

**Molekularbiologische Charakterisierung des Gens für die pflanzliche
Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase als Auxin-bindendes Protein ABP₄₄ aus *Pisum
sativum* L.**

Vom Fachbereich Biologie der Universität Hannover
zum Erlangen des Grades
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN
- Dr. rer. nat.-
genehmigte Dissertation

Von
Dipl. Biol. Viktoria Janke
geboren am 13.05.1965
in Alma-Ata/Kasachstan

2000

Referent: Prof. Dr. Hans-Jörg Jacobsen

Korreferent: Prof. Dr. Walter Müller

Tag der Promotion: 06.06.2000

Abstract

The present thesis describes the molecular characterization of a novel plant isovaleryl-CoA dehydrogenase (IVD) from pea, originally identified as the auxin binding protein ABP₄₄. The protein was isolated from apex tissues from 5 to 7 days old etiolated pea seedlings and characterized as a single band in 2D-electrophoresis.

The N-terminal microsequencing revealed 21 amino acids. An internal microsequencing of ABP₄₄ rendered 14 amino acids.

Microsequencing data from highly purified pea ABP₄₄ was used to derive degenerated primers for the amino terminus and the internal fragment for a PCR-based screening of cDNA prepared from 3 day old etiolated pea seedlings. The amplified PCR products obtained using the degenerate primers were subcloned and sequenced and a 450bp fragment was identified which contained regions corresponding to the amino acid sequences obtained by microsequencing. A modified 5'- and 3'-RACE procedure was then employed to identify a full cDNA sequence of ABP₄₄ from pea. The cDNA nucleotide sequence contains a 102bp 5'- untranslated region (5'-UTR), a 1224bp translated region and 247bp 3'- untranslated region (3'-UTR). The 1224bp nucleotides of the translated region are coding for the 408 amino acids of the preliminary protein. A consensus mitochondrial targeting leader peptide of 24 amino acids could be identified. The sequence was published in the EMBL database under Acc. Number AJ010945.

Pea ABP₄₄ is 58% homologous to isovaleryl-CoA dehydrogenase (IVD) from *C. elegans*, and 60% homologous to the human and rat enzymes, and 83% homologous to a putative IVD from *Arabidopsis thaliana*.

From the genomic DNA a 3.6kb PCR fragment was obtained and sequenced. The sequenced area obtained 3542bp and was published in the EMBL database under Acc. number AJ010946. The pea IVD gene consists of 13 exons and 12 introns, with exon sizes ranging from 41bp to 205bp and intron sizes ranging from 71bp to 549bp.

Key words: auxin-binding protein (ABP), isovaleryl-CoA dehydrogenase, pea

Kurzfassung

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die molekularbiologische Analyse des Gens für das Auxin-bindende Protein ABP₄₄ aus *Pisum sativum* L..

Dieses Protein wurde 1992 isoliert und als Auxin-bindend identifiziert. Das Protein konnte nur aus dem Apex von max. 5- bis 7-Tage alten Erbsenkeimlingen isoliert werden.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde das Protein in einer für die Mikrosequenzierung ausreichenden Menge isoliert. Die Reinheit der aufgereinigten Proteinprobe wurde mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese bestätigt. Es wurden N-terminale und interne Microsequenzierungen des Proteins ABP₄₄ durchgeführt. Die N-terminale Microsequenz bestand aus 21 Aminosäuren. Die interne Microsequenz des Proteins bestand aus 14 Aminosäuren. Aus beiden Microsequenzen wurden die degenerierten Primer abgeleitet, welche anschließend für das Durchmustern der cDNA-Banken eingesetzt wurden.

Das Durchmustern der doppelsträngigen cDNA mittels PCR führte zu der Amplifikation eines 450bp großen PCR-Fragments. Die anschließende Analyse der Sequenz ergab, daß es sich um eine partielle cDNA für das Protein ABP₄₄ handelte. Die Charakterisierung der cDNA-Sequenzen aus den flankierenden 5'- und 3'-Regionen erfolgte mittels modifizierter RACE-PCR. Die vollständige cDNA-Sequenz umfaßt 1573bp. In der aus der cDNA-Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz finden sich die kompletten experimentell gewonnenen Mikrosequenzen des Auxin-bindenden-Protein ABP₄₄ wieder. Die Sequenz wurde in der EMBL Datenbank unter Acc.-Nr. AJ010945 publiziert.

Die Nukleotidsequenz der IVD-cDNA aus Erbse besteht aus der 102bp-langen 5'-untranslatierten Region (5'-UTR), der 1224bp umfassenden translatierten Region sowie der 247bp-langen 3'-untranslatierten Region (3'-UTR).

Die 1224 Nukleotide der translatierten Region der cDNA-Sequenz kodieren für die 408 Aminosäuren lange Sequenz des Vorläufer-Proteins. Das unmittelbar nach der N-terminalen Mikrosequenz in 5'-Richtung identifizierte Peptid besteht 24 Aminosäuren und entspricht den Anforderungen eines mitochondrialen Signalpeptids. Es konnte eine Homologie zu der Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase (IVD) aus Ratte von 60%, zu menschlicher IVD von 60%, zu einer putativen IVD aus *Arabidopsis thaliana* von 83%, zur IVD aus *Caenorhabditis elegans* von 58% festgestellt werden.

Aus der genomischen DNA wurde ein 3,6kb großes PCR-Produkt erhalten. Der sequenzierte Bereich umfaßte 3542 Nukleotide. Die ermittelte Sequenz wurde in der EMBL Datenbank unter Acc.-Nr. AJ010946 publiziert.

Das IVD-Gen besteht aus 13 Exons, deren Sequenzen von 12 Introns unterbrochen wurden. Die Größe der Exons erstreckt sich von 41bp für bis 205bp, die Größe der Introns der Erbsen-IVD liegt zwischen 71bp und 549bp.

Stichwörter: Auxin-bindendes Protein (ABP), Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase, Erbse.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
1.1 Auxine und auxin-bindende Proteine	1
1.2 Das auxin-bindende Protein ABP ₄₄	3
1.3 Acyl-CoA-Dehydrogenasen-Familie	4
1.4 Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase	6
1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	8
 II. Material und Methoden	 9
1. Material	9
1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	9
1.2 Verwendete Enzyme	9
1.3 Verwendete Vektoren	10
1.4 Verwendete Oligonukleotide	10
1.5 Verwendete Bakterienstämme	11
1.6 Größenmarker	11
1.7 Verwendete Kits	12
1.8 Pflanzenmaterial	12
2. Methoden	13
2.1 Sterilisation von Lösungen und Geräten	13
2.2 Pflanzenanzucht	13
2.3 Biochemische Methoden	13
2.3.1 Proteinaufreinigung	13
2.3.1.1 Herstellung eines Proteinrohextraktes aus Erbse	13
2.3.1.2 Gewinnung des pflanzlichen Fusionsproteins aus <i>E. coli</i>	14
2.3.2 Affinitätschromatographische Verfahren	15
2.3.2.1 Kopplung von Liganden an Epoxy-aktivierte Sepharose 6b	15
2.3.2.2 Affinitätschromatographie	16
2.3.3 Fällungsmethoden	17
2.3.3.1 Ammoniumsulfatfällung	17
2.3.3.2 Methanol-Aceton-Fällung	18
2.3.3.3 TCA-Fällung	18
2.3.4 Elektrophorese-Verfahren	18
2.3.4.1 SDS-Gelelektrophorese	18
2.3.4.2 Native Gelelektrophorese	20
2.3.5 Protein-Färbemethoden	21

2.3.5.1	Proteinbestimmung	21
2.3.5.2	Coomassie-Färbung	21
2.3.5.3	Silberfärbung	21
2.3.6	Western-Blot	22
2.3.7	Cystein-Derivatisierung	22
2.3.8	Aminosäure-Sequenzierung des Proteins	23
2.3.8.1	N-terminale Aminosäure-Sequenzanalyse	23
2.2.2.2	Sequenzierung von Spaltpeptiden nach Endoproteinase Lys-C-Verdau	23
2.4	Datenbankrecherchen	24
2.5	Molekularbiologische Methoden	25
2.5.1	Absorptionsmessung	25
2.5.2	Trübungsmessung	25
2.5.3	Agarosegelelektrophorese	25
2.5.4	Bakterienkulturen	26
2.5.4.1	Verwendete Nährmedien	26
2.5.4.2	Anlegen von Dauerkulturen	27
2.5.4.3	Anzucht von Bakterien aus Dauerkulturen	27
2.5.5	Isolierung der Gesamt-RNA	27
2.5.6	cDNA-Bank-Herstellung	27
2.5.6.1	Bestimmung des Phagentiters-(Grobtitrierung)	27
2.5.6.2	Bestimmung des Phagentiters-(Feintitrierung)	28
2.5.6.3	Amplifizierung der Phagenbank	28
2.5.6.4	Herstellung von präparativen Flüssiglysaten	28
2.5.7	Präparation und Aufreinigung von DNA	29
2.5.7.1	Lambda-DNA Mini-Präparation	29
2.5.7.2	Präparation von Plasmid-DNA	30
2.5.7.3	Isolierung genomischer Pflanzen-DNA	31
2.5.7.4	Ethanol-Fällung	32
2.5.7.5	Isopropanol-Fällung	32
2.5.7.6	PEG-Fällung	33
2.5.7.7	Phenol-Chloroform-Extraktion	33
2.5.7.8	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	33
2.5.7.9	Aufreinigung von PCR-Produkten	33
2.5.8	Enzymatische Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen ...	34
2.5.9	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	34
2.5.9.1	Kolonie-PCR	35
2.5.9.3	Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR)	35

2.5.10	Klonierung von DNA-Fragmenten	36
2.5.10.1	T-Vektor Klonierung	36
2.5.10.2	Dephosphorylierung von linearisierten Plasmiden	37
2.5.10.3	Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA	38
2.5.11	Herstellung transformationskompetenter Zellen	38
2.5.12	Transformation	39
2.5.12.1	Transformation von Bakterien	39
2.5.12.2	Transformation von Blättern mittels Partikelbombardement	39
2.5.13	Sequenzierung	41
2.5.14	Sequenzanalyse	41
III.	Ergebnisse.....	42
3.1	Reinigung des 44kDa-Proteins mittels Affinitätschromatographie.....	42
3.2	2-D Gelelektrophorese	43
3.3	Reinigung für die Aminosäure-Sequenzanalyse	44
3.4	Aminosäure-Sequenzanalyse	45
3.5	Sequenzhomologie-Vergleiche	46
3.6	PCR- basierendes „Screening“ der cDNA-Banken aus Erbse	46
3.6.1	Primererstellung	46
3.6.2	Gewinnung der Phagen-DNA	47
3.3.3	Klonierung des amplifizierten 600bp großen cDNA-Fragments	47
3.3.4	Sequenzierung des 600bp PCR-Fragments	50
3.7	Herstellung der cDNA-Bank	51
3.7.1	Isolierung der Gesamt-RNA aus etiolierten Erbsenkeimlingen .	51
3.7.2	cDNA-Synthese	52
3.8	Identifizierung der partiellen cDNA des Proteins ABP ₄₄ mit Hilfe der PCR	54
3.8.1	PCR-gestütztes „Screening“ der hergestellten Phagen-Bank	54
3.8.2	PCR-gestütztes „Screening der ds cDNA	55
3.8.3	Klonierung der PCR-Produkte	56
3.8.4	Sequenzierung der klonierten PCR-Produkte	57
3.9	RACE-PCR-Experimente	59
3.9.1	5'-RACE	59
3.9.2	3'-RACE	61
3.10	Klonierung der vollständigen IVD-cDNA	62
3.10.1	Identifizierung der vollständigen cDNA mittels PCR	62
3.10.2	Sequenzierung und Sequenzanalyse der IVD-cDNA	63
3.10.3	Homologievergleich	66

3.11	Klonierung des Gens für Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase aus <i>Pisum sativum</i> L.	68
3.11.1	Identifizierung eines genomischen Klons für IVD aus <i>Pisum sativum</i> L.	68
3.11.2	Nukleotidsequenz des IVD-Gens aus Erbse	69
3.11.3	Exon-/Intronübergänge	73
3.12	Expression der rekombinanten IVD in <i>E. coli</i>	74
3.12.1	Klonierung der IVD-cDNA in pET-Vektor	74
3.12.2	Nachweis der Expression der rekombinanten IVD in <i>E. coli</i>	77
3.13	Zelluläre Lokalisation der Signal-Peptid-Expression	78
3.13.1	Klonierung der für das Signal-Peptid kodierenden cDNA-Sequenz in pCATgfp-Vektor	78
3.13.2	Transformation von Blättern verschiedener Pflanzen mittels Partikelbombardement	80
VI.	Diskussion	82
4.1	Isolierung des auxin-bindenden Proteins ABP ₄₄	82
4.2	Aminosäuresequenzanalyse des auxin-bindenden Proteins ABP ₄₄	83
4.3	PCR-gestütztes Durchmustern der cDNA-Banken aus <i>Pisum sativum</i> L.	84
4.4	Identifizierung der cDNA von ABP ₄₄ mittels PCR	88
4.5	Sequenzanalyse der gesamten cDNA- und daraus resultierende Aminosäuresequenz	90
4.6	Identifizierung des Gens für Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase aus <i>Pisum sativum</i> L.....	94
V.	Zusammenfassung	97
VI.	Literatur	99

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
BCAD	2-Methyl-Branched Chain Acyl-CoA-Dehydrogenase
ABP	Auxin-bindendes Protein
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APP	Apurin/Purin
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AS	Ammoniumsulfat
bp	Basenpaar
C	Cytosin
cpm	Counts per minute (Zerfälle pro Minute)
cDNA	copy (komplementäre) DNA
2-D	zweidimensional
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxy-Essigsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DIECA	Diethyldithiocarbonat
dH ₂ O	Wasser (Aqua bidest)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fa.	Firma
G	Guanin
GFP	Green Fluorescence Protein
IAA	Indolyllessigsäure
IPS	Impulse pro Sekunde
IPTG	Isopropyl-β-D-galactopyranosid
IVD	Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase
kbp	Kilobasenpaare
LB	Luria Bertani Vollmedium
LCAD	Long Chain Acyl-CoA-Dehydrogenase
kDa	Kilodalton
LM	low melting (niedrig schmelzend)

Lys-C	Endoproteinase Lys-C
MCAD	Medium Chain Acyl-CoA-Dehydrogenase
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
N	Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin
NaAc	Natriumacetat
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
p	Plasmid
p.A.	pro Analysis
P/C/I	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaction)
PEG	Polyethylenglycol
pfu	Plaque forming Units
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
R	Purine
RNA	Ribonucleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
upm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SCAD	Short Chain Acyl-CoA-Dehydrogenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Sodium Saline Citrate
TAE	Tris-Acetate-EDTA
T	Thymin
TCA	„tri-chloro-acetic-acid“; Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(Hydroxyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Puffer
U	Unit (Enzymeinheit)
ÜN	Übernacht
ÜNK	Übernachtskultur
UV	Ultraviolett
Vol.	Volumen

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

v/v	Volumenanteile/Volumen (bei Prozentangaben)
w/v	gewichtanteile/Volumen (bei Prozentangaben)
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-D-Galactopyranosid
Y	Pyrimidine

I. Einleitung

Pflanzliche Wachstums- und Differenzierungsprozesse werden durch zahlreiche endogene und exogene Faktoren gesteuert. Die externe Steuerung des Wachstums erfolgt durch verschiedene Reize, wie Lichtintensität, Schwerkraft und Wasserangebot. Intern sind an diesen Prozessen in vielen Fällen die Phytohormone beteiligt. Diese Hormone werden in die Gruppen der Auxine, Gibbereline, Cytokinine, Abscisinsäure, Ethylen, Jasmoate und Brassicasteroide eingeteilt. Phytohormone werden von bestimmten Geweben der Pflanze, wo ihre Produktion stattfindet, zu ihren Wirkorten transportiert. Sie rufen eine Vielzahl an Effekten in den verschiedenen Entwicklungsstadien in verschiedenen Geweben der unterschiedlichen Spezies hervor.

1.1 Auxine und Auxin-bindende Proteine

Das am weitesten verbreitete natürlich vorkommende Auxin ist die Indolylessigsäure (IAA). Sie wurde bereits 1933 beschrieben und chemisch charakterisiert (Kögl, *et al.*, 1933). Dieses Hormon kontrolliert verschiedene Bereiche des Wachstums von Pflanzen sowohl auf zellulärer Ebene als auch die Morphogenese auf Organebene.

Auxine sind an zahlreichen physiologischen Prozessen in der Pflanze beteiligt. So spielen sie bei Zelldifferenzierung, Apikaldominanz, Wurzelbildung sowie die Kontrolle der Zellteilung eine wesentliche Rolle (Chadwick und Garrod, 1986; Davies, 1987, Palme *et al.*, 1991). Aus diesem Grunde wird diese Gruppe der Phytohormone in einem weiten Rahmen in der Zell- und Gewebekultur zur Steuerung von Wachstumsprozessen eingesetzt. Dabei sind die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen praktisch unbekannt.

Neben den natürlich vorkommenden Auxinen, wie IAA oder 4-Cl-IAA, werden auch viele Substanzen beschrieben, die einige oder alle Auxinwirkungen verursachen.

Natürliche und die meisten synthetischen Auxine stellen lipophile (mit Ausnahme von 2,4D und Picloram) schwache Säuren dar. Sie werden von Pflanzenzellen akkumuliert (Rubery, 1981). Diese Akkumulation umfaßt die Diffusion freier Moleküle über die Membran der pflanzlichen Zelle. Die Fähigkeit der Auxine, in die Zelle diffundieren zu können, sowie die Vielzahl von Prozessen, die von diesen Hormonen kontrolliert werden, lassen vermuten, daß deren Wirkung über mehrere Signaltransduktionsketten vermittelt wird. Die Signaltransduktionswege, welche zu den unterschiedlichen Auxinreaktionen hinführen, sind noch unbekannt. Auch die Lokalisation der primären Erkennungsstelle für Auxine auf zellulärer Ebene wird immer noch diskutiert.

Analog zu tierischen Systemen wird eine Auxinwirkung sowohl über membrangebundene als auch über lösliche Rezeptorproteine postuliert (Jones, 1990; Napier und Venis, 1991; Venis

und Napier, 1991). Generell wird angenommen, daß die sog. schnellen Auxineffekte durch membranlokalisierte Auxin-bindende Proteine (mABPs), während die langsamen, morphogenetischen Effekte über lösliche Auxin-bindende Proteine (sABPs) vermittelt werden.

Das am besten charakterisierte Auxin-bindende Protein ABP1 wurde bereits 1985 beschrieben und es wurde ein Zusammenhang zwischen diesem Protein und Zellstreckungswachstum der äußeren Epidermisschicht postuliert (Löbner und Klämbt, 1985). Auxin-bindendes Protein ABP1, welches im Endoplasmatischen Reticulum (ER) und vermutlich in geringen Mengen auf der Plasmamembran lokalisiert ist, wurde aus Maiskoleoptilen isoliert und sequenziert (Inohara, *et al.*, 1989; Tillmann *et al.*, 1989; Hesse *et al.*, 1989; Walther, *et al.*, 1997; Review: MacDonald, 1997). Solche membranassoziierten Auxin-bindenden Proteine (mABPs) wurden seitdem in verschiedenen Pflanzen gefunden (Shimomura *et al.*, 1986; Venis, 1987; Shimomura *et al.*, 1988). Deren Gene sind identifiziert und charakterisiert worden (Hesse *et al.*, 1989; Inohara *et al.*, 1989). Die aktuellen Untersuchungen befassen sich mit der molekularbiologischen Charakterisierung homologer Gene aus anderen Spezies, wie *Arabidopsis thaliana* (Massotte, *et al.*, 1995), Erdbeere (Lazarus und MacDonald, 1996), Pfeffer (Choi, 1996) und Tabak (Leblanc, *et al.*, 1997). Dabei ist die physiologische Relevanz der ER-Lokalisation des ABP1 immer noch unverstanden (Tian, *et al.*, 1995).

Ein weiteres membranständiges ABP von 40-42kDa wurde mittels Photoaffinitätsmarkierung als Teil eines pH-abhängigen Auxin-Aufnahme-Symport beschrieben (Hicks, *et al.*, 1989).

Eine weitere Klasse bilden intrazelluläre (cytoplasmatische oder nukleäre), lösliche Auxin-bindende Proteine ("soluble Auxin-Binding Proteins", sABPs), welche in verschiedenen Geweben unterschiedlicher Pflanzenarten nachgewiesen wurden. So wurden die löslichen sABPs im Kallus-Gewebe aus Tabak (Oostrom *et al.*, 1980; v. d. Linde *et al.*, 1984; Libbenga, *et al.*, 1987), in Keimlingen der Mungobohnen (Sakai, *et al.*, 1986; Kikuchi, *et al.*, 1989), in Erbsenkeimlingen (Jacobsen, 1982; Jacobsen, 1984) und in Sojasuspensionskultur (Herber, *et al.*, 1988) beschrieben. Das von Sakai und Mitarbeitern beschriebene nukleäre Auxin-bindende Protein (ABP-II) stimuliert die IAA-abhängige Expression eines 18kDa Translationsproduktes. Jedoch weist dieses ABP-II eine geringe Affinität zu Auxin auf (Sakai, *et al.*, 1986). Es wurden außerdem noch eine Glutathion-abhängige Formaldehyd-Dehydrogenase mit einer geringen Affinität zu Auxin (Sugaya und Sakai, 1995) und die Auxin-induzierte Modulation der P-Typ ATPase aus Reis durch lösliche Faktoren beschrieben (Kim, *et al.*, 1997).

Aus den Untersuchungen bei Tabaksuspensionskulturen gab es Hinweise auf den Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Wachstumsstadien und der Veränderung im Rezeptorstatus (v. d. Linde, *et al.*, 1984). Es wurde auch ein nukleäres 65kDa Protein beschrieben, welches mittels antiidiotypischer Antikörper gegen IAA in vielen verschiedenen Pflanzenspezies nachgewiesen werden konnte (Prasad und Jones, 1991). Bei diesem Protein handelt es sich allerdings um eine Glutathion-S-Transferase (GST) (Jones, 1994 a), welche eine Funktion bei

der Entgiftung von Zellen hat (Wiegand, *et al.*, 1986). Die GSTs sind bereits mehrfach bei der Untersuchungen zu den Auxinwirkungen als Auxin-bindende Proteine (Bilang, *et al.*, 1993) sowie als Auxin-induzierte Gene (Droog, *et al.*, 1993) detektiert worden. Ihre physiologische Bedeutung blieb bis heute noch ungeklärt.

1.2 Das Auxin-bindende Protein ABP₄₄

Reinard konnte 1992 ein Auxin-bindendes Protein (ABP₄₄) isolieren und charakterisieren. Durch die Kombination von drei verschiedenen Nachweismethoden (Photoaffinitätsmarkierung mittels 3H-Azido-IAA, Gleichgewichtsdialyse-Bindungstest sowie Affinitätschromatographie mittels Auxin-gekoppelter Sepharose) konnte dieses 44kDa Protein als Auxin-bindend identifiziert werden. Dieses Protein erfüllte viele der Anforderungen an einem Auxinrezeptor, insbesondere bezüglich der Affinität und Spezifität (Reinard & Jacobsen, 1995; Reinard *et al.*, 1998). Höchste Affinitäten wurden für die sehr starken Auxinanaloga 1-NAA, 4-OH-PAA, Picloram und 2,4-D ermittelt. Die Auxinbindung von ABP₄₄ ist hochspezifisch für aktive Auxinanaloga, welche auch bei der Gewebekultur wegen ihrer starken Wirkung eingesetzt werden. Inaktive oder schwache aktive Analoga, wie Phenoxyessigsäure, oder Substanzen mit ähnlichen Molekülstrukturen, wie Tryptophan oder verschiedene Derivate der Benzoesäure, sowie Inhibitoren des Auxintransportes (2,3,5-Trijodbenzoesäure und 1-Naphthylphthalaminsäure) zeigten keine hochaffine Bindung an ABP₄₄. Affinitätschromatographien mit verschiedenen Liganden (4-OH-IAA, 4-OH-PAA, 4-OH-Benzoesäure) resultierten in der Aufreinigung des ABP₄₄, wenn 4-OH-IAA oder 4-OH-PAA verwendet wurden. Diese Liganden wiesen auch schon in Bindungstests eine hohe Affinität auf. Die Verwendung von 4-OH-Benzoesäure als Ligand ergab keine Bindung von ABP₄₄. Es wurde eine Affinitätschromatographie mittels 4-OH-PAA-Sepharose als letzter Reinigungsschritt für die Aufreinigung von ABP₄₄ gewählt, da es stabiler als 4-OH-IAA ist.

Es konnte auch gezeigt werden, daß das Vorkommen von ABP₄₄ auf wachsende Gewebe von etiolierten Keimlingen von *Pisum sativum* L. begrenzt ist (Reinard, 1992; Reinard & Jacobsen, 1995). Weitere Untersuchungen zeigten, daß dieses Protein selbst in wachsenden Geweben nur in sehr geringen Konzentrationen gefunden wurde. Auch aus diesem Grund erwies sich die Affinitätschromatographie für die Isolation des Proteins als am besten geeignet, da bei dieser Methode ein Minimum an Extraktionsschritten aufgewendet wird.

Die Bindungstests, die mit mittels Affinitätschromatographie aufgereinigten Proteinfractionen durchgeführt wurden, bestätigten die Spezifitäten der partiell aufgereinigten Proteinlösungen. Es wurde außerdem gezeigt, daß das Auftreten des Proteins nicht nur räumlicher (Apex etiolierter Erbsenkeimlinge), sondern auch entwicklungsabhängiger zeitlichen Begrenzung unterliegt. Das Protein konnte aus dem Apex von 5- bis 7-Tage alten Erbsenkeimlingen isoliert

werden, aber nicht aus 10-Tage alten Erbsenkeimlingen (Reinard & Jacobsen, 1995).

Eine versuchte Mikrosequenzierung des Proteins schlug jedoch wegen der geringen Menge an ABP₄₄ fehl (Reinard, pers. Mitteilung).

Die in der vorliegenden Arbeit ersten erzielten Ergebnisse belegten aber, daß es sich bei dem Auxin-bindenden Protein ABP₄₄ um eine pflanzliche Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase handelt, welche zu der Acyl-CoA-Dehydrogenase-Familie gehört.

1.3 Acyl-CoA-Dehydrogenase-Familie

Die Mitochondrien enthalten die Komplexe der Atmungskette, die Enzyme des Citratzyklus und die der Fettsäureoxidation. Die Fettsäuren, die in Mitochondrien oxidiert werden, werden vor dem Eintritt in die mitochondriale Matrix aktiviert. Diese "Aktivierung" dient dazu, daß das chemisch relativ schwer zugängliche Fettsäuremolekül unter ATP-Verbrauch in die energiereiche Verbindung des Acyl-CoA überführt wird. Doch bevor der Fettsäureabbau in Mitochondrien stattfindet, muß der Fettsäurerest von Coenzym A auf Carnitin umgeladen werden, da die Acyl-Reste nur in Bindung an diese spezifische Trägersubstanz die innere Mitochondrienmembran passieren können. Dieser Übertragungsschritt erfordert keine zusätzliche Energie. In der Mitochondrien-Matrix müssen die eingeschleusten Fettsäure-Reste wieder auf Coenzym A übertragen werden, da sich die folgende Reaktionsschritte der Oxidation nur an der Coenzym A-Verbindung der Fettsäure-Reste vollziehen. Die Fettsäuren-Acyl-CoA werden durch β -Oxidation von Fettsäuren-Acyl-CoA-Derivaten am β -Kohlenstoffatom abgebaut. Dieser komplexe Vorgang, an dem mehrere Enzyme und Coenzyme beteiligt sind, läuft anscheinend in Tier und Pflanze identisch ab.

Die Acyl-CoA-Dehydrogenasen gehören zu der Familie der tierischen und menschlichen mitochondrialen Enzyme (Ikeda *et al.*, 1983). Durch eine Acyl-CoA-Dehydrogenase wird die erste Reaktion der β -Oxidation des Acyl-CoA katalysiert. Bei dieser Reaktion entsteht ein trans- α,β -Enoyl-CoA mit einer trans-Doppelbindung zwischen C- α und C- β .

Das Wasserstoff wird durch Acyl-CoA-Dehydrogenase, einem Flavoprotein mit FAD als Wirkgruppe abgespalten, wodurch die ungesättigte Coenzym A-Verbindung der betroffenen Fettsäure entsteht. Dieses Flavoprotein ist eines von vier gleichartig wirkenden Enzymen, welche lediglich eine modifizierte Substratspezifität aufweisen. Sie sind auf Fettsäuren unterschiedlichen Kettenlänge eingestellt. Dies hängt eng mit dem Abbau bei der β -Oxidation zusammen, welcher sich durch wiederholtes Durchlaufen einer cyclischen Reaktionssequenz vollzieht. Dabei wird die Kohlenstoffkette jedesmal um ein C₂-Fragment verkürzt.

Sieben tierischen und menschlichen Acyl-CoA-Dehydrogenasen, welche sich in Länge und

Konfiguration ihrer Substrate unterscheiden, sind mittlerweile aus Mitochondrien isoliert und charakterisiert worden (Ikeda *et al.*, 1983; Ikeda und Tanaka, 1983a; Ikeda und Tanaka, 1983b; Ikeda *et al.*, 1985a; Izai *et al.*, 1992). Vier von diesen Enzymen, nämlich die **Short Chain Acyl-CoA-Dehydrogenase** = SCAD, **Medium Chain Acyl-CoA-Dehydrogenase** = MCAD, **Long Chain Acyl-CoA-Dehydrogenasen** = LCAD und **Very Long Chain Acyl-CoA-Dehydrogenase** = VLCAD, katalysieren spezifisch den ersten Schritt der β -Oxidation der Fettsäure-Acyl-CoA mit kurzen, mittleren, langen und sehr langen Kohlenstoffketten (Ikeda *et al.*, 1985a; Izai *et al.*, 1992). Bei den Reaktionen, welche von diesen Enzymen katalysiert werden, wird ein Proton an C α abstrahiert und ein Hybrid-Ion von C β auf FAD übertragen. Das gebildete FADH₂ wird in der Elektronentransportkette der Mitochondrien mit Hilfe einer Reihe von Elektrontransfer-Reaktionen reoxidiert. Das elektronübertragende Flavoprotein (Electron-Transfer Flavoprotein = ETF) gibt ein Elektronenpaar von FADH₂ an das Flavin-Eisen-Schwefel-Protein (Ubichinon-Oxidoreduktase) weiter, das wiederum ein Elektronpaar auf die mitochondriale Elektronentransportkette überträgt (Ikeda *et al.*, 1985b).

Die Glutaryl-CoA-Dehydrogenase beteiligt sich in einer FAD-abhängigen Dehydrierungs-Reaktion des Glutaryl-CoA zu Glutaconyl-CoA bei der oxidativen Abbau von Lysin (Rozen *et al.*, 1994).

Zwei weitere Enzyme, **Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase** (IVD) und **2-Methyl-Branched Chain Acyl-CoA-Dehydrogenase** (BCAD), sind im Abbau von der verzweigt-kettigen Aminosäuren beteiligt. Die Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase katalysiert die FAD-abhängige Oxidation von Isovaleryl-CoA zu 3-Methyl-Crotonyl-CoA im Leucin-Abbau (Ikeda und Tanaka, 1983a). Die 2-Methylbranched chain acyl-CoA-Dehydrogenase katalysiert die FAD-abhängige Oxidation von 2-Methylbutyryl-CoA beim Abbau von Isoleucin und Isobutyryl-CoA beim Abbau von Valin (Ikeda und Tanaka, 1983b).

Die fünf Acyl-CoA-Dehydrogenasen, SCAD, MCAD, LCAD; IVD und BCAD, sind Tetramere und bestehen aus 40kDa-45kDa großen Untereinheiten, jede Untereinheit enthält 1 mol FAD (Ikeda und Tanaka, 1983a,b; Ikeda *et al.*, 1985). Diese Enzyme werden kernkodiert und als Vorläufer-Proteine, welche in der Regel aus 410-430 Aminosäuren bestehen, im Cytosol synthetisiert. Sie beinhalten Signal-Peptide (24-30 Aminosäuren), welche für die Import der Proteine in die Mitochondrien zuständig sind (Kelly *et al.*, 1987; Matsubara *et al.*, 1989).

Die VLCAD dagegen ist ein Dimer und besteht aus zwei 71kDa großen Untereinheiten (Izai *et al.*, 1992).

Die kompletten cDNA-Sequenzen der zu den menschlichen und tierischen Acyl-CoA-Dehydrogenasen-Familien gehörenden Enzyme sind isoliert und charakterisiert worden. Die Analysen der erhaltenen cDNA-Sequenzen der tierischen und menschlichen SCAD (Matsubara *et al.*, 1989; Naito *et al.*, 1989), MCAD (Matsubara *et al.*, 1987; Kelly *et al.*, 1987), LCAD (Matsubara *et al.*, 1989; Indo *et al.*, 1991) und IVD (Kraus *et al.*, 1987; Matsubara *et al.*, 1990) ermöglichten die Identifizierung von spezifischen Mutationen in der Strukturen der

Genen, welche zu einem Defekt in der Synthese dieser Enzyme führten (Kelly, *et al.*, 1990; Vockley, *et al.*, 1992; Mohsen, *et al.*, 1998).

1.4 Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase

Die ersten drei Schritte zum Abbau der verzweigtkettigen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin verlaufen für alle drei Aminosäuren identisch (Michal, 1999). Die verzweigtkettige Aminosäure Leucin wird wie folgt abgebaut:

1. Transaminierung des Leucins mit α -Ketoglutarat als NH_2 -Akzeptor.

Aus Leucin entsteht dabei α -Ketoisocapronat. Diese α -Ketosäure wird dann über die Reaktionen abgebaut, die denen im Citratzyclus und in der Fettsäureoxidation entsprechen.

2. Oxidative Decarboxylierung von α -Ketoisocapronat zu Isovaleryl-CoA.

3. FAD-abhängige Oxidation von Isovaleryl-CoA zu β -Methylcrotonyl-CoA.

Diese Oxidation wird von der Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase katalysiert, wobei FAD als Wasserstoffakzeptor dient – wie in der analogen Reaktion der Fettsäureoxidation, die von der Acyl-CoA-Dehydrogenase katalysiert werden.

4. Biotin- und ATP-abhängige Carboxylierung von β -Methylcrotonyl-CoA zu β -Methylglutaconyl-CoA (unter Verbrauch eines ATP);

5. Wasseranlagerung und Bildung von β -Hydroxy- β -Methylglutaryl-CoA (HMG).

6. Spaltung von HMG zu Acetoacetat und Acetyl-CoA. Diese Reaktion wird auch bei der Bildung von Ketokörper aus Fettsäuren benötigt. Die Fettsäuren werden in den mitochondrialen Matrix durch β -Oxidation zu Acetyl-CoA abgebaut. Die bei der β -Oxidation entstandenen FADH_2 und NADH übertragen ihre Elektronen durch die Elektronentransportkette auf O_2 .

Wie schon erwähnt wurde, katalysiert die Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase im Leucin-Abbau die FAD-abhängige Oxidation von Isovaleryl-CoA zu β -Methylcrotonyl-CoA (Ikeda and Tanaka, 1983a). Eine Hypothese über die Existenz dieses Enzyms und seine Rolle bei einem bestimmten angeborenen Stoffwechseldefekt (Isovalerianazidämie - IVA), welches den Abbau von Leucin beeinflusst, wurde schon 1966 von Tanaka postuliert. Das Enzym konnte aber erst 1983 als 43kDa großes Protein aus Mitochondrien der Ratten-Leber isoliert und charakterisiert werden (Tanaka *et al.*, 1966; Ikeda and Tanaka, 1983a). 1987 wurde auch die menschliche IVD aus Leber isoliert und charakterisiert (Finnocchiaro *et al.*, 1987). In darauffolgenden Jahren wurden die cDNAs der beiden Enzyme kloniert und sequenziert. Die kodierende Region der menschlichen IVD-cDNA ist 1269bp lang, die cDNA der Ratten-IVD enthält eine 1272bp lange kodierende Region. Die Analyse der aus der cDNA-Sequenz abgeleiteten

Aminosäuresequenz von menschlicher IVD ergab, daß das Vorläufer-Protein der menschlichen IVD aus 423 Aminosäuren besteht. Die Aminosäuresequenz des Vorläufer-Proteins der Ratten-IVD besteht aus 424 Aminosäuren. (Kraus *et al.*, 1987; Matsubara *et al.*, 1989; Matsubara *et al.*, 1990). Die Homologie zwischen den beiden Enzymen auf Aminosäureebene beträgt 89,6% (Matsubara *et al.*, 1990). Die Homologie zwischen IVD und den anderen Enzymen der Acyl-CoA-Dehydrogenase-Familie beträgt 30-35% (Tanaka *et al.*, 1987; Matsubara *et al.*, 1990).

Die Struktur des menschlichen IVD-Gens wurde 1993 von Parimoo und Tanaka beschrieben. Die genomische DNA ist 15kb groß und besteht aus 12 Exons und 11 Introns (Parimoo und Tanaka, 1993).

Die aus Ratten- und menschlichen Leber isolierten Isovaleryl-CoA-Dehydrogenasen werden wie die meisten mitochondriale Enzyme im Zellkern kodiert und als 45kDa bzw. 46kDa Vorläufer-Protein im Cytosol synthetisiert. Während des Transports in die Mitochondrien wird das mitochondriale Signal-Peptid am N-terminalen Ende des Vorläufer-Proteins abgespaltet. Nach der Prozessierung entsteht ein 43kDa reifes Polypeptid, das um 3kDa kleiner als das Vorläufer-Protein ist. Die aktive Form der Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen (Ikeda *et al.*, 1987; Ikeda und Tanaka, 1988).

Die Isovalerialanazidämie (IVA) ist eine erbliche Störung des Leucinstoffwechsels. Die klinische Symptome der Isovalerialanazidämie, Lethargie und Koma, zeigen sich schon am fünften Tag nach der Geburt des Kindes. Viele Kinder mit dieser Krankheit sterben in den ersten Lebensmonaten. Nach jüngsten Berichten führte die Verabreichung von großen Glycinmengen bei zwei Kinder mit der Krankheit zu einer deutlichen klinischen Besserung. Die Untersuchungen an aus der Fibroblasten der IVA-Patienten isolierten IVD haben gezeigt, daß diese Krankheit durch einen Mangel an Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase verursacht wird (Rhead und Tanaka, 1990). Die Analysen von IVD in 15 Zellkulturen der IVA-Patienten ergaben fünf unterschiedliche Klassen von Defekten in der Struktur der IVD (Ikeda *et al.*, 1985). Vockley hat vier Klassen von IVD-Mutationen, welche die IVA verursachen, auf molekularer Ebene beschrieben (Vockley *et al.*, 1991).

Die vorgestellten Arbeiten weisen darauf hin, daß es sich bei IVD um ein essentielles Enzym beim Leucin-Abbau handelt.

In der jüngsten Zeit 1999 erfolgte die Klonierung und Sequenzierung einer möglichen IVD-cDNA aus *Arabidopsis thaliana* (Däschner, *et al.*, 1999). Über die physiologische Bedeutung dieses Enzyms bei Pflanzen ist jedoch noch nichts bekannt.

1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung, Sequenzierung und molekularbiologische Analyse des ABP₄₄-codierendes Gens.

1. Mikrosequenzierung des ABP₄₄

- Mit Hilfe der Affinitätschromatographie sollte das 44kDa-Auxin-bindende-Protein gereinigt und in ausreichender Menge für die Mikrosequenzierung isoliert werden.

2. Isolierung eines cDNA-Klons

- Anhand der Mikrosequenzen sollten degenerierte Oligonukleotide abgeleitet werden.
- Diese Oligonukleotide sollten zur Identifikation des entsprechenden cDNA-Klons beim Durchmustern der cDNA-Banken eingesetzt werden

3. Sequenzierung des Gens von ABP₄₄

- Nach der Identifizierung und Isolierung eines möglichst die volle Länge umfassenden cDNA-Klons des ABP₄₄-Gens sollte die cDNA-Sequenz ermittelt werden.

4. Suche nach Homologien zu beschriebenen Genen

- mögliche Homologien zu bereits beschriebenen Genen sollte mittels Datenbankrecherche gefunden und analysiert werden.

5. Identifizierung eines genomischen Klons

- Mit Hilfe der cDNA sollte der genomische Klon identifiziert und sequenziert werden.
Des weiteren sollte das Gen, wenn seine Größe es zulässt, sequenziert werden. Bei der DNA-Sequenz-Analyse sollten Strukturmerkmale des Gens, wie Exon/Intron-Struktur ermittelt werden.

6. Produktion größerer Mengen an Protein

- Aus dem Grund, daß ABP₄₄ nur in geringen Konzentrationen aus der Erbse isoliert werden kann, sollten größere Mengen an Protein in einem heterologen System, wie z.B. in *E.coli*, produziert werden.

Die Überexpression des Proteins ABP₄₄ in *E.coli* wird die Möglichkeit geben, die Auxinbindung des hieraus isolierten rekombinanten Protein mittels verschiedenen Methoden zu testen.

II. Material und Methoden

Alle in dieser Arbeit angewandten Methoden wurden, wenn nicht anders vermerkt, nach „Molecular Cloning“ (Sambrook, 1989), bzw. nach Anleitung der verwendeten Kits durchgeführt.

1. Material

1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Alle verwendeten Chemikalien entsprachen dem analytischen Reinheitsgrad und wurden, wenn nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen: Applichem (Darmstadt), Boehringer-Ingelheim (Ingelheim), ICN Biomedicals GmbH (Eschwege), Life Technologies (Effenstein), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen), Stratagene (Heidelberg), Qiagen (Hilden).

1.2 Verwendete Enzyme

Enzyme:

Combipol-DNA-Polymerase
 Proteinase K (E.C. 3.4.21.14)
 RNase A (E.C. 3.1.27.4)
 T4 - DNA - Ligase
 Taq-DNA-Polymerase
 InViTaq-DNA-Polymerase
 Taq-DNA-Polymerase
 Lysozym
 Alkalische Phosphatase CIAP
 Restriktionsendonukleasen
 Restriktionsendonukleasen
 Restriktionsendonukleasen
 Superscript II Rnase H Reverse
 Transcriptase

Hersteller:

InViTek/Berlin
 Roche Diagnostics/Mannheim
 Roche Diagnostics/Mannheim
 Promega/Mannheim
 Sigma/Deisenhofen
 InViTek/Berlin
 Clontech/Heiderberg
 Fluka Chemie/Ulm
 MBI Fermentas/St. Leon-Rot
 Life Technologies/Eggenstein
 Roche Diagnostics/Mannheim
 MBI Fermentas/St. Leon-Rot
 Life Technologies/Eggenstein

1.3 Verwendete Vektoren

<u>Vektor:</u>	<u>Hersteller:</u>
pBluescript II SK+	Stratagene/Heidelberg
pGEM-T	Promega/Mannheim
pET-32a(+)	Novagen/Heidelberg
Phage Lambda-ZAP	Stratagene/Heidelberg
Phage Lambda gt11	Clontech/Heidelberg

1.4 Verwendete Oligonukleotide

<u>Bezeichnung:</u>	<u>Sequenz 5'-3':</u>
ABP -1	TTY GAY GAY ACN CAR ATH CAR T
ABP ⁴⁴ -2	CCR TTN ARN ACR TAN CCN CCR TC
ABP ⁴⁴ -3	GCA AGG CTG ATC GTG TAG AC
ABP ⁴⁴ -4 reverse	GGA TCC TGA AGC GCG GCT AAT
ABP ⁴⁴ -5	CGA CAA AAG GGG ATA GCG ATA
ABP ⁴⁴ -6 reverse	CGC GAA AAT ATT GTT TGA ATT GC
ABP ⁴⁴ -7	CGA GAA TTG CTT TGT TCC
ABP ⁴⁴ -8 reverse	CTT TTC CGT TAT CAC AGT CC
ABP ⁴⁴ -9 forward	CTT CTT CTT ATT CCA CTT CC
ABP ⁴⁴ -9 reverse	GTA CAC CAC ATC TTG TTA CC
ABP ⁴⁴ -10/ <i>EcoRI</i>	GGA ATT CAT GCT TAG AAC AAG AAT
ABP ⁴⁴ -10/ <i>SalI</i>	GGT CGA CCA TTG CTC CTT GAA
ABP ⁴⁴ -11	CTG CTT ATT GGC AGA GTA G
ABP ⁴⁴ -12	CCA TGG GAT TAC TGC ACC A
ABP ⁴⁴ -13	GGT CTT TCT TAT GGT GCT CA
ABP ⁴⁴ -15	GGA TAG CGA TAT AAA ACA AGA AC
IVD-1/ <i>SmaI</i>	CCC GGG ATG CTT AGA ACA AGA
IVD-2/ <i>NheI</i>	GCT AGC CAT TGC TCC TTG AAG
IVD-3	CCA TGG ATG CTT AGA ACA AGA A
IVD-5	CCC GGG ACT TCC TTC CTC
IVD-8/ <i>EcoRI</i>	GGA ATT CAC TTC CTT CCT CTT T
IVD-9/ <i>NcoI</i>	CCA TGG AAT AAG AAG AAG AAT TGs
pGFP reverse	CCG TAT GTT GCA TCA CCT TC
CDS/3' PCR primer	Oligo(dT) N ³⁰ N ⁻¹ , (N=A, G, C, T; N ⁻¹ =A, G, C)
SMART™ Oligonukleotide	TAC GGC TGC GAG AAG ACG ACA GAA GGG
5' PCR primer	TAC GGC TGC GAG AAG ACG ACA GAA

T7	CGA CTC ACT ATA GGG CG
T3	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG

1.5 Verwendete Bakterienstämme

E. coli BLR(DE3): F⁻omp T, hsdSB(r⁻ m⁻), gal dcm⁺(srl-recA) 306::Tn10(DE3)

E. coli XL1-Blue: recA⁻ (recA1, lac⁻, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, F⁺proAB, lac1q, lacZ DeltaM15, Tn 10)

E. coli Y1090r: araD139, hsdR(r⁻ m⁺), mcrB⁺, rpsL, supF, trpC22::Tn10, lacU169, Ion, F⁻, λ⁻ (pMC9)^k

1.6 Größenmarker

Alle verwendeten DNA-Marker wurden von Fa. MBI/Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

DNA-Marker:

100bp Ladder Plus: 100bp-900bp, 1031bp, 1200bp, 1500bp, 2000bp, 3000bp

Lambda/*HindIII*: 23,13kb, 9,42kb, 6,55kb, 4,36kb, 2,32kb, 2,07kb, 0,6kb, 0,15kb

Lambda Mix 19: 48502bp, 38416bp, 33498bp, 29946bp, 24508bp/23994bp, 19397bp, 17053bp, 15004bp, 12220bp, 10086bp, 8614bp, 8271bp

pUC 18/*Sau3A*: 943bp, 585bp, 341bp, 258bp, 153bp, 105bp

pBR, Marker M 21: 2617bp, 1857bp, 1246bp, 1058bp, 929bp, 498bp, 383bp, 121bp

M 2: 23130bp, 9419bp, 6557bp, 4361bp, 2322bp, 2027bp, 561bp

Protein-Molekulargewichtsmarker:

MS-SDS-70 (Sigma): 66kDa, 45kDa, 36kDa, 29kDa, 24kDa, 20,1kDa, 14,2kDa

„Prestained Marker“ (Stratagene): 120kDa, 80kDa, 46kDa, 35kDa, 27kDa, 19kDa

1.7 Verwendete Kits

Verwendete Kits:

Advantage cDNA PCR Kit
Lambda Midi Kit
Nucleobond®Nucleic Acid Purification Kit
Nucleotrap®Extraktion Kit
Plant Rneasy Mini Kit
Silver Stain Kit
SMART™PCR cDNA Library Construction Kit
QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit
Oligotex-dT-Kit
QIAquick Spin PCR Purification Kit

Hersteller:

Clontech/Heidelberg
Qiagen/Hilden
Clontech/Heidelberg
Macherey-Nagel/Düren
Qiagen/Hilden
Stratagene/Heidelberg
Clontech/Heidelberg
Qiagen/Hilden
Qiagen/Hilden
Qiagen/Hilden

1.8 Pflanzenmaterial

Für die Untersuchungen wurden die Apices von 3 bis 5 Tage alten etiolierten Erbsenkeimlingen (*Pisum sativum* L.) der Sorte *Solara* verwendet.

2 Methoden

2.1 Sterilisation von Lösungen und Geräten

Die Sterilisation von Wasser, Puffern, Medien und hitzeempfindlichem Labormaterial erfolgte bei 121 °C in einem Autoklaven der Fa. Schütt (Göttingen).

2.2 Pflanzenanzucht

Reife Samen der Erbse wurden für 3 bis 4 Stunden in Leitungswasser vorgequollen, in feuchtem Vermiculite (Deutsche Vermiculite GmbH, Sprockhörl) ausgelegt und im Dunkeln für 3 bis 6 Tage bei RT angezogen. Die zu untersuchenden Pflanzenteile wurden geerntet, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –20°C gelagert.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1.1 Herstellung eines Proteinrohextrakts aus Erbse

Lösungen:

Homogenisierungspuffer:

50mM	Tris-HCl, pH 7,8
3% (w/v)	Polyklar AT
4% (v/v)	DIECA (Natriumdiethyldithiocarbamat)
1mM	PMSF (0,1M Stamm in Isopropanol)

Durchführung:

20g Apex von etiolierten Erbsenkeimlingen wurden in 50ml (2-3faches Vol) Homogenisationspuffer im Bühler-Homogenisator (150ml-Gefäß) 3x15s auf Eis bei 20000 rpm homogenisiert und das Homogenat durch 3 Lagen Nylon (100, 60 und 20 µm Porengröße; Fa. Nyltal, Schweizerseidenfabrik AG, Thal) gepresst. Das Filtrat wurde in 50.2 Ti-Rotor (Beckman) bei 42000 rpm und 4°C für 1h 10min ultrazentrifugiert und das Volumen des Überstandes ermittelt. Der Überstand wurde zur Aufreinigung von ABP₄₄ verwendet. Alle Extraktionsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

2.3.1.2 Gewinnung des pflanzlichen Fusionsproteins aus E. coliLösungen:*Waschlösung:*

20mM	Tris-HCl, pH 7,8
------	------------------

Zellaufschlußpuffer:

10mM	MgCl ₂
100µg/ml	Lysozym
20µg/ml	DNase I
20mM	Tris-HCl, pH 7,8

Durchführung:**a) Expression des pflanzlichen Fusionsproteins in E. coli**

5ml LB-Amp-Medium wurden mit einer einzelnen Bakterienkolonie einer LB-Amp-Platte beimpft und ÜN unter Schütteln bei 37°C kultiviert. Mit der Übernachtskultur wurden 50ml LB-Amp-Medium beimpft und unter Schütteln inkubiert. Das Zellwachstum wurde durch Trübungsmessung bei 600nm (2.5.2) verfolgt. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,9 wurde 1ml der Bakteriensuspension entnommen. Diese diente später als Negativkontrolle bei der Überprüfung der Induktion in einem SDS-Gel. Die Induktion erfolgte durch die Zugabe von IPTG und Inkubation der Bakteriensuspension bei 37°C unter Schütteln.

Anschließend konnte die Bakterienkultur entweder zur Ermittlung der geeignetsten Kultivierungsdauer nach der Expression oder für die präparative Herstellung des Fusionsproteins verwendet werden.

b) Ermittlung der Zeitabhängigkeit der Expression

Zur Ermittlung der Zeitabhängigkeit der Expression wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion je 1ml Zellsuspension entnommen. Nach der Zentrifugation der entnommenen Bakterienkultur-Proben (1min bei 15000rpm bei RT) und Verwerfen des Überstandes wurden die Pellets in je 100µl SDS-Probenpuffer resuspendiert und für 5min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben in einem 10%igen SDS-Gel analysiert(2.3.4.1).

c) Präparative Herstellung des Fusionsproteins

Für die präparative Herstellung des Proteins wurden die Bakterienzellen nach der Induktion für 5min auf Eis gestellt und anschließend bei 5000xg für 5min bei 4°C sedimentiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellsediment in 5ml (1/10 des Volumens der Bakterienkultur) resuspendiert und erneut, wie oben beschrieben, zentrifugiert. Nach dem vorsichtigen Dekantieren des Überstandes wurden die sedimentierten Bakterienzellen in einem Zellaufschluß-

Puffer resuspendiert, für 90min auf Eis inkubiert und anschließend mit Ultraschall behandelt. Die Zeitdauer und Intervalle der Ultraschallbehandlung richteten sich nach der Gebrauchsanweisung des Ultraschallgeräts. Zur Sedimentierung unlöslicher Zellkomponenten wurde die Suspension einer Zentrifugation in SS-34-Rotor (Fa. Sorvall) bei 40000xg und 4°C für 20min unterzogen. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß transferiert. Der Überstand und das Sediment wurden in einem SDS-Gel überprüft.

2.3.2 Affinitätschromatographische Verfahren

2.3.2.1 Kopplung von Liganden an Epoxy-aktivierte Sepharose 6b

Puffer:

Kopplungspuffer:

50mM Na-Carbonat, pH 11-12

Acetatpuffer:

0,1M Na-Acetat, pH 4,0

0,5M NaCl

Boratpuffer:

0,2M H₃BO₃

0,014M Na₂B₄O₇ · 10H₂O

0,05M NaCl

ergibt pH 8,0

Liganden-Lösung:

0,2M 4-OH-Phenyllessigsäure

im Kopplungspuffer

pH 11 mit 3N NaOH einstellen

Blocklösung:

6%(v/v) Ethanolamin (2-Aminoethanol)

im Kopplungspuffer

pH 8,0 mit HCl einstellen

Alle Lösungen wurden mit Reinstwasser angesetzt und über 0,23µm-Filter gefiltert.

Durchführung:

Nachdem 12g Epoxy-aktivierte Sepharose 6b (Fa. Pharmacia) in 400ml aq^{reinst} bei RT 1h gequollen wurde, wurde das Gel über eine Fritte (Porengröße 3, Fa. Duran) mit weiteren 2l Reinstwasser und anschließend mit 1200ml Kopplungspuffer gewaschen.

Das gewaschene Gel wurde in Liganden-Lösung gelöst, in Erlenmeyer-Kolben mit Hilfe von 1ml-Eppendorf-Pipetten mit abgeschnittenen Spitzen überführt und zum Blocken der noch freien Epoxy-Gruppen bei 37°C für mindestens 4h oder über Nacht im Schüttelwasserbad inkubiert..

Das Gel wurde nach der Inkubation über eine Fritte mit Porengröße 3 wie folgt gewaschen:

1. 400ml Acetatpuffer,
2. 400ml Boratpuffer,
3. 800ml Reinstwasser,
4. 400ml Acetatpuffer,
5. 400ml Boratpuffer
6. 800ml 50mM Tris-HCl, pH 7,7.

Das in 50ml gelöste Gel konnte in einen Säulenkörper überführt oder nach Zugabe von 0,02% (v/v) Na-Azid (final) bei 4°C gelagert werden.

2.3.2.2 Affinitätschromatographie - Aufreinigung von ABP⁴⁴ über an Epoxy-aktivierte Sepharose 6b gekoppelte Liganden

Die Aufreinigung von ABP⁴⁴ fand über an epoxy-aktivierte Sepharose 6b gekoppelte Liganden statt. Als Ligand für die Affinitätschromatographie wurde 4-OH-PAA gewählt, da es bei pH 5,5 eine hohe Affinität zum ABP⁴⁴ aufwies. Die Elution des ABP⁴⁴ fand durch eine Änderung des pH-Wertes statt. Für die Affinitätschromatographie wurde als Ausgangsmaterial eine mit 50% Ammoniumsulfat gefällte Fraktion eines Pflanzenrohextrakts aus Erbse verwendet.

Puffer:

MES-Puffer:

25mM MES

100mM NaCl

ad 2l, pH 5,5 mit 10N NaOH einstellen

Waschpuffer:

0,1M NaCl

0,05M MES-NaOH, pH 5,5

Elutionspuffer:

1M Tris-HCl, pH 8,0

0,5M NaCl

Alle Lösungen für die Affinitätschromatographie wurden mit Reinstwasser angesetzt, über 0,23µm-Filter (Nitrocellulose) gefiltert, vor Gebrauch gründlich entgast und nach dem Entgasen der pH-Wert eingestellt.

Durchführung:

Für die Aufreinigung von Rohextrakt aus 20g Sproßspitzen empfiehlt es sich, 2 Säulen mit je 3ml Volumen parallel zu verwenden.

Während der Ammoniumsulfat-Fällung der Proteinlösung wurden die Säulen mit MES-Puffer gewaschen/equilibriert, sowie die Einstellung für die Flußrate ermittelt. Sie sollte während des Auftrags 0,3-0,38ml/min, während des Waschens 0,5-0,55ml betragen. Vor dem Auftrag wurde der pH-Wert der Proteinlösung nachtitriert. Die Proteinprobe wurde mind. 3x rezirkulierend auf die Säulen aufgetragen. Anschließend wurden die Säulen mit dem Waschpuffer über Nacht bei einer Flußrate von 0,5-0,58ml/min gewaschen. Nach dem Abstellen der Pumpe und Absenken des Pufferspiegels wurde das Protein mit je 4 ml Elutionspuffer von der Säulen eluiert. Die Säulen wurden zur Reinigung mit MES-Puffer gewaschen. Zur weiteren Verarbeitung wurden die eluierten Protein-Proben mit Methanol-Aceton gefällt (2.3.3.2), in SDS-Probenpuffer aufgenommen und in einer SDS-PAGE aufgetrennt (2.3.4.1) oder bei -80°C gelagert.

2.3.3 Fällungsmethoden

2.3.3.1 Ammoniumsulfat-Fällung

Durch eine Ammoniumsulfatfällung wurde der Proteinrohextrakt (2.3.1) für eine Affinitätschromatographie (2.3.2.2) fraktioniert und konzentriert. Die gesamte Fällung wurde bei 4°C durchgeführt. Dabei wurde das 50% Ammoniumsulfat in 3 Schüben über 30min unter langsamen Rühren zugegeben (Cooper,1981). Nach der letzten Zugabe und weiterem Rühren von 30 min erfolgte eine Zentrifugation in SS34-Rotor der Sorvall-Zentrifuge bei 15000rpm, 4°C für 15min. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in insgesamt 22-25ml MES-Puffer resuspendiert, für 10min auf Eis belassen und erneut zentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge, SS34-Rotor, 15000rpm, 4°C, 15min). Der Überstand wurde in ein neues 50ml-Falcon-Röhrchen überführt und direkt für eine Affinitätschromatographie verwendet.

2.3.3.2 Methanol-Aceton-Fällung

Nach der Affinitätschromatographie wurden die Proteineluate durch den Zusatz eines vierfachen Überschuß an eiskaltem 2:7 (v/v) Methanol/Aceton gefällt. Nach der Inkubation ÜN bei -20°C wurden die Proteinproben bei 15.000rpm und 4°C für 15min zentrifugiert. Das Proteinpräzipitat wurde in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

2.3.3.3 TCA-Fällung

Die Trichloressigsäure-Fällung dient sowohl dem Entsalzen und dem Abtrennen der bei der Elektrophorese störenden Lipide und Kohlenhydrate als auch dem Aufkonzentrieren der verdünnten Proteinlösungen. Die Zugabe von Natrium-Desoxycholat vor der TCA-Fällung führt dazu, daß die Proteine leichter ausfallen.

Die Proteinproben wurden mit 10% (v/v) einer 0,15%igen Natrium-Desoxycholat-Lösung (w/v) und 15min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 10% (v/v) einer 100%igen Trichloressigsäure-Lösung wurden die Proben für 15min auf Eis inkubiert und bei 40.000xg für 20min zentrifugiert. Das Pellet wurde 2x mit 80% (v/v) Aceton (-20°C) gewaschen und jeweils für 15min bei 20.000xg zentrifugiert. Das Proteinpräzipitat wurde in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

2.3.4. Elektrophorese-Verfahren

2.3.4.1 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophoresen wurden mit Modifikationen nach Laemmli (1970) und Murray und Key (1978) durchgeführt. Für die meisten SDS-Gelelektrophoresen wurde das Minigel-System (Gelgröße 10cm x 9cm) der Firma Biometra verwendet. Für präparative Zwecke erfolgte eine Auftrennung der Proteinen im Protean-Gelsystem (BioRad, Gelgröße 18x18cm, Geldicke 1,0 bzw. 1,5mm). Die Zusammensetzung der verwendeten Gele gibt die Tabelle 2-1 wieder. Das Trenngel-Volumen für ein Minigel beträgt 5ml, für ein Protean-Gel 25ml (Geldicke 1,0mm) bzw. 35ml (Geldicke 1,5mm).

Lösungen:

1xSDS-Laufpuffer:

50mM Tris-HCl, pH 8,7

380mM Glycin

0,1%(w/v) SDS

1xSDS-Probenpuffer:

50mM Tris-HCl, pH 8,0
 20% (v/v) Glycerin
 4% (w/v) SDS
 50mM DTT
 0,002% Bromphenolblau

Trenngel	7% AA-Gel		10% AA-Gel	
	Minigel	Protean	Minigel	Protean
Lösungen	5ml	25ml	5ml	25ml
ddH ₂ O	2,5ml	12,5ml	2,0ml	9,9ml
30% Acrylamid/ / 0,8% Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30; 37,5 : 1)	1,15ml	5,75ml	1,7ml	8,3ml
1,5M Tris-HCl (pH 8,8)	1,3ml	6,3ml	1,3ml	6,3ml
10% SDS	50µl	250µl	50µl	250µl
10% APS	50µl	250µl	50µl	250µl
TEMED	3µl	15µl	2µl	10µl

Sammelgel	Minigel	Protean-Gel
Lösungen	2ml	10ml
ddH ₂ O	1,4ml	6,8ml
30% Acrylamid/ / 0,8% Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30; 37,5 : 1)	0,33ml	1,7ml
0,5M Tris-HCl (pH 6,8)	0,25ml	1,25ml
10% SDS	20µl	100µl
10% APS	20µl	100µl
TEMED	2µl	10µl

Tab. 2-1: Zusammensetzung der Lösungen für 7%, 10% SDS-Trenn- und Sammelgele im Minigel- bzw. Protean-Gelsystem.

Durchführung:

Proteinprobenvorbereitung:

Vor dem Auftrag wurden die Proben mit dem gleichen Volumenanteil an zweifach konzentriertem SDS-Probenpuffer versetzt und anschließend für 1 min bei 600W in der Mikrowelle aufgekocht.

Elektrophorese-Bedingungen:

Vor dem Probenauftrag wurden die Gele für 15-20min vor-elektrophoretisiert (Minigele:5mA/Gel; Protean-Gele: 10mA/Gel). Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 12-15mA/Minigel, bzw. 10-12mA/ Protean-Gel. Die Laufzeit für Minigele betrug insgesamt ca. 2h, Protean-Gele liefen 14 bis 16h bei RT.

2.3.4.2. Native Gelelektrophorese

Lösungen:

10x Nativer Probenpuffer:

50mM	Tris-HCl, pH 6,8
40% (w/v)	Saccharose
0,005% (w/v)	Bromphenol-Blau

Nativer Laufpuffer:

25mM	Tris
192mM	Glycin

Durchführung:

Native Proteine wurden in einem 10%igen, bzw. einem 7%igen Acrylamid-Gel getrennt, welches analog wie das SDS-Gel (s.Tab.2-1) nur unter Abwesenheit von SDS angesetzt wurde. Vor dem Probenauftrag wurden die Proteinproben entweder unverdünnt oder in der vorgesehenen Verdünnung im Probenpuffer aufgenommen

Vor dem eigentlichen Gellauf wurde für ca. 15 min bei 10mA/Gel vor-elektrophoretisiert. Die Elektrophorese selbst erfolgte zuerst bei einer Stromstärke von 10 mA/Gel, die nach dem vollständigem Eintreten der Proben ins Sammelgel auf 15 mA/Gel erhöht wurde. Die Spannung betrug etwa 70 V. Der Gellauf erfolgte bei RT und dauerte ca. 3 Stunden.

2.3.5. Protein-Färbemethoden

2.3.5.1 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehalts der Proteinextrakte erfolgte nach Bradford (1976) anhand einer Eichkurve, die mit BSA erstellt wurde. Ein Abschätzen der Gesamt-Proteinmenge in Proben für die SDS-Gelelektrophorese wurde nach der Methode von Esen (1978) durchgeführt.

2.3.5.2 Coomassie-Färbung

Lösungen:

Coomassie Färbelösung:

10% (v/v)	Eisessig
25% (v/v)	Isopropanol
0,1% (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R 250

Entfärberlösung:

10% (v/v)	Eisessig
-----------	----------

Durchführung:

SDS- und native Gele wurden nach dem Gellauf kurz in dH₂O gespült und für 20 min in Coomassie-Lösung fixiert und gefärbt. Nach dem Entfärben des Hintergrunds in 10% (v/v) Essigsäure wurden die angefärbten Proteinbanden sichtbar.

2.3.5.3 Silberfärbung

Die Silberfärbung wurde mit dem „Silverstain-Kit“ der Fa. Stratagene nach Herstellerangaben durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode wurden auch geringe Proteinbanden im Gel sichtbar gemacht.

2.3.6 Western Blot

Lösungen:

Carbonat-Transferpuffer:

10mM	NaHCO ₃
3mM	NaCO ₃
20% (v/v)	Methanol
	pH 9,9

Durchführung:

Die mittels Acrylamidgelelektrophorese im Protean-System aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Aktivierung der Membran erfolgte nach Angaben des Herstellers. Als Transferpuffer wurde ein Carbonat-Puffer nach Dunn (1986) verwendet. Der Transfer der Proteine von dem Gel auf die Membran erfolgte in einem „Semi-dry“ Transfergerät (TransBlot SD, BioRad).

Das Gel, die Membran und die Filterpapierlagen wurden in Transferpuffer getränkt und als „Blot-Sandwich“ wie folgt zusammengelegt:

- drei Lagen Filterpapier (Anode);
- aktivierte Membran;
- Gel;
- vier Lagen Filterpapier (Katode).

Der Proteintransfer erfolgte bei max. 20V und 5,5mA/cm² Filterpapier für 45min. Nach dem Transfer konnte die Membran für die Aminosäure-Sequenzierung weiter behandelt werden.

2.3.7 Cystein-Derivatisierung

Lösungen:

Methanol-Coomassielösung:

40% (v/v)	Methanol
1% (v/v)	Eisessig
0,1%(v/v)	Coomassie Brilliant Blue R250

Methanol-Entfärber:

45% (v/v)	Methanol
7% (v/v)	Eisessig

Durchführung:

Direkt nach dem Protein-Transfer schloß sich eine Cystein-Derivatisierung mittels 4-Vinyl-Pyridin an (Tarr, 1983; Fullmer, 1984).

Die mit Methanol benetzte Membran wurde in 100ml Waschpuffer überführt und nach Zugabe von 2,5ml β -Mercaptoethanol für 1h bei RT schwenkend inkubiert. Nach Entfernung des Puffers und mehrfachem Waschen der Membran mit Waschpuffer wurde die Membran in 200ml Waschpuffer mit 5ml 4-Vinyl-Pyridin erneut 10min bei RT inkubiert, mehrmals gründlich mit Waschpuffer gewaschen und einer modifizierten Coomassie-Färbung unterzogen. Dazu wurde die Membran 1min in frisch angesetzte Methanol-Coomassielösung gelegt und im ebenso frisch angesetzten Methanol-Entfärber entfärbt. Die sichtbare Proteinbande wurde ausgeschnitten, zwischen Filterpapier getrocknet und bis zur Sequenzierung bei -20°C gelagert.

2.3.8 Aminosäure-Sequenzierung des Proteins

Für die Aminosäure-Sequenzieranalysen wurde das 44kDa-Protein wie unter 2.3.6 beschrieben auf eine PVDF-Membran transferiert und weiterbehandelt (2.3.7) Die Sequenzierungen wurden von Dr. F. Buck im Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie Universitäts-Krankenhaus Eppendorf (UKE)/Universität (Hamburg) durchgeführt.

2.3.8.1 N-terminale Aminosäure-Sequenzanalyse

Die geblotteten Proteinbanden wurden N-terminal ansequenziert.

2.3.8.2 Sequenzierung von Spaltpeptiden nach Endoproteinase Lys-C-Verdau

Die enzymatische Spaltung des Proteins mit Endoproteinase Lys-C wurde an auf PVDF-Membran transferiertem Protein durchgeführt. Die Auftrennung der Peptidfragmente erfolgte über eine Reversed Phase Chromatographie (Vydac C4, 250x2,1mm; The Separation Group) unter Standardbedingungen (200 $\mu\text{l}/\text{min}$; Acetonitril/TFA-Gradient). Für die Sequenzierung der geeigneten Peptidfragmente wurde der Protein Sequencer (Fa. Applied Biosystems) verwendet.

2.4 Datenbankrecherchen

Die Aminosäuresequenzen wurden in Datenbankrecherchen nach Homologien zu bekannten Proteinen untersucht. Die Sequenzabgleiche erfolgte mittels BLAST Algorithmus („Basic Local Alignment Search Tool“; Altschul, 1990) über den „Experimental GENINFO® BLAST Network Service“ des National Center for Biotechnology Information in verschiedenen Peptidsequenz-Datenbanken. Es wurde auch einen Abgleich der Aminosäuresequenzen nach dem „Pearson-Lipman Alignment“ (Pearson und Lipman, 1988) und nach dem SW-Algorithmus (Smith und Waterman, 1981) in der Datenbank SwissProt mit den Programmen FASTA und BLITZ des European Molecular Biology Laboratory durchgeführt.

2.5. Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Absorptionsmessung

Der DNA- bzw. RNA-Gehalt in wässrigen Lösungen wurde durch Absorptionsmessung in einem Spektralphotometer bestimmt. Standardmäßig wurden 100µl einer 1/20-Verdünnung der DNA- oder RNA-Lösung in einer Quarzküvette mit 1cm Schichtdicke gegen Reinstwasser bei 260nm gemessen. Die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration wurde unter Verwendung folgender Formeln durchgeführt:

Doppelstrang - DNA: $c = A_{260\text{nm}} \times 50 \text{ g / ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$

Gesamt-RNA: $c = A_{260\text{nm}} \times 40 \text{ g / ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$

Die Reinheit der DNA-Lösungen wurde unter Bildung des Quotienten $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$ bestimmt. Bei sehr reinen Nukleinsäurelösungen sollte dieser Wert zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.5.2 Trübungsmessung

Das Wachstum von Bakterien in Flüssigkulturen wurde durch die Bestimmung der optischen Dichte bei 600nm verfolgt. Hierzu wurde 1ml Bakterienkultur in einer Küvette gegen Medium gemessen.

2.5.3 Agarosegelelektrophorese

Lösungen:

1xTAE:

40mM	Tris-HCl, pH 8,3
1mM	Essigsäure
100mM	EDTA

10xProbenpuffer (Blaumarker):

50% (v/v)	Glycerin
0,2% (w/v)	SDS
0,05% (w/v)	Bromphenolblau

Durchführung:

Die Agarosegele dienen sowohl zur Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von DNA und DNA-Fragmenten als auch zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten. Legt man eine elektrische Spannung an ein Agarosegel an, so wandert die DNA aufgrund ihrer negativen Ladung im Agarosegel von der Kathode zur Anode. Kleine, in linearisierter Form vorliegende DNA-Fragmente wandern schneller als große Fragmente, so daß man auf diese Weise eine Auftrennung der unterschiedlichen DNA-Fragmentgrößen in einem Gemisch erhält. Durch die parallele Auftragung eines DNA-Größenmarkers kann man die Größe der DNA-Fragmente bestimmen, die als Banden nach Anfärbung durch Ethidiumbromid im Gel sichtbar werden. Für die Agarosegelelektrophoresen wurden Mini-Gele (50ml) hergestellt. Die Agarosekonzentrationen variierten zwischen 0,7% und 1,5% (w/v). Als Puffersystem diente 1xTAE-Puffer. Das Probenauftragsvolumen variierte zwischen 5µl und 20µl mit 10x Probenpuffer (Blaumarker). Zum Anfärben der Banden im Gel wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5g/ml noch vor dem Gießen des Gels in die warme Agaroselösung gegeben. Die Banden konnten daraufhin auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und fotografiert werden.

2.5.4 Bakterienkulturen**2.5.4.1 Verwendete Nährmedien***LB-Medium:*

1% (w/v)	Caseinhydrolysat
0,5% (w/v)	Hefeextrakt
0,5% (w/v)	NaCl
	eingestellt auf pH 7,4

Nach dem Autoklavieren wurden folgende Zutaten dem LB-Medium zugefügt:

LB-MgSO₄:

LB-Medium mit 10mM MgSO₄

LB-Amp:

LB-Medium mit 50 bzw. 100 g/ml Ampicillin

LB-Kan:

LB-Medium mit 50 g/ml Kanamycin

LB-Agar:

LB-Medium mit 1,5% (w/v) Agar

2.5.4.2 Anlegen von Dauerkulturen

0,85ml einer Übernachtskultur wurden mit 0,15ml einer autoklavierten 86%igen Glycerinlösung in einem 1,5ml Reaktionsgefäß vermischt und bei -80°C gelagert.

2.5.4.3 Anzucht von Bakterien aus Dauerkulturen

Mit einer sterilen Impföse wurden Zellen aus einer Dauerkultur auf einer LB-Amp-Platte als Verdünnungsausstrich aufgetragen und die Platte über Nacht bei 37°C inkubiert. Von den gewachsenen Kolonien wurde eine Einzelkolonie isoliert und in 5ml LB-Amp-Nährmedium über Nacht inkubiert. Eine solche Kultur bestand aus Zellen eines einzigen Bakterienklons und konnte zur Präparation von Plasmid-DNA eingesetzt werden.

2.5.5 Isolierung der Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNA aus Sproßspitzen von 3Tage alten etiolierten Erbsenkeimlingen wurde nach Herstellerangaben des „Plant RNeasy Mini Kits“ der Fa. Qiagen/Hilden isoliert.

2.5.6 cDNA-Bank-Herstellung

Die cDNA-Bank aus 3 Tage alten etiolierten Erbsenkeimlingen wurde mit Hilfe des „SMART™PCR cDNA Library Construction Kits“ der Fa. Clontech/Heidelberg hergestellt. Die Herstellung der cDNA-Bank erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.5.6.1 Bestimmung des Phagentiters - (Grobtitrierung)

Durchführung:

200µl einer frischen XL 1-Blue-ÜNK wurden mit 3,5ml 50°C heißem Weichagar („Toplayer“) vermischt und auf einer LB-(MgSO₄)-Agarplatte verteilt. Von der Ausgangssuspension unbekanntem Titers wurde eine dekadische Verdünnungsreihe in den Stufen 10⁻¹ bis 10⁻¹⁰ in SM-Puffer angelegt und jeweils 10µl der einzelnen Verdünnungen auf zuvor markierte Bereiche der Platte aufgetropft. Nach 12h Inkubation bei 37°C wurde die Plaqueanzahl der auszählbaren Verdünnungsstufen ermittelt und in pfu/ml für die Ausgangssuspension hochgerechnet.

2.5.6.2 Bestimmung des Phagentiters - (Feintitrierung)

Durchführung:

Die Feintitrierung diente zur Bestimmung des exakten Titers eines Phagenlysates. Hierzu wurden 10µl der Verdünnungsstufe, welche einen durch die Grobtitrierung ermittelten geeigneten Titer besaß, zunächst 10min mit 200µl einer *E. coli* XL1-Blue MRA-ÜNK-Kultur bei 37°C zum Zweck der Phagenadsorption vorinkubiert, mit 3,5ml 50°C heißem Weichagar vermischt und daraufhin auf einer LB/MgSO₄-Agarplatte ausplattiert. Die Verwendung einer ganzen Platte anstatt einer in Sektoren unterteilten Platte ermöglichte nach der Inkubation bei 37°C ÜN genaueres Auszählen der Phagenplaques und somit eine relativ exakte Berechnung des Phagentiters.

2.5.6.3 Amplifizierung der Phagenbank

Durchführung:

Die Phagenbank wurde auf großen LB-(MgSO₄)-Agarplatten (150mm x 150mm) wie folgt amplifiziert: 600µl einer frischen Bakterien-ÜNK₄ wurde mit 5×10^4 pfu für 15min bei 37°C zur Adhäsion der Phagen an die Wirtszellen unbewegt inkubiert, anschließend mit 5ml 50°C heißem Weichagar vermischt, gleichmäßig auf der Platte verteilt und bei 37°C für 12 bis 18h ÜN inkubiert. Zu der Platte mit dichtgewachsenen Phagenplaque wurden 12ml SM-Puffer zugegeben und die Phagen bei 4°C ÜN „abgeschwemmt“. Nach der anschließenden Inkubation der Platten bei RT für 1h auf der Wippe wurden die Phagenlysate von der Platten abpipettiert und in sterilem 50ml Falcon gesammelt. Zum Abtöten der evtl. verbleibenden Bakterien wurden zu dem Phagenlysat ein paar Tropfen Chloroform zugegeben. Es folgte eine Inkubation bei RT für 15min. Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 2.000xg und 4°C für 10min. Der Überstand wurde in ein neues Falcon überführt und der Titer der amplifizierten Phagenbank wie unter 2.5.6.2 beschrieben bestimmt.

2.5.6.4 Herstellung von präparativen Flüssiglysaten

Durchführung:

Flüssiglysate wurden zur Gewinnung eines ausreichend großen Phagentiters für die anschließende Phagen-DNA-Präparation hergestellt. Ein 50ml-Falcon mit 15ml autoklavierten LB/0,2% Maltose/MgSO₄-Medium wurde mit einer einzelnen Kolonie des *E. coli*-Stammes beimpft

und bei 37°C im Kulturschüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Die Bakterienzellen wurden bei 500xg und 4°C für 10min abzentrifugiert und in 1 Volumen 10mM MgSO₄ resuspendiert. Der Bakteriensuspension wurden 2x10⁸ pfu/ml des Phagenlysates zugesetzt. Zur Adsorption der Phagen wurde der Falcon für 10 min bei 37°C unbewegt stehengelassen. Die gesamte Kultur wurde in einen 250ml-Kolben mit 50ml autoklaviertem LB/MgSO₄-Medium überführt und bei 37 °C im Kulturschüttler inkubiert. Der Kultur wurden zunächst stündlich, dann alle 15 min Proben entnommen, um den Eintritt der Lyse anhand des Abfalls der optischen Dichte zu ermitteln. Die optische Dichte der Kultur wurde bei 600 nm photometrisch bestimmt. Die Lyse trat nach ca. 3-4h ein und war am Auftreten von Zelltrümmern und der Abnahme der Trübung in der Kultur erkennbar. Nach dieser Zeit wurden dem Lysat einige Tropfen Chloroform zugegeben und der Kolben für weitere 15 min geschüttelt, um noch intakte Zellen zu lysieren. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 5000rpm und 4°C sedimentiert. Der zellfreie Überstand wurde mit dem „Lambda Midi Kit“ (Fa. Qiagen) weiterbearbeitet.

2.5.7 Präparation und Aufreinigung von DNA

2.5.7.1 Lambda-DNA Mini Präparation

Für die Isolation von Phagen-DNA wurde das Lambda-DNA Mini-Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Pufferbezeichnungen entsprechen denen im Kit.

Durchführung:

Zur Durchführung der Präparation wurden zu je 10ml Flüssiglysaten in einem SS-34-Röhrchen 30µl Puffer L1 zugegeben und für 30min bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden 2ml Puffer L2 zugegeben, 60 min auf Eis erneut inkubiert und anschließend 10 min bei 10000xg und 4°C in einem SS-34-Rotor (Fa. Sorvall) zentrifugiert. Nach der vollständigen Abnahme des Überstandes wurde das Sediment in 1 ml Puffer L3 vorsichtig resuspendiert. Zu der Suspension wurde 1ml Puffer L4 zugegeben, vorsichtig gemischt, bei 70 °C für 20 min inkubiert und auf Eis abgekühlt. Nach der Abkühlung wurde zur Suspension 1ml Puffer L5 zugegeben, noch mal vorsichtig gemischt und für 30 min bei 15000xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues SS-34-Röhrchen überführt, nochmal 10 min bei 15000xg und 4°C zentrifugiert und in eine mit 1ml QBT-Puffer equilibrierte Säule pipettiert. Nach dem Waschen der Säule mit 2ml QC-Puffer wurden 1,5ml QF-Puffer in die Säule pipettiert, der die DNA-Lösung-enthaltene Durchfluß in einem Röhrchen aufgefangen und mit Isopropanol für 1 h bei 15000xg und 4°C zentrifugiert. Das Sediment (isolierte DNA) wurde zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und in 100µl dH₂O gelöst.

2.5.7.2 Präparation von Plasmid - DNA

Lösungen:

Puffer 1:

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

Puffer 2:

200mM	NaOH
1% (w/v)	SDS

Puffer 3:

2,55M	Kaliumacetat, pH 4,8
-------	----------------------

PEG - Lösung:

30% (w/v)	PEG 6.000
1,5M	NaCl

Durchführung:

Bei dieser Methode wurden 4ml einer LB-Amp-Übernachtskultur zentrifugiert und das Sediment in 300µl eiskaltem Puffer 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 300µl Puffer 2 wurde der Ansatz für 5min bei RT inkubiert und anschließend 300µl Puffer 3 hinzugegeben. Der Ansatz wurde für 10min auf Eis belassen und dann bei 15000rpm und 4°C für 15min zentrifugiert. Der wässrige, klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1x Volumen Isopropanol versetzt. Die Plasmid-DNA wurde durch Zentrifugation bei 15000rpm für 30min bei RT sedimentiert. Das Sediment wurde nach Eintrocknen bei RT für 15min in 100µl dH₂O aufgenommen und zur erneuten Fällung der DNA mit 50µl PEG-Lösung versetzt. Der Ansatz wurde für eine halbe Stunde bei 4°C inkubiert und die DNA anschließend durch Zentrifugation bei 15000rpm (15min, RT) sedimentiert. Der Überstand wurde quantitativ entfernt und das DNA-Sediment zweimal wie unter 2.5.7.4 beschrieben mit 70%igem EtOH gewaschen. Die präparierte Plasmid-DNA hatte einen hohen Reinheitsgrad und konnte zur Sequenzierung eingesetzt werden.

2.5.7.3 Isolierung genomischer Pflanzen-DNALösungen:*CTAB-Puffer:*

1,4M	Natriumchlorid
20mM	EDTA
100mM	Tris-HCl, pH 8,0
0,5% (w/v)	Polyvinylpyrrolidon (PVP-40) autoklavieren
3,0% (w/v)	Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)
0,2% (v/v)	β-Mercaptoethanol

Waschpuffer:

76% (v/v)	Ethanol
10mM	Ammoniumacetat autoklavieren

TE-Puffer:

10mM	Tris-HCl, pH 8,0
1mM	EDTA autoklavieren

RNase A-Stammlösung:

10mg/ml	RNase A
---------	---------

Chloroform/Isoamylalkohol:

24/1 (v/v)	Chloroform/Isoamylalkohol
------------	---------------------------

Ammoniumacetat:

7,5M	Ammoniumacetat
------	----------------

Durchführung:

Die Isolierung genomischer Pflanzen-DNA erfolgte nach Doyle und Doyle (1990) mit Modifikationen für kleine Volumina.

200mg Blattmaterial wurde in flüssigem Stickstoff mit dem autoklavierten und bei -20°C

vorgekühlten Pistill in einem ebenso autoklavierten und vorgekühlten Mörser pulverisiert, in ein 2ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 800µl auf 65°C vorgewärmtem CTAB-Puffer versetzt und für 30min bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 800µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) und anschließender Zentrifugation bei 11000xg und 4°C für 10min wurde die wäßrige Phase abgenommen und in ein neues 2ml-Reaktionsgefäß überführt. Die durch Zugabe von 2/3 Volumen eiskalten Isopropanols ausgefallenen Nukleinsäuren wurden durch kurzes Zentrifugieren (weniger als 5min) bei 11.000xg/RT am Gefäßboden gesammelt und nach Entfernen des Überstandes in 200µl Waschpuffer gespült. Nach erneutem kurzen Zentrifugieren und sehr gründlichem Entfernen des Waschpuffers wurde das Pellet in 200µl sterilen TE-Puffer resuspendiert. Zu der DNA-Lösung wurde RNase A bis zu einer finalen Konzentration von 10µg/ml zugegeben und für 30min bei 37°C inkubiert. Nach anschließender Ethanol-Fällung (2.5.7.4) wurde die DNA in 100µl sterilen Wassers aufgenommen, bei 4°C ÜN gelöst und bei -20°C gelagert.

2.5.7.4 Ethanolfällung

Zur Präzipitation von DNA aus wässrigen Lösungen (dH₂O oder TE) wurde eine Ethanolfällung durchgeführt. Die gelöste DNA wurde mit 2,5Vol. EtOH (RT) und 1/10Vol. 3M Natriumacetat, pH5,2 versetzt. Bei geringen DNA-Konzentrationen (< 500ng/µl) wurde die Fällung durch Kälteinkubation bei -20°C ÜN, bzw. 2h bei -80°C oder 5min in flüssigem Stickstoff durchgeführt und anschließend bei 15000rpm bei 4°C zentrifugiert. Bei höheren DNA-Konzentrationen (>1g/µl) wurde auf die Kälteinkubation verzichtet und sofort zentrifugiert. Anschließend wurde die sedimentierte DNA mit 300µl 70%igem EtOH einmal gewaschen, das Sediment getrocknet und die DNA in dH₂O gelöst

2.5.7.5 Isopropanolfällung

Gelöste DNA wurde alternativ zur Ethanolfällung mit 1xVol. Isopropanol (RT) aus wässrigen Lösungen gefällt. Die DNA wurde ohne Kälteinkubation sofort bei 15000rpm/4°C in einer Tischzentrifuge sedimentiert und wie unter 2.5.7.4 beschrieben einmal mit 70%igem EtOH gewaschen. Die DNA wurde anschließend in dH₂O gelöst.

2.5.7.6 PEG - Fällung

Der gelösten DNA wurde 1/2 Volumen einer 30%igen PEG-Lösung mit 1,5M NaCl zugefügt. Der Ansatz wurde gründlich vermischt. Das Sedimentieren der DNA erfolgte durch Zentrifugation bei 12000rpm/4°C. Zur Entfernung des PEGs wurde das Sediment zweimal mit 70%igem kaltem EtOH gewaschen. Nach Eintrocknen konnte die DNA in einem geeigneten Volumen dH₂O aufgenommen werden.

2.5.7.7 Phenol/Chloroform-Extraktion

Eine Phenol/Chloroform-Extraktion wurde zum Entfernen von Proteinen aus wässrigen DNA-Lösungen durchgeführt. Die DNA wurde zunächst mit einfachem Volumen TE-gesättigtem Phenol versetzt, kurz vermischt und zur Phasentrennung bei 12000rpm für 1min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die phenolische Phase wurde verworfen, die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut in gleicher Weise mit TE-gesättigtem Phenol extrahiert. Bei geringen DNA-Mengen (<1g) wurden die Phenolphasen mit gleichem Volumen TE + 1/10 Volumen 3M NaAc, pH 6,0 wie oben beschrieben reextrahiert und die wässrigen Phasen anschließend vereinigt. Die gelöste DNA wurde zur Entfernung von Phenolresten zweimal mit dem gleichem Volumen Chloroform ausgeschüttelt und anschließend zur Phasentrennung 1min zentrifugiert. Die Chloroformphase wurde mit einer Pipette entfernt und die DNA wie unter 2.5.7.4 beschrieben gefällt.

2.5.7.8 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen mit dem Nucleotrap®-Kit

Zur Isolierung von DNA aus Elektrophoresegelen wurde eine elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen mit 0,5g Ethidiumbromid pro 1ml Gelvolumen durchgeführt. Entsprechend der Größe der zu isolierenden DNA-Fragmente wurden 0,8-1,5%ige Agarosekonzentrationen eingesetzt. Die Bereiche mit den DNA-Fragmenten wurden nach der Elektrophorese unter durchscheinendem UV-Licht auf einer sauberen Unterlage mit einem sterilen Skalpell oder einer Rasierklinge aus dem Gel ausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt, gewogen und weiter nach Angaben des Herstellers aufgereinigt

2.5.7.9 Aufreinigung von PCR-Produkten

Das „QIAquick Spin PCR Purification Kit“ wurde verwendet, um die mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente aufzureinigen. Die Arbeiten wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.5.8 Enzymatische Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Sequenzmotive in doppelsträngigen Nucleinsäuren und hydrolysieren die Phosphodiesterbindungen an spezifischen Stellen dieser Erkennungsmotive. Für die Hydrolyse von 1 µg DNA wurden routinemäßig 1-5U Restriktionsendonuklease eingesetzt. Die Hydrolyse wurde in 10x konzentriertem Restriktionsendonukleasepuffer (vom Hersteller der jeweiligen Restriktionsendonuklease mitgeliefert) bei 37°C für 1-3h durchgeführt. Das Volumen eines typischen Restriktionsansatzes betrug 20-50 µl. Zur Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen wurden die Ansätze entweder für 10-20min bei 65°C inkubiert oder auf das Agarosegel aufgetragen.

2.5.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

In der Polymerasekettenreaktion (Saiki, 1985; Mullis und Faloona, 1987) können spezifische DNA-Abschnitte aus geringsten Mengen eines DNA-Gemisches amplifiziert werden. Man benötigt hierzu zwei spezifische Oligonukleotide, die in gegensätzlicher Orientierung an die Ziel-DNA hybridisieren, nachdem deren komplementäre Stränge bei 94°C aufgeschmolzen wurden. Eine hitzestabile Taq DNA-Polymerase repliziert im ersten Zyklus der Reaktion die komplementären Stränge der DNA-Matrize mit dem 3'-Ende der Primer als Replikationsstartpunkt. Die neusynthetisierten Stränge dienen im nächsten Zyklus wieder als Matrizen, so daß rechnerisch nach n Zyklen 2^n Kopien des Ausgangsmoleküls vorliegen. Ein Zyklus unterteilt sich in drei grundlegende Abschnitte: im ersten Schritt werden die komplementären Stränge des DNA-Moleküls durch Denaturierung bei 94°C getrennt. Die Hybridisierung („Annealing“) der Primer an die Zielsequenzen erfolgt bei der für jedes Oligonukleotid individuellen Annealingtemperatur (Schritt 2). Im dritten Schritt erfolgt die Synthese der komplementären Stränge. Das Temperaturoptimum der Taq-DNA-Polymerase liegt bei 72 °C. In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR aus cDNA, genomischer DNA, Plasmid- und Phagen-DNA sowie aus Bakterienkolonien durchgeführt.

PCR-Ansatz:

5 µl	10xTaq-DNA-Polymerasepuffer
1 µl	10mM dNTP-Mix
5 µl	Primer 1
5 µl	Primer 2
X µl	DNA
3U	Taq DNA-Polymerase
	ad. 50 µl dH ₂ O

Standard - PCR - Programm:

90s 94°C, 2min T_{AN} °C, 2min 72°C, 29 Zyklen
 90s 94°C, 2min T_{AN} °C, 10min 72°C, 1 Zyklus
 4°C

2.5.9.1 PCR direkt aus Bakterienkolonien

Die Kolonie-PCR ist eine PCR-basierte Methode zur schnellen Identifizierung der Bakterienklone, die rekombinante Plasmide erhalten.

PCR-Premix:

5µl 10xPCR-Reaktionspuffer
 5µl Primer 1
 5µl Primer 2
 1µl dNTP-Mix
 ad. 50µl , dH₂O steril

PCR-Programm:

3min 98°C, 3min 72°C (Taq-Polymerase-Zugabe), 1Zyklus
 90s 94°C, 2min T_{AN} °C, 2min 72°C, 29 Zyklen
 10min 72°C, 4°C ∞

Durchführung:

Die Bakterienkolonie wurde mit einer sterilen Pipettenspitze eingestochen und direkt in den PCR-Premix übertragen. Für die PCR wurden zwei spezifische Primer aus der inserierten Sequenz eingesetzt, um zu gewährleisten, daß ausschließlich rekombinante Plasmide in der PCR als Ziel-DNA dienen. Nach dem Denaturieren der DNA bei 98°C in dem ersten Zyklus der PCR wurde zu dem PCR-Ansatz Taq-Polymerase zugegeben. Anschließend wurden 20-30 Zyklen durchgeführt. Die Klone, bei denen in einem anschließenden Agarosegel amplifizierte Fragmente detektiert werden konnten, wurden einer Plasmid-DNA-Präparation unterzogen (2.5.7.2).

2.5.9.2 Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR)

Ausgehend von 600ng-1µg der wie unter 2.5.5 beschrieben isolierten Gesamt-RNA unter Ver-

wendung der Primerkombination SMART oligonukleotide und CDS/3' PCR Primer aus dem SMART™ PCR Library Construction Kit wurde bei der RT-PCR Erststrang-cDNA synthetisiert.

Erststrang-cDNA-Synthese-Durchführung:

	600ng-1µg Gesamt-RNA
1µl	SMART oligonukleotide
1µl	CDS/3' PCR Primer
	ad. 5µl dH ₂ O
2min bei 72°C denaturieren, 2min auf Eis abkühlen	
2µl	5xErststrangsynthesepuffer
1µl	DTT (20mM)
1µl	dNTP-Mix (10 mM)
1µl	MMLV Reverse Transcriptase (200U/µl)

1h bei 42°C inkubieren.

2µl des Erststrang-cDNA-Ansatzes wurde in einer nachfolgender PCR mit einem spezifischen Sense- und einem Antisense Oligonukleotid oder mit Primerkombination 5' PCR Primer/CDS 3' PCR Primer eingesetzt.

2.5.10 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.5.10.1 T-Vektor-Klonierung

Für diese Verfahren wird die Taq-Polymerase benötigt, die an 5'-Enden der Amplifikationsprodukte ein Adenin-Nukleotid anhängt. Da die beide Enden des DNA-Fragments bedingt durch die beschriebene Eigenschaft der Polymerase in der PCR gleich beschaffen sind, kann das Insert ungerichtet in einem Vektor einligiert werden.

Zur T/A-Klonierung von DNA-Fragmenten wurde der Vektor pGem-T verwendet. Dieses Plasmid besitzt neben dem Resistenzgen für Ampicillin eine LacZ-Region, welche für das α-Komplement der β-Galaktosidase kodiert. Durch Komplementation dieses Teilfragmentes mit einem durch das bakterielle Genom kodierten weiteren Teilfragment der β-Galaktosidase entsteht die enzymatisch aktive Form der β-Galaktosidase. Nach Induktion des entsprechenden Gen-Promotors durch IPTG ist dieses Enzym in der Lage, X-Gal in einen blauen Farbstoff umzusetzen. Die Kolonien erscheinen daher blau. Da der Polylinker in der Lac Z-Region liegt,

wird in rekombinanten Plasmiden, deren Insertion über eine Restriktionsschnittstelle des Polylinkers einkloniert wurde, keine enzymatisch aktive -Galaktosidase synthetisiert. Solche Kolonien erscheinen weiß, da keine Umsetzung des X-Gal in einen blauen Farbstoff mehr erfolgt. Für die Identifizierung der Kolonien mit rekombinanten Plasmiden wurden daher auf den LB-Amp-Platten 40µl 0,1M IPTG und 40µl 2%iges X-Gal ausplattiert. Solche Kolonien erscheinen dann weiß. Diese weiße Kolonien wurden nach Inkubation bei 37°C ÜN von den Platten isoliert. Aus 5ml LB/Amp-Übernachtskulturen dieser Kolonien wurden Plasmidschnellpräparationen (2.5.7.2) durchgeführt und die Plasmide nach Hydrolyse mit Restriktionsenzymen (2.5.8) auf die gesuchte Insertion untersucht.

Die T-Vektor-Ligation erfolgte nach Herstellerprotokoll. Der Vektor wurde vom Hersteller vorbehandelt, so daß er direkt in eine Ligation eingesetzt werden konnte. Die Ligation erfolgte bei 16°C ÜN.

Ligationsansatz:

1µl	10xT4-DNA-Ligase-Puffer
2µl	pGEM®-T-Vektor (10ng/µl)
80ng	PCR-Produkt
1µl	T4-DNA-Ligase
	ad. 10µl mit dH ₂ O

2.5.10.2 Dephosphorylierung von linearisierten Plasmiden

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren über die Knüpfung von kohäsiven Einzelstrangenden ist es vorteilhaft, die Vektor-DNA nach Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen am 5'-Terminus mit Hilfe der alkalischen Phosphatase (AP) zu dephosphorylieren, um die Wahrscheinlichkeit einer Religation der Vektor-DNA mit sich selbst zu verringern und somit die Klonierungseffizienz von Passagier-DNA und Vektor zu erhöhen. Man erhält somit einen geringeren Hintergrund an blauen Kolonien im „Blau/Weiß“-Screening. Zur Durchführung der Dephosphorylierung wurden 2U AP direkt in den Restriktionsansatz gegeben und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde nochmals Enzym dazugegeben und erneut für 15 min inkubiert. Das Enzym wurde anschließend für 10 min bei 65 °C inaktiviert. Zur quantitativen Entfernung des Enzyms wurde entweder eine Phenolextraktion wie unter 2.5.7.7 beschrieben oder eine Aufreinigung der Vektor- DNA über ein Agarosegel (2.5.7.8) durchgeführt.

2.5.10.3 Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA erfolgt über die Knüpfung einer Phosphodiesterbindung von kohäsiven Einzelstrangenden („Sticky ends“) oder stumpfen Enden („blunt ends“). Voraussetzung für die Ligation war eine vorausgegangene Hydrolyse der Passagier-DNA und der Vektor-DNA mit Restriktionsendonukleasen, die zueinander kohäsive Enden oder „blunt ends“ erzeugen. Passagier-DNA wurde nach Hydrolyse über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt (2.5.7.8) und in molaren Verhältnissen von 1:1, 1:2, bzw. 1:5 mit der Vektor-DNA ligiert. Die Ligation wurde mit Hilfe der T4 DNA-Ligase unter Hydrolyse von ATP durchgeführt. Für die Ligation wurden standardmäßig 100-300ng hydrolysierte Vektor-DNA sowie 5-10U T4 DNA-Ligase in einfach konzentriertem T4-Ligasepuffer in einem Reaktionsvolumen von 10 µl eingesetzt. Die Ligation erfolgte für über Nacht bei 16°C.

2.5.11 Herstellung transformationskompetenter Zellen

Lösungen:

Medium A:

10mM	MgSO ₄
0,2% (w/v)	Glucose
in LB-Medium (sterilfiltriert)	

Medium B:

36% (v/v)	Glycerin
12%(w/v)	PEG 8.000
12mM	MgSO ₄
in LB-Medium (sterilfiltriert)	

Durchführung:

Transformationskompetente Zellen wurden nach der Methode von Nishimura (1990) hergestellt. Hierzu wurden 50ml Medium A mit 500µl einer 5ml-ÜN-Kultur des Bakterienstammes *E. coli* XL1-Blue angeimpft und bei 37°C im Schüttler bis zu einer optischen Dichte von 0,5 inkubiert. Die Kultur wurde anschließend 10min auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation der Zellen bei 3000rpm bei 4°C für 5 min wurde das Sediment in 500µl kaltem Medium A resuspendiert und anschließend 2,5ml kaltes Medium B hinzugegeben. Die kompetenten Zellen konnten nun zu je 100 µl aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert werden.

2.5.12 Transformation**2.5.12.1 Transformation von Bakterien**Lösungen:*SOC-Medium:*

20% (w/v)	Casein
1% (w/v)	Hefeextrakt
0,058% (w/v)	NaCl
0,019% (w/v)	KCl
	ad 1l dH ₂ O, pH 7,0 mit 1M NaOH einstellen, autoklavieren
20mM	Glucose, sterilfiltriert
10mM	MgCl ₂

IPTG-Lösung:

0,1M	IPTG
------	------

X-Gal-Lösung:

2% (w/v)	X-Gal in Dimethylformamid
----------	------------------------------

Durchführung:

Die Transformation von Bakterienzellen mit rekombinanten Plasmiden erfolgte mit Hilfe kompetenter Zellen des Stammes *E. coli* XL1-Blue, die wie unter 2.5.13 beschrieben hergestellt wurden. Hierzu wurden 5µl eines 10µl-Ligationsansatzes mit 100µl auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen vermischt, der Ansatz für 30min auf Eis stehengelassen und anschließend für 90s bei 42 °C inkubiert. Nach erneuter Inkubation auf Eis für 2min wurde dem Ansatz 900µl SOC-Medium hinzugefügt und die Zellen für eine Stunde bei 37°C im Heizblock unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin bei 4°C und 3000rpm für 3min sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 400µl SOC-Medium resuspendiert, je 200µl auf LB-Amp/X-Gal/IPTG-Platten ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert.

2.5.12.2 Transformation von Blätter mittels Partikelbombardement

Für die Transformation von einzelnen abgetrennten Blättern verschiedener Pflanzenarten für Expressionsuntersuchungen wurde die Partikelkanone PDS1000 (Fa. Bio-Rad/München) ver-

wendet. Die Partikelkanone ermöglicht das Bombardement einzelner abgetrennten Blätter mit an Wolfram- oder Goldpartikeln gebundene DNA-Molekülen mit hoher Effizienz.

Durchführung:

Für die Partikelbombardement wurden die Blätter mit einem Durchmesser von 3 bis 4 cm verwendet. Die abgetrennten Blätter wurden in Petrischalen beschossen. Nach erfolgtem Bombardement wurden die Blätter für 12 Stunden in einer mit Parafilm abgedichteten Petrischale auf feuchtem Filterpapier im Dunkeln inkubiert.

Vorbereitung der Partikel:

30mg Wolframpartikel wurden in 1ml 96%igen Ethanol aufgenommen, 5min gemischt und 15min bei RT inkubiert. Nach der Zentrifugation für 30sec bei 2000rpm und Verwerfen des Überstandes wurden die Partikel in 1ml sterilem Bideest resuspendiert, 5min gemischt, 15min bei RT inkubiert und erneut 30sec bei 2000rpm zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden die Partikel in 500µl sterilem Bideest aufgenommen und bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

Vorbereitung der DNA:

Zu 90µl der Partikelsuspension in einem Eppendorfgefäß wurden unter "vortexen" 10µg Plasmid-DNA (1µg/µl) zugegeben und die Suspension für 15min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 90µl 2,5M CaCl₂, 36µl 0,1M Spermidin und 182µl Ethanol (abs.) unter "Vortexen" erfolgte eine Inkubation für 10min auf Eis. Nach der Zentrifugation der Suspension für 30sec bei 2000rpm und Verwerfen des Überstandes wurden die beladenen Partikel in 64µl Ethanol (abs.) aufgenommen und im Ultraschallbad resuspendiert. Je 5µl der beladenen Partikelsuspension wurden auf jeden "Macrocarrier" (Fa. Bio-Rad/München) aufgetragen. Nach Verdunsten von Ethanol konnte das Partikelbombardement nach Anleitung des Herstellers für die Partikelkanone PDS1000 durchgeführt werden.

2.5.13 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von der Fa. Sequence Laboratories Göttingen GmbH durchgeführt.

2.5.14. Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse erfolgte mit dem Programm OMIGA 1.1 der OXFORD MOLECULAR GROUP Ltd. Die DNA-Sequenzen wurden auf offene Leseraster, Restriktionsschnittstellen, Intron/Exon- Übergänge untersucht.

Die Homologievergleiche und die Translation von Nukleinsäuresequenzen in Aminosäuresequenzen konnten mittels Programm BLASTN (Altschul, 1990) über die genomischen Datenbank Server des National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) oder des European Molecular Biology Laboratory (EMBL) durchgeführt werden.

III. Ergebnisse.

3.1 Reinigung des 44kDa-Proteins mittels Affinitätschromatographie

Für die Herstellung eines Rohextraktes wurden 5 Tage alten etiolierten Erbsenkeimlinge ausgewählt, da das ABP₄₄ im Erbsengewebe nur sehr früh in der Entwicklung gebildet und nach 7 Tagen nicht mehr exprimiert wird (Reinard, 1994).

Der Proteinrohextrakt wurde mit 50% Ammoniumsulfat gefällt (2.3.3.1) und auf die fertig gepackte und equilibrierte Säule rezirkulierend aufgetragen. Die entscheidenden Parameter für die Extraktion sind die Wahl des Liganden, der pH des Proteinrohextraktes beim Auftrag und des Waschpuffers. Die Affinitätschromatographie wurde wie unter 2.3.2.2 beschrieben bei pH 5,5 und 4-OH-PAA als Ligand durchgeführt.

Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte mit Elutionspuffer, pH 8.0 (2.3.2.2). Das Elutionsvolumen betrug 4ml pro Säule. Nach etwa 10 Extraktionen nahm die Kapazität der Säule kontinuierlich ab, wie aus der Abnahme der eluierten Proteinmenge und der Zunahme des unspezifischen Hintergrunds in einem SDS-Gel ersichtlich war. Die durch Methanol-Aceton-Fällung (2.3.3.2) aufkonzentrierten Eluate wurden in SDS-Proben-Puffer resuspendiert, durch SDS-Gel analysiert (2.3.4.1) und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

Deren Proteingehalt konnte geschätzt werden, indem jeweils 1/5 des Proteineluats auf das Gel aufgetragen wurde. Als Referenz diente ein Proteingrößenmarker. Ein typisches Photo eines Gels ist in Abbildung 3.1 gezeigt.

Es wurden insgesamt 32 Extraktionen durchgeführt. Die Ausbeute des Proteins variierte bei den einzelnen Extraktionen beträchtlich und lag bei 0,38-4,2 μg /20g Apices.

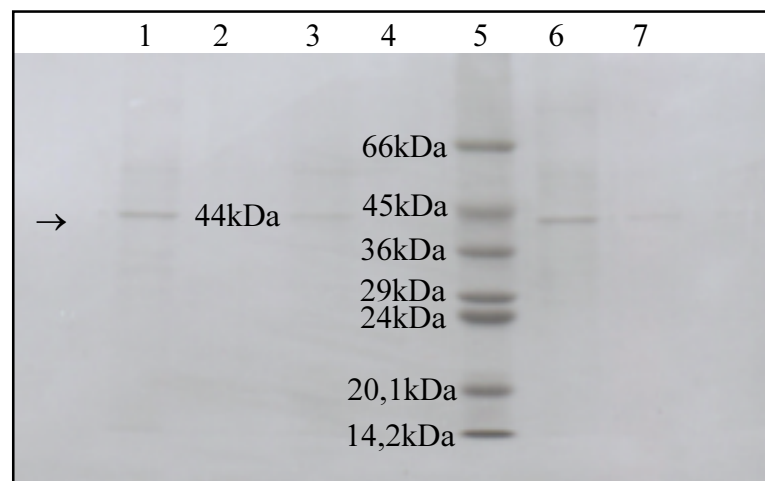


Abb. 3.1: Coomassie-Färbung des SDS-Gels mit Aliquots von jeweils 1/5 verschiedener Eluaten der Affinitätschromatographie.

Bahn 1,3,6,7: Aufgereinigtes Protein ABP₄₄; (→ kennzeichnet 44kDa Protein);
 Bahn 5: Proteingrößenmarker MS-SDS-70 (Fa. Sigma).

3.2 2-D Gelelektrophorese

Um festzustellen, ob es sich bei der im SDS-Gel aufgetrennten 44kDa-Bande tatsächlich um ein einziges Protein handelt, wurde das Eluat in einer modifizierten 2-D-Elektrophorese analysiert.

Das mittels Affinitätschromatographie aufgereinigte Protein wurde in einem 7%igen Acrylamid-Gel unter nativen Bedingungen aufgetrennt (2.3.4.2), die Gelbahn mit dem aufgetrennten Protein ausgeschnitten und im 2D-Puffer für 20min bei RT inkubiert. Das Protein in dem Gelstreifen wurde in der zweiten Dimension durch eine 10% Acrylamid SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (2.3.4.1). Das 2-D Gel wurde mit Coomassie (2.3.5.2) angefärbt und ist in Abbildung 3.2 dargestellt. Es konnte nur ein Signal bei einem Molekulargewicht um 44kDa detektiert werden. Das Ergebnis dieser Untersuchung bestätigte die Voraussage, daß es bei der 44kDa großen Bande (Abb. 3.1) nur um einem einzigen Protein handelt, das mittels Affinitätschromatographie bei pH=5,5 (2.3.2.2) gewonnen wurde.

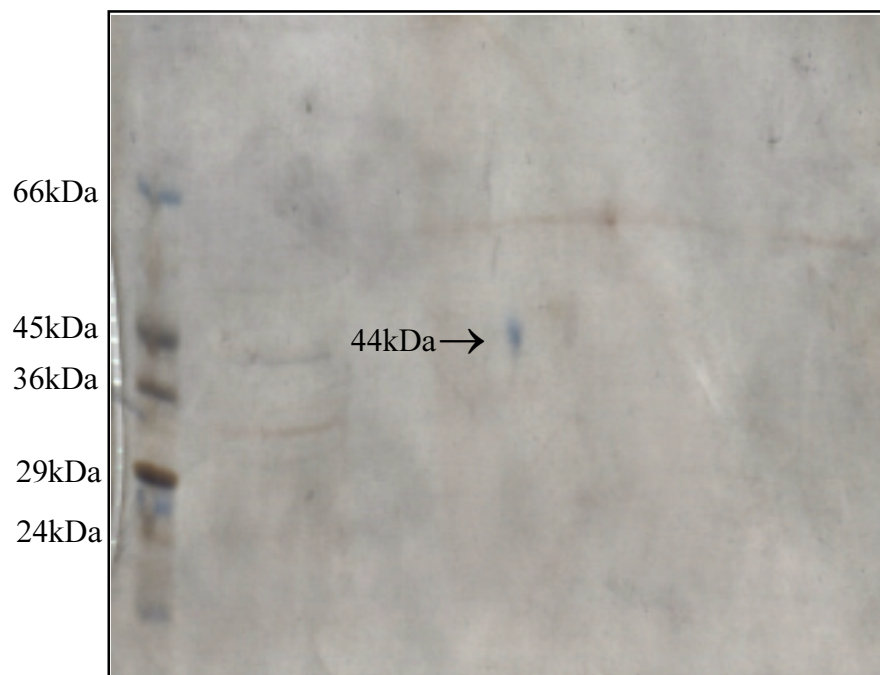


Abb. 3.2: Coomassie-Färbung der 2-D Gelelektrophorese.

Das aufgereinigte Protein wurde in einem nativen Gel aufgetrennt und in einer zweiten Dimension (SDS-Gel) aufgetragen. Im Bahn 1 wurde der Proteingrößenmarker MS-SDS-70 (Fa. Sigma) aufgetragen.

Das Signal bei 44kDa ist gekennzeichnet (→).

3.3 Reinigung für die Aminosäure-Sequenzanalyse.

Da für die Aminosäure-Sequenzanalyse des Proteins ABP₄₄ mindestens 5µg Proteins benötigt werden, wurden ca. 9µg des Proteins aus 10 Aufreinigungen zusammengeführt, auf drei Gelbahnen aufgeteilt und die Proteinbanden durch eine präparative 10% Acrylamid-SDS-Gelelektrophorese (2.3.4.1) voneinander getrennt. Nach der Auftrennung der Proteinproben im Gel und dem nachfolgenden Transfer auf aktivierte PVDF-Membran wurde der Bereich der 44kDa-Bande ausgeschnitten und bei -20°C bis zur Sequenzierung gelagert. Das Photo der Membran vor dem Ausschneiden der Proteinbande zeigt die Abbildung 3.2. Die Verunreinigungen der transferierten Proteinproben konnte auf der Membran als Schmier identifiziert werden.

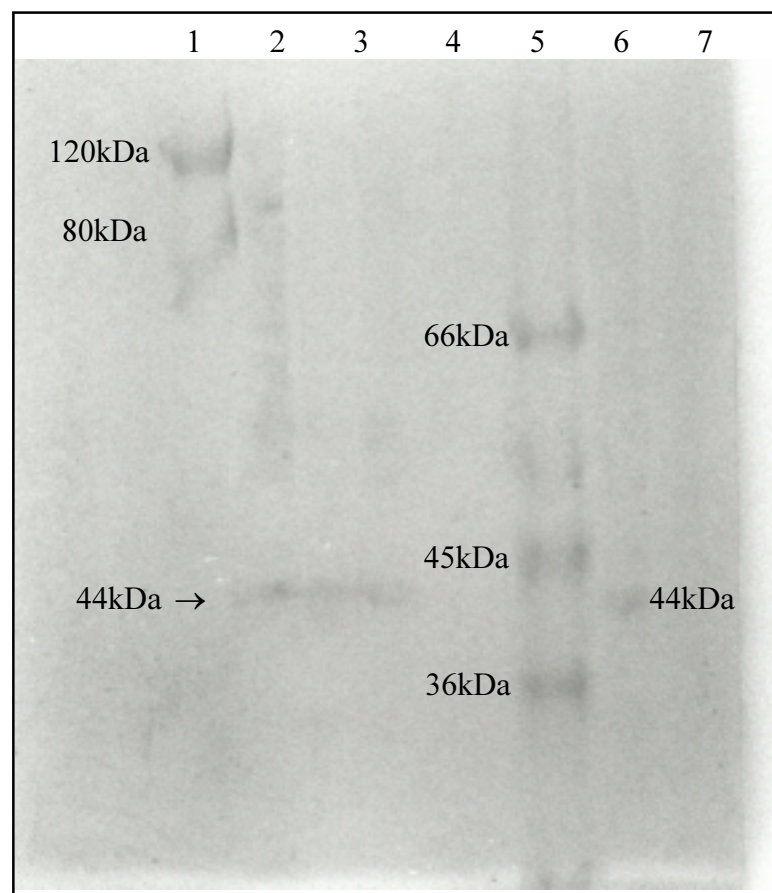


Abb. 3.3: Ponceau-S- Färbung des Western-Blots

Bahn 1: Prestained-Marker (Fa. Stratagene);

Bahn 2,3,6,: die zusammengeführten Proteineluate aus 10 Aufreinigungen wurden auf drei Bahnen verteilt (→ kennzeichnet 44kDa Proteinbande);

Bahn 5: Proteingrößenmarker MS-SDS-70 (Fa. Sigma).

3.4 Aminosäure-Sequenzanalyse

Es wurden zwei Mikrosequenzierungen von Dr. F. Buck (Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie, Universitäts-Krankenhaus Eppendorf (UKE)/Universität Hamburg) durchgeführt, eine N-terminale und eine interne nach Lys-C-Verdau.

Nach der Spaltung des Proteins mittels Endoproteinase Lys-C, welche C-terminal von Lysinen spezifisch schneidet, konnte eine weitere Sequenzierung eines internen Peptids durchgeführt werden. Es konnte nur eine einzige Fraktion (markierte Peak, Abb.3.4) zur Sequenzierung eingesetzt werden.

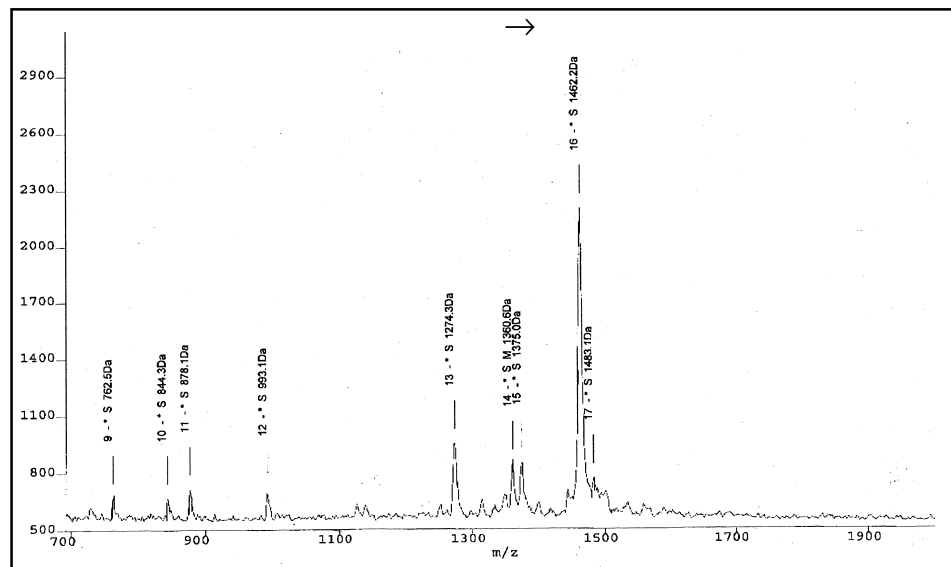


Abb. 3.4: Elutionsprofile der Reversed Phase Chromatographie. Trennung der Spaltpeptide nach Lys-C-Verdau; das sequenzierte Spaltpeptid (b in Abb. 3.5) ist gekennzeichnet (→).

Das Ergebnis der N-terminale Sequenzanalyse des aufgereinigten Proteins ist in Abbildung 3.5a dargestellt. Die untersuchte Proteinprobe zeigte keine Verunreinigungen mit weiteren Proteinkomponenten und keine N-terminale Modifizierung.

Die Aminosäure-Sequenz des Spaltpeptids im Ein-Buchstaben-Code zeigt die Abbildung 3.5b.

a) X T S F L F D D T Q I Q F X E (S) V A (S) F (A/N)
b) (A) D (R/C) V D G G Y V L N G N (K)

Abb. 3.5: a) N-terminale Mikrosequenz des Proteins ABP₄₄;

b) Mikrosequenz des Peptids nach interner Lys-C-Spaltung der 44kDa-Proteinbande.

3.5 Sequenzhomologie-Vergleiche

Mit den in Abbildungen 3.5a und 3.5b gezeigten Mikrosequenzen wurde über den “Experimental GENINFO® BLAST Network Service” des National Center for Biotechnology Information (BLAST@ncbi.nlm.nih.gov) in Peptidsequenz-Datenbanken (GenBank CDS translations, SwissProt, PIR, PDB und GenPept) nach Homologien zu bekannten Proteinen gesucht. Die Datenbankrecherchen ergaben keinerlei signifikante Homologien diesen Sequenzen zu bekannten Proteinen. Auch die Datenbankrecherchen unter dem Einsatz anderer Server (BLITZ@ebi.ac.uk und FASTA@ebi.ac.uk des EBI) blieben erfolglos.

3.6. PCR basierende Screening der cDNA-Banken aus Erbsen

3.6.1 Primererstellung

Für die weiteren molekularbiologischen Arbeiten wurden aus der erhaltenen N-terminalen bzw. internen Aminosäuresequenz zwei Primer ABP₄₄-1 und ABP₄₄-2 abgeleitet. Da für die meisten Aminosäuren mehrere Codons existieren, wurden die Oligonukleotide als degenerierte Primer synthetisiert, d.h. für gewisse Positionen mußten verschiedene Nukleotide berücksichtigt werden. Bei der Planung wurden die internen Bereiche der Mikrosequenzen mit 7 bis 8 Aminosäuren Länge ausgewählt, die nach Übersetzung in den Nukleotidcode am wenigsten degeneriert waren. Da in *Pisum sativum* L. konstitutiv exprimierte Gene eine charakteristische Codon Präferenz in Vergleich mit den anderen Genen besitzen, die Expressionsweise des zu identifizierenden Gens jedoch nicht bekannt war, wurde bei der Konstruktion der Primer die “codon usage” nicht berücksichtigt. Um die Spezifität der Primer nicht herabzusetzen, wurde weiterhin auf die Verwendung von Inosin verzichtet, welches sich mit allen vier Basen paart und somit zur Minderung der Sequenzvarianten im Primergemisch beitragen könnte. Bei dem Primer ABP₄₄-2 handelt es sich um einen reversen Primer. Die Nukleotidabfolge der beiden Primer zeigt die Tabelle 3-1. Die Oligonukleotide wurden von Fa. ROTH synthetisiert und zunächst für das PCR-gestützte Screening einer vorhandenen cDNA-Bank eingesetzt.

Primer	Sequenz in 5'3' Richtung	Variationen
N'-Mikrosequenz Primer ABP ₄₄ -1	5' TSFL F D D T Q I Q F XE(S)VA(S)F(A/N) 3' 5'GG TTY GAY GAY ACN CAR ATH CAR T 3'	40
Interne Mikrosequenz Primer ABP ₄₄ -2	5' (A)D(R/C)V D G G Y V L N G N(K) 3' 3' GAY GGN GGN TAY GTN YTN AAY GG 5' 5' CC RTT NAR NAC RTA NCC NCC RTC 3'	273

Tabelle 3-1: Die von der Mikrosequenzen abgeleitete Primer, die für die Amplifizierung des Gen-Fragments aus der cDNA-Bank in die PCR angesetzt worden sind.

Abkürzungen für Wobbels: R=A,G; Y=C,T; H=A,C,T; N=A,G,C,T.

3.6.2 Gewinnung der Phagen-DNA

Die verwendete λ ZAP-cDNA-Bank wurde 1993 von Markku Saloheimo aus Apex von 6 Tage alten etiolierten Erbsenkeimlingen hergestellt.

Zunächst wurde die Phagen-Bank, wie unter 2.5.6.3 beschrieben, amplifiziert und anschließend der Titer des Lysates durch Feintitrierung (2.5.6.2) bestimmt. Die Feintitrierung ergab einen Titer von 57pfu/50 μ l der Verdünnungstufe 10^{-6} . Aus diesem Wert konnte ein Titer von $1,14 \times 10^9$ pfu/ml für das amplifizierte Phagenlysate berechnet werden.

Zur Herstellung des Flüssiglysates (2.5.6.4) wurden 2×10^8 pfu angesetzt. Die weiteren Aufreinigung der Phagen-DNA erfolgte wie unter 2.5.7.1 beschrieben. Die aufgereinigte DNA wurde in 30 μ l autoklaviertem H₂O gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt. Die DNA-Ausbeute betrug 4,4 μ g.

3.6.3 Klonierung des amplifizierten 600bp großen cDNA-Fragments

Das Durchmustern der λ ZAP cDNA-Bank erfolgte mit zwei degenerierten Primern ABP₄₄-1 und ABP₄₄-2, Standard-Primer T3 und T7 des Vektors Uni-ZAP und aufgereinigter Phagen-DNA als Template in der PCR. Zur Orientierung wurden die analytischen PCRs mit der in der Tabelle 3-2 ausgeführten Primerkombinationen in 50 μ l-Ansätzen bei der Annealing-Temperaturen von 55°C; 52°C und 48°C in 30 Zyklen durchgeführt. Die Komponenten der PCR-Ansätze wurden in den unter 2.5.9 angegebenen Konzentrationen verwendet. Die Auswahl der Annealing-Temperatur richtete sich nach T_{AN} der Standard-Primer T7 und T3, die aus der Nukleotidabfolge dieser Primer errechnet werden konnte.

Aliquots der PCR-Ansätze von je 5 μ l wurden über eine Agarosegelelektrophorese analysiert. Die Abbildung 3.6 zeigt das Gelphoto mit den Amplifikaten.

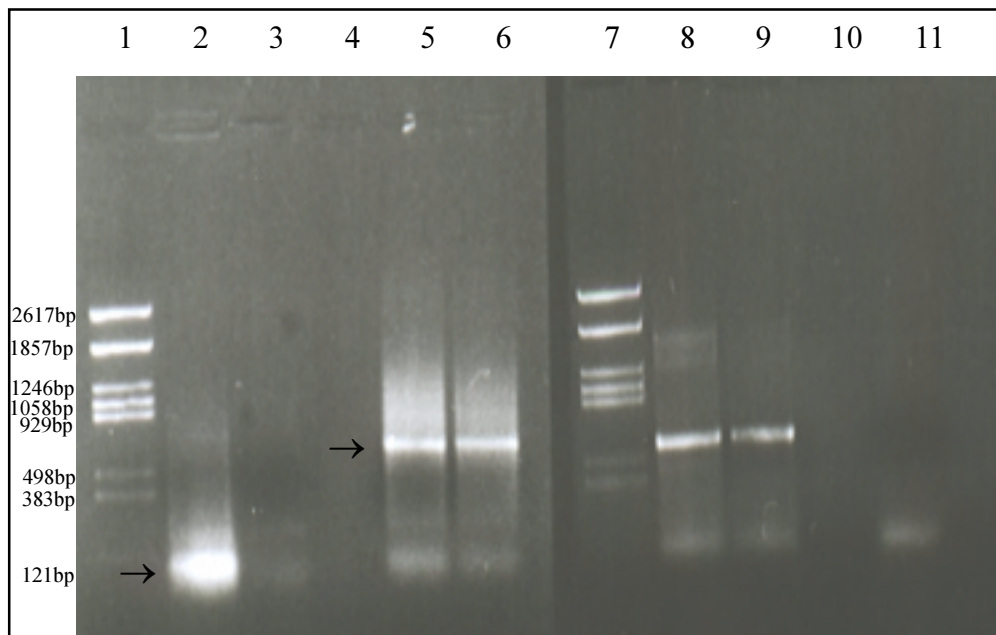


Abb. 3.6: Amplifizierte cDNA-Fragmente eines PCR basierenden Screenings der λ ZAP-cDNA-Bank aus Apex von 6 Tage alten etiolierten Erbsenkeimlingen.

Bahn 1 und 7: DNA-Größenmarker M21;

Bahn 2 und 3: PCR-Ansatz mit Primerkombination ABP₄₄-1/T7, durchgeführt bei T_{AN}=55°C;

Bahn 5 und 6: PCR-Ansatz mit Primerkombination ABP₄₄-1/T7, durchgeführt bei T_{AN}=52°C;

Bahn 8 und 9: PCR-Ansatz mit Primerkombination ABP₄₄-1/T7, durchgeführt bei T_{AN}=48°C;

Bahn 11: PCR-Ansatz mit Primerkombination ABP₄₄-1/T7, durchgeführt bei T_{AN}=48°C als Negativkontrolle ohne Template.

Die in der Tabelle 3-2 dargestellte cDNA-Amplifikate sind gekennzeichnet (→);

Die überschüssigen Primer sind als diffuse Banden im unteren Bereich des Gels zu erkennen.

Da die Lage der internen Mikrosequenz innerhalb des Proteins nicht bekannt war, konnte für die Primerkombinationen ABP₄₄-1/ABP₄₄-2 und ABP₄₄-2/T3 keine Größe des PCR-Produkts vorhergesagt werden. Die Größe des zu erwarteten PCR-Produktes bei der Primerkombination ABP₄₄-1/T7 konnte aus der Größe des Proteins errechnet werden. Das Fragment sollte um 1500bp groß sein.

Primerkombination	ABP ₄₄ -1 / ABP ₄₄ -2	ABP ₄₄ -1 / T7	ABP ₄₄ -2 / T3
Tm=55°C	Kein Amplifikat	150 bp Fragment	Kein Amplifikat
Tm=52°C	Kein Amplifikat	600 bp Fragment	Kein Amplifikat
Tm=48°C	Kein Amplifikat	600 bp Fragment	Kein Amplifikat

Tab. 3-2: Die Tabelle zeigt die Fragmentgrößen, die mit entsprechenden Primerkombinationen in einer PCR amplifiziert worden sind.

Wie aus der Tabelle 3-2 ersichtlich ist, konnten keine Genfragmente bei den Primerkombinationen ABP₄₄-1/ABP₄₄-2 und ABP₄₄-2/T3 amplifiziert werden. Bei der PCR mit der Primer ABP₄₄-1 und T7 konnten bei drei verschiedenen Annealing-Temperaturen zwei cDNA-Fragmente erhalten werden. Obwohl die Größen der Fragmente nicht mit der errechneten Größe übereinstimmen, wurden die Banden der 150bp- und 600bp-Amplifikate mit einer sterilen Rasierklinge aus einem präparativen Agarosegel unter UV-Licht herausgeschnitten und die DNA aus der Agarose, wie unter 2.5.7.8 beschrieben, aufgereinigt.

Die aufgereinigte DNA-Fragmente wurden in den pGEM-T-Vektor subkloniert. Die Ligation fand bei 16°C über Nacht in einem 20µl Ansatz (2.5.10.1) statt. Je ein 100µl-Aliquot kompetenter *E. coli XL-1 blue* Zellen wurde mit jeweils 5µl der Ligationsansätze transformiert (2.5.12). Von positiven, weißen Kolonien der Subklonierung des 600bp-Fragments wurden Plasmidschnellpräparationen (2.5.7.2) durchgeführt und die erhaltene, native DNA gelelektrophoretisch analysiert. Als Größenkontrolle im Gel diente native Vektor-DNA. Plasmide, die größer als das Ausgangsplasmid waren und somit eine Insertion besaßen, wurden mit *SstI* und *SstII* Restriktionsendonukleasen, wie unter 2.5.8 beschrieben, hydrolysiert und in einem weiteren Agarosegel analysiert. Die Abbildung 3.7. zeigt eines dieser Gele. Die Klonierung des 150bp PCR-Fragments blieb erfolglos, da es sich bei dieser Bande mit größer Wahrscheinlichkeit um eine diffuse Bande der überschüssigen Primer oder um Primerdimere handelte.

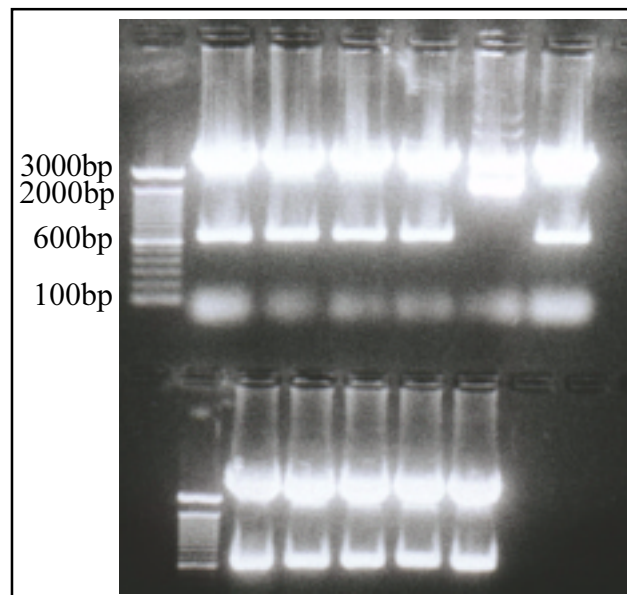


Abb. 3.7: Überprüfung rekombinanter Plasmide der Subklonierung des 600bp-PCR-Amplifikates durch *SstI/SstII*-Hydrolyse. Die Auftrennung der Hydrolyseprodukte im 1%igen Agarosegel zeigt bei 10 der 11 analysierten Plasmiden eine ca. 600bp große Insertion. Als Größenmarker diente der 100bp-Marker (MBI Fermentas).

3.6.4 Sequenzierung des 600bp PCR-Fragments

Die Analyse der erhaltenen Sequenzen des 600bp PCR-Fragmentes ergab, daß bei nur zwei der zehn sequenzierten Plasmide, die ein Insert besaßen, die Nukleotidabfolge des Primers ABP₄₄-1 bis auf zwei letzten Basen wiedergefunden werden konnte. Die Sequenzen aus den flankierenden Aminosäuresequenzen der Mikrosequenzierung konnten aber in der Nukleotidsequenz nicht gefunden werden. Die Sequenzen der beiden Klone waren 100%ig identisch. Die anderen acht Klone enthielten Phagen-DNA als klonierten Amplifikat.

Die Homologievergleiche der cDNA-Sequenz in der EMBL Datenbank zeigten 83% Homologie mit dem Histon H3-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und 84% Homologie mit dem Histon H3-Gen von *Medicago sativa*, wobei bei dem ca. 26bp langen Sequenzfragment am 5'-Terminus, welches auch die Primersequenz einschließt, gar keine Homologie zu den bekannten Sequenzen festgestellt werden konnte. Daraus konnte geschlossen werden, daß entweder begünstigt durch den starken Wobbeln des Primers ABP₄₄-1 oder durch „mispriming“ dieses Primers in der PCR ein cDNA-Fragment für ein anderes Gen amplifiziert und kloniert wurde. Die Sequenz wird in Abbildung 3.8 dargestellt.

```

GTT CGA TGA TAC GCA AAT CCA CCG GAG GCA AAG CCC CAA GGA AAC AAC TAG CAA CCA
AAG CTG CTC GCA AAT CTG CTC CGG CGA CCG GAG GAG TAA AGA AGC CTC ACA GAT TTC
GTC CAG GAA CTG TTG CTT TAA GAG AGA TCA GGA AGT ATC AGA AGA GCA CAG AGC TTC
TCA TCA GGA AAC TTC CGT TCC AAA GAT TGG TTA GAG AAA TCG CTC AGG ATT TCA AAA
CGG ATC TCC GAT TCC AAA GCA GTG CCG TTT CTG CTC TTC AAG AAG CCG CTG AAG CCT
ATC TTG TTG GTT TGT TCG AAG ATA CCA ACC TTT GTG CCA TTC ATG CAA AGA GAG TCA
CTA TCA TGC CTA AGG ATA TTC AAC TCG CTC GCA GAA TCA GAG GCG AGA GAG CTT AGA
ATT TTC ATT TTA TGT AAT TTC GCT CTA TTA GGG TTT GGT TCA TCT GTT AAG AAT CTT
GAT GTA GCA GTG CAT CGA TCT ATT AAT ATG AGT TTG TTC GGA AAG TGA ATC AAC ATG
TTT TAT AAT ATT AAT CTT GAA TGT TTG GAT TCG TAA AAAAAAAAAAAAAA 564

```

Abb. 3.8: cDNA-Sequenz eines PCR-Fragmentes aus λ ZAP cDNA-Bank aus Apex der 6 Tage alten etiolierten Erbsenkeimlingen.
Der für die PCR angesetzte degenerierte Primer ABP₄₄-1 ist fettgedruckt.

Um die Daten zu überprüfen, wurden zwei spezifische Primer PHLP-1 und PHLP-2 von den Sequenzbereichen am 5'-Ende und 3'-Ende abgeleitet, welche eine Homologie zu den Nukleotidsequenzen der anderen Histon H3-Genen aufwiesen, und in eine PCR unter gleichen Bedingungen eingesetzt. Das amplifizierte Fragment wurde in pGem-T Vektor subkloniert und sequenziert. Bei der Sequenz handelte es sich um ein Histon H3-Gen, da die abgeleitete Aminosäuresequenz 100%ige Homologie zu dem Histon H3 aus Erbse und anderen bekannten Histon H3-Sequenzen zeigte. Die cDNA-Sequenz wurde in NCBI Datenbank unter Acc.-Nr. AJ002555 eingetragen.

Anhand dieser Ergebnisse wurde die Notwendigkeit der Herstellung einer neuen cDNA-Bank aus Erbse ersichtlich.

3.7 Herstellung der cDNA-Bank

3.7.1 Isolierung der Gesamt RNA aus etiolierten Erbsenkeimlingen

Für die Gewinnung der Gesamt RNA wurden die 3 Tage alten Keimlinge von *P. sativum* var. *Solara* im Dunkel angezogen (2.2). Aus 100mg im Dunkel geernteten Apices wurde die Gesamt-RNA mit der Hilfe des "RNeasy Plant Kits" (2.5.5) präpariert. Die photometrische Messung der gewonnenen Gesamt-RNA ergab die Konzentration von 200ng/μl. Die Ausbeute betrug 10μg. Die isolierte Gesamt-RNA wurde gelelektrophoretisch analysiert (Abb.3.9) und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert

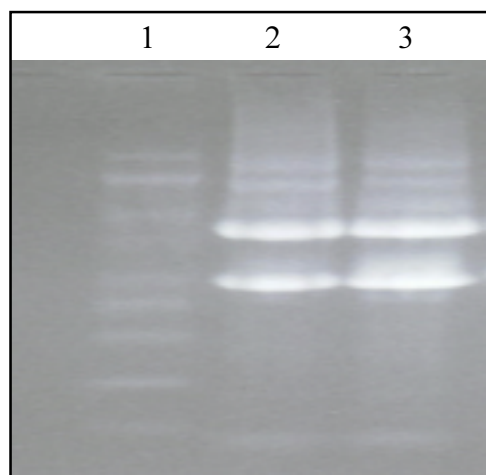


Abb. 3.9: Elektrophoretische Analyse der Gesamt-RNA aus Apex von drei Tage alten etiolierten Erbsenkeimlinge (Bahn 2; 3). Bahn 1: RNA-Größenmarker.

3.7.2 cDNA-Synthese

Die Erststrang-cDNA- und Doppelstrang-cDNA-Synthese wurde mit der Hilfe des “SMART-Kits” (Fa. Clontech) für cDNA-Bank-Herstellung durchgeführt (2.5.6).

Aus 600ng in eine Synthese-Reaktion angesetzter Gesamt-RNA wurde unter Verwendung der Superscript MMLV Reverse Transcriptase (Fa. Life Technologies) und der Primerkombination SMART Oligonukleotide und CDS/3' PCR-Primer die Erststrang-cDNA revers transkribiert. 2µl aus dem Erststrangsyntheseansatz wurden als Template in 100µl-PCR-Ansatz mit Primerkombination 5' PCR-Primer und CDS/3' PCR-Primer unter Verwendung 50xAdvantage Klen Taq Polymerase zur Amplifizierung der Doppelstrang-cDNA angesetzt.

Die gewonnene Doppelstrang-cDNA wurde gelelektrophoretisch analysiert (Abb.3.10).

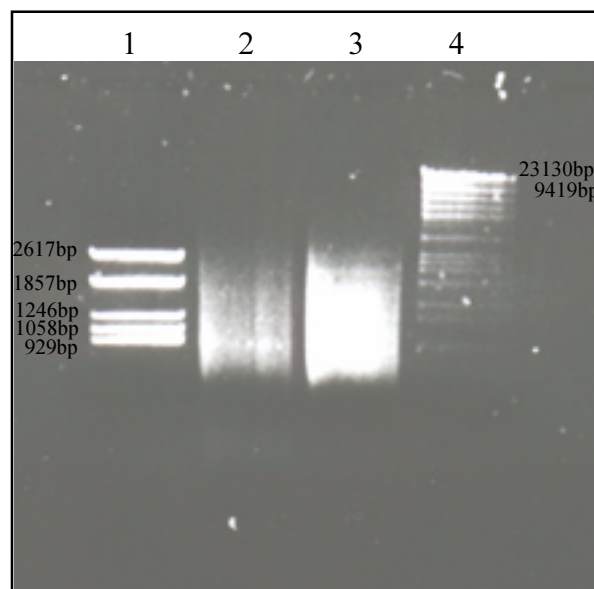


Abb. 3.10: Analyse der im 1,1% Agarosegel aufgetrennten Doppelstrang-cDNA.

Bahn 1: DNA-Größenmarker M21 (Fa. MBI Fermentas);

Bahn 2: ds-cDNA, amplifiziert aus humaner Skelettmuskel-Gesamt-RNA, welche im Kit als Kontrolle mitgeliefert wurde;

Bahn 3: ds-cDNA aus *P.sativum* L.;

Bahn 4: DNA-Größenmarker M17 (Fa. MBI Fermentas).

Um die Subklonierung der gewonnenen cDNA in den λ gt11-Vektor über eine *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle zu ermöglichen, mußte die cDNA mit den *EcoRI*-NotI-*Sall*-Adaptoren ligiert werden. Nach der anschließenden Dephosphorylierung wurde die cDNA einer Fraktionierung unterzogen, um die kleine (<0,4kb) cDNA-Fragmente, unligierte Adaptoren und Adaptor- und Primerdimere zu entfernen. Dieser Schritt hat eine sehr große Bedeutung,

da die kleineren Fragmente bei einer Ligation mit dem Vektor immer bevorzugt werden. Die aus solcher Ligationen entstandene Produkte können die Qualität der hergestellten cDNA-Bank beträchtlich reduzieren. Die Fraktionierung der cDNA erfolgte über eine "Size-Säule". Jeweils 3µl von jeder Fraktion wurden in einem 1,1%igen Agarosegel analysiert (Abb. 3.11).

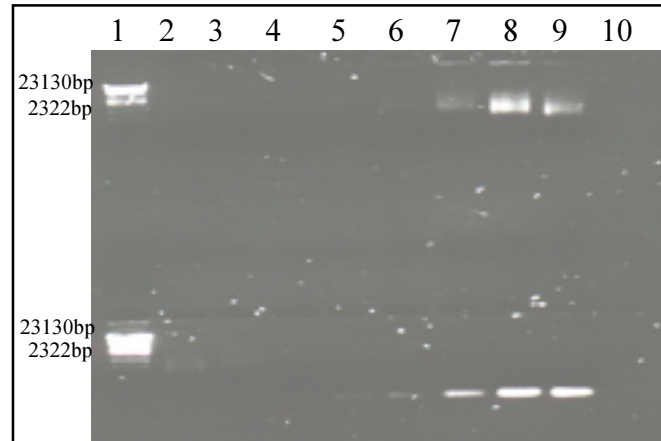


Abb. 3.11: Analyse der Fraktionsprofile der cDNA.
 Bahn 1 (oben und unten): DNA-Größenmarker M2 (Fa. MBI Fermentas);
 Bahn 2-9 (oben): cDNA-Fraktionen 1 bis 8;
 Bahn 2-9 (unten): cDNA-Fraktionen 10 bis 16.

Es wurde bei Fraktionen 7 und 8 die höchste Intensität der größeren als 0,5kb cDNA-Banden festgestellt. Die kleineren (<0,4kb) cDNA-Fragmente und die möglichen Verunreinigungen sind ab Fraktion 11 auf dem Gel zu sehen.

Die Fraktionen 5-10 wurden zusammengeführt, die cDNA mittels Glycogen-Fällung konzentriert und in 6µl sterilem Wasser resuspendiert. Die so vorbereitete cDNA konnte zwischen Restriktionsschnittstellen des Einklonierungsbereiches („Multiple Cloning Site“) des λ-Vektors durch eine Ligation eingebaut werden. Der λgt11-Vektor wurde vor der Ligation mit der *EcoRI*-Restriktionseendonuklease geschnitten. Die bei der Ligation entstandenen rekombinanten Vektormoleküle wurden anschließend in Phagen verpackt.

Für die Verpackung der rekombinanten Vektor-DNA wurde der Verpackungsextrakt "Gigapack® III Gold" (Fa. Stratagene) verwendet.

Von der hergestellten cDNA-Bank wurde eine Feintitrierung wie unter 2.5.6.2 beschrieben durchgeführt. Der Titer der cDNA-Bank konnte nach Auszählung der Phagenplaques der Verdünnung 1:5 mit $1,5 \times 10^6$ pfu/ml ermittelt werden. Für die weitere Verwendung wurde die Bank wie unter 2.5.6.3 beschrieben amplifiziert. Die Amplifizierung der gesamten cDNA-Bank erfolgte auf siebzehn 150mm-großen LB ($MgSO_4$)-Agarplatten. Es wurde 5×10^4 pfu pro Platte ausplattiert und für 16 Stunden über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Platten zeigten am nächsten Morgen eine fast vollständige Lyse des Y1090-Bakterienrasens. Die Phagen wurden mit je 2ml SM-Puffer von den Platten abgeschwemmt und die Phagenlysate in einem 50ml-

Falcon gesammelt. Die Zugabe des Chloroforms führte zur Abtötung der eventuell verbleibenden Bakterien. Durch die anschließende Zentrifugation konnten die Phagenlysate ohne Bakterienreste gewonnen werden. Die amplifizierte cDNA-Bank wurde erneut titriert (2.5.6.1). Es ergab sich ein Titer von $1,5 \times 10^{10}$ pfu/ml.

3.8 Identifizierung der partiellen cDNA des Proteins ABP₄₄ mit Hilfe der PCR

3.8.1 PCR-gestütztes Screening der hergestellten Phagen-Bank

Bei dem PCR-gestützten Screening der Phagen-Bank mit den in der Tabelle 3-1 aufgeführten degenerierten Primern diente die wie unter 2.5.7.1 beschrieben isolierte Phagen-DNA aus dem cDNA-Bank als Template. (Abb. 3.12). Es konnten zwei Banden in einer PCR mit der Annealingtemperatur von 60°C amplifiziert werden, wobei die ca. 1600bp große Bande eine stärkere Intensität zeigte. Der starke Hintergrund, der auf dem Gel zu sehen ist, ist auf Wobbeln den Primer zurückzuführen. Bei einem Reamplifizierungsversuch unter stringenteren Bedingungen ($T_{AN}=62^\circ\text{C}$) verschwanden die schwächeren Banden und die Intensität des Hintergrunds nahm ab (Daten nicht gezeigt). Das 1,6kb PCR-Fragment wurde aus dem Gel aufgereinigt (2.5.7.8), in *E. coli* XL1-blue kloniert und sequenziert. Bei der Sequenzanalyse des klonierten PCR-Amplifikates wurde eine starke Homologie zu der Phagen-DNA festgestellt, dabei handelte es sich um einer Mispriming des Primers ABP₄₄-1. Die Nukleotidabfolge des Primers ABP₄₄-2 konnte nicht wiedergefunden werden.

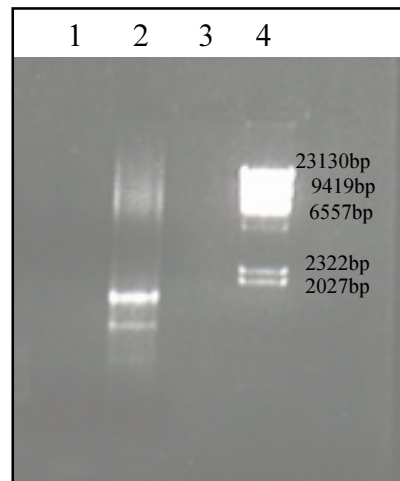


Abb. 3.12: Amplifizierte PCR-Fragmente zur Gewinnung des N-terminalen Teils des ABP₄₄-Gens aus der Phagen-DNA der cDNA-Bank aus apicalen Bereich der 3 Tagen alten Erbsenkeimlingen. (50µl PCR-Ansatz mit Primer ABP₄₄-1/ABP₄₄-2, Phagen-DNA als „Template“, 2-3U 50xAdvantage KlenTaq-Polymerase Mix (Fa. Clontech).

Bahn1: Negativkontrolle mit Aq_{reinst} als „Template“;

Bahn2: Mögliche N-terminale Fragmente des ABP₄₄-Gens, welche bei $T_{AN}=60^\circ\text{C}$ amplifiziert wurden;

Bahn4: DNA-Größenmarker M2 (Fa. MBI Fermentas).

3.8.2 PCR-gestütztes "Screening" der ds-cDNA

Nachdem der Versuch, ein cDNA-Fragment aus der cDNA-Bank über PCR mit degenerierten Oligonukleotiden zu amplifizieren, kein positives Ergebnis erbrachte, wurde als alternativer Ansatz eine PCR mit der ds-cDNA als Template und bei gleicher Primerkombination durchgeführt.

Die Aliquots der PCR-Ansätze von je 5 μ l wurden über eine Agarosegelelektrophorese analysiert, welche in Abbildung 3.13 gezeigt wird.

Das am stärksten amplifizierte PCR-Produkt der Primerkombination ABP₄₄-1 / ABP₄₄-2 lag im Bereich zwischen 383bp und 498bp. Bei der Annealingtemperatur von 60°C hatten sich neben diesem Amplifikat auch schwächer amplifizierte Produkte durchgesetzt. In Bahn 4 sind die schwachen Banden zu beobachten, die etwa 1kb, 500bp und 300bp groß sind. Bei der niedrigeren Annealingtemperatur von 55°C konnte nur eine sehr schwache Bande im Bereich zwischen 383bp und 498bp amplifiziert werden, die anderen Amplifikate verschwanden. In der Abwesenheit von cDNA kam es zur keiner Amplifikation der PCR-Produkten, was die Verunreinigung des PCR-Ansatzes ausschloß.

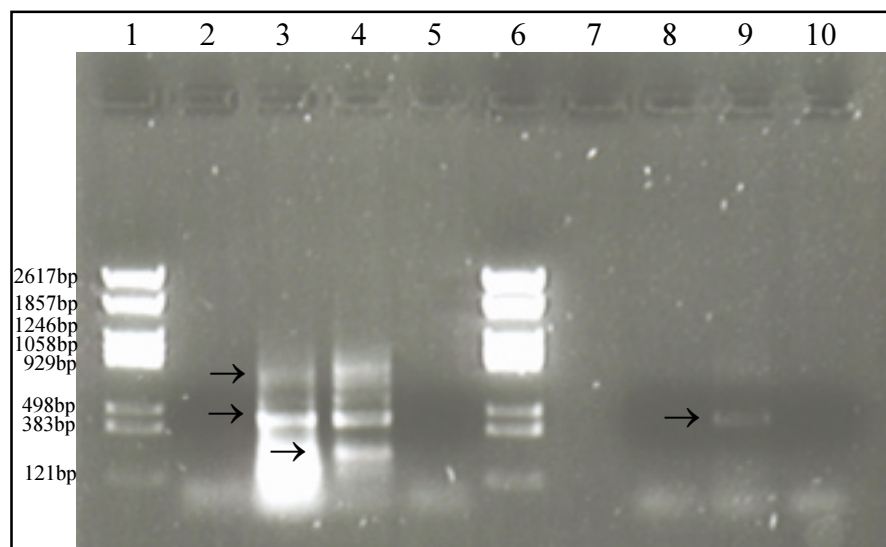


Abb. 3.13: Amplifizierte Genfragmente analytischer PCR zur Gewinnung des N-terminalen Teils des ABP₄₄-Gens aus der ds-cDNA aus apicalen Bereich der 3 Tagen alten Erbsenkeimlingen. (50 μ l PCR-Ansatz mit Primer ABP₄₄-1/ABP₄₄-2, ds-cDNA als „Template“, 2-3U 50x Advantage KlenTaq-Polymerase Mix (Fa. Clontech).

Bahn 1, 6: DNA-Größenmarker M21 (Fa. MBI Fermentas);

Bahn 2: Negativkontrolle mit Aq_{reinst} als „Template“;

Bahn 3 und 4: Mögliche N-terminale Fragmente des ABP₄₄-Gens, welche bei T_{AN}=60°C amplifiziert wurden;

Bahn 9: Mögliches N-terminalen Fragment des ABP₄₄-Gens, welches bei T_{AN}=55°C amplifiziert wurde
Die cDNA-Amplifikate sind gekennzeichnet (→).

Obwohl die DNA der ca.300bp, ca. 450bp und ca.1kb großen PCR-Amplifikate aus dem Agarosegel aufgereinigt wurden, konnte eine Klonierung nicht durchgeführt werden, weil die DNA nach der Aufreinigung in sehr geringer Konzentration vorlag.

Durch eine wiederholte PCR mit aufgereinigten cDNA-Amplifikaten als Template konnten die 450bp und 1kb Fragmente so verstärkt werden, das genügend DNA für die weitere Klonierung aufgereinigt werden konnte. Die ca. 300bp und ca. 500bp großen PCR-Fragmente konnten dagegen nicht reamplifiziert werden.

3.8.3 Klonierung der PCR-Produkte

Die Klonierung der durch PCR erzeugten Fragmente diente einer späteren Identifizierung der partiellen cDNA des untersuchten Proteins ABP₄₄.

Beide isolierte PCR-Fragmente wurden zuerst in den pGem T-Vektor subkloniert (2.5.10.1), mit dem anschließend der *E.coli*-Stamm XL1-Blue transformiert wurde. Die Selektion positiver Klone konnte durch Ausplattierung auf mit IPTG und X-Gal vorbehandelten LB-Amp Platten durchgeführt werden. Von den gewachsenen Klonen der 450bp-Klonierung sind 19 nicht blau gefärbt worden, bei der 1kb-Klonierung konnten 14 weißen Klone identifiziert werden. Bei einem Kontrollansatz mit dem unbehandelten Vektor wurden ausschließlich blaue Klone erhalten. Eine weitere Kontrolle mit *E.coli* XL1-Blue ohne Plasmid bestätigte die Selektivität der Platten, indem keine Bakterienkolonien auf der Platte gewachsen sind.

Von jeweils 9 positiven Klonen aus beiden erfolgreichen Klonierungen wurden Übernachtkulturen angesetzt und die Plasmide isoliert. Mit einer *SstI/SstII*-Hydrolyse und einer Gelelektrophorese wurden die Plasmide daraufhin untersucht, ob sie die einklonierten PCR-Fragmente enthielten (Abb.3.14a und b).

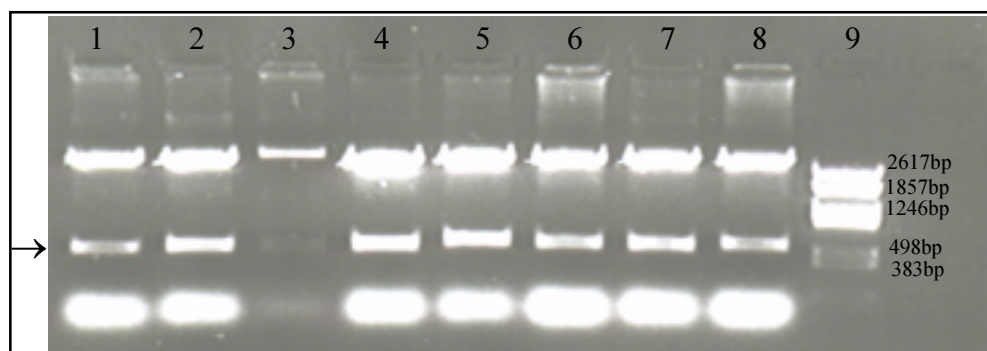


Abb.3.14a: Restriktionsanalyse nach einer Plasmidpräparation der Subklonierung eines ca. 450bp großen PCR-Amplifikates. Es wurden acht Restriktionsansätze mit jeweils 1µg DNA aufgetragen (Bahn 1-8), die mit jeweils 10U *SstI* und *SstII* gespalten wurden. Alle untersuchten Plasmide enthalten ein Insert von der Größe, die dem klonierten PCR-Fragment entspricht. Die ausgeschnittenen Fragmente sind gekennzeichnet (→).

Bahn 9: DNA-Größenmarker M21 (Fa. MBI Fermentas).

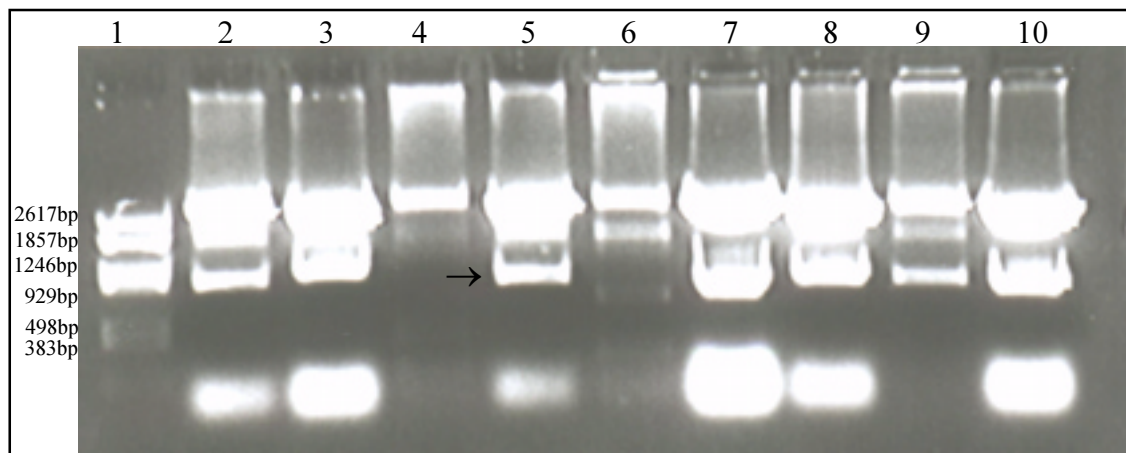


Abb.3.14b: Restriktionsanalyse nach einer Plasmidpräparation der Subklonierung eines ca. 1kb großen PCR-Amplifikates. Es wurden die Restriktionsansätze mit jeweils 1µg DNA aufgetragen, die mit jeweils 10U *SstI* und *SstIII* gespalten wurden. Sieben der neun untersuchten Plasmide enthalten ein Insert von der Größe, die dem klonierten PCR-Fragment entspricht (Bahn 2, 3, 5, 7-10). Die ausgeschnittenen Fragmente sind gekennzeichnet (→). Bahn 1: DNA-Größenmarker 21.

3.8.4 Sequenzierung der klonierten PCR-Produkte

Die beiden klonierten Fragmente konnten direkt aus dem aufgereinigten Plasmid pGem-T sequenziert werden.

Durch die Sequenzierung der Fragmente mit den Primer T7 und SP6 konnte jedes Fragment von beiden Seiten sequenziert werden, wobei der T7 Primer die Sequenz des kodierenden Stranges vom 5'-Ende Richtung 3'-Ende liest und der SP6 Primer mit dem 3'-Ende des Fragments beginnt und Richtung 5'-Ende liest. Die Orientierung des Inserts im Vektor konnte erst anhand seiner Sequenz ermittelt werden, da es ungerichtet in das Plasmid einligiert wurde.

Die Analyse der erhaltenen Sequenzen der Subklonierung des 450bp-Fragmentes ergab, daß bei vier der sieben sequenzierten Plasmide die Nukleotidabfolge der Primer ABP₄₄-1 und ABP₄₄-2 wiedergefunden werden konnte. Die Sequenzen aus den flankierenden Aminosäuresequenzen der beiden Mikrosequenzierungen konnten aber in der Nukleotidsequenz nicht gefunden werden. Die Sequenzen der Klone waren 100%ig identisch. Bei den drei anderen sequenzierten Plasmiden p0,5-1; p0,5-2 und p0,5-3 konnten sowohl die beiden Primer als auch die Sequenzen aus den flankierenden Aminosäuresequenzen der N-terminalen und internen Mikrosequenzierungen wiedergefunden werden. Das klonierte Fragment ist 455bp groß. Aufgrund des durch die PCR-Primer vorgegebenen Leserasters konnte die Aminosäuresequenz des 455bp-Fragmentes abgeleitet werden. Die von der Nukleotidsequenz des 455bp-PCR-Produktes abgeleitete Aminosäuresequenz besteht aus 151 Aminosäuren. Die Aminosäuresequenz zeigte 58% Homologie mit der Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase (IVD) aus Ratte (Acc.-Nummer P12007), 60% Homologie mit der menschlichen IVD (Acc.-Nummer P26440), 62%

Homologie mit der IVD aus *Caenorhabditis elegans* und 77% Homologie mit einer nicht näher charakterisierten partiellen cDNA aus Reisswurzeln (Acc.-Nummer D24729). Es wurde aber 78% und damit die höchste Homologie zu IVD aus *Arabidopsis thaliana* festgestellt. Nach den Ergebnissen der Sequenzvergleiche könnte das 455bp-PCR-Amplifikat mit hoher Wahrscheinlichkeit einem für eine IVD-kodierenden Gen entstammen. Die erhaltene Nukleotidsequenz wird in Abbildung 3.15 dargestellt.

→ Primer ABP ₄₄ -1														
F	D	D	T	Q	I	Q	F	K	E	S	V	A	Q	F
ttt	gac	gac	acg	cag	att	cag	ttt	aaa	gag	agt	gtt	gct	caa	ttt
A	N	E	N	I	A	P	H	A	S	K	I	D	H	T
gct	aat	gaa	aat	att	gcc	cct	cat	gct	tcc	aaa	att	gac	cac	act
N	Y	F	P	Q	E	V	N	L	W	K	S	M	G	E
aac	tat	ttc	cca	cag	gag	gtt	aac	ttg	tgg	aaa	agt	atg	gga	gaa
F	N	L	H	G	I	T	A	P	E	E	Y	G	G	L
ttt	aat	ctc	cat	ggg	att	act	gca	cca	gag	gag	tat	gga	ggg	ctt
G	L	G	Y	L	Y	H	C	I	A	M	E	E	I	S
ggt	cta	ggt	tac	ttg	tat	cat	tgt	ata	gca	atg	gaa	gag	att	agc
R	A	S	G	S	V	G	L	S	Y	G	A	H	S	N
cgc	gct	tca	gga	tcc	gtt	ggt	ctt	tct	tat	ggt	gct	cat	tct	aac
L	C	I	N	Q	L	V	R	N	G	S	H	A	Q	K
cta	tgt	atc	aat	caa	ctg	gtg	agg	aat	gga	agc	cat	gct	cag	aaa
Q	K	Y	L	P	K	L	I	S	G	D	H	V	G	A
cag	aaa	tac	ttg	cca	aag	ctt	atc	tcc	ggg	gat	cac	gtg	gga	gct
L	A	M	S	E	P	N	S	G	S	D	V	V	S	M
ttg	gcg	atg	agt	gaa	ccc	aat	tct	ggg	tct	gat	gtt	gtc	ggc	atg
K	C	K	A	D	R	V	D	G	G	Y	V	L	N	G
aaa	tgc	aag	gct	gat	cgt	gta	gac	gga	gga	tat	gta	ctt	aat	gg
														←Primer ABP ₄₄ 2

Abb. 3.15: cDNA-Sequenz des mit der Primerkombination ABP₄₄-1/ABP₄₄-2 amplifizierten PCR-Fragments und daraus übersetzte Aminosäuresequenz. Die für die PCR angesetzten Primer finden sich jeweils an den Enden der Sequenz und sind fettgedruckt. Die Aminosäuresequenzen aus den Mikrosequenzierungen des Proteins sind fettgedruckt.

Von den Plasmiden, die 1kb großen Inserts besaßen, wurden drei Klone sequenziert. Es konnten zwar in der erhaltenen Nukleotidabfolgen die beiden Oligonukleotide ABP₄₄-1 und ABP₄₄-2 wiedergefunden werden, die restlichen Sequenzen waren aber nicht homolog zu den Nukleotidsequenzen, die aus Aminosäuresequenzen des Proteins abgeleitet wurden. Die Sequenzen zeigten 100%ige Homologie zueinander. Durch diese Sequenzierung konnte eindeutig belegt werden, daß es sich bei dem 1kb großen PCR-Fragment nicht um eine cDNA des Proteins ABP₄₄ handelt.

Die Datenbankrecherche zeigte 94%ige Homologie der Nukleinsäuresequenz des 1kb-Amplifikates zur cDNA-Sequenz des 14-3-3-like Proteins aus *Pisum sativum* L..

3.9 RACE-PCR-Experimente

Um die Sequenz der gesuchten cDNA von der bereits identifizierten partiellen cDNA in 5'- und 3'-Richtungen verlängern zu können, wurde eine RACE (**R**apid **A**mplification of **c**DNA **E**nds)-Methode ausgewählt. Diese Methode soll die Erzeugung der gesamten cDNA erleichtern, von der nur ein kurzer Bereich (partielle cDNA) bekannt ist. Durch Ligation der eingesetzten cDNA mit dem speziellen Adaptor können PCR-Versuche mit einem genspezifischen Primer und einem für den Adaptor hergestellten Primer durchgeführt werden. Da die in dieser Arbeit für die RACE-Experimente eingesetzte cDNA bereits bei der Erststrang-Synthese mit Hilfe der beiden AdaptorPrimer SMART-oligonucleotide und CDS/3'Primer hergestellt wurde (s.3.7.2), konnte auf die Ligation der cDNA mit dem anderen AdaptorPrimern verzichtet werden. In einem parallelen RACE-PCR-Ansatz wurde Phagen-DNA aus der cDNA-Bank als „Template“ eingesetzt.

3.9.1 5'-RACE

Für die Identifizierung von spezifischen Sequenzen aus dem 5'-Bereich wurde die PCR mit sequenzspezifischem Reverse-Primer ABP₄₄-4rev in Kombination mit dem 5'-Primer aus dem „SMART-Kit“ durchgeführt. Das mit dieser Primerkombination erzeugte Produkt in einem PCR-Ansatz mit cDNA als Template wies eine Bande bei ca. 450bp auf und wurde für die anschließende Klonierung ausgewählt (Abbildung 3.16). Im Gegensatz zu diesem Experiment wurden in dem PCR-Ansatz mit Phagen-DNA als „Template“ mehrere Fragmente amplifiziert, wobei die korrespondierende Bande eine geringere Intensität aufwies (Abbildung 3.16; Bahn 2; gekennz.→).

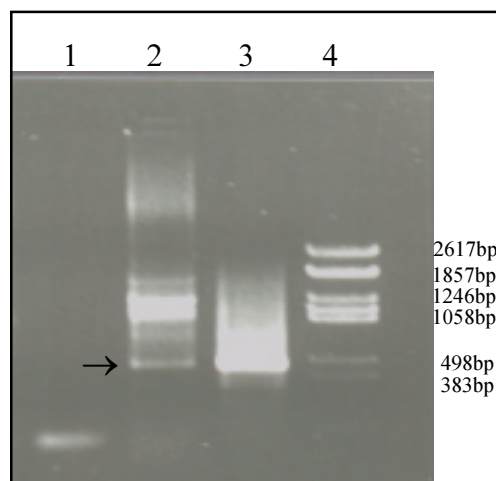


Abb. 3.16: Amplifizierte Genfragmente einer PCR zur Gewinnung des 5'-Endes der cDNA des ABP₄₄-Gens. (50µl PCR-Ansatz mit Primer SMART5'Primer/ABP₄₄-4rev, dscDNA bzw. Phagen-DNA aus der cDNA-Bank als „Template“, 2-3U Combipol (Fa. Invitex)).

Bahn 1: Negativkontrolle mit Aq_{reinst} als „Template“;

Bahn 2: Mögliche 5'Fragmente des ABP₄₄-Gens, welche in einem PCR-Ansatz mit Phagen-DNA als „Template“ amplifiziert wurden;

Bahn 3: Mögliches 5'Fragment des ABP₄₄-Gens, welches in einem PCR-Ansatz mit cDNA als „Template“ amplifiziert wurde;

Bahn 4: DNA-Größenmarker M21 (Fa. MBI Fermentas).

Um genügend DNA für die anschließende Ligation aus dem Gel aufzureinigen zu können, war es notwendig, dieses PCR-Produkt in einem wiederholten PCR-Ansatz zu reproduzieren. Das 450bp große cDNA-Fragment wurde mit pGEM-Vektor für die Ligation eingesetzt, um die kompetenten Bakterien des *E. coli* XL 1-Blue-Stammes zu transformieren. Insgesamt 9 unabhängige Bakterienkolonien wurden durch Restriktionsverdau überprüft. Bei sieben der neun untersuchten Klone entsprach die Insertgröße den erwarteten 450bp (Abb.3.17).

Als Negativkontrolle diente die nach der Restriktionsverdau linearisierte DNA des pGem-T-Vektors.

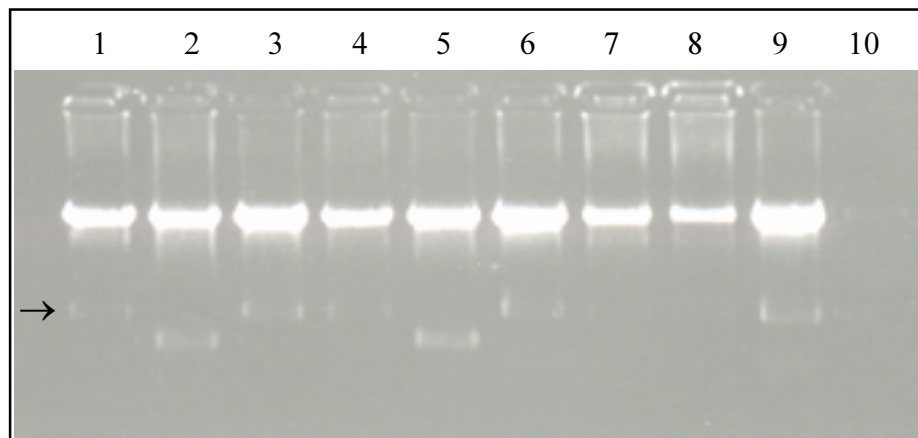


Abb. 3.17: Restriktionsanalyse nach einer Plasmidpräparation der Subklonierung eines ca. 450bp großen PCR-Amplifikates. Es wurden neun Restriktionsansätze mit jeweils 1 µg DNA aufgetragen, die mit jeweils 10U *SstI* und *SstII* gespalten wurden. Sieben der neun untersuchten Plasmide (Bahn 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9) enthielten ein Insert von der Größe, die dem klonierten PCR-Fragment entsprach.

Die Plasmide p0,4-4 und p0,4-9 wurden für die Sequenzierung ausgewählt.

Die Sequenzierungen der beiden Plasmide ergaben dieselbe Basenfolge mit einer Länge des einklonierten PCR-Fragments von 457bp.

Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit der partiellen cDNA-Sequenz (3.8.4) verglichen. Im Insert konnte ein Sequenzbereich identifiziert werden, der mit 239bp der partiellen cDNA-Sequenz (3.8.4) übereinstimmte, außerdem konnten die Sequenzen der beiden für die Amplifizierung des Fragments angesetzten Primer ABP₄₄-4rev und SMART 5'Primer gefunden werden. Durch diese Sequenzierung des Amplifikationsproduktes konnte der 5'-flankierende Sequenzbereich des ABP₄₄-cDNA-Fragmentes um 189bp erweitert werden. Dieser Sequenzabschnitt enthielt das Translationsstartcodon. Aufgrund der Tatsache, daß bei der Herstellung der cDNA mittels reverser Transkription (2.5.9.2) der SMART 5'Primer zur Erhaltung der Cap-Struktur am 5'-Ende der cDNA, und damit zur Erhaltung des vollständigen 5'-Endes der cDNA beiträgt, wurde geschlossen, daß somit das komplette 5'-Ende der cDNA des untersuchten Proteins gefunden wurde.

3.9.2 3'-RACE

Um den 3'-Terminus der cDNA aufzuklären, wurden der genspezifischen Primer ABP₄₄-3 und der CDS/3' Primer aus dem SMART-Kit in reverser Richtung in eine 3'-RACE-PCR eingesetzt. Der CDS/3' Primer sollte dabei mit dem PolyA-Sequenz am 3'-Terminus der cDNA hybridisieren und nach der Amplifikation ein PCR-Fragment ergeben, welches die komplette Sequenz des Gens vom ABP₄₄-3 (Vorwärtsprimer) bis zum C-Terminus beinhaltet. Da bei diesem Experiment nur der ABP₄₄-3 Primer die genspezifische Nukleotidabfolge besaß und der andere Primer mit allen Transkripten hybridisieren konnte, die über eine PolyA-Sequenz verfügten, wurde die PCR bei der für den ABP₄₄-3 Primer errechneten Annealingtemperatur von 60°C durchgeführt. Die PCR-Ansätze wurden in einem 1%igen Agarosegel überprüft (Abb. 3.18). In der Abbildung ist zu sehen, daß sich unter den beschriebenen Bedingungen eine spezifische ca. 1000bp große Bande durchsetzen konnte, wobei die Amplifikate aus PCR-Ansätzen mit Phagen-DNA als „Template“ deutlich schwächer sind als Amplifikate, die aus Ansätzen mit ds-cDNA als „Template“ erhalten werden.

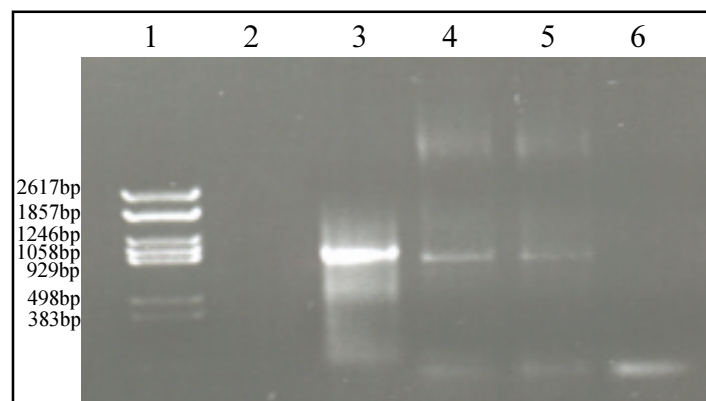


Abb. 3.18: Amplifizierte Genfragmente einer PCR zur Gewinnung des 3'-Endes der cDNA des ABP₄₄-Gens. (50µl PCR-Ansatz mit Primer ABP₄₄-3/CDS3'Primer, ds-cDNA bzw. Phagen-DNA aus der cDNA-Bank als „Template“, 2-3U Combipol (Fa. Invitex).

Bahn 1: DNA-Größenmarker M21 (Fa. MBI Fermentas);

Bahn 3: Mögliches 3' Fragment des ABP₄₄-Gens, welches in einem PCR-Ansatz mit cDNA als „Template“ amplifiziert wurde;

Bahn 4 und 5: Mögliches 3'Fragment des ABP₄₄-Gens, welches in einem PCR-Ansatz mit Phagen-DNA als „Template“ amplifiziert wurde;

Bahn 6: Negativkontrolle mit Aq_{reinst} als „Template“.

Nach anschließender Subklonierung dieses Amplifikates im pGEM-T-Vektor und Transformation der *E. coli* XL1-blue konnten mehrere weiße Klone erhalten werden. Aus neun Klonen wurde Plasmid-DNA präpariert und nach einem Verdau mit Restriktionsendonukleasen *SstI* und *SstII* in einem 1%igen Agarosegel untersucht. Um festzustellen, ob die aus den positiven

Klonen isolierten Plasmide das Insert beinhalten, wurde die nach dem Restriktionsverdau linearisierte DNA des pGem-T-Vektors aufgetragen, welche als Negativkontrolle diente. Wie in Abbildung 3.19 zu sehen ist, enthalten alle neun untersuchten Plasmide zwei DNA-Fragmente als Insert, was auf eine interne *SstI*- bzw. *SstII*-Restriktionsschnittstelle in dem einklonierten PCR-Amplifikat deutet. Die Größen der beiden Fragmente konnten in einem weiteren Agarosegel festgestellt werden, indem ein DNA-Größenmarker neben der Plasmid-DNA aufgetragen wurde. Die Summe der Größen der beiden Fragmente entsprach der Größe des einklonierten Inserts. Nach der anschließenden Sequenzierung des Plasmids p1-6 wurde eine Sequenz erhalten, welche sowohl die Nukleotidsequenzen der beiden Primer, als auch die Aminosäuresequenz der internen Mikrosequenzierung des Proteins beinhaltet.

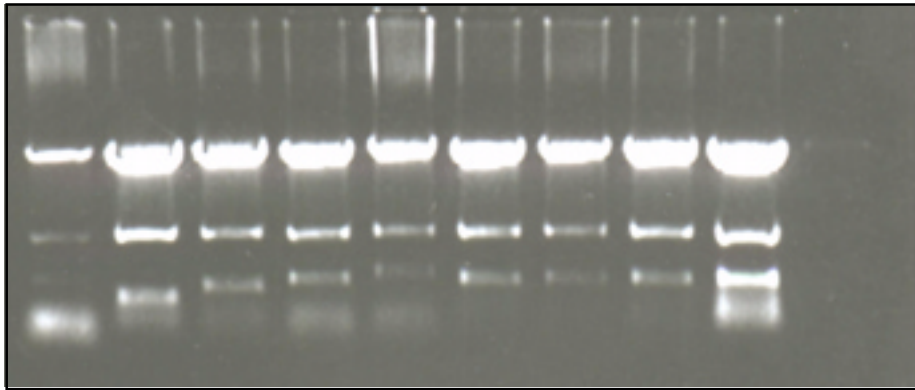


Abb.3.19: Restriktionsanalyse nach einer Plasmidpräparation der Subklonierung eines ca. 1kb großen PCR-Amplifikates der 3'RACE. Es wurden die Restriktionsansätze mit jeweils 1µg DNA aufgetragen, die mit jeweils 10U *SstI* und *SstII* gespalten wurden. Alle neun aufgetragenen Plasmide enthalten ein Insert, das wegen einer interne *SstI* bzw. *SstII*-Restriktionsschnittstelle in zwei Fragmente gespalten wurde.

3.10 Klonierung der vollständigen ABP₄₄-cDNA

3.10.1 Identifizierung der vollständigen ABP₄₄-cDNA mittels PCR

Insgesamt konnten mit den Primerkombinationen ABP₄₄-1/ABP₄₄-2, ABP₄₄-3/CDS3'Primer, ABP₄₄-4rev/SMART 5'Primer etwa 1600bp amplifiziert werden. Da diese Sequenz nur durch Addition der Sequenzen von drei verschiedenen PCR-Fragmenten entstand, mußte die Existenz der cDNA des untersuchten Proteins in *Pisum sativum* L. durch die Isolierung der kompletten cDNA bestätigt werden. Die Sequenzaufklärung des 5'- und 3'-Terminus der cDNA ermöglichte die Synthese von spezifischen Primern ABP₄₄-5 (=sense) ABP₄₄-6 rev (=antisense), die für eine Amplifikation der gesamten cDNA eingesetzt werden konnten. Mit diesen Primern ließ sich aus der cDNA ein ca. 1,5kb großes Fragment bei T_{AN}=60°C amplifizieren. Eine PCR

mit Phagen-DNA der cDNA-Bank als „Template“ ergab ein Amplifikationsprodukt gleicher Größe, aber schwächerer Intensität. Die PCR-Ansätze wurden unter Verwendung der korrekturlesenden Combi Polymerase (Fa. InViTek) durchgeführt. Das Amplifikationsprodukt aus der cDNA wurde aus dem Agarosegel isoliert (2.5.7.8) und kloniert. Nach Transformation kompetenter *E.coli* XL-1 Blue Zellen sind aus den rekombinanten Klonen die Plasmide isoliert worden, welche nach dem Restriktionsverdau mit *SstI* und *SstII* Enzymen auf einem Agarosegel analysiert wurden.

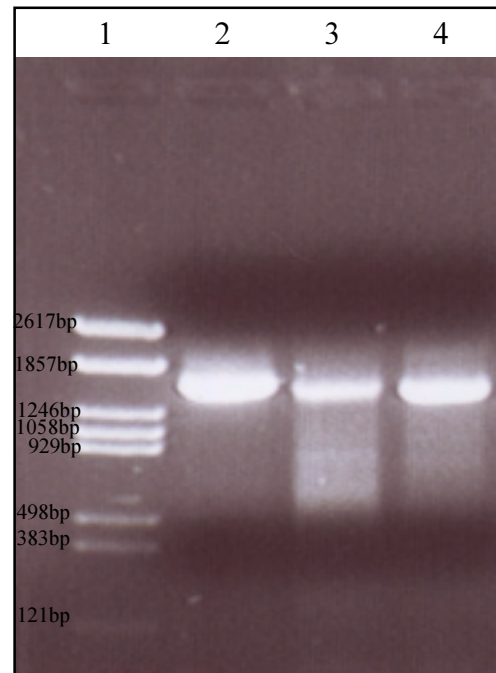


Abb. 3.20: Amplifikation spezifischer cDNA-Fragmente des IVD-Genes aus *Pisum sativum* L. Mit der Primerkombination ABP₄₄-5/ABP₄₄-6 konnte sowohl aus der cDNA (Spur 2) als auch aus Phagen-DNA der cDNA-Bank (Spur 3, 4) ein ca. 1,5kb großes Fragment amplifiziert werden. In Spur 1 ist der DNA-Größenmarker M21 (MBI Fermentas) gezeigt.

3.10.2 Sequenzierung und Sequenzanalyse der ABP₄₄-cDNA

Die Sequenzierung des positiven Klon pC-5 zeigte eine 100% Übereinstimmung mit den Sequenzen der Plasmide p0,5-1, p0,4-4, und p1-6. In der Sequenz konnten die Nukleotidabfolgen aller für die Amplifikation der PCR-Produkte angesetzten Primer, sowie die Aminosäuresequenzen aus der Mikrosequenzierungen des isolierten Proteins identifiziert werden. Somit war die Klonierung der gesamten cDNA für das aufgereinigte 44kDa große Auxin-bindende Protein ABP₄₄ abgeschlossen. Die Sequenz umfaßte 1573bp (Abb. 3.21). Die Sequenz wurde in der EMBL Datenbank unter Acc. Nummer AJ010945 publiziert.

Die Sequenzanalyse erfolgte mit Hilfe des Programms OMIGA 1.1 (Oxford Molecular Group

Ltd.), dabei wurde die cDNA-Sequenz auf Restriktionsschnittstellen und offene Leseraster untersucht. Die translatierte Region umfaßt 1224bp, beginnend mit dem ersten Startcodon (Initiationscodon) an der Position 103 am 5'-Terminus und endend an der Position 1327 am 3'-Terminus. Unmittelbar nach der N-terminalen Mikrosequenz in 5'-Richtung konnte ein Signalpeptid identifiziert werden, welches aus 24 Aminosäuren besteht.

5'→3'Primer ABP₄₄-5

gat agc gat ata aaa caa gaa caa caa caa cta cta cta aag cta

stromaufwärts gelegener Translationsstop im Leseraster des ABP₄₄ ←- 5'-nicht
act aac caa tca tat caa **taa** cac aca cac aca cgg ttt tat tta

translatierte Region M L R T R I N T A R S
ttg ttg tta aac **atg** ctt aga aca aga atc aac aca gca cgt tcc

I F S S I F R I N S S S Y S T
att ttt tca tct att ttc aga atc aat tct tct tct tat tcc act

5'→3'Primer ABP₄₄-1

S F L F D D T Q I Q F K E S V
tcc ttc ctc ttt gac gac acg cag att cag ttt aaa gag agt gtt

A Q F A N E N I A P H A S K I
gct caa ttt gct aat gaa aat att gcc cct cat gct tcc aaa att

D H T N Y F P Q E V N L W K S
gac cac act aac tat ttc cca cag gag gtt aac ttg tgg aaa agt

M G E F N L H G I T A P E E Y
atg gga gaa ttt aat ctc cat ggg att act gca cca gag gag tat

G G L G L G Y L Y H C I A M E
gga ggg ctt ggt cta ggt tac ttg tat cat tgt ata gca atg gaa

Primer ABP₄₄-4 rev 3'←5'

E I S R A S G S V G L S Y G A
gag att agc cgc gct tca gga tcc gtt ggt ctt tct tat ggt gct

H S N L C I N Q L V R N G S H
cat tct aac cta tgt atc aat caa ctg gtg agg aat gga agc cat

A Q K Q K Y L P K L I S G D H
gct cag aaa cag aaa tac ttg cca aag ctt atc tcc ggg gat cac

V G A L A M S E P N S G S D V
gtg gga gct ttg gcg atg agt gaa ccc aat tct ggg tct gat gtt

5'→3' **Primer ABP₄₄-3**

V S M K C K **A D R V D G G Y V**
gtc ggc atg aaa tgc aag gct gat cgt gta gac gga gga tat gta

L N G N K M W C T N G T V A Q
ctt aat ggt aac aag atg tgg tgt act aat ggg acc gtt gct caa

T L V V Y A K T D I T A G S K
aca tta gtt gtc tat gca aaa aca gac ata aca gca ggg tca aaa

G I T A F I I E K G M P G F S
gga atc act gca ttc atc atc gag aag gga atg cct gga ttc agt

T A Q K L D K L G M R G S D T
act gcg cag aaa ttg gat aaa cta ggg atg cga gga agt gat aca

C E L V F E N C F V P D E N V
tgt gag ctt gtc ttc gag aat tgc ttt gtt cca gac gaa aat gtt

L G K E G K G V Y V M M S G L
ctt ggg aaa gaa gga aaa gga gtc tat gtc atg atg tcg ggg ttg

D L E R L V L S G G P L G I M
gat ttg gaa agg ctt gtt tta tca ggt ggt ccc ctt ggt att atg

Q A C L D V V L P Y T R Q R E
cag gca tgt ctc gat gtt gtc ctt cct tat act cga caa cga gag

Q F G H P I G E F Q F I Q G K
cag ttt ggt cat cct att gga gag ttt cag ttc atc cag gga aaa

V A D M F T S L Q S S R S Y V
gtt gca gac atg ttt acg tct tta cag tcc tca agg tct tac gtg

Y S V A R D C D N G K V D P K
tat tct gta gct cgg gac tgt gat aac gga aaa gtt gac ccg aag

D C A G V I L C A A E R A T Q
gat tgt gct gga gtt ata ctt tgt gca gct gaa aga gca acg cag

V A L Q A I Q C L G G N G Y V
gtt gct ttg cag gcg ata caa tgt tta ggc ggg aac ggt tat gtg

N E Y P T G C L L R D A K L Y
aat gaa tat cca acc ggt tgt ctc ctt aga gat gct aaa ctt tac

E I G A G T S E I R R M I I G
gag atc gga gcc gga act agt gag atc aga aga atg att ata gga

R E L F K E Q ******* 3'-nicht translatierte Region→
cgc gag ctc ttc aag gag caa **tga** catgctagtcctttggatthttgactgg

aactgagcctcttgagatgattctttgtaaaagaatthtttcattaatcaaatgagaat

tgtgttaaccaaattgatcaacaatacaagaacaaaaaactgccatgtcatatthttg

Primer ABP₄₄-6 rev 3'←5'

atgtgctcttttgctgtgaaaatcttgtaagcaattcaaacaatatttttcgcgaaaaaa
 aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagcggccgctcgaatta 1573

Abbildung 3.21: Darstellung der gesamten Nukleotidsequenz der IVD-cDNA aus Erbse, der flankierenden Bereiche und der abgeleiteten Aminosäuren des IVD-ORFs. Die Aminosäuresequenzen sind über dem zweiten Nukleotid jedes Codons im Ein-Buchstaben-Code angegeben. Die Translationsstart- und Terminationsstelle sind fettgedruckt. Die Nukleotidsequenzen der in die PCR-Reaktionen eingesetzten Primer sind einfach unterstrichen. Die Aminosäuresequenzen der N-terminalen und internen Mikrosequenzierungen des Auxin-bindenden Proteins ABP₄₄ sind fettgedruckt. Die Aminosäuresequenz des Signalpeptids ist einfach unterstrichen.

3.10.3 Homologievergleich

Mit dem Programm BLASTN des National Center for Biotechnology Information (NCBI) wurde in der genomischen Datenbank EMBL nach homologen Sequenzen zu cDNA gesucht. Dabei konnte die größte Homologie von 78% zur cDNA von Isovaleryl-CoA Dehydrogenase aus *Arabidopsis thaliana* (Acc.Nummer:AF160729.1) festgestellt werden. Außerdem wies die IVD aus *Caenorhabditis elegans* mit 62% die zweithöchste Identität auf. In einem vergleichbaren Bereich bewegten sich die Homologien zu der IVD aus Ratte zu menschlicher IVD, nämlich 61%, und 60%.

Auf Aminosäureebene betrug die Homologie zu der IVD aus *Caenorhabditis elegans* 57,8%, zur menschlichen IVD: 60% und zur IVD aus *Arabidopsis thaliana*: 83,1%. Die meisten Unterschiede zwischen Aminosäuresequenzen aus verschiedenen Spezies, welche in Abbildung 3.22 dargestellt sind, befanden sich in N-terminalen Bereichen der Proteine.

Aus den Daten der Mikrosequenzierung und der DNA-Analyse ergab sich zweifelsfrei, daß das gesuchte Auxin-bindende Protein ABP₄₄ offenbar eine Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase aus Erbse sein konnte. Genauerer Aufschluß könnten die funktionale Analyse des Proteins, sowie molekulare Charakterisierung des genomischen Klons ergeben.

3.11 Klonierung des Gens für Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase aus *Pisum sativum* L.

3.11.1 Identifizierung eines genomischen Klons für IVD aus *Pisum sativum* L.

Zur Identifizierung des IVD-Gens aus *Pisum sativum* L. führte ein PCR-gestütztes ‘‘Screening’’ der genomischen Gesamt-DNA.

Zunächst wurde die genomische Gesamt-DNA aus Pflanzenmaterial der Erbsensorten ‘‘Solara’’ und ‘‘Dippes Gelbe Viktoria’’ (DGV) mittels CTAB-Methode (2.5.7.3) isoliert und als ‘‘Template’’ in die PCR-Reaktionen mit den Primerkombination ABP₄₄-15/ABP₄₄-6rev unter Verwendung der Combipol-Polymerase (Fa. InViTek) angesetzt. Diese Polymerase ist für die Amplifikation von größeren Fragmenten besser geeignet, als die anderen Polymerasen. Die Annealing-Temperatur betrug 62°C. Die Aliquots der PCR-Ansätze von je 5µl wurden über eine Gelelektrophorese analysiert, welche in Abbildung 3.23 dargestellt wird.

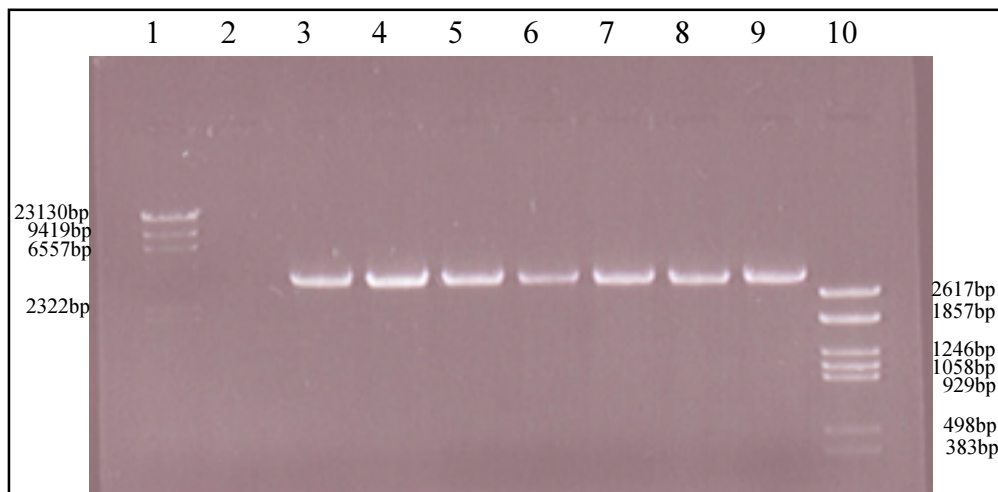


Abb. 3.23: Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente des IVD-Gens aus *Pisum sativum* L. Mit der Primerkombination ABP₄₄-15/ABP₄₄-6rev konnte ein ca. 3600bp großes Fragment aus DNA der Sorte ‘‘Solara’’ (Spur 3-6) und DGV (Spur 7-9) amplifiziert werden. In Spur 1 ist der DNA-Größenmarker M2 gezeigt. In Spur 10 ist der DNA-Größenmarker M21 gezeigt.

Wie aus Tabelle 3-3 ersichtlich ist, unterscheiden sich die cDNA-Amplifikate und Amplifikate aus genomischer DNA beträchtlich, was auf die Präsenz von Introns in der genomischen DNA zurückzuführen ist.

Primerkombination	ABP ₄₄ -15/ABP ₄₄ -6	ABP ₄₄ -15/ABP ₄₄ -4	ABP ₄₄ -3/ABP ₄₄ -6
cDNA-Amplifikat (bp)	1573bp	429bp	929bp
Genomische DNA-Amplifikat (bp)	Ca.3600bp	Ca.1000bp	Ca.1800bp

Tab. 3-3: Die Tabelle zeigt die Fragmentgrößen der Amplifikate aus cDNA und genomischer Gesamt-DNA, die mit entsprechenden Primerkombinationen in einer PCR amplifiziert worden sind.

Aufgrund der Größenunterschiede zwischen den beiden mit der Primerkombination ABP₄₄-15/ABP₄₄-6rev amplifizierten Fragmente konnte die gesamte Länge der vermutlichen Introns berechnet werden. Die betrug ca. 2027bp.

3.11.2 Nukleotidsequenz des IVD-Gens aus Erbse

Zur Ermittlung der gesamten Nukleotidsequenz des mit den Primer ABP₄₄-15 und ABP₄₄-6rev aus der genomischen Gesamt-DNA amplifizierten PCR-Fragments mußte diese Sequenz zunächst für die Sequenzanalyse zugänglich gemacht werden, indem die für die weitere Klonierung des Fragments ausreichende DNA-Menge durch die Reamplifizierung gewonnen werden konnte. Parallel dazu wurden die beiden kleineren DNA-Fragmente, welche mit Primerkombinationen ABP₄₄-15/ABP₄₄-4rev und ABP₄₄-3/ABP₄₄-6rev amplifiziert worden sind, dem Reamplifikationsschritt unterzogen. Nach der Subklonierung der aus dem Agarosegel aufgereinigten DNA-Fragmente in den pGem-T-Vektor und Transformation der *E. coli XL-1 Blue* Zellen wurden Plasmidschnellpräparationen von positiven weißen Kolonien durchgeführt. Die Analyse der Plasmide nach der Restriktionsverdau mit Restriktionsendonukleasen *SstI* und *SstII* erfolgte in einem Agarosegel (Abb.3.24).

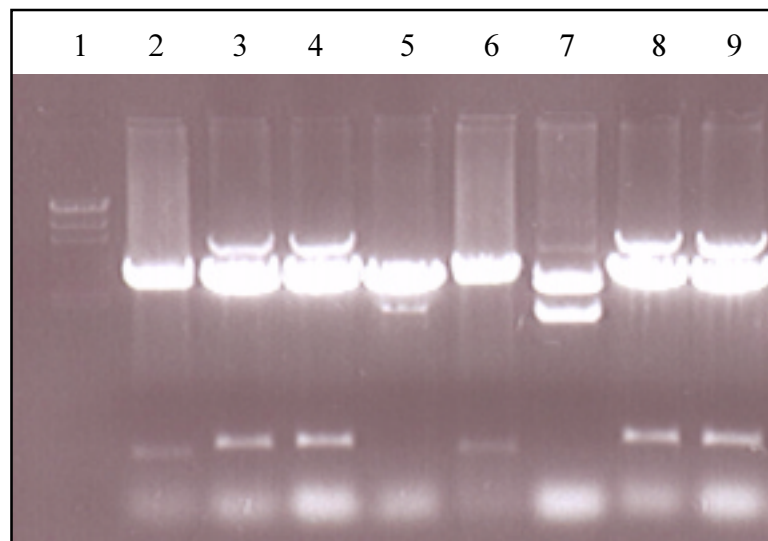


Abb. 3.24: Restriktionsanalyse nach einer Plasmidpräparation der Subklonierung eines ca. 3,6kb großen PCR-Amplifikates. Es wurden die Restriktionsansätze mit jeweils 1 µg DNA aufgetragen, die mit jeweils 10U *SstI* und *SstII* gespalten wurden. Sechs aufgetragene Plasmide enthalten ein Insert, das wegen einer internen *SstI* bzw. *SstII*-Restriktionschnittstelle in zwei Fragmente gespalten wurde.

Mit Hilfe der direkten Sequenzierung der Plasmide p3,6-2 und p3,6-9 unter Verwendung der genspezifischen Primer wurde die Nukleotidabfolge des 3,6kb großen amplifizierten Fragments bestimmt. Es konnten keine Abweichungen in den Sequenzdaten zwischen den beiden Plasmiden festgestellt werden. Die ermittelten Sequenzen mit 1kb und 1,8kb großen Inserts wiesen eine Homologie von 100% zu den entsprechenden 5'- und 3'-Bereichen des 3,6kb großen PCR-Amplifikates auf.

Die Nukleotidsequenz des IVD-Gens, wie in Abbildung 3.25 dargestellt, umfaßt 3542bp.

5'-nicht translatierte Region

```
GATAGCGATA TAAAACAAGA ACAACAACAA CTACTACTAA AGCTAACTAA CCAATCATAT 60
                                     EXON I
                                     M L R T R I
CAATAACACA CACACACACG GTTTTATTTA TTGTTGTAA ACATGCTTAG AACAGAATC 120
N T A R S I F S S I F R I N S S S Y S T
AACACAGCAC GTTCATTTT TTCATCTATT TTCAGAATCA ATTCTTCTTC TTATTCCACT 180

S F L F D D T Q I Q INTRON I
TCCTTCCTCT TTGACGACAC GCAGATTCAG gtttcaccct ttactgtttg tacttgtttt 240

tctcatgttt tggctctaat cattgccccca ttttgtgtgt tttgtaaaaa tttgatcttt 300

tctcatctgg gtttttttagc ttgggtcaaaa atgattgatc ccatttttct gtatttgtaa 360

aaatttgaac tttttcattt gggttggtaa aaaatgatga tcccattttt ctgtatttat 420

aaaaatttga acttttttat ctgggttggg caaaaatgat gatcttattt ttctgtattt 480
```

ataaaaatTT gaactTTTTc atttgggttg gtaaaaaatg atgatcttat ttttctgtat 540
 ttataaaaat ttgaactTTTT tcatttgggtt tttgttcaat tctctatttag gaataatTTg 600
 catanaggTT ccaaaagact gctgtgatta cnatggTTTTg tttcatttca tgtcatgtnt 660

EXON II
 F K E S V A Q F A N E

ttaatggTTT caaattcctg ttg**cagTTTA** AAGAGAGTGT TGCTCAATTT GCTAATGAAA 720

N I A P H A S K I D H T N Y F P Q INTRON II
 ATATTGCCCC TCATGCTTCC AAAATTGACC AACTAATA TTTCC**CAG** gtagtgtttca 780

tgatatgatg atctatTTTT gtttttttaa tcatctcaat gaacaatata tagctcaaag 840

EXON III
 E V N L W K S

tgtgattgaa cattgtggTT gtgtttcgat ctaatTT**tag** GAGGTAACT TGTGGAAAAG 900

INTRON III
 M G E F N L H G I T A P **INTRON III**

TATGGGAGAA TTTAATCTCC ATGGGATTAC TGCAC**CAGag** gaggttaact tgtggaaaag 960

tatgggagaa tttaatctcc atgggattac tgcaccaggt aatctctttt tatgaactta 1020

tatcagtata ctcggcgtct ttagtatatg atcatgattt tgttgcgaca aacgttttcc 1080

EXON IV
 E E Y G G L G L G Y L Y

aactatattt ctgcttattt g**cagAGG**AGT ATGGAGGGCT TGGTCTAGGT TACTTGTATC 1140

H C I A M E E I S R A S G S V G L S Y G
 ATGTATAGC AATGGAAGAG ATTAGCCGCG CTTCAGGATC CGTTGGTCTT TCTTATGGTG 1200

A H S N L C I N Q L INTRON IV
 CTCATTCTAA CCTATGTATC AATCA**ACT**Taa ttganggaac ttaagtctct ttcattgtat 1260

EXON V
 V R

gcttgacgat tttcaaacgg agtattcaga atcgctacct tgtgtttgTT **tagGTGAGG** 1320

INTRON V

N G S H A Q K Q K Y L P K INTRON V
 AATGGAAGCC ATGCTCAGAA ACAGAAATAC TTGCCA**AAGg** ttctagattc tagttcccc 1380

tagtttaatc ttatttgatt ctactttttc catgaaatat tggttgtctt gccctatttc 1440

catcatgtgt aatgtttgac ttatcgggta aaaatgctct taataactag ttgctgcgTT 1500

cgggagggtt ggTTtgctca cctggTTtga gctaaagagt taaacgagTT gaaagaatta 1560

gcacctattg tagaaaagat ggtggaaaat agatttaggt ggTTtgggca tgtagagaga 1620

atatctgtag atTTtggTT aaagaaagta tatctgatga agagaagaca aacaataaaa 1680

gtagaggaag acttaaaaag actacaagag aagttattaa gaaatatctc gagattaacg 1740

atTTgattg aagcatggTc ctggatagaa cattatggaa aaagttgatc catgtaacag 1800

accacactta gtggaataag gcttggttgt tgttggtgcg tatttgtttg tttattcggt 1860
EXON VI
L I S G
taaagttaag gctgacttgt tatatatattt tgctcttcaa ttttgaagCT TATCTCCGGG 1920

D H V G A L A M S E P N **INTRON VI**
GATCACGTGG GAGCTTTGGC GATGAGTGAA CCCA**ATTgta** agatatgtga aattgaatag 1980

agtatctttg tcatttagat attctaagga ctttgctgag tgaatttgtg tcttctg**cag** 2040
EXON VII
S G S D V V S M K C K A D R V D G G Y V
CTGGGTCTGA TGTGTTCGGC ATGAAATGCA AGGCTGATCG TGTAGACGGA GGATATGTAC 2100

L N G N K M W C T N G T V A Q T L V V Y
TTAATGGTAA CAAGATGTGG TGTACTAATG GGACCGTTGC TCAAACATTA GTTGTCTATG 2160

A K T D I T A G S K G I T A F I I E K G
CAAAAACAGA CATAACAGCA GGTCAAAAG GAATCACTGC ATTCATCATC GAGAAGGGAA 2220

M P **G INTRON VII**
TGCC**TGgata** attttaccga atgacaccaa tagaatcgtg attattgata aatcgtttta 2280

ttacagtgag aaaactagac gtgaaagatg aaaacctgac aatcgttgct gtttgactac 2340
EXON VIII
F S T A Q K L D K L G M R G S D T **INTRON VIII**
agATTCAGTA CTGCGCAGAA ATTGATAAA CTAGGGATGC GAGGAAGTGA **TACgta**tgta 2400

tgcatgttcc atgttgtaat ttcgatactg aatccatttc caattccaac gacatggttt 2460
EXON IX
C E L V F E N C F V
tactgataaa acggaatttt ctcgg**cagAT** **GTGAGCTTGT** CTTCGAGAAT TGCTTTGTTC 2520

P D E N V L G K E G K G **INTRON IX**
CAGACGAAAA TGTTCTTGGG AAAGAAGGAA **AAGgtc**tgaa aatttctttt ataatctttg 2580

tttgataga cttaaagaga aatgagctta taaataagag atattttctt tttgtt**cagG** 2640
EXON X
V Y V M M S G L D L E R L V L S G G P L
AGTCTATGTC ATGATGTCGG GTTGGATTG GGAAAGGCTT GTTTTATCAG GTGGTCCCCT 2700

G I M Q A C L D V V L P Y T R Q R E Q F
TGGTATTATG CAGGCATGTC TCGATGTTGT CCTTCCTTAT ACTCGACAAC GAGAGCAGTT 2760

G H P I G E F Q F I Q **INTRON X**
TGGTCATCCT ATTGGAGAGT TTCAGTTCAT **CAGTgg**cat aattttttta tttttcgтта 2820

tcgtgtcctc cgtggttgtat gtgaatctta gttcagtttc aattgatctt ttggttac**cag** 2880
EXON XI
G K V A D M F T S L Q S S R **Intron XI**
GGAAAAGTTG CAGACATGTT TACGTCTTTA CAGTCCTCAA **Ggtaga**agat tttaatgtca 2940
EXON XII
S Y
ctcttctgaa taagtttgca acgaagtcga ttggtaacat tctttattcc **agGTC**TTACG 3000

```

V Y S V A R D C D N G K V D P INTRON XII
TGTATTCTGT AGCTCGGGAC TGTGATAACG GAAAAGTTGA CCCTgctcc acttaataca 3060

ataactataa tatttttctg tttgcaaca agaaaacatt gtaaaacaaa ctctcttctg 3120
EXON XIII
      K D C A G V I L C A A E R A T
gtttactaat ttcagGAAGG ATTGTGCTGG AGTTATACTT TGTGCAGCTG AAAGAGCAAC 3180

  Q V A L Q A I Q C L G G N G Y V N E Y P
GCAGGTTGCT TTGCAGGCGA TACAATGTTT AGGCGGGAAC GGTTATGTGA ATGAATATCC 3240

  T G C L L R D A K L Y E I G A G T S E I
AACCGTTTGT CTCCTTAGAG ATGCTAAACT TTACGAGATC GGAGCCGGAA CTAGTGAGAT 3300

  R R M I I G R E L F K E Q *** 3'-nicht translatierte
CAGAAGAATG ATTATAGGAC GCGAGCTCTT CAAGGAGCAA TGACATGCTA GTCCTTTGGA 3360
Region
TTTTGACTGG AACTGAGCCT CTTGGAGATG ATTCTTTGTA AAAGAATTTT TCATTAATCA 3420

AATGAGAATT GTGTTAACCA AAATTGATCA ACAATACAAG AAACAAAAAA CTGCCATGTC 3480

ATATTTGTAT GTGCTCTTTT GCTGTGAAAA TCTTGTAAGC AATTCAAACA ATATTTTCGCG 3541

```

Abbildung 3.25: Darstellung der gesamten Nukleotidsequenz der genomischen DNA der IVD aus *Pisum sativum* L.. Die Aminosäuresequenzen sind über dem zweiten Nukleotid jedes Codons innerhalb der Exonbereiche im Ein-Buchstaben-Code angegeben. Die Translationsstart- und Terminationsstellen sind fettgedruckt. Das Gen besteht aus dreizehn Exons (Exon I – Exon XIII), die durch zwölf Introns (Intron I – Intron XII) unterbrochen werden. In der Sequenz des IVD-Gens sind die Nukleotidsequenzen der Exonbereiche in Großbuchstaben, die Nukleotidsequenzen der Intronbereiche in Kleinbuchstaben angegeben. Die Exon-/Intronübergänge sind hervorgehoben.

3.11.3 Exon-/Intronübergänge

Die Nukleotidsequenz der genomischen DNA wurde mit der cDNA-Sequenz (3.10.2) verglichen, um Exon/Intronübergänge und eventuelle Abweichungen innerhalb der Exons zu ermitteln. Der Sequenzvergleich zeigte, daß der translatierte Bereich des Gens sich aus 13 Exons zusammensetzt und durch 12 Introns unterbrochen wird. Es konnte festgestellt werden, daß die Nukleotidsequenzen der Exonbereichen mit der cDNA-Sequenz übereinstimmten. Die exakte Exon/Intron-Übergängen wurden mit Hilfe des Programms NetPlantGene 2 ermittelt. Bei dem Vergleich zwischen der Nukleotidsequenzen der genomischen DNA, der cDNA und aus der cDNA abgeleiteter IVD-Aminosäuresequenz konnten alle drei Typen von Codonsunterbrechung gefunden werden. Bei 5 der 12 Exon/Intron-Übergängen findet keine Unterbrechung des Codons statt ("Codon-Phase" Typ 0). Bei drei Exon-/Intronübergängen werden die Codons nach dem ersten Nukleotid unterbrochen ("Codon-Phase" Typ I) und bei vier Exon-/Intronübergängen werden die Codons nach dem zweiten Nukleotid ("Codon-Phase" Typ II) unterbrochen. In der Tabelle 3-4 sind die Exon-/Intronübergänge aufgeführt.

Exon	Splicing-Donor/5'-Ende-Intron	Intron	3'-Ende-Intron/Splicing-Akzeptor	Codon-Phase
Exon I	ACACGCAGATTCAGgtttcacct	Intron I	cctggtgcagTTTAAAGAGAG	0
Exon II	TTTCCCACAGgtatgtttca	Intron II	ctaatttagGAGGTAACT	0
Exon III	CACCAGaggagg	Intron III	ttattgcagAGGAGTATGG	I
Exon IV	AATCAACTaattga	Intron VI	ttgttttaGGTGAGGAATG	0
Exon V	CTTGCCAAAGgttctagatt	Intron V	AattttgaagCTTATCTCCG	0
Exon VI	GAACCCAATTgtaagatatg	Intron VI	tcttctgcagCTGGGTCTGA	I
Exon VII	ATGCCTGGataattt	Intron VII	ttgactacagATTCAGTACT	II
Exon VIII	GAAGTGATACgtatgtatgc	Intron VIII	tttctcggcagATGTGAGCTT	II
Exon IX	GAAGGAAAAGgtctgaaaat	Intron IX	ttttgttcagGAGTCTATGT	I
Exon X	TTCATCCAGtggcataatt	Intron X	ttggttacagGGAAAAGTTG	0
Exon XI	AGTCCTCAAGgttagaagatt	Intron XI	tttattccagGTCTTACGTG	II
Exon XII	AGTTGACCctgcctcc	Intron XII	ctaatttcagGAAGGGATTG	II
Exon XIII	CAATGA Stop			

Tabelle 3-4: Exon-/Intronübergänge des IVD-Gens.

Die "Splicing"-Donorbase und die "Splicing"-Akzeptorbase sowie die erste Base des Intronanfangs und die letzte Base des Intronendes sind hervorgehoben. Die Nukleotide der Exonsequenzen sind in Großbuchstaben dargestellt. Die Nukleotide der Intronsequenzen sind in Kleinbuchstaben dargestellt.

Die Positionen der Exon- bzw. Intronbereiche innerhalb der Gen- bzw. cDNA-Sequenz und ihre Größe sind in Tab.3-5 dargestellt.

EXON	Position in cDNA	Position in Gen-DNA	Größe	INTRON	Position in Gen-DNA	Größe
Exon I	1-108	103-210	108bp	Intron I	211-686	475bp
Exon II	109-192	687-770	84bp	Intron II	771-880	110bp
Exon III	193-250	881-938	58bp	Intron III	939-1104	166bp
Exon IV	251-374	1105-1228	124bp	Intron VI	1229-1313	85bp
Exon V	375-420	1314-1359	46bp	Intron V	1360-1908	549bp
Exon VI	421-469	1909-1957	49bp	Intron VI	1958-2040	83bp
Exon VII	470-656	2041-2227	187bp	Intron VII	2228-2342	115bp
Exon VIII	657-707	2343-2393	51bp	Intron VIII	2394-2488	95bp
Exon IX	708-772	2489-2553	65bp	Intron IX	2554-2639	86bp
Exon X	773-927	2640-2794	155bp	Intron X	2795-2880	86bp
Exon XI	928-968	2881-2921	41bp	Intron XI	2922-2992	71bp
Exon XII	969-1019	2993-3043	51bp	Intron XII	3044-3135	92
Exon XIII	1020-1224	3236-3340	205			

Tabelle 3-5: Position der Exons/Introns im Gen

3.12 Expression der rekombinanten IVD in *E. coli*

3.12.1 Klonierung der IVD-cDNA in pET-Vektor

Um eine erfolgreiche Expression des Proteins in *E. coli* durchführen zu können, wurde zunächst ein rekombinantes Plasmid hergestellt, welches den kodierenden Bereich der IVD-cDNA enthielt. Als Vektor für die Expression in *E. coli* wurde pET-32a(+)-Vektor (Fa. Nova

gen) gewählt. Die cDNA-Sequenz sollte zwischen *EcoRI*- und *Sall*-Restriktionsschnittstellen inkloniert werden. Diese Schnittstellen wurden ausgewählt, weil sie der optimalen Bedingung für den Enzymverdau der cDNA entsprachen: die cDNA konnte mit beiden Enzymen in einem Ansatz geschnitten werden, womit die zusätzlichen Aufreinigungsschritte und damit verbundenen Verluste der cDNA-Menge vermeiden werden konnten. Da diese Schnittstellen in der cDNA nicht vorkamen, mußten zuerst drei Primer synthetisiert werden, welche neben der genspezifischen Nukleotidsequenzen noch zusätzliche Nukleotide für Restriktionsschnittstellen enthielten, die für die Klonierung des cDNA-Fragments in den pET-Vektor notwendig waren.

Mit den Primern ABP₄₄-10/*EcoRI* und ABP₄₄-10/*Sall* konnte ein Fragment amplifiziert werden, welches die gesamte translatierte Region der IVD-cDNA umfaßt, einschließlich Signalpeptid. Weiterhin wurde mit dem Primerpaar IVD-8/*EcoRI* / ABP₄₄-10/*Sall* das cDNA-Fragment der IVD ohne Signalpeptid amplifiziert (Abb. 3.26).

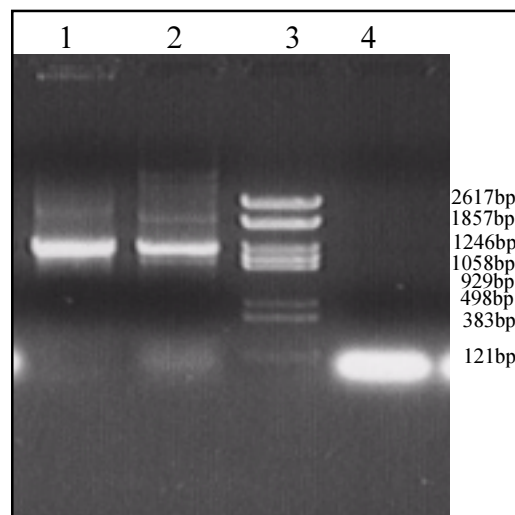


Abb. 3.26: Amplifizierte Genfragmente einer PCR zur Gewinnung der translatierten Region der IVD-cDNA.

Bahn 1: 1,2kb großes cDNA-Fragment, welches den kodierenden Bereich der IVD-cDNA umfaßt, einschließlich Signal-Peptid;

Bahn 2: 1,1kb großes cDNA-Fragment, welches den translatierten Bereich der IVD-cDNA ohne Signal-Peptid umfaßt;

Bahn 3: DNA-Größenmarker M21 (Fa. MBI Fermentas);

Bahn 4: Negativkontrolle mit Aq_{reinst} als „Template“.

Nach der Aufreinigung aus dem Agarosegel (2.5.7.9) wurden die beiden amplifizierten Fragmente sowie der pET-32a(+)-Vektor mit *EcoRI* und *Sall*-Restriktionsenzyme verdaut (2.5.8), die Restriktionsverdaureaktion wurde durch Auftragen der PCR-Produkte und Vektor auf ein Agarosegel abgestoppt. Nach erneuter Aufreinigung aus dem Agarosegel und zusätzlicher

Dephosphorylierung des Vektors mit alkalischer Phosphatase CIAP (2.5.10.4) wurden die beiden amplifizierten Fragmente mit dem pET-32a(+)-Vektor ligiert. Die Ligation erfolgte ÜN bei 16°C (2.5.10.5). Danach wurden jeweils 20µl kompetenter *E. coli* BLR (DE3)-Zellen mit je 1µl aus den Ligationsansätzen transformiert (2.5.12). Die nach der Transformation gewachsene Bakterienklone, die rekombinante Plasmide enthielten, konnten mittels Kolonie-PCR mit der Primerkombination IVD-8/*EcoRI* / ABP₄₄-10/*SalI* (2.5.9.1) selektiert werden. Nach der PCR-Reaktion wurde ein Aliquot des Ansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen (Abb. 3.27).

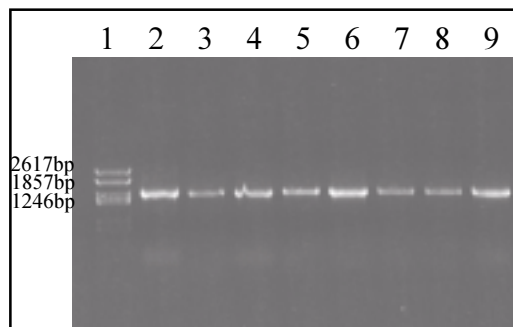


Abb. 3.27: Amplifikation spezifischer cDNA-Fragmente aus positiven Klonen in einer Kolonie-PCR. Bahn 2-9: mit der Primerkombination IVD-8/*EcoRI* und ABP₄₄-10/*SalI* konnte von jedem Klon ein ca. 1,1kb großes Fragment amplifiziert werden. In Bahn 1 ist der DNA-Größenmarker M21 gezeigt.

Aus den positiven rekombinanten Kolonien, die anhand der amplifizierten Fragmente detektiert wurden, wurden anschließend die Plasmid-DNA-Präparationen durchgeführt. Um feststellen zu können, ob die cDNA-Fragmente im pET-Vektor richtig ligiert wurden und durch die Ligation keine Leserasterverschiebung eintrat, wurden die Plasmid-DNAs der Klone pEX-1 und pEn-1 sequenziert. Die erhaltene Sequenzen zeigen die Abbildungen 3.28 a und b.

```

                                EcoRI
cagatctgggtaccgacgacgacgacaaggccatggctgatatcggatccGAATTCATGCTTAGAACAAGAAT
CAACACAGCACGTTCCATTTTTTCATCTATTTTCAGAATCAATTCTTCTTATTCCACTTCCTTCCTCTTT
GACGACACACAGATTCAG

```

Abb. 3.28a: Darstellung der partiellen Sequenz des rekombinanten Plasmids pEX-1.

Die Nukleotidsequenz des pET-32a(+)-Vektors ist in Kleinbuchstaben, des einligierten cDNA-Amplifikates in Großbuchstaben angegeben. Die Nukleotidsequenz der Restriktionsschnittstelle ist fettgedruckt. Das erste Codon der cDNA-Sequenz ist einfach unterstrichen.

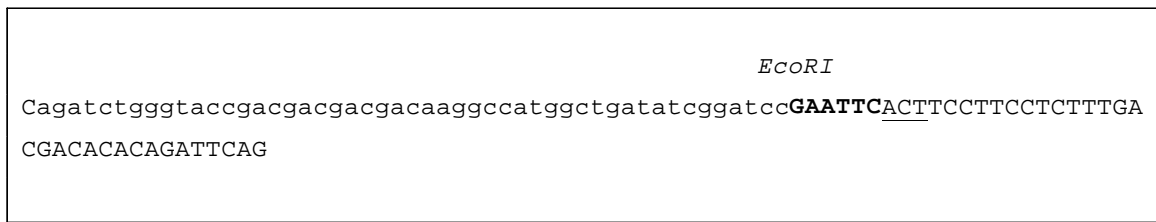


Abb. 3.28b: Darstellung der partiellen Sequenz des rekombinanten Plasmids pEn-1.

Die Nukleotidsequenz des pET-32a(+)-Vektors ist in Kleinbuchstaben, des einligierten cDNA-Amplifikates in Großbuchstaben angegeben. Die Nukleotidsequenz der Restriktionsschnittstelle, über die die Klonierung des Inserts in den Vektor erfolgte, ist fettgedruckt. Das erste Codon der cDNA-Sequenz ist einfach unterstrichen.

3.12.2 Nachweis der Expression der rekombinanten IVD in *E. coli*

Der Nachweis des rekombinanten Proteins im Gesamtproteinextrakt diente zur Optimierung der Anzuchts- und Induktionsbedingungen für eine effiziente Expression. Dabei wurden sowohl die verschiedenen IPTG-Konzentrationen (von 0,4mM, 1mM und 2mM) als auch die Inkubationszeit der IPTG-Induktion (von 1h, 2h, 3h und 4h) getestet. Nach der Auftrennung der Proteine und Coomassie-Färbung des Gels konnte in allen untersuchten Proben eine sehr starke Proteinbande mit einer Masse von ca.60kDa nachgewiesen werden, die in nicht-induzierten Proben, welche als Negativkontrollen dienten, nicht auftrat. Die Abbildung 3.29 zeigt eines dieser Gele.

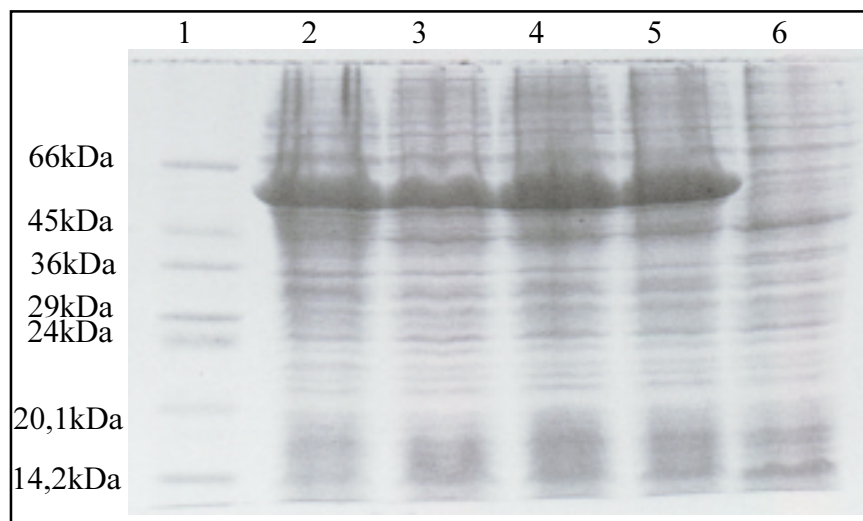


Abb. 3.29: Coomassie-Färbung des SDS-Gels des Gesamtproteins nach der Induktion mit IPTG.
 Bahn 1: Marker MS-SDS-70 (Fa. Sigma);
 Bahn 2-5: 1h bis 4h Induktion mit 2mM IPTG;
 Bahn 6: nicht induzierte Probe als Negativkontrolle.

Die Korrelation zwischen IPTG-Konzentration, Inkubationszeit und Intensität der Proteinbande ist in Tabelle 3-7 dargestellt.

Zeit	1h	2h	3h	4h	1h	2h	3h	4h	1h	2h	3h	4h
IPTG/ mM	0,4				1				2			
Inten- sität	+	++	+++	++++	+	++	+++	++++	++	+++	++++	++++

Tabelle 3-7: Die Tabelle zeigt den Einfluß der IPTG-Konzentration und der Inkubationszeit auf die Expression der rekombinanten IVD in *E. coli*-Stamm BLR(DE3). Die Expressionseffizienz wurde durch die Intensität der Proteinbande im SDS-Gel bestimmt: += erkennbar; ++= gut erkennbar; +++= sehr gut erkennbar; ++++= sehr intensiv.

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, konnte schon eine Stunde nach Zugabe von 2mM IPTG eine gute Expression des rekombinanten Fusionsproteins festgestellt werden. Für nachfolgende Versuche erwiesen sich eine IPTG-Konzentration von 2mM und eine Inkubationszeit von 2 Stunden als optimal. Nach dem Zellaufschlußverfahren (2.3.1.2c) konnten die Proteine aufgereinigt werden, dabei wurde aber festgestellt, daß die beiden rekombinanten Fusionsproteine (sowohl mit Signalpeptid, als auch ohne Signalpeptid) nicht in löslichem Zustand, sondern als Einschluß-Körperchen isoliert wurden. Deswegen konnte eine Spaltungsreaktion mit Enterokinase und anschließende Aufreinigung der Proteine über die Säule nicht durchgeführt werden. Erst nach Resuspendieren des Proteinpellets in 6M Harnstoff und darauffolgender Dialyse konnten die Fusionsproteine für funktionelle Analysen, die in der vorliegenden Studie nicht erfaßt worden sind, zugänglich gemacht werden.

3.13 Zelluläre Lokalisation der Signal-Peptid-Expression

3.13.1 Klonierung der für das Signal-Peptid kodierenden cDNA-Sequenz in pCATgfp-Vektor

Um die zelluläre Lokalisation des Expressionsortes des Signal-Peptids festzustellen, wurde zunächst ein rekombinantes Plasmid hergestellt. Als Vektor für die Expression in Pflanzen diente pCATgfp-Vektor (MPI/Köln). Das 72bp große cDNA-Fragment, welches für das Signal-Peptid der IVD aus Erbse kodiert, sollte zwischen *EcoRI* und *NcoI* Restriktionsschnittstellen inkloniert werden. Das cDNA-Fragment wurde mit der Primerkombination ABP₄₄-10/*EcoRI* und IVD-9/*NcoI* in einer PCR amplifiziert (Abb. 3.30).

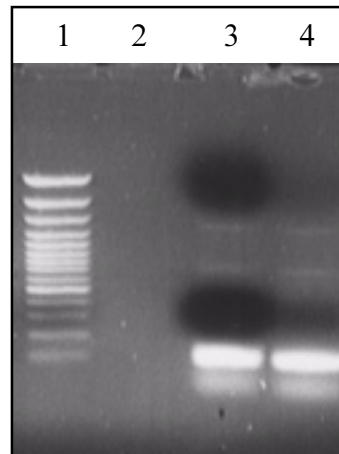


Abb. 3.30: Amplifikation des cDNA-Fragments, welches für das Signal-Peptid der IVD aus *Pisum sativum* L. kodiert.

Spur 1: DNA-Größenmarker – 100bp Ladder Plus (Fa. MBI/Fermentas)

Spur 3,4: Das 80bp große Fragment wurde mit der Primerkombination ABP₄₄-10/*EcoRI* und IVD-9/*NcoI* aus der cDNA amplifiziert.

Nach Aufreinigung des PCR-Amplifikats aus dem Agarosegel (2.5.7.8) erfolgte die enzymatische Hydrolyse von PCR-Amplifikat und pCATgfp-Vektor mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *NcoI* (2.5.8). Die Restriktionsverdaureaktion wurde durch Auftragen der PCR-Produkte und des Vektors auf ein Agarosegel abgestoppt. Nach erneuter Aufreinigung aus dem Agarosegel und zusätzlicher Dephosphorylierung des Vektors mit alkalischer Phosphatase CIAP (2.5.10.4) wurde das cDNA-Fragment mit dem pCATgfp-Vektor ligiert. Die Ligation erfolgte ÜN bei 16°C (2.5.10.5). Danach wurden 20µl kompetenter *E. coli* XL1 Blue-Zellen mit 5µl aus dem Ligationsansatz transformiert (2.5.12). Die nach der Transformation gewachsenen Bakterienklone, die rekombinante Plasmide enthielten, konnten mittels Kolonie-PCR mit der Primerkombination ABP₄₄-10/*EcoI*// IVD-9/*NcoI* (2.5.9.1) selektiert werden. Die PCR-Ansätze wurden mittels Agarosegelen überprüft.

Aus den positiven rekombinanten Kolonien, die anhand der amplifizierten Fragmente detektiert wurden, wurden anschließend die Plasmid-DNA-Preparationen durchgeführt. Die Sequenzanalyse der sequenzierten Plasmid-DNAs der Klone pSP.CATgfp-1 und pSP.CATgfp-2 ergab, daß das cDNA-Fragment richtig in den pCATgfp-Vektor ligiert wurde und durch die Ligation keine Leserasterverschiebung eingetreten war.

3.13.2 Transformation von Blätter verschiedener Pflanzen mittels Partikelbombardement

Die transiente Transformation der einzelnen abgetrennte Blätter von Tabak, Erbse und Zwiebel mit dem rekombinanten pCATgfp-Vektor erfolgte durch Partikelbombardement (2.5.12.2) mit der Partikelkanone PDS100 (Fa. Bio-Rad/München).

Das Bombardement und anschließende Analyse der transformierten Blätter unter dem Zeiss LSM 410 “confocal laser scanning” Mikroskop wurde von Dipl.-Biol. G. Laucke (Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Braunschweig (BBA)) durchgeführt. Es wurde festgestellt, daß die Expression des Signal-Peptids der IVD aus *Pisum sativum* L. in den Mitochondrien stattfindet. Die Ergebnisse der Transformation von Tabakblätter sind in den Abbildungen 3.31 a und 3.31 b dargestellt.

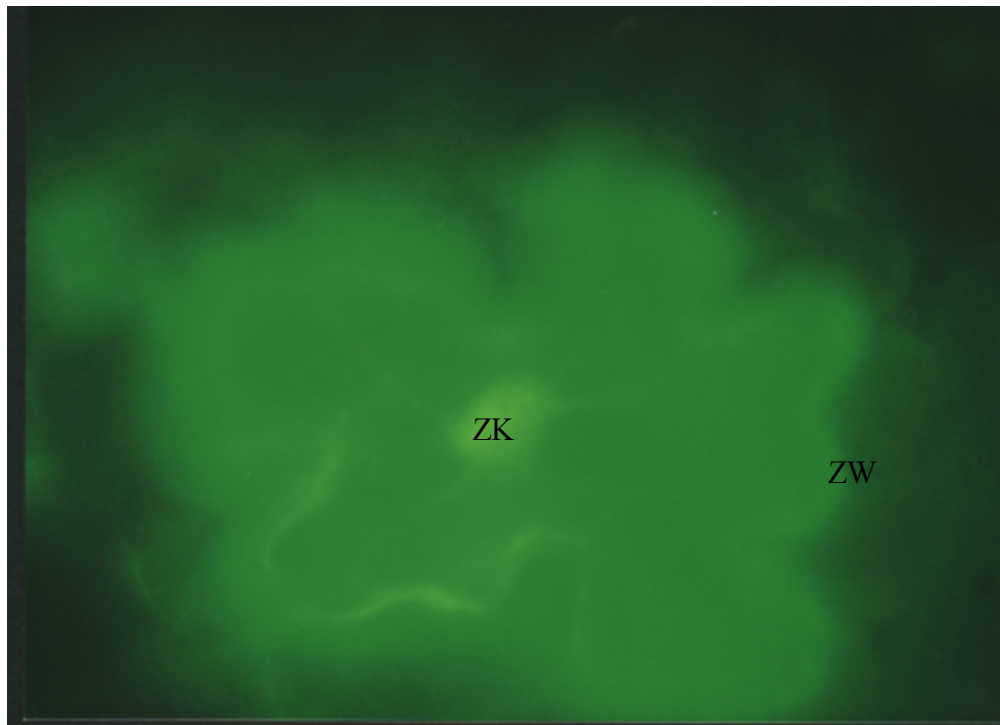


Abb. 3.31 a: Die Sublokalisierung des GFP in den Organellen der Epidermiszelle von Tabak. (ZK) Zellkern, (ZW) Zellwand.

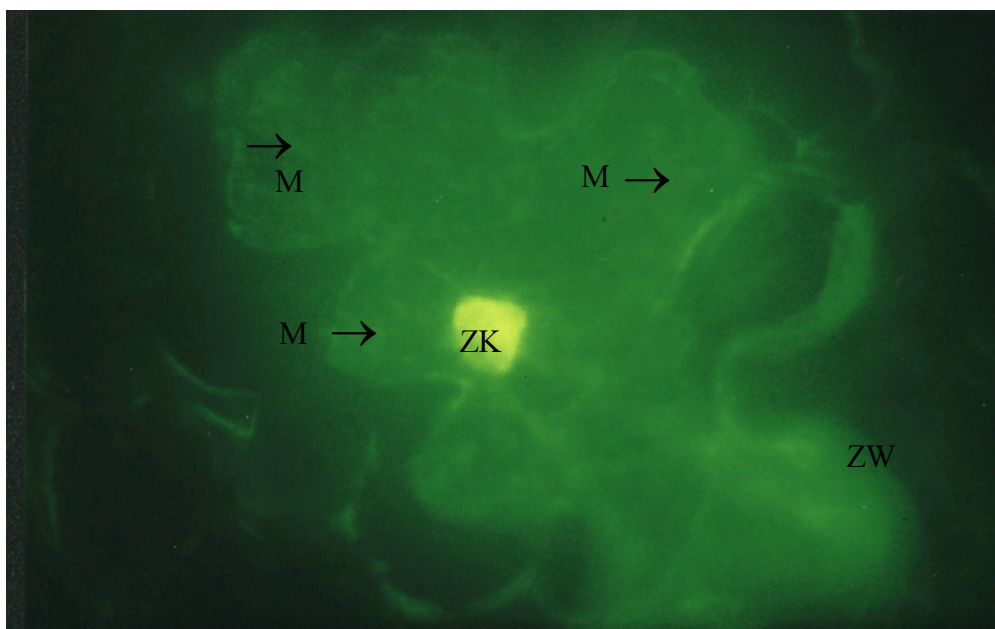


Abb. 3.31 b: Die Sublokalisierung des Fusionsproteins, welches sich aus dem Signal-Peptid der IVD aus *Pisum sativum* L. und GFP als Reporter-Protein zusammensetzt, in den Organellen der Epidermiszelle von Tabak. (ZK) Zellkern, (ZW) Zellwand, (M) Mitochondrien.

VI. Diskussion

4.1 Isolierung von Auxin-bindenden-Protein ABP₄₄

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchte 44kDa Protein, vermutlich ein Dimer aus 44kDa-Untereinheiten, wurde 1992 isoliert und beschrieben (Reinard, 1992). Durch die Kombination von drei unterschiedlichen Nachweismethoden (Photoaffinitätsmarkierung mittels Azido-IAA, Gleichgewichtsdialyse-Bindungstest sowie Affinitätschromatographie mittels Auxin-gekoppelter Sepharose) konnte das 44kDa Protein als Auxin-bindend identifiziert werden. Dieses Protein erfüllt viele der Anforderungen an einem Auxinrezeptor, insbesondere bezüglich der Affinität und Spezifität (Reinard & Jacobsen, 1995; Reinard *et al.*, 1998). Hoch affine Auxinbindung wurde für die sehr starken Auxine, bzw. Analoga, IAA, 1-NAA, Picloram und 2,4-D ermittelt. Die Auxinbindung von ABP₄₄ ist hochspezifisch für aktive Auxinanaloga, welche auch in der Gewebekultur wegen ihrer starken Wirkung eingesetzt werden. Es konnte auch gezeigt werden, daß das Vorkommen von ABP₄₄ auf wachsende Gewebe von etiolierten Keimlingen von *Pisum sativum* L. begrenzt ist (Reinard, 1992; Reinard & Jacobsen, 1995). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, daß dieses Protein nur in sehr geringen Konzentrationen in Rohextrakt vorlag. Es wurde auch gezeigt, daß das Auftreten des Proteins entwicklungsabhängiger Regulation unterliegt. Das Protein konnte aus dem Apex von 5- bis 7-Tage alten Erbsenkeimlingen isoliert werden, aber nicht aus 10-Tage alten Erbsenkeimlingen (Reinard & Jacobsen, 1995).

Da der molekularen Wirkung von Auxinen auf die Wachstums- und Entwicklungsprozesse höherer Pflanzen seit vielen Jahren ein besonderes Interesse gilt, war die Isolierung und molekularbiologische Charakterisierung des Gens für das auxin-bindende-Protein ABP₄₄ als zentrale Aufgabe anzusehen.

Mehrere Versuche im Vorfeld dieser Arbeit führten nicht zu einer erfolgreichen Mikrosequenzierung. Dies wurde einerseits durch die oben erwähnte geringe Abundanz des Proteins verursacht, andererseits durch seine recht geringe Stabilität während der Lagerung bei -20°C/-80°C (Achmus, pers. Mitteilung).

Bei der Sequenzierung unbekannter Proteine ist eine Analyse von mindestens 10 Aminosäuren empfehlenswert, damit aus den Ergebnissen der nachfolgenden Datenbankrecherchen eindeutige Aussagen gemacht werden können. Deswegen müssen die isolierten Proteinproben mehreren Anforderungen entsprechen:

- 1) Das Protein soll mindestens zu 80% sauber sein und einen einheitlichen Aminoterminus haben, da sonst die Auswertung erschwert wird.
- 2) Kontaminationen wie Salze, Detergenzien und freien Aminosäuren, sowie eine Verschleppung von Glycin beim Blotten von SDS-Gelen sollen möglichst vermieden werden. Solche

Kontaminationen können die Datenauswertung gerade bei kleinen Proteinmengen erschweren.

3) Die Proteinprobe soll einer Derivatisierung unterzogen werden, da Cystein ohne vorherige Derivatisierung nicht nachweisbar ist (Gassen, & Schrimpf, 1999).

Eine der Aufgaben der vorliegenden Arbeit war daher die Aufreinigung des Auxin-bindenden Proteins in ausreichender Menge. Ziel der Extraktion war die qualitative Gewinnung des 44kDa Proteins aus dem Rohextrakt. Eine weitere Anforderung an die Extraktion war, daß sie schnell und unter schonenden Bedingungen durchgeführt werden konnte, damit weder eine Degradation des Proteins noch irgendwelche extraktionsbedingte Modifikationen am N-terminalen Ende stattfinden konnten. Alle diese Anforderungen wurden von der Affinitätschromatographie erfüllt. Diese Art der Affinitätschromatographie wurde auch schon bei der Aufreinigung des wohl am besten charakterisierten Auxin-bindenden Protein aus Mais angewandt (Tillmann, *et al.*, 1989).

Eine Fraktionierung des in 20mM MES-Puffer (pH 5,5) extrahierten löslichen Gesamtproteins wurde über eine Fällung mit 50% Ammoniumsulfat und darauffolgende Affinitätschromatographie bei pH 5,5 über eine 4-OH-PAA-Säule durchgeführt. Im letzten säulenchromatographischen Schritt konnte das an die Matrix gebundene Protein erst durch eine hohe Salzkonzentration und Änderung des pH-Wertes eluiert werden. So wurde eine effiziente Trennung von den restlichen Proteinen erzielt. Die Reinheit der Säulenfraktion wurde mittels zweidimensionalen SDS-Gelelektrophorese bestätigt. Als erste Dimension wurde ein natives Gel gewählt, als zweite Dimension diente ein SDS-Gel. So konnte verifiziert werden, daß die aufgereinigte Probe tatsächlich nur ein Polypeptid um 44kDa enthielt (Abb.3.2). Für die anschließende Aminosäuresequenzierung wurde das Protein auf eine PVDF-Membran transferiert.

Die Ausbeute an Protein variierte bei den einzelnen Extraktionen beträchtlich und betrug 0,38-4,2µg/20g Frischgewicht (Apex). Diese Unterschiede werden durch die mehrfache Benutzung der Säule hervorgerufen. Die Kapazität der Säule nahm während der ersten zehn Säulenläufe kontinuierlich ab, wie aus der Zunahme des unspezifischen Hintergrunds in einem SDS-Gel ersichtlich war (Daten nicht gezeigt). Es ist hier von Nachteil, daß erst am Ende des Verfahrens eine Überprüfung der Qualität der Extraktion mittels SDS-Gelelektrophorese durchgeführt werden konnte.

4.2 Aminosäuresequenzanalyse des Auxin-bindenden-Proteins ABP₄₄

Da der sogenannte sequenzierbare Anteil eines Proteins in einer geblotteten Probe bei ca. nur 20% liegt, wurden mindestens 3µg des aufgereinigten Proteins benötigt, um eine erfolgreiche

N-terminale Aminosäuresequenzierung durchführen zu können (Dr. F. Buck pers. Mitteilung). Interne Sequenzierungen erfordern wegen des zusätzlichen proteolytischen Schrittes sogar noch mehr Protein.

Die N-terminale Blockierung stellt eine bekannte posttranslationale Modifikation von Proteinen dar (Hirano, *et al.*, 1993). Es kann jedoch auch zur künstlichen Blockierung von Proteinen während der Extraktion, der Polyacrylamid-Gelelektrophorese oder dem Western-Transfer kommen. Während der Präparation des Proteins wurden solche künstlichen Blockierungen durch die Verwendung frisch angesetzter, hochreiner Lösungen und dem Einsatz von Thioglycolsäure als Radikalfänger weitgehend vermieden. So konnte eine erfolgreiche N-terminale Aminosäuresequenzierung des Auxin-bindenden Proteins ABP₄₄ von Dr. F. Buck (Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie, Universitäts-Krankenhaus Eppendorf (UKE), Universität Hamburg) durchgeführt werden. Die N-terminale Mikrosequenz bestand aus 21 Aminosäuren, wobei fünf Aminosäuren nicht genau identifiziert werden konnten (Abb.3.5 a).

Für die Sequenzierung eines internen Peptidfragments wurde das auf eine PVDF-Membran transferierte Protein mit der Endoproteinase Lys-C (Roche) gespalten, welche das Peptid C-terminal von Lysinen spezifisch schneidet. Nach der Trennung der Spaltprodukte über eine „Reversed Phase“ Chromatographie konnte eine Fraktion (Abb.3.4) zur Sequenzierung eingesetzt werden.

Die erhaltene interne Microsequenz des Proteins ABP₄₄ bestand aus 14 Aminosäuren (Abb.3.5 b).

Mit den beiden Microsequenzen wurde in Peptidsequenz-Datenbanken nach Homologien zu bekannten Proteinen gesucht. 1997 konnten keinerlei Homologien zu den bekannten Proteinen in der Datenbanken gefunden werden. Erst in der jüngsten Zeit konnte eine Homologie von 76% zu dem N-terminalen Ende einer putativen Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase aus *Arabidopsis thaliana* (Acc.-Nr. Y12695) festgestellt werden. Diese Aminosäuresequenz wurde aus einer cDNA-Sequenz abgeleitet (Däschner, *et al.*, 1999).

4.3 PCR-gestütztes Durchmustern der cDNA-Banken aus *Pisum sativum* L.

Die Klonierung eukaryontischer Gene zur Ermittlung der gesamten Proteinsequenz erfolgt ausschließlich über eine cDNA. Oft wird aus der mRNA eine cDNA-Bank hergestellt. Die für den Aufbau der Bank verwendete mRNA wird aus entsprechenden Geweben isoliert. Diese mRNA stellt damit eine Mischung der zelltyp- und differenzierungsspezifischen mRNA-Moleküle dar. Die isolierte mRNA wird danach in cDNA umgeschrieben und in ein Phagemid kloniert. So wird eine Population von Phagen erhalten, in der die relative Häufigkeit einer jeden cDNA der entsprechenden mRNA im Ausgangsgewebe entspricht.

Neben der Reindarstellung des Proteins ABP₄₄ war die Isolierung der zugehörigen cDNA ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit. Zunächst wurde eine vorhandene cDNA-Bank aus Apex 6 Tage alter Erbsenkeimlinge mittels PCR durchmustert. Die dafür benötigten degenerierten Primer wurden aus den beiden Microsequenzen abgeleitet.

Es konnte nur ein 600bp Fragment mit Primerkombination ABP₄₄-1/T7 amplifiziert werden (Tab.3-2). Die erhaltenen Nukleotidsequenzen stimmten nur in dem Bereich, der für die Ableitung der Primer verwendet wurde, mit der N-terminalen Mikrosequenz überein. Die flankierenden Aminosäuresequenzen konnten nicht gefunden werden.

Die Sequenzanalyse und Homologievergleiche in der EMBL Datenbank ergaben 84% und damit die höchste Homologie zu der Histon H3-cDNA aus *Medicago sativa* (Acc.-Nr. U09459) und 83% Homologie zu der Histon H3-cDNA aus *Arabidopsis thaliana* (Acc.-Nr. M17131), sowie Homologien zu weiteren für die Histon H3 kodierenden Gene aus verschiedenen Spezies. Bei dem ca. 11bp langen Sequenzfragment am 5'-Terminus, welches ausschließlich die Primersequenz enthielt, konnte gar keine Homologie zu den bekannten Sequenzen der Histon-Gene festgestellt werden. Dies deutete auf „mispriming“ des Primers ABP₄₄-1 hin.

Zum Überprüfen der erhaltenen Daten wurde erneut versucht, ein Fragment aus der Phagen-DNA der cDNA-Bank mit neuen Primern zu amplifizieren. Die zwei spezifischen Primer dafür wurden von den Sequenzbereichen am 5'- und 3'-Ende abgeleitet, welche eine Homologie zu den Nukleotidsequenzen der Histon H3-Genen aus *Medicago sativa* und *Arabidopsis thaliana* aufwiesen. Es wurde ein ca. 320bp großes Fragment amplifiziert, dessen Nukleotidsequenz einige Abweichungen von der Nukleotidsequenz des 600bp großen Fragments zeigte. Die aus den Nukleotidsequenzen beider Fragmente abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigten aber 100%ige Homologie zu dem bekannten Histon H3 aus Erbse, wobei es sich bei den abweichenden Nukleotiden der beiden cDNA-Fragmente um die Positionen wobbelnder Codons für die gleiche Aminosäure handelte. Dies deutet darauf hin, daß die beiden amplifizierten Fragmente zwei verschiedene Allele bzw. Kopien des Histon H3-Gens aus *Pisum sativum* L. darstellen.

Die Aminosäuresequenzen der Histone, insbesondere der Histone H3 und H4, sind sehr konserviert und haben sich während der Evolution nur sehr wenig verändert. Die Sequenzen der 135 Aminosäuren im Histon H3 aus Kalbthymus-Zellen, Maus und Erbse unterscheiden sich nur an vier Stellen (Knippers, 1997). Die meisten Unterschiede zwischen Aminosäuresequenzen der tierischen und pflanzlichen Histone H3 liegen bei den Aminosäuren in der Position 90. Bei pflanzlichen Histonen könnten an dieser Stelle sowohl die hydrophoben Aminosäuren Alanin oder Leucin als auch die polare Aminosäure Serin oder die basische Aminosäure Arginin auftreten, während bei tierischen Histonen ausschließlich Methionin vorkommt (Wu, *et al.*, 1989). Die Besonderheit der Histone liegt darin, daß ihre Gene meistens keine Introns enthalten. Die mRNA der meisten tierischen Histone besitzt keine Signalsequenz zur Polyadenylierung und auch keinen poly-A-Schwanz, sondern eine Haarnadelstruktur in der 3'-Region und eine kon-

servierte Sequenz, die Basenpaarung mit der U7 snRNA erlaubt, wodurch ein entsprechendes Zuschneiden des 3'-Endes der Histon-mRNA eingeleitet wird (Maxson, *et al.*, 1983, Birnstiel, *et al.*, 1985, Cotten, *et al.*, 1988). Das trifft allerdings nicht immer zu. Die Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, daß es neben den klassischen bekannten Histonen viele Varianten von Histonen gibt, welche sowohl die polyadenylierten mRNAs als auch die Introns in der Gensequenz enthalten, wie z.B. die Gen-Familie für menschliches Histon H 3.3. Das 8,8kb große Gen für das menschliche Histon H 3.3 beinhaltet 3 Introns, deren Gesamtsequenz 8kb lang ist (Wells, *et al.*, 1987). Im Gegensatz zu der eher geringen Anzahl solcher Histone bei Tieren ist die Zahl der beschriebenen polyadenylierten mRNAs bei Hefen (Fahrner, *et al.*, 1980), *Tetrahymena* (Bannon, *et al.*, 1983) und Pflanzen relativ groß. Bei Hefe sind fast 90% aller Histon-mRNAs polyadenyliert (Fahrner, *et al.*, 1980; Calzone, *et al.*, 1983). Verschiedene Studien zeigen, daß die mRNAs, welche für die Histone H3 und H4 aus Mais (Chaubet, *et al.*, 1988), Arabidopsis (Chaboute, *et al.*, 1987) und mit großer Wahrscheinlichkeit Tabak und Sonnenblume (Chaboute, *et al.*, 1988) kodieren, auch polyadenyliert sind. Im Einklang zu diesen Daten steht auch die beschriebene polyadenylierte mRNA für Histon H1 aus *Pisum sativum* L. (Gantt, und Key, 1987). Auch die mRNA für Histon H3 aus *Medicago sativa*, enthält einen poly-A-Schwanz und eine Polyadenylierungs-Signal-Sequenz AAUGAAA, die sich allerdings von der tierischen, hoch konservierten Konsensus-Sequenz AAUAAA unterscheidet (Wu, *et al.*, 1989). Die beschriebenen mRNAs für die Histone H 3 und H4 aus Arabidopsis (Chaboute, *et al.*, 1988) und Mais (Chaubet, *et al.*, 1988) enthalten vermutliche Polyadenylierungs-Signal-Sequenzen, welche einer Konsensus-Sequenz A/GAUG(G)AAA für das Polyadenylierungs-Signal höherer Pflanzen entsprechen. Es wurde postuliert, daß pflanzliche Histon mRNAs eventuell generell einen poly-A-Schwanz mit oder ohne veränderte Sequenz des Polyadenylierungs-Signals besitzen. Die 3'-untranslatierte Region der pflanzlichen Histon-mRNA ist im Vergleich zur klassischen tierischen viel länger (Tabata und Iwabuchi, 1986; Gantt, und Key, 1987) und enthält keine Haarnadelstruktur (Wu, *et al.*, 1989). Mit diesen Daten korreliert auch das Vorhandensein des Poly-A-Schwanzes und einer wahrscheinlichen Polyadenylierungs-Signal-Sequenz ATTAAT in der erhaltenen cDNA-Sequenz aus Erbse. Diese Sequenz entspricht zwar nicht der Konsensus-Sequenz, wurde aber in dem Cab-Gen aus Maiz als mögliche Polyadenylierungs-Signal-Sequenz interpretiert (Dean, *et al.*, 1986). All diese Befunde bestätigen, daß es sich bei den klonierten Fragmenten um Histon H3-Gensequenz handelt, die für *Pisum sativum* L. noch nicht bekannt waren. Die partielle cDNA-Sequenz wurde in der EMBL-Datenbank unter der Acc.-Nr. AJ002555 (Janke, *et al.*, 1998) eingetragen.

Das cDNA-Fragment für das ABP₄₄ konnte somit jedoch nicht amplifiziert werden. Es können mindestens drei mögliche Ursachen definiert werden, welche zu diesem Ergebnis führen könnten:

- Das Alter der cDNA-Bank:

Die Bank wurde 1993 hergestellt und seitdem mehrmals amplifiziert. Jede Amplifizierung einer Bank führt zu erheblichen Verlusten von seltenen und mit einer geringen Kopienzahl vorkommenden mRNA's. Empfehlenswert ist nur eine einzige Vermehrung der Bank, da sich bei wiederholter Vermehrung die Häufigkeit einzelner Phagenklone in der Gesamtpopulation verändert (Gubler und Hoffman, 1983).

- Verlust des kompletten 5'-Bereiches der mRNA:

Von dem ersten Schritt der cDNA-Bank-Herstellung ist die Vollständigkeit und die Qualität der cDNA-Banken abhängig. Die einfache und für Herstellung der cDNA-Banken am meisten verwendete Methode wurde 1983 von Gubler und Hoffman entwickelt. Dieses Verfahren, bei dem es sich um RNA-Priming handelt, führt in der Regel zu erhöhten Ausbeuten an vollständiger cDNA, welche der kompletten mRNA-Sequenz entspricht. Trotzdem kommt es häufig vor, daß die Synthese des komplementären DNA-Stranges abbricht, bevor das 5'-Ende der zu kopierenden mRNA erreicht wird, was auch als Nachteil dieser Methode gesehen wird (Gubler und Hoffman, 1983).

Ursachen hierfür sind meist die Ausbildung störender Sekundärstrukturen innerhalb des zu kopierenden RNA-Stranges oder eine geringe Aktivität der verwendeten reversen Transcriptase. Die erhaltene cDNA besteht daher aus einer Population von Molekülen unterschiedlicher Länge. Dabei handelt es sich sowohl um die cDNA-Moleküle, welche das komplette 5'-Ende der mRNA enthalten, als auch um die unvollständigen cDNA-Moleküle, bei denen die Erststrang-Synthese nur partiell funktioniert hat.

Um diesen Nachteil zu bewältigen, wurde eine Reihe von Techniken zur Herstellung der vollständigen cDNA mit dem kompletten 5'-Ende entwickelt. Bei den so genannten „oligo-capping“ Methoden basiert die Synthese der cDNA auf der Modifizierung der Cap-Site der mRNA, indem vor der reversen Transkription ein synthetisiertes Oligonukleotid mit dem 5'-Ende der mRNA ligiert wird (Fromont-Racine, *et al.*, 1993; Maruyama und Sugano, 1994; Kato, *et al.*, 1994, Suzuki, *et al.*, 1997). Die mit Hilfe von „oligo-capping“ Methoden synthetisierten cDNA-Banken enthalten deutlich weniger unvollständig synthetisierte cDNA's. Mit 30% ist der Anteil der unvollständig synthetisierten cDNA's aber noch relativ groß. Eine weitere Möglichkeit, die vollständige cDNA zu synthetisieren, bietet die „CAP-Trapper“ Methode. Bei dieser Methode wird die Cap-Struktur und das 3'-Ende der isolierten mRNA vor der reversen Transcription biotinyliert. Die Einführung der Biotin-Gruppen an beiden Enden der mRNA und die nachfolgende Selektion der vollständig synthetisierten cDNA's mit Hilfe der „magnetic beads“ führt zu sehr hohen Ausbeuten (bis zu 95%) an cDNA mit voller Länge (Carnini, *et al.*, 1996).

- Degenerierung der Primer:

Da die Primer aus der Aminosäuresequenz des Proteins abgeleitet sind, kann deren

Degenerierung die Amplifikation spezifischer Produkte aus der cDNA-Bank sehr erschweren. Dabei entstehen sehr viele unspezifische oder gar keine Amplifikate.

Um zwei der drei möglichen oben beschriebenen Ursachen der Fehlamplifikation zu umgehen, wurde eine neue cDNA-Bank aus Apices von 3 Tage alten etiolierten Erbsenkeimlingen mit dem „SMART-Kit“ (Fa. Clontech) hergestellt. Das ist eine neue auf PCR basierende Methode zur Herstellung einer hochqualitativen cDNA-Bank (CLONTECHniques, 1997). Die Besonderheit dieser Methode liegt darin, daß während der Erststrangsynthese durch das sogenannten „template switching“ an das 5'-Ende eine bekannte SMART-Oligonukleotidsequenz angehängt wird. So wird bei der Umschreibung der mRNA in die cDNA unter Verwendung der Superscript MMLV Reverse Transcriptase (Fa. Life Technologies) das komplette 5'-Ende der cDNA und deren 7-Methylguanosin-Cap-Struktur erhalten bleiben. Diese 7-Methylguanosin-Cap-Struktur ist am 5'-Ende aller eukaryontischen mRNA zu finden (Furuichi und Miura, 1975). In Gegensatz zu den „oligo-capping“ Methoden (Fromont-Racine, *et al.*, 1993; Maruyama und Sugano, 1994; Kato, *et al.*, 1994; Suzuki, *et al.*, 1997) ist hier der Ligationsschritt vor der Erststrangsynthese der cDNA nicht mehr notwendig.

Die vollständige Doppelstrang-cDNA (ds cDNA) wird in einer „long-distance“ PCR (LD-PCR) unter Verwendung der SMART-5'- und 3'-Primer, deren Sequenzen den definierten 5'- und 3'-Enden der Erststrang-cDNA entsprechen, amplifiziert (CLONTECHniques, 1997). Somit wird die Amplifikation der unvollständigen cDNAs, welche keine SMART-Oligonukleotidsequenz am 5'-Ende enthalten, ausgeschlossen. Diese selektive Amplifikation führt zu einer 100%igen Repräsentation von vollständigen cDNAs in der so hergestellten cDNA-Bank.

Danach wurde erneut versucht, mit der Phagen-DNA als Template mittels PCR die hergestellte cDNA-Bank durchzumustern. Die mit beiden degenerierten Primern durchgeführte PCR resultierte letztendlich in der Amplifikation einer 1600bp großen Bande, deren Nukleotidabfolge bei der Sequenzanalyse eine starke Homologie zu der Phagen-DNA aufwies. Dabei handelte es sich um eine „mispriming“ des Primers ABP₄₄-1.

Darüberhinaus konnte geschlossen werden, daß ein Durchmustern der cDNA-Banken mit aus der Proteinmikrosequenzen abgeleiteten degenerierten Primern aussichtslos ist.

4.4 Identifizierung der cDNA von ABP₄₄ mittels PCR

Wenn die Sequenzinformationen über das zu klonierende Gen bekannt sind, kann das Anlegen und Durchmustern einer cDNA-Bank umgangen werden, indem die cDNA aus der mRNA-Population unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide durch PCR synthetisiert und amplifiziert wird. Die degenerierten Primer können dafür aber nicht benutzt werden, da sie eine Mischung aus vielen Primern darstellen. Alternativ wird die cDNA mit Hilfe der beschriebenen Techniken, wie Oligo(dT)-Priming, Selbst-Priming oder Vektor-Priming wie z.B. Okayama-

Berg-Methode synthetisiert (Okayama und Berg, 1982). Bei der cDNA-Synthese nach Okayama-Berg, dem sogenannten Vektor-Priming, sorgt die relativ aufwendige Abfolge von einzelnen cDNA-Synthese-Schritten dafür, daß jeweils nur ein Ende des Konstruktes in geeigneter Weise modifiziert ist und als Primer für die cDNA-Synthese verwendet werden kann. Der verwendete Vektor-Primer wird durch Spaltung mit Restriktionsenzymen verkürzt und durch Anhängen von Oligo(dT) oder Oligo(dC)-Enden modifiziert. Nach der Synthese des ersten cDNA-Stranges kann das erhaltene Molekül über seine *HindIII*-Enden zirkularisiert werden. Die Auffüllreaktion mit DNA-Polymerase und Synthese des zweiten cDNA-Stranges erfolgt dann an diesem zirkularisierten Molekül. Die Suche nach dem Gen kann dann in einer PCR-Reaktion mit genspezifischen Primern und cDNA als Template fortgesetzt werden, wobei hier auch wie bei dem PCR-gestützten Durchmustern der cDNA-Banken die Degenerierung der Primer zu der Amplifikation unspezifischer Produkte aus Vektorsequenzen führen könnten.

Nachdem das Durchmustern der cDNA-Bank mit den degenerierten Primern zu keinem positiven Ergebnis führte, wurde die doppelsträngige cDNA mit dem „SMART-Kit“ synthetisiert. Auf die Klonierung der entstandenen PCR-Produkte in den Phagemid wurde verzichtet. Somit enthielt die Template-cDNA, die mittels PCR mit den beiden degenerierten Primern durchmustert werden sollte, keine zusätzlichen Vektorsequenzen.

Schon die erste PCR führte zu der Amplifikation von zwei verschiedenen Fragmenten, die nach der Reamplifikation in den pGEM-T-Vektor kloniert wurden.

Die anschließende Sequenzanalyse ergab, daß es sich nur bei dem 450bp großen PCR-Fragment um eine partielle cDNA für das Protein ABP₄₄ handelt. Die cDNA-Sequenz bei diesem Fragment beginnt mit der Nukleotidsequenz des Primers ABP₄₄-1 und endet mit der Nukleotidsequenz des Primers ABP₄₄-2. Auch die flankierenden Bereiche der Mikrosequenzen des Proteins konnten wiedergefunden werden.

Die Sequenzierung des 1000bp großen PCR-Amplifikates zeigte, daß es sich bei diesem Fragment nicht um eine cDNA des Proteins ABP₄₄ handeln kann. In der Sequenz des Fragments konnten die Nukleotidabfolgen der beiden Oligonukleotide ABP₄₄-1 und ABP₄₄-2 wiedergefunden werden. Die restlichen Sequenzen waren aber nicht homolog zu den Nukleotidsequenzen, die aus Aminosäuresequenzen des Proteins abgeleitet wurden. Die Nukleinsäuresequenz des 1000bp große PCR-Amplifikates wies eine Homologie von 94% zu der cDNA-Sequenz des 14-3-3-like Proteins aus *Pisum sativum* L. Die spezifischen Funktionen und Aktivitäten des pflanzlichen 14-3-3 Proteins beinhalten die Assoziation mit einem DNA/Protein-Komplex sowie die Bindung und Regulation von Nitrat-Reduktase (Wu, et al., 1997).

Da die zur Identifizierung der partiellen cDNA eingesetzten Primer nur teilweise die beiden Mikrosequenzen des Proteins repräsentierten (Tab. 3-1), sollte die Suche nach den fehlenden cDNA-Sequenzen aus der flankierenden 5'- und 3'-Regionen fortgesetzt werden. Es wurden verschiedene PCR-Methoden beschrieben, die es erlauben, ausgehend von kurzen Bereichen

bekannter Sequenz unbekannte Bereiche gezielt zu amplifizieren und anschließend deren Sequenz zu bestimmen (Ochman, *et al.*, 1993). Die Vervollständigungen der Sequenzen von Transkripten mit unbekanntem Sequenz am 5'- oder 3'-Ende ausgehend von bekannter Sequenz ermöglicht die Methode der „rapid amplification of cDNA ends“ - RACE-PCR (Fromann, *et al.*, 1988). Die dafür benötigten genspezifischen Primer ABP₄₄-3 und ABP₄₄-4rev konnten aus der cDNA-Sequenz abgeleitet werden.

Die Charakterisierung der cDNA-Sequenzen aus den flankierenden 5'- und 3'-Regionen erfolgte mittels einer modifizierten RACE-PCR (s. 3.9), welche zur Amplifikation von 450bp großen PCR-Fragment am 5'-Ende und 1000bp großen Fragment am 3'-Ende führte. Die Sequenzaufklärung der unbekanntem 5'- und 3'-Bereichen der cDNA ermöglichte die Synthese von zwei spezifischen Primern ABP₄₄-5 und ABP₄₄-6, die für eine Amplifikation der kompletten cDNA-Sequenz eingesetzt werden konnten, wobei der Primer ABP₄₄-5 ein Teil von dem SMART-5'-Primer beinhaltete. Zur Sequenzanalyse der kompletten cDNA erfolgte zunächst die Klonierung des amplifizierten ca. 1600bp großen Fragments in den pGem-T-Vektor. Die erhaltene Sequenz umfaßt 1573bp und beinhaltet die Nukleotidabfolge aller für die Amplifikation der PCR-Produkte in dieser Arbeit angesetzten Primer. Auch die Sequenzen aller in RACE eingesetzten Primer konnten wiedergefunden werden. In der aus der cDNA-Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz finden sich die kompletten experimentell gewonnenen Mikrosequenzen des Auxin-bindenden-Proteins ABP₄₄ wieder. Die Sequenz wurde in der EMBL Datenbank unter Acc.-Nr. AJ010945 publiziert.

4.5 Sequenzanalyse der gesamten cDNA- und daraus resultierende Aminosäuresequenz

Mit dem Programm BLASTN des National Center for Biotechnology Information (NCBI) wurde in der genomischen Datenbank EMBL nach homologen Sequenzen zur aufgefundenen cDNA gesucht. Dabei konnte überraschenderweise eine Homologie von 61% zu der Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase (IVD) aus Ratte und eine Homologie von 60% zu menschlicher IVD festgestellt werden. Die höchste Homologie von 78% wurde zur cDNA der IVD aus *Arabidopsis thaliana* (Acc.Nummer:AF160729.1 und Y12695) festgestellt. Die IVD aus *Caenorhabditis elegans* wies mit 72% die zweithöchste Homologie auf. In einem vergleichbaren Bereich bewegte sich die Homologie zu einer 1995 in EMBL Datenbank eingetragenen nicht identifizierten partiellen cDNA aus Reiswurzeln (Acc. Nummer: D24729). Auf Aminosäureebene betrug die Homologie zu der IVD aus *Caenorhabditis elegans* 57,8% (Acc.Nummer: AAD21088), zur menschlichen IVD (Acc. Nummer: P26440) und IVD aus Rattenleber (Acc. Nummer P12007) 60% und zur IVD aus *Arabidopsis thaliana* (Acc. Nummer: CAA73227) 83,1%. Die meisten Unterschiede in der Aminosäuresequenz, befanden sich im N-terminalen Bereich der Proteine, welche in Abbildung 4.1 dargestellt sind. Deswegen konnten anhand der zu-

nächst erhaltenen N-terminalen Mikrosequenz die Homologien zur tierischen und menschlichen ACDH-Familie nicht festgestellt werden. Wenn man die publizierten Aminosäuresequenzen genau betrachtet, findet man insgesamt nur 7 Aminosäuren, die bei allen vier Proteinen am Aminoterminal homolog sind.

Pea	M--LRTRINTARSIFSSIFRINSSSYST-----SFL-----FDDTQIQFKESVAQFANENIAP
Arab.	M---QRFFSARAILGYAVKTRRRSFSS---RSSLL-----FDDTQLQFKESVSKFAQDNIAP
Rat	MAT-ATRLL-GWRVASWRLRP---PLAGFVSQRAHSLLPVDDAINGLSEEQRQLRQTMAKFLQEHLAP
Human	MAT-AVRLG-GRRVSSWRLRPLPSPLA--VPQRAHSMLPVDDDINGLNEEQQLRHTISKFVQENLAP

Abb.4.1: Vergleich der N-terminalen Enden der IVD-Aminosäuresequenzen aus verschiedenen Spezies. Unterstrichen ist die N-terminale Mikrosequenz des aus Erbse isolierten auxin-bindenden Proteins ABP₄₄. Die homologen Aminosäuren sind fettgedruckt.

Die Sequenzanalyse der cDNA erfolgte mit Hilfe der Programme OMIGA 1.1 (Oxford Molecular Group Ltd.) und Lasergene (DNA Star). Dabei wurde die cDNA-Sequenz auf Restriktionsschnittstellen, offene Leseraster sowie Sequenzmotive für Bindungsschnittstellen untersucht. Die translatierte Region beginnt mit dem ersten Startcodon (Initiationscodon) an der Position 103 am 5'-Terminus und endet an der Position 1327 am 3'-Terminus der cDNA. Die Nukleotidsequenz der IVD-cDNA aus Erbse besteht demnach aus der 102bp-langen 5'-untranslatierten Region (5'-UTR), der 1224bp umfassenden translatierten Region sowie der 247bp-langen 3'-untranslatierten Region (3'-UTR).

Die 1224 Nukleotide der translatierten Region der cDNA-Sequenz kodieren für die 408 Aminosäuren lange Sequenz des Vorläufer-Proteins. Die Analyse der Protein-Sequenz mit Hilfe des Programms MitoProt II (Claros, 1995; Claros und Vinsens, 1996; Claros, et al., 1997) ergab, daß es bei dem N-Terminus der Sequenz mit der Wahrscheinlichkeit von P=0,97 um eine Signalpeptid-Sequenz handelt. Das unmittelbar nach der N-terminalen Mikrosequenz in 5'-Richtung identifizierte Peptid besteht aus 24 Aminosäuren (Abb.4.2) und entspricht den Anforderungen eines mitochondrialen Signalpeptids:

- die meisten pflanzlichen mitochondrialen Signalpeptide bestehen aus ca. 18 bis 36 Aminosäuren (Sjöling und Glaser, 1998), somit hat das gefundene Peptid mit 24 Aminosäuren eine durchschnittliche Länge;
- ein hoher Anteil an basischen Aminosäuren (in diesem Fall sind es vier Arginine);
- hohe Repräsentation von Serin (17%);
- das Fehlen von sauren Aminosäuren, wie Asparaginsäure und Glutaminsäure
- Ausbildung einer amphipatischen Helix aus neutralen und hydrophoben Aminosäuren

(Schneider, et al., 1998; Braun und Schmitz, 1999).

MLRTRINTARSIFSSIFRINSSSY

Abb. 4.2: Die Aminosäuresequenz des mitochondrialen Signalpeptids der IVD aus *Pisum sativum* L. Die basischen Aminosäuren sind fettgedruckt; die Aminosäuren Serin und Threonin sind einfach unterstrichen.

Um die mitochondriale Lokalisation des Signalpeptids zu bestätigen, wurde der für das Signalpeptid kodierende Abschnitt der IVD-cDNA in einen binären pCATgfp-Vektor kloniert. Nach der transienten Transformation mittels Partikelbombardement verschiedener Pflanzen (Erbse, Zwiebel und Tabak) mit dem rekombinanten Vektor konnte die Expression des Fusionsproteins in Mitochondrien festgestellt werden (3.13.2). Die mitochondriale Lokalisation der IVD aus Erbse wurde auch von Däschner bestätigt, indem das ca. 43 kDa Protein aus Mitochondrien der Erbse isoliert wurde (Däschner, *et al.*, 1999). Deren N-terminale Mikrosequenz weist 98% Homologie zur in der vorliegenden Arbeit beschriebenen N-terminalen Mikrosequenz auf. Diese Daten korrelieren auch mit den publizierten Daten für menschliche und tierische Isovaleryl-CoA-Dehydrogenasen, deren Vorkommen in Mitochondrien nachgewiesen wurde (Noda, *et al.*, 1980; Ikeda, *et al.*, 1983; Finocchiaro, *et al.*, 1988). Die beschriebenen menschlichen und tierischen Isovaleryl-CoA-Dehydrogenasen sowie Acyl-CoA-Dehydrogenasen enthalten die den mitochondrialen Signalpeptiden entsprechenden Aminosäuresequenzen (Matsubara, *et al.*, 1989). Es konnte keine Homologie zwischen den IVD-Signalpeptidsequenzen aus tierischen und pflanzlichen Spezies festgestellt werden (Abb. 4.1), wobei die Homologie zwischen IVD-Signalpeptidsequenzen aus Ratte und Mensch 73% beträgt. Die Homologie zwischen Signalpeptidsequenzen der SCAD aus Ratte und Mensch beträgt 62%, der MCAD aus Ratte und Mensch nur 56% (Matsubara, *et al.*, 1989).

Im Vergleich zu den beschriebenen cDNA's der Acyl-CoA-Dehydrogenasefamilie aus Ratte (Überblick: Matsubara, *et al.*, 1989), SCAD aus Mensch und IVD aus *Arabidopsis thaliana* hat die IVD-cDNA aus Erbse mit ca. 1,6kb eine durchschnittliche Länge (Tab.4.1).

Name des Enzyms	cDNA-Länge (bp)		Vorläufer-Protein	Signalpeptid	Reifes Protein
	gesamt	/ translatierte Region			
IVD aus Erbse	1573	1224	408 AS	24 AS	384 AS
IVD aus <i>A. thaliana</i>	1547	1227	409 AS		
IVD aus Mensch	1881	1269	423 AS	29 AS	394 AS
LCAD aus Mensch	2217	1290	430 AS	30 AS	400 AS
SCAD aus Mensch					
MCAD aus Mensch	ca.2400	1263	421 AS	ca.30 AS	ca.391 AS
IVD aus Ratte	2104	1272	424 AS	30 AS	394 AS
LCAD aus Ratte	1440	1290	430 AS	30 AS	400 AS
SCAD aus Ratte	1773	1242	414 AS	26 AS	338 AS
MCAD aus Ratte	2200	1263	421 AS	25 AS	396 AS

Tabelle 4.1: Vergleich der ermittelten Größen der cDNA- und Aminosäuresequenzen von bekannten Dehydrogenasen der Acyl-CoA-Familie aus verschiedenen Spezies. Die Daten über die Acyl-CoA-Dehydrogenasen aus Ratte und Mensch sind der Publikationen von Kelly, *et al.* (1987; 1989); Indo, *et al.*, (1991); Matsubara, *et al.*, (1989; 1990) entnommen.

Anhand der erhaltenen cDNA und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz der IVD konnte das genaue Molekulargewicht des Proteins ermittelt werden und mit den Daten aus der Literatur, den anderen Acyl-CoA-Dehydrogenasen aus Mensch und Ratte verglichen werden. Die Tabelle 4.2 zeigt keine erheblichen Unterschiede zwischen den molekularen Größen der Acyl-CoA-Dehydrogenasen aus den verschiedenen Spezies. Mit 44,6kDa liegt die IVD aus Erbse in mittlerem Bereich.

Name des Enzyms	Isoliertes Protein	Vorläufer-Protein	Signalpeptid	reifes Protein
IVD aus Erbse	44,000 kDa	44,616 kDa	2,9 kDa	41,716 kDa
IVD aus Mensch	46,000 kDa	46,000 kDa	3,000 kDa	43,000 kDa
LCAD aus Mensch	45,000 kDa	47,656 kDa	3,221 kDa	44,435 kDa
SCAD aus Mensch	41,000 kDa			
MCAD aus Mensch	44,000 kDa	46,588 kDa	Ca. 4,000 kDa	Ca. 42,500kDa
IVD aus Ratte	43,000 kDa	46,436 kDa	3,338 kDa	43,098 kDa
LCAD aus Ratte	45,000 kDa	47,873 kDa	3,201 kDa	44,672 kDa
SCAD aus Ratte	41,000 kDa	44,968 kDa	2,780 kDa	42,188 kDa
MCAD aus Ratte	45,000 kDa	46,556 kDa	2,871 kDa	43,685 kDa

Tabelle 4.2: Ermittelte molekulare Gewichten der bekannten Acyl-CoA-Dehydrogenasen aus den verschiedenen Spezies. Das molekulare Gewicht des IVD-Signalpeptides aus Erbse wurde durch Subtrahieren des Gewichts des reifen Proteins aus dem Gewicht des Vorläufer-Proteins ermittelt. Die Daten über die Acyl-CoA- und Isovaleryl-CoA-Dehydrogenasen aus Ratte sind der Publikationen von Ikeda, *et al.* (1984); Kraus, *et al.*, (1987); Matsubara, *et al.* (1989) entnommen. Die Daten über die Acyl-CoA- und Isovaleryl-CoA-Dehydrogenasen aus Mensch entstammen den Publikationen von Indo, *et al.* (1991); Kelly, *et al.* (1987).

4.6 Identifizierung des Gens für Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase aus *Pisum sativum* L.

Die oben geschilderten Ergebnisse führten zu einer veränderten Zielsetzung der vorliegenden Arbeit, das Gen für IVD aus *Pisum sativum* L. zu isolieren und zu charakterisieren.

Die Isolierung des IVD-Gens aus Erbse erfolgte mit Hilfe der PCR aus der genomischen DNA. Ein Problem bei der Charakterisierung eukaryontischer Gene ist, daß die kodierenden Abschnitte von Introns unterbrochen werden und die Introngrößen nicht vorhersagbar sind. Eine frühe Abschätzung der Introngröße war damit für die Planung weiterer Arbeiten unumgänglich. Die beide Primern ABP₄₄-15 und ABP₄₄-6, die aus 5'- und 3'-Bereichen der gesamten cDNA-Sequenz abgeleitet wurden, konnten zur Amplifikation des genomischen IVD-Fragments eingesetzt werden. Aus der genomischen DNA wurde ein 3,6kb großes PCR-Produkt erhalten. Das PCR-Amplifikat war somit um 2kb größer als die entsprechende IVD-cDNA. So ergab sich eine Gesamtgröße der Intronbereiche von ca. 2kb innerhalb dieses genomischen Abschnittes. Durch die fortlaufende Sequenzierungen des in den Plasmiden p3,6-2 und p3,6-9 lokalisierten DNA-Fragments konnte die Nukleotidabfolge des IVD-Gens bestimmt werden. Der sequenzierte Bereich umfaßte 3542 Nukleotide. Die ermittelte Sequenz wurde in der EMBL Datenbank unter Acc.-Nr. AJ010946 publiziert.

Die Nukleotidsequenz der genomischen DNA wurde mit der cDNA-Sequenz der IVD verglichen, um eventuelle Abweichungen in Exon-Bereichen feststellen zu können. Die Sequenzvergleiche ergaben, daß die Nukleotidsequenzen der Exonbereiche mit der cDNA-Sequenz übereinstimmten und keinerlei Abweichungen zeigten. Hieraus ließ sich schließen, daß es sich bei diesem DNA-Fragment um eine authentische Kopie des IVD-Gens handelte und der translatierte Bereich der cDNA über einen 3,6 kb großen genomischen DNA-Abschnitt verteilt liegen mußte. Durch Southern-Blot Analyse konnte nachgewiesen werden, daß das genomische DNA-Fragment eine „Single-copy“ Sequenz repräsentiert (Firnhaber, in Vorbereitung).

Die Aufklärung der kompletten Gensequenz ergab, daß das IVD-Gen aus 13 Exons besteht, deren Sequenzen von 12 Introns unterbrochen wurden. Die Größe der Exons erstreckt sich von 41bp für Exon XI bis 205bp für Exon XIII (Tab. 3-6). Es besteht eine Korrelation zwischen der Zahl der Exons bei der genomischen IVD-Sequenz aus Erbse und der Zahl der Exons bei der publizierten Gensequenz der menschlichen IVD, die sich aus 12 Exons und 11 Introns zusammensetzt (Parimoo & Tanaka, 1993). Jedoch korrelieren die relative Lage und Größe der Exons im Gen der Erbsen-IVD nicht mit der Exon/Intron-Struktur des Gens der menschlichen IVD. Die Größe der Exons der menschlichen IVD erstreckt sich von 52bp für Exon III bis 728bp für Exon XII, wobei das Gen selbst 15kb groß ist.

Die Größe der Introns der Erbsen-IVD liegt zwischen 71bp bei Intron XII und 549bp bei Intron V. Das entspricht den publizierten Daten über die Größen der Introns, welche spezi-

fisch für verschiedene Spezies sind. So sind die bekannten pflanzlichen Introns zwischen 70bp und 1000bp lang, wogegen die von Tieren bzw. menschlichen Introns zwischen 70bp und mehrere tausend Nukleotide groß sein können (Hawkins, *et al.*, 1988). Die minimale funktionale Länge des pflanzlichen Introns liegt bei 70bp (Goodball und Filipowicz, 1990).

Um die für das Spleißen von pre-mRNA sehr wichtigen Exon/Intron-Konsensussequenzen und die Verzweigungsstelle zu ermitteln, hatten mehrere Arbeitsgruppen verschiedene computergestützte Analysen der in Datenbanken publizierten Sequenzen durchgeführt. Die meisten Studien befaßten sich mit der Analyse der tierischen und menschlichen Gensequenzen (Staden, 1984; Ohshima und Gotoh, 1986; Shapiro und Senapathy, 1987; Harris und Senapathy, 1990; Petersen, *et al.*, 1990). Die gängige NetGene-Methode zur Ermittlung der Exon/Intron-Übergänge bei tierischen und menschlichen Genen wurde von Brunak beschrieben (Brunak, *et al.*, 1990; 1991). Mit dieser Methode konnten bis zu 95% der für die menschlichen Gene beschriebenen stark konservierten Konsensussequenzen des 5'-„Splicing-Donor-Sites“ (C/A)AG/GT(G/A)AGT (Mount, 1982; Zhuang & Weiner, 1986) und weniger ausgeprägten Konsensussequenzen des 3'-„Splicing-Acceptor-Sites“ (T/C)N (C/T)AG/G (Mount, 1982; Chabot, *et al.*, 1985; Tazi, 1986) bei allen untersuchten Gensequenzen ermittelt werden.

Bei den Pflanzen treten jedoch oft die Konsensussequenzen des 5'-Splicing-Donor-Sites AG/GTAAAGT oder AG/GTAAGT und des 3'-Splicing-Acceptor-Sites TGYAG/GT (Wiebauer, *et al.*, 1988; White, *et al.*, 1992; Waigmann und Barta, 1992; Hebsgaard, *et al.*, 1996) auf, die nur partiell den tierischen Konsensussequenzen entsprechen. Die wenig konservierte Konsensussequenz für die Verzweigungsstelle URAY in der Position zwischen -20 und -30 bei Pflanzen (White, *et al.*, 1992) unterscheidet sich von der tierischen Konsensussequenz Y/CYRAY (Ohshima, 1987; Harris und Senapathy, 1990). Deswegen wurde für die Analyse der pflanzlichen Gensequenzen ein modifiziertes und für die Pflanzen geeignetes Programm NetPlantGene 2 benutzt (Hebsgaard, *et al.*, 1996).

Die für das pflanzliche IVD-Gen ermittelten Exon/Intron-Übergänge entsprachen nur zum Teil dem Konsensus. Nur 7 von 12 Introns begannen mit der Sequenz GT. Bei 11 Introns entsprach die 3'-Splicing-Acceptor-Sits der Konsensus-Sequenz AG. Die Splicing-Donor- und Splicing-Acceptor-Base des Exons sind im Falle des IVD-Gens aus Erbse variabel, gehäuft treten jedoch als Splicing-Donor-Site Nukleotide AG am 3'-Terminus des Exons. Und als Splicing-Akzeptor-Base fungiert am 5'-Terminus bei sechs Exons ein G, bei drei Exons ein A und bei zwei Exons ein C. Am 5'-Terminus des Exons I tritt ein T auf (s. Tab. 3-4). Im Vergleich: alle Exon/Intron-Übergänge des menschlichen IVD-Gens entsprechen den Konsensussequenzen (Parimoo und Tanaka, 1993).

Bei 5 der 12 Exon/Intron-Übergänge findet keine Unterbrechung des Codons statt. Die Codons für die Aminosäuren Glutaminsäure (Exon III), Serin (Exon VI) und Glycin (Exon IX) werden durch einen Exon/Inton-Übergang innerhalb der Gensequenz nach dem ersten Nukleotid un-

terbrochen. Bei den Aminosäuren Glycin (Exon VII), Threonin (Exon VIII), Arginin (Exon XI) und Prolin (ExonXII) werden die Codons durch einen Exon/Intron-Übergang innerhalb der Gensequenz nach dem zweiten Nukleotid unterbrochen. Solche Exon/Intron-Muster können Aufschluß über die Evolution eines Gens geben und sind meist zwischen verwandten Spezies konserviert.

Eine Funktion oder biologische Aktivität von IVD aus Erbse konnte noch nicht nachgewiesen werden und würde den Rahmen dieser Doktorarbeit sprengen. Die Bearbeitung dieser Fragestellungen innerhalb unserer Arbeitsgruppe ist jedoch beabsichtigt.

Vorrangig wird die Klonierung des Gens in einen geeigneten Vektor sein, um eine Expression des Gens in transgenen Pflanzen analysieren zu können, welche die funktionale Charakterisierung des untersuchten Proteins ermöglichen wird.

Da die Regulation eines Gens im allgemeinen durch die funktionale Analyse der Promotorregion untersucht wird, sollen die weiteren geplanten Experimente zur Aufklärung der Promotorregion beitragen. Der Promotor-Bereich soll kartiert und nachfolgend funktional charakterisiert werden. Weiterhin sollen Versuche zur Identifizierung potentieller Bindungstellen für Transkriptionsfaktoren durchgeführt werden. Die könnten einen Hinweis auf die Regulation des pflanzlichen IVD-Gens geben.

V. Zusammenfassung

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die molekularbiologische Analyse des Gens für das Auxin-bindende Protein ABP₄₄ aus *Pisum sativum* L..

Dieses Protein wurde 1992 von T. Reinard isoliert und als Auxin-bindend identifiziert (Reinard, 1992). Es erfüllt viele der Anforderungen an einen Auxinrezeptor, insbesondere bezüglich der hohen Affinität und Spezifität (Reinard & Jacobsen, 1995; Reinard *et al.*, 1998). Außerdem wurde festgestellt, daß das Vorkommen von ABP₄₄ auf wachsende Gewebe von etiolierten Keimlingen von *Pisum sativum* L. begrenzt ist (Reinard, 1992; Reinard & Jacobsen, 1995). Das Protein konnte nur aus dem Apex von max. 5- bis 7-Tage alten Erbsenkeimlingen isoliert werden. (Reinard & Jacobsen, 1995).

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde das Protein in einer für die Mikrosequenzierung ausreichenden Menge isoliert. Die Reinheit wurde mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese bestätigt. Die so aufgereinigte Probe wurde einer Aminosäure-Sequenzanalyse unterzogen. Es wurden N-terminale und interne Mikrosequenzierungen des Proteins ABP₄₄ durchgeführt. Die N-terminale Mikrosequenz bestand aus 21 Aminosäuren. Die interne Mikrosequenz des Proteins bestand aus 14 Aminosäuren.

Aus beiden Mikrosequenzen wurden die degenerierten Primer abgeleitet, welche anschließend für das Durchmustern der cDNA-Banken eingesetzt wurden.

Für die Isolierung der zugehörigen cDNA wurde zunächst eine vorhandene cDNA-Bank aus Apex 6 Tage alter Erbsenkeimlinge mittels PCR durchmustert.

Die Nukleotidsequenzen des mit Primerkombination ABP₄₄-1/T7 amplifizierten Fragments stimmten nur in dem Bereich, der für die Ableitung der Primer verwendet wurde, mit der N-terminalen Mikrosequenz überein. Die flankierenden Aminosäuresequenzen konnten nicht gefunden werden.

Die Sequenzanalyse und Homologievergleiche in der EMBL Datenbank ergaben 84% und damit die höchste Homologie zu der Histon H3-cDNA aus *Medicago sativa* (Acc.-Nr. U09459) und 83% Homologie zu der Histon H3-cDNA aus *Arabidopsis thaliana* (Acc.-Nr. M17131), sowie Homologien zu weiteren für das Histon H3 kodierenden Gene aus verschiedenen Spezies.

Auch das Durchmustern einer aus Apices von 3 Tage alten etiolierten Erbsenkeimlingen neu erstellten cDNA-Bank mit den degenerierten Primern führte zu keinem positiven Ergebnis.

Das Durchmustern der mit dem „SMART-Kit“ synthetisierten, doppelsträngigen cDNA mittels PCR führte zu der Amplifikation des 450bp großen PCR-Fragments.

Die anschließende Analyse der Sequenz ergab, daß es sich um eine partielle cDNA für das Protein ABP₄₄ handelte. Die Charakterisierung der cDNA-Sequenzen aus den flankierenden 5'- und 3'-Regionen erfolgte mittels modifizierter RACE-PCR, welche zur Amplifikation von

einem 450bp großen PCR-Fragment am 5'-Ende und einem 1000bp großen Fragment am 3'-Ende führte. Zur Sequenzanalyse der kompletten cDNA, erfolgte zunächst die Klonierung des amplifizierten ca. 1600bp großen Fragments in den pGem-T-Vektor. Die erhaltene Sequenz umfaßte 1573bp. In der aus der cDNA-Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz finden sich die kompletten experimentell gewonnenen Mikrosequenzen des Auxin-bindenden Protein ABP₄₄ wieder. Die Sequenz wurde in der EMBL Datenbank unter Acc.-Nr. AJ010945 publiziert.

Mit dem Programm BLASTN des National Center for Biotechnology Information (NCBI) wurde in der genomischen Datenbank EMBL nach homologen Sequenzen zur cDNA gesucht. Dabei konnte eine Homologie zu der Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase (IVD) aus Ratte von 61%, zu menschlicher IVD von 60%, zu einer putativen IVD aus *Arabidopsis thaliana* von 78%, zur IVD aus *Caenorhabditis elegans* von 72% festgestellt werden.

Die Nukleotidsequenz der IVD-cDNA aus Erbse besteht aus der 102bp-langen 5'-untranslatierten Region (5'-UTR), der 1224bp umfassenden translatierten Region sowie der 247bp-langen 3'-untranslatierten Region (3'-UTR).

Die 1224 Nukleotide der translatierten Region der cDNA-Sequenz kodieren für die 408 Aminosäuren lange Sequenz des Vorläufer-Proteins. Das unmittelbar nach der N-terminalen Mikrosequenz in 5'-Richtung identifizierte Peptid besteht 24 Aminosäuren und entspricht den Anforderungen eines mitochondrialen Signalpeptids.

Aus der genomischen DNA wurde ein 3,6kb großes PCR-Produkt erhalten. Eine Gesamtgröße der Intronbereiche innerhalb des genomischen Abschnittes betrug ca. 2kb. Durch die Sequenzierungen des DNA-Fragments konnte die Nukleotidabfolge des genomischen Klons der IVD bestimmt werden. Der sequenzierte Bereich umfaßte 3542 Nukleotide. Die ermittelte Sequenz wurde in der EMBL Datenbank unter Acc.-Nr. AJ010946 publiziert.

Das IVD-Gen besteht aus 13 Exons, deren Sequenzen von 12 Introns unterbrochen wurden. Die Größe der Exons erstreckt sich von 41bp für Exon XI bis 205bp für Exon XIII (Tab. 3-6). Die Größe der Introns der Erbsen-IVD liegt zwischen 71bp bei Intron XII und 549bp bei Intron V.

Bei 5 der 12 Exon/Intron-Übergänge findet keine Unterbrechung des Codons statt. Die Codons für die Aminosäuren Glutaminsäure (Exon III), Serin (Exon VI) und Glycin (Exon IX) werden durch einen Exon/Intron-Übergang innerhalb der Gensequenz nach dem ersten Nukleotid unterbrochen. Bei den Aminosäuren Glycin (Exon VII), Threonin (Exon VIII), Arginin (Exon XI) und Prolin (Exon XII) werden die Codons durch einen Exon/Intron-Übergang innerhalb der Gensequenz nach dem zweiten Nukleotid unterbrochen. Solche Exon/Intron-Muster können Aufschluß über die Evolution eines Gens geben und sind meist zwischen verwandten Spezies konserviert.

VI. LITERATUR

Altschul, S. F., Gisch, W., Miler, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410.

Bannon, G., Calzone, F., Bowen, J., Allis, C. and Gorovsky, M. (1983) Multiple, independently regulated, polyadenylated messages for histone H 3 and H 4 in *Tetrahymena*. *Nucl. Acids Res.*, **11**, 1295-1304.

Bilang, J., MacDonald, H., King, P. J. and Sturm, A. (1993) A soluble auxin-binding protein from *Hyoscyamus muticus* is a glutathione-s-transferase. *Plant Physiology*, **102**, 29-34.

Birnstiel, M., Busslinger, M. and Strub, K. (1985) Transcription termination and 3' processing: the end is in site. *Cell*, **41**, 349-359.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-252.

Braun, H.-P. and Schmitz, U. (1999) The protein-import apparatus of plant mitochondria. *Planta*, **209**, 267-274.

Brunak, S., Engelbrecht, J. and Knudsen, S. (1990) Neural network detects errors in the assignment of pre-mRNA splice sites. *Nucl. Acids Res.*, **18**, 4797-4801.

Brunak, S., Engelbrecht, J. and Knudsen, S. (1991) Prediction of human mRNA Donor and Acceptor Sites from the DNA Sequence. *J. Mol. Biol.*, **220**, 49-65.

Carnini, P., Kvam, C., Kitamura, A., Ohsumi, T., Okasaki, Y., Itoh, M., Kamiya, K., Sasaki, N., Izawa, M., Miramatsu, M., Hayashizaki, Y., Schneider, C. (1996) High-efficiency full-length cDNA cloning by biotinylated CAP trapper. *Genomics*, **37**, 327-336.

Chabot, B., Black, D., LeMaster, D., Steitz, J. (1985) The 3' splice site of pre-messenger RNA is recognized by a small nuclear ribonucleoprotein. *Science*, **230**, 1344-1349.

Chaboute, M.-E., Chaubet, N., Ehling, M., and Gigot, C. (1987) Genomic organisation and nucleotide sequences of two histone H3 and H4 genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, **8**, 179-181.

Chaboute, M.-E., Chaubet, N., Clement, B., Ehling, M., Gigot, C. and Philipps, G. (1988) Polyadenylation of histone H3 and H4 mRNAs in dicotyledonous plant. *Gene*, **71**, 217-233.

Chadwick, C. M. and Garrod, D. R. (1986) Hormones, receptors and cellular interactions in plants. Cambridge University Press, Cambridge.

Chaubet, N., Chaboute, M.-E., Clement, B., Ehling, M., Philipps, G. and Gigot, C. (1988) The histon H3 and H4 mRNAs are polyadenylated in maize. *Nucl. Acids Res.*, **16**, 1295-1304.

Choi, S. Y. (1996) Molecular cloning and expression of the hot pepper ERabp 1 gene encoding auxin-binding protein. *Plant. Mol. Biol.*, **32**, 995-997.

Claros, M. (1995) Mitoprot, a Macintosh application for studying mitochondrial proteins. *Comput. Appl. Biosci.*, **11** (4), 441-447.

Claros, M. and Vinsens, P. (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem.*, **241**, 779-786.

Claros, M., Brunak, S. and von Heijne, G. (1997) Prediction of N-terminal protein sorting signals. *Current Opinion in Structural Biology*, **7**, 394-398.

Cooper, T. G. (1981) Biochemische Arbeitsmethoden. Neumeier, R., Maurer, H. R. (Eds.) Walter de Gruyter, Berlin, New York.

Cotten, M., Gick, O., Vasserot, A., Schaffner, G. and Birnstiel, M. (1988) Specific contrast between mammalian U7 snRNA and histone precursor RNA are indispensable for the in vitro 3' RNA processing reaction. *EMBO J.*, **7**, 801-808.

Davies, P. J. (1987) Plant hormones and their role in plant growth and development. Martinus Nijhoff Publishers, Kluwer Academic Publishers Group, Dordrecht.

Däschner, K., Thalheim, C., Guha, C., Brennicke, A. and Binder, S. (1999) In plants a putative isovaleryl-CoA-dehydrogenase is located in mitochondria. *Plant Mol. Biol.*, **39**, 1275-1282.

Dean, C., Tamaki, S., Dunsmuir, P., Favreau, M., Katayama, C., Dooner, H. and Bedbrook, J. (1986) mRNA transcripts of several plant genes are polyadenylated at multiple sites in vivo. *Nucl. Acids Res.*, **14**, 2229-2240.

Doyle, J. J. and Doyle, J. L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, **12** (1), 13-15.

Droog, F. N. J., Hooykaas, P. J. J., Libbenga, K. R. and van der Zaal, E. J. (1993) Protein encoded by an auxin-regulated gene family of tobacco share limited but significant homology with glutathione-s-transferases and one member indeed shows in vitro GST activity. *Plant Mol. Biol.*, **21**, 965-972.

Dunn, S. D. (1986) Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins on Western blots by monoclonal antibodies. *Anal. Biochem.*, **157**, 144-153.

Esen, A. (1978) A simple method for quantitative, semiquantitative and qualitative assay of proteins. *Anal. Biochem.*, **89**, 264-273.

Fahrner, K., Yarger, J. and Hereford, L.(1980) Yeast histone mRNA is polyadenylated. *Nucl. Acids Res.*, **8**, 5725-5738.

Finocchiaro, G., Ito, M. and Tanaka, K. (1987) Purification and properties of short chain, medium chain and isovaleryl acyl-CoA dehydrogenases from human liver. *J. Biol. Chem.*, **262** (17) 7982-7989.

Frohman, M. A., Dush, M. K. and Martin, G. R. (1988) Rapid production of full length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **85**, 8998-9002.

Fromont-Racine, M., Bertrand, E., Pictet, R and Grange, T. (1993) A highly sensitive method for mapping the 5' termini of mRNAs. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 1683-1684.

Fullmer, C. S. (1984) *Anal. Biochem.*, **142**, 336.

Furuchi, Y. and Miura, K. (1975) A blocked structure at the 5' terminus of mRNA from cytoplasmic polyhedrosis virus. *Nature*, **253**, 374-375.

Gubler, U., and Hoffman, B. (1983) A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene*, **25**, 263-269.

Gantt, J., and Key, J. (1987) Molecular cloning of a pea H1 histone cDNA. *Eur. J. Biochem.*, **166**, 119-125.

Gassen, H.-G. & Schrimpf, G. (1999) Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.

Goodall, G. and Filipowicz, W. (1990) The minimum functional length of pre-mRNA introns in monocots and dicots. *Plant Mol. Biol.*, **14**, 727-733.

Harris, N. and Senapathy, P. (1990) Distribution and consensus of branch point signals in eukaryotic genes: a computerized statistical analysis. *Nucl. Acids Res.*, **18**, 3015-3019.

Hawkins, J. (1988) A survey on intron and exon lengths. *Nucl. Acids Res.*, **16**, 9893-9908.

Hebsgaard, S. M., Korning, P. G., Tolstrup, N., Engelbrecht, J., Rouze, P. and Brunak, S. (1996) Splice site prediction in *Arabidopsis thaliana* pre-mRNA by combining local and global sequence information. *Nucl. Acids Res.*, **24** (17), 3439-3452.

Henderson, J., MacDonald, H., Lazarus, C. M., Napier, R. M. and Hawes, C. R. (1996) Protein retention in the endoplasmic reticulum of insect cells is not compromised by baculovirus infection. *Cell. Biol. Int.*, **20**, 413-422.

Herber, B., Ulrich, B. and Jacobsen, H.-J. (1988) Modulation of soluble auxin-binding proteins in soybean cell suspensions. *Plant Cell Reports*, **7**, 178-181.

Hesse, T., Feldwisch, J., Balshemann, D., Bauw, G., Puype, M., Vanderkerckhove, J., Löbner, M., Klämbt, D., Schell, J. and Palme, K. (1989) Molecular cloning and structural analysis of a gene from *Zea mays* L. coding for a putative receptor for the plant hormone auxin. *EMBO J.*, **8**, 2453-2461.

Hirano, H., Komatsu, S., Kajiwara, H., Takagi, Y. and Tsunasawa, S. (1993) Microsequence analysis of the N-terminally blocked proteins immobilized on polyvinylidene difluoride membrane by western blotting. *Electrophoresis*, **14**, 839-846.

Ikeda, Y. and Tanaka, K. (1983a) Purification and characterization of isovaleryl-coenzyme A dehydrogenase from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **258**(2), 1077-85.

Ikeda, Y. and Tanaka, K. (1983b) Purification and characterization of 2-methyl-branched chain acyl coenzyme A dehydrogenase, an enzyme involved in the isoleucin and valin metabolism, from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **258(15)**, 9477-9487.

Ikeda, Y., Dabrowski, C. and Tanaka, K. (1983) Separation und properties of five distinct acyl-CoA dehydrogenases from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **258**, 1077-1076.

Ikeda, Y., Ikeda, K. O. and Tanaka, K. (1985a) Purification and characterization of short-chain, medium-chain and long-chain acyl-CoA dehydrogenases from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **260**, 1311-1325.

Ikeda, Y., Hine, D., Okamura-Ikeda, K. and Tanaka, K. (1985b) Mechanism of action of short-chain, medium-chain and long-chain acyl-CoA dehydrogenases. *J. Biol. Chem.*, **260**, 1326-1337.

Ikeda, Y., Keese, S. M. and Tanaka, K. (1985c) Molecular heterogeneity of variant isovaleryl-CoA dehydrogenase from cultured isovaleric acidemia fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7081-7085.

Ikeda, Y. and Tanaka, K. (1988a) Mutant isovaleryl-CoA dehydrogenase in isovaleric acidemia cells: assay of activity and molecular characterisation. *Methods Enzymol.* **166**, 155-166.

Ikeda, Y. and Tanaka, K. (1988b) Isovaleryl-CoA dehydrogenase from rat liver. *Methods Enzymol.*, **166**, 374-389.

Indo, Y., Yang-Feng, T., Glassberg, R. and Tanaka, K. (1991) Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNAs encoding human long-chain acyl-CoA dehydrogenase and assignment of its gene to chromosome 2. *Genomics*, **11**, 609-620.

Inohara, N., Shimomura, S., Fukui, T. and Futai, M. (1989) Auxin-binding protein located in the endoplasmatic reticulum of maize shoots: molecular cloning and complete primary structur. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 3564-3568.

Izai, K., Uchida, Y., Orii, T., Yamamoto, S and Hashimoto, T. (1992) Novel fatty acid β -oxidation enzymes in rat liver mitochondria, I. Purification and poperties of very long chain acyl-coenzyme A dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **267**, 1027-1033.

Jacobsen, H.-J. (1982) Soluble auxin-binding proteins in pea epicotyls. *Plant Physiol.*, **56**, 161-167.

Jacobsen, H.-J. (1984) Two different soluble cytoplasmic auxin-binding sites in etiolated pea epicotyls. *Plant & Cell Physiol.*, **25**, 867-873.

Jacobsen H.-J. and Hajek, K. (1987) Growth-stage dependent occurrence of soluble auxin-binding proteins in pea. In: Fox, E. J. and Jacobs, M. (eds.) *Molecular biology of plant growth control*. Alan R. Liss Inc., New York, 257-266.

Jacobsen H.-J., Hajek, K., Mayerbacher, R. and Herber, B. (1987) Soluble auxin-binding: is there a correlation between growth-stage dependent high-affinity auxin-binding and auxin-competence? In: Klämbt, D. (Eds.) *Plant Hormone Receptors*. NATO ASI Series, 10, Springer Verlag, Berlin, 63-69.

Jones, A. M. and Venis, M. A. (1989) Comparison of site I auxin binding and a 22 kilodalton-protein in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6153-6156.

Jones, A. M. (1990) Location of transported auxin in etiolated maize shoots using 5-azidoindole-3-acetic acid. *Plant Physiol.*, **93**, 1154-1161.

Jones, A. M. (1994) Auxin-binding proteins. *Annual Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.*, **45**, 393-420.

Kato, S., Sekine, S., Oh, S. W., Kim, N. S., Umezawa, Y., Abe, N., Yokoyama-Kobayashi, M. and Aoki, T. (1994) Construction of human full-length cDNA libraries. *Gene*, **150**, 243-250.

Kelly, D., Kim, J.-J., Billadello, J., Hainline, B., Chu, T. and Strauss, A. (1987) Nucleotide sequence of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase mRNA and its expression in enzyme-deficient human tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 4068-4072.

Kelly, D., Whelan, A., Ogden, M., Alpers, R., Zhang, Z., Bellus, G., Gregersen, N., Dorland, L. and Strauss, A. (1990) Molecular characterization of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 9236-9240.

Kikuchi, M., Imaseki, H. and Sakai, S. (1989) Modulation of gene expression in isolated nuclei by auxin-binding proteins. *Plant & Cell Physiol.*, **30**, 765-773.

Kim, D., Kim, Y. S., Jung, J. (1997) Involvement of soluble proteinous factors in auxin-induced modulation of P-type ATPase in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *FEBS Lett.*, **409**, 273-276.

Knippers, R., Philippsen, P., Schäfer, K. P. und Fanning, E. (1997) Molekulare Genetik. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.

Korning, P., Hebsgaard, S., Rouze, P. and Brunak, S. (1996) Cleaning the GenBank *Arabidopsis thaliana* data set. *Nucl. Acids Res.*, **24** (2), 316-320.

Krainer, A., Conway, G. and Kozak, D. (1990) The essential pre-mRNA Splicing factor SF2 influences 5' splice site selection by activating proximal sites. *Cell*, **62**, 35-42.

Kögl, F., Haagen-Smit, A. J. und Erxleben, H. (1933) Über ein Phytohormon der Zellstreckung. Reindarstellung des Auxins aus menschlichem Harn. *Hoppe-Seyer's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, **214**, 241-261.

Kraus, J. P., Matsubara, Y., Barton, D., Yang-Feng, T. L., Glassberg, R., Ito, M., Ikeda, Y., Mole, J., Francke, U. and Tanaka, K. (1987) Isolation of cDNA clones coding for rat isovaleryl-CoA dehydrogenase and assignment of the gene to human chromosome 15. *Genomics*, **1** (3), 264-269.

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

Lazarus, C. M. and MacDonald, H., (1996) Characterization of a strawberry gene for auxin-binding protein and its expression in insect cells. *Plant. Mol. Biol.*, **31**, 267-277.

Leblanc, N., Roux, C., Pradier, J. M. and Perrot-Rechenmann, C. (1997) Characterization of two cDNAs encoding auxin-binding proteins in *Nicotiana tabacum*. *Plant. Mol. Biol.*, **33**, 679-689.

Löbler, M. and Klämbt, D. (1985a) Auxin-binding protein from corn coleoptile membranes of corn (*Zea mays* L.). *J. Biol. Chem.*, **260** (17), 9848-9853.

Löbler, M. and Klämbt, D. (1985b) Auxin-binding protein from corn coleoptile membranes of corn (*Zea mays* L.). *J. Biol. Chem.*, **260** (17), 9854-9859.

MacDonald, H. (1997) Auxin perception and signal transduction. *Physiol. Plant.*, **100**, 423-430.

Massotte, D., Fleig, U. and Palme, K. (1995) Purification and characterization of an auxin-binding protein from *Arabidopsis thaliana* expressed in baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr. Purif.*, **6**, 220-227.

Maruyama, K. and Sugano, S. (1994) Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eucaryotic mRNAs with oligoribonucleotides. *Gene*, **138**, 171-174.

Matsubara, Y., Osaza, H., Glassberg, R., Finocchiaro, G., Ikeda, Y., Mole, J., Rosenberg, L. and Tanaka, K. (1989) Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding the entire precursor of rat liver medium chain acyl-CoA dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **262** (21), 10104-10108.

Matsubara, Y., Indo, Y., Natio, E., Osaza, H., Glassberg, R., Vockley, J., Ikeda, Y., Kraus, J. and Tanaka, K. (1989) Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNAs encoding the precursors of rat long chain acyl-coenzyme A, short chain acyl-coenzyme A, and isovaleryl-coenzyme A dehydrogenases. Sequence homology of four enzymes of the acyl-CoA dehydrogenase family. *J. Biol. Chem.*, **264**, 16321-31.

Matsubara, Y., Michinori, I., Glassberg, R., Satyabhama, S., Ikeda, Y. and Tanaka, K. (1990) Nucleotide sequence of messenger RNA encoding human isovaleryl-coenzyme A dehydrogenase and its expression in isovaleric acidemia fibroblasts. *J. Clin. Invest.*, **85**, 1058-1064.

Maxson, R., Cohn, R. and Kedes, L. (1983) Expression and organisation of histone genes. *Annu. Rev. Genet.*, **17**, 239-277.

Mohsen, A. W., Anderson, B., Volchenboum, S., Battaile, K., Tiffany, K., Robrerts, D., Kim, J.-J. and Vockley, J. (1998) Charakterization of molecular defects in isovaleryl-CoA dehydrogenase in patients with isovaleric acidemia. *Biochemistry*; **37** (28), 10325-10335.

Mohsen, A. W. and Vockley, J. (1995) Identification of active site catalytic residue in human isovaleryl-CoA dehydrogenase. *Biochemistry*, **34**(32): 10146-10152.

Mount, S. (1982) A catalogue of splice junction sequences. *Nucl. Acids Res.*, **10**, 459-472.

Mullis, K. and Faloona, F. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.*, **55**, 335-350.

Murray, M. G. and Key, J. L. (1978) 2,4-dichlorophenoxyacetic acid enhanced phosphorylation of soybean nuclear proteins. *Plant Physiol.*, **61**, 190-198.

Naito, E., Ozasa, H., Ikeda, Y. and Tanaka, K. (1989) Molecular cloning and nucleotide sequence of complementary DNAs encoding human short chain acyl-coenzyme A dehydrogenase and the study of the molecular basis of human short chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *J. Clin. Invest.*, **83**, 1605-1613.

Napier, R. M. and Venis, M. A. (1991) From auxin-binding protein to plant hormone receptor. *Trends Biochem. Sci.*, **16**, 72-75.

Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y. and Sugino, Y. (1990) A rapid highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli*-cells. *Nucl. Acids Res.*, **18**, 6169.

Noda, C., Rhead, W. J. and Tanaka, K. (1980) Identification of the active site catalytic residue in human isovaleryl-CoA dehydrogenase. *Biochemistry*, **34**, 10146-10152.

Ohshima, Y. and Gotoh, Y. (1987) Signals for the selection of a splice site in pre-mRNA. *J. Mol. Biol.*, **195**, 247-259.

Okayama, H. and Berg, P. (1982) High efficiency cloning of full-length cDNA. *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 161-170.

Oostrom, H., Kulescha, Z., v. Vliet, T. B. and Libbenga, K. R. (1980) Characterisation of a cytoplasmic auxin receptor from tobacco-pith callus. *Planta*, **149**, 44-47.

Palme, K., Hesse, T., Moore, I., Campos, N., Feldwisch, J., Garbers, C., Hesse, F. and Schell, J. (1991) Hormonal modulation of plant growth: the role of auxin perception. *Mechanisms of Development*, **33**, 97-106.

Parimoo, B. and Tanaka, K. (1993) Structural organisation of the human isovaleryl-CoA dehydrogenase gene. *Genomics*, **15(3)**, 582-90.

Pearson, W. R. and Lipman, D. J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 2444-2448.

- Petersen, S. B., Bohr, H., Bohr, K., Brunak, S., Cotterill, R. M. J., Fredholm, H. and Lautrup, B.** (1990) Training neural networks to analyse biological sequences. *Trends Biotechnology*, **11**, 304-308.
- Prasad, P. V. and Jones, A. M.** (1991) Putative receptor for the plant growth hormone auxin identified and characterized by anti-idiotypic antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 5479-5483.
- Reinard, T.** (1992) Charakterisierung und Isolierung löslicher Auxin-bindender Proteine und eines mit Streckungswachstum korrelierten Zellwandproteins. Dissertation, Universität Bonn.
- Reinard, T. and Jacobsen, H.-J. A** (1995) Soluble High Affinity Auxin-Binding Protein from Pea Apex. *J. Plant Physiol.*, **147**, 132-138.
- Reinard, T., Achmus, H., Walther, A., Rescher, U., Klämbt, D. and Jacobsen, H.-J.** (1998) Assignment of the Auxin Binding Abilities of ABP₄₄ in Gel. *Plant & Cell Physiol.*, **39(8)**, 874-878.
- Rhead, W. J. and Tanaka, K.** (1990) Demonstration of a specific mitochondria Isovaleryl-CoA dehydrogenase deficiency in fibroblasts from patients with isovaleric acidemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77 (1)**, 580-583.
- Rozen, R., Vockley, J., Zhou, L., Milos, R., Willard, J., Fu, K., Vicanek, C., Low-Nang, L., Torban, E. and Fournier, B.** (1994) Isolation and expression of cDNA encoding the precursor for a novel member (ACADSB) of the acyl-CoA dehydrogenase gene family. *Genomics*, **24**, 280-287.
- Rubery, P. H.** (1981) Auxin receptors. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **32**, 569-595.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Sakai, S., Seki, J. and Imaseki, K.** (1986) Stimulation of RNA-synthesis in isolated nuclei by auxin-binding proteins I and II. *Plant & Cell Physiol.*, **27**, 635-643.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Shimomura, S., Sotobayashi, T., Futai, M. and Fukui, T. (1986) Purification and properties of an auxin-binding protein from maize shoot membranes. *J. of Biochem.*, **99**, 1513-1524.

Shimomura, S., Inohara, N., Futai, M. and Fukui, T. (1988) Different properties of two types of auxin-binding sites in membranes from maize coleoptiles. *Planta*, **175**, 558-566.

Schneider, G., Sjöling, S., Wallin, E., Wrede, P., Glaser, E. and von Heijne, G. (1998) Feature-extraction from endopeptidase cleavage sites in mitochondrial targeting peptides. *Proteins*, **30**, 49-60.

Shapiro, M., and Senapathy, P. (1987) RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucl. Acids Res.*, **15**, 7155-7174.

Sjöling, S. and Glaser, E. (1998) Mitochondrial targeting peptides in plants. *Trends Plant Sci.*, **3**, 136-140.

Smith, T. F. and Waterman, M. S. (1981) Identification of common molecular subsequences. *J. Mol. Biol.*, **147**, 195-197.

Sugaya, S. and Sakai, S. (1996) Identification of a soluble auxin-binding protein as a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. *Plant Sci.*, **114**, 1-9.

Suzuki, Y., Yoshimoto-Nakagawa, K., Maruyama, K., Suyama, A. and Sugano, S. (1997) Construction and characterization of a full length-enriched and a 5'-end-enriched cDNA library. *Gene*, **200**, 149-156.

Staden, R. (1984) Computer methods to locate signals in nucleic acids sequences. *Nucl. Acids Res.*, **12**, 505-519.

Tanaka, K., Budd, M. A., Efron, M. L., and Isselbacher, K. J. (1966) Isovaleric acidemia: A new genetic defect of leucine metabolism. *Biochemistry*, **56**, 236-242.

Tabata, T. and Iwabuchi, M. (1986) Characteristic sequences in the 3' flanking region of wheat histone genes. *Plant Cell. Physiol.*, **27**, 929-933.

Tazi, J., Alibert, C., Tamsamani, J., Reveillaud, G., Brunel, C. and Jeanteur, P. (1986) A protein that specifically recognizes the 3' splice site of mammalian pre-mRNA introns is associated with a small nuclear ribonucleoprotein. *Cell*, **47**, 755-766.

Tian, H., Klämbt, D. and Jones, A. M. (1995) Auxin-binding protein 1 does not bind auxin within the endoplasmic reticulum despite this being the predominant subcellular location for this hormone receptor. *J. Biol. Chem.*, **270**, 26962-26969.

Tiffany, K. A., Roberts, D. L., Wang, M., Paschke, R., Mohsen, A. W., Vockley, J. and Kim, J. P. (1997) Structure of human isovaleryl-CoA dehydrogenase at 2.6 Å resolution: structural basis for substrate specificity. *Biochemistry*, **15**, **36(28)**, 8455-64.

Tillmann, U., Viola, G., Kayser, B., Siemeister, G., Hesse, T., Palme, K., Löbler, M. and Klämbt, D. (1989) cDNA clones of the auxin-binding protein from corn coleoptiles (*Zea mays* L.): isolation and characterisation by immunological methods. *EMBO J.*, **8**, 2463-2467.

van der Linde, P. C. G., Bouman, H., Mennes, A. M., Quint, A. and Libbenga, K. R. (1984) A soluble auxin-binding protein from cultured tobacco tissue stimulates RNA synthesis *in vitro*. *Planta*, **160**, 102-106.

Venis, M. A. (1987) Auxin-binding proteins in maize: purification and receptor function In: Molecular biology of plants growth control, 219-228, Eds.: Fox, J. E. and Jacobs, M.; Alan R. Liss Inc., New York.

Venis, M. A. and Napier, R. M. (1991) Auxin receptors: recent developments. *Plant Growth Regulation*, **10**, 329-340.

Vockley, J., Parimoo, B. and Tanaka, K. (1991) Molecular characterisation of four different classes of mutations in the isovaleryl-CoA dehydrogenase gene responsible for isovaleric acidemia. *American Journal of Human Genetics*, **49**, 147-157.

Vockley, J., Nagao, M., Parimoo, B. and Tanaka, K. (1992) The variant human isovaleryl-CoA dehydrogenase gene responsible for type II isovaleric acidemia determines an RNA splicing error, leading to the deletion of the entire second coding exon and the production of a truncated precursor protein that interacts poorly with mitochondrial import receptors. *J Biol Chem.*, **267** (4), 2494-2501.

Walther, A., Rescher, U., Schiebl, C. and Klämbt, D. (1997) Antibodies against distinct ABP1 regions modify auxin binding to ABP1 and change the physiological auxin response of maize coleoptile sections. *J. Plant Physiol.*, **150**, 110-114.

Wells, D., Hoffmann, D., and Kedes, L. (1987) Unusual structure, evolutionary conservation of non-coding sequences and numerous pseudogenes characterize the human H 3.3 histone multigene family. *Nucl. Acids Res.*, **15**, 2871-2886.

Waigmann, E. and Barta, A. (1992) Processing of chimeric introns in dicot plants: evidence for a close cooperation between 5' and 3' splice site. *Nucl. Acids Res.*, **20**, 75-81.

White, O., Soderlund, C., Shnmugan, P. and Fields, C. (1992) Information contents and dinucleotide compositions of plant intron sequences vary with evolutionary origin. *Plant Mol. Biol.*, **19**, 1057-1064.

Wiebauer, K., Herrero, J.-J. and Filipowicz, W. (1988) Nuclear pre-mRNA processing in plants: distinct model of 3'-splice-site in plants and animals. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 2042-2051.

Wiegand, R. C., Shah, D. M., Mozer, T. J., Harding, E. I., Diaz-Collier, J., Saunders, C., Jaworski, E. G. and Tiemeier, D. C. (1986) Messenger RNA encoding a glutathione-S-transferase responsible for herbicide tolerance in maize is induced in response to safener treatment. *Plant Mol. Biol.*, **7**, 235-243.

Wu, S.-C., György, J. and Dudits, D. (1989) Polyadenylated H3 histone transcripts and histone variants in alfalfa. *Nucl. Acids Res.*, **17**, 3057-3063.

Zhang, Z., Kelly, D. P., Kim, J.-J., Zhou, Y., Ogden, M. L., Whelan, A. J. and Strauss, A. W. (1992) Structural organization and regulatory regions of the human medium-chain acyl-CoA dehydrogenase gene. *Biochemistry*, **31**, 81-89.

Zhuang, Y. and Weiner, A. M. (1986) A compensatory base change in U1 snRNA suppresses a 5' splice site mutation. *Cell*, **46**, 827-835.

Lebenslauf

1. Persönliche Daten

Name: Viktoria Janke
Geburtstag: 13. Mai 1965
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet
Geburtsort: Alma-Ata/UdSSR

2. Schulbildung

1972 - 1982 Mittelschule Alma-Ata/Kasachstan
Abschluß: Abitur mit Durchschnittsnote 1,0

3. Berufsausbildung

1982 -1987 Staatsuniversität Kazan/Rußland
Fachrichtung: Biologie
Hauptfach: Genetik
Abschluß: Diplom

1994-1996 Universität Hannover
Fachrichtung: Biologie
Hauptfach: Mikrobiologie
Nebenfächer: Genetik, Biochemie, Tierphysiologie
Abschluß: Diplom
Note: Gut
Diplomarbeit: Charakterisierung des Gens des humanen β -Defensins hBD-1
Ort: Niedersächsisches Institut für Peptid-Forschung Hannover
Note: Sehr gut

Berufserfahrung:

27.08.1987-
22.11.1988 Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin im Labor für Zellingenieurie im Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Akademie der Wissenschaft des Kasachstans

28.11.1988-
17.12.1991 Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin im Labor für Immunitätsforschung im Wissenschaftlichen Forschungsinstitut für Geburtshilfe und Frauenheilkunde des Ministeriums für Gesundheitswesen des Kasachstans

01.05.1996-
30.07.1996 Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Peptid-Forschung / Hannover

Ab 01.02.1997 Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin und Promotionsstudium am Lehrgebiet für Molekulargenetik / Universität Hannover

Sonstiges:

05.1992-03.1993 Sprachkurs bei der Volkshochschule / Hannover
05.1993-10.1993 Deutsch-Intensivsprachkurs bei DGB / Hannover

Hannover, den 31. März 2000

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hans-Jörg Jacobsen möchte ich für die Bereitstellung des Themas, die guten Arbeitsmöglichkeiten und die fachliche Diskussion danken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. Walter Müller für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Dr. rer. nat. Thomas Reinard danke ich für die umfangreiche Betreuung und Unterstützung in allen Fragen dieser Arbeit.

Für die Durchführung der Mikrosequenzierungen bedanke ich mich bei Dr. Fritz Buck.

Für die Durchführung der Transformation von Pflanzen mittels Partikelbombardement möchte ich mich bei Dipl.-Biol. Guido Laucke ganz herzlich bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Steffi Sprunck und Dipl.-Biochem. Bustanur Rosidi für zahlreiche Denkanstöße und ihre stetige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Dem „Computer-Doktor“ Holger Meyer gilt mein besonderer Dank.

Ich möchte mich herzlich bei Frau Dipl.-Biol. Natalie Kadow für ihre Hilfe bedanken.

Allen Mitarbeitern des Lehrgebietes Molekularbiologie bin ich zu besonderem Dank für ihre stete Hilfsbereitschaft und freundliche Aufnahme verpflichtet.

Mein herzlicher Dank gilt meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann und meinem Sohn, die mir immer zur Seite gestanden haben und ohne deren Unterstützung und Aufmunterung ich diese Arbeit nie geschafft hätte.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt und ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hannover, den

Viktoria Janke