

# **Untersuchungen zur Rolle von Stress-induzierbaren Lipoxygenase-Aktivitäten in Weizen**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen  
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der  
Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin  
Angelika Seiler, geb. Zimmermann

aus  
Geilenkirchen

Berichter: Universitätsprofessor em. Dr. H.-J. Grambow  
Universitätsprofessor A. J. Slusarenko, Ph. D.

Tag der mündlichen Prüfung: 25.01.2007

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online  
verfügbar.



## Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Zusammenfassung</b>	
<b>II</b>	<b>Abkürzungen</b>	
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Die pflanzliche Abwehr</b>	<b>2</b>
1.1.1	Die Nicht-Wirt-Resistenz	2
1.1.2	Die Wirt-Resistenz	3
1.1.3	Abwehrmechanismen von Pflanzen	4
1.1.4	Die Wirt-Pathogen-Erkennung: Elicitoren	7
<b>1.2</b>	<b>Lipoxygenasen (LOX)</b>	<b>8</b>
1.2.1	Der LOX-Stoffwechselweg bei Pflanzen	9
1.2.2	Die Klassifizierung pflanzlicher LOX	13
1.2.3	Die physiologische Bedeutung von Pflanzen-LOX und ihrer Stoffwechselprodukte	15
1.2.4	Die Funktion von Pflanzen-LOX bei der Pathogenabwehr	17
<b>1.3</b>	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>Geräte</b>	<b>20</b>
<b>2.2</b>	<b>Kits, Enzyme, Marker und Chemikalien</b>	<b>21</b>
<b>2.3</b>	<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>22</b>
<b>2.4</b>	<b>PCR- und Sequenzierungs-Primer</b>	<b>22</b>
<b>2.5</b>	<b>Vektoren</b>	<b>23</b>
<b>2.6</b>	<b>cDNA-Bank</b>	<b>23</b>
<b>2.7</b>	<b>Bakterienstämme</b>	<b>24</b>
<b>2.8</b>	<b>Antikörper</b>	<b>24</b>
2.8.1	Primäre Antikörper	24
2.8.2	Sekundäre Antikörper und Enzymsubstrate	25
<b>2.9</b>	<b>Nachweis der Polyhistidin-getaggten LOX-Proteine</b>	<b>25</b>
<b>2.10</b>	<b>Pflanzen</b>	<b>25</b>
<b>2.11</b>	<b>Zellkulturen</b>	<b>26</b>
<b>2.12</b>	<b>Weizenschwarzrost</b>	<b>27</b>
2.12.1	Inokulation mit dem Weizenschwarzrost	27
<b>2.13</b>	<b>Gerstenmehltau</b>	<b>28</b>
2.13.1	Inokulation mit dem Gerstenmehltau	28
<b>2.14</b>	<b>Induktion einer „touched-induced“ LOX („Windbehandlung“)</b>	<b>28</b>
<b>2.15</b>	<b>Applikation von Testlösungen und Elicitoren</b>	<b>28</b>
2.15.1	Pgt-Elicitor	29
2.15.2	Methyljasmonat	29
2.15.3	BION®	29
<b>2.16</b>	<b>Präparation von Proteinextrakten</b>	<b>30</b>
2.16.1	Blatt- und Zellkultur-Rohextrakte	30
2.16.2	Partiell gereinigte Pflanzen- und Zellkulturextrakte	30

zur Gelelektrophorese	
2.16.3 LOX-Extrakte nach Induktion aus transformierten <i>E. coli</i>	30
2.16.4 LOX-Extrakte nach zellfreier Expression mittels „Rapid Translation System RTS 500“ (Roche, Mannheim)	31
2.16.5 Ionenaustauschchromatographie (IAC)	32
<b>2.17 LOX-Enzymaktivitätsbestimmungen</b>	<b>34</b>
2.17.1 Photometrische Enzymaktivitäts-Messung	35
2.17.2 Polarographische Enzymaktivitäts-Messung	35
2.17.3 Bestimmung des pH-Optimums	35
<b>2.18 Proteinbestimmungen</b>	<b>36</b>
<b>2.19 Isolierung von Chloroplasten</b>	<b>36</b>
<b>2.20 Gelelektrophoresen von Proteinen</b>	<b>37</b>
2.20.1 Weitere Anreicherung von LOX-Proteinen	37
2.20.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
2.20.3 2-D-Elektrophorese	41
2.20.4 Protein-Fingerprints	44
2.20.5 Proteinfärbemethoden im SDS-Gel	45
2.20.5.1 Positiv-Färbungen	45
2.20.5.2 Negativ-Färbungen	46
<b>2.21 Westernblot-Analyse</b>	<b>46</b>
2.21.1 Tankblotting	47
2.21.2 Semidry-Blotting	47
2.21.3 Immunodetektion von Proteinen	47
2.21.4 Entfernen von Antikörpern von Membranen („Strippen“)	49
<b>2.22 Positionsspezifität (Produktanalyse) von Lipoxygenasen</b>	<b>50</b>
<b>2.23 Sequenzierung von LOX-Proteinen</b>	<b>51</b>
<b>2.24 RNA-Extraktion</b>	<b>51</b>
2.24.1 RNase freies Arbeiten	51
2.24.2 Extraktion von Gesamt-RNA	52
<b>2.25 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren</b>	<b>53</b>
<b>2.26 Denaturierende Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese</b>	<b>53</b>
<b>2.27 Northernblot-Analyse</b>	<b>54</b>
2.27.1 Northernblot	55
2.27.2 Hybridisierung	55
<b>2.28 Amplifizierung von cDNA mithilfe reverser Transkriptasen</b>	<b>57</b>
2.28.1 Konstruktion einer Weizen-LOX-Sonde mittels degenerierter Primer über RT-PCR	57
2.28.2 Klonierung der 3'UT mittels 3'-RACE	58
2.28.3 5'-RACE	60
<b>2.29 Klonierung einer LOX-cDNA</b>	<b>60</b>
<b>2.30 Ligationen</b>	<b>65</b>
2.30.1 Ligation von PCR-Produkten	66
2.30.2 Klonierung der LOX cDNA in den Expressions-Vektor pIVEX 2.3	66
<b>2.31 Expression der LOX-cDNA</b>	<b>66</b>

2.31.1	Expression in <i>E. coli</i>	66
2.31.2	Zellfreie Expression	67
<b>2.32</b>	<b>Aufzucht von <i>E. coli</i></b>	<b>67</b>
<b>2.33</b>	<b>Transformation von <i>E. coli</i></b>	<b>68</b>
2.33.1	Herstellung kompetenter Zellen	68
2.33.2	Transformation	69
<b>2.34</b>	<b>DNA Gelelektrophorese</b>	<b>70</b>
<b>2.35</b>	<b>Extraktion von DNA aus Agarosegelen</b>	<b>70</b>
2.35.1	Extraktion von DNA mithilfe silanisierter Glaswolle	70
2.35.2	Extraktion von DNA aus Agarosegelen mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit	71
<b>2.36</b>	<b>Amplifikation von DNA mittels PCR</b>	<b>71</b>
<b>2.37</b>	<b>Restriktionsverdau von DNA</b>	<b>72</b>
<b>2.38</b>	<b>Plasmidpräparationen</b>	<b>73</b>
2.38.1	STET-Miniplasmidpräparationen	73
2.38.2	Miniplasmidpräparationen für Sequenzierungen	73
<b>2.39</b>	<b>Sequenzierung von DNA</b>	<b>74</b>
<b>2.40</b>	<b>Computergestützte Auswertung der Daten</b>	<b>75</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>76</b>
<b>3.1</b>	<b>Pathogen- und Elicitor-induzierbare LOX in Weizen: Protein-biochemische Arbeiten</b>	<b>78</b>
3.1.1	Induzierbare Weizen-LOX im Rohextrakt	78
3.1.1.1	Immunodetektion	78
3.1.1.1	Enzymaktivität	80
3.1.2	Anreicherung, Immunodetektion und Differenzierung induzierbarer Weizen-LOX	84
3.1.2.1	Anreicherung mittels Anionenaustausch-Chromatographie (IAC)	84
3.1.2.2	Immunodetektion der LOX-aktiven Fraktionen	86
3.1.2.3	Versuche zur Differenzierung der induzierbaren Weizen-LOX	88
3.1.2.3.1	Subzelluläre Lokalisation von Lipoxygenasen in Weizen	88
3.1.2.3.2	2-D-Elektrophorese	88
3.1.2.3.3	Protein-Fingerprints	94
3.1.2.3.4	Versuche zur Sequenzierung der aktiven LOX-92-Spezies	97
<b>Zusammenfassung des Kapitels 3.1</b>		<b>106</b>
<b>3.2</b>	<b>Molekularbiologische Strategien zur Analytik von LOX-Spezies in Weizen</b>	<b>107</b>
3.2.1	Konstruktion der Sonden	107
3.2.2	Screening einer Weizen-cDNA-Bank	113
3.2.3	Northern-Analysen	127
3.2.3.1	Northern-Analysen mit der Weizen-LOX-cDNA <i>Wci 2</i> und den cDNA-Fragmenten <i>L 500</i> bzw. <i>ZK 500</i> und <i>L 3UT</i>	128
<b>Zusammenfassung des Kapitels 3.2</b>		<b>135</b>

<b>3.3</b>	<b>Die Expression der LOX-cDNA (<i>LOX2 Ta1</i>) in <i>E. coli</i> und im zellfreien System (rekombinante LOX)</b>	<b>136</b>
3.3.1	LOX-Aktivitätsmessungen mit den rekombinanten LOX-Enzymen	139
3.3.2	Westernblot-Analysen mit den rekombinanten LOX-Enzymen	141
3.3.3	Bestimmung des pH-Optimums der rekombinanten LOX aus Klon 15.2	142
3.3.4	Positionsspezifität der rekombinanten LOX aus Klon 15.2	143
	<b>Zusammenfassung des Kapitels 3.3</b>	<b>147</b>
<b>3.4</b>	<b>Computergestützte Aufarbeitung der bisherigen Ergebnisse zur Charakterisierung der <i>LOX2 Ta1</i></b>	<b>148</b>
3.4.1	Untersuchungen zur Feststellung der wahrscheinlichen Lokalisation des LOX-Enzyms <i>LOX2 Ta1</i>	149
3.4.2	Bestimmung des Molekulargewichts von <i>LOX2 Ta1</i> sowie des pI (isoelektrischen Punktes)	152
3.4.3	Bestimmung der Positionsspezifität, Klassifizierung der <i>LOX2 Ta1</i> , Einordnung in den „Phylogenetic tree“	152
3.4.4	Stabilität der <i>LOX2 Ta1</i>	155
	<b>Zusammenfassung des Kapitels 3.4</b>	<b>156</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>157</b>
<b>4.1</b>	<b>Induzierbare Lipoxygenasen (LOX) in Pflanzen</b>	<b>157</b>
<b>4.2</b>	<b>Durch Stress induzierbare Weizen-LOX</b>	<b>157</b>
4.2.1	LOX-92 und LOX-103	158
4.2.2	Die klonierten LOX-cDNA-(Fragmente): <i>LOX2 Ta1</i> und <i>L500</i>	164
<b>4.3</b>	<b>Die Charakterisierung der Lipoxygenase <i>LOX2 Ta1</i></b>	<b>165</b>
4.3.1	Die Induktion der <i>LOX2 Ta1</i>	165
4.3.2	Die Expression des rekombinanten LOX-Proteins <i>LOX2 Ta1</i>	168
4.3.3	Die Sequenzanalyse von <i>LOX2 Ta1</i>	168
4.3.4	Entspricht <i>LOX2 Ta1</i> einem der vorher charakterisierten LOX-Enzyme?	170
<b>4.4</b>	<b>Mögliche Funktionen von LOX-92 und <i>LOX2 Ta1</i> (alias LOX-103)</b>	<b>172</b>
4.4.1	Gibt es eine Kooperation von 9-LOX (LOX-92) und der 13-LOX ( <i>LOX2 Ta1</i> bzw. LOX-103) beim Weizen?	173
4.4.2	Einordnung der 9-LOX bzw. 13-LOX-Spezies in das Signal- und Reaktionsnetz beim Ablauf pflanzlicher Abwehrreaktionen – <b>eine Hypothese</b>	176
<b>III</b>	<b>Literatur</b>	

## I Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung Stress-induzierbarer Weizen-Lipoxygenasen (Weizen-LOX). Insbesondere sollte die Rolle von Weizen-LOX nach Pathogenbefall und nach Elicitierung untersucht werden. Hierbei spielen sowohl 9- als auch 13-LOX-Spezies eine Rolle. Zur Untersuchung beider LOX-Spezies wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Zunächst wurde die protein- und biochemische Charakterisierung von bekannten induzierbaren Weizen-LOX-Enzymen fortgeführt. Der Fokus dieser Untersuchungen lag bei den hochaktiven LOX-92- sowie den plastidären LOX-103-Spezies.

Bei den LOX-92 handelt es sich aufgrund der Positionsspezifität um Vertreter der 9-LOX. Unabhängig vom vorangegangenen (Stress-) Reiz sind sie für etwa 80% der LOX-Enzymaktivität verantwortlich. Sie sind nicht in den Plastiden zu finden, offenbar sind sie im Cytoplasma lokalisiert. Northern-Analysen zeigten, dass ihre Induktion nach Pathogenbefall und Elicitierung nicht auf eine *de novo*-Synthese zurückführbar ist. Eine posttranslationale Aktivierung der LOX-92 ist daher wahrscheinlich.

Mithilfe einer über RT-PCR konstruierten Weizen-LOX-Sonde (*L500*) konnte eine vollständige Weizen-LOX cDNA, die *LOX2 Ta1*, kloniert werden. Es gibt ausreichend Hinweise, dass *LOX2 Ta1* und LOX-103 identisch sind. Sie sind mit hoher Sicherheit Vertreter der 13-LOX. Für die *LOX2 Ta1* ist eine Induktion durch Methyljasmonat (Meja) und Verwundungsstress auf RNA-Ebene gezeigt worden. Mit Hilfe von Northernanalysen, Sequenzanalysen und durch die Einordnung in einen phylogenetischen Stammbaum konnte die *LOX2 Ta1* gut charakterisiert werden:

- Es handelt sich um eine 102 kDa 13-LOX mit einer putativen Chloroplasten-Zielsequenz. Gemäß neuerer Nomenklatur gehört sie demnach zu den Typ2-LOX.
- Sie muss aufgrund ihres hohen Instabilitätsindex von 48,76 als ein instabiles Molekül eingeordnet werden. Hohe LOX-Enzymaktivitätsverluste innerhalb weniger Tage bestätigen diese Klassifizierung.
- Über den phylogenetischen Stammbaum konnte eine enge Verwandtschaft zu zwei Gramineen-LOX-Enzymen dokumentiert werden, der *LOX2 Hv 1* (Vorös

1998) aus Gerste und zur *LOX2 Os2* (Zabai 2004) aus Reis. Diese beiden LOX scheinen eine Rolle bei der induzierten Resistenz zu spielen. Für die *LOX2 Ta1* konnte dies bisher nicht bewiesen werden. Jedoch akkumulieren ihre Transkripte nach Inokulation mit dem Nicht-Wirt *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, dem echten Gersten-Mehltau.

Nach Pathogen- bzw. Stress-Induktion werden sowohl die cytosolische 9-LOX LOX-92 als auch die plastidäre 13-LOX LOX-103 (= *LOX2 Ta1*) zeitgleich aktiviert. Eine gemeinsame Regulation im Rahmen der Signal- und Reaktionsnetze beim Ablauf pflanzlicher Abwehrreaktionen wird diskutiert.

Zusätzlich ergaben sich Hinweise, dass bisher nicht identifizierte Komponenten eine wichtige Rolle bei der LOX-Stabilität und –Aktivität beim Weizen spielen.

## II Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AOS	Allenoxid-Synthase
APS	Ammoniumpersulfat
A. reinst	Aqua reinst
AS	Aminosäuren
Bp	Basenpaare
BSA	Rinder Serum Albumin
BTH	Benzothiadiazol
cDNA	komplementäre DNA
Chl	Chloroplasten
CS	cleavage site
cTP	chloroplast transit peptide
d	Tag
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DES	Divinylether-Synthase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
2-D	Zwei-dimensional
EAS	Epoxyalkohol-Synthase
EDTA	Ethylendinitriltetraessigsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
f.	für
FH	Fachhochschule
f. sp.	forma specialis
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPL	Hydroperoxid-Lyase
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
HPOD	Hydroperoxyoctadecadiensäure
HPOT	Hydroperoxyoctadecatriensäure
HR	Hypersensitive Reaktion
IAC	Ionenaustauschchromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	isoelektrischer Punkt
IgG	Immunglobulin G
Inst.	Institut
IPG	immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
IZKF	Interdisziplinären Zentrum für klinische Forschung
JA	Jasmonat
k	Kilo

## Abkürzungen

---

Kap.	Kapitel
LB Medium	Luria-Bertiani Medium
LH	freie ungesättigte Fettsäure
LOOH	Lipidhydroperoxide
LOX	Lipoxygenasen
M	Marker
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase
Meja	Methyljasmonat
MeOH	Methanol
Meth.-Blau	Methylenblau
MOPS	3 (N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	Messenger RNA
mTP	Mitochondrial targeting peptide
NBT	Nitroblautetrazolium
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pers.	persönlich(e)
Pgt	<i>Puccinia graminis</i> Pers. f. sp. <i>tritici</i>
pH	potentia Hydrogenii
PL	Phospholipasen
POD	Peroxidasen
POX	Peroxygenase
PR- Proteine	pathogenesis related proteines
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
R	Rohextrakt
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RC	reliability class
RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	rounds per minute
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
SA	Salicylsäure
SAR	systemic acquired resistance
SAPS	statistical analysis of protein sequences
SDS	Natriumdodecylsulfat
Spatelssp.	Spatelspitze
SSC	Sodium-Salt-Citrat
<i>Ta</i>	<i>Triticum aestivum</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N',Tetramethyldiamin

## Abkürzungen

---

Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Ube	unbehandelte
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
3' UT	3' untranslatiert
µg	Mikrogramm
vgl.	vergleiche
(v/v)	Volumenanteile
w/v	Gewicht pro Volumen
ZK	Zellkulturen



1

## 2 Einleitung

Getreide nimmt für die Ernährung der Menschheit eine führende Stellung ein, allein die Jahresproduktion von Weizen liegt bei rund 595 Millionen Tonnen.

Ernteverluste durch tierische Schädlinge sowie durch pilzliche und bakterielle Pathogene haben immer wieder zu verheerenden Hungerkatastrophen geführt. Seit dem Beginn der Kultivierung von Nutzpflanzen sind daher Pflanzenkrankheiten und die entsprechenden Schutzmaßnahmen notwendigerweise von hohem Interesse.

Theodor Mommsen z.B. beschreibt in seinem Buch „Römische Geschichte“ (1856), dass schon die Römer „am 25. [April] dem bösen Feinde der Saaten, dem Roste (Robigus: Robigalia) Opfer dargebracht [haben]“. Das dort erwähnte Pathogen, der Weizenschwarzrost (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*), ist immer noch eine der meist gefürchteten Pflanzenkrankheiten, zu deren Verständnis auch die vorliegende Arbeit einen Beitrag leisten möchte.

Allein die Rostpilze verursachen regelmäßig Einbußen von ca. 10% des weltweiten Getreideertrags. Pflanzenschutz hat also bis heute, gerade in Zeiten der Monokultur, nichts von seiner Aktualität verloren. Im Gegenteil, es werden enorme Anstrengungen unternommen, um Nutzpflanzen vor Pathogenbefall zu schützen. Dies erreicht man auf unterschiedliche Weise, durch den Einsatz von chemischen Pflanzenschutzmitteln, aber auch durch die Züchtung resistenter Sorten. Beides birgt Nachteile in sich: der enorme Einsatz von Pflanzenschutzmitteln ist nicht nur teuer und umweltbedenklich, sondern aufgrund der raschen Anpassung der Schaderreger auch häufig im Nutzen eingeschränkt. Ebenso werden die Resistenzen der Züchtungen manchmal relativ schnell wieder gebrochen.

Von Natur aus sind Pflanzen jedoch gegen die meisten potentiellen Pathogene durch wirksame Abwehrstrategien geschützt. Diese natürlichen Schutzmechanismen nimmt der moderne Pflanzenschutz sich zum Vorbild, um in Zukunft effizientere Wege zu beschreiten und so z.B. den Einsatz chemischer Mittel auf ein Minimum zu beschränken.

Die Prozesse auf molekularer Ebene werden daher genau untersucht. Man will verstehen, warum einige Pflanzen gegen bestimmte Pathogene resistent sind, gegen andere wiederum nicht. Wie funktioniert das Erkennen bzw. Nicht-Erkennen von

Pathogenen? Welche Signaltransduktionen sind von Nöten? Wie werden die Angreifer gestoppt oder vielleicht sogar abgetötet? Welche molekularbiologischen Prozesse sind beteiligt? Wieso können Schaderreger diese Mechanismen bei bestimmten Sorten nur schwer durchbrechen? Wieso gelingt es ihnen bei anderen Sorten?

Ein prominentes Beispiel einer stabilen natürlichen Resistenzsituation findet man im Weizen-Weizenschwarzrost-System. Die Weizensorte Prelude *Sr5* ist in der Lage, eine Besiedlung von *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* erfolgreich zu bekämpfen. Obwohl gerade in diesem Fall viele Daten gesammelt und dokumentiert sind, konnte die Komplexität der Abwehrreaktionen nur teilweise erfasst werden. Die vorliegende Arbeit soll versuchen, einen kleinen Ausschnitt dieser komplexen Abläufe auf biochemischer und molekularer Ebene zu untersuchen, um sie besser zu verstehen.

## **1.1 Die pflanzliche Abwehr**

Wie bereits oben angesprochen, sind in den meisten Fällen die pflanzlichen Abwehrreaktionen so effizient, dass potentielle Pathogene keinen Erfolg haben (Isaak 1992; Krautwig and Lorz 1996; Ishida et al. 1997). Es bestehen prinzipiell zwei Abwehrmechanismen bei Pflanzen: die passive und die aktive Abwehr.

Während für die aktive Abwehr die Erkennung des Schädlings unabdingbar ist, geschieht die passive Abwehr ohne Erkennung durch den Wirt. Man spricht in diesem Fall auch von präformierter Abwehr. Hierzu gehören passive mechanische Barrieren (strukturelle Resistenz), wie z.B. Struktur und Anzahl der Stomata oder eine verdickte Kutikula, und die rasche Freisetzung von vorgebildeten bzw. konstitutiv vorhandenen chemischen toxischen Substanzen, wie z.B. Saponine, Phenole bzw. Phenolderivate oder cyanogene Glycoside.

### **2.1.1 Die Nicht-Wirt-Resistenz**

Eine andere Einteilung pflanzlicher Abwehr unterscheidet zwischen Wirt- und Nicht-Wirt-Resistenz. Die Nicht-Wirt-Resistenz zeichnet sich nach gegenwärtigem Verständnis oft durch einen polygenen Charakter aus und kann daher von potentiellen Pathogenen nicht so schnell gebrochen werden. Ein wichtiger Unterschied zur Wirt-Resistenz ist, dass sie nicht auf einzelne Pflanzensorten beschränkt sind, sondern weiter verbreitet wirksam ist und ganze „Pflanzengruppen“ betrifft. Konstitutive

Barrieren (chemischer bzw. physikalischer Art) bilden die erste Abwehrfront (u.a. Heath 2000; Dixon 2001). Dies geschieht unabhängig von der Erkennung des potentiellen Pathogens. Werden diese ersten Barrieren überwunden, ist eine Erkennung eines Pathogens (ähnlich der Unterscheidung zwischen Selbst und Nicht-Selbst beim tierischen Organismus) notwendig (Heath 2001; Mellersh and Heath 2003; Nürnberger and Lipka 2005). Unterschiedliche Signale spielen dabei eine Rolle, wie z.B. mechanische Reize und Elicitoren (endogene und exogene). Letztere werden von einigen Autoren auch als „**Pathogen-associated molecular Patterns**“ (PAMP) bezeichnet (u.a. Nürnberger et al. 2004). Hierzu gehören u.a. Chitine, Invertase,  $\beta$ -Glukane oder Lipopolysaccharide (Zeidler et al. 2004). Über Signalerkennung und die anschließende Signaltransduktion folgen induzierbare Abwehrreaktionen der Nicht-Wirt-Resistenz. Diese Reaktionen sind z.T. relativ unspezifisch und können so eine große Bandbreite möglicher Angreifer erfassen. Stellvertretend für die Vielzahl der Mechanismen sollen hier die Produktion von Phytoalexinen und HR-ähnliche Reaktionen (u.a. Nürnberger and Brunner 2002; Nürnberger and Lipka 2005) genannt werden.

### **2.1.2 Die Wirt-Resistenz**

Die Wirt-Resistenz ist spezifischer als die zuvor beschriebene Nicht-Wirt-Resistenz. Oft ist sie auf einzelne Pflanzensorten beschränkt. Bei der Wirt-Resistenz kann man zwischen horizontaler und vertikaler Resistenz bzw. quantitativer und qualitativer Resistenz unterscheiden:

Die quantitative (horizontale) Resistenz beruht ähnlich der Nicht-Wirt-Resistenz häufig auf dem Zusammenspiel mehrerer Gene (polygen) und ist daher für potentielle Pathogene schwer zu durchbrechen. Diese Form der Resistenz ist nicht auf bestimmte Rassen beschränkt (rassenunspezifisch), aber oft auch nicht vollständig, sie kann z.B. auf ein bestimmtes Organ beschränkt sein. Die genauen Wirkungsmechanismen sind noch unbekannt (Schlösser 1997).

Zur vertikalen (qualitativen) Resistenz gibt es dagegen relativ viele Daten:

Schon in den frühen vierziger Jahren hat Flor (Flor 1942; Flor 1947) aufgrund seiner Arbeiten mit Flachspflanzen und unterschiedlichen Rassen des Rostpilzes

*Melampsora lini* die Basis für die „Gen-für-Gen-Hypothese“ gelegt. Er konnte zeigen, dass spezifische Resistenz in diesem Wirt-Pathogen-System nur dann vorliegt, wenn einem dominanten Resistenzgen R der Wirtspflanze ein dominantes Avirulenzgen A auf Seiten des Pathogens entspricht. In diesem Fall kann keine Infektion stattfinden, d.h. die Wirt-Parasit-Interaktion ist inkompatibel.

Für eine inkompatible Interaktion sind also immer beide dominanten Gene, Avirulenzgen A und Resistenzgen R notwendig. Es ist daher davon auszugehen, dass diese Form der Resistenz das Resultat einer Co-Evolution von Wirtsorten und den entsprechenden Pathogenen ist. Hoher Selektionsdruck führte zur Rassen-Sorten-Spezifität bei der Wirt-Resistenz.

Eine suszeptible (kompatible) Wirt-Parasit-Interaktion findet nach der Gen-für-Gen-Hypothese immer dann statt, wenn andere Genpaarungen als AR gegeben sind (Tabelle 1.1). Kompatibel bedeutet, dass die Infektion erfolgreich ist, die Pflanze ist anfällig.

Die Gen-für-Gen-Hypothese		
Virulenz- oder Avirulenzgene des Pathogens	Resistenz- oder Anfälligkeitgene der Pflanze	
	R	r
A	AR resistent	Ar anfällig
a	aR anfällig	ar anfällig

**Tab. 1.1 Die Gen-für-Gen-Hypothese – vereinfachte Darstellung**

Nur wenn bei einer Wirt-Pathogen-Interaktion ein dominantes Avirulenzgen A auf ein dominantes Resistenzgen R trifft, ist diese Interaktion inkompatibel und die Pflanze somit resistent gegenüber dem Pathogen. Alle anderen Kombinationen führen zu einer kompatiblen Interaktion, d.h. die Pflanze ist diesem Pathogen gegenüber anfällig.

### 2.1.3 Abwehrmechanismen von Pflanzen

Es gibt zahlreiche wirksame Abwehrmechanismen bei Pflanzen. Häufig ist es so, dass das gleiche Abwehr-Programm sowohl bei der kompatiblen als auch bei der inkompatiblen Reaktion abläuft bzw. zumindest gestartet wird. Entscheidend über den

Erfolg ist oft die Schnelligkeit, mit der die Reaktionen anlaufen. Ein Beispiel hierfür ist die frühe Aktivierung der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) sowie anderer wichtiger Enzyme der Ligninbiosynthese bei der Interaktion von Reis mit dem Pilz *Magnaporthe grisea* bei der inkompatiblen Interaktion (u.a. Thieron 1993). Eine absolute Resistenz gibt es, genau wie eine vollständige Suszeptibilität, eher selten (u.a. Agrios 1997), sondern es werden unterschiedliche Resistenzausprägungen beobachtet. Der Score für den Befall (Infektionsklassen) wird makroskopisch bestimmt und reicht von 0 (hochresistent) bis 4 (hoch suszeptibel).

Nachfolgend werden einige nach unserem heutigen Verständnis wesentliche, von Pflanzen genutzte Abwehrmechanismen genannt:

- Zellwandmodifikationen

Die lokale Verstärkung der Zellwand durch Einlagerung von Kallose, Lignin und/oder Glykoproteinen (Collinge and Slusarenko 1987) dient als mechanischer Schutz. Eine besondere Form sind eng begrenzte Zellwandappositionen (Papillen), welche direkt an der Penetrationsstelle des Pathogens (Bestwick et al. 1997) gebildet werden und so ein Fortschreiten der Infektion verlangsamen oder sogar verhindern.

- „Oxidative burst“

Die rasche transiente Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS; „oxidative burst“), wie z.B. von  $H_2O_2$ , Superoxidanionen oder Hydroxylradikalen, gehört zu den frühen Abwehrreaktionen der Pflanzen. Kombrink und Somssich (1995) beschreiben die ROS als „first line of defense“, welche Pathogene entweder direkt abtöten (u.a. reviewed in Baker and Orlandi 1995) oder zumindest die Ausbreitung des Erregers durch rasche Initiierung der Zellwandverstärkung via „oxidative cross linking“ behindern. Den ROS werden sowohl direkte (z.B. toxische), als auch indirekte (z.B. die Aktivierung von Abwehrgenen) Funktionen (Jabs et al. 1997) zugeschrieben. Auch an der an der Signaltransduktionskaskade (u.a. Nürnberger et al. 1994; Nürnberger et al. 1997) pflanzlicher Abwehrreaktionen und bei der induzierten Resistenz (Bi et al. 1995; Neuenschwander et al. 1995) scheinen ROS eine Rolle zu spielen. Eine Beteiligung von ROS an der Hypersensitiven Reaktion (HR) wird ebenfalls von mehreren Autoren propagiert (u.a. Levine et al. 1994; Tenhaken et al. 1995; Lamb and Dixon 1997; Bolwell 1999).

Zur Bildung der ROS werden vermutlich an der Zelloberfläche vorhandene Komponenten aktiviert, es existieren unterschiedliche Hypothesen (Wojtaszek 1997).

Einige Autoren propagieren die Aktivierung des Sauerstoffs durch membrangebundene NADPH-Oxidasen, ähnlich dem „respiratory burst“ bei der Phagozytose im tierischen System (Van Gestelen et al. 1998). Eine andere Hypothese besagt, dass zellwandgebundene Peroxidasen in der Lage sind, eine pH-abhängige Produktion von  $H_2O_2$  zu generieren (Wojtaszek 1997; Scheel 1998).

- Hypersensitiver Zelltod (HR)

Der Hypersensitive Zelltod (= Hypersensitive Reaktion, HR) wird als eine Form des Programmierten Zelltods („Programmed Cell Death“, PCD) angesehen, welcher wenige Minuten nach Pathogenangriff startet (u.a. Greenberg 1996; Hammond-Kosack and Jones 1996; Agrios 1997). An der Infektionsstelle erkennt man, auch mit bloßem Auge sichtbare, eng begrenzte Nekrosen. Auf zellulärer Ebene treten u. a. Membranschädigungen, Lignifizierungen, Dekompartimentierung der Wirtszellen, Induktion von Enzymen, Elektrolytverlust und DNA-Degradierung auf (Collinge and Slusarenko 1987; Dangl et al. 1996).

- Phytoalexine

Phytoalexine sind niedermolekulare Substanzen mit antimikrobieller Wirkung, die bei vielen Pflanzen nahe der Infektionsstelle akkumulieren (Hammond-Kosack and Jones 1996; Rusterucci et al. 1996; Nürnberger et al. 1997). Oft besteht eine Korrelation zwischen der Resistenz einer Pflanze und ihrer Phytoalexinsynthese (Croft et al. 1993; Padmavati and Reddy 1999)

- Pathogenesis Related (PR-)-Proteine

Nach Pathogenbefall akkumulierende Genprodukte, deren Aktivierung kurz nach dem Pathogenkontakt oder Elicitierung nachweisbar ist, werden als „Pathogenesis Related“ (PR-)-Proteine zusammengefasst (Bowles 1990).

PR-Proteine sind induzierbare säurestabile relativ kleine Moleküle von 15 - 40 kDa. Kennzeichnend ist ihre Unempfindlichkeit gegenüber Proteinasen. Auffällig ist zudem, dass der isoelektrische Punkt (pI) dieser Proteine häufig entweder stark basisch oder stark sauer ist (Elstner and Osswald 1996). Zurzeit

sind 17 verschiedene Familien bekannt (Stintzi et al. 1993), wobei die Zuordnung zu den einzelnen Familien auf der Aminosäuresequenz, der biologischen Aktivität und auf serologischen Verwandtheitsgraden beruht. Zu den PR-Proteinen gehören u.a. Chitinasen, Glucanasen, Proteinase-Inhibitoren und Peroxidasen. Von einigen PR-Proteinen ist die Funktion noch unbekannt (Van Loon 1994; Elstner and Osswald 1996; Van Loon 1999).

Obwohl bisher zahlreiche Einzelheiten bezüglich der pflanzlichen Abwehr bekannt sind, bleibt festzuhalten, dass viele Fragen hinsichtlich des Zusammenwirkens der oben aufgeführten Mechanismen noch offen sind.

#### **2.1.4 Die Wirt-Pathogen-Erkennung: Elicitoren**

Für die Einleitung spezifischer Abwehrreaktionen ist das Erkennen des Pathogens durch den Wirt unabdingbar. Dieser Vorgang wird durch das Rezeptor-Elicitor-Modell (Keen 1990) beschrieben. Hiernach erfolgt die Erkennung des Pathogens bei der inkompatiblen Interaktion über die Bindung eines spezifischen Elicitors durch einen Rezeptor des Wirtes (reviewed in Nürnberger 1999).

Es wird häufig postuliert, dass der Elicitor ein direktes Produkt des entsprechenden Avirulenz-Gens auf Seiten des Pathogens ist. Einige bekannte rassenspezifische Elicitoren, wie z.B. die AVR9- und AVR4-Peptide von *Cladosporium fulvum*, einem pilzlichen Schaderreger von Tomaten, entsprechen dieser Hypothese (de Witt et al. 1997; Lauge et al. 2000). Es gibt jedoch auch Elicitoren, die rassenunspezifisch wirken. Der in dieser Arbeit eingesetzte Pgt-Elicitor gehört in diese Klasse. Hierbei handelt es sich um ein ca. 67 kDa großes Glykoproteogalaktan, welches aus den Zellwänden der Keimschläuche des Weizenschwarzrostes (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, Pgt) gewonnen wird (Moerschbacher 1984; Moerschbacher et al. 1986; Moerschbacher et al 1989)

## 2.2 Lipoxygenasen (LOX)

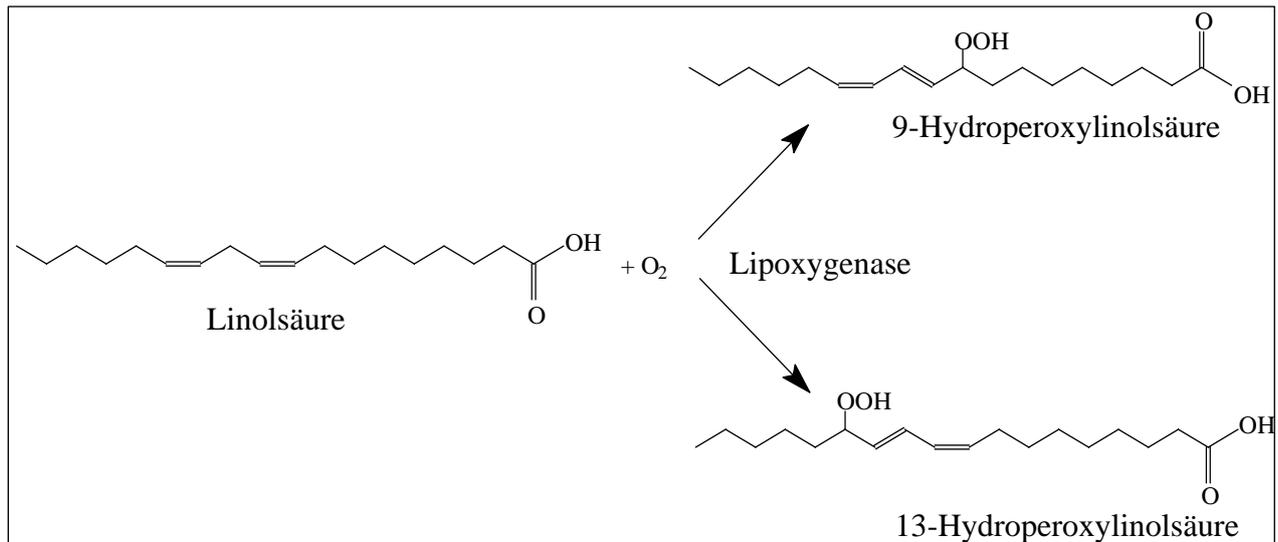
In den zurückliegenden Jahren sind im Kontext mit pflanzlichen Abwehrreaktionen auch Lipoxygenasen in den Blickpunkt geraten (1.2.4). Lipoxygenasen (LOX) sind ubiquitär vorkommende nicht-Häm-Eisen-haltige Dioxygenasen aerober Organismen, welche die Oxygenierung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit cis, cis-1,4-Pentadienstruktur katalysieren (Siedow 1991). Die Reaktionsprodukte der LOX gehören zu den Oxylipinen. Hierzu zählt man alle Oxidationsprodukte von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Grechkin 1998).

Bisher sind die Säuger-LOX am besten charakterisiert. Ihnen dient die in den Membranen vorkommende Arachidonsäure als Substrat. Die Säugeroxylipine werden als Eicosanoide zusammengefasst (vom griechischen *eikosi* = zwanzig). Zu den Eicosanoiden gehören auch die Cyclooxygenase-Produkte Prostaglandine und Thromboxane. Wichtige LOX-Produkte bei Säugern sind die Leukotriene und Lipoxine. (u.a. Blee 2002). Diese übernehmen als schnellwirksame Hormone bioregulatorische Aufgaben. U.a. wird ihnen eine Beteiligung beim programmierten Zelltod (Maccarrone et al. 1996) und bei entzündlichen Prozessen zugeschrieben (Samuelsson et al. 1987).

Die bedeutsame Rolle der LOX und ihrer Produkte beim Säugerstoffwechsel lassen auf eine ähnlich zentrale Stellung der pflanzlichen LOX schließen (Grechkin 1998). Pflanzliche LOX stehen daher schon seit längerer Zeit im Interesse vieler Forschergruppen. Die Pflanzen-LOX sind monomere Proteine von ca. 100 kDa (Siedow 1991). Typischerweise nutzen sie Linol- oder Linolensäure als Substrat. Arachidonsäure wird, obwohl im pflanzlichen Organismus nicht vorhanden, dennoch *in vitro* von pflanzlichen LOX umgesetzt (Rosahl 1996). Freie Fettsäuren sind zwar bevorzugtes Substrat für enzymatische LOX-Aktivität (Siedow 1991), jedoch konnten in einigen Fällen auch membranassoziierte LOX-Spezies detektiert werden, welche in der Lage sind, Membranlipide zu oxidieren (Maccarrone et al. 1994; Regdel et al. 1994; Vorös et al. 1998; Sicilia et al. 2005)

### 1.2.1 Der LOX-Stoffwechselweg bei Pflanzen

Pflanzliche LOX katalysieren die Oxidation von Linolsäure bzw. Linolensäure zu Fettsäurehydroperoxiden an C13- oder an C9-Position. Diese erste Reaktion (Primärreaktion) ist in Abbildung 1.1a beispielhaft für das Substrat Linolsäure dargestellt.

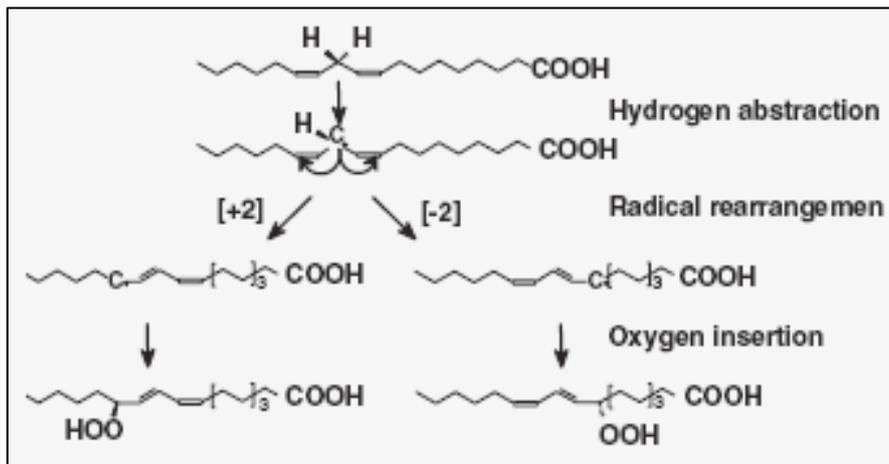


**Abb. 1.1a** Die Primärreaktion von pflanzlichen LOX mit Linolsäure als Substrat (in Anlehnung an Siedow, 1991)

Die in Abbildung 1.1a vereinfacht dargestellte LOX-Reaktion verläuft in vier Schritten (Kühn et al. 1986), eine Darstellung dieser Abläufe bietet Abbildung 1.1b:

1. Entfernung eines Wasserstoffatoms vom doppelt allylen Kohlenstoffatom führt zur Entstehung eines Fettsäureradikals
2. Konjugation der Doppelbindungen mit einer *trans*-Isomerisierung der verschobenen Doppelbindung und gleichzeitigem Rearrangement ungepaarter Elektronen
3. Anlagerung von molekularem Sauerstoff unter Bildung eines Peroxyanions
4. Anlagerung eines Protons an das Peroxyanion, es entsteht eine Hydroperoxyfettsäure

(Die Schritte 3 und 4 finden notwendigerweise nahezu zeitgleich statt.)



**Abb. 1.1b Die Einzelschritte der LOX-Reaktion** (aus Liavonchanka and Feußner 2006)

Die Primärprodukte der LOX-Reaktion können auf vielen unterschiedlichen Wegen (s. Abb. 1.2a und 1.2b) weiter metabolisiert werden, es werden im Allgemeinen vier Hauptreaktionswege genannt (Blee 1998; Feußner and Wasternack 2002):

#### Der Hydroperoxid-Lyase (HPL)-Weg

Die Hydroperoxid-Lyase spaltet die Fettsäurederivate in aliphatische Säuren (Oxosäuren) und Aldehyde. Die Aldehyde wiederum können über Alkoholdehydrogenasen in die entsprechenden Alkohole überführt werden. Flüchtige Verbindungen, die über diesen Weg entstehen, wie z.B. Hexanal, bestimmen das charakteristische Aroma von Früchten oder von frisch gemähtem Gras (Vick and Zimmermann 1987; Gardner 1991).

#### Der Allenoxid-Synthase-(AOS)-Weg

Eines der bekanntesten Reaktionsprodukte dieses Wegs ist die Jasmonsäure. Zunächst werden aus den 13-Hydroperoxyfettsäuren instabile Allenoxide gebildet. Diese reagieren entweder spontan (Hydrolyse) zu  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Ketolen (Gardner 1991) oder durch eine Allenoxidcyclase zu 12-oxo-Phytodiensäure (Hamberg 1998). Diese kann enzymatisch über eine Reduktase reduziert und das Produkt über drei  $\beta$ -Oxidationen zu dem Signalmolekül Jasmonsäure überführt werden (Vick and Zimmermann 1987; Gardner 1991; Blee 1998; Liavonchanka and Feußner 2006).

#### Der Peroxygenase-(POX)-Weg

Hier kommen zwei Enzyme zum Einsatz: eine Peroxygenase und anschließend eine Epoxid-Lyase. Zunächst katalysiert eine Peroxygenase innermolekularen

Sauerstofftransfer zur Bildung von Epoxyalkoholen bzw. intermolekularem Sauerstoff zu Epoxiden. Über eine Epoxid-Lyase findet anschließend eine Hydrierung der entstandenen Epoxide statt (Blee 1996).

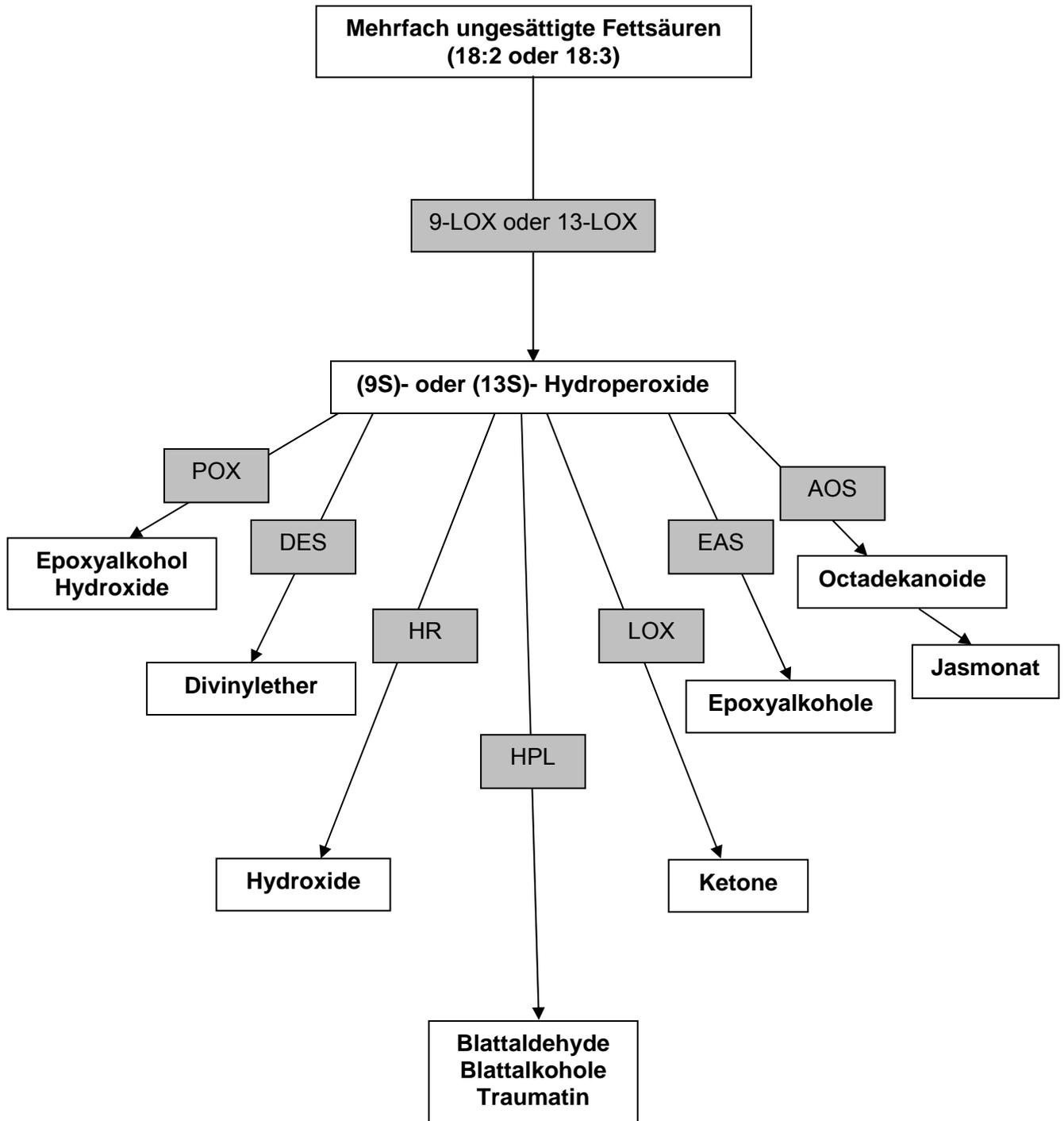
#### Der Divinylether-Synthase-(DES)-Weg

Die bei diesem Weg entstehenden Divinylether (Colnel- oder Colnelensäure) sind relativ instabil (Grechkin 1998).

Weitere Reaktionsmöglichkeiten der Hydroperoxyfettsäuren sind im Folgenden kurz aufgelistet:

- der Reduktase-Weg (HR): Hier findet eine (POX-unabhängige) Reduktion zu den entsprechenden Hydroxyderivaten der Hydroperoxyde statt. Der Mechanismus ist weitgehend ungeklärt (Feußner and Wasternack 2002).
- die Epoxyalkohol-Synthase-Reaktion (EAS): Bisher wurde dieser Weg nur bei Solanaceen beobachtet, Endprodukte sind Epoxyhydroxyfettsäuren (Feußner and Wasternack 1998; Hamberg 1999)
- Unter anaeroben Bedingungen ist zudem eine Lipoxygenase-katalysierte (LOX) Alkoxyradikalbildung möglich, welche sich per Dimerisierung zu Ketodienen rearrangieren können (Kühn et al. 1991).

Die hier vorgestellten LOX-Stoffwechselwege sind in den Abbildungen 1.2a (Übersicht) und 1.2b zu sehen.



**Abb. 1.2a** Übersicht der LOX-Stoffwechselwege bei Pflanzen (in Anlehnung an Feußner and Wasternack 2002)

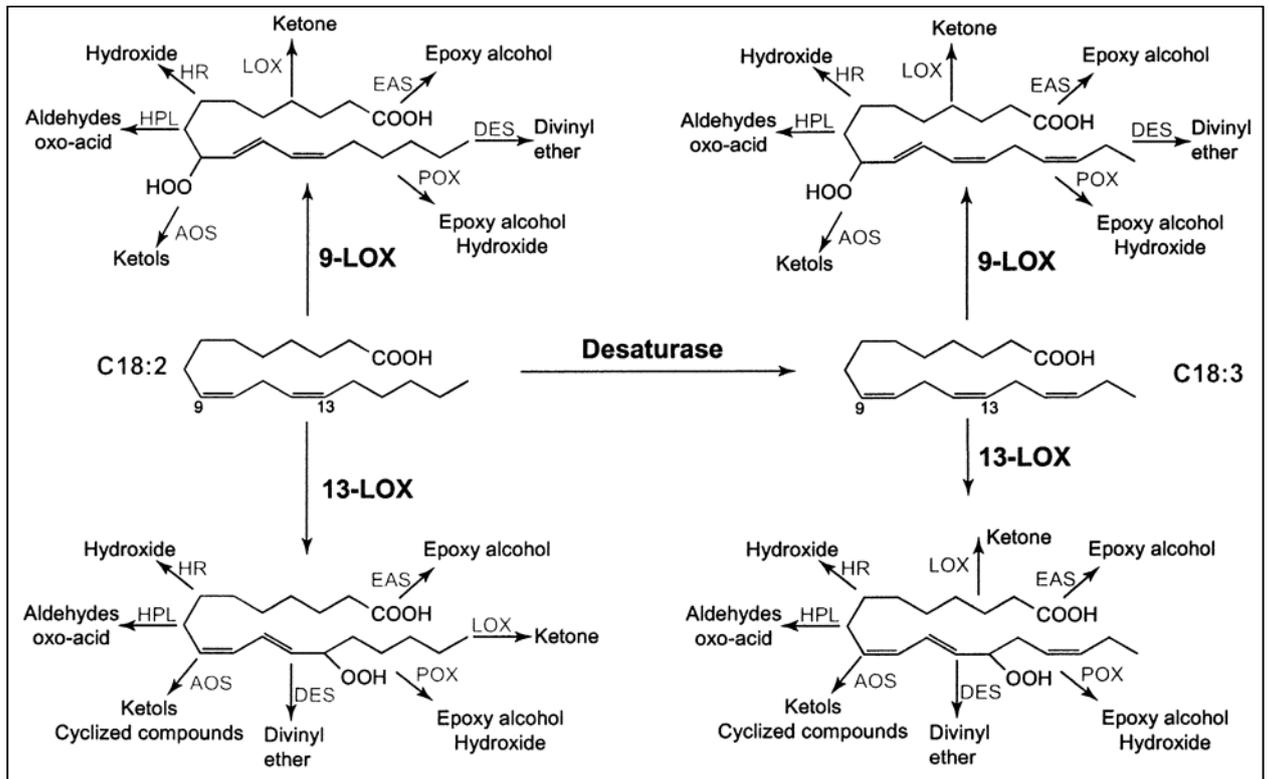
Die Primärprodukte (Hydroxyfettsäure-Derivate = LOOH) der LOX-Reaktion mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren (C18:2 bzw. C18:3) dienen als Substrat für unterschiedliche Stoffwechselwege.

Erläuterungen: (s. folgende Seite)

**Abb. 1.2a** Übersicht der LOX-Stoffwechselwege (Fortführung der Legende)

Erläuterungen:

(LOX): Lipoxygenase; (EAS): Epoxyalkohol-Synthase; (POX): Peroxygenase; (DES): Divinylether-Synthase; (AOS): Allenoxid-Synthase; (HPL): Hydroperoxid-Lyase; (HR): Reduktase



**Abb. 1.2b** Die LOX-Stoffwechselwege ausgehend von Linolsäure (C18:2) bzw. Linolensäure (C18:3) als Substrat (übernommen aus Blee 2002)

Die Primärprodukte sind die entsprechenden 9- bzw. 13-Hydroperoxyfettsäure-Derivate (LOOH).

Erläuterungen:

(LOX): Lipoxygenase; (EAS): Epoxyalkohol-Synthase; (POX): Peroxygenase; (DES): Divinylether-Synthase; (AOS): Allenoxid-Synthase; (HPL): Hydroperoxid-Lyase; (HR): Reduktase

### 1.2.2 Die Klassifizierung pflanzlicher LOX

Die Klassifizierung von Pflanzen-LOX kann nach unterschiedlichen Gesichtspunkten erfolgen. Eine mögliche Einteilung ist die nach den entstehenden Produkten:

Wie in den vorangegangenen Abbildungen dargestellt, katalysieren Pflanzen-LOX die Oxidation von Linolsäure zu zwei unterschiedlichen Primärprodukten, nämlich zur 9-

oder 13-Hydroxylinolsäure. Je nachdem, welche Position bevorzugt von den LOX oxidiert wird, spricht man von 9- bzw. 13-LOX:

- 13-LOX: bevorzugt die Oxidation an der C13-Position
- 9-LOX: bevorzugt die Oxidation an der C9-Position

Eine weitere (ältere) Möglichkeit der Klassifizierung von LOX besteht nach dem pH-Optimum (Siedow 1991; Slusarenko 1996):

- LOX 1 hat ein pH-Optimum um 9,0
- LOX 2 hat ein pH-Optimum um 7,0

In letzter Zeit sind viele LOX-Gene bzw. die entsprechenden Proteine näher untersucht worden. Alleine bei der Kartoffel sind mindestens 14 LOX-Gene bekannt (Liavonchanka and Feußner 2006). Dabei fällt auf, dass eine Klasse von LOX-Enzymen eine hohe Sequenzhomologie aufweist. Diese Enzyme besitzen alle keine Chloroplasten-Transidpeptid-Sequenz (Chloroplasten-Zielsequenz). Es existiert eine weitere Klasse von LOX-Enzymen, die untereinander keine hohe Sequenzhomologie aufweisen, aber alle eine N-terminale Chloroplasten-Transidpeptid-Sequenz für den Transport in die Chloroplasten (Shibata and Axelrod 1995) besitzen. Aufgrund dieser Tatsache wurde eine weitere Nomenklatur eingeführt: die LOX ohne Transidpeptid gehören demnach zum Typ1, die übrigen zum Typ2 (Feußner and Wasternack 2002). Die Einteilung in 9- bzw. 13- LOX wird zusätzlich angewandt. Bisher sind nach dieser Nomenklatur folgende Variationen bekannt:

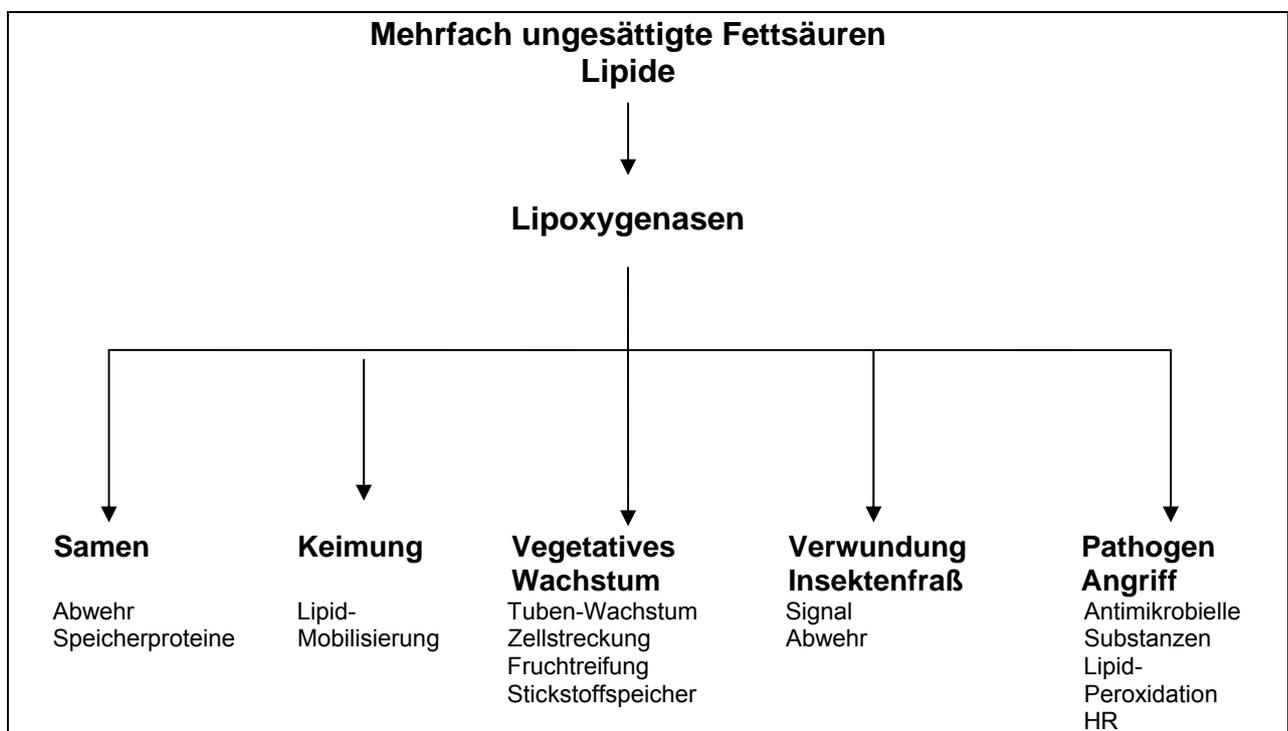
- Typ1 9-LOX            9-LOX ohne Chloroplasten-Transidpeptid-Sequenz
- Typ1 13-LOX        13-LOX ohne Chloroplasten-Transidpeptid-Sequenz
- Typ2 13-LOX:        13-LOX mit Chloroplasten-Transidpeptid-Sequenz

Typ2 9-LOX, also 9-LOX mit Chloroplasten-Transidpeptid-Sequenz, tauchen in dieser Aufzählung (noch) nicht auf, jedoch wurden in Tabak bereits plastidäre 9-LOX beschrieben (Cacas et al. 2005).

### 1.2.3 Die physiologische Bedeutung von Pflanzen-LOX und ihrer Stoffwechselprodukte

Pflanzliche LOX sind an vielen wichtigen Lebensabschnitten, wie Samenkeimung, Wachstum und Entwicklung beteiligt (u.a. Brash 1999; Fischer et al. 1999; He et al. 2002). Man findet sie dementsprechend in unterschiedlichen Organen und Organellen (Feußner and Kindl 1994; Stephenson et al. 1998; Sicilia et al. 2005).

Einen Überblick wichtiger durch LOX beeinflussten Reaktionen geben Abbildung 1.3 und der nachfolgende Text:



**Abb. 1.3 Die Bedeutung von LOX im pflanzlichen Leben.** (nach Porta and Rocha-Sosa 2002)

#### Wachstum und Entwicklung

In jungen, schnell wachsenden Pflanzenteilen, sowie bei der Fruchtreifung (Perez et al. 1999) werden ganz besonders hohe LOX-Enzymaktivitäten gemessen, welche mit zunehmendem Alter wieder abnehmen (Siedow 1991; Rosahl 1996; Porta and Rocha-Sosa 2002).

Die Bedeutung der LOX bei der Samenkeimung konnte noch nicht genau geklärt werden, doch gibt es Hinweise, dass LOX hier als Speicherproteine fungieren könnten (Siedow 1991; Porta and Rocha-Sosa 2002). Außerdem wird diskutiert, dass LOX bei der Zerstörung von Speicherorganellen-Membranen bei der Keimung involviert sind

und so eine Freisetzung von Speicherverbindungen für den Embryo ermöglichen (Rosahl 1996; Matsui et al. 1999).

### Seneszenz

Die Abnahme der LOX-Aktivität mit zunehmendem Alter steht zunächst im Widerspruch zu einer möglichen Funktion von LOX bei der Seneszenz. Während der Seneszenz kommt es zu einem Verlust der Membranintegrität, mit Peroxidation und Freisetzung von Membranlipiden. Die Beteiligung von LOX bei diesen Prozessen konnte im tierischen System nachgewiesen werden (Vericel et al. 1992). Auch bei Pflanzen wird eine LOX-Beteiligung angenommen (Feußner and Wasternack 1998), jedoch wegen dem oben genannten Widerspruch (noch) nicht allgemein akzeptiert (Siedow 1991). Eine Aktivierung von membranassoziierten LOX-Formen, welche bei der Lipidperoxidation eine Rolle spielen könnten, wird jedoch diskutiert. In Tomate (Bowsher 1992; Regdel et al. 1994) und Soja (Maccarrone et al. 1994) wurden bereits membranassoziierte LOX entdeckt.

### Verwundung

Verwundung (unabhängig, ob abiotisch oder durch Insektenbefall hervorgerufen) bedeutet Stress. Als Reaktion werden von Pflanzen viele unterschiedliche Prozesse ausgelöst. Darunter fallen neben den Mechanismen zur Wundheilung die Induktion von Abwehrgenen oder auch die Synthese antimikrobiell wirksamer Moleküle. Einige dieser Substanzen wurden als LOX-Produkte identifiziert (Rosahl 1996; Porta and Rocha-Sosa 2002).

Traumatin bzw. Traumatinsäure sowie Jasmonat sind prominente Vertreter des LOX-Stoffwechsels, deren Gehalt nach Verwundung (Creelman and Mullet 1997; Porta and Rocha-Sosa 2002). Untersuchungen bei Tomaten ergaben Hinweise darauf, dass Jasmonat nach Verwundung oder Herbivorenbefall als systemisches Signal genutzt wird (Wasternack et al. 2006). Relativ rasch werden nach Verwundung auch leicht flüchtige Stoffe des Hydroperoxid-Lyase (HPL)-Weges freigesetzt (Blee 1998; Porta and Rocha-Sosa 2002).

Auch andere Stress-Faktoren, wie z.B. Pathogenbefall (s. 1.2.4) führen zu einer Erhöhung der LOX-Aktivität.

### **1.2.4 Die Funktion von Pflanzen-LOX bei der Pathogenabwehr**

Nach Pathogenbefall erfolgt in vielen Wirt-Pathogen-Systemen eine Erhöhung der LOX-Enzymaktivität und/oder die Induktion von LOX-Genen (u.a. Koch et al. 1992; Rosahl 1996; Veronesi et al. 1996; Bohland et al. 1997; Kolomiets et al. 2000). Im Allgemeinen wird eine raschere und stärkere Aktivierung der LOX bei der inkompatiblen Wirt-Pathogen-Interaktion im Vergleich zur kompatiblen Interaktion beobachtet (Slusarenko et al. 1991; Polkowska-Kowalczyk et al. 2004). Ähnliche Effekte werden auch nach Elicitor-Induktion (Ocampo et al. 1986; Bohland et al. 1997; Veronesi et al. 1999) erreicht.

Die entstehenden LOX-Produkte besitzen Signalfunktionen (Creelman and Mullet 1997) oder auch direkte antimikrobielle Wirkungen (Croft et al. 1993; Weber et al. 1999; Porta and Rocha-Sosa 2002). Interessant ist die Beobachtung erhöhter LOX-Aktivität bei der Hypersensitiven Reaktion (HR) (u.a. Rusterucci et al. 1999; Jalloul et al. 2002; Op den Camp et al. 2003; Kiba et al. 2006). Hier können unterschiedliche LOX und die entsprechenden Stoffwechselprodukte sowohl bei der Induktion, als auch bei der Reaktion selber eine Rolle spielen.

## **2.3 Ziele der Arbeit**

Wie im voran gegangenen Text aufgeführt, sind LOX durch viele äußere Faktoren induzierbar. Auch bei Gramineen (u.a. bei Reis, Weizen und Gerste) wurden induzierbare LOX nach unterschiedlichen Reizen, wie „Wind“ (Mauch et al. 1997), Elicitoreinwirkung oder Pathogenbefall (u.a. Shibata et al. 1994; Feußner et al. 1995; Van Mechelen et al. 1995; Rosahl 1996; Bohland 1997; Bohland et al. 1997; Rouster et al. 1997; Suzuki and Matsukura 1997, Feußner 1998; Feußner and Wasternack 1998; Vorös et al. 1998; Hause et al. 1999; Srivastava et al. 1999; Zabbai et al. 2004) beschrieben.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit induzierbaren Weizen-LOX und schließt an vorangegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe Grambow, RWTH Aachen an. Eine Erhöhung der LOX-Enzym-Aktivität beim Weizen wurde von Ocampo et al. (1986) nach Elicitierung bzw. nach Inokulation mit dem Weizenschwarzrost während der inkompatiblen Reaktion beobachtet.

Bohland (1997) und Loers (1999) haben anschließend verschiedene induzierbare LOX-Enzyme im Weizen beschrieben. Im Mittelpunkt dieser beiden Arbeiten standen biochemische Untersuchungen einer 92 kDa großen 9-LOX (LOX-92), in Weizenblättern induzierbar durch Inokulation mit Sporen des Weizenschwarzrostes (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, Pgt) sowie durch Infiltration des Pgt-Elicitors. In Weizenzellkulturen mit dem Resistenzgen *Sr5* ist dieses LOX-Enzym ebenfalls nachweisbar und zeigt konstitutiv eine hohe spezifische Enzymaktivität. Es gibt aber auch LOX-Enzyme, welche nur in Weizenpflanzen, aber nicht in den Weizenzellkulturen detektiert werden konnten. Hierzu gehört die, wahrscheinlich in den Chloroplasten lokalisierte, LOX-103. Beide LOX-Enzyme, die LOX-92 und die LOX-103 wurden in die vorliegenden Untersuchungen mit einbezogen.

Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden sollte die Charakterisierung von Weizen-LOX fortgeführt werden. Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag wiederum bei der Untersuchung durch Stress induzierbarer Weizen-Lipoxygenasen. Die wichtigsten Ziele können in drei Bereiche unterteilt werden:

- Die Bedeutung der LOX-92 sollte näher untersucht werden:

Spielt diese LOX nur eine Rolle bei der Pathogenabwehr oder ist sie auch an anderen Stressreaktionen beteiligt? Gibt es überhaupt „die LOX-92“, oder verbergen sich darunter unterschiedliche Isoenzyme mit gleicher molekularer Masse? Zunächst wurden Protein- und biochemische Experimente zur Klärung dieser Fragen eingesetzt.

- Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag letztlich bei molekularbiologischen Fragestellungen, wie z.B. Expressionsanalysen. Erschwerend in diesem Kontext war, dass für diese Untersuchungen weder eine vollständige Weizen-LOX-cDNA noch eine spezifische Weizen-LOX-DNA-Sonde zur Verfügung stand. Die Konstruktion einer geeigneten Sonde und die anschließende Klonierung einer induzierbaren Weizen-LOX waren demnach Voraussetzung für weitergehende Analysen.
- Die Sequenzierung und anschließende Expression dieser LOX in *E. coli* sollte als Grundlage für die weitergehende Charakterisierung dieser induzierbaren Weizen-Lipoxygenase dienen:

Letztendlich wurde eine möglichst genaue Klassifizierung (Positionsspezifität, pH-Optimum etc.) angestrebt, um die Zuordnung dieses Enzyms in die bereits vorher beschriebenen Weizen-LOX zu erreichen und so das Bild abzurunden.

Um dies zu erreichen, sollten biochemische und molekularbiologische Erkenntnisse miteinander verbunden werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

Die benutzten Geräte werden größtenteils im Ergebnisteil genannt, die übrigen sind hier aufgeführt. Alle nicht näher bezeichneten Geräte entsprachen dem üblichen Laborstandard.

- **pH-Meter Expandable**  
Ion Analyzer EA 940 Orion Research
- **Elektrophoresenetzgeräte**  
Power Supply PPS 200-1D MWG Biotech  
RM 6 LAUDA Renner
- **Waagen**  
Mettler P160, P 1200 Mettler  
Mettler PC 440 Mettler  
Sartorius 2357 Sartorius  
Sartorius Basic Sartorius
- **Photometer**  
Dioden Array Spectrophotometer Beckman  
Spectrophotometer Modell 24 Beckman
- **Zentrifugen**  
Eppendorf 5417 C Eppendorf  
Eppendorf 4415 C Eppendorf  
Sigma 1K15 Sigma  
Labofuge III Heraeus Christ  
Sorvall RC2-B mit Rotor SS 34 Sorvall  
Beckman J-21 mit Rotor JA-20/JA-14 Beckman  
L5-65B mit Rotor SW 28 Beckman
- **Sauerstoffelektrode**  
Rank Brothers
- **Wachstumsschränke**  
Sanyo MRL.350 Sanyo

- **Thermocycler**  
Peltier Thermal Cyclers PTC-200 Biozym
- **Sterilbank**  
Microflow Stolco Stoltenberg-Lerche & Co  
KG
- **Thermoschüttler**  
Eppendorf 5436 Eppendorf
- **Sonstige**  
Waring Blendor Waring

## 2.2 Kits, Enzyme, Marker und Chemikalien

Alle nicht im Einzelnen genannten Chemikalien, Enzyme wurden in p. a.- Qualität von den Firmen PeqLAP, Erlangen; Promega, Mannheim; Serva, Heidelberg; Boehringer, Mannheim, Mbi Fermentas, St. Leon-Rot; Gibco Brl, Karlsruhe; Merck, Darmstadt; Sigma-Aldrich, Deisenhofen und Fluka, Deisenhofen bezogen.

Die eingesetzten Kits werden im Text beschrieben und sind daher hier nicht im Einzelnen aufgeführt.

- **Ribonuklease A** Boehringer
- **Restriktionsenzyme** Mbi Fermentas  
Promega  
Boehringer  
Roche
- **DNA Polymerasen** Sigma  
Promega  
Mbi Fermentas
- **Protein-Marker**  
SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range, Bio Rad
- **DNA-Marker**  
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Mbi, Fermentas  
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Mbi, Fermentas  
Lambda DNA/*EcoRI* + *HindIII* Marker 3 Mbi, Fermentas

1kb-Ladder

Gibco Brl

• **RNA-Marker**

RNA Ladder; High Range, ready-to-use

Mbi, Fermentas

**2.3 Verbrauchsmaterialien**

• **Centricon-50-Konzentratoren**

Amicon

• **Gel-Blotting-Papier**

Schleicher & Schüll

• **Membranen für O<sub>2</sub>-Elektrode**

Beckman

• **Miracloth**

Calbiochem

• **PD-10-Säulen**

Pharmacia

• **Petrischalen**

Greiner

• **Einmal-Plastikküvetten**

RatioLab

• **Sterilfilter**, Porengröße 0,22 µm; 0,45 µm

Millipore

• **Autoradiographiefilme**, Hyperfilm

Amershan

**2.4 PCR- und Sequenzierungs-Primer**

Name	Sequenz (5' → 3')	Schmelz- Temperatur
P 1	(AG)AA(AG)TT(AGCT)AC(AGCT)GC(AGCT)GC(AG)TG	53,7
P 2	GA(CT)TA(CT)CC(AGCT)TA(CT)GC(AGCT)	45,1
GIPN	AT GCT GTT GGG (GA)AT (GTC)CC	47
HAA	GTN AA(TC) TT(TC) GGN CA(AG) TA	43
DT	TTT TTT TTT TTT TTT TTT T(AGC)	41
HIAAC	AAC AAG AAC AGG TGT GG	50
HICC	CCA CAC CTG TTC TTG TT	50
MIAGT	AGT TCA GTG GCA GAC TGA AG	57,3
MICT	CTT CAG TCT GCC ACT GAA CT	57,3
VOCA	CAC CGG GAT GTT CTT CCG CA	60
AUAP <sup>1)</sup>	GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC	60
AIELS	GCC ATC GAG CT(GC) AGC	53,3
AIELT	GCC ATC GAG CT(GC) ACC	53,3
GER2	CC (CG)AG GTA (AG)AA (AG)TC GTC	58

GER2L	TCC CA(TG) GTA CTC CTC GTC	58
TGAN	ACN GGN GCN AA(TC) AA(AG) AA	54
AP <sup>1)</sup>	GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT T	66,1
VNF	GTG AAC TTC GGG CAG TAC	59,4
FNV	TGG TAC TGC CCG AAG TTC AC	59,4
5'AAP <sup>1)</sup>	GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACGT GCG GGI IGG GII GGG IIG	66,1
3cdna300	CAC CTT CTT CCA CCA CGC CC	63,5
5rcdna340	GAA AAT CGG TCC CTC TCA AG	57,3
5cdna320	CTT GAG AGG GAC CGA TTT TC	57,3
16 rev	GCC CGT TCA TCA TCT TCT C	50,2
22 rev	GAC GGC AGG TAT GAC TTG AC	52,7
11 for	CTA CAT CAT CGC CAC CAA CC	59,4
18 for	TGG AGA AGA TGA TGA ACG GG	57,3
saclI-REV	AAG MAGG TCC TGG ATG TCG TCG	61,8
14-for	CGG GAC GAT GAG ATG AAG AAG	59,8
Sma1rev	CCA CAT CCC GGG AAT GGA GA	61,4
NcoI (for)	CGC CAG CCA TGG TCC ATC TGA	63,7

<sup>1)</sup>Gibco

Tab.2.1 Liste der verwendeten Primer

## 2.5 Vektoren

Für Klonierungen wurden die folgenden Vektoren genutzt:

- **pGEM<sup>®</sup>-T-Easy Vector**, 3015 bp, Promega
- **pBluescript<sup>®</sup> SK+/-**, 2960 bp, Stratagene
- **PIVEX 2.3**, 3530 bp, Roche

## 2.6 cDNA-Bank

Die cDNA-Bank, hergestellt nach Inokulation von Weizenpflanzen (Weizensorte 75141) mit dem Gerstenmehltau (Rasse A6), wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. R. Dudler, (Inst. f. Pflanzenbiologie, Univ. Zürich, Schweiz) zur

Verfügung gestellt.

## 2.7 Bakterienstämme

Es kamen folgende Bakterienstämme zum Einsatz:

- **JM109**  
*endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17* ( $r_K^-$ ,  $m_K^+$ ), *relA1, supE44*,  $\Delta$  (*lac-proAB*), [ $F'$ , *traD36, proAB, lac<sup>f</sup>Z*  $\Delta$ M15)
- **DH5 $\alpha$** <sup>®</sup>  
 $\phi$ 80*dlacZ* $\Delta$ M15, *recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17* ( $r_K^-$ ,  $m_K^-$ ), *sup E44, relA1, deoR*,  $\Delta$  (*lacZYA-argF*)U169
- **XL1-Blue MRF'**  
 $\Delta$ (*mrcA*)183,  $\Delta$ (*mcrCB-hsdSNR-mrr*)173,*endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA69, relA1, lac[F' proAB, lac<sup>f</sup>Z*  $\Delta$ M15,Tn5 (Kan<sup>r</sup>)]
- **XL0LR**  
 $\Delta$ (*mrcA*)183,  $\Delta$ (*mcrCB-hsdSNR-mrr*)173,*endA1, thi-1, recA1, gyrA69, relA1 lac[F' proAB, lac<sup>f</sup>Z*  $\Delta$ M15,Tn10 (TET<sup>r</sup>)] Su<sup>-</sup>,  $\lambda^r$
- **M15 [pREP4]**  
Nal<sup>S</sup>, STr<sup>S</sup>, Rif<sup>S</sup>, Lac<sup>-</sup>, Ara<sup>-</sup>, Gal<sup>-</sup>, Mtl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, RecA<sup>+</sup>, Uvr<sup>+</sup>, Lon<sup>+</sup>
- **SG13009[pREP4]**  
Nal<sup>S</sup>, STr<sup>S</sup>, Rif<sup>S</sup>, Lac<sup>-</sup>, Ara<sup>-</sup>, Gal<sup>-</sup>, Mtl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, RecA<sup>+</sup>, Uvr<sup>+</sup>, Lon<sup>+</sup>

## 2.8 Antikörper

### 2.8.1 Primäre Antikörper

Zum Nachweis von Lipoxygenase-Proteinen (LOX-Proteinen) auf Nitrozellulose bzw. PVDF-Membranen kamen unterschiedliche Anti-LOX-Antikörper zum Einsatz. Anti-Reis-Saat LOX L3- (1 : 5000) Anti-Erbesen-LOX-B (1 : 2500) und Anti-Bohnen-LOX-Antikörper (1 : 2500) wurden freundlicherweise von Dr. D. Shibata (Ibaraki, Japan), Dr. C. Domoney (Norwich, England) und Prof. Dr. A. J. Slusarenko (Aachen) zur Verfügung gestellt.

### 2.8.2 Sekundäre Antikörper und Enzymsubstrate

Mit alkalischer Phosphatase gekoppelte IgG-Antikörper wurden mit einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt. Im Falle des Anti-Bohnen LOX-Antikörpers waren das Anti-Chicken IgG, für die anderen beiden Anti-LOX-Antikörper wurden Anti-Rabbit IgG genutzt. Die Farbreaktion erfolgte nach Zugabe des Substrats BCIP/NBT.

Für Chemilumineszenz-Nachweise wurden dagegen Peroxidase gekoppelte IgG-Antikörper in einer Verdünnung von 1 : 5000 eingesetzt.

### 2.9 Nachweis der Polyhistidin-getaggten LOX-Proteine

Polyhistidin-getaggte Proteine wurden mit dem SuperSignal<sup>®</sup> West HisProbe<sup>™</sup> Kit von Pierce detektiert. Der Nachweis erfolgte nach Herstellerangaben.

### 2.10 Pflanzen

Die nahezu isogenen Weizenlinien *Triticum aestivum* L. Prelude-Sr5 und -srx, die eine ausgeprägte Resistenz bzw. Suszeptibilität gegenüber dem Rostpilz *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (Rasse 32) aufweisen, dienten als Versuchspflanzen. In wenigen Experimenten wurde die ebenfalls resistente Linie Marquis-Sr5 eingesetzt. Das Sr5-Gen ist bei den genannten Linien für die hypersensitive Reaktion verantwortlich. Die anfälligen Pflanzen verfügen nicht über dieses Gen.

Für die Untersuchung einer „touched induced“ LOX kam die Weizensorte 75141, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. F. C. Mauch, Fribourg, zum Einsatz. Alternativ wurde aber auch hier mit Prelude-Sr5 gearbeitet.

Zur Aufzucht wurden die Karyopsen nach einstündigem Quellen und 24stündigem Vorkeimen auf feuchtem Filterpapier bei 20 °C in vorgedüngte und gedämpfte Erde gebracht. Sie wurden bei 60% relativer Luftfeuchte und einer Lichtintensität von 18 klux während 16stündigen Lichtperioden (Langtag) in Phytokammern herangezogen.

Für die unterschiedlichen Behandlungen wurden immer sieben Tage alte Pflanzen eingesetzt.

## 2.11 Zellkulturen

Die von Gotthardt (Gotthardt 1992) etablierten Weizen-Suspensionskulturen des Kultivars Prelude-Sr5 kamen für Zellkulturversuche zum Einsatz.

Der Kulturzeitraum betrug jeweils eine Woche. Danach wurden die Zellkulturen unter sterilen Bedingungen in frisches Medium (modifiziertes M&S Kulturmedium, vgl. Tab. 2.2) überführt, wobei grobe Zellaggregate durch Sieben entfernt wurden. Die genaue Durchführung ist ausführlich beschrieben bei Gotthardt (Gotthardt 1992).

Für Versuche wurden die Zellen nach einem Zeitraum zwischen eins und drei Tagen geerntet, mithilfe von flüssigem N<sub>2</sub> schockgefrostet und bis zur Nutzung bei –80 °C gelagert.

<b>Makro-Nährsalze</b>	<b>mg/l</b>	<b>Spurenelemente</b>	<b>mg/l</b>	<b>Vitamine</b>	<b>mg/l</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	KJ	0,83	Myo-Inosit	100,0
KNO <sub>3</sub>	1900	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20	Nicotinsäure	0,5
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	440	MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	8,45	Pyridoxin-HCl	0,5
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	370	ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	8,60	Thiamin-HCl	0,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,25	Glycin	2,0
		CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,025		
		CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,025		
<b>Komplexe</b>	<b>mg/l</b>	<b>Kohlenhydrate</b>	<b>g/l</b>	<b>Zusätze</b>	<b>mg/l</b>
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	27,8	Maltose	30	Caseinhydrolys at	1000
Na <sub>2</sub> -EDTA x 2 H <sub>2</sub> O	37,3			2,4 D	2
pH-Wert: 5,8 – 6,0 (KOH)					

Tab. 2.2 Zusammensetzung des modifizierten M&S-Mediums für Weizen-Suspensionskulturen (nach Gotthardt 1992)

## 2.12 Weizenschwarzrost

Zur Inokulation von Weizenpflanzen wurden Uredosporen des Rostpilzes *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Eriks. & Henn. Rasse 32 verwendet. Die Rasse 32 enthält die Avirulenzgene P5, P6 und P36 (Tiburzy 1984). Die Uredosporen dienten als Ausgangsmaterial für den Pgt-Elicitor, vermehrt wurden sie auf suszeptilen Weizenpflanzen der Sorte Little Club in einer Phytokammer (Bedingungen s. 2.5). Nach der Ernte können die Sporen bei  $-20/-80$  °C über Monate/Jahre gelagert werden.

### 2.12.1 Inokulation mit dem Weizenschwarzrost

Die Inokulation mit dem Weizenschwarzrost wurde entsprechend der Methode von Moerschbacher et al. (1986) durchgeführt. Dazu brachte man sieben Tage alte Weizenpflanzen in einen Inokulationsraum und befeuchtete sie mittels eines Druckluftzerstäubers gleichmäßig mit Wasser. Nach dem Besprühen der Pflanzen mit einer Uredosporensuspension (240 mg in 15 ml 1,1,2-Trichlorfluorethan, „Freon“, pro 180 Pflanzen) aus einer Entfernung von ca. 30 cm, deckte man die Weizenpflanzen mit einem Polyethylenzelt ab. Um eine nahezu gesättigte Wasserdampfatosphäre zu erhalten, wurde das Zelt von innen kräftig befeuchtet. Kontrollpflanzen erhielten genau die gleiche Behandlung wie die Versuchspflanzen, jedoch fehlten die Sporen im Sprühansatz.

Anschließend stellte man die Pflanzen in die Phytokammer und beließ sie für 16 h im Dunkeln. Während der Dunkelphase keimen die Uredosporen aus und ein großer Teil erreicht die Spaltöffnungen. Dann wurden die Pflanzen wieder dem normalen Licht/Dunkel-Rhythmus von 16/8 h ausgesetzt. Mit dem Einsetzen der Lichtphase und dem damit verbundenen Öffnen der Stomata kann der Rostpilz die Blätter weitgehend gleichmäßig penetrieren. 2 h nach Beginn der Lichtphase wurde das Polyethylenzelt entfernt.

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Primärblätter geerntet (1 - 7 d).

## **2.13 Gerstenmehltau**

Für die Inokulation mit Gerstenmehltau *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* wurde die Rasse A6 eingesetzt. Der Weizen ist nicht anfällig, zeigt nach der Behandlung jedoch erhöhte LOX-Aktivität.

### **2.13.1 Inokulation mit dem Gerstenmehltau**

Die Behandlung fand in einem speziellen Raum statt. Sieben Tage alte Weizenpflanzen wurden zunächst mit Wasser besprüht und dann in ein Inokulationszelt gestellt. Dann wurde ein stark mit Mehltau befallenes Gerstenblatt über den Weizenpflanzen kräftig geschüttelt, so dass eine gleichmäßige Verteilung der Sporen auf den Weizenblättern gewährleistet war.

Schließlich kam eine Haube über die Pflanzentablets. Anschließend wurden die Pflanzen wieder dem normalen Hell/Dunkel-Rhythmus ausgesetzt. Während des Versuchs mussten die Plastikhauben von innen feucht gehalten werden, um dem Pilz optimale Bedingungen zu gewährleisten. Die Kontrollpflanzen wurden ebenso behandelt, bis auf die Inokulation mit den Sporen.

Geerntet wurden wiederum nur die Primärblätter (24 h-6 d).

## **2.14 Induktion einer „touched-induced“ LOX („Windbehandlung“)**

Zur Induktion einer „touched-induced“ Lipoxygenase stellte man einen Ventilator so vor die Pflanzen, dass diese einem heftigen Windzug ausgesetzt waren. Im Gegensatz zu anderen Experimenten konnten für RNA-Extraktionen alle Blätter geerntet werden. Für Proteinextrakte wurden auch hier ausschließlich die Primärblätter verwendet. Probenentnahme erfolgte über einen Zeitraum von 4 h - 7 d.

## **2.15 Applikation von Testlösungen und Elicitoren**

Zur Untersuchung von Methyljasmonat, dem Pgt-Elicitor und Wasser (Kontrollansatz) hinsichtlich ihrer biologischen Wirksamkeit auf Weizenpflanzen wurden die Präparate als wässrige Lösungen mit einer Injektionszange (mechanische Werkstatt, Biologie, RWTH Aachen) über eine Distanz von 7 cm in den Interzellularraum der

Weizenprimärblätter injiziert. Dazu fixierte man das jeweilige Blatt zwischen zwei Silikonpolster am Ende der Injektionszange und infiltrierte die jeweilige Lösung. Das Eindringen der Substanzen konnte durch eine Dunkelfärbung der infiltrierten Blattbereiche verfolgt werden.

Für die BION<sup>®</sup>-Behandlung (Benzothiadiazol, BTH) besprühte man die Pflanzen mit einer 0,01%igen wässrigen Lösung. Kontrollpflanzen wurden mit Wasser besprüht. Für einen Tag mussten die Pflanzen mit einer Haube abgedeckt werden, um ein schnelles Verdunsten der Testlösung zu vermeiden. Geerntet wurde zwischen 3 h und 72 h.

### **2.15.1 Pgt-Elicitor**

Aus den Zellwänden gekeimter Uredosporen des Rostpilzes wurde nach Moerschbacher et al. (1986) eine Elicitor-Rohfraktion gewonnen und freundlicherweise von G.E. Grambow, Aachen, zur Verfügung gestellt. Diese Fraktion wurde mittels Anionenaustausch-Chromatographie (DEAE-Cellulose) gereinigt (Beißmann 1990; Arz 1992). Die genaue Methode ist bei Loers (1999) beschrieben.

Die Konzentration der verwendeten wässrigen Lösung betrug 25 µg/µl. Der Zeitraum für die Probenentnahme lag zwischen 4 h und 48 h nach Injektion.

### **2.15.2 Methyljasmonat**

Die Signalsubstanz Methyljasmonat (Meja) entsteht über den Hydroperoxid-Dehydrogenase-Weg aus dem Lipoxygenase-Primärprodukt 13-Hydroperoxylinolensäure und wird den Phytohormonen zugerechnet. Für die Behandlung von Weizenprimärblättern wurde eine wässrige Lösung (50 µM) von Methyljasmonat hergestellt. Über einen Zeitraum von 4 h bis 24 h nach Infiltration wurden Primärblätter geerntet.

### **2.15.3 BION<sup>®</sup>**

BION<sup>®</sup> (Benzothiadiazol, BHT) ist ein chemischer Induktor von SAR (Systemic Acquired Resistance) und ein Aktivator der Expression von Resistenzgenen bei Pflanzen. Es handelt sich um ein rein synthetisches Produkt, welches in der Natur

nicht vorkommt.

## **2.16 Präparation von Proteinextrakten**

### **2.16.1 Blatt- und Zellkultur-Rohextrakte**

Zwei 7 bzw. 8 cm (Infiltrationsexperimente/alle übrigen Ansätze) lange Primärblattabschnitte wurden mit einer Schablone geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Alternativ wurden 150 mg Weizenzellen vom Kulturmedium getrennt und ebenfalls in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur Nutzung wurden die Proben jeweils bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Aufarbeitung erfolgte in einem vorgekühlten Mörser mit 2 ml kaltem 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer (pH 7,5), 1 mM EDTA, 25 mg Polyclar AT sowie 25 mg Quarzsand. Nach 1minütigem Mörsern wurden die Extrakte 20 min bei 27500 g und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert.

Die Überstände konnten für LOX-Aktivitätsbestimmungen, Proteinbestimmungen und Gelelektrophoresen genutzt werden.

### **2.16.2 Partiiell gereinigte Pflanzen- und Zellkulturextrakte zur Gelelektrophorese**

Die unter Abschnitt 2.16.1 beschriebenen Extrakte konnten sofort mit dem 4fachen Volumen Aceton gefällt, anschließend in 1x SDS-Probenpuffer (s. 2.20) gelöst und zur Denaturierung 2 min bei  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  erhitzt werden.

Zumeist wurden die Rohextrakte jedoch erst, wie bei Loers (1999) beschrieben, über PD10-Säulen von Pharmacia gereinigt. Dann erfolgte die Fällung der Proteine, die Aufnahme in 1x SDS-Probenpuffer und die Denaturierung.

Vor der Fällung wurde jeweils eine Proteinbestimmung durchgeführt, um eine Konzentration von  $1\text{ }\mu\text{g}$  Gesamtprotein/ $\mu\text{l}$  in den Proben herstellen zu können.

### **2.16.3 LOX-Extrakte nach Induktion aus transformierten *E. coli***

Außer aus Weizenblättern und Weizenzellkulturen wurden auch aus transformierten *E.coli*-M15-Kulturen Lipoxygenasen extrahiert.

Die Kulturen wurden bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 3500 rpm für 15 min zentrifugiert. Die erhaltenen Pellets mussten für mindestens 2 h bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren werden. Anschließend

erfolgte die Aufnahme in 4,5 ml Ionenaustauschchromatographie (IAC)-Aufarbeitungspuffer (2.16.5), 55 mg Polyclar AT, 1 mM EDTA und 500 µl Lysozym-Lösung (10 mg/ml). Die Pellets wurden suspendiert und mindestens 30 min auf Eis gelagert.

Mittels Ultraschall auf Eis bei 6x 10 s (10 s Pause zwischen den Durchgängen), einer Leistung von 60 Watt und einer Pulsdauer von 0,5 s wurden die Zellen aufgeschlossen. Hiernach zentrifugierte man die Proben 30 min bei 4 °C und 10000 g. Die erhaltenen Überstände (Ü1) wurden für LOX-Aktivitätsmessungen, Produktanalysen und Gelelektrophoreseneingesetzt.

Die Pellets wurden mit 5 ml eiskaltem IAC-Aufarbeitungspuffer, 60 mg Polyclar AT und 60 mg Quarzsand gemörsert. Wiederum wurde für 30 min, 4 °C und 10000 g zentrifugiert. Die Überstände wurden für LOX-Aktivitätsmessungen und Gelelektrophoresen genutzt.

#### **2.16.4 LOX-Extrakte nach zellfreier Expression mittels „Rapid Translation System RTS 500“ (Roche, Mannheim)**

Alternativ zur Expression in M15 wurde die LOX in einem zellfreien System („Rapid Translation System RTS 500, *E. coli* Circular Template Kit“, Roche Diagnostic GmbH, Mannheim) expremiert. Hierzu konnte der Vektor pIVEX 2.3 mit der cDNA als Insert direkt zur Expression eingesetzt werden.

Das System besteht aus zwei Teilen, dem „RTS 500 Instrument“ -hier kann die Reaktions-Dauer, -Temperatur sowie die Rührergeschwindigkeit eingestellt werden- und einem durch eine semipermeable Membran geteilten Reaktionsgefäß. Das Reaktionsgefäß besteht aus dem „reaction compartment“ mit einem Innenvolumen von ca. 1 ml und dem „feeding compartment“ mit ca. 10 ml Volumen. Zu beiden gehört je ein Magnetprüherstübchen.

Zuerst wurde das „reaction compartment“ mit der nach Herstellerangaben zusammengesetzten Reaktionslösung, inklusive ca. 10 µg der Plasmid-DNA, luftblasenfrei befüllt. Danach kamen 10 ml „feeding solution“ (Zusammensetzung nach Herstellerangaben) in das „feeding compartment“ und das Reaktionsgefäß konnte in das „RTS 500 Instrument“ eingesetzt werden. Dabei war darauf zu achten, dass die Rührerstübchen sich auf dem Boden des jeweiligen Gefäßes befanden. Es wurde über Nacht für 18 Stunden bei 20 °C und 120 rpm gerührt. Die Reaktionslösung

enthält das synthetisierte Enzym in gelöster Form und konnte direkt für Gelelektrophoresen, Enzymaktivitätsbestimmungen und Produktanalysen eingesetzt werden.

Schematisch ist die Funktionsweise des Systems in Abbildung. 2.1 dargestellt.

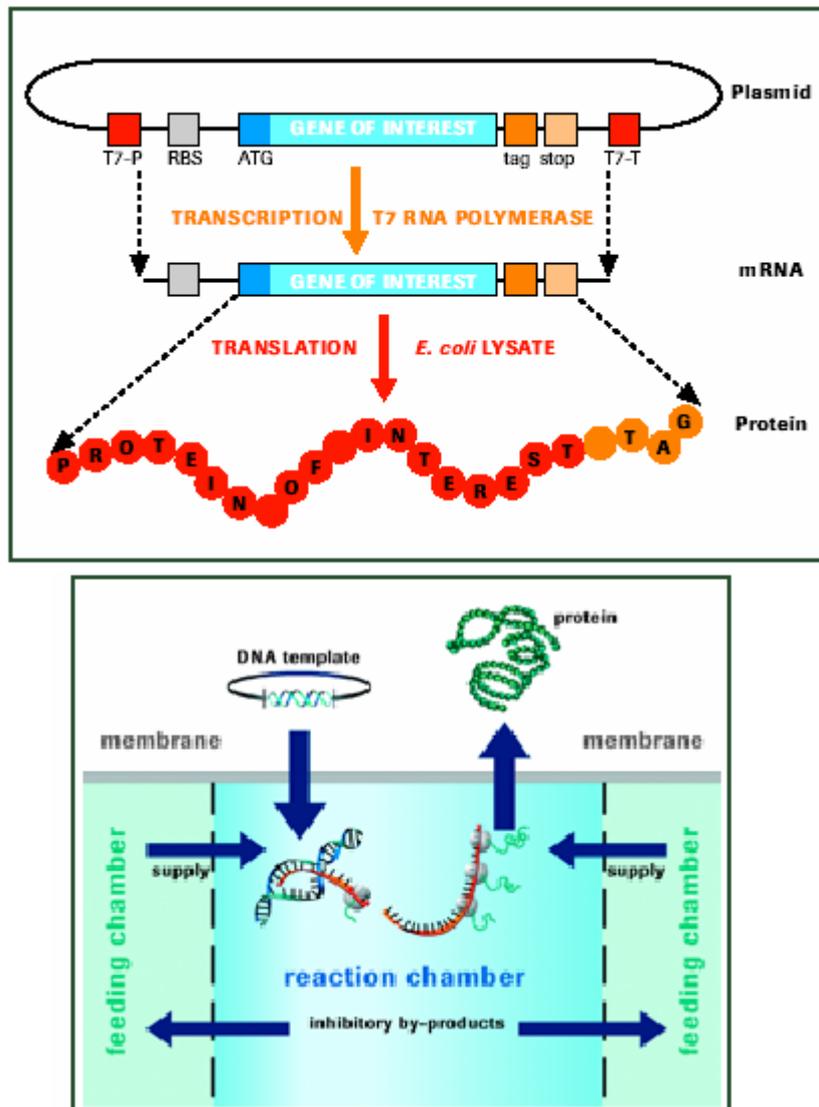


Abb. 2.1 Schematische Darstellung der zellfreien Expression mittels „Rapid Translation System RTS 500“ (Roche, Mannheim; entnommen aus: Overview: The Rapid Translation System RTS, Roche Diagnostics)

### 2.16.5 Ionenaustauschchromatographie (IAC)

Mittels Ionenaustauschchromatographie (IAC) können Makromoleküle aufgrund ihrer Ladung getrennt werden. Die Trennung beruht dabei auf der reversiblen Adsorption der Moleküle an entgegengesetzt geladene Liganden, welche an einer Matrix immobilisiert sind.

Das Verfahren wurde sowohl für LOX aus Weizenpflanzen als auch aus Weizenzellkulturen genutzt:

Hierfür wurden jeweils 45 Primärblattsegmente bzw. 3 g Weizenzellen in einem vorgekühlten Mörser mit 15 ml eiskaltem IAC-Aufarbeitungspuffer (50 mM Natriumphosphat, pH 7,5), 175 mg Polyclar AT und 200 mg Quarzsand 3 min gemörsert. Das erhaltene Homogenisat zentrifugierte man 20 min lang bei 4 °C und 27500 g. Dieser Überstand (Ü1) wurde entsprechend dem Ü1 des LOX-Extrakts aus *E. coli* (s. A.) weiterbehandelt und Ü2 ebenfalls über IAC aufgereinigt.

Das hier verwendete Säulenmaterial (Q Sepharose High Performance) besitzt eine stark quervernetzte Agarose-Matrix (24 µm-Perlen) mit quartären, positiv geladenen Aminogruppen und zeichnet sich durch eine hohe Selektivität und Trennleistung aus.

Eine Leer-Säule (XK 16/20, Pharmacia) wurde den Herstellerangaben entsprechend gepackt, das Säulenbettvolumen betrug 11 ml. Die Chromatographie wurde mit einer Anlage der Firma Pharmacia (Gradifrac™ System mit Pumpe P1, Uvicord SII mit Lampe Typ 1, 2-Kanal-Schreiber LKB, Gradifrac™ Fraktionssammler) genutzt.

Vorbereitung:

Alle verwendeten Puffer wurden filtriert (Filterporengröße 22 µm) und entgast. Vor dem Auftragen der Probe wurde die Säule 45 min bei einer Laufgeschwindigkeit von 1ml/min mit Puffer B (10 mM Natriumphosphat pH 7,5, 1 M NaCl) gespült. Dieser Schritt dient der Regeneration des Säulenmaterials. Anschließend äquilibrierte man die Säule durch 90minütiges Spülen mit Puffer A (10 mM Natriumphosphat, pH 7,5).

Nach dem Spülen der Säule erfolgte die Aufgabe der Protein-Extrakte und die Elution gebundener Proteine mit einem NaCl-Stufengradienten (s. Tabelle 2.3).

Zeit [min]	Puffer A [%]	Puffer B [%]	Probe <sup>1</sup> [%]	Flussrate [ml/min]	Fraktionen [ml]	Erläuterung
0	0	0	100	1	9	Probenaufgabe, Sammeln der nichtbindenden Fraktion
73	0	0	100	1	9	
75	75	0	25	1	9	
90	100	0	0	1	9	
200	100	0	0	1	5	Elution und Sammeln der Fraktionen 1-28
300	75	25	0	1	5	
320	0	100	0	1	5	
330	0	100	0	1	5	
340	100	0	0	1	-	Spülen der Säule
350	100	0	0	1	-	

1) Alternativ musste die Probe wegen technischer Probleme über Kanal B aufgetragen werden.

**Tab. 2.3 Trennprogramm-Anionenaustausch-Chromatographie**

Die LOX-Aktivität und der Proteingehalt der erhaltenen Fraktionen wurde bestimmt. Für Gelelektrophoresen wurden Aliquots (20 - 40 µg) mit 4 Volumen eiskaltem Aceton gefällt, zentrifugiert und in SDS-Probenpuffer gelöst denaturiert.

Die Restvolumina der LOX-aktiven Fraktionen (Fraktionen 7 - 9) konnten jeweils vereinigt und durch Ultrafiltration mit Centricon-50 Konzentratoren (Bohland 1997) aufkonzentriert oder mit vier Volumen eiskaltem Aceton gefällt werden. Die Enzyme lagerte man bei -20 °C. Für Fingerprints, Sequenzierungen oder 2-D-Gelelektrophoresen war eine weitere Konzentrierung der Proteinfractionen notwendig (2.20.1).

Durch 45minütiges Spülen mit Puffer B konnte das Säulenmaterial gleichzeitig von störenden Proteinen, Lipiden etc. befreit und regeneriert werden. Die Lagerung der Säule fand in 20% (v/v) Ethanol statt.

Zusätzlich musste in regelmäßigen Abständen eine Grundreinigung des Materials durchgeführt werden. Es kam hierbei das von Bohland und Balkenhohl entwickelte Verfahren (1997) zum Einsatz.

## 2.17 LOX-Enzymaktivitätsbestimmungen

Die Lipoxygenase (LOX)-Aktivität wurde sowohl photometrisch als auch

polarographisch bestimmt.

### **2.17.1 Photometrische Enzymaktivitäts-Messung**

Während der LOX-Reaktion kommt es zur Extinktionsänderung bei 234 nm aufgrund des entstehenden Systems von konjugierten Doppelbindungen der Fettsäurehydroperoxide. Diese Extinktionsänderung lässt sich photometrisch feststellen. Zur Berechnung der enzymatischen Aktivität nutzt man den Extinktionskoeffizient des Hydroperoxids mit  $\epsilon = 2,5 \times 10^7 \text{ cm}^2/\text{mol}$  (Kühn et al. 1985). Die Messungen der unterschiedlichen LOX-Extrakte fanden in Halbmikro-Quarzküvetten mit einem Spektralphotometer bei 30 °C statt. Dazu wurden 5 - 100 µl Extrakt mit 1 ml 0,1 M Citratphosphat-Puffer (pH 6,2) gemischt, die Reaktion durch die Zugabe von 100 µl Substrat (2,5 mM Linolsäure; 0,15% (v/v) Tween 20; pH 9,0) gestartet und über einen Zeitraum von 10 min verfolgt. Ansätze ohne Enzym dienten als Kontrolle.

### **2.17.2 Polarographische Enzymaktivitäts-Messung**

Um Fehlinterpretationen bei den gemessenen Extinktionsänderungen auszuschließen, sind teilweise (vor allem bei der in *E. coli* exprimierten LOX) Kontrollmessungen mit der O<sub>2</sub>-Elektrode durchgeführt worden. Dazu wurden 20 – 100 µl des Enzymextrakts mit luftgesättigtem Messpuffer und 100 µl Substratlösung (250 µl Linolsäurelösung) in einem Gesamtvolumen von 1 ml bei 30 °C inkubiert. Als Kontrollen dienen Blindmessungen bzw. die Extrakte von nicht transformierten *E. coli*-M15-Bakterien. Da bei der Lipoxygenase-katalysierten Fettsäureoxidation molekularer Sauerstoff in das Substrat eingebaut wird, kann als Maß für die Enzymaktivität die Sauerstoffabnahme genommen werden und mittels O<sub>2</sub>-Elektrode verfolgt werden. Der Aufbau wurde ausführlich bei Bohland (1997) erklärt. Mit einem 2-Kanalschreiber (Pharmacia) wurde der O<sub>2</sub>-Verbrauch beobachtet. Die Messung erfolgte wie bei Loers (1999) beschrieben.

### **2.17.3 Bestimmung des pH-Optimums**

Das pH-Optimum rekombinanter LOX-Enzyme wurde mit Hilfe photometrischer LOX-

Enzymaktivitätsbestimmungen bestimmt. (Die genaue Durchführung ist unter 3.3.3 beschrieben.)

## **2.18 Proteinbestimmungen**

Die meisten Proteinbestimmungen wurden mit dem Coomassie-Test durchgeführt, nur in Ausnahmefällen kam der BCA-Test zum Einsatz.

### **Coomassie-Test**

Dieser Test wurde in einer leicht modifizierten Form (Scopes 1988) durchgeführt. Die Coomassie-Lösung (0,06% Coomassie Brilliant Blue G-250 in 2% Perchlorsäure) wurde wie bei Bohland (1997) beschrieben angesetzt.

Ein Messansatz, bestehend aus 500 µl mit H<sub>2</sub>O verdünnter Probe – es wurden Verdünnungen von 1:1 bis 1:500 gemessen – und 500 µl Coomassie-Lösung, wurde in einer Einmal-Plastikküvette gemischt. Nach 10 min bei RT war die Farbreaktion abgeschlossen, der gebildete Farbkomplex blieb für eine Stunde stabil. Bei 595 nm erfolgte die Messung der Ansätze. Als Bezug diente eine BSA-Eichreihe von 0 – 14 µg Protein.

### **BCA-Test**

Die Bestimmung wurde gemäß den Herstellerangaben (BCA\* Protein Assay, Pierce) durchgeführt. Bezugsbasis war hier eine BSA-Eichreihe von 0 – 800 µg Protein/ml.

## **2.19 Isolierung von Chloroplasten**

Um die genaue Lokalisation der Lipoxygenasen zu bestimmen, wurden Plastiden isoliert und über SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die SDS-Gele geblottet und mit dem LOX-Antikörper untersucht.

Für die Präparation von Chloroplasten aus Weizen-Primärblättern wurden 7 Tage alte Pflanzen eingesetzt. Zur Induktion der LOX wurden sie wie unter 2.12, 2.13, 2.14 und 2.15 beschrieben behandelt und nach 24 h unter Standardbedingungen weitere 24 h im Dunkeln inkubiert. Damit wurde eine Verringerung der Stärkeakkumulation erreicht und somit die Beschädigung der Plastiden während der Zentrifugation durch Stärkekörner vermindert.

Die Isolation der Chloroplasten wurde wie bei Bohland (1997) und Furken (1999) beschrieben durchgeführt.

## **2.20 Gelelektrophoresen von Proteinen**

Die weitere Auftrennung der unterschiedlich aufgereinigten Proteinfractionen gelang mithilfe von Gelelektrophoresen. Vor der Elektrophorese war in den meisten Fällen eine zusätzliche Konzentrierung notwendig. Ein Teil der Proben wurde hierfür mit vier Volumenanteilen Aceton gefällt, meist wurden die Proteine jedoch mittels Centricon-50 Konzentratoren angereichert. Diese Methode ist besonders schonend, gleichzeitig wird ein Teil der kleineren Moleküle abgetrennt. Jedoch kommt es immer auch zu irreversiblen Bindungen der LOX-Proteine an die Membran. Diese unerwünschten Phänomene werden bei zunehmender Aufkonzentrierung verstärkt, so dass diese Methode schnell an ihre Grenzen stößt. Für einige Folgeexperimente, wie z. B. Sequenzierungen (2.23) war jedoch eine besonders hohe Konzentration nötig. Dies wurde mit den in 2.20.1 beschriebenen Methoden erreicht.

### **2.20.1 Weitere Anreicherung von LOX-Proteinen**

Neben den bereits beschriebenen, kamen zwei weitere Verfahren zum Einsatz. Ausgangsmaterial waren jeweils die aktiven LOX-IAC-Fractionen nach Ultrafiltration mit Centricon-50 Konzentratoren.

#### A. Anreicherung nach SDS-PAGE und Elektroelution

Diese Methode wurde eingesetzt, wenn die LOX-Proteine anschließend sequenziert werden sollten. Die Proteinlösung wurde mit der entsprechenden Menge 2x Probenpuffer versetzt, kurz aufgekocht, in die vorbereiteten Taschen eines 1,5 mm dicken SDS-Gels (7,5 %) gebracht und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Lauf wurden die Proteine mittels einer Negativ-Färbung sichtbar gemacht (2.20.5.2) und die zu untersuchenden Banden isoliert. Diese wurden gesammelt, bei 4 °C gelagert, um später mithilfe einer Elektroelution vereinigt und wieder in Lösung gebracht zu werden. Die Proteine wurden gefällt und wiederum einer SDS-PAGE unterworfen. Anschließend erfolgte der Transfer auf eine PVDF-Membran und die Anfärbung mit Amidoschwarz. Die LOX-Bande wurde ausgeschnitten und zur Sequenzierung

genutzt.

Für die Elektroelution wurde eine umgebaute horizontale Elektrophoresekammer (mechanische Werkstatt, Biologie, RWTH Aachen) genutzt. Diese Kammer ist in der Mitte durch eine Trennscheibe aus Plexiglas in zwei Hälften geteilt. Darauf kam ein Sammelgefäß, welches aus zwei unterschiedlich großen Auffangbehältern besteht. Diese Behälter besitzen auf der Unterseite eine Öffnung, oben sind sie über eine Art „Brücke“ miteinander verbunden. Das Sammelgefäß wurde so auf die Trennscheibe gelegt, dass die unteren Öffnungen in den Puffer hineinragten. Zuvor wurden diese mit einer Dialysemembran (Dialysis Tubing – Visking, Size 3 Inf Dia 20/32; Medicell) verschlossen, um die eluierten Proteine aufzufangen.

Die Elektrophoresekammer wurde mit soviel SDS-Laufpuffer befüllt, dass die „Brücken“ der Sammelgefäße gerade mit Puffer bedeckt waren. Die ausgeschnittenen Gelstückchen kamen auf diese Stege und durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wanderten die negativ geladenen Proteine aus den Gelstücken Richtung Anode. Dabei positionierte man die Sammelgefäße so, dass die kleinere Öffnung Richtung Anode zeigte und die Proteine sich an der Dialysemembran sammeln konnten. Die Elution fand bei 200 V für 1 h statt. Dann wurde kurz umgepolt, damit sich die eluierten Moleküle von der Membran lösten. Die Proteine wurden in ein 2 ml Eppendorfgefäß gegeben und mit Aceton gefällt.

#### B. Anreicherung durch die Kombination von Ultrafiltration und Fällung

Das oben genannte Verfahren war sehr aufwendig und führte zu Degradationsprodukten. Als Alternative wurde hier nach der Konzentrierung durch die Centricon-50-Konzentratoren eine Fällung der Proteine durchgeführt. Die Kombination dieser Methoden ermöglichte es, das Probenvolumen erheblich zu verringern ohne nennenswerte Verluste an Proteinmaterial.

Nach der Fällung wurden die Proteine über eine SDS-PAGE aufgetrennt, reversibel gefärbt und auf PVDF-Membranen geblottet. Anschließend wurde wie unter Punkt A verfahren.

Alternativ konnte auch die LOX-Bande direkt aus dem Gel ausgeschnitten und zur Sequenzierung eingereicht werden. Diese Gelstückchen wurden auch für das Fingerprinting (2.20.4) verwendet.

### **2.20.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Es wurde in Anlehnung an die Methode nach Lämmli (1970) verfahren.

Da Lipoxygenasen normalerweise ein Molekulargewicht zwischen 80 und 100 kDa aufweisen, wurden meist Trenngele mit einer Gesamtmonomerkonzentration von 7,5% genutzt. In einzelnen Versuchen kamen auch höher konzentrierte Gele zum Einsatz.

#### A. Minislab-Gele

Für die Standard-Untersuchungen wurden Minislab-Gele (Mighty Small™II Slab Gel, Hoefer) von 0,75 – 1,5 mm Dicke genutzt.

Die Zusammensetzung für jeweils zwei 1 mm dicke Gele (Trenn- und Sammelgel) ist in Tabelle 2.4 dargestellt, für andere Gel-Größen wurden die Mengen entsprechend angepasst.

Zuerst wurde das Trenngel gegossen. Die benötigte Menge Wasser, Acrylamidlösung und Puffer wurden zusammengegeben, für 5 min entgast, danach fügte man SDS, TEMED (Katalysator) und APS (Ammoniumpersulfat, Radikalbildner) hinzu, mischte kurz und pipettierte die fertige Gellösung in die vorbereiteten Gelkammern. Nach der Überschichtung mit Wasser blieben die Gele bis zur vollständigen Polymerisation für ca. 30 min stehen. Danach wurde das Wasser abgenommen, die mit APS und TEMED versetzte Sammelgellösung auf das Trenngel gegeben und zur Ausbildung von Probestaschen ein Kamm mit 10 bzw. 15 Zähnen eingesteckt.

Nach wiederum ca. 30 min war das Sammelgel auspolymerisiert, das Gel konnte sofort genutzt oder feucht eingeschlagen bei 4 °C bis zu 10 Tagen gelagert werden.

	<b>Sammelgel</b>	<b>Trenngel</b>	<b>Trenngel</b>	<b>Trenngel</b>
	<b>4,5%</b>	<b>7,5%</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>
Sammelgelpuffer (0,5 M Tris/HCl pH 6,8)	1,5 ml	-	-	-
Trenngelpuffer (1,5M Tris/HCl pH 8,8)	-	3,0 ml	3 ml	3,0 ml
30,8%Acrylamid/Bisacrylamid (ROTH)	804 µl	3,0 ml	4,05 ml	4,8 ml
A. reinst	3,6 ml	5,8 ml	5,95 ml	4,2 ml
SDS (10%, w/v)	60 µl	120 µl	120 µl	120ml
TEMED	6 µl	12 µl	12 µl	12 µl
APS (10%, w/v)	60 µl	60 µl	60µl	60 µl
Bromphenolblau, gesättigte Lösung	10 µl	-	-	-

**Tab. 2.4**      **Zusammensetzung von SDS-Polyacrylamid-Gelen** (Die angegebene Menge reicht jeweils für 2 Gele von 1 mm Dicke)

Die Proben wurden vor dem Auftragen in Probenpuffer gelöst, durch 2minütiges Erhitzen auf 95 °C denaturiert, sofort in die vorbereiteten Geltaschen einpipettiert oder bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert. Zur Größenorientierung kamen unterschiedliche Protein-Marker (2.2) zum Einsatz.

Bei 200 V, 6 °C bzw. RT wurden die Elektrophoresen in SDS-Laufpuffer (0,025 M Tris, pH 8,3; 0,192 M Glycin; 0,1% SDS, w/v) durchgeführt. Die Dauer betrug ca. 75 min (bis der Blaumarker Bromphenolblau die untere Gelkante erreichte).

Die aufgetrennten Proteine wurden entweder im Gel angefärbt oder auf Nitrocellulose- bzw. PVDF-Membranen geblottet. Nach dem Blot wurde meist eine Immunodetektion durchgeführt, in Ausnahmefällen wurden die Blots auch mit Amidoschwarz gefärbt.

- **1x SDS-Probenpuffer**

- |             |                                     |
|-------------|-------------------------------------|
| 62,5 mM     | Tris/HCl, pH 6,8                    |
| 2% (w/v)    | SDS                                 |
| 10% (w/v)   | Glycerin                            |
| 5% (v/v)    | Mercaptoethanol                     |
| 1 Spatelsp. | Bromphenolblau (pro 1 ml 1x Puffer) |

- **SDS-Laufpuffer** (Lämmli-Puffer)

0,025 M                      Tris, pH 8,3

0,192 M                      Glycin

0,1% (w/v)                      SDS

### 2.20.3 2-D-Elektrophorese

Diese Methode dient vor allem der „Proteomanalyse“. Als Proteom bezeichnet man die Gesamtheit aller Proteine, die zu einem bestimmten Zeitpunkt vom Genom einer Zelle oder eines Organismus exprimiert werden (Wilkins and Williams 1997b). Das Proteom ist somit nicht statisch, sondern verhält sich im Gegensatz zum Genom äußerst flexibel. Proteomanalysen sind daher als wichtige Ergänzung zu Genomanalysen anzusehen.

Auch wenn, wie hier, nur ein Teil des Proteoms untersucht werden soll, leistet die 2-D-Elektrophorese gute Dienste, da Proteine gleicher Größe aber unterschiedlicher Ladung, auch Isoenzyme, differenziert werden können. Die Auftrennung erfolgt nach zwei Kriterien, dem isoelektrischen Punkt und der Molekülgröße. Die Trennleistung ist daher um ein Vielfaches höher als bei eindimensionalen Verfahren.

Sämtliche Apparaturen und Geräte für die 2-D-Elektrophorese waren von der Firma Bio-Rad und wurden freundlicherweise vom Interdisziplinären Zentrum für klinische Forschung (IZKF) Biomaterialien und Material-Gewebesinteraktion bei Implantaten (BIOMAT, Aachen, Universitäts-Klinikum) zur Verfügung gestellt.

#### A. Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung

Hier wurde mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG) gearbeitet. Dabei ist der pH-Gradient fester Bestandteil des Gels, er unterscheidet sich daher grundsätzlich von mit Trägerampholyten erzeugten Gelgradienten. Die genutzten Gele sind als Gel-Streifen auf einer Trägerfolie stabilisiert in unterschiedlichen Größen und pH-Bereichen fertig erhältlich. Hier wurden IPG- Strips der Firma Bio-Rad (IPG-Ready Strips, 17 cm, pH 4 - 7) verwendet.

Für die Versuche wurden die aktiven, durch Ultrafiltration konzentrierten IAC-Fraktionen (2.16.5) eingesetzt. Unmittelbar vor dem Lauf wurden diese in Rehydrierungspuffer gelöst. Dabei durfte das Gesamtvolumen 600 µl (optimal ist ein Volumen von 300 - 450 µl für 17 cm lange Strips) nicht überschreiten.

Es wurde folgendermaßen vorgegangen:

Als erstes pipettierte man die in Rehydrierungspuffer gelöste Probe in die Mitte des Gelträgers (PROTEAN® IEF-Cell, Bio-Rad). Danach wurde die Schutzfolie des Gel-Streifens abgezogen und der IPG-Strip mit der Gelseite nach unten von der Mitte her vorsichtig in den Gelträger abgerollt. Die Probenlösung verteilte sich so gleichmäßig und luftblasenfrei über das gesamte Gel. Man überschichtete es mit Mineralöl und schloss den Gelträger an die Elektrophorese-Apparatur an. Es können gleichzeitig bis zu zwölf 17 cm lange IPG-Steifen prozessiert werden. Die Elektrophorese lief nach dem aus Tabelle 2.5 ersichtlichen Programm ab.

Schritt	Spannung	Dauer	Temperatur	Erläuterungen
1	0 V	12 h	20 °C	Rehydrierung mit gleichzeitiger Probenaufgabe
2	150 V	45 min	20 °C	Entsalzen
3	500 V	1 h	20 °C	Konditionierung
4	1000 V	1 h	20 °C	Dieser Schritt dient der Erhöhung der Spannung vor der Fokussierung
5	8000 V	6 h	20 °C	Fokussierung
6	500 V	∞	20 °C	Ende, hier kann jederzeit unterbrochen werden.

**Tab. 2.5** Elektrophoreseprogramm für die Isoelektrische Fokussierung

- **Rehydrierungspuffer**

- 8 M Harnstoff
- 4% (w/v) CHAPS
- 10 mM DTT
- 0,2% (w/v) Ampholyte (Bio-Lyte 3/10, BioRad)
- 1 Spatelsp. Bromphenolbau (pro 25 ml Puffer)

Nach dem Lauf konnten die IPG-Strips bei –80 °C (bis zu 6 Monaten) gelagert oder sofort für die zweite Dimension verwendet werden.

B. Zweite Dimension: SDS-PAGE

Die zweite Dimension wurde als vertikale SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (12%ig) durchgeführt. Im Unterschied zur herkömmlichen SDS-PAGE wird kein Sammelgel

benötigt. Die zuvor äquilibrierten IPG-Streifen werden mittels heißer Agarose auf dem SDS-Gel fixiert, daneben der Marker mit einem Filterpapierstreifen, falls gewünscht.

Es wurde die Bio-Rad PROTEAN® II Elektrophoresekammer für SDS-Gele im Großformat (inkl. „IPG-conversion kit“) benutzt. Zuerst mussten die fokussierten Proteine mit SDS beladen werden. Dazu wurden der IPG-Strip 2 x 10 min in Äquilibrationpuffer geschüttelt (s. u.).

In der Zwischenzeit stellte man das SDS-Gel fertig (Zusammensetzung für 2 Gele s. Tab. 2.5). Es war darauf zu achten, dass für die Aufnahme des Strips, über der Geloberkante ein ca. 1 cm breiter Bereich frei blieb. Damit eine glatte horizontale Auflagefläche vorhanden war, musste das SDS-Gel bis zum Gebrauch mit wassergesättigtem 2-Butanol überschichtet werden. Zur Entfernung des 2-Butanols wurde mehrmals mit SDS-Laufpuffer gespült.

Nach den Äquilibrationsschritten ließ man überschüssigen Puffer von dem IPG-Strip abtropfen und tauchte es kurz in Lämmli-Puffer. Sodann wurde es mit zwei Pinzetten luftblasenfrei auf das SDS-Gel gelegt und mit heißer Agarose [0,5% (w/v) in Lämmli-Puffer] fixiert. (Bei Bedarf wurde ein Marker mit Hilfe eines speziellen Filterpapierstreifens neben dem Gel platziert.) Nach dem Erstarren der Agarose konnte das SDS-Gel in die Elektrophorese-Apparatur eingesetzt und der Lauf gestartet werden. Pro Gel wurde für 20 min eine Stromstärke von 20 mA und anschließend von 30 mA eingestellt. Die Trennung wurde solange fortgesetzt, bis die Bromphenolblaufront das Ende des Trenngels erreichte, was nach ca. 5 - 6 h der Fall war. Im Anschluss wurden die Gele gefärbt oder geblottet.

#### Äquilibration der IPG-Streifen

Die IPG-Streifen wurden 2 x 10 min in 10 ml Äquilibrationlösung geschüttelt. Die Lösung des ersten Äquilibrationsschritts enthielt zusätzlich 2% DTT (frisch zugefügt), die des zweiten Schritts 2,5% (w/v) Iodoacetamid, um Streifenbildung nach der Silberfärbung zu vermeiden.

- **Äquilibrationlösung**

0,375 M	Tris/HCl, pH 8,8
6 M	Harnstoff
2% (w/v)	SDS
20% (v/v)	Glycerol
1 Spatelsp.	Bromphenolblau (pro 25 ml)

	Trenngel 10%	Trenngel 12%
Trenngelpuffer (1,5M Tris/HCl pH 8,8)	20 ml	20 ml
30,8% Acrylamid/Bisacrylamid	26,64 ml	33,4 ml
A. reinst	32,16 ml	25,4 ml
SDS (10%, w/v)	800 µl	800 µl
TEMED	50 µl	50 µl
APS (10%, w/v)	400 µl	400 µl

**Tab. 2.6**      **Zusammensetzung von SDS-Gelen für die 2-D-Elektrophorese**  
 Die Menge ist ausreichend für zwei Gele (Bio-Rad Protean® II Zelle)

#### 2.20.4 Protein-Fingerprints

Hierbei handelt es sich um eine andere Form der 2-D-Elektrophorese. Zuerst findet eine SDS-PAGE statt. Im Anschluss müssen die aufgetrennten Proteine mittels einer reversiblen Färbung sichtbar gemacht werden. Die entsprechende Bande wird ausgeschnitten, entfärbt und das Gelstückchen auf ein zweites dickeres SDS-Gel in vorbereitete Taschen gegeben. (Wegen der entstandenen Fragmente muss für die zweite Dimension ein höher konzentriertes Gel genutzt werden.) Dazu werden geeignete Proteasen pipettiert.

Nachdem die Proben ins Sammelgel (das Sammelgel sollte etwas länger als normal sein) eingelaufen sind, wird der Lauf für die Dauer des Verdau (15 min – 1 h) unterbrochen. Zum Schluss werden die Gele gefärbt. Anhand des sich bildenden Fragmentmusters (Fingerprint) lassen sich Proteine gleicher Größe unterscheiden.

Hier kam das „Protein Fingerprinting System“ von Promega zur Anwendung. Um genügend Ausgangsmaterial (LOX-Protein) zur Verfügung zu haben, wurde zunächst eine Anreicherung (2.20.1B) vorgenommen. (Ansonsten wären nach dem Verdau die kleineren Fragmente nicht mehr sichtbar gewesen.)

Nach der ersten Dimension (1 mm dicke Mini-Slap-Gele, 7,5%) erfolgte die (reversible) Negativ-Färbung mit Zink-Imidazol (2.20.5.2) und das Ausschneiden der Banden. Danach wurden die Proteine mittels SDS-Laufpuffer wieder mobilisiert. Die Gelstückchen kamen in die vorbereiteten Taschen eines 12 % SDS-PAGE-Gels (1,5 mm Dicke) und wurden mit 5 µl einer Überschichtungslösung (Gel Slice Overlay Solution, Promega) überschichtet. Hierauf gab man 5 µl der entsprechend den

Herstellerangaben verdünnten Enzymlösungen.

Nach dem Einlaufen der Proben ins Sammelgel wurde der Lauf für 30 min gestoppt, der Verdau konnte so ungehindert ablaufen. Die anschließende Auftrennung der Proteinfragmente wurde, bis der Blaumarker die untere Gelkante erreichte, fortgeführt. Mittels Silberfärbung („Silver Staining Kit Protein“, Plus One™, Pharmacia) konnten die erhaltenen Fragmente sichtbar gemacht werden.

### **2.20.5 Proteinfärbemethoden im SDS-Gel**

Es kamen sowohl Positiv- als auch Negativ-Färbemethoden zum Einsatz. Bei Positiv-Färbung werden die aufgetrennten Proteinmoleküle angefärbt. Dagegen färbt sich bei Negativ-Färbung der Hintergrund und die Proteine bleiben als klare Banden erkennbar. Weil die meisten Positiv-Färbemethoden die Proteine dauerhaft fixieren, sind sie weniger geeignet, falls im Anschluss weitere Untersuchungen, wie z. B. Sequenzierungen oder Western-Blots, geplant sind. In diesen Fällen haben sich Negativ-Färbungen bewährt.

#### **2.20.5.1. Positiv-Färbungen**

##### Silberfärbung

Das „Silver Staining Kit Protein“, Plus One™ von Pharmacia wurde nach Herstellerangaben eingesetzt.

##### Coomassie-Färbung

Es wurden zwei verschiedene Praktiken (A, B) angewendet. Die zweite schnellere Methode fixiert die Proteine nicht so stark, so dass auch hier weitere Untersuchungen folgen konnten.

##### A. stark fixierend

Das Gel wurde 1 – 2 h in Färbelösung (0,25%, w/v, Coomassie Brilliant Blue R-250; 40%, v/v, Methanol; 7%, v/v, Essigsäure) unter leichtem Schütteln inkubiert, dann 1-2 h in Entfärbelösung I (40% Methanol, 7% Essigsäure) und schließlich in Entfärbelösung II (5% Methanol, 7% Essigsäure) entfärbt. In 7% Essigsäure konnte das Gel für mehrere Wochen ohne Veränderungen bei 4 °C gelagert werden.

##### B. weniger stark fixierend

Diese Verfahrensweise ist erheblich kürzer als die vorherige. In 0,1% Coomassie Brilliant Blue R 250, 50% Methanol und 1% Essigsäure wurden die Proteine maximal

eine Stunde gefärbt. Entfärbt wurde mit 50% Methanol nur wenige Minuten lang (bis die Banden gut sichtbar waren).

Die niedrigere Konzentration an Coomassie und Essigsäure bewirkte eine schwächere Fixierung der Moleküle.

### **2.20.5.2 Negativ-Färbungen**

Hier erscheinen die Proteine als farblose Banden in einem gefärbten Gel. Sie sind am besten vor einem dunklen Hintergrund, z. B. blauer oder schwarzer Pappe, erkennbar.

#### Kupferchlorid-Färbung:

Das Gel wurde kurz in A. reinst gewaschen, unter leichtem Schütteln in Kupferfärbelösung (0,3 M  $\text{CuCl}_2$  in A. reinst) für 5 min gefärbt und darauf 2 – 3 min in A. reinst gewaschen. In Wasser konnten die Gele bei 4 °C über einige Wochen stabil gelagert werden.

#### Zink-Imidazol-Färbung:

Zuerst wurde für 30 - 60 s mit A. reinst gewaschen und 5 min (5-10%ige Gele) bzw. 15 min (höher konzentrierte Gele) in Imidazolösung (0,2 M Imidazol, 0,1% (w/v) SDS in  $\text{H}_2\text{O}$ ) auf dem Schüttler äquilibriert. Dann wurde bis zum Erscheinen von klaren Banden (15 – 60 s) gegen einen weißgefärbten Hintergrund in Zinklösung (0,2 M Zinksulfat, in A. reinst) leicht geschüttelt. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Waschen mit A. reinst für 3 x 5 s.

Die Proteine sind nach der Färbung immobilisiert und können in Wasser über mehrere Monate bei 4 °C gelagert werden.

## **2.21 Westernblot-Analyse**

Nach der Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE erfolgte in vielen Fällen ihre Übertragung auf geeignete Trägermaterialien. Zumeist wurde dafür eine Nitrocellulose-Membran (Nitrocellulose BA 85, Schleicher & Schüll) genutzt. Wenn die Proteine sequenziert werden sollten, fand eine PVDF-Membran (PVDF Protein Sequencing Membrane, BIO-RAD) Verwendung. Je nach Anwendung geschah dies mittels Tank-Blotting (Mighty Small™ TransphoRTank Transfer-Einheit, Hoefer) oder mit einer Semidry-Blotting-Apparatur (Multiphor II, Pharmacia).

### 2.21.1 Tankblotting

Dieses Verfahren wurde am häufigsten angewandt. Der Blot wurde wie bei Bohland (1997) beschrieben aufgebaut. Als Blottingpuffer wurde für Nitrocellulose-Membranen Towbin Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin und 20% (v/v) Ethanol) und für PVDF-Membranen CAPS-Puffer (10 mM CAPS; 10%, (v/v) Methanol; pH 11 mit NaOH) eingesetzt. Der Transfer erfolgte bei 400 mA für 75 min.

### 2.21.2 Semidry-Blotting

Wenn His-getaggte Proteine aufgetrennt wurden oder auch bei größeren Gelen (2-D-Gele), wurde das Semidry-System von Pharmacia (Multiphor II) genutzt. Der Blotting-Puffer (15,6 mM Tris, 120 mM Glycin, 20% Ethanol) diente dem Befeuchten von Membranen, Whatman-Papier und dem Gel. Ansonsten wurde kein Puffer benötigt. Der Blot wurde folgendermaßen aufgebaut:

<b>Oben (Kathode):</b>	3 Lagen Whatman-Papier Gel Membran
<b>Unten (Anode)</b>	3 Lagen Whatman-Papier

Bei  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  Gelfläche dauerte das Elektroblothing 75 min.

Nach dem Transfer wurde die Markerspür abgeschnitten und mit Amidoschwarz gefärbt (Ausnahme: vorgefärbte Marker). Die übrigen Proteine wurden normalerweise einer Immunodetektion unterworfen. Der Nachweis von His-getagkten Proteinen erfolgte wie unter 2.5 beschrieben.

### 2.21.3 Immunodetektion von Proteinen

Die Schritte 1 – 6 wurden immer unter leichtem Schütteln durchgeführt, unabhängig von der gewählten Nachweismethode.

A. Immunodetektion als Farbreaktion mittels Phosphatase gekoppelter IgG`s und dem Farbreagenz BCIP/NBT

1. 10 min Waschen des Blots mit TBST bei RT
2. 60 min Blockieren mit Blockierungslösung (3%) bei RT
3. Inkubation mit dem ersten Antikörper (s. 2.8.1) in Blockierungslösung (3%) bei 4 °C ü. N. oder für 2 h bei RT
4. Waschen für 6 x 5 min mit TBST bei RT
5. Inkubation mit dem zweiten Antikörper (s. 2.8.2) in TBST für eine Stunde bei 37 °C
6. Waschen für 6 x 5 min mit TBST bei RT
7. 2 – 15 min Farbreaktion mit BCIP/NBT-Lösung bei RT im Dunkeln
8. Abstoppen der Farbreaktion mit A. reinst

Der Blot wurde zwischen mehreren Lagen Blotting-Papier (Schleicher & Schüll) getrocknet und zwecks Dokumentation eingescannt.

B. Immunodetektion als Chemilumineszenz-Nachweis mittels Peroxidase gekoppelter IgG`s

1. 10 min Waschen des Blots mit TBST bei RT
2. 2 h Blockieren der Membran mit Blockierungslösung (10%) bei RT
3. Inkubation mit dem ersten Antikörper (2.8.1) in Blockierungslösung (10%) bei 4 °C ü. N. oder für 2 h bei RT
4. 3 x 5 min Waschen mit TBST bei RT
5. Inkubation mit dem zweiten Antikörper (2.8.2) in TBST für eine Stunde bei RT
6. 3 x 5 min Waschen mit TBST bei RT
7. Die Membran auf eine Klarsichtfolie geben, mit der fertigen ECL-Lösung benetzen, überflüssige ECL-Lösung vorsichtig abstreichen und die Membran mit der Folie bedecken
8. Röntgenfilm kurz auflegen (20 s – 15 min) und entwickeln (Dunkelkammer)
9. Die Höhe der Proteinmarker-Banden auf dem Film markieren

Der Film wurde ebenfalls zu Dokumentationszwecken eingescannt.

### 2.21.4 Entfernen von Antikörpern von Membranen („Strippen“)

Diese Methode konnte nur nach Immunodetektion durch Chemilumineszenz-Nachweis angewendet werden. Durch das „Strippen“ wird sowohl der erste als auch der zweite Antikörper wieder abgewaschen, jedoch schädigt dieses Verfahren die Epitope.

1. Waschen der Membran in Blockierungslösung (5%)
2. Trocknen der Membranen auf Blotting-Papier (Schleicher & Schüll)
3. 30 min bei 60 °C in Erasing-Puffer schütteln
4. 2 x 10 min in TBST Waschen bei RT (Blot kann dann in Frischhaltefolie eingeschlagen bei –20 °C gelagert werden.)
5. (für weitere Immunodetektionen) 6 h Blockieren in Blockierungslösung (5%) bei RT

- **5x TBS**

50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
0,75 M	NaCl

- **TBST (1 l)**

200 ml	5x TBS
800 ml	A. reinst
500 µl	Tween 20

- **Blockierungslösungen**

3% (w/v)	Magermilchpulver in TBST
5% (w/v)	Magermilchpulver in TBST
10% (w/v)	Magermilchpulver in TBST

- **BCIP/NBT**

1 Tablette BCIP/NBT(Sigma Fast™, Sigma) in 10 ml A. reinst lösen.

- **ECL-Lösung 1 (25 ml, bei 4 °C lagern)**

125 µl	500 mM Luminol in DMSO
125 µl	26,3 mg/ml p-Cumarinsäure in DMSO
2,5 ml	1 M Tris-HCl, pH 8,5

Mit A. reinst auf 25 ml auffüllen.

- **ECL-Lösung 2** (25 ml, bei 4 °C lagern)  
15 µl                      30% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
2,5 ml                     1 M Tris-HCl, pH 8,5  
Mit A. reinst auf 25 ml auffüllen.
- **Fertige ECL-Lösung**  
ECL-Lösung 1 und 2 im Verhältnis 1 : 1 gemischt.
- **Erasing-Puffer** (100 ml, Lagerung bei 4°C)  
6,25 ml                    1 M Tris-HCl, pH 6,8  
10 ml                      20% (w/v) SDS  
0,7 ml                     β-Mercaptoethanol  
Mit A. reinst auf 100 ml auffüllen.

## 2.22 Positionsspezifität (Produktanalyse) von Lipoxygenasen

Die Positionsspezifität, also die Neigung, bevorzugt ein bestimmtes Hydroperoxid (z.B. 9-HPOD oder 13-HPOD) herzustellen, gehört zu den charakteristischen Eigenschaften von Lipoxygenasen.

Diese Untersuchungen sind sowohl mit den in *E. coli* exprimierten als auch mit Lipoxygenasen aus Weizenpflanzen/Weizenzellkulturen, durchgeführt worden. Als Kontrollansätze dienten enzymfreie Ansätze, 9- und 13-HPOD-Standards sowie Reaktionen mit Soja-LOX (Typ I.S, Sigma).

Pro Reaktionsansatz von 1,5 ml wurden 300 µl Photometersubstrat mit O<sub>2</sub>-gesättigtem Puffer und 2 nkat LOX-Lösung (max. 500 µl), zum Starten der Reaktion, gemischt. Für Soja-LOX war 0,1 M Borat-Puffer, pH 9,0 und für Weizen- und in *E. coli* exprimierte – LOX 0,1 M Citratphosphat-Puffer, pH 6,2 eingesetzt worden. Die Reaktionen wurden 10 - 30 min bei 30 °C auf dem Eppendorf-Thermoschüttler in 2 ml Reaktionsgefäßen geschüttelt. Die Kontrollansätze wurde immer parallel zu den jeweiligen Versuchsansätzen durchgeführt. Die Reaktionszeiten waren identisch.

Nach dem Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 5 µl konz. HCl wurden die Hydroperoxide mit 500 µl Chloroform extrahiert, zweimal mit 500 µl A. reinst gewaschen und kurz mit N<sub>2</sub> begast. Die so erhaltenen Produkte konnten sofort zur Messung eingesetzt werden, oder bei –20 (bis zu einer Woche) bzw. –70 °C (längere Lagerung) unter N<sub>2</sub> gelagert werden.

Die Trennung der Produkte fand durch Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (sp-

HPLC, Milton Roy CM4000 und SM4000; Schreiber SS-250 F, Sekonic) auf einer Kieselgelsäule (Suprasphere-Si, 4 µM Partikelgröße, 4,6 x 125 mm) statt. Die Elution mit n-Hexan/Isopropanol/Acetonitril/Eisessig (98,3 : 1,5 : 0,1 : 0,1 v/v) erfolgte bei einer Flussrate von 1 ml/min. Anhand der eingesetzten Standards konnten die Lipoxygenase-Produkte bei 234 nm detektiert und identifiziert werden.

## **2.23 Sequenzierung von LOX-Proteinen**

Für Proteinsequenzierungen muss das zu untersuchende Protein als möglichst saubere Fraktion in ausreichendem Maße zur Verfügung stehen. Die Sequenzierungen wurden von verschiedenen Laboren (Institut für Enzymtechnologie, FH Jülich; Department of Biochemistry, Biozentrum of the University of Basel; Royal Holloway School of Biological Sciences, University of London) als Auftragsarbeit durchgeführt. Die Menge an reinem Protein, die benötigt wird, schwankt je nach angewandeter Methode.

Die Vorbereitungen der Proben entsprachen den Anforderungen der jeweiligen Institute. Diese haben die LOX-Proteine mittels Edman-Abbau sequenziert. Wegen N-terminaler Blockierung wurde teilweise vorher ein tryptischer Verdau und die Auftrennung der entstandenen Fragmente über HPLC durchgeführt.

In den Verfahren, die hier zur Verfügung standen, wurde relativ viel LOX-Protein benötigt. Da das zu untersuchende Enzym zwar höchst aktiv, jedoch nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden ist, war nach der IAC (2.16) eine weitere Anreicherung notwendig.

## **2.24 RNA-Extraktion**

### **2.24.1 RNase freies Arbeiten**

Beim Arbeiten mit RNA muss eine Kontamination mit Ribonukleasen (RNasen) verhindert werden. Diese können einerseits als Verunreinigungen auf Geräten, Verbrauchsmaterialien und Lösungen vorkommen, andererseits werden beim Zellaufschluss von pflanzlichem bzw. tierischem Material natürlich vorhandene RNasen freigesetzt. Durch unterschiedliche Verfahren vor und während dem Arbeiten mit RNA können diese RNasen inhibiert bzw. zerstört werden.

Voraussetzung für RNase-freies Arbeiten ist zunächst die Nutzung von Handschuhen. Des Weiteren müssen alle wässrigen Lösungen mit DEPC-Wasser hergestellt werden und autoklaviert sein. DEPC (Diethylpyrocarbonat) ist ein starker RNase-Inhibitor. Es wird eine 0,1%ige Lösung in A. reinst hergestellt, indem man die Lösung über Nacht unter dem Abzug rühren lässt. Danach muss das DEPC (stark cancerogen) autoklaviert und damit inaktiviert werden.

Reaktionsansätzen mit RNA, wie z. B. RT-PCR kann man zur Unterdrückung von RNase-Aktivität im Ansatz käufliche RNase-Inhibitoren hinzufügen. Bei der Extraktion von RNA nutzt man im Allgemeinen die denaturierenden Eigenschaften von Guanidin-HCl und Guanidiniumthiocyanat und/oder die reduzierende Eigenschaft von  $\beta$ -Mercaptoethanol.

Gelagert wird RNA idealerweise bei einer Temperatur zwischen -80 und -70 °C. Auch so werden RNasen in ihrer Aktivität gehemmt.

#### **2.24.2 Extraktion von Gesamt-RNA**

Für die Extraktion von Gesamt-RNA wurde das „peqGold RNA Pure Kit“ der Firma Peqlab verwendet.

In einem mit N<sub>2</sub> vorgekühlten Mörser wurden von den einzelnen Behandlungen je 5 Weizenprimärblattabschnitte (a 7 bzw. 8 cm Länge; s. 2.15.1) mit flüssigem Stickstoff so lange gemörsert, bis man ein weißliches Pulver erhielt. Davon wurde ungefähr die Hälfte in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und sofort 1,5 ml pegGold RNA Pure dazugegeben, kräftig gevortext und zunächst auf Eis gesammelt.

Die andere Hälfte des Pulvers kam in ein weiteres Eppendorfgefäß, wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und konnte bei -70 °C für einen späteren Gebrauch gelagert werden.

Nachdem alle Proben fertig gemörsert waren, beließ man sie für 5 min bei RT. Dann gab man 0,3 ml Chloroform hinzu und mischte wiederum kräftig auf dem Vortex. Nach weiteren 3 – 10 min bei RT wurden die Proben 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert und die wässrige obere Phase kam in ein neues Gefäß. Mit einem Vol. Isopropanol wurde die RNA über Nacht bei 4 °C gefällt.

Nach der Fällung erfolgte eine Zentrifugation von 20 min bei 4 °C und 14000 rpm. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet mit 70% ETOH (DEPC) gewaschen, getrocknet und in 50  $\mu$ l DEPC-Wasser aufgenommen.

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt. Bis zu ihrer Verwendung wurde die RNA bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

## **2.25 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Bei 260 nm entspricht die Absorption von einer DNA-Menge von 50  $\mu\text{g/ml}$  bzw. einer RNA-Menge von 40  $\mu\text{g/ml}$ . Der Quotient aus der Absorption bei 260 und 280 nm Wellenlänge gibt Hinweise auf die Qualität der gemessenen Nukleinsäure-Proben. Normalerweise liegt er bei 2,0 für RNA und 1,8 für DNA. Abweichungen hiervon weisen auf Verunreinigungen durch Proteine oder phenolische Substanzen hin. Bei monokotylen Pflanzen weicht der Quotient jedoch von diesen Idealwerten ab, ohne dass eine Verunreinigung vorliegt. Er liegt hier für RNA meist zwischen 1,6 und 1,9.

## **2.26 Denaturierende Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese**

Hierbei werden Ribonukleinsäuren unter denaturierenden Bedingungen, d. h. unter Auflösung ihrer Sekundärstruktur, im elektrischen Feld aufgetrennt.

Für 40 ml eines 1%igen Agarosegels wurden 0,4 g Agarose in 34 ml A. reinst und 4 ml 1x MOPS aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  fügte man 2 ml Formaldehyd (37%ige Lösung) und Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,25  $\mu\text{g/ml}$ ) hinzu. Die Agaroselösung wurde kurz geschwenkt und dann in eine vorbereitete horizontale Gekassette unter dem Abzug gegossen. Wenn das Gel vollständig erstarrt war, kam es in die mit 1x MOPS befüllte Elektrophoresekammer.

Je 10  $\mu\text{g}$  in DEPC-Wasser gelöste RNA wurden mit DEPC-Wasser auf 10  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und in 15  $\mu\text{l}$  RNA-Aufnahmepuffer aufgenommen. Bei  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  denaturierten die RNA-Proben für 4 min, dann wurden sie auf Eis abgekühlt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurden sie in die Taschen des Agarosegels einpipettiert und bei 3 V/cm ca. 1 Stunde (die Dauer hängt von der Größe des Gels ab) lang aufgetrennt. Zwecks Größenvergleich wurde z. T. ein RNA-Marker mit auf das Gel aufgetragen.

Das Ethidiumbromid im Gel interkaliert in Nukleinsäurestrukturen und ermöglicht so deren Detektion unter UV Licht bei 302 nm.

- **10x MOPS:**  
200 mM MOPS  
50 mM Natriumacetat  
10 mM EDTA  
pH 7,0 mit NaOH einstellen und autoklavieren.
- **RNA-Aufnahmepuffer**  
720 µl Formamid  
150 µl 10x MOPS  
260 µl Formaldehyd  
80 µl autoklaviertes Glycerol  
80 µl gesättigte Bromphenolblaulösung  
Mit DEPC-Wasser auf 1,5 ml auffüllen.

## 2.27 Northernblot-Analyse

Mithilfe von Northernblot-Analysen kann man die Expression einzelner Gene zu einem bestimmten Zeitpunkt untersuchen. Dazu trennt man RNA-Proben der zu untersuchenden Zeitpunkte elektrophoretisch auf und immobilisiert sie anschließend mittels Kapillartransfer auf einer positiv geladenen Nylonmembran.

Für die spätere Dokumentation erweist sich nach dem Transfer die Färbung des Filters mit Methylenblau als geeignet. Diese Färbung stört bei der anschließenden Hybridisierung nicht, ist aber auch nachträglich durchführbar. Der Blot wird hierbei für wenige Minuten in der Methylenblaulösung (0,4% Methylenblau in 0,5 M Natriumacetat) gefärbt und anschließend unter leichtem Schütteln mit A. reinst solange entfärbt, bis die Banden der ribosomalen RNA gut sichtbar werden.

Der Nachweis, ob ein Gen zum untersuchten Zeitpunkt aktiv ist, erfolgt mit einer genspezifischen markierten Sonde (z. B. radioaktiv). Die Sonde erkennt komplementäre Sequenzen und bindet daran. Um unerwünschte Reaktionen, unspezifische Hybridisierungen der markierten Nukleinsäuren oder deren Adsorption an den Filter, zu verhindern, blockiert man diese Bindungsstellen mittels Heringsperma-DNA oder anderer geeigneter Blockierungslösung. Nach der Hybridisierung kann ein Röntgenfilm aufgelegt werden, positive Signale werden nach der Autoradiographie als Schwärzungen auf dem Film sichtbar.

### **2.27.1 Northernblot**

Die im Gel aufgetrennte RNA wurde über Kapillartransfer auf eine Nylonmembran geblottet.

Der Blot wurde folgendermaßen aufgebaut:

In eine große Plastikschaale kam in die Mitte eine viereckige Dose mit etwas höherem Rand als die Schale. Darauf wurde eine Glasscheibe gelegt. Nun wurde die größere Schale mit Natriumphosphatpuffer (pH 6,4; 25 mM) befüllt, so dass der Boden ca. 3 cm bedeckt war. Ein Streifen Whatmanfilterpapier (Whatman 3MM) wurde so zugeschnitten, dass er eine Brücke von der linken Seite der Schale über die Glasplatte zur rechten Seite bilden konnte. Er wurde mit Puffer befeuchtet und luftblasenfrei über die Glasplatte gebracht. Darauf kamen drei auf Gelgröße zugeschnittene, in Puffer getränkte Filterpapiere, ebenfalls luftblasenfrei.

Das RNA-Gel wurde, nach dem Abschneiden der Probestaschen, mit der Oberseite nach unten auf das Filterpapier gelegt. Jetzt noch freiliegendes Filterpapier wurde mit vier Parafilmstreifen abgedeckt, damit der Puffer nicht an den Seiten hoch diffundieren konnte.

Eine positiv geladene, auf Gelgröße zurechtgeschnittene Nylonmembran (Hybond N, Boehringer, Mannheim) wurde ebenfalls mit Puffer angefeuchtet und luftblasenfrei auf das Gel aufgelegt. Es folgten weitere drei Lagen angefeuchtetes Filterpapier und mehrere Lagen (ca. 10 cm hoch) trockenes Zellstoffpapier.

Den Abschluss bildeten eine Glasscheibe und ein etwa 600 g schweres Gewicht. Der Transfer erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

### **2.27.2 Hybridisierung**

Für die Hybridisierung wurden radioaktiv markierte Sonden eingesetzt. Die Sonden besaßen eine hohe Homologie zu den untersuchten Genen. Sie mussten vor der Nutzung denaturiert werden. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden die Blots zunächst im Hybridisierungspuffer unter Zugabe von denaturierter Heringssperma-DNA prähybridisiert. Erst dann erfolgte die Hybridisierung mit der gewünschten Sonde. Durch stringente Waschschrte wurde unspezifisch gebundene Sonde wieder abgewaschen. Zum Schluss kamen die Blots in Frischhaltefolie und ein Röntgenfilm wurde aufgelegt, bei  $-80$  -  $-70$  °C exponiert und nach 1-14 Tagen

entwickelt (abhängig von der Signalstärke).

Durchführung:

Nach dem Transfer wurde der Blot kurz getrocknet, dann unter UV „gecrosslinked“ (Ultra Violet Crosslinker, Amersham Life Science). Bis zum weiteren Gebrauch konnten die Filter wahlweise bei RT oder  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in Frischhaltefolie eingeschlagen gelagert werden.

Die mit A. reinst angefeuchteten Blots wurden in Hybridisierungsröhren gegeben und bei  $58\text{ }^{\circ}\text{C}$  für eine Stunde mit 10 – 15 ml der Prähybridisierungslösung in einem Rollerbrutschrank inkubiert.

Im Anschluss fügte man der Prähybridisierungslösung die markierte und denaturierte Sonde zu. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei  $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Am nächsten Tag wurde die Lösung in ein 50 ml Falcongefäß abgegossen und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zu einem späteren Gebrauch gelagert. Unspezifisch gebundene Sonde entfernte man durch verschiedene Waschstritte:

- |                                            |       |
|--------------------------------------------|-------|
| 1. 2 x 30 s mit 6x SSC, 1% (w/v) SDS       | 58 °C |
| 2. 2 x 30 min mit 2x SSC, 0,1% (w/v) SDS   | 58 °C |
| 3. 1 x 30 min mit 0,2x SSC, 0,1% (w/v) SDS | 58 °C |
| 4. 1 x 30 s mit 0,2x SSC                   | RT    |

Der letzte Schritt diente lediglich dem Auswaschen von überschüssigem SDS.

- **20x SSC**

3,0 M NaCl  
0,3 M Natriumcitrat  
pH 7,0 mit NaOH einstellen.

- **Hybridisierungspuffer**

10% (w/v) Dextransulfat  
1 M NaCl  
1% (w/v) SDS

- **Prähybridisierungslösung**

Hybridisierungspuffer versetzt mit 100 µg/ml denaturierter Heringssperma-DNA.

Radioaktive Markierung der Sonde:

Hierfür wurde das „DecaLabel™ DNA Labeling Kit“ der Firma MBI Fermentas nach Herstellerangaben genutzt, wobei wahlweise  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$  oder  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$

eingesetzt wurde. Nach dem Abstoppen der Reaktion wurde der Ansatz mit autoklaviertem A. reinst auf 300 µl aufgefüllt. Pro Hybridisierungsröhre kamen 100 – 150 µl der denaturierten Sonde zum Einsatz.

## **2.28 Amplifizierung von cDNA mithilfe reverser Transkriptasen**

Im Gegensatz zu den in Pro- und Eukaryonten vorkommenden DNA-Polymerasen, welche DNA als Matrize brauchen, nutzen virale reverse Transkriptasen mRNA als Template. Es entsteht eine DNA („copy“ DNA = cDNA), die komplementär zur mRNA ist. In der Molekularbiologie nutzt man reverse Transkriptasen, um die zu einem bestimmten Zeitpunkt exprimierten Gene zu untersuchen.

### **2.28.1 Konstruktion einer Weizen-LOX-Sonde mittels degenerierter Primer über RT-PCR**

Für die Konstruktion der Sonde wurde aus konservierten Sequenz-Bereichen vom 3'-Ende her degenerierte Primer (s. 2.4) ausgewählt. Mithilfe des „Titan™ One Tube RT-PCR System“ von Boehringer, Mannheim konnte mit diesen Primern aus Gesamt-RNA ein ca. 500 bp großes DNA-Fragment isoliert werden.

Vorgehen:

Um die LOX-RNA-Synthese zu induzieren, wurden 7 Tage alte Weizenpflanzen mit dem Pgt-Elicitor, Methyljasmonat, „Wind“ oder Wasser (Kontrollansatz) behandelt und die Primärblätter (bei „Wind-Behandlung“ konnten alle Blätter genutzt werden) nach 12 - 24 h geerntet. Aus diesen Blättern isolierte man, wie unter 2.24.2 beschrieben, die Gesamt-RNA.

Alle Ansätze mussten grundsätzlich auf Eis gelagert bzw. vorbereitet werden. Je 1 µl Gesamt-RNA (1 µg) kam mit je einem µl „upstream“ und „downstream“ Primer (10 µM) in ein 500 µl PCR-Gefäß (= Ansatz RNA) und wurde zur Verminderung von Sekundärstrukturen bei 95 °C für 4 min denaturiert. In der Zwischenzeit wurden 2 Mastermixe (Mix 1 und 2, s. u.) hergestellt.

Zu Ansatz RNA pipettierte man 22 µl Mix 1 und 25 µl Mix 2, mischte kurz auf dem Vortex und zentrifugierte sie anschließend. Im vortemperierten Thermocycler (The DNA ENGINE Peltier Thermal Cycler, PTC 200, MJ Research Inc.) fand die cDNA-Synthese bei 36 – 60 °C (abhängig von der Schmelztemperatur der Primer) für 1,5 h

statt. Anschließend wurde eine PCR über 35 Cycles nach Herstellervorgaben durchgeführt, wobei die Annealingtemperatur immer der jeweiligen Schmelztemperatur (1-2 °C niedriger) der verwendeten Primer angepasst wurde. Bei Bedarf wurde eine weitere PCR mit „nested“ (innerhalb des zu amplifizierenden Bereichs liegenden) Primern angeschlossen.

Die Proben wurden auf einem 1 %igen Agarosegel analysiert, positive PCR-Produkte unter UV mit dem Skalpell ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert (2.35). Es folgte die Klonierung (2.30.2) der Produkte in den pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector (pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System, Promega) und die Transformation in *E. coli* (2.33). Zur Isolierung des gewünschten Plasmids wurden die transformierten *E. coli*-Kulturen in einem LB-Flüssigmedium (2.32) ü. N. angezogen und am nächsten Tag geerntet. Nach Präparation (2. 38) wurden die Plasmide mithilfe von Restriktionsverdauen analysiert, positive Kandidaten wurden sequenziert.

Die gewonnenen DNA-Sonden wurden für Northern-Analysen und zum Screening einer cDNA-Bank genutzt. Außerdem diente die Sequenz der Primerkonstruktion für die 3'- und 5'-RACE-Experimente.

- **Mix 1:** (ausreichend für 3 Reaktionen)  
12 µl dNTP (10 mM)  
7,5 µl DTT (100 mM)  
7,5 µl RNasin<sup>®</sup> (Promega, 'Ribonuclease Inhibitor', 1U/µl, 1 : 10 verdünnt)  
39 µl DEPC-Wasser
- **Mix 2:** (ausreichend für 3 Reaktionen)  
30 µl 5x RT-PCR Puffer  
3 µl Enzym Mix (Expand<sup>™</sup> High Fidelity enzyme mix, reverse transcriptase, AMV)

### 2.28.2 Klonierung der 3'UT mittels 3'-RACE

Nach der Sequenzierung (2.39) wurde ein genspezifischer Primer konstruiert. Mithilfe des „3'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA ends“ von Gibco konnte aus Gesamt-RNA ein DNA-Fragment (inklusive einem Teil der 3'UT) amplifiziert und kloniert werden.

Die 3'-RACE funktioniert nach folgendem Prinzip:

A. Annealing eines Oligo (dT) Adapterprimers an das Poly-A-Ende der mRNA

Dieser Primer besitzt an seinem 3'-Ende einen möglichst langen Oligo-dT-„Schwanz“, am anderen die Adaptersequenz. Letztere dient dem Annealing des Universal Primers aus Schritt 3 sowie der späteren Klonierung, da zusätzliche Schnittstellen eingefügt werden. Mittels Oligo dT-Ende wird die Poly-A-Plus-Sequenz am Ende der m-RNA erkannt und an diese gebunden (Annealing).

B. „First Strand“-Synthese der cDNA

Nach dem Annealing des Primers erfolgt mittels einer reversen Transkriptase die „First Strand“-cDNA-Synthese. Hiernach wird die RNA-Matrix enzymatisch zerstört (RNase H, reagiert spezifisch auf RNA:DNA-Duplexe). Dadurch wird der cDNA-Erststrang frei und ist für die weitere Synthese zugänglich.

C. Amplifizierung der Ziel-cDNA

Ein genspezifischer Primer, der innerhalb der amplifizierten cDNA liegt, und ein Universalprimer, welcher den Adapter erkennt, werden für diesen Schritt eingesetzt. Es erfolgt eine normale PCR. Das entstandene Produkt kann direkt zur Klonierung eingesetzt werden.

D. (Nicht obligatorisch) Zweite „nested“ Amplifizierung der cDNA

Aufgrund des eingesetzten unspezifischen Oligo-dT-Primers entstehen beim ersten Schritt viele unterschiedliche Produkte, da alle polyadenylierten mRNAs als Matrize genutzt werden. Daraus resultieren bei der anschließenden Amplifizierung häufig auch etliche unspezifische Produkte. Eine zweite „nested“ PCR erhöht die Spezifität der amplifizierten Produkte.

E. Klonierung des PCR-Produkts

Die Größe des PCR-Fragments wird auf einem Agarose-Gel kontrolliert. Stimmt diese mit der erwarteten Größe überein, so kann das Fragment aufgereinigt und anschließend in einen geeigneten Vektor (hier pGEM<sup>®</sup> T-Easy, Vector Promega) kloniert (2.31.1) werden. Dabei bedient man sich häufig der zusätzlich eingefügten Restriktionsschnittstellen.

F. Transformation von *E. coli*

*E. coli* wird mit dem neu entstandenen Plasmid transformiert (2.33). Dann erfolgt die Vermehrung des Plasmids für weitere Untersuchungen.

Das „3'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA ends“ wurde nach Herstellerangaben eingesetzt. Für die Amplifizierung der Ziel-DNA wurden der

Abridged Universal Amplification Primer (AUAP, Gibco) sowie zwei genspezifische Primer verwendet.

### **2.28.3 5'-RACE**

Es wurde das „5'-RACE System for Rapid Amplifikation of cDNA Ends, Version 2.0“ von Gibco eingesetzt. Das Prinzip ist ähnlich wie bei einer 3'-RACE, jedoch gibt es einige wichtige Unterschiede, die in den Punkten A - D kurz beschrieben werden. Alle anderen Schritte bleiben gleich.

#### A. Annealing eines genspezifischen Primers an die mRNA

Statt eines Oligo-dT-Primers wird hier ein „antisense“ genspezifischer Primer benötigt.

#### B. „First Strand“-Synthese der cDNA

Die mRNA wird mit reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben, dann die RNA-Matrize mit RNase abgebaut und alle Bruchstücke, Primerreste etc. von der cDNA abgetrennt (hier: GlassMAX Spin Cartridge, Gibco).

#### C. „Tailing“ (mit dCTP) der gereinigten cDNA und Amplifizierung der Ziel-cDNA

An das 3'Ende des cDNA-Strangs wird ein Poly-C-Schwanz (mittels einer Terminalen Deoxynucleotidyl Transferase) angehängt, dieser dient als Erkennungssequenz für den Anker-Primer (hier: Abridged Anchor Primer, Gibco). Mit diesem Primer und einem zweiten („nested“) genspezifischen Primer kann über PCR ein DNA-Doppelstrang amplifiziert werden.

#### D. Zweite („nested“) PCR

Ein dritter („nested“) genspezifischer Primer und ein Universal Primer (welcher die „Ankersequenz“ erkennt, hier: AUAP oder UAP von Gibco werden für diese PCR gebraucht. Dieses Produkt kann in wiederum geeignete Vektoren kloniert werden.

## **2.29 Klonierung einer LOX-cDNA**

Die Klonierung der cDNA erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde eine weizenspezifische cDNA-Sonde konstruiert. Diese wiederum kam für das Screening einer cDNA-Bank zur Isolation einer vollständigen Weizen-LOX-cDNA zum Einsatz.

Mit Hilfe eines viralen Enzyms einer reversen Transkriptase kann eine komplementäre DNA (cDNA = copy DNA) zu einer mRNA synthetisiert werden. Man erhält so die Möglichkeit, die zu einem bestimmten Zeitpunkt exprimierten Gene zu untersuchen.

Für die Konstruktion einer cDNA-Bank wird die cDNA in einen geeigneten Vektor verpackt. Eine häufig angewandte Methode ist das  $\gamma$ -ZAP Klonierungssystem von Stratagene. Hierbei wird die cDNA in einen  $\gamma$ -Phagen kloniert. Durch „in vivo Excision“ können die cDNA-Inserts mittels eines Helfer-Phagen in Plasmide umgewandelt werden. Die Vermehrung der cDNA erfolgt in infizierten *E. coli* Bakterien.

In diesem Fall wurde mit dem ZAP-cDNA<sup>®</sup> SYNTHESIS KIT von Stratagene hergestellte cDNA-Bank aus Weizen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von R. Dudler, Zürich) gearbeitet. Zur RNA-Induktion waren die Weizenpflanzen mit Gerstenmehltau infiziert worden. Für das Screening kam die unter 2.29.1 beschriebene Sonde zum Einsatz.

Vorgehen:

#### A. Bestimmung: des Phagentiters

Zunächst musste der Titer der Phagenbank bestimmt werden. Über Nacht wurde eine Vorkultur von XL1-Blue MRF<sup>`</sup> (Wirtsbakterien) in LB Medium mit 0,2% (w/v) Maltose und 10 mM MgSO<sub>4</sub> bei 37 °C angezogen und damit eine Flüssigkultur in 50 ml LB [0,2% (w/v) Maltose; 10 mM MgSO<sub>4</sub>] angeimpft. Bis zur OD<sub>600</sub> von 0,6 – 1,0 inkubierte man die Bakterien auf dem Schüttler bei 37 °C. Dann wurden sie bei 1000 g für 10 Minuten zentrifugiert, das Pellet in ca. 20 ml 10 mM MgSO<sub>4</sub> gelöst und eine OD<sub>600</sub> von 1,0 eingestellt. Von den Phagen wurde mit SM Puffer eine Verdünnungsreihe (1 : 100 – 1 : 10<sup>9</sup>) vorbereitet. Die jeweilige Menge an Phagenverdünnung wurde 15 Minuten mit 200  $\mu$ l Wirtsbakterien (in 10 mM MgSO<sub>4</sub>; OD<sub>600</sub> = 1,0) in einem sterilen Reagenzglas bei 37 °C inkubiert. Dazu kamen 3,5 ml auf 48 °C vorgewärmte NZY-Top-Agarose. Man mischte kurz und gab diese auf vorgewärmte NZY-Platten. Im 37 °C Brutschrank wurden die Platten ü. N. bebrütet.

Am nächsten Tag wurden die Phagenplaques auf den Platten gezählt und der Titer in pfu/ml bestimmt.

#### B. Erstes Screening:

Vorbereitung der Filter:

Es wurden 150 mm NZY Platten genutzt. Die Phagenkonzentration wurde so eingestellt, dass pro Platte 20.000 – 50.000 Phagenplaques zu erwarten waren. Aufzucht und Verdünnung der Wirtsbakterien sowie das Ausplattieren der Phagen-Bakterienmischung mit Top-Agarose entsprach der Vorgehensweise beim Bestimmen des Titers. Jedoch wurden, wegen der größeren Platten, die Phagen mit je 500  $\mu$ l Bakterienlösung und 8 ml vorgewärmter NZY-Top-Agarose ausgegossen. Über Nacht

entstand ein dichter Plaque-Rasen.

Die Platten kamen am nächsten Tag für ca. 1 h in den Kühlschrank, dann wurden Nitrocellulosemembranen (Optitran BA-S 85, Schleicher & Schüll) für 2 s luftblasenfrei aufgelegt, mit einer Nadel und schwarzer Tinte markiert und dann wieder abgezogen. Die an den Filter gebundene Phagen-DNA wurde 2 min mit 0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl denaturiert, mit 1 M Tris-HCl, pH 8,0 neutralisiert und anschließend auf der Laborbank getrocknet. Zur Immobilisierung der DNA wurden die Filter 30 min bei 80 °C in einem Vakuumofen gebacken. Die Membranen konnten sofort für die Hybridisierung eingesetzt werden oder bei – 20 °C gelagert werden.

Hybridisierung:

Zunächst wurde eine Prähybridisierung in 5x Denhardts, 6x SSPE, 1 % (w/v) SDS sowie 100 µg/ml denaturierter Heringssperma-DNA und 25 mg/ml denaturierter  $\gamma$ -DNA bei 65 °C für 60 min durchgeführt.

Dann setzte man der Prähybridisierungslösung 150 µl der denaturierten radioaktiv markierten Sonde (vgl. 2.29.2) hinzu und hybridisierte ü. N. bei 65 °C. Die Membranen wurden folgendermaßen gewaschen:

1. 2 x 30 s mitt 6x SSPE, 1% (w/v) SDS; 65 °C
2. 1 – 2 x10 min mit 2x SSPE, 1 % (w/v) SDS; 65 °C, (bis Waschflüssigkeit  $\pm$  frei von Radioaktivität)
3. 1 x 15 min mit 0,2x SSPE, 0,1 % (w/v) SDS, 65 °C
4. 1 x 30 s mit 0,2x SSPE RT

Die Membranen wurden in Frischhaltefolie eingeschlagen, in eine Filmkassette gebracht und ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Exposition fand bei –80 °C für 4 – 8 h oder bei schwächeren Signalen ü. N. statt.

Nach der Entwicklung des Films wurden die Phagen-Plaques, deren DNA ein starkes Signal zeigten, mit einer abgeschnittenen 1 ml Plastikpipettenspitze isoliert und in ein mit 500 µl SM Puffer befülltes Eppendorfgefäß gegeben. Dazu kamen nach kräftigem Mixen 20 µl Chloroform zum Abtöten der Bakterien. Es wurde ein weiteres Mal gevortext. Die Phagen befanden sich nun im Puffer, jedoch waren wegen der hohen Phagendichte noch keine einzelnen Klone isoliert worden. Dazu waren ein zweites und drittes Screening notwendig.

C. Zweites und drittes Screening:

Das zweite und dritte Screening verlief im Prinzip wie das erste, mit nur wenigen Unterschieden. Es wurden kleinere Petrischalen gebraucht. Die Phagenkonzentration (der positiven Klone vom vorangegangenen Screening) wurde reduziert, so dass einzelne Plaques gut sichtbar und auch problemlos isolierbar waren. Optimal ist eine Phagendichte von 50 bis maximal 450 pro Platte. Die positiven Klone isolierte man, um sie für weitere Screenings einzusetzen. Nach dem dritten Screening lagerte man die isolierten Phagenklone bis zur *in vivo* Excision bei 4 °C.

D. *In vivo* Excision des Bluescript Phagemids:

Über Nacht wurde je eine Vorkultur von XL1 Blue MRF' (Wirtsbakterium für die isolierten Phagen) und XLOR in LB mit 0,2% Maltose und 10 mM MgSO<sub>4</sub> angezogen, diese wurden dann jeweils in einen 50 ml Kolben überimpft und bei 37 °C inkubiert.

XL1-Blue-MRF' ließ man bis zu einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,2 – 0,5 wachsen, zentrifugierte die Zellen anschließend bei 1500 g und nahm sie in 10 mM MgSO<sub>4</sub> auf (OD<sub>600</sub> ≅ 1). Dann gab man 200 µl der XL1-Blue-MRF', 250 µl des isolierten Phagens und 1 µl des Helferphagens (ExAssist-Helper-Phage, Stratagene) in ein 50 ml Falcongefäß und inkubierte dieses 15 min bei 37 °C. Danach fügte man 3 ml NZY Medium hinzu und inkubierte 2,5 – 3 h auf dem Schüttler bei 37 °C. Hinterher wurden die Bakterien bei 65 – 70 °C (20 min) abgetötet. Dann zentrifugierte man 15 min bei 3500 rpm. Der Überstand enthielt filamentöse Phagenpartikel mit dem Plasmid. Dieser Phagemid Vektor ist bei 4 °C 1 - 2 Monate stabil.

In der Zwischenzeit konnten die anderen Bakterien (XLOR) zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 – 1,0 heranwachsen. Man zentrifugierte sie 15 min bei 3500 rpm und 16 °C und stellte anschließend die OD<sub>600</sub> auf ca. 1,0 mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> ein. Dann gab man in zwei Eppendorfgefäße (A und B) jeweils 200 µl XLOR. Zu Ansatz A pipettierte man 10 µl und zu B 100 µl des Phagemid Vektors. Die beiden Ansätze inkubierte man 15 min bei 37 °C, dann gab man 300 µl NZY Medium hinzu und schüttelte die Bakterien 45 min bei 37 °C. Zum Schluss plattierte man je 200 µl auf LB<sub>Amp</sub> Platten aus. Die Platten kamen über Nacht in den 37 °C Brutschrank.

E. Überprüfung der Insertgrößen:

Einzelne Kolonien wurden in 3 ml LB<sub>Amp</sub> Flüssigmedium angeimpft, ü. N. angezogen und in der späten log-Phase geerntet. Die Plasmide (Bluescript Phagemid) wurden präpariert (2.38) und einem/mehreren Restriktionsverdau(s) (s. 2.37) unterworfen. Aufgrund der Größe der entstandenen Fragmente konnten nicht positive Klone sicher

ausgeschlossen werden. Außerdem konnten positive Klone mittels PCR und Primern aus konservierten Bereichen getestet werden. Die zu erwartenden Größen der Produkte waren bekannt und konnten leicht kontrolliert werden.

- **NZY Medium** (flüssig, 1l)
  - 5 g NaCl
  - 2 g  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
  - 5 g Hefeextrakt
  - 10 g Casein Hydrolysat
  - pH 7,5 mit NaOH
- **NZY Medium** (fest)
  - 15 g Agar/l dem NZY Medium zufügen
- **NZY Top Agar**
  - 0,7% (w/v) Agarose dem NZY Medium zufügen
- **SM Puffer** (1 l)
  - 5,8 g NaCl
  - 2 g  $\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
  - 50 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,5)
  - 5 ml 2% (w/v) Gelatine

- **LB Medium** (flüssig, 1l)
  - 10 g NaCl
  - 10 g Trypton
  - 5 g Hefe Extrakt
  - pH 7,0 mit NaOH
- **LB Medium** (fest)
  - 15 g/l Agar dem LB Medium zufügen
- **20x SSPE** (1l)
  - 3,6 M NaCl
  - 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - 0,02 M EDTA, pH 7,7
- **50x Denhardts**
  - 1% (w/v) Ficoll™
  - 1% (w/v) PVP (Polyvinylpyrrolidon)
  - 1% (w/v) BSA (Rinder Serum Albumin)
- **Antibiotika**

Die Antibiotika wurden jeweils als Stocklösungen angesetzt, sterilfiltriert und den Medien nach Abkühlung auf 65 °C zugeführt.

Kanamycin wurde zur Aufzucht von XLOR dem LB Medium in einer Konzentration von 50 µg/ml zugesetzt, Tetracyclin für XL1-Blue MRF' in einer Konzentration von 12 µg/ml. Die transformierten XLOR wurden in LB<sub>Amp</sub> [100 µg/ml] angezogen.
- **Denaturierungslösung**
  - 0,5 N NaOH
  - 1,5 M NaCl
- **Neutralisierungslösung**
  - 1 M Tris-HCl, pH 8,0

### 2.30 Ligationen

Für Ligationen ist es vorteilhaft, wenn das Insert gegenüber dem Vektor in 3fach molarem Überschuss vorhanden ist. Die jeweils einzusetzenden Mengen lassen sich aus folgender Formel berechnen:

$$\text{Menge Vektor} \times \text{Länge Insert} / \text{Länge Vektor} \times 3 = \text{Menge Insert}$$

### 2.30.1 Ligation von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden mit dem PGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System von Promega in den zugehörigen Vektor kloniert.

Die Ligation wird hier mittels 3'-T-Überhänge an der Insertionsstelle der Plasmide erleichtert. (PCR-Produkte haben meist einen 3'-A-Überhang, ansonsten kann ein „A-Tailing“ angeschlossen werden.)

Um die Klonierung unspezifischer Produkte zu vermeiden, wurden PCR-Produkte erst über ein Agarosegel aufgetrennt, die entsprechende Bande ausgeschnitten und eluiert (2.35). Es folgte die Standard A Tailing Prozedur nach Herstellerangaben.

Die Ligationen wurden wie in der Anleitung angegeben durchgeführt. Abweichend hiervon setzte man jedoch nur 25 ng Vektor pro Ansatz ein. Die Reaktionen fanden ü. N. bei 4 °C statt.

### 2.30.2 Klonierung der LOX cDNA in den Expressions-Vektor pIVEX 2.3

Die LOX-cDNA integrierte nach der *in vivo* Expression als Insert im Vektor pBluescript<sup>®</sup> SK +/- (Stratagene). Für weitere Untersuchungen war die Subklonierung in einen Expressionsvektor notwendig. Hierfür wurde pIVEX 2.3 aus dem „Rapid Translation System RTS 500“ von Roche genutzt. Dieses Plasmid hat den Vorteil, dass es sowohl für die Expression in *E. coli* als auch im zellfreien System geeignet ist. Die Ligation erfolgte über „sticky ends“, so erreichte man eine gerichtete Klonierung. Ansonsten wäre die spätere Expression nicht möglich.

Die Klonierungsstrategie ist im Ergebnisteil ausführlich beschrieben.

## 2.31 Expression der LOX-cDNA

### 2.31.1 Expression in *E. coli*

Die *E. coli* Stämme M15 [pREP4] und SG 13009 [pREP4] (beide aus dem QIAexpress Kit, Qiagen) wurden als Wirtsbakterien eingesetzt. Die Bakterien wurden mit der cDNA transformiert (s. 2.33) und die entstandenen Klone mittels Restriktionsanalysen sowie Sequenzierungen überprüft.

Damit wurden im kleinen Maßstab Vorversuche durchgeführt. Man impfte aus einer Übernachtvorkultur 10 ml LB Medium<sub>Amp,Kan</sub> (inkl. 25 µg Kanamycin/ml, 100 µg

Ampicillin/ml) an und ließ die Zellen bis zur einer  $OD_{600}$  von 0,5 – 0,7 bei 37 °C heranwachsen.

Nach Induktion durch IPTG (Endkonzentration 1 mM) fand die weitere Kultivierung ü. N. bei niedrigeren Temperaturen statt. Es wurden Temperaturen zwischen 15 und 26 °C getestet. Zusätzlich wurde überprüft, ob die Zufuhr von Ethanol eine positive Auswirkung auf die Expression hatte.

Die präparativen Ansätze wurden in einem größeren Maßstab vorgenommen. Für die Vorkulturen wurden 50 ml, für die Hauptkulturen (mehrere) Kolben mit 250 ml genutzt. Die Anzucht nach Induktion fand mit einer leicht verringerten IPTG Konzentration (ca. 0,95 mM) bei 15 °C statt.

Kontrollansätze waren einerseits nicht transformierte M15 bzw. SG13009 Kulturen (angezogen in  $LB_{Kan}$ , mit 25 µg Kanamycin/ml) andererseits nicht induzierte Kulturen. Die Kontrollansätze wurden ohne IPTG-Induktion unter ansonsten identischen Bedingungen wie die Testansätze angezogen.

Die Aufarbeitung der LOX fand wie unter 2.16.3 beschrieben statt.

### **2.31.2 Zellfreie Expression**

Das „Rapid Translation System RTS 500, *E. coli* Circular Template Kit“ von Roche kam hierbei zum Einsatz. Es wurde nach Herstellerangaben gearbeitet. Die Kontrollansätze wurden entsprechend behandelt, nur wurde hier der untransformierte Vektor genutzt. Die ausführliche Durchführung ist unter 2.16.4 beschrieben.

### **2.32 Aufzucht von *E. coli***

Die Kultivierung von *E. coli* fand, wenn nicht anders beschrieben, in LB- Medium (2.32) bei 37 °C statt. Zur Selektion war die benötigte Konzentration des jeweiligen Antibiotikums zugefügt worden. Flüssigkulturen wurden auf dem Schüttler, Festkulturen im Brutschrank angezogen.

Zusätzlich zu den unter 2.32 beschriebenen Medien kam bei Transformationen mit ultrakompetenten Zellen SOC-Medium zum Einsatz:

### **SOC Medium**

2,0 g	Trypton
0,5 g	Hefe Extrakt
1,0 ml	1 M NaCl
0,25 ml	1 M KCl

Autoklavieren, dann Zugabe von:

1,0 ml	2 M Mg <sup>2+</sup> Stock, sterilfiltriert
1,0 ml	2 M Glukose, sterilfiltriert

- **2M Mg<sup>2+</sup> Stock, 100 ml**

20,33 g	MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O
24,65 g	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O

Mit A. dest. auf 100 ml auffüllen und sterilfiltrieren.

Die fertige Lösung wurde in ein steriles Gefäß filtriert, bei -20 °C gelagert und immer nur bei Bedarf aufgetaut.

#### Anlegen von Glycerinkulturen:

Glycerinkulturen können bei -70 °C nahezu unbegrenzt gelagert werden. 800 µl einer Vorkultur wurden mit 200 µl 99% (v/v) Glycerin in einem verschraubbaren Eppendorfgefäß gemischt und bei -70 °C gelagert.

### **2.33 Transformation von *E. coli***

Für die Transformation wurden meist selbst hergestellte kompetente *E. coli* genutzt, für einige Ansätze (Ligationen mit nur wenig Ausgangsmaterial) jedoch ultrakompetente Zellen vom Typ JM 109 Competent Cells, High Efficiency, Promega.

#### **2.33.1 Herstellung kompetenter Zellen**

Eine Übernachtskultur des jeweiligen Bakterienstamms wurde in 250 ml frisches Medium überimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von ungefähr 0,5 (dem Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase) bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Man zentrifugierte die Bakterien 10 min bei 4000 rpm und resuspendierte das Pellet in 75 ml kaltem TFBI. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurde abermals 10 min bei 4000 rpm (GS-3-Rotor) zentrifugiert. Das Pellet suspendierte man in 10 ml kaltem TFBII. Die Bakterien wurden in Aliquots von 200 µl in vorgekühlten Eppendorfgefäßen

in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei – 70 °C gelagert.

- **TFB I**

100 mM	RbCl
45 mM	MnCl
35 mM	Kaliumacetat
10 mM	CaCl <sub>2</sub>
0,5 mM	LiCl
15%, v/v	Glycerin

pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure einstellen
- **TFB II**

10 mM	MOPS
75 mM	CaCl <sub>2</sub>
10 mM	RbCl
15%, v/v	Glycerin

pH 7,0 mit 0,1 M NaOH einstellen

### 2.33.2 Transformation

#### A. Transformation der *E. coli* Stämme DH5 $\alpha$ , M15 und SG 13009

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, anschließend mit dem jeweiligen Plasmid (ca. 100 ng) oder der Ligation vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein 2minütiger Hitzeschock von 42 °C und eine weitere Inkubation auf Eis von 2 min. Nach Zugabe von 800  $\mu$ l LB-Medium wurden die Zellen zwecks Regeneration 1 h bei 37 °C auf dem Thermoschüttler inkubiert. Anschließend plattierte man die Zellen auf Selektionsmedium aus.

#### B. Transformation von JM 109 ultrakompetenten Zellen

Pro Ligation wurden 2  $\mu$ l in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß auf Eis vorgelegt. Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und je 50  $\mu$ l zu den vorbereiteten Tubes gegeben. Man mischte vorsichtig und inkubierte die Transformationsansätze 20 min auf Eis. Es folgte ein Hitzeschock von 45 – 50 s auf 42 °C, dann eine weitere Inkubation auf Eis für 2 min. Zur Regeneration gab man 950  $\mu$ l SOC Medium zu den Zellen und beließ sie für 1,5 h auf dem Schüttler bei 37 °C. Die Transformanten wurden auf Selektionsmedium ausplattiert.

## 2.34 DNA Gelelektrophorese

Die Auftrennung der zu untersuchenden DNA erfolgte im Allgemeinen durch Elektrophorese in 0,6 – 2, 0% (w/v) Agarosegelen. Die Agarose wurde durch Aufkochen in 1 x TAE Puffer gelöst, nach Abkühlung auf 65 °C mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 25 – 5 µg/ml) versetzt und in den vorbereiteten Gelträger (inkl. Kamm) gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde es in eine mit 1xTAE Puffer befüllte Elektrophoresekammer überführt und der Kamm entfernt. Die in 1x „Loading-Solution“ vorbereiteten DNA-Proben wurden in die entstandenen Taschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 40 – 150 V für 0,5 – 4 h, je nach Gelgröße und erwünschter Auftrennung. Zur Größen- und Konzentrations-Kontrolle wurden geeignete Marker aufgetragen (2.2).

- **20x TAE**

800 mM Tris-HCl, pH 7,9

400 mM Natriumacetat

40 mM EDTA, pH 7,9

- **10x Loading Solution**

10% (w/v) Ficoll

0,25% (w/v) Bromphenolblau

0,25% (w/v) Xylenxyanol

0,25 M EDTA, pH 8,0

## 2.35 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

### 2.35.1 Extraktion von DNA mithilfe silanisierter Glaswolle

Die zu isolierenden Fragmente wurden nach der Agarosegelelektrophorese unter UV-Licht mit einem Skalpell vorsichtig ausgeschnitten. Sie wurden in Eppendorfgefäße überführt, welche bis zum Konus mit silanisierter Glaswolle gefüllt waren, unten im Boden der Gefäße war ein kleines Loch gebohrt worden. Man setzte ein weiteres

Reaktionsgefäß zum Auffangen der isolierten DNA darunter und zentrifugierte 5 – 10 min bei 13000 rpm. Die DNA gelangte als wässrige Lösung in das Auffanggefäß und wurde mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5,6) und 2 Vol. Ethanol abs. gefällt (mind. 20 min, -20 °C). Die DNA pelletierte durch Zentrifugation (20 min, 13000 rpm), wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und anschließend in TE aufgenommen.

- **TE**  
10 mM Tris-HCl, pH 7,6  
1 mM EDTA, pH 7,6

### **2.35.2 Extraktion von DNA aus Agarosegelen mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit**

Hierbei wird die DNA bei niedrigem pH und hoher Salzkonzentration an Silica-Partikel gebunden. Durch mehrere Waschschrte werden Agarose, Salze und Ethidiumbromid entfernt. Die DNA eluiert bei niedriger Salzkonzentration und neutralem bis leicht alkalischem pH.

Das QIAEX II-Kit, (Qiagen) wurde nach Herstellerangaben verwendet. Die DNA wurde mit nukleasefreiem Wasser eluiert.

### **2.36 Amplifikation von DNA mittels PCR**

Die „Polymerase Chain Reaktion“ (PCR) ist eine Methode, um bestimmte DNA-Abschnitte *in vitro* zu vermehren. Benötigt werden eine DNA Matrize (Template) und zwei Oligonukleotide (Primer) mit der jeweils komplementären Sequenz zum Plus- bzw. Minus-Strang des Templates.

Die Primer dienen als Startmoleküle für eine Reihe (Zyklen) von enzymatisch gesteuerten Reaktionen, wobei jeder Zyklus aus drei Teilschritten besteht. Im ersten erfolgt die Denaturierung der Template-DNA durch Hitze (94 °C), dann das „Annealing“ der Primer, d.h. die Hybridisierung der Primer an die komplementären Sequenzen der Template-DNA. Eine thermostabile DNA-Polymerase beginnt im dritten Schritt mit der Synthese (Extension) der neuen DNA.

Durch die Wiederholung dieser drei Schritte entsteht, da die neu entstandenen Fragmente ebenfalls wieder als Matrize dienen, ein DNA-Doppelstrang, welcher an

seinen Enden von den Sequenzen der eingesetzten Primer flankiert wird. Es kommt so zu einer exponentiellen Amplifikation des gewünschten Teilstücks.

Da sowohl die PCR-Reaktionsansätze als auch die benötigten PCR-Programme in Abhängigkeit von der jeweiligen Aufgabenstellung und der eingesetzten Primer stark variieren können, sind hier nur beispielhaft je ein Programm/Reaktionsansatz genannt.

- **PCR Standardansatz für Plasmide**

1,0 µl	Template DNA (100 ng)
1,0 µl	dNTP-Mix (0,2 mM je Nukleotid)
5,0 µl	10x Polymerase Puffer
2,5 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
1,0 µl	Polymerase
1,0 µl	„upstream“ Primer (10 mM)
1,0 µl	„downstream“ Primer
12,5 µl	A. reinst

- **PCR Programm zur Amplifikation von Plasmiden**

1 x	Denaturieren	94 °C	2 min
30 x	Denaturieren	94 °C	30 s
	„Annealing“	50 –65 °C <sup>1)</sup>	30 s
	Synthese	72 °C	45 s
1 x	„Fill in“	72 °C	7 min

<sup>1)</sup> „Annealing“-Temperatur ist abhängig von den Schmelztemperaturen der Primer.

## 2.37 Restriktionsverdau von DNA

Analytische Untersuchungen wurden gemäß dem unten stehenden Standardansatz durchgeführt. Für präparative Arbeiten wurden die Mengen entsprechend angepasst.

- **Restriktionsansatz**

5 µl	DNA (ca. 100 ng)
1 µl	10x Puffer <sup>2)</sup>
0,2 µl	Restriktionsenzym
3,8 µl	A. reinst

<sup>2)</sup> Falls vom Hersteller keine andere Konzentration vorgeschrieben wurde.

## 2.38 Plasmidpräparationen

Es wurden nur Miniplasmidpräparationen durchgeführt. Für rein analytische Versuche wurden STET-Minipräparationen, für alle anderen Untersuchungen die Mini-Plasmidkits der Firmen Genomed und Promega („JETstar Mini“; „Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System“) genutzt.

### 2.38.1 STET-Miniplasmidpräparationen

1,5 ml einer Übernachtskultur wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und 3 min bei 1300 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 110 µl STET-Puffer resuspendiert, 30 s in einem kochenden Wasserbad inkubiert und anschließend 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Mit einem sterilen Zahnstocher entfernte man das Pellet und fällte die DNA mit 110 µl Isopropanol. Es wurde wiederum für 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet kurz getrocknet. Man nahm es in 50 µl TE und 0,5 µl RNase (10 mg/ml) auf. Die Plasmide konnten bei -20 °C gelagert werden.

- STET-Puffer

Saccharose	8%
Triton X-100	5%
EDTA	50 mM
Tris/HCl (pH 8,0)	50 mM

Unmittelbar vor Gebrauch wurde dem Puffer Lysozym (Endkonzentration 0,5mg/ml) zugesetzt.

### 2.38.2 Miniplasmidpräparationen für Sequenzierungen

Für viele Anwendungen, z. B. für Sequenzierungen, war Plasmid-DNA von hoher Reinheit notwendig. Diese wurde mit dem „JETstar Mini“-Kit von Genomed oder mit dem „Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System“ von Promega isoliert. Die Anwendung erfolgte nach Herstellerangaben.

## 2.39 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen wurden größtenteils mit dem „Automated Laser Fluorescent ‘ALF’-DNA-Sequencer“ von PHARMACIA BIOTECH durchgeführt, die Reaktionen mit dem „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ von Amersham Pharmacia Biotech.

Einige der Sequenzierungen gingen als Auftragsarbeit an die Firma SeqLab in Göttingen.

Vorgehen:

Ausführlich beschrieben wurden die einzelnen Arbeitsschritte bereits bei Seiler (1995). Abweichungen werden im Einzelnen unten aufgeführt.

- **6% Polyacrylamid-Sequenziergel**

30 g	Harnstoff
22 ml	A. reinst (nicht autoklaviert)
10,4 ml	Polyacrylamidlösung. (Rotiphorese <sup>®</sup> , Autoseq., 29:1, Roth)
6 ml	NF-TBE-Puffer (Roth)

Der Ansatz wurde gerührt, bis sich alles gelöst hatte und dann sterilfiltriert. Der Lösung wurden 25 µl TEMED und 200 µl 10% (w/v) APS zugeführt. Man mischte kurz und goss die Gellösung in die vorbereitete Apparatur. Während das Gel polymerisierte, konnten die Sequenzierreaktionen vorbereitet werden:

- **„Premix“**

2 µg	Plasmid-DNA
1 µl	fluoreszenzmarkierter Sequenzierprimer (0,5 pmol/µl)
x µl	A. reinst (ad. 24 µl; nicht autoklaviert)

- **„Cycle Sequencing“ Reaktionsansatz** (In je ein 200 µl Gefäß eines PCR-Stripes vorbereiten.)

2 µl	A/C/G/T-Reagenz
6 µl	„Premix“

Zum Schluss wurde der Ansatz mit 20 µl Mineralöl überschichtet. Es wurde das folgende PCR-Programm eingesetzt.

- **Standard PCR Programm**

1 x	Denaturieren	94 °C	5 min
30 x	Denaturieren	94 °C	30 s
	„Annealing“	50 – 65 °C <sup>1)</sup>	30 s
	Synthese	72 °C	45 s
1 x	„Fill in“	72 °C	5 min

<sup>1)</sup>Die „Annealing“-Temperatur ist abhängig von den Schmelztemperaturen der Primer.

Nach der PCR wurden die Reaktionen mit je 4 µl Ladungspuffer versetzt und kurz vor dem Auftragen denaturiert. Pro Gel-Spur wurden 6 – 8 µl eingesetzt. Die Laufparameter waren 1500 V, 38 mA, 34 W, 40 °C und 2 s Sampling Interval. Ein Lauf dauerte zwischen 6 und 10 Stunden.

## 2.40 Computergestützte Auswertung der Daten

Die genutzten Programme und Datenbanken werden ausführlich im Ergebnisteil beschrieben.

### 3 Ergebnisse

Lipoxygenasen (LOX) sind nicht-Häm-Eisen-haltige Dioxygenasen, welche die Oxygenierung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit cis,cis-1,4-Pentadienstruktur katalysieren. Sie sind sowohl im Pflanzen- als auch im Tierreich weit verbreitet (1.2).

Während die Säuger-LOX bereits recht gut charakterisiert sind, ist das bei den pflanzlichen LOX nicht der Fall, obwohl auch hier bereits eine Vielzahl von LOX-Enzymen beschrieben wurde. LOX treten bei fast allen wichtigen Prozessen des pflanzlichen Lebens in Erscheinung. Ihnen wird z. B. eine wichtige Rolle bei der Entwicklung, Differenzierung und bei Reaktionen auf biotischen sowie abiotischen Stress zugeschrieben. Dabei scheint ein Zusammenhang zwischen der hohen Anzahl von LOX-Isoenzymen und den unterschiedlichen physiologischen Aufgaben zu bestehen. Als Substrat kommen freie Fettsäuren, vor allem Linol- und Linolensäure, sowie membrangebundene Fettsäureester in Frage (Grechkin 1998). Die LOX-Produkte werden als Oxylipine bezeichnet. „Oxylipine“ steht dabei als Oberbegriff für alle Oxidations-Produkte ungesättigter Fettsäuren (Grechkin 1998).

In Weizen-Blättern und Weizen-Suspensionskulturen wurden von Bohland (1997) und Loers (1999) unterschiedliche induzierbare LOX detektiert. Im Vordergrund beider Arbeiten stand die biochemische Untersuchung einer 92 kDa großen LOX (LOX-92), welche als Folge von Pathogenbefall (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici*, Weizenschwarzrost, „Infektion“) bzw. Elicitierung (Pgt-Elicitor, „Pgt“ = *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici*-Elicitor) induziert wird.

Diese Arbeit schließt an die vorangegangenen Untersuchungen an, wobei die Möglichkeiten der rein biochemischen Methoden zur Charakterisierung der LOX-Spezies nahezu erschöpft waren. Um ein vollständigeres Bild zu erhalten, wurde in dieser Arbeit Wert auf die Verknüpfung zwischen diesen und molekularbiologischen Arbeiten gelegt.

Im ersten Teil (Kapitel 3.1) werden die Daten der protein-biochemischen Charakterisierung der im Weizen natürlich vorkommenden LOX zusammengefasst und ergänzt. Im Vordergrund stand die weitere Analyse der pathogen- und elicitor-induzierbaren LOX. Dazu wurden u. a. Protein-Fingerprinting-Experimente und 2-D-Gelelektrophoresen eingesetzt.

Kapitel 3.2 beschäftigt sich mit rein molekularbiologischen Untersuchungen. Über RT-PCR und 3'-RACE konnten mit degenerierten Primern genspezifische Sonden konstruiert werden, welche für Expressionsanalysen sowie für die Isolierung einer vollständigen Weizen-LOX-cDNA (*LOX2 Ta1*) genutzt wurden.

Auf die Ergebnisse der Expression dieser cDNA sowohl in *E. coli* als auch im zellfreien System wird im vorletzten Kapitel 3.3 eingegangen. Hier standen wiederum biochemische Untersuchungen, wie Enzymaktivitätsmessungen, Western-Analysen und Positionsspezifität-Untersuchungen im Vordergrund.

Im letzten Kapitel (3.4) werden die erhaltenen Daten computergestützt aufgearbeitet. Die Vergleiche mit anderen beschriebenen pflanzlichen LOX erbrachten weitere Erkenntnisse über die mögliche Funktion dieser LOX (*LOX2 Ta1*):

.

### **3.1 Pathogen- und Elicitor-induzierbare LOX in Weizen: Protein-biochemische Arbeiten**

#### **3.1.1 Induzierbare Weizen-LOX im Rohextrakt - Zusammenfassung vorliegender Daten in Ergänzung mit neuen Ergebnissen**

##### **3.1.1.1 Immunodetektion**

Wie bereits oben beschrieben reagieren Weizen-Pflanzen sowohl nach Elicitierung (Pgt-Elicitor, Meja; s. 2.15) als auch nach Infektion mit dem Weizenschwarzrost (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici*) während der inkompatiblen Interaktion mit einer Erhöhung der LOX-Enzymaktivität. Diese Reaktion ist jedoch nur in Weizen-Pflanzen, nicht aber in den entsprechenden Weizen- Suspensionskulturen zu beobachten. In diesem Modell-System bewegt sich die LOX-Enzymaktivität während der gesamten Kulturperiode auf einem vergleichsweise hohen Level. Eine weitere Steigerung der Aktivität als Reaktion auf Elicitierung ist nicht erreicht worden (Bohland 1997).

In den Westernblot-Analysen (2.21) der Rohextrakte (2.16.1) aus Weizen-Pflanzen und den Suspensionskulturen wurden bereits von Bohland (1997) mit Anti-LOX-Antikörpern unterschiedliche LOX-Proteine detektiert. Zur Einführung in das Thema sind in Tabelle 3.1 einige der im Rohextrakt nachgewiesenen LOX zusammengefasst (Bohland 1997; Bohland et al. 1997; Loers 1999). Wichtig ist der Zusammenhang zwischen der Signalstärke bei der Immunodetektion und der korrespondierenden Enzymaktivität. Meist besteht ein direkter Zusammenhang zwischen diesen beiden Größen. Um die Tabelle möglichst übersichtlich zu gestalten, wird auf die Aufführung aller bisher detektierten LOX bewusst verzichtet. U. a. fehlt eine 110 kDa LOX in dieser Aufzählung, da diesem Protein in Folgeexperimenten keinerlei Enzymaktivität zugeordnet werden konnte (Bohland 1997), obwohl mittels Immunodetektion ein deutliches Signal erkennbar war.

Im Rohextrakt von Weizen-Blättern und Weizen-Zellkulturen detektierte LOX				
System	Detektierte LOX-Spezies in kDa und deren Signalstärke im Immunoblot			Korreliert die Signalstärke mit der LOX-Enzym-Aktivität?
	92	100	103	
Blätter Pgt	++	+ <sup>(↓)</sup>	++	Ja (LOX-92), dagegen für LOX-103 nicht nachweisbar
Blätter Meja	-	++	-	Ja, aber nur bis 12 h, danach fällt die Aktivität wieder ab, trotz Signalverstärkung
Blätter Kontrolle H <sub>2</sub> O	+/- <sup>1)</sup>	+	+/- <sup>1)</sup>	Ja
Blätter Infektion	+	+ <sup>2)</sup>	+/-	Ja (LOX-92), für LOX-103 nicht nachweisbar
Blätter Kontrolle Freon	+/- <sup>3)</sup>	+	+/- <sup>3)</sup>	Ja
Zellkulturen unbehandelt	++	-	-	Ja

**Tab. 3.1 Induzierbare LOX im Rohextrakt von Weizen-Blättern und Weizen-Zellkulturen**

(Zusammenfassung der Resultate von Bohland und Loers, welche in der vorliegenden Arbeit bestätigt wurden.)

Erläuterungen:

Pgt = Injektion des Pgt-Elitors [25µg/µl], Meja = Injektion von Methyljasmonat [50 µM], Kontrolle A. reinst = Kontrollansatz (Injektion von A. reinst) für Pgt und Meja, „Infektion“ = Inokulation mit Uredosporen des Weizenschwarzrostes, Kontrolle Freon (Trägersubstanz für Uredosporen) = Kontrollansatz zu „Infektion“; Zellkulturen = unbehandelte Suspensionskulturen

(↓) Das Signal wird schwächer (im Vergleich zum Kontrollansatz).

- 1) Die 92er bzw. 103er Banden konnten bei den Kontrollansätzen nicht regelmäßig und lediglich mit einem speziellen Antikörper (Anti-Reis-LOX-Antikörper) nachgewiesen werden. Auch waren die erhaltenen Signale sehr schwach.
- 2) Das Signal bleibt gleich stark im Vergleich zum Kontrollansatz.
- 3) Hier waren die Signale, unabhängig vom verwendeten Antikörper, nur sehr schwach. Zeitweise war kein Signal erkennbar.

In obiger Tabelle werden drei induzierbare LOX-Spezies vorgestellt. Dabei handelt es sich um eine 92 kDa LOX (LOX-92), welche in den Weizen-Zellkulturen konstitutiv und in den Weizen-Pflanzen nach Induktion durch den Pgt-Elicitor (Pgt) und nach Inokulation mit dem Weizenschwarzrost („Infektion“) gebildet wird; eine 103 kDa LOX (LOX-103), ebenfalls Pgt-induziert, sowie eine 100 kDa LOX (LOX-100), die durch Behandlung mit dem Signalmolekül Methyljasmonat (Meja) verstärkt wird. Die beiden letztgenannten Spezies wurden auch in Chloroplasten-Fractionen (Bohland 1997) nachgewiesen. Im Laufe dieser Arbeit gewann die mutmaßlich in den Plastiden lokalisierte LOX-103 immer mehr an Bedeutung. Es wird daher auch auf die subzelluläre Lokalisation von Lipoxygenasen im Weizen eingegangen (3.1.2.3.1).

Hervorzuheben ist der folgende Sachverhalt: Die Signalstärke der im Rohextrakt detektierbaren 92er LOX-Bande korreliert immer mit der LOX-Gesamtzym-Aktivität, d. h. eine Verstärkung des Signals im Westernblot stand auch immer einer Zunahme der LOX-Enzymaktivität gegenüber.

Ganz anders ist jedoch die Situation nach Meja-Injektion: Hier wird im Rohextrakt die Induktion einer LOX-100 nachgewiesen. Während der ersten 12 h beobachtet man auch hier eine direkte Abhängigkeit von LOX-(Gesamt)-Enzymaktivität und der Signalstärke der 100er Bande im Westernblot (Bohland 1997). Nach 12 h ist die LOX-Enzymaktivität wieder rückläufig, während das Antikörper-Signal der 100er Bande weiter verstärkt wird (Bohland 1997). Damit drängt sich die Vermutung auf, dass die Erhöhung der LOX-Enzymaktivität nach Injektion von Methyljasmonat (Meja) nicht bzw. nicht allein auf die im Rohextrakt detektierten LOX-100 zurückzuführen ist. Die spätere Anreicherung der LOX über Anionenaustausch-Chromatographie (IAC; 2.16) scheint den Verdacht zu bestätigen, dass für die LOX-Enzym-Aktivitätszunahme nach Meja-Injektion hauptsächlich ein anderes LOX-Protein, nämlich ebenfalls eine LOX-92, verantwortlich ist. In Abschnitt 3.1.2.1 wird auf die Klärung dieser Frage näher eingegangen.

### **3.1.1.2 Enzymaktivität**

Zuerst stand aber die weitere Analyse der Enzym-Aktivität der Rohextrakte im Vordergrund. Es wurden neben den von Loers und Bohland durchgeführten Tests

zwei weitere Behandlungen zur Induktion von Lipoxygenasen in die Untersuchungen mit einbezogen:

- Von Mauch et al. (1997) wurde die Induktion einer „touched-induced“ LOX in Weizenpflanzen der Sorte 75141 durch „Wind“ (s. 2.1.3) beschrieben. Die Induktion dieser LOX war auch in Enzymrohextrakten des vorliegenden Pflanzenmaterials (*Triticum aestivum* L. Prelude-Sr5) nachweisbar. Die zugehörige Weizen-LOX-cDNA (*wci-2*) der „touched-induced“-LOX war von Prof. Dr. F. Mauch, (Dept. of Biol., Plant Biology, Univ. Fribourg, Schweiz) freundlicherweise für molekularbiologische Untersuchungen zur Verfügung gestellt worden. Die Enzymaktivitätstests waren u. a. für die Bewertung der im Kapitel B beschriebenen Northern-Analysen unverzichtbar.
- Des Weiteren wurde im Verlauf der molekularbiologischen Arbeiten mit einer Weizen-LOX-cDNA-Bank (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. R. Dudler, (Inst. f. Pflanzenbiologie, Univ. Zürich, Schweiz) gearbeitet, welche nach Inokulation mit Sporen des Gerstenmehltaus konstruiert wurde. In diesem Fall musste vor den Arbeiten mit dieser cDNA-Bank sichergestellt werden, dass nach Inokulation mit Sporen des Gerstenmehltaus eine LOX-Induktion stattfindet. Folglich waren auch hier Enzymaktivitätsbestimmungen notwendig.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Ergebnisse von Bohland (1997) und Loers (1999) ansonsten bestätigt und durch die beiden letztgenannten Untersuchungen ergänzt. In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen dargestellt.

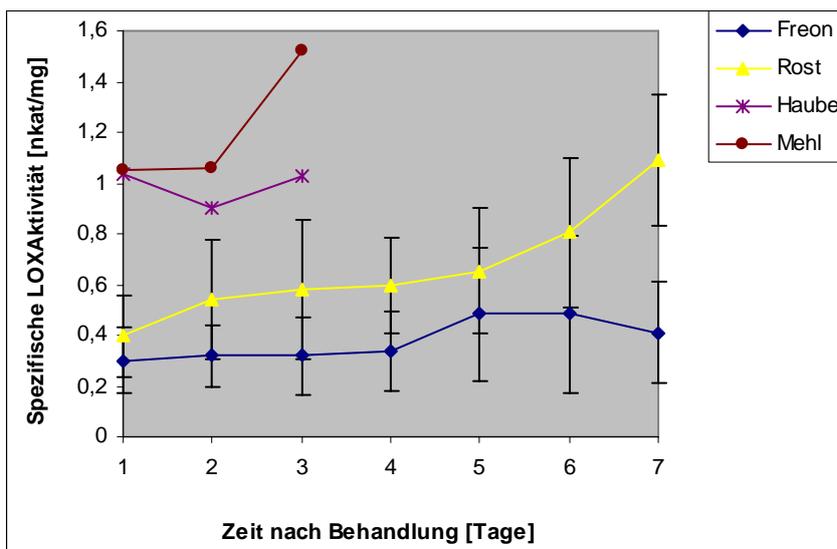
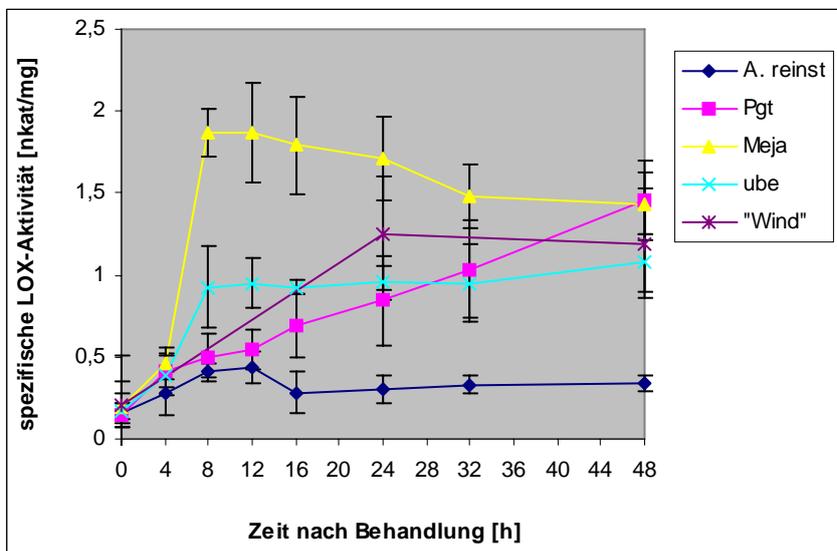
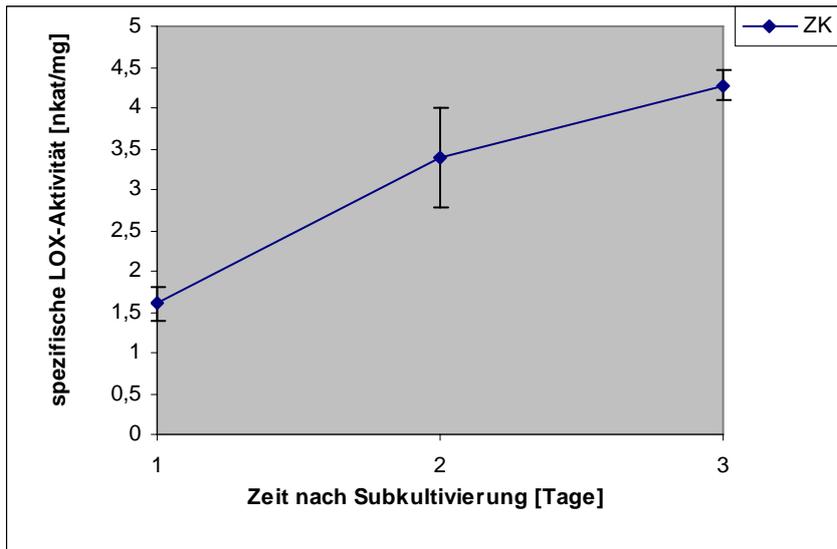


Abb. 3.1 Spezifische LOX-Enzymaktivität (nkat/mg) in Rohextrakten von Weizen-Zellkulturen (a) und -Blättern (b + c) (Fortführung der Legende s. nächste Seite)

**Abb. 3.1 Spezifische LOX-Enzymaktivität (nkat/mg) in Rohextrakten von Weizen-Zellkulturen (a) und -Blättern (b + c)**

Erläuterungen:

- a) ZK: Zellkulturen, unbehandelt (2.11)
- b) A. reinst: Kontrollansatz (H<sub>2</sub>O, Wasserkontrolle) für Pgt und Meja (2.15); Pgt: Behandlung mit dem Pgt-Elicitor [25µg/µl]; Meja: Injektion von Methyljasmonat [50 µM], ube: unbehandelte Pflanzen, Kontrolle für „Wind“; „Wind“: Induktion einer „touched-induced“ LOX (2.14)
- c) „Rost“, „Mehl“: Inokulation mit dem Weizenschwarzrost (2.12) bzw. Gerstenmehltau (2.13); Freon: Kontrollansatz für die Rostpilz-Inokulation; Haube: Kontrollansatz für Mehltau-Inokulation (2.12; 2.13)

Für die Rohextrakte wurden jeweils zwei Weizen-Primärblattabschnitten bzw. 0,06 g Weizen-Zellkulturen aufgearbeitet (2.16.1). Es wurden pro Messzeitpunkt jeweils vier Proben in die Auswertung aufgenommen.

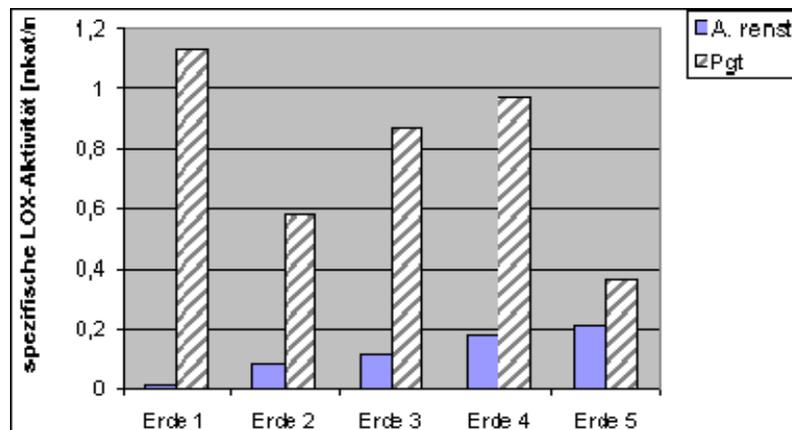
Ausnahmen: Die Rohextrakte nach „Wind“-Induktion bzw. Inokulation mit dem Gerstenmehltau dienten nur als Kontrollansätze für Northern-Analysen (3.2.3) eine statistische Auswertung fehlt daher.

Die Darstellung zeigt, dass die maximale Enzymaktivitätssteigerung in Abhängigkeit von den vorangegangenen Behandlungen zu z. T. sehr unterschiedlichen Zeitpunkten erreicht wird. Nach Methyljasmonat-(Meja-)Injektion wurde die höchste Aktivität z. B. schon nach 10 h, nach Rostpilz-Inokulation dagegen erst nach 7 Tagen gemessen. Bei den gewählten Beispielen wird daneben auch eine große Differenz in den absoluten Maximal-Werten ersichtlich.

Auch bei gleich behandelten Pflanzen kam es zeitweise zu erheblichen Schwankungen der LOX-Enzymaktivität. Hier konnte eine Abhängigkeit von nicht immer stabilen äußeren Faktoren, wie z. B. der Charge der Einheitserde (s. Abb. 3.2), der gewählten Phytokammer (obwohl die Einstellungen der genutzten Kammern identisch waren) und sogar vom Standort der Pflanzen in der jeweiligen Kammer, beobachtet werden.

Beispielhaft für dieses Phänomen ist in Abbildung 3.2 die LOX-Enzymaktivität in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Chargen der genutzten Einheitserde dargestellt. Die Ansätze (pro Versuchsansatz wurden 12 Blätter geerntet) für diese Versuchsreihe wurden zeitgleich auf einem Tablett angezogen, d. h., alle anderen Bedingungen waren identisch. Dieses Beispiel zeigt, dass ein direkter Vergleich der absoluten Messwerte nur mit den jeweiligen parallel angesetzten Kontrollen

gerechtfertigt ist. Die statistische Relevanz der Enzymmessungen bleibt davon jedoch unbeeinträchtigt.



**Abb. 3.2 Beispiel für die Abhängigkeit der LOX-Enzymaktivität von äußeren Faktoren**

Demonstration der starken Schwankungen der LOX-Enzymaktivität in Abhängigkeit von einem äußeren Faktor (hier: unterschiedliche Chargen der Einheitserde), alle anderen Bedingungen wurden stabil gehalten. Pro Messpunkt wurden 6 Proben gemessen (entspricht 12 Weizenprimärblättern) und der Mittelwert gebildet. Es wurden 5 verschiedene Chargen der Einheitserde zeitgleich getestet (Erde 1 – 5).

Erläuterungen:

Pgt: Injektion des Pgt-Elicitors, 25µg/ml, 48 h; A. reinst: Injektion von H<sub>2</sub>O Kontrollansatz, 48 h

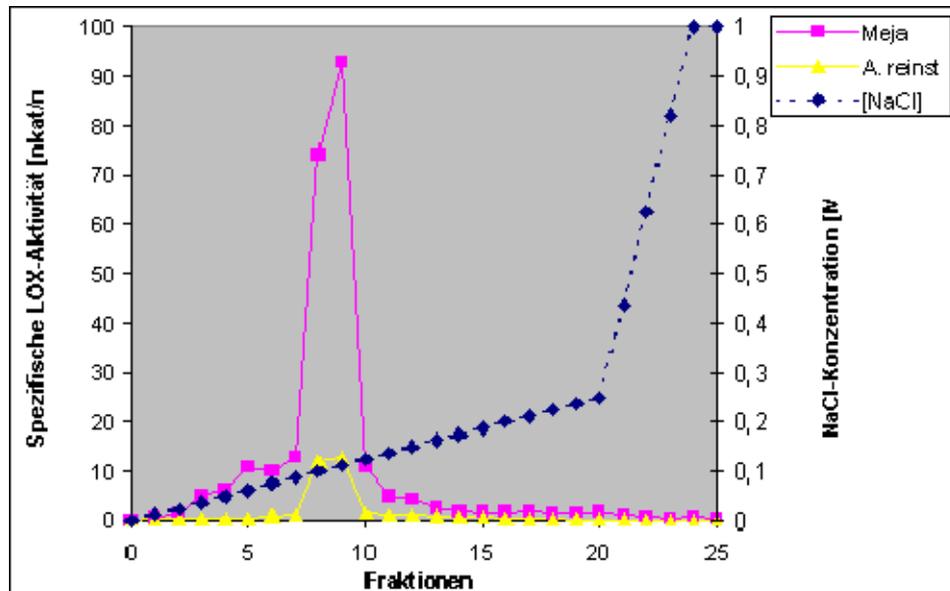
### 3.1.2 Anreicherung, Immunodetektion und Differenzierung induzierbarer Weizen-LOX

#### 3.1.2.1 Anreicherung mittels Anionenaustausch-Chromatographie (IAC)

Die Reinigung der Rohextrakte wurde über Anionenaustausch-Chromatographie (IAC, s. 2.16) vorgenommen. Hierfür wurden je 3 g Zellkulturen (3 d) bzw. 45 Primärblattabschnitte aufgearbeitet. Die einzelnen Behandlungen bzw. Kontrollansätze sind im Methodenteil (2.11- 2.15) beschrieben.

Der Verlauf einer Anionenaustauschchromatographie ist in Abb. 3.3 beispielhaft für die Anreicherung von LOX nach Behandlung mit dem Signalmolekül Methyljasmonat (Meja, 12 h) und den entsprechenden (Wasser-) Kontrollansätzen (A. reinst, 12 h) dargestellt. Die IAC wurde zur Gewinnung von ausreichendem Proteinmaterial

routinemäßig durchgeführt, d. h. dass insgesamt mehr als 100 IAC-Läufe (verschiedene Behandlungen) vorgenommen wurden.



**Abb. 3.3 Anionenaustauschchromatographie (IAC) nach Behandlung mit Methyljasmonat (Meja)**

Rohextrakte von mit Meja ([50 $\mu$ M], 12 h) bzw. mit A. reinst (Wasserkontrolle, 12 h) behandelten Weizenprimärblättern wurden über IAC fraktioniert. Von den einzelnen Fraktionen wurden Protein- und Enzymaktivitäts-Messungen durchgeführt.

Die IAC wurde standardmäßig zur Reinigung von LOX-Proteinen durchgeführt. Diese Darstellung steht daher beispielhaft für ca. 30 IAC nach Meja-Behandlung.

Bohland (1997) beschränkte seine Untersuchungen der induzierbaren Weizen-LOX im Wesentlichen auf die Untersuchung der durch den Pgt-Elicitor und Rostpilzinfektion induzierbare LOX-92. Nach Anreicherung über IAC fand er 80 % der LOX-Enzymaktivität immer in den Fraktionen 6 – 8. Mittels Immunodetektion mit einem Anti-Bohnen-LOX-Antikörper war in diesen Fraktionen immer eine 92 kDa große LOX (LOX-92) nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt wurde angenommen, dass die LOX-92 in Weizen-Blättern nur nach Induktion durch Injektion des Pgt-Elicitors bzw. durch Inokulation mit Uredosporen des Weizenschwarzrostes vorkommt. Der Grund für diese Annahme war, dass nur hier die LOX-92 im Rohextrakt nachweisbar war.

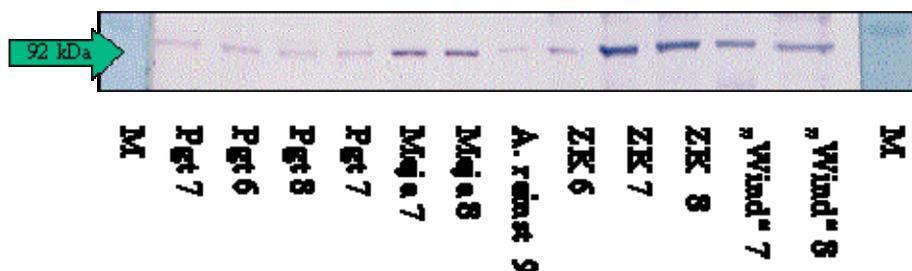
Loers machte dagegen 1999 die Beobachtung, dass in den LOX-aktiven IAC-Fractionen nach Meja-Induktion ebenfalls eine LOX-92 für rund 80 % der Gesamt-LOX-Enzymaktivität verantwortlich ist, hat dies aber nicht weiter verfolgt.

Interessant ist der Nachweis einer Meja-induzierten LOX-92 deshalb, weil diese im Rohextrakt (also ohne Anreicherung über IAC) mittels Antikörpernachweis nicht detektierbar ist. Dagegen kann man die Verstärkung des Signals einer 100 kDa LOX (LOX-100) im Rohextrakt nach Meja-Behandlung feststellen. Nach Anreicherung über IAC kann dieser LOX jedoch keine Enzymaktivität zugeordnet werden (Loers 1999). Es ist daher davon auszugehen, dass auch nach Meja-Behandlung eine LOX-92 für die Steigerung der Enzymaktivität verantwortlich ist und nicht wie anfangs angenommen eine LOX-100.

### 3.1.2.2 Immunodetektion der LOX-aktiven Fraktionen

In der vorliegenden Arbeit wurde nun untersucht, inwieweit die LOX-92 auch nach anderen Behandlungen für eine Steigerung der Enzymaktivität verantwortlich ist. Tatsächlich entfiel 80 – 90 % der LOX-Ausgangsaktivität nach Anreicherung der Rohextrakte über IAC bei allen untersuchten Proben (unabhängig von der vorangegangenen Behandlung) auf die Fraktionen 6 – 8, bzw. 7 – 9. In diesen Fraktionen wurde immer eine 92er LOX-Bande detektiert. Wichtig ist in diesem Zusammenhang auch der Nachweis einer 92er LOX in den Kontrollansätzen (A. reinst s. Abb. 3.4).

Die Immunodetektion der aktiven Fraktionen (mit jeweils mindestens 80 % der LOX-Enzymaktivität) ist in Abbildung 3.4 dargestellt. Es fehlt die Darstellung nach Rostpilz-Inokulation, da dies bereits ausführlich von Bohland (1997) und Loers (1999) behandelt wurde. Auch hier wurde eine 92 kDa LOX detektiert.



**Abb. 3.4 Immunodetektion von LOX-Proteinen nach IAC (2.1.6)**

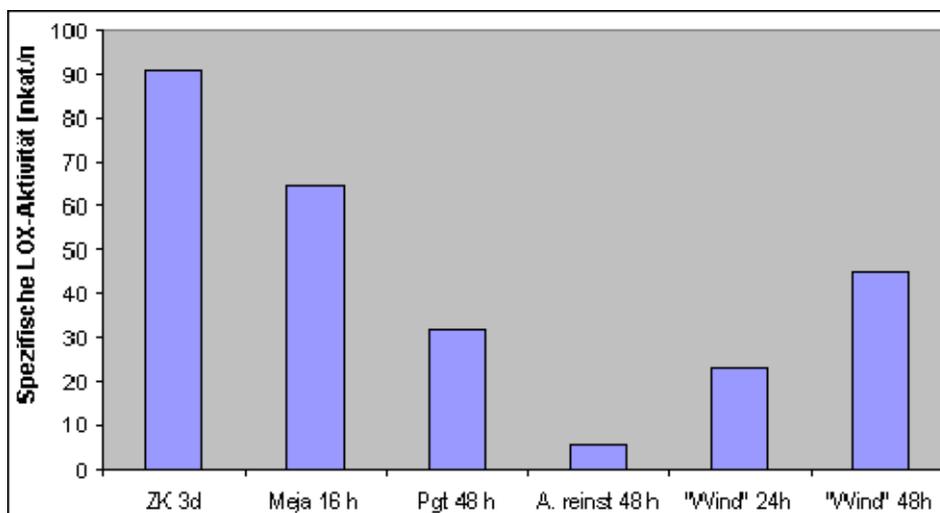
Dargestellt sind jeweils die Fraktionen mit mindestens 80 % der Gesamt-Lipoxygenase-Aktivität. (Fortführung der Legende s. folgende Seite)

**Abb. 3.4 Immunodetektion von LOX-Proteinen nach IAC (2.1.6)**

Erläuterungen:

M = Marker, 97 kDa; Behandlung: Pgt = Pgt-Elicitor, 48 h; Meja = Methyljasmonat, 12 h; „Wind“ = „touched induced“-LOX, induziert durch Wind, 48 h; A. reinst = Kontrollansatz, 48 h; ZK = Zellkulturen, 3 Tage; 6, 7, 8, 9 = Fraktionen 6, 7, 8, 9; (s.2.10; 2.1.3; 2. 14). Die Ergebnisse beruhen jeweils auf mindestens vier unabhängige Versuche.

Enzymmessungen zeigten, dass die LOX-92, je nach voran gegangener Behandlung, sehr unterschiedliche spezifische LOX-Enzym-Aktivität aufweisen (s. Abb. 3.5).



**Abb. 3.5 Die spezifische LOX-Enzymaktivität der aktiven IAC-Fraktionen**

Extrakte aus behandelten Weizen-Blättern und aus unbehandelten 3 Tage alten Zellkulturen (2.10; 2.11; 2.13; 2.14) wurden über IAC (2.16) fraktioniert. Die Fraktionen mit insgesamt 80 – 90 % der Aktivität (Fraktionen 6 – 8 bzw. 7 – 9) vereinigt und die spezifische Aktivität [nkat/mg] bestimmt. Hierbei handelt es sich um die Mittelwerte von je 6 unabhängigen Versuchen.

Erläuterungen:

Meja	Injektion von Methyljasmonat [50 µg]
Pgt	Injektion des Pgt-Elicitors [25µg/µl];
A. reinst	Wasser- Kontrollansatz
„Wind“	Induktion einer „touched-induced“ LOX, Ernte nach 24 h bzw. 48 h
ZK 3d	Enzymextrakt aus unbehandelten Zellkulturen, drei Tage nach Überimpfung

### 3.1.2.3 Versuche zur Differenzierung der induzierbaren Weizen-LOX

Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob die einzelnen LOX-92 identisch sind oder ob es sich um unterschiedliche LOX-Spezies handelt, die zufällig die molekulare Masse besitzen. Zu diesem Zeitpunkt gab es bereits mehrere Hinweise, dass mehr als eine 92 kDa große LOX-Spezies im Weizen existiert:

1. Der Nachweis einer LOX-92 nach Meja-Injektion (im Westernblot), welche in Rohextrakten nicht detektierbar ist, aber auf jeden Fall für über 80 % der Gesamtaktivität nach Induktion verantwortlich ist.
2. Der Nachweis einer LOX-92 in den Kontrollansätzen, auch hier ist in den Rohextrakten keine LOX-92 detektierbar.
3. Im IEF-Gel der aktiven LOX-IAC-Fractionen (LOX-92) detektierte Bohland (1997, Abb. 3.22) mehr als eine LOX-Bande nach der Immunodetektion mit Anti-LOX-Antikörpern.

Im nachfolgenden Text wird daher allgemein von den LOX-92 (Plural) gesprochen, nicht mehr von der LOX-92.

Eine Differenzierung einzelner LOX-92-Spezies war im Westernblot (Abb. 3.5) nicht möglich. Es musste daher nach alternativen Möglichkeiten gesucht werden. Als erstes wurde die subzelluläre Lokalisation der induzierbaren Weizen-LOX untersucht.

#### 3.1.2.3.1 Subzelluläre Lokalisation von Lipoxygenasen in Weizen

Viele der bekannten pflanzlichen Lipoxygenasen sind in den Chloroplasten lokalisiert (Feußner and Kühn 1995; Blee and Joyard 1996; Heitz et al. 1997; Vorös et al. 1998) Auch in Weizen-Pflanzen wurden von Bohland (1997) unterschiedliche Chloroplasten-LOX beschrieben. Im Wesentlichen sind bisher jedoch nur die LOX-Spezies nach Pgt-Elicitierung im Vergleich zur Kontrolle betrachtet worden. Die Untersuchungen sollten ausgeweitet werden, um einen Vergleich zu den im Rohextrakt detektierten induzierbaren Lipoxygenaseproteinen zu ermöglichen. Diese Versuche wurden größtenteils von Henrike Furken im Rahmen ihrer Staatsexamensarbeit (1999) durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse werden hier daher nur noch tabellarisch zusammengefasst. In Tabelle 3.2 sind die in der Chloroplasten-Fraktion und im Rohextrakt von Weizenprimärblättern detektierten LOX-Proteine dargestellt.

Induzierbare LOX im Rohextrakt und in Chloroplastenfraktionen										
Behandlung	LOX-Spezies (kDa) im Rohextrakt (R) bzw. in Chloroplasten (Chl)									
	92		97		100		103		110	
	R	Chl	R	Chl	R	Chl	R	Chl	R	Chl
Unbehandelt	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
A. reinst 24 h	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
A. reinst 48 h	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
Pgt 48h	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Meja 24 h	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+

**Tab. 3.2 LOX-Proteine in Rohextrakten und Chloroplastenfraktionen**

Erläuterungen:

R: Rohextrakt; Chl: Chloroplastenfraktion; A. reinst 24 h/48 h: Kontrollansätze mit A. reinst behandelte Blätter nach 24 h/48 h; Pgt 48 h: mit dem Pgt-Elicitor behandelte Pflanzen nach 48 h; Meja 24 h: mit Methyljasmonat behandelte Pflanzen nach 24 h

Insgesamt konnten 4 verschiedene LOX-Spezies in Weizenchloroplasten-Fractionen detektiert werden und zwar 97 kDa, 100 kDa, 103 kDa sowie 110 kDa groß. Während die anderen putativen Chloroplasten-LOX auch in den Kontrollansätzen nachweisbar sind, ist die 103 kDa LOX-Bande als einzige nur nach Elicitierung durch Methyljasmonat und Pgt-Elicitor sichtbar und sollte daher weiter untersucht werden. Die 92 kDa LOX ist dagegen nicht in den Chloroplasten nachweisbar, auch diese LOX-Spezies bleibt daher besonders interessant.

### 3.1.2.3.2 2-D-Elektrophorese

Die folgenden Arbeiten wurden mir freundlicherweise am Interdisziplinären Zentrum für klinische Forschung „Biomaterialien und Material-Gewebeinteraktion bei Implantaten“ (IZKF „BIOMAT“) des Universitätsklinikums Aachen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Willi Jahnen-Dechent ermöglicht.

Wie bereits im Methodenteil (2.20.3) beschrieben, dient die 2-D-Elektrophorese vor allem der Proteomanalyse. Als Proteom bezeichnet man die Gesamtheit aller Proteine, die zu einem bestimmten Zeitpunkt vom Genom einer Zelle oder eines Organismus exprimiert werden (Wilkins and Williams 1997). Das Proteom ist im Gegensatz zum Genom nicht statisch, sondern ständiger Veränderung unterworfen. Proteomanalysen sind daher als wichtige Ergänzung zu Genomanalysen anzusehen.

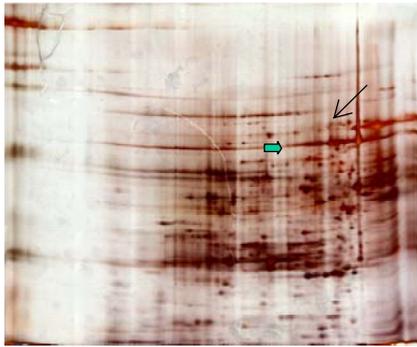
Hier sollte nur ein Teil des Proteoms untersucht werden, nämlich die zu einem bestimmten Zeitpunkt in Weizen-Blättern und Weizen-Zellkulturen aktiven LOX-Spezies. Speziell sollte herausgefunden werden, inwieweit Unterschiede bei den nach IAC im Western-Blot klassifizierten „LOX-92“-Fraktionen bestehen. Da die Trennleistung um ein Vielfaches höher als bei eindimensionalen Verfahren ist, ist im Prinzip auch die Differenzierung von Isoenzymen möglich. Dazu wurden jeweils die aktiven IAC-Fraktionen (2.16) eines Laufs vereinigt und mittels Ultrafiltration (Centricon-50-Konzentratoren; Bohland 1997) eingeeengt und für je ein Gel genutzt. Da das native Protein für die Untersuchungen benötigt wurde, waren die für die Protein-Sequenzierung genutzten Methoden zur weiteren Anreicherung des Proteins nicht geeignet.

Durch Vorversuche (Bohland 1997; Loers 1999) war bekannt, dass der isoelektrische Punkt (IEP) der aktiven LOX-Fraktionen zwischen pH 4 – 7 liegt. Für die erste Dimension (2.20.3.A.) wurden daher IPG-Strips (IPG-Ready Strips 17 cm, Bio-Rad) mit pH 4 –7 eingesetzt. Das sind Gele mit immobilisiertem pH-Gradienten (IPG). Die zweite Dimension (2.20.3.B.) fand als vertikale SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (12 %) statt. Die fertigen Gele wurden entweder auf Nitrocellulose geblottet und einer Immunodetektion unterzogen oder direkt gefärbt. Anhand der entstandenen Muster sollten die LOX-Enzyme unterschieden werden. Es kamen dabei unterschiedliche Nachweismethoden zum Einsatz: (Abb. 3.6)

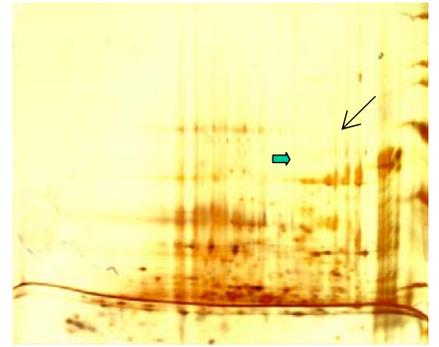
1. Die Silberfärbung der SDS-Gele (Positiv-Färbung; Gele a, b, e, f, g). Diese Färbemethode ist sehr sensitiv aber auch stark fixierend. Silbergefärbte Gele können nicht mehr für einen Western-Blot und so auch nicht mehr für die anschließende Immunodetektion eingesetzt werden.
2. Die Zink-Imidazol-Färbung (Negativ-Färbung; nur Gel c). Diese Färbemethode ist nicht so sensitiv, wie die Silberfärbung, hat jedoch den Vorteil, dass die gefärbten Gele geblottet werden können und die Proteine anschließend für eine Immunodetektion zugänglich sind. Diese Methode wurde bei Gel c eingesetzt. Dieses Gel wurde zunächst mit Zink-Imidazol gefärbt, fotografiert und anschließend auf Nitrocellulose geblottet. Anschließend erfolgte die dritte eingesetzte Nachweismethode.

3. Die Immunodetektion mit einem Anti-Bohnen-LOX-Antikörper Gel d).

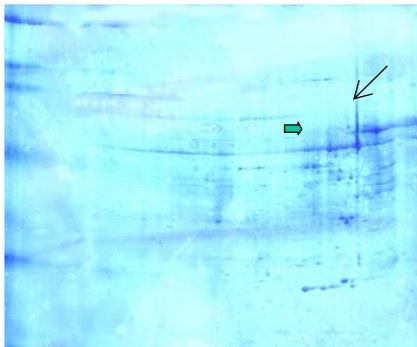
In allen sieben Gelen ist eine gute Trennleistung erkennbar. Aufgrund der vielen unterschiedlichen Spots ist die Identifizierung der LOX-92 erschwert. Daher war es zunächst notwendig, mehrere Gele mit gleichbehandeltem Ausgangsmaterial (gemeint sind die Gele a, c, und g, jeweils nach Induktion durch den Pgt-Elicitor) miteinander zu vergleichen. Zusätzlich wurde eines dieser Gele (Gel c, Pgt 2) nach der (reversiblen) Zink-Imidazol-Färbung zuerst dokumentiert und dann auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Anschließend fand die Immunodetektion mittels Anti-Bohnen-LOX-Antikörper statt. Es wurden insgesamt 6 Signale detektiert, wobei hervorgehoben werden muss, dass sie allesamt recht schwach waren: Zwei stärkere Signale lagen auf der Höhe von 92 kDa. Daneben war ein weitaus schwächeres Signal ebenfalls auf Höhe von 92 kDa erkennbar. Oberhalb von 92 kDa bei 103 kDa konnten zwei weitere Signale detektiert werden. Auch hier war ein drittes sehr schwaches Signal detektierbar. Anschließend wurde versucht, den Signalen der Immunodetektion einzelne Spots zuzuordnen (zur Orientierung Pfeile)



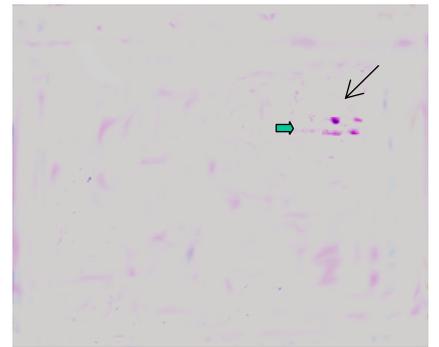
a) Pgt 1



b) A. reinst



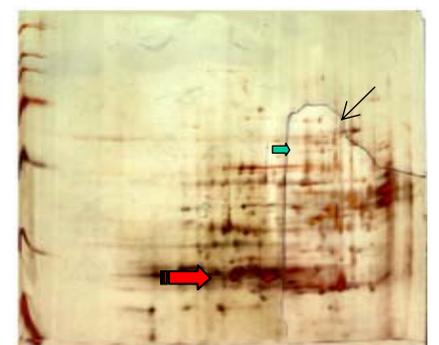
c) Pgt 2



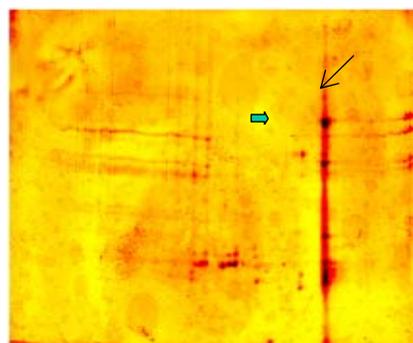
d) Pgt 2



e) Meja



f) ZK



g) Pgt 3

Abb. 3.6 2-D-Elektrophorese -Legende s. nächste Seite –

**Abb. 3.6****2-D-Elektrophorese**

Dargestellt sind die gefärbten 2-D-Gele (**a, b, c, d, f, g**) der LOX-aktiven IAC-Fractionen (s. 2.16) nach Pgt-, Meja- und Wasser-Behandlung bzw. von unbehandelten 3 Tage alten Zellkulturen sowie der Immunoblot von Gel **c** (**d**).

- |           |                                                                                                             |           |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>a)</b> | Silbergefärbtes 2-D-Gel von LOX-aktiven IAC-Fractionen (7 – 9; LOX-92) nach Pgt-Behandlung                  | Pgt 1     |
| <b>b)</b> | Silbergefärbtes 2-D-Gel von LOX-aktiven IAC-Fractionen (7 – 9; LOX-92) nach Wasser-Behandlung („Kontrolle“) | A. reinst |
| <b>c)</b> | Zink-Imidazol-gefärbtes 2-D-Gel von LOX-aktiven IAC-Fractionen (7 – 9; LOX-92) nach Pgt-Behandlung          | Pgt 2     |
| <b>d)</b> | Immunoblot von Gel d                                                                                        | Pgt 2     |
| <b>e)</b> | Silbergefärbtes 2-D-Gel von LOX-aktiven IAC-Fractionen (7 – 9; LOX-92) nach Meja-Behandlung                 | Meja      |
| <b>f)</b> | Silbergefärbtes 2-D-Gel von LOX-aktiven IAC-Fractionen (7 – 9; LOX-92) von unbehandelten Zellkulturen (3 d) | ZK        |
| <b>g)</b> | Weiteres silbergefärbtes 2-D-Gel von LOX-aktiven IAC-Fractionen (7 – 9; LOX-92) nach Pgt-Behandlung         | Pgt 3     |

Erläuterungen: (Zur besseren Orientierung wurden Pfeile in die Abbildungen integriert:)

-  Die kleinen dicken (grünen) Pfeile markieren die Höhe von 92 kDa.
-  Die schwarzen Pfeile entsprechen der Höhe der LOX-Signale nach der Immunodetektion von Pgt 1(e).
-  Die größeren dicken (roten) Pfeile weisen auf Spots hin, welche nach Meja-Behandlung bzw. in den Zellkultur-Fractionen besonders stark sichtbar waren.

Die Auswertung dieser Versuchsreihe wurde durch die folgenden Tatsachen stark erschwert:

- Es stand sehr wenig Ausgangsmaterial an LOX-Protein pro Gel zur Verfügung: Trotz eindeutiger Signale im Western-Blot (Abb. 3.6d) sind auf dieser Höhe des Zink-Imidazol-gefärbten Gels (Abb. 3.6c) keine Spots erkennbar.
- Eine gleichmäßige Beladung der Gele war ebenfalls nicht möglich. Pro Gel wurde jeweils die Gesamtausbeute der aktiven Fractionen eines IAC-Laufs aufgetragen.

Ähnliche Probleme mit 2-D-Gelen wurden auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Feußner, persönliche Mitteilung). Deswegen erfolgt üblicherweise die Auswertung derart komplexer 2-D-Gele mit Hilfe von computergestützten Auswertungsprogrammen (Miller 1989; Dunn 1992). Mit diesen Programmen lassen sich versuchsbedingte Unterschiede der Beladung wieder „herausrechnen“. Leider

stand ein derartiges Programm nicht zur Verfügung. Rein visuell ist nur mit Hilfe der Immunodetektion eine Unterscheidung von einzelnen LOX-92 sowie von LOX-103 erkennbar.

Deutlich sichtbar sind jedoch Unterschiede weiterer Komponenten (Proteine?) sowohl bezüglich ihrer Verteilung (vgl. „rote“ Pfeile  ) als auch ihrer Gesamtmenge. Auffällig ist auch, dass die Menge und Verteilung dieser unbekannteren Komponenten auch bei gleichbehandelten Proben (hier: Pgt 1 – 3) nicht einheitlich ist. Eine Zuordnung dieser unbekannteren Moleküle war leider nicht möglich. Es wäre jedoch interessant, herauszufinden, inwieweit diese Komponenten für die LOX-Reaktion von Bedeutung sind, bzw. ob ein Fehlen dieser Komponenten die Aktivität der LOX-92 beeinträchtigt. Solange ein Abtrennen nicht erfolgreich ist (ohne gleichzeitig die native Struktur der LOX-92 zu zerstören), kann diese Frage im Weizen-System nicht beantwortet werden. Die Expression einer Weizen-LOX-cDNA in *E. coli* (s. Kapitel 3.3) gibt jedoch Hinweise darauf, dass die Stabilität der LOX in Abwesenheit bestimmter (allerdings noch nicht spezifizierter) natürlicher „Begleit- Komponenten“ nicht gewährleistet ist. Weil die rekombinante LOX nur eine sehr geringe Enzym-Aktivität und Stabilität zeigen, fehlen in diesem System möglicherweise gerade diese nicht identifizierten Faktoren. Daraus erklärt sich vielleicht auch, warum die „Begleit-Komponenten“ im natürlichen System so schwer abtrennbar sind.

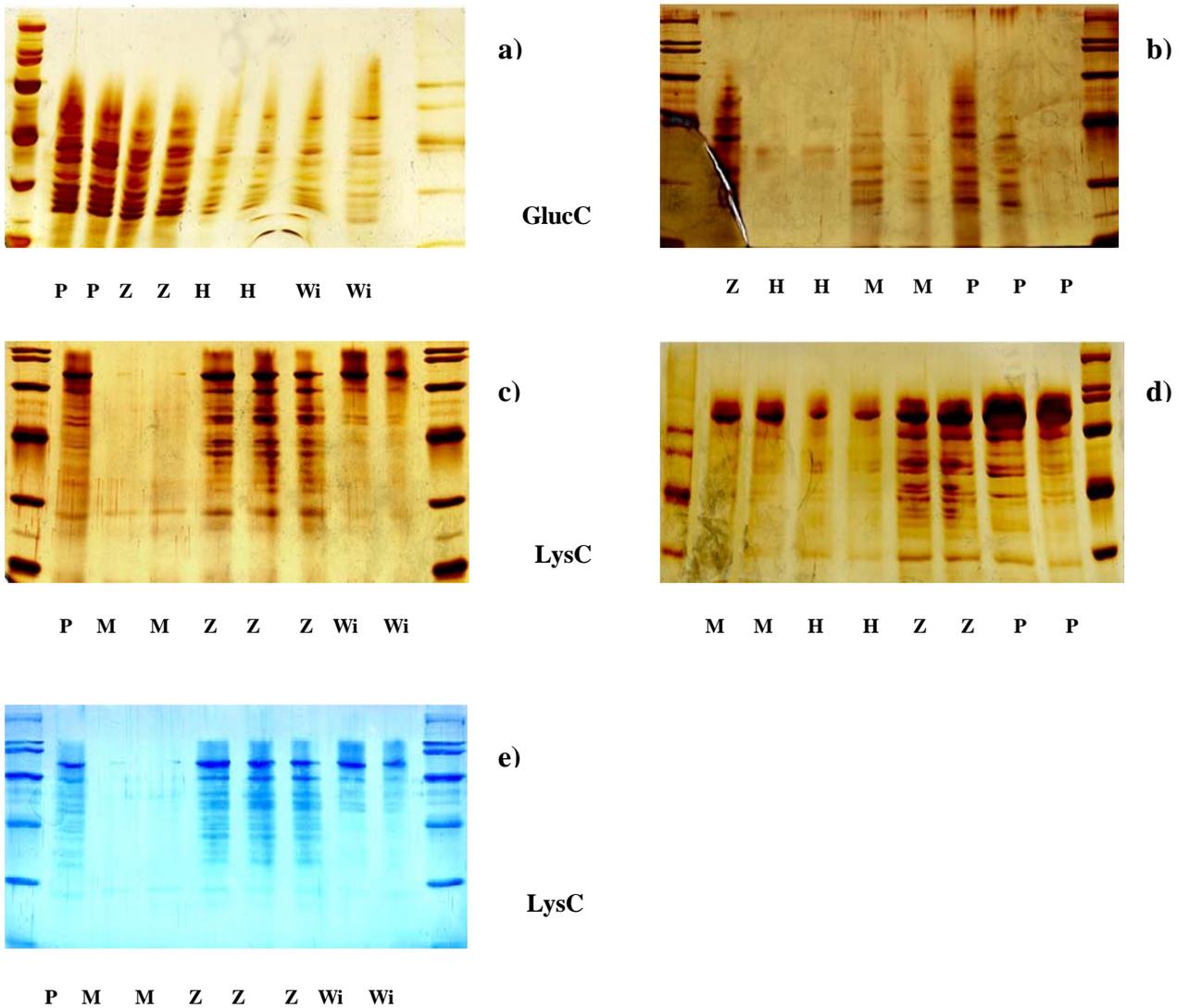
Als wichtiges Ergebnis dieser Versuche gilt der Nachweis sowohl von mindestens zwei unterschiedlichen LOX-92 als auch von mindestens zwei LOX-103.

### **3.1.2.3.3 Protein-Fingerprints**

Protein-Fingerprints dienen der Unterscheidung von Molekülen gleicher Größe. Es handelt sich hierbei um eine andere Form der 2-D-Elektrophorese. Die erste Dimension findet als herkömmliche SDS-PAGE statt. Es folgt eine zweite SDS-PAGE, in deren Verlauf die zu untersuchenden Proteine enzymatisch gespalten und die entstehenden Fragmente ihrer Größe nach im Gel aufgetrennt werden. Anhand des sich bildenden Fragmentmusters („Fingerprint“) lassen sich Proteine gleicher Größe differenzieren. Weil sich einige Proteine, z. B. Isoenzyme, nur in kleinen Bereichen unterscheiden und die entstehenden Fragmente recht klein sein können, wäre auch hier eine computergestützte Bearbeitung der Ergebnisse von Vorteil.

Da die Analyse wiederum nur visuell durchgeführt werden konnte, musste für diese Versuche eine relativ große Menge an LOX-Protein zur Verfügung stehen. Dies wurde mit dem unter 2.20.1.B beschriebenen Verfahren erreicht. Die erste Dimension erfolgte in einem normalen SDS-Gel (7,5 %). Die 92er Banden wurden ausgeschnitten und für die zweite Dimension (12 %) eingesetzt. Es kamen zwei unterschiedliche Enzyme (Endoproteinase LysC, Endoproteinase GluC) zum Einsatz.

In Abbildung 3.7 sind die silbergefärbten Protein-Fingerprints (a-d) von LOX-92 aus unbehandelten Weizen-Zellkulturen sowie aus Pgt-, Meja-, „Wind-“ und Wasser-behandelten Weizenprimärblättern abgebildet (Ausnahme Gel 3.7 e). Hier sind die Protein-Fingerprints von LOX-92 mit der Negativ-Färbemethode Zink-Imidazol dargestellt. Dieses Gel wurde anschließend wieder entfärbt und silbergefärbt (Abb. 3.7 c).



**Abb. 3.7 Fingerprinting der 92er LOX**

Dargestellt sind die silbergefärbten Gele (**a-d**) nach der zweiten Dimension. Es wurden 2 Endoproteinasen verwendet, Endoproteinasen GlucC (**a, b**) und Endoproteinasen LysC (**c, d**). Zum Vergleich ist unter **e** die Zink-Imidazol-Färbung von Gel **c** zu sehen

Erläuterungen:

Behandlungen: P = Pgt-Elicitor, 25µg/µl; Z = Zellkulturen, unbehandelt, 3d; H = A. reinst (Wasserkontrolle); Wi = „Wind“, M = Methyljasmonat, 50 µM) Außen links und rechts wurden Protein- Marker aufgetragen.

Die Verdauungen waren in allen Experimenten erfolgreich. In Abhängigkeit von der verwendeten Endoproteinase war bei allen Ansätzen ein LOX-typisches Fragmentmuster erkennbar. Es konnten keine qualitativen Unterschiede zwischen den einzelnen aktiven LOX-92-Spezies festgestellt werden. Quantitative Unterschiede der neu entstandenen Banden waren dagegen deutlich erkennbar, was jedoch wiederum auf die unterschiedlichen Ausgangsmengen an Gesamt-Protein zurückzuführen ist. Dies ließ sich wegen der bereits beschriebenen Probleme leider nicht vermeiden. Die scheinbare Divergenz im Fragmentmuster nach Verdauung mit der Endoproteinase LysC entstand aufgrund der ungleichen Beladung der Gele. Somit konnte auch hier nicht eindeutig geklärt werden, ob es sich bei den aktiven LOX-92 um ein einziges oder um unterschiedliche LOX-Enzyme mit zufällig ähnlichen Eigenschaften handelt.

Insgesamt lassen die Daten den Schluss zu, dass im Weizen mindestens zwei unterschiedliche LOX-92-Spezies vorkommen. Trotzdem bleibt die Frage offen, welche dieser LOX-Spezies für die Haupt-Enzymaktivität verantwortlich ist. Gibt es hierbei Unterschiede je nach vorangegangener Behandlung? Oder ist immer dieselbe LOX-92 für die Haupt-LOX-Enzymaktivität der untersuchten Vorgänge verantwortlich? Da im visuellen Vergleich der Protein-Fingerprints unterschiedlich behandelte Weizen-Blätter keine Abweichungen erkennbar sind, besteht zumindest die Möglichkeit, dass die Haupt-LOX-Enzymaktivität immer von demselben Protein getragen wird.

#### **3.1.2.3.4 Versuche zur Sequenzierung der aktiven LOX-92-Spezies - Weitere Reinigung und Anreicherung der LOX-92**

Nach den eher enttäuschenden Resultaten der im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Untersuchungen war endgültig klar, dass die weitere Analyse der induzierbaren Weizen-LOX mit protein-biochemischen Methoden nicht zu bewerkstelligen ist. Konsequenterweise sollten daher molekularbiologische Strategien eingesetzt werden (3.2 – 3.3) Als erstes sollte die Klonierung von induzierbaren Weizen-Lipoxygenasen mittels cDNA-Screening in Angriff genommen werden. Da eine geeignete Weizen-LOX-Sonde nicht zur Verfügung stand, sollte diese mithilfe der RT-PCR („Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction“) isoliert werden. Hierfür wurden Sequenzinformationen für die Konstruktionen von degenerierten Primern für die RT-PCR benötigt. Als Vorbereitung der molekularbiologischen

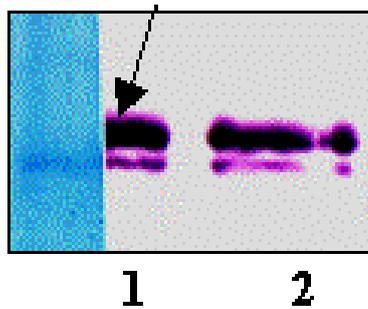
Untersuchungen wurde daher die Sequenzierung der aktiven LOX-92-Spezies angestrebt. Ziel dieser Versuche war die Gewinnung von Sequenzinformationen zur Konstruktion degenerierter Primer.

Da unser Labor für Proteinsequenzierungen nicht ausgerüstet ist, mussten diese als Auftragsarbeiten vergeben werden.

Die Proben wurden entsprechend der Vorgaben der beauftragten Institute (Institut für Enzymtechnologie, FH Jülich; Department of Biochemistry, Biozentrum of the University of Basel; Royal Holloway School of Biological Sciences, University of London) vorbereitet. Hier werden daher nur diese Arbeiten sowie die Ergebnisse der Sequenzierungsversuche beschrieben. Für alle Ansätze war eine relativ große Menge an Enzym angefordert worden. Das wurde mit unterschiedlichen Ansätzen erreicht, die ausführliche Beschreibung erfolgte bereits im Methodenteil unter 2.20.1.

Es muss jedoch auf die Probleme, die bei der Vorbereitung (Anreicherung) der LOX-92 auftraten, eingegangen werden: Wie bereits im vorangegangenen Text erwähnt, verfügen die LOX-92-Fractionen über eine sehr hohe spezifische Enzymaktivität. Quantitativ betrachtet findet man jedoch nur wenig an Enzym-Menge in den einzelnen Fractionen.

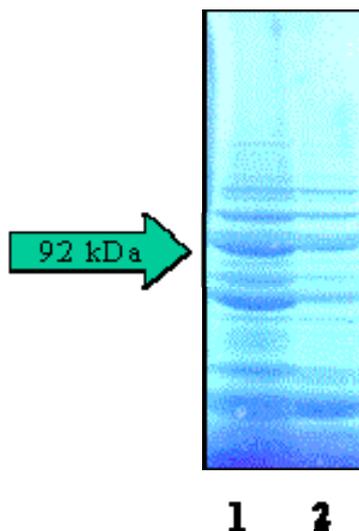
Als Beispiel zur Verdeutlichung der ungünstigen Mengensituation an LOX-Protein wird die Sachlage nach Meja-Behandlung genutzt (Abb. 3.8). Obwohl die 92er LOX für über 80 % der Gesamtaktivität von Meja-behandelten Pflanzen verantwortlich sind, ist kein Protein im Rohextrakt mit dem Anti-LOX-Antikörper auf der Höhe von 92 kDa detektierbar. Selbst nach Anreicherung zeigt sich zwar bei der Immunodetektion ein starkes Signal, bei unspezifischer Färbung mit Amidoschwarz ist dieselbe Menge jedoch nicht bzw. nur schwach erkennbar. Dagegen ist eine ansonsten nicht weiter identifizierte Bande unterhalb der LOX-92 bei der Immunodetektion genauso stark sichtbar wie nach Amidoschwarzfärbung, d. h. die Stärke des Antikörper-Signals entspricht hier der unspezifischen Färbung. In diesem Fall kann daher von einer unspezifischen Reaktion des Anti-LOX-Antikörpers ausgegangen werden. Wegen dem nur sehr schwachen Antikörper-Signal im Vergleich zur Amidoschwarzfärbung ist es zwar unwahrscheinlich, dass es sich bei diesem Protein ebenfalls um ein LOX-Protein handelt, aus zuschließen ist dies jedoch nicht.



**Abb. 3.8 Vergleich von Immunodetektion und Amidoschwarzfärbung der aktiven IAC-Fractionen**

Die aktiven Fraktionen 7 – 8 einer Anionenaustauschchromatographie (Meja 12 h) wurden vereinigt. Die Fraktionen wurden mittels Centricon-50-Konzentratoren, (2.16) aufkonzentriert, denaturiert und davon je 15 µg Gesamtprotein in Spur 1 und 2 aufgetragen. Anschließend wurden sie gelelektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Spur 1 ist je zur Hälfte Amidoschwarz-gefärbt bzw. für die Immunodetektion mit einem Anti-LOX-Antikörper eingesetzt worden. Spur 2 wurde ausschließlich der Immunodetektion unterworfen. Der Pfeil markiert die Position der 92er Bande (LOX-92). Auffällig ist, dass die LOX-92 in dieser Konzentration mittels Amidoschwarzfärbung nicht detektierbar ist. Unterhalb dieser Bande sieht man ein weiteres erheblich schwächeres Signal auf den Antikörper.

Der Anteil der LOX-92 am Gesamtprotein in den aktiven IAC-Fractionen ist tatsächlich sehr gering (Abb. 3.9). Ein Großteil wird von anderen unbekannt Proteinen bestimmt.



**Abb. 3.9 Zink-Imidazol-Färbung (Negativ-Färbung) der LOX-aktiven IAC-Fractionen 7 – 9 nach Pgt-Behandlung (48 h) (Legende s. nächste Seite)**

**Abb. 3.9 Zink-Imidazol-Färbung (Negativ-Färbung) der LOX-aktiven IAC-Fractionen 7 – 9 nach Pgt-Behandlung (48 h)**

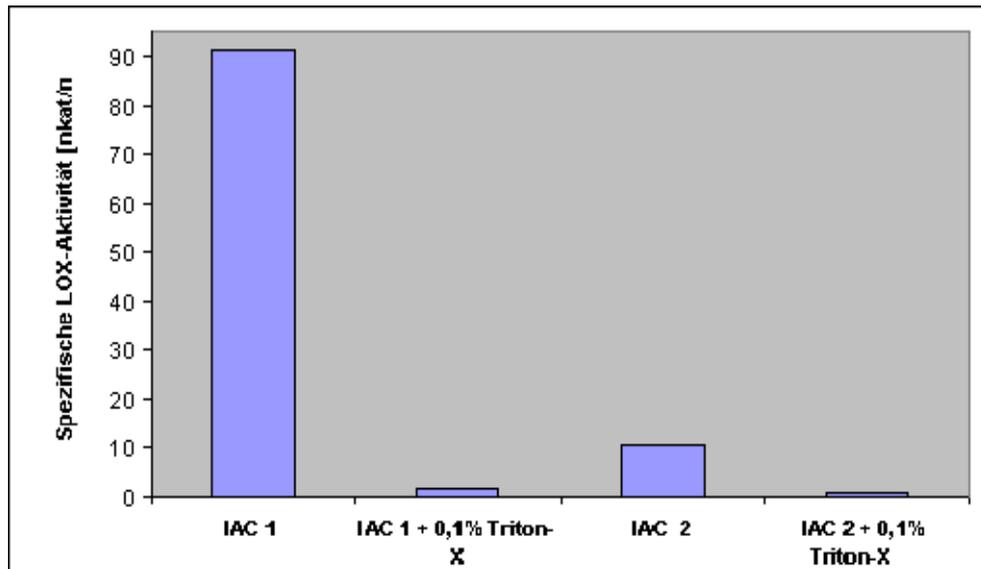
Die aktiven Fraktionen 7 – 9 einer Anionenaustauschchromatographie (Pgt 48 h; 2.16) wurden vereinigt. Die Fraktionen wurden mittels Centricon-50-Konzentratoren aufkonzentriert und denaturiert. Davon wurde 12 µg Gesamtprotein in Spur 1 und 3 µg Gesamtprotein in Spur 2 aufgetragen. Anschließend wurden sie gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Zink-Imidazol gefärbt (2.20.5; Negativfärbung). Die Höhe der LOX-92 ist mit einem Pfeil markiert. In dieser Konzentration ist mit der gewählten Färbemethode die LOX-92 nur schwach bzw. nicht sichtbar. Weil das Gel vor einem dunkelblauen Hintergrund fotografiert wurde, erscheinen die Proteinbanden dunkelblau vor einem hellblauen Hintergrund.

Die Abtrennung der Fremd-Proteine gelingt mit der Anionenaustausch-Chromatographie nicht. Für die folgenden Untersuchungen war es jedoch unerlässlich, das Enzym in höherer Quantität und weitgehend frei von begleitenden Proteinen zu erhalten. Die Arbeiten hierzu sind im folgenden Abschnitt beschrieben.

Mit klassischen Methoden der Enzymreinigung wie z. B. der hydrophoben Interaktionschromatographie oder der Gelfiltration (Knauf, 1996; Bohland, persönliche Mitteilung) gelang es nicht, störende Fremdproteine zu entfernen. Eine höhere Konzentrierung mittels Centricon-50-Konzentratoren war ebenfalls nicht erfolgreich, da es zu irreversiblen Bindungen der LOX an die Membran kam. Es musste daher nach alternativen Möglichkeiten gesucht werden.

Brash et al. (1996) beschrieben ähnliche Probleme bei der Aufreinigung einer Korallen-LOX. Sie konnten durch die Zugabe von 0,1 % Triton-X bei der IAC eine verbesserte Anreicherung des LOX-Proteins erreichen.

In der vorliegenden Arbeit mit der Weizen-LOX-92 führten jedoch Veränderungen des IAC-Programms regelmäßig zu einem erheblichen Verlust sowohl an spezifischer LOX-Enzymaktivität (Abb. 3.10), als auch an LOX-Protein (Abb. 3.11). Im Extremfall kam es zu Totalausfällen. Ebenfalls misslang der Versuch, die aktiven Fraktionen in einer zweiten IAC weiter zu reinigen. Auch unter diesen Bedingungen kam es zu deutlichen Verlusten an LOX-92. In den Abbildungen 3.10 und 3.11 sind die Verluste an LOX-Enzymaktivität bzw. an -Protein beispielhaft für einige Aufreinigungsversuche dargestellt.



**Abb. 3.10 Verlust der LOX-Enzymaktivität nach weiteren Aufreinigungen der LOX-92**

Gezeigt sind die Aktivitätsverluste nach IAC von Enzymextrakten aus unbehandelten drei Tage alten Zellkulturen unter veränderten Bedingungen. Zum Vergleich ist die spezifische LOX-Enzymaktivität nach Standard-Protokoll abgebildet (IAC1).

Erläuterungen:

IAC 1	LOX-Enzymaktivität der Fraktionen 7 –9 nach Standard-IAC (2.16.1)
IAC 1 + 0,1 % Triton-X	LOX-Enzymaktivität der Fraktionen 7 – 9 nach IAC unter Zugabe von 0,1 % Triton X (2.16.2)
IAC 2	LOX-Enzymaktivität der Fraktionen 7 –9 nach zweiter IAC unter Standardbedingungen (2.16.1)
IAC 2 + 0,1 % Triton-X	LOX-Enzymaktivität der Fraktionen 7 –9 nach zweiter IAC unter veränderten Bedingungen (Zugabe von 0,1% Triton-X zur zweiten Runde (2.16.2), die erste Runde fand unter normalen Bedingungen statt).



**Abb. 3.11 Verlust an LOX-Protein nach zweiter IAC**

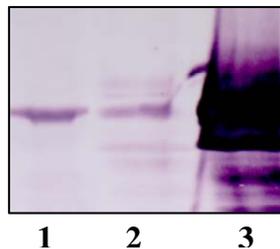
Man sieht die Immunodetektion der aktiven Fraktionen 7 – 9 (F7.1 – F9.1 bzw. F7.2 – F9.2) aus Zellkulturen (drei Tage nach Subkultivierung) nach IAC 1 (F7.1 – F9.1) und nach zweiter IAC (F7.2 – F9.2). Pro Spur wurden 10 µg der jeweiligen Fraktion gefällt und in 1x Probenpuffer gelöst eingesetzt. Wurde der IAC 0,1% Triton-X zugesetzt, so war nach Immunodetektion mit dem Farbreagenz BCIP/NBT kein Signal detektierbar (Daten nicht gezeigt).

Da die weitere Anreicherung der LOX mithilfe chromatographischer Methoden nicht möglich war, wurden alternative Strategien versucht, diese sind im folgenden Text aufgeführt. In allen Fällen wurde wegen der besseren Handhabung und Proteinausbeute mit Enzymextrakten aus drei Tage alten Zellkulturen gearbeitet.

#### A. Anreicherung nach SDS-PAGE und Elektroelution

Hier wurden die 92er Banden von mehreren IAC-Läufen (jeweils 8 – 10 Läufe für eine Spur) nach Auftrennung über SDS-PAGE ausgeschnitten und gesammelt. Dann wurden die Proteine mittels Elektroelution (s. 2.20) wieder in Lösung gebracht, gefällt, in 1x Probenpuffer aufgenommen und einer zweiten SDS-PAGE unterworfen. Die Gele wurden geblottet (s. 2.21) und die mit Amidoschwarz angefärbten Banden der LOX-92 zur N-terminalen Sequenzierung eingeschickt (Institut für Enzymtechnologie, FH Jülich).

Das gewählte Verfahren zur Anreicherung ist jedoch sehr aufwendig und führte außerdem zu Degradierungsprodukten (Abb. 3.12).



**Abb. 3.12 Degradierungsprodukte der LOX-92 nach Elektroelution (2.20.1)**

Aufgetragen ist die LOX-92 aus Zellkulturen vor (Spur 1) und nach Elektroelution (Spuren 2 und 3). Auffällig sind zusätzlich entstandene Banden nach der Elektroelution.

Erläuterungen:

**Spur 1** Vor der Elektroelution: 5 µg Gesamt-Protein

**Spur 2** Nach der Elektroelution: 5 µg Gesamt-Protein

**Spur 3** Nach der Elektroelution: die Menge Gesamt-Protein, die gerade noch in 15 µl 1x Puffer löslich ist.

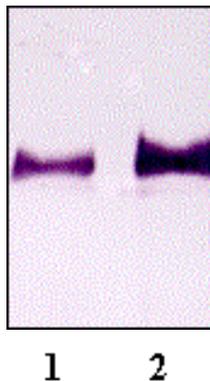
Die Sequenzierungsversuche der mit Amidoschwarz gefärbten geblotteten LOX-92-Bande durch das Institut für Enzymtechnologie der FH Jülich waren leider erfolglos, da eine N-terminale Blockierung vorlag (pers. Mitteilung Frau Dagmar Müller). Mit einem tryptischen Verdau auf der PVDF-Membran hätte man das Problem vielleicht umgehen können. Am Institut für Enzymtechnologie der FH Jülich war dies aus

technischen Gründen jedoch nicht möglich. Die Sequenzierung der zusätzlich entstandenen Banden (Degradationsprodukte) gelang ebenfalls nicht. In diesem Fall war die verbliebene Protein-Menge für eine Sequenzierung nicht ausreichend (pers. Mitteilung Frau Dagmar Müller).

### B. Anreicherung durch die Kombination von Ultrafiltration und Fällung

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Blockierung erst durch die recht drastische Art der Vorbehandlung (Degradationsprodukte) entstanden war, wurde die unter 2.20.1.B beschriebene Kombination von Ultrafiltration und Fällung angewendet. Auch hier waren für eine Spur die aktiven Fraktionen von 8 – 10 IAC-Läufen notwendig. Beispielhaft ist in Abb. 3.13 der Westernblot mit der LOX-92 aus 3 Tage alten unbehandelten Zellkulturen dargestellt. Im Unterschied zu der zuvor beschriebenen Methode sind hier im Westernblot keine Degradationsprodukte erkennbar.

Für die Sequenzierung wurden die Proteine nach der Fällung über SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. Anschließend fand wiederum eine Färbung mit Amidoschwarz statt. Die Bande der LOX-92 wurde ausgeschnitten und für eine N-terminale Sequenzierung eingesetzt.



**Abb. 3.13 Westernblot einer LOX-92 aus Zellkulturen nach Anreicherung mittels Ultrafiltration und Fällung**

Man sieht die Immunodetektion vor (**Spur 1**) und nach (**Spur 2**) der Fällung (s. 2.20.1 B). Aufgetragen sind jeweils die in 5 µl 1x Probenpuffer lösliche Menge an Protein. Man erkennt die deutliche Anreicherung der LOX-92. Degradationsprodukte sind nicht erkennbar.

Obwohl diese Methode schonender war, gelang die Sequenzierung wiederum aufgrund der N-terminalen Blockierung (pers. Mitteilung: Prof. Dr. Paul Bolwel, Royal

Holloway, University of London) der LOX-92 nicht. Daher sollte nun vor der Sequenzierung ein tryptischer Verdau mit anschließender HPLC-Reinigung der entstandenen Fragmente stattfinden. Herr Dr. Paul Jenö vom Department of Biochemistry, Biozentrum der Universität Basel, erklärte sich freundlicherweise bereit, diese Untersuchungen für uns durchzuführen.

Ein wichtiger Unterschied (für die Vorbereitungen) zu den vorangegangenen Sequenzierungsversuchen war, dass in diesem Fall lediglich das (Coomassie-) gefärbte Gelstück mit der LOX-92 angefordert wurde. Somit entfiel das Blotting auf die PVDF-Membran und die anschließende Färbung. Protein-Verluste bzw. – unbeabsichtigte Modifikationen (z. B. N-terminale Blockierung) vor der eigentlichen Untersuchung konnten somit reduziert werden.

Die Proteine der aktiven Fraktionen aus drei Tage alten Zellkulturen von 8 – 10 IAC-Läufen (für eine Spur) wurden nach der Konzentrierung (Ultrafiltration) über SDS-Gele aufgetrennt. Nach der Auftrennung erfolgte die Färbung der Proteine, die LOX-Banden wurden ausgeschnitten und in Basel für einen tryptischen Verdau eingesetzt. Zunächst scheiterten diese Versuche bereits daran, dass die LOX-92 nach der empfohlenen Färbung (Coomassie) für den Verdau nicht mehr zugänglich war. Abhilfe war durch die Anwendung einer anderen weniger fixierenden Färbemethode (Zink-Imidazol) gegeben (Fernandez-Patron et al. 1995). Dabei handelt es sich um eine reversible Negativ-Färbung. Beispiele für Zink-Imidazol gefärbte Gele sind u. a. in den Abbildungen 3.7 und 3.9 zu sehen.

Alle restlichen Arbeiten (tryptischer Verdau, Auftrennung der Fragmente über HPLC [high pressure liquid chromatography] und die anschließende Sequenzierung) wurden in Basel routinemäßig durchgeführt.

Nach dem tryptischen Verdau kam es jedoch zu erheblichen Mengenverlusten, die anscheinend auf (irreversible) Bindungen der entstandenen Fragmente an die verwendeten Gefäße bzw. Apparaturen (HPLC-Apparatur) zurückzuführen waren. Die Quantität der rückgewonnenen Proteinfragmente nach der HPLC war so gering, dass eine Sequenzierung wiederum nicht gelang (Paul Jenö, persönliche Mitteilung).

Abschließend musste leider festgestellt werden, dass die Versuche, das LOX-Protein zu sequenzieren, allesamt fehlgeschlagen sind.

Auch wenn eine Klassifizierung der untersuchten LOX-92-Spezies damit nicht möglich war, ist sicher, dass im Weizen mehr als eine 92er LOX zu finden ist. Die Argumente hierfür werden im Folgenden kurz zusammengefasst:

- Im Rohextrakt von Meja- und Wasser-behandelten Weizen-Blättern ist keine LOX-92 detektierbar. Nach Anreicherung über IAC findet sich in den Fraktionen mit 80 –90 % der LOX-Anfangs-Aktivität jedoch immer eine gut detektierbare LOX-92 (s. 3.1.3).
- Nicht zu vergessen ist, dass sowohl Bohland (1997) als auch Loers (1999) nach isoelektrischer Fokussierung der LOX-aktiven Fraktionen (entsprechend Peak 1) im Immunoblot mehr als nur eine LOX-Bande detektierten. Leider war mit dieser Methode die Größenzuordnung der detektierten Moleküle nicht möglich.
- Letzteres gelang durch die Auftrennung der LOX-aktiven IAC-Fraktionen über 2-D-Elektrophorese. Hier konnten erstmals auf Höhe von 92 kDa zwei LOX-Spezies mit offensichtlich unterschiedlichem IEP (isoelektrischem Punkt) nachgewiesen werden (s. Abb. 3.7).
- Auch das Scheitern der zahlreichen Versuche, das 92er LOX-Protein zu sequenzieren lässt sich in diesem Zusammenhang leichter erklären. Da sich auf der Höhe von 92 kDa tatsächlich (mindestens) zwei LOX-Proteine verbergen, war die Sequenzierung mit den zur Verfügung stehenden Methoden wegen mangelnder Reinheit nicht zu bewerkstelligen.

Hiermit wurden die bio- und proteinchemischen Versuche von Weizen-Pflanzen und Weizen-Zellkulturen (vorerst) abgeschlossen und die Charakterisierung der Weizen-Lipoxygenasen mit molekularbiologischen Arbeitsweisen fortgesetzt.

### Zusammenfassung des Kapitels 3.1

- Am Anfang der Untersuchungen waren mindestens drei induzierbare, im Rohextrakt detektierbare, Weizen-LOX-Spezies bekannt: LOX-92, LOX-100 und LOX-103.
- Die Aufreinigung der Enzymextrakte über IAC zeigte, dass für rund 80 % der Gesamtaktivität immer LOX-92 verantwortlich sind. Interessant ist die Beobachtung, dass dies auch für Kontrollansätze und nach Meja-Induktion gilt, da in den entsprechenden Rohextrakten in diesen Ansätze keine LOX-92 detektierbar waren.
- Ungeklärt bleibt, ob immer dieselbe LOX-92 für diese Aktivität verantwortlich sind, oder ob es sich um unterschiedliche LOX-Spezies handelt. Sowohl 2-D-Elektrophorese- als auch Protein-Fingerprinting-Experimente brachten wegen fehlender Auswertungssoftware kaum neue Erkenntnisse.
- Dagegen konnte mit Hilfe der 2-D-Elektrophorese die Existenz von wenigstens zwei unterschiedlichen LOX-92 gezeigt werden. Ebenfalls war der Nachweis zweier LOX-103 möglich. Festzuhalten bleibt hier, dass mindestens eine der LOX-103 in den Chloroplasten-Fractionen nachweisbar ist und Elicitor-induzierbar ist.
- Die Unmöglichkeit, nicht identifizierte „Begleit-Komponenten“ (Proteine?) in den aktiven IAC-Fractionen vom nativen Molekül zu trennen, verhinderten zwar die erfolgreiche Sequenzierung des LOX-Proteins, weisen aber vielleicht auf die Bedeutung dieser Komponenten für aktive Weizen-LOX-Spezies hin. Diese Frage wird in Kapitel 3.3 wieder aufgenommen.
- Da der LOX-100 keine Enzym-Aktivität zugeordnet werden konnte, konzentrierten sich die folgenden Untersuchungen auf die Charakterisierung der beiden anderen induzierbaren LOX-Spezies, den LOX-92 und den LOX-103.

## **3.2 Molekularbiologische Strategien zur Analytik von LOX-Spezies in Weizen**

Nach Abschluss der protein-biochemischen Arbeiten erfolgte die weitere Charakterisierung von induzierbaren Weizen-LOX mit molekularbiologischen Methoden.

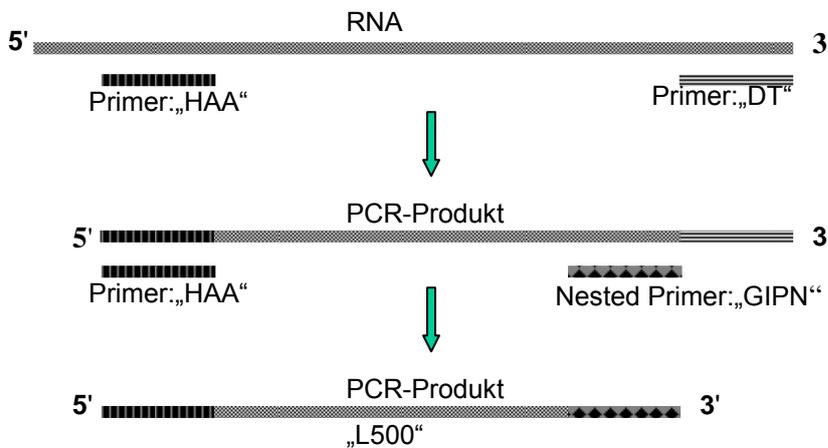
Insbesondere sollte die Expression von Weizen-LOX auf RNA-Ebene erfasst werden. Für weitergehende Experimente (s. auch Kapitel 3.3) war die Isolierung einer kompletten („full-length“) Weizen-LOX-cDNA geplant, zumal zu diesem Zeitpunkt noch kein vollständiger Weizen-LOX-cDNA Klon existierte.

### **3.2.1 Konstruktion der Sonden**

Um die Expression der Weizen-LOX zu untersuchen, wurden Northern-Analysen durchgeführt. Die Sonden für diese Experimente wurden mittels RT-PCR bzw. 3'-RACE unter Induktionsbedingungen (Pgt-Elicitierung) isoliert (2.28). Als Template wurde Gesamt-RNA (2.24.2) aus Pgt-behandelten und zum Vergleich aus Wasser - behandelten (A. reinst) bzw. unbehandelten Weizenblättern sowie aus Zellkulturen (zwei Tage nach Subkultivierung) eingesetzt.

Es kamen degenerierte Primer aus konservierten Bereichen anderer bekannter LOX-Spezies zum Einsatz, da spezifische Sequenzinformationen aufgrund der gescheiterten Proteinsequenzierungen der Weizen-LOX (Kapitel 3.1) nicht zur Verfügung standen. Die Sequenzen der genutzten Primer sind dem Methodenteil zu entnehmen (Tab. 2.1). Für alle Ansätze war 1 µg Gesamt-RNA als Template genutzt worden. Die Klonierungsstrategien für die einzelnen Sonden sind in Abbildung 3.14 schematisch dargestellt. Das genaue Prozedere ist bereits im Methodenteil (2.29) beschrieben.

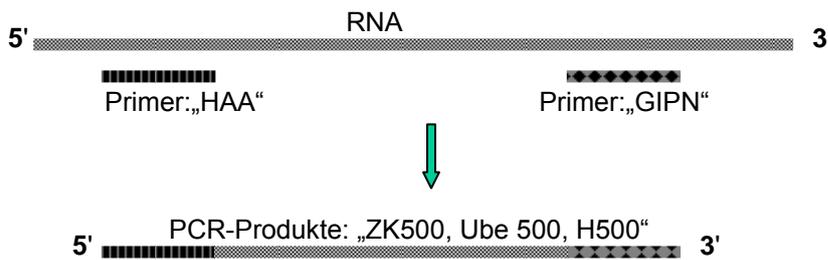
**a) RT-PCR: One Step RT-PCR über zwei Runden**



**1. Runde**  
 "One Step RT-PCR":  
Template: Gesamt-RNA  
 aus Pgt-behandelten  
 Blättern  
Primer: „DT“, „HAA“

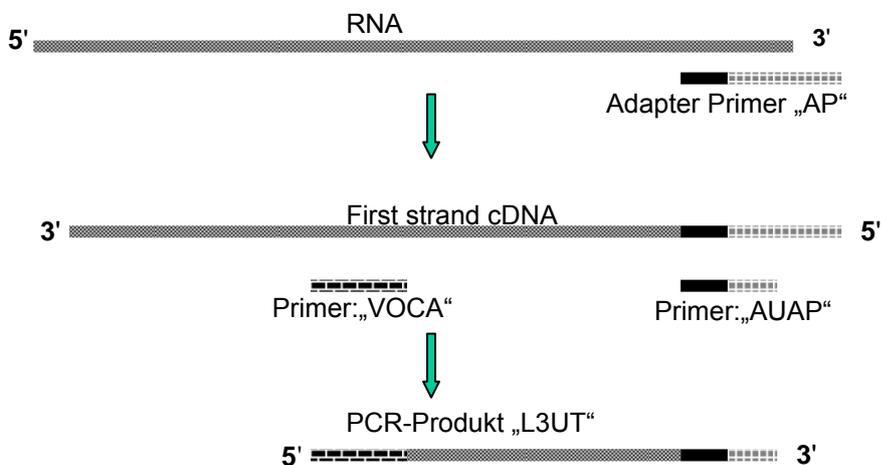
**2. Runde**  
 Standard PCR:  
Template: PCR-Produkt aus  
 Runde 1  
Primer: „GIPN“, „HAA“

**b) RT-PCR: One Step RT-PCR mit spezifischen Primern (nur eine Runde)**



**1. Runde**  
 "One Step RT-PCR":  
Template: Gesamt-RNA  
 aus Zellkulturen bzw.  
 unbehandelten/A. reinst-  
 behandelten Blättern  
Primer: „GIPN“, „HAA“

**c) 3' RACE über zwei Runden**



**1. Runde**  
 "First strand cDNA-  
 Synthese":  
Template: Gesamt-RNA  
 aus Pgt-behandelten  
 Blättern  
Primer: Adapter Primer  
 „AP“

**2. Runde**  
 Standard PCR:  
Template: PCR-Produkt aus  
 Runde 1 (First strand cDNA)  
Primer: „VOCA“, „AUAP“

Abb. 3.15 Klonierungsstrategien der Weizen-LOX-Sonden (Legende s. folgende Seite)

**Abb. 3.15 Klonierungsstrategien der Weizen-LOX-Sonden****a) Konstruktion der Sonde „L 500“ (2.28.1)**

Mittels „One Step RT-PCR“ (Titan™ One Tube RT-PCR System, Boehringer, Mannheim) wurde mit einem Oligo-DT-Primer („DT“) und einem degenerierten (genspezifischen) Primer („HAA“) und Gesamt-RNA aus Pgt-behandelten Weizen-Blättern ein erstes PCR-Produkt gewonnen. Dieses Produkt wurde für eine zweite PCR mit dem Primer „HAA“ und dem „nested“ (genspezifischen) Primer „GIPN“ eingesetzt. Das Produkt („L 500“) wurde anschließend in den Vektor pGEM®-T-Easy von Promega kloniert.

**b) Konstruktion der Sonden „ZK 500“, „Ube 500“ und „H 500“ (2.28.1)**

Die Gesamt-RNA aus unbehandelten/A. reinst-behandelten Weizen-Blättern („Ube 500“/„H 500“), bzw. unbehandelten zwei Tage alten Zellkulturen („ZK 500“) wurde als Template genutzt. Für die „One Step RT-PCR“ (Titan™ One Tube RT-PCR System, Boehringer, Mannheim) wurden die degenerierten (genspezifischen) Primer „GIPN“ und „HAA“ eingesetzt. Die PCR-Produkte („ZK 500“, „Ube 500“ und „H 500“) wurden anschließend in den Vektor pGEM®-T-Easy von Promega kloniert.

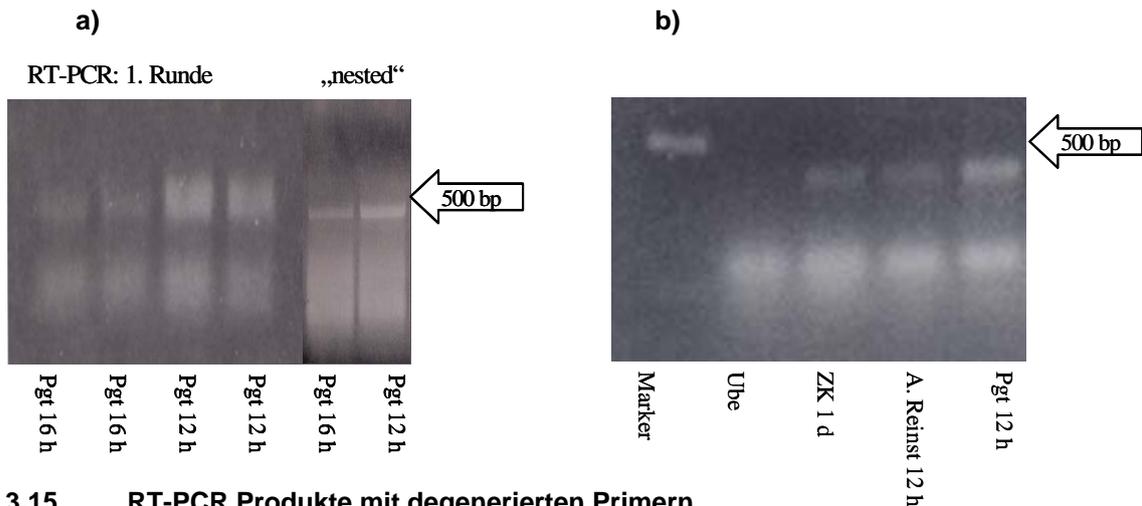
**c) Konstruktion der Sonde „L 3UT“**

Nach der „First Strand Synthese“ (3'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA ends, Gibco; mit Gesamt-RNA aus Pgt-behandelten Blättern als Template und dem Adapter Primer „AP“ (2.1, Gibco), folgte über eine normale PCR mit dem genspezifischen Primer „VOCA“ und dem Universal-Primer „AUAP“ (Gibco). Das Produkt wurde in Vektor pGEM®-T-Easy von Promega kloniert.

Mittels RT-PCR (2.29) konnten vier Weizen-LOX cDNA-Sonden („L 500“, „H 500“, „Ube 500“, ZK 500“; jeweils 435 bp) kloniert werden. Als Template war Gesamt-RNA aus behandelten („L 500“: Pgt-Injektion; „H 500“: A. reinst-Injektion) und unbehandelten („Ube 500“) Weizenblättern bzw. Zellkulturen („ZK 500“) genutzt worden. Wie sich nach der Sequenzierung herausstellte, sind die Sequenzen von „L 500“, „ZK 500“, „Ube 500“ und „H 500“ absolut identisch. Unterschiede waren nur in der Ausbeute an PCR-Produkten (s. Abb. 3.16) erkennbar.

Über 3'-„RACE“ (Rapid Amplification of cDNA Ends, 2.29.2) wurde anschließend ein Teil der 3' UT dieser Weizen-LOX cDNA amplifiziert („L 3UT“, 341 bp). In dem überlappenden Teil (157 bp) zu den vorher klonierten Sonden besteht eine 100%ige Übereinstimmung der Sequenz.

In Abbildung 3.15 sind die PCR-Produkte mit degenerierten Primern beispielhaft für die Sonden L 500, Ube 500, H 500 und ZK 500 dargestellt.



**Abb. 3.15 RT-PCR Produkte mit degenerierten Primern**

Als Template wurde jeweils 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Pro Spur sind je 5 µl eines 50 µl Gesamtansatzes aufgetragen worden.

- a) RT-PCR mit Gesamt-RNA aus Pgt-behandelten Blättern, 12 h bzw. 16 h nach Behandlung geerntet. In der ersten Runde kamen die Primer „DT“ und „HAA“ zum Einsatz. Angeschlossen wurde eine „nested“ PCR mit „GIPN“ und „HAA“. Das PCR-Produkt der zweiten Runde (Pgt 12 h) wurde in den Vektor pGEM<sup>®</sup>-T-Easy von Promega kloniert.
- b) RT-PCR mit Gesamt-RNA aus Zellkulturen (1 Tag nach Subkultivierung), unbehandelten Weizenblättern und aus A. reinst- bzw. Pgt-behandelten Weizenblättern (12 h). Als Primer wurden „GIPN“ und „HAA“ eingesetzt. Die PCR-Produkte (obere Banden) wurden in den Vektor pGEM<sup>®</sup>-T-Easy von Promega kloniert.

Obwohl jeweils genau je 1 µg Gesamt-RNA als Template für die einzelnen Ansätze eingesetzt wurde, war die Produktausbeute der RT-PCR unterschiedlich. Bei Pgt-behandelten Blättern ist die Menge an PCR-Produkt 12 h nach Injektion deutlich höher als nach 16 h. Dies deutet darauf hin, dass bereits 16 h nach Injektion des Pgt-Elicitors die LOX-Induktion wieder abnimmt. Auf Enzymaktivitätsebene ist diese Abnahme erst nach 48 h zu verzeichnen (Abb. 3.1).

Auch die Art der Behandlung hat, wie erwartet, einen Einfluss auf die Produktausbeute der RT-PCR. Man erkennt z. B. 12 h nach Pgt-Elicitierung eine deutlich stärkere Bande als 12 h nach Injektion von A. reinst (Abb.3.15 b), wogegen die Bande des PCR-Produktes aus unbehandelten Zellkulturen fast gleich stark wie die Bande nach Pgt-Elicitierung (12 h, Abb. 3.15 b) der Weizenblätter ist. Letzteres war aufgrund der Ergebnisse der vorangegangenen biochemischen Untersuchungen erwartet worden, da die LOX-Enzymaktivität in den Weizenzellkulturen durchweg relativ hoch ist. Aus unbehandelten Weizenblättern ist die Menge an PCR-Produkt

indes so gering, dass auf dem Agarosegel die entsprechende Bande kaum sichtbar ist. Dies weist darauf hin, dass schon die Injektions-Behandlung alleine, unabhängig vom injizierten Wirkstoff, für die Weizenpflanzen eine Stresssituation bedeutet, welche eine erhöhte LOX-Induktion bewirkt.

Bei all diesen Beobachtungen muss jedoch berücksichtigt werden, dass die PCR-Ansätze nur halbquantitativ (ohne internen Standard) erfolgten. Zur genauen Untersuchung der LOX-Expression wurden daher Northern-Analysen durchgeführt (s. 3.2.3).

Alle PCR-Produkte wurden in den pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector von Promega kloniert. Die resultierenden Plasmide wurden P L500; P Ube500, P ZK500, P H500 und P L3UT genannt. Die Konstrukte wurden für die Transformation (2.43.29) von *E. coli* DH5 $\alpha$  (Stratagene) bzw. von *E. coli* JM 109 (Promega) eingesetzt und Glycerinstocks (s. 2.33) der Klone bei -70 °C gelagert. Sämtliche Plasmide wurden sequenziert [„Automated Laser Fluorescent-(ALF)-DNA-Sequencer“, Pharmacia Biotech; „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“, Amersham Pharmacia Biotech; s. 2.39].

Die Plasmidkarten von P L500 (identisch mit P H500, P ZK 500 und P Ube500) und P L3UT sind in Abbildung 3.16 dargestellt. In Abbildung 3.17 ist die Sequenz dieser cDNA-Fragmente, die daraus abgeleitete Aminosäuren-Sequenz in Abbildung 3.18 aufgeführt. In den überlappenden Bereichen sind die beiden Fragmente absolut identisch.

Die Sequenzierungsstrategie der Fragmente ist gemeinsam mit der Sequenzierungsstrategie der Gesamt-cDNA in Abbildung 3.24 abgebildet.

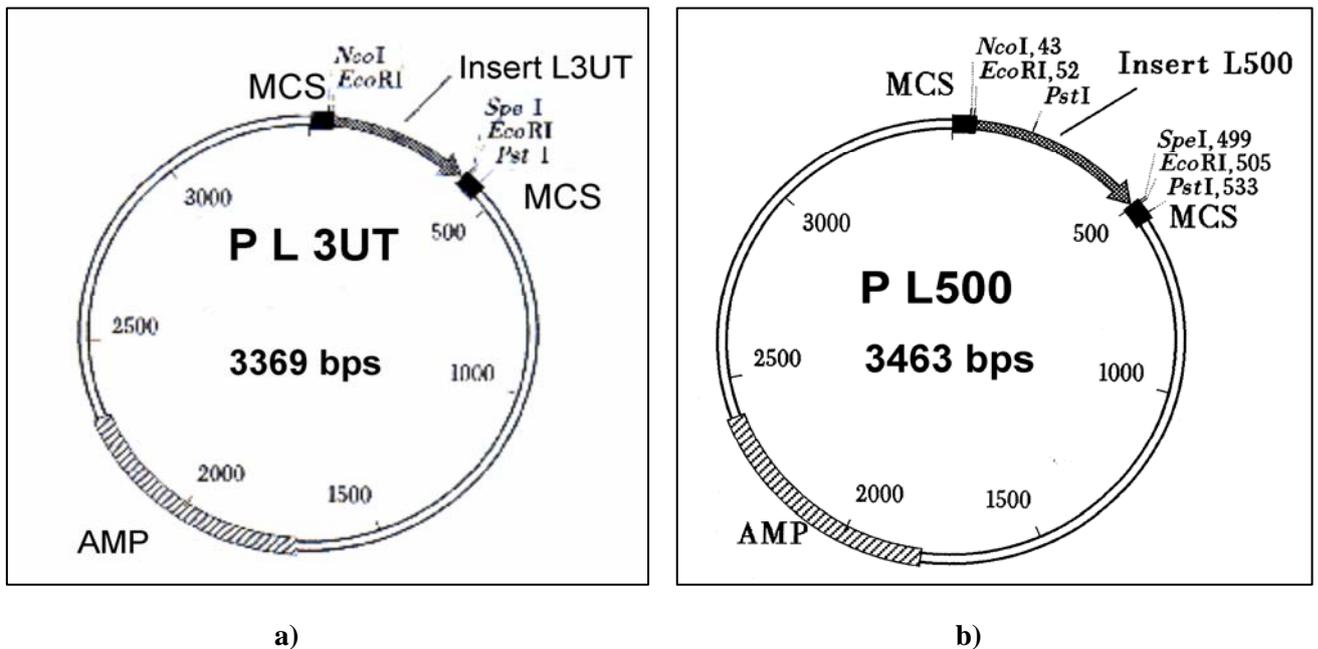


Abb. 3.16 Die Plasmidkarten von PL 500 (a) und PL 3UT (b)

Die Plasmide haben einen Teil einer Weizen-LOX cDNA als Insert. Als Vektor wurde jeweils pGEM<sup>®</sup>-T-Easy von Promega genutzt.

1	GTGAACTTCG	GGCAGTACCA	TTACGCCGGG	TACTTCCCA	ACCGTCCGAC
51	GGTGGTGCGG	AAGAACATCC	CGGTGGAAGA	AAACCGGGAC	GATGAGATGA
101	AGAAGTTCAT	GGCAAGGCCA	GAGGAGGTGC	TGCTGCAGAG	CCTCCCCTCG
151	CAGATGCAGG	CCATCAAGGT	GATGGCGACG	CTGGACATCC	TCTCCTCACA
201	CTCCCCCGAC	GAGGAGTACA	TGGGAGAGTA	CGCGGACCGG	CGTGGCTGGC
251	AGAGCCATGG	TGAAGGCGGC	ATTCGAGAAG	TTCAGTGGCA	GACTGAAGGA
301	GGTGGAGGGC	CCATCGACCA	GCGAAACAAC	AACCCGGAGA	ACAAGAACAG
351	GTGTGGGCCC	GGCATCGTGC	CGTACGAGCT	GCTCAAGCCG	TTCTCAGAAC
401	CAGGGGTCAC	TGGGAGGGGC	ATCCCCAACA	GCATATCCAT	<u>CTGA</u> ATGTGG
451	CCCCAGGATA	AGTTATCATT	GCATGTAGGA	TTAGGAATAA	GATGTGCACC
501	ATGTACGCAC	CCAGCAGCGA	TTGCTCCCGT	CCCGTGCATG	ACAGGGGCCA
551	GGAGAGGCAT	CTACTAGTGT	GTTCCCGCTA	TTGTATGCCG	TGAATTAGCA
601	GTACTAATAA	GGTTATTTGA			

Abb. 3.17 Die Sequenzen von L 500 und L 3UT

Die Sequenz von L 500 ist farbig unterlegt. Das 5'-Ende von L 3UT ist durch einen Pfeil markiert. Das Stop-Codon (TGA) ist unterstrichen. Die Sequenz von L 500 ist identisch mit H 500, Meja 500, Wind 500 und Ube 500.

```

1  VNFGQYHYAG YFPNRPTVVR KNIPVEENRD DEMKKFMARP EEVLLQSLPS
51 QMQAIKVMAT LDILSSHSPD EEYMGEYADR RGWQSHGEGG IREVQWQTEG
101 GGGPIDQRNN NPENKNRCGP GIVPYELLKP FSEPGVTGRG IPNSISI

```

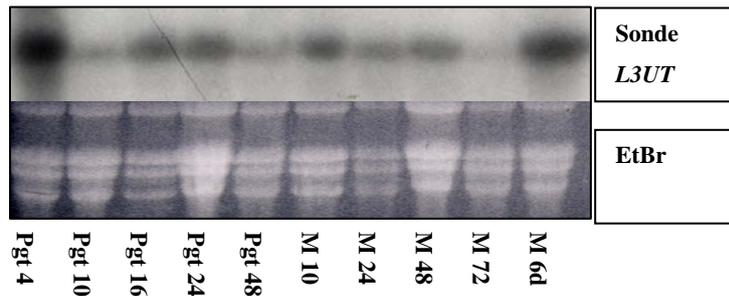
**Abb. 3.18 Die abgeleitete Aminosäuren-Sequenz aus den cDNA-Fragmenten L 500 und L 3UT**

Stark konservierte LOX-typische Sequenzmotive sind grau unterlegt.

Des Weiteren wurde versucht, mittels 5'-RACE (2.29.3) das fehlende 5'-Ende zu isolieren. Da das 5'-Ende im Vergleich zum 3'-Ende kaum konserviert ist, konnten keine geeigneten Primer konstruiert werden. Die Amplifikation des 5'-Endes war daher nicht möglich. Um trotzdem eine vollständige Weizen-LOX-cDNA zu erhalten, wurde L500 für das Screening einer Weizen-cDNA-Bank genutzt (3.2.2).

### 3.2.2 Screening einer Weizen-cDNA-Bank

Von Herrn Prof. Dr. R. Dudler, (Inst. f. Pflanzenbiologie, Univ. Zürich, Schweiz) war freundlicherweise eine Weizen-cDNA-Bank, hergestellt nach Inokulation von Weizenpflanzen mit dem Gerstenmehltau (Rasse A6), zur Verfügung gestellt worden. Zunächst musste getestet werden, ob diese cDNA-Bank für das Screening überhaupt geeignet ist, d.h. ob die Weizen-LOX unter diesen Bedingungen (also nach Inokulation mit dem Gerstenmehltau) induziert werden. Daher wurden zunächst Enzymaktivitätsmessungen (vgl. Abb. 3.1) der Rohextrakte aus mit Gerstenmehltau inokulierten Weizenblättern durchgeführt. Nachdem auf diesem Wege eine LOX-Induktion durch den Gerstenmehltau nachgewiesen werden konnte, erfolgten anschließend Northern-Analysen (2.27) mit Gesamt-RNA aus mit Gerstenmehltau inokulierten Pflanzen (s. Abb. 3.19). Hierfür war Gesamt-RNA (2.25.2) 10 h – 6 d nach Inokulation aufgearbeitet worden. Gesamt-RNA aus Pgt-behandelten Primärblättern diente bei diesem Ansatz als Positivkontrolle. Die RNA wurde unter denaturierenden Bedingungen gelelektrophoretisch (2.26) aufgetrennt, anschließend auf eine Nylonmembran geblottet (2.27.1) und die Northern-Analyse (2.27) mit der radioaktiv-markierten ( $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ , 2.28) Sonde L3UT durchgeführt. Das Autoradiogramm ist in Abbildung 3.19 zu sehen.



**Abb. 3.19 Induktion von Weizen-Lipoxygenasen nach Inokulation mit dem Gerstenmehltau**  
 Autoradiogramm der Northern-Analyse mit der Sonde *L3UT*. Aufgetragen ist Gesamt-RNA aus Weizenprimärblättern. 7 Tage alte Weizenpflanzen waren mit dem Gerstenmehltau inokuliert worden und die Gesamt-RNA nach 10 h, 24 h, 48 h, 72 h und 6 d (M 10, M 24, M 48, M 6d) aufgearbeitet worden. Zum Vergleich (Positivkontrolle) ist auch RNA nach Pgt-Behandlung (4 h, 10 h, 16 h, 24 h und 48 h) aufgetragen worden. Zwecks Ladungskontrolle (EtBr) ist das Foto des Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegels (1,2% w/v) gezeigt.

Im Autoradiogramm der Northern-Analyse mit der Sonde *L3UT* ist in allen Spuren ein Signal erkennbar, was auf eine Expression der LOX schließen lässt. Da sowohl bei den Enzym-Messungen (s. 3.1) als auch bei den Northern-Analysen eine LOX-Induktion durch den Gerstenmehltau nachgewiesen konnte, schien die cDNA-Bank (Phagenbank) für das Screening geeignet zu sein. Hierfür wurde die Phagenbank, wie unter 2.30 beschrieben, verdünnt.

Eine schematische Übersicht über den Verlauf des Screenings und der Isolierung einer vollständigen Weizen-LOX-cDNA ist in den folgenden beiden Seiten dargestellt (s. Abb. 3.20).

1. Screening

<u>Signalstärke</u>	<u>Isolierte Klone</u>	
+/-	1, 4, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14	} → Lagerung bei 4 °C
++	2, 3, 5	
+++	7, 10	

2. Screening

<u>Signalstärke</u>	<u>Isolierte Klone</u>	
+/-	7.1, 2.1, 3.1, 5.1	} → Lagerung bei 4 °C
++	10.1, 10.2, 10.3, 10.10	
+++	10.4, 10.5, 10.6, 10.7, 10.8, 10.9	

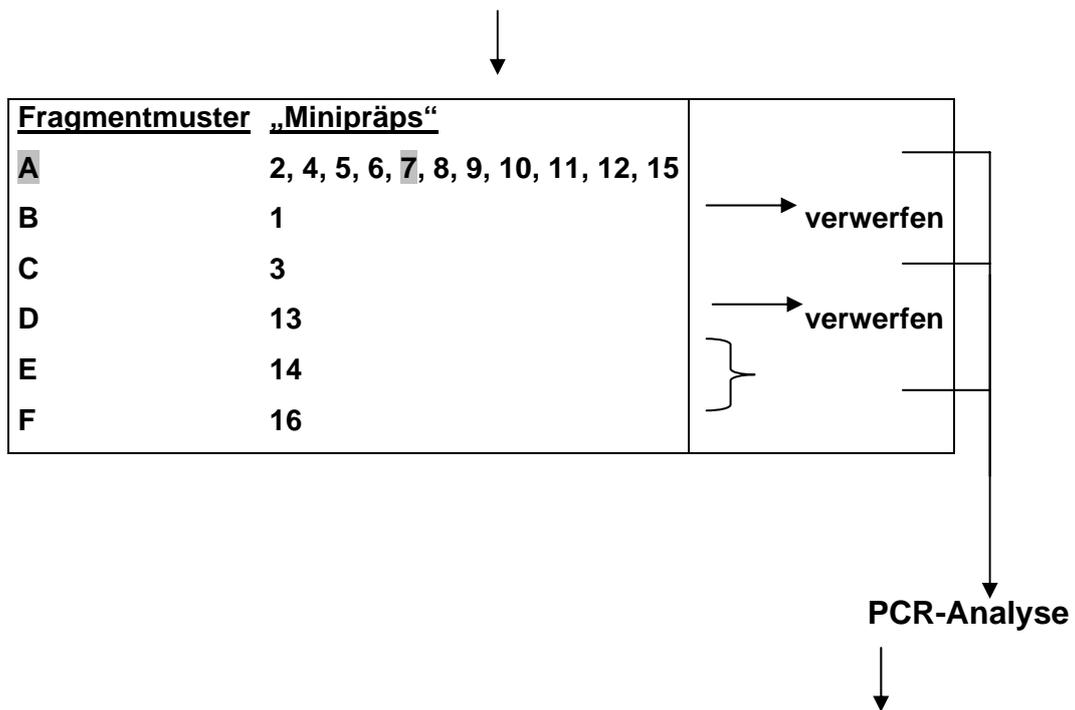
3. Screening

<u>Signalstärke</u>	<u>Isolierte Klone</u>	<u>Umbenannt in</u>	<u>„Minipräps“</u>
+++	10.4.1	I	1, 2
+++	10.4.2	II	3, 4
+++	10.5.1	III	5, 6
+++	10.5.2	IV	7, 8
+++	10.6.1	V	9
+++	10.6.2	VI	10
+++	10.7.1	VII	11
+++	10.7.2	VIII	12
+++	10.8.1	IX	13
+++	10.8.2	X	14
+++	10.9.1	XI	15
+++	10.9.2	XII	16

Restriktionsanalyse

(Fortführung s. folgende Seite)

**Restriktionsanalyse**



<b>Fragmentmuster</b>	<b>„Minipräps“</b>
<b>A</b>	2, 4, 5, 6, <b>7</b> , 8, 9, 10, 11, 12, 15
<b>B</b>	1
<b>C</b>	3
<b>D</b>	13
<b>E</b>	14
<b>F</b>	16

**PCR-Analyse**

<b>Fragmentmuster/Mini-Präp</b>	<b>PCR 1</b>	<b>PCR 2</b>	<b>PCR 3</b>	
<b>A "Mini" 7</b>	+	-	+	→ <b>LOX2 Ta1</b>
<b>C/ "Mini" 3</b>	+	-	-	} <b>Primer ungeeignet</b>
<b>E/ "Mini" 14</b>	+	-	-	
<b>F/ "Mini" 16</b>	+	-	-	

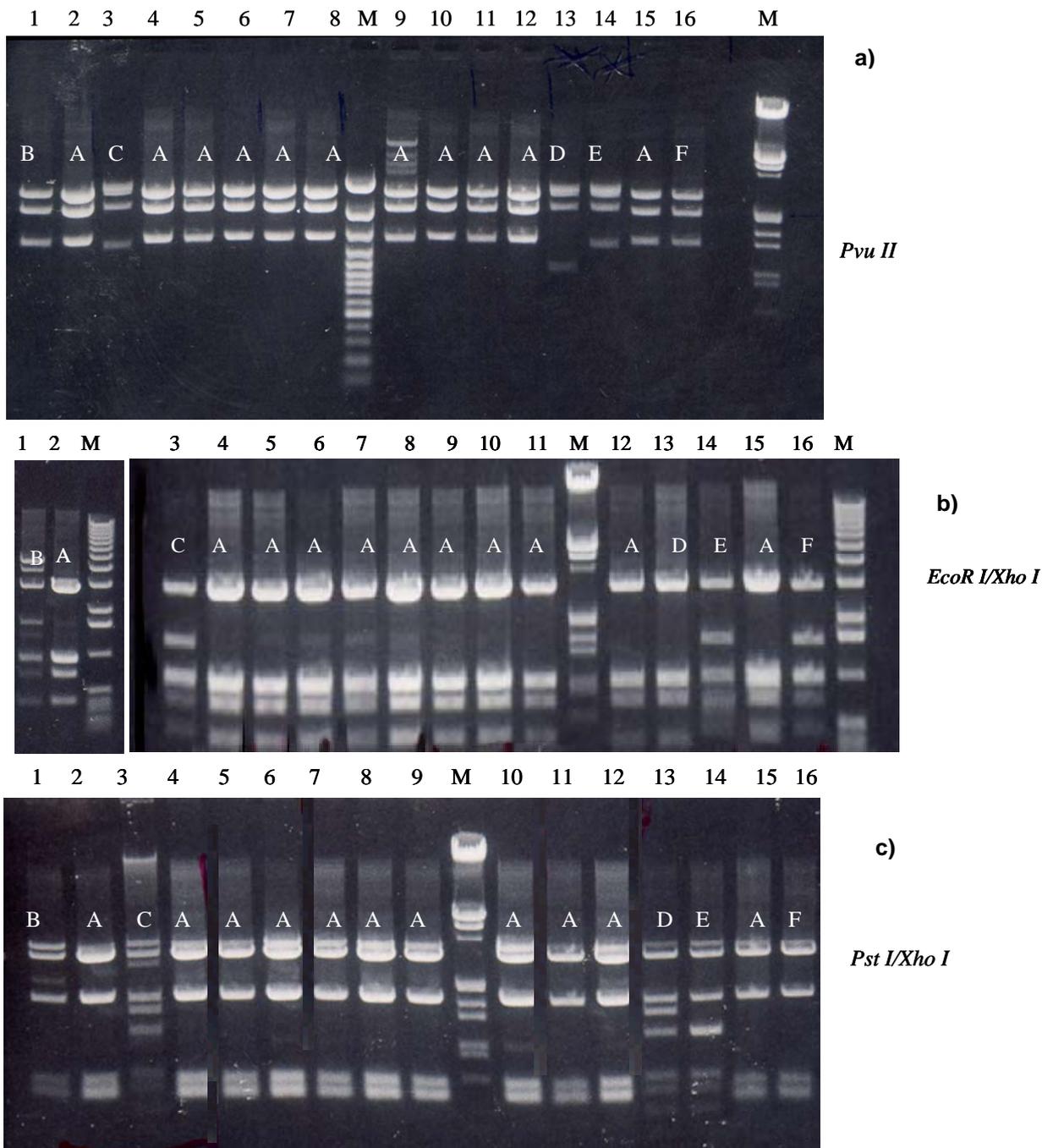
**Abb. 3.20 Screening einer Weizen-cDNA-Bank und Isolierung einer vollständigen Weizen-LOX-cDNA (*LOX2 Ta1*)**

Das cDNA-Screening verlief über 3 Runden. Das Ergebnis waren 12 Klone (I - XII) mit sehr starkem Signal. Mithilfe von Restriktionsanalysen konnten diese Klone in 6 Klassen (Fragmentmuster A - F) eingeteilt werden, zwei davon (B, D) konnten bereits zu diesem Zeitpunkt (zusätzliche Banden, s. Abb. 3.21) ausgeschlossen werden. Mit den verbliebenen vier Kandidaten wurden PCR-Analysen durchgeführt, womit weitere drei Kandidaten ausgeschlossen werden konnten. Die isolierte LOX-cDNA (aus Klon IV) wurde gemäß neueren Nomenklatur-Regeln in *LOX2 Ta1* umbenannt. Zur besseren Orientierung ist der gesuchte cDNA-Klon grau unterlegt.

Nach dem ersten Screening waren insgesamt 14 Signale zu sehen, verteilt auf fünf Platten mit einem Phagentiter von je 20000 – 50000 phu/Platte. Davon waren zwei Signale sehr stark (Klon 7, 10), drei stark (Klon 2, 3, 5) und die restlichen eher schwach. Die Phagen mit den fünf stärksten Signalen wurden isoliert und die Klone 7, 10, 2, 3 und 5 für das weitere Screening eingesetzt. Nach dem zweiten Screening

waren nur auf den Membranen der Platten mit Klon 10 starke Signale zu sehen. Es wurden 10 Klone (10.1 –10.10) isoliert und wiederum nur die mit den stärksten Signalen (10.4, 10.5, 10.6, 10.7, 10.8, 10.9) für das dritte Screening eingesetzt. Dafür wurden die Phagen so stark verdünnt, dass die einzelnen Plaques gut sichtbar waren. Von allen sechs Klonen (10.4 – 10. 9) wurden je zwei (10.4.1, 10.4.2, 10.5.1, 10.5.2 etc.; später unbenannt in Klon I = 10.4.1 – Klon XII = 10.9.2) aufgearbeitet („*In vivo* Excision“, s. 2.29).

Von diesen Klonen wurden insgesamt 16 (1 – 16; wobei 1 und 2 von Klon I; 3, 4 von II; 5, 6 von III; 7, 8 von IV; 9 von V; 10 von VI; 11 von VII; 12 von VIII, 13 von IX, 14 von X; 15 von XI und 16 von XI stammen), willkürlich ausgewählte Miniplasmid-Präparationen (2.38.1) aufgearbeitet. Zwecks Überprüfung der Insertgrößen wurden Restriktionsanalysen (Abb. 3.21) mit diesen Plasmiden durchgeführt. Es wurden 3 unterschiedliche Restriktionsanalysen angesetzt, a) *Pvu II*, b) *EcoR I* + *Xho I* und c), *Pst I* + *Xho I* (Abb. 3.21).



**Abb. 3.21 Restriktionsanalyse von Klon I- XII (a – c)**

Von den zwölf Klonen wurden insgesamt 16 Miniplasmid-Präparationen hergestellt und damit je drei Restriktionsanalysen durchgeführt. Dabei wurden die aufgeführten Restriktionsenzyme genutzt:

- a) *Pvu II*
- b) *EcoR I + Xho I*
- c) *Pst I + Xho I*.

Man erkennt sechs verschiedene Fragmentmuster (A –F)

Bei allen drei Ansätzen sollte das Insert komplett herausgeschnitten werden. Aus Vergleichen mit bekannten LOX-Genen (Daten nicht gezeigt) konnte von einer Insert-Größe von rund 2500 – 3000 bp ausgegangen werden, falls eine vollständige cDNA kloniert worden war. Zusammen mit einem Vektoranteil von ebenfalls rund 3000 bp sollte die Gesamtgröße von ca. 5500 – 6000 bp betragen. Zudem wurde in dem streng konservierten Bereich des 3'-Endes aufgrund der Sequenzinformationen der genutzten Sonde für das Screening („L 500“) mit einer *Pst I*-Schnittstelle gerechnet. Die Klonierungsrichtung war aufgrund der Konstruktion der cDNA-Bank (s. ZAP-cDNA<sup>®</sup> Synthesis Kit, instruction manual for Lot #UC124, Stratagene) bekannt. In der nachfolgenden Tabelle sind die erwarteten Fragmente und alle tatsächlich detektierten einander gegenübergestellt.

Verdau	Erwartete Fragmente	Erhaltene Fragmente
<b><i>Pvu II</i></b>	mind. 2 Banden:  2500 bp (Vektor), ca. 2900 – 3400 bp (Insert + 400 bp Vektor)	3 Banden:  2500 bp, ca. 2100 bp, und 1000 – 1300 bp (meist 1300 bp)
<b><i>Pst I, Xho I</i></b>	mind. 3 Banden:  3000 bp (Vektor), 400 – 500 bp (bekannte <i>Pst I</i> -Schnittstelle), ca. 2500 bp (Insert)	4 bzw. 6 Banden:  ca. 3000 bp, ca. 1600 bp, 500 bp, 400 bp, zusätzlich (z. T.): 1000 bp, 1600 bp 600 bp
<b><i>EcoR I, Xho I</i></b>	mind. 2 Banden:  ca. 3000 bp (Vektor), ca. 2500 3000 bp (Insert)	4 bzw. 5 Banden  3000 bp, 1000 bp (sehr stark), 700 bp, 400 bp zusätzlich: z. T.: 1600 bp

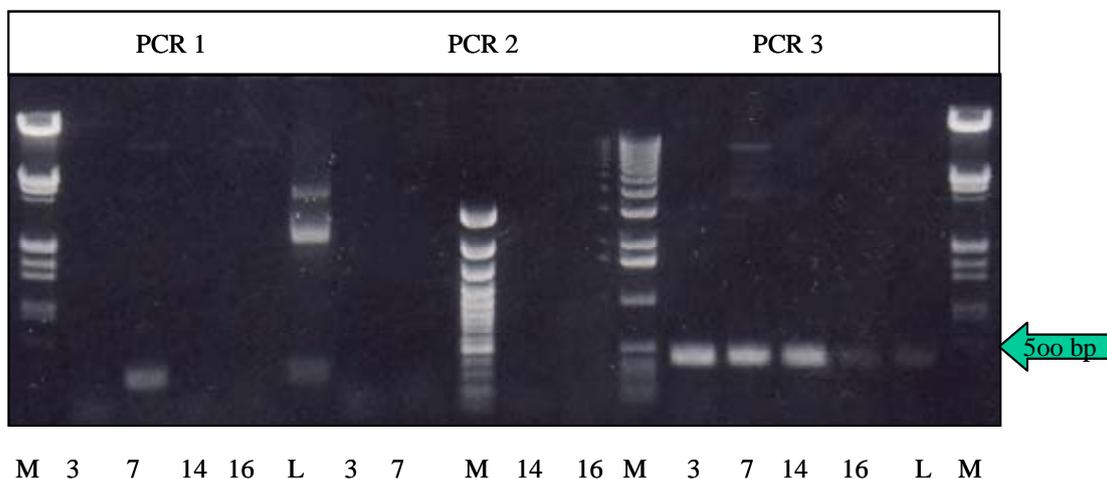
**Tab. 3.4 Restriktionsanalysen der cDNA-Klone I – XII**

Die erwarteten Fragmente nach dem Verdau sind den tatsächlich erhaltenen Fragmenten gegenübergestellt.

Die Restriktionsanalysen ergaben, dass das Insert Schnittstellen für die ausgewählten Enzyme besitzt. Die Banden einiger Fragmente waren außergewöhnlich stark, weswegen vermutet wurde, dass sich darunter mehrere Fragmente verbargen. Diese Annahme erwies sich im Nachhinein als richtig.

Anhand der Fragmentmuster ließen sich die Plasmide der cDNA-Klone in sechs verschiedene Klassen (A - F, vgl. Abb. 3.21) einteilen, wobei die Restriktionsanalysen von 1 (B) und 13 (D) wegen der vielen zusätzlichen Banden sehr stark vom erwarteten Fragmentmuster abwichen. Sie wurden daher nicht weiter untersucht.

Von den übrigen Gruppen wurde je ein Vertreter (7 aus A, 3 aus C, 14 aus E, 16 aus F) für PCR-Analysen (2.37) ausgewählt (Abb. 3.22). Die Größe der erwarteten Produkte war bekannt, s. Tab. 3.6. Es kamen sowohl spezifische Primer aus L 500 („VNF“ und „MiCT“; PCR1, s. Tab. 2.1) als auch degenerierte LOX-Primer („AIELT“ und P1; PCR 2; „GIPN“ und „HAA“, PCR 3, s. Tab. 2.1) zum Einsatz. Für die Kontrollansätze von PCR 1 und PCR 3 wurde L 500 als Template genutzt. Für PCR 2 stand kein Kontrollansatz zur Verfügung. Wie sich später herausstellte, war der in PCR 2 genutzte Primer „AIELT“ aufgrund seiner Sequenz nicht geeignet. Daher konnte in diesem Fall auch kein Produkt amplifiziert werden.



**Abb. 3.22** PCR-Analysen (2.37) der „Mini-Präps“ 7 (A, aus IV), 3 (C, aus II), 14 (E, aus X) und 16 (F, aus XII).

Die Plasmide wurden mit drei verschiedenen Primerkombinationen Ansatz 1 – 3 = PCR 1 – 3) getestet. Während Primerkombination 3 bei allen eingesetzten Templates zu einem PCR-Produkt der richtigen Größe führte, war Primerkombination 1 nur mit Plasmid 7 (C) und dem Kontrollplasmid PL 500 erfolgreich. Mit Primerkombination 2 war keine Amplifikation möglich. Wie sich später herausstellte, war die Sequenz von „AIELT“ nicht komplementär zur cDNA.

Ansatz	Template	Primer-Kombination	Erwartete Größe	Erhaltene Größe
PCR 1	7 (A)	VNF, MiCT	300	300
PCR 1	3 (C)	VNF, MiCT	300	-
PCR 1	14 (E)	VNF, MiCT	300	-
PCR 1	16 (F)	VNF, MiCT	300	-
PCR 1	L 500 (Kontrolle)	VNF, MiCT	300	300
PCR 2	7 (A)	AIELT, P 1	700	-
PCR 2	3 (C)	AIELT, P 1	700	-
PCR 2	14 (E)	AIELT, P 1	700	-
PCR 2	16 (F)	AIELT, P 1	700	-
PCR 3	7 (A)	„GIPN“, „HAA“	440	440
PCR 3	3 (C)	„GIPN“, „HAA“	440	440
PCR 3	14 (E)	„GIPN“, „HAA“	440	440
PCR 3	16 (F)	„GIPN“, „HAA“	440	440
PCR 3	L 500 (Kontrolle)	„GIPN“, „HAA“	440	440

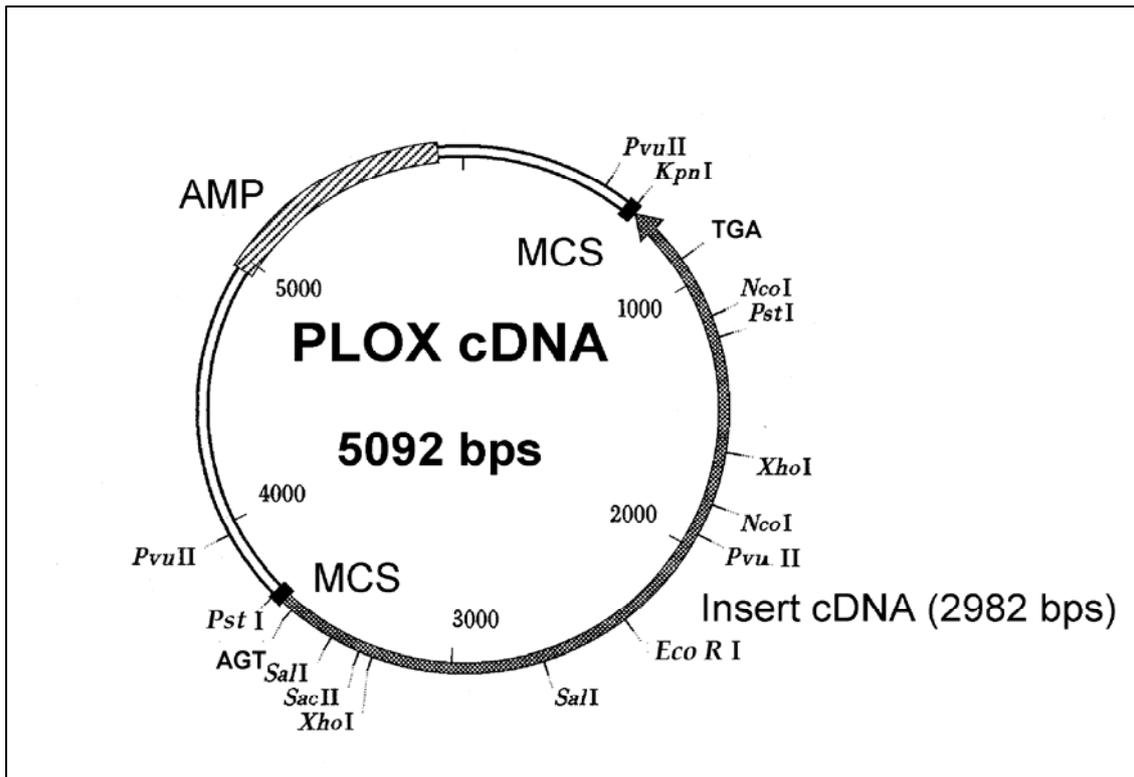
Tab. 3.6 PCR-Analysen der Klone 7 (A), 3 (C), 14 (E) und 16 (F).

Für jeden Klon wurden drei unterschiedliche PCR-Ansätze (PCR 1, PCR 2, PCR 3) getestet. Dazu wurden je drei Primerkombinationen eingesetzt. Wie sich später herausstellte, war der Primer „AIELT“ nicht komplementär zur gesuchten DANN und daher für diese Analyse nicht geeignet.

Die drei PCR-Analysen wurden parallel durchgeführt. Während bei PCR 3 mit allen fünf Templates eine Amplifizierung möglich war, gelang dies bei PCR 1 nur mit dem Kontrollplasmid PL 500 sowie mit Plasmid 7 (aus A, Klon IV).

Aufgrund der Konstruktionsweise der cDNA-Bank lag die LOX-cDNA als Insert im Vektor pBluescript® SK +/- (Stratagene) vor. Das resultierende Plasmid wurde PLOX-cDNA bezeichnet. Die cDNA wurde sequenziert.

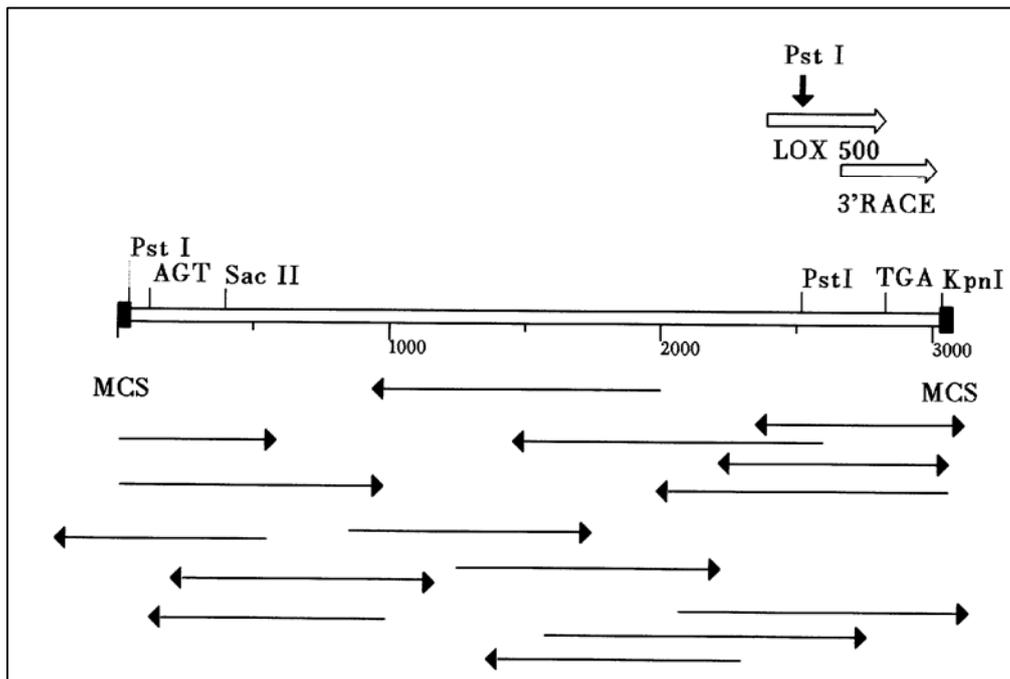
Da es sich bei der klonierten cDNA um die **erste** vollständige Weizen-LOX-cDNA handelt und diese aufgrund der Sequenz dem Typ2-LOX zugeordnet wird, wurde dieser Klon später umbenannt in *LOX2 Ta1* (Kapitel 3.4) Die Plasmidkarte findet man in Abbildung 3.23.



**Abb. 3.23** Plasmidkarte von PLOX-cDNA in pBluescript® SK +/- (Stratagene)

Die Karte stellt das Plasmid mit der klonierten „full-length“ LOX-cDNA schematisch dar. Sie wurde später aufgrund der Sequenz in *LOX2 Ta1* umbenannt.

Die Sequenzierungsstrategie von *LOX2 Ta1* sowie den cDNA-Fragmenten *L 500* und *L3UT* ist in Abbildung 3.24, die Sequenz von *LOX2 Ta1* ist in Abbildung 3.25 dargestellt.



**Abb. 3.24 Die Sequenzierungsstrategie von LOX2 Ta1, L 500 und L3UT**

Die einzelnen Sequenzierungen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Zur Orientierung ist die relative Lage von L 500 und von L 3UT (3'RACE) mit dickeren Pfeilen markiert.

1	GGCACGAGAG	AAGGTAGAGG	TCGAACCAGC	TCGATCCATC	GGCAGCAGCT
51	AGCTAGCCCT	GCCCGCGCCA	GCC <u>ATG</u> ATCC	ATCTGAAGCA	GCCGCTGGTG
101	CTCTCCGCGC	AGAGCAGCAA	TGTTGCCTCA	CCGCCGCTCT	TCGCCACGGC
151	GGCGGCCGCG	AGCGGCCAGC	AGAGGCGGGC	GTCCGGCGCC	GGGAGGAGCC
201	GCTCTGGGCG	CCGGCTCACG	GCGGCGAGGA	TAAGCTGCGC	GTCGACCGAG
251	GAGGCCGTCG	GCGTCTCGAC	GTCCGTGACG	ACCAAGGAGA	GGTCGCTGAC
301	GGTGACGGCC	GTCGTGACCG	CGCAGGCGCC	GACCTCCGTG	TACGTGCCCC
351	GCGGCCTCGA	CGACATCCAG	GACCTCTTCG	GCAAGAACT	GCTGCTCGAG
401	CTCGTCAGCT	CCGAGCTTGA	CCCCAAGACG	GGAAGGGAGA	GGGAGAAAGT
451	TAAGGGGTTC	GCGCACATGA	CGCTCAAGGA	GGGACGTAC	GAGGCCAAGA
501	TGTCGGTGCC	GGCGTCGTTC	GGGCCGGTGG	GCGCGGTGCT	GGTGGAGAAC
551	GAGCACCACA	GGGAGATGTT	CATCAAGGAC	GTCAAGCTCA	TCACCGGCGG
601	CGACGAGAGC	ACCGCCATCA	CCTTCGACGT	CGCCTCCTGG	GTGCACTCCA
651	AGTTCGACGA	CCCCGAGCCG	CGCGTCTTCT	TCACCGTCAA	GTCATACCTG

## Ergebnisse

---

701	CCGTCGCAGA	CGCCGCCGGG	AATCGAGGCG	CTGAGGAAGA	AGGAGCTGGA
751	GAAGCTGCGT	GGCGACGGGC	ACAGCGAGCG	CAAGTTCCAC	GAGCGCGTCT
801	ACGACTACGA	CACGTACAAC	GACCTCGGCG	ACCCTGACAA	GAACATCGAC
851	CACAAACGCC	CGGTGCTGGG	CACCAAGGAG	CACCCCTACC	CTCGCCGGTG
901	CCGCACCGGC	CGGCCCAAGA	CCCTCTACGA	TCCGGAGACG	GAGAGGAGGA
951	GCTCGCCGGT	GTACGTGCCG	CGCGACGAGC	AGTTCTCGGA	CGTCAAGGGG
1001	CGGACGTTCA	GCGCGACGAC	GCTGCGGTCTG	GGGCTGCACG	CCATCCTGCC
1051	GGCGCTGGCG	CCGCTGCTCA	ACAACCTCGCA	GTGCTTCTCG	CACTTCCCGG
1101	CCATCGACGC	CCTCTACAGC	GACGGCATCC	CGCTCCCCGT	CGACGGGCAC
1151	GGCGGCGCCT	CCTTCAACGT	CATCAACGAC	GTCATTCCCC	GTGTCGTCCA
1201	GATGATCGAG	GACACCACCG	AGCACGTCTT	CCGCTTCGAG	GTCCCCGAGA
1251	TGCTTGAGAG	GGACCGATTT	TCGTGGTTCA	GAGACGAGGA	GTTTCGCGAGG
1301	CAGACGCTCG	CCGGGCTCAA	CCCTATCTGC	ATCCGCCGCC	TCACGGAATT
1351	CCCCATCGTG	AGCAAGCTGG	ACCCGGCGGT	GTACGGGCCG	GCGGAGTCGG
1401	CGCTGACCAA	GGAGGTCCTG	GAGAAGATGA	TGAACGGGCG	CATGACGGTG
1451	GAGGAGGCGG	TGGAGAAGAA	GCGGCTGTTC	CTGCTGGACT	ACCACGACGT
1501	GTTCCCTGCCG	TACGTGCACA	GGGTGCGCGA	GCTGCCGGAC	ACGACGCTGT
1551	ACGGGTCCCG	CACCGTCTTC	TTCCTGAGCG	AGGAGGGCAC	GCTGATGCCG
1601	CTGGCCATCG	AGCTGACGCG	GCCGCAGTCG	CCGACCAGGC	CGCAGTGGAG
1651	GCGCGCCTTC	ACGCACGGCC	CCGACGCCAC	CGAGTCGTGG	CTGTGGAAGC
1701	TGGCCAAGGC	GCACGTGCTG	ACCCACGACA	CCGGCTACCA	CCAGCTGGTC
1751	AGCCACTGGC	TGCGCACGCA	CGCCTGCGTC	GAGCCCTACA	TCATCGCCAC
1801	CAACCGGCAG	CTCAGCCGGA	TGCACCCGGT	GCACCGCCTG	CTGCACCCGC
1851	ACTTCCGCTA	CACCATGGAG	ATCAACGCGC	TGGCCAGGGA	GGCGCTCATC
1901	AACGCCGACG	GCATCATCGA	GGAGGCCTTC	TGGCCGGGGA	GGTACTCCAT
1951	CGAGCTCAGC	TCCGTGCGCT	ACGGCGCCGC	CTGGCAGTTC	GACACGGAGG
2001	CGCTGCCGGA	GGACCTGGTA	AGCCGGGGGC	TCGCCGTGCG	CAGGGACGAC
2051	GGCGAGCTCG	AGCTCGCCAT	CAAGGACTAC	CCGTACGCCG	ACGACGGGCT
2101	CCTCATCTGG	GGCTCCATCA	AGCAGTGGGC	GTCCGACTAC	GTGGACTTCT
2151	ACTACAAGTC	GGACGGCGAC	GTCGCCGGCG	ACGAGGAGCT	GCGGGCGTGG
2201	TGGAAGAAGG	TGCGCACCAA	GGGGCACGCG	GACAAGAAGG	ACGAGCCGTG

2251	GTGGCCCGTG	TGCGACTCCA	AGGAGAACCT	CGTCCAGATC	CTGACCATCA
2301	TCATGTGGGT	CACGTCCGGC	CACCACGCCG	CCGTCAACTT	CGGGCAGTAC
2351	CATTACGCCG	GGTACTTCCC	CAACCGTCCG	ACGGTGGTGC	GGAAGAACAT
2401	CCCGGTGGAA	GAAAACCGGG	ACGATGAGAT	GAAGAAGTTC	ATGGCAAGGC
2451	CAGAGGAGGT	GCTGCTGCAG	AGCCTCCCCT	CGCAGATGCA	GGCCATCAAG
2501	GTGATGGCGA	CGCTGGACAT	CCTCTCCTCA	CACTCCCCCG	ACGAGGAGTA
2551	CATGGGAGAG	TACGCGGAGC	CGGCGTGGCT	GGCAGAGCCC	ATGGTGAAGG
2601	CGGCATTCTGA	GAAGTTCAGT	GGCAGACTGA	AGGAGGTGGA	GGGCACCATC
2651	GACCAGCGAA	ACAACAACCC	GGAGAACAAG	AACAGGTGTG	GCGCCGGCAT
2701	CGTGCCGTAC	GAGCTGCTCA	AGCCGTTCTC	AGAACCAGGG	GTCACTGGGA
2751	GGGGCATCCC	CAACAGCATC	TCCATTGAA	TGTGGCCCCA	GGATAAGTTA
2801	TCATTGCATG	TAGGATTAGG	AATAAGATTG	CCACCATGTA	CGCACCCAGC
2851	AGCGATTGCT	CCCGTCCCGT	GCATGACAGG	GGCCAGGAGA	GGCATCTACT
2901	AGTGTGTTCC	CGCTATTGTA	TGCCGTGAAT	TAGCAGTACT	AATAAGGTTA
2951	TTTGAATTGT	GAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AA	

**Abb. 3.25 Die Sequenz von LOX2 Ta1**

Die Sequenzen von *L 500* bzw. *L 3UT* sind farbig unterlegt. Sequenz-Abweichungen von *L 500* bzw. *L 3UT* zu *LOX2 Ta1* sind oberhalb der Sequenz angegeben (- bedeutet, dass hier eine Base fehlt!). Das Start- (**ATG**) und das Stop- (**TGA**) Codon sind unterstrichen.

Es war eine vollständige Weizen-LOX-cDNA kloniert worden. Insgesamt wurden 8 Abweichungen zu der Sequenz von *L 500* bzw. *L 3UT* festgestellt. Wenn man die entsprechenden abgeleiteten Aminosäuresequenzen miteinander vergleicht, erkennt man, dass es sich um zwei unterschiedliche Weizen-LOX-Enzyme handelt, deren cDNA (- Fragmente) hier kloniert wurden. Beide sind bisher nicht in den Datenbanken zu finden (s. Teil 3.4). Ein Vergleich der beiden Aminosäure-Sequenzen mit bekannten LOX-Spezies findet man ebenfalls in Kapitel 3.4. Die von *LOX2 Ta1* abgeleitete Proteinsequenz ist in Abbildung 3.26 abgebildet. Einige stark konservierte LOX-spezifische Sequenz-Motive sind grau unterlegt.

Ergebnisse

1	MIHLKQPLVL	SAQSSNVASP	PLFATAAAAS	GQRRRASGAG	RSRSGRRLTA
51	RRISCASTEE	AVGVSTSVTT	KERSLTVTAV	VTAQAPTSVY	VARGLDDIQD
101	LFGKTLLEL	VSELDPKTG	REREKVKGFA	HMTLKEGTYE	AKMSVPASFG
151	PVGAVLVENE	HHREMFIDV	KLITGGDEST	AITFDVASWV	HSKFDDPEPR
201	VFFTVKSYLP	SQTPPGIEAL	RKKELEKLRG	DGHSERKFHE	RVYDYDTYND
251	LGDPDKNIDH	KRPVLGTKEH	PYPRRCRTGR	PKTLYDPETE	RRSSPVYVPR
301	DEQFSDVKGR	TFSATTLRSG	LHAILPALAP	LLNNSQCFSH	FPAIDALYSD
351	GIPLPVDGHG	GASFNVINDV	IPRVVQMIED	TTEHVLRSR	PRCLRGTDFR
401	GFRDEEFARQ	TLAGLNPICI	RRLTEFPIVS	KLDPAVYGPA	ESALTKEVLE
451	KMMNGRMTVE	EAVEKKRFL	LDYHDVFLPY	VHRVREL PDT	TLYGSRTVFF
501	LSEEGTLMPL	<b>AIELTRPQSP</b>	TRPQWRAFT	HGPDATESWL	WKLAKAHVLT
551	HDTGYHQLVS	HWLRTHACVE	PYIATNRQL	SRMHPVHRL	HPHFRYTM EI
601	NALAREALIN	ADGIIIEAFW	PGRYSIELSS	VAYGAAWQFD	TEALPEDLVS
651	RGLAVRRDDG	ELELAIKDYP	YADDGLLIWG	SIKWASDYV	DFYYKSDGDV
701	AGDENCRAWW	KKVRTKGHAD	KKDEPWWPVC	DSKENLVQIL	TIIMWVTSGH
751	<b>HAAVNF</b> GQYH	YAGYFPNRPT	VVRKNIPVEE	NRDDEMKKFM	ARPEEVLLQS
801	LPSQMQAIV	MATLDILSSH	SPDEEYMGEY	AEPAWLA EPM	VKAAFEKFSG
851	RLKEVEGTID	QRNNNPENKN	RCGAGIVPYE	LLKPFSEPGV	TGR <b>GIPNSIS</b>
901	<b>I</b>				

**Abb. 3.26** Die von der DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäure-Sequenz von *LOX2 Ta1*  
Einige stark konservierte LOX-spezifische Sequenz-Motive sind grau unterlegt.

### 3.2.3 Northern-Analysen

Northern-Analysen dienen im Allgemeinen dazu, die Expression bestimmter Gene zu untersuchen. Das Hauptmotiv dieser Arbeit ist die Charakterisierung von induzierbaren Weizen-LOX. In Kapitel 3.1 wurde die Induktion von Weizen-LOX auf Enzymebene beschrieben, u. a. durch den Pgt (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici*)-Elicitor, das Signalmolekül Methyljasmonat (Meja), Berührung und durch Rostpilzinokulation (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici*).

Ein Ziel der Northern-Analysen war die Klärung der Frage, inwieweit sich diese Ergebnisse auch auf RNA-Ebene widerspiegeln. Zusätzlich sollte der Einfluss des chemischen Induktors Bion auf die LOX-Synthese festgestellt werden.

Entsprechend der beiden grundsätzlich unterschiedlichen Primärprodukte der LOX-Reaktion, nämlich dem 9er HPOD bzw. 13er HPOD, lassen sich die pflanzlichen LOX in 13- und 9-LOX einteilen. Das 13er HPOD ist Voraussetzung für den Jasmonat-Weg, wogegen bei einer 9-LOX andere Produkte (Gardner 1991; Liavonchanka and Feußner 2006) zu erwarten sind. Eindeutige Aussagen über die Positionsspezifität wurden bisher nur für die LOX-92 gemacht, diese gehören zu den 9-LOX (Bohland 1997; Loers 1999).

Die Unterscheidung, ob mit der *LOX2 Ta1* eine 9- oder 13-LOX kloniert wurde, ist ein weiterer Punkt, der mit Hilfe der Northern-Analysen bearbeitet werden sollte.

Daneben dienen die Northern-Analysen der weiteren Identifizierung und Charakterisierung der klonierten LOX-cDNA *LOX2 Ta1* und des klonierten cDNA-Fragmentes *L500*.

Zusammenfassend lassen sich die Ziele der Northern-Analysen wie folgt beschreiben:

- Die Untersuchung der LOX-Induktion auf RNA-Ebene
- Die weitere Identifizierung und Charakterisierung der klonierten LOX-Spezies
- Hinweise auf die Funktion der klonierten LOX

### 3.2.3.1 Northern-Analysen mit der Weizen-LOX-cDNA *Wci 2* und den cDNA-Fragmenten *L 500* bzw. *ZK 500* und *L 3UT*

Gesamt-RNA aus Weizenpflanzen und Weizensuspensionskulturen (unbehandelt) wurde, wie unter 2.26 beschrieben, aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membran geblottet (2.27.1).

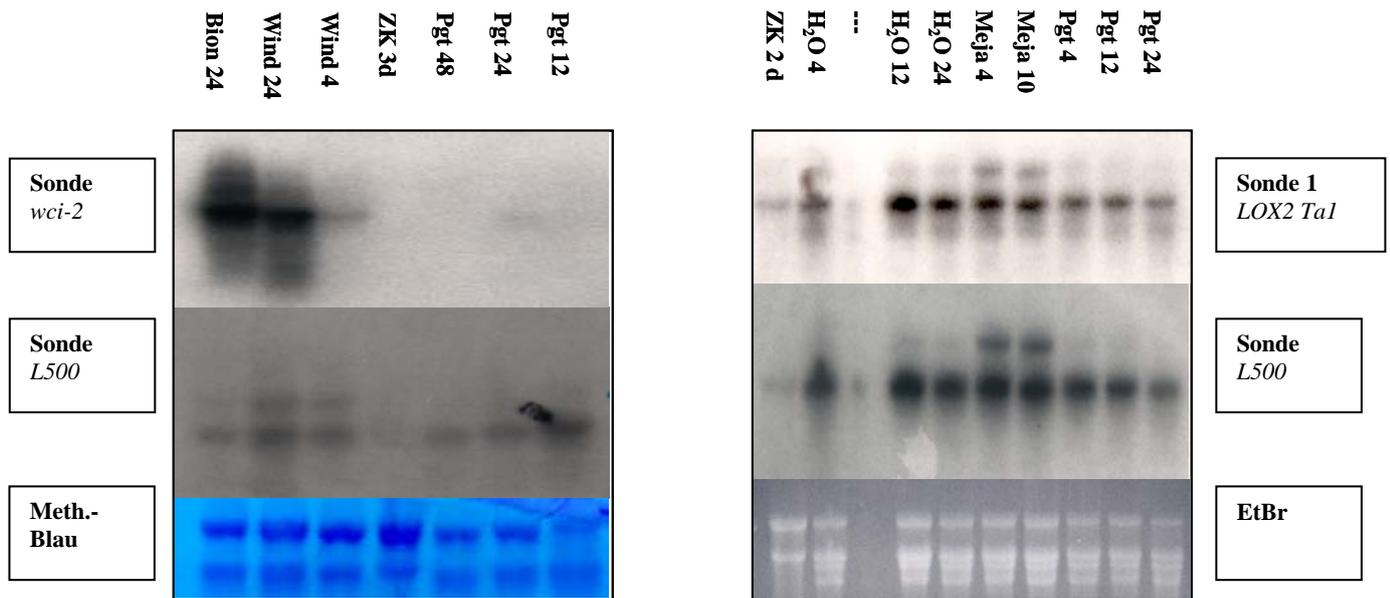
Die Zellkulturen (**ZK**) waren 1 – 3 Tage nach Subkultivierung geerntet worden, die Weizenpflanzen waren folgendermaßen behandelt (2.10) worden:

- **Pgt** (Ernte nach 4h – 48h) - Kontrollansatz: **A. reinst** („Wasser“; 4h - 48h)
- **Meja** (Ernte nach 4h – 24h) - Kontrollansatz: **A. reinst** („Wasser“; 4h – 24h)
- „**Wind**“ (Ernte nach 24h – 48h) - Kontrollansatz: **unbehandelt** („ube“, 24h - 48h)

Es kamen die folgenden Sonden zum Einsatz:

- *wci-2* - DNA *wci-2* (Positivkontrolle für „Wind“-Behandlung)
- *L500* - Insert von PL 500
- Sonde 1 *LOX2 Ta1* - *LOX2 Ta1*, geschnitten mit *XhoI* (ca. 1700 bp; vgl. Abb. 3.23 )
- Sonde 2 *LOX2 Ta1* - *LOX2 Ta1* geschnitten mit *PstI* / *EcoRI* (5' Ende, ca. 1400 bp, vgl. Abb. 3.23)
- Sonde 3 *LOX2Ta1* - *LOX2 Ta1*, geschnitten mit *PstI* / *Sall* (5' Ende, ca. 400 bp, vgl. Abb. 3.23)

In Abbildung 3.27 sind die Autoradiogramme von den ersten Northern-Analysen mit den Sonden *L 500* und *Wci-2* und Sonde 1 der LOX-cDNA *LOX2 Ta1* abgebildet.



**Abb. 3.27** Autoradiogramme von Northern-Analysen von RNA aus Weizenblättern nach unterschiedlichen Behandlungen, sowie aus unbehandelten Weizen-Suspensionkulturen

Gesamt-RNA (10 µg/Spur) wurde aus behandelten Weizenblättern und unbehandelten Weizen-Suspensionskulturen zu unterschiedlichen Zeitpunkten isoliert.

Erläuterungen:

- |                             |                                                                                      |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| ZK 3d, ZK 2d:               | RNA aus 3 bzw. 2 Tage alten Zellkulturen                                             |
| Wind 4, Wind 24             | RNA aus „Wind“-behandelten Weizenprimärblättern, nach 4 bzw. 24 h geerntet           |
| Bion 24                     | RNA aus Bion <sup>®</sup> -behandelten Weizenprimärblättern, nach 24 geerntet        |
| Meja 4h; 10 h               | RNA aus Meja-behandelten Weizenprimärblättern, nach 4 bzw. 10 h geerntet             |
| Pgt 4, 12, 24, 48 h         | RNA aus Pgt-behandelten Weizenprimärblättern, nach 4, 12, 24, 48 h geerntet          |
| H <sub>2</sub> O 4, 12, 24h | RNA aus H <sub>2</sub> O-behandelten Weizenprimärblättern, nach 4, 12, 24 h geerntet |

Als Ladungskontrolle ist der Methylenblau (Meth.-Blau) gefärbte Northernblot (s. 2.28) bzw. das EtBr-gefärbte Agarosegel (EtBr) (1,2% w/v) mit abgebildet.

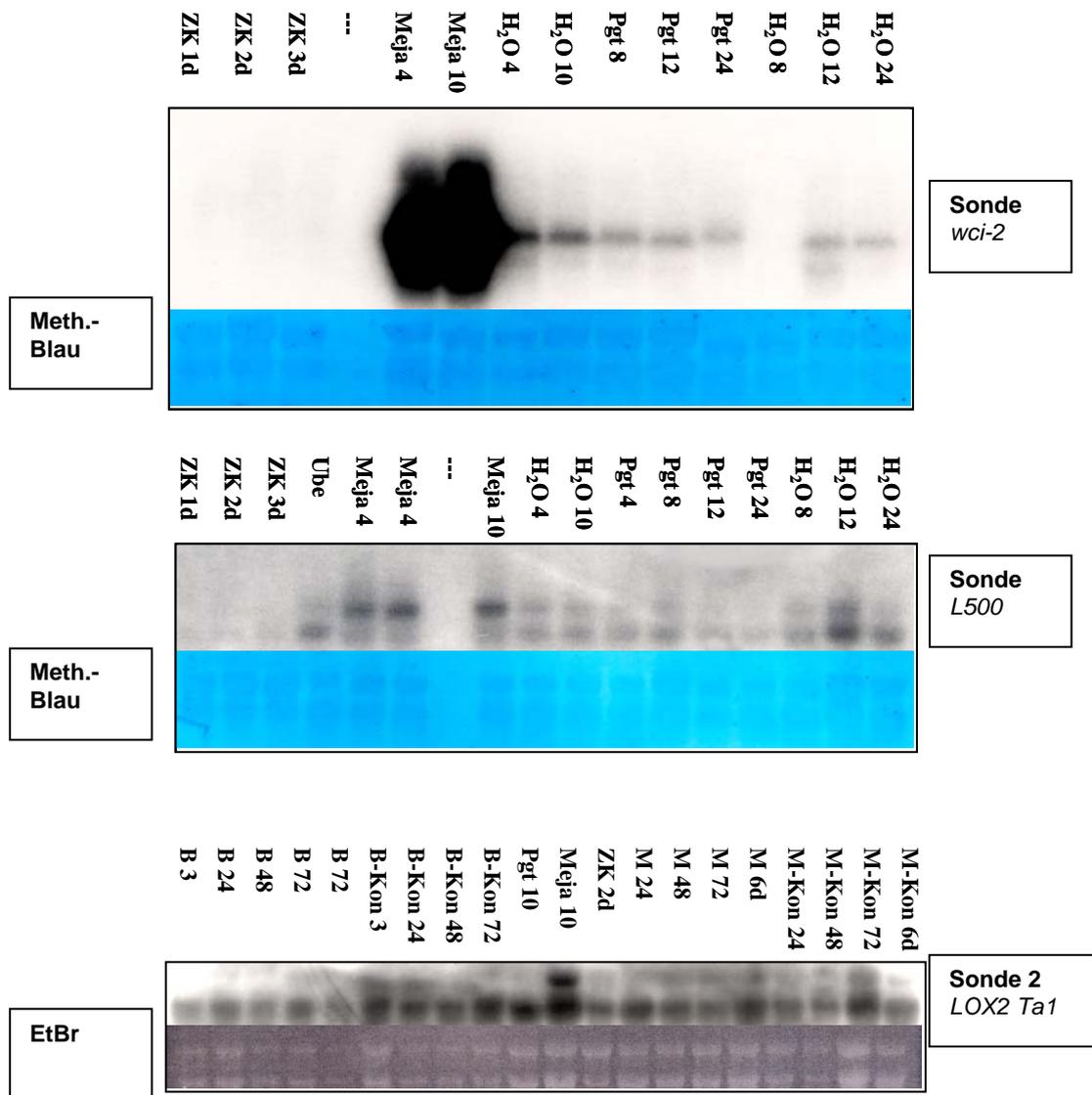
Bei diesen ersten Northern-Analysen wurde Folgendes beobachtet:

Es werden 2 unterschiedlich große Signale detektiert, wobei das untere konstitutiv vorhanden zu sein scheint. Eine Induktion der LOX-RNA durch den Pgt-Elicitor konnte nicht gezeigt werden, vielmehr kam es zu einer leichten Abschwächung des unteren

Signals nach Pgt-Injektion. Das obere Signal ist dagegen nur nach Meja-Injektion, „Wind“-Induktion und Bion<sup>®</sup>-Behandlung erkennbar.

Die detektierten Signale waren insgesamt aber noch nicht eindeutig. Da LOX-Gene sich am 3'-Ende kaum, am 5'-Ende dagegen stark unterscheiden, wurde die LOX-cDNA *LOX2 Ta1* für die folgenden Analysen immer weiter in Richtung 5'-Ende verkürzt. Die entstandenen Sonden waren daher spezifischer als die Sonde aus der Mitte des Gens (Sonde 1). Unspezifische Signale wurden so vermindert.

Zum Vergleich wurden jeweils immer auch Untersuchungen mit den Sonden *wci-2* und *L500* durchgeführt: In Abbildung 3.28 sind die Autoradiographien von Northern-Analysen mit den Sonden *wci-2*, *L500* und Sonde 2 aus der LOX-cDNA *LOX2 Ta1* abgebildet.



**Abb. 3.28** Autoradiogramme von Northern-Analysen mit den Sonden *wci-2*, *L500*, und der Sonde 2 aus *LOX2 Ta1*

Gesamt-RNA (10µg/Spur) aus unterschiedlich behandelten Weizenpflanzen sowie aus unbehandelten Weizen-Suspensionskulturen wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf Nylonmembranen immobilisiert. Es sind die folgenden Behandlungen untersucht worden:

- **B** Besprühen mit dem chemischen Induktor Bion, Ernte nach 3 – 72 h
- **B Kon** Kontrollansatz zur Bion-Behandlung, Besprühen mit der Leerformulierung, Ernte nach 3 – 72 h
- **Meja** Injektion des Signalmoleküls Methyljasmonat, Ernte nach 4-10 h

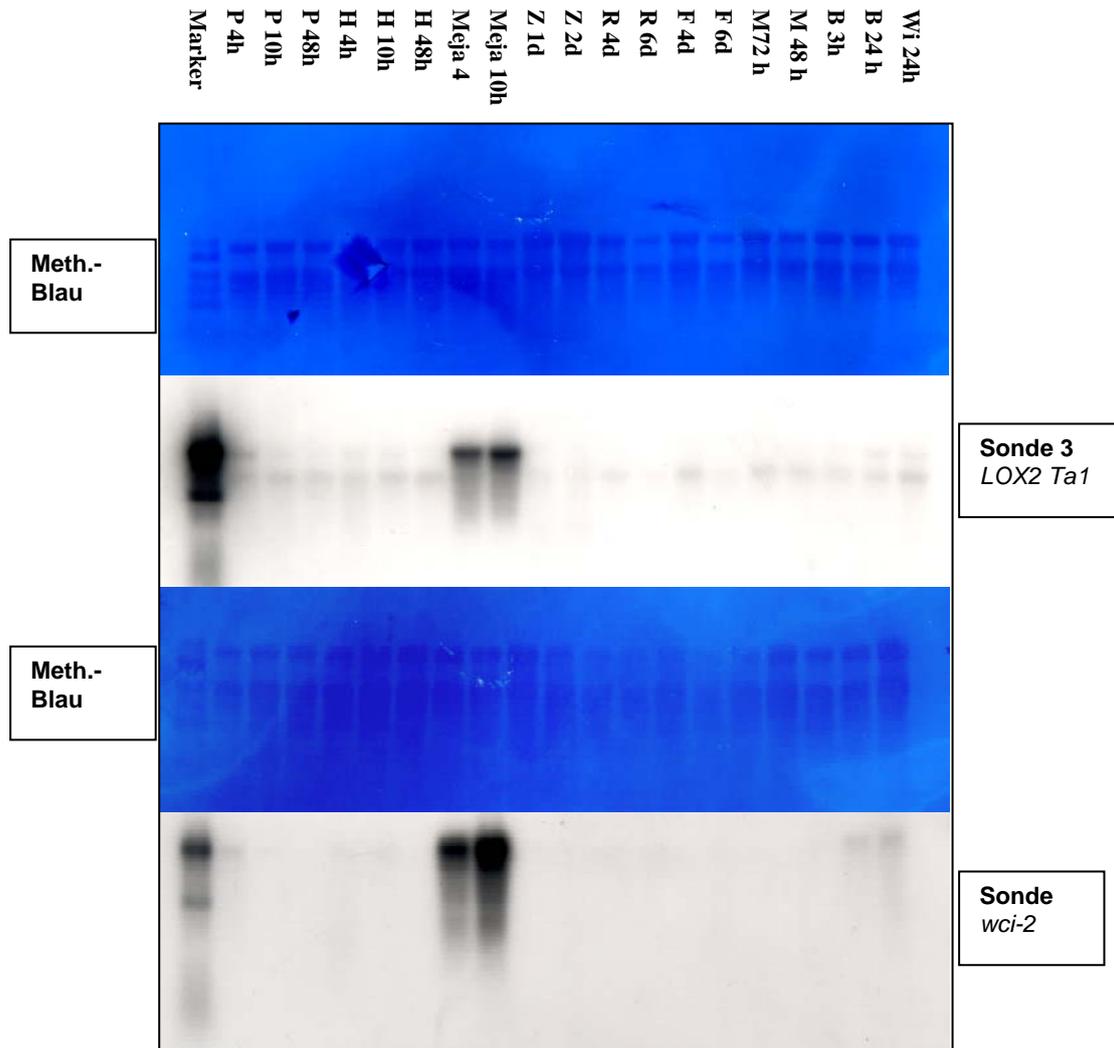
(Fortführung der Legende s. nächste Seite)

**Abb. 3.28**      **Autoradiogramme von Northern-Analysen mit den Sonden *wci-2*, *L500*, und der Sonde 2 aus *LOX2 Ta1* (Fortführung der Legende)**

- **M**                      Inokulation mit *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, dem echten Gersten-Mehltau, Ernte nach 24h - 6d
- **M-Kon**                Kontrollansatz zu M, Besprühen mit Wasser, Ernte nach 24h – 6d
- **Pgt**                     Injektion des Pgt-Elicitors, Ernte nach 4 – 12 h
- **H<sub>2</sub>O**                    Injektion von A. reinst, Kontrollansatz für Meja und Pgt, Ernte nach 4 – 12 h
- **ube**                    unbehandelt, ein zusätzlicher Kontrollansatz  
Außerdem wurde die RNA aus unbehandelten Weizen-Suspensionskulturen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1 – 3 d; **ZK**) aufgetragen.

Als Ladungskontrolle sind die Methylenblau-gefärbten (Meth.-Blau) Northernblots bzw. das EtBr-gefärbte Agarosegel (EtBr; 1,2% w/v) mitabgebildet.

Die in Abbildung 3.28 gezeigten Northern-Analysen verstärken die Hinweise, dass *LOX2 Ta1* durch Meja induzierbar ist. Das Ergebnis ist jedoch noch nicht eindeutig, da mit den bisher genutzten Sonden auch bei anderen Ansätzen Signale im Northernblot erkennbar sind. Dieser Effekt kann möglicherweise auf die Konstruktion der genutzten Sonden zurückgeführt werden. Diese beinhalten meist auch sehr konservierte DNA-Sequenzbereiche (Sonden 1 und 2). Daher wurde die cDNA *LOX2 Ta1* auf ca. 400 bp vom 5'- Ende weiter verkürzt (Sonde 3). Mit dieser Sonde wurden eindeutige Ergebnisse erzielt (Abb. 3.29).



**Abb. 3.29** Autoradiographie von Northern-Analysen mit der Sonde *wci-2* und der Sonde 3 aus *LOX2 Ta1*

Die Sonde *wci-2* war in diesem Fall als Positiv-Kontrolle eingesetzt worden. Pro Spur war 10 µg Gesamt-RNA aufgetragen worden. Die folgenden Behandlungen wurden untersucht:

- **B** Besprühen mit dem chemischen Induktor Bion, Ernte nach 3 bzw. 24 h
  - **R** Inokulation mit Uredosporen des Weizenschwarzrostes, Ernte nach 4 bzw. 6 d
  - **F** Besprühen mit Freon, Kontrollansatz für R, Ernte nach 4 bzw. 6 d
  - **Meja** Injektion des Signalmoleküls Methyljasmonat, Ernte nach 4 bzw. 10 h
  - **P** Injektion des Pgt-Elicitors, Ernte nach 4 – 48 h
  - **H** Injektion von H<sub>2</sub>O, Kontrollansatz für P und Meja, Ernte nach 4- 48 h
- Außerdem wurde die RNA aus unbehandelten Weizen-Suspensionskulturen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1d bzw. 2d; **Z 1d, Z 2d**) aufgetragen. Zur Ladungskontrolle sind die Methylenblau-gefärbten Northernblots abgebildet. Zum Größenvergleich ist ein RNA-Marker aufgetragen worden. Die Induktion durch Methyljasmonat ist deutlich erkennbar.

Mit Sonde 3 konnte die Induktion der *LOX2 Ta1* durch das Signalmolekül Meja (Methyljasmonat) eindeutig nachgewiesen werden. Dies kann als ein Hinweis gewertet werden, dass eine 13er LOX kloniert (Selbstinduktion) wurde. (Für den Jasmonat-Weg ist das 13er HPOD der LOX-Reaktion Voraussetzung.) Im Kapitel 3.3 wird dieser Hinweis weiter verfolgt.

Neben der starken Induktion durch Meja war auch durch die Injektion des Pgt- (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici*)-Elicitors nach relativ kurzer Zeit (4 h) ein schwaches Signal oberhalb der konstitutiv vorhandenen Bande sichtbar, was nach 10 h jedoch wieder verschwindet. Leider zeigt auch der daneben aufgetragene Marker ein Signal. Möglicherweise handelt es sich hierbei um zufällige Sequenzhomologien.

Des Weiteren konnte eine Induktion nach Besprühen mit dem chemischen Induktor Bion nachgewiesen werden. Das Signal war im Vergleich zur Meja-Induktion jedoch nur sehr schwach. Die Induktion durch Bion wurde daher nicht weiter untersucht.

Die RNA aus Zellkulturen zeigte, obwohl eine starke LOX-Enzym-Aktivität vorhanden, kein bzw. ein extrem schwaches Signal mit den verwendeten cDNA-Sonden.

Für weitere Untersuchungen wurde die cDNA *LOX2 Ta1* in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert und anschließend in *E. coli* sowie zellfrei expremiert (Kapitel 3.3).

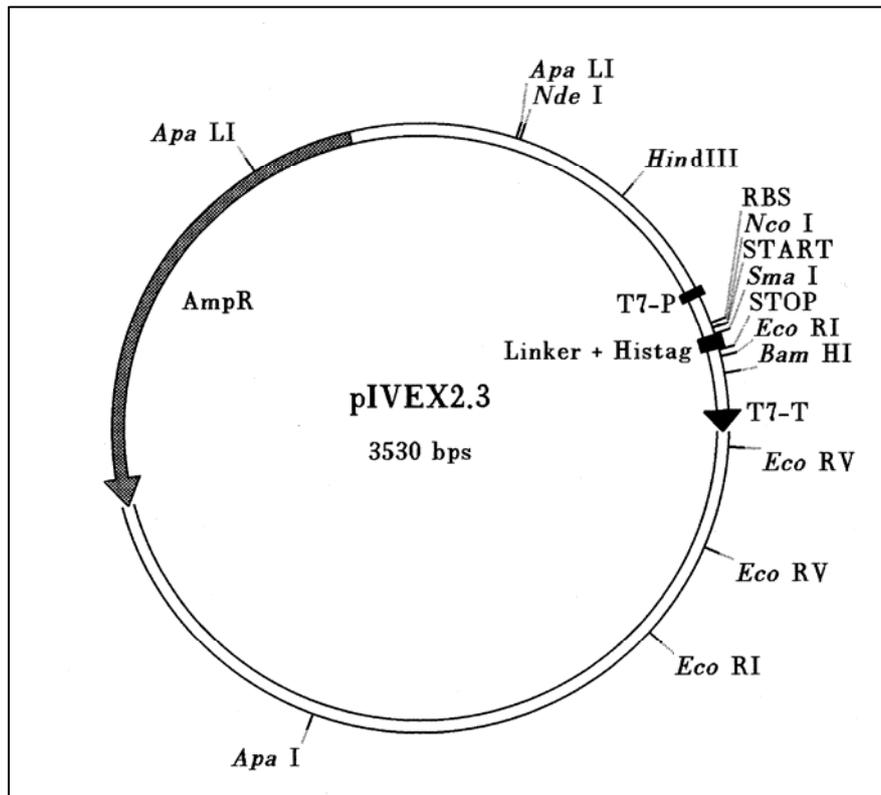
### Zusammenfassung des Kapitels 3.2

- Mit Hilfe von Sequenzvergleichen konnten degenerierte Primer konstruiert werden, welche erfolgreich zur Klonierung von Weizen-LOX-cDNA-Fragmenten (*L500*, *ZK 500*, *Ube 500* und *H 500*) eingesetzt wurden.
  - Sequenzvergleiche ergaben, dass diese klonierten cDNA-Fragmente identisch sind.
  - Mittels 3'-RACE („Rapid amplification of cDNA-ends“) wurde zudem ein Teilstück der 3'-untranslatierten Region dieses cDNA-Gens gewonnen. In den überlappenden Bereichen besteht eine 100%ige Übereinstimmung zu den zuvor klonierten cDNA-Fragmenten.
  - Eines dieser Weizen-LOX-cDNA-Fragmente (*L500*) wurde als Sonde für die Isolierung einer „full-length“ LOX-cDNA (*LOX2 Ta1*) genutzt.
  - Sequenzvergleiche ergaben, dass insgesamt sehr wahrscheinlich zwei unterschiedliche Weizen-LOX-cDNA bzw. Weizen-LOX-cDNA-Fragmente kloniert (*LOX2 Ta1*, *L500*) wurden.
  - Northern-Analysen zeigten, dass *LOX2 Ta1* durch das Signalmolekül Meja (Methyljasmonat) induzierbar ist. Möglicherweise weist dies darauf hin, dass hier eine 13-LOX kloniert wurde.
-

### 3.3 Die Expression der LOX-cDNA (*LOX2 Ta1*) in *E. coli* und im zellfreien System (rekombinante LOX)

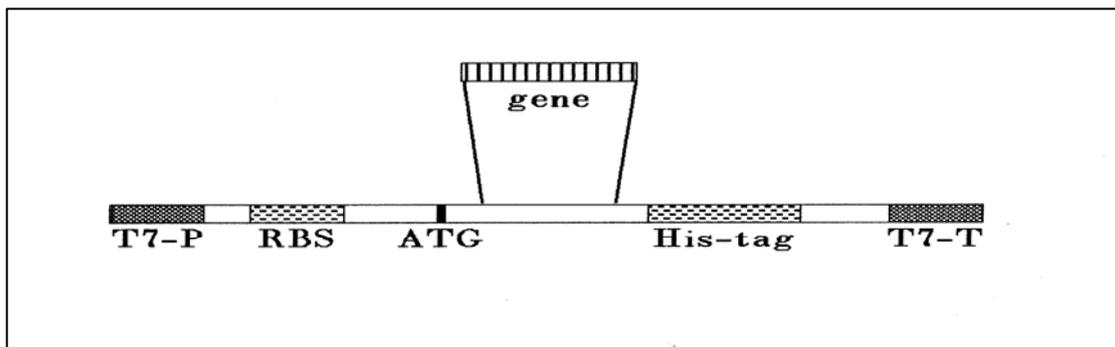
Um das LOX-Protein zu untersuchen, wurde die cDNA in den Expressionsvektor pIVEX 2.3 (Roche; s. Abb. 3.30 a, b) kloniert. Dieser Vektor besitzt einen C-terminalen "Histag" mit 6 Histidin-Resten. Diese Histidin-Reste können von spezifischen Antikörpern erkannt werden. Somit wird die Aufreinigung des rekombinanten Proteins sowie dessen Nachweis mittels Immunodetektion erleichtert.

Die Klonierung erfolgte über die *Nco* I- *Sma* I- Schnittstelle des Vektors. Dazu wurde *LOX2 Ta1* aus drei cDNA-Fragmenten (Fragmente 1-3) zeitgleich in den aufgeschnittenen Vektor einligiert (Abb. 3.31). Zuvor mussten per PCR am 5'-Ende eine *Nco* I- (am ATG, PCR 1) und am 3'-Ende eine *Sma* I- Schnittstelle (Entfernen des Stop-Signals, PCR 2) eingefügt werden. Anschließend wurde das Produkt von PCR 1 mit *Nco* I und *Sac* II (Fragment 1), *LOX 2 Ta1* mit *Sac* II und *Pst* I (Fragment 2) und das Produkt von PCR 2 mit *Pst* I und *Sma* I (Fragment 3) geschnitten. Schematisch ist die Klonierungsstrategie in Abbildung 3.31 wiedergegeben. Das neue Plasmid wurde Ligation 1 genannt.



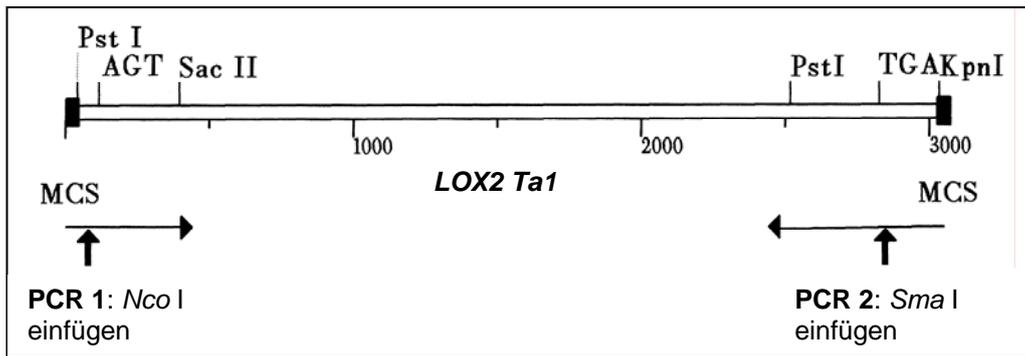
**Abb. 3.30 a** Der Vektor pIVEX 2.3

Die Karte stellt den Expressionsvektor pIVEX 2.3 mit den funktionellen Elementen und einigen wichtigen Restriktionsenzymchnittstellen dar.



**Abb. 3.30 b** Die funktionellen Elemente des Vektors pIVEX 2.3

1. cDNA vorbereiten (Fragmente 1, 2 und 3)



PCR 1 schneiden mit *Nco* I und *Sac* II:

cDNA *LOX2 Ta1* schneiden mit *Sac* II und *Pst* I:

PCR 2 schneiden mit *Pst* I und *Sma* I:

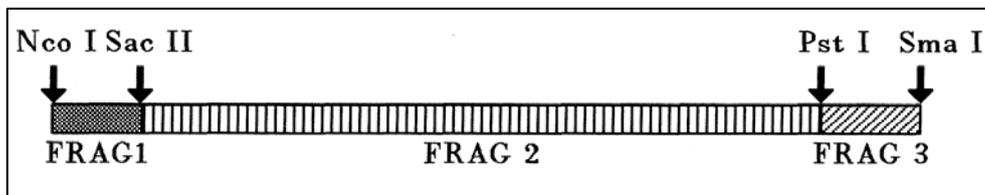
Fragment 1 (**FRAG 1**)

Fragment 2 (**FRAG 2**)

Fragment 3 (**FRAG 3**)



2. Ligation von Fragment 1, 2 und 3 (erfolgt zeitgleich mit Schritt 3)



3. Den vorbereiteten (mit *Nco* I und *Sma* I geschnittenen) Vektor pIVEX2.3 (s. 2.X) und die Fragmente 1, 2 und 3 zeitgleich ligieren: **Ligation 1**

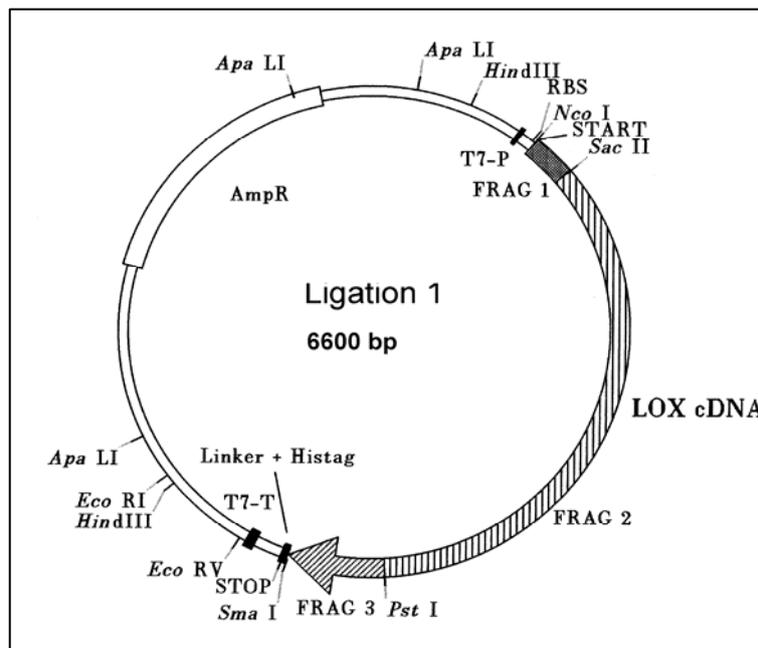


Abb. 3.31 Die Klonierungsstrategie von *LOX2 Ta1* in den Expressionsvektor pIVEX 2.3: (**Ligation 1**) (Schritte 1-3)

Das fertige Konstrukt (Ligation 1) wurde für die Transformation der *E. coli*- Stämme M15 und Sg 13009 eingesetzt. Zwecks Kontrolle, ob die cDNA „in frame“ ligiert wurde, wurden die Schnittstellen überprüft sowie Sequenzierungen mit dem T7-Terminator bzw. dem T7-Promotor als Primer durchgeführt. Danach erfolgte die Expression der LOX-cDNA in *E. coli*.

Es wurde jeweils ein positiv getesteter Klon ausgewählt: Klon 15.2 (aus M15) und Klon SG 4 (aus Sg 13009). Diese wurden wie unter 2.32.1 beschrieben angezogen und die LOX aufgearbeitet (s. 2.16.3). Mit den gereinigten Enzymen wurden Aktivitätsmessungen (2.17; 3.3.1), Produkt-Analysen (s. 2.22; 3.3.4) und Westernblot-Analysen (s. 2.21; 3.3.2) durchgeführt.

Parallel zu diesen Arbeiten wurde Ligation 1 auch für die Expression im zellfreien System („Rapid Translation System RTS 500“, Roche) eingesetzt. Die Versuche wurden wie unter 2.15.4 beschrieben durchgeführt. Das Produkt konnte direkt in die nachfolgenden Experimente eingesetzt werden.

### **3.3.1 LOX-Aktivitätsmessungen mit den rekombinanten LOX-Enzymen**

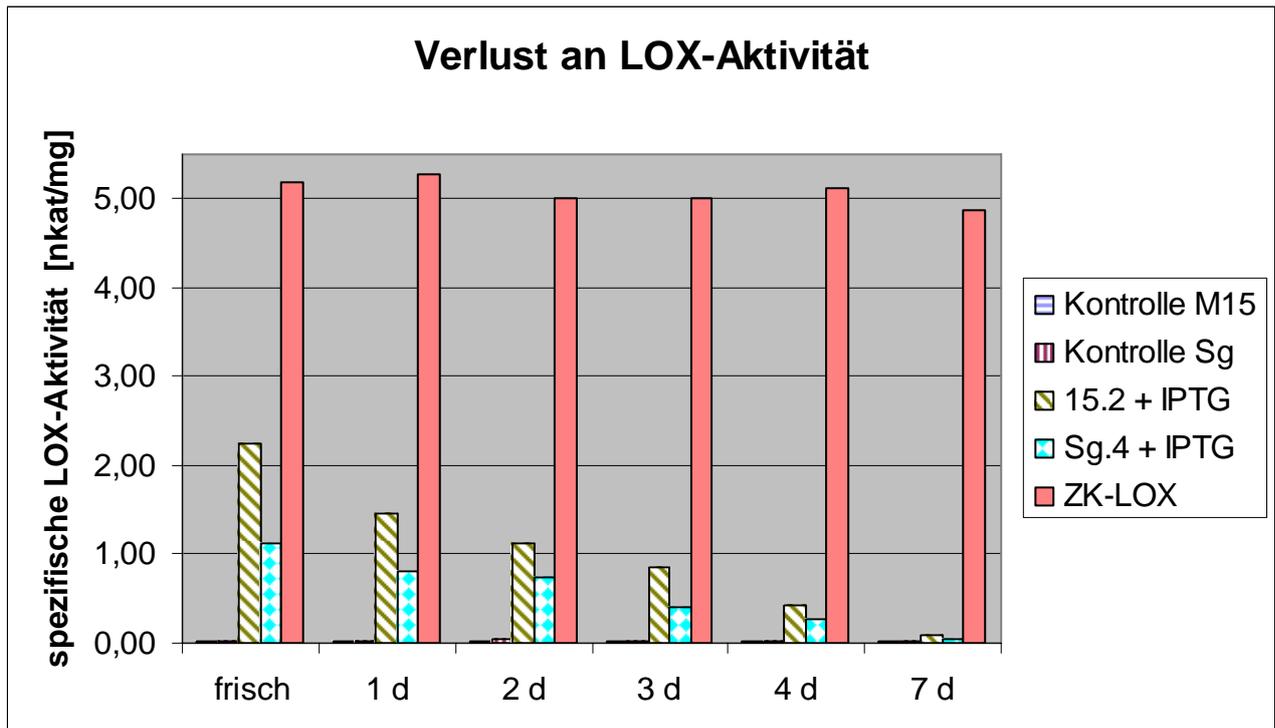
Alle gewonnenen rekombinanten LOX-Enzyme zeigten eine relativ niedrige LOX-Enzymaktivität und erwiesen sich als sehr instabil. Meist lag die messbare LOX-Enzymaktivität nahe Null. Es konnte jedoch, nach der Induktion durch IPTG, eine starke Abhängigkeit der LOX-Enzymaktivität von der Kultivierungs-Temperatur beobachtet werden. Die höchste LOX-Enzymaktivität wurde nach einer Inkubation bei 15 °C erreicht. Doch auch dann gab es Stabilitätsprobleme, schon nach 2 – 3 Tagen war 40 – 50 % der LOX-Enzymaktivität verloren. Spätestens nach einer Woche war kaum noch LOX-Enzymaktivität (< 0,5 nkat/mg) mehr messbar. Um die hohen LOX-Enzymaktivitätsverluste zu dokumentieren, wurde eine Zeitreihe durchgeführt, die Ergebnisse sind in Abbildung 3.32 dargestellt. Als Kontrollansätze dienten Extrakte aus:

- Nativen (nicht transformierten) M 15 und Sg 13009 *E. coli*- Kulturen, unter Induktionsbedingungen angezogen (= Kontrolle Sg bzw. Kontrolle M15)
- Als Positiv-Kontrolle LOX-Extrakte aus Weizen-Zellkulturen

Bei Kontrollansätzen der Klone 15.2 und SG 4 ohne IPTG-Induktion konnte keine LOX-Aktivität gemessen werden (z. T. negative Messwerte, Daten nicht gezeigt).

Um Fehlinterpretationen aufgrund der sehr niedrigen Messwerte auszuschließen, wurden sowohl photometrische als auch polarographische Bestimmungen (2.17) durchgeführt.

Insgesamt lagen die gemessenen LOX-Enzymaktivitäten deutlich unter den Werten der induzierten LOX-92 in den Weizenpflanzen bzw. der konstitutiv exprimierten LOX-92 in den Zellkulturen.



**Abb. 3.32** Zeitreihe (0 – 7 Tage) der LOX-Enzymaktivitäten der rekombinanten LOX aus den Klonen SG.4 und 15.2 im Vergleich zur LOX- Enzymaktivität aus Weizenzellkultur-Extrakten

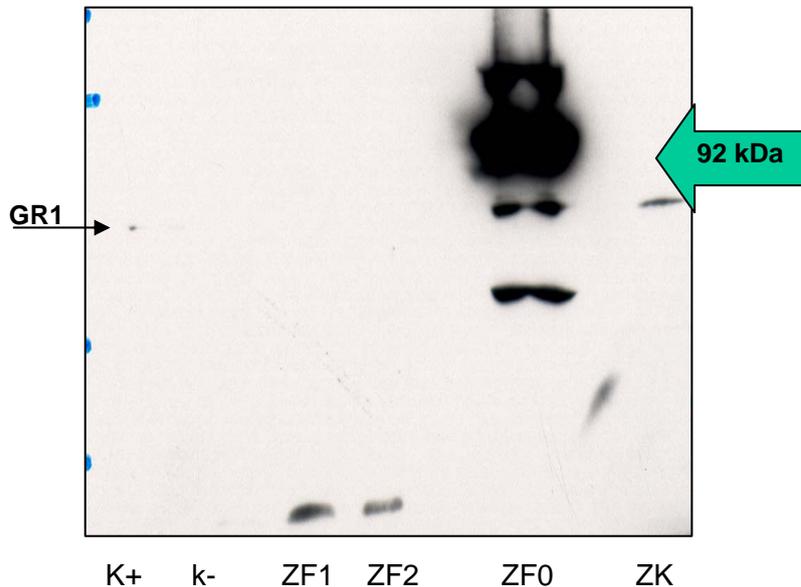
Dargestellt ist die LOX-Enzymaktivität aus den Rohextrakten. Kontroll-Ansätze waren: die Rohextrakte aus den nicht transformierten *E. coli*- Stämmen M15 (Kontrolle M15) und Sg 13009 (Kontrolle SG) nach Induktion durch IPTG (Negativ-Kontrollen) sowie als Positivkontrolle die Rohextrakte aus Weizenzellkulturen (Prelude Sr5). Es handelt sich hierbei um die Mittelwerte von zwei unabhängig durchgeführten Versuchsreihen.

Erläuterungen:

- |                      |                                                                                     |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| frisch:              | Messungen wurden unmittelbar nach der Aufarbeitung durchgeführt.                    |
| 1 d:                 | Messungen wurden genau einen Tag nach der Aufarbeitung durchgeführt.                |
| 2 (3; 4; 5; 6; 7) d: | Messungen wurden nach genau 2 (3; 4; 5; 6; 7) Tagen nach Aufarbeitung durchgeführt. |

### 3.3.2 Westernblot-Analysen mit den rekombinanten LOX-Enzymen

Weil das zellfrei exprimierte LOX-Protein keinerlei LOX-Enzymaktivität zeigte, wurde hier der Nachweis per Westernblot-Analyse (Abb. 3.33) durchgeführt. Für nachfolgende Experimente war dieses Protein jedoch ungeeignet.



**Abb. 3.33 Nachweis des rekombinanten LOX-Enzyms im zellfreien System über den Histag, mittels Anti-His-Antikörper**

Man sieht das Autoradiogramm eines Western-Blots nach der Chemilumineszenz-Reaktion. Signale weisen auf Histidin-Reste (Histag) der aufgetragenen Proteinextrakte hin. Der Nachweis wurde mittels Anti-His-Antikörper durchgeführt.

Erläuterungen:

K+: Positiv-Kontrolle, GR1-Protein, ca. 80 kDa

k-: Negativ-Kontrolle, der leere untransformierte Vektor

ZF1,2: 1 bzw. 2 Wochen alte zellfreie Ansätze

ZF0: frisch aufgearbeiteter zellfreier Ansatz

ZK: IAC-aufgereinigte LOX aus Weizen-Zellkulturen

Abbildung 3.33 zeigt das Autoradiogramm des Western-Blots von verschiedenen LOX-Extrakten nach der Chemilumineszenz-Reaktion. Nachgewiesen werden konnten Histidin-Reste (Histag) durch Anti-His-Antikörper. Aus abbildungstechnischen Gründen ist das Signal einer Positiv-Kontrolle (K+; GR1-Protein, 80 kDa, freundlicherweise von Frau Gudrun Schmitz, RWTH Aachen zur Verfügung gestellt) nur schwach erkennbar. Deswegen wurde ein Pfeil auf der Höhe des Positiv-Signals eingezeichnet. Der untransformierte Vektor pIVEX 2.3 diente als Negativ-Kontrolle

(k-).

Auf der Höhe von ca. 90 – 110 kDa sind bei den zellfrei gewonnenen LOX-Extrakten (ZF) zwar starke Signale erkennbar, jedoch sind diese Signale bei eine Woche alten Proben wieder verschwunden. Stattdessen erscheint ein nur wenige kDa großes schwächeres Signal, welches vorher nicht vorhanden war. Möglicherweise handelt es sich hierbei um Zerfallprodukte der LOX-Proteine. Das Signal des Zellkulturextraktes auf der Höhe von ca. 80 kDa weist auf eine native Anhäufung von His-Resten der Weizen-LOX hin.

### **3.3.3 Bestimmung des pH-Optimums der rekombinanten LOX aus Klon 15.2**

Insgesamt konnte bei den rekombinanten LOX-Enzymen lediglich relativ geringe LOX-Enzymaktivitäten gemessen werden. Auch erwiesen sich diese LOX-Enzyme als verhältnismäßig instabil. Da die LOX-Enzymaktivität der Enzymextrakte aus Klon 15.2 stets höher und auch stabiler als die LOX aus Klon SG.4 war, wurden alle weiteren Untersuchungen mit der 15.2-LOX durchgeführt. Auf die Anreicherung der rekombinanten LOX per IAC musste verzichtet werden, da nach der Chromatographie keine LOX-Enzymaktivität mehr messbar war.

Ein wichtiges Kriterium zur weiteren Charakterisierung von LOX-Enzymen ist die Identifizierung der primären LOX-Reaktionsprodukte. Dies wurde auch für die rekombinante LOX aus Klon 15.2 (15.2-LOX) angestrebt. Da die 15.2-LOX nur wenig LOX-Enzymaktivität zeigte und diese relativ rasch wieder verlor, war zuvor eine Optimierung der LOX-Reaktionsbedingungen unabdingbar. Deswegen sollte das pH-Optimum des Enzyms bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden photometrische Enzymaktivitäts-Bestimmungen bei unterschiedlichen pH-Werten angesetzt und zwar von pH 5,0 bis pH 9,0. Im Einzelnen wurden hierfür folgende Puffer-Lösungen eingesetzt:

im pH-Bereich von 5,0 – 6,0      0,1M Na-Acetat

im pH-Bereich von 6,0 – 7,0      0,1M Na-Citrat,

im pH-Bereich von 7,0- 9,0      0,1M Tris/HCl

Es konnten lediglich im Bereich von pH 6,0 bis pH 6,5 auswertbare (positive) Extinktionen gemessen werden. Die Enzymaktivität lag hier bei frisch aufgearbeiteten Proben zwischen 1,18 und 1,54 nkat/mg. Das beste Ergebnis konnte mit dem 0,1M

Citratpuffer bei pH 6,2 festgestellt werden. Die klonierte LOX gehört demnach zu den Typ2-LOX, wenn man die Klassifizierung anhand des pH-Optimums anwendet (Siedow 1991; Slusarenko 1996).

### 3.3.4 Die Positionsspezifität der rekombinanten LOX aus Klon 15.2

Die Bestimmung der Positionsspezifität (= Produktanalyse) ist ein wichtiges Kriterium zur Charakterisierung von LOX-Enzymen. Die Versuche zur Analyse der Positionsspezifität wurden wie unter 2.23 beschrieben durchgeführt. Zur Kontrolle waren zuvor LOX-Enzymaktivitätsmessungen durchgeführt worden (s. 3.3.1). Als Kontrollansätze dienten 13- und 9-HPODs-Standards (13- und 9-LOOH) sowie enzymfreie Ansätze.

Auch hier stellte die relativ geringe und sehr instabile Enzymaktivität der rekombinanten LOX aus Klon 15.2 ein Problem dar. Nach der Auftrennung der LOX-Reaktionsprodukte aus Klon 15.2 ergab sich folgendes Bild (Abb. 3.35a): Die „Ausbeute“ an sowohl 13-LOOH als auch an 9-LOOH war deutlich geringer als nach den parallel angesetzten enzymfreien Kontrollansätzen. Zum Vergleich wurden die folgenden Kontrollansätze mit bekannten LOX-Spezies gestartet:

- Mit der IAC-aufgereinigten LOX-92 aus Weizen-Primärblättern nach Pgt-Induktion (= „Pgt-LOX“)
- Mit der IAC-aufgereinigten LOX-92 aus Weizenzellkulturen (= „ZK-LOX“)
- Mit der käuflich erworbenen Soja-LOX (Typ I.S., Sigma)

Das Ergebnis dieser Tests ist ebenfalls in Abbildung 3.35 b zu sehen. Sie stimmten mit den zu erwartenden Ergebnissen überein (Bohland 1997, Loers 1999). Da beim Versuchsansatz mit dem Extrakt aus *E. coli* eine Abnahme der LOOH (sowohl der 9- als auch der 13-LOOH) im Vergleich zum enzymfreien Kontrollansatz zu verzeichnen war, wurden die folgenden modifizierten Vergleichsansätze durchgeführt:

Zunächst wurden LOX-Reaktionen mit bekannten LOX-Enzymen („Pgt-LOX“, „ZK-LOX“, Soja-LOX Typ1) normal gestartet. Nach 7 min erfolgte das Abstoppen der Reaktionen durch Ansäuern mit HCl. Eine Hälfte der entstandenen Produkte wurde direkt in die Produktanalyse eingesetzt und per HPLC aufgetrennt. Die andere Hälfte

wurde mithilfe von O<sub>2</sub>-gesättigtem Citratpuffer umgepuffert und nun als Substrat für LOX-Reaktionen mit der rekombinanten LOX eingesetzt. Diese Reaktionsprodukte wurden wiederum per HPLC aufgetrennt (Abb. 3.35c). Die Ergebnisse aller zuvor beschriebenen Versuchsansätze sind in Abbildung 3.35 (a-c) dargestellt.

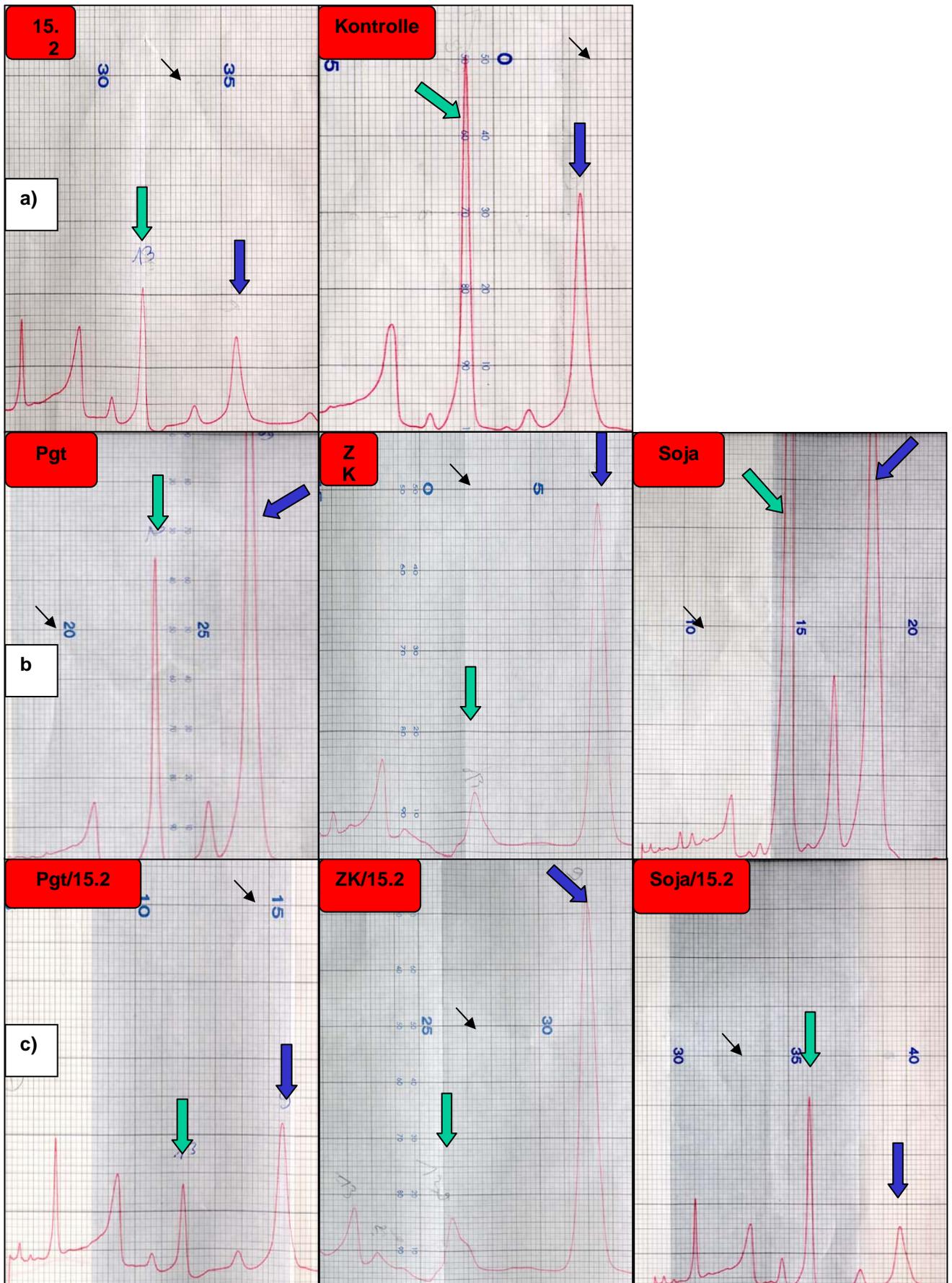


Abb. 3.35 a-c (Legende s. folgende Seite)

**Abb. 3.35 a-c Die Schreiberaufzeichnungen der Produktanalysen von LOX-Reaktionen (a-c)**

Dargestellt sind die Schreiberaufzeichnungen der über HPLC aufgetrennten LOX-Reaktionsprodukte.

Erläuterungen:

Die Schreiberaufzeichnungen zeigen die Produkte der Reaktionen mit den folgenden LOX-Enzymen:

**a)**

Kontrolle: Enzymfreier Kontrollansatz

15.2: die rekombinante LOX aus dem Klon 15.2

**b)**

Pgt: die Pgt-induzierte, IAC-aufgereinigte LOX-92 aus Weizenprimärblättern (= „Pgt-LOX“)

ZK: IAC-aufgereinigte LOX-92 aus Weizenzellkulturen (= „ZK-LOX“)

Soja: Soja-LOX (Typ I. S, Sigma)

**c)**

Darunter sind die Schreiberaufzeichnungen der über HPLC aufgetrennten LOX-Reaktionsprodukte der rekombinanten LOX aus Klon 15.2. Im Unterschied zu den vorangegangenen Reaktionen wurden diesmal LOX-Reaktionsprodukte als Substrat eingesetzt. Im Einzelnen waren das:

Pgt/15.2: Die Reaktionsprodukte der „Pgt-LOX“

ZK/15.2: Die Reaktionsprodukte der konstitutiv induzierten „ZK-LOX“

Soja/15.2: Die Reaktionsprodukte der Soja-LOX (Typ I. S. Sigma).

Die grünen Pfeile weisen auf die 13-LOOH hin, die blauen Pfeile auf die 9-LOOH. Die kleinen schwarzen Pfeile dienen der Größenorientierung. Alle Versuche wurden jeweils fünfmal durchgeführt.

Das Resultat ergab leider keine Aussage, über die mögliche Positionsspezifität der in *E. coli* exprimierten LOX2 *Ta1*, wohl aber darauf, dass im *E. coli*-Extrakt Faktoren vorhanden sind, welche die entstandenen LOOH zumindest schneller weiter umsetzen ihre Neubildung. Auf eine weitere Untersuchung des Sachverhaltes musste an dieser Stelle verzichtet werden.

### Zusammenfassung des Kapitels 3.3

- Die LOX-cDNA *LOX2 Ta1* wurde erfolgreich in den Expressions-Vektor pIVEX2.3 (Roche) kloniert.
  - Das neue Plasmid wurde für die Transformation in *E. coli* eingesetzt. Das entstehende Translations-Produkt zeigte jedoch nur geringe LOX-Enzymaktivität. Zudem war die Stabilität des LOX-Enzyms nur für wenige Tage gewährleistet.
  - Die *in vitro* Translation mit demselben Plasmid brachte kein funktionsfähiges LOX-Enzym, jedoch konnte das LOX-Protein per Westernblot-Analyse über den „Histag“ nachgewiesen werden.
  - Die Analyse des pH-Optimums der klonierten *LOX2 Ta1* weist auf eine Typ2- LOX hin.
  - Die Positionsspezifität (Produktanalyse) der klonierten LOX konnte nicht geklärt werden. Hier sollte die computergestützte Sequenzanalyse weiterhelfen.
-

### 3.4 Computergestützte Aufarbeitung der bisherigen Ergebnisse zur Charakterisierung der LOX2 *Ta1*

Zum Abschluss wurden sämtliche Daten zusammengetragen, um die Identifikation (Zuordnung) der klonierten LOX-cDNA *LOX2 Ta1* zu einem der bekannten Weizen-LOX-Enzyme zu ermöglichen. Im Weizen waren bisher mehr als drei induzierbare LOX-Enzyme bekannt. In diesem Zusammenhang sei noch einmal auf die Tabelle 3.2 von Kapitel 3.1 verwiesen. Mit Hilfe geeigneter Computermodelle sollten deswegen zunächst die Sequenzdaten aufgearbeitet werden, um schließlich eine möglichst genaue Charakterisierung und Klassifizierung des resultierenden LOX-Enzyms, der *LOX2 Ta1* zu erreichen.

Es wurden folgende Parameter per Computeranalyse untersucht:

- Die Molekülgröße, dabei halfen virtuelle Verdauungen des Enzyms.
- Eine Stabilitätsanalyse, auch hierzu gibt es geeignete Computermodelle, welche die wahrscheinliche Stabilität eines Moleküls berechnen.
- Der isoelektrische Punkt kann ebenfalls per Computerprogramm errechnet werden und ist ein Kriterium zur Charakterisierung der *LOX2 Ta1*.
- Die wahrscheinliche Lokalisation der *LOX2 Ta1*: Hierfür wurde die Aminosäure-Sequenz auf das Vorhandensein von Signalpeptiden untersucht.
- Die Klassifizierung der *LOX2 Ta1* als Typ1 bzw. Typ2- LOX aufgrund der Aminosäuren-Sequenz.
- Die Erstellung einer phylogenetischen Stammbaumanalyse „phylogenetic tree“.

Mit Ausnahme der phylogenetischen Stammbaumanalyse (freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Ivo Feußner, Göttingen erstellt) wurde dieser Teil mit Hilfe von unterschiedlichen z. T. frei zugänglichen Computeranalyseprogrammen durchgeführt. Im Einzelnen waren das:

- „Pile Up“ (freundlicherweise vom Institut Biologie I der RWTH Aachen zur Verfügung gestellt): Hierbei gelingt der direkte Vergleich mit anderen bekannten LOX-DNA- oder auch AS- (Aminosäuren) Sequenzen: Gemeinsame DNA- (bzw. AS-) Motive, aber auch spezifische Abweichungen zu anderen Sequenzen sind so leicht erkennbar.

Alle folgenden Programme sind unter „SWISS-PROT Proteomics tools“ (Gasteiger et al. 2005) via Internet für jedermann zugänglich.

- TargetP 1.0 (Emanuelsson et al. 2000): Dieses Programm erleichtert die Identifizierung von Enzymen, die in bestimmten Zellorganellen (z. B. Mitochondrien oder Plastiden) lokalisiert sind aufgrund ihrer Aminosäure-Sequenz (AS-Sequenz). Es werden bestimmte Ziel- (Target)-Sequenzen erkannt.
- ChloroP 1.1 (Emanuelsson et al. 1999; Peltier et al. 2000): Mit diesem Programm lässt sich die Wahrscheinlichkeit einer Chloroplasten-Ziel-Sequenz und deren Länge berechnen.
- SAPS [(Brendel et al. 1992) **S**tatistical **A**nalysis of **P**rotein **S**equences]: Obwohl dieses Programm viel mehr vermag, wurde es in diesem Fall nur für die Molekulargewichtsbestimmung herangezogen.
- Compute pI/Mw tool (Bjellqvist et al. 1993): Hiermit kann das theoretische Molekulargewicht sowie der pI (isoelektrische Punkt) bestimmt werden.
- ExPASy-PeptideMass (Wilkins et al. 1997): Mit diesem Programm kann man mit unterschiedlichen Enzymen virtuelle Verdauung eines Proteins vornehmen lassen und so das wahrscheinliche Molekulargewicht berechnen. ExPASy-PeptideMass ist ebenfalls in der Lage, den theoretischen pI zu bestimmen.
- ExPASy – ProtParam (Wilkins et al. 1998): Hier werden unterschiedliche Parameter, wie z.B. die Menge der negativ bzw. positiv geladenen Reste untersucht, womit sich letztendlich auch eine Prognose über die Stabilität des Proteins machen lässt.

### **3.4.1 Untersuchungen zur Feststellung der wahrscheinlichen Lokalisation des LOX-Enzyms LOX2 *Ta1***

Erste Hinweise, dass das LOX-Enzym LOX2 *Ta1* ein Signalpeptid besitzt, ergab ein „Pile Up“ (Abb. 3.36) im Vergleich mit anderen bekannten LOX-AS-Sequenzen (die jeweiligen EMBL Accession-Nummern sind in Klammern angegeben):

Lox A: (L35931), RiceL-2 (X64396, Samen); Lox C (L37358); Lox B (L37359); AraLox (L04637, pathogeninduziert), SoyLox1 (JO2795), BarLox2 (U56406, jasmonatinduziert), LOX2Os2 (AJ270938), LOX2 *Ta1*, RcL 2 (D14000)



**Abb. 3.36** „Pile up“ von LOX2 *Ta1* zu neun anderen LOX-Protein-Sequenzen

Dargestellt ist ein Teil des Ergebnisses des „Pile Up“ der LOX2 *Ta1* zu neun anderen bereits bekannten LOX-Spezies (in Klammern sind die jeweiligen EMBL-Accession-Nummern angegeben):

LOX A: (L35931), RiceL-2 (X64396, Samen); LOX C (L37358); LOX B (L37359); AraLOX (L04637, pathogeninduziert), SoyLox1 (J02795), BarLOX2 (U56406, jasmonatinduziert), LOX2Os2 (AJ270938), LOX2 *Ta1* (nicht veröffentlicht), Rcl2 (D14000).

Hier wurde LOX2 *Ta1* mit neun anderen bekannten LOX-Proteinen verglichen. Man erkennt, dass die AS-Sequenzen einiger LOX-Enzyme, so auch die der LOX2 *Ta1*, am N-terminalen Ende „länger“ sind, bevor die sehr strenger konservierten homologen Sequenzabschnitte beginnen. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis auf ein Signalpeptid am N-terminalen Ende sein. Bei einigen dieser LOX-Enzyme war das Vorhandensein eines Signalpeptids am N-terminalen Ende bekannt.

Dieser Hinweis auf eine Leadersequenz wurde verifiziert. Zunächst kam TargetP V1.0 zum Einsatz: Dieses Programm geht u. a. auf Untersuchungen von Nielsen, Engelbrecht et al (1997) zurück und ermöglicht die Identifizierung von Mitochondrien- bzw. von Plastiden-Ziel-(Targeting)-Sequenzen.

Das Ergebnis sah folgendermaßen aus (Abb. 3.37):

name	ength	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC
LOX2 <i>Ta1</i>	901	0.836	0.054	0.009	0.034	C	2
cutoff	0.00	0.00	0.00	0.00			

**Abb. 3.37 Auszug der Ergebnisse der TargetP-Analyse von LOX2 *Ta1***

Erläuterung:

name	Name der untersuchten Sequenz
length	Länge der Aminosäuren-Sequenz
cTP	„Chloroplast transit peptid“, d.h. die Sequenz besitzt am N-terminalen Ende eine Chloroplasten-Transit-Sequenz.
mTP	„Mitochondrial targeting peptide“, d.h. die Sequenz besitzt eine Mitochondrien-Ziel-(Targeting)-Sequenz.
sP	„Secretory pathway“, d.h. die Sequenz besitzt ein Signalpeptid für den sekretorischen Stoffwechsel
other	„Any other location“, d.h. das untersuchte Protein ist weder in den Plastiden, noch in den Chloroplasten lokalisiert.
C	Protein ist in den Chloroplasten lokalisiert.
RC	„Reliability Class“: Maß, für die Wahrscheinlichkeit, dass das Signalpeptid einer bestimmten Klasse angehört.

Die Lokalisation ist dort am wahrscheinlichsten, wo der höchste Wert (hier: 0,836 für eine Chloroplasten-Transit-Sequenz). Das Ergebnis kann daher so gewertet werden, dass eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit existiert, dass die LOX eine Chloroplasten-Leader-Sequenz besitzt. Zur Überprüfung wurde das Programm ChloroP 1.1 genutzt. Das Ergebnis dieser Analyse sah folgendermaßen aus (Abb. 3.38):

name	length	Score	cTP	CS-score	cTP- length
LOX2 <i>Ta1</i>	901	0.577	Y	5.641	54

**Abb. 3.38 Auszug der Ergebnisse der ChloroP-Analyse von LOX2 *Ta1***

Erläuterungen:

name	Name der untersuchten Sequenz
length	Länge der Aminosäuren-Sequenz
Score	Maß für die Wahrscheinlichkeit
cTP	„Chloroplast transit peptid“, d.h. die Sequenz besitzt am N-terminalen Ende eine Chloroplasten-Transit-Sequenz.
Y	„Yes“

(Fortführung der Legende s. folgende Seite)

**Abb. 3.38 Auszug der Ergebnisse der ChloroP-Analyse von LOX2 Ta1**  
(Fortführung der Legende)

CS-Score	„Cleavage site-Score“ Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass eine „Cleavage site“ (Schnittstelle) für eine Chloroplasten-Transit-Sequenz besteht.
cTP-length	Länge der Chloroplasten-Transit-Sequenz

Der Hinweis, dass die LOX2 Ta1 eine Chloroplasten-Leader-Sequenz besitzt, wird bestätigt, die Länge dieser Sequenz beträgt mit hoher Wahrscheinlichkeit 54 AS (Aminosäuren).

### **3.4.2 Bestimmung des Molekulargewichts von LOX2 Ta1 sowie des isoelektrischen Punktes**

Zur Bestimmung des Molekulargewichts von LOX2 Ta1 wurden 3 unterschiedliche Programme genutzt: Compute pI/Mw tool, ExPASy-PeptideMass und SAPS (Statistical Analysis of Protein Sequences).

Das Ergebnis war bei allen drei Methoden gleich. Es wurde ein Molekulargewicht von knapp 102 kDa bestimmt (im Einzelnen: 101,58224 kDa; 101.6 kDa sowie 101,58224 kDa [average mass] bzw. 101,51863 [monoisotopic mass]).

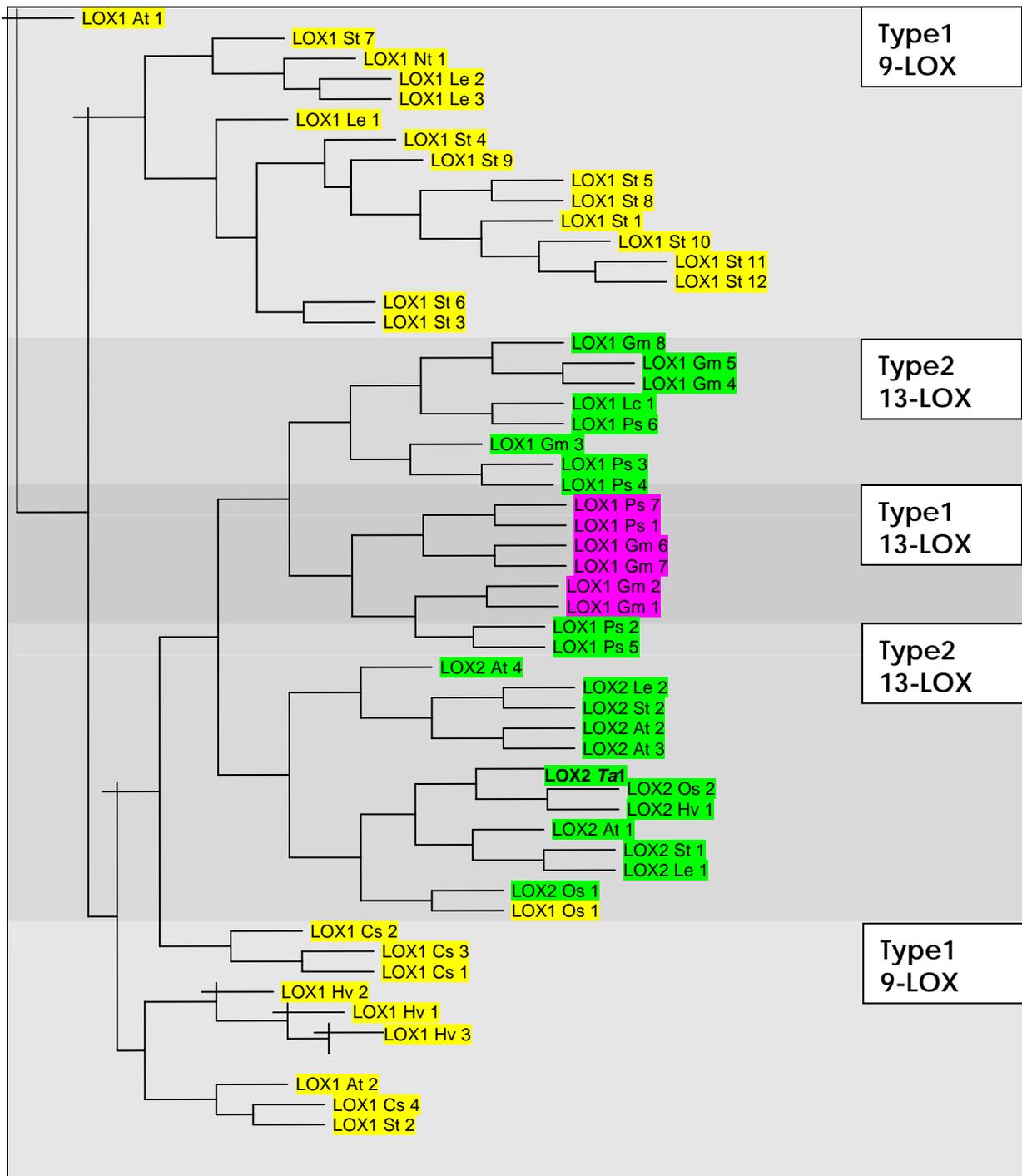
Der isoelektrische Punkt, also der pH-Wert, an dem das Enzym als Zwitterion vorliegt, wurde einheitlich mit pH 6,46 angegeben. Zur Erinnerung, die isoelektrischen Punkte der 92er LOX-Enzyme liegen zwischen pH 4 und pH 7 (Bohland 1997; Loers 1999).

### **3.4.3 Bestimmung der Positionsspezifität, Klassifizierung der LOX2 Ta1, Einordnung in den „Phylogenetic tree“**

Dieser Teil der Analyse wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Ivo Feußner, Universität Göttingen, durchgeführt (s. auch: Feußner and Wasternack 2002) und ist in Abbildung 3.39 (in leicht modifizierter Art) dargestellt.

Die Klassifizierung der Lipoxygenasen als Typ1 bzw. Typ2 erfolgte hier nach neueren Kriterien (Shibata et al. 1994; Shibata and Axelrod 1995; Feußner and Wasternack 2002). Je nachdem, ob die LOX ein N-terminales Chloroplasten-Targeting-Peptid besitzen, werden sie als LOX Typ2 (mit N-terminalem Chloroplasten-Targeting-Peptid)

bzw. LOX Typ1 (ohne N-terminale Extension) bezeichnet. Die letztgenannte Gruppe zeichnet sich durch hohe Sequenzhomologie (> 75%) untereinander aus. Zur zweiten Gruppe gehören weitestgehend 13-LOX mit geringerer Sequenzhomologie (ca. 35%) untereinander.



**Abb. 3.39** Der phylogenetische Stammbaum ausgesuchter pflanzlicher Lipoxygenasen  
 Erläuterungen:  
 gelb hinterlegt: Typ1 9-LOX; Grün hinterlegt: Typ2 13-LOX; Lila hinterlegt: Typ1 13-  
 LOX  
 (Fortführung der Legende s. nächste Seite)

**Abb. 3.39 Der phylogenetische Stammbaum ausgesuchter pflanzlicher Lipoxygenasen***(Fortführung der Legende)*

Die abgebildeten Proteine sind unter den folgenden Acc.-Nummern in der Genbank zu finden: *Arabidopsis thaliana* – LOX1 *At* 1 (*At*LOX1, Q06327), LOX2 *At* 1 (*At*LOX2, P38418), LOX2 *At* 2 (*At*LOX3, AAF79461), LOX2 *At* 3 (*At*LOX4, AAF21176), LOX1 *At* 2 (*At*LOX5, CAC19365), LOX2 *At* 4 (*At*LOX6, AAG52309); *Cucumis sativa* – LOX1 *Cs* 1 (AAC61785), LOX1 *Cs* 2 (*Cs*ULOX, AAA79186), LOX1 *Cs* 3 (*Cs*LBLOX, CAA63483), LOX1 *Cs* 4 (CAB83038); *Glycine max* – LOX1 *Gm* 1 (Soybean LOX1, AAA33986), LOX1 *Gm* 2 (Soybean LOX2, AAA33987), LOX1 *Gm* 3 (Soybean LOX3, CAA31664), LOX1 *Gm* 4 (Soybean *vlxa*, BAA03101), LOX1 *Gm* 5 (Soybean *vlxb*, AAB67732), LOX1 *Gm* 6 (Soybean *vlxc*, AAA96817), LOX1 *Gm* 7 (Soybean *vlxd*, S13381), LOX1 *Gm* 8 (Soybean *vlxe*, AAC49159); *Hordeum vulgare* – LOX1 *Hv* 1 (*Hv*LOXA, Barley LOXA; AAA64893), LOX1 *Hv* 2 (*Hv*LOXB, Barley LOXB, AAB60715), LOX1 *Hv* 3 (*Hv*LOXC, Barley LOXC, AAB70865), LOX2 *Hv*1 (*Hv*LOX1, AA12951); *Lycopersicon esculentum* – LOX1 *Le* 1 (*tom*LOXA, P38415), LOX1 *Le* 2 (*tom*LOXB, P38416), LOX1 *Le* 3 (*tom*LOXtox, AAG21691), LOX2 *Le* 1 (*tom*LOXC AAB65766), LOX2 *Le* 2 (*tom*LOXD, AAB65767); *Nicotinia tabacum* – LOX1 *Nt* 1 (*Nt*LOX, S57964); *Oryza sativa* – LOX1 *Os* 1 (CAA45738), LOX2 *Os* 1 (ORYSALOXC, BAA03102), LOX2 *Os* 2 (*Os*LOX, RC11, CAC01439); *Pisum sativum* – LOX1 *Ps* 1 (AAB71759), LOX1 *Ps* 2 (CAA55318), LOX1 *Ps* 3 (CAA55319), LOX1 *Ps* 4 (Pea LOX, CAA30666), LOX1 *Ps* 5 (Pea LOX2, CAA34906), LOX1 *Ps* 6 (Pea LOXG, CAA53730), LOX1 *Ps* 7 (CAC04380); *Solanum tuberosum* – LOX1 *St* 1 (SOLTULOX1, S44940), LOX1 *St* 2 (STLOX, AAD09202), LOX1 *St* 3 (*St*LOX1, S73865), LOX1 *St* 4 (CAA64766), LOX1 *St* 5 (CAA64765), LOX1 *St* 6 (POT-LX-2, AAB67858), LOX1 *St* 7 (POT-LX-3, AAB67865), LOX1 *St* 8 (POT-LX-1 AAB67858), LOX1 *St* 9 (AAD04258), LOX1 *St* 10 (pLOX2, AAB81595); LOX1 *St* 11 (pLOX1, AAB81594), LOX1 *St* 12 (CAB65460), LOX2 *St* 1 (*St*LOXH1, CAA65268), LOX2 *St* 2 (*St*LOXH3 CAA65269); *Triticum aestivum* – **LOX2 *Ta*1** (nicht veröffentlicht) – (in Anlehnung an Feußner and Wasternack 2002)

**3.4.4 Stabilität der LOX2 *Ta*1**

Die mangelnde Stabilität des rekombinanten Proteins stellte eines der Hauptprobleme bei den biochemischen Untersuchungen dar. Da unklar war, was für diese Instabilität ursächlich verantwortlich ist, wurde auch eine Stabilitätsprognose durchgeführt. Genutzt wurde hierfür das Programm ExPASy – ProtParam. Dieses Programm untersucht verschiedene Parameter, wie z. B. die Menge der negativ bzw. positiv geladenen Reste. Anhand dieser Kriterien lässt sich eine Prognose über die Stabilität des Proteins machen, angegeben durch den Instabilitätsindex. Dieser beträgt bei LOX2 *Ta*1 48,76. Diese LOX wurde daher als instabiles Protein klassifiziert. Ein

Protein mit einem Instabilitätsindex kleiner als 40 gilt als relatives stabiles Molekül, bei einem Wert über 40 gilt es indes als instabil (Guruprasad et al. 1990).

#### **Zusammenfassung des Kapitels 3.4**

- Das theoretisch berechnete Molekulargewicht der LOX 2 *Ta1* beträgt ca. 102 kDa.
  - Das LOX2 *Ta1*-Protein besitzt mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Chloroplasten-Targeting-Peptid, d. h. LOX2 *Ta1* wird daher mit ziemlicher Sicherheit eine Chloroplasten-LOX sein.
  - Gemäß neuerer Nomenklatur gehört die LOX2 *Ta1* demnach zu den LOX2-Proteinen (Typ2).
  - Im phylogenetischen Stammbaum wird LOX2 *Ta1* ebenfalls als 13-LOX vom Typ2 klassifiziert.
  - Die LOX2 *Ta1* muss aufgrund ihres relativ hohen Instabilitätsindex als instabiles Molekül eingeordnet werden.
-

## 4 Diskussion

### 4.1 Induzierbare Lipoxygenasen (LOX) in Pflanzen

Pflanzliche Lipoxygenasen (LOX) sind an vielen wichtigen Lebensabschnitten, wie Samenkeimung und Wachstum beteiligt. Einige LOX werden daher entwicklungsabhängig synthetisiert. Andere LOX sind durch äußere Faktoren (exogene Faktoren) induzierbar (z.B. Koch et al. 1992; Melan et al. 1993; Veronesi et al. 1996; Kolomiets et al. 2000; Ben-Hayyim et al. 2001). Stress ist einer der äußeren Kräfte, die für die Induktion von Lipoxygenasen verantwortlich sind (Rosahl 1996; Blee 1998; Blee 2002; Howe and Schillmiller 2002; Farmer et al. 2003).

Stress bedeutet, dass exogene Reize eine Pflanze dermaßen beeinträchtigen, dass sich ihr physiologischer Zustand verändert (Osmond et al. 1987). Stressfaktoren können sowohl abiotischer (wie z.B. Wassermangel, Überflutung oder mechanische Belastungen) als auch biotischer Natur (z.B. Insektenfraß, Pathogenbefall) sein (Scheel 1999). Hierauf reagieren viele Pflanzen mit erhöhter LOX-Enzymaktivität bzw. mit der Induktion von LOX-RNA. In Folge werden Phytohormone, Signalmoleküle (z.B. Traumatinsäure, Jasmonsäure; Rickauer et al. 1997; Schaller 2001; Wasternack et al. 2006), antifungale und antimikrobiell wirksame Produkte (Aldehyde und Polyhydroxy-Fettsäuren) und andere Abwehrmoleküle des LOX-Stoffwechselwegs synthetisiert (Hamberg 1999; Almeras et al. 2003; Senger et al. 2005).

Diese Arbeit beschäftigt sich speziell mit den durch Stress induzierbaren Weizen-LOX.

### 4.2 Durch Stress induzierbare Weizen-LOX

Aus vorangegangenen Arbeiten ergab sich als ein Fokus der vorliegenden Untersuchungen die weitere Charakterisierung der LOX-Enzyme LOX-92 und LOX-103 (3.1). Beide LOX-Spezies werden durch Inokulation mit dem Weizenschwarzrost bzw. durch Elicitorbehandlung induziert (Bohland 1997; Bohland et al. 1997; Loers 1999).

Zwei weitere Weizen-LOX wurden im Zuge der vorliegenden Arbeit identifiziert: die *L500* und die *LOX2 Ta1*. Die Charakterisierung dieser vier durch Stress induzierbaren Weizen-LOX wird im Folgenden diskutiert.

### 4.2.1 LOX-92 und LOX-103

Hierbei handelt es sich um LOX-Enzyme, die aus Weizen-Pflanzen und aus Weizenzellkulturen (nur LOX-92) isoliert wurden. Diese Enzyme sind wahrscheinlich in unterschiedlichen Zell-Organellen lokalisiert. Nur die LOX-103 konnten in den Plastiden nachgewiesen werden. Für die LOX-92 gilt es dagegen als sicher, dass sie nicht in den Plastiden lokalisiert sind. Hierfür spricht, dass die Weizenzellkulturen keine funktionsfähigen Plastiden besitzen, wohl aber funktionsfähige und hochaktive LOX-92-Enzyme. Auch in Weizenblättern konnten keine plastidären LOX-92 nachgewiesen werden. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich um cytosolische Proteine. Cytosolische LOX wurden u.a. in Soja detektiert (Stephenson et al. 1998; Fischer et al. 1999).

Den LOX-103 und LOX-92 ist gemeinsam, dass sie mit ziemlicher Sicherheit nicht „einmalig“ sind: Verschiedene Untersuchungen (u.a. 2 D-PAGE) weisen darauf hin, dass mindestens zwei unterschiedliche LOX-92 und ebenfalls zwei unterschiedliche LOX-103 beim Weizen existieren (3.1). Es wird daher weiterhin von den LOX-92 bzw. den LOX-103 gesprochen. Hervorzuheben gilt auch die Tatsache, dass beide LOX-Spezies nach Elicitierung zeitgleich aktiv sind.

- **Die LOX-92**

Eine hohe LOX-Enzym-Aktivität korreliert beim Weizen immer mit dem Nachweis einer LOX-92 (Abb. 3.4). Dies gilt sowohl für die konstitutiv in den Weizenzellkulturen aktiven LOX-92, als auch für die durch viele unterschiedliche Stress-Reize in Weizenpflanzen induzierbaren LOX-92. Auch in anderen Pflanzensystemen sind Lipoxygenasen bekannt, die durch viele verschiedene Faktoren induziert werden (Heitz et al. 1997; Senger et al. 2005).

Das bevorzugte Substrat der LOX-92 sind offenbar freie Fettsäuren. Die Positionsspezifität der LOX-92 liegt deutlich auf Seiten der 9-LOOH [9- HPOD (70 - 87%) mit Linolsäure bzw. 9-HPOT (60 - 77%) mit Linolensäure als Substrat]. Zudem weisen alle untersuchten LOX-92 eine hohe Stereospezifität auf. 90% aller Primärprodukte liegen als S-Isomer vor (Loers 1999).

In den Weizenpflanzen bleiben die LOX-92 meist für längere Zeit aktiv (zwischen 10h und 7 Tage; Abb. 3.1). Die angereicherten LOX-92 Enzyme sind relativ stabil. Relativ

bedeutet, dass dies nur bis zu einem bestimmten Reinigungsgrad gilt, bis zur Anreicherung über IAC. Weitere Anreicherungsversuche, mit dem Ziel hochreine LOX-92-Proteine zu gewinnen, mussten wegen erheblicher LOX-Enzymaktivitäts- sowie Stabilitätsverluste (Abb. 3.11), begleitet von der Verringerung der nachweisbaren Menge an LOX-Proteinen (Abb. 3.12), aufgegeben werden. Es gelang nicht, unbekannte „Begleitkomponenten“ (Proteine?) abzutrennen (3.1.2). Die Beobachtung, dass sich bestimmte, bisher nicht identifizierte, „Begleitkomponenten“ (3.1.2.3; Abb. 3.11 – 3.13) vom nativen LOX-Protein nicht trennen ließen, kann als erster Hinweis gewertet werden, dass diese Komponenten für Weizen-LOX-Spezies von Bedeutung sind.

Bisher ist nicht bekannt, welcher Art diese Komponenten sind. In den angereicherten IAC-Fraktionen mit 80 - 90 % Gesamt-LOX-Aktivität befinden sich neben den LOX-92 auch nicht identifizierte Proteine. Es könnte daher sein, dass diese Komponenten unter den nicht identifizierten Proteinen zu finden sind, also Proteine sind. Interaktionen unterschiedlicher Proteine untereinander sind in der Natur nicht selten. Dies gilt auch für LOX-Enzyme, z. B. mit 14-3-3 Proteinen (Holtman et al. 2000a; Holtman et al. 2000b).

Weil die Natur der „unbekannten Begleitkomponenten“ nicht geklärt werden konnte, wäre die weitere Diskussion der möglichen Funktion daher hoch spekulativ und kann aus diesem Grund nicht weiter fortgeführt werden.

Konstitutiv sind die LOX-92 in Weizenblättern nur in geringem Maße nachweisbar. Eine Ausnahme bilden die LOX-92 in Weizen-Zellkulturen. Diese LOX sind über den gesamten Kulturrhythmus sehr aktiv und zeigen zudem eine ungewöhnlich hohe spezifische Enzymaktivität (bis zu 90 nkat/mg). Eine Steigerung der Enzymaktivität durch exogene Reize ist nicht möglich.

Von mehreren Autoren (u.a. Kolomiets et al. 2000; Göbel et al. 2002) wird propagiert, dass LOX bei der Pathogenabwehr eine entscheidende Rolle spielen. Hinweise hierfür gibt es auch für die Weizen-LOX-92. Sowohl nach Inokulation durch den Weizenschwarzrost, als auch nach Injektion des aus den Keimschläuchen des Weizenschwarzrostes gewonnenen Pgt-Elicitors, steigt die LOX-Enzymaktivität der LOX-92 in den Weizenblättern stark an.

Dass die LOX-92 in den Weizenzellkulturen konstitutiv sehr aktiv sind, scheint in diesem Zusammenhang ein Widerspruch zu sein. Jedoch zeigen nur die Suspensionskulturen des Kultivars Prelude Sr5 diese hohen LOX-Enzymaktivitäten. Dieses Kultivar besitzt ein Abwehrgen gegen den Weizenschwarzrost, das Gen *Sr5*. Bei den Zellkulturen der kompatiblen Rasse Prelude *srx* ist weder eine vergleichbar hohe LOX-Enzymaktivität messbar, noch ist im Westernblot eine LOX-92-Bande erkennbar (Bohland 1997). Der signifikante Unterschied bezüglich der LOX-Enzymaktivität dieser Kultivare kann ebenfalls als ein Hinweis gewertet werden, dass die LOX-92 für die Pathogenabwehr eine Rolle spielen. Am Ende von Kapitel 4.4 wird die Bedeutung der LOX-Enzymaktivität für die Ausbildung der HR nochmals aufgegriffen.

Nicht geklärt ist bisher die Frage, ob es sich bei den aktiven (induzierbaren) LOX um eine *de novo*-Synthese handelt. Wenn man die Northern-Analysen betrachtet, kann das zumindest für die durch den Pgt-Elicitor induzierten LOX-92 nicht bejaht werden. Die Aktivierung von LOX-92-Enzym durch den Pgt-Elicitor ist eindeutig belegt. Das Maximum der LOX-Enzymaktivität ist nach 48 Stunden erreicht. Bei einer Induktion auf RNA-Ebene müsste demnach vor diesem Zeitpunkt ein starkes Signal im Northernblot erkennbar sein. Dies ist aber nicht der Fall. Im Gegenteil, scheinbar ergibt sich nach Pgt-Elicitor-Induktion sogar eine leichte Abschwächung der Signale (Abb. 3.23, Abb. 3.24).

Wichtig ist in diesem Zusammenhang wiederum die Situation bei den Zellkulturen. Hier ist trotz sehr hoher konstitutiv vorhandener LOX-Enzymaktivität kein oder nur ein sehr schwaches Signal bei den Northern-Analysen erkennbar (Abb. 3.28). Wie im zuvor beschriebenen Fall (Pgt-Elicitor-Induktion) ist das Ergebnis unabhängig von der genutzten Sonde; auch die wenn das cDNA-Fragment *L500* als Sonde eingesetzt wird. *L500* wurde über RT-PCR mit Hilfe degenerierter Primer aus dem stark konservierten 3'-Ende von Pflanzen-LOX-Genen isoliert. Aufgrund dieser Eigenschaft sollten die meisten Pflanzen-LOX-Gene von dieser Sonde erkannt werden, also auch die RNA der LOX-92.

Die LOX-92 nach Pgt-Induktion in den Weizenpflanzen und auch die LOX-92 in den Zellkulturen werden folglich nicht auf RNA-Ebene, sondern durch andere Mechanismen, vielleicht durch ein posttranslationales Protein-Processing, aktiviert.

Anders sieht das Ergebnis der Northern-Analysen nach Methyljasmonat-Behandlung aus: Hier konnte eindeutig die Induktion einer LOX im Northernblot nachgewiesen

werden (Abb. 3.25). Die Frage, die sich stellt, ist in diesem Fall: Handelt es sich hierbei um eine LOX-92 oder ist eine andere LOX-Spezies für dieses Signal verantwortlich?

Die Northern-Analysen wurden mit vier verschiedenen Weizen-LOX-Sonden durchgeführt. Nur mit Sonde 3 ist nach Meja-Induktion ein eindeutiges (starkes) Signal erkennbar. Bei allen anderen Ansätzen war mit Sonde 3 kein vergleichbares Signal erkennbar. Um Fehlinterpretationen auszuschließen, wurde Sonde 3 aus dem nur wenig konservierten Bereich vom 5'-Ende der cDNA *LOX2 Ta1* konstruiert um so die Spezifität zu erhöhen. *LOX2 Ta1* kodiert für ein ca. 102 kDa großes LOX-Protein mit einer putativen Transidsequenz für Chloroplasten. Somit eignet sich Sonde 3 besonders zur Detektion sehr naher verwandter (Chloroplasten)-LOX-Spezies. Die durch Pgt induzierte cytosolische *LOX-92* sollte demnach, zumindest nach stringenter Waschung, mit dieser Sonde kein bzw. nur ein schwaches Signal im Northernblot zeigen. Tatsächlich war nach Pgt-Induktion mit Sonde 3 kein Signal im Northernblot detektierbar (Abb. 3.29).

Ist es trotzdem möglich, dass eine durch Meja induzierte LOX-92 für das Signal mit Sonde 3 verantwortlich ist? Mit den anderen weniger spezifischen Sonden werden nach Meja-Induktion zwei Signale sichtbar: ein kleineres (unteres) Signal, welches anscheinend konstitutiv vorhanden ist und ein größeres (oberes) Signal, welches durch Meja verstärkt wird. Mit Sonde 3 kann nur das obere Signal detektiert werden. Wenn man von der berechtigten Annahme ausgeht, dass Sonde 3 zumindest die eigene RNA (*LOX2 Ta1*) erkennt, so sollte das Signal in diesem Fall einer LOX-RNA entsprechen, die für ein LOX-Protein von ungefähr 102 kDa codiert. Da mit Sonde 3 nach Meja-Induktion nur die obere Bande erkannt wird, kann es sich hierbei nicht um die kleinere *LOX-92* handeln. Somit scheinen auch die durch Meja induzierte LOX-92 nicht auf RNA-Ebene aktiviert zu werden. Auch in diesem Fall ist eine posttranslationale Aktivierung der LOX-92 wahrscheinlich.

Zu der Vorstellung einer posttranslationalen Aktivierung passt, dass die durch Meja-Induktion aktivierten LOX-92 im Westernblot nur nach Anreicherung über IAC (Abb. 3.4) sichtbar werden, nicht aber in den Westernblots der Rohextrakte. Rein quantitativ betrachtet, scheint keine große „Enzym-Menge“ für die entsprechend hohe LOX-

Enzym-Aktivität notwendig zu sein. Eine relativ schnelle Aktivierung von konstitutiv vorhandenen LOX-Enzymen könnte der Schlüssel zu diesen Beobachtungen sein. Auch für alle anderen aktiven LOX-92 konnte keine Induktion auf RNA-Ebene dargestellt werden. Eine posttranslationale Aktivierung einer bereits vorhandenen LOX ist daher für die untersuchten Weizen-LOX-92 wahrscheinlich. Wie diese Aktivierung aussieht, bleibt offen. Unterschiedliche posttranslationale Modifikationen von Proteinen sind bekannt, u.a. Glykosylierungen oder Phosphorylierungen. Phosphorylierungen z.B. gehören zu den effektivsten Mechanismen der posttranslationalen Aktivierung von Proteinen (Xing et al. 2002). Auch die Interaktion mit bestimmten Zellstrukturen oder auch mit anderen Proteinen (Holtman et al. 2000b; Mellersh and Heath 2001) gehören zu den bekannten posttranslationalen Möglichkeiten um Proteine zu aktivieren. Die Abspaltung von N-terminalem Methionin oder auch von größeren Abschnitten (z.B. Signalsequenzen) sind weitere prominente Mechanismen.

- **Die LOX-103**

Diese LOX sind nach Meja-Induktion nicht in den Westernblots der Enzymrohextrakte, wohl aber in Blots der IAC-Fraktionen 10 - 14 und in den Chloroplasten-Fraktionen nachweisbar. Wie viele andere Pflanzen-LOX auch (Feußner 1995; Heitz 1997; Vörös 1998), sind sie höchstwahrscheinlich in den Plastiden lokalisiert.

Wichtige Unterschiede zu den LOX-92 sind:

- Die LOX-103 sind, im Gegensatz zu den LOX-92, in Zellkulturextrakten nicht detektierbar.
- Sie zeigen im Vergleich zu den LOX-92 eine erheblich geringere spezifische LOX-Enzym-Aktivität.

Wie bei den LOX-92 gelang die Anreicherung nur unvollständig (Daten nicht gezeigt). Nach IAC findet man die LOX-103 zusammen mit anderen auf den Antibohnen-LOX-Antikörper immunoreaktiven Proteinen in den Fraktionen 10 – 14. Da weitere Anreicherungsversuche ohne Protein- und Aktivitätsverlust erfolglos blieben, wurden sämtliche Enzymaktivitätsmessungen und Produktanalysen mit den Proteinen der Fraktionen 10 – 14 durchgeführt. Für diese Fraktionen gilt:

- Nach Anreicherung über IAC enthielten sie 2 - 5% der gesamten LOX-Enzymaktivität (Abb. 3.3).

- Die Produktanalyse (Loers 1999) zeigte, dass das Verhältnis von 13- und 9-Hydroperoxifettsäuren (LOOH) ca. 50:50 ist. Da in diesen Fraktionen auch weitere LOX-immunoreaktive Proteine, also potentielle LOX-Enzyme zu finden sind, kann eine klare Aussage für die LOX-103 allein nicht getroffen werden. Es sind jedoch durchaus LOX-Enzyme bekannt, die die Bildung beider Produkte zu etwa gleichen Anteilen katalysieren können (Hughes et al. 2001).

Da nach Elicitierung die LOX-92 und LOX-103 zeitgleich aktiv sind, drängt sich die Vermutung auf, dass beim Weizen diese LOX-Spezies gemeinsam „operieren“ könnten. Wenn diese Annahme stimmt, könnten die LOX-92 wegen ihrer hohen spezifischen Enzymaktivitäten die Aufgabe der (haupt-)„agierenden“ LOX übernehmen. Somit könnten die LOX-103 die Funktion einer Art „Schaltstelle“ für die LOX-Induktion einnehmen. An dieser Stelle ist ein solches Modell natürlich noch nicht verifizierbar, doch können Argumente hierfür aufgezeigt werden:

Mithilfe dieses Modells ließe sich leichter erklären, warum bei den Prelude Sr5-Zellkulturen keine Steigerung der LOX-Enzym-Aktivität durch äußere Reize möglich ist. Die LOX-103 sind mit hoher Wahrscheinlichkeit in den Chloroplasten lokalisiert. Funktionsfähige Chloroplasten fehlen den Zellkulturen ebenso wie eine LOX-103. Falls die LOX-103 tatsächlich eine Art Schaltstelle für die Regulation der LOX-92 darstellen sollten, fehlte den Zellkulturen diese Schaltstelle, was hier die konstitutiv hohe Expression der LOX-92 erklären könnte.

Gestützt werden kann das Modell auch dadurch, dass die LOX-103, soweit untersucht, im Vergleich zur LOX-92 vermehrt das 13-Fettsäure-Hydroperoxid bilden. Dieses Hydroperoxid ist Vorstufe für das Signalmolekül Jasmonat. Wenn die LOX-103 tatsächlich die Funktion einer „Schaltstelle“ übernehmen würden, müsste von hier aus ein wie auch immer geartetes Signal weitergeleitet werden. Das Signalmolekül Jasmonat wäre hierfür geeignet (u.a. Rickauer et al. 1997; Wasternack and Parthier 1997; Farmer et al. 1998; Lobler and Lee 1998; Wasternack et al. 1998).

Bei den vorangegangenen Ausführungen bleibt festzustellen, dass es sich hierbei um Überlegungen handelt, welche mit den verfügbaren Daten kompatibel sind. Jedoch sind sie natürlicherweise sehr spekulativ.

#### 4.2.2 Die klonierten LOX-cDNA-(Fragmente): *LOX2 Ta1* und *L500*

- ***L500***

Hierbei handelt es sich um ein knapp 500 bp großes Fragment vom hochkonservierten 3'-Ende einer putativen LOX-cDNA. Damit entspricht dieses Fragment in seiner Länge ungefähr einem Fünftel einer vollständigen LOX-cDNA. Kloniert wurde es per RT-PCR mithilfe von degenerierten Primern. Die *L500* wird wahrscheinlich konstitutiv gebildet. Argumente hierfür sind zwei Beobachtungen:

- Dieses Fragment konnte per RT-PCR sowohl nach Pgt-, Meja-, Wasser-Injektion, als auch aus unbehandelten Pflanzen isoliert werden. Auch mit RNA von Weizen-Zellkulturen war die RT-PCR erfolgreich. Die klonierten Fragmente waren absolut identisch, dies wurde anhand von Sequenzanalysen überprüft (3.2.1).
- In den Northern-Analysen von Gesamt-RNA aus unterschiedlich vorbehandelten bzw. unbehandelten Weizenblättern war immer ein Signal detektierbar, wenn *L500* als Sonde eingesetzt wurde (3.2.3). Auch mit Gesamt-RNA aus den Weizen-Zellkulturen konnte auf gleicher Höhe ein, wenn auch nur sehr schwaches, Signal detektiert werden.

Per 3'-RACE wurde ein weiteres Fragment (80 bp überlappend zur *L500*; die *L3UT*) kloniert. *L3UT* und *L500* sind in den überlappenden DNA-Bereichen absolut identisch. Insgesamt konnten so 600 bp einer putativen LOX-cDNA identifiziert werden.

*L500* wurde erfolgreich als Sonde für die Klonierung einer vollständigen Weizen-LOX-cDNA (*LOX2 Ta1*, s.u.) eingesetzt. Bei den Northern-Analysen war die Signalverteilung deckungsgleich mit den Ergebnissen der Analysen mit der Gesamt-cDNA *LOX2 Ta1* als Sonde (Abb. 3.23).

Zur Nukleotid-Sequenz der LOX-cDNA *LOX2 Ta1* existieren acht Abweichungen (Abb. 3.25) Verschiedene Gründe sind denkbar:

- PCR-Fehler: Dieses Argument erscheint relativ unwahrscheinlich, da bei fünf verschiedenen RT-PCR-Ansätzen für die *L500* die entsprechenden Produkte eine identische DNA-Sequenz aufweisen (s.o.).
- Der unterschiedliche genetische Hintergrund: Da das Ausgangsmaterial für die RT-PCR und die zur Verfügung stehende cDNA-Bank von unterschiedlichen

Kultivaren (Prelude Sr5 bzw. Weizensorte 75141) stammt, sind leichte Abweichungen der DNA-Sequenz im Rahmen der natürlichen Varianz möglich.

- Es ist aber auch denkbar, dass zwei verschiedene LOX-cDNA-(Fragmente) kloniert wurden und ihre Gemeinsamkeiten lediglich darauf beruhen, dass die *L500* aus dem sehr stark konservierten 3'-Ende kloniert wurde.

Am wahrscheinlichsten scheint die letzte Erklärung. Für die *LOX2 Ta1* konnte mit der hochspezifischen Sonde 3 eindeutig die Induktion durch Meja nachgewiesen werden. Wenn *L500* und *LOX2 Ta1* identisch oder zumindest sehr eng verwandt wären, sollte mit *L500* als Sonde ein ähnliches Signal nach Meja-Induktion erkennbar sein. Dies ist aber nicht der Fall. Zudem ist *L500* in den Weizen-Zellkulturen über RT-PCR eindeutig nachweisbar. Für die *LOX2 Ta1* ist das nicht der Fall.

- ***LOX2 Ta1***

*LOX2 Ta1* ist eine vollständige Weizen-LOX-cDNA von 2982 bp Länge. Im Bereich 2333 bis 2962 bp ist die Sequenz dieser cDNA bis auf acht Abweichungen identisch mit den cDNA-Fragmenten *L500* und *L3UT* (s.o. und Abb. 3.25).

Die von der DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuren-Sequenz besitzt ein offenes Leseraster von 901 AS. Qualitativ und quantitativ gestaltete sich die genaue Untersuchung dieser LOX zu einem Hauptanliegen dieser Arbeit. Daher fällt auch die Diskussion der Ergebnisse ausführlicher aus (4.3; 4.4).

### **4.3 Die Charakterisierung der Lipoxygenase *LOX2 Ta1***

Zur Charakterisierung wurden molekularbiologische sowie protein- und biochemische Untersuchungen durch die computergestützte Aufarbeitung der erhaltenen Daten ergänzt.

Die Northern- und Sequenzanalysen erbrachten die zuverlässigsten Erkenntnisse.

#### **4.3.1 Die Induktion der *LOX2 Ta1***

Eine der wichtigsten Aussagen der Northern-Analysen (3.2.3; 4.2.1) ist, dass *LOX2 Ta1* durch das Signalmolekül Mehtyljasmonat (Meja) induzierbar ist. Meja ist ein Derivat der Jasmonsäure; letztere wird über einen von 13-LOX eingeleiteten Stoffwechselweg synthetisiert. Das LOX-Signal nach Meja-Induktion könnte durch

Selbstinduktion durch das LOX-Produkt Jasmonat oder dessen Derivat Meja ausgelöst werden. *LOX2 Ta1* könnte somit für eine 13-LOX kodieren. Ob es sich bei der detektierten Bande tatsächlich um das Signal einer 13-LOX handelt, soll im Folgenden diskutiert werden.

Hierzu muss man sich zunächst die Ergebnisse der Northern-Analysen der Weizenzellkulturen und den nicht mit Meja behandelten Weizenblättern anschauen. Mit den unspezifischeren Sonden *L500*, Sonde 1 und Sonde 2 war bei diesen Ansätzen immer ein Signal sichtbar (Abb. 3.27; Abb. 3.28), weswegen hier sicherlich eine konstitutiv vorhandene RNA detektiert wurde. Ihr Signal ist jedoch nicht auf gleicher Höhe wie das nach Meja-Induktion mit Sonde 3 nachgewiesene Signal, sondern weiter unten im Northernblot. Wenn dieses untere Signal auch von einer LOX-RNA stammt, müsste diese demnach kleiner als die RNA von *LOX2 Ta1* sein.

Nach Meja-Induktion sind mit den unspezifischen Sonden wie schon erwähnt zwei Signale detektierbar, das untere (konstitutive) Signal der kleineren (LOX-) RNA und das Signal der oberen LOX-RNA-Bande (Abb. 3.27). Dieses obere Signal taucht in einigen Ansätzen auch dann aus, wenn andere Substanzen anstatt Meja injiziert wurden (Abb. 3.28). Es ergibt sich die Frage, woher das obere Signal bei diesen nicht mit Meja behandelten Pflanzen stammt. Die folgende Interpretation bietet sich an:

Methyljasmonat (Meja) spielt wie seine Vorstufe Jasmonat eine wichtige Funktion bei der Signalübertragung nach Verwundung (u.a. Heitz et al. 1997; Royo et al. 1999; Reymond et al. 2000; Liechti and Farmer 2002).

Eine Injektion von Lösungen ist immer auch eine Verletzung der Pflanzen. Sogar dieser kleine Eingriff bedeutet Stress und kann somit zur Induktion der Signalkaskade nach „Verwundungsstress“ führen. In der Tat wurde schon zuvor beobachtet, dass allein die Injektion von Lösungen in Weizenpflanzen Stressreaktionen auslöste (Furken 1999).

Das obere Signal könnte bei den nicht mit Meja behandelten Pflanzen demnach von einer LOX stammen, welche an der Signalkaskade nach „Verwundungsstress“ beteiligt ist. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine 13-LOX, die für die Synthese von (Methyl-) Jasmonat notwendig ist. Verstärkt wird das obere Signal durch

die direkte Injektion von Meja (Abb. 3.28), der Verwundungseffekt wird hier scheinbar simuliert. Die Annahme, dass es sich hierbei um die RNA einer 13-LOX handelt wird also bekräftigt.

Meja-induzierbare 13-LOX sind in anderen Systemen ebenfalls bekannt. Z.B. haben Vorös et al. (1998) aus Gerste eine 13-Chloroplasten-LOX isoliert, die durch Methyljasmonat induzierbar ist, die LOX2 *Hv1*. Auch hier wird vermutet, dass diese LOX (LOX2 *Hv1*) selber bei der Jasmonatbiosynthese involviert ist. Der phylogenetische Stammbaum zeigt eine sehr enge Verwandtschaft von LOX2 *Ta1* und LOX2 *Hv1* (Abb. 3.41). Auch dies ist ein weiterer Hinweis, dass es sich bei LOX2 *Ta1* ebenfalls um eine 13-LOX handelt.

Die Induktion der LOX2 *Ta1* durch den chemischen Induktor BTH (Bion<sup>®</sup>) wurde ebenfalls überprüft. Mit den unspezifischeren Sonden (L500; Sonde 1, Sonde 2) war ein schwaches Signal beider Banden nach der Behandlung (Besprühung) mit BTH erkennbar (Abb. 3.27). Mit Sonde 3 dagegen war nur das sehr schwache Signal der kleineren RNA-Bande erkennbar (Abb. 3.29). Für LOX2 *Ta1* scheint BTH somit zumindest kein besonders starker Induktor zu sein.

Fazit dieses Abschnitts ist:

- LOX2 *Ta1* wird sowohl durch Meja, als auch durch den „Verwundungsstress“, z.B. ausgelöst durch die Injektion von Lösungen, induziert.
- LOX2 *Ta1* kodiert vermutlich für eine 13-LOX und könnte somit bei der Synthese von (Methyl-)Jasmonat eine Rolle spielen.
- Unterhalb des Signals von LOX2 *Ta1* ist eine weitere konstitutiv vorhandene (LOX-) RNA sichtbar. Diese RNA ist nicht durch Meja induzierbar. Welche (LOX-)RNA sich hinter dieser Bande verbirgt, konnte nicht geklärt werden.
- BTH (Bion<sup>®</sup>) ist kein starker Induktor von LOX2 *Ta1*.

Zur weiteren Charakterisierung der LOX2 *Ta1* wurden die Expression des LOX-Proteins im zellfreien System und in *E. coli* sowie Computermodelle zur Hilfe genommen.

### 4.3.2 Die Expression des rekombinanten LOX-Proteins LOX2 *Ta1*

Die Untersuchung des rekombinanten Proteins erwies sich schwieriger als zunächst erwartet: Die Expression im zellfreien System erbrachte kein funktionsfähiges Enzym. Das erhaltene Protein war nicht stabil, nach wenigen Tagen konnten im Westernblot nur noch Fragmente des Proteins nachgewiesen werden (Abb. 3.33).

Die Expression in *E. coli* war wegen geringer Stabilität des Enzyms und der insgesamt sehr niedrigen LOX-Enzymaktivität ebenfalls problematisch. Zeitweise war keine Enzym-Aktivität messbar. Erst nach Optimierung der Anzuchtbedingungen (3.3) konnten akzeptable LOX-Enzymaktivitäten gemessen werden. Wichtig hierbei war, dass die Wachstumstemperatur der Bakterien nach der Induktion durch IPTG deutlich unter 30°C gehalten werden musste. Die besten Ausbeuten an funktionsfähigem LOX-Enzym gelangen bei einer Temperatur von 15°C. Einen vergleichbaren Effekt der Wachstumstemperatur auf die Aktivität einer exprimierten rekombinanten (Pflanzen)-LOX wurde auch von Hilbers et al. (1996) beschrieben. Die Ursache für diesen Effekt ist nicht bekannt.

Trotz dieser Optimierung erwies sich die in *E. coli* exprimierte LOX2 *Ta1* als relativ instabil, die Enzymaktivität fiel bereits nach wenigen Tagen wieder rapide ab (unter 0,5 nkat/mg; Tab. 3.8). Der Grund hierfür lag wahrscheinlich in der Proteinstruktur selber. Dies wurde anhand von Sequenzanalysen mittels „ExpASy – ProtParam“ bekräftigt (3.4; 4.3.3).

Die Positionsspezifität konnte nicht direkt durch Produktanalysen (3.3.4) nachgewiesen werden. Die Produktanalysen lieferten möglicherweise jedoch einen weiteren Hinweis darauf, dass bisher nicht identifizierte „Begleitkomponenten“ für die Aktivität und Stabilität des LOX-Enzyms wichtig sind (4.2).

### 4.3.3 Die Sequenzanalyse von LOX2 *Ta1*

Mit Hilfe von Computermodellen lassen sich allein über die Sequenz eines Gens relativ gesicherte Aussagen über Funktion, biochemische Eigenschaften, Proteinstruktur und andere charakteristische Eigenschaften des abgeleiteten Proteins machen (u. a. Lutteke et al. 2003; Sander et al. 2006). Verwandtschaftsgrade können erkannt und phylogenetische Stammbäume (Feußner and Wasternack 2002) erstellt werden (3.4.3). Einige der hierzu benötigten Programme sind „online“ nutzbar. Dies hat den Vorteil, dass aktuelle Daten mit in die Auswertung einbezogen werden.

Die Arbeiten mit dem in *E. coli* exprimierten Enzym haben gezeigt, dass LOX2 *Ta1* ein sehr instabiles Protein ist (3.3; 4.3.2). Die Determinanten, die für die Produktspezifität verantwortlich sind, könnten eine Erklärung hierfür bieten: Im Fall der LOX2 *Ta1* sind es AF, normalerweise finden sich an dieser Stelle TF (Feußner, persönliche Mitteilung).

Eine Gesamtbewertung der Stabilität eines Proteins bietet „ExPASy – ProtParam“. Hiermit kann anhand der Sequenz der Instabilitätsindex berechnet werden. Für LOX2 *Ta1* wurde ein Instabilitätsindex von 48,76 bestimmt. Proteine mit einem Instabilitätsindex größer als 40 gelten als sehr instabil (Gasteiger et al. 2003). Der zügige Abbau nicht mehr benötigter Proteine kann für die Pflanze durchaus von Vorteil sein, u. a. stehen wichtige Bausteine wieder zur Verfügung.

Auch die (putative) zelluläre Lokalisation eines Proteins stellt ein weiteres wichtiges Charakterisierungsmerkmal dar (Feußner and Wasternack 1998; Wang et al. 1999). Bei Gerste zeigten Feußner et al. (1995) z.B., dass alle durch Jasmonat und Methyljasmonat induzierte LOX-Enzyme ohne Ausnahme in den Chloroplasten lokalisiert sind. Hinweise, dass es sich bei der LOX2 *Ta1* ebenfalls um eine Chloroplasten-LOX handelte, lieferten „Pile Up“ (Abb. 3.38), TargetP- und ChloroP-Analysen sowie die bereits genannte phylogenetische Stammbaum – Analyse (freundlicherweise durchgeführt von Herrn Prof. Dr. Ivo Feußner, Göttingen; 3.4.1). Phylogenetische Analysen erlauben, wie schon im vorangegangenen Text besprochen, gute Vorhersagen über bestimmte biochemische Eigenschaften, wie die Positionsspezifität (Feußner and Wasternack 2002).

Im phylogenetischen Stammbaum wird die LOX2 *Ta1* klassifiziert bei den Typ2-LOX mit der Positionsspezifität für die 13-Fettsäure-Hydroperoxide. Zudem konnte eine enge Verwandtschaft zu zwei Gramineen-LOX-Enzymen dokumentiert werden, zur zuvor erwähnten LOX2 *Hv1* aus Gerste und zur LOX2 *Os2* aus Reis (Zabbai et al. 2004). Alle drei Lipoxygenasen besitzen eine putative Chloroplasten-Transidsequenz. LOX2 *Os2* und LOX2 *Hv1* sind durch chemische Resistenzinduktoren wie Salicylsäure und BTH (Bion<sup>®</sup>) induzierbar und scheinen bei der induzierten Resistenz eine Rolle zu spielen. Die LOX2 *Ta1* zeigte nach der Induktion durch BTH (Bion<sup>®</sup>) im Northernblot nur ein schwaches Signal (s.o.). Sicher ist, dass Transkripte von LOX2 *Ta1* nach Inokulation mit dem Nichtwirt-Pathogen *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, dem echten Gersten-Mehltau, akkumulieren. (Die zugehörige cDNA-Bank wurde nach Inokulation mit dem echten Gersten-Mehltau konstruiert.) Es kann daher nicht ausgeschlossen

werden, dass auch LOX2 *Ta1* bei der induzierten Resistenz eine Rolle spielt. Ohne weiterführende Experimente kann dies jedoch nicht verifiziert werden.

#### **4.3.4 Entspricht LOX2 *Ta1* einem der vorher charakterisierten LOX-Enzyme?**

Als nächstes soll die Frage diskutiert werden, ob LOX2 *Ta1* einem der bereits vorgestellten Weizen-LOX-Enzyme entspricht. In der folgenden Tabelle sind einige charakteristische Eigenschaften bekannter Weizen-LOX-Enzyme mit ähnlicher molekularer Masse wie der LOX2 *Ta1*, den Eigenschaften der LOX2 *Ta1* gegenübergestellt. Obwohl die LOX-92 aufgrund ihrer geringeren molekularen Masse scheinbar nicht hier mit hinein gehören, wurden sie mit in die Tabelle aufgenommen.

Induzierbare Lipoxygenasen in Weizen				
Eigenschaften zur Charakterisierung	LOX-Spezies			
	LOX-92	LOX-100	LOX-103	LOX2 Ta1
Molekulare Masse	92	100	103	102
Wahrscheinliche subzelluläre Lokalisation in den Chloroplasten	-	+	+	+
13-LOOH als Hauptprodukt	-	?	(+/-)	+
9- LOOH als Hauptprodukt	+	?	(+/-)	-
Stabilität über 1 Woche	+	?	?	-
Enzymaktivität	++++ (80 % der Gesamt-Aktivität)	Nie Aktivität messbar, nur AK-Signal	+	+
Induzierbar durch Pgt	++	+	+	+ (schwaches Signal)
Induzierbar durch Meja	+	+	+	+
Nachweis in den Weizenzellkulturen	+	-	-	-

**Tab. 4.1 Charakteristische Eigenschaften von LOX-92, LOX-100, LOX-103 und LOX2 Ta1 im Überblick**

Gemeinsamkeiten zur LOX2 Ta1 sind farblich unterlegt.

Anhand der Tabelle werden Gemeinsamkeiten von LOX-103 und LOX2 Ta1 leicht erkennbar. Hier gibt es die größte Übereinstimmung, die beiden LOX-Spezies könnten demnach identisch sein. Die meisten Argumente wurden bereits genannt:

- Sie besitzen eine nur geringe Enzymaktivität im Vergleich zu den LOX-92.
- Sie sind eindeutig durch Meja induzierbar.
- Eine geringere Induktion ist jeweils durch den Pgt-Elictor möglich.
- In den Zellkulturen konnten sie nicht nachgewiesen werden.
- Beide LOX-Spezies sind mit hoher Wahrscheinlichkeit in den Chloroplasten lokalisiert.

- Die Produkt-Positionsspezifität scheint bei beiden Spezies auf der Seite der 13-Fettsäurehydroperoxide zu liegen.
- Das Molekulargewicht stimmt zwar nicht vollständig überein, doch muss man hierbei die unterschiedlichen Messmethoden berücksichtigen:

Die Größe der LOX-103 wurde aus einem SDS-PAGE-Gel mithilfe von Protein-Größenmarkern abgeschätzt. Das Molekulargewicht von LOX2 *Ta1* ist per Computerprogramm (theoretische Verdauung) errechnet worden. Beide Methoden sind nicht 100%ig miteinander vergleichbar.

Es spricht also vieles dafür, dass LOX2 *Ta1* und LOX-103 identisch oder zumindest nahe verwandt sind. Ansonsten müsste es sich bei LOX2 *Ta1* um eine bisher unbekannte Weizen-LOX handeln. In dem Fall wäre sie jedoch in allen bisherigen Westernblot-Analysen übersehen worden. Weder in den Rohextrakten, bei den Chloroplastenisolationen, noch bei den IAC-Fraktionen konnte im Westernblot eine Weizen-LOX von exakt 102 kDa nachgewiesen werden.

Es sind auch andere (LOX-) Systeme bekannt, bei denen die molekulare Masse des nativen (LOX-) Proteins nicht genau mit der des rekombinanten (LOX-) Proteins übereinstimmen. Vorös et al. (1998) beschreiben die Isolation einer Gersten-LOX cDNA von 100 kDa großen Chloroplasten-LOX-Enzyms. Diese cDNA hat ein offenes Leseraster von 3073. Das zugehörige, in *E. coli* exprimierte Enzym verfügt über 936 Aminosäurereste und eine molekulare Masse von 106 kDa, d.h., in diesem Fall ist die Diskrepanz zwischen dem nativen LOX-Enzym (100 kDa) und dem rekombinanten LOX-Enzym (106 kDa) sogar noch größer.

#### 4.4 Mögliche Funktionen von LOX-92 und LOX2 *Ta1* (alias LOX-103)

Während der inkompatiblen Reaktion im Weizen – Weizenschwarzrost – System werden vor Ausbildung der HR (Hypersensitiven Reaktion) sowohl 9-LOX (LOX-92) als auch 13-LOX (LOX-103 bzw. LOX2 *Ta1*) induziert. Ein vergleichbares Bild erhält man nach der Elicitierung durch den Pgt-Elicitor und auch durch die Injektion von Methyljasmonat (Meja).

Die LOX-92 sind durch viele weitere Stressauslöser induzierbar. Sie scheinen in diesen Situationen aufgrund ihrer hohen Enzymaktivität die „agierenden“ LOX-Enzyme zu sein. Im Gegensatz hierzu scheinen die LOX-103 bzw. die LOX2 *Ta1*, also

die 13-LOX, durch weniger Faktoren induzierbar zu sein. Im direkten Vergleich zu den LOX-92 zeichnen sie sich sowohl durch eine erheblich geringere Enzymaktivität, als auch durch eine geringere Stabilität des LOX-Proteins aus.

Da 9- und 13-LOX gleichzeitig aktiviert werden, ergeben sich mehrere Fragen:

- Warum werden zeitgleich einerseits hochaktive 9-LOX und andererseits relativ gering aktive 13-LOX benötigt?
- Wie sieht die Regulation aus? Gibt es eine gemeinsame Regulation oder werden 9- und 13-LOX unabhängig voneinander gesteuert?
- Welche Rolle spielen 9- bzw. 13-LOX bei der Hypersensitiven Reaktion (HR)?

#### **4.4.1 Gibt es eine Kooperation von 9-LOX (LOX-92) und der 13-LOX (LOX2 *Ta1* bzw. LOX-103) beim Weizen?**

Da beide LOX-Spezies vor Ausprägung der HR aktiviert werden, lässt sich ein Zusammenhang zwischen HR und LOX-Induktion vermuten.

In anderen Systemen, so beim Tabak (Rusterucci et al. 1999), Kartoffeln (Kolomiets et al. 2000), Linsen (Maccarrone et al. 2000) und weiteren Pflanzen (z.B. Rosahl 1996) wurde ein Zusammenhang zwischen der LOX-Induktion bzw. der Erhöhung der LOX-Enzymaktivität und der HR beobachtet. Hier sollen Argumente dargestellt werden, dass dies auch für Weizenpflanzen gilt.

Für die 9-LOX LOX-92, nicht aber für die 13-LOX LOX-103 alias LOX2 *Ta1*, wurde eine Beteiligung an der HR von Loers (1999) ausführlich diskutiert. Die dort genannten Argumente werden hier in die Diskussion mit eingebunden und ergänzt:

Nach Elicitierung durch den Pgt-Elicitor und auch nach Meja-Induktion wird eine Erhöhung der Lipidperoxidkonzentration von 40 – 110% in den Membranen beobachtet (Loers 1999). Die Erhöhung der Lipidperoxidkonzentration gehört zu den Ereignissen, die die HR einleiten bzw. begleiten (u.a. Jalloul et al. 2002; Göbel et al. 2003; Li et al. 2004; Kiba et al. 2006). Zeitgleich zur Erhöhung der Lipidperoxidkonzentration werden beim Weizen Lipoxygenasen induziert. Auch hier gibt es eine Übereinstimmung zu anderen Systemen (u.a. Kolomiets et al. 2000; Kiba et al. 2006).

Die Erhöhung an Lipidperoxiden in den Weizenmembranen durch die LOX-92, könnte Radikalkettenreaktionen einleiten. Diese wiederum könnten zum Verlust der Membranintegrität beitragen und so die HR (Hypersensitive Reaktion) begünstigen

(u.a. Jalloul et al. 2002; Li et al. 2004) und letztendlich die Resistenz gegenüber Pathogenen erhöhen. Ein Zusammenhang zwischen HR, Resistenz gegenüber Pathogenen und erhöhter Lipid-Peroxidation wird z.B. beim Wirt-Pathogensystem Reis - *Magnaporthe grisea* beobachtet. In diesem Fall wird eine direkte Abhängigkeit beobachtet zwischen Lipid-Peroxidation sowie HR einerseits und Resistenz gegenüber dem Pathogen andererseits.

Beim Weizen könnten nun zeitgleich induzierte Phospholipasen freie Fettsäuren aus den Membranlipiden freisetzen und so genügend Substrat für den Start der LOX-Reaktionen zur Verfügung zu stellen.

Während der späten Phase der HR werden aromatische Monomere unter Beteiligung einer Peroxidase polymerisiert. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Lipidperoxide, wie sie bei der LOX-Reaktion entstehen, für diese Reaktionen als Elektronenakzeptoren in Frage kommen (Loers 1999). Somit wäre auch bei dieser wichtigen Reaktion eine Beteiligung von LOX-Produkten möglich.

Beim Tabak wurde von Rusterucci et al. (1999) gezeigt, dass bei der Ausbildung der HR nach Elicitierung mit Cryptogein zwei verschiedene LOX-Spezies beteiligt sind. Cryptogein ist ein Protein, welches vom Pathogen *Phytophthora cryptogea* isoliert wird und eine elicitierende Wirkung, ähnlich dem Pgt-Elicitor, besitzt. Nach Elicitierung werden eine 9- und eine 13-LOX aktiviert. Eine entsprechende Reaktion wird auch nach Induktion durch Meja gestartet. Ein direkter Vergleich mit der Induktion von Weizen-LOX nach Elicitierung mit dem Pgt-Elicitor und nach Meja-Injektion bietet sich an.

Im Modell von Rusterucci werden freie Fettsäuren zum Start der Lipoxygenase-Reaktionen durch Lipasen zur Verfügung gestellt. Beim Weizen wurde nach der Elicitierung oder Pathogenbefall eine erhöhte Phospholipasenaktivität festgestellt (Loers 1999). Eine 9-LOX im Cytosol katalysiert gleichzeitig die massive Bildung von Hydroperoxiden mehrfach ungesättigter Fettsäuren. Dadurch kommt es zur Peroxidation von Membranlipiden und so zu Membranschädigungen. Diese Reaktionskaskade induziert in diesem Modell letztendlich die Hypersensitive Reaktion (HR). Das 13-LOX Reaktionsprodukt Jasmonat dient hier der Regulation der Prozesse.

Porta und Rocha-Sosa (2002) haben das Modell von Rusterucci et al. größtenteils übernommen. Sie postulieren ebenfalls, dass beim Tabak für die HR nach Cryptogeinbehandlung die Aktivitäten von zwei LOX-Spezies, die einer 13-LOX und einer 9-LOX, notwendig sind. Bei dem von Porta und Rocha-Sosa vorgestellten Modell ist eine 13-LOX in der Lage, 13-Hydroperoxyfettsäuren (13-HPOT) zu synthetisieren, welche über den Allenoxyd-Synthase-Weg (AOS) in das Signalmolekül Jasmonat überführt werden und so eine Regulation der Abläufe ermöglichen. Andererseits schädigen die Primärprodukte von 9- und 13-LOX, die 9- und 13-Hydroperoxide der Fettsäuren in der Zellmembran, direkt die Zellmembranen. Letztendlich kommt es zur Ausbildung der Hypersensitiven Reaktion (HR).

Besonders wichtig erscheint der Aspekt, dass bei beiden vorgestellten Modellen unterschiedliche LOX-Spezies, nämlich 9- und 13-LOX für die Entstehung der HR gemeinsam eine Schlüsselposition einnehmen.

Ausgehend von der von Rusterucci et al. aufgestellten und von Porta und Rocha-Sosa überarbeiteten Hypothese könnte die Regulation der 9- und 13-LOX (LOX-92 und LOX2 *Ta1*) in erster Annäherung folgendermaßen erklärt werden:

Nach Induktion durch Meja oder den Pgt-Elicitor kommt es durch die aktiven LOX-92 zur Synthese von 9 (S)-Hydroperoxiden. Die freien Fettsäuren für den Start dieser LOX-Reaktionen können durch die ebenfalls induzierten (Phospho-)Lipasen zur Verfügung gestellt werden. Nach Auffassung von Rusterucci et al. (1999) findet diese erste Freisetzung von freien Fettsäuren meist an den Chloroplastenmembranen statt. Beim Weizen sind 85% der gesamten Phospholipase-Aktivität im Cytosol zu finden (Loers 1999), so dass hier durchaus auch andere Zellmembranen betroffen sein könnten.

Über Radikalkettenreaktionen wäre die Peroxidation von Membranlipiden durch die LOX-92 möglich. Eine Zunahme von peroxidierten Membranlipiden wird nach Meja- und nach Pgt-Induktion tatsächlich beobachtet (Loers 1999).

Wichtige Kriterien für die Hypersensitive Reaktion (HR) sind Polymerisierungsreaktionen ligninartiger Substanzen und somit auch die Aktivierung der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) nach Elicitierung durch den Pgt-Elicitor (Moerschbacher, 1988). Für die anschließend ablaufenden Peroxidase-katalysierten Polymerisierungsreaktionen sind die Primärprodukte der LOX-92-Reaktion, die 9 (S)-Hydroperoxide durchaus in der Lage, als notwendige Elektronenakzeptoren (anstelle

von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) zu fungieren (Loers 1999). Die LOX-92 könnten demnach bei der Pathogenabwehr, welche durch die Elicitierung mit dem Pgt-Elicitor simuliert wird, für die Peroxidierung der Lipidmembranen und letztendlich auch für die Abläufe der HR mitverantwortlich sein.

Zeitgleich mit den 9-LOX werden beim Weizen nach Induktion durch den Pgt-Elicitor und durch Meja auch 13-LOX (LOX-100 bzw. LOX2 *Ta1*) induziert. Die 13-LOX sind prinzipiell dazu fähig, über den Allenoxid-Synthase-Weg zur Bildung des Signalmoleküls Jasmonat zu führen. Wasternack et al. (1998) beschreiben Jasmonat als „master switch“ unter den verschiedenen Lipid-Signalmediatoren. Bei dem hier vorgestellten Modell wird diese Idee aufgegriffen. Die Aktivität der 9-LOX (LOX-92) könnte somit (teilweise) über das Signalmolekül Jasmonat gesteuert werden, also indirekt über die 13-LOX.

Ein Argument zur Stützung des vorgestellten Modells wurde bereits genannt: Den Weizenzellkulturen fehlen funktionsfähige Chloroplasten. Auch konnten hier die 13-LOX LOX2 *Ta1* bzw. LOX-103 nicht nachgewiesen werden. Die im Modell vorgestellte Regulationsmöglichkeit über diesen Jasmonatweg fehlte den Weizenzellkulturen demnach. Die offensichtlich nicht durch äußere Faktoren regulierbare konstitutiv hohe LOX-Enzymaktivität der LOX-92, könnte somit, wie bereits an anderer Stelle propagiert, erklärt werden.

Eine Vielzahl weiterer Steuerungselemente, welche direkt oder indirekt auf Stressreize reagieren, fehlen dem oben beschriebenen Modell. Unter Abschnitt 4.4.2 wird daher versucht, wichtige bisher unberücksichtigte Faktoren in die Gesamtbetrachtung mit einzubeziehen.

#### **4.4.2 Einordnung der 9-LOX bzw. 13-LOX-Spezies in das Signal- und Reaktionsnetz beim Ablauf pflanzlicher Abwehrreaktionen - eine Hypothese**

Als Resultat intensiver Bemühungen zahlreicher Arbeitsgruppen zum Verständnis von Pflanze-Pathogen-Interaktionen wird einer Vielzahl von Faktoren eine Funktion bei pflanzlichen Abwehrreaktionen zugeschrieben. In der Summe bilden diese Faktoren ein Signal- und Reaktionsnetz, dessen tatsächliche Struktur, Regulation und Funktionsweise erst in Anfängen verstanden ist.

Um den "Stellenwert" der in dieser Arbeit betrachteten Lipoxygenase-Spezies zu verdeutlichen, ist in Abb. 4.2 eine "Gesamtsicht" versucht, welche notwendigerweise spekulativ ist. Die Abbildung integriert einzelne Teilaspekte, welche u.a. in Übersichten von Rusterucci et al. (1999), Jabs and Slusarenko (2000), Bleé (2002), sowie Porta and Rocha-Sosa (2002) dargestellt sind.

Die Abbildung berücksichtigt die durch umfassende Daten gestützte Auffassung, dass es nach einer Pathogen-Rezeptor-Interaktion zu frühzeitigen Translokationen von  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$ -Ionen an der Zellmembran kommt, begleitet von einem schnellen und transienten "oxidative burst", d.h. der Generation reaktiver Sauerstoff-Spezies  $O_2^-$  und  $H_2O_2$ .

Reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) sind auch ein Begleitprodukt energietransformierender Prozesse in Mitochondrien, Plastiden und Peroxisomen. Die Zellen sind durch antioxidative Schutzmechanismen dagegen weitgehend geschützt. Pathogen-Befall und auch andere Stress-Situationen führen zu einer Störung der subtilen Balance der ROS-Homöostase und somit zu Veränderung im Redox-Status der Zelle. Zahlreiche Autoren vertreten die Auffassung, dass dadurch zelluläre Prozesse gesteuert werden, welche letztlich zum Zelltod führen. Damit wird den ROS die Rolle von Signalfaktoren zugeschrieben, welche Signaltransduktions-Kaskaden initiieren (Reviews von Mittler 2002; Apel and Hirt 2004; Van Breusegem and Dat 2006; Halliwell 2006; Torres and Dangl 2006).

Das interaktive Wechselspiel mit weiteren Signalmolekülen ist kaum verstanden und ein zentrales Thema der gegenwärtigen Forschung. Beteiligt an dem zellulären Geschehen sind, in Abbildung 4.3 vereinfacht als Dreier-Zeilenblock dargestellt, offenbar „Crosstalk“- und „Feedback“-Verstärkungsmechanismen, unter Beteiligung u.a. von Salicylsäure (SA), Jasmonsäure (JA), Stickstoffmonoxid (NO), Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und „Pathogenesis-Related“ (PR) Proteinen sowie der Expression anderer Gene.

Und die Rolle der Lipoxygenasen bei diesen Vorgängen?

Im Abschnitt 4.4.1 wurde ein Modell entwickelt, wie eine „Abstimmung“ zwischen LOX-Spezies mit einer unterschiedlichen Kompartimentierung und einer unterschiedlichen Positions-Spezifität (9-LOX bzw. 13-LOX, entsprechend LOX-92 bzw. LOX-103 =

*LOX2 Ta1* im Weizen) aussehen könnte. Ausgehend von dem oben genannten Modell kann für eine „Gesamtsicht“ folgende Hypothese aufgezeigt werden:

Die 9-LOX (im Weizen repräsentiert durch die cytosolischen LOX-92), welche nach Pathogenbefall in der inkompatiblen Interaktion oder nach Elicitor-Einwirkung sehr stark aktiviert sind katalysieren die Bildung von 9-LOOH, welche anstelle von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Co-Substrat Peroxidase-katalysierte Polymerisations- bzw. Lignifizierungs-Reaktionen ermöglicht (Loers 1999). Solche Reaktionen sind ein Kennzeichen der pflanzlichen Hypersensitivitäts-Reaktion (Moerschbacher et al., 1988). Darüber hinaus ist denkbar, dass die vermutlich in großer Menge anfallenden Lipidhydroperoxide - wie ansonsten auch die ROS - zu Membranlipid-Peroxidationen führen. Insbesondere könnten auch sie zur Bildung von Phyto-Oxylipinen führen (Bleé 2002), welche sehr wohl durch einen toxischen Effekt auf pathogene Mikroorganismen zur pflanzlichen Abwehr beitragen könnten (Prost et al. 2005).

Die vorliegende Arbeit zeigt im Weiteren, dass ein kleiner Anteil der LOX-Aktivierung sehr wahrscheinlich auf eine plastidäre 13-LOX zurückzuführen ist. Diese führt letztlich zur Bildung eines Signalmoleküls (Jasmonsäure), welches nach gegenwärtigem Verständnis eine Komponente in dem oben angesprochenen Signalnetz darstellt. Die Aktivitätssteigerung der 13-LOX, welche in dieser Arbeit durch die Weizen *LOX2 Ta1* repräsentiert ist, ist nach dem vorliegenden Ergebnis auf eine Aktivierung der Gen-Expression zurückzuführen, während die Aktivitätssteigerung der 9-LOX offenbar das Resultat posttranslationaler Modifikationen (und damit vermutlich noch schnellerer Prozesse) ist.

Das Substrat der angesprochenen Lipoxgenasen sind ungesättigte Fettsäuren, welche durch (Phospho-)Lipase-Aktivitäten aus zellulären Membranen freigesetzt werden. Als verantwortliche Enzyme hierfür werden Phospholipasen A (PLA) und D (PLD) angesehen (Reviews von Bleé 2002; Wang 2004). Im Weizen-Rostpilz-System erfolgt in der Tat eine Aktivierung beider Aktivitäten (Loers 1999). Die Steuerung der angesprochenen Phospholipasen (PL) in Pflanzen ist wenig bekannt; eine Regulation von PLD durch G-Proteine sowie eine Interaktion mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wird diskutiert (Wang 2004); im Falle der PLA spielen Ca<sup>2+</sup>-Ionen eine Rolle (Ryu 2004). Aktuell wird in Tabakblättern auch eine plastidäre Galactolipase (interessanterweise neben einer ebenfalls plastidären 9-LOX) ins Spiel gebracht (Cacas et al. 2005).

Die in Abb. 4.2 dargestellte Hypothese erhält eine zusätzliche Stütze und gleichzeitig eine interessante mögliche Erweiterung durch aktuelle Arbeiten mit einem *Nicotiana-Pseudomonas syringae*-System (Montillet et al. 2005): Diese Arbeiten hatten zum Ziel, die ROS-vermittelte mit einer LOX-abhängigen Lipid-Peroxidation zu vergleichen. Dies war möglich durch die Messung der Membran-Peroxidation in Blättern transgener Catalase-defizienter Pflanzen bei unterschiedlichen Licht-Konditionen. Mit diesem System wurde gezeigt, dass bei Lichteinstrahlung bzw. unter Photosynthesebedingungen, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> photorespiratorischer Herkunft in der Tat ursächlich zur Lipid-Peroxidation bzw. zum Zelltod führt. Im Dunkeln dagegen war die Initiation des Zelltods unabhängig von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; stattdessen war unter diesen Bedingungen eine Korrelation zwischen Lipid-Peroxidation und 9-LOX-Weg gegeben. Diese Daten verdeutlichen eindrucksvoll die Wechselbeziehung zwischen ROS und LOX-abhängiger Lipid-Peroxidation in Abhängigkeit von Außenfaktoren. Natürlich bleiben Fragen offen, was die Vergleichbarkeit des in der zitierten Arbeit verwendeten Solanaceen-Systems mit dem in der vorliegenden Arbeit genutzten Gramineen-System betrifft. Das gilt insbesondere auch für die Aussage, dass in Tabak-Blättern eine plastidäre (und nicht eine cytosolische) 9-LOX-Aktivität für die Lipid-Peroxidation verantwortlich sein soll (Cacas et al. 2005).

Schon zuvor wurden Resultate, welche mit einem transgenen *Solanum*-System mit einer reduzierten 9-LOX-Transkription gewonnen worden waren, von den Autoren in dem Sinne interpretiert, dass die Hypersensitivitäts-Reaktion normalerweise durch die Aktivität einer spezifischen 9-LOX gestützt wird. Falls aber die Bildung von 9-Lipidhydroperoxiden unterdrückt ist, dann können diese - unter Lichtbedingungen - ersetzt werden durch "autoxidative" Lipid-Peroxidationen sowie durch die Aktivität von 13-LOX (Göbel et al. 2003).

Die Mitwirkung von photorespirativem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei Abwehrreaktionen und Zelltod wurde ebenfalls bei transgenen Catalase-defizienten *Arabidopsis*-Pflanzen gezeigt. Weitergehende Microarray-Analysen haben darüber hinaus den unmittelbaren Einfluss von photorespirativem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf das Transkriptions-Muster dieser Pflanzen verdeutlicht (Vandenabeeck et al. 2004). Ebenfalls mit einem *Arabidopsis*-System wurde gezeigt, dass charakteristische Abwehrreaktionen wie PAL-Aktivierung, die Akkumulation von Salicylsäure und auch die Etablierung der systemischen Resistenz

lichtabhängig sind, nicht jedoch der frühe "oxidative burst", die Pathogen-induzierte Akkumulation von Jasmonsäure und die Phytoalexin-Produktion (Zeier et al. 2004).

In der Summe lassen die hier vorgelegte sowie die zitierten Arbeiten für die Zukunft einen wachsenden Erkenntnisprogress erwarten, was die zeitlichen und räumlichen Beziehungen von Lipid-Peroxidationen und nachfolgenden Reaktionswege, der Generation von Reaktiven Sauerstoffspezies, sowie der Interaktion dieser Prozesse mit anderen Signalmolekülen betrifft. Dieser Erkenntnisprogress wird bereits verdeutlicht durch den 9-LOX-Weg, dessen Bedeutung im Zusammenspiel mit dem 13-LOX-Weg und Reaktiven Sauerstoffspezies im Verständnis von pflanzlichen Abwehrreaktionen sich erst in der vergangenen wenigen Jahren abzuzeichnen begann und vorher nicht vorauszusehen war.

In Abbildung. 4.2 wird die aufgestellte Hypothese schematisch zusammengefasst.

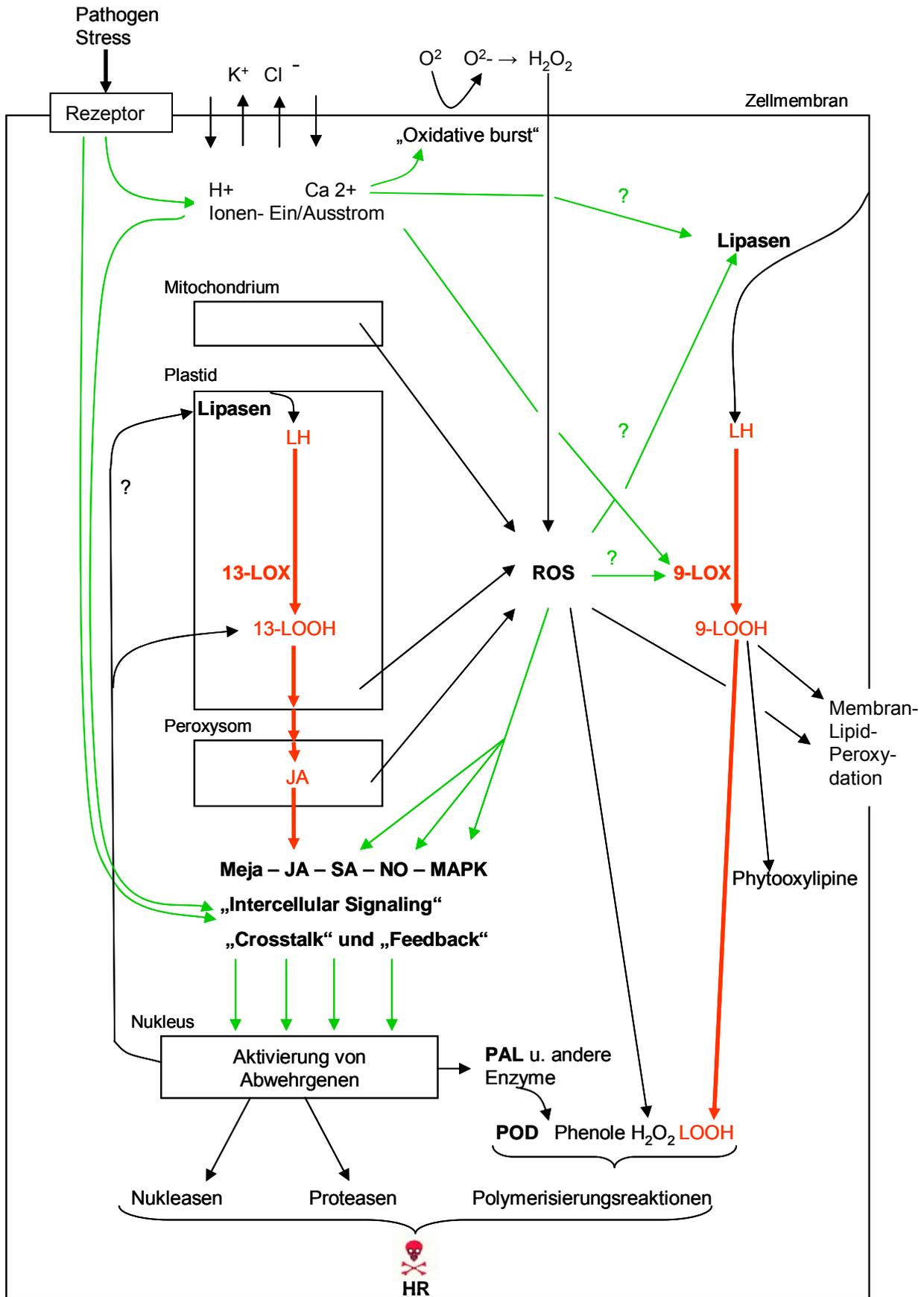


Abb. 4.2 Hypothese zur Beteiligung von Lipoxygenasen mit unterschiedlicher Positions-Spezifität an der Hypersensitivitätsreaktion pflanzlicher Zellen (Fortsetzung der Legende s. folgende Seite)

**Abb. 4.2 Hypothese zur Beteiligung von Lipoxygenasen mit unterschiedlicher Positions-Spezifität an der Hypersensitivitätsreaktion pflanzlicher Zellen** (in teilweiser Anlehnung an Darstellungen von Rusterucci et al. 1999; Jabs and Slusarenko 2000; Blée 2002; von Breusgem and Dat 2006).

Nach Pathogen- bzw. Stress-Einwirkung kommt es zur Aktivierung sowohl eines plastidären 13-LOX-Weges als auch eines cytosolischen 9-LOX-Weges.

Der plastidäre Weg führt über 13-LOOH und den Allenoxidsynthese Weg zur Bildung von Jasmonat (JA), welches als Signalsubstanz zelluläre Prozesse moduliert. Die Wirkung von JA lässt sich im Experiment durch extern zugeführtes Methyljasmonat (Meja) simulieren. In der vorliegenden Arbeit wird die plastidäre 13-LOX durch die Weizen-LOX-Spezies "LOX 103" = LOX2 *Ta1* repräsentiert.

Der cytosolische Weg führt zwar nicht zur Bildung einer (bekannten) regulatorischen Substanz, wohl aber mit 9-LOOH zu einem Intermediat, welches als Co-Substrat Peroxidase (POD)-katalysierte Polymerisations-Reaktionen ermöglicht (Loers 1999). In der vorliegenden Arbeit wird die 9-LOX durch die nach Pathogen-Befall sehr stark aktivierte Weizen-LOX-Spezies "LOX-92" repräsentiert. (Weitere Erläuterungen im begleitenden Text Kap. 4.4).

Erläuterungen:

**orange** Die in der vorliegenden Arbeit betrachteten Wege bzw. LOX-Spezies  
**grün** Spekulativ vermutete Signal- und Regulationswege (posttranslationale Modifikationen)

LH	Aus Membranlipiden freigesetzte ungesättigte Fettsäuren
LOOH	Lipidhydroperoxide
ROS	Reaktive Oxygen-Spezies
JA	Jasmonat
Meja	Methyljasmonat
SA	Salicylat
NO	Nitroxid-Radikal
MAPK	Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase(-Kaskade)
POD	Peroxidasen
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
HR	Hypersensitive Reaktion

(Die obige Darstellung ist in gemeinschaftlichen Diskussionen mit H.J. Grambow entstanden.)

### III Literatur

**Agrios, G. N.** (1997).

Environment factors that cause plant diseases. Plant Pathol. **10**: 225-243.

**Almeras, E., Stolz, S., Vollenweider, S., Reymond, P. Mene-Safrane, L., Farmer, E.E.** (2003).

Reactive electrophile species activate defense gene expression in Arabidopsis. Plant J. **34**(2): 205-16.

**Apel, K. and Hirt, H.** (2004).

Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu. Rev. Plant Biol. **55**: 373-99.

**Arz, M.** (1992).

Enzymaktivitäten von Phospholipase C und Phospholipase A in Plasmamembranen aus Weizen. Biochemische Untersuchungen zur Signaltransduktion in der Weizen/Schwarzrost- Interaktion. Dissertation, RWTH-Aachen.

**Baker, C.J. and Orlandi, E.W.** (1995).

Active oxygen in plant pathogenesis. Annu. Rev. Phytopathol. **33**: 299-321.

**Beißmann, B.** (1990).

Strukturelle und funktionelle Charakterisierung eines Glykoproteinelicitors von *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Dissertation, RWTH-Aachen.

**Ben-Hayyim, G., Gueta-Dahan, Y., Avsian-Kretchmer, O., Weichert, H., Feussner, I.** (2001).

Preferential induction of a 9-lipoxygenase by salt in salt-tolerant cells of *Citrus sinensis* L. Osbeck. Planta **212**(3): 367-75.

**Bestwick, C.S., Brown, I.R., Bennett, M.H., Mansfield, J.W.** (1997).

Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. Plant Cell **9**(2): 209-21.

**Bi, J.M., Kenton, P., Mur, L., Darby, R., Draper, J.** (1995)

Hydrogen peroxide does not function downstream of salicylic acid in the induction of PR protein expression Plant J. **8** (2): 235-45

**Bjellqvist, B., Hughes, G.J., Pasquali, C., Paquet, N., Ravier, F., Sanchez, J.C., Frutiger, S., Hochstrasser, D.** (1993).

The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. Electrophoresis **14**(10): 1023-31.

**Blee, E.** (1996).

Phytooxylipins: The Peroxygenase Pathway, AOCS Press, Champaign, Illinois.

**Blee, E. and Joyard, J.** (1996).

Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acid hydroperoxides. Plant Physiol. **110**(2): 445-454.

**Blee, E.** (1998).

Phytooxylipins and plant defense reactions. Progr. Lipid Res. **37**(1): 33-72.

**Blee, E.** (2002).

Impact of phyto-oxylipins in plant defense. Trends Plant Sci. **7**(7): 315-22.

**Bohland, C.** (1997).

Lipoxygenasen aus Weizen - Elicitorwirkung, partielle Reinigung und biochemische Charakterisierung. Dissertation, RWTH-Aachen.

**Bohland, C., Balkenhohl, T., Loers, G., Feussner, I., Grambow, H.J.**(1997).

Differential induction of lipoxygenase isoforms in wheat upon treatment with rust fungus elicitor, chitin oligosaccharides, chitosan, and methyl jasmonate. Plant Physiol. **114**(2): 679-685.

**Bolwell, G.P.** (1999).

Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. Curr. Opin. Plant Biol. **2**(4): 287-294.

**Borch, J., Bych, K., Roepstorff, P., Palmgren, M.G., Fuglsang, A.T.** (2002).

Phosphorylation-independent interaction between 14-3-3 protein and the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. Biochem. Soc. Transact. **30**(4): 411-5.

**Bowles, D.J.** (1990).

Defense-related proteins in higher plants. Annu. Rev. Biochem. **59**: 873-907.

**Bowsher, C.G., Ferrie, J.M., Gosh, S., Todd, J., Thompson, E.J., Rothstein, S.J.** (1992).

Purification and partial characterization of a membrane-associated lipoxygenase in tomato fruit. Plant Physiol. **100**: 1802-1807.

**Brash, A.R.** (1999).

Lipoxygenases: Occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. J. Biol. Chem. **274**(34): 23679-23682.

**Brash, A.R., Boeglin, W.E., Chang, M.S., Shieh, B.H.** (1996).

Purification and molecular cloning of an 8R-lipoxygenase from the coral *Plexaura homomalla* reveal the related primary structures of R- and S-lipoxygenases. J. Biol. Chem. **271**(34): 20949-20957.

**Brendel, V., Bucher, P., Nourbakhsh, I.R., Blaisdell, B.E., Karlin, S.** (1992).

Methods and algorithms for statistical analysis of protein sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**(6): 2002-6.

**Cacas, J.L., Vaillau, F., Davoine, C., Ennar, N., Agnel, J.P., Tronchet, M., Ponchet, M., Blein, J.P., Roby, D., Triantaphylides, C., Montillet, J.L.** (2005)

The combined action of 9 lipoxygenase and galactolipase is sufficient to bring about programmed cell death during tobacco hypersensitive response. Plant, Cell & Environm. **28** (11): 1367-1378.

**Collinge, D. and Slusarenko, A.J.** (1987).

Plant gene expression in response to pathogens. Plant Mol. Biol. **9**: 389-410.

**Creelman, R.A. and Mullet, J.E.** (1997).

Biosynthesis and action of jasmonates in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **48**: 355-381.

**Croft, K., Juttner, F., Slusarenko, A.J.** (1993).

Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. Plant Physiol. **101**(1): 13-24.

**Dangl, J.L., Dietrich, R.A., Richberg, M.H.** (1996).

Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. Plant Cell **8**(10): 1793-1807.

**Darling, D.L., Yingling, J., Wynshaw-Boris, A.** (2005).

Role of 14-3-3 proteins in eukaryotic signaling and development. Curr. Top. Dev. Biol. **68**: 281-315.

**De Witt, P. Lauge, R, Honee, G, Joosten, MHAJ, Vossen, P, Koman-Gersmann, M, Vogelsang, R, Vervoort, J.M** (1997).

Molecular and biochemical basis of the interaction between tomato and its fungal pathogen *Cladosporium fluvum*. Antonie van Leeuwenhoek **71**: 137-141.

**Dixon, R.A.** (2001).

Natural products and plant disease resistance. Nature **411**(6839): 843-7.

**Elstner, E.F., Osswald, W., Schneider, I.** (1996).

Phytopathologie. Allgemeine und Biochemische Grundlagen. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.

**Emanuelsson, O., Nielsen, H., von Heijne, G.** (1999).

ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. Protein Sci. **8**(5): 978-84.

**Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., von Heijne, G.** (2000).

Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. J. Mol. Biol. **300**(4): 1005-16.

**Farmer, E.E., Weber, H., Vollenweider, S.** (1998).

Fatty acid signaling in Arabidopsis. Planta **206**(2): 167-174.

**Farmer, E.E., Almeras, E., Krishnamurthy, V.** (2003).

Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. Curr. Opin. Plant Biol. **6**(4): 372-8.

**Fernandez-Patron, C., Calero, M., Collazo, P.R., Garcia, J.R., Madrazo, J., Musacchio, A., Soriano, F., Estrada, R., Frank, R., Castellanos-Serra, L.R., Mendez, E.** (1995).

Protein reverse staining: high-efficiency microanalysis of unmodified proteins detected on electrophoresis gels. Anal. Biochem. **224**(1): 203-11.

**Feußner, I. and Kindl, H.** (1994).

Particulate and soluble lipoxygenase isoenzymes - comparison of molecular and enzymatic-properties. Planta **194**(1): 22-28.

**Feußner, I., Hause, B., Vorös, K., Parthier, B., Wasternack, C.** (1995).

Jasmonate-induced lipoxygenase forms are localized in chloroplasts of barley leaves (*Hordeum vulgare* cv Salome). Plant J. **7**(6): 949-957.

**Feußner, I. and Kühn, H.** (1995).

The lipid body lipoxygenase from cucumber seedlings exhibits unusual reaction specificity. FEBS Lett. **367**(1): 12-14.

**Feußner, I. and Wasternack, C.** (1998).

Lipoxygenase catalyzed oxygenation of lipids. Fett-Lipid **100**(4-5): 146-152.

**Feußner, I. and Wasternack, C.** (2002).

The lipoxygenase pathway. Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. **53**: 275-297.

**Fischer, A.M., Dubbs, W.E., Baker, R.A., Fuller, M.A., Stephenson, L.C., Grimes, H.D.** (1999).

Protein dynamics, activity and cellular localization of soybean lipoxygenases indicate distinct functional roles for individual isoforms. Plant J. **19**(5): 543-54.

**Flor, H.H.** (1942).

Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. Phytopathology **32**: 653-669.

**Flor, H.H.** (1947).

Inheritance of reaction to rust in flax. J. Agricult. Res. **74**: 241–262.

**Furken, H.** (1999)

Untersuchungen und Charakterisierung von Lipoxygenasen und Phospholipasen aus Weizenchloroplasten. Staatsexamensarbeit, RWTH-Aachen.

**Gardner, H.W.** (1991). Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. Biochim. Biophys. Acta **1084**(3): 221-39.

**Grechkin, A.** (1998). Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. Progr. Lipid Res. **37**(5): 317-352.

**Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D., Bairoch, A.** (2003).

ExpASY: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. Nucleic Acids Res. **31**(13): 3784-8.

**Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A.;** (2005).

Protein identification and analysis tools on the ExpASY server. In: The Proteomics Protocols Handbook, ed. J. M. Walker, Humana Press, pp 571-607.

**Göbel, C., Feussner, I., Rosahl, S.** (2002).

Oxylipin profiling in pathogen-infected potato leaves. Biochim. Biophys. Acta **1584**(1): 55-64.

**Göbel, C., Feussner, I., Rosahl, S.** (2003).

Lipid peroxidation during the hypersensitive response in potato in the absence of 9-lipoxygenases. J. Biol. Chem. **278**(52): 52834-40.

**Gotthardt, U.** (1992).

Etablierung und Charakterisierung von Weizen-Suspensionskulturen Untersuchungen zur Signaltransduktion in der Weizen-Schwarzrost- Interaktion. Dissertation, RWTH-Aachen.

**Greenberg, J.T.** (1996).

Programmed cell death: A way of life for plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**(22): 12094-12097.

**Guruprasad, K., Reddy, B.V., Pandit, M.W.** (1990).

Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting *in vivo* stability of a protein from its primary sequence. Protein Eng **4**(2): 155-61.

**Halliwell, B.** (2006).

Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. Plant Physiol. **141**(2): 312-22.

**Hamberg, M.** (1998).

A pathway for biosynthesis of divinyl ether fatty acids in green leaves. Lipids **33**(11): 1061-1071.

**Hamberg, M.** (1999).

An epoxy alcohol synthase pathway in higher plants: Biosynthesis of antifungal trihydroxy oxylipins in leaves of potato. Lipids **34**(11): 1131-1142.

**Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J.D.G.** (1996).

Resistance gene-dependent plant defense responses. Plant Cell **8**(10): 1773-1791.

**Hause, B., Vorös, K., Kogel, K.H., Besser, K., Wasternack, C.** (1999).

A jasmonate-responsive lipoxygenase of barley leaves is induced by plant activators but not by pathogens. J. Plant Physiol. **154**(4): 459-462.

**He, Y., Fukushige, H., Hildebrand, D.F., Gan, S** (2002).

Evidence supporting a role of jasmonic acid in Arabidopsis leaf senescence. Plant Physiol. **128**(3): 876-84.

**Heath, M.C.** (2000).

Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. Curr. Opin. Plant Biol. **3**(4): 315-9.

**Heath, M.C.** (2001).

Non-host resistance to plant pathogens: Nonspecific defense or the result of specific recognition events? Physiol. Mol. Plant Pathol. **58**: 53-54.

**Heitz, T., Bergey, D.R., Ryan, C.A.** (1997).

A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. Plant Physiol. **114**(3): 1085-1093.

**Hilbers, M.P., FinazziAgro, A., Veldink, G.A., Vliegenthart, J.F.G** (1996).

Purification and characterization of a lentil seedling lipoxygenase expressed in *E-coli*: Implications for the mechanism of oxodiene formation by lipoxygenases. Int. J. Biochem. Cell Biol. **28**(7): 751-760.

**Holtman, W.L., Roberts, M.R., Oppedijk, B.J., Testerink, C., van Zeijl, M.J., Wang, M.** (2000a).

14-3-3 proteins interact with a 13-lipoxygenase, but not with a 9-lipoxygenase. FEBS Lett. **474**(1): 48-52.

**Holtman, W.L., Roberts, M.R., Wang, M.** (2000b).

14-3-3 proteins and a 13-lipoxygenase form associations in a phosphorylation-dependent manner. Biochem. Soc. Transact. **28**(6): 834-6.

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

**Hughes, R.K., West, S.I., Hornostaj, A.R., Lawson, D.M., Fairhurst, S.A., Sanchez, R.O., Hough, P., Robinson, B.H., Casey, R.** (2001).

Probing a novel potato lipoxygenase with dual positional specificity reveals primary determinants of substrate binding and requirements for a surface hydrophobic loop and has implications for the role of lipoxygenases in tubers. Biochem. J. **353**(Pt 2): 345-55.

**Isaak, S.** (1992).

Fungal - Plant Interactions. Chapman and Hall, London.

**Ishida, H., Nishimori, Y., Sugisawa, M., Makino, A., Mae, T.** (1997).

The large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase is fragmented into 37-kDa and 16-kDa polypeptides by active oxygen in the lysates of chloroplasts from primary leaves of wheat. Plant Physiol. **114**(3): 1054-1054.

**Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K., Scheel, D.** (1997).

Elicitor-stimulated ion fluxes and O<sub>2</sub>(-) from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**(9): 4800-4805.

**Jabs, T. and Slusarenko, A.J.** (2000).

The hypersensitive response. In: Mechanisms of Resistance to Plant Disease, Kluwer Academic Publishers, pp 279-323.

**Jalloul, A., Montillet, J.L., Assigbetse, K., Agnel, J.P., Delannoy, E., Triantaphylides, C., Daniel, J.F., Marmey, P., Geiger, J.P., Nicole, M.** (2002).

Lipid peroxidation in cotton: Xanthomonas interactions and the role of lipoxygenases during the hypersensitive reaction. Plant J. **32**(1): 1-12.

**Keen, N.T.** (1990).

Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. Annu. Rev. Genet. **24**: 447-63.

**Kiba, A., Takata, O., Ohnishi, K., Hikichi, Y.** (2006).

Comparative analysis of induction pattern of programmed cell death and defense-related responses during hypersensitive cell death and development of bacterial necrotic leaf spots in eggplant. Planta. **224**(5): 981-94.

**Koch, E., Meier, B.M., Eiben, H.G, Slusarenko, A.J** (1992).

A lipoxygenase from leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is induced in response to plant pathogenic pseudomonas. Plant Physiol. **99**: 571-576.

**Kolomiets, M.V., Chen, H., Gladon, R.J., Braun, E.J., Hannapel, D.J.** (2000).

A leaf lipoxygenase of potato induced specifically by pathogen infection Plant Physiol. **124**(3): 1121-30.

**Kombrink, E. and Somssich, I.E.** (1995).

Defense responses of plants to pathogens. Adv. Bot. Res. **21**: 1-34.

**Krautwig, B. and Lorz, H.** (1996).

From cell to wheat plant - in vitro embryogenesis and regeneration in Poaceae. Naturwissenschaften **83**(9): 414-423.

**Kühn, H., Heydeck, D, Wiesner, R, Schewe, T.** (1985).

The positional specificity of wheat lipoxygenase; the carboxylic group as signals for the recognition of the site of the hydrogen removal. Biochim. Biophys. Acta **830**: 25-29.

**Kühn, H., Schewe, T., Rapoport, S.M.** (1986).

The stereochemistry of the reactions of lipoxygenases and their metabolites. Proposed nomenclature of lipoxygenases and related enzymes. Adv. Enzymol. Rel. Areas Mol. Biol. **58**: 273-311.

**Kühn, H., Wiesner, R., Rathmann, J., Schewe, T.** (1991).

Formation of ketodienoic fatty acids by the pure pea lipoxygenase-1. Eicosanoids **4**(1): 9-14.

**Laemmli, U.K.** (1970).

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**(5259): 680-5.

**Lamb, C. and Dixon, R.A.** (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **48**: 251-275.

**Lauge, R., Goodwin, P.H., de Wit, P.J., Joosten, M.H.** (2000).

Specific HR-associated recognition of secreted proteins from *Cladosporium fulvum* occurs in both host and non-host plants. Plant J. **23**(6): 735-45.

**Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., Lamb, C.** (1994).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. Cell **79**(4): 583-93.

**Li, Y.F., Wang, Z.Z., Jia, X.L.** (2004).

Membrane lipid peroxidation and hypersensitive reaction induced by a glycoprotein elicitor from *Magnaporthe grisea* in rice leaves Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao **30**(2): 147-52.

**Liavonchanka, A. and Feußner, I.** (2006).

Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis. J. Plant Physiol. **163**(3): 348-57.

**Liechti, R. and Farmer, E.E.** (2002).

The jasmonate pathway. Science **296** (5573): 1649-1650

**Lobler, M. and Lee, J.** (1998).

Jasmonate signalling in barley. Trends Plant Sci. **3**(1): 8-9.

**Loers, G.** (1999).

Zur Funktion von Lipoxygenasen und Phospholipasen bei der Hypersensitiven Reaktion von Weizen. Dissertation, RWTH-Aachen.

**Lutteke, T., Krieg, P., Furstenberger, G., von der Lieth, C.W.** (2003).

LOX-DB- database on lipoxygenases. Bioinformatics **19**(18): 2482-3.

**Maccarrone, M., van Aarle, P.G., Veldink, G.A., Vliegthart, J.F.** (1994).

*In vitro* oxygenation of soybean biomembranes by lipoxygenase-2. Biochim. Biophys. Acta **1190**(1): 164-9.

**Maccarrone, M., Nieuwenhuizen, W.F., Dullens, H.F.J., Catani, M.V., Melino, G., Veldink, G.A., Vliegthart, J.F.G., Agro, A.F.** (1996).

Membrane modifications in human erythroleukemia K562 cells during induction of programmed cell death by transforming growth factor beta 1 or cisplatin. Eur. J. Biochem. **241**(1): 297-302.

**Maccarrone, M., Van Zadelhoff, G., Veldink, G.A., Vliegenthart, J.F.G., Finazzi-Agro, A.** (2000).

Early activation of lipoxygenase in lentil (*Lens culinaris*) root protoplasts by oxidative stress induces programmed cell death. Eur. J. Biochem. **267**(16): 5078-5084.

**Matsui, K., Hijiya, K., Tabuchi, Y., Kajiwara, T.** (1999).

Cucumber cotyledon lipoxygenase during postgerminative growth. Its expression and action on lipid bodies. Plant Physiol. **119**(4): 1279-1287.

**Mauch, F., Kmecl, A., Schaffrath, U., Volrath, S., Görlach, J., Ward, E., Ryals, J., Dudler, R.** (1997).

Mechanosensitive expression of a lipoxygenase gene in wheat. Plant Physiol. **114**(4): 1561-1566.

**Melan, M.A., Dong, X., Endara, M.E., Davis, K.R., Ausubel, F.M., Peterman, T.K.** (1993).

An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. Plant Physiol. **101**(2): 441-50.

**Mellersh, D.G. and Heath, M.C.** (2001).

Plasma membrane-cell wall adhesion is required for expression of plant defense responses during fungal penetration. Plant Cell **13**(2): 413-24.

**Mellersh, D.G. and Heath, M.C.** (2003).

An investigation into the involvement of defense signaling pathways in components of the nonhost resistance of *Arabidopsis thaliana* to rust fungi also reveals a model system for studying rust fungal compatibility. Mol. Plant-Microbe Interact. **16**(5): 398-404.

**Mittler, R.** (2002).

Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci. **7**(9): 405-10.

**Moerschbacher, B.M.** (1984).

Untersuchungen zum Elicitor der HS-Reaktion am Schwarzrost/Weizen Wirt-Parasit-System. Diplomarbeit, RWTH-Aachen.

**Moerschbacher, B.M., Kogel, K.H., Noll U.M., Reisener H.J.** (1986).

An elicitor of the hypersensitive lignification response in wheat leaves isolated from the rust fungus *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. I. Partial purification and characterization. Zeitschr. Naturforsch. J. Biosci. **41c**: 830-838.

**Moerschbacher B.M.** (1988)

Ligninbiosynthese und die Resistenz des Weizens gegen Schwarzrost. Dissertation, RWTH-Aachen.

**Moerschbacher B.M., Noll U.M., Flott B.E., Reisener H.J.** (1988)

Lignin biosynthetic enzymes in stem rust infected, resistant and susceptible near-isogenic wheat lines. Physiol. Mol. Plant Pathol. **33**: 33-46

**Montillet, J.L., Chamnongpol, S., Rusterucci, C., Dat, J., van de Cotte, B., Agnel, J.P., Battesti, C., Inze, D., Van Breusegem, F., Triantaphylides, C.** (2005).

Fatty acid hydroperoxides and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. Plant Physiol. **138**(3): 1516-26.

**Neuenschwander, U., Vernooij, B., Friedrich, L., Uknes, S., Kessmann, H., Ryals, J.** (1995).

Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? Plant J. **8**, 227-233.

**Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., von Heijne, G.** (1997).

Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Protein Eng. **10**(1): 1-6.

**Nürnbergger, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W.R., Hahlbrock, K., Scheel, D.** (1994).

High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. Cell **78**(3): 449-60.

**Nürnbergger, T., Wirtz, W., Nennstiel, D., Hahlbrock, K., Jabs, T., Zimmermann, S., Scheel, D.** (1997).

Signal perception and intracellular signal transduction in plant pathogen defense. J. Receptor Signal Transduct. Res. **17**(1-3): 127-136.

**Nürnbergger, T.** (1999).

Signal perception in plant pathogen defense. Cell. Mol. Life Sci. **55**(2): 167-182.

**Nürnbergger, T. and Brunner, F.** (2002).

Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. Curr. Opin. Plant Biol. **5**(4): 318-24.

**Nürnbergger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., Piater, L.** (2004).

Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. Immunol. Rev. **198**: 249-66.

**Nürnbergger, T. and Lipka, V.** (2005).

Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. Mol. Plant Pathol. **6**(3): 335-345.

**Ocampo, C.A., Moerschbacher, B.M.; Grambow, H.J.** (1986).

Increased lipoxygenase activity is involved in the hypersensitive response of wheat leaves infected with avirulent rust fungi or treated with fungal elicitor. Zeitschr. Naturforsch. J. Biosci. **41c**: 559-563.

**Op den Camp, R. G. Przybyla, D., Ochsenbein, C., Laloi, C., Kim, C., Danon, A., Wagner, D., Hideg, E., Gobel, C., Feussner, I., Nater, M., Apel, K.** (2003).

Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in Arabidopsis. Plant Cell **15**(10): 2320-32.

**Osbourn, A.E.** (1996).

Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. Plant Cell **8**(10): 1821-1831.

**Osmond, C.B., Austin, M.P., Berry, J.A., Billings, W.D., Boyer, J.S., Dacey, J.W.H., Nobel, P.S., Smith, S.D., Winner, W.E** (1987).

Stress physiology and the distribution of plants. BioScience **37**(1): 38-44.

**Padmavati, M. and Reddy, A.R.** (1999).

Flavonoid biosynthetic pathway and cereal defence response: An emerging trend in crop biotechnology. J. Plant Biochem. Biotechnol. **8**(1): 15-20.

**Perez, A.G., Sanz, C., Olias, R., Olias, J.M.** (1999).

Lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities in ripening strawberry fruits. J. Agricult. Food Chem. **47**(1): 249-253.

**Polkowska-Kowalczyk, L., Wielgat, B., Maciejewska, U.** (2004).

The elicitor-induced oxidative processes in leaves of Solanum species with differential polygenic resistance to *Phytophthora infestans*. J. Plant Physiol. **161**(8): 913-20.

**Porta, H. and Rocha-Sosa, M.** (2002).

Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. Plant Physiol. **130**(1): 15-21.

**Prost, I., Dhondt, S., Rothe, G., Vicente, J., Rodriguez, M.J., Kift, N., Carbonne, F., Griffiths, G., Esquerre-Tugaye, M.T., Rosahl, S., Castresana, C., Hamberg, M., Fournier, J.** (2005).

Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. Plant Physiol. **139**(4): 1902-13.

**Regdel, D., Kühn, H., Schewe, T.** (1994).

On the reaction specificity of the lipoxygenase from tomato fruits. Biochim. Biophys. Acta **1210**(3): 297-302.

**Reymond, P., Weber, H., Damond, M., Farmer, E.E.** (2000).

Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in Arabidopsis. Plant Cell **12**(5): 707-719.

**Rickauer, M., Brodschelm, W., Bottin, A., Veronesi, C., Grimal, H., Esquerre-Tugaye, M.T.** (1997).

The jasmonate pathway is involved differentially in the regulation of different defence responses in tobacco cells. Planta **202**(2): 155-162.

**Rosahl, S.** (1996).

Lipoxygenases in plants - Their role in development and stress response. Zeitschr. Naturforsch. J. Biosci. **51**(3-4): 123-138.

**Rouster, J., Leah, R., Mundy, J., CameronMills, V.** (1997).

Identification of a methyl jasmonate-responsive region in the promoter of a lipoxygenase 1 gene expressed in barley grain. Plant J. **11**(3): 513-523.

**Royo, J., Leon, J., Vancanneyt, G., Albar, J.P., Rosahl, S., Ortego, F., Castanera, P., Sanchez-Serrano, J.J.** (1999).

Antisense-mediated depletion of a potato lipoxygenase reduces wound induction of proteinase inhibitors and increases weight gain of insect pests. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**(3): 1146-1151.

**Rusterucci, C., Stallaert, V., Milat, M.L., Pugin, A., Ricci, P., Blein, J.P.** (1996).

Relationship between active oxygen species, lipid peroxidation, necrosis, and phytoalexin production induced by elicitors in Nicotiana. Plant Physiol. **111**(3): 885-891.

**Rusterucci, C., Montillet, J.L., Agnel, J.P., Battesti, C., Alonso, B., Knoll, A., Bessoule, J.J., Etienne, P., Suty, L., Blein, J.P., Triantaphylides, C.** (1999).

Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogein on tobacco leaves. J. Biol. Chem. **274**(51): 36446-36455.

**Ryu, S.B.** (2004).

Phospholipid-derived signaling mediated by phospholipase A in plants. Trends Plant Sci. **9**(5): 229-35.

**Samuelsson, B., Dahlen, S.E., Lindgren, J.A., Rouzer C.A., Serhan, C.N.** (1987).

Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. Science **237**: 1171-1175.

**Sander, O. Sommer, I., Lengauer, T.** (2006).

Local protein structure prediction using discriminative models. BMC Bioinformatics **7**: 14.

**Schaller, F.** (2001).

Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules. J. Exp. Bot. **52**(354): 11-23.

**Scheel, D.** (1998).

Resistance response physiology and signal transduction. Curr. Opin. Plant Biol. **1**(4): 305-310.

**Scheel, D.** (1999).

Signaling in plants - Introduction. Cell. Mol. Life Sci. **55**(2): 151-152.

**Schlösser, E.** (1997).

Allgemeine Phytopathologie, Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Auflage.

**Scopes, R.K.** (1988).

Protein purification. Principles and practice. Springer Verlag New York, Heidelberg, Berlin, London, Paris, Tokyo.

**Senger, T., Wichard, T., Kunze, S., Gobel, C., Lerchl, J., Pohnert, G., Feussner, I.** (2005).

A multifunctional lipoxygenase with fatty acid hydroperoxide cleaving activity from the moss *Physcomitrella patens*. J. Biol. Chem. **280**(9): 7588-96.

**Shibata, D., Slusarenko, A., Casey, R., Hildebrand, D., Bell, E.** (1994).

Lipoxygenases. Plant Mol. Biol. Rep. **12**(2): 41-2.

**Shibata, D. and Axelrod, B.** (1995).

Plant Lipoxygenases. J. Lipid Med. Cell Sign. **12**(2-3): 213-228.

**Sicilia, F., Mattei, B., Cervone, F., Bellincampi, D., De Lorenzo, G.** (2005).

Characterization of a membrane-associated apoplastic lipoxygenase in *Phaseolus vulgaris* L.. Biochim. Biophys. Acta **1748**(1): 9-19.

**Siedow, J.N.** (1991).

Plant lipoxygenase: structure and function. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **42**: 145-188.

**Slusarenko, A.J., Croft, K.; Voisey, C.R** (1991).

Biochemical and molecular events in the hypersensitive response of bean to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. In: Biochemistry and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions, CJ Smith (ed.), Oxford University Press, Oxford, pp 126-143.

**Slusarenko, A.J.** (1996).

The role of lipoxygenase in plant resistance to infection. In: Lipoxygenase and Lipoxygenase Pathway Enzymes. G. J. Piazza (ed.), AOSC Press, :176-196.

**Srivastava, V., Anderson, O.D., Ow, D.W.** (1999).

Single-copy transgenic wheat generated through the resolution of complex integration patterns. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**(20): 11117-11121.

**Stephenson, L.C., Bunker, T.W., Dubbs, W.E., Grimes, H.D.** (1998).

Specific soybean lipoxygenases localize to discrete subcellular compartments and their mRNAs are differentially regulated by source-sink status. Plant Physiol. **116**(3): 923-933.

**Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M., Fritig, B.** (1993).

Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. Biochimie **75**(8): 687-706.

**Strittmatter, G. and Wegener, D.** (1993).

Genetic engineering of disease and pest resistance in plants: present state of the art. Zeitschr. Naturforsch. J. Biosci. **48c**: 773-688.

**Suzuki, Y. and Matsukura, U.** (1997).

Lipoxygenase activity in maturing and germinating rice seeds with and without lipoxygenase-3 in mature seeds. Plant Sci. **125**(2): 119-126.

**Tenhaken, R., Levine, A., Brisson, L.F., Dixon, R.A., Lamb, C.** (1995).

Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**(10): 4158-4163.

**Thieron, M.** (1993).

Die Resistenz von Reis gegen *Pyricularia oryzae*., Dissertation, RWTH-Aachen.

**Tiburzy, R.** (1984).

Untersuchungen zur Bedeutung der hypersensitiven Reaktion befallener Weizenzellen als Resistenzfaktor gegen *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Dissertation, RWTH-Aachen.

**Torres, M.A., Jones, J.D., Dangl, J.L.** (2006).

Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. Plant Physiol. **141**(2): 373-8.

**Van Breusegem, F. and Dat, J.F** (2006).

Reactive oxygen species in plant cell death. Plant Physiol. **141**(2): 384-90.

**Vandenabeele, S., Vanderauwera, S., Vuylsteke, M., Rombauts, S., Langebartels, C., Seidlitz, H.K., Zabeau, M., Van Montagu, M., Inze, D., Van Breusegem, F** (2004).

Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. **39**(1): 45-58

**Van Gestelen, P., Asard, H., Horemans, N., Caubergs, R.J.** (1998).

Superoxide-producing NAD(P)H oxidases in plasma membrane vesicles from elicitor responsive bean plants. Physiol. Plant. **104**(4): 653-660.

**Van Loon, L.C., Pierpoint, W.S., Boller, T., Conejero, V.** (1994).

Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. Plant Mol. Biol. Rep. **12**: 245-264.

**Van Loon, L.C. and Van Strien, E.A** (1999).

The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiol. Mol. Plant Pathol. **55**: 85-97.

**Van Mechelen, J., Smits, M., Douma, A.C., Rouster, J., Cameron-Mills, V., Heidekamp, F., Valk, B.E.** (1995).

Primary structure of lipoxygenase from barley grain as deduced from its cDNAS sequence. Biochim. Biophys. Acta **1254**: 221-225.

**Vericel, E., Rey, C., Calzada, C., Haond, P., Chapuy, P.H., Lagarde, M.** (1992).

Age-related changes in arachidonic acid peroxidation and glutathione-peroxidase activity in human platelets. Prostaglandins **43**(1): 75-85.

**Veronesi, C., Rickauer, M., Fournier, J., Pouenat, M.L., EsquerreTugaye, M.T.** (1996).

Lipoxygenase gene expression in the tobacco *Phytophthora parasitica nicotianae* interaction. Plant Physiol. **112**(3): 997-1004.

**Veronesi, C., Pouenat, M.L., Rickauer, M., Esquerre-Tugaye, M.T.** (1999).

Regulation of tobacco lipoxygenase by methyl jasmonate and fatty acids. Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences **322**(6): 491-497.

**Vick, B.A. and Zimmermann, D.C.** (1987).

Oxidative systems for modification of fatty acids. The Lipoxygenase Pathway. In: The Biochemistry of plants. Stumpf, P.K (ed.) Academic Press, Orlando, pp 53-90

**Vorös, K., Feussner, I., Kühn, H., Lee, J., Graner, A., Lobler, M., Parthier, B., Wasternack, C.** (1998).

Characterization of a methyljasmonate-inducible lipoxygenase from barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome) leaves. Eur. J. Biochem. **251**(1-2): 36-44.

**Wang, C.X., Jarlfors, U., Hildebrand, D.F.** (1999).

Regulation and subcellular localization of auxin-induced lipoxygenases. Plant Sci. **148**(2): 147-153.

**Wang, X.** (2004).

Lipid signaling. Curr. Opin. Plant Biol. **7**(3): 329-36.

**Wasternack, C. and Parthier, B.** (1997).

Jasmonate signalled plant gene expression. Trends Plant Sci. **2**(8): 302-307.

**Wasternack, C., Miersch, O., Kramell, R., Hause, B., Ward, J., Beale, M., Boland, W., Parthier, B., Feussner, I.** (1998).

Jasmonic acid: biosynthesis, signal transduction, gene expression. Fett-Lipid **100**(4-5): 139-146.

**Wasternack, C., Stenzel, I., Hause, B., Hause, G., Kutter, C., Maucher, H., Neumerkel, J., Feussner, I., Miersch, O.** (2006).

The wound response in tomato--role of jasmonic acid. J. Plant Physiol. **163**(3): 297-306.

**Weber, H., Chetelat, A., Caldelari, D., Farmer, E.E.** (1999).

Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves. Plant Cell **11**(3): 485-493.

**Wilkins, M.R., Lindskog, I., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J.C., Hochstrasser, D.F., Appel, R.D.** (1997b).

Detailed peptide characterization using PEPTIDEMASS--a World-Wide-Web-accessible tool. Electrophoresis **18**(3-4): 403-8.

**Wilkins, M. R. and Williams, K. L.** (1997a).

Cross-species protein identification using aminoacid composition, peptide mass fingerprinting, isoelectric point and molecular mass: a theoretical evaluation. J. Theor. Biol. **186**(1): 7-15.

**Wilkins, M.R., Gasteiger, E., Wheeler, C.H., Lindskog, I., Sanchez, J.C., Bairoch, A., Appel, R.D., Dunn, M.J., Hochstrasser, D.F.** (1998).

Multiple parameter cross-species protein identification using Multident--a world-wide web accessible tool. Electrophoresis **19**(18): 3199-206.

**Wojtaszek, P.** (1997).

Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. Biochem. J. **322**: 681-692.

**Xing, T., Ouellet, T., Miki, B.L.** (2002).

Towards genomic and proteomic studies of protein phosphorylation in plant-pathogen interactions. Trends Plant Sci. **7**(5): 224-30.

**Zabbai, F., Jarosch, B., Schaffrath, U.** (2004).

Over-expression of chloroplastic lipoxygenase RCI1 causes PR1 transcript accumulation in transiently transformed rice. Physiol. Mol. Plant Pathol. **64**(1): 37-43.

**Zeidler, D., Zähringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., Hutzler, P., Durner, J.** (2004).

Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101**(44): 15811-6.

**Zeier, J. Pink, B., Mueller, M.J., Berger, S.** (2004).

Light conditions influence specific defence responses in incompatible plant-pathogen interactions: uncoupling systemic resistance from salicylic acid and PR-1 accumulation. Planta **219**(4): 673-83.

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. H.J. Grambow danke ich herzlich für die freundliche und großzügige Förderung und Unterstützung meiner Arbeit, den gewährten Freiraum und vor allem für die Bereitschaft, auch nach seiner Erimittierung meine Arbeit zu betreuen.

Herrn Prof. Dr. A.J. Slusarenko möchte ich für die freundliche Übernahme des Co-Referats und für sein Interesse an meiner Arbeit danken.

Bei Herrn Dr. F. Kreuzaler möchte ich mich ebenfalls für seine Unterstützung, auch schon vor dieser Arbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ivo Feußner für die Aufnahme der LOX2 *Ta1* in die physiologische Stammbaumanalyse pflanzlicher LOX.

Für die gute Zusammenarbeit danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Biologie III der RWTH Aachen. Insbesondere natürlich den Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe: Frau Gerlind Grambow, Gaby Loers, Christian Bohland, Martina Aulike, Ria Lindt und Henrike Furken für offene Ohren in allen Lebenslagen, heißen Tee nach längeren Kühlraumaufenthalten, Zeit und die tolle kollegiale Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank gilt auch PD Dr. Ulrich Schaffrath und PD Dr. Nikolaus Schlaich für ihre Diskussionsbereitschaft, die positive Kritik sowie ihre wertvollen Tipps.

Ingrid Kiefer, Gudrun Schmitz, Esther Jonas-Straube und Frauke Zabbai möchte ich für ihre Freundschaft, die ständige Hilfsbereitschaft und ihre ideenreichen Anregungen danken.

Ulrike Noll danke ich besonders für ihre moralische Unterstützung, das Aufspüren und Eliminieren von Rechtschreib- und Grammatikfehlern sowie für ihre regelmäßigen Anrufe und E-Mail-Kontakte.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch den Mitarbeitern der mechanischen und der elektrischen Werkstatt der Biologie der RWTH Aachen.

Meinen Kollegen Annette Zerfass und Thomas Perske möchte ich für ihre freundschaftliche Unterstützung und das kritische Begutachten einzelner Manuskriptteile ganz herzlich danken.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinem Mann Josef, meinem Sohn Thomas und bei meinen Eltern. Sie gaben mir den Rückhalt, der zur Durchführung der Arbeit nötig war und zeigten unendlich viel Geduld und Verständnis.



# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name Angelika Seiler, geb. Zimmermann  
Geburtstag, -ort 13.05.1963 in Geilenkirchen  
Familienstand verheiratet, einen Sohn

## Schulbildung

1969 – 1973 Katholische Grundschule Übach  
1973–1982 Besuch des Städtischen Gymnasiums in Übach-Palenberg, Abitur 1982

## Hochschulstudium

04.1983 – 09.1984 Chemiestudium an der RWTH Aachen  
09.1984 – 11.1995 Biologiestudium an der RWTH Aachen  
*02.1987 – 04.1990 Familienphase*  
08.1994 – 11.1995 Diplomarbeit bei Prof. Dr. F. Kreuzaler am Institut für Biologie I an der RWTH Aachen  
Thema: „Charakterisierung eines Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Gens aus *Solanum tuberosum*“

## Berufliche Laufbahn

02.1996 – 03.1996 Freie Mitarbeit für die Unternehmensberatung Dorow & Partner in Bielefeld  
03.1996 – 04.1996 Mitarbeiterin bei der Royal Insurance in Aachen  
05.1996 – 07.1996 Mitarbeiterin im Außenhandel bei der SpanSet Secutex GmbH in Übach-Palenberg  
08.1996 – 07.2002 Wissenschaftliche Angestellte im Rahmen der Promotion am Institut für Biologie III, LFG Biochemie der Pflanzen bei Prof. Dr. H.J. Grambow an der RWTH Aachen  
10.2002 – 01.2003 Diplom-Biologin für den Bereich medizinische Diagnostik in der Gemeinschaftspraxis Dr. med. H. Knechten und Dr. med. L. Habets (PZB) in Aachen

01.06.2003 – 30.11.2003

Wissenschaftlicher Außendienst bei Innovex Services GmbH, Mannheim im Auftrag der Shire Deutschland GmbH & Co. KG, Köln

seit dem 01.12.2003

Wissenschaftlicher Außendienst für Shire Deutschland GmbH & Co. KG, Köln