2:</b> Dot Blot von Agrostin <sub>Sigma</sub> , Peptid, isoliertes Agrostin und Extrakt mit unterschiedlichen Verdünnungen der anti-Peptid Ak.	116
<b>Abb. A3:</b> Western Blot von anti-Saporin Ak mit diversen Proteinen.	117
<b>Abb. A4:</b> MS/MS-Spektrum des Peptidfragmentes m/z = 794.37, Trypsin-Verdau.	117
<b>Abb. A5:</b> MS/MS-Spektrum des Peptidfragmentes m/z = 817.44, Trypsin-Verdau.	118
<b>Abb. A6:</b> MS/MS-Spektren der Peptidfragmente m/z = 876.51 (oberes Spektrum) und m/z = 1004.63 (unteres Spektrum), Trypsin-Verdau.	118
<b>Abb. A7:</b> MS/MS-Spektrum des Peptidfragmentes m/z = 1117.65, Trypsin-Verdau.	119
<b>Abb. A8:</b> MS/MS-Spektrum des Peptidfragmentes m/z = 1361.78, Trypsin-Verdau.	119
<b>Abb. A9:</b> MS/MS-Spektrum des Peptidfragmentes m/z = 1565.85, Trypsin-Verdau.	120
<b>Abb. A10:</b> MS/MS-Spektrum des Peptidfragmentes m/z = 1693.88, Trypsin-Verdau.	120



- Abb. A11:** Vergleich der MS/MS-Spektren der Peptidfragmente  $m/z = 1693.88$  und  $m/z = 1709.87$ , Teil 1. 121
- Abb. A12:** Vergleich der MS/MS-Spektren der Peptidfragmente  $m/z = 1693.88$  und  $m/z = 1709.87$ , Teil 2. 121
- Abb. A13:** MS/MS-Spektrum des Peptidfragmentes  $m/z = 1997.12$ , Trypsin-Verdau, Teil 1 (bis 1050). 122
- Abb. A14:** MS/MS-Spektrum des Peptidfragmentes  $m/z = 1997.12$ , Trypsin-Verdau, Teil 2 (ab 1050). 122
- Abb. A15:** MS/MS-Spektrum des Peptidfragmentes  $m/z = 853.42$ , AspN-Verdau. 123
- Abb. A16:** MS/MS-Spektrum des Peptidfragmentes  $m/z = 1570.91$ , AspN-Verdau. 123
- Abb. A17:** Absorptionskurve der RNA-Probe I aus Kap. 4.4.2 für die Konzentrationsbestimmung. 124
- Abb. A18:** Kolonien der Klone nach Ligation des Klonierungs-PCR-Produktes in den pJET-Vektor. 124

## 9 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1.</b> Übersichtstabelle der RIPs und RIP ähnlichen Proteine	6
<b>Tabelle 2.</b> Zusammensetzung des Polyacrylamidgels	39
<b>Tabelle 3.</b> Eingesetzte Volumina der Puffer für die Antikörper-Isolierung mit Protein A	43
<b>Tabelle 4.</b> Reverse Transkriptase zur Generierung von Oligo(dT)-cDNA und GSP-cDNA	57
<b>Tabelle 5.</b> Eingesetzte Volumina der Reaktionspartner der Klonierungs-PCR	59
<b>Tabelle 6.</b> Reaktionsbedingungen der Klonierungs-PCR im T1 Thermocycler	60
<b>Tabelle 7.</b> Eingesetzte Volumina der Reaktionspartner der 3'RACE-PCR und nested PCR	62
<b>Tabelle 8.</b> Reaktionsbedingungen der 3'RACE-PCR, 5'RACE-PCR und nested PCR im T1 Thermocycler	62
<b>Tabelle 9.</b> Eingesetzte Volumina der Reaktionspartner der 5'RACE-PCR und nested PCR	63
<b>Tabelle 10:</b> b-Ionen und y-Ionen des Peptidfragmentes $m/z = 1462.77$ und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz	82
<b>Tabelle 11:</b> Zusammenfassung der ermittelten Aminosäuresequenzen	84
<b>Tabelle 12:</b> Theoretisch ermittelte Massen der Typ 1 RIPs mit bekannter Sequenz von Caryophyllaceae-Arten	85
<b>Tabelle 13:</b> Sequenzhomologien der Typ 1 RIPs der Caryophyllaceae-Arten	86
<b>Tabelle 14:</b> Eingesetzte Mengen des Pflanzenmaterials der verschiedenen Entwicklungsstadien für die Extrakterstellung	87
<b>Tabelle 15:</b> Konzentrationen der RNA-Proben	90
<b>Tabelle 16:</b> Zusammenfassung der Sequenzunterschiede der Peptidfragmente und Konsensussequenz	95
<b>Tabelle 17:</b> Aminosäurezusammensetzung der Agrostin-Sequenz	100

<b>Tabelle 18:</b> Sequenzhomologien der Typ 1 RIPs der Caryophyllaceae-Arten mit Agrostin und Bouganin	103
---	-----

## 10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Matthias F. Melzig möchte ich für die Überlassung des Themas und die stets freundliche Unterstützung danken.

Herrn Prof. Dr. Hendrik Fuchs danke ich für das Zweitgutachten und die Möglichkeit in den Laboren seines Arbeitskreises arbeiten zu können. Für Letzteres möchte ich mich selbstverständlich auch bei den Mitgliedern dieses Arbeitskreises bedanken.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Kunze und Herrn Dr. Alexis Kasaras möchte ich für die Unterstützung in den molekularbiologischen Methoden danken.

Herrn Dr. Christoph Weise danke ich für die langjährige Kooperation und für seine Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der MALDI-TOF.

Frau Dr. Camila Mazzoni möchte ich für die Koordinierung der Auswertung der RNA-Seq-Daten danken. Marie und Max danke ich für die gemeinsame bioinformatische Auswertung dieser Daten.

Frau Dr. Regina Schenk danke ich für die Anzucht der Kornrade.

Dr. Alexander Weng danke ich für seine zahlreichen Tipps und anregenden Diskussionen, sowie für sein stetes Interesse an dieser Arbeit.

Meinem Arbeitskreis möchte ich für die entspannte Stimmung danken und hierbei möchte ich mich ganz besonders bei Frau Cornelia Görick für die zahlreichen Gespräche und ihren großen Erfahrungsschatz bedanken.

Meiner Familie danke ich für die mentale Unterstützung.

Einem ganz besonderen Menschen danke ich, dass es ihn gibt.

## **11 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, den

Joachim Schrot