

**Die zelluläre Kontrolle der PLA₂-Aktivität –
ein Element des Signaltransfers
zur Auslösung der Alkaloid-Biosynthese
in *Eschscholzia californica***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.),
vorgelegt der
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
von Diplompharmazeut
Wieland Schwartze,
geboren am 15. August 1976 in Jena.

Halle/Saale, den 01. Februar 2007

Gutachter:

1. Prof. Dr. Werner Roos
2. Priv.-Doz. Dr. Udo Conrad
3. Prof. Dr. Günther Scherer

Datum der Verteidigung: 30. Mai 2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Pflanzliche Phospholipasen als Signalenzyme	7
1.1.1	Phospholipase A	8
1.1.2	Phospholipase C	9
1.1.3	Phospholipase D	10
1.2	Pflanzliche G-Proteine	11
1.2.1	Kleine G-Proteine	12
1.2.2	Heterotrimere G-Proteine	12
1.2.3	Unkonventionelle G-Proteine	15
1.3	Aktueller Wissensstand zum Signaltransfer für die Induktion der Phytoalexin-Biosynthese in <i>Eschscholzia californica</i>	16
1.4	Zielstellung der Arbeit	18
2	Material und Methoden	20
2.1	Material und Methoden auf Protein-Ebene	20
2.1.1	Proteinbestimmung durch Absorptionsmessung	20
2.1.2	SDS-Gel-Elektrophorese	20
2.1.3	Proteinfärbung in Polyacrylamid-Gelen	21
2.1.4	Western-Blot-Analyse	22
2.1.5	Proteinfärbung auf PVDF-Membranen mit Fast-Green	23
2.1.6	Proteinbestimmung durch Western-Blot-Analyse	24
2.2	Material und Methoden auf DNA-Ebene	24
2.2.1	Agarose-Gel-Elektrophorese	24
2.2.2	Klonierung und Sequenzierung	25
2.2.2.1	Sequenzierung der scFv-Einketten-Antikörper	26
2.2.2.2	Sequenzierung des G α von <i>E. californica</i> aus der cDNA-Bank	26
2.2.2.3	Sequenzierung der Expressionskassette für das G α -Protein	26
2.2.3	Bakterienstämme (<i>E. coli</i>)	26
2.2.4	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	27
2.2.4.1	Elektroporation	27
2.2.4.2	Hitzeschock-Transformation	27

2.3	Kultivierungstechniken	28
2.3.1	Kultivierung von Bakterien (<i>E. coli</i>)	28
2.3.2	Kultivierung von <i>Eschscholzia californica</i>	28
2.4	Zellfraktionierung	29
2.4.1	Aufschluss und fraktionierende Zentrifugation	29
2.4.2	Anreicherung von Plasmamembran durch Verteilung im wässrigen 2-Phasen-System	30
2.5	Isolierung und Expression eines spezifisch bindenden anti-Gα-scFv	32
2.5.1	Gewinnung des Antigens	32
2.5.1.1	Heterologe Expression und Extraktion eines G α -Fragments	32
2.5.1.2	Reinigung des G α -Fragments	35
2.5.2	Das Phage-Display	35
2.5.3	Expression löslicher scFv in <i>E. coli</i>	37
2.5.3.1	Expression löslicher scFv auf Mikrotiterplatten	37
2.5.3.2	Produktion löslicher scFv im Milliliter-Maßstab	37
2.5.3.3	Extraktion und Reinigung von löslichem scFv aus bakteriellem Kulturüberstand	38
2.5.4	ELISA mit löslichen scFv	39
2.5.5	Expression von anti-G α -scFv in Zellen von <i>Eschscholzia californica</i> ..	40
2.5.5.1	Konstruktion des scFv-Expressionsvektors für pflanzliche Zellen .	40
2.5.5.2	Transformation von Suspensions-Zellkulturen durch Biolistik	41
2.5.5.3	Nachweis der Expression von anti-G α -scFv in Kulturen von <i>E. californica</i>	43
2.5.5.4	Quantitativer Nachweis der scFv-Expression in Kulturen von <i>E. californica</i>	44
2.5.5.5	Reinigung von anti-G α -scFv aus transformierten Zellkulturen von <i>E. californica</i>	44
2.5.6	Alkaloidbildung nach Elicitorbehandlung	45
2.5.6.1	Bestimmung der Alkaloidantwort von Suspensionskulturen	45
2.5.6.2	Quantitative Bestimmung von Alkaloidgehalt und Trockenmasse ..	45
2.5.7	Messung der Phospholipase-A ₂ -Aktivität in Zellsuspensionen	46

2.6	Identifizierung und Expression eines vollständigen Gα-Proteins aus <i>E. californica</i>	47
2.6.1	Herstellung der cDNA-Bank	47
2.6.2	Screening der cDNA-Bank	48
2.6.3	Klonierung und heterologe Expression des G α	51
2.6.4	GTP- γ - ³⁵ S-Bindungstest mit heterolog exprimiertem G α	54
2.6.5	Bindung von PLA ₂ und G α -Protein an Ni-NTA-Agarose.....	55
2.7	Lipidanalyse in Zellen von <i>E. californica</i>.....	57
2.7.1	Dünnschichtchromatografische Untersuchung von Lipidextrakten (HPTLC).....	57
2.7.1.1	Probengewinnung nach Substratzusatz.....	57
2.7.1.2	Dünnschichtchromatografische Trennung von Lipidgemischen	58
2.7.1.3	Quantifizierung ¹⁴ C-markierter Lipide nach dünn- schichtchromatografischer Trennung.....	59
2.7.1.4	Gewinnung ¹⁴ C-markierter Lipide von HPTLC-Platten.....	60
2.7.2	MALDI-TOF-Massenspektrometrische Untersuchung von Lipidextrakten	60
2.7.2.1	Probengewinnung nach Substratzusatz.....	60
2.7.2.2	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	62
2.7.3	Hydrolyse von Phosphatidylcholinen durch PLA ₂ -Verdau.....	62
2.7.4	Quantifizierung freier Fettsäuren in Ganzzellen von <i>E. californica</i> durch GC/MS.....	63
3	Ergebnisse und Diskussion	65
3.1	Die Regulation des Signalzyms PLA₂ auf der Aktivitätsebene: Modulation der Gα-Funktion durch endogene scFv.....	65
3.1.1	Versuchsstrategie.....	65
3.1.2	Etablierung scFv-exprimierender Zelllinien von <i>E. californica</i>	67
3.1.2.1	Phage-Display zur Auffindung von anti-G α -Kurzketten- Antikörpern (scFv)	67
3.1.2.2	Die Gewinnung des Antigens.....	68
3.1.2.3	Selektion und Reinigung eines spezifisch bindenden scFv.....	69
3.1.2.4	Konstruktion eines Expressionsvektors.....	73

3.1.2.5	Transformation von <i>Eschscholzia californica</i> -Zellkulturen.....	76
3.1.3	Charakterisierung der transformierten <i>Eschscholzia</i> -Zelllinien	76
3.1.3.1	Qualitativer und quantitativer Nachweis der scFv-Expression.....	76
3.1.3.2	Bindungsaffinität des in <i>Eschscholzia californica</i> exprimierten scFv zu G α	79
3.1.4	Wirkung des anti-G α -scFv auf den Elicitor-ausgelösten Signaltransfer.....	80
3.1.4.1	Die Elicitierung der Alkaloidantwort in scFv-exprimierenden Zelllinien	80
3.1.4.2	Die Kontrolle der Phospholipase A ₂ -Aktivität in scFv- exprimierenden Zelllinien.....	85
3.1.4.3	Veränderte G α -Konzentration in scFv-exprimierenden Zelllinien ..	86
3.2	Das Gα von <i>Eschscholzia californica</i>	89
3.2.1	Versuchsstrategie.....	89
3.2.2	Herstellung der cDNA-Bank und Screening nach dem G α -Gen	89
3.2.3	Die G α -Sequenz	93
3.2.4	Klonierung und heterologe Expression des G α	95
3.2.5	Bindung von PLA ₂ an heterolog exprimiertes G α	97
3.3	Die Regulation des Signalzyms PLA₂ auf der Produkt- ebene: Die Kontrolle des steady states von LPC	99
3.3.1	Ausgangspunkte.....	99
3.3.2	LPC wird durch Acyltransfer zu PC metabolisiert	101
3.3.3	Lokalisierung der LPC-acylierenden Aktivität.....	104
3.3.4	Qualitativer Vergleich von LPC-Metabolisierung und Phospholipid-Synthese	105
3.3.4.1	Fettsäureverteilung bei der Phosphatidylcholin-Biosynthese.....	106
3.3.4.2	Spezifität der LPC-Reacylierung.....	113
3.3.5	Ausmaß und Limitierung des LPC-Metabolismus.....	116
3.3.6	Der Einfluss von Hefeelicitor auf die Reacylierungsrate	118

4	Zusammenfassung	120
5	Literaturverzeichnis.....	122
6	Abkürzungsverzeichnis	136
7	Abbildungen und Tabellen	139

1 Einleitung

Das zentrale Thema der vorliegenden Arbeit ist ein in Zellen des Kalifornischen Mohns (*Eschscholzia californica* Cham., Papaveraceae) ablaufender Signaltransduktionsprozess, der durch Kontakt der Zelle mit einem Elicitor (Glykoprotein aus Hefe) ausgelöst wird und in die Biosynthese von Benzophenanthridin-Alkaloiden mündet. Diese zelluläre Reaktion dient der Abwehr von Pathogenen, da es sich bei den gebildeten Alkaloiden um wirksame Phytoalexine handelt.

Die sich hinter diesem Phänomen verbergende Signalkaskade wurde in der Vergangenheit schrittweise untersucht, wobei sich die aktive Rolle von pH-shifts als ein besonderes Charakteristikum erwies (Roos et al. 1998, Roos et al. 2006, Viehweger et al. 2006). Die vorliegende Arbeit ist auf eine frühe Etappe des Signalwegs fokussiert, welche durch eine G-Protein-kontrollierte Phospholipase A₂ (PLA₂) dominiert wird. Die durch diese PLA₂ freigesetzten Signalmoleküle werden durch die aktuelle Aktivität des Enzyms kontrolliert, welche damit eine entscheidende Regelgröße für den gesamten Signalweg darstellt.

Zunächst soll ein kurzer Überblick über die bisherigen Erkenntnisse zu Phospholipasen und G-Proteinen in Pflanzen gegeben werden.

1.1 Pflanzliche Phospholipasen als Signalenzyme

Phospholipasen bilden eine umfangreiche Gruppe von Hydrolasen, die an Glycerophospholipiden Esterase-Wirkungen entfalten. Sie sind in allen Organismen anzutreffen und zwar sowohl membrangebunden als auch in Form löslicher Proteine. Sie spielen eine zentrale Rolle für die Bildung und Aufrechterhaltung der Struktur zellulärer Membranen durch die Kontrolle des Ab- und Umbaus der Phospholipide, z.B. während des Wachstums, bei Differenzierungs- und Entwicklungsvorgängen sowie Verletzungen. Darüberhinaus regulieren Sie eine Vielzahl zellulärer Signalwege über die durch ihre Aktivität freigesetzten Signalmoleküle bzw. deren Ausgangsstrukturen, wie Linolensäure, Diacylglycerole, Phosphatidsäuren und Lysolipide.

Glycerophospholipide unterscheiden sich in der Zusammensetzung ihrer mit dem Glycerol-Grundgerüst veresterten Fettsäuren in den Positionen C₁ und C₂ und in ihren hydrophilen Kopfgruppen (Alkohol-Komponente) in Position C₃.

Phospholipasen werden nach dem molekularen Angriffspunkt am Phospholipid in die Typen A₁, A₂, C und D eingeteilt (Abb. 1-1). Von jedem dieser Typen existieren zahlreiche Isoenzyme, die jeweils durch ihre biochemischen Parameter, ihre Lokalisation oder Sequenzmerkmale charakterisiert sind. Ein Beispiel dafür sind die pflanzlichen, sekretorischen PLA₂, die u.a. über ein N-terminales Signalpeptid, eine Ca²⁺-bindende Domäne sowie 12 Cystein-Reste als gemeinsame Merkmale verfügen (Ryu, 2004).

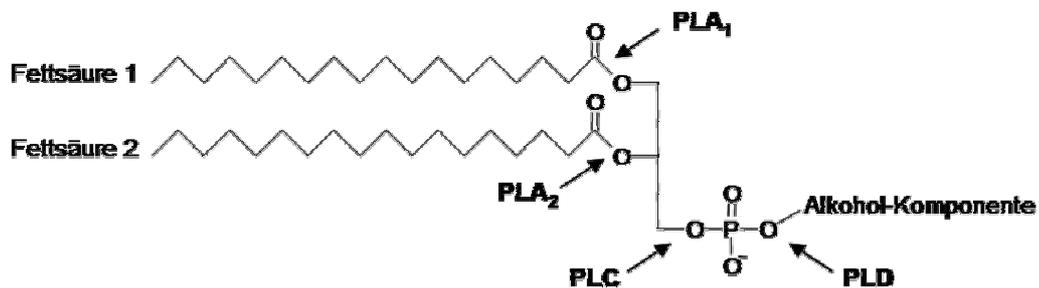


Abb. 1-1: Angriffsorte der Phospholipasen an Phospholipiden

Dargestellt sind die Hydrolyse-Angriffsorte der Phospholipasen A₁, A₂, C und D an ihre Substrate.

1.1.1 Phospholipase A

Phospholipasen des Typs A (PLA) hydrolysieren die Fettsäuren in Position C₁ (PLA₁) bzw. in Position C₂ (PLA₂) und überführen ihre Substrate dabei in Lyso-Glycerophospholipide. Die Aktivität der in Pflanzen relativ seltenen PLA₁ wurde beispielsweise am Tonoplasten von *Acer pseudoplatanus* (Tavernier et al., 1995) und in *Arabidopsis thaliana* in Mikrosomen (Noiriel et al., 2004) und Staubblättern (Ishiguro et al., 2001) nachgewiesen. An diesem Beispiel wurde die Bedeutung der PLA₁ bei der Jasmonat-Synthese und dem damit im Zusammenhang stehenden Wassertransport gezeigt.

In sehr viel größerem Umfang wurden in Pflanzen PLA₂ nachgewiesen und in ihrer physiologischen Bedeutung charakterisiert. PLA₂-Aktivität wurde in Suspensions-Zellkulturen zahlreicher Pflanzenspezies sowie in unterschiedlichen Geweben nachgewiesen. Die Vielfalt der Phospholipasen A₂ kann in lösliche und membrangebundene, Ca²⁺-abhängige und -unabhängige Enzyme eingeteilt werden (Wang, 2001, Scherer, 2002, Ryu, 2004).

Den Spaltprodukten der PLA – Fettsäuren und Lysolipide – wurden in zahlreichen Pflanzenspezies Bedeutung als Botenmoleküle in Signaltransduktionsprozessen nachgewiesen (Munnik et al., 1998, Wang, 2001, Ryu, 2004).

Linolensäure (18:3) ist Ausgangsmolekül der Octadecanoide und damit Schlüsselverbindung aller durch Jasmonsäure gesteuerten Prozesse. Es konnte gezeigt werden, dass Linolen- und Jasmonsäure in Suspensionskulturen von *Eschscholzia californica* nach Elicitorbehandlung akkumulieren (Blechert et al., 1995). Jasmonsäure löst u.a. die Stimulation der Expression von Abwehrgenen aus (Ryan, 2000, Memelink et al., 2001).

Lysophosphatidylcholin (LPC), durch Hydrolyse einer Fettsäure aus Phosphatidylcholin (PC) gebildet, aktiviert pflanzliche Plasmamembran- H^+ -ATPasen (Palmgren et al., 1989) und Proteinkinasen (Martiny-Baron et al., 1989). Am Tonoplasten von *Eschscholzia californica* löst LPC eine Aktivierung von H^+ / Na^+ -Antiportern aus (Viehweger et al. 2002). Dieser Prozess führt zu einer transienten Ansäuerung des Zytosols, welche als intermediäres Signal die Biosynthese von Benzophenanthridin-Alkaloiden induziert (Roos et al., 1999; Viehweger et al., 2006; Roos et al. 2006).

Für zahlreiche Entwicklungs- und Anpassungsprozesse ist die Beteiligung von PLA_2 erforderlich, wobei viele der molekularen Details des Signaltransfers noch unbekannt sind.

Neben der Aktivierung von PLA_2 durch Elicitoren sind auch andere Faktoren zur Stimulation bekannt, wie z.B. hydraulische Reize, die bei Verwundungen von Ganzpflanzen auftreten oder die ebenfalls nach Verwundung beobachtete PLA_2 -Aktivierung durch das pflanzliche Peptid-Hormon Systemin in *Lycopersicon esculentum* (Narváez-Vásquez et al., 1999, Ryan, 2000). Auxin, ein wichtiges pflanzliches Wachstumshormon, stimuliert die Aktivität einer PLA_2 in Zellen von *Petroselinum crispum* und *Glycine max* (Paul et al., 1998). In *Arabidopsis thaliana* wurde für eine sekretorische PLA_2 eine steuernde Funktion beim Zellwachstum gezeigt (Lee et al., 2003).

1.1.2 Phospholipase C

Phospholipase C (PLC) hydrolysiert die Phosphatester-Bindung in Position C_3 des Glycerolgrundgerüsts, wodurch Diacylglycerole und die phosphorylierte Kopfgruppe entstehen. Aufgrund ihrer Substratspezifität werden pflanzliche PLC

in drei Gruppen unterteilt. Die am häufigsten in Pflanzen nachgewiesene PLC ist Phosphoinositid-spezifisch (PI-PLC), weiterhin werden die Phosphoinositid-unspezifische und die Glycosylphosphatidyl-Inositol-spezifische PLC unterschieden (Wang, 2001). In Pflanzen sind sowohl membranassoziierte als auch gelöste PLC bekannt (Munnik et al., 1998). Nachweise von PLC-Aktivitäten in komplexen Zellextrakten sind grundsätzlich schwierig, da hier meist gleichzeitig PLD-Aktivität vorliegt und die Produkte beider Enzyme - Diacylglycerol und Phosphatidsäure - durch Kinasen und Phosphatasen rasch ineinander umgewandelt werden können (Wang, 2001).

Für die Phosphoinositid-spezifische PLC in Pflanzen konnte eine durch Stressfaktoren, wie osmotischer Stress, Licht, Pathogene, aber auch durch Abscisinsäure ausgelöste Aktivierung vielfach nachgewiesen werden. Das dadurch neben Diacylglycerol freigesetzte Inositol-1,4,5-trisphosphat (InP_3) führt zu einer Zunahme der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration. Versuche mit *Nicotiana tabacum* deuten darauf hin, dass die Aktivierung von PI-PLC über ein G-Protein erfolgt. Der veränderte Ca^{2+} -Spiegel beeinflusst über eine Calcium-abhängige Proteinkinase die nukleäre DNA-Synthese (Apone et al., 2003). In *Arabidopsis thaliana* wurde gezeigt, dass die Inhibition der PI-PLC ein Ausbleiben Abscisinsäure-ausgelöster Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration und des Schließens von Spaltöffnungen nach sich zieht (Wang, 2001).

1.1.3 Phospholipase D

Phospholipasen des Typs D (PLD) hydrolysieren die Bindung zwischen Phosphat und Alkohol-Komponente, wodurch Phosphatidsäuren entstehen. In Pflanzen wurden mehrere Isoenzyme der PLD entdeckt, spezifisch für verschiedene Gewebetypen und Formen der Regulation. Es werden drei große PLD-Gruppen unterschieden. Sie haben einen unterschiedlichen Bedarf an Ca^{2+} , sowie verschiedene pH-Optima und Substratspezifitäten bezüglich der Alkohol-Komponenten (Wang, 2001). Die Aktivität von PLD wird durch vielfältige Faktoren, wie Ca^{2+} -Konzentration, Substratzusammensetzung und pH-Änderungen beeinflusst. Für PLD wurde erstmalig die Kontrolle der Aktivität einer Phospholipase durch ein G-Protein gezeigt (Lein et al., 2001, Zhao et al., 2004).

Es konnte in den Ca^{2+} -abhängigen PLD eine N-terminale Ca^{2+} -bindende Domäne identifiziert werden, über die eine Steuerung der enzymatischen Aktivität

durch Konformationsänderung stattfindet (Wang, 2001). In *Arabidopsis thaliana* wurde eine weitere PLD charakterisiert, die nicht Ca^{2+} -abhängig ist, ausschließlich Phosphatidylcholin hydrolysiert und für ihre katalytische Aktivität Phosphatidyl-inositol-bisphosphat benötigt (Qin et al., 2002).

Die PLD-vermittelte Hydrolyse von Phospholipiden spielt eine entscheidende Rolle bei diversen physiologischen Prozessen ebenso wie im stress-abhängigen Signaltransfer von Pflanzen oder Pflanzenzellen nach Einwirkung von Kälte, Trockenheit, Verwundung, Pathogen-Kontakt und bei suboptimalen Nährstoffbedingungen. Hier dürfte der Einfluss von PLD auf Wirkung und Produktion Stress-induzierter Hormone, wie Abscisinsäure, welche eine Aktivierung von PLD hervorruft, eine wesentliche Rolle spielen. Die durch PLD freigesetzte Phosphatidsäure hat nachfolgend u.a. Einfluss auf die Regulierung der Spaltöffnungen (Wang, 2001). Ein weiteres Element dieser Signalkaskade konnte in *Arabidopsis thaliana* gefunden werden. Offenbar bindet hier Phosphatidsäure, Produkt einer PLD, an eine Phosphatase (ABI1), welche ein Negativ-Regulator von Abscisinsäure-Effekten in *Arabidopsis thaliana* ist. Durch diese Bindung wird ABI1 deaktiviert, wodurch Abscisinsäure-Signale in ihrer Wirkung verstärkt werden können (Zhang et al., 2004).

In Zellen von *Nicotiana tabacum* zeigt eine durch Butanol aktivierbare PLD einen wesentlichen Einfluss auf die Reorganisation von Microtubuli. Deshalb stellt sie wahrscheinlich ein wichtiges Steuerungselement von Zellzyklus, Zellteilung und -wachstum dar (Dhonukshe et. al, 2003).

1.2 Pflanzliche G-Proteine

Die in tierischen und pflanzlichen Zellen bekannten Guanosin-Triphosphat-(GTP)-bindenden Proteine, kurz G-Proteine, werden in zwei Gruppen unterteilt: kleine G-Proteine und heterotrimere G-Proteine. Darüberhinaus gibt es „unkonventionelle“ G-Proteine, die aufgrund abweichender Struktur, Größe oder Funktion keiner der beiden genannten Gruppen zugeordnet werden können (Assmann, 2002).

1.2.1 Kleine G-Proteine

Kleine G-Proteine haben Molekularmassen zwischen 21 und 30 kDa und zeigen strukturelle Gemeinsamkeiten, u.a. vier GTP-bindende und eine Effektor-bindende Domäne. Dennoch zeigen sie eine bemerkenswerte Vielfältigkeit in Aufbau und Funktion. Aufgrund struktureller und funktioneller Unterschiede und ihres Vorkommens werden die fünf großen Familien Ras, Rho, Rab, Arf und Ran unterschieden. Die Familien Rab, Arf und Ran wurden in allen Eukaryonten, so auch in Pflanzen gefunden. Das Genom von *Arabidopsis thaliana* enthält 93 für kleine G-Proteine kodierende Sequenzen. Kleine G-Proteine regulieren zahlreiche zelluläre Prozesse, wie Vesikeltransport und Hormonwirkungen. Sie unterscheiden sich von den heterotrimeren G-Proteinen im Mechanismus ihrer Regulation wie auch der Art und Weise der Aktivierung ihrer Targets. Aktiviert durch ein Signal, verwandelt ein „Guanin-Nukleotid-Exchange-Faktor“ (GEF) die inaktive, GDP-bindende Form in die aktive, GTP-bindende. Über die Effektor-Bindedomäne aktiviert die GTP-bindende Form des G-Proteins ein spezifisches Effektor-Protein, woraus bereits erwähnte downstream-Effekte resultieren. Dieser Funktionsmechanismus kleiner G-Proteine ist für alle Organismen, demzufolge auch für Pflanzen, praktisch identisch (Yang, 2002).

1.2.2 Heterotrimere G-Proteine

Heterotrimere G-Proteine setzen sich aus 3 verschiedenen Untereinheiten (α , β und γ) zusammen und sind meist mit Plasmamembran-Rezeptoren assoziiert. In tierischen Organismen ist eine große Vielfalt innerhalb der G-Protein-Untereinheiten bekannt; im menschlichen Genom wurden 23 α -, 5 β - und 12 γ -Untereinheiten identifiziert (Jones et al., 2004).

Die in Säugern vorkommenden $G\alpha$ -Proteine haben eine Größe von 39 bis 46 kDa und enthalten ca. 20 % hoch konservierter Aminosäuren. Sie haben starke strukturelle Übereinstimmungen bei mehreren Domänen, die der GTPase-Aktivität und den dabei erforderlichen Konformationsänderungen dienen. Aufgrund dieser strukturellen Gemeinsamkeiten sind sie eindeutig von kleinen G-Proteinen (s. Kap. 1.2.1) zu unterscheiden (Assmann, 2002).

Die ca. 35 kDa großen β -Untereinheiten sind ebenfalls durch strukturelle Gemeinsamkeiten gekennzeichnet, wogegen sich die γ -Untereinheiten (7 bis 10 kDa)

stärker unterscheiden. G β - und G γ -Proteine sind durch eine nicht-kovalente aber sehr feste strukturelle Interaktion verbunden (Assmann, 2002).

Heterotrimere G-Proteine haben bei verschiedenen Signaltransduktionsprozessen in Pflanzen Kontroll- und Steuerungsfunktionen. Die „klassische“ Signalübertragung wird durch die extrazelluläre Bindung eines Liganden an einen Transmembranrezeptor ausgelöst. Dieser gehört meist zur Gruppe der sog. „G-Protein-gekoppelten Rezeptoren“ (GPCR), welche durch sieben Transmembranhelices gekennzeichnet sind. Die Konformationsänderung aktiviert das G-Protein, indem sie den Austausch von GDP durch GTP an der α -Untereinheit auslöst. Die GTP-bindende G α -Untereinheit dissoziiert nun vom G $\beta\gamma$ -Komplex, bindet an ein Effektor-Protein und löst so die downstream-Effekte aus. Durch die den G-Proteinen eigene GTPase-Aktivität wird GTP hydrolysiert, und das G-Protein geht wieder in seinen inaktiven, GDP-bindenden Zustand über.

Zahlreiche Daten belegen die Beteiligung der G-Proteine an Wachstums- und Entwicklungsprozessen, z.B. für die Kontrolle des Zellzyklus über eine Steuerung der DNA-Synthese, die wahrscheinlich durch die Aktivierung einer PLC vermittelt wird (Apone et al., 2003). Doch auch an der Regulation der Sensitivität gegenüber den Phytohormonen Auxin (Ullah et al., 2003), Gibberelinsäure (Ullah et al., 2002) und Abscisinsäure (Wang et al., 2001, Pandey et al., 2004) bei Prozessen wie dem Zellwachstum, der Zellteilung, der Samenreifung und der Kontrolle des Wasserhaushaltes über die Spaltöffnungen haben heterotrimere G-Proteine direkt oder indirekt Anteil.

Extrazelluläres Calmodulin stimuliert in Pflanzen intrazelluläre Signalkaskaden, die über Veränderungen der zytosolischen Konzentration von Ca²⁺ und H₂O₂ u.a. die Funktion der Spaltöffnungen beeinflussen. Bei dem dafür erforderlichen Signaltransfer vom extrazellulären Bereich in die Zelle hinein spielt die Aktivität eines heterotrimeren G-Proteins offenbar eine tragende Rolle, wie mit Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* gezeigt wurde (Chen et al., 2004).

Heterotrimere G-Proteine sind auch an der Kontrolle der Pathogen-Abwehr beteiligt. Seit einiger Zeit existieren Hinweise darauf, dass sie Steuerungsfunktionen bei der Generierung reaktiver Sauerstoffspezies in Redoxprozessen an der Plasmamembran haben, z.B. nach Behandlung von suspensionskultivierten Zellen von *Lycopersicon esculentum* mit Pilz-Elicitor (Vera-Estrella et al., 1994) oder bei der

Behandlung einzelner Zellen von *Glycine max* mit avirulenten Pseudomonaden (Rajasekhar et al., 1999).

Die Beteiligung heterotrimerer G-Proteine bei der Auslösung der Produktion von Phytoalexinen wurde z.B. in Suspensionskulturen von *Eschscholzia californica* bei Behandlung mit Hefeelicitor (Roos et al., 1999) und von *Daucus carota* bei Behandlung mit Oligogalakturonid-Elicitor (Kurosaki et al., 2001) gezeigt. Innerhalb der großen Vielfalt der Signalwege zur Pathogenabwehr scheinen sowohl G-Protein-abhängige als auch -unabhängige zu existieren. In *Eschscholzia californica* wurde dies für zwei Signalwege zur Alkaloidbildung nachgewiesen (s.u.). Analog dazu wurde bei mutierten, in Suspension kultivierten Zellen von *Oryza sativa*, die über keine funktionstüchtige $G\alpha$ -Untereinheit verfügten, nach Behandlung mit Chitin-Oligosaccharid-Elicitor eine normale Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, Alkalisierung des Kulturmediums und Expression der Gene zur Phytoalexin-Produktion gemessen (Tsukada et al., 2002).

In den letzten Jahren konnten die Funktionsweisen heterotrimerer G-Proteine differenzierter dargestellt werden. Insbesondere die spezifische Rolle der Untereinheiten α , β und γ wurde verstärkt untersucht. In *Arabidopsis thaliana* kommt der $G\beta$ -Untereinheit eine wesentliche Bedeutung bei der Regulation der Auxin-Sensitivität bei Zellwachstum und -teilung zu. Sie ist offenbar ein Negativ-Regulator für Auxin-angestimmte Wachstums- und Entwicklungsprozesse. Mutanten ohne funktionstüchtiges $G\beta$ zeigten Auxin-Hypersensitivität, während sich Pflanzen ohne normale $G\alpha$ -Funktion diesbezüglich nicht vom Wildtyp unterscheiden (Ullah et al., 2003). Aktuelle Versuchsergebnisse belegen, dass bestimmte Elemente der Hypersensitivitätsreaktionen selektiv durch $G\alpha$ - oder $G\beta$ -Untereinheiten gesteuert werden. In Mutanten von *Arabidopsis thaliana* wurde festgestellt, dass das erste von zwei durch Ozon ausgelösten Maxima des „oxidative burst“, welches vornehmlich von den Chloroplasten ausgeht, durch ein Signal des G-Protein-Heterotrimeren oder durch den Komplex der Untereinheiten β und γ gesteuert wird. Das zweite Maximum des „oxidative burst“, bei dem membran-gebundene NADPH-Oxidasen aktiviert werden, erfordert hingegen ausschließlich die Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit (Joo et al., 2005).

Die große Bandbreite pflanzlicher Signalprozesse, welche heterotrimere G-Proteine benötigen, steht im Kontrast zu der Tatsache, dass für Pflanzen jeweils nur eine $G\alpha$ - und eine $G\beta$ -Untereinheit bekannt sind, die jeweils durch ein single-

copy-Gen kodiert werden (Jones et al., 2004, Kato et al., 2004). Im Genom von *Arabidopsis thaliana* konnte bisher auch nur ein potenzielles G-Protein-gebundenes Rezeptor-Protein charakterisiert werden, welches eine starke Sequenzhomologie zu nicht-pflanzlichen G-Protein-Rezeptor-Proteinen aufweist. Die direkte Interaktion dieses Rezeptorproteins zu $G\alpha$ wurde belegt (Pandey et al., 2004). Es kann angenommen werden, dass Pflanzen die erforderliche Selektivität des G-Protein-abhängigen Signaltransfers auf anderem Wege erreichen, als dies bei tierischen Organismen der Fall ist. Bisher sind nur wenige Effektorproteine in Pflanzen bekannt, die durch heterotrimere G-Proteine kontrolliert werden, beispielsweise Kalium- (Wang et al., 2001) und Calciumkanäle (Aharon et al., 1998) und Phospholipasen des Typs A_2 (Roos et al., 1999), D (Lein et al., 2001, Zhao et al., 2004) und C (Assmann, 2002).

Um die Funktion und Bedeutung heterotrimerer G-Proteine in Pflanzen in größerem Umfang zu verstehen, ist es nicht nur erforderlich, weitere Zielproteine zu identifizieren. Auch funktionale Spezifitäten, wie Dynamik, Signaturen und downstream-Effekte der second messenger, die durch eine G-Protein-Zielprotein-Interaktion freigesetzt werden, müssen untersucht werden. Beispielsweise wurde bereits gezeigt, wie eine G-Protein-kontrollierte PLA_2 in suspensionskultivierten Zellen von *Eschscholzia californica* indirekt intrazelluläre Protonenfluxe steuert, die ihrerseits essentiell für die Auslösung der Phytoalexin-Biosynthese nach Kontakt mit Hefeelicitator zu sein scheinen (Viehweger et al., 2006).

1.2.3 Unkonventionelle G-Proteine

Für die heterogene Gruppe der „unkonventionellen“ G-Proteine liegen weit weniger Daten vor als für die bereits beschriebenen Gruppen; das Verständnis für deren Signalfunktionen ist daher noch sehr viel geringer. In *Arabidopsis thaliana* wurden mehrere Gene für „extra-große G-Proteine“, mit Molekulargewichten von 90 bis 100 kDa gefunden. Es konnten teilweise signifikante Homologien zum $G\alpha$ des heterotrimeren G-Proteins und für die Bindung von GTP essentielle Sequenzen festgestellt werden (Assmann, 2002). Einem dieser Proteine, RHD3, konnten wichtige Funktionen bei der Regulation des Zellwachstums, z.B. beim Wachstum der Wurzelhaare und dem Zellwachstum bei der Entwicklung der Wurzelepidermis nachgewiesen werden; *rhd3*-Mutanten zeigten verkleinerte Zellen der Wurzelepidermis mit anormaler Form (Wang et al., 2002).

Als „unkonventionelle“ G-Proteine gelten auch die entwicklungspezifisch regulierten (developmentally regulated G proteins, DRGs). Sie werden in allen Geweben auf mRNA- und Protein-Niveau exprimiert und wurden vorrangig in aktiv wachsenden Geweben, wie Wurzelspitzen oder jungen Sprossachsen gefunden (Devitt et al., 1999).

1.3 Aktueller Wissensstand zum Signaltransfer für die Induktion der Phytoalexin-Biosynthese in *Eschscholzia californica*

In Suspension kultivierte Zellen des Kalifornischen Mohns (*Eschscholzia californica*, Cham., Papaveraceae) reagieren auf den Kontakt mit biotischen und abiotischen Elicitoren mit der verstärkten Biosynthese von Benzophenanthridin-Alkaloiden. Diese Phytoalexine verhindern das Wachstum von phytopathogenen Bakterien und Pilzen aufgrund ihrer Fähigkeit zur Interkalation in doppelsträngige DNA sowie der Interaktion mit verschiedenen SH-Proteinen und erfüllen dadurch eine wichtige Schutzfunktion für die sie produzierende Pflanze. Bisher konnten 18 Benzophenanthridine in *Eschscholzia californica* identifiziert werden. Insgesamt sind ca. 80 dieser Alkaloide bekannt, die vorrangig in Papaveraceen gefunden wurden (Weiss, 2004).

Enzyme der Benzophenanthridin-Biosynthese werden nach Kontakt mit einigen mikrobiellen Elicitoren oder Zusatz von Jasmonat induziert (Dittrich et al., 1991, Viehweger et al., 2006). Die Expression der Enzyme der Benzophenanthridin-Biosynthese ist das Ergebnis mindestens zweier konvergierender Signalwege (Roos et al., 2006).

Niedrige Elicitorkonzentrationen aktivieren eine G-Protein-kontrollierte Phospholipase A₂ (PLA₂). Diese Ca²⁺-unabhängige Enzymaktivität kann in intakten Zellen und Plasmamembranvesikeln gemessen werden und ist durch bekannte PLA₂-Inhibitoren, wie Aristolochiasäure, Chlorpromazin oder ETYA, hemmbar. Wenige Minuten nach dem Anstieg der PLA₂-Aktivität kommt es zu einem Ausstrom von Protonen aus der Vakuole, welcher einen transienten pH-Abfall im Zytoplasma zur Folge hat. Dieser Efflux wird durch Lysophosphatidylcholin (LPC) ausgelöst, ein Produkt der vorausgegangenen, PLA₂-katalysierten Hydrolyse von Phosphatidylcholin. LPC durchläuft nach Elicitorkontakt ein transientes Kon-

zentrationmaximum und aktiviert Na^+/H^+ -Austauscher des Tonoplasten, wie experimentell an in situ-Vakuolen gezeigt wurde. Der resultierende zytosolische pH-Shift ist eine notwendige und hinreichende Bedingung für die Induktion der Alkaloidbiosynthese, wie durch experimentell ausgelöste pH-Shifts nachgewiesen wurde (Viehweger et al., 2006).

*Hobe Elicitor*konzentrationen führen neben den genannten Reaktionen auch zur Bildung von Jasmonat. Dabei ist wahrscheinlich eine weitere, G-Protein-unabhängige PLA_2 beteiligt, welche den zur Jasmonat-Biosynthese erforderlichen Precursor α -Linolensäure liefert. Jasmonat ist seinerseits ein bekannter Induktor der Phytoalexin-Biosynthese in *Eschscholzia* (Mueller et al., 1993, Haider et al., 2000) und anderen Pflanzen (van der Fits et al., 2001). Die Induktion der Benzophanthridin-Biosynthese durch Jasmonat-Zusatz in *Eschscholzia*-Zellen ist nicht von zytoplasmatischen pH-Shifts begleitet (Färber et al., 2003). Neben der Phytoalexinbildung bewirken hohe Elicitorkonzentrationen eine Alkalisierung des Kulturmediums, Verlust von zellulärem K^+ , Polyphenolbildung („browning“) und hypersensitiven Zelltod.

Diese Ergebnisse zeigen, dass:

- *niedrige Konzentrationen* des Elicitors den LPC/pH-Weg aktivieren, welcher eine selektive Auslösung der Alkaloidbildung ermöglicht,
- *hohe Elicitor*konzentrationen zusätzlich den Jasmonat-Weg initiieren, welcher die Auslösung der Alkaloid-Biosynthese und der Hypersensitivitätsreaktion kombiniert.

Die durch niedrige Elicitorkonzentrationen vermittelte Wirkung auf die PLA_2 kommt sehr wahrscheinlich über ein heterotrimeres G-Protein zustande:

- die PLA_2 -Aktivität läßt sich durch niedrige Konzentrationen des G-Protein-Stimulators Mastoparan steigern,
- in der Plasmamembran konnten sowohl die $\text{G}\alpha$ - als auch die $\text{G}\beta$ -Untereinheit immunologisch nachgewiesen werden,
- die Bindung von $\text{GTP}\gamma^{35}\text{S}$ an der Plasmamembran wird durch niedrige Elicitorkonzentrationen erhöht.

Experimente mit transgenen Zelllinien bestätigten die Hinweise auf die Beteiligung von $\text{G}\alpha$ an der Kontrolle des LPC/pH-Signalwegs. Durch eine Antisense- $\text{G}\alpha$ -Transformation erzeugte Zelllinien enthalten signifikant weniger $\text{G}\alpha$ als Zel-

len des Wildtyps. Sie zeigen eine stark reduzierte Alkaloid-Antwort, fehlende Aktivierung der PLA₂ durch niedrige Elicitorkonzentrationen und keinen pH-Shift (Viehweger et al., 2006).

Immunpräzipitations-Experimente mit solubilisierten Plasmamembran-Proteinen führten zur gemeinsamen Ausfällung von G α und PLA₂ nach Behandlung mit anti-G α -Antikörpern (unveröffentlicht) und sprechen damit für das Vorliegen eines Detergens-resistenten Komplexes beider Proteine an der Plasmamembran.

1.4 Zielstellung der Arbeit

Anknüpfend an die oben umrissenen Kenntnisse zum Signaltransfer in Zellen von *E. californica* wurden die Fragestellungen für die vorliegende Arbeit formuliert. Im Zentrum des Interesses stand die Aktivitätskontrolle der Plasmamembran-gebundenen PLA₂. Dieses Enzym spielt eine zentrale Rolle bei der Umsetzung externer Signale in den intrazellulären „second messenger“ LPC und ist deshalb für den durch niedrige Elicitorkonzentrationen ausgelösten Signalweg essentiell. Für die Planung der vorliegenden Arbeit wurde davon ausgegangen, dass die Signalfunktion der PLA₂ auf wenigstens zwei Ebenen kontrolliert wird:

- durch Regulation ihrer Aktivität über ein heterotrimeres G-Protein,
- durch Metabolisierung des „second messenger“ LPC.

Folgende Zielstellungen wurden daraufhin formuliert:

Charakterisierung der Kontrolle durch G α :

- Etablierung und Charakterisierung von Zelllinien, die einen gegen das *Eschscholzia*-G α gerichteten scFv-Antikörper exprimieren,
- Isolierung, Sequenzierung, heterologe Expression und Reinigung des vollständigen G α -Proteins von *Eschscholzia californica*.

Charakterisierung der Kontrolle durch den Metabolismus von LPC:

- Feststellung, ob LPC durch Acylierung mit einer freien Fettsäure wieder in ein Phospholipid umgewandelt (reacyliert) wird,
- Lokalisierung des „Recycling“ des LPC in der Zelle,

- Untersuchung der Spezifität der Reacylierung, durch Vergleich verschiedener LPC,
- Prüfung auf Veränderungen der reacylierenden Aktivität durch Elicitorkontakt,
- Gegenüberstellung der Aktivitäten der LPC-generierenden PLA₂ und der LPC-vernichtenden Reacylierung.

2 Material und Methoden

2.1 Material und Methoden auf Protein-Ebene

2.1.1 Proteinbestimmung durch Absorptionsmessung

Die Quantifizierung der Proteine erfolgte sowohl nach der Methode von Bradford (1976) als auch nach der BCA-Methode („BCA Protein Assay Kit“, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA; Smith, 1985). Zur Messung der Absorptionswerte bei 590 nm bzw. 562 nm diente ein Spektrophotometer („Ultraspec 3000“, Pharmacia Biotech, Freiburg, BRD). Die Grundlage der Quantifizierung bildeten Kalibrierungskurven, die mit dem Standardprotein Rinderserumalbumin erstellt wurden, nachdem es jeweils in demselben Puffer gelöst worden war wie das zu quantifizierende Protein.

2.1.2 SDS-Gel-Elektrophorese

Die Trennung von Proteinen durch Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) erfolgte, leicht modifiziert, nach Laemmli (1970).

Acrylamid-Lösung	■ „Rotiphorese“ (ROTH, Karlsruhe, BRD) ■ 30 % Acrylamid ■ 0,8 % Bisacrylamid
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	■ 0,5 M Tris/HCl ■ 0,4 % (w/v) Na-Dodecylsulfat (SDS)
Trenngelpuffer (pH 8,8)	■ 1,5 M Tris/HCl ■ 0,4 % (w/v) Na-Dodecylsulfat (SDS)
APS-Lösung	■ 10 % Ammoniumpersulfat
TEMED	■ Tetramethylethyldiamin
Probenpuffer (pH 6,8)	■ 16,67 % (v/v) Sammelgelpuffer ■ 2,67 % (w/v) SDS ■ 33,33 % (v/v) Glycerol ■ 0,033 % (w/v) Bromphenolblau ■ 16,67 % (v/v) β -Mercaptoethanol

Laufpuffer (pH 8,3)	<ul style="list-style-type: none"> ■ 50 mM Tris/HCl ■ 380 mM Glycin ■ 0,1 % (w/v) SDS
Proteinmarker	<ul style="list-style-type: none"> ■ peqGOLD Protein-Marker I, (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, BRD) ■ Midrange-Protein-Marker, (Promega, Mannheim, BRD)

Für Trenn- und Sammelgel wurden die Komponenten in Menge und Reihenfolge wie nachfolgend angegeben unter Rühren gut vermischt und sofort verwendet.

Trenngel (12 %)	<ul style="list-style-type: none"> ■ 2,0 ml Rotiphorese (Acryl-/Bisacrylamid) ■ 1,25 ml Trenngelpuffer ■ 1,7 ml Aqua demin. ■ 7,5 µl TEMED ■ 37,5 µl APS
Sammelgel (5 %)	<ul style="list-style-type: none"> ■ 0,31 ml Rotiphorese (Acryl-/Bisacrylamid) ■ 0,5 ml Sammelgelpuffer ■ 1,0 ml Aqua demin. ■ 4,0 µl TEMED ■ 10 µl APS

Die Proben wurden jeweils im Verhältnis 1:2 durch Auf- und Abpipettieren mit Probenpuffer gemischt (10 µl + 10 µl), 10 min bei 95 °C denaturiert (Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg, BRD) und nachfolgend kurz zentrifugiert (Centrifuge 5403, Eppendorf, Hamburg, BRD). Das Gemisch wurde jeweils vollständig in eine Geltasche pipettiert. Die Behandlung der Markerproteine erfolgte analog. Es wurde eine Elektrophoreseapparatur der Firma KEUTZ (Reiskirchen, BRD) verwendet, der Gellauf wurde bei 100 V durchgeführt; die Laufdauer betrug ca. 75 min.

2.1.3 Proteinfärbung in Polyacrylamid-Gelen

Zur Proteinfärbung nach beendeter Elektrophorese wurden die Gele für 30 min auf einer Rundschüttelmaschine (KS 500, Janke & Kunkel IKA Labortechnik,

Staufen, BRD) mit Färbelösung gefärbt. Nachfolgend wurde der Überschuss des Farbstoffs durch Inkubation mit Entfärbelösung entfernt bis die Proteinbanden deutlich sichtbar wurden. Die Gele wurden mit einer Digitalkamera (CAMEDIA E-10, Olympus, Hamburg, BRD) fotografiert.

Färbelösung	<ul style="list-style-type: none"> ■ 10 % (v/v) Essigsäure in 50/50 % (v/v) Methanol/Aqua demin. ■ 0,2 % Coomassie-Brillantblau G 250
Entfärbelösung	<ul style="list-style-type: none"> ■ 10 % (v/v) Essigsäure in 50/50 % (v/v) Methanol/Aqua demin.

2.1.4 Western-Blot-Analyse

Der Transfer der mittels SDS-PAGE getrennten Proteine auf eine Membran erfolgte durch Semi-Dry-Blotting. Dies wurde in einer Blotting-Apparatur mit Graphit-Elektroden (25 x 25 cm) durchgeführt. Der zwischen den beiden Elektroden platzierte Transfer-Stapel setzte sich von oben (Anode) nach unten (Kathode) aus folgenden Schichten zusammen:

- 6 x Whatman®-Papier (0,21 mm, WHATMAN, Dassel, BRD), getränkt in Blotting-Puffer 1,
- 3 x Whatman®-Papier, getränkt in Blotting-Puffer 2,
- PVDF-Membran (Amersham Hybond™-P, GE-Healthcare, München, BRD), getränkt in Blotting-Puffer 2,
- SDS-Gel, gewaschen in Blotting-Puffer 3,
- 9 x Whatman®-Papier, getränkt in Blotting-Puffer 3.

Blotting-Puffer 1	0,3 M Tris.Cl, pH 10,4, 20 % MeOH
Blotting-Puffer 2	25 mM Tris.Cl, pH 10,4, 20 % MeOH
Blotting-Puffer 3	Puffer 2 + 40 mM Aminocapronsäure, 0,01 % SDS

Whatman®-Papiere und PVDF-Membran wurden auf Gelgröße geschnitten. Die Stromstärke betrug 0,57 mA/cm² Gelfläche. Der Transfer dauerte 12 bis 14 Stunden und wurde bei 4-6 °C Umgebungstemperatur durchgeführt.

Die Immunodetektion der Proteine auf der PVDF-Membran wurde mithilfe des WesternBreeze®-Kits (INVITROGEN™, Karlsruhe, BRD) nach Herstellerangaben durchgeführt. Es handelt sich hierbei um die klassische Inkubation einer geblockten Membran mit Erst- und Zweitantikörper. Der Zweitantikörper ist ein Anti-Maus-Alkalische-Phosphatase-Konjugat, welches CDP-Star®-Chemilumineszenz-Substrat umsetzt. Das Chemilumineszenz-Signal wird durch einen aufgelegten Film (Hyperfilm™ECL™, AMERSHAM, GE-Healthcare, München, BRD) erfasst. Die Expositionszeiten betragen 5-20 min.

Abweichend davon wurde im Fall der Detektion des pflanzlichen G α ein Erstantikörper aus Kaninchen eingesetzt, weshalb als Zweitantikörper ein Anti-Kaninchen-HRP-Konjugat (SIGMA-ALDRICH, Schnelldorf, BRD) zum Einsatz kam. Dieses wurde 1:2000 in Antikörper-Verdünnungslösung (s. WesternBreeze®-Kit) verdünnt. Nach Inkubation der gewaschenen PVDF-Membran mit ECL-Detektions-Reagenz für HRP (AMERSHAM, GE-Healthcare, München, BRD) wurde analog der Methode mit CDP-Star®-Chemilumineszenz-Substrat verfahren (s.o.).

Die Filmentwicklung wurde in einer Dunkelkammer durchgeführt (Fixierer und Entwickler von KODAK, Stuttgart, BRD).

Verwendete Erstantikörper:

- Anti-c-myc-Antikörper (Überstand der Hybridomazellen 9E10 [*Evan et al., 1985*], Maus, Zellzuchtlabor der Arbeitsgruppe Phytoantikörper, IPK Gatersleben, BRD), Einsatz 1:50 verdünnt,
- Anti-His-tag Monoklonaler Antikörper, Maus, (Novagen, EMD Biosciences, Schwalbach, BRD), Einsatz 1:1500 verdünnt,
- w6-Antikörper (gegen rekombinantes G α 1-C-terminales Peptid, P. Millner, University of Leeds, UK), Einsatz 1:300 verdünnt.

2.1.5 Proteinfärbung auf PVDF-Membranen mit Fast-Green

Falls nach dem Elektrotransfer eine Protein-Färbung auf der PVDF-Membran durchgeführt werden sollte, wurde diese für 2 min unter leichter Bewegung in 0,1 %igem Fast Green, gelöst in 1 %iger Essigsäure, inkubiert.

Anschließend erfolgte die Entfärbung der Membran in PBS bis die Protein-Banden deutlich sichtbar waren.

Zur vollständigen Entfärbung der Membran wurde diese für 5 min in 0,2 M NaOH unter leichter Bewegung inkubiert, die Membran anschließend 2 x 5 min in PBS gewaschen.

PBS	8 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , 150 mM NaCl, pH 7,5
-----	--

2.1.6 Proteinbestimmung durch Western-Blot-Analyse

Die Quantifizierung von immunodetektierten Proteinen auf Western-Blots erfolgte durch Vergleich mit definierten Mengen von Referenz-Proteinen ähnlicher Affinität zum Erstantikörper. Die Proteinlösungen wurden auf ein SDS-Acrylamid-Gel gegeben (s. Kap. 2.1.2) und nach dem Lauf auf PVDF-Membran geblottet. Die Membran wurde anschließend mit Erst- und Zweitantikörper inkubiert (s. Kap. 2.1.4) und entwickelt. Die resultierende Banden-Intensität der Verdünnungsreihen von Proben- und Referenzprotein wurde durch digitale Bildanalyse (OPTIMAS^R 6.2, Media Cybernetics, Silver Spring, USA) ermittelt, die Probenkonzentration anhand der Referenz-Schwärzung errechnet.

2.2 Material und Methoden auf DNA-Ebene

2.2.1 Agarose-Gel-Elektrophorese

Agarose für die Gel-Elektrophorese (SERVA, Heidelberg, BRD) wurde in 1xTBE-Puffer unter Aufkochen und Rühren gelöst (1%ige Agarose). Nach Abkühlen auf 50-60 °C wurden unter Rühren 2,5 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (50 µg/ml) zugesetzt und das Gel danach ausgegossen. Nach dem Erkalten wurde der Kamm entfernt und die Elektrophorese-Kammer mit 1xTBE-Puffer gefüllt, bis das Gel mit Puffer bedeckt war. Bei Verwendung kleiner Geltaschen wurden je Probe 5 µl DNA-Agarose-Gelpuffer mit variablen Volumina DNA-Lösung (1-10 µl) durch Auf- und Abpipettieren gemischt und in die Tasche gegeben. Als qualitative und quantitative DNA-Referenz diente der SmartLadder (EUROGENTEC, Seraing, Belgien). Der Gellauf wurde bei 120 V durchgeführt und dauerte ca. 45 min. Es wurde eine Mini-Elektrophorese-Kammer der Firma

Roth (Karlsruhe, BRD) verwendet. Die Gele konnten durch den Ethidiumbromid-Zusatz anschließend auf einem UV-Tisch ausgewertet und mit einer Digitalkamera (CAMEDIA E-10, Olympus, Hamburg, BRD) fotografiert werden.

1 x TBE-Puffer	89 mM Tris-Base, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA(2Na)
DNA-Agarose-Gel-Puffer	2,1 ml: 1 ml 10 x TBE, 0,5 ml Aqua demin., 0,5 ml Glycerol, 100 µl 0,2 % Bromphenolblau-Lsg.

2.2.2 Klonierung und Sequenzierung

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Standardmethoden zur Klonierung wie Plasmidisolierung, Restriktionsspaltungen, Agarose-Gel-Elektrophorese, Ligation sowie Anzucht und Vermehrung von Bakterien wurden wie bei Sambrook et al. (1989) beschrieben durchgeführt. Detaillierte Angaben hierzu sind in den entsprechenden Kapiteln zu finden. Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen wurde mit dem „Qiagen Plasmid Mini-, Midi oder Maxi Kit“ (QIAGEN, Hilden, BRD) entsprechend der Herstellerangaben isoliert.

Zur Quantifizierung von Plasmid-DNA oder PCR-Produkten wurde ein Ethidiumbromid-Agarose-Gel angefertigt (Kap. 2.2.1), auf dem sowohl die zu quantifizierende Probe in mehreren Verdünnungsstufen als auch ein DNA-Standard zur qualitativen und quantitativen DNA-Bestimmung (SmartLadder, EUROGEN-TEC, Seraing, Belgien) aufgetragen wurde.

Die Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem „QIAquick Gel Extraktion Kit“ (QIAGEN, Hilden, BRD).

Zur Transformation der verwendeten *E.-coli*-Stämme wurden, wie jeweils angegeben, die Elektroporation bzw. die Hitzeschock-Transformation eingesetzt.

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte nach Sanger et al. (1977) und wurde von der MWG Biotech AG (Ebersbach, BRD) durchgeführt. Zur Sequenzanalyse dienten das PC-Programm „Lasergene“ (DNASTAR Inc.) und diverse Online-Tools (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

2.2.2.1 Sequenzierung der scFv-Einketten-Antikörper

Zur Sequenzierung der scFv-DNA-Sequenzen im Phagemid-Vektor pIT1 wurden folgende Primer verwendet:

LMB 3 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'
Phenseq 5'-CTA TGC GGC CCC ATT CA-3'

2.2.2.2 Sequenzierung des G α von *E. californica* aus der cDNA-Bank

Die zu sequenzierenden cDNAs lagen in dem Eingangsvektor pDONRTM 222 vor, weshalb zur Erstsequenzierung die vom Hersteller des CloneMinerTM cDNA Library Construction Kit (INVITROGENTM, Karlsruhe, BRD) empfohlenen Primer verwendet wurden:

M13 forward 5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'
M13 reverse 5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3'

Die Termini der G α -Sequenz konnten durch Vergleich mit anderen, bereits bekannten G α -Sequenzen, wie beispielsweise von *Arabidopsis thaliana* und *Lotus japonicus*, ermittelt werden. Im Zuge der ersten Sequenzierung konnte ein zentraler Teil der Sequenz (78 Basen) nicht eindeutig ermittelt werden, weshalb eine weitere Sequenzanalyse mit selbst gewählten, G α -internen Primern (GalphaFor/GalphaRev) erforderlich war:

GalphaFor 5'-GGT TTT GAT GAT GCC GAA CT-3'
GalphaRev 5'-CTC AAA ACA TGG CTG CTT CA-3'

2.2.2.3 Sequenzierung der Expressionskassette für das G α -Protein

Zur Sequenzierung der PCR-amplifizierten und in den Expressionsvektor pET23a klonierten Volllänge-G α -DNA wurden folgende Primer verwendet:

T7 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
T7 term 5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3'

2.2.3 Bakterienstämme (*E. coli*)

BL 21 (DE3, pLysS) F⁻, *ompT*, *hsdSB* (*rB*⁻, *mB*⁻), *dcm*, *gal*, λ (DE3), pLysS, Cm^r, (Promega, Mannheim, BRD)

ElectroMAX™ DH10B™ T1

F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-bsdRMS-mcrBC*) *f80lacZΔM15* Δ*lacX74* *deoR* *recA1*
endA1 *ara* Δ139 Δ(*ara,leu*)7697 *galU* *galK* λ- *rpsL* *nupG* *tonA*
 (Invitrogen, Karlsruhe, BRD; Manual „CloneMiner™ cDNA Library
 Construction Kit“)

HB2151 K12, *ara*, Δ(*lac-pro*), *thi*/F'*proA+B+*, *lacI^sZΔM15*
 (Hoogenboom et al., 1991)

TG1 K12, Δ(*lac-pro*), *supE*, *thi*, *bsdD5*/F'*traD36, proA+B+*, *lacI^s*, *lacZΔM15*
 (Hoogenboom et al., 1991)

XL1-Blue *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *hsdR17* *supE44* *relA1* *lac* [F'*proAB*
lacI^sZΔM15Tn10 (Tet^r)] (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

2.2.4 Transformation von *Escherichia coli*

2.2.4.1 Elektroporation

40 µl einer Suspension kompetenter *E. coli*-Zellen wurden auf Eis mit ca. 300 ng der zu transferierenden DNA versetzt und in eine eisgekühlte 2-mm-Gap-Küvette gegeben. Die Elektroporation erfolgte mittels eines „BTX Electro Cell Manipulator 600“ (BTX Instrument Division, Harvard Apparatus, Inc., Holliston, MA, USA; V: 2,45 kV; T: 2,5 kV/Resistance; R: 129 Ohm). Nach Zusatz von 1 ml SOC-Medium erfolgte eine Inkubation für 1 h bei 37 °C.

2.2.4.2 Hitzeschock-Transformation

100 µl einer Suspension kompetenter *E.-coli*-Zellen wurden auf Eis mit ca. 750 ng der zu transferierenden DNA durch Auf- und Ab-Pipettieren vermischt und für 20 min eisgekühlt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 1,5 min bei 42 °C, gefolgt von weiteren 10 min auf Eis. Nach Zusatz von 0,5 ml SOC-Medium erfolgte eine Inkubation für 1 h bei 37 °C.

2.3 Kultivierungstechniken

2.3.1 Kultivierung von Bakterien (*E. coli*)

Die Kultivierung von Bakterienzellen in Suspension erfolgte in den jeweils in den Kapiteln angegebenen Medien. Das Kulturvolumen betrug 2 bis 250 ml, die verwendeten Glasgefäße (Kolben) verfügten über das 4- bis 5-fache Volumen. Kultiviert wurde, falls nicht anders angegeben, für ca. 16 h bei 37 °C auf einem Rundschtütler (KS 500, Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen, BRD) bei 160 rpm. Die Kulturmedien wurden jeweils durch Übertragung einiger Milliliter Vorkultur oder mit einer Impföse beimpft.

Bakterienkulturen auf Festmedium wurden durch Ausspateln einiger hundert Mikroliter Bakterienkultur bzw. Bakterien in SOC-Medium nach Transformation, falls nicht anders angegeben, auf vorbereiteten Petrischalen (Ø 8 cm) mit Festmedium beimpft. Die Kultivierung erfolgte für ca. 16 h bei 37 °C.

2.3.2 Kultivierung von *Eschscholzia californica*

Suspendierte Einzelzellen des Kalifornischen Mohns (*Eschscholzia californica* Cham.) wurden in einem modifizierten Nährmedium nach Linsmaier und Skoog [1965] mit den Phytohormonen 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und α -Naphthalenessigsäure (jeweils 1 μ M) kultiviert (LS-Medium). Die Kultivierung erfolgte auf einem Rundschtütler (100 rpm) bei 24 °C und Dauerlicht ($\sim 7 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) in einem 9-/10-Tage-Wachstumszyklus (Wildtyp) oder einem 11-/12-Tage-Wachstumszyklus (anti-G α -Mutanten).

Kalluskulturen, die entweder aus suspendierten Zellen oder Teilen von Ganzpflanzen gewonnen worden waren, wurden auf Nährmedium nach Linsmaier und Skoog (s.o.) kultiviert, welches mit Agarose (1%ig) verfestigt war (Festmedium). Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C und Dauerlicht ($\sim 7 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

Nach jeweils 4- bis 5-wöchiger Kultivierungszeit wurden kleine Bereiche der zuletzt gewachsenen Kallusmasse mit einer sterilen Pinzette entnommen und auf frischem Nährmedium platziert.

2.4 Zellfraktionierung

2.4.1 Aufschluss und fraktionierende Zentrifugation

Zum Aufschließen und zur Gewinnung zellulärer Fraktionen von suspensionskultivierten Zellen wurden diese durch Absaugen mit einer Wasserstrahlpumpe vom Kultivierungsmedium getrennt und das erhaltene Zellpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

40 g eingefrorenen Zellpellets wurden zusammen mit dem doppelten Volumen Trockeneis grob gemörsert und anschließend in einer Zelmühle (ZM1000, Retsch, Haan, BRD) bei 15.000 rpm gemahlen. Das erhaltene Trockeneis-Zellmehl wurde bei Raumtemperatur so lange gerührt, bis das gesamte Trockeneis verdampft war. Nach Zugabe von 100 ml Proteinextraktionspuffer (4 °C) wurde das Gemisch in einem Glashomogenisator behandelt. Diese Stufe der Aufarbeitung wird als „Homogenat“ bezeichnet.

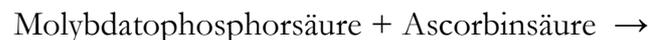
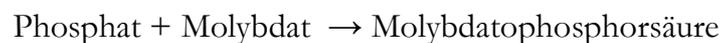
Zur Erzeugung subzellulärer Fraktionen wurde das Homogenat für 10 min bei 4 °C zentrifugiert (500 x g; K23D, MLW Medizintechnik Leipzig, BRD), der resultierende Überstand für 15 min bei 4 °C (15.000 x g; OPTIMA LE-80K, Beckman Coulter, Krefeld, BRD). Eine weitere Zentrifugation dieses Überstandes für 60 min bei 4°C (100.000 x g; OPTIMA LE-80K, Beckman) erbrachte die Fraktionen „100.000-x-g-Überstand“ und ein Pellet, die „mikrosomale Fraktion“. Das Pellet wurde mit Suspensionspuffer abgespült und schließlich durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert (unterschiedliche Volumina). Die Proteinkonzentration wurde im 100.000-x-g-Überstand und in der Suspension der mikrosomalen Fraktion nach Bradford bestimmt. Zum Anreichern von Plasmamembran wurde das Verfahren der „Verteilung im wässrigen 2-Phasen-System mit Saccharose“ angewandt (Dordschbal, 2003; s. a. Kap. 2.4.2).

Proteinextraktions-Puffer	50 mM MOPS, 330 mM Saccharose, 5 mM Na ₂ EDTA, 1 mM PMSF (Zugabe als 100 mM Lsg. in Isopropanol), 5 mM DTE, 5 mM Ascorbinsäure in Aqua demin., pH 7,5 eingestellt mit 10 N KOH
---------------------------	---

Suspensionspuffer	4 mM K ₂ HPO ₄ , 1 mM KH ₂ PO ₄ , 5 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTE, 330 mM Saccharose, pH 7,8
-------------------	--

2.4.2 Anreicherung von Plasmamembran durch Verteilung im wässrigen 2-Phasen-System

Zum Nachweis der Anreicherung von Plasmamembran bei der Verteilung im wässrigen 2-Phasen-System (Dordschbal, 2003) wurde die spezifische, Vanadat-inhibierbare ATPase-Aktivität der mikrosomalen Fraktion und der Plasmamembran-Fraktion nach 2-Phasen-Verteilung bestimmt. Die Vanadat-inhibierbare ATPase gilt als Markerenzym der Plasmamembran (Briskin et al., 1987). Deshalb kann eine Erhöhung der spezifischen Aktivität dieses Enzyms mittels 2-Phasen-Verteilung als Nachweis der Anreicherung plasmamembranärer Strukturen angesehen werden. Zur Bestimmung der Aktivität wurde die Konzentration des durch ATPase aus ATP innerhalb von 10 min freigesetzten Phosphats gemessen. Dem Messverfahren liegen folgende Umsetzungen zugrunde:



Die zur ATPase-Aktivität proportionale Konzentration des reduzierten Molybdatophosphat-Komplexes wurde durch Messung der Absorption bei 820 nm bestimmt.

Zur Durchführung des Versuches wurden jeweils 500 µl der mikrosomalen Fraktion und der Plasmamembran-Fraktion durch Zentrifugation (100.000 x g, 1 h, 4 °C; TL-100, Beckman Coulter, Krefeld, BRD) pelletiert und das Pellet anschließend in jeweils 50 µl ATPase-Waschpuffer resuspendiert. Jeweils 10 µl Probe wurden dann mit 90 µl ATPase-Substrat +/- Vanadat (immer frisch hergestellt) versetzt. Anschließend wurde für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von jeweils 500 µl kalter Trichloressigsäure (10 % w/v) gestoppt, die Reaktionsgefäße zur Proteinfällung 2 h zu 4 °C gestellt. Nach Zentrifugation

(10 min, 8.600 x g; Eppendorf 5403) wurden jeweils 200 µl Überstand mit 1,8 ml ATPase-Farbreagenz versetzt und diese Mischung 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Absorption wurde bei 820 nm („Ultraspec 3000“, Pharmacia Biotech, Freiburg, BRD) gegen phosphatfreien Waschpuffer gemessen, die Phosphatkonzentrationen anhand einer mit Kaliumhydrogenphosphat (KH₂PO₄) erstellten Kalibrierungsgeraden ermittelt.

In Abbildung 2-1 ist das Ergebnis eines typischen Versuchs dargestellt. Die Plasmamembran-Fraktion zeigt gegenüber der mikrosomalen Fraktion eine deutlich erhöhte, Vanadat-sensitive ATPase-Aktivität.

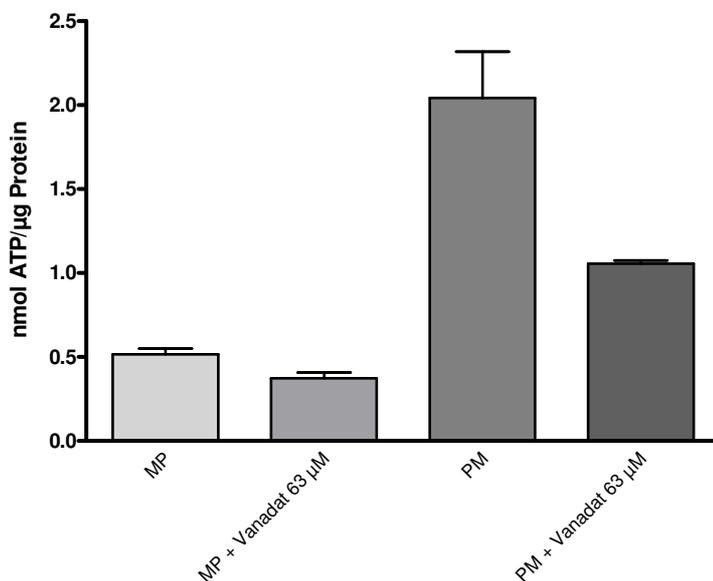


Abb. 2-1: Vanadat-sensitive ATPase-Aktivität vor und nach 2-Phasen-Verteilung

Dargestellt sind die ATP-Umsätze in der mikrosomalen Fraktion (MP) und nach Plasmamembran-Anreicherung (PM) sowohl mit als auch ohne Zusatz von 63 µM Vanadat. Der besonders deutliche Rückgang der ATPase-Aktivität in der Plasmamembran-Fraktion bei Zusatz von Vanadat belegt die Anreicherung dieser Membran aus der mikrosomalen Fraktion durch Verteilung im wässrigen 2-Phasen-System (SD; n=2).

ATPase-Waschpuffer	50 mM Tris/HCl, 250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, pH 7,5
ATPase-Substrat	35 mM Tris/HCl, 5 mM MgSO ₄ , 55 mM KCl, 1 mM Na ₂ MoO ₄ , 1 mM NaN ₃ , 0,05 % (v/v) Triton X-100, 3 mM ATP, +/- 70 µM Na ₃ VO ₄

ATPase-Farbreagenz	1 Teil 3 M H ₂ SO ₄ , 1 Teil 2,5 % (w/v) (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O, 1 Teil 10 % (w/v) Ascorbat, 6 Teile H ₂ O; frisch anzusetzen, Teile in dieser Reihenfolge mischen
--------------------	--

2.5 Isolierung und Expression eines spezifisch bindenden anti-G α -scFv

2.5.1 Gewinnung des Antigens

2.5.1.1 Heterologe Expression und Extraktion eines G α -Fragments

Die durch PCR gewonnene DNA, die für ein Fragment des *E.-californica*-G α kodierte, (Abb. 2-2) wurde in den Expressionsvektor pET23a (Novagen, EMD Biosciences, Schwalbach, BRD) ligiert (T4-DNA-Ligase, INVITROGEN™, Karlsruhe, BRD). Dieser war zuvor durch die Restriktionsendonukleasen *Eco*RI und *Xho*I (INVITROGEN™, Karlsruhe, BRD) linearisiert worden. Der dazu erforderliche Restriktionsverdau erfolgte mit beiden Restriktionsendonukleasen gleichzeitig, da ein Reaktionspuffer zur Verfügung stand, welcher beiden Restriktasen maximale Aktivität ermöglichte. Der Restriktionsansatz war wie nachfolgend angegeben zusammengesetzt:

- 1 μ l DNA-Lsg. (ca. 100 ng/ μ l pET23a-DNA),
- 1 μ l REact®-2-Puffer (Invitrogen, Karlsruhe, BRD),
- 1 μ l *Eco*RI (Invitrogen, Karlsruhe, BRD),
- 1 μ l *Xho*I (Invitrogen, Karlsruhe, BRD),
- 6 μ l H₂O.

Es folgten eine einstündige Inkubation in Ruhe bei 37 °C und die Trennung der verdauten DNA-Bestandteile mithilfe eines Ethidiumbromid-Agarose-Gels.

Die Ligation der DNA des G α -Fragments in den linearisierten Vektor erfolgte in einem Ansatz, der wie nachfolgend angegeben zusammengesetzt war:

- 1 μ l Fragment-DNA-Lsg. (ca. 50 ng/ μ l),
- 1 μ l Plasmid-DNA-Lsg. (ca. 100 ng/ μ l),
- 1,3 μ l T4-DNA-Ligase (Invitrogen, Karlsruhe, BRD),

37 °C bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,5 kultiviert. Anschließend folgten die Induktion der Proteinexpression durch Zusatz von IPTG (resultierende Konz.: 0,5 μ M) und die weitere Kultivierung für 3 h bei 37 °C. Nach Zentrifugation der Kultur (2.600 x g, 10 min, 4 °C) wurde das Pellet in 15 ml eisgekühltem Bindepuffer aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das unter Schütteln aufgetaute, resuspendierte Bakterienpellet wurde auf Eis mithilfe einer Ultraschallsonotrode (Dauer: 6 min; Power: 85 %; Cycle: 50 %; Elektronik UW70, Bandelin, Berlin, BRD) aufgeschlossen. Die Suspension sah nach dem Aufschließen gelb-opaleszent aus. Sie wurde anschließend zentrifugiert (16.500 x g, 30 min, 4 °C; OPTIMA LE-80K, Beckman Coulter, Krefeld, BRD). Das exprimierte Protein war unlöslich, wie durch Western-Blot-Analyse von Pellet und Überstand festgestellt wurde. Hierbei kam ein Anti-T7-Antikörper (NOVAGEN, Merck, Darmstadt, BRD) zum Einsatz, da das Protein aufgrund seiner Expression mit dem Vektor pET23a (NOVAGEN, Merck, Darmstadt, BRD) über einen N-terminalen T7-Tag verfügt. Das Protein-haltige Pellet wurde zunächst zweimal mit je 15 ml PBS-1% Triton gewaschen, nachfolgend in 15 ml Bindepuffer mit Guanidin-HCl (6 M) aufgenommen und 1 h bei 4 °C unter langsamer Bewegung inkubiert, wodurch sich das G α -Fragment denaturiert lösen konnte. Nach einer weiteren Zentrifugation (16.500 x g, 30 min, 4 °C; OPTIMA LE-80K, Beckman Coulter, Krefeld, BRD) wurde der Überstand zur Reinigung des darin gelösten Proteins verwendet.

LB-Medium	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl in Aqua demin. zu 1l, pH 7,0
LB-Agar	15 g Agar zu 1 Liter LB-Medium
LB/Amp-Medium	LB-Medium mit Ampicillin (100 μ g/ml)
LB/Amp-Agar	LB-Agar mit Ampicillin (100 μ g/ml)
Bindepuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0
PBS-1% Triton	8 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , 150 mM NaCl, pH 7,5; 1% Triton

2.5.1.2 Reinigung des G α -Fragments

Proteine, die mithilfe des Vektors pET23a exprimiert werden, verfügen über einen C-terminalen His-Tag. Dabei handelt es sich um eine Aneinanderreihung von 6 Histidinresten, die eine starke Bindungsaffinität für Ni-Ionen aufweist. Die in der zur Protein-Reinigung verwendeten Ni-NTA-Agarose (QIAGEN, Hilden, BRD) vorhandenen Ni-Ionen sind über Nitrilotriessigsäure (NTA) an der Agarose fixiert. Proteine, die über einen His-Tag verfügen, werden hochspezifisch gebunden. Heterolog exprimierte Proteine können auf diese Weise aus dem Proteingemisch von Kulturhomogenaten isoliert werden.

Eine Polypropylen-Säule (endcapped, Vol. 3 ml; ROTH, Karlsruhe, BRD) wurde mit 0,5 ml Ni-NTA-Agarose befüllt. Dann wurde sie zuerst mit 5 ml Aqua de-min., anschließend mit 5 ml Guanidin-HCl (6 M) und schließlich mit 10 ml Guanidin-HCl (6 M) in Bindepuffer equilibriert. Nun wurde die Lösung des denaturierten Proteins auf die Säule gegeben. Nach dem Waschen der Säule mit 20 ml Guanidin-HCl (6 M) in Waschpuffer konnte das an der Ni-NTA-Agarose gebundene Protein durch Zugabe von 5 ml Guanidin-HCl (6 M) in Elutionspuffer eluiert werden. Das Eluat wurde in 1 Volumenteil Glycerol (100 %ig) aufgenommen, gut durchmischt und bei -20 °C gelagert. Diese Proteinlösung wurde nach Bradford (1976) quantifiziert und für das Phage-Display verwendet.

Bindepuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0
Waschpuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0
Elutionspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0

2.5.2 Das Phage-Display

Das als „Phage-Display“ oder „Panning“ bekannte Verfahren dient der Selektion spezifisch bindender scFv. Die hierzu erforderlichen Arbeiten wurden von J. Schneeberg im Labor von Dr. U. Conrad (IPK Gatersleben, BRD) nach einem dort entwickelten Protokoll (Leps, 2003) durchgeführt, dessen wesentliche Arbeitsschritte im Folgenden aufgeführt werden.

Die für die Immunselektion und das Panning notwendigen Vorbereitungen umfassten die Herstellung eines Helferphagenstocks von 10¹²-10¹³ Phagen/ml (nach Angaben des Herstellers) und das Titern der vorhandenen Phagenbibliotheken. Für den Helferphagenstock wurden M13K07-Helferphagen (Pharmacia Biotech,

GE-Healthcare, München, BRD) verwendet. Nach der Herstellung eines der quantitativen Vorraussetzung von mindestens 10^{12} Phagen/ml entsprechenden Helferphagenstocks wurden die Phagenbibliotheken A und B („Human single framework scFv libraries“, MRC Cambridge, De Wildt et al., 2000) separat kultiviert und getitert. Das Titern der Phagenbibliotheken erfolgte nach Angaben im Protokoll des Herstellers (MRC Cambridge, UK).

Die Immunselektion beginnt mit dem ersten Panning der Bibliotheken. Dafür wurde eine 96-well-Maxi-Sorb-Platte (Nunc, Wiesbaden, BRD) mit je 100 μ l des Antigens (G α -Fragment in Beschichtungspuffer) je Vertiefung beschichtet. Nach diversen Waschschrritten und Blocken mit BSA wurden in jede beschichtete Vertiefung der Platte 10^{10} - 10^{11} Phagen der beiden Phagenbibliotheken pipettiert. Nach Inkubation und Waschen wurden die an der Platte gebundenen Phagen durch Zugabe von 100 mM Triethylamin eluiert.

Anschließend wurden die Triethylamin-Eluate der Phagenbibliotheken A und B mit den darin enthaltenen abgelösten Phagen vereinigt und zur Vermehrung in eine frische TG1-Kultur (*E. coli*, Suppressor-Linie) gegeben. Zur Bestimmung des Phagentiters wurden Verdünnungsreihen der erhaltenen Bakteriensuspension hergestellt und auf TYE-Agarplatten ausplattiert.

Um weitere Selektionsrunden durchführen zu können, wurde abgenommene Bakteriensuspension aus der vorhergehenden Selektionsrunde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 kultiviert. Anschließend wurden sie mit Helferphagen versetzt, inkubiert, zentrifugiert, das erhaltene Pellet resuspendiert und erneut kultiviert. Nach zahlreichen weiteren Inkubations- und Zentrifugationsvorgängen wurde der Überstand mit den in der ersten Selektionsrunde selektierten, rekombinanten Phagen in die zweite Selektionsrunde übernommen. Durch Wiederholung der beschriebenen Versuchsabfolge können beliebig viele Selektionsrunden zur Isolierung und Anreicherung antigenspezifisch bindender rekombinanter Phagen durchgeführt werden. Zur Auffindung eines gegen das G α -Fragment gerichteten scFv wurde der Vorgang des Pannings dreimal durchgeführt.

Aus Einzelkolonien stammende Phagen wurden zum Nachweis ihrer antigenspezifischen Bindungsaffinität im Phagen-ELISA getestet.

Um lösliche scFv zu exprimieren, wurden HB2151-Zellen (*E. coli*, Non-Suppressor-Linie) durch ausgewählte Phagen infiziert.

TYE-Agar 15 g Agar, 8 g NaCl, 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt in Aqua demin.
zu 1 l

2.5.3 Expression löslicher scFv in *E.coli*

2.5.3.1 Expression löslicher scFv auf Mikrotiterplatten

Für die Expression löslicher scFv wurden die Kavitäten von Mikrotiterplatten (Greiner Bio-One, Frickenhausen, BRD) mit je 100 μ l 2 x TY (+ 1 % Glucose, 100 μ g/ml Ampicillin) befüllt. Jeweils eine Kavität wurde mit einem HB2151-Klon angeimpft. Anschließend wurden die Platten 225 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

Weitere Mikrotiterplatten wurden mit jeweils 175 μ l 2 x TY (+ 0,1 % Glucose, 100 μ g/ml Ampicillin) pro Kavität befüllt. Von den bereits inkubierten Platten wurden jeweils 2 x 2 μ l Kultur aus den Kavitäten entnommen und in zwei Kavitäten der neuen Platten übertragen. Anschließend wurden die neuen Platten 180 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Induktion der scFv-Expression erfolgte durch Zusatz von jeweils 25 μ l 2 x TY (+ 100 μ g/ml Ampicillin, 8 mM IPTG). Die anschließende Inkubation erfolgte über Nacht bei 28 °C unter Schütteln.

Die über Nacht inkubierten HB2151-Zellkultur-Platten wurden zentrifugiert (10 min, 1800 x g) und jeweils 100 μ l scFv-haltiger Überstand in eine neue Mikrotiterplatte gegeben. Dabei wurden die jeweils zusammengehörenden Überstände (für jeden Klon waren 2 Kavitäten angeimpft worden) zu 200 μ l pro Kavität gemischt.

2 x TY 16 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl in Aqua demin. zu 1 l,
pH 7,0

2.5.3.2 Produktion löslicher scFv im Milliliter-Maßstab

Von dem jeweiligen HB2151-Klon wurde eine 2-ml-Vorkultur angeimpft (2 x TY, 1 % Glucose, 100 μ g/ml Ampicillin) und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. 50 ml 2 x TY (+ 0,1 % Glucose, 100 μ g/ml Ampicillin) wurden mithilfe der Vorkultur angeimpft. Nach dreistündiger Inkubation bei 37 °C unter Schütteln wurden 50 μ l IPTG (1 M) zugesetzt und die Inkubation über Nacht bei 30 °C fortgesetzt.

Der nach Zentrifugation (5.000 x g, 4°C, 30 min; 3K12, Sigma Laborzentrifugen, Osterode, BRD) erhaltene, scFv-haltige Kulturüberstand wurde für Western-Blot-Analysen, für ELISAs und zur Reinigung mithilfe einer rProtein-L™-Agarose-Säule (ACTIgen Ltd., Oslo, Norwegen) verwendet.

2 x TY	16 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl in Aqua demin. zu 1l, pH 7,0
--------	---

2.5.3.3 Extraktion und Reinigung von löslichem scFv aus bakteriellem Kulturüberstand

Um einen scFv in erhöhter Quantität und Reinheit zu produzieren, wurde der Überstand einer 250-ml-Kultur der diesen scFv exprimierenden HB2151-Zellen extrahiert. Zunächst erfolgte unter Rühren eine Dialyse des Kulturüberstandes gegen das 20fache Volumen PBS (Dialyseschlauch, Cellulose-Membran; SIGMA-ALDRICH, Schnelldorf, BRD) bei 4 °C über 5 h. Es folgte eine Filtrierung durch ein Sterilfilter (Porendurchmesser: 0,22 µm).

Eine Polypropylen-Säule (endcapped, Vol. 3 ml; ROTH, Karlsruhe, BRD) wurde mit 0,5 ml rProtein-L™-Agarose (ACTIgen Ltd., Oslo, Norwegen) befüllt. Sie wurde mit 10 ml PBS equilibriert und anschließend der scFv-haltige Überstand durch die Säule laufen gelassen. Nach dem Waschen der Säule mit 10 ml PBS wurden gebundene scFv mit 2 ml Citrat-Puffer eluiert. Durch Zusatz von 0,66 ml Tris-Base wurde das Eluat auf pH 7,5 eingestellt.

Die Reinheit des Eluates wurde mittels SDS-PAGE festgestellt. Ein mit Coomassie-Brilliantblau gefärbtes SDS-Gel zeigte eine singuläre Proteinbande mit einer Größe von 27 kDa (Abb. 2-3), wie es für den gereinigten scFv zu erwarten war. Es konnten ca. 150 µg des reinen Anti-Gα-scFv gewonnen werden.

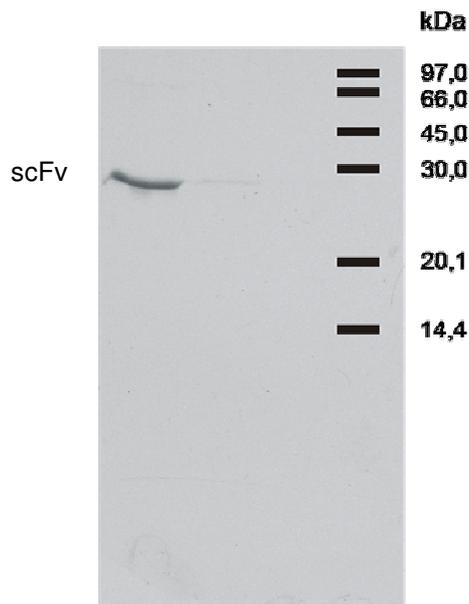


Abb. 2-3: Gereinigter scFv (Coomassie-Färbung)

Über eine rProtein-L™-Agarose-Säule gereinigter, in E.coli exprimierter scFv Nr. 15. Das SDS-Gel wurde mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt. Marker: Midrange-Protein-Marker (Promega, Mannheim, BRD). Die Abbildung zeigt ein Graustufenbild nach Kontrastverstärkung.

Citrat-Puffer	0,1 M Zitronensäure-Monohydrat, pH 2,5 mit NaOH einstellen
PBS	8 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , 150 mM NaCl, pH 7,2
Tris-Base	1 M Tris, pH 8,0 mit HCl einstellen

2.5.4 ELISA mit löslichen scFv

Maxisorb-Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden, BRD) wurden durch Zusatz von 100 µl Antigen-Lösung (in PBS) pro Kavität und Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht mit Antigen beschichtet. Die beschichteten Platten wurden 3 x mit PBS gewaschen und für 2 h mit 200 µl 3 %igem BSA-in-PBS/Kavität bei Raumtemperatur geblockt. Die geblockten Platten wurden 3 x mit PBS gewaschen und anschließend mit 90 µl scFv-Lösung/Kavität in der jeweils angegebenen Verdünnung bzw. Konzentration (in 3 %igem BSA) versetzt. Nach 90-minütiger Inkubation bei 25 °C in Ruhe wurden sie 5 x mit PBS-T gewaschen. In jede Kavität wurden anschließend 100 µl Anti-c-myc-Antikörper (9E10-Antikörper, 1:75) in 3 %igem BSA-in-PBS gegeben. Nach 90-minütiger Inkubation bei 25 °C in Ruhe wurden die Platten 5 x mit PBS-T gewaschen. Pro Kavität wurden 100 µl AP-

anti-mouse-Konjugat (1:2000; SIGMA-ALDRICH, Schnelldorf, BRD) in 3 %igem BSA-in-PBS hinzupipettiert. Nach 60-minütiger Inkubation bei 25 °C in Ruhe wurde 5 x mit PBS-T gewaschen. Nach Zusatz von 100 µl pNPP-Fertigsubstrat (SIGMA-ALDRICH, Schnelldorf, BRD) pro Kavität wurde bei 37 °C in Ruhe inkubiert und die Absorption bei 405 nm nach 20 bis 65 min vermessen (MRX Microplate Reader, Dynatech Laboratories, Chantilly, USA).

PBS	8 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , 150 mM NaCl, pH 7,2
PBS-T	0,1 % Tween 20 in PBS
9E10-Antikörper	gewonnen aus dem Überstand der Hybridomazellen 9E10 (<i>Evan et al., 1985</i>), Zellzuchtlabor der Arbeitsgruppe Phytoantikörper, IPK Gatersleben, BRD

2.5.5 Expression von anti-G α -scFv in Zellen von *Eschscholzia californica*

2.5.5.1 Konstruktion des scFv-Expressionsvektors für pflanzliche Zellen

Der die scFv-Sequenz enthaltende pIT1-Phagemid-Vektor und der Zielvektor pRTRA 7/3 wurden mit den Restriktasen *Nco*I und *Not*I verdaut. Die Restriktionsansätze waren jeweils wie nachfolgend angegeben zusammengesetzt:

- 1 µl DNA-Lsg. (ca. 100 ng/µl),
- 1 µl REact[®]-3-Puffer (Invitrogen, Karlsruhe, BRD),
- 1 µl *Nco*I (Invitrogen, Karlsruhe, BRD),
- 1 µl *Not*I (Invitrogen, Karlsruhe, BRD),
- 6 µl H₂O.

Dem Verdau folgten eine einstündige Inkubation in Ruhe bei 37 °C und die Trennung der DNA-Bestandteile mithilfe eines Ethidiumbromid-Agarose-Gels. Danach wurden das scFv-DNA-Stück und die DNA des geöffneten pRTRA 7/3 aus dem Gel extrahiert. Die Ligation der scFv-DNA in den linearisierten Vektor erfolgte in einem Ansatz mit folgender Zusammensetzung:

- 1 µl scFv-DNA-Lsg. (ca. 50 ng/µl),
- 1 µl Vektor-DNA-Lsg. (ca. 100 ng/µl),
- 1,3 µl T4-DNA-Ligase (Invitrogen, Karlsruhe, BRD),
- 2,7 µl 5 x DNA-Ligase-Puffer (Invitrogen, Karlsruhe, BRD),
- 4 µl H₂O.

Erneut wurde für 1 h in Ruhe bei Raumtemperatur inkubiert. Daran schloss sich eine Inaktivierung der Ligase bei 65 °C für 15 min an. Zur Produktion des pRTRA 7/3 mit scFv-Insert dienten durch Elektroporation transformierte *E.-coli*-Zellen (XL1-Blue), die in LB/amp.-Medium kultiviert wurden.

Durch o.g. Arbeitsschritte war die gewünschte Kasette zur Expression des scFv im pflanzlichen Zytosol erstellt worden. Nun wurde die Kasette in den zur Expression in *E. californica* gewählten Vektor pCB301 eingefügt. Dazu wurden pCB301 und pRTRA 7/3 (mit scFv) jeweils mit dem Restriktionsenzym *Hind*III in einem Ansatz folgender Zusammensetzung verdaut:

- 1 µl DNA-Lsg. (ca. 100 ng/µl)
- 1 µl REact®-2-Puffer (Invitrogen, Karlsruhe, BRD)
- 1 µl *Hind*III (Invitrogen, Karlsruhe, BRD)
- 7 µl H₂O

Bei dem linearisierten Vektor pCB301 folgte nach einstündiger Inkubation in Ruhe bei 37 °C eine Dephosphorylierung. Dazu wurde der *Hind*III-Restriktionsansatz nach o.g. Verdau für 15 min bei 65 °C inaktiviert und ihm 3 µl Alkalische Phosphatase (Shrimp; Promega, Mannheim, BRD) sowie 3 µl Phosphatase-Puffer zugesetzt. Nach Inkubation für 30 min bei 37 °C wurde der Ansatz für 15 min bei 65 °C inaktiviert. Die Trennung der verdauten DNA-Bestandteile erfolgte mithilfe eines Ethidiumbromid enthaltenden Agarose-Gels. Anschließend wurden Expressionskasette und linearisierter Expressionsvektor aus dem Gel extrahiert. Die Integration der Expressionskasette in den linearisierten Plasmid-Vektor erfolgte analog zu oben angeführter Ligation. XL1-Blue-Zellen (*E. coli*) wurden anschließend durch Elektroporation mit dem Ligationsprodukt transformiert und in LB/amp.-Medium kultiviert, um den Expressionsvektor zu produzieren.

LB-Medium	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl in Aqua demin. zu 1 l, pH 7,0
LB/Amp-Medium	LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml)

2.5.5.2 Transformation von Suspensions-Zellkulturen durch Biolistik

Kalli von *E. californica* wurde auf Filterpapierscheiben (Ø 3 cm) kultiviert, welche auf Festmedium platziert waren. Für den biolistischen Gentransfer wurde jeweils

eine mit Kallus belegte Filterpapierscheibe mittig in einer trockenen, sterilen Petrischale platziert. Für das Bombardement (Biolistik) wurde ein PDS-1000/He-System (BioRad, München, BRD) den Anweisungen des Herstellers entsprechend verwendet (Rupture-Disk: 1100 psi, Kallusabstand: 9 cm). Die für das Verfahren erforderliche Goldpartikel-Präparation wurde wie folgt angefertigt: je 15 μl Goldpartikelsuspension 0,6 μm bzw. 1,0 μm (BioRad) wurden gemischt, 2 x mit je 30 μl EtOH (96 %) gewaschen (gevortext), 3 x mit je 100 μl H₂O gewaschen (Ultraschallbad), unter Vortexen 55 μl H₂O und 5 μl Plasmid-DNA in H₂O (Expressionsvektor; 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) zugegeben, 1 min gevortext, 20 μl Spermidin (0,1 M) und 50 μl CaCl₂ (2,5 M) zugegeben, 3 min gevortext, gewaschen in ETOH s.o., aufgenommen in EtOH zu einem Endvolumen von 84 μl . Pro Bombardement wurden 3,5 μl Goldpartikel-Präparation verwendet.

Nach erfolgtem Bombardement wurden die auf dem Filterpapier platzierten Kalli auf das Festmedium zurückgesetzt. Sechs Tage nach dem Gentransfer wurden die Kalluskulturen, zerteilt in kleinere Teilmengen, auf Paromomycin-haltiges Festmedium (Selektionsmedium, beginnend mit 50 μM , sukzessiv gesteigert auf 200 μM = Standardkonzentration) umgesetzt. Nach einem Monat waren erste Anzeichen für Kalluswachstum erkennbar. Nach einem weiteren Monat reichte das nachgewachsene Kallusmaterial aus, um Suspensionskulturen (mit V = 10 ml beginnend) zu etablieren. Insgesamt zeigten 19 von 32 behandelten Kalli ein Wachstum, also erfolgreichen Gentransfer hinsichtlich der Paromomycin-Resistenz.

Nicht biolistisch behandeltes Kallusmaterial war in keinem Fall in der Lage, auf Paromomycin-haltigem Medium zu wachsen (Abb. 2-4).

Um das Volumen der 10-ml-Startkulturen zu verzehnfachen und stabil wachsende Suspensionen zu erhalten, wurden ca. zwei Monate mit 11- bis 12-tägigem Kultivierungsintervall benötigt.

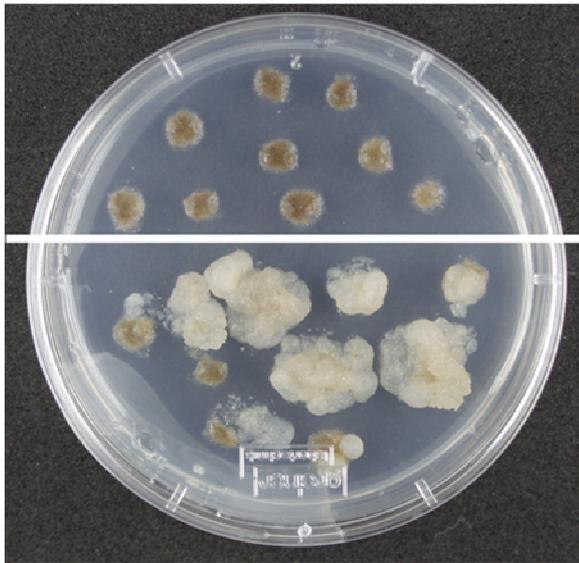


Abb. 2-4: Transformierter Kallus auf Paromomycin-Agar

Sechs Tage nach dem biolistischen Gentransfer wurde das Kallusmaterial auf Paromomycin-haltigen (zunächst 50 μM , sukzessiv gesteigert auf 200 μM) Nähr-Agar gebracht. Nach weiteren 8 Wochen zeigte transformierter Kallus starkes Wachstum (unten). Nicht transformiertes Kallusmaterial war nicht in der Lage, auf Paromomycin-haltigem Nähr-Agar zu wachsen (oben).

2.5.5.3 Nachweis der Expression von anti-G α -scFv in Kulturen von

E. californica

Jeweils 0,2 g Frischmasse von in Suspension kultivierten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit Mörser und Pistill gemahlen. Das Pulver wurde mit 125 μl Probenpuffer versetzt, die Mischung mit einem Mikropistill behandelt und gevortext. Nach 10-minütiger Inkubation bei 95 °C und 25-minütiger Zentrifugation bei 16.000 \times g („centrifuge 5403“, Eppendorf, Hamburg, BRD) wurden jeweils 20 μl Überstand in eine Tasche eines SDS-Polyacrylamidgels gegeben. Die Entwicklung des Gels, das Western-blotting und der spezifische Proteinnachweis erfolgten wie in Kap. 2.1 beschrieben mit anti-c-myc-Antikörper als Erstantikörper.

Probenpuffer (pH 6,8)	16,67 % (v/v) Sammelgelpuffer; 2,67 % (w/v) SDS; 33,33 % (v/v) Glycerol; 0,033 % (w/v) Bromphenolblau; 16,67 % (v/v) β -Mercaptoethanol
-----------------------	---

2.5.5.4 Quantitativer Nachweis der scFv-Expression in Kulturen von

E. californica

Jeweils 0,2 g Frischmasse von in Suspension kultivierten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit Mörser und Pistill gemahlen. Das Pulver wurde mit 130 µl Proteinextraktions-Puffer versetzt, die Mischung mit einem Mikropistill behandelt und gevortext. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 16.000 x g und 4 °C (centrifuge 5403, Eppendorf, Hamburg, BRD) wurde der Proteingehalt (nach Bradford, s. Kap. 2.1.1) im Überstand als Bezugsbasis für die scFv-Konzentration vermessen (gesamtes lösliches Protein, TSP). Definierte Mengen Gesamtprotein wurden in diversen Verdünnungen zu jeweils 10 µl mit je 10 µl Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95 °C inkubiert. Die Gesamtvolumina von je 20 µl wurde in je eine Tasche eines SDS-Polyacrylamidgels gegeben. Die Entwicklung des Gels, das Western-Blotting und der spezifische Proteinachweis erfolgten wie in Kap. 2.1 beschrieben mit anti-c-myc-Antikörper als Erstantikörper.

Proteinextraktions-Puffer	50 mM MOPS, 330 mM Saccharose, 5 mM Na ₂ EDTA, 1 mM PMSF (Zugabe als 100 mM Lsg. in Isopropanol), 5 mM DTE, 5 mM Ascorbinsäure in Aqua demin., pH 7,5 eingestellt mit 10 N KOH
---------------------------	---

2.5.5.5 Reinigung von anti-Gα-scFv aus transformierten Zellkulturen

von *E. californica*

Zur Gewinnung löslicher, in Zellen von *E. californica* exprimierter scFv wurden von der betreffenden Zelllinie ca. 40 g Frischmasse in flüssigem Stickstoff eingefroren und nach Zusatz von Trockeneis mittels Mörser und Pistill sowie einer Zelmühle (RETSCH ZM 2000; 15000 rpm) pulverisiert. Nach Zugabe von 63 ml Proteinextraktionspuffer pH 8,0 wurde die Suspension mit einem Glashomogenisator (Potter) homogenisiert und danach 35 min bei 100.000 x g und 4 °C zentrifugiert (optima LE-80K, Beckman Coulter, Krefeld, BRD). Der Überstand, ca. 80 ml, wurde analog dem in Kap. 2.5.3.3 beschriebenen Verfahren dialysiert, filtriert und durch eine rProtein-LTM-Agarose-Säule (ACTigen Ltd., Oslo, Norwegen) ge-

leitet. Der scFv-Gehalt des neutralisierten Eluates wurde mittels Western-Blot quantifiziert.

Proteinextraktions-Puffer	50 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8,0
	0,1 % Tween 20

2.5.6 Alkaloidbildung nach Elicitorbehandlung

2.5.6.1 Bestimmung der Alkaloidantwort von Suspensionskulturen

Von der zu untersuchenden Suspensionskultur wurden 3 x 5 ml Suspension entnommen, die Zellen mithilfe eines Gaze-Netzes vom Medium getrennt und in 3 separaten Kolben mit je 5 ml Sorbit-Lösung (100 mM) resuspendiert. Der Sorbitlösung war zuvor Hefeelicitor (Präparation nach Schumacher et al., 1987; 1 mg/ml) zum Erreichen der jeweils unter „Ergebnisse und Diskussion“ angegebenen Konzentrationen zugesetzt worden. Die Suspensionen wurden für 30 min unter normalen Kultivierungsbedingungen (s. Kap. 2.3.2) mit dem Elicitor inkubiert. Anschließend wurden sie mit je 5 ml NL-P-75-% gewaschen und in weiteren 5 ml NL-P-75-% resuspendiert. Von diesen Suspensionen wurden je 0,5 ml zur Bestimmung von Alkaloidgehalt und Trockenmasse entnommen, die verbleibende Suspension für 24 Stunden unter normalen Kultivierungsbedingungen inkubiert. Nach 24 Stunden wurden erneut 0,5 ml entnommen, um Vergleichswerte für Alkaloidgehalt und Trockenmasse zu erhalten. Für die Zeitpunkte $t = 0$ und $t = 24$ h wurde für alle Proben der Alkaloidgehalt pro mg Trockenmasse berechnet und der Anstieg über diesen Zeitraum für jede Suspension ermittelt. Je stärker sich der Alkaloidzuwachs einer elicitierten Probe von dem der Kontrolle unterscheidet, umso stärker ist die Alkaloidantwort auf den Elicitorkontakt.

NL-P-75-%	Nährlösung nach Linsmaier und Skoog, s. Kap. 2.3.2, jedoch ohne Phosphat-Quelle, alle anderen Komponenten zu 75 %
-----------	---

2.5.6.2 Quantitative Bestimmung von Alkaloidgehalt und Trockenmasse

0,5 ml einer Zellsuspension wurden mit 0,5 ml HCl 5 %ig in MeOH gemischt und bei 40 °C für 25 min bei 750 rpm inkubiert (Thermomixer 5436, Eppendorf,

Hamburg, BRD). Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 16.000 x g (centrifuge 5403, Eppendorf, Hamburg, BRD) wurde die Fluoreszenz des Überstandes mittels eines Fluoreszenz-Platten-Readers (FL_X800™, BIO-TEK Instruments Inc., Winooski, VT, USA) gegen eine Kalibrierungsgerade von Sanguinarin vermessen (λ_{EX} 485 nm, λ_{EM} 580 nm). Der Alkaloidgehalt einer Zellsuspension konnte so ermittelt werden.

Zur Messung der korrespondierenden Trockenmasse wurde das nach der Zentrifugation erhaltene Pellet mit 0,5 ml EtOH gewaschen und schließlich 2 h bei 80 °C getrocknet. Aus der Massedifferenz des jeweiligen Tube mit und ohne Pellet wurde die Trockenmasse für eine 0,5-ml-Probe errechnet. Die Masse der Tubes wurde mithilfe einer Analysenwaage bestimmt.

2.5.7 Messung der Phospholipase-A₂-Aktivität in Zellsuspensionen

Auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte mit Glasboden (Greiner, Frickenhausen, BRD) wurden in jedes Kompartiment 50 μ l PLA₂-Substratlösung gegeben. Nach 2-minütiger Equilibrierung wurden jeweils 20 μ l Zellsuspension (ca. 50 mg Frischmasse/ml in 100 mM Sorbitol) zugegeben und nach Rütteln der Platte für 2 s im Fluoreszenz-Reader die Fluoreszenz kontinuierlich über einen Zeitraum von 3 min gemessen (λ_{EX} 485 nm, λ_{EM} 580 nm; FL_X800™, BIO-TEK Instruments Inc., Winooski, VT, USA). Nach der ersten Messphase wurde den Zellsuspensionen 5 μ l Elicitor-Lösung (Präparation nach Schumacher et al., 1987) zum Erreichen der entsprechenden Konzentration zugesetzt und eine erneute 3-min-Messperiode gestartet.

Nach Beenden der Phospholipase-Aktivitätsmessung wurde die individuelle Zellmenge in jedem Kompartiment über den DNA-Gehalt quantifiziert. Hierfür wurden 5 μ l Sytox Blue (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) und das Detergenz CTAB zugesetzt. Die resultierenden Konzentrationen waren 50 nM bzw. 0,05 %. Die Sytox-Blue-DNA-Fluoreszenz (λ_{EX} 360 \pm 40 nm, λ_{EM} 460 \pm 40 nm) steht in einem festen Verhältnis zur Anzahl Zellaggregate, welches über die Messung der Zelldichte mittels Zellzähler (Casy 1, Schärfe Systems, Reutlingen, BRD) ermittelt worden war.

Der Anstieg der PLA₂-vermittelten Fluoreszenz wurde auf die Menge der Zellaggregate bezogen und durch nichtlineare Regression ermittelt. Die Elicitor-ausgelöste Aktivierung der PLA₂ wurde aus dem Verhältnis des Fluoreszenzanstieges

vor und nach Elicitorzusatz errechnet. Ein Fluoreszenzanstieg repräsentiert die Hydrolyse des Substrates, was mittels Dünnschichtchromatografie vielfach belegt wurde (Roos et al., 1999).

PLA ₂ -Substratlösung	75 nM BODIPY®-FL-C ₁₁ -PC (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) und 0,01 % CHAPS in 100 mM Sorbitol
----------------------------------	--

2.6 Identifizierung und Expression eines vollständigen G α -Proteins aus *E. californica*

2.6.1 Herstellung der cDNA-Bank

Wichtigste Voraussetzung für die Herstellung einer cDNA-Bank ist die Extraktion reiner und möglichst unbeschädigter mRNA. 4 g frisch abfiltrierter und mit Nährlösung gewaschener Zellen einer Suspensionskultur von *E. californica* wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit Mörser und Pistill (RNAse-frei, hitzebehandelt) zermahlen. Die Gesamt-RNA wurde unter Einsatz von Phenol und durch Fällung mit LiCl extrahiert (de Vries et al., 1993). Der Absorptions-Quotient A_{260}/A_{280} betrug 1,74. Eine visuelle Kontrolle der RNA-Qualität erfolgte mithilfe der Agarose-Gel-Elektrophorese.

Mit dem Oligotex[®]-mRNA-Kit (QIAGEN, Hilden, BRD) wurde aus Gesamt-RNA die mRNA extrahiert, welche für die Herstellung der cDNA-Bank verwendet wurde. Das Trennprinzip beruht auf der hochaffinen Bindung des für mRNA charakteristischen poly-Adenylat-Terminus an poly-Thymidylat-Oligonukleotide, die an Polystyren-Latex-Partikeln fixiert sind.

Für die Herstellung der cDNA-Bank wurde das CloneMiner[™] cDNA Library Construction Kit (INVITROGEN[™], Karlsruhe, BRD) verwendet. Unter den in der Arbeitsanweisung wählbaren Optionen wurden die Vorgehensweise ohne radioaktive Markierung der cDNA und die Größenfraktionierung mittels Säulenchromatografie gewählt. Alle Arbeitsschritte wurden entsprechend der Arbeitsanweisung durchgeführt (zur Übersicht s.a. Abb. 3-18, S. 90).

Wichtige Kriterien für die Qualität einer cDNA-Bank sind der Anteil der Klone, die über ein cDNA-Insert verfügen und die durchschnittliche Insertgröße. Je län-

ger die Inserts sind, umso größer ist die Wahrscheinlichkeit, Klone zu finden, die vollständige Gene tragen.

24 willkürlich ausgewählte Klone der cDNA-Bank wurden in LB/Kan-Medium kultiviert, die Plasmid-DNA extrahiert und mit der Restriktionsendonuklease *BsrGI* in folgendem Ansatz verdaut:

- 1 μ l DNA-Lsg. (ca. 400 ng/ μ l),
- 9 μ l Enzym-Mix.

Es wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und das Enzym anschließend inaktiviert (20 min bei 80 °C). Die cDNA-haltigen Plasmide der Bank verfügen über zwei Restriktionsschnittstellen in den Adapterbereichen des Inserts, welches deshalb bei Verdau mit *BsrGI* herausgeschnitten wird. Durch Trennung der linearisierten Plasmide und der Inserts mithilfe der Agarose-Gel-Elektrophorese wurden die Insertgrößen im Vergleich zu einem DNA-Größenstandard ermittelt.

LB-Medium	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl in Aqua demin. zu 1 l, pH 7,0
LB/Kan-Medium	LB-Medium mit Kanamycin (50 μ g/ml)
Enzym-Mix	12 μ l <i>BsrGI</i> ; 1,2 μ l 100 x BSA; 12 μ l 10 x NEB-Puffer 2 (alle Komponenten von New England BioLabs, Frankfurt a.M., BRD); 82,8 μ l Aqua demin.

2.6.2 Screening der cDNA-Bank

Alle Arbeitsschritte wurden, weitestgehend, nach Sambrock (1989) durchgeführt. Es sollte ein möglichst großes Spektrum der in der cDNA-Bank vorliegenden DNA auf Nylon-Membranen fixiert werden, um die Hybridisierung der radioaktiv markierten DNA-Sonde mit einem komplementären Gen oder Genfragment der cDNA-Bank zu ermöglichen.

Dazu wurden auf 12 Kulturplatten (12 x 12 cm, LB/Kan-Agar) je 55 μ l cDNA-Bank in 400 μ l LB/Kan-Medium ausgespatelt. Nach 14-stündiger Inkubation der Platten bei 37 °C waren diese mit insgesamt ca. 80.000 Klonen gleichmäßig bewachsen und wurden zunächst bei 4 °C aufbewahrt und nachfolgend zur Übertragung der Kolonien auf Nylon-Membranen verwendet.

12 Nylonmembranen (Hybond N⁺; AMERSHAM, GE-Healthcare, München, BRD), jeweils 10 x 10 cm, wurden mit wasserfestem Stift sowie durch Einkerbungen an einer Kante individuell nummeriert und markiert. Jede der Membranen wurde mit ihrer Vorderseite (= Kolonieseite) für 5 min auf eine der auf Raumtemperatur gebrachten cDNA-Bank-Kulturplatten aufgelegt. Während dieser Zeit wurde die individuelle Membranmarkierung mit wasserfestem Stift deckungsgleich auf die Rückseite der Kulturplatte übertragen.

Die mit einer Pinzette verwischungsfrei von den Kulturplatten abgezogenen Membranen wurden jeweils für 3 min, Kolonieseite nach oben, auf einen mit 10 %igem SDS getränkten Filterpapierstapel blasenfrei aufgelegt. Anschließend folgte die gleiche Behandlung auf einem weiteren Filterpapierstapel, der mit Denaturierungslösung getränkt war (5 min). Zuletzt wurden die Membranen auf einem Filterpapierstapel mit Neutralisierungslösung behandelt (5 min). Schließlich wurden die Filter, Kolonieseite oben, für 5 min auf 2 x SSPE zum Schwimmen gebracht und danach durch Schwenken des Gefäßes untergetaucht. Nachdem alle Filter derart behandelt waren, wurden sie der 2-x-SSPE-Lösung entnommen und für 1 h auf trockenem Filterpapier ausgelegt. Zum Fixieren der DNA auf den Nylonmembranen wurden diese 1 h in einem Umluftofen bei 80 °C gebacken und einem UV-Crosslinking (Auto-Modus, Stratalinker, Stratagene, La Jolla, CA, USA) unterzogen. Derart behandelte Filter können, in Aluminiumfolie gewickelt, längere Zeit bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

Die abgezogenen Kulturplatten wurden zur Stabilisierung der Kolonien für 7 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert.

In Vorbereitung der Hybridisierung wurden die trockenen Membranen für 5 min in 2 x SSC überführt, danach 30 min unter Bewegung in 6 x SSC bei Raumtemperatur inkubiert. Die noch auf den Membranen befindlichen Kolonie-Reste wurden vorsichtig mit einem in 6 x SSC getränkten Zellstofftuch abgewischt. Bis zur Vorhybridisierung wurden die Membranen weiterhin in 6 x SSC inkubiert. Zur Vorhybridisierung wurden die Membranen, auf einem Gaze-Netz liegend, eingewickelt, zu je 2 Stück in 6 Hybridisierungsflaschen (Länge 250 mm, NeoLab, Heidelberg, BRD) überführt und 2 h bei 65 °C mit je 25 ml Roti-Hybri-Quick (Roth, Karlsruhe, BRD) rollend inkubiert.

45 µl DNA-Lösung (G α -Fragment kodierende DNA, „Sonden-DNA“, s. Kap. 3.1.2.2; 0,9 ng/µl) in TE-Puffer wurden 5 min bei 95 °C denaturiert, dann auf Eis

gestellt. Nach Zusatz von 5 μl d-³²P-CTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml; AMERSHAM, GE-Healthcare, München, BRD) wurde randomisiert markierte Sonden-DNA mithilfe des Rediprime-II-Kits (AMERSHAM) entsprechend der Arbeitsanweisung des Herstellers synthetisiert. Mittels Größenausschluss-Chromatografie wurde die markierte DNA von Nukleotiden getrennt. Die hochaktive Fraktion (ca. 570 μl , Verfolgung per Geigerzähler) mit kurzer Retentionszeit wurde für die Hybridisierung eingesetzt.

Die Hybridisierungsflaschen wurden mit je 25 ml Roti-Hybri-Quick (Roth) befüllt, je 95 μl markierter DNA (s.o.) und 10 μl reiner Plasmid-DNA (pET 23a, 500 ng/ μl) wurden nach deren Denaturierung (5 min, 95 °C) zugesetzt. Es folgte eine Inkubation bei 65 °C (rollend, über Nacht) zur Hybridisierung.

Die Hybridisierungslösung wurde aus den Flaschen entfernt und bei -20 °C für weitere Hybridisierungszyklen aufbewahrt. Alle Flaschen wurden zur Hälfte mit Waschlösung 1 (65 °C) befüllt und 5 min bei 65 °C rollend inkubiert. Mit frischer Waschlösung 1 (65 °C) wurde ein weiteres Mal befüllt, anschließend für 90 min inkubiert.

Die Membranen wurden den Hybridisierungsflaschen entnommen und zu je 6 Stück in Wannen überführt, die mit Waschlösung 2 (65 °C) befüllt waren. Es folgte eine 1-stündige Waschung bei 65 °C in einem Wasserbad bei langsamer Bewegung. Dieser Waschschrift wurde zweimal für 45 min, zunächst mit Waschlösung 2, anschließend mit Waschlösung 3, wiederholt.

Das Hybridisierungsergebnis wurde durch Autoradiografie erzeugt. Die Membranen wurden dafür leicht getrocknet (nicht ausgetrocknet) und zwischen 2 Lagen Klarsichtfolie (Saran-Wrap) in Fotokassetten fest fixiert (Kolonieseite oben). Nach Auflegen des Films (Hyperfilm™ECL™, AMERSHAM GE-Healthcare, München, BRD) und des Enhancer-Films (Kodak™ BioMax™ MS Intensifying Screen; KODAK, Stuttgart, BRD) wurden die Kassetten bei -80 °C aufbewahrt. Der Film muss reproduzierbar aufgelegt werden, damit nach der Entwicklung deckungsgleiches Auflegen gewährleistet werden kann, z.B. durch Anbringung von Lumineszenzmarkierungen in der Kassette. Die Expositionszeit betrug 17 Stunden. Anschließend wurden die Filme entwickelt (Fixierer und Entwickler von KODAK, Stuttgart, BRD). Nach der Entwicklung wurden die Filme deckungsgleich erneut in die Kassetten eingelegt, um die spezifischen Membranmarkierungen auf die Filme zu übertragen. Durch Auflegen der Kulturplatten auf die mit

den Markierungen versehenen Filme konnten die Areale bzw. Spots, die ein positives Hybridisierungssignal verursacht hatten, identifiziert und mittels Pipettenspitze ausgestochen werden.

Die potentiell positiven Bakterien-Proben, die von den Kulturplatten abgenommen worden waren, wurden jeweils separat auf LB/Kan-Agar ausgespatelt und kultiviert. Um potentiell positive Signale zu bestätigen und mit Sicherheit monoklonale Kulturen zu erhalten, wurden alle Arbeitsschritte der Kultivierung, des Übertragens und Fixierens der DNA auf Nylon-Membran, die Hybridisierung (hier wurde die bereits benutzte Hybridisierungslösung mit markierter DNA-Sonde wiederverwendet), die Waschung und das Entwickeln zweifach wiederholt. Durch Plasmid-Sequenzierung der auch im dritten Durchgang positiven Klone wurde das Ergebnis überprüft.

LB-Medium	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl in Aqua demin. zu 1 l, pH 7,0
LB-Agar	15 g Agar zu 1 l LB-Medium
LB/Kan-Medium	LB-Medium mit Kanamycin (50 µg/ml)
LB/Kan-Agar	LB-Agar mit Kanamycin (50 µg/ml)
Denaturierungslösung	1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH
Neutralisierungslösung	0,5 M Tris/HCl, 1,5 M NaCl, pH 7,4
20 x SSPE	3 M NaCl, 0,2 M NaH ₂ PO ₄ , 0,02 M EDTA, pH 7,4 mit 10 N NaOH einstellen
20 x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0 mit 14 N HCl einstellen
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA
Waschlösung 1	2 x SSC, 0,1 % SDS (m/v)
Waschlösung 2	1 x SSC, 0,1 % SDS (m/v)
Waschlösung 3	0,1 x SSC, 0,1 % SDS (m/v)

2.6.3 Klonierung und heterologe Expression des G α

Die gesamte DNA-Sequenz des G α wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Als Template diente das aus der cDNA-Bank selektierte

Plasmid, dessen Insert die vollständige Sequenz enthielt. Um die Klonierung der amplifizierten DNA in einen Expressionsvektor zu ermöglichen, wurden die PCR-Primer derart gewählt, dass im PCR-Produkt proximal zum N-Terminus eine *EcoRI*- und proximal zum C-Terminus eine *XhoI*-Restriktionsschnittstelle vorlag. Folgende Primer wurden zur PCR-Amplifizierung der G α -DNA eingesetzt:

5'-Primer 5'-GAC GAA TTC ATG GGC TCA CTC TGC-3'
EcoRI N-Terminus

3'-Primer 5'-CTG CTC GAG TAA TAG ACC TGC TTC GA-3'
XhoI C-Terminus

Der PCR-Ansatz (50 μ l) war wie folgt zusammengesetzt:

- 5 μ l 10 x Taq-Puffer (Promega, Mannheim, BRD),
- 1,8 μ l MgCl₂ (25 mM),
- 0,6 μ l dNTP-Mix (10 mM, Invitrogen, Karlsruhe, BRD),
- 2 μ l je Primer (40 pmol), s.o. (Operon, Huntsville, AL, USA),
- 0,25 μ l Taq-DNA-Polymerase (Promega, Mannheim, BRD),
- 1 μ l Template-DNA (25 ng),
- 37,4 μ l H₂O.

Die PCR wurde in einem Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, BRD) mit folgendem Programm durchgeführt:

1 x	Denaturierung	95 °C 90 Sek.
25 x	1. Denaturierung	95 °C 30 Sek.
	2. Annealing	37 °C 30 Sek.
	3. Elongation	72 °C 120 Sek.
1 x	Elongation	72 °C 300 Sek.

Es wurde nur ein PCR-Produkt im erwarteten Größenbereich von ca. 1170 Basenpaaren erhalten. Dieses Produkt wurde aus dem Gel extrahiert, mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *XhoI* (INVITROGEN™, Karlsruhe, BRD) verdaut und in den Expressionsvektor pET23a (Novagen, EMD Biosciences, Schwalbach, BRD) ligiert (analog Kap. 2.5.1.1; s.a. Abb. 2-5). Zur Kontrolle von PCR und Ligationsergebnis wurde die Plasmid-DNA sequenziert.

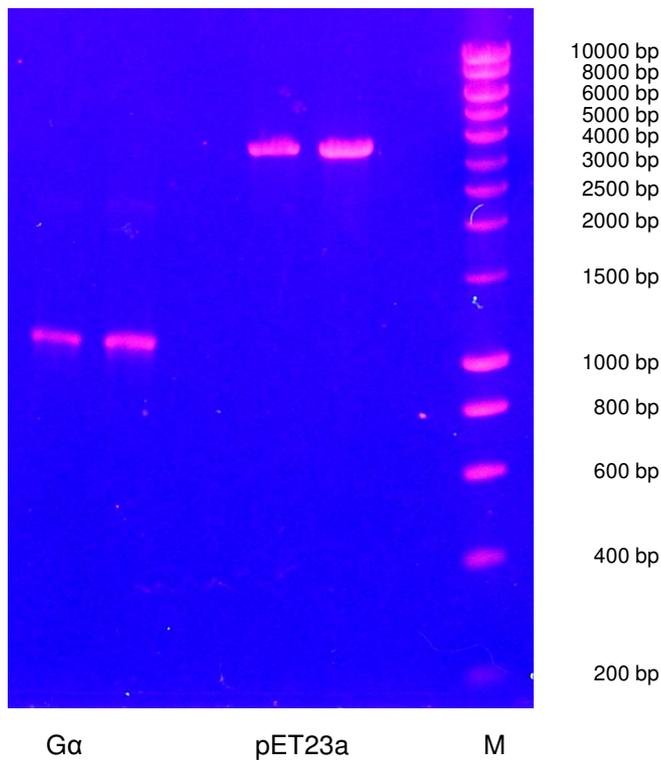


Abb. 2-5: G α -PCR-Produkt und pET23a (Ethidiumbromid-Agarose-Gel)

Die durch PCR amplifizierte DNA des G α -Proteins sowie der Expressionsvektor pET23a wurden mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *XhoI* verdaut und zur Kontrolle auf ein Ethidiumbromid-Agarose-Gel aufgetragen. Beide Schnittstellen liegen außerhalb der G α -Gensequenz.

Molekülgrößen: G α : 1158 bp; pET23a: 3632 bp

Rechts wurde ein DNA-Standard (M) aufgetragen (SmartLadder, EUROGENTEC, Seraing, Belgien).

Die heterologe Expression und Reinigung des vollständigen G α -Proteins wurde analog der Expression und Reinigung des G α -Fragments (s. Kap. 2.5.1) durchgeführt. In folgenden Details wird das Verfahren abgehandelt: Das Volumen der bakteriellen Expressionskultur betrug 4 x 250 ml. Diese wurde bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,7 kultiviert. Eine weitere Kultivierung bzw. Induktion mit IPTG erfolgte nicht. Vorversuche hatten gezeigt, dass dies zu verstärktem Auftreten unvollständiger Expressionsprodukte bzw. Degradationsbruchstücken führte, nicht aber zur verstärkten Expression des gewünschten Proteins. Nachfolgend verwendete Puffer-Mengen etc. wurden entsprechend dem größeren Kulturvolumen angepasst. Durch qualitative Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines Anti-His-Antikörpers (NOVAGEN, EMD Biosciences, Schwalbach, BRD) wurde festgestellt, dass das exprimierte Protein zu einem erheblichen Teil löslich

im Überstand nach Zentrifugation vorlag. Dieser Überstand wurde zur Reinigung des darin gelösten Proteins verwendet.

Beim Volllänge-G α musste, im Gegensatz zum G α -Fragment, nicht denaturierend gearbeitet werden, um das Protein in Lösung zu bringen. Deshalb kam kein Guanidin-HCl zum Einsatz. Die Ni-NTA-Agarose-Säule wurde mit 5 ml Bindepuffer (+ PMSF 1 mM) equilibriert, bevor der proteinhaltige Zentrifugationsüberstand durch die Säule gegeben wurde. Das Waschen der Säule erfolgte in drei Schritten: 10 ml Waschpuffer (+ PMSF 1 mM, + Triton X-100 0,5 %), 5 ml Waschpuffer (+ PMSF 1 mM), 3 ml Waschpuffer (+ PMSF 1 mM, Imidazol 50 mM). Eluiert wurde mit 3 ml Elutionspuffer (+ PMSF 1 mM). Das Eluat wurde mit 3 ml 85 %igem Glycerol versetzt und bei -20 °C aufbewahrt.

Bindepuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0
Waschpuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0
Elutionspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0

2.6.4 GTP- γ -³⁵S-Bindungstest mit heterolog exprimiertem G α

Es sollte festgestellt werden, ob das heterolog exprimierte G α -Protein in der Lage ist, ebenso wie die nativen G α -Proteine, GTP spezifisch zu binden. Dazu wurden auf 1 x 1 cm großen Nitrocellulose-Stücken (Hybond ECL, Amersham, GE-Healthcare, München, BRD) jeweils 3 μ l der Stammlösung des G α -Proteins (s. Kap. 2.6.3) aufgetragen. Diese Nitrocellulose und zusätzliche Kontrollstücke ohne G α -Protein wurden 30 min bei Raumtemperatur einzeln in je 4 ml GTP-Bindepuffer unter Bewegung inkubiert. Anschließend wurden die Membranstücke auf trockenem Untergrund ausgelegt und mit je 100 μ l GTP- γ -³⁵S (2 nM, 1000 Ci/mmol) in GTP-Bindepuffer überschichtet. Bei einem Teil der zuerst mit G α beschichteten Membranen wurde dem GTP- γ -³⁵S zusätzlich GTP (1 mM) zugesetzt. Nach 1-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden alle Membranen 3 mal mit je 4 ml GTP-Bindepuffer (+ 0,1 % Tween 20) für 5 min unter Bewegung gewaschen. Die Radioaktivität der gewaschenen Membranen wurde in einem Flüssig-Scintillationsmessgerät (Tri-Carb, Packard-PerkinElmer, Wellesley, MA, USA) bestimmt. Ein typisches Ergebnis ist in Abb. 2-6 dargestellt.

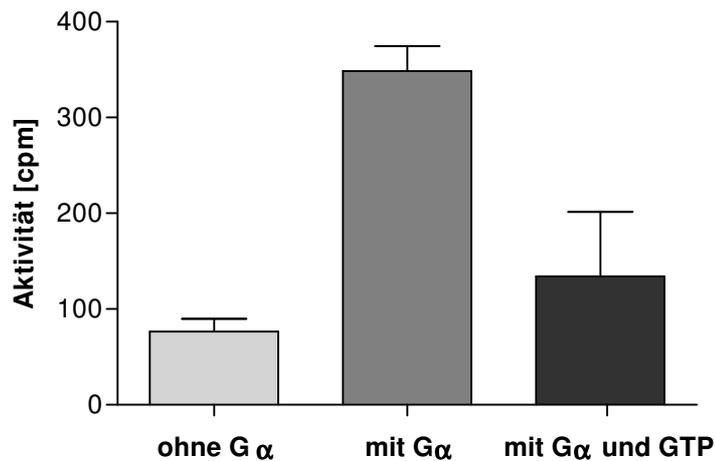


Abb. 2-6: GTP- γ -³⁵S-Bindungstest mit G α -Protein

Das Diagramm zeigt die Ergebnisse der Aktivitätsmessung von Nitrocellulose-Membranen, die wie in Kapitel 2.6.4 beschrieben durchgeführt wurde (SD, n=3).

Die stärkste Bindung von GTP- γ -³⁵S wurde für die Membranen festgestellt, die zuvor mit heterolog exprimiertem G α -Protein inkubiert worden waren (Mitte). GTP- γ -³⁵S wird bei gleichzeitiger Inkubation mit GTP kompetitiv verdrängt (rechts). Eine schwache, unspezifische Bindung von GTP- γ -³⁵S wurde an Nitrocellulose festgestellt, die nicht mit G α -Protein inkubiert worden war (Kontrolle, links).

Das heterolog exprimierte G α -Protein ist demnach in der Lage, GTP und GTP- γ -S spezifisch zu binden.

GTP-Bindepuffer	25 mM Tricin, 30 mM Mg-Acetat, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM ATP, pH 6,5
-----------------	---

2.6.5 Bindung von PLA₂ und G α -Protein an Ni-NTA-Agarose

Voraussetzung für diesen Versuch war die Gewinnung solubilisierter Plasmamembran von ausreichender Reinheit. Hierzu wurde durch 2-Phasenverteilung erhaltene Plasmamembran (s. Kap. 2.4.2) mit einer Gesamt-Proteinmenge von ca. 40 μ g je Probe dreifach aufgetaut und wieder eingefroren. Anschließend wurde 40 min bei 4°C und 100.000 x g zentrifugiert (TL100, Beckman Coulter, Krefeld, BRD). Das erhaltene Pellet wurde in 400 μ l Solubilisierungspuffer (pH 9,5) aufgenommen und durch Schütteln bei ca. 300 rpm (KS 500, Janke&Kunkel IKA Labortechnik, Staufen, BRD) für 2 h bei 8 °C gelöst bzw. suspendiert und erneut wie oben zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde im weiteren Versuchsverlauf als „solubilierte Plasmamembran“ eingesetzt.

50 μ l Ni-NTA-Agarose (QIAGEN, Hilden, BRD) wurden in einem 1,5-ml-Eppendorf-tube 4 x mit 150 μ l Bindepuffer gewaschen. Ein Waschschrift wurde

auf folgende Weise durchgeführt: 150 μ l Puffer hinzupipettieren, 10 s vortexen, 20 s bei 430 x g zentrifugieren (EBA 21, Hettich, Tuttlingen, BRD), 150 μ l Überstand abpipettieren.

Zu der gewaschenen Ni-NTA-Agarose wurden 1000 μ l G α -Protein-Lösung oder aber (als Kontrolle) das reine Lösungsmittel, also 1000 μ l Elutionspuffer/Glycerol (s. Kap. 2.6.3; 1:10 verdünnt mit Verdünnungspuffer) gegeben. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 45 min. Das 1,5-ml-tube wurde dabei seitlich liegend horizontal mit 230 rpm geschüttelt (HS 500, Janke&Kunkel IKA Labortechnik, Staufen, BRD). Nach der Inkubation wurde zentrifugiert (20 s bei 430 x g), der Überstand abpipettiert und die Agarose viermal mit je 150 μ l Bindepuffer gewaschen.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte eine Inkubation analog der vorhergehenden, aber mit 150 μ l 3 %igem BSA in Bindepuffer über 30 min. Anschließend wurde zentrifugiert (20 s bei 430 x g), der Überstand abpipettiert und die Agarose viermal mit je 150 μ l Bindepuffer gewaschen.

Abschließend erfolgte die Inkubation mit je 400 μ l solubilisierter Plasmamembran über 2 h unter gleichen Bedingungen. Nach dieser Inkubation wurde fünfmal mit je 500 μ l Waschpuffer gewaschen.

Zur Messung von PLA₂-Aktivität wurde nach Zusatz von 80 μ l Phospholipase-Substrat wurde 3 h bei 30 °C im Eppendorf-Schüttler (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg, BRD) inkubiert.

Der Substratumsatz wurde durch Zusatz von 400 μ l MeOH/CHCl₃/HCl (150/75/1) und 200 μ l 100 mM KCl gestoppt, der Ansatz ausgeschüttelt und die Lipid-Fraktion durch Entnahme der Unterphase gewonnen. Diese wurde im N₂-Strom eingetrocknet und nach Wiederaufnahme in 10 μ l CHCl₃ vollständig in einer 4 mm breiten Bande auf eine HPTLC-Platte aufgetragen. Die einfache dünnschichtchromatografische Entwicklung erfolgte mit dem Laufmittel CHCl₃/MeOH/H₂O (65/25/4). Siehe hierzu auch Kap. 2.7.3.

Entwickelte und vollständig getrocknete HPTLC-Platten wurden unter UV-Licht ($\lambda = 285$ nm) fotografiert (CAMEDIA E-10, Olympus, Hamburg, BRD). Das Fluoreszenzsignal wurde durch digitale Bildanalyse (OPTIMAS^R 6.2, Media Cybernetics, Silver Spring, USA) quantifiziert.

Solubilisierungspuffer	20 mM Tris, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0,5 % Na-Cholat, pH 7,5 bzw. 9,5
Bindepuffer	5 mM Imidazol, 20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 7,5
G α -Protein-Lösung	1:10-Verdünnung der G α -Protein-Lsg. (Kap. 2.6.3) mit Verdünnungspuffer
Verdünnungspuffer	20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 7,5
Elutionspuffer/Glycerol	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0
Waschpuffer	20 mM Imidazol, 20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 7,5
Phospholipase-Substrat	8 μ M BEPC in Solubilisierungspuffer, pH 7,5

2.7 Lipidanalyse in Zellen von *E. californica*

2.7.1 Dünnschichtchromatografische Untersuchung von Lipidextrakten (HPTLC)

2.7.1.1 Probengewinnung nach Substratzusatz

200 μ l einer Zellsuspension (Dichte entsprechend einer Trockenmasse von ca. 6,4 mg/ml) bzw. einer der subzellulären Fraktionen (s. Kap. 2.4) wurden in einem Eppendorf-Tube (1,5 ml) mit 200 μ l Lösung der jeweils unter „Ergebnisse und Diskussion“ angegebenen Substrate (in MES-Puffer) versetzt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur unter Bewegung. Nach Ablauf der jeweils unter „Ergebnisse und Diskussion“ angegebenen Inkubationszeit wurden 400 μ l Lipid-Extraktionmittel zugesetzt, wodurch die Zellen sofort lysiert und alle enzymatischen Reaktionen gestoppt wurden. Zur besseren Trennung von wässriger und organischer Phase wurden danach 200 μ l 100 mM KCl-Lösung zugesetzt und kräftig geschüttelt. Nach einer Zentrifugation (16.100 x g, 10 min; centrifuge 5403, Eppendorf, Hamburg, BRD) wurde die organische Phase separiert, die wässrige zur weiteren Lipidextraktion mit 200 μ l CHCl₃ versetzt und nach kräftigem Schütteln erneut zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde verworfen, die organischen Phasen beider Extraktionsschritte vereinigt und für 1 h bei -20 °C auf-

bewahrt. Nach Entfernen letzter Reste wässriger Phase wurde die organische Phase im Luftstrom bis zur Trockne eingedampft.

Lipid-Extraktionsmittel	MeOH/CHCl ₃ /HCl _{conc} entspr. 150/75/1
MES-Puffer	100 mM MES, pH 6,0

2.7.1.2 Dünnschichtchromatografische Trennung von Lipidgemischen

Bei den dieser Arbeit zugrundeliegenden Versuchen wurde die Hochleistungs-Dünnschichtchromatografie (HPTLC) eingesetzt, wodurch die zugesetzten und teilweise radioaktiv markierten Stoffe sowie deren Metabolite hoch aufgelöst voneinander getrennt werden konnten. Es wurde ein Verfahren mit dreifacher Entwicklung der HPTLC-Platte verwendet (Christie, 1990). Dadurch konnten die v.a. im hydrophilen Bereich unterschiedlichen Phospholipidgruppen (Phosphatidylcholine, -serine, -ethanolamine, -inositole) voneinander separiert werden. Abbildung 2-7 zeigt das Chromatogramm eines auf diese Weise getrennten Lipidgemisches aus *E. californica*.

Die extrahierten Lipide (s.Kap. 2.7.1.1) wurden in 10 µl CHCl₃ aufgenommen und nach kurzem Vortexen mit einer Glaskapillare als 4 mm lange Linie in Starthöhe (1 cm vom unteren Rand entfernt) vollständig auf die HPTLC-Platte (Kieselgel 60, Glas, 10 x 10 cm; Merck, Darmstadt, BRD) aufgetragen. Der Abstand zwischen einzelnen Proben auf einer Platte betrug mindestens 6 mm, der seitliche Abstand zum Plattenrand mindestens 1 cm. Die Platte wurde vor der Entwicklung kurz mit einem Föhn erwärmt und anschließend in die Dünnschichtchromatografie-Kammer (Horizontal Developing Chamber, 10 x 10 cm; CAMAG, Muttenz, Schweiz) eingelegt. Es wurde mit Kammersättigung gearbeitet, d.h., ca. 1 min nach Einlegen der Platte wurde die Entwicklung gestartet. Die erste Entwicklung erfolgte bis zur Hälfte der möglichen Laufstrecke mit DC-Laufmittel 1. Die zweite Entwicklung wurde analog zur ersten nach vollständiger Trocknung und erneuter Erwärmung der Platte durchgeführt. Die dritte Entwicklung erfolgte nach erneuter Trocknung und Erwärmung der Platte über die gesamte Laufstrecke mit DC-Laufmittel 2.

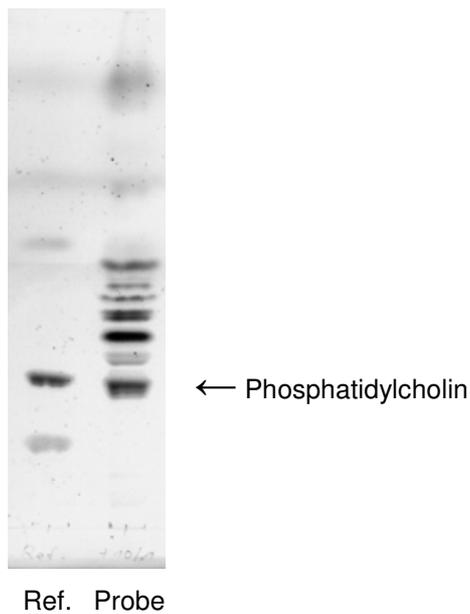


Abb. 2-7: Dünnschichtchromatografische Trennung der Gesamt-Lipide der *Escherichia*-Zellkultur
 Nach Extraktion der Lipide aus Ganzzellen und Auftragen auf eine HPTLC-Platte (Probe) wurde diese 3-fach, wie in Kapitel 2.7.1.2 beschrieben, entwickelt. Als Referenz (Ref.) diente Lecithin vom Schwein (SIGMA-ALDRICH, Schnelldorf, BRD). Nach der Entwicklung wurde die HPTLC-Platte mit 20 %iger H_2SO_4 besprüht und für einige Minuten in einem Trockenschrank auf 200 °C erhitzt (unspezifische Anfärbung), um die scharfe Trennung der verschiedenen Lipid-Spezies sichtbar zu machen.

DC-Laufmittel 1	$CHCl_3/MeOH/H_2O$ entspr. 12/6/1
DC-Laufmittel 2	Hexan/Diethylether/Essigsäure entspr. 80/20/1,5

2.7.1.3 Quantifizierung ^{14}C -markierter Lipide nach dünnschichtchromatografischer Trennung

Entwickelte und vollständig getrocknete HPTLC-Platten wurden in Klarsichtfolie (Saran Wrap) eingeschlagen und fest in einer Autoradiografiekassette (Hypercasette™, Amersham/GE-Healthcare, München, BRD) fixiert. Nach Auflegen eines Phosphor-Screens (Storage Phosphor Screen, Amersham) wurde die geschlossene Kassette für 72 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach Entnehmen des Screens wurde dieser auf einem Storm-Imager (Amersham) gescannt.

Die Quantifizierung der durch ^{14}C -Radioaktivität hervorgerufenen Schwärzung wurde durch digitale Bildanalyse (OPTIMAS^R 6.2, Media Cybernetics, Silver Spring, USA) realisiert.

2.7.1.4 Gewinnung ¹⁴C-markierter Lipide von HPTLC-Platten

Um radioaktiv markierte Lipidspezies nach dünn-schichtchromatografischer Trennung sauber von der Kieselgelplatte entfernen und extrahieren zu können, wurde zwischen der vollständigen Entwicklung und der Exposition auf dem Phosphor-Screen an zwei mit Bleistift gekennzeichneten Punkten etwas ¹⁴C-markierte Substanz auf der Kieselgel-Platte aufgebracht. Nach Exposition und Scannen des Phosphor-Screens (s. Kap. 2.7.1.3) konnten die Markierungen auf der Dünnschichtplatte (Bleistift) und auf dem gescannten Abbild (Schwärzung durch ¹⁴C) in Übereinstimmung gebracht werden. Mithilfe der Markierungen war es nun möglich, die gewünschten Substanzbanden eindeutig zu identifizieren und von der Kieselgelplatte zu entnehmen.

2.7.2 MALDI-TOF-Massenspektrometrische Untersuchung von Lipidextrakten

2.7.2.1 Probengewinnung nach Substratzusatz

1200 µl einer Zellsuspension (Dichte entsprechend einer Trockenmasse von ca. 13 mg/ml) wurden in ein Rollrand-Glas (V = 10 ml) gegeben und mit 1200 µl Substrat-Lösung in MES-Puffer versetzt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur unter Bewegung. Die verwendeten Substrate, deren Konzentration und die Inkubationszeiten sind in den betreffenden Kapiteln in „Ergebnisse und Diskussion“ angegeben.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 1800 µl Lipid-Extraktionmittel zugesetzt, wodurch die Zellen sofort lysiert und alle enzymatischen Reaktionen gestoppt wurden. Zur besseren Trennung von wässriger und organischer Phase wurden nachfolgend 900 µl KCl-Lösung (100 mM) zugesetzt und kräftig geschüttelt. Nach Zusatz von 0,015 mg Dipentadecanoyl-Phosphatidylcholin als Mengenstandard, gelöst in 100 µl CHCl₃, wurde nach Zentrifugation (5000 x g, 20 min; 3K12, Sigma Laborzentrifugen, Osterode, BRD) die organische Phase separiert. Die wässrige Phase wurde zur weiteren Lipidextraktion erneut mit 1800 µl Lipid-Extraktionmittel versetzt und nach kräftigem Schütteln zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde verworfen, die beiden organischen Phasen vereinigt und für 1 h bei -20 °C aufbewahrt. Nach Entfernen letzter Reste der wässrigen Phase wurde die organische Phase im Stickstoffstrom auf ca. 500 µl eingengt. Der entstandene Lipidextrakt wurde mit einer Mikroliterspritze als

7 cm lange Linie in Starthöhe (2 cm vom unteren Rand entfernt) vollständig auf eine präparative HPTLC-Platte (Kieselgel 60, Glas, 20 x 20 cm, ; Merck, Darmstadt, BRD) aufgetragen. Der Abstand zwischen einzelnen Proben auf einer Platte und der seitliche Abstand zum Plattenrand betragen mindestens 1 cm. Als Referenz-Standard wurde an beiden Seiten sowie in der Mitte der Platte eine kleine Menge des mit nativen PC Rf-gleiche, fluoreszierende bis-BODIPY-C₁₁-PC (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) aufgetragen. Die Platte wurde vor der Entwicklung kurz mit einem Föhn erwärmt und anschließend vertikal in eine Dünnschichtchromatografie-Kammer gestellt. Es wurde mit Kammersättigung gearbeitet. Die erste Entwicklung erfolgte bis zur Hälfte der möglichen Laufstrecke mit DC-Laufmittel 1. Die zweite Entwicklung wurde analog zur ersten nach vollständiger Trocknung und erneuter Erwärmung der Platte durchgeführt. Die dritte Entwicklung erfolgte nach vollständiger Trocknung und Erwärmung der Platte über die gesamte Laufstrecke mit DC-Laufmittel 2.

Von der entwickelten und vollständig getrockneten Platte wurde das PC-haltige Kieselgel (in Höhe des fluoreszierenden Standards) abgekratzt und in 2 Eppendorf-Tubes gegeben. Die Lipide wurden durch Zusatz von je 400 µl Lipid-Extraktionsmittel extrahiert. Zur besseren Trennung von wässriger und organischer Phase wurden nachfolgend 200 µl 100 mM KCl-Lösung zugesetzt und kräftig geschüttelt. Das Kieselgel sammelt sich hierbei in der wässrigen Phase. Die organische Phase wurde separiert und der Extraktionsvorgang wiederholt. Die organischen Phasen wurden vereinigt und im Stickstoff-Strom zur Trockne eingedampft. Diese Proben wurden, sofern Massenspektren der Phosphatidylcholine erzeugt werden sollten, zur MALDI-TOF-Massenspektrometrie (s.Kap. 2.7.2.2) eingesetzt.

Zur Bereitstellung von invitro erzeugtem LPC aus extrahiertem PC für die MALDI-TOF-Massenspektrometrie wurde unter Verwendung von PLA₂ nach Kap. 2.7.3 verfahren. Die Hydrolyse-Produkte wurden, wie hier beschrieben, auf präparativen HPTLC-Platten getrennt.

MES-Puffer	100 mM MES, pH 6,0
Lipid-Extraktionsmittel	MeOH/CHCl ₃ /HCl _{conc} entspr. 150/75/1
DC-Laufmittel 1	CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O entspr. 12/6/1
DC-Laufmittel 2	Hexan/Diethylether/Essigsäure entspr. 80/20/1,5

2.7.2.2 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die Proben wurden mit einem Reflektor-Flugzeit-Massenspektrometer (REFLEX II) der Firma Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland analysiert. Das Massenspektrometer ist mit einer SCOUT Ionen-Quelle und einer gepulsten Ionenextraktion ausgestattet. Die Daten wurden mit der XMASS-Software (Bruker) analysiert. In Methanol gelöste 2,5-Dihydroxybenzoesäure diente als Matrix. Die Proben wurden in Chloroform gelöst, 1:2 mit der Matrix gemischt und auf den Probenträger zur Kristallisation aufgebracht.

Die Quantifizierung der Mengen einzelner Phospholipidspezies erfolgte aus den Verhältnissen von Signalhöhe der Peaks und der durchschnittlichen Höhe des Rausch-Signals.

2.7.3 Hydrolyse von Phosphatidylcholinen durch PLA₂-Verdau

20 mg trockenes PC wurde in 20 µl EtOH aufgenommen, die Lösung nacheinander mit 150 µl MOPS-Puffer, 20 µl 100 mM CaCl₂-Lösung und 10 µl PLA₂-Lösung (PLA₂ aus Bienengift, SIGMA; 1 mg/ml in MOPS-Puffer) versetzt und 35 min bei 35 °C und 1000 rpm (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg, BRD) inkubiert. Die Lipidextraktion wurde analog zur Extraktion aus Zellsuspensionen (s. Kap. 2.7.1.1) durchgeführt, wobei der PLA₂-Ansatz entsprechend der Zellsuspension verwendet wurde. Die resultierende organische Phase wurde eingengt und als 3,5 cm langer Streifen in Starthöhe (1 cm vom unteren Rand entfernt) vollständig auf eine HPTLC-Platte (Kieselgel 60, Glas, 10 x 10 cm; Merck, Darmstadt, BRD) aufgetragen. Der Abstand zwischen zwei Proben auf einer Platte betrug 1 cm, der seitliche Abstand zum Plattenrand ebenfalls. An beiden Seiten sowie in der Mitte der Startlinie wurden kleine Mengen des mit nativen LPC Rf-gleiche, fluoreszierende BODIPY-C₁₁-LPC (Gewinnung durch PLA₂-Verdau des bis-BODIPY-C₁₁-PC, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) aufgetragen. Die Platte wurde vor der Entwicklung kurz mit einem Föhn erwärmt und anschließend in die Dünnschichtchromatografie-Kammer (Horizontal Developing Chamber, 10 x 10 cm; CAMAG, Muttenz, Schweiz) eingelegt. Die einfache Entwicklung erfolgte unter Kammersättigung. Gestartet wurde ca. 1 min nach Einlegen der Platte. Es wurde mit DC-Laufmittel 3 gearbeitet.

Die Gewinnung des LPC-haltigen Kieselgels und die Extraktion erfolgten wie bei den PC-Proben (s. Kap. 2.7.1.4).

DC-Laufmittel 3	CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O entspr. 65/25/4
MOPS-Puffer	50 mM MOPS, pH 5,6

2.7.4 Quantifizierung freier Fettsäuren in Ganzzellen von *E. californica* durch GC/MS

13 g Frischmasse lebender Zellen von *E. californica* wurden in einem Rundkolben mit 20 ml heißem Isopropanol (65 °C) versetzt und 15 min auf einem Rundschüttler (KS 500, Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen, BRD) geschüttelt. Anschließend wurden 10 µl Heptadecansäure-Lsg. (1,3 µg/µl; in Chloroform) als Mengenstandard zugegeben.

Nach Zusatz von 9,99 ml Chloroform und 8,0 ml H₂O wurde für 30 min geschüttelt, in Zentrifugengläser überführt und 20 min bei 5000 x g zentrifugiert (3K12, Sigma Laborzentrifugen, Osterode, BRD). Nach Abtrennen der Chloroformphase wurde die wässrige Phase zweimal mit je 6 ml Chloroform reextrahiert, die Chloroformphasen anschließend vereinigt.

Zum Waschen wurde der gesamte Chloroformextrakt mit 6.5 ml 1 M KCl versetzt, geschüttelt, zentrifugiert (s.o.), die wässrige Phase anschließend entfernt. Der Extrakt wurde im Rotationsverdampfer (LABO ROTA S300, resona techniques, Gossau, Switzerland) auf 1 ml eingengt, der Kolben 2 x mit je 1 ml Chloroform nachgespült, ein letztes Einengen auf ca. 1 ml erfolgte im Stickstoffstrom. Der eingengte Extrakt wurde mit einer Mikroliterspritze als ca. 16 cm lange Linie auf eine Kieselgelplatte (präparativ, Kieselgel 60, Glas, 20 x 20 cm; Merck, Darmstadt, BRD) aufgetragen und unter Kammersättigung in einer Vertikal-Kammer dreifach entwickelt (s. Kap. 2.7.2.1). Als Referenz-Marker für die freien Fettsäuren wurde eine kleine Menge BODIPY®-C₁₁-Fettsäure (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) aufgetragen.

Nach vollständiger Entwicklung der Dünnschicht-Platte wurde das Kieselgel horizontal in Höhe der fluoreszierenden Fettsäure-Referenz entfernt, die Fettsäuren extrahiert (s. Kap. 2.7.2.1).

Der vollständig unter Stickstoff eingedampfte Extrakt wurde in 50 µl Chloroform gelöst und zur Fettsäure-Quantifizierung mittels GC/MS verwendet:

Derivatisierung: Die eingedampfte Probe wurde in 200 µl CHCl₃ /N,N-diisopropylethylamin (1+1) gelöst und durch Zusatz von 10 µL Pentafluoroben-

zylbromid über Nacht bei 20 °C derivatisiert. Die anschließend eingedampfte Probe wurde in 5 ml n-Hexan aufgenommen und über eine Chromabond-SiOH-Säule (500 mg; Macherey-Nagel, Düren, BRD) gegeben. Die Pentafluorobenzyl-Ester der Fettsäuren wurden mit 7 ml n-Hexan/Diethylether (2+1) eluiert. Das Eluat wurde eingedampft, in 100 µl MeCN gelöst und zur weiteren Analyse verwendet.

GC-MS: (Polaris Q, Thermo-Finnigan), 100 eV, negative chemische Ionisation, Ionisationsgas NH₃, Ion-source-Temperatur 180 °C, Säule Rtx-5w/Integra Guard (Restek, Germany), 5 m inerte Vorsäule verbunden mit Säule 15 m x 0.25 mm, 0.25 µm Filmdicke, crossbond 5 % diphenyl – 95 % dimethyl polysiloxane, Injektionstemperatur 220 °C, Interface-Temperatur 250 °C; Helium 1 ml/min; Splitless-Injektion; Säulen-Temperaturprogramm: 1 min 60 °C, 25 °C/min bis 180 °C, 5 °C/min bis 270 °C, 10 °C/min bis 300 °C, 10 min 300 °C.

Anhand analog behandelte, bekannter Fettsäurespezies konnten die Retentionszeiten aller relevanten Fettsäuren für diese Messanordnung bestimmt werden. Dadurch war die qualitative Bestimmung der in der Probe enthaltenen Fettsäuren gewährleistet. Durch die zu Beginn der Extraktion zugesetzte Heptadecansäure wurde die Quantifizierung der einzelnen Fettsäuren in der Probe durch Vergleich der Peakflächen ermöglicht. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit der Xcalibur™-Software (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA).

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Die Regulation des Signalzyklus PLA₂ auf der Aktivitätsebene: Modulation der G α -Funktion durch endogene scFv

3.1.1 Versuchsstrategie

Zu den Zielen der vorliegenden Arbeit gehörte es, die Rolle des G α -Proteins bei der Kontrolle der PLA₂ in der von einem Elicitor ausgelösten Signalkette besser zu verstehen. Mit dieser Absicht waren bereits Zelllinien etabliert worden, welche antisense-G α -mRNA exprimierten und erwartungsgemäß einen stark verminderten G α -Gehalt besaßen (15 bis 40 %, Viehweger et al., 2006). Diese Zelllinien lieferten klare Hinweise auf die Beteiligung dieses Proteins an der Induktion der Alkaloid-Biosynthese. Elicitierbare PLA₂-Aktivität und Alkaloidbildung waren deutlich reduziert. Es zeigten sich zugleich die Grenzen der Antisense-Strategie: in Pflanzen existiert jeweils nur ein G α -Protein (außerdem ein G β , zwei G γ), welches zahlreiche Signalfunktionen ausübt, u.a. innerhalb der Signalkaskaden des Auxins und der Abscisinsäure (Wang et al., 2001, Assmann, 2002, Jones und Assmann, 2004). Deshalb ist bei einem unkontrollierten Mangel an G α im Gesamtorganismus, wie er nach antisense-Transformation zu erwarten ist, mit vielfältigen Ausfallserscheinungen und einem durchaus komplexen Phänotyp zu rechnen. In den antisense-G α -Stämmen von *E. californica* zeigte sich dies u.a. in einem verzögerten Wachstum und einer verringerten Basalrate der Alkaloidbildung, d.h. in Abwesenheit eines Elicitors (Viehweger et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb ein Verfahren zur Modulation der G α -Aktivität angewandt, welches eine bessere lokale Kontrolle erwarten ließ. Die Zellen wurden mit einem scFv-Gen transformiert, welches einen spezifisch an die G α -Untereinheit bindenden Einketten-Antikörper (scFv) kodiert. Unter Verwendung eines geeigneten Targeting-Signals im Transformationsvektor sollten die Expression und Anreicherung des Antikörpers auf das Zytoplasma begrenzt werden. Ziel war es, ohne Verminderung der G α -Expression in der Zelle die Wirksamkeit des Antikörpers auf die vom Zytoplasma aus erreichbaren Bindungsstellen zu beschränken. Die Manipulation war demnach auf die Funktion des über das Zytoplasma erreichbaren G α , nicht aber auf seine Expression gerichtet.

Die Immunmodulation pflanzlicher Signalmoleküle durch die Expression von Kurzketten-Antikörpern wurde bereits vielfach angewendet. Am häufigsten kamen Einketten-Antikörper zum Einsatz. Dabei handelt es sich um eine Kombination der Fv-Fragmente jeweils einer leichten und einer schweren IgG-Kette (scFv, Abb. 3-1). Die Expression dieser Antikörper diente u.a. zur Charakterisierung der Funktionsweise pflanzlicher Hormone, wie Abscisinsäure in *Solanum tuberosum* (Strauß et al., 2001), Jasmonat in *Nicotiana tabacum* (Ten Hoopen, 2002) und Brassinosteroiden in *Arabidopsis thaliana* (Ankudo, 2004). Herbizidresistente Tabakpflanzen wurden durch Expression von Anti-Quinmerac-scFv erzeugt (Leps, 2003).

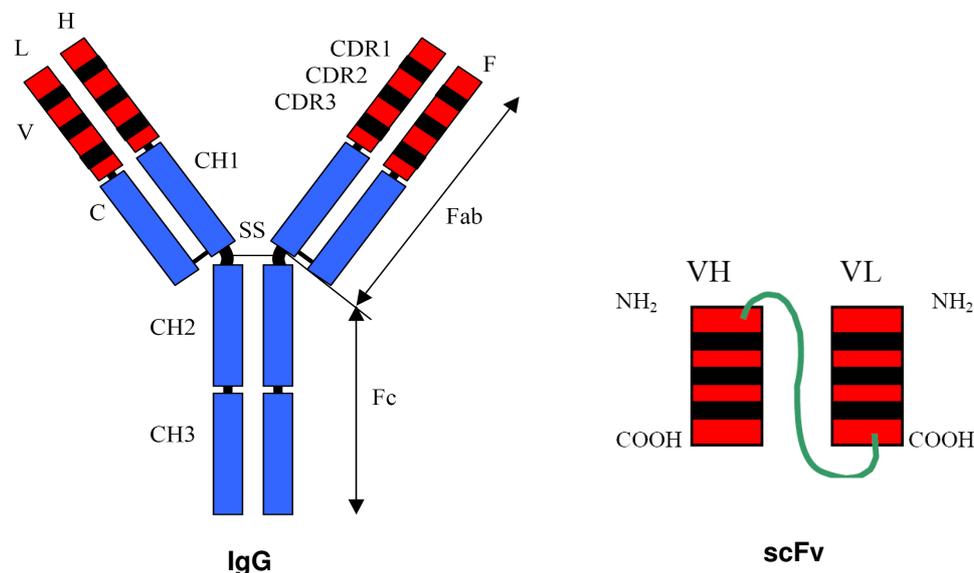


Abb. 3-1: Schematische Darstellung eines Immunglobulins und eines scFv

Dargestellt ist ein Immunglobulin (IgG), bestehend aus je zwei identischen leichten (L) und schweren (H) Aminosäure-Ketten (links):

- blau: konstante Regionen,
- schwarz/rot: variable Bereiche.

Bei der Konstruktion von scFv-Einketten-Antikörpern (scFv, rechts) wurden je ein variabler Bereich der leichten (VL) und der schweren (VH) Kette über ein Linkerpeptid (grün) miteinander verbunden (Darstellung: Ten Hoopen, 2002).

Der in der vorliegenden Arbeit gewählte Ansatz zur Expression von anti- $\text{G}\alpha$ -scFv war auch von grundsätzlichem Interesse, weil bisher kaum Erfahrungen zur Wirksamkeit endogener scFv gegen pflanzliche, zelleigene Proteine, insbesondere Signalproteine, vorhanden sind.

3.1.2 Etablierung scFv-exprimierender Zelllinien von *E. californica*

3.1.2.1 Phage-Display zur Auffindung von anti-G α -Kurzketten-Antikörpern (scFv)

Grundlage für die Auswahl und Charakterisierung eines geeigneten scFv bildeten zwei scFv-Bibliotheken, die von I. M. Tomlinson am MRC Cambridge etabliert wurden. Sie basieren auf menschlichen V-Gensequenzen und liegen im scFv-Phagemid-Format vor (De Wildt et al., 2000). Für die Herstellung des Phagemid-Systems wurde ein pIT1-Plasmid-Expressionsvektor (Abb. 3-2) verwendet. Er ermöglicht die Expression der Antikörpergene als Fusionsproteine auf der Oberfläche von Phagenpartikeln, wenn man sie in einer Suppressormutante von *E. coli* (z.B. TG1) durchführt. In dieser wird das C-terminal an die scFv-Sequenz anschließende Amber-Stoppcodon überlesen. Alternativ wird bei Expression in einer Nicht-Suppressor-Linie (z.B. HB2151) das Amber-Stoppcodon erkannt, und lösliche scFv werden in den periplasmatischen Raum sekretiert.

Das als „Phage-Display“ bekannte Verfahren zur Selektion geeigneter scFv beruht auf einer multizyklischen Exposition der Phagen-Antikörper gegenüber dem fixierten Antigen. Nach Abwaschen der ungebundenen Antikörper werden die gebundenen durch Elution gewonnen und nach einer weiteren Wachstumsphase der Phagen erneut dem Antigen ausgesetzt. Durch mehrmaliges Wiederholen dieser Prozedur findet eine Anreicherung der scFv statt, die sich gegenüber dem Antigen durch hohe Affinität auszeichnen. Als Antigen wurde ein 100-Aminosäuren-Fragment des G α von *E. californica* (s. Kap. 2.5.1.1) eingesetzt. Diese Arbeiten wurden von J. Schneeberg im Labor von Dr. U. Conrad (IPK Gatersleben) nach einem dort entwickelten Protokoll (Leps, 2003, s. Kap. 2.5.2) durchgeführt.

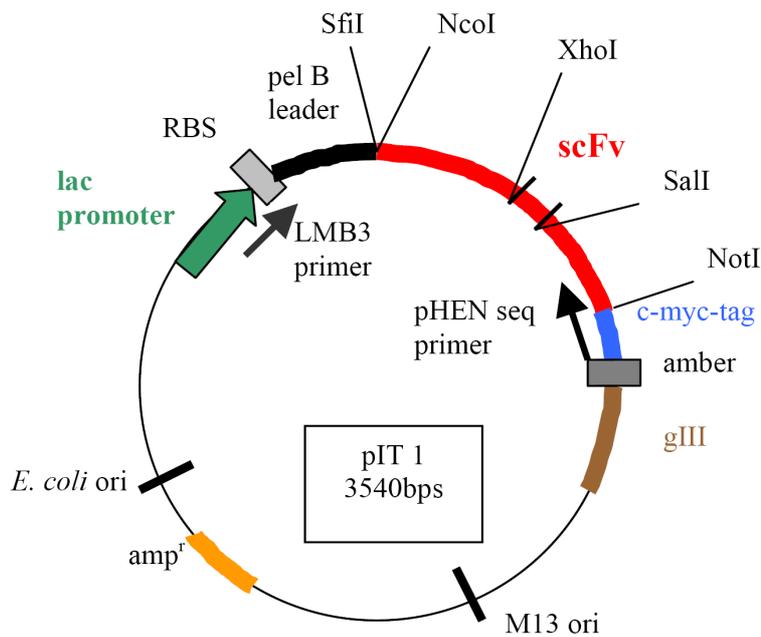


Abb. 3-2: Schematische Darstellung des pIT1-Phagemid-Vektors

lac promoter: E. coli Lac Z Promotor; **RBS:** ribosomale Bindungsstelle; **pel B leader:** Signalpeptid für Sekretion in das Periplasma; **SfiI, NcoI, XhoI, SalI, NotI:** Restriktionsschnittstellen; **scFv:** DNA-Sequenz des scFv-Antikörpers; **c-myc-tag:** Erkennungssequenz für den 9E10-Antikörper für qualitativen und quantitativen scFv-Nachweis; **amber:** Amber-Stop-Codon; **gIII:** DNA-Sequenz für gIII-Phagen-Hüllprotein; **M13 ori:** M13-Phagen-Replikationsursprung; **amp^r:** Ampicillin-Resistenz-Gen; **E.coli ori:** E. coli-Replikationsursprung; **LMB3-** und **pHEN seq-primer:** priming sites, die zur Sequenzierung der scFv-DNA verwendet wurden (Darstellung: Ten Hoopen, 2002)

3.1.2.2 Die Gewinnung des Antigens

Als Antigen wurde ein G α -Fragment hergestellt, dessen DNA mittels PCR aus genomischer DNA von *E. californica* amplifiziert worden war. Dieses Fragment hatte sich bereits zur Gewinnung von antisense-G α -Konstrukten bewährt (Viehweger et al., 2006, Abb. 2-2). Durch einen Vergleich des G α -DNA-Fragments (26 % des gesamten G α -Gens) mit homologen Sequenzen des G α anderer Pflanzenspezies wurde festgestellt, dass es einen zentralen Bereich der Aminosäuresequenz des Gesamtproteins kodiert (Aminosäuren 190-282 von 384 Aminosäuren).

Unter Verwendung des Expressionsvektors pET23a wurde das Genfragment in *E. coli* (BL 21) heterolog exprimiert. Die in diesem System exprimierten Proteine verfügen über einen N-terminalen T7-Tag und einen C-terminalen His-Tag (6 His). Letzterer ermöglichte die Reinigung des Proteins über Ni-NTA-Agarose.

Das produzierte G α -Protein-Fragment war zunächst unlöslich, konnte aber durch Zusatz von Guanidin-HCl in Lösung gebracht werden.

3.1.2.3 Selektion und Reinigung eines spezifisch bindenden scFv

Die bakterielle Expression der scFv erfolgt unter Kontrolle des im Phagemid-Vektor integrierten lacZ-Promotors. Um lösliche scFv in transformierten *E. coli*- (HB2151)-Zellen zu produzieren, wurden diese zunächst in Anwesenheit von Glucose kultiviert und die scFv-Expression in der log-Phase durch Zusatz von IPTG induziert. Mittels geeigneter Kultivierungsbedingungen kann eine partielle Lyse der Bakterienzellwand erreicht werden, so dass die scFv in das Kulturmedium gelangen. Dieses Medium konnte direkt für Nachweis und Charakterisierung der scFv per Western-Blot und ELISA verwendet werden. Der Nachweis der scFv erfolgte über den am C-Terminus fusionierten c-myc-tag (Munroe, Pelham, 1987) mittels des gegen diesen gerichteten murinen anti-c-myc-Antikörpers 9E10 (Evan et al., 1985).

Das Phage-Display-Verfahren lieferte acht verschiedene scFv-Spezies, die eine deutliche Affinität zum Antigen aufwiesen. Diese wurden per ELISA hinsichtlich ihrer Affinität gegen das G α -Fragment verglichen. In Abbildung 3-3 sind die Versuchsergebnisse dargestellt.

Die verglichenen scFv-Spezies zeigten deutliche Unterschiede in ihrer Affinität zum G α -Fragment. Weiterhin ist untersucht worden, wie stark die Bindung der scFv an die nicht G α -spezifischen Strukturen des Antigens, den T7- und den His-Tag ist. Aus diesem Grund wurden zwei weitere Antigene eingesetzt, die auch in pET23a exprimiert wurden und über T7- und His-Tag verfügen. Antikörper mit hoher Affinität gegen diese Proteine wurden als nicht G α -spezifisch angesehen und nicht weiter bearbeitet.

Für die Expression in *E. californica* wurde scFv Nr. 15 ausgewählt, da dieser die höchste Affinität zum G α -Fragment zeigte, jedoch keine zu den beiden anderen T7- und His-markierten Proteinen. Mithilfe eines weiteren ELISA wurde die Bindungsaffinität dieses scFv zu dem im Phage-Display eingesetzten G α -Fragment bestimmt. Die halb-maximale Bindung konnte mit einer scFv-Konzentration von 6,4 nM erreicht werden (Abb. 3-4). Sowohl die DNA- als auch die Aminosäure-Sequenz dieses Antikörpers sind in Abbildung 3-5 dargestellt.

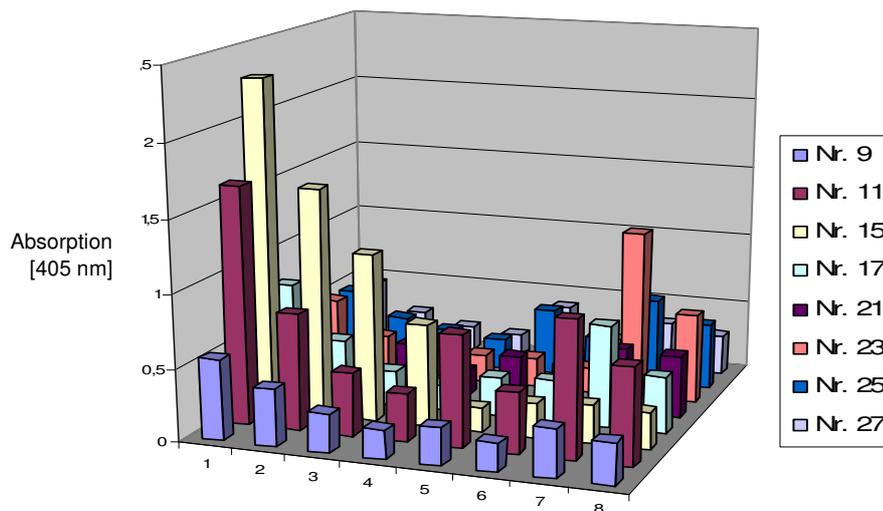


Abb. 3-3: Affinitätstest mit acht verschiedenen scFv-Klonen (ELISA)

Die Kulturmedien der Bakterienklone Nr. 9, 11, 15, 17, 21, 23, 25, 27 wurden auf eine Mikrotiterplatte pipettiert, die wie nachfolgend angegeben vorbehandelt war:

- Reihen 1 bis 4: beschichtet mit G α -Fragment,
- Reihen 5 und 6: beschichtet mit "Bm" (32 kDa),
- Reihen 7 und 8: beschichtet mit "Bklein" (10 kDa).

Die Proteinkonzentrationen bei der Beschichtung betragen je ca. 20 μ g/ml. "Bm" und "Bklein" sind in pET23a exprimierte Proteine, die über einen C-terminalen His-Tag und einen N-terminalen T7-Tag verfügen. Die scFv-("Erstantikörper")-Konzentrationen wurden zunächst per Western-Blot quantifiziert, aneinander angeglichen und anschließend für:

- Reihen 1, 5, 7: nicht verdünnt,
- Reihen 2, 6, 8: 1:2 verdünnt,
- Reihe 3: 1:4 verdünnt,
- Reihe 4: 1:8 verdünnt.

Als zweiter Antikörper diente der anti-c-myc-Antikörper (9E10), als dritter Antikörper ein Anti-Maus-AP-Konjugat. Die Bestimmung der Absorption erfolgte 20 min nach Zusatz des pNPP-Substrates. Zur Entwicklung des ELISA siehe auch Kap. 2.5.4.

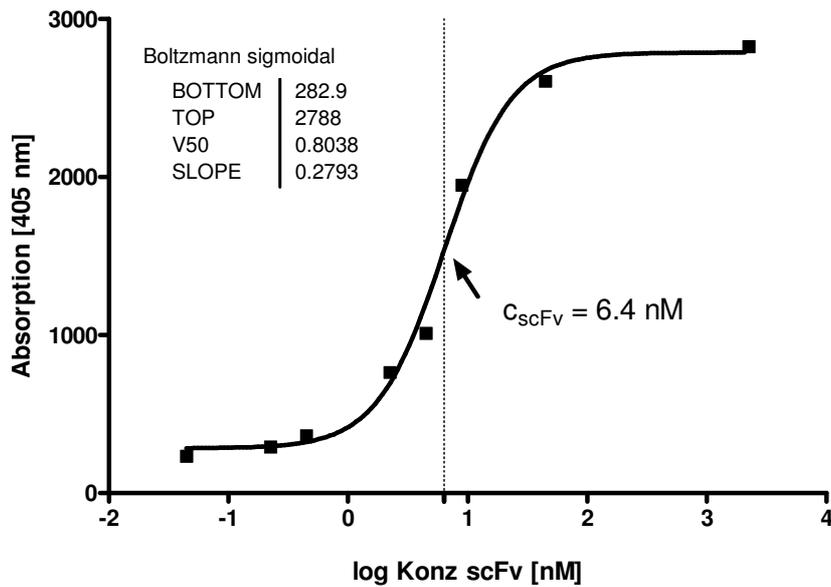


Abb. 3-4: Bestimmung der Bindungsaffinität von scFv Nr. 15 (ELISA)

Der bakteriell exprimierte scFv-Antikörper wurde in der jeweils angegebenen Konzentration auf eine Mikrotiterplatte pipettiert, die mit G α -Fragment (welches zum Phage-Display eingesetzt wurde) beschichtet worden war. Die Proteinkonzentration bei der Beschichtung betrug ca. 20 $\mu\text{g/ml}$.

Als zweiter Antikörper diente der anti-c-myc-Antikörper (9E10), als dritter Antikörper ein Anti-Maus-AP-Konjugat. Die Bestimmung der Absorption erfolgte 20 min nach Zusatz des pNPP-Substrates. Zur Entwicklung des ELISA siehe auch Kap. 2.5.4.

Durch Darstellung der Absorption gegen den Logarithmus der scFv-Konzentration lässt sich die scFv-Konzentration ermitteln, welche für eine halb-maximale Bindung erforderlich ist. Sie betrug 6,4 nM.

VH →	<i>FR-H1</i>	
M A E V Q L L E S G G G L V Q		15
ATG GCC GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG		45
P G G S L R L S C A A S G F T		30
CCT GGG GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC		90
<i>CDR-H1</i>	<i>FR-H2</i>	
F S K Y S M A W V R Q A P G K		45
TTT AGC AAG TAT AGT ATG GCT TGG GTC CGC CAG GCT CCT GGG AAG		135
<i>CDR-H2</i>		
G L E W V S A I S G S G G S T		60
GGG CTG GAG TGG GTC TCA GCT ATT AGT GGT AGT GGT GGT AGC ACA		180
<i>FR-H3</i>		
Y Y A D S V K G R F T I S R D		75
TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC AGA GAC		225
N S K N T L Y L Q M N S L R A		90
AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC		270
<i>CDR-H3</i>		
E D T A V Y Y C A K K P S T F		105
GAG GAC ACG GCC GTA TAT TAC TGT GCG AAA AAG CCG TCT ACT TTT		315
<i>FR-H4</i>	<i>Linker</i>	
D Y W G Q G T L V T V S S G G		120
GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCG AGC GGT GGA		360
G G S G G G S G G G S T D		135
GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC AGC GGC GGT GGC GGG TCG ACG GAC		405
VL →	<i>FR-L1</i>	
I Q M T Q S P S S L S A S V G		150
ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA		450
<i>CDR-L1</i>		
D R V T I T C R A S H S I T A		165
GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAT AGC ATT ACG GCG		495
<i>FR-L2</i>		
S L S W Y Q Q K P G K A P K L		180
TCT TTA TCG TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG CTC		540
<i>CDR-L2</i>	<i>FR-L3</i>	
L I Y A A S S L Q S G V P S R		195
CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG		585
F S G S G S G T D F T L T I S		210
TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC		630
<i>CDR-L3</i>		
S L Q P E D F A T Y Y C Q Q S		225
AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAC TAC TGT CAA CAG AGT		675
<i>FR-L4</i>		
Y S T P L T L G Q G T K V E I		240
TAC AGT ACC CCT CTG ACG TTA GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC		720
K R A A A		
AAA CGG GCG GCC GCA		

Abb. 3-5: Aminosäure- und DNA-Sequenz von scFv Nr. 15

Aminosäure- und DNA-Sequenz des Anti-G α -scFv Nr. 15 (5'→3'). Dargestellt sind die Sequenz des komplementären Stranges als Triplettabfolge nach Sequenzierung im Vektor pIT1 und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz.

VH: variable Domäne der schweren Kette; **Linker:** Linkersequenz; **VL:** variable Domäne der leichten Kette; **CDR-H1-3** bzw. **CDR-L1-3:** hypervariable Bereiche der variablen schweren und leichten Ketten; **FR-H1-3** bzw. **FR-L1-3:** Gerüstregionen der variablen schweren und leichten Ketten.

Um den scFv Nr. 15 in ausreichender Quantität und Qualität zu produzieren, wurde er nach Expression in *E.-coli*-(HB2151)-Zellen aus dem Kulturüberstand extrahiert und mithilfe einer rProtein-LTM-Agarose-Säule gereinigt. rProtein-LTM, ein Protein aus *Peptostreptococcus magnus*, bindet Immunglobuline vorrangig über die κ -light-chain, ohne mit der Antigen-bindenden Region zu interferieren. Besonders starke Bindungsaffinität besteht zu den humanen κ -light-chain-Unterklassen I, III und IV.

3.1.2.4 Konstruktion eines Expressionsvektors

Das heterotrimere G-Protein, an dessen α -Untereinheit der zu exprimierende scFv binden sollte, ist wahrscheinlich mit der Plasmamembran assoziiert (Roos et al., 1999). Deshalb erschien es sinnvoll, die Expression des scFv auf das Zytosol zu begrenzen.

Das selektive Targeting von Proteinen ist durch die Konstruktion der für die Expression erforderlichen DNA-Sequenz („Expressionskassette“) steuerbar. Dabei ist die Promotorregion ausschlaggebend für das zur Expression befähigte Gewebe, während Signalpeptide für die Steuerung des Proteintransports zwischen den zellulären Kompartimenten verantwortlich sind. Für die zytosolische Expression von scFv in Pflanzenzellen hat sich der 35S-Promotor aus dem Cauliflower-Mosaic-Virus (CaMV) als günstig erwiesen. Das Targeting ins Zytosol geschieht hier durch Abwesenheit einer N-terminalen Signalsequenz, welche sonst die kompartimentspezifische Aufnahme des scFv aus dem Zytosol, z.B. ins Endoplasmatische Retikulum bewirkt (Artsaenko et al., 1995; Conrad et al., 1998; Leps, 2003). Die zytosolische Expression von scFv ist aufgrund des reduzierenden Milieus und eines dadurch begünstigten, möglichen Abbaus des Proteins problematisch (Bruyins et al., 1996). Die maximalen Expressionshöhen liegen meist unter denen, die im Endoplasmatischen Retikulum erreicht werden (Conrad et al., 1998). Um die Stabilität des scFv im Zytosol zu erhöhen, wurde die Expressionskassette C-terminal zur c-myc-Sequenz um die Sequenz für das Tetrapeptid Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) ergänzt. Dieses Tetrapeptid ist bekannt für seine Funktion, die Retention von Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum zu bewirken (Pelham, 1989, Denecke et al., 1992). In Abwesenheit einer N-terminalen Targeting-Sequenz (s.o.) bewirkt die C-terminale KDEL-Sequenz offenbar eine Stabilisierung von scFv im Zytosol (Schouten et al., 1997). Die Wirkungs-

weise der Stabilisierung durch KDEL ist bisher nicht eindeutig geklärt. Möglicherweise handelt es sich um einen Schutz vor C-terminalem Proteinabbau. Die für das Anti-G α -scFv-Protein kodierende Sequenz wurde aus dem pIT1-Phagemid-Vektor herausgeschnitten und mit einem linearisierten Fragment des Vektors pRTRA 7/3 (Artsaenko et al., 1995, Abb. 3-6) ligiert. Dieser Vektor enthält eine Expressionskassette, die sich aus dem CaMV35S-Promotor, dem Legumin-B4-Signalpeptid, einem scFv, dem c-myc-tag, dem KDEL-Peptid und dem CaMV35S-Terminator zusammensetzt.

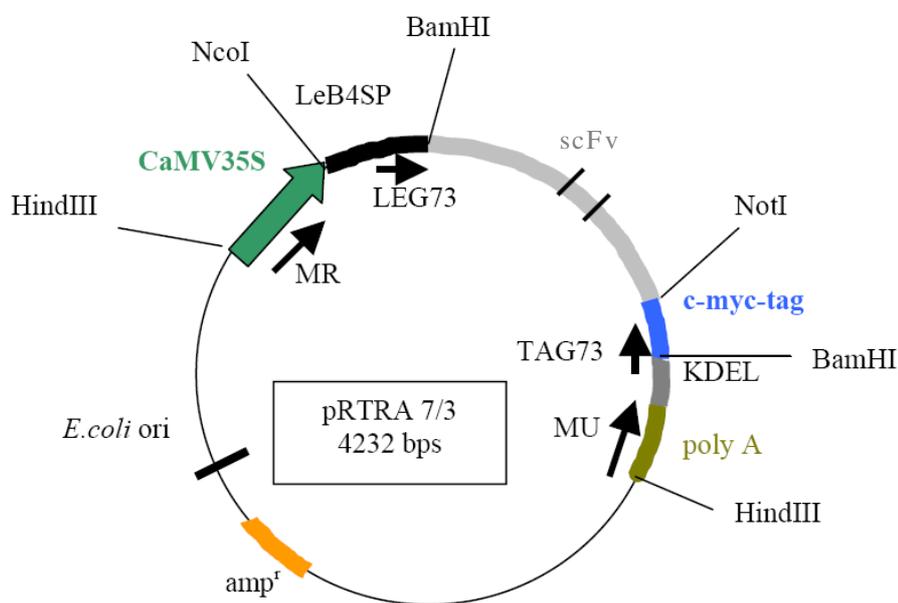


Abb. 3-6: Schematische Darstellung des Vektors pRTRA 7/3

Durch Ersetzen der LeB4SP- und der ursprünglichen scFv-Sequenz durch die anti-G α -scFv-Sequenz wurde die Expressionskassette für die cytosolische Expression optimiert.

CaMV35S: Cauliflower-Mosaic-Virus-35S-Promotor; **LeB4SP:** Signalpeptid für kompartimentspezifische Aufnahme des Fusionsproteins; **HindIII, NcoI, BamHI, NotI:** Restriktionsschnittstellen; **scFv:** DNA-Sequenz des scFv-Antikörpers; **c-myc-tag:** Erkennungssequenz für den 9E10-Antikörper für qualitativen und quantitativen scFv-Nachweis; **KDEL:** Retentionssequenz für Endoplasmatisches Retikulum; **poly A:** poly-Adenin-Sequenz; **amp^r:** Ampicillin-Resistenz-Gen; **E.coli ori:** E.-coli-Replikationsursprung; **MR, MU, LEG73, TAG73:** priming sites zur Sequenzierung (Darstellung: Ten Hoopen, 2002)

Mittels Linearisierung und Ligation wurden das Signalpeptid und die scFv-Sequenz durch die Anti-G α -scFv-Sequenz ersetzt. Die resultierende Expressionskassette für das scFv-KDEL-Fusionsprotein (ohne Legumin-B4-Signalpeptid) sollte die zytosolische Expression des scFv gewährleisten (Abb. 3-7).

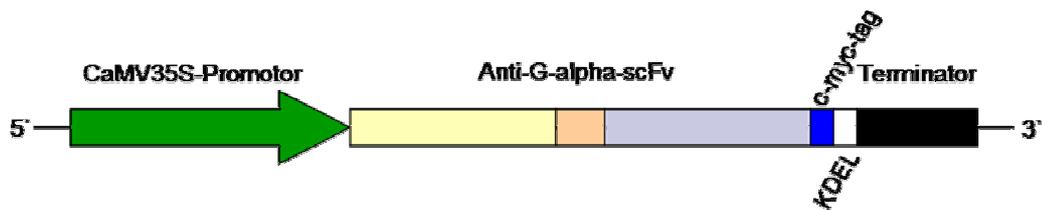


Abb. 3-7: Expressionskassette im pCB301-Kan-Vektor für die zytosolische Expression

Zur Expression kommt ein Anti-G α -Einkettenantikörper (scFv), C-terminal fusioniert mit einem c-myc-tag (9E10-Antikörper kann dadurch zum Nachweis eingesetzt werden) und der KDEL-Sequenz (dadurch Stabilisierung des scFv im Zytosol).

Diese Expressionskassette wurde aus dem nun veränderten pRTRA 7/3 geschnitten und in den Vektor pCB301-Kan (Scheller et al., 2004, Abb. 3-8) ligiert. Dieser basiert auf dem Mini-Binärvektor pCB301, welcher sich aufgrund seiner geringen Größe leicht in vitro manipulieren lässt und über eine Vielzahl einfach vorhandener Restriktionsorte innerhalb der „multiple cloning site“ verfügt (Xiang et al., 1999).

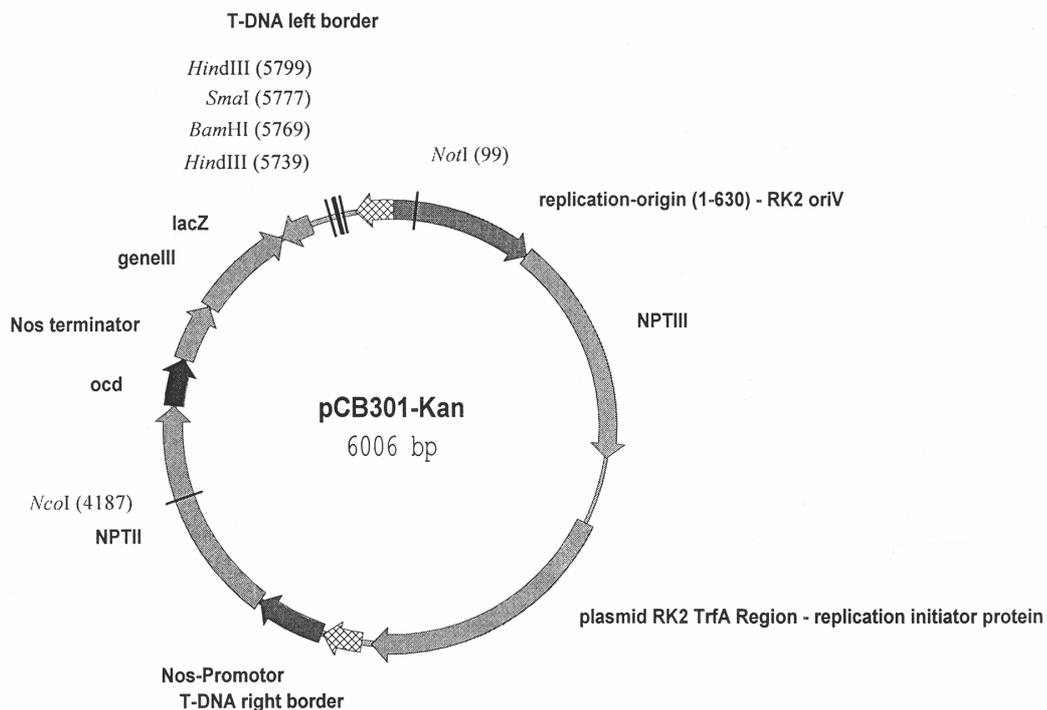


Abb. 3-8: Schematische Darstellung des pCB301-Kan-Vektors

HindIII, SmaI, BamHI, NcoI, NotI: Restriktionsschnittstellen; **NPTIII/NPTII:** Aminoglykosid-Resistenz-Gene für Bakterien/Pflanzenzellen vermitteln Resistenz gegenüber Kanamycin/Paromomycin (Darstellung: U. Conrad, IPK Gatersleben, BRD)

Er erschien auch für die Expression in *E. californica* geeignet. pCB301-Kan enthält ein T-DNA-Fragment des Binärvektors pBIN19 (Bevan, 1984), welches das *npII* (Neomycin-Phosphotransferase)-Gen trägt. Dieses Gen ermöglicht es Pflanzen, Neomycin-Phosphotransferase zu exprimieren, wodurch eine Resistenz der transformierten Zellen gewährleistet wird, beispielsweise gegenüber Kanamycin.

3.1.2.5 Transformation von *Eschscholzia californica*-Zellkulturen

Als Ausgangsmaterial für die Transformation von *Eschscholzia californica* mit dem Anti-G α -scFv-Konstrukt dienten Kalluskulturen, die aus Wurzelmaterial von Ganzpflanzen gewonnen worden waren. Da die erwarteten transgenen Zellkulturen u.a. für Experimente zur Pathogenabwehr verwendet werden sollten, erschien es notwendig, auf das häufig als Vektor eingesetzte, T-Plasmid tragende *Agrobacterium* zu verzichten, um bakterielle Kontaminationen auszuschließen. Deshalb kam zur Transformation die biolistische Methode („particle bombardment“) zur Anwendung, die inzwischen zu den biotechnologischen Standardverfahren gehört (Marc et al., 1998, Digeon et al., 1999, Sawahel, 2002, Jeoung et al., 2002). Zur positiven Selektion transformierter Zellen wurde Paromomycin eingesetzt. Dieses Aminoglykosid-Antibiotikum zeigt seine Wirksamkeit gegenüber untransformierten Zellen von *Eschscholzia californica* und *Papaver somniferum* bereits bei deutlich niedrigeren Konzentrationen als das häufig verwendete Kanamycin (Belny et al., 1997, Park et al., 2000).

Nach dem Gentransfer wurden Suspensionskulturen aus den auf Paromomycin-haltigem Selektionsmedium gewachsenen Kalli etabliert. Insgesamt zeigten 19 von 32 behandelten Kalli ein Wachstum, d.h. erfolgreichen Gentransfer bezüglich der Paromomycin-Resistenz. Nicht biolistisch behandeltes Kallusmaterial zeigte auf dem Selektionsmedium kein Wachstum (Abb. 2-4, S. 43)

3.1.3 Charakterisierung der transformierten *Eschscholzia*-Zelllinien

3.1.3.1 Qualitativer und quantitativer Nachweis der scFv-Expression

Suspensionskulturen des Wildtyps und von 6 transformierten Zelllinien wurden auf die Anwesenheit von scFv untersucht, wobei der im scFv-Molekül vorhandene c-myc-tag als Erkennungsmerkmal diente. Es zeigte sich, dass alle unter-

suchten Zelllinien das scFv-Protein exprimierten (Abb. 3-9). Die durch die Transformation erworbene Resistenz gegenüber Paromomycin war demnach immer mit der Expression einer nachweisbaren scFv-Menge verbunden. Ein weiteres, kleineres Protein, welches mit dem anti-c-myc-Antikörper kreuzreagiert, kommt sowohl im Wildtyp als auch in den Transformanten vor und stellt keinen scFv dar.

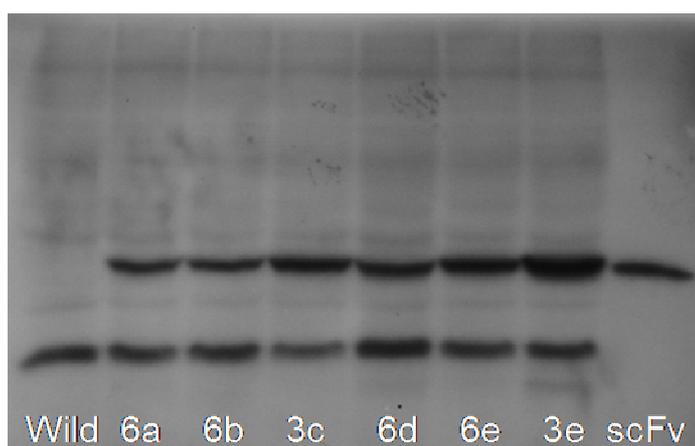


Abb. 3-9: Nachweis der scFv-Expression in transformierten Zelllinien von *E. californica* (Western-Blot)

Western-Blot mit Gesamt-Proteinextrakten aus Wildtyp (ganz links) und transformierten Zelllinien (6a-3e). Bakteriell exprimierter scFv (ca. 125 ng) wurde als Referenz aufgetragen (ganz rechts). Erstantikörper: anti-c-myc (9E10); Zweitantikörper: anti-Maus-AP-Konjugat

Der scFv-Gehalt wurde anhand einer Konzentrationsreihe des bakteriell exprimierten scFv-Proteins (Standard) per Western-Blot ermittelt und auf den Gesamtgehalt der löslichen Proteine (TSP) der transformierten Zellsuspension bezogen.

Die Expressionshöhe lag für die untersuchten Zelllinien zwischen 0,006 % und 0,018 % des TSP (3,1 - 9,3 µg scFv/g dwt) und damit niedriger als bei scFv gegen andere Proteine in Ganzpflanzen, z.B. in *Nicotiana tabacum* („anti-phytochrome“, „anti-artichoke mottled crinkle virus“) und *Solanum tuberosum* („anti-β-1,4-endoglucanase“). Diese führten bei zytosolischer Expression zu zehn- bis dreißigfach höheren Expressionsniveaus (Conrad et al., 1998). Das zytosolische Volumen von suspensionskultivierten Zellen von *E. californica* beträgt ca. 0,686 ml/g dwt (Viehweger et al., 2002). Daraus resultiert bei ausschließlich zytosolischem Auftreten des scFv eine Konzentration von 4,5–13,6 µg scFv/ml bzw. 0,17–0,50

μM . Bei dem verhältnismäßig großen Molekulargewicht des Zielproteins $G\alpha$ von ca. 42.000 und dessen damit erwartungsgemäß niedriger Konzentration sollte o.g. scFv-Konzentration ausreichend sein, um eine Wirkung auf das Zielprotein zu erreichen, sofern eine hohe Affinität des scFv zum G-Protein intrazellulär gewährleistet ist.

Innerhalb einer Kultivierungsperiode (11-12 Tage) war ein kontinuierlicher Rückgang des scFv-Expressionsniveaus zu beobachten (Abb. 3-10). Der mittlere scFv-Gehalt (Vergleich ähnlicher Kulturalter) blieb dagegen über Monate stabil (Abb. 3-11).

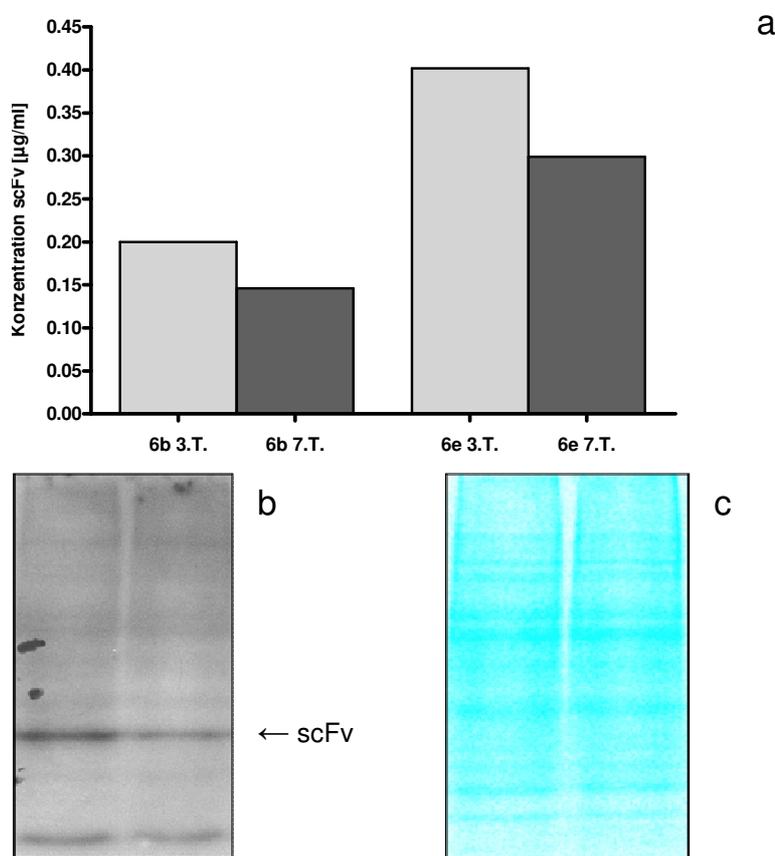


Abb. 3-10: Rückgang des scFv-Expressionsniveaus innerhalb einer Kultivierungsperiode

- a) Das Diagramm zeigt die Konzentration des scFv-Antikörpers in Extrakten der Zelllinien TGA6b und TGA6e an den Kulturtagen 3 und 7. Die Quantifizierung des scFv erfolgte per Western-Blot.
- b) Die Abbildung zeigt einen Western-Blot mit Extrakten der Zelllinie TGA6b vom 3. (links) und 7. (rechts) Kulturtag. Erstantikörper: anti-c-myc (9E10); Zweitantikörper: anti-Maus-AP-Konjugat.
- c) Die Abbildung zeigt den selben Western-Blot wie (b) nach Fast-Green-Färbung (Beleg identischer Gesamt-Proteinmenge für beide Kulturtage).

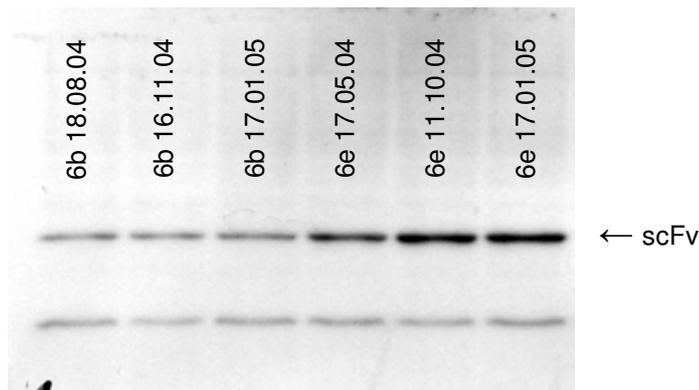


Abb. 3-11: Nachweis langfristig stabiler scFv-Expression

Western-Blot mit Gesamt-Proteinextrakten aus 2 transformierten Zelllinien (TGA6b, TGA6e). Die Extrakte wurden an den jeweils angegebenen Tagen (jeweils 10. Kulturtag) gewonnen. Es wurden pro Bahn ca. 11 μ g Gesamt-Protein aufgetragen.

Erstantikörper: anti-c-myc (9E10); Zweitantikörper: anti-Maus-AP-Konjugat.

3.1.3.2 Bindungsaffinität des in *Eschscholzia californica* exprimierten scFv zu $G\alpha$

Das Phage-Display zur Suche nach einem geeigneten, $G\alpha$ -bindenden scFv war mit bakteriell exprimierten scFv-Proteinen und einem Fragment des $G\alpha$ -Proteins durchgeführt worden. Es wurde ein in-vitro-Test per ELISA durchgeführt, um zu prüfen, ob das in *E. californica* exprimierte scFv-Protein eine Bindungsaffinität gegen das vollständige $G\alpha$ -Protein dieser Pflanze besitzt. Für die Analysen zur Funktion des scFv im Signaltransfer sollten Zelllinien ausgewählt werden, die Antikörper mit möglichst starker Bindungsaffinität exprimierten. Eine signifikante Affinität des pflanzlich exprimierten scFv zum vollständigen, heterolog exprimierten $G\alpha$ aus *E. californica* (s. Kap. 3.2.4) konnte für die beiden untersuchten Zelllinien festgestellt werden (Abb. 3-12).

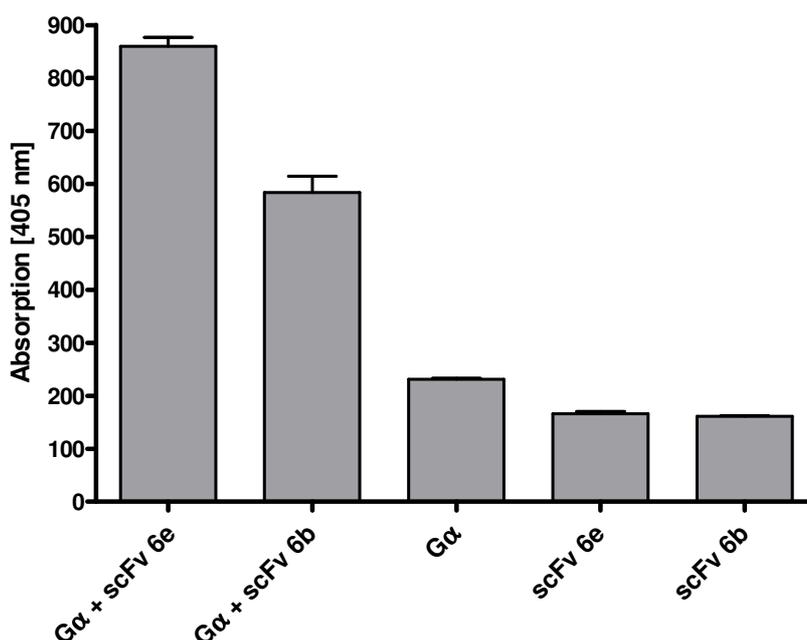


Abb. 3-12: Affinitätstest mit anti-G α -scFv aus zwei transformierten Zelllinien von *E. californica* (ELISA)

Die wells a-c der Mikrotiterplatte wurden mit bakteriell exprimiertem G α -Protein (16 μ g/ml in PBS) beschichtet. Die wells d+e wurden nicht beschichtet. Alle wells (a-e) wurden mit BSA geblockt.

- a+d) Die wells wurden mit gereinigtem scFv aus Zelllinie TGA6e (ca. 1,2 μ g/ml) versetzt,
- b+e) Die wells wurden mit gereinigtem scFv aus Zelllinie TGA6b (ca. 1,2 μ g/ml) versetzt,
- c) Die wells wurden mit 3 % BSA in PBS versetzt.

Die Absorptionsmessung erfolgte 65 min. nach Substratzusatz (SD, n=3).

3.1.4 Wirkung des anti-G α -scFv auf den Elicitor-ausgelösten Signaltransfer

3.1.4.1 Die Elicitierung der Alkaloidantwort in scFv-exprimierenden Zelllinien

In Kap. 1.3 wurde darauf hingewiesen, dass in kultivierten Zellen von *E. californica* zwei separate, konvergente Signalwege zur Expression der Phytoalexin-Biosynthese existieren, welche jeweils durch niedrige bzw. hohe Elicitorkonzentrationen ausgelöst werden (Roos et al., 2006). Um die Auswirkung der scFv-Expression auf beide Signalwege zu testen, wurden die Transformanten auf ihre Alkaloid-Antwort nach Behandlung mit niedrigen (ca. 1 μ g/ml) und hohen Elicitorkonzentrationen (bis 100 μ g/ml) untersucht. Diese schwankte in einem breiten Bereich, wobei typischerweise Werte unterhalb derer des Wildtyps auftraten.

Für die weiteren Versuche wurden zwei Zelllinien ausgewählt, deren Alkaloid-Antwort auf hohe Elicitorkonzentrationen (Ergebnis beider Signalwege bei Sättigung der Signalstärke) bei mehreren Bestimmungen maximale Werte erreichte (70 bis 75 % im Vergleich zum Wildtyp). Die Wahrscheinlichkeit einer generellen Beeinträchtigung der Expression der Biosynthese-Gene erschien bei diesen Kulturen am geringsten. Bei näherer Untersuchung dieser Linien stellte sich heraus, dass die Antwort auf niedrige Elicitorkonzentrationen stärker reduziert war als die Reaktion auf hohe Konzentrationen. In Abbildung 3-13 ist das Ergebnis eines typischen Experiments für die Linien TGA6b, TGA6e und den Wildtyp dargestellt.

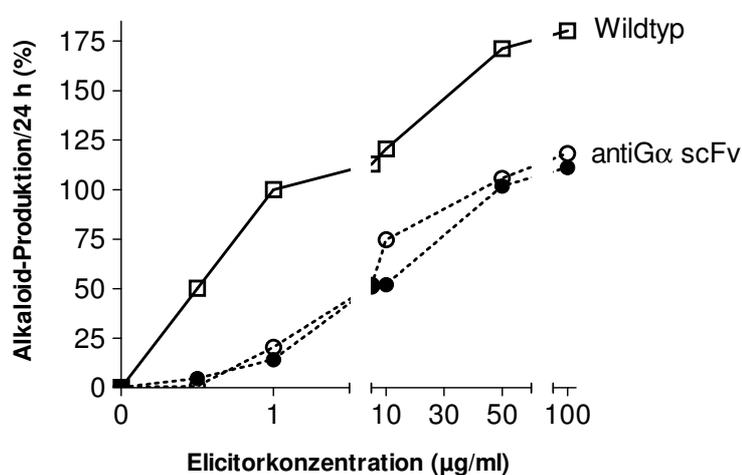


Abb. 3-13: Alkaloid-Antwort, ausgelöst durch verschiedene Elicitorkonzentrationen

Dargestellt ist der Anstieg der Alkaloidkonzentration in Zellsuspensionen innerhalb 24 h nach Behandlung mit Elicitor.

- Offene Kreise: TGA6b (5. Kulturtag),
- Geschlossene Kreise: TGA6e (5. Kulturtag).

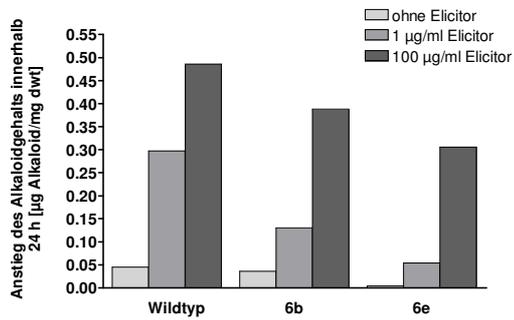
Aufgrund der Variabilität der Alkaloid-Antwort zwischen verschiedenen Kultur-Proben wurden die Messwerte normalisiert, d.h. in Bezug auf die mittlere Alkaloid-Antwort des Wildtyps nach Behandlung mit 1 µg/ml Elicitor, die 100 % gesetzt wurde, dargestellt. Die Versuche wurden für jede Zelllinie an dem Tag mit der normalerweise stärksten Alkaloid-Antwort durchgeführt (Abb. aus Viehweger et al., 2006).

Ein weniger einheitliches Bild ergab sich, wenn die Alkaloidantwort auf Elicitorkontakt nach kürzerer und längerer Kultivierungsdauer verglichen wurde, z.B. am 3. und 7. Kulturtag (eine Kultivierungsperiode umfasste 11 bis 12 Tage). In Abb. 3-14 ist ein typisches Versuchsergebnis dargestellt. Beide Zelllinien zeigten nach kurzer Kultivierungsdauer die Tendenz zu verminderter Reaktion auf kleine Elicitorkonzentrationen. Dies war stärker bei Linie TGA6e ausgeprägt, während Linie

TGA6b relativ oft die gleiche Reaktion auf hohe und niedrige Elicitorkonzentrationen zeigte, d.h. eine maximale Alkaloidproduktion bereits bei niedriger Elicitorkonzentration (Abb. 3-15). Nach längerer Kultivierung wurde meist eine ansteigende Alkaloidantwort auf niedrige Elicitorkonzentrationen erhalten. Die Alkaloidantwort der Zelllinien auf Elicitorkontakt wurde über mehrere Monate verfolgt, wobei sich die Tendenz weiter verfestigte: der Quotient aus Alkaloidproduktion nach niedrigen und höheren Elicitorkonzentrationen war nach kurzer Kultivierung deutlich kleiner als im Wildtyp und näherte sich diesem mit längerer Kultivierungsdauer.

Diesen Ergebnissen wird in Abb. 3-14/15 die scFv-Expressionshöhe derselben Kulturen gegenübergestellt. Das höhere Expressionsniveau von scFv in TGA6e korreliert mit der dort stabil nachweisbaren Wirkungshemmung niedriger Elicitorkonzentrationen. Die maximal elicitierbare Alkaloidproduktion wird durch die Höhe der scFv-Expression nicht beeinträchtigt. Dies spricht dafür, dass die scFv-Expression die Fähigkeit zur Alkaloidproduktion (Biosynthese) generell kaum vermindert, sondern den durch niedrige Elicitorkonzentrationen ausgelösten Signalweg beeinflusst. Außerdem zeigen die dargestellten Ergebnisse, dass mit zunehmendem Kulturalter der Einfluss der scFv auf die Wirkung kleiner Elicitorkonzentrationen abnimmt. Der Verlust der Antikörperwirkung auf Auslösung der Alkaloid-Biosynthese bei höherem Kulturalter korreliert mit dem Absinken des scFv-Gehaltes während einer Kultivierungsperiode (s. Kap. 3.1.3.1).

3. Kulturtag



7. Kulturtag

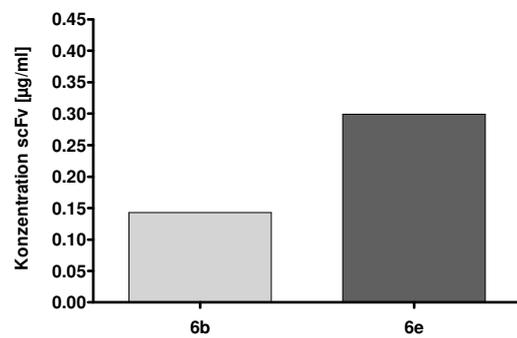
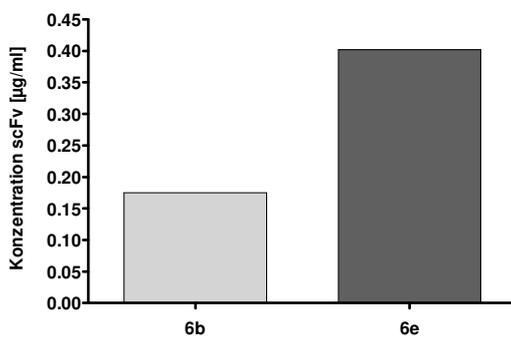
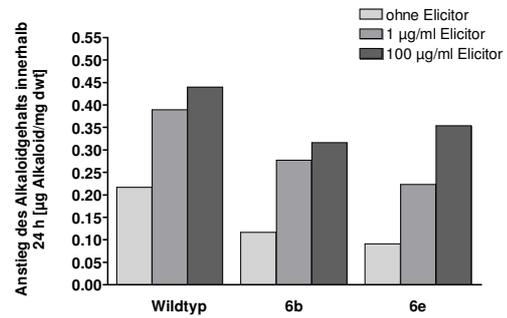


Abb. 3-14: Alkaloid-Antwort und scFv-Expression von anti-Gα-scFv-Zelllinien (1)

oben:

Die transformierten Zelllinien TGA6b und TGA6e sowie der Wildtyp von *E. californica* wurden ohne Elicitor, mit 1 µg/ml Elicitor und mit 100 µg/ml Elicitor behandelt. Dargestellt ist der jeweilige Anstieg der Alkaloidkonzentration innerhalb 24 Stunden nach Elicitorung am 3. und 7. Kulturtag.

unten:

Die Diagramme zeigen die Konzentration des scFv-Antikörpers in den Extrakten an den Kulturtagen 3 und 7 für die Zelllinien TGA6b und TGA6e. Die Quantifizierung des scFv erfolgte per Western-Blot. Elicitorbehandlung und Probenentnahme zur Quantifizierung des scFv-Antikörpers erfolgten jeweils am selben Tag.

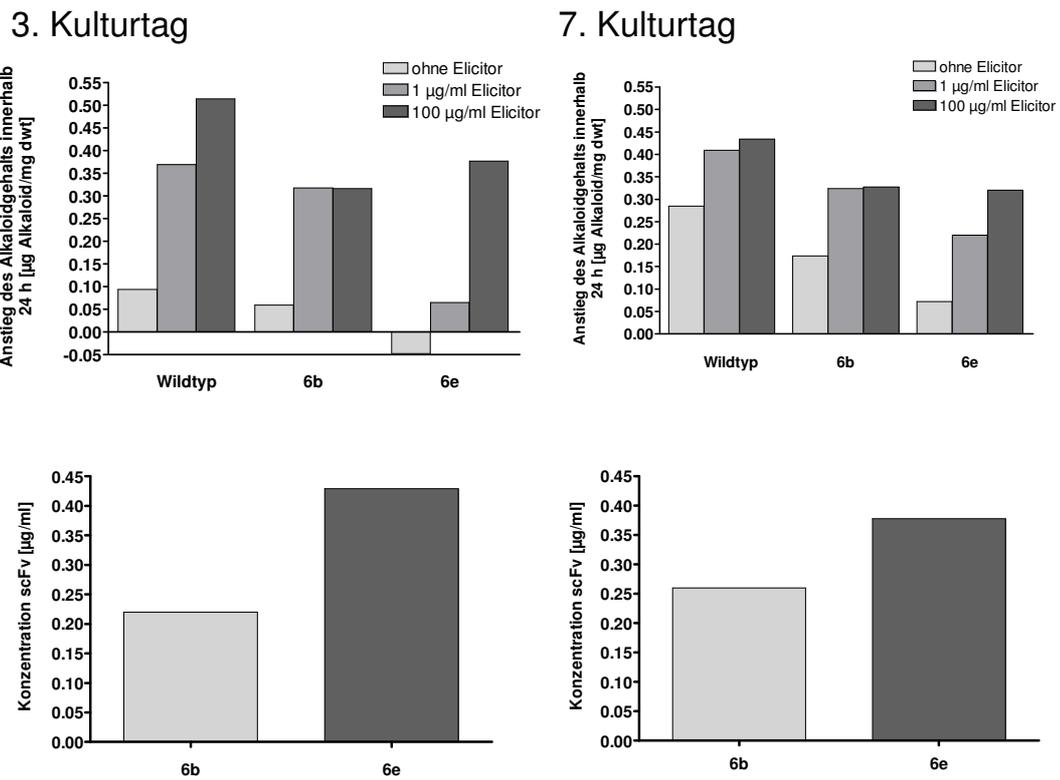


Abb. 3-15: Alkaloid-Antwort und scFv-Expression von anti-G α -scFv-Zelllinien (2)

oben:

Die transformierten Zelllinien TGA6b und TGA6e sowie der Wildtyp von *E. californica* wurden ohne Elicitor, mit 1 µg/ml Elicitor und mit 100 µg/ml Elicitor behandelt. Dargestellt ist der jeweilige Anstieg der Alkaloidkonzentration innerhalb 24 Stunden nach Elicitorung am 3. und 7. Kulturtag.

unten:

Die Diagramme zeigen die Konzentration des scFv-Antikörpers in den Extrakten an den Kulturtagen 3 und 7 für die Zelllinien TGA6b und TGA6e. Die Quantifizierung des scFv erfolgte per Western-Blot.

Elicitorbehandlung und Probenentnahme zur Quantifizierung des scFv-Antikörpers erfolgten jeweils am selben Tag.

3.1.4.2 Die Kontrolle der Phospholipase A₂-Aktivität in scFv-exprimierenden Zelllinien

Frühere Arbeiten hatten bereits Hinweise darauf erbracht, dass die PLA₂ der Plasmamembran einen für die Auslösung der Alkaloid-Biosynthese essentiellen second-messenger, das Lysophosphatidylcholin (LPC), produziert (s. Kap. 1.3; Viehweger et al., 2002). Deshalb wurde untersucht, ob die Expression des scFv eine Verminderung der Elicitor-vermittelten Aktivierung der PLA₂ zur Folge hat. Experimente von Viehweger et al. (2006) bestätigten diese Vermutung (Abb. 3-16). Die Einwirkung niedriger Elicitorkonzentrationen (bis 1 µg/ml) rief bei den Anti-Gα-scFv-Linien, im Gegensatz zum Wildtyp, keine erhöhte Aktivität der PLA₂ hervor. Demgegenüber lösten hohe Elicitorkonzentrationen eine dem Wildtyp ähnliche bzw. sogar größere Aktivität der PLA₂ aus. Bei dieser Aktivität scheint es sich um eine andere, nicht Gα-kontrollierte PLA₂ zu handeln, die am Signaltransfer nach hohen Elicitor-Konzentrationen beteiligt ist. Dies wäre bei der nachgewiesenen Bedeutung von Jasmonat für diesen Signalweg nachvollziehbar (Färber et al., 2003).

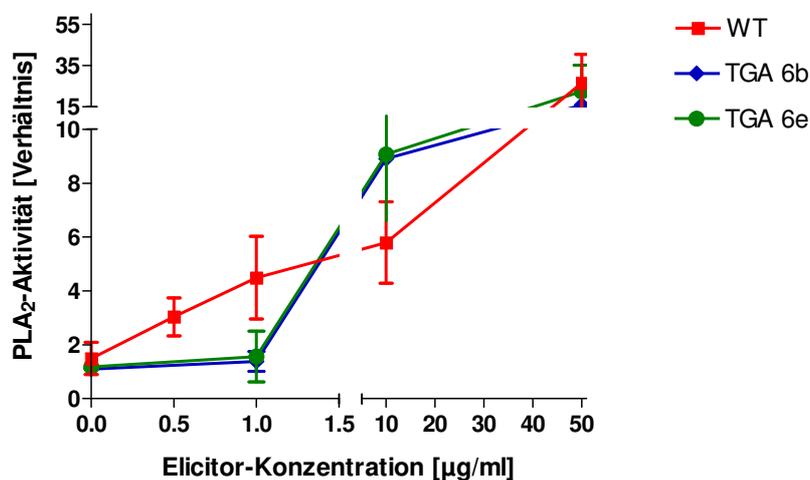


Abb. 3-16: Aktivität der Phospholipase A₂ in Zellen des Wildtyps und in anti-Gα-scFv-Zelllinien

Die Aktivität der PLA₂ wurde in Wildtyp-Zellen (WT) sowie in scFv-exprimierenden Zellen (TGA6b und TGA6e) nach Zugabe des fluorogenen Substrates bis-BODIPY®-C11-PC und Hefeelicitor in den angegebenen Konzentrationen bestimmt.

Dargestellt ist die durch nichtlineare Regression aus dem Fluoreszenz-Anstieg und der jeweiligen Zellzahl ermittelte Aktivität der PLA₂ in Abhängigkeit von der Elicitorkonzentration (Abb. aus Viehweger et al., 2006).

Antisense-Transformanten mit drastisch reduziertem $G\alpha$ -Gehalt verhielten sich analog (Viehweger et al., 2006). Das bedeutet, dass beide Strategien zur Manipulation des $G\alpha$ -Proteins, d.h. die Verminderung seiner Menge über die antisense-Transformation wie auch die Beeinflussung seiner Aktivität durch die Expression eines bindenden Antikörpers, auf eine Kontrolle der PLA_2 durch dieses Protein hinweisen.

3.1.4.3 Veränderte $G\alpha$ -Konzentration in scFv-exprimierenden Zelllinien

In Kap. 3.1.4.1 wurde gezeigt, dass die in den anti- $G\alpha$ -scFv-Zelllinien beobachtete Hemmung der Elicitorwirkung mit zunehmendem Kulturalter deutlich abnimmt. In einigen Fällen konnte in der zweiten Hälfte der Kultivierungszeit (Kulturalter > 6 d) der völlige Verlust der Antikörperwirkung, also eine vollständige Übereinstimmung mit der Alkaloidproduktion des Wildtyps festgestellt werden. Auch wenn der Hintergrund für dieses Phänomen nicht abschließend geklärt werden konnte, wurden erste Experimente für eine mögliche Erklärung durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass die scFv-exprimierenden Zelllinien mehr $G\alpha$ -Protein enthalten als der Wildtyp. Dabei korreliert ein erhöhter Gehalt an anti- $G\alpha$ -scFv mit erhöhtem Gehalt an $G\alpha$, wie bei den Zelllinien TGA6b und TGA6e gezeigt werden konnte (Abb. 3-17).

Es ist bisher unklar, ob die Erhöhung der $G\alpha$ -Konzentration in den untersuchten Zelllinien eine Verstärkung der Neusynthese oder einen verminderten Abbau von $G\alpha$ widerspiegelt. In jedem Fall belegen diese Ergebnisse eine spezifische Reaktion der Zellen auf die Expression eines zusätzlichen, $G\alpha$ -bindenden Proteins. In Kap. 3.1.1 wurde auf Spezifika der bisher durchgeführten Strategien zur Manipulation des $G\alpha$ -Proteins in *Eschscholzia* eingegangen. Während bei der früher angewandten antisense-Transformation die Expression und damit die vorhandene Menge des Zielproteins selbst reduziert wurde (Viehweger et al., 2006), ist dies bei der im Rahmen dieser Arbeit etablierten Expression eines künstlichen und die Funktion des $G\alpha$ möglicherweise beeinträchtigenden Bindeproteins nicht der Fall. Die unter diesen Bedingungen festgestellte Expressionserhöhung des $G\alpha$ zeigt, dass in den anti- $G\alpha$ -scFv exprimierenden Zelllinien die Expression von $G\alpha$ nicht nur unbehindert abläuft, sondern die Beeinträchtigung der Funktion(en) von $G\alpha$ „erkannt“ und mit Überproduktion dieses Proteins beantwortet werden kann. Durch ihre Fähigkeit, die möglichen Ausfallserscheinungen zu kompensieren,

zeigen die anti-G α -scFv-Zelllinien einen weniger stark vom Wildtyp abweichenden Phänotyp als die antisense-Linien (z.B. bezüglich Wachstumsrate, maximale Alkaloidproduktion, Reaktion auf Elicitor-Kontakt).

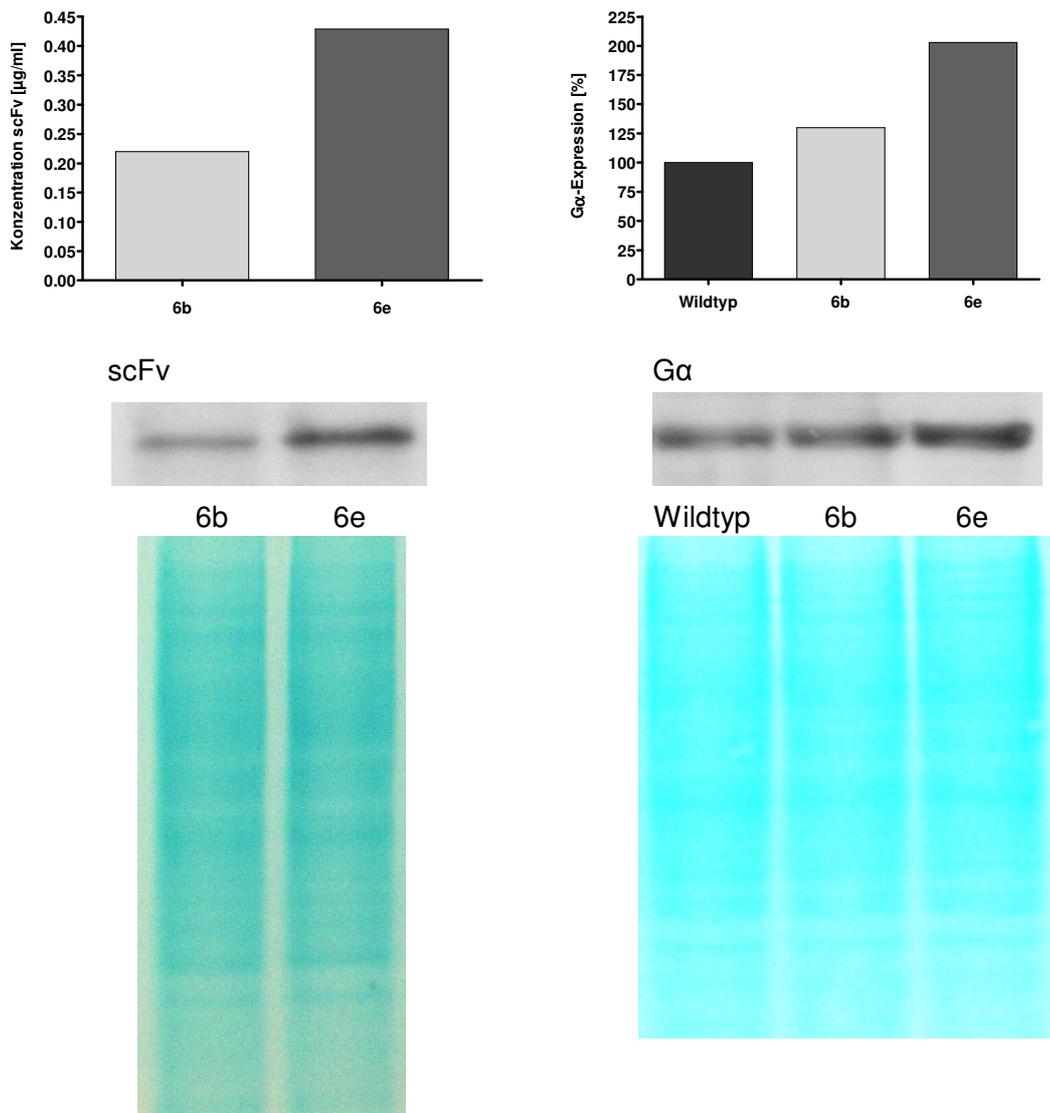


Abb. 3-17: Vergleich der Proteinmengen von anti-G α -scFv und G α

Am 3. Kulturtag wurden Proteinextrakte aus dem Wildtyp und den anti-G α -scFv-Zelllinien 6b und 6e gewonnen, auf gleichen Proteingehalt eingestellt und der Gehalt an anti-G α -scFv sowie G α per Western-Blot bestimmt.

- oben links: Gehalt an anti-G α -scFv,
 - oben rechts: Gehalt an G α (der Gehalt beim Wildtyp wurde 100 % gesetzt),
 - unten: Fast-Green-Färbung derselben Western-Blots zum Vergleich der vorhandenen Proteinmengen.
- Die Quantifizierung von scFv und G α erfolgte durch digitale Bildanalyse der Western-Blots (Mitte).

Zur Detektion wurden verwendet:

- scFv-Erstantikörper: anti-c-myc (9E10, 1:50),
- scFv-Zweitantikörper: anti-Maus-AP-Konjugat (s. Material/Methoden),
- G α -Erstantikörper: w6-Antikörper (gegen rekombinantes G α 1-C-terminales Peptid, von P. Millner, University of Leeds, UK; 1:300),
- G α -Zweitantikörper: anti-Kaninchen-HRP-Konjugat 1:2000.

3.2 Das G α von *Eschscholzia californica*

3.2.1 Versuchsstrategie

Die heterologe Expression des G α -Proteins aus *E. californica* stellte ein wichtiges Ziel dieser Arbeit dar, um das Protein aus dieser Spezies für Bindungsstudien und analytische Bestimmungen sowie als Antigen für die Gewinnung von anti-G α -Antikörpern zur Verfügung zu stellen.

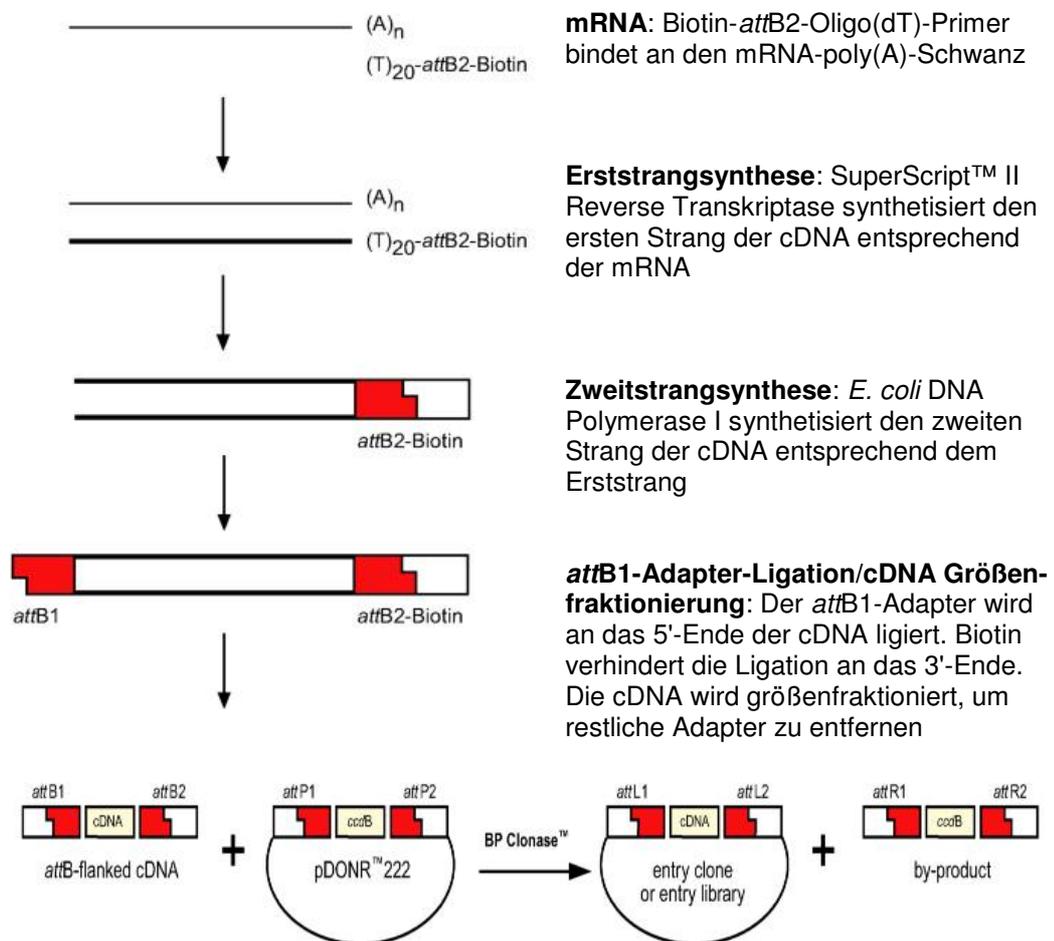
Zunächst wurde die vollständige G α -Gensequenz in einer *Eschscholzia*-cDNA-Bank identifiziert, wobei das bereits vorliegende Fragment (26 % des gesamten G α -Gens, s. Kap. 3.1.2.2) als Sonde diente.

In den bisher untersuchten Pflanzenspezies wurden jeweils nur eine G α -Untereinheit und ein dafür kodierendes single-copy-Gen gefunden. Für einige Mono- und Dicotyledonen wurden bereits G α -Untereinheiten kloniert, die untereinander 70 bis 90 % Sequenz-Identität aufwiesen (Ma et al., 1990, Assmann, 2002, Jones und Assmann, 2004). In Analogie zu diesen G α -Spezies wurde für das gesuchte Gen von *E. californica* eine Länge von ca. 1152 Basenpaaren erwartet.

3.2.2 Herstellung der cDNA-Bank und Screening nach dem G α -Gen

Die mittels des Phenol/LiCl-Verfahrens (de Vries, 1993) aus Zellmaterial von *E. californica* gewonnene mRNA war Grundlage für die Herstellung der cDNA-Bank, wofür das CloneMiner™-cDNA-Library-Construction-Kit von INVITRO-GEN™ genutzt wurde. Diesem Kit liegt die Gateway®-Technologie zugrunde. Sie basiert auf dem Rekombinationssystem des λ -Phagen und seiner Fähigkeit, λ -DNA an spezifischen Orten (att) in das *E. coli*-Chromosom zu integrieren. Das so in den Eingangsvektor (pDONR™222) gebrachte cDNA-Insert kann leicht mithilfe der Gateway-Technologie in andere Vektoren, beispielsweise zur Expression, eingesetzt werden. Zu diesem Zweck müssen dem Eingangsvektor lediglich der Zielvektor und ein Enzymgemisch zugesetzt werden, welcher den Transfer des DNA-Inserts zwischen den Vektoren vermittelt.

Obwohl mit dieser Technik auf die klassischen Klonierungsmethoden mittels Restriktionsendonukleasen verzichtet werden kann, besteht auch die Möglichkeit, die fertige cDNA-Bank mit Restriktase-basierten Methoden zu benutzen. In Abbildung 3-18 sind die einzelnen Arbeitsschritte beginnend mit der mRNA bis zur vollständigen cDNA-Bank schematisch dargestellt.



Gateway®-Rekombinations-Reaktion: *attB*-flankierte cDNA wird mit einem *attP*-enthaltenden Vektor (pDONR™222) rekombiniert, um eine *attL*-enthaltende Bank zu konstruieren. Diese Reaktion wird durch den BP-Clonase™-Enzym-Mix katalysiert.

Abb. 3-18: Schematische Darstellung der Konstruktion einer cDNA-Bank aus mRNA mithilfe der Gateway-Technologie (aus "Instruction Manual" des CloneMiner™ cDNA Library Construction Kit, INVITROGEN™, Karlsruhe, BRD)

Kompetente Zellen von *E. coli* (ElectroMAX™ DH10B™ T1) wurden anschließend mit den cDNA enthaltenden Plasmiden durch Elektroporation transformiert. Der verwendete Vektor trägt ein Resistenzgen (Neomycin-Phosphotransferase), welches die positive Selektion transformierter Zellen, z.B. durch Wachstum in Gegenwart von Kanamycin ermöglicht. Die unmittelbar nach der Transformation durchgeführte Bestimmung des Titers ergab für die Bank einen

Gesamtumfang von ca. 8 Millionen koloniebildender Einheiten (cfu), das entspricht ca. 0,7 Mio. cfu/ml und stimmt mit den Herstellerangaben überein.

Um die Qualität der erstellten cDNA-Bank zu überprüfen, wurden aus willkürlich ausgewählten Klonen Plasmide extrahiert und mithilfe einer Restriktionsendonuklease linearisiert. Durch Trennung des linearisierten Plasmids und des Inserts mittels Agarose-Gel-Elektrophorese wird die Größe des Inserts (cDNA) erkennbar (Abb. 3-19). Alle untersuchten Plasmide (24) enthielten cDNA. Die durchschnittliche Insertgröße betrug 1350 bp.

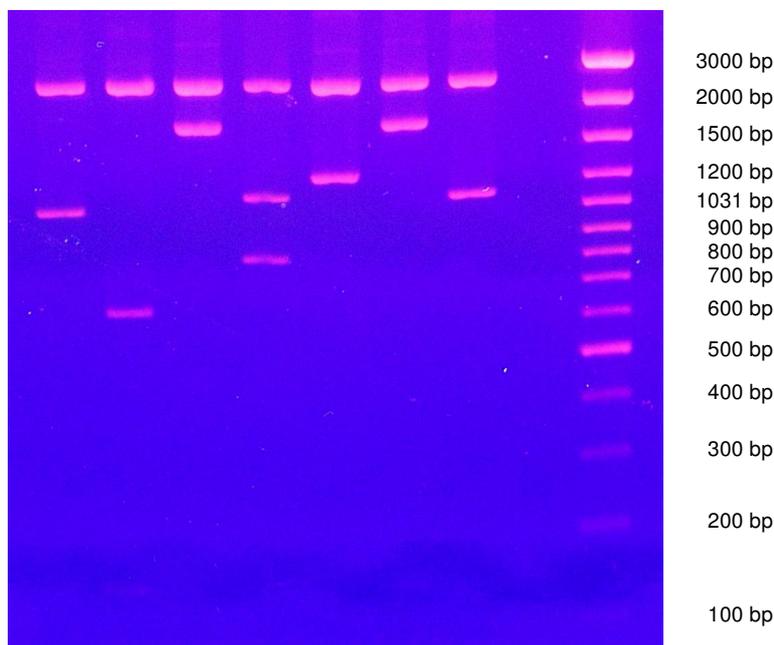


Abb. 3-19: Bestimmung von Insert-Größen der cDNA-Bank (Ethidiumbromid-Agarose-Gel)

Plasmid-DNA aus 7 Klonen der cDNA-Bank wurde mit der Restriktionsendonuklease *BsrGI* verdaut und auf ein Ethidiumbromid-Agarose-Gel aufgetragen. Rechts wurde ein DNA-Standard aufgetragen (peQ-Gold 100 bp DNA-Leiter Plus, peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, BRD).

Der linearisierte Plasmid-Rest (Größe 2500 bp) erscheint in allen Proben gleichermaßen. Die cDNA-Inserts haben für jeden Klon eine andere Größe. Durchschnittliche Insertgröße der cDNA-Bank (bestimmt für 24 Klone) ist 1350 bp.

Zur Hybridisierung der $G\alpha$ -DNA-Sonde mit cDNA wurde ein Teil der erstellten cDNA-Bank auf Nylon-Membranen fixiert. Das bereits beschriebene $G\alpha$ -DNA-Fragment (300 bp, s. Kap. 3.1.2.2) wurde als Sonde verwendet und hierfür radioaktiv markiert. Unter Verwendung des Rediprime II-Kit (GE-Healthcare, München, BRD) erfolgte eine randomisierte Markierung mit ^{32}P .

Als primäres Hybridisierungsergebnis konnten zunächst mehrere, potentiell positive Signale identifiziert werden (Abb. 3-20). Nach zweifacher Wiederholung dieser Prozedur wurde festgestellt, dass lediglich zwei der zunächst potentiell positiven Klone tatsächlich eine Hybridisierung mit der markierten Sonde eingingen. Nach einem dritten Hybridisierungsdurchgang konnten beide Klone einzeln isoliert (Abb. 3-21) und deren Plasmid-DNA sequenziert werden.

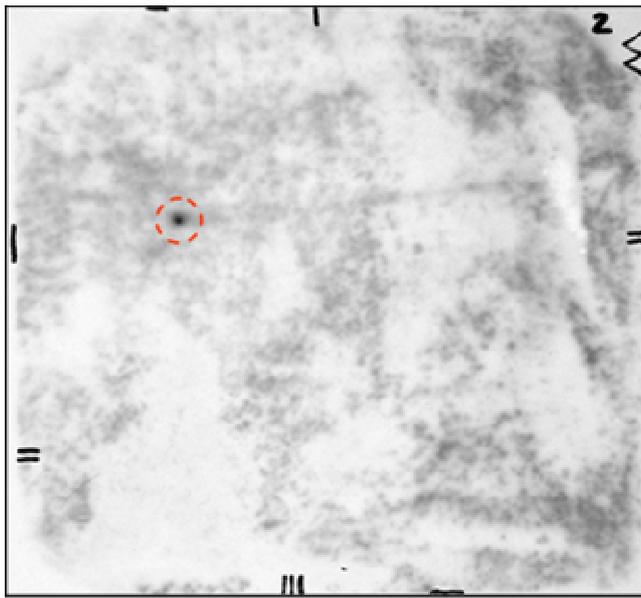


Abb. 3-20: Primäres Ergebnis des cDNA-Bank-Screenings (Autoradiogramm)

Dargestellt ist das Autoradiografie-Ergebnis einer der beim Screening der cDNA-Bank verwendeten Nylon-Membranen. Das gekennzeichnete, schwarze Signal zeigt einen der Klone, die ein positives Hybridisierungsergebnis erbrachten. Die vollständige Sequenz des gesuchten $G\alpha$ -Proteins wurde in diesem Klon nachgewiesen.

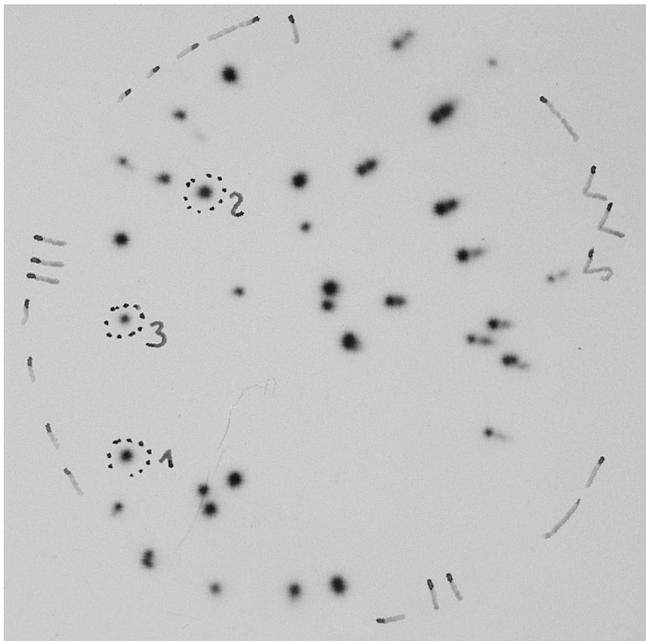


Abb. 3-21: Ergebnis des 3. Hybridisierungsdurchgangs (Autoradiogramm)

Dargestellt ist das Autoradiografie-Ergebnis einer der beim 3. Hybridisierungsdurchgang verwendeten Nylon-Membranen. Die den mit Zahlen gekennzeichneten Signalen zuzuordnenden Bakterien-Klone wurden kultiviert, die Plasmid-DNA sequenziert.

3.2.3 Die G α -Sequenz

Von den beiden bei der Hybridisierung positiv reagierenden Klonen enthielt nur einer die vollständige G α -Sequenz. Diese ist zusammen mit der daraus abgeleiteten Aminosäure-Sequenz in Abbildung 3-22 dargestellt. Das Protein besteht aus 384 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 44,6 kDa.

Tabelle 3-1 zeigt die hohe und bemerkenswert konstante Homologie des G α von *E. californica* zu den G α anderer Pflanzenspezies:

Spezies (Gen)	Zahl Aminosäuren	Identität zu <i>E.c.</i> -G α	Referenz
<i>Arabidopsis thaliana</i> (GPA1)	383	82 %	Ma et al., 1990
<i>Lotus japonicus</i> (LjGPA1)	384	84 %	Poulsen et al., 1994
<i>Lycopersicon esculentum</i> (TGA1)	384	82 %	Ma et al., 1991

Spezies (Gen)	Zahl Aminosäuren	Identität zu E.c.-G α	Referenz
<i>Lupinus luteus</i> (LGP α 1)	384	84 %	Kusnetsov et al., 1996
<i>Pisum sativum</i> (PGA1)	384	83 %	Marsh et al., 1999
<i>Pisum sativum</i> (PGA2)	384	82 %	Marsh et al., 1999
<i>Nicotiana tabacum</i> (NtGP α 1)	366	83 %	Saalbach et al., 1999
<i>Nicotiana tabacum</i> (NtGA2)	384	82 %	Ando et al., 2000
<i>Glycine max</i> (SGA1)	385	80 %	Kim et al., 1995
<i>Glycine max</i> (SGA2)	385	82 %	Gotor et al., 1996
<i>Spinacia oleracea</i> (SOGA1)	383	79 %	Perroud et al., 2000
<i>Oryza sativa</i> (RGA1)	380	76 %	Seo et al., 1995

Tab. 3-1: G α -Proteine einiger Pflanzenspezies im Vergleich zu G α von *E. californica*

Im Falle von *Pisum* und *Nicotiana* sind zwei Isoformen beschrieben, die sich jedoch in ihren Sequenzen nur sehr wenig unterscheiden.

<i>M</i>	<i>G</i>	<i>S</i>	<i>L</i>	<i>C</i>	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>H</i>	<i>N</i>	<i>H</i>	<i>R</i>	<i>N</i>	<i>E</i>	<i>G</i>	<i>D</i>	15
ATG	GGC	TCA	CTC	TGC	AGC	AGA	CAC	AAT	CAT	CGA	AAT	GAA	GGC	GAC	45
<i>S</i>	<i>E</i>	<i>E</i>	<i>N</i>	<i>V</i>	<i>Q</i>	<i>A</i>	<i>A</i>	<i>E</i>	<i>I</i>	<i>E</i>	<i>K</i>	<i>R</i>	<i>I</i>	<i>A</i>	30
TCG	GAA	GAA	AAT	GTG	CAG	GCT	GCA	GAG	ATT	GAG	AAG	CGG	ATA	GCT	90
<i>Q</i>	<i>E</i>	<i>T</i>	<i>K</i>	<i>A</i>	<i>E</i>	<i>K</i>	<i>H</i>	<i>I</i>	<i>Q</i>	<i>K</i>	<i>L</i>	<i>L</i>	<i>L</i>	<i>L</i>	45
CAA	GAA	ACA	AAA	GCC	GAG	AAG	CAC	ATC	CAA	AAA	CTT	CTG	CTA	CTT	135
<i>G</i>	<i>A</i>	<i>G</i>	<i>E</i>	<i>S</i>	<i>G</i>	<i>K</i>	<i>S</i>	<i>T</i>	<i>I</i>	<i>F</i>	<i>K</i>	<i>Q</i>	<i>I</i>	<i>K</i>	60
GGG	GCT	GGA	GAG	TCA	GGG	AAG	TCT	ACA	ATT	TTC	AAG	CAG	ATA	AAG	180
<i>L</i>	<i>L</i>	<i>F</i>	<i>Q</i>	<i>T</i>	<i>G</i>	<i>F</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>A</i>	<i>E</i>	<i>L</i>	<i>K</i>	<i>S</i>	<i>Y</i>	75
CTT	TTG	TTT	CAA	ACT	GGT	TTT	GAT	GAT	GCC	GAA	CTA	AAG	AGC	TAT	225
<i>T</i>	<i>S</i>	<i>V</i>	<i>I</i>	<i>Y</i>	<i>A</i>	<i>N</i>	<i>V</i>	<i>Y</i>	<i>Q</i>	<i>T</i>	<i>I</i>	<i>K</i>	<i>V</i>	<i>L</i>	90
ACC	TCA	GTT	ATC	TAT	GCC	AAT	GTG	TAC	CAG	ACA	ATT	AAA	GTA	TTA	270
<i>H</i>	<i>D</i>	<i>G</i>	<i>A</i>	<i>K</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>S</i>	<i>E</i>	<i>T</i>	<i>E</i>	<i>E</i>	<i>D</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	105
CAT	GAT	GGA	GCA	AAG	GAA	TTT	TCT	GAG	ACT	GAA	GAA	GAT	TCA	TCA	315
<i>K</i>	<i>Y</i>	<i>L</i>	<i>L</i>	<i>S</i>	<i>P</i>	<i>E</i>	<i>N</i>	<i>R</i>	<i>D</i>	<i>I</i>	<i>G</i>	<i>E</i>	<i>K</i>	<i>L</i>	120
AAA	TAT	CTT	TTA	TCT	CCG	GAA	AAT	CGG	GAT	ATT	GGA	GAG	AAG	CTA	360
<i>S</i>	<i>G</i>	<i>I</i>	<i>G</i>	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>L</i>	<i>D</i>	<i>H</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>L</i>	<i>T</i>	<i>A</i>	<i>E</i>	135
TCT	GGA	ATT	GGA	AGT	AGG	TTG	GAT	CAT	CCA	CGT	CTG	ACT	GCA	GAG	405
<i>L</i>	<i>A</i>	<i>H</i>	<i>E</i>	<i>I</i>	<i>E</i>	<i>T</i>	<i>L</i>	<i>W</i>	<i>K</i>	<i>D</i>	<i>S</i>	<i>A</i>	<i>V</i>	<i>Q</i>	150
CTC	GCA	CAT	GAA	ATA	GAA	ACT	TTA	TGG	AAG	GAT	TCT	GCA	GTT	CAG	450
<i>E</i>	<i>T</i>	<i>Y</i>	<i>T</i>	<i>R</i>	<i>G</i>	<i>N</i>	<i>E</i>	<i>L</i>	<i>Q</i>	<i>L</i>	<i>P</i>	<i>D</i>	<i>C</i>	<i>A</i>	165
GAA	ACT	TAT	ACT	CGC	GGA	AAT	GAA	CTG	CAA	CTT	CCA	GAC	TGT	GCA	495
<i>H</i>	<i>Y</i>	<i>F</i>	<i>M</i>	<i>E</i>	<i>N</i>	<i>L</i>	<i>Q</i>	<i>R</i>	<i>L</i>	<i>S</i>	<i>D</i>	<i>V</i>	<i>N</i>	<i>Y</i>	180
CAC	TAT	TTC	ATG	GAG	AAC	TTA	CAA	AGA	TTG	TCT	GAT	GTT	AAT	TAT	540

V	P	T	K	E	D	V	L	H	A	R	V	R	T	S	195
GTC	CCA	ACC	AAG	GAA	GAT	GTA	CTT	CAT	GCA	AGA	GTT	CGT	ACA	TCT	585
G	V	V	E	I	Q	F	S	P	V	G	E	N	K	K	210
GGC	GTC	GTG	GAA	ATC	CAA	TTC	AGC	CCT	GTT	GGA	GAG	AAC	AAA	AAA	630
S	G	E	V	Y	R	L	F	D	V	G	G	Q	R	N	225
AGT	GGT	GAA	GTT	TAT	AGA	CTA	TTT	GAT	GTT	GGA	GGT	CAG	AGA	AAT	675
E	R	R	K	W	I	H	L	F	E	G	V	N	A	V	240
GAG	AGA	AGA	AAG	TGG	ATT	CAT	TTA	TTT	GAA	GGG	GTT	AAT	GCT	GTG	720
I	F	C	A	A	I	S	E	Y	D	Q	M	L	F	E	255
ATC	TTT	TGT	GCT	GCA	ATT	AGC	GAG	TAC	GAC	CAA	ATG	CTC	TTT	GAA	765
D	E	N	K	N	R	M	M	E	T	K	E	L	F	E	270
GAT	GAA	AAT	AAG	AAC	CGG	ATG	ATG	GAA	ACA	AAG	GAG	CTC	TTT	GAA	810
W	V	L	K	Q	P	C	F	E	K	T	S	F	M	L	285
TGG	GTT	CTG	AAG	CAG	CCA	TGT	TTT	GAG	AAA	ACA	TCG	TTC	ATG	CTA	855
F	L	N	K	F	D	V	F	E	K	K	V	L	Q	V	300
TTT	CTC	AAC	AAG	TTC	GAT	GTA	TTT	GAG	AAG	AAA	GTC	CTA	CAA	GTA	900
P	L	N	V	C	D	W	F	K	D	Y	Q	P	V	S	315
CCA	TTA	AAT	GTG	TGC	GAT	TGG	TTC	AAG	GAT	TAC	CAG	CCT	GTG	TCG	945
T	G	K	Q	E	I	E	N	A	Y	E	F	V	K	K	330
ACA	GGA	AAA	CAA	GAG	ATT	GAG	AAT	GCG	TAT	GAG	TTT	GTA	AAG	AAG	990
K	F	E	E	M	Y	F	Q	S	T	G	P	D	R	V	345
AAA	TTC	GAA	GAA	ATG	TAC	TTC	CAG	AGT	ACT	GGT	CCT	GAT	CGT	GTC	1035
D	R	V	F	K	V	Y	R	T	T	A	L	D	Q	K	360
GAC	CGA	GTA	TTC	AAA	GTC	TAC	CGA	ACG	ACA	GCT	CTA	GAT	CAA	AAG	1080
L	V	K	K	T	F	K	L	V	D	E	T	L	R	R	375
CTC	GTC	AAA	AAA	ACA	TTC	AAA	TTG	GTA	GAC	GAG	ACT	TTA	AGG	AGG	1125
R	N	L	L	E	A	G	L	L							384
AGA	AAC	CTT	CTC	GAA	GCA	GGT	CTA	TTA							1152

Abb. 3-22: G α -Sequenz von *Eschscholzia californica*

Dargestellt sind die vollständige DNA- und die daraus abgeleitete Aminosäure-Sequenz (*kursiv*) der α -Untereinheit des G-Proteins von *Eschscholzia californica*.

3.2.4 Klonierung und heterologe Expression des G α

Um das G α -Protein von *E. californica* heterolog exprimieren zu können, musste das in der cDNA-Bank gefundene Gen aus dem Eingangsvektor der Bank in einen geeigneten Expressionsvektor überführt werden. Dafür wurde das Plasmid pET23a gewählt, welches sich für eine heterologe Expression bereits vielfach bewährt hatte.

Durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde das Gen von G α amplifiziert. Dabei diente das in der cDNA-Bank gefundene Plasmid mit vollständiger G α -Sequenz als Template. Die PCR-Primer wurden so gewählt, dass sich an den Termini des Produktes die für eine Klonierung in den Expressionsvektor erforderlichen Restriktionsorte befanden (s. Material/Methoden).

Nach Ligation der PCR-amplifizierten G α -DNA in den Expressionsvektor wurden das PCR-Produkt und seine Einbettung in den Vektor durch Sequenzie-

zung überprüft. Sowohl die Amplifizierung als auch die Ligation waren fehlerfrei verlaufen.

Die heterologe Expression des Proteins, welches über einen N-terminalen T7-Tag und über einen C-terminalen His-Tag verfügt, erfolgte in *E. coli* (BL21), die Reinigung mithilfe von Ni-NTA-Agarose. Abbildung 3-23 zeigt einen Western-Blot mit dem $G\alpha$ -Protein. Aufgrund des großen Produktanteils im Überstand nach Zentrifugation wurde nur dieser – lösliche – Anteil des Proteins zur weiteren Reinigung verwendet. In Abbildung 3-24 ist ein mit Coomassie-Brilliantblau gefärbtes Polyacrylamid-Gel zu sehen, welches das gereinigte $G\alpha$ -Protein zeigt. Das heterolog exprimierte Protein war in der Lage, GTP- γ - ^{35}S spezifisch zu binden. Diese Bindung konnte durch Zusatz von GTP stark zurückgedrängt werden (s. Material/Methoden). Es wurde damit belegt, dass das heterolog exprimierte Protein ein wesentliches funktionelles Kriterium der G-Proteine erfüllt, die GTP-Bindung.

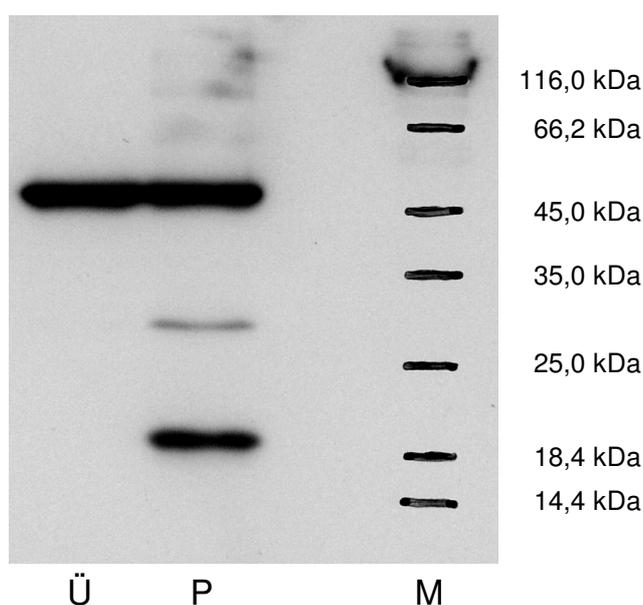


Abb. 3-23: Heterolog exprimiertes $G\alpha$ -Protein aus *Eschscholzia californica*

Western-Blot mit heterolog exprimiertem $G\alpha$ -Protein (47,3 kDa) in Überstand (Ü) und Pellet (P) nach Zellaufschluss und Zentrifugation.

Erstantikörper: anti-His-Tag (Novagen, EMD Biosciences, Schwalbach, BRD); Zweitantikörper: anti-Maus-AP-Konjugat; Marker (M): peqGOLD Protein-Marker (peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, BRD). Die Positionen der Markerbanden wurden nach FastGreen-Färbung der Blot-Membran gekennzeichnet.

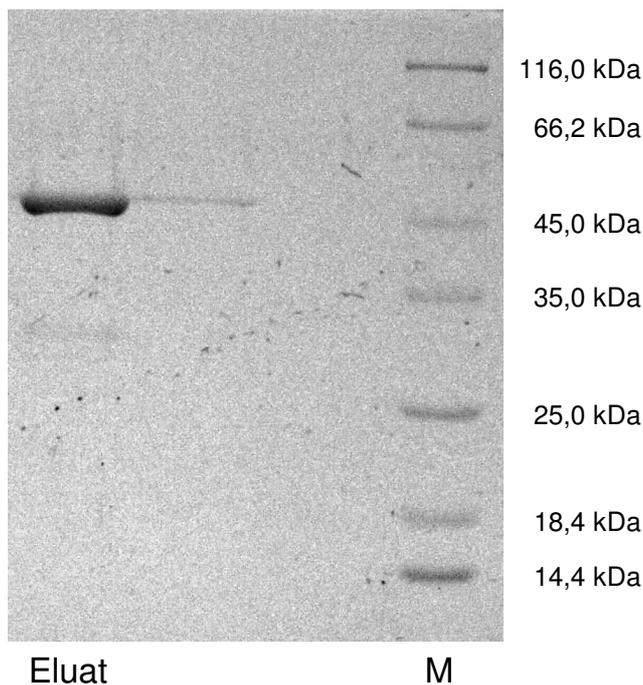


Abb. 3-24: Gereinigtes, heterolog exprimiertes $G\alpha$ -Protein aus *Escherichia californica* (Coomassie-Färbung)

Heterolog exprimiertes $G\alpha$ -Protein wurde mit Ni-NTA-Agarose gereinigt und auf ein PAA-Gel aufgetragen (ca. 3,2 μ g Protein; Eluat). Marker (M): peqGOLD Protein-Marker (peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, BRD). Das Gel wurde mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt (s. Material/Methoden).

3.2.5 Bindung von PLA_2 an heterolog exprimiertes $G\alpha$

Bei der mit der Plasmamembran assoziierten PLA_2 handelt es sich offenbar um ein durch ein $G\alpha$ -Protein kontrolliertes Signalenzym (s. Kap. 1.3, 3.1.4). Es ist bisher unklar, ob diese Kontrolle durch direkte Interaktion oder über weitere Zwischenstufen erfolgt. Der Nachweis einer engen Bindung beider Proteine wäre deshalb ein weiterer wichtiger Beleg zur Klärung dieser Frage.

Zur Prüfung einer Interaktion beider Proteine wurde Plasmamembran von *E. californica*, welche über PLA_2 -Aktivität verfügt (Roos et al., 1999, Viehweger et al., 2002) solubilisiert und mit dem heterolog exprimierten und über einen His-tag an Ni-NTA-Agarose fixierten $G\alpha$ inkubiert. Nach Zusatz des Fluoreszenzmarkierten PLA_2 -Substrates BEPC wurde aus der Agarose-Suspension ein Lipidextrakt gewonnen, die Produkte der PLA_2 -Reaktion dünnschichtchromatografisch getrennt und über ihre Fluoreszenz auf der HPTLC-Platte quantifiziert. Dabei konnte gezeigt werden, dass an der mit $G\alpha$ -Protein besetzten Ni-NTA-Agarose nach Inkubation mit solubilisierter Plasmamembran signifikant mehr

Substrat umgesetzt wurde als an der $G\alpha$ -freien Agarose. Dieser Befund konnte allerdings nur nach Solubilisierung der Plasmamembran bei pH 9,5, nicht aber bei pH 7,4 gefunden werden (Abb. 3-25). Vermutlich ist das leicht alkalische Milieu erforderlich, um die in der Plasmamembran gebundene PLA_2 aus ihrer Bindung an andere Bindungspartner – inklusive dem potentiellen Partner $G\alpha$ – herauszulösen und so eine Bindung an das fixierte $G\alpha$ -Protein zu ermöglichen.

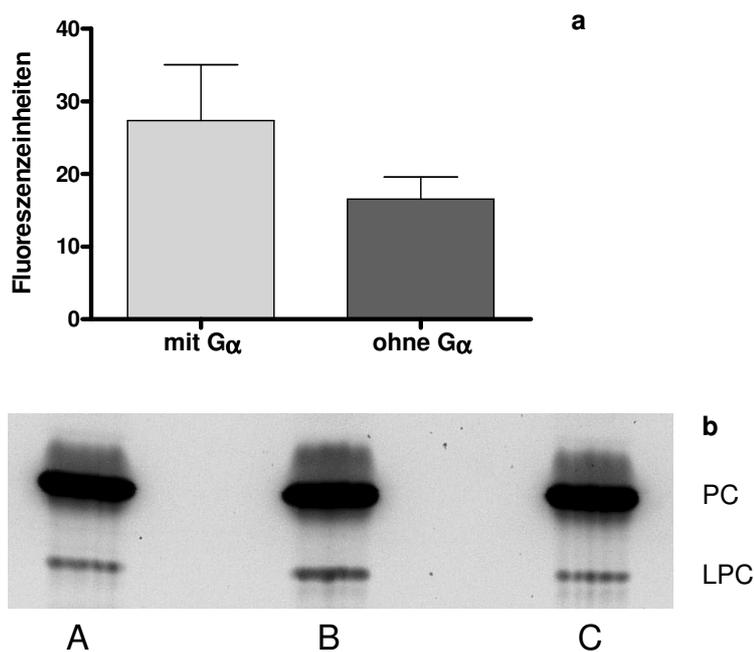


Abb. 3-25: Bindung von PLA_2 an immobilisiertes $G\alpha$

a) Ni-NTA-Agarose wurde mit heterolog exprimiertem $G\alpha$ -Protein (mit His-Tag) oder reinem Lösungsmittel inkubiert und anschließend gewaschen. Es folgte die Inkubation mit der bei pH 9,5 solubilisierten Plasmamembran. Nach erneutem Waschen der Agarose folgte die Bestimmung der an die Agarose gebundenen PLA_2 -Aktivität mit dem fluoreszenz-markierten Substrat BEPC. Das PLA_2 -Produkt LPC wurde nach Extraktion und dünnschichtchromatografischer Trennung quantifiziert. Das Diagramm zeigt die auf der HPTLC-Platte gemessenen Fluoreszenzeinheiten bei $\lambda_{EX} = 285 \text{ nm}$ ($n=3$; SD). s. a. Kap. 2.6.5

b) Ni-NTA-Agarose wurde nacheinander inkubiert mit:

- A: heterolog exprimiertem $G\alpha$ und bei pH 7,5 solubilisierter Plasmamembran,
- B: heterolog exprimiertem $G\alpha$ und bei pH 9,5 solubilisierter Plasmamembran,
- C: bei pH 7,5 solubilisierter Plasmamembran.

Nach anschließendem Waschen wurde die an die Agarose gebundene PLA_2 -Aktivität wie unter a) angegeben bestimmt. Dargestellt ist das Dünnschichtchromatogramm der Lipidextrakte mit dem Substrat (PC) und dem daraus durch PLA_2 -Aktivität gebildeten Produkt (LPC).

Dieses Versuchsergebnis ist ein erstes Indiz für eine direkte Interaktion von $G\alpha$ und PLA_2 an der Plasmamembran und sollte zu weiteren Experimenten ermutigen, um eine solche Interaktion exakt zu belegen.

Im Zeitrahmen der vorliegenden Arbeit konnte das o.g. Experiment noch nicht ausreichend oft wiederholt werden. Bei weiteren Experimenten ist auch sicherzustellen, dass es sich bei der Bindung der PLA_2 an Ni-NTA-Agarose um eine spezifische Bindung an $G\alpha$ und nicht um eine unspezifische handelt, die allein durch die Behandlung der Agarose mit einem beliebigen His-tag-Protein ermöglicht wurde.

3.3 Die Regulation des Signalenzym PLA_2 auf der Produktebene: Die Kontrolle des steady states von LPC

3.3.1 Ausgangspunkte

Lysophosphatidylcholin (LPC) ist ein Produkt der Hydrolyse von Phosphatidylcholin (PC) durch Phospholipase A_2 . Diese Verbindung wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits als ein second messenger charakterisiert, welcher an der Plasmamembran durch PLA_2 -Aktivität freigesetzt wird und anschließend Na^+/H^+ -Austauscher am Tonoplasten aktiviert. Der durch den Efflux vakuolärer Protonen ausgelöste, transiente Abfall des zytosolischen pH wirkt als induzierendes Signal zur Neubildung von Enzymen der Alkaloidbiosynthese (Roos et al., 1999, Viehweger et al., 2002, Viehweger et al., 2006, Roos et al., 2006). Die Bildung von LPC durch die Elicitor-aktivierbare PLA_2 ist damit eine Schlüsselreaktion für die Auslösung der Phytoalexin-Antwort. Durch mehrere Aktivitätstests konnte die Anwesenheit des Enzyms in der Plasmamembran nachgewiesen werden (Roos et al., 1999, Dordschbal, 2003). Die Klassifizierung als Phospholipase A, Typ 2, ergibt sich aus ihrer Fähigkeit zur Umsetzung von Phospholipiden, deren Fettsäuren am C_1 -Hydroxyl als Alkylether und am C_2 -Hydroxyl als Alkylester verknüpft sind. Diese Verbindungen sind durch eine an C_1 angeifende PLA, Typ 1, nicht umsetzbar.

Die Wirksamkeit verschiedener Lysophospholipide als second messenger wurde an Vakuolen in situ getestet. Es zeigte sich, dass Cholin als Alkohol-Komponente (hydrophile Kopfgruppe) des LPC ausschlaggebend für die Wirksamkeit des Mo-

leküls ist. Während Verbindungen mit fehlendem Substituenten in C₃-Position oder mit anderen Kopfgruppen als Phosphocholin keinen Protonenausstrom aus der Vakuole auslösten, waren LPC mit verschiedenen, in C₁-Position gebundenen Fettsäuren etwa gleich wirksam (Viehweger et al., 2002; Abb. 3-26).

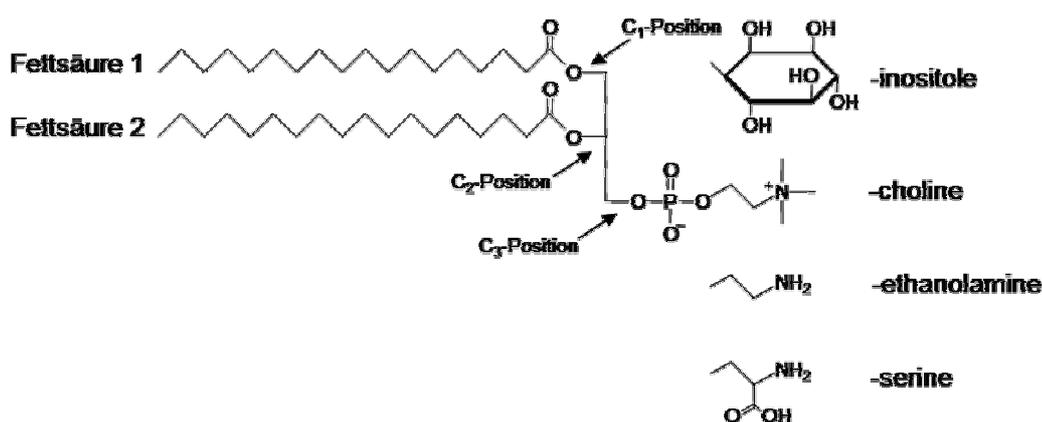


Abb. 3-26: Übersicht: Struktur von Phosphatidylcholinen und anderen Phospholipiden

Die in C₁- und C₂-Position gebundenen Fettsäuren verfügen über verschiedene Kettenlängen und Sättigungsgrade. Die hydrophile, in C₃-Position gebundene Kopfgruppe bestimmt wesentlich die Eigenschaften des Phospholipids. In Abhängigkeit von dieser Gruppe unterscheidet man Phosphatidylcholone, -ethanolamine, -serine, -inositole.

Die Quantifizierung von LPC in Zellextrakten mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie zeigte, dass der im nicht stimulierten Zustand niedrige LPC-Gehalt (ca. 1 pmol/mg dwt) bereits wenige Minuten nach Elicitorkontakt erhöht wird. Der Anstieg ist transient, d.h. der LPC-Gehalt nähert sich nach wenigen Minuten wieder dem Kontrollniveau. Dieser rasche Abfall spricht für eine Metabolisierung des gebildeten LPC, was durch Experimente mit extern zugesetztem, fluoreszenzmarkiertem LPC bestätigt wurde (Viehweger et al., 2002 Dordschbal, 2003). Erste Hinweise auf die Art der Metabolisierung ergaben sich aus der Inkubation mit fluoreszenzmarkierten LPC-Analoga, gefolgt vom dünnschichtchromatografischen Nachweis der Produkte. Zellsuspensionen von *E. californica* verwandeln BODIPY®-markiertes LPC (BODIPY®-FL-C₁₁-LPC) rasch in Metaboliten, die R_f-gleich mit Phosphatidylcholinen sind. Durch Verdau dieser Metaboliten mit einer PLA₂ aus Bienengift entstehen wieder Produkte, die polarer und R_f-gleich mit LPC sind (Schwartz, 2001). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass freies LPC von *Eschscholzia*-Zellen durch Acylierung in ein Phospholipid zurückverwandelt

wird. Die Acylierung von extern zugesetztem LPC zu Phosphatidylcholin (PC) wurde bereits für andere Pflanzen beschrieben. So wurden der Import und die sich daran anschließende Acylierung von LPC in Chloroplasten bei Porree (*Allium porrum* L.) beobachtet (Mongrand et al., 2000). In Mikrosomen aus Suspensionskulturen des Raps (*Brassica napus* L.) wurde eine LPC-Acyltransferase charakterisiert (Furukawa-Stoffer et al., 2003).

Da LPC in *E. californica* als Signalmolekül dient (s.o.), ist die Fähigkeit zur Metabolisierung dieser Verbindung von besonderer Bedeutung: als Gegenspieler der PLA₂-Aktivität ist die kontrollierte Beseitigung von LPC ein wesentlicher Faktor für die Einstellung des steady-states dieses second messenger.

Darüberhinaus ist die Fähigkeit zur „Entgiftung“ von LPC lebensnotwendig, um eine Akkumulation dieser hochwirksamen Verbindung zu verhindern. Konzentrationen > 10 µM führen zur Zerstörung der Barriere-Funktion von zellulären Membranen (Viehweger und Roos, unveröffentlicht).

3.3.2 LPC wird durch Acyltransfer zu PC metabolisiert

Nach Zusatz von ¹⁴C-markiertem 16:0-LPC zu Ganzzellen akkumuliert die Radioaktivität rasch und nahezu ausschließlich im Pool der Phosphatidylcholine, was durch dünnschichtchromatografische Analyse gezeigt werden konnte (Abb. 3-27). Die Identität des aus LPC gebildeten Acylierungsproduktes Phosphatidylcholin wurde durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestätigt. Im Gegensatz zu Proteinen können Lipide gut mittels MALDI-TOF-MS quantifiziert werden, weshalb diese Methode seit einigen Jahren in der Lipid-Analytik etabliert ist (Schiller et al., 2001, Petković et al., 2001 (1+2), Dordschbal, 2003). Aufgrund seiner amphiphilen Eigenschaften ist LPC in der Lage, sich rasch innerhalb von wässrigen Phasen zu verteilen und in Membranen zu penetrieren (Moreau et al., 1998, Viehweger et al., 2002). Deshalb kann extern zugesetztes LPC sehr schnell intrazellulär metabolisiert werden.

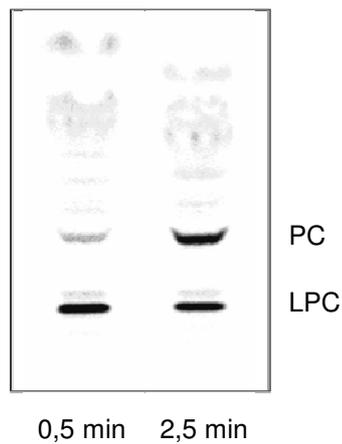


Abb. 3-27: Dünnschichtchromatografische Untersuchung nach ^{14}C -LPC-Zusatz

Nach Zusatz von ^{14}C -markiertem LPC zu Ganzzellen akkumuliert die Radioaktivität nahezu ausschließlich in den Phosphatidylcholinen.

Dargestellt ist die Verteilung der Radioaktivität im Dünnschichtchromatogramm zweier Zellextrakte 0,5 min und 2,5 min nach Zusatz des ^{14}C -markierten LPC (s. a. Material/Methoden).

In einem alternativen Versuch wurde geprüft, ob der Zusatz einer definierten Fettsäure als potentieller Reacylierungspartner gemeinsam mit LPC zu dem erwarteten Phospholipid führt. Dazu wurde den Zellen jeweils eine Fettsäure gemeinsam mit LPC zugesetzt und die Zunahme des Gehalts der Phospholipidspezies mithilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie gemessen. In Abb. 3-28 ist eine auf diese Weise ausgelöste, quantitative Veränderung des Phospholipid-Spektrums dargestellt. Durch Zusatz von 16:0-LPC und Ölsäure (18:1) erhöht sich der Massepeak jenes Phosphatidylcholins, welches Palmitinsäure (16:0) und Ölsäure (18:1) enthält. Dies zeigt, dass die zugesetzte freie Fettsäure in den Zellen aktiviert und zur Acylierung des ebenfalls zugesetzten LPC verwendet wird.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zur Acylierung von LPC zu PC wurden innerhalb kurzer Zeiträume (max. 15 min) nach Zusatz des LPC gemessen. Die Bildung weiterer Metabolite außer PC, z.B. Phospholipidspezies mit anderen Kopfgruppen oder der Einbau von Bestandteilen des zugesetzten LPC in andere Molekülspezies konnte in diesem Zeitraum nicht festgestellt werden.

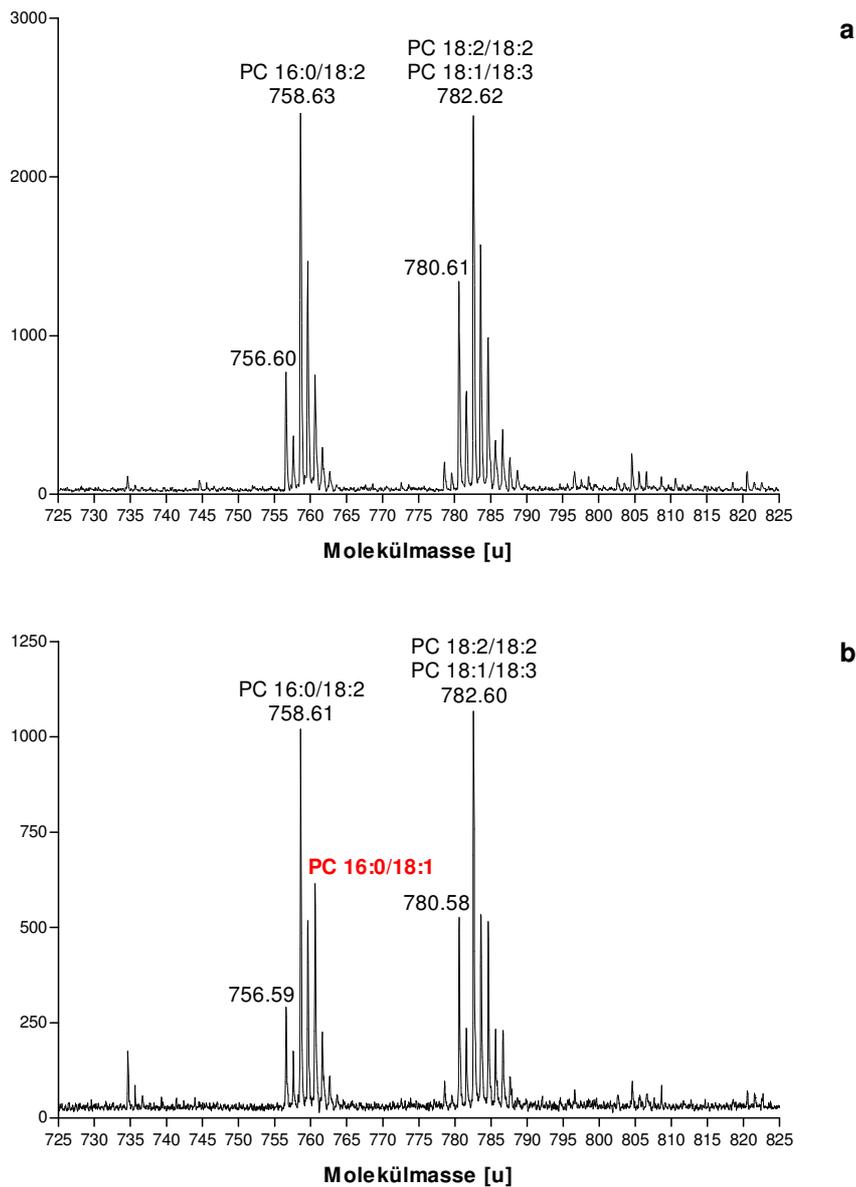


Abb. 3-28: Massenspektrometrische Untersuchung der PC-Spezies in Ganzzellen

Phosphatidylcholine wurden aus Ganzzellen extrahiert und mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie untersucht. Die dargestellten Massepeaks repräsentieren die verschiedenen Phosphatidylcholin-Spezies als Protonen-Addukte. Die Peakhöhe entspricht der relativen Häufigkeit einer Masse im Gesamt-Extrakt. Für die beiden häufigsten Massen sind jeweils die in diesen Lipiden vertretenen Fettsäuren in den möglichen Kombination angegeben.

a: Extrakt aus unbehandelten Zellen

b: Extrakt aus Zellen, die 10 min mit 16:0-LPC (80 μ M) und Ölsäure (18:1; 80 μ M) inkubiert wurden. Nach dieser Behandlung ist die PC-Spezies mit den Fettsäuren 16:0 (Palmitinsäure) und 18:1 (Ölsäure) häufiger vertreten und rot gekennzeichnet.

3.3.3 Lokalisierung der LPC-acylierenden Aktivität

Nach Zellaufschluss und fraktionierender Zentrifugation wurden das Homogenat, der 100.000-g-Überstand, die mikrosomale Fraktion (zelluläre Membranen) und die daraus mittels 2-Phasenverteilung angereicherte Plasmamembran auf ihre Kapazität zur Acylierung von LPC (16:0) untersucht. Außer dieser Verbindung wurde den Fraktionen Oleoyl-(18:1)-CoA als Acyldonor zugesetzt. Die mikrosomale Fraktion zeigte eine bedeutend höhere Reacylierungsrate als der 100.000-g-Überstand (lösliche Proteine) (Abb. 3-29). Nach 2-Phasen-Verteilung des mikrosomalen Pellets wurde die höchste spezifische Aktivität in der Plasmamembran-Fraktion gefunden (Abb. 3-30). Demnach ist der weitaus größte Teil der Reacylierungskapazität an die Plasmamembran gebunden. Er steht damit in unmittelbarer Nähe des Bildungsortes von LPC, d.h. an der ebenfalls in dieser Membran vorhandenen PLA₂ zur Verfügung.

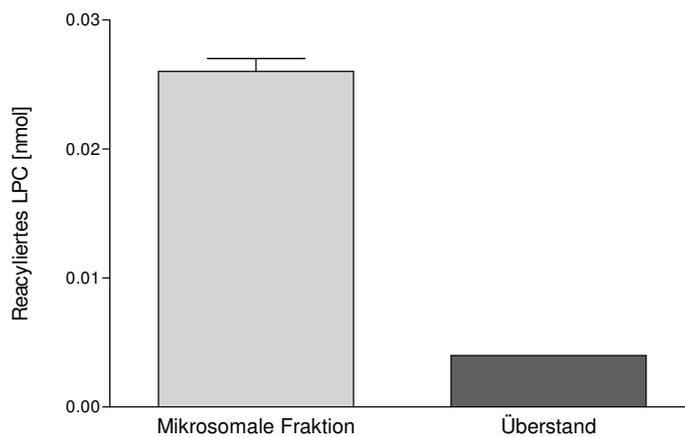


Abb. 3-29: Aktivität der Reacylierung von LPC in Zellfraktionen

Der Überstand einer 15.000 x g-Zentrifugation nach Zellaufschluss wurde für 1 Stunde bei 100.000 x g zentrifugiert. Das Pellet (mikrosomale Fraktion) wurde in einem dem abgenommenen Überstand entsprechenden Volumen Puffer resuspendiert. Gleichen Volumina des Überstandes und des resuspendierten Pellets wurden je 30 µM ¹⁴C-16:0-LPC (spezifische Aktivität: 2,7 mCi/mmol) und 150 µM Oleoyl-CoA zugesetzt, Phosphatidylcholin nach 1,5 min extrahiert und mithilfe der HPTLC quantifiziert (SD, n=3; s. a. Material/Methoden).

Die Möglichkeit, die reacylierende Aktivität durch Zentrifugation anzureichern zeigt, dass es sich bei der Acyltransferase nicht um ein gelöstes (zytoplasmatisches), sondern um ein membrangebundenes Protein handelt.

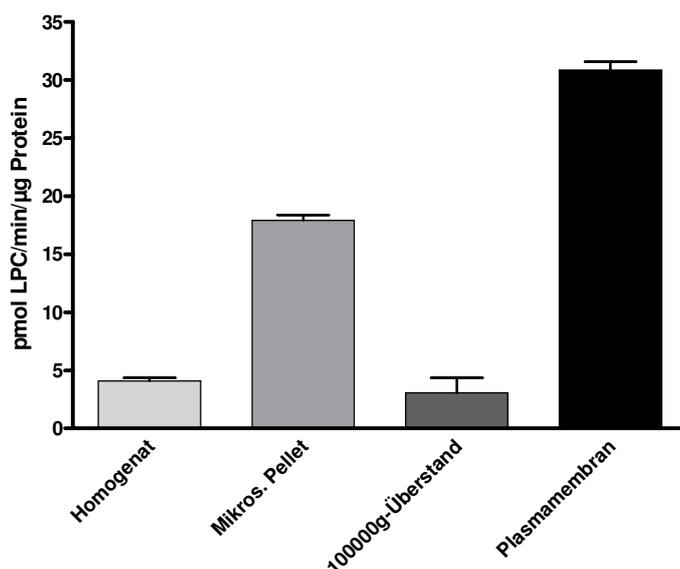


Abb. 3-30: Spezifische Reacylierungsrate in Zellfraktionen

Das Diagramm zeigt die initiale Reacylierungsrate des Substrates LPC in den angegebenen Fraktionen im Verhältnis zum jeweiligen Proteingehalt.

Homogenat, resuspendiertes mikrosomales Pellet, 100.000 x g-Überstand und Plasmamembran aus Ganzzellen wurden jeweils mit 30 µM ^{14}C -markiertem 16:0-LPC (spezifische Aktivität: 2,8 mCi/mmol) und 200 µM Oleoyl-CoA versetzt. Es wurden jeweils 2 Inkubationszeiten berücksichtigt: Homogenat: 0,5 min und 1,0 min; Mikros. Pellet: 1,0 min und 2,0 min; 100.000 x g-Überstand: 5,0 min und 10,0 min; Plasmamembranen: 1,5 min und 3,0 min. (SD; n=3). S. a. Material/Methoden.

3.3.4 Qualitativer Vergleich von LPC-Metabolisierung und Phospholipid-Synthese

Bei der Reacylierung wird eine durch Veresterung mit Coenzym A aktivierte Fettsäure mittels Acyl-Transfer an LPC gebunden. Dabei entstehen Phosphatidylcholine. Diese Reaktion ist kein Teilschritt bei der Biosynthese der Phospholipide. Dort erfolgt der Einbau von Fettsäuren bereits bei der Bildung von Phosphatidsäuren, d.h. durch Acylierung von Glycerol-3-phosphat. Anschließend entstehen am endoplasmatischen Retikulum die nativen Phospholipide durch Anlagerung von Phosphocholin/-ethanolamin an die aus den Phosphatidsäuren gebildeten Diacylglycerole (Abb. 3-31). Es ist deshalb zu erwarten, dass verschiedene Acyltransferasen für die Acylierung von LPC einerseits und die Biosynthese von PC andererseits verantwortlich sind. Um einen Hinweis auf solche Unterschiede und auf die Regulation von LPC-Reacylierung und PC-Biosynthese zu erhalten, wurde im Folgenden das Spektrum der bei der Reacylierung von LPC und bei der PC-Biosynthese eingebauten Fettsäuren vergleichend untersucht. Dieses Spektrum

wird einerseits durch die in der Zelle verfügbaren freien Fettsäuren und andererseits durch die Substratspezifität der beteiligten Acyltransferasen bestimmt.

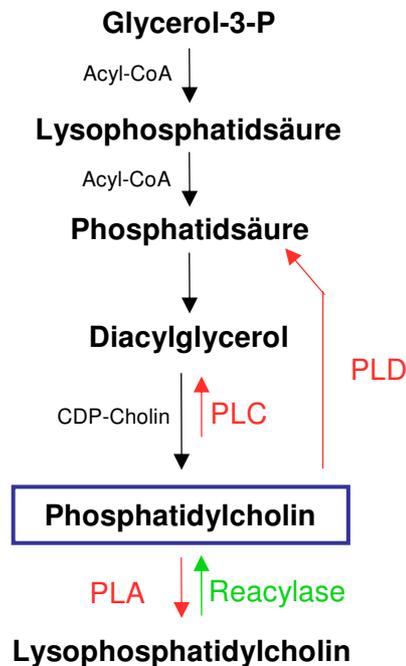


Abb. 3-31: Phosphatidylcholin - Biosynthese, Phospholipasen, Reacylierung

Die Übersicht zeigt die von Glycerol-3-Phosphat ausgehende Biosynthese von Phosphatidylcholin, Produkte der Phospholipase-katalysierten Hydrolyse und die Funktion der "Reacylase": Acyltransfer auf LPC, ein nicht in der Biosynthese der Phospholipide enthaltener Reaktionsschritt.

PLA, PLC, PLD: Phospholipasen des Typs A, C bzw. D; CDP: Cytidindiphosphat.

3.3.4.1 Fettsäureverteilung bei der Phosphatidylcholin-Biosynthese

Das Fettsäure-Spektrum pflanzlicher Phosphatidylcholone umfasst vorrangig Palmitinsäure (16:0), Stearinsäure (18:0), Ölsäure (18:1), Linolsäure (18:2) und Linolensäure (18:3). Während die gesättigten Fettsäuren überwiegend in C₁-Position gebunden sind, finden sich die ungesättigten Fettsäuren meist in C₂-, seltener in C₁-Position (Williams et al., 1995). In Tabelle 3-2 ist das Spektrum der aus Ganzzellen von *E. californica* extrahierten Phosphatidylcholone anhand ihrer Massepeaks und die daraus abzuleitenden Fettsäure-Kombinationen dargestellt.

Massepeak	mögliche Fettsäurekombinationen im PC	rel. Häufigkeit [%]
756,6	16:0/18:3 u. 18:3/16:0	8,1
758,6	16:0/18:2 u. 18:2/16:0	25,2
760,6	16:0/18:1 u. 18:1/16:0	7,9
780,6	18:2/18:3 u. 18:3/18:2	14,1
782,6	18:1/18:3 u. 18:3/18:1 u. 18:2/18:2	25,0
784,6	18:1/18:2 u. 18:2/18:1 u. 18:0/18:3 u. 18:3/18:0	10,3
786,6	18:1/18:1 u. 18:0/18:2 u. 18:2/18:0	4,2

Tab. 3-2: Massepeaks der Phosphatidylcholine aus *E. californica*

Aus Ganzzellen von *E. californica* wurden sämtliche Lipid-Spezies extrahiert und dünnschichtchromatografisch getrennt. Die Gruppe der Phosphatidylcholine wurde separiert und mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie qualitativ (s. Massepeak) und quantitativ (s. relative Häufigkeit) untersucht.

Aus den Massepeaks lassen sich die jeweils möglichen, im Molekül kombinierten Fettsäuren ableiten (16:0 = Palmitinsäure, 18:0 = Stearinsäure, 18:1 = Ölsäure, 18:2 = Linolsäure, 18:3 = Linolensäure; die Positionsangaben der Fettsäuren sind wie folgt zu lesen: C₁-Position/C₂-Position; s. a. Material/Methoden)

Es muss betont werden, dass die ermittelten Häufigkeiten einzelner Phospholipidspezies eine Momentaufnahme für die verwendete Zellsuspension zum Zeitpunkt der Probennahme darstellen. Bekanntlich findet ein ständiger Fettsäure-Turnover innerhalb der Lipide statt, der durch viele Faktoren beeinflusst wird, beispielsweise die Umgebungstemperatur. Jedoch erlaubt die gute Reproduzierbarkeit der Massenverhältnisse in den dargestellten Größenordnungen Rückschlüsse auf die normalen Verteilungsverhältnisse der Fettsäuren innerhalb der Phosphatidylcholine. Aus den dargestellten Werten geht hervor, dass die ungesättigten 18-C-Fettsäuren beide Positionen im Phosphatidylcholin-Molekül besetzen können.

Durch Verdau dieser Lipide mit authentischer Phospholipase A₂ wurden die in C₂-Position gebundenen Fettsäuren abgespalten. Die daraus erhaltenen LPC-Spezies wurden erneut mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie untersucht. Diese Massepeaks spiegeln die jeweils angegebene Fettsäure in C₁-Position wider (Tab. 3-3).

Massepeak	C ₁ -Fettsäure	rel. Häufigkeit [%]
496,5	16:0	25,6
518,5	18:3	8,5
520,5	18:2	44,7
522,5	18:1	10,9
524,5	18:0	8,0

Tab. 3-3: Massepeaks der Lysophosphatidylcholine aus *E. californica*

Aus Ganzzellen von *E. californica* wurden die Phosphatidylcholine extrahiert und mit PLA₂ verdaut. Die entstandenen Lysophosphatidylcholine wurden dünn-schichtchromatografisch von den ebenfalls freigesetzten Fettsäuren getrennt und mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie qualitativ (s. Massepeak) und quantitativ (s. relative Häufigkeit) untersucht. Aus den Massepeaks lassen sich die jeweils im Molekül an C₁-Position gebundenen Fettsäuren ableiten (16:0 = Palmitinsäure, 18:0 = Stearinsäure, 18:1 = Ölsäure, 18:2 = Linolsäure, 18:3 = Linolensäure; s. a. Material/Methoden)

Linol- (18:2) und Palmitinsäure (16:0) sind in dieser Reihenfolge die am häufigsten in C₁-Position vertretenen Fettsäuren. Die Dominanz von LPC 18:2 unterstützt frühere Daten, welche dieses Molekül als die häufigste genuine LPC-Spezies in Plasmamembranen von *E. californica* charakterisieren. LPC 18:2 hat auch den größten Anteil an dem nach Elicitorkontakt auftretenden LPC-Peak (Viehweger et al., 2002, Dordschbal, 2003).

Unter gleichzeitiger Berücksichtigung der Massenspektren der genuine PC-Moleküle und ihrer C₁-Fettsäuren (im LPC) lassen sich Größenordnungen ableiten, in denen die 18 potentiell möglichen Phosphatidylcholin-Spezies vertreten sind, welche die in Tabelle 3-2 dargestellten Massepeaks verursachen. Das Ergebnis ist in Tabelle 3-4 dargestellt.

Phosphatidylcholin-Spezies		rel. Häufigkeit [%], ca.
C ₁ -Fettsäure	C ₂ -Fettsäure	
Linolsäure (18:2)	Linolsäure (18:2)	20
Palmitinsäure (16:0)	Linolsäure (18:2)	16
Linolsäure (18:2)	Linolensäure (18:3)	11

Tab. 3-4: Häufigste Phosphatidylcholin-Spezies in *E. californica*

Mithilfe der relativen Häufigkeiten der Phosphatidylcholin-Massen (Tab. 3-2) und der Analyse der in C₁-Position gebundenen Fettsäuren (Tab. 3-3) wurden die am häufigsten in Zellen von *E. californica* vorkommenden Phosphatidylcholinspezies ermittelt. Alle nicht aufgeführten Spezies haben jeweils einen Anteil von < 10 % an der Gesamtmenge der PC.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Linolsäure (18:2) die mit Abstand am stärksten vertretene Fettsäure im Gesamt-PC von *E. californica* ist. Ihre Verteilung auf die Positionen C₁ und C₂ ist ausgewogen. Die höher ungesättigte Linolensäure (18:3) ist überwiegend in C₂-Position gebunden, während Ölsäure (18:1) häufiger in C₁- als in C₂-Position vorliegt. Palmitinsäure (16:0), die zweithäufigste Fettsäure im PC-Pool, ist überwiegend in C₁-Position aber auch in C₂-Position verestert. Nach Zusatz freier Fettsäuren zu Zellsuspensionen von *E. californica* werden diese schnell und zunächst fast ausschließlich in Phosphatidylcholone eingebaut. Dieser Vorgang ist unter Verwendung ¹⁴C-markierter Fettsäuren gut im Dünnschichtchromatogramm nachzuvollziehen (Abb. 3-32). Nach Extraktion der PC und Spaltung mit PLA₂ gibt das Dünnschichtchromatogramm Aufschluss über die Positionierung der zugesetzten, ¹⁴C-markierten Fettsäure am Glycerol-Grundgerüst. Radioaktivität im LPC bedeutet C₁-Positionierung, Radioaktivität in der Fettsäure-Bande bedeutet C₂-Positionierung (Abb. 3-33). Nach Zusatz zwei verschiedener Fettsäurespezies, von denen jeweils eine radioaktiv ist, lässt sich die Spezifität des Einbaus als die Konkurrenz beider Fettsäuren um die C₁- und C₂-Position feststellen. Abb. 3-34 zeigt das Ergebnis eines solchen Versuches, bei dem Palmitinsäure (16:0), Ölsäure (18:1) und Linolsäure (18:2) eingesetzt wurden. Während Palmitinsäure zu fast 90 % in C₁-Position verestert wird, wird für Öl- und Linolsäure die C₂-Position leicht bevorzugt. Konkurrenz von Palmitinsäure

(16:0) und Ölsäure (18:1) verstärkt die Tendenz, die gesättigte Fettsäure in C₁-, die ungesättigte in C₂-Position einzubauen. Konkurrenz der beiden ungesättigten 18-C-Fettsäuren bewirkt einen bevorzugten Einbau der Ölsäure in C₁-, der Linolensäure in C₂-Position.

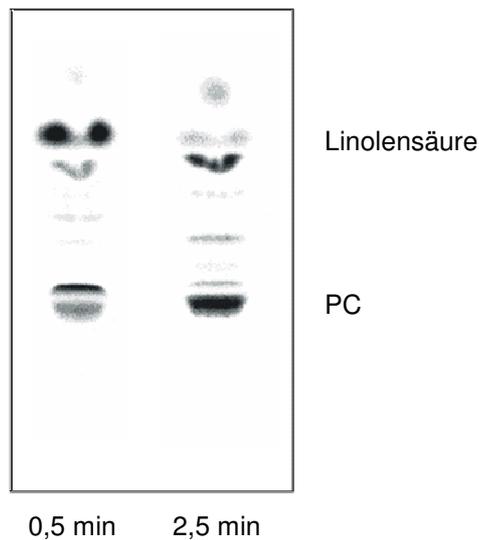


Abb. 3-32: Einbau extern zugesetzter Fettsäuren in PC (Radioaktivitätsverteilung im Dünnschichtchromatogramm)

Aus Ganzzellen wurden 0,5 min und 2,5 min nach Zusatz von 20 μM ^{14}C -Linolensäure (spezifische Aktivität: 5,4 mCi/mmol) die Lipide extrahiert und dünnschichtchromatografisch getrennt. Weitere Fettsäuren, wie Palmitin-, Öl- und Linolsäure wurden analog verstoffwechselt.

Wie aus den Ergebnissen der massenspektrometrischen Untersuchung der Phosphatidylcholin-Zusammensetzung, ist auch aus diesem Experiment zu schlussfolgern, dass Palmitinsäure typischerweise in C₁-Position verestert ist, während die längeren, ungesättigten Fettsäuren ausgewogener in beiden Positionen vorkommen. Dabei ist der Sättigungsgrad einer in C₁-Position gebundenen Fettsäure meist höher als der einer in C₂-Position gebundenen Fettsäure.

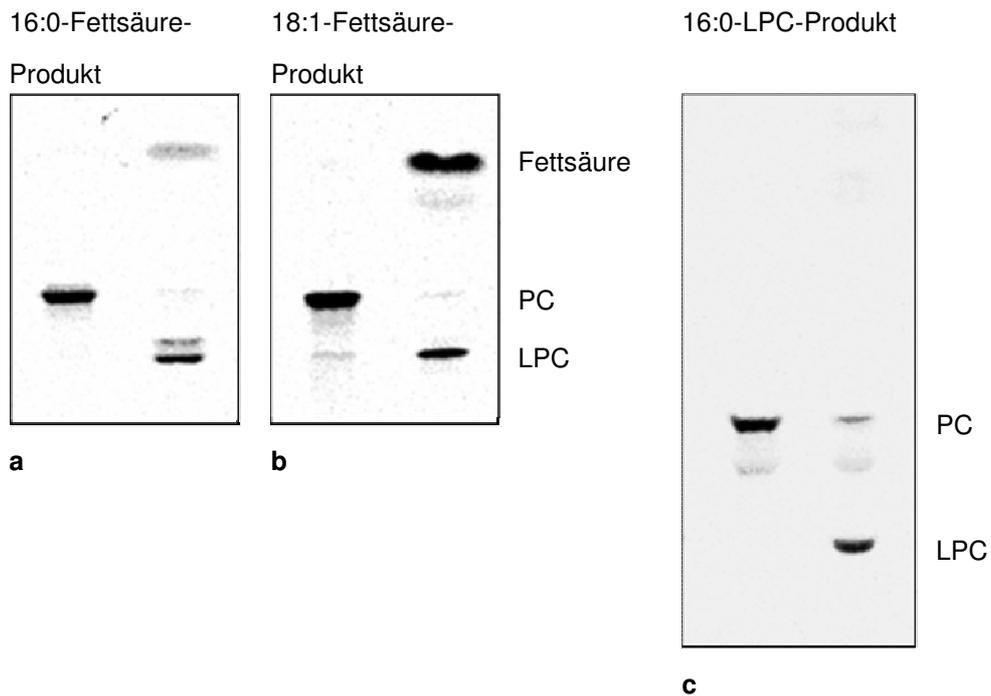
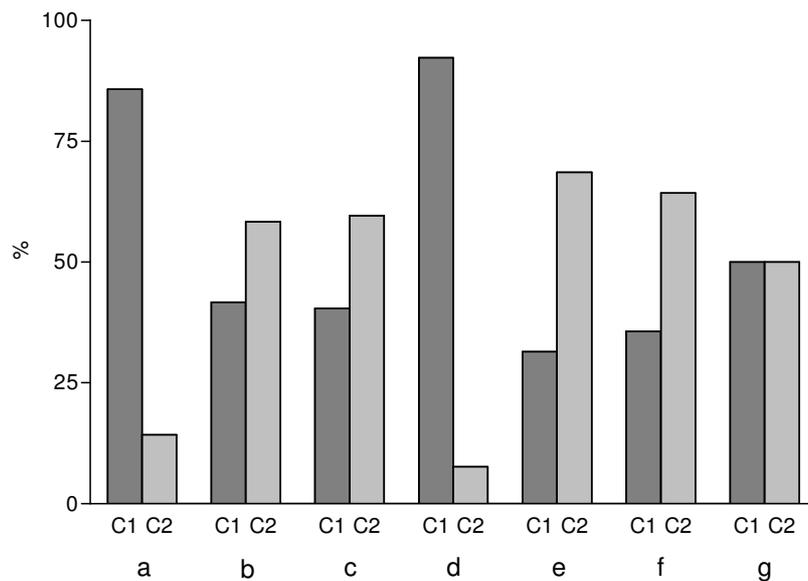


Abb. 3-33: Positionierung extern zugesetzter Fettsäuren in Phosphatidylcholinen (Radioaktivitätsverteilung im Dünnschichtchromatogramm)

- a) Die Phosphatidylcholine aus Ganzzellen wurden 2,5 min nach Zusatz von 20 μM ^{14}C -Palmitin(16:0)säure (spezifische Aktivität: 5,4 mCi/mmol) mithilfe der HPTLC extrahiert. Durch Zugabe von PLA_2 erfolgte die Spaltung in LPC und Fettsäure. Der Extrakt wurde vor (links) und nach (rechts) PLA_2 -Verdau dünn-schichtchromatografisch getrennt. Durch den Verdau freigesetzte Fettsäuren waren im PC in C_2 -Position, nach Verdau an LPC gebundene Fettsäuren in C_1 -Position gebunden.
- b) Analog A, statt Palmitinsäure wurde Ölsäure (18:1) eingesetzt.
- c) Analog A, statt Palmitinsäure wurde 16:0-LPC eingesetzt.

Palmitinsäure wird überwiegend in C_1 -Position, Ölsäure überwiegend in C_2 -Position eingebaut. Zugesetztes LPC wird mit zelleigenen Fettsäuren reacyliert, wobei die in C_1 -Position gebundene (hier ^{14}C -markierte) Fettsäure in ihrer Position gebunden bleibt.



- a = 100 % ^{14}C -Palmitinsäure
 b = 100 % ^{14}C -Ölsäure
 c = 100 % ^{14}C -Linolsäure
 d = 50 % ^{14}C -Palmitinsäure + 50 % Ölsäure
 e = 50 % Palmitinsäure + 50 % ^{14}C -Ölsäure
 f = 50 % ^{14}C -Linolsäure + 50 % Ölsäure
 g = 50 % Linolsäure + 50 % ^{14}C -Ölsäure

Abb. 3-34: Einbau zugesetzter Fettsäuren in Phosphatidylcholine

Dargestellt ist die prozentuale Verteilung von Palmitinsäure (16:0), Ölsäure (18:1) und Linolsäure (18:2) auf die Positionen C₁ bzw. C₂ im zellulär gebildeten PC nach Zugabe der jeweils angegebenen Fettsäure(n).

- a-c) Die Phosphatidylcholine aus Ganzzellen wurden 2,5 min nach Zusatz von 40 μM ^{14}C -markierter Fettsäure (spezifische Aktivität: 2,7 mCi/mmol) extrahiert, durch HPTLC isoliert und mittels ihrer Radioaktivität quantifiziert.
- d-g) Die Phosphatidylcholine aus Ganzzellen wurden 2,5 min nach Zusatz von 20 μM ^{14}C -markierter Fettsäure (spezifische Aktivität: 5,4 mCi/mmol) und 20 μM einer weiteren, unmarkierten Fettsäure extrahiert, durch HPTLC isoliert und mittels ihrer Radioaktivität quantifiziert.

Nach Verdau der extrahierten PC mit PLA₂ wurde dünn-schichtchromatografisch getrennt und die prozentuale Verteilung der jeweils ^{14}C -markierten Fettsäure auf die Positionen C₁ bzw. C₂ im zellulär gebildeten PC ermittelt. (s. a. Material/Methoden)

3.3.4.2 Spezifität der LPC-Reacylierung

Es wurde bereits gezeigt, dass LPC, welches zu Zellsuspensionen von *E. californica* zugesetzt wird, rasch durch Acylierung in ein PC umgewandelt wird. Auch hier stellte sich die Frage nach der Spezifität, d.h. dem Einfluss der in C₁-Position gebundenen Fettsäure auf das Ausmaß der Reacylierung dieser verschiedenen LPC-Spezies. Untersuchungen dazu wurden sowohl mit Ganzzellen als auch mit isolierten Plasmamembranen durchgeführt. Sie zeigen, dass hier keine Bevorzugung bestimmter LPC-Spezies (d.h. Fettsäuren in C₁-Position) vorliegt (Abb. 3-35). Alle angebotenen LPC-Spezies wurden mit etwa gleicher Rate reacyliert. Selbst das artifizielle 17:0-LPC wurde im gleichen Ausmaß wie die nativen Spezies umgesetzt.

Die uneingeschränkte Acylierung des nicht natürlich vorkommenden 17:0-LPC ermöglichte Experimente zur Feststellung der für die Reacylierung bevorzugten Fettsäuren. Die aus 17:0-LPC gebildeten Phosphatidylcholine sind im Spektrum der natürlichen Phospholipide nicht vertreten, so dass die Neubildung dieser Moleküle sehr viel empfindlicher gemessen werden kann als die verhältnismäßig geringe Überproduktion bereits vorhandener Molekülspezies nach Zusatz von nativem LPC. Ein nach Zugabe von 17:0-LPC zu Ganzzellen erstelltes Massenspektrum der Phosphatidylcholine zeigt, dass vorrangig Linolsäure (18:2), aber auch Linolensäure (18:3) von den Zellen zur Reacylierung verwendet wird (Abb. 3-36). Die Reacylierung der C₂-Position erfolgt demnach bezüglich der verwendeten Fettsäuren nach den gleichen „Kriterien“ wie die Phosphatidylcholin-Biosynthese. Es werden nicht die mengenmäßig am stärksten vorliegenden Fettsäuren bevorzugt – dies sind vor allem Palmitin-(16:0) und Stearinsäure (18:0), s. Abb. 3-37 – sondern es dienen vorrangig solche Fettsäuren zur Reacylierung, welche die Bildung der typischen, abundanten PC-Spezies mit ungesättigter C₂-Fettsäure ermöglichen.

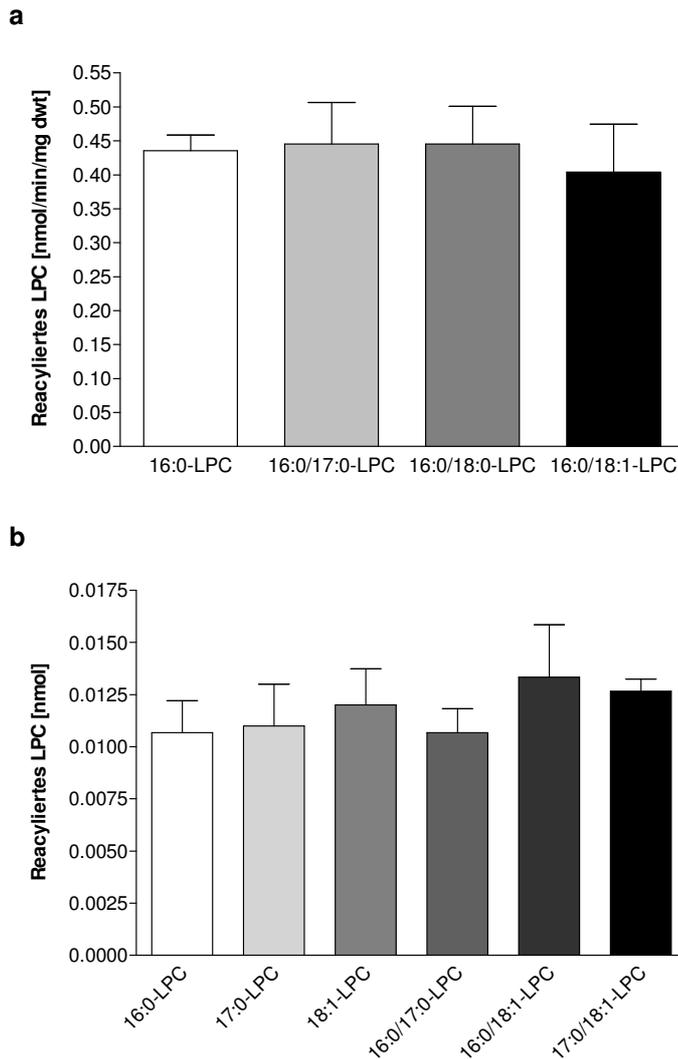


Abb. 3-35: Reacylierung verschiedener LPC-Spezies in Ganzzellen und isolierten Plasmamembranen

A) Die Lipide aus Ganzzellen wurden 2,5 min nach Zusatz von LPC extrahiert, durch HPTLC isoliert und der Umsatz des ^{14}C -markierten LPC mittels der Radioaktivität quantifiziert.

Der Zusatz verschiedener LPC-Spezies erfolgte wie angegeben, $40\ \mu\text{M}$ ^{14}C -16:0-LPC (spezifische Aktivität: $2,7\ \text{mCi/mmol}$) bzw. jeweils $20\ \mu\text{M}$ ^{14}C -16:0-LPC (spezifische Aktivität: $5,4\ \text{mCi/mmol}$) + $20\ \mu\text{M}$ einer weiteren LPC-Spezies.

Die identische Einbaurrate von markiertem 16:0-LPC in PC belegt gleichberechtigten Umsatz aller zugesetzter LPC (SD, $n=3$; s. a. Material/Methoden).

B) Die Lipide aus Plasmamembranen wurden 5 min nach Zusatz von LPC und Oleoyl-CoA extrahiert, durch HPTLC isoliert und der Umsatz des ^{14}C -markierten Oleoyl-CoA mittels der Radioaktivität quantifiziert.

Der Zusatz verschiedener LPC-Spezies erfolgte wie angegeben, jeweils $30\ \mu\text{M}$ LPC einer Spezies bzw. jeweils $15\ \mu\text{M}$ LPC zweier Spezies kombiniert. Allen Proben wurde $60\ \mu\text{M}$ ^{14}C -Oleoyl-CoA (spezifische Aktivität: $1,4\ \text{mCi/mmol}$) zugesetzt, da in Plasmamembranen keine aktivierten Fettsäuren vorliegen oder generiert werden können.

Die identische Einbaurrate von markiertem Oleoyl-CoA in PC belegt gleichberechtigten Umsatz aller zugesetzter LPC (SD, $n=3$; s. a. Material/Methoden).

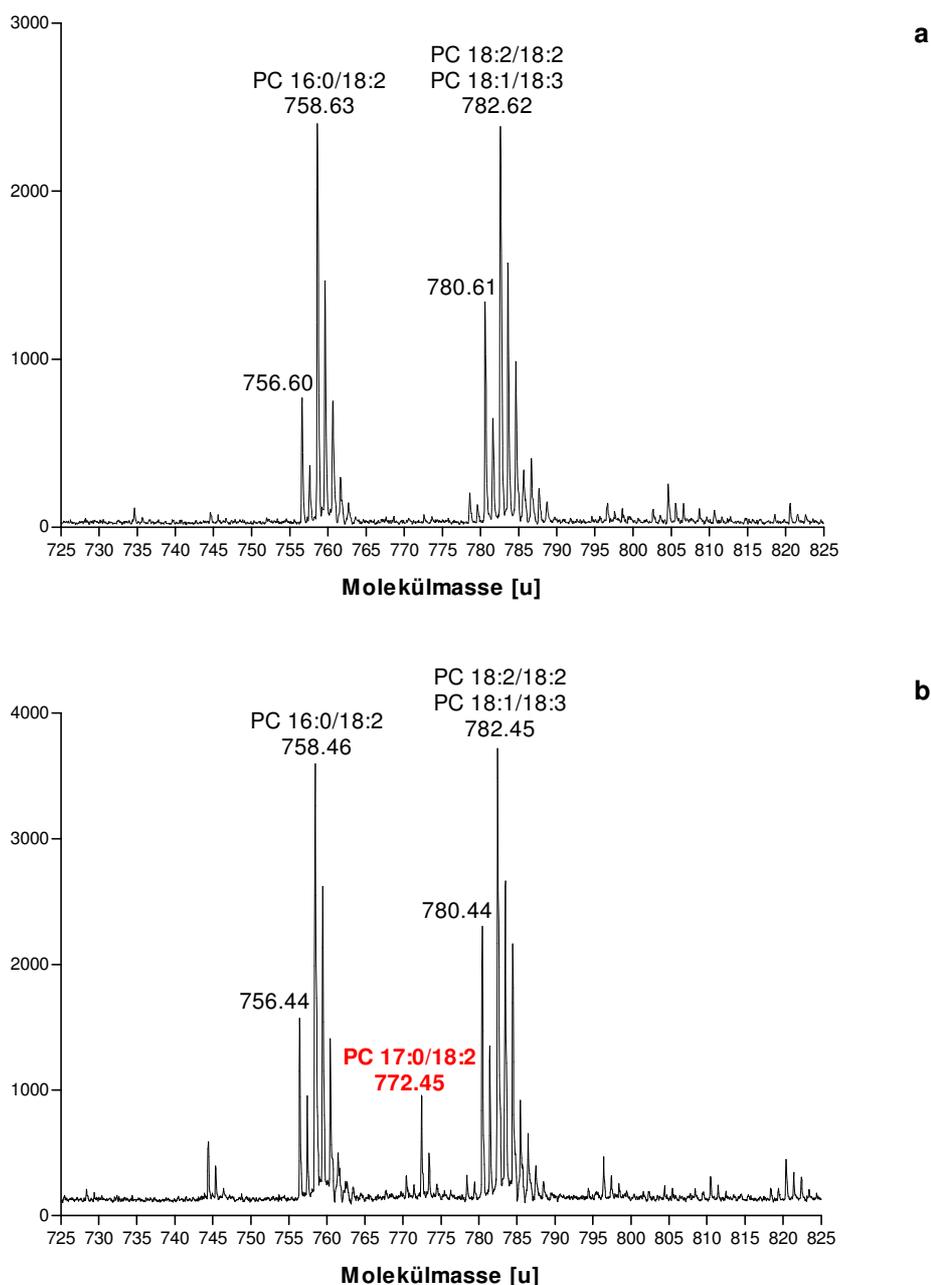


Abb. 3-36: Massenspektrometrische Untersuchung der PC-Spezies in Ganzzellen nach Zusatz von 17:0-LPC

Phosphatidylcholine wurden aus Ganzzellen extrahiert und mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie untersucht. Die dargestellten Massepeaks repräsentieren die verschiedenen Phosphatidylcholin-Spezies als Protonen-Addukte. Die Peakhöhe entspricht der relativen Häufigkeit einer Masse im Gesamt-Extrakt. Für die beiden häufigsten Massen sind jeweils die in diesen Lipiden vertretenen Fettsäuren in den möglichen Kombination angegeben.

- a: Extrakt aus unbehandelten Zellen
- b: Extrakt aus Zellen, die 10 min mit 17:0-LPC (80 μ M) inkubiert wurden. Nach dieser Behandlung ist die PC-Spezies mit den Fettsäuren 17:0 (Heptadecansäure) und 18:2 (Linolsäure) vertreten und rot gekennzeichnet.

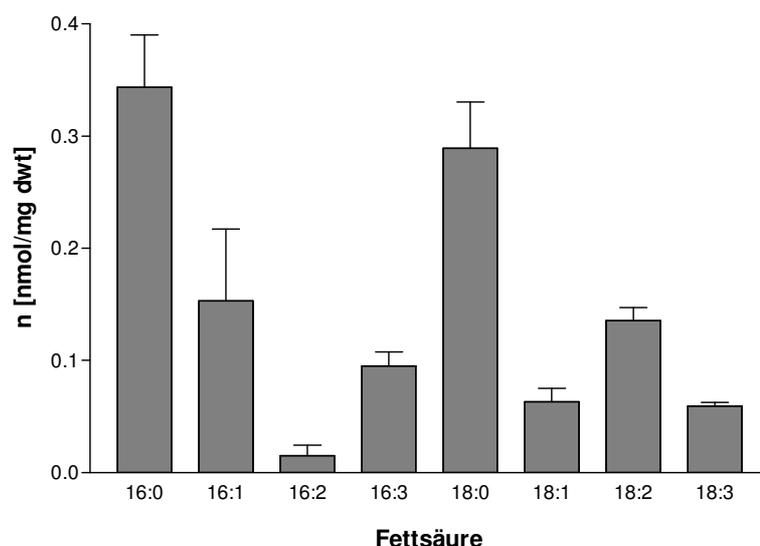


Abb. 3-37: Gehalt freier Fettsäuren in Ganzzellen

Nach Extraktion der freien Fettsäuren aus Ganzzellen erfolgte die Quantifizierung der häufigsten Spezies durch GC/MS anhand des zugesetzten Fettsäure-Mengenstandards Heptadecansäure (17:0). (SD, n=2; s. a. Material/Methoden).

3.3.5 Ausmaß und Limitierung des LPC-Metabolismus

Aus den bisher verfügbaren Informationen geht hervor, dass die aktuelle Konzentration von LPC in einer *Eschscholzia*-Zelle von der Balance zweier Reaktionen abhängt:

- Bildung von LPC durch die Aktivität von PLA₂
- Rate der Reacylierung durch die Reacylase-Aktivität

Das Verhältnis beider Aktivitäten sollte daher die maximal mögliche Konzentration an LPC bestimmen. Nachdem die maximale Kapazität der PLA₂ aus vorherigen Arbeiten abgeschätzt werden kann (Viehweger et al., 2002), wurde zunächst untersucht, welche Faktoren die Reacylierungsrate begrenzen.

Die Reacylierungsrate von LPC in Ganzzellen wurde nach Zusatz sättigender Mengen 16:0-LPC mit ca. 0,43 nmol/min/mg dwt bestimmt. Bei zusätzlicher Gabe von freier Fettsäure (z.B. Linolsäure) wird diese auch zur Reacylierung verwendet. Dies ging aus einer erhöhten Einbaurate ¹⁴C-markierter Fettsäuren in PC nach Zusatz von LPC hervor. Die Rate der Reacylierung erhöht sich durch Zusatz von Fettsäuren aber nicht (Abb. 3-38). Dies bedeutet, dass die in der Zelle

zur Verfügung stehende Menge freier Fettsäuren die Reacylierungsrate nicht begrenzt.

Wird den Zellen Linolsäure (18:2) in Abwesenheit von LPC zugesetzt, erfolgt der Einbau dieser Fettsäure in PC deutlich schneller (ca. 1,2 nmol/min/mg dwt) als die Reacylierung zugesetzten LPCs (s.o.). Demzufolge ist auch die Kapazität zur Aktivierung freier Fettsäure zu Acyl-CoA nicht limitierend für die Einbaurrate in PC. Hinzu kommt, dass diese vergleichsweise hohe Rate des Fettsäure-Einbaus in PC durch LPC-Zusatz gesteigert werden kann (s.o.). Offenbar kann eine ausreichende Menge aktivierter Fettsäuren auch für dieses weitere Substrat bereitgestellt werden.

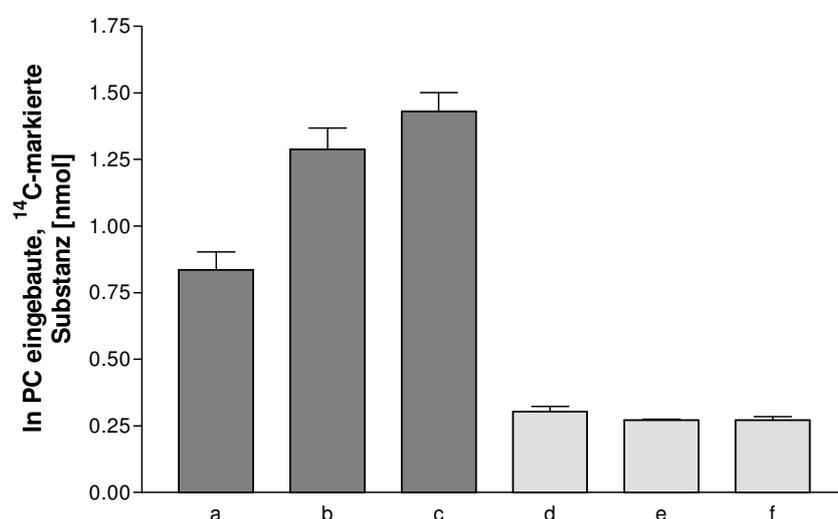


Abb. 3-38: Einbau freier Fettsäure und LPC in Phosphatidylcholine von Ganzzellen

- a) Die Lipide aus Ganzzellen wurden 2,5 min nach Zusatz von 20 μ M ¹⁴C-markierter Linolsäure (18:2; spezifische Aktivität: 5,4 mCi/mmol) extrahiert, der Einbau der ¹⁴C-markierten Fettsäure mithilfe der HPTLC quantifiziert (SD, n=3; s. a. Material/Methoden). Der Wert widerspiegelt die Summe aller in der Ganzzelle ablaufenden Prozesse des Einbaus freier Fettsäuren in Phosphatidylcholin, z.B. Phospholipid-Biosynthese und Reacylierung.
- b) analog a), zusätzlich wurde 20 μ M 16:0-LPC zugesetzt
- c) analog a), zusätzlich wurde 20 μ M 18:1-LPC zugesetzt
- d) Die Lipide aus Ganzzellen wurden 2,5 min nach Zusatz von 20 μ M ¹⁴C-16:0-LPC (spezifische Aktivität: 5,4 mCi/mmol) extrahiert, die Metabolisierung des ¹⁴C-markierten LPC mithilfe der HPTLC quantifiziert (SD, n=3; s.a. Material/Methoden). Der Wert widerspiegelt ausschließlich die Menge des von außen zugesetzten und in dieser Zeit durch Acyltransfer metabolisierten LPC.
- e) analog d), zusätzlich wurde 20 μ M Linolsäure (18:2) zugesetzt
- f) analog d), zusätzlich wurde 20 μ M Ölsäure (18:1) zugesetzt

Demnach wird das Ausmaß der LPC-Reacylierung nicht durch Substrate, sondern durch die Kapazität des Acyl-Transfers, d.h. die Aktivität der LPC-Reacylase (LPC-Acyltransferase) bestimmt. Diese Aktivität ist, wie bereits beschrieben, zum weitaus überwiegenden Teil an der Plasmamembran gebunden.

Vergleicht man die verfügbare LPC-reacylierende Kapazität von Ganzzellen mit der in diesen Zellen maximal erreichbaren PLA₂-Aktivität, kommt man zu einem überraschenden Ergebnis: Die PLA₂-Aktivität (nach Elicitor-Zusatz mittels fluorogenen Substraten messbare Umsatzrate) ist um den Faktor > 100 geringer als die Kapazität der Reacylierung. In einem typischen Experiment wurde für die Umsatzrate der PLA₂ ein Wert von ca. 1,5 pmol/min/mg dwt gemessen (Viehweger et al., 2002). Für die Reacylierung wurde, wie bereits erwähnt, ein Umsatz von ca. 430 pmol/min/mg dwt gefunden.

Da die Reacylierungskapazität an der Plasmamembran konzentriert ist, kann der transiente Peak der LPC-Konzentration (s.o.) demnach nicht unmittelbar an der Plasmamembran entstehen, sondern nur nach der raschen Diffusion und Kumulation des gebildeten LPC im Zytoplasma, wo keine oder nur eine geringe Reacylierung erfolgt (s. Kap. 3.3.3). Die hohe Ausbreitungsgeschwindigkeit selbst von extern zugesetztem, fluoreszenzmarkiertem LPC in das Zytoplasma wurde durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen bestätigt (Viehweger et al. 2002). Die hier gefundene Reacylierung des LPC ist von entscheidender Bedeutung für den transienten Charakter, d.h. die Signalfunktion des LPC-Peaks innerhalb des Signaltransfers vom Elicitorkontakt zum pH-Shift.

3.3.6 Der Einfluss von Hefeelicitor auf die Reacylierungsrate

Das transiente Auftreten erhöhter LPC-Spiegel nach Kontakt der Zellen mit Hefeelicitor (s.o.) könnte sowohl durch erhöhte Aktivität der PLA₂ als auch durch verminderte Reacylierung des LPC zustande kommen. Neben der bereits nachgewiesenen Aktivierung der PLA₂ durch Elicitorkontakt wurde deshalb auch ein möglicher Einfluss des Elicitors auf die reacylierende Aktivität überprüft. In Abbildung 3-39 ist zu sehen, dass die Reacylierung des LPC bei Anwesenheit des Elicitors und unabhängig von dessen Einwirkzeit unverändert bleibt. Für die kurzfristig erhöhte LPC-Konzentration ist demnach ausschließlich die Aktivitätserhöhung der PLA₂ verantwortlich. Die konstant hohe Aktivität der Reacylierung

begrenzt deshalb die maximal erreichbare steady-state-Konzentration des Signalmoleküls LPC.

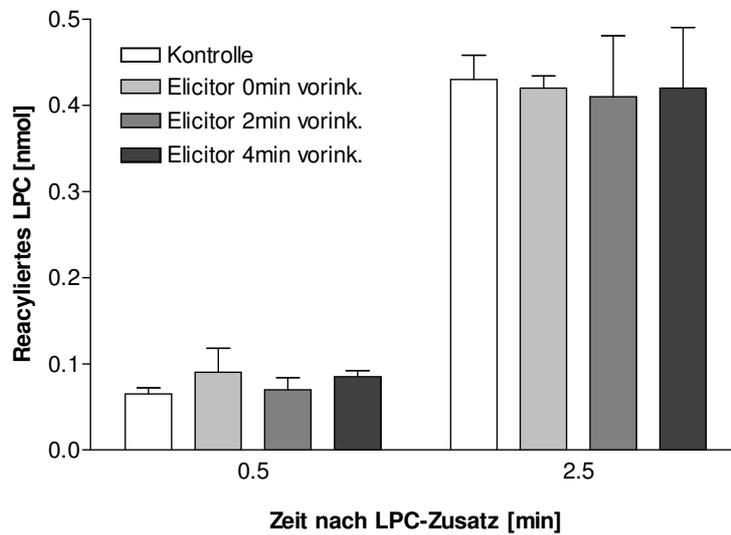


Abb. 3-39: Recylierung von LPC unter Elicitoreinfluss

Aus Ganzzellen wurden 0,5 min bzw. 2,5 min nach Zusatz von $20 \mu\text{M}$ ^{14}C -16:0-LPC (spezifische Aktivität: $5,4 \text{ mCi/mmol}$) die Lipide extrahiert und mithilfe der HPTLC quantifiziert. Zusätzlich wurde, wie oben angegeben, 0, 2 oder 4 min vor LPC-Zusatz Elicitor ($2 \mu\text{g/ml}$; ausgenommen Kontrolle) zugegeben (SD, $n=2$). S. a. Material/Methoden.

4 Zusammenfassung

- (1) Eine in der Plasmamembran lokalisierte Phospholipase A_2 besitzt eine entscheidende Rolle im Signalweg zwischen Elicitorkontakt und Biosynthese von Benzophenanthridin-Alkaloiden in *Eschscholzia californica*. In Suspensionskultivierten Zellen wurden zwei Mechanismen gefunden, welche die Kontrolle dieses Signalenzym ermöglichen:
 - (a) die Kontrolle der Enzymaktivität (Freisetzung von LPC) durch die Wirkung des $G\alpha$ -Proteins,
 - (b) die Kontrolle des LPC-Gehalts durch Reacylierung.

- (2) Bei der regulatorischen Wirkung von G-Proteinen in Pflanzen sind noch zahlreiche Fragen offen, da ein einzelnes, vermutlich in allen höheren Pflanzen konserviertes Molekül zahlreiche Signalprozesse beeinflusst. In *Eschscholzia californica* ist das $G\alpha$ -Protein direkt an der Kontrolle der PLA_2 -Aktivität beteiligt (Viehweger et al., 2006, Roos et al., 2006). Um eine möglichst selektive Inaktivierung von $G\alpha$ an der Plasmamembran zu erreichen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression eines single-chain-Antikörpers (scFv) im Zytosol angewandt.

- (3) Das Auffinden von anti- $G\alpha$ -scFv erfolgte über die Selektion eines spezifisch bindenden Antikörpers aus zwei Phagenbanken mit humanen Antikörperfragmenten mittels Phage-Display. Es wurden ein Plasmid-Vektor zur Antikörper-Expression im pflanzlichen Zytosol konstruiert, Zellen von *Eschscholzia californica* transformiert, selektiert und langfristig kultiviert.

- (4) Die transformierten Zelllinien zeigten eine über mehrere Monate stabile Antikörper-Expression. Sie reagierten mit einer deutlich verminderten Alkaloid-Biosynthese bei Behandlung mit niedrigen Elicitorkonzentrationen. Zugleich war die Aktivierung der PLA_2 durch diese Elicitorkonzentrationen vermindert. Bei der essentiellen Bedeutung von LPC, des Produktes der PLA_2 , als Signalmolekül sprechen diese Daten für eine Kontrolle des gesamten Signalwegs durch $G\alpha$.

- (5) Transformierte, Antikörper produzierende Zelllinien exprimierten signifikant mehr G α -Protein als Zelllinien des Wildtyps. Dieses Phänomen erklärt einerseits den im Vergleich zu antisense-G α -Zelllinien weniger vom Wildtyp abweichenden Phänotyp und belegt zugleich eine spezifische Reaktion der Zellen auf die Expression eines G α -bindenden Proteins.
- (6) Zur Gewinnung des vollständigen G α -Proteins wurde eine cDNA-Bank von *Eschscholzia californica* hergestellt, das vollständige Gen isoliert, sequenziert und das Protein mit His-tag heterolog in Bakterien exprimiert. Bindungsstudien mit dem rekombinanten Protein sprechen für eine physikalische Interaktion mit solubilisierter PLA₂ aus der Plasmamembran.
- (7) Der Zusatz von LPC zu Zellsuspensionen führt zu einer raschen Reacylierung dieser Verbindungen, wobei bevorzugt Linolsäure als Acylierungspartner verwendet wird. Die Reacylierung hat damit die gleiche Präferenz für die verwendete C₂-Fettsäure wie die Phosphatidylcholin-Biosynthese.
- (8) Die Rate der Reacylierung wird nicht durch die Verfügbarkeit aktivierter Fettsäuren oder LPC limitiert, sondern durch die enzymatische Aktivität, welche überwiegend an der Plasmamembran lokalisiert ist.
- (9) Die Kapazität der Reacylierung in der Plasmamembran überschreitet bei Weitem die Aktivität der dort lokalisierten PLA₂. So ist sichergestellt, dass der für den weiteren Signalweg entscheidende Peak von LPC transient im Zytoplasma bzw. am Tonoplasten entsteht.

5 Literaturverzeichnis

Aharon, G.S., Gelli, A., Snedden, W.A., Blumwald, E., (1998), „Activation of a plant plasma membrane Ca^{2+} channel by $\text{TG}\alpha 1$, a heterotrimeric G protein α -subunit homologue“, FEBS Letters, 424, 17-21

Ando, S., Takumi, S., Ueda, Y., Ueda, T., Mori, N., Nakamura, C., (2000), „*Nicotiana tabacum* cDNAs encoding alpha and beta subunits of a heterotrimeric GTP-binding protein isolated from hairy root tissues“, Genes Genet. Syst., 75 (4), 211-221

Ankudo, T., (2004), „Immunomodulation of Brassinosteroid Functions in Seeds of *Arabidopsis thaliana* (L.)“, Dissertation, MLU Halle/Saale

Apone, F., Alyeshmerni, N., Wiens, K., Chalmers, D., Chrispeels, M.J., Colucci, G., (2003), „The G-Protein-Coupled Receptor GCR1 Regulates DNA Synthesis through Activation of Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C“, Plant Physiology, 133, 571-579

Artsaenko, O., Peisker, M., zur Nieden, U., Fiedler, U., Weiler, E.W., Müntz, K., Conrad, U., (1995), „Expression of a single-chain Fv antibody against abscisic acid creates a wilted phenotype in transgenic tobacco“, The Plant Journal, 8(5), 745-750

Assmann, S.M., (2002), „Heterotrimeric and Unconventional GTP Binding Proteins in Plant Cell Signaling“, The Plant Cell, Supplement 2002, 355-373

Belny, M., Hérouart, D., Thomasset, B., David, H., Jacquin-Debreuil, A., David, A., (1997), „Transformation of *Papaver somniferum* cell suspension cultures with *saml* from *A. thaliana* results in cell lines of different S-adenosyl-L-methionine synthase activity“, Physiologia plantarum, 99, 233-240

Bevan, M., (1984), „Binary Agrobacterium vectors for plant transformation“, Nucl. Acids Res., 12, 8711-8721

Blechert, S., Brodschelm, W., Hölder, S., Kammerer, L., Kutchan, T.M., Mueller, M.J., Xia, Z.-Q., Zenk, M.H., (1995), „The octadecanoid pathway: Signal molecules for the regulation of secondary pathways“, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 92, 4099-4105

Bradford, M.M., (1976), „A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding“, Analytical Biochemistry, 73: 248-254

Briskin, D.P., Leonard, R.T., Hodges, T.K., (1987), „Isolation of the plasma membrane: Membrane markers and general principles“, Methods Enzymol. **148**, 542–558

Bruyns, A.-M., De Jaeger, G., De Neve, M., De Wilde, C., Van Montagu, M., Depicker, A., (1996), „Bacterial and plant-produced scFv proteins have similar antigen-binding properties“, FEBS Letters, 386: 5-10

Chen, Y.-L., Huang, R., Xiao, Y.-M., Lü, P., Chen, J., Wang, X.-C., (2004), „Extracellular Calmodulin-Induced Stomatal Closure Is Mediated by Heterotrimeric G Protein and H₂O₂“, Plant Physiol., 136, 4096-4103

Christie, W.W., (1990), „Has thin-layer chromatography had its day?“, Lipid Technology, 2, 22-23

Conrad, U., Fiedler, U., (1998), „Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity“, Plant Molecular Biology 38: 101-109

Denecke, J., De Rycke, R., Botterman, J., (1992), „Plant and mammalian sorting signals for protein retention in the endoplasmic reticulum contain a conserved epitope“, The EMBO Journal, Vol. 11, 6, 2345-2355

- Devitt, M.L., Maas, K.J., Stafstrom, J.P.**, (1999), „Characterization of DRGs, developmentally regulated GTP-binding proteins, from pea and *Arabidopsis*“, Plant Mol. Biol., 39, 75-82
- De Vries, S., Hoge, H., Bisseling, T.**, (1993), „Isolation of total and poly-somal RNA from plant tissues“ In: Gelvin SB, Schilperoort RA and Verma DPS (eds.), Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, B6, pp. 1-13.
- De Wildt, R.M.T., Mundy, C.R., Gorick, B.D., Tomlinson I.M.**, (2000), „Antibody arrays for high-throughput screening of antibody-antigen interactions“, Nature Biotechnology, 18: 989-994
- Dhonukshe, P., Laxalt, A.M., Goedhart, J., Gadella, T.W.J., Munnik, T.**, (2003), „Phospholipase D Activation Correlates with Microtubule Reorganization in Living Plant Cells“, Plant Cell, 15, 2666-2679
- Digeon, J.-F., Guideroni, E., Alary, R., Michaux-Ferrière, N., Joudrier, P., Gautier, M.-F.**, (1999), „Cloning of a wheat *puroindoline* gene promotor by IPCR and analysis of promotor regions required for tissue-specific expression in transgenic rice seeds“, Plant Molecular Biology, 39: 1101-1112
- Dittrich, H., Kutchan, T.M.**, (1991), „Molecular cloning, expression and induction of berberine bridge enzyme, an enzyme essential to the formation of benzophenanthridine alkaloids in the response of plants to pathogenic attack“, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 88: 9969-9973
- Dordschbal, B.**, (2003), „Aktivität und Regulation von Phospholipase A2 in der Plasmamembran von *Eschscholzia californica*“, Dissertation, MLU Halle/Saale
- Evan, G.I., Lewis, G.K., Ramsey, G., Bishop, J.M.**, (1985), „Isolation of monoclonal antibodies specific for human *c-myc* proto-oncogene product“, Molecular and Cellular Biology, 5(12): 3610-3616

- Färber, K., Schumann, B., Miersch, O., Roos, W.**, (2003), „Selective desensitization of jasmonate- and pH-dependent signaling in the induction of benzophenanthridine biosynthesis in cells of *Eschscholzia californica*“, *Phytochemistry*, 62, 491-500
- Fiedler, U., Phillips, J., Artsaenko, O., Conrad, U.**, (1997), „Optimization of scFv antibody production in transgenic plants“, *Immunotechnology* 3: 205-216
- Furukawa-Stoffer, T.L., Boyle, R.M., Thomson, A.L., Sarna, M.A., Weselake, R.J.**, (2003), „Properties of Lysophosphatidylcholine Acyltransferase from *Brassica napus* Cultures“, *Lipids*, 38, 651-656
- Gotor, C., Lam, E., Cejudo, F.J., Romero, L.C.**, (1996), „Isolation and analysis of the soybean SGA2 gene (cDNA), encoding a new member of the plant G-protein family of signal transducers“, *Plant Mol. Biol.* 32 (6), 1227-1234
- Haider, G., von Schrader, T., Füslein, M., Blechert, S., Kutchan, T.M.**, (2000), „Structure-Activity Relationships of Synthetic Analogs of Jasmonic Acid and Coronatine on Induction of Benzo[*d*]phenanthridine Alkaloid Accumulation in *Eschscholzia californica* Cell Cultures“, *Biol. Chem.*, Vol. 381, 741-748
- Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., Johnson, K.S., Chiswell, D.J., Hudson, P., Winter, G.**, (1991), „Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains“, *Nucleic Acids Research*, 19(15): 4133-4137
- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I., Okada, K.**, (2001), „The *DEFECTIVE IN ANTHHER DEHISCENCE1* Gene Encodes a Novel Phospholipase A1 Catalyzing the Initial Step of Jasmonic Acid Biosynthesis,

Which Synchronizes Pollen Maturation, Anther Dehiscence, and Flower Opening in Arabidopsis“, *The Plant Cell*, Vol. 13, 2191-2209

Jeoung, J.M., Krishnaveni, S., Muthukrishnan, S., Trick, H.N., Liang, G.H., (2002), „Optimization of sorghum transformation parameters using genes for green fluorescent protein and β -glucuronidase as visual markers“, *Hereditas* 137: 20-28

Jones, A.M., Assmann, S.M., (2004), „Plants: the latest model system for G-protein research“, *EMBO reports* 5, 572-578

Joo, J.H., Wang, S., Chen, J.G., Jones, A.M., Fedoroff, N.V., (2005), „Different Signaling and Cell Death Roles of Heterotrimeric G Protein α and β Subunits in the Arabidopsis Oxidative Stress Response to Ozone“, *The Plant Cell*, Vol. 17, 957-970

Kato, C., Mizutani, T., Tamaki, H., Kumagai, H., Kamiya, T., Hirobe, A., Fujisawa, Y., Kato, H., Iwasaki, Y., (2004), „Characterization of heterotrimeric G protein complexes in rice plasma membrane“, *The Plant Journal*, 38, 320-331

Kim, W.Y., Cheong, N.E., Lee, D.C., Je, D.Y., Bahk, J.D., Cho, M.J., Lee, S.Y., (1995), „Cloning and sequencing analysis of a full-length cDNA encoding a G protein alpha subunit, SGA1, from soybean“, *Plant Physiol.* 108 (3), 1315-1316

Kurosaki, F., Yamashita, A., Arisawa, M., (2001), „Involvement of GTP-binding protein in the induction of phytoalexin biosynthesis in cultured carrot cells“, *Plant Sci.*, 161, 273-278

Kutsnetsov, V.V., Oelmueller, R., (1996), „Isolation of cDNAs encoding the subunit alpha of heterotrimeric G proteins from *Lupinus luteus*“, *Plant Physiol.* 112, 1399-1399

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

Lee, H.Y., Bahn, S.C., Kang, Y.-M., Lee, K.H., Kim, H.J., Noh, E.K., Palta, J.P., Shin, J.S., Ryu, S.B., (2003), „Secretory Low Molecular Weight Phospholipase A₂ Plays Important Roles in Cell Elongation and Shoot Gravitropism in Arabidopsis“, *The Plant Cell*, Vol. 15, 1990-2002

Lein, W., Saalbach, G., (2001), „Cloning and direct G-protein regulation of phospholipase D from tobacco“, *Bioch. Biophys. Acta*, 1530, 172-183

Leps, B., (2003), „Anti-Quinmerac Einkettenantikörperexpression in transgenen Tabakpflanzen“, Dissertation, MLU Halle/Saale

Linsmaier, E.M., Skoog, F., (1965), „Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures“, *Physiol. Plant* 18, 100-127

Ma, H., Yanofsky, M.F., Huang, H., (1991), „Isolation and sequence analysis of TGA1 cDNAs encoding a tomato G protein alpha subunit“, *Gene* 107 (2), 189-195

Ma, H., Yanofsky, M.F., Meyerowitz, E.M., (1990), „Molecular cloning and characterization of GPA1, a G protein alpha subunit gene from *Arabidopsis thaliana*“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 (10), 3821-3825

Marc, J., Granger, C.L., Brincat, J., Fisher, D.D., Kao, T., McCubbin, A.G., Cyr, R.J., (1998), „A GFP-MAP4 Reporter Gene for Visualizing Cortical Microtubule Rearrangements in Living Epidermal Cells“, *The Plant Cell*, Vol. 10, 1927-1939

Marsh, J.F. III, Kaufman, L.S., (1999), „Cloning and characterisation of PGA1 and PGA2: two G protein alpha-subunits from pea that promote growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*“, *Plant J.* 19 (3), 237-247

- Martiny-Baron, G., Scherer, G.F.E.**, (1989), „Phospholipid-stimulated Protein Kinase in Plants“, *J. Biol. Chem.*, 264, 18052-18059
- Memelink, J., Verpoorte, R., Kijne, J.W.**, (2001), „ORCA nization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism“, *TRENDS in Plant Science*, Vol. 6, 5, 212-219
- Mongrand, S., Cassagne, C., Bessoule, J.-J.**, (2000), „Import of Lyso-Phosphatidylcholine into Chloroplasts Likely at the Origin of Eukaryotic Plastidial Lipids“, *Plant Physiology*, Vol. 122, 845-852
- Moreau, P., Bessoule, J.-J., Mongrand, S., Testet, E., Vincent, P., Cassagne, C.**, (1998), „Lipid Trafficking in Plant Cells“, *Prog. Lipid Res.*, Vol. 37, 371-391
- Mueller, M., J., Brodschelm, W., Spannagl, E., Zenk, M., H.**, (1993), „Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 90, 7490-7494
- Munnik, T., Irvine, R.F., Musgrave, A.**, (1998), „Phospholipid signalling in plants“, *Bioch. et Biophys. Acta*, 1389, 222-272
- Munroe, S., Pelham, H.R.B.**, (1987), „A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins“, *Cell*, 48: 899-907
- Narváez-Vásquez, J., Florin-Christensen, J., Ryan, C.A.**, (1999), „Positional Specificity of a Phospholipase A Activity Induced by Wounding, Systemin, and Oligosaccharide Elicitors in Tomato Leaves“, *Plant Cell*, Vol. 11, 2249-2260
- Noiriel, A., Benveniste, P., Banas, A., Stymne, S., Bouvier-Navé, P.**, (2004), „Expression in yeast of a novel phospholipase A1 cDNA from *Arabidopsis thaliana*“, *Eur. J. Biochem.*, 271, 3752-3764

- Palmgren, M.G., Sommarin, M.**, (1989), „Lysophosphatidylcholine Stimulates ATP Dependent Proton Accumulation in Isolated Oat Root Plasma Membrane Vesicles“, *Plant Physiol.*, 90, 1009-1014
- Pandey, S., Assmann, S.M.**, (2004), „The Arabidopsis Putative G Protein-Coupled Receptor GCR1 Interacts with the G Protein α Subunit GPA1 and Regulates Abscisic Acid Signaling“, *Plant Cell*, 16, 1616-1632
- Park, S.-U., Facchini, P.J.**, (2000), „*Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of opium poppy, *Papaver somniferum* L., and California poppy, *Eschscholzia californica* Cham., root cultures“, *Journal of Experimental Botany*, Vol. 51, No. 347, 1005-1016
- Paul, R.U., Holk, A., Scherer, G.F.E.**, (1998), „Fatty acids and lysophospholipids as potential second messengers in auxin action. Rapid activation of phospholipase A₂ activity by auxin in suspension-cultured parsley and soybean cells“, *Plant Journal*, 16, 601-611
- Pelham, H.R.B.**, (1989), „Heat shock and the sorting of luminal ER proteins“, *The EMBO Journal*, Vol. 8, 11, 3171-3176
- Perroud, P.F., Diogon, T., Crevecoeur, M., Greppin, H.**, (2000), „Molecular cloning, spatial and temporal characterization of spinach SOGA1 cDNA, encoding an alpha subunit of G protein“, *Gene* 248 (1-2), 191-201
- Petković, M., Schiller, J., Müller, J., Müller, M., Arnold, K., Arnhold, J.**, (2001), „The signal-to-noise ratio as the measure for the quantification of lysophospholipids by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry“, *Analyst*, 126, 1042-1050 (1)
- Petković, M., Schiller, J., Müller, M., Benard, S., Reichl, S., Arnold, K., Arnhold, J.**, (2001), „Detection of Individual Phospholipids in Lipid Mixtures by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass

Spectrometry: Phosphatidylcholine Prevents the Detection of Further Species“, *Analytical Biochemistry*, 289, 202-216 (2)

Poulsen, C., Mai, X.M., Borg, S., (1994), „A *Lotus japonicus* cDNA encoding an alpha subunit of a heterotrimeric G-protein“, *Plant Physiol.* 105 (4), 1453-1454

Qin, C., Wang, X., (2002), „The Arabidopsis Phospholipase D Family. Characterization of a Calcium-Independent and Phosphatidylcholine-Selective PLD ζ 1 with Distinct Regulatory Domains“, *Plant Phys.*, 128, 1057-1068

Rajasekhar, V.K., Lamb, C., Dixon, R.A., (1999), „Early Events in the Signal Pathway for the Oxidative Burst in Soybean Cells Exposed to Avirulent *Pseudomonas syringae* pv *glycinea*“, *Plant Physiol.*, 120, 1137-1146

Roos, W., Viehweger, K., Dordschbal, B., Schumann, B., Evers, S., Steighardt, J., Schwartze, W., (2006), „Intracellular pH signals in the induction of secondary pathways - The case of *Eschscholzia californica*“, *Journal of Plant Physiology*, 163, 369-381

Roos, W., Dordschbal, B., Steighardt, J., Hieke, M., Weiss, D., Saalbach, G., (1999), „A redox-dependent, G-protein-coupled phospholipase A of the plasma membrane is involved in the elicitation of alkaloid biosynthesis in *Eschscholzia californica*“, *Biochimica et Biophysica Acta* 1448, 390-402

Roos, W., Evers, S., Hieke, M., Tschöpe, M., Schumann, B., (1998), „Shifts of Intracellular pH Distribution as a Part of the Signal Mechanism Leading to the Elicitation of Benzophenanthridine Alkaloids“, *Plant Physiology*, 118: 349-364

Ryan, C.A., (2000), „The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes“, *Biochim. et Biophys. Acta* 1477, 112-121

Ryu, S.B., (2004), „Phospholipid-derived signaling mediated by phospholipase A in plants“, Trends in Plant Science, 9: 229-235

Saalbach, G., Natura, B., Lein, W., Buschmann, P., Dahse, I., Rohrbeck, M., Nagy, F., (1999), „The α -subunit of a heterotrimeric G-protein from tobacco, NtGP α 1, functions in K⁺ channel regulation in mesophyll cells“, J. Exp. Bot. 50, 53-61

Sambrook, J., Maniatis, T., Fritsch, E.F., (1989), „Molecular cloning : A laboratory manual“, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, New York

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., (1977), „DNA sequencing with chain-terminating inhibitors“, Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74(12): 5463-5467

Sawahel, W.A., (2002), „Stable genetic transformation of garlic plants using particle bombardment“, Cellular & Molecular Biology Letters, Vol. 7, 49-59

Scheller, J., Henggeler, D., Viviani, A., Conrad, U., (2004), „Purification of Spider Silk-elastin from Transgenic Plants and Application for Human Chondrocyte Proliferation“, Transgenic Research, 13(1): 51-57

Scherer, G.F.E., (2002), „Secondary messengers and phospholipase A2 in auxin signal transduction“, Plant Mol. Biol., 49, 357-372

Schiller, J., Zschörnig, O., Petković, M., Müller, M., Arnhold, J., Arnold, K., (2001), „Lipid analysis of human HDL and LDL by MALDI-TOF mass spectrometry and ³¹P-NMR“, Journal of Lipid Research“, Vol. 42, 1501-1508

Schouten, A., Roosien, J., de Boer, J.M., Wilmink, A., Rosso, M.-N., Bosch, D., Stiekema, W.J., Gommers, F.J., Bakker, J., Schots, A., (1997), „Improving scFv antibody expression levels in the plant cytosol“, FEBS Letters, 415, 235-241

- Schumacher, H.M., Gundlach, H., Fiedler, F., Zenk, M.H.,** (1987), „Elicitation of benzophenanthridine alkaloid synthesis in *Eschscholzia* cell cultures“, Plant Cell Rep.6, 410-413
- Schwartz, W.,** (2001), „Untersuchungen zur Rolle der Phospholipase A2 und ihrer Katalyseprodukte im Signaltransfer in Einzelzellen von *Eschscholzia californica*“, Diplomarbeit, MLU Halle/Saale
- Seo, H.S., Kim, H.Y., Jeong, J.Y., Lee, S.Y., Cho, M.J., Bahk, J.D.,** (1995), „Molecular cloning and characterization of RGA1 encoding a G protein alpha subunit from rice (*Oryza sativa* L. IR-36)“, Plant Mol. Biol. 27 (6), 1119-1131
- Smith, P.K.** et al., (1985), „Measurement of protein using bicinchoninic acid“, Anal. Biochem., 150, 76-85
- Strauß, M., Kauder, F., Peisker, M., Sonnewald, U., Conrad, U., Heineke, D.,** (2001), „Expression of an abscisic acid-binding single-chain antibody influences the subcellular distribution of abscisic acid and leads to developmental changes in transgenic potato plants“, Planta, Vol. 213 (3), 361-369
- Tavernier, E., Pugin, A.,** (1995), „Phospholipase activities associated with the tonoplast from *Acer pseudoplatanus* cells: identification of a phospholipase A₁ activity“, Biochimica et Biophysica Acta, 1233, 118-122
- Ten Hoopen, P.,** (2002), „Immunomodulation of jasmonate functions“, Dissertation, MLU Halle/Saale
- Tsukada, K., Ihizaka, M., Fujisawa, Y., Iwasaki, Y., Yamaguchi, T., Minami, E., Shibuya, N.,** (2002), „Rice receptor for chitin oligosaccharide elicitor does not couple to heterotrimeric G protein: Elicitor responses of

suspension cultures rice cells from Daikoku dwarf (d1) mutants lacking a functional G protein alpha-subunit“, *Physiol. Plant.*, 116, 373-382

Ullah, H., Chen, J.-G., Temple, B., Boyes, D.C., Alonso, J.M., Davis, K.R., Ecker, J.R., Jones, A.M., (2003), „The β -Subunit of the Arabidopsis G Protein Negatively Regulates Auxin-Induced Cell Division and Affects Multiple Developmental Processes“, *Plant Cell*, 15, 393-409

Ullah, H., Chen, J.-G., Wang, S., Jones, A.M., (2002), „Role of a heterotrimeric G protein in regulation of Arabidopsis seed germination“, *Plant Physiol.*, 129, 897-907

Vera-Estrella, R., Higgins, V.J., Blumwald, E., (1994), „Plant Defense Response to Fungal Pathogens (II. G-Protein-Mediated Changes in Host Plasma Membrane Redox Reactions)“, *Plant Physiol.*, 106, 97-102

Van der Fits, L., Memelink, J., (2001), „The jasmonate-inducible AP2/ERF-domain transcription factor ORCA3 activates gene expression via interaction with a jasmonate-responsive promoter element“, *Plant Journal*, 25 (1): 43-53

Viehweger, K., Schwartz, W., Schumann, B., Lein, W., Roos, W., (2006), „The G α protein controls a pH dependent signal path to the induction of phytoalexin biosynthesis in *Eschscholzia californica*“, *The Plant Cell*, 18, 1510-1523

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

Wang, X.-Q., Ullah, H., Jones, A.M., Assmann, S.M., (2001), „G Protein Regulation of Ion Channels and Abscisic Acid Signaling in *Arabidopsis* Guard Cells“, *Science*, Vol. 292, 2070-2072

- Wang, X.**, (2001), „Plant Phospholipases“, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52, 211-231
- Wang, H., Lee, M.M., Schiefelbein, J.W.**, (2002), „Regulation of the Cell Expansion Gene *RHD3* during Arabidopsis Development“, *Plant Physiology*, 129, 638-649
- Weiss, D.**, (2004), „Die Sanguinarin-Reduktase - ein neues Redoxenzym mit essentiellen Funktionen in Metabolismus und Kompartimentierung der Benzophenantridine in Zellsuspensionen von *Eschscholzia californica*“, Dissertation, MLU Halle/Saale
- Williams, J.P., Khan, M.U., Wong, D.**, (1995), „A simple technique for the analysis of positional distribution of fatty acids on di- and triacylglycerols using lipase and phospholipase A₂“, *Journal of Lipid Research*, Vol. 36, 1407-1412
- Xiang, C., Han, P., Lutziger, I., Wang, K., Oliver, D.J.**, (1999), „A mini binary vector series for plant transformation“, *Plant Molecular Biology*, 40: 711-717
- Yang, Z.**, (2002), „Small GTPases: Versatile Signaling Switches in Plants“, *The Plant Cell*, Supplement 2002, 375-388
- Zabrouskov, V., Al-Saad, K.A., Siems, W.F., Hill, H.H. Jr.N., Knowles, R.**, (2001), „Analysis of plant phosphatidylcholines by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry“, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 15, 935-940
- Zhang, W., Qin, C., Zhao, J., Wang, X.**, (2004), „Phospholipase D α 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling“, *PNAS*, Vol. 101, 9508-9513

Zhao, J., Wang, X., (2004), „*Arabidopsis* Phospholipase D α 1 Interacts with the Heterotrimeric G-protein α -Subunit through a Motif Analogous to the DRY Motif in G-protein-coupled Receptors“, J. Biol. Chem., 279, 1794-1800

6 Abkürzungsverzeichnis

AP.....	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP.....	Adenosin-Triphosphat
BCA	Bicinchonsäure
BEPC	BODIPY®-markiertes PC-Analogon, dessen C ₁ -Fettsäure über eine Ether-Brücke gebunden ist (1-(O-(11-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionyl)-amino)undecyl)-2-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin)
bp.....	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	Copy-DNA
CHAPS.....	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CoA.....	Coenzym A
cpm	„counts per minute“, gemessene radioaktive Zerfälle pro Minute
CTAB.....	Cetyltrimethylammoniumbromid
CTP	Cytosin-Triphosphat
DC.....	Dünnschichtchromatografie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Mischung der Desoxy-Nukleosid-Triphosphate von Adenin, Thymin, Cytosin, Guanin
DTE	Dithioerythritol
dwt.....	Trockenmasse
ECL.....	verstärkte Chemolumineszenz
EDTA.....	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
ELISA.....	Enzym-gebundener Immuno-Sorbtiions-Assay
ETYA	5,8,11,14-Eicosatetraensäure
Fv	variable Fragmente einzelner Immunglobulin-Ketten
x g.....	relative Zentrifugalkraft
GC.....	Gaschromatografie
GDP.....	Guanosin-Diphosphat
GTP	Guanosin-Triphosphat

GTP γ ³⁵ S.....	³⁵ S-markiertes GTP
HPTLC.....	Hochleistungs-Dünnschichtchromatografie
HRP	Rettich-Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IPTG.....	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDa.....	Kilodalton
KDEL.....	Sequenz der 4 Aminosäuren Lys-Asp-Glu-Leu
LPC	Lysophosphatidylcholin
M	„molar“, Mol pro Liter
MALDI-TOF ...	matrix assisted laser desorption ionisation time of flight
MeOH.....	Methanol
MES	Morpholinoethansulfonsäure
mikros.	mikrosomal(es)
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger-RNA
MS	Massenspektrometrie
N.....	„normal“, Mol Reaktionsäquivalente pro Liter
NADPH.....	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (reduziert)
NPT	Neomycin-Phospho-Transferase
NTA.....	Nitrilotriessigsäure
OD ₆₀₀	optische Dichte (Absorption) bei 600 nm
PAA	Polyacrylamid
PAGE.....	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS.....	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PC.....	Phosphatidylcholin
PCR.....	Polymerase-Kettenreaktion
PI-PLC.....	Phosphoinositid-spezifische PLC
PLA.....	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PLD.....	Phospholipase D
PMSF	Phenylmethylsulfonfluorid
pNPP	Para-Nitrophenylphosphat
PVDF.....	Polyvinylidenfluorid
Rf.....	Retentionsfaktor

RNA.....	Ribonukleinsäure
rpm.....	Umdrehungen pro Minute
scFv.....	Einketten-Antikörper-(Fragment)
SD.....	Standardabweichung
SDS.....	Natrium-Dodecylsulfat
TBE.....	Tris/Borsäure/EDTA
TEMED.....	Tetramethylethyldiamin
TGA.....	transgene, (Einketten-)Antikörper exprimierende Zelllinie von <i>E. californica</i>
Tris.....	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSP.....	Gesamtheit aller löslicher Proteine
λ_{EM}	Emissions-Wellenlänge
λ_{EX}	Excitations-Wellenlänge

Alle weiteren im Text verwendeten Abkürzungen werden direkt erklärt oder als bekannt vorausgesetzt.

7 Abbildungen und Tabellen

Abb. 1-1.....	Angriffsorte der Phospholipasen an Phospholipiden.....	8
Abb. 2-1.....	Vanadat-sensitive ATPase-Aktivität vor und nach 2-Phasen-Verteilung.....	31
Abb. 2-2.....	DNA- und Aminosäuresequenz eines G α -Fragments	33
Abb. 2-3.....	Gereinigter scFv (Coomassie-Färbung).....	39
Abb. 2-4.....	Transformierter Kallus auf Paromomycin-Agar	43
Abb. 2-5.....	G α -PCR-Produkt und pET23a (Ethidiumbromid- Agarose-Gel)	53
Abb. 2-6.....	GTP- γ - ³⁵ S-Bindungstest mit G α -Protein	55
Abb. 2-7.....	Dünnschichtchromatografische Trennung komplexer Lipid-Matrizes	59
Abb. 3-1.....	Schematische Darstellung eines Immunglobulins und eines scFv.....	66
Abb. 3-2.....	Schematische Darstellung des pIT1-Phagemid-Vektors.....	68
Abb. 3-3.....	Affinitätstest mit acht verschiedenen scFv-Klonen (ELISA).....	70
Abb. 3-4.....	Bestimmung der Bindungsaffinität von scFv Nr. 15 (ELISA).....	71
Abb. 3-5.....	Aminosäure- und DNA-Sequenz von scFv Nr. 15	72
Abb. 3-6.....	Schematische Darstellung des Vektors pRTRA 7/3	74
Abb. 3-7.....	Expressionskassette im pCB301-Kan-Vektor für die zytosolische Expression.....	75
Abb. 3-8.....	Schematische Darstellung des pCB301-Kan-Vektors	75
Abb. 3-9.....	Nachweis der scFv-Expression in transformierten Zelllinien von <i>E. californica</i> (Western-Blot).....	77
Abb. 3-10.....	Rückgang des scFv-Expressionsniveaus innerhalb einer Kultivierungsperiode.....	78
Abb. 3-11.....	Nachweis langfristig stabiler scFv-Expression (Western-Blot).....	79
Abb. 3-12.....	Affinitätstest mit anti-G α -scFv aus zwei transformierten Zelllinien von <i>E. californica</i> (ELISA).....	80

Abb. 3-13.....	Alkaloid-Antwort, ausgelöst durch verschiedene Elicior- konzentrationen	81
Abb. 3-14.....	Alkaloid-Antwort und scFv-Expression von anti-G α - scFv-Zelllinien (1).....	83
Abb. 3-15.....	Alkaloid-Antwort und scFv-Expression von anti-G α - scFv-Zelllinien (2).....	84
Abb. 3-16.....	Aktivität der Phospholipase A ₂ in Zellen des Wildtyps und in anti-G α -scFv-Zelllinien	85
Abb. 3-17.....	Vergleich der Proteinmengen von anti-G α -scFv und G α	88
Abb. 3-18.....	Schematische Darstellung der Konstruktion einer cDNA- Bank aus mRNA mithilfe der Gateway-Technologie.....	90
Abb. 3-19.....	Bestimmung von Insert-Größen der cDNA-Bank (Ethidiumbromid-Agarose-Gel)	91
Abb. 3-20.....	Primäres Ergebnis des cDNA-Bank-Screenings (Auto- radiogramm)	92
Abb. 3-21.....	Ergebnis des 3. Hybridisierungsdurchgangs (Autoradio- gramm)	93
Abb. 3-22.....	G α -Sequenz von <i>Eschscholzia californica</i>	95
Abb. 3-23.....	Heterolog exprimiertes G α -Protein aus <i>Eschscholzia</i> <i>californica</i> (Western-Blot)	96
Abb. 3-24.....	Gereinigtes, heterolog exprimiertes G α -Protein aus <i>Eschscholzia californica</i> (Coomassie-Färbung)	97
Abb. 3-25.....	Bindung von PLA ₂ an immobilisiertes G α	98
Abb. 3-26.....	Übersicht: Struktur von Phosphatidylcholinen und anderen Phospholipiden	100
Abb. 3-27.....	Dünnschichtchromatografische Untersuchung nach ¹⁴ C-LPC-Zusatz	102
Abb. 3-28.....	Massenspektrometrische Untersuchung der PC-Spezies in Ganzzellen.....	103
Abb. 3-29.....	Aktivität der Reacylierung von LPC in Zellfraktionen.....	104
Abb. 3-30.....	Spezifische Reacylierungsrate in Zellfraktionen.....	105
Abb. 3-31.....	Phosphatidylcholin - Biosynthese, Phospholipasen, Reacylierung	106

Abb. 3-32.....	Einbau extern zugesetzter Fettsäuren in PC (Radioaktivitätsverteilung im Dünnschichtchromatogramm).....	110
Abb. 3-33.....	Positionierung extern zugesetzter Fettsäuren in Phosphatidylcholinen (Radioaktivitätsverteilung im Dünnschichtchromatogramm).....	111
Abb. 3-34.....	Einbau zugesetzter Fettsäuren in Phosphatidylcholine.....	112
Abb. 3-35.....	Recycling verschiedener LPC-Spezies in Ganzzellen und isolierten Plasmamembranen	114
Abb. 3-36.....	Massenspektrometrische Untersuchung der PC-Spezies in Ganzzellen nach Zusatz von 17:0-LPC	115
Abb. 3-37.....	Gehalt freier Fettsäuren in Ganzzellen.....	116
Abb. 3-38.....	Einbau freier Fettsäure und LPC in Phosphatidylcholine von Ganzzellen	117
Abb. 3-39.....	Recycling von LPC unter Elicitorinfluss.....	119
Tab. 3-1	G α -Proteine einiger Pflanzenspezies im Vergleich zu G α von <i>E. californica</i>	94
Tab. 3-2	Massepeaks der Phosphatidylcholine aus <i>E. californica</i>	107
Tab. 3-3	Massepeaks der Lysophosphatidylcholine aus <i>E. californica</i>	108
Tab. 3-4	Häufigste Phosphatidylcholin-Spezies in <i>E. californica</i>	109

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Werner Roos, der mir die Möglichkeit gab, mich im Rahmen dieser Arbeit mit einer sehr interessanten und komplexen Thematik eingehend zu beschäftigen. Die zahlreichen Diskussionen mit ihm über Zellphysiologie wie auch viele andere Belange dieser Welt weiteten den Blick und schärften die Sinne.

Untrennbar verbunden mit der Entstehung dieser Arbeit ist die gesamte Arbeitsgruppe „Molekulare Zellbiologie“ im Institut für Pharmazeutische Biologie und Pharmakologie. Die lieben Kollegen halfen, berieten und unterstützten mich mit ihrer Erfahrung. Vielen Dank an alle!

Besonders hervorheben möchte ich die Unterstützung durch Frau Dr. Katrin Viehweger, die mit enormem Fleiß auch meine scFv-Zelllinien untersuchte sowie durch Frau Margit Hieke und Frau Dr. Brigitte Schumann, die mir Zellsuspensionen, Kalluskulturen, Medien und vieles mehr zur Verfügung stellten. Sie trugen ganz wesentlich zum Gelingen der Versuche und dazu bei, dass es den Kulturen an nichts fehlte.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich an das IPK in Gatersleben, an die Arbeitsgruppe Phytoantikörper von Dr. Udo Conrad richten. Ohne die vielfältigen Hilfestellungen und die sehr freundliche Aufnahme im Labor wären die Antikörper-Expression und das Screening der cDNA-Bank nicht zustande gekommen. Mit Rat und Tat standen mir v.a. Dr. Udo Conrad, Isolde Tillack, Ingrid Pfort und Dr. Cora Münnich zur Seite.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Jochen Kumlehn (IPK Gatersleben) für die Möglichkeit, die biolistische Transformation der *Escherichia*-Zellen in seinem Labor vornehmen zu können.

Bei Frau Dr. Angelika Schierhorn (Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle) bedanke ich mich für die zahlreichen MALDI-TOF-Messungen, die sie jederzeit mit meinen Lipid-Proben durchführte.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Otto Miersch (IPB Halle) für die GC/MS-Bestimmung der freien Fettsäuren in den von mir untersuchten Zellen.

Vielen Dank an Andreas Gesell (IPB Halle), der mir im Zusammenhang mit der PCR viele gute Ratschläge gab und das Vorankommen meiner Arbeit sehr beschleunigte.

Meiner Familie und v.a. Sabine und Nora danke ich für die große Geduld, das Interesse, das Verständnis und die fleißige Mitarbeit beim Probelesen und bei der Gestaltung.

Lebenslauf/Bildungsgang

Name: Wieland Schwartze

Wohnort: Amselsteg 6
01326 Dresden

Geburtstag: 15. August 1976

Geburtsort: Jena

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1983-1991 Polytechnische Oberschule „Bertolt Brecht“, Jena

1991-1995 Gymnasium „Ernst-Haeckel“, Jena; Abschluss Abitur

Zivildienst:

1995-1996 Häusliche Alten- und Krankenpflege, DRK-Sozialstation
Jena-Ost

Studium:

1996-2001 Pharmaziestudium an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

- 1998 Erstes Staatsexamen
 - 2000 Zweites Staatsexamen
 - 2000-2001 Anfertigung einer Diplomarbeit im Institut für Pharmazeutische Biologie, Abteilung Molekulare Zellbiologie, Titel der Arbeit: „Untersuchungen zur Rolle der Phospholipase A₂ und ihrer Katalyseprodukte im Signaltransfer in Einzelzellen von *Eschscholzia californica*“
 - 2001 Pharmazie-Praktikum in der Richard-Wagner-Apotheke Halle (Saale)
 - 2001 Drittes Staatsexamen
- 2002 Erteilung der Approbation als Apotheker

Berufstätigkeit

- 2002-2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter des Institutes für Pharmazeutische Biologie, Abt. Molekulare Zellbiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- seit 2005 Leitender Apotheker der Abteilung „Krankenhausversorgung“ der Apotheke Johannstadt, Dresden

Dresden, Februar 2007

Wieland Schwartze

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich zur Anfertigung der vorliegenden Dissertation keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel und keine nichtgenannte fremde Hilfe in Anspruch genommen habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Die Dissertation wurde ausschließlich der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt. Ich habe mich zu keinem früheren Zeitpunkt um den Doktorgrad beworben.

Dresden, Februar 2007

Wieland Schwartze