

**Klonierung und Expression in *E. coli*
der Cardenolid-16'-O-Glucohydrolase
von *Digitalis lanata* EHRH.**

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 Herrn Johann Joachim Framm

geb. am 14.12.1971 in der Hansestadt Wismar

Gutachterin/Gutachter:

1. Prof. Dr. Martin Luckner
2. Prof. Dr. Birgit Dräger
3. Prof. Dr. Wolfgang Kreis

Halle/Saale, den 18. April 2002

urn:nbn:de:gbv:3-000003975

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3A3Agbv%3A3-000003975>]

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	1
1	Cardenolide	1
2	β -Glucosidasen	3
2.1	Allgemeines	3
2.2	β -Glucosidasen in Pflanzen	4
2.3	β -Glucosidasen in <i>D. lanata</i>	5
3	Zielstellung der Arbeit	8
B	Material und Methoden	9
1	Material	9
1.1	Wasser, DEPC-Wasser	9
1.2	Pflanzenmaterial	9
1.3	RNA der somatischen Embryogenese	10
1.4	cDNA-Bank aus Blättern von <i>D. lanata</i>	10
1.5	Lösungen	10
1.6	Medien	11
1.7	Puffer	11
1.8	Oligodesoxyribonukleotide (Primer)	12
1.9	Plasmide	13
1.10	<i>Escherichia coli</i> -Stämme	15
1.11	Geräte	16
1.12	Chemikalien, Enzyme, Kits, Verbrauchsmaterial	17
2	Methoden	19
2.1	Molekularbiologische Methoden	19
2.1.1	Konzentrationsbestimmungen von Nucleinsäuren	19
2.1.2	Trennung und Nachweis von DNA	19
2.1.3	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	20
2.1.4	Herstellung kompetenter Zellen	20
2.1.5	Transformation von <i>E. coli</i>	20
2.1.6	Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterienzellen	20
2.1.6.1	Mini-Präparation von Plasmid-DNA	20
2.1.6.2	Midi-Präparation von ultrareiner Plasmid-DNA	21
2.1.7	Restriktion von Plasmiden	21
2.1.8	DNA-Sequenzierung	22

2.1.9	Auswertung der Nukleotid- bzw. Proteinsequenzen und Sequenzvergleiche	22
2.1.10	Isolierung von Gesamt-RNA	22
2.1.11	Trennung von Gesamt-RNA in denaturierenden Formaldehyd-Agarosegelen	22
2.1.12	Aufreinigung von mRNA	23
2.1.13	cDNA-Synthese	23
2.1.14	RT-PCR	24
2.1.15	Klonierung von PCR-Produkten	24
2.1.16	Screening einer cDNA-Bank aus Blättern von <i>D. lanata</i>	25
2.1.16.1	Bestimmen des Phagen-Titers	25
2.1.16.2	Plattieren der Phagenkolonien	25
2.1.16.3	Herstellen der Filterabdrücke	26
2.1.16.4	Markieren der Sonde	26
2.1.16.5	Hybridisieren der Filter	26
2.1.16.6	Isolieren von Phagenklonen	27
2.1.16.7	Sekundärscreening	27
2.1.16.8	Überprüfen positiver Phagenklone	28
2.1.16.9	Tertiärscreening	28
2.1.16.10	<i>In vivo</i> Excision	28
2.1.16.11	Verwendete Lösungen	29
2.1.17	Northern-Blot-Analyse	29
2.1.17.1	Isolierung von Gesamt-RNA	29
2.1.17.2	Trennung von Gesamt-RNA in denaturierenden Formaldehyd-Agarosegelen	30
2.1.17.3	Northern-Blot-Verfahren	30
2.1.17.4	Markierung der Sonde	30
2.1.17.5	Hybridisieren und Waschen der Blots	31
2.1.17.6	Detektion der Signale	31
2.1.17.7	Kontrollhybridisierung	32
2.1.18	Southern-Blot-Analyse	32
2.1.18.1	Isolierung genomischer DNA	32
2.1.18.2	Restriktion genomischer DNA	33
2.1.18.3	Elektrophoretische Trennung von genomischer DNA im Agarosegel	34
2.1.18.4	Southern-Blot-Verfahren	34
2.1.18.5	Markierung der Sonde	34
2.1.18.6	Hybridisierung und Waschen der Blots	35
2.1.19	Heterologe Expression in <i>E. coli</i>	35
2.1.19.1	Konstruktion der Expressionsplasmide HF 6, HF 8 und HF 10	35
2.1.19.2	Expression von <i>cghI</i> in <i>E. coli</i>	36
2.1.19.3	Analyse der Expression	37
2.1.20	Mutagenese	37
2.1.20.1	Konstruktion der Expressionsplasmide HF 11 und HF 12	37

2.1.20.2	Konstruktion des Expressionsplasmids HF 13	38
2.1.20.3	Expression von <i>cghI</i> Δ 205-300, <i>cghI</i> Δ 491-495 und <i>cghI</i> A187P in <i>E. coli</i>	39
2.2	Proteinchemische Methoden	39
2.2.1	Proteinbestimmung	39
2.2.2	SDS-PAGE	40
2.2.2.1	Herstellung der Gele	40
2.2.2.2	Probenvorbereitung	40
2.2.2.3	Proteinstandard	41
2.2.2.4	Laufbedingungen	41
2.2.2.5	Färbung der Proteine	41
2.2.2.6	Aufbewahrung der Gele	42
2.2.3	Aktivitätsbestimmung	42
C	Ergebnisse	44
1	Klonierung der Cardenolid-16-O'-Glucohydrolase von <i>D. lanata</i>	44
1.1	RT-PCR	44
1.2	Klonierung der PCR-Produkte	45
1.3	Homologien zu <i>cghI</i> 374	46
1.4	Screening der cDNA-Bank	46
1.5	Die Sequenz <i>cghI</i>	47
1.6	Sequenzunterschiede zwischen CGH I und <i>cghI</i>	48
2	Heterologe Expression von <i>cghI</i> in <i>E. coli</i>	49
2.1	Expression von <i>cghI</i> als His-tag-Fusionsprotein	50
2.2	Expression mit dem GST-System	52
3	Bestimmung enzymkinetischer Daten von rCGH I	52
3.1	pH-Optimum	52
3.2	Temperaturoptimum und -stabilität	53
3.3	K _m -Werte	54
4	Isoenzyme der CGH I	55
4.1	Southern-Blot-Analyse	55
4.2	PCR	55
4.3	Sekundärscreening weiterer Primärphagenklone	56
5	Northern-Blot-Analyse	56
5.1	mRNA-Expression der <i>cghI</i> in Pflanzenteilen von <i>D. lanata</i>	56
5.2	mRNA-Expression der <i>cghI</i> im Verlauf der somatischen Embryogenese von PEMs von <i>D. lanata</i>	57

6	Konstruktion und Expression von <i>cghI</i>-Mutanten	58
6.1	Konstruktion von <i>cghI</i> Δ 205-300, <i>cghI</i> Δ 491-495 und <i>cghI</i> A187P	58
6.2	Expression von <i>cghI</i> Δ 205-300, <i>cghI</i> Δ 491-495 und <i>cghI</i> A187P	58
D	Diskussion	60
1	Klonierung der Cardenolid-16-O'-Glucohydrolase von <i>D. lanata</i>	60
1.1	Allgemeines zur Klonierungsstrategie	60
1.2	RT-PCR	60
1.3	Screening einer cDNA-Bank aus Blättern von <i>D. lanata</i>	64
1.4	Die Sequenz <i>cghI</i>	65
1.5	Zuordnung der <i>cghI</i> zur Familie 1 der Glykosyl-Hydrolasen	67
1.6	Subzelluläre Lokalisation der CGH I	68
1.7	Auswertung möglicher Eigenschaften von <i>cghI</i>	70
1.8	Sequenzvergleiche von <i>cghI</i>	71
1.8.1	Homologien von <i>cghI</i> zu Sequenzen der Datenbanken	71
1.8.2	Vergleich der <i>cghI</i> mit den homologen β -Glucosidasen	72
2	Isoenzyme der CGH I in <i>D. lanata</i>	75
2.1	Allgemeines	75
2.2	Vorkommen von β -Glucosidasen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	76
2.3	Versuche zum Nachweis von Isoenzymen	78
2.3.1	PCR	78
2.3.2	Analyse weiterer Phagenklone	78
2.3.3	Southern-Blot-Analyse	79
3	Expression der <i>cghI</i> in <i>E. coli</i>	79
3.1	Wahl des Expressionssystems und Optimierung	79
3.2	Bestimmung kinetischer Parameter von rCGH I	80
3.3	Mutanten	81
4	mRNA-Expression der <i>cghI</i>	82
4.1	mRNA-Expression der <i>cghI</i> in Pflanzenteilen von <i>D. lanata</i>	82
4.2	mRNA-Expression der <i>cghI</i> im Verlauf der somatischen Embryogenese von PEMs von <i>D. lanata</i>	84
5	Abschließende Diskussion und Ausblick auf weitere Arbeiten	85
E	Zusammenfassung	87
F	Literaturverzeichnis	90

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin)
cDNA	komplementäre DNA (<u>c</u> opy DNA)
CGH I	Cardenolid-16'-O-Glucohydrolase
<i>cghI</i>	vollständige cDNA, die für ein Isoenzym der CGH I kodiert
CGH II	Cardenolid-4'-O-Glucohydrolase
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
DC	Dünnschichtchromatographie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DLC	Desacetyllanatosid C
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP's	Desoxynukleosidtriphosphate
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	Europäisches Molekularbiologisches Laboratorium (<u>E</u> uropean <u>M</u> olecular <u>B</u> iology <u>L</u> aboratory)
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (<u>H</u> igh <u>P</u> erfor- <u>m</u> ance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
L	Liter
LA	Lanatosid A
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LC	Lanatosid C
M	molar
MOPS	2-Morpholino-O-propansulfonsäure
M_G	Molekulargewicht
mRNA	Boten-RNA (<u>m</u> essenger RNA)

NYHA	New York Heart Association
OD _x	optische Dichte bei x nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer (<u>Phosphate Buffered Saline</u>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<u>Polymerase Chain Reaction</u>)
PEMs	Proembryogene Massen
pfu	Plaque bildende Einheiten (<u>plaque forming units</u>)
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
P _i	Isoelektrischer Punkt
PVP	Polyvinylpyrolidin
rCGH I	rekombinante Cardenolid-16'-O-Glucohydrolase aus <i>E.coli</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SDS	Natriumduodecylsulfat (<u>Sodiumdodecylsulfate</u>)
SDS-PAGE-Gel	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese-Gel
SSC	Standard Saline Citrate
SpTrEMBL	Proteinsequenzdatenbank, die sich aus der Übersetzung der Nukleinsäuren der EMBL-Datenbank ergibt (<u>SWISS-PROT annotated translated EMBL</u>)
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris Buffered Saline
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
TM	Handelsname (<u>Trade mark</u>)
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminoethan
U	Enzym-Einheit (<u>Unit</u>)
UPM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VT	Volumenteile
X-Gal	5-Brom-4-chlor-indolyl-β-D-galactopyranosid

A Einleitung

1 Cardenolide

Unter Cardenoliden versteht man eine Gruppe meist glykosidischer Pflanzeninhaltsstoffe, die eine spezifische Wirkung auf den Herzmuskel von Kalt- und Warmblütern haben. Strukturchemisch sind sie C₂₃-Steroide, die über eine alkoholische 3-Hydroxylgruppe in glykosidischer Bindung mit dem zyklischen Halbacetal eines Mono-, Di-, Tri-, Tetra- oder Pentasaccharids verknüpft sind. Im Steroidteil fällt die selten vorkommende cis-trans-cis-Verknüpfung der Ringe A/B/C/D auf. An C17 ist β -ständig ein 5gliedriger Lactonring gebunden. Ungewöhnlich ist die an der 3-Hydroxylgruppe β -ständig gebundene Zuckerkette. Diese ist meistens unverzweigt, besteht aus maximal 5 Zuckern und weist neben häufigen auch seltene Zucker, vornehmlich 2-, 6-Desoxyzucker bzw. 2,6-Didesoxyzucker, auf. Während diese Desoxyzucker direkt am Aglykon gebunden sind, befindet sich Glucose, soweit vorhanden, immer am Ende der Zuckerkette. Cardenolide mit terminaler Glucose werden als Primärglykoside, solche ohne Glucose als Sekundärglykoside bezeichnet (siehe LUCKNER und WICHTL, 2000 für die Entwicklung dieser Begriffe).

In der Gattung *Digitalis* wurden bisher über 100 Cardenolide gefunden. Ihre strukturelle Vielfalt ergibt sich aus der Kombination von 6 verschiedenen Aglyka (Reihe A – F) mit Zuckern unterschiedlicher Länge und Struktur. Die im Rahmen dieser Arbeit relevanten Cardenolide gehören entweder zur A-Reihe (Lanatosid A – Digitoxigenin als Aglykon) oder zur C-Reihe (Lanatosid C/Desacetyllanatosid C – Digoxigenin als Aglykon). Sie sind in Abbildung 1 dargestellt bzw. in Tabelle 1 mit ihren zugehörigen Sekundärglykosiden aufgelistet.

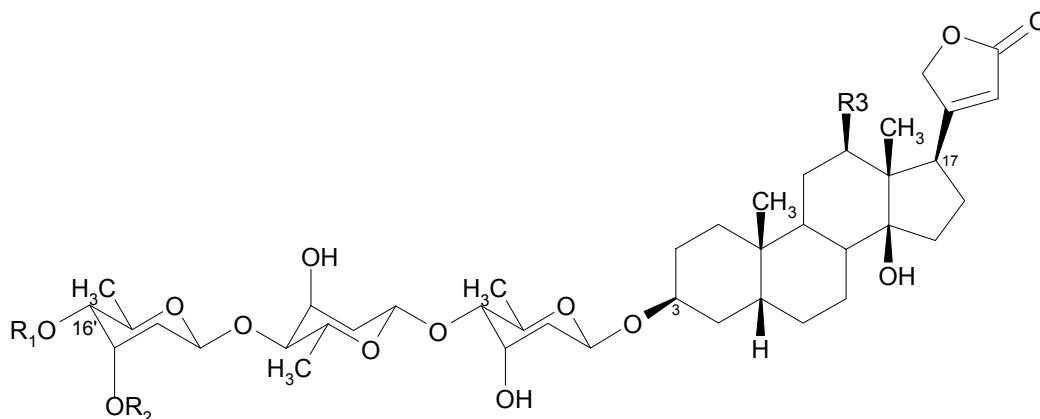


Abb.1: Chemische Struktur der Cardenolide

Primärglykoside	R1	R2	R3	Sekundärglykoside	R1	R2	R3
Lanatosid A	Glu	COCH ₃	H	α -Acetyldigitoxin	H	COCH ₃	H
Lanatosid C	Glu	COCH ₃	OH	α -Acetyldigoxin	H	COCH ₃	OH
Desacetyllanatosid C	Glu	H	OH	Digoxin	H	H	OH

Tab.1: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Primär- bzw. deren Sekundärglykoside

In *Digitalis*-Arten gefundene Cardenolide sind hauptsächlich Primärglykoside, die in der Vakuole der Zelle gespeichert werden (KREIS und REINHARD, 1987; HOELZ et al., 1992). Sekundärglykoside, die nur in geringen Mengen detektiert wurden, werden als Artefakte bei der Aufarbeitung bzw. als Abbauprodukte diskutiert (HOELZ et al., 1992). Die Umwandlung von Primär- zu Sekundärglykosiden bei der Aufarbeitung der *Digitalis*-Blätter wird auf die Wirkung glykosidspaltender Enzyme, die erst bei der Zerstörung des Gewebes mit ihrem Substrat in Kontakt kommen, zurückgeführt. Da in der Therapie vorwiegend Sekundärglykoside angewandt werden, ist dieser Prozeß erwünscht, d.h. er wird in der pharmazeutischen Industrie bewußt ausgenutzt (LUCKNER und DIETRICH, 1979; BOEHRINGER MANNHEIM, 1990).

Für Primärglykoside, die als vermutliche Endprodukte der Cardenolid-Biosynthese in der Vakuole gespeichert werden, konnte an *Digitalis-lanata*-Suspensionskulturen eine aktive Aufnahme in die Zelle bzw. Vakuole gezeigt werden, während für Sekundärglykoside nur Diffusionsvorgänge beobachtet wurden (KREIS und REINHARD, 1987).

Cardenolide bieten aufgrund ihrer kardiotoxischen Wirkungen *Digitalis*-Pflanzen einen effektiven Schutz gegen Fraßfeinde, vor allem gegenüber Säugetieren und Vögeln. Die in subtoxischen Dosen auftretenden kardiotonischen Wirkungen der Cardenolide macht man sich bei der Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz (NYHA-Stadium II und III) und bei Arrhythmien (Vorhofflimmern, Vorhofflattern) – vor allem bei solchen, die von einer Herzinsuffizienz begleitet sind – zu Nutze. Da es bisher nicht gelungen ist, Cardenolide in einem ökonomisch vertretbaren Rahmen synthetisch zugänglich zu machen bzw. effektivere Arzneistoffe für die Therapie der Herzinsuffizienz bereitzustellen, werden Cardenolide nach wie vor aus Blättern von kultivierten *D. lanata*-Pflanzen gewonnen und in der Therapie angewandt.

2 β -Glucosidasen

2.1 Allgemeines

β -Glucosidasen katalysieren die Hydrolyse von Alkyl-, Aryl- oder Oligo- β -D-Glykosiden und führen damit zur Freisetzung von β -D-Glucose und dem entsprechenden Aglykon bzw. einem Zucker (REESE, 1977). Ihr Vorkommen ist wahrscheinlich ubiquitär, d.h. sie sind in Archebakterien, Eubakterien und in Eukaryoten zu finden (WOODWARD und WISEMAN, 1982).

In der IUB Enzym-Nomenklatur (1984) werden β -Glucosidasen unter dem Eintrag [EC 3.2.1.21] aufgeführt. Diese Einteilung reflektiert hauptsächlich die Substratspezifität und in seltenen Fällen den möglichen Reaktionsmechanismus. Da in steigendem Maße die Sequenzen der Enzyme zugänglich sind, werden Glykosyl-Hydrolasen aufgrund der Ähnlichkeit ihrer Aminosäuresequenz klassifiziert (HENRISSAT, 1991; HENRISSAT und BAIROCH, 1993, 1996). Diese Einteilung, die im Moment aus 87 Familien besteht, beruht auf der strukturellen Ähnlichkeit der Enzyme und läßt Vermutungen über deren evolutionäre Beziehung untereinander sowie den möglichen Reaktionsmechanismus zu. β -Glucosidasen sind darin den Familien 1 und 3 der Glykosyl-Hydrolasen zugeordnet (COUTINHO und HENRISSAT, 1999).

Innerhalb der β -Glucosidasen konnte aufgrund struktureller Unterschiede eine klare Trennung in 2 Subfamilien (A und B) gemacht werden (BEGUIN, 1990; GRÄBNITZ et al., 1991). Während sich die Subfamilie A aus β -Glucosidasen von Bakterien, Archebakterien, Pflanzen und Säugetieren zusammensetzt (ZENG und POULTON, 1995; GRÄBNITZ et al., 1991), sind in der Subfamilie B die β -Glucosidasen aus Pilzen und aus Bakterien des Pansen von Wiederkäuern zu finden (ROJAS und ROMEU, 1995).

Die weite Verbreitung der β -Glucosidasen läßt bei ihnen ähnliche Eigenschaften erwarten. Tatsächlich haben die meisten β -Glucosidasen ein Molekulargewicht von 55 bis 65 kDa, ein pH-Optimum im sauren Milieu (pH 5-6) und ihre Substrate müssen in den meisten Fällen β -Glucoside sein. Ist die Substratspezifität der β -Glucosidasen bezüglich der Zuckerkomponente noch hoch, kann sie in Bezug auf das Aglykon erheblich variieren (HÖSEL und CONN, 1982). In ihrer Struktur und Spezifität unterscheiden sich β -Glucosidasen aus verschiedenen Reichen oft wesentlich, was auf ihre Nichtbeteiligung am Primärstoffwechsel und evolutionäre Divergenz/Konvergenz zu besserer Substraterkennung zurückzuführen sein könnte. Als ein weiteres Merkmal weisen viele

β -Glucosidasen eine erstaunlich hohe Stabilität gegenüber Proteasen und denaturierenden Reagenzien auf (ESEN, 1993).

β -Glucosidasen sind aus verschiedenen Gründen von medizinischem, wirtschaftlichem und wissenschaftlichem Interesse. So führt z. B. beim Menschen ein Defekt in einer Glucocerebrosidase zur Erbkrankheit des Morbus Gaucher (GRABOWSKI et al., 1993); Zellulose, der stärkste nachwachsende Rohstoff auf der Erde, wird nach Hydrolyse zu Zellobiose durch β -Glucosidasen in 2 Moleküle Glucose gespalten (BEGUIN, 1990), und in Pflanzen sind β -Glucosidasen an einer Reihe von wichtigen Prozessen beteiligt.

2.2 β -Glucosidasen in Pflanzen

Das überwiegende Interesse an pflanzlichen β -Glucosidasen ist durch die von ihnen freigesetzten Aglyka und deren Wirkungen bedingt. So können β -Glucosidasen z.B. Phytohormone (BRZOBOHATY et al., 1993), Isothiocyanate (BENNETT und WALLSGROVE, 1994), Blausäure (POULTON, 1990), Steroidsaponine (NISIUS, 1988; INOUE et al., 1996), Flavonoide (HÖSEL und CONN, 1982) und Alkaloide (HEMSCHIEDT und ZENK, 1982; SCHÜBEL et al., 1986; GEERLINGS et al., 2000) aus ihren konjugierten Formen freisetzen und damit Prozesse, wie z. B. das Wachstum und die Entwicklung von Pflanzen (BRZOBOHATY et al., 1993), die Abwehr von Fraßfeinden sowie den Abbau (HÖSEL und CONN, 1982) und die Biosynthese (HEMSCHIEDT und ZENK, 1982; SCHÜBEL et al., 1986; GEERLINGS et al., 2000) von Sekundärstoffen beeinflussen bzw. regulieren.

Ein in Pflanzen weitverbreitetes Phänomen, an dem β -Glucosidasen beteiligt sind, ist die Cyanogenese. Dabei wird aus cyanogenen Glykosiden durch die Einwirkung von β -Glucosidasen Blausäure freigesetzt. In der intakten Pflanze liegen Enzym und Substrat in verschiedenen Zellkompartimenten vor. Bei einer Verletzung der Pflanze durch Fraßfeinde wird diese Kompartimentierung aufgehoben, und als Folge davon werden cyanogene Glykoside zu Blausäure hydrolysiert, die die Angreifer abtötet (POULTON, 1990).

Bereits 1837 beschrieben LIEBIG und WÖHLER (1837) das Enzymgemisch Emulsin aus Mandeln, das aus Amygdalin Blausäure freisetzen konnte. Inzwischen wurden alle 3 Enzyme des Emulsins aus *Prunus serotina* identifiziert und charakterisiert (POULTON, 1993). Cyanogene Prozesse konnten bis dato in über 3000 Pflanzen aus 110 verschiedenen Familien nachgewiesen werden (POULTON, 1990).

Eine Beteiligung von β -Glucosidasen an der Freisetzung toxischer Verbindungen nach Verwundung durch Fraßfeinde wurde auch für Senföle (BENNETT and WALLSGROVE, 1994), Steroidsaponine (NISIUS, 1988) und Alkaloide (GEERLINGS et al., 2000) angenommen.

2.3 β -Glucosidasen in *D. lanata*

Schon 1935 konnten von STOLL et al. glykosidspaltende Enzyme in Blättern von *Digitalis*-Arten (Digilanidase, Digipurpidase) nachgewiesen werden. Sie ließen sich jedoch nicht extrahieren und wurden deshalb als „Desmoenzyme“ bezeichnet. Unter Verwendung eines Detergenz gelang es 1972 BÄRISCH et al. geringe Enzymmengen zu solubilisieren. Wesentlich größere Mengen an Enzym konnten 1990 durch KREIS und MAY unter Einsatz des nichtionischen Detergenz Triton X-100 aus Blättern von *D. lanata*, *D. purpurea* und *D. heywoodii* extrahiert werden. Damit wurde das Enzym einer Reinigung zugänglich. Bis 1998 konnte das Enzym aus Blättern von *D. lanata* gereinigt, charakterisiert (MAY und KREIS, 1997; SCHÖNIGER et al., 1998) und zu einem geringen Teil sequenziert werden (SCHÖNIGER et al., 1998). Aufgrund seiner Spezifität, die Hydrolyse der β -D-Glucose von Cardenoliden mit einem Tetrasaccharid als Zuckerkette (s. Abb.1) zu katalysieren, wurde es als Cardenolid-16'-O-Glucohydrolase bezeichnet und konnte durch die sequenzierten Peptide der Familie 1 der Glykosyl-Hydrolasen (SCHÖNIGER et al., 1998) zugeordnet werden. Seit eine zweite cardenolidspezifische β -Glucosidase (CGH II) in Suspensionskulturen von *D. lanata* detektiert wurde (THEURER et al., 1994), wird die Cardenolid-16'-O-Glucohydrolase als CGH I bezeichnet.

Während die CGH I nur in Geweben, die Cardenolide synthetisieren, zu finden ist (MAY und KREIS, 1990), ist die CGH II sowohl in cardenolidsynthetisierenden als auch in cardenolidfreien Geweben vorhanden (THEURER et al., 1994). Die CGH II ist inzwischen aus *D. lanata*-Blättern gereinigt und charakterisiert worden (HORNBERGER et al., 2000). Sie weist ihr eigenes Substratspektrum auf und unterscheidet sich auch in ihren Eigenschaften (Lokalisation, Molekulargewicht, pI) von der CGH I. Aufgrund ihrer Fähigkeit, die Hydrolyse von Cardenoliden mit einem Disaccharid als Zuckerkette zu katalysieren (s. Abb.2), wird die CGH II als Cardenolid-4'-O-Glucohydrolase bezeichnet.

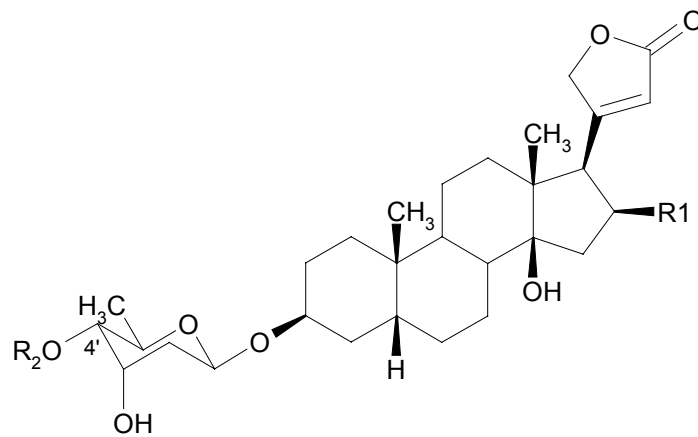


Abb.2: Chemische Struktur von Cardenoliden mit einem Disaccharid als Zuckerkette

	R1	R2
Glucosylatromonosid	H	β -D-Glucose
Glucogitorosid	OH	β -D-Glucose
Glucosylquinosid	H	β -D-Quinosid

Tab.2: Strukturformeln einiger Substrate der Cardenolid-4'-O-Glucohydrolase (CGH II)

Für die CGH II liegen Berechnungen vor, die die unterschiedliche Substrataffinität der CGH II zu Cardenoliden mit verschiedenen Disacchariden als Zuckerkette erklären können und die vermuten lassen, daß das Aglykon für die Substraterkennung eine untergeordnete Rolle spielt (TERADA et al., 2000).

Über die biologische Funktion glykosidspaltender Enzyme in *Digitalis*-Arten konnten bisher nur Vermutungen angestellt werden. Während die Cardenolide in Form ihrer Primärglykoside in der Vakuole gespeichert werden (KREIS und REINHARD, 1987; HOELZ et al., 1992), wurde für die CGH I eine Bindung an die Chloroplastenmembran (BÜHL, 1984) bzw. an weitere Organellenmembranen (MAY-HERTL, 1991) berichtet, so daß eine räumliche Trennung von Enzym und Substrat innerhalb der Zelle vorliegt. Wird diese Struktur, z. B. nach Feindangriff, zerstört, kommen Substrat und Enzym in Kontakt, und aus den Primärglykosiden werden Sekundärglykoside gebildet, die toxisch für Fraßfeinde sind (MAY und KREIS, 1997).

Weiterhin ist eine Beteiligung der CGH I am Transport von Cardenoliden diskutiert worden. Da die Biosynthese der Cardenolide zum überwiegenden Teil in den Mesophyllzellen der grünen Blätter abläuft (HAGIMORI et al., 1984), sie jedoch in allen Organen der

Digitalis-Pflanzen vorhanden sind (VOGEL und LUCKNER, 1981), muß ein Transport von den Bildungsgeweben (sources) zu den Speichergeweben (sinks) erfolgen. CHRISTMANN et al. (1993) zeigten, daß die Cardenolide im Phloem in Form ihrer Primärglykoside transportiert werden und postulierten ein Sink-Source-Modell, bei dem neben neu-synthetisierten Primärglykosiden auch die in der Vakuole gespeicherten Primärglykoside von Bildungsgeweben für den Transport zu den Speichergeweben mobilisiert werden.

Für diese Mobilisierung ist eine Beteiligung von cardenolidspezifische Glucosidasen, wie der CGH I, und Glucosyltransferasen in Betracht gezogen worden. Die „korrespondierende“ Glucosyltransferase DGT (UDP-Glucose:Digitoxin 16'-O-Glucosyltransferase) wurde als extravakuoläres, lösliches Protein in Zellkulturen von *D. lanata*, *D. purpurea*, *D. heywoodii*, *D. lutea* und *D. grandiflora* (KREIS et al., 1986, 1993) sowie in Blättern, Blüten und Wurzeln von *D. lanata* (MAY und KREIS, 1990) gefunden. Eine weitere Glucosyltransferase, die UDP-Glucose:Cardenolid 4'-O-Glucosyl-transferase, konnte aus *D. heywoodii* gereinigt und charakterisiert werden (HORNBERGER, 1999) und die Existenz mindestens noch einer weiteren Glucosyltransferase geschlußfolgert werden (THEURER et al., 1994).

Eine Remetabolisierung der Primärglykoside aus der Vakuole ist zu vermuten, da der Gehalt an Cardenoliden einjähriger *D. lanata*-Pflanzen nach Erreichen eines Maximums wieder abfällt (WICHTL und FREIER, 1978; KIRSCHKE, 1996). Wie eine derartige Mobilisierung der Primärglykoside abläuft und welche Rolle dabei glykosidsplattende Enzyme spielen, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Als mögliche Abbaureaktion für Cardenolide konnten in seneszenten *D. lanata*-Sproßkulturen oxidative Prozesse in der Zuckerkette beschrieben werden (RHENIUS et al., 1997).

Für die CGH II ist aufgrund ihrer überraschend hohen Substratspezifität eine bestimmte Funktion in der Biosynthese und/oder im Abbau der Cardenolide in *D. lanata* vermutet worden (HORNBERGER et al., 2000).

Neben den cardenolidspezifischen β -Glucosidasen konnte die Existenz von unspezifischen β -Glucosidasen in Blättern von *D. lanata* nachgewiesen werden (KREIS et al., 1986; HOELZ et al., 1992; MAY und KREIS, 1997; SCHÖNIGER et al., 1998; HORNBERGER et al., 2000).

3 Zielstellung der Arbeit

Zielstellung der vorliegenden Arbeit war es, einen cDNA-Klon der Cardenolid-16'-O-Glucohydrolase (CGH I) zu isolieren. Dabei sollten die Erfahrungen und vorhandenen Hilfsmittel (Antikörper, Peptidfragmente der CGH I, cDNA-Bank aus einjährigen Blättern von *D. lanata*) zur Klonierung der CGH I genutzt werden.

Mittels der cDNA sollten Aussagen über die Struktur sowie die Lokalisation und Expression der CGH I in *D. lanata* getroffen werden. Dazu sollten molekularbiologische Methoden (Northern- und Southern-Blot-Analyse, heterologe Expression und rekombinante Technologie) zur Anwendung kommen.

B Material und Methoden

1 Material

1.1 Wasser, DEPC-Wasser

Wasser wurde durch Umkehrosiose (CHRIST) mit nachfolgendem, mehrstufigem Ionenaustauscher (SERAL) und einer Filterpatrone für organische Bestandteile gereinigt. Für proteinchemische Arbeiten wurde unsterilisiertes, gereinigtes Wasser verwendet; für molekularbiologische Arbeiten wurde es zusätzlich autoklaviert.

DEPC-Wasser wurde gewonnen, indem gereinigtes Wasser 2 h mit 0,1 % DEPC versetzt und anschließend autoklaviert wurde. Es kam bei Arbeiten mit RNA zur Anwendung.

1.2 Pflanzenmaterial

Zur Isolierung von Gesamt-RNA für die RT-PCR-Versuche und zur Isolierung von genomischer DNA wurden junge, innere Rosettenblätter von einer einjährigen *D. lanata* Pflanze (Sorte „Dresdner“) geerntet. Die Blätter wurden nach einer Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff zerkleinert und unmittelbar zur RNA-Isolierung verwendet bzw. für die Isolierung von genomischer DNA bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert.

Für die Northern-Blot-Analyse wurden je eine einjährige und eine zweijährige *D. lanata* Pflanze (Sorte „Dresdner“) geerntet, in die jeweiligen Pflanzenteile zerlegt und wie oben angegeben behandelt.

1.3 RNA der somatischen Embryogenese

Gesamt-RNA für die Northern-Blot-Analyse der somatischen Embryogenese von proembryogenen Massen (PEMs) von *D. lanata* (Erhaltungskultur des Stammes VIII) wurde von STECHERT (1998) nach REINBOTHE et al. (1992) isoliert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

1.4 cDNA-Bank aus Blättern von *D. lanata*

Die verwendete cDNA-Bank war aus mRNA von Blattmaterial von einjährigen Freilandpflanzen (Sorte „Dresdner“) von *D. lanata* angelegt worden. Die cDNA wurde dazu in den Uni-ZAP™XR-Vektor nach der Vorschrift des ZAP-cDNA® SYNTHESIS KIT (Stratagene) kloniert (WERLE, 1995). Sie wurde freundlicherweise von A. PETERSON (Biozentrum Halle/S.) zur Verfügung gestellt.

1.5 Lösungen

Heringssperma-DNA (10 mg/ml)

Die Lösung wurde 30 min im Ultraschallbad inkubiert und anschließend 30 min im Wasserbad gekocht. Aliquote wurden bei -20°C eingefroren. Vor Gebrauch wurde die Lösung 10 min gekocht und anschließend 2 min in Eis inkubiert.

Phenol

Phenol wurde mit 100 mM Tris/HCl; pH 8,0, das 0,1 % 8-Hydroxychinolin enthielt, bis zur Sättigung gerührt.

RNase A (10 mg/ml)

Ribonuklease A wurde in TE-Puffer gelöst; zur Beseitigung der DNase-Aktivität wurde die Lösung 30 min in kochendes Wasser gestellt.

X-Gal Stammlösung (40 mg/ml)

400 mg X-Gal wurden in 10 ml Dimethylformamid gelöst. Von dieser Lösung wurden je 40 µl auf eine LB-Platte (90 mm) ausplattiert.

1.6 MedienLB-Medium (steril)

Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	1 %
Trypton	1 %

LB-Agar

Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	1 %
Trypton	1 %
Agar noble	1,5 %

SOC-Medium

Hefeextrakt	0,5 %
Trypton	2 %
KCl	2,5 mM
NaCl	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucose	20 mM

1.7 Puffer

McIlvaine CP/2 pH 5,0:	51,5 mM Na ₂ HPO ₄ ; 24,25 mM Zitronensäure
10 x TBE:	1 M Tris; 0,83 M Borsäure; 10 mM EDTA
TE-Puffer:	10 mM Tris/HCL; 1 mM EDTA; pH 8,0
10 x TAE-Puffer:	0,4 M Tris; 0,2 M Natriumacetat; 0,01 M EDTA; pH 7,5
20 x SSC:	3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0
SM-Puffer:	50 mM Tris/HCL; 100 mM NaCl; 10 mM MgSO ₄ (wasserfrei); 0,1 % Gelatine; pH 7,5
PBS-Puffer	0,15 M NaCl; 0,01 M H ₃ PO ₄ ; 0,2 % Tween 20; pH 7,4

1.8 Oligodesoxyribonukleotide (Primer)

Die Stammlösungen der Primer (50 µM in Wasser) wurden bei -20°C gelagert.

Anwendung	Bezeichnung	Sequenz von 5'→ 3'	Besonderheit	
RT-PCR	1	AAYGAYCARGGNCCNYT		
	2	CCRTTYTCNGTDATRTA		
	3	GGNGTNGAYTTYATGYT		
	4	ARCATRAARTCNACNCC		
	5	CAYAAAYCAYACNGAYCA		
	3.1	GGCGTKGAYTTYATGTT		
	3.2	GGCGTKGAYTTYATGCT		
	5.1	AAYCAYACYGAYCAYAAAYGT		
	1rev	ARNGGNCCYTGRTCRTT		
	Sequenzieren	T3	ATTAACCCTCACTAAAG	Cy5
T7		TAATACGACTCACTATAG	Cy5	
Uni		CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT	Cy5	
Rev		CAGGAAACAGCTATGAC	Cy5	
CghIVor1		GCAGGTTTAGAGGCATACAG	Cy5	
CghIHin1		GAAAGGAAGCACAAAGCATAC	Cy5	
CghIVor2		CCGCACTCTCTCTACAATAC	Cy5	
CghIHin2		TTCGCTTGCCCCATTTTCTG	Cy5	
PQE3/4uni		CGGATAACAATTTACACAG	Cy5	
PQEv		GTTCTGAGGTCATTACTGG	Cy5	
5pGEX		GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	Cy5	
3pGEX		CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	Cy5	
Expression		CghI <i>Bam</i> HI	CAATCGGGATCCACTAACGAATCCATTCAT	<i>Bam</i> HI
		CghI <i>Kpn</i> I	CGTAGCGGTACCTTAGTCAAGATTATCCAG	<i>Kpn</i> I
	60Vorn	CATGCCATGGCTAACGAATCCAATCATA	<i>Nco</i> I	
	60Hin	GAAAGATCTGTCAAGATTATCCAGAAA	<i>Bgl</i> II	

	GST <i>Bam</i> HI	<u>GGATCCCC</u> ATGACTAACGAATCC	<i>Bam</i> HI
	GST <i>Xho</i> I	CTCGAGTTAGTCAAGATTATCCAG	<i>Xho</i> I
RT-PCR	Iso1	TAGGCYTCNARNGTNAC	
	Iso2	GAGGCNTAYMGNGCNCA	
	Iso3	CCGTAYACNGTNGCNTA	
Deletion	Del1	CCGACCAGGTGGACACGTTCCATT	5'-PO ₄
	Del2	AAGAGAACTGGAATGGCACGAGCA	5'-PO ₄
	Del3	CCTCTTATTTATATTACAGAAAAT	5'-PO ₄
	Del4	GTCCTTAAATTTGTTTCGTCATTTTC	5'-PO ₄
Punktmutation	Pmvor	GGATAACAATAAATGAGCCATGGAGCTACACG	<i>Nco</i> I
	Pmrev	CGTGTAGCTCCATGGCTCATTTATTGTTATCC	<i>Nco</i> I

Tab.3: Verwendete Oligodesoxyribonukleotide (Primer)

Buchstabencodes: A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin

D = G+A+T, K = G+T, M = A+C, N = A+C+G+T, R = A+G, Y = C+T

Cy5 = Fluoreszenzmarkierung am 5'-Ende, 5'-PO₄ = Phosphorylierung am 5'-Ende

Unterstrichen sind die in die Primer eingeführten palindromischen Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen; die jeweiligen Enzyme sind in der rechten Spalte aufgeführt

1.9 Plasmide

Sämtliche Plasmide wurden bei -20°C in TE-Puffer gelagert.

Leerplasmide:

pCR-Script™ SK(+)	(Stratagene)
pBluescript® SK(+/-)	(Stratagene)
pCR® 2.1-TOPO®	(Invitrogen)
pQE 30, pQE 60	(Qiagen)
pGEX-5X-3	(Amersham Pharmacia Biotech)

Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide:

Bezeichnung	Leerplasmid	Insert	Beschreibung
HF 1	pCR-Script™ SK(+)	<i>cghI</i> 374	PCR-Produkt aus cDNA mit Primern 3.2 und 1rev
HF 2	pCR® 2.1-TOPO®	<i>cghI</i> 1121	PCR-Produkt aus cDNA mit Primern 4 und 5.1
HF 3	pCR® 2.1-TOPO®	<i>cghI</i> 1478	PCR-Produkt aus cDNA mit Primern 5.1 und 1rev
HF 4	pBluescript® SK(+/-)	<i>cghI</i> +untransl. Bereich	Plasmid aus cDNA-Bank
HF 5	PCR® 2.1-TOPO®	<i>cghI</i>	PCR-Produkt aus HF 4 mit Primern CghI <i>Bam</i> HI und CghI <i>Kpn</i> I
HF 6	PQE 30	<i>cghI</i>	Insert aus HF 5 nach <i>Bam</i> HI/ <i>Kpn</i> I Verdau in pQE 30 subkloniert
HF 7	PCR® 2.1-TOPO®	<i>cghI</i>	PCR-Produkt aus HF 4 mit Primern 60Vorn und 60Hinmit
HF 8	pQE 60	<i>cghI</i>	Insert aus HF 7 nach <i>Nco</i> I/ <i>Bgl</i> III Verdau in pQE 60 subkloniert
HF 9	pCR® 2.1-TOPO®	<i>cghI</i>	PCR-Produkt aus HF 4 mit Primern GST <i>Bam</i> HI und GST <i>Xho</i> I
HF 10	pGEX-5X-3	<i>cghI</i>	Insert aus HF 11 nach <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I Verdau in pGEX-5X-3 subkloniert
HF 11	pQE 30	<i>cghI</i> Δ 205-300	PCR-Produkt aus HF 6 mit Primern Del1 und Del2
HF 12	pQE 30	<i>cghI</i> Δ 491-495	PCR-Produkt aus HF 6 mit Primern Del3 und Del4
HF 13	pQE 30	<i>cghI</i> <i>A187P</i>	PCR-Produkt aus HF 6 mit Primern PMvor und PMrev

Tab.4: Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide

Plasmid zur Kontrollhybridisierung der Northern-Blot-Analyse:

pBD 18

(DOBROWOLSKI et al., 1989)

1.10 *Escherichia coli*-Stämme

Die Stämme wurden in LB-Medium mit 20 % Glycerol bei -20°C gelagert. Zur weiteren Bearbeitung wurden die Stämme auf LB-Agarplatten, die das jeweilige Antibiotikum in der angegebenen Konzentration enthielten, mit einer Impföse ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

XL1-Blue MRF'	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI}^q\Delta M15 \text{ Tn10 (Tet}^r\text{)]}$ (Stratagene)
SOLR™	$e14^-(mcrA) \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 \text{ sbcC recB recJ umuC}::\text{Tn5(Kan}^r\text{) uvrC lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1 } \lambda^R \text{ [F' proAB, lacI}^q\Delta M15\text{], Su}^- \text{ (nonsuppressing)}$ (Stratagene)
One Shot TOP10	$F^- \text{ mcrA } \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \text{ 80lacZ}\Delta M15\Delta lacX74 \text{ recA1 deoR araD139 } \Delta(ara-leu)7697 \text{ galU galK rpsL (Str}^R\text{) endA1 nupG}$ (Invitrogen)
SG13009[pREP4]	(Nal ^S , Str ^S , Rif ^S , Thi ⁻ , Lac ⁻ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺) (Qiagen)
BL21	[F ⁻ , ompT, hsdS (r _b ⁻ , m _b ⁻), gal] (Amersham Pharmacia Biotech)

1.11 Geräte

ALFexpress™ DNA Sequenzer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Brutschrank B6060	Heraeus Instruments, Hanau
Brutschrank/Schüttler 3032	GFL, Burgwedel
DNA-Speed-Vac DNA 110	Savant Instruments, Farmingdale, USA
Elektrophorese:	
Phero-Stab 300	Biotech Fischer, Reiskirchen
MultiPhorII	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Mini-Protean II Slab Cell	Bio-Rad, München
Transfer Cell	Bio-Rad, München
Nautico 810	H.Hölzel, Erlangen
French Press	SLM Aminco, Büttelborn
Gene Quant II	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Heizplatte/Rührer RCT basic	IKA, Staufen
HPLC Anlage Series 1050	Hewlett Packard, Waldbronn
Hybridisierungsöfen 0V1/0V2	Biometra, Göttingen
LaminAir® HB2472	Heraeus Instruments, Hanau
Mastercycler 5330 + 5330 Plus (Deckel)	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Nano-DC-Kammer	Merck, Darmstadt
Push Column Beta Shield Device	Stratagene, Heidelberg
Rundschüttler KS 501 D	IKA, Staufen
Sofortbildkamera Polaroid MP 4	Polaroid, Offenbach
Thermomixer 5437	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Transilluminator Spectroline TC-312 A/F	Spectronics Corporation, Westbury, USA
UV Stratalinker® 2400	Stratagene, Heidelberg
UV/VIS spectrometer Unicam 8625	ATI Unicam, England
Ultraschallbad Bandelin <i>Sonorex Super</i> RK 103 H	Bandelin Electronic, Berlin
Vortex VF2	IKA, Staufen

Waagen:

Analysenwaage JI-200	Chyo Balance Corp., Japan
Satorius Basic	Satorius, Göttingen

Wasserbäder:

Biometra F 10-L	Biometra, Göttingen
GFL 1083	GFL, Burgwedel

Zentrifugen:

Laborzentrifugen 3K10 und 3K12	Sigma, Osterrode/Harz
Centrifuge 5415 C Eppendorf	Gerätebau Eppendorf, Engelsdorf
Sorvall Combi Plus	DuPont, Bad Homburg
Beckmann J6-MC	Beckmann, Palo Alto, CA, USA
Mikrozentrifuge	Roth, Karlsruhe

1.12 Chemikalien, Enzyme, Kits, Verbrauchsmaterial

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg:	Cy5 TM AutoRead TM SEQUENCING KIT; Hybond N; Primer für PCR; LMW Calibration Kit; mRNA Purification Kit
Appligene, Heidelberg:	dATP, dCTP, dGTP, dTTP (je 100 mM); <i>Taq</i> -Polymerase und Puffer
Arzneimittelwerk Dresden, Radebeul:	Lanatosid A
Biometra, Göttingen:	Cellophan
Biomol Feinchemikalien, Hamburg:	Glycin, Tris
CS-Chromatographie Service GmbH:	HPLC-Fertigsäule 250 x 4 mm mit Waters Sherisorb 5 ODS2
Difco, Augsburg:	Agar noble; Trypton
GibcoBRL, Karlsruhe:	SUPERScript TM RNase H ⁻ Reverse Transkriptase Kit; READY-LOAD TM Λ DNA/ <i>Hind</i> III Fragments
Invitrogen, Groningen, Niederlande:	One Shot kompetente Zellen TOP10; TOPO-T/A-Cloning [®] Kit
Merck, Darmstadt:	DC-Fertigplatten F ₂₅₄
Messer Griesheim GmbH, Krefeld:	Helium 5.0

NEB, Boston, USA:	1 kb DNA ladder; REFLECTION™ Autoradiography Film; Restriktionsenzyme und Puffer; T4 DNA Ligase und Puffer
NEN, Köln:	[α - ³² P] dATP 3000 Ci/mmol; NEF585 X-Omat Blue Film
Polaroid, Offenbach:	Polaroid Filme 3 ¼ x 4 ¼,
Qiagen, Hilden:	Anti-His Antibody Selector Kit; Ni-NTA Spin Kit; QIABRANE, Nylonmembranen, ungeladen, 0,2 µm; QIAEX II Gel Extraction Kit; QIAexpress Kit Type III und Type IV; QIAGEN Plasmid Midi Kit
Roche Diagnostics, Mannheim:	DIG Luminescent Detection Kit; High Prime DNA Labeling Kit; Proteasen-Inhibitor-Cocktail Complete, Mini, EDTA-free
Roth, Karlsruhe:	Acetonitril (HPLC-rein); α -Acetyldigoxin; Desacetyllanatosid C; IPTG; Lanatosid C; Methanol (HPLC-rein); Roti®-Blue (Kolloidale Coomassie-Färbung); Rotiphorese® Gel 30 (30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid); X-Gal
Serva, Heidelberg:	Agarose für DNA-Gelelektrophorese; Agarose Serva high EEO; Ammoniumpersulfat; Bromphenolblau; EDTA; Ethidiumbromid; Ficoll; Heringsperma; Kanamycin; Mercaptoethanol; MOPS; PVP; Ribonuklease A; TEMED; Tetracyclin; Tween 20; Hefeextrakt
Sigma-Aldrich-Chemie, Deisenhofen:	DEPC; DMF; DMSO; Gelatine; SDS; PROTEIN ASSAY KIT (P5656); BSA (Fraktion V); Triton X-100
Stratagene, Heidelberg:	ExAssist Interference-Resistant Helper Phage; NucTrap Probe Purification Columns; pCR-Script™ Amp SK(+) Cloning Kit; <i>Pfu</i> DNA-Polymerase und Puffer; SOLR™; XL1-Blue MRF'
TROPIX, Bedford, USA:	Tropilon Plus, positively charged

VEB Laborchemie Apolda: 3,5-Dinitrobenzoesäure,
Rubidiumchlorid

Alle weiteren, hier nicht genannten Puffersalze oder -zusätze waren entweder von Serva, Heidelberg, oder Sigma, Deisendorf.

2 Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

Konzentrationen von Nukleinsäuren wurden photometrisch am GENE QUANT II (Amersham Pharmacia Biotech) bei 260 nm bestimmt. Dabei wurde eine Absorption von 1 einer Konzentration von 40 µg RNA bzw. 50 µg DNA pro ml gleichgesetzt. Als Maß für die Reinheit der jeweiligen Präparation wurde der Proteinindex P_i (A_{260}/A_{280}) bestimmt.

2.1.2 Trennung und Nachweis von DNA

Die Trennung und der Nachweis von DNA erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese. Dazu wurden in Abhängigkeit von den zu erwartenden Fragmentlängen entsprechend 0,8-2 %ige Agarosegele hergestellt. Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer suspendiert und in der Mikrowelle bis zur klaren Lösung geschmolzen. Der auf etwa 65°C abgekühlten Lösung wurde Ethidiumbromidlösung (Endkonzentration 0,4 µg/ml) hinzugefügt und das Gel gegossen.

Die DNA-Proben wurden mit 0,1 VT DNA-Stoppuffer versetzt, kurz geschüttelt und in die Geltaschen aufgetragen. Als Standard wurde in den meisten Fällen 0,5 µg der 1 kb DNA ladder (NEB) aufgetragen. Die Elektrophorese der Proben erfolgte in 1 x TAE bei 60 V etwa 30-45 min lang. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die DNA im UV-Licht (Transilluminator Spectroline TC-312 A/F) sichtbar gemacht und gegebenenfalls photographiert (Sofortbildkamera Polaroid MP 4).

10 x DNA-Stoppuffer: 0,2 M EDTA; pH 7,5; 50 % Glycerol; 0,2 % Bromphenolblau

2.1.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

DNA-Banden wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Für die Extraktion von DNA aus Agarosestücken wurde der QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Die DNA wurde einmalig mit 20 µl gereinigtem Wasser eluiert.

2.1.4 Herstellung kompetenter Zellen

One Shot TOP10 Zellen wurden bereits kompetent erworben. XL1-Blue MRF', SG13009[pREP4] und BL21 Zellen wurden nach dem Protokoll des Qiaexpressionist™ (1998) kompetent gemacht und nach dem Aliquotieren bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.1.5 Transformation von *E. coli*

200 µl kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit dem zu transformierenden Plasmid versetzt. Der Ansatz wurde 5 min auf Eis inkubiert; anschließend erfolgte bei 42°C ein „Hitzeschock“ für 60 sec. Der Ansatz wurde erneut für 2 min auf Eis gestellt und dann 250 µl SOC-Medium hinzupipettiert. Unter starkem Schütteln wurde der gesamte Transformationsansatz bei 37°C für 1 h inkubiert und danach ein Teil davon auf LB-Agarplatten, die das entsprechende Antibiotikum enthielten, ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.1.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterienzellen

2.1.6.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Von dem Ausstrich wurden Einzelkolonien mit Zahnstochern gepickt und in Minikulturen, die 3 ml LB-Medium und das entsprechende Antibiotikum in der jeweiligen Konzentration enthielten, über Nacht bei 37°C mit 150 UPM inkubiert.

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte durch alkalische Lyse der Bakterienzelle nach der Methode von SAMBROOK et al. (1989). Die erfolgreiche Plasmidpräparation wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.1.6.2 Midi-Präparation von ultrareiner Plasmid-DNA

Ultrareine Plasmid-DNA wurde für Sequenzierungen und Subklonierungen präpariert. Dazu wurden 500 µl einer Minikultur in 50 ml LB-Medium, das das jeweilige Antibiotikum in der entsprechenden Konzentration enthielt, gegeben und bei 37°C über Nacht mit 150 UPM inkubiert.

Zur Midi-Plasmidisolierung wurde der QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen) verwendet, wobei nach den Vorschriften des Herstellers verfahren wurde. Die DNA wurde entweder in 50 µl TE-Puffer (für Subklonierung) oder ½ x TE-Puffer (für Sequenzierungen) aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Die Konzentration an Plasmid-DNA wurde photometrisch bestimmt.

2.1.7 Restriktion von Plasmiden

Plasmide konnten durch Verdau mit geeigneten Restriktionsendonukleasen und anschließender Agarose-Gelelektrophorese kartiert bzw. die Größe ihrer Inserte bestimmt werden. Außerdem wurden durch Restriktionsverdau Plasmide bzw. Inserte aus Plasmiden herausgeschnitten, in Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit aus der Agarose isoliert und für Subklonierungen verwendet.

Der Standardansatz für Restriktion von Plasmid-DNA enthielt:

1-2 µg Plasmid, 1 x Restriktionspuffer, 2 U Restriktionsenzym bzw. der -enzyme und Wasser ad 15 µl. Die Restriktionsansätze wurden 2 h bei 37°C inkubiert. Sollte das Plasmid für weitere Klonierungen präpariert werden, wurde dem Ansatz nach der 2stündigen Inkubation weitere 2 U der Restriktionsendonukleasen zugefügt und für weitere 2 h bei 37°C inkubiert.

2.1.8 DNA-Sequenzierung

DNA wurde mit der Didesoxynukleotid-Methode nach SANGER et al. (1977) sequenziert. Dazu kam der Cy5™ AutoRead™ SEQUENCING KIT (Amersham Pharmacia Biotech) nach der Prozedur C des ALFexpress™ DNA Sequenzer (Amersham Pharmacia Biotech) zur Anwendung. Zur Sequenzierungsreaktion wurden 7,5 µg ultrareine Plasmid-DNA und die jeweiligen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markierten Primer eingesetzt. Die elektrophoretische Trennung der Ansätze erfolgte in Polyacrylamidfertiggelen (GRADE READY MIX GEL; Amersham Pharmacia Biotech) in 1 x TBE.

2.1.9 Auswertung der Nukleotid- bzw. Proteinsequenzen und Sequenzvergleiche

Die Auswertung und Bearbeitung von Nukleotid- bzw. Proteinsequenzen erfolgte mit Programmen aus dem Internet. Um homologe Sequenzen zu finden, wurde die EMBL Nucleotide Sequence Database (Release 53, Dezember 1997 für *cghI* 374; Release 67, Juni 2001 für *cghI*) (STOESSER et al., 2001) unter Verwendung der BLAST- und FASTA-Algorithmen (ALTSCHUL et al., 1990 und 1997) (PEARSON und LIPMAN, 1988) durchsucht. Aligments verschiedener Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms MULTALIGN (CORPET, 1988) durchgeführt.

2.1.10 Isolierung von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA wurde aus jungen, inneren Rosettenblättern von *D. lanata* nach der modifizierten Methode von REINBOTHE et al. (1992) isoliert. Dabei wurde die Vorschrift von DUMKE-LEHMANN (1993) angewendet.

Die aliquotierte RNA wurde bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert.

2.1.11 Trennung von Gesamt-RNA in denaturierenden Formaldehyd-Agarosegelen

RNA wurde in denaturierenden, 1,2 %igen Formaldehyd-Agarose-Gelen nach einer Vorschrift von SAMBROOK et al. (1989) aufgetrennt.

3,6 g Agarose (Standard High EEO, Boehringer-Ingelheim) wurden in 30 ml 10 x MOPS-Puffer und 216 ml DEPC-Wasser so lange erhitzt, bis sich die Agarose aufgelöst hatte. Nach Abkühlen der Lösung auf etwa 60°C wurden 54 ml Formaldehyd und 12,5 µg Ethidiumbromidlösung (1 mg/ml TE-Puffer) zugesetzt. Das Gel wurde zur Polymerisation 30 min bei RT und 10 min bei 4°C gelagert. 20 µg Gesamt-RNA wurden mit 3 Volumen Probenpuffer und 0,1 Volumen RNA-Stoppuffer versetzt. Nach 15 min Denaturierung bei 65°C und kurzer Abkühlung auf Eis wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in 1 x MOPS bei 100 V in einer Elektrophoresekammer.

10 x MOPS:	0,2 M MOPS; 50 mM Natriumacetat; 10 mM EDTA; pH 7,0
RNA-Probenpuffer:	500 µl Formamid entionisiert; 180 µl Formaldehyd; 70 µl 14,3 x MOPS
Formamid entionisiert:	100 ml Formamid und 5 g Ionenaustauscher (Dowex AG 501-X8, mixed-bed, 50 mesh, Biorad) wurden 1-2 h bei RT gerührt, dann filtriert und bei -20°C gelagert.
RNA-Stoppuffer:	0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylencyanol FF; 50 % Glycerol; 1 mM EDTA; pH 8,0

2.1.12 Aufreinigung von mRNA

mRNA wurde aus Gesamt-RNA durch Affinitätschromatografie an Oligo-(dT)-Cellulose aufgereinigt. Dafür kam der mRNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech) zur Anwendung. Es wurden 1,25 mg Gesamt-RNA über eine Säule gegeben; auf eine zweite Säulenreinigung wurde verzichtet.

2.1.13 cDNA-Synthese

cDNA wurde aus mRNA mittels des SUPERSRIPT™ RNase H⁻ Reverse Transkriptase Kit (GibcoBRL) generiert, wobei nur eine Erststrangsynthese durchgeführt wurde. Zur Reaktion wurden 0,5 µg mRNA eingesetzt.

2.1.14 RT-PCR

Zur RT-PCR waren in einem 50 µl-Ansatz enthalten:

dNTP's (200 µM je Nukleotid), 1 x PCR-Puffer, 2 µl cDNA, Sense und Antisense-Primer (jeweils 1 µM), 1 U *Taq*-Polymerase und gereinigtes Wasser ad 50 µl. Die Polymerase wurde zum Schluß hinzugefügt, dann kurz zentrifugiert und der Reaktionsansatz in den Mastercycler (Eppendorf) gestellt. Das PCR-Programm bestand aus folgenden Schritten:

1. Initiale Denaturierung	95°C		5 min
2. Zyklen:		35x	
Denaturierung	95°C		1 min
Primeranlagerung	x°C		1 min
Kettenverlängerung	72°C		1 min
5. Finale Kettenverlängerung	72°C		10 min
6. Lagerung	4°C		bis zur Entnahme

Die Temperaturen für die Primeranlagerung wurden den jeweiligen PCR-Versuchen angepasst.

Nach Entnahme der Proben aus dem PCR-Block wurden Aliquote der Ansätze mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. PCR-Produkte wurden aus dem Gel isoliert und anschließend kloniert.

2.1.15 Klonierung von PCR-Produkten

Zur Klonierung von PCR-Produkten kamen in Abhängigkeit von der Länge der PCR-Produkte der TOPO-T/A-Cloning[®] Kit (Invitrogen) (>500 bp Fragmentlänge) bzw. der pCR-Script[™]Amp SK(+)-Cloning Kit (Stratagene) (<500 bp Fragmentlänge) zur Anwendung, wobei nach den Anweisungen der Hersteller verfahren wurde. Da die jeweiligen Zellen bzw. Plasmide eine Blau/Weiß-Selektion nach SAMBROOK et al. (1989) auf rekombinante Klone ermöglichen, wurden den LB-Agarplatten neben Ampicillin (100 µg/ml LB-Agar) auch X-gal (40 µg/ml LB-Agar) und IPTG (79 µg/ml LB-Agar) hinzugefügt. Nach einer 12-16stündigen Inkubation bei 37°C wurden weiße Kolonien gepickt, kultiviert und die entsprechenden Plasmide isoliert und gegebenenfalls sequenziert.

2.1.16 Screening einer cDNA-Bank aus Blättern von *D. lanata*

Die Blatt-cDNA-Bank von *D. lanata* wurde nach einer Methode von LUO et al. (1994) und einer modifizierten Vorschrift des DNA Screening Protocol des ZAP-cDNA[®] Synthesis Kit auf positive Phagenklone durchsucht.

2.1.16.1 Bestimmen des Phagen-Titers

Eine Kolonie der *E. coli*-Zellen (Stamm XL1-Blue MRF') wurde von einem Verdünnungsausstrich gepickt und in 50 ml antibiotikafreiem LB-Medium über Nacht bei 37°C mit 150 UPM inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (4800 x g, 10 min, 4°C), in 10 mM MgSO₄ resuspendiert und die Suspension dabei auf eine OD₆₀₀ = 0,5 eingestellt.

Von der cDNA-Bank wurde eine Verdünnungsreihe (1:4000 – 1:6000) in SM-Puffer hergestellt und je 1 µl der Verdünnungen mit 200 µl der Zellen zur Transfektion gemischt und für 15 min bei 37°C inkubiert.

Zu 3,5 ml Top-Agar, der auf 55°C vorgewärmt war, wurden die transfizierten Zellen gegeben, kurz gemischt und der Top-Agar auf LB-Agarplatten (Ø 90 mm) ausgebracht. Die Platten wurden so lange bei 37°C inkubiert, bis einzelne, deutlich sichtbare Phagenkolonien erkennbar waren. Die Kolonien wurden gezählt und daraus der Phagentiter der cDNA-Bank bestimmt.

2.1.16.2 Plattieren der Phagenkolonien

Phagenkolonien wurde wie oben beschrieben plattiert.

Dabei wurde das Volumen cDNA-Bank zur Transfektion von 600 µl *E. coli*-Zellen so gewählt, daß auf einer LB-Agarplatte (Ø 140 mm) 50000 plaque forming units (pfu) zu finden waren. Beim Primärscreening kamen 5 Platten (Ø 140 mm) zum Einsatz, so daß etwa 250000 Phagenklone durchsucht werden konnten.

2.1.16.3 Herstellen der Filterabdrücke

Von den Phagenkolonien wurden auf QIABRANE Nylonmembranen (Qiagen, Ø 132 mm, 0,2 µm) doppelte Abdrücke angefertigt, wobei wie folgt vorgegangen wurde:

Filter und LB-Agarplatten wurden mindestens 1 h bei 4°C gelagert. Anschließend wurden die Filter mit Pinzetten auf die Platten gelegt und die Filter und die Platten in ihrer Orientierung zueinander markiert. Der erste Abdruck wurde 1 min, der zweite 3 min lang genommen. Nach kurzem Trocknen wurden die Filter auf Filterpapier, das mit folgenden Lösungen gesättigt war, gelegt: 5 min auf Denaturierungslösung, 5 min auf Neutralisierungslösung und 5 min auf 2 x SSC, wobei die Filter dazwischen kurz getrocknet wurden. Zum Schluß wurden die Filter für 10 min auf Filterpapier getrocknet und die DNA durch doppeltes Kreuzvernetzen (1200 µJ x 100) im UV STRATALINKER® 2400 (Stratagene) fest an den Membranen verankert. Die Filter wurden eingeschweißt und bei -20°C gelagert.

2.1.16.4 Markieren der Sonde

Als Sonde zum Hybridisieren wurde das PCR-Produkt *cghI* 374 verwendet. Dazu wurde das Fragment aus dem Plasmid HF 1 durch Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *Pst*I und *Not*I geschnitten, der Ansatz mittels Agarosegelelektrophorese getrennt und das Fragment aus der Agarose isoliert.

Die Markierung der Sonde erfolgte mit dem High Prime DNA Labeling Kit (Roche Diagnostics), wobei 125 ng Sonde und 25 µl [α -³²P] dATP 3000 Ci/mmol (NEN) in den Polymerisationsansatz gegeben wurden. Nicht gebundene Nukleotide wurden danach durch Ionenaustauschchromatografie an NucTrap Probe Purification Columns (Stratagene) unter Anwendung des Push Column Beta Shield Device (Stratagene) abgetrennt.

2.1.16.5 Hybridisieren der Filter

Zunächst wurden die Filter in 80 ml Hybridisierungspuffer für 4,5 h bei 68°C vorhybridisiert. Anschließend wurde die markierte Sonde für 10 min im kochenden Wasser

erhitzt und nach kurzem Lagern auf Eis dem Hybridisierungspuffer hinzugefügt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68°C.

Nach dem Hybridisieren wurden die Filter wie folgt gewaschen: Zweimal für 15 min bei RT in 2 x SSC und 0,1 % SDS, dann zweimal für 30 min bei 65°C in 1 x SSC und 0,1 % SDS und zuletzt einmal für 30 min bei 65°C in 0,1 x SSC und 0,1 % SDS.

Die Filter wurden nach dem Waschen kurz auf Filterpapier getrocknet, in Folie eingeschweißt und zusammen mit einem NEF585 X-Omat Blue Film (NEN) in eine Autoradiographiekassette für 2-3 Tage eingelegt und danach ausgewertet.

2.1.16.6 Isolieren von Phagenklonen

Die Markierung der Filter wurde auf die Filme übertragen. So konnten Signale auf den Filmen nach Korrelation der Orientierung der Filme mit denen der LB-Agarplatten Phagenklonen zugeordnet werden. Dabei wurden nur Phagenklone, die auf beiden Filtern Signale ergaben, weiterbearbeitet. Um die zugeordneten Phagenklone wurde mit einem Skalpell ein jeweils 0,5 x 0,5 cm großes Stück aus dem LB-Agar ausgeschnitten und in 1 ml SM-Puffer, dem 20 µl Chloroform zugesetzt waren, gegeben. Die Suspension wurde 4 h bei RT geschüttelt und anschließend kurz abzentrifugiert. Die Phagenklone wurden bis zum Sekundärscreening bei 4°C gelagert.

2.1.16.7 Sekundärscreening

Der Titer der Phagenklone wurde bestimmt. Anschließend wurden auf LB-Agarplatten (Ø 90 mm) 200 µl Zellen, die mit dem jeweiligen Volumen Phagenklone transfiziert waren, in 3,5 ml Top-Agar so ausplattiert, daß etwa 300 pfu/Platte zu finden waren. Von den Platten wurden Filterabdrücke (QIABRANE, Ø 83 mm) angefertigt und die Filter erneut mit dem PCR-Fragment *cghi* 374 als Sonde hybridisiert, wobei 25 ng Sonde und 5 µl [α -³²P] dATP 3000 Ci/mmol eingesetzt wurden. Einzelphagenklone wurden aus dem LB-Agar isoliert und anschließend in 0,5 ml SM-Puffer mit 20 µl Chloroform suspendiert.

2.1.16.8 Überprüfen positiver Phagenklone

Die Phagenklone wurden nach dem Sekundärscreening auf die Länge und die Richtigkeit ihrer Inserte nach einer Methode von SANG und THOMPSON (1994) überprüft.

Die Phagenklone wurden nach dem Zerstören der Phagenhülle durch 3maligen Frier-Tauprozess (flüssiger Stickstoff – kochendes Wasser) als Matrix für PCR-Reaktionen eingesetzt. Dabei kamen einerseits ein sequenzspezifisches Primerpaar (3.2 – 1rev) und ein vektorspezifisches Primerpaar (uni – rev) zur Anwendung. Die PCR-Produkte wurden danach mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Danach wurde das Gel 15 min mit Denaturierungslösung und 10 min mit Neutralisierungslösung behandelt und anschließend die DNA nach SAMBROOK et al. (1989) durch Kapillarkräfte auf Nylon-Membranen (Hybond N) transferiert. Der Transfer erfolgte über Nacht in 20 x SSC.

Nach dem Blotten wurde die DNA auf den Membranen durch doppeltes Kreuzvernetzen (1200 μ J x 100) im UV STRATALINKER[®]2400 fest an den Membranen verankert. Die Membranen wurden zum Schluß in 2 x SSC gewaschen und unter den oben beschriebenen Bedingungen hybridisiert.

2.1.16.9 Tertiärscreening

Das Tertiärscreening wurde analog dem Sekundärscreening durchgeführt, wobei jetzt ein Phagentiter von 50 pfu/Platte verwendet wurde. Zum Schluß wurden Einzelphagenklone isoliert und aus diesen die Phagemide isoliert.

2.1.16.10 *In vivo* Excision

Die Phagemide aus den Phagenklonen wurde unter Zuhilfenahme des ExAssist Interference-Resistant Helper Phage nach der Vorschrift des DNA Screening Protocol des ZAP-cDNA[®] Synthesis Kit (Stratagene) präpariert. Die isolierten Phagemide wurden dann in kompetenten SOLR[™]-Zellen auf LB-Platten mit Ampicillin über Nacht bei 37°C vermehrt. Ein Klon wurde in 50 ml LB-Medium kultiviert, die Plasmide präpariert und anschließend sequenziert.

2.1.16.11 Verwendete Lösungen

Top-Agar:	LB-Agar mit 0,7 % Agar noble
Denaturierungslösung:	0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl
Neutralisierungslösung:	0,5 M Tris/HCl; 1,5 M NaCl; pH 7,4
Vorhybridisierungslösung:	6 x SSC; 10 mM EDTA; 5 x Denhardts Reagenz; 0,5 % SDS; 100 µg/ml Heringssperma
Hybridisierungslösung:	Vorhybridisierungslösung mit radioaktiv markierter Sonde
50 x Denhardts Reagenz:	1 % Ficoll 400; 1 % BSA; 1 % PVP

2.1.17 Northern-Blot-Analyse

2.1.17.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNA wurde mittels CsCl-Methode nach SAMBROOK et al. (1989) isoliert. 1,5 g Pflanzenmaterial wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und in ein Falcon-Röhrchen überführt. Es wurden 8 ml Lysis-Puffer, 400 µl SLS-Lösung und 80 µl β-Mercaptoethanol zugefügt, das Gemisch für 2 min gevortext und anschließend zentrifugiert (5000 x g, 10 min, RT). Der wäßrige Überstand wurde vorsichtig abgenommen und damit eine 5,7 M CsCl-Lösung in einem Ultrazentrifugenröhrchen überschichtet. Die Lösung wurde in der Ultrazentrifuge Sorvall Combi Plus zentrifugiert (13000 x g, 24 h, RT) und danach das Röhrchen durch Aufschneiden mit einer Rasierklinge geöffnet. Der Überstand wurde verworfen und die präzipitierte RNA wurde abgenommen. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Im folgenden wurde das Pellet in 200 µl TE-Puffer pH 8,0 aufgenommen, der Boden des Röhrchens mit 100 µl TE-Puffer pH 8,0 gespült und beide Lösungen vereint. Die RNA wurde durch Zugabe von 0,1 VT 3 M Natriumacetat und 3 VT 96 % Ethanol für 30 min auf Eis gefällt und durch Zentrifugation (10000 x g, 15 min, 4°C) abgetrennt. Das Pellet wurde nochmals mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und nach Trocknung an der Luft in DEPC-Wasser gelöst. Aliquote der RNA wurden bei -80°C eingefroren.

Von einem Aliquot wurde die Konzentration der RNA und die Reinheit der Präparation bestimmt.

Lysis-Puffer:	4 M Guanidinthiocyanat; 0,1 M Tris/HCl; pH 7,5
CsCl-Lösung:	5,7 M Cäsiumchlorid; 0,01 M EDTA; pH 7,5
SLS-Lösung:	10 % Natriumlaurylsarcosinat

2.1.17.2 Trennung von Gesamt-RNA in denaturierenden Formaldehyd-Agarosegelen

Die Trennung von Gesamt-RNA erfolgte wie unter B 2.1.11 angegeben.

2.1.17.3 Northern-Blot-Verfahren

Die Membran (Tropilon Plus, positively charged) wurde kurz in 20 x SSC eingeweicht und die DNA nach SAMBROOK et al. (1989) durch Kapillarkräfte auf die Membran transferiert. Der Transfer erfolgte über Nacht in 20 x SSC. Transferierte RNA wurde durch doppeltes Kreuzvernetzen (1200 μ J x 100) im UV STRATALINKER[®]2400 fest an den Membranen verankert, die Membran kurz mit DEPC-Wasser gespült und an der Luft trocknen gelassen. Die Membran wurde anschließend eingeschweißt und bei -20°C gelagert oder direkt zur Hybridisierung verwendet.

2.1.17.4 Markierung der Sonde

Als Sonde zur Hybridisierung kam *cghI* zum Einsatz, die aus dem Plasmid HF 4 durch Restriktionsverdau (*EcoRI/XhoI*), Agarosegelelektrophorese und Isolierung der DNA aus der Agarose gewonnen wurde.

Die Markierung wurde mit dem High Prime DNA Labeling Kit durchgeführt, wobei 100 ng DNA und Digoxigenin markiertes dUTP in den Polymerisationsansatz gegeben wurden. Der Ansatz wurde 24 h bei 37°C inkubiert und anschließend die DNA mit 0,1 VT 4 M LiCl-Lösung und 3 VT 96 % Ethanol für 16 h bei -20°C gefällt. Danach wurde die

DNA zentrifugiert (10000 x g, 15 min, 4°C), mit 70 % Ethanol gewaschen und nach einer erneuten Zentrifugation an der Luft getrocknet. Die DNA wurde in 50 µl TE-Puffer pH 8,0 aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Die Effektivität der Markierung wurde mittels Dot-Blot-Verfahren überprüft und damit gleichzeitig die einzusetzende Sondenkonzentration abgeschätzt.

2.1.17.5 Hybridisieren und Waschen der Blots

Zunächst wurde die Membran in 20 ml Hybridisierungspuffer für 3 h bei 50°C im Hybridisierungsofen (Biometra) vorhybridisiert. Anschließend wurde die Sonde für 10 min gekocht und nach kurzem Lagern auf Eis dem Hybridisierungspuffer hinzugefügt. Die Hybridisierung erfolgte wie die Vorhybridisierung für 3 h bei 50°C.

Die Membran wurde wie folgt gewaschen: 2 x 5 min mit 2 x SSC; 0,1 % SDS bei RT; 2 x 15 min 1 x SSC; 0,1 % SDS bei 60°C und 1 x 15 min 0,1 SSC; 0,1 % SDS bei 60°C.

Hybridisierungslösung: 1 M NaCl; 1% SDS; 10 % Dextransulfat; 50 % Formamid (entionisiert); 100 µg/ml Heringssperma-DNA

2.1.17.6 Detektion der Signale

Nach einer fünfminütigen Inkubation in Waschpuffer wurde die Membran für 60 min in Block-Lösung gelegt. Dem Waschpuffer wurde dann der Anti-DIG-Alkalische Phosphatase Antikörper (1:20000 verdünnt) zugegeben und für weitere 30 min inkubiert. Nach 2 x 15 min Waschen der Membran in Waschpuffer, wurde die Membran für 5 min in Detektionspuffer inkubiert. Zum Detektionspuffer wurde CDP[®]-STAR (1:3000 verdünnt) gegeben und die Membran mit dieser Lösung 5 min im Dunkeln übergossen. Die getrocknete Membran wurde in Folie eingeschweißt und die Membran zusammen mit einem Film (REFLECTION[™] Autoradiography Film, NEB) in eine Filmkassette eingelegt, wobei die Belichtungsdauer etwa 15 min betrug. Danach wurden die Filme entwickelt.

- Waschpuffer: 150 mM NaCl; 100 mM Maleinsäure; 0,3 % Tween[®] 20; mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt
- Detektionspuffer: 100 mM Tris/HCl; 100 mM NaCl; mit HCl auf pH 9,5 eingestellt
- Block-Lösung: 1 g Block-Reagenz in 100 ml Waschpuffer

2.1.17.7 Kontrollhybridisierung

Zur Kontrolle gleicher RNA-Konzentrationen wurde die Membran mit dem Plasmid pDB 18 (DOBROWOLSKI et al., 1989), das eine 18S RNA-Teilsequenz enthält, unter gleichen Bedingungen hybridisiert.

2.1.18 Southern-Blot-Analyse

2.1.18.1 Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA wurde nach der CTAB-Methode von ROGERS und BENDICH (1994) isoliert.

8 g Blattmaterial wurden in einem Mörser unter flüssigem Stickstoff mit dem Pistill zerrieben. Nach dem Verdampfen des Stickstoffs wurde das Material in ein Falcon-Röhrchen überführt und mit 1 VT 2 x CTAB-Puffer, der vorher auf 65°C erhitzt wurde, versetzt. Anschließend wurde 1 VT Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugeführt und zur Bildung einer Emulsion vorsichtig geschüttelt. Durch Zentrifugation (5000 x g, 5 min, 4°C) wurden die Phasen getrennt und die Oberphase in ein neues Falcon-Röhrchen gegeben. Diese Phase wurde mit 0,1 VT 10 % CTAB-Lösung versetzt, gemischt und erneut wie oben angegeben mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Zu der abgenommenen Oberphase wurde 1 VT CTAB-Präzipitationspuffer hinzugefügt und gemischt. Die Lösung wurde für 45 min auf Eis gelagert und danach zentrifugiert (5000 x g, 2 x 2 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2 ml Hochsalz-TE-Puffer gelöst. Durch Zusatz von 2 VT 96 % Ethanol wurden die Nukleinsäuren präzipitiert und durch Zentrifugation (5000 x g, 30 min, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde verworfen und die Nukleinsäuren mit dem gleichen Volumen 80 % Ethanol gewaschen, wieder zentrifugiert (5000 x g, 15 min, 4°C) und nach Verwerfen des

Überstands das Pellet für 45 min an der Luft getrocknet. Die Nukleinsäuren wurden in 200 µl 0,1 TE-Puffer gelöst und mit 2 µl RNase-Lösung für 1 h bei 37°C behandelt. Die DNA wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die genomische DNA wurde in ihrer Konzentration und Reinheit bestimmt und vor und nach Verdau mit Restriktionsendonukleasen in 0,8 %igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Prüfung auf Verunreinigungen wurde im UV-Wellenlängenbereich von 200 bis 400 nm ein kontinuierliches Spektrum aufgenommen.

Lösungen:

2 x CTAB-Puffer:	2 % CTAB; 100 mM Tris, pH 8,0; 20 mM EDTA, pH 8,0; 1,4 M NaCl; 1 % PVP M _G 40000
10 % CTAB-Lösung:	10 % CTAB; 0,7 M NaCl
CTAB-Präzipitationspuffer:	1 % CTAB; 50 mM Tris, pH 8,0; 10 mM EDTA, pH 8,0
Hochsalz-TE-Puffer:	10 mM Tris, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0; 1 M NaCl
0,1 x TE-Puffer:	1,0 mM Tris, pH 8,0; 0,1 mM EDTA, pH 8,0

2.1.18.2 Restriktion genomischer DNA

Genomische DNA wurde in folgenden Ansätzen verdaut:

2,5 µl DNA (8µg/µl DNA)
20 µl 10 x Puffer
2,5 µl Restriktionsendonuklease (40 U/µl)
175 µl gereinigtes Wasser

Es wurden 5 Reaktionen angesetzt, wobei die DNA jeweils mit einem der folgenden Restriktionsendonukleasen in den dazugehörigen Puffern verdaut wurde: *Bam*HI, *Bg*III, *Eco*RI, *Kpn*I, *Xho*I. Die Ansätze wurden für 10 h bei 37°C inkubiert, danach mit 1 µl der jeweiligen Restriktionsendonuklease (40 U/µl) versetzt und nochmals für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 0,1 VT 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 3 VT Ethanol 96 % 24 h bei -20°C gefällt. Durch Zentrifugation (13000 x g, 15 min, 4°C) wurde die DNA abgetrennt, getrocknet und mit 100 µl Ethanol 70 % gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (13000 x g, 10 min, 4°C) wurde

die DNA kurz an der Luft getrocknet und je Ansatz in 30 µl TE-Puffer pH 8,0 aufgenommen.

2.1.18.3 Elektrophoretische Trennung von genomischer DNA im Agarosegel

Zu den Ansätzen wurden jeweils 3 µl 10 x DNA-Stoppuffer gegeben. Die DNA wurde in einem 0,8 %igen Agarosegel, das Ethidiumbromid (0,4 µg/ml) enthielt, bei 16 mV über 16 h in 1 x TAE-Puffer, der ständig umgepumpt wurde, elektrophoretisch getrennt. Parallel dazu wurde der READY-LOAD™ Λ DNA/*Hind* III Fragments (GibcoBRL) als Standard mit aufgetragen. Das Gel wurde im UV-Licht photographiert.

2.1.18.4 Southern-Blot-Verfahren

Das Gel wurde danach wie folgt behandelt: 10 min in 0,25 M HCl, 2 x 15 min in Denaturierungslösung und 2 x 15 min in Neutralisierungslösung geschwenkt, wobei zwischen den einzelnen Schritten das Gel kurz mit gereinigtem Wasser gespült wurde. Die Membran (Tropilon Plus, positively charged) wurde kurz in 20 x SSC eingeweicht und die DNA nach SAMBROOK et al. (1989) durch Kapillarkräfte auf die Membran transferiert. Der Transfer erfolgte über Nacht in 20 x SSC. Zum Schluß wurde die DNA durch doppeltes Kreuzvernetzen (1200 µJ x 100) im UV STRATALINKER® 2400 fest an den Membranen verankert, die Membran kurz in gereinigtem Wasser gespült und an der Luft trocknen gelassen. Die Membran wurde entweder eingeschweißt und bei -20°C gelagert oder direkt zur Hybridisierung verwendet.

2.1.18.5 Markierung der Sonde

Als Sonden kamen entweder *cghI* 374 oder *cghI* zum Einsatz, die aus den jeweiligen Plasmiden (HF 1 bzw. HF 4) durch Restriktionsverdau (*Not*I/*Pst*I bzw. *Eco*RI/*Xho*I), Agarosegelelektrophorese und Isolierung der DNA aus der Agarose gewonnen wurden.

Die Markierung und Reinigung der Sonden erfolgte wie in B 2.1.16.4 angegeben, wobei 50 ng Sonde und 10 μ l [α -³²P] dATP 3000 Ci/mmol (NEN) in den Polymerisationsansatz gegeben wurden.

2.1.18.6 Hybridisierung und Waschen der Blots

Zunächst wurde die Membran in 50 ml Church-Puffer, dem vorher Heringssperma-DNA (100 μ g/ml) zugesetzt wurden, für 2 h bei 65°C vorhybridisiert. Anschließend wurde die markierte Sonde für 10 min gekocht und nach kurzem Lagern auf Eis dem Church-Puffer hinzugefügt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C.

Nach dem Hybridisieren wurden die Filter wie folgt gewaschen: 5 min bei RT in 2 x SSC und 0,1 % SDS und dann für 10 min 55°C in 1 x SSC und 0,1 % SDS.

Die Filter wurden nach dem Waschen kurz auf Filterpapier getrocknet, in Folie eingeschweißt und zusammen mit einem NEF585 X-Omat Blue Film in eine Autoradiographiekassette für 5-7 Tage eingelegt. Danach wurden die Filme entwickelt.

Church-Puffer: 1 mM EDTA; 0,5 M Na₂HPO₄; pH 7,2; 7 % SDS

2.1.19 Heterologe Expression in *E. coli*

2.1.19.1 Konstruktion der Expressionsplasmide HF 6, HF 8 und HF 10

Um die Expressionsplasmide HF 6, HF 8 und HF 10 zu konstruieren, wurde zunächst die kodierende Sequenz *cghI* vom Plasmid HF 4 mittels PCR amplifiziert, wobei sich an den verwendeten Primern palindromische Sequenzen für Restriktionsendonukleasen befanden. Zur PCR waren in einem 50 μ l-Ansatz enthalten:

dNTP's (200 μ M je Nukleotid), 1 x PCR-Puffer, Plasmid HF 4 (100 ng), das Primerpaar CghI_{Bam}HI/CghI_{Kpn}I für das Plasmid HF 6, 60Vorn/60Hin für das Plasmid HF 8 und GST_{Bam}HI/GST_{Xho}I für das Plasmid HF 10 (jeder Primer 0,5 μ M), 2,5 U *Pfu*-Polymerase und gereinigtes Wasser ad 50 μ l. Bis auf die Polymerase wurden sämtliche Komponenten zusammengefügt, abzentrifugiert und in den Mastercycler gestellt. Nachdem die initiale

Denaturierungstemperatur (95°C) erreicht war, wurde die Polymerase zupipettiert. Das PCR-Programm bestand aus folgenden Schritten:

1. Initiale Denaturierung	95°C	45 sec
2. Zyklen:		30x
Denaturierung	95°C	45 sec
Primeranlagerung	50°C	45 sec
Kettenverlängerung	72°C	6 min
5. Finale Kettenverlängerung	72°C	10 min
6. Lagerung	4°C	bis zur Entnahme

Danach wurden 20 µl der Ansätze mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, die PCR-Produkte wurden aus dem Gel isoliert und anschließend mit dem TOPO-T/A-Cloning[®] Kit kloniert. Die generierten Plasmide (HF 5, HF 7, HF 9) wurden präpariert und durch Restriktionsanalyse identifiziert. Die Inserte wurden durch Restriktionsverdau (HF 5 – *Bam*HI/*Kpn*I, HF 7 – *Nco*I/*Bg*III, HF 9 – *Bam*HI/*Xho*I) aus den Plasmiden geschnitten, durch Agarosegelelektrophorese getrennt, aus der Agarose isoliert und in die jeweiligen Vektoren subkloniert (pQE 30 – HF 6, pQE60 – HF 8, pGEX-5X-3 – HF 10). Die Plasmide (HF 6, HF 8, HF10) wurden in XL1-Blue MRF'-Zellen propagiert, präpariert und sequenziert.

2.1.19.2 Expression von *cghI* in *E. coli*

Kompetente SG13009[pREP4]-Zellen wurden mit den Plasmiden HF 6 und HF 8 transformiert, während das Plasmid HF 10 zur Transformation von BL21-Zellen verwendet wurde. Die Transformationsansätze wurden auf LB-Agarplatten, die Antibiotika enthielten (SG13009[pREP4]-Zellen: 100 µg Ampicillin/ml + 25 µg Kanamycin/ml; BL21-Zellen: 50 µg Ampicillin/ml), ausgestrichen und für 16 h bei 37°C inkubiert. Einzelne Klone wurden in 3 ml LB-Medium, das die entsprechenden Antibiotika enthielt, für weitere 16 h bei 37°C inkubiert. 50 µl davon wurden in 3 unterschiedlichen 5 ml LB-Medium, das vorgewärmt war und wiederum die entsprechenden Antibiotika enthielt, gegeben und bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 wachsen gelassen. Anschließend wurden den 3 Kulturen pro Klon entweder 1 mM IPTG, 0,2 mM IPTG oder 0,1 mM IPTG zugefügt und dementsprechend entweder für 5 h bei 37°C, 16 h bei 17°C oder 96 h bei 4°C inkubiert.

Exprimierende Klone wurden in 50 ml LB-Medium, das die entsprechenden Antibiotika enthielt, für 16 h bei 37°C kultiviert. Die 50 ml wurden zu 1 L vorgewärmtem LB-

Medium, das wiederum die entsprechenden Antibiotika enthielt, gegeben, bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ wachsen gelassen und nach Zugabe von 0,1 mM IPTG für 96 h bei 4°C inkubiert.

2.1.19.3 Analyse der Expression

Die Expression wurde sowohl durch SDS-PAGE als auch im Enzymassay für Cardenolide überprüft. Zur SDS-PAGE wurde wie in B 2.2.2 angegeben verfahren, zum Aktivitätstest wurden die Zellen zentrifugiert (5000 x g, 5 min, RT) und anschließend in 1/100 des originalen Volumens PBS-Puffer (1 % Triton X-100, 1 mM PMSF) resuspendiert.

Bei den 5 ml Kulturen wurden die Suspensionen 5 mal für je 45 sec ins Ultraschallbad (Bandelin *Sonorex Super* RK 103 H) und anschließend für je 25 sec auf Eis gestellt. Die Zellrückstände wurden abzentrifugiert (13000 x g, 10 min, 4°C) und der Überstand unmittelbar zur Aktivitätsbestimmung (B 2.2.3) eingesetzt.

Den 1 L Kulturen wurde eine Tablette des Proteasen-Inhibitor-Cocktail Complete, Mini, EDTA-free (Qiagen) hinzugefügt. Die Zellen wurden dreimal in der French press durch Druck aufgeschlossen und anschließend die Zellrückstände mittels Zentrifugation (13000 x g, 10 min, 4°C) abgetrennt. Die Überstände wurden aliquotiert und entweder zum Aktivitätstest verwendet oder bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C eingefroren.

Die exprimierten Proteine mit einem 6 x His-tag wurden mittels des Anti-His Antibody Selector Kit und des Ni-NTA Spin Kit (jeweils Qiagen) untersucht.

2.1.20 Mutagenese

2.1.20.1 Konstruktion der Expressionsplasmide HF 11 und HF 12

Um aus dem Expressionsplasmid HF 6, d.h. aus der Sequenz *cghI*, die Aminosäuren von 205-300 (*cghI* Δ 205-300) bzw. von 491-495 (*cghI* Δ 491-495) zu deletieren und die Expressionsplasmide HF 11 und HF 12 zu konstruieren, wurde die Methode der PCR angewendet. In einem 50 µl-Ansatz waren enthalten:

dNTP's (200 μM je Nukleotid), 1 x PCR-Puffer, Plasmid HF 6 (18 ng), das Primerpaar Del1/Del2 für das Plasmid HF 11 und Del3/Del4 für das Plasmid HF 11 (jeder Primer 125 ng), 2,5 U *Pfu*-Polymerase und gereinigtes Wasser ad 50 μl . Bis auf die Polymerase wurden sämtliche Komponenten zusammenpipettiert, abzentrifugiert und in den Mastercycler gestellt. Nachdem die initiale Denaturierungstemperatur (95°C) erreicht war, wurde die Polymerase zupipettiert. Das PCR-Programm bestand aus folgenden Schritten:

1. Initiale Denaturierung	95°C	30 sec
2. Zyklen:		20x
Denaturierung	95°C	30 sec
Primeranlagerung	55°C	1 min
Kettenverlängerung	72°C	12 min
5. Finale Kettenverlängerung	72°C	10 min
6. Lagerung	4°C	bis zur Entnahme

Nach Beendigung des Programms wurden zu den Ansätzen je 5 U *DpnI* zugefügt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden Aliquote der Ansätze mit 0,1 VT 10 x DNA-Stoppuffer versetzt, mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die PCR-Produkte wurden aus dem Gel isoliert, wobei die DNA in 20 μl gereinigtem Wasser aufgenommen wurde. Zu 10 μl davon wurden 1 x Ligations-Puffer und 10 U T4 DNA Ligase (NEB) gegeben und die Reaktion für 48 h bei 16°C inkubiert. Danach wurden dem Ansatz 2 μl entnommen und damit One Shot TOP10 transformiert. Positive Klone wurden kultiviert, deren Plasmide präpariert und sequenziert

2.1.20.2 Konstruktion des Expressionsplasmids HF 13

Um in dem Expressionsplasmid HF 6, d.h. in der Sequenz *cghI*, die Aminosäure Alanin 187 gegen Prolin (*cghI A187P*) auszutauschen und das Expressionsplasmid HF 13 zu konstruieren, wurde sich wiederum der Methode der PCR bedient. In einem 50 μl -Ansatz waren enthalten:

dNTP's (100 μM je Nukleotid), 1 x PCR-Puffer, Plasmid HF 6 (7,5 ng), die Primer PMvor und PMrev (jeweils 1 μM), 2,5 U *Pfu*-Polymerase und gereinigtes Wasser ad 50 μl . Bis auf die Polymerase wurden sämtliche Komponenten zusammengefügt, abzentrifugiert und in den Mastercycler gestellt. Nachdem die initiale Denaturierungstemperatur (95°C)

erreicht war, wurde die Polymerase zupipettiert. Das PCR-Programm bestand aus folgenden Schritten:

1. Initiale Denaturierung	95°C		30 sec
2. Zyklen:		12x	
Denaturierung	95°C		30 sec
Primeranlagerung	55°C		1 min
Kettenverlängerung	72°C		14 min
5. Finale Kettenverlängerung	72°C		10 min
6. Lagerung	4°C		bis zur Entnahme

Nach Beendigung des Programms wurden 10 µl des Ansatzes mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die PCR-Produkte im UV-Licht analysiert.

Dem Rest des Ansatzes wurden 5 U *DpnI* zugefügt und für 3 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden vom Ansatz 5 µl abgenommen und damit kompetente XL1-Blue MRF' transformiert. Positive Klone wurden kultiviert, deren Plasmide präpariert und sequenziert.

2.1.20.3 Expression von *cghI* Δ205-300, *cghI* Δ491-495 und *cghI* A187P in *E. coli*

Kompetente SG13009[pREP4]-Zellen wurden jeweils mit den Plasmiden HF 11 (*cghI* Δ205-300), HF12 (*cghI* Δ491-495) und HF 13 (*cghI* A187P) transformiert. Die Klone wurden wie B 2.1.19.2 angegeben kultiviert und in ihrer Expression analysiert.

2.2 Proteinchemische Methoden

2.2.1 Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen wurden nach der durch PETERSON (1977) modifizierten Methode nach LOWRY et al. (1951) durchgeführt. Dazu wurde der PROTEIN ASSAY KIT P5656 (Sigma) verwendet, bei dem BSA als Standard fungiert.

2.2.2 SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen (SDS-PAGE) wurden mit dem Puffersystem von LAEMMLI (1970) durchgeführt. Es kamen ausschließlich 10 %ige Gele zur Anwendung; die Proteine wurden danach mit Coomassie gefärbt. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurden die Eichproteine des LMW Calibration Kit verwendet; die Gele wurden in Cellophan eingespannt und am Schluß getrocknet.

2.2.2.1 Herstellung der Gele

Für das Trenngel wurden 4 ml gereinigtes Wasser; 2,5 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8; 100 µl SDS (10 %); 3,33 ml 30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid (Rotiphorese[®] Gel 30 – Roth); 100 µl APS (10 %) und 5 µl TEMED gemischt, in die Mini-Protean II Slab Cell (Bio-Rad)-Apparatur gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurde der Isopropanol abgegossen und für das Sammelgel 6,1 ml gereinigtes Wasser, 2,5 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 6,8; 100 µl SDS (10 %); 1,3 ml 30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid (Rotiphorese[®] Gel 30 – Roth); 100 µl APS (10 %) und 10 µl TEMED gemischt. Das Sammelgel wurde über das Trenngel gegossen und Probenaschen durch einen zugegebenen Kamm generiert. Nach der Polymerisation des Gels wurden die Proben in die Probenaschen gegeben.

2.2.2.2 Probenvorbereitung

Von den *E. coli*-Kulturen wurde je 1 ml abgenommen und zentrifugiert (5000 x g, 5 min, RT). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl Laemmli-Puffer suspendiert. Die Suspension wurde fünfmal für je 45 sec ins Ultraschallbad und anschließend für je 25 sec auf Eis gestellt. Vor dem Auftragen wurden die Proben für 10 min gekocht.

Laemmli-Puffer: 0,125 M Tris/HCl, pH 6,8; 10 % β-Mercaptoethanol; 20 % Glycerol;
0,01 % Bromphenolblau; 4 % SDS

2.2.2.3 Proteinstandard

Als Eichproteine zur Bestimmung des Molekulargewichts wurden die Proteine des LMW Calibration Kit verwendet:

Phosphorylase b	94,5 kDa
Albumin	67,0 kDa
Ovalbumin	42,0 kDa
Carbonic anhydrase	29,0 kDa
Trypsin inhibitor	20,1 kDa
α -Lactalbumin	14,4 kDa

Die lyophilisierten Proteine wurden in Laemmli-Puffer gelöst und für 5 min gekocht. Pro Tasche wurden 70 μ g des Proteingemisches aufgetragen.

2.2.2.4 Laufbedingungen

Die elektrophoretische Trennung der Protein-SDS-Aggregate erfolgte zunächst für etwa 15 min bei 100 V/ 20 mA bis die Proben ins Sammelgel eingelaufen waren; danach wurde für etwa eine Stunde bei 200 V/ 100 mA elektrophoretisch getrennt.

Laufpuffer: Glycin 28,8 g/l; Tris-Base 3,02 g/l; SDS 1,00 g/l

2.2.2.5 Färbung der Proteine

Für die Färbung der Proteine kam die Coomassie-Färbung zur Anwendung. Die Gele wurden für etwa 1 h in Färbelösung geschüttelt und danach sukzessiv entfärbt.

Coomassie-Lösung:

Coomassie Brilliant Blau R 250	2,0 g
Coomassie Brilliant Blau G 250	0,5 g
Vergällter Ethanol	425 ml
Methanol	50 ml
Essigsäure	100 ml
Gereinigtes Wasser	425 ml

2.2.2.6 Aufbewahrung der Gele

Die Gele wurden 0,5 h in Trocknungslösung geschwenkt und im folgenden zwischen Cellophanfolien zum Trocknen eingespannt.

Trocknungslösung: 6 ml Glycerol; 40 ml Methanol; 10 ml Essigsäure; 44 ml gereinigtes Wasser

2.2.3 Aktivitätsbestimmung

Zum Nachweis der Aktivität rekombinanter Klone wurde die Aktivität gegenüber Lanatosid C (LC) bestimmt. Für die Bestimmung kinetischer Parameter kamen neben Lanatosid C auch Desacetyllanatosid C (DLC) und Lanatosid A (LA) zum Einsatz.

Der Enzymtest wurde wie bei SCHÖNIGER et al. (1998) durchgeführt. Für qualitative Bestimmungen wurden die Proben mit McIlvaine CP/2 pH 5,0 (0,05 % Triton X-100, 10 mM β -Mercaptoethanol) auf 150 μ l verdünnt. Nach Zugabe von 1 mM Cardenolid-Glykosid (Stammlösung in DMSO) wurden die Ansätze für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Cardenolide wurden dann mit 150 μ l Ethylacetat ausgeschüttelt und mittels Dünnschichtchromatographie getrennt und durch Kedde-Reagenz (KEDDE, 1947) detektiert.

Für quantitative Bestimmungen wurden die Proben mit McIlvaine CP/2 pH 5,0 (0,05 % Triton X-100, 10 mM β -Mercaptoethanol) auf 300 μ l verdünnt. Nach Zugabe von 1 mM Cardenolid-Glykosid wurden die Ansätze für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von 310 μ l Methanol gestoppt und die Proben zentrifugiert (17500 x g, 15 min, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und die sich darin befindenden Cardenolide mittels HPLC bestimmt.

Der Enzymassay für quantitative Bestimmungen wurde je nach dem zu untersuchenden Parameter (pH-Optimum, Temperaturoptimum, Temperaturstabilität, K_m -Werte) variiert. Sämtliche Meßergebnisse sind Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung.

Dünnschichtchromatographie

30 µl der Ethylacetat-Phase wurden auf DC-Fertigplatten F₂₅₄ (Merck, 5 x 5 cm) aufgetragen. Als Vergleiche wurden 10 µl Lanatosid C und α-Acetyldigoxin (je 1 mg/ml Methanol) auf die Platten aufgebracht.

Die chromatographische Trennung erfolgte in der Nano-DC-Kammer (Merck) mit dem Gemisch Ethylacetat/Methanol/gereinigtes Wasser (88:11:8). Die Platten wurden an der Luft getrocknet und die Cardenolide mit der Reaktion nach KEDDE et al. (1947) detektiert.

Kedde-Sprühreagenz: 3 % 3,5-Dinitrobenzoesäure in Ethanol und 2 M NaOH
unmittelbar vor dem Besprühen 1:1 gemischt

Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die Cardenolide wurden durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie quantifiziert.

Es kam das HPLC-System von Hewlett Packard (Serie 1050) zur Anwendung. Die stationäre Phase bildete eine Reverse Phase (RP-18) HPLC-Fertigsäule 250 x 4 mm (CS-Chromatographie Service GmbH), die mobile Phase bestand aus einem Gradientengemisch von Wasser und Acetonitril, wobei die Flüssigkeiten durch einen Heliumstrom entgast wurden. Nach erfolgter Trennung wurden die Cardenolide mit dem UV/VIS-Detektor photometrisch bestimmt.

Trenn- und Meßbedingungen:

Stationäre Phase:	Waters Sherisorb 5 ODS2	
Mobile Phase:	A	gereinigtes Wasser
	B	84 % Acetonitril
Gradient	0 min	20 % B
	10 min	65 % B
	13,5 min	100 % B
	8,5 min	100 % B
	20,5 min	20 % B
	22 min	20 % B
Injektionsvolumen:	20 µl	
Flußrate:	1 ml/min	
Meßwellenlänge:	220 nm	

C Ergebnisse

1 Klonierung der Cardenolid-16-O'-Glucohydrolase von *D. lanata*

1.1 RT-PCR

cDNA aus Blättern von *D. lanata* wurde für PCR-Versuche mit vollständig degenerierten Primern, die aus den Peptiden von CGH I (SCHÖNIGER et al., 1998) abgeleitet waren, eingesetzt. Für alle sinnvollen Primerkombinationen (D 1.2) resultierten bei 3 unterschiedlichen Primer-Anlagerungstemperaturen (45°C, 50°C und 55°C) keine PCR-Produkte.

Die Primer wurden danach in ihrer Struktur modifiziert (D 1.2) und diese nun zusammen mit den vollständig degenerierten Primern wie folgt kombiniert:

Kombination	Primerpaar
I	5 und 1rev
II	5.1 und 1 rev
III	5.1 und 2
IV	5.1 und 4
V	3 und 1rev
VI	3.1 und 1rev
VII	3.2 und 1rev
VIII	3.1 und 2
IX	3.2 und 2

Tab.5: Eingesetzte Primerpaare nach Modifikation der Primer

Es wurden wiederum 3 Primer-Anlagerungstemperaturen (45°C, 50°C und 55°C) getestet, wobei bei 45°C und 50°C 4 PCR-Produkte (etwa 400, 1100 und 1500 bp) zu erkennen waren.

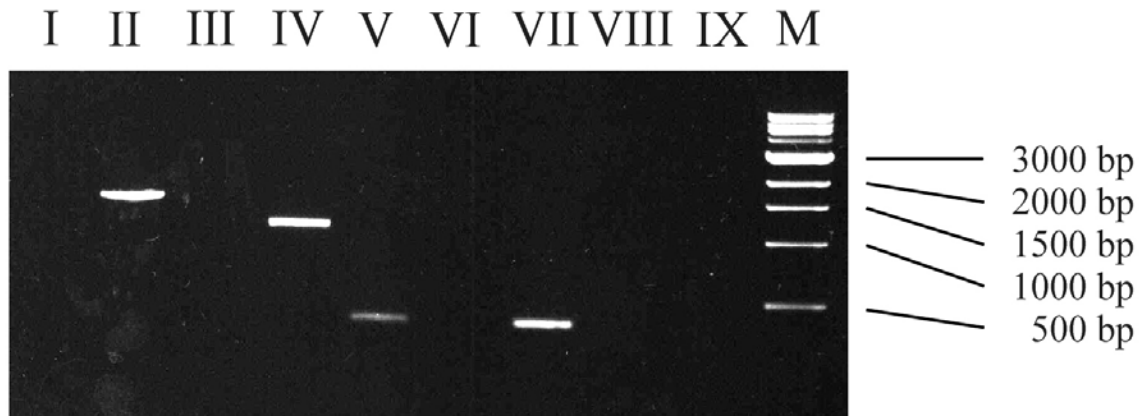


Abb.3: Agarosegel (im UV-Licht) der PCR-Produkte durch die Primerkombinationen (I-IX) bei 50°C Primer-Anlagerungstemperatur; M – 1 kb DNA Leiter (NEB)

1.2 Klonierung der PCR-Produkte

Von den Amplimeren konnten nur die beiden kürzeren (aus Primerkombination V bzw. VII, beide etwa 400 bp) kloniert und anschließend sequenziert werden. Die PCR-Produkte waren beide 374 bp lang und erwiesen sich als identisch. Nach Übersetzung der DNA-Sequenz in Aminosäuren ergab sich folgende Sequenz:

<u>GVDFMLYWFV</u> EPIVTGKYPE RMVKRVGKRL PCFTIEEEEM VRGSYDFLGV	50
NYTTTYAIN LPIPIIAPPN YFSDMGVLST PTRGGVPIGI QCGQGGWIYI	100
YPRGLYLILI EMTNKFKDKN <u>DQGP</u>	124

Abb.4: Abgeleitete Aminosäuresequenz von *cghI 374*

Unterstrichen sind die Peptide von CGH I (SCHÖNIGER et al., 1998), aus denen die Primer abgeleitet wurden

Außer den beiden Peptidfragmenten, aus denen die Primer abgeleitet wurden, konnte kein weiteres Peptid der CGH I (SCHÖNIGER et al. 1998) in der Sequenz gefunden werden. Die Sequenz wurde als *cghI 374* bezeichnet.

1.3 Homologien zu *cghI 374*

Zum PCR-Fragment *cghI 374* wurden in der SpTrEMBL-Datenbank folgende homologe Proteinsequenzen gefunden:

Sequenz- eintrag	Funktion	Organismus	Identität in %
Q00326	Myrosinase Präkursor	<i>Brassica napus</i>	44,1
P49235	β -Glucosidase, Chloroplastidärer Präkursor	<i>Zea mays</i>	43,5
P29738	Myrosinase MB2	<i>Sinapis alba</i>	43,5
P29092	Myrosinase MB3 Präkursor	<i>Sinapis alba</i>	42,7
P29737	Myrosinase MB1	<i>Sinapis alba</i>	42,6
P26205	Cyanogene β -Glucosidase Präkursor	<i>Trifolium repens</i>	40

Tab.6: Homologe Proteinsequenzen zu *cgh 374*, Sequenzeinträge aus SpTrEMBL

Aufgrund der Homologien zu anderen pflanzlichen β -Glucosidasen wurde mit dem PCR-Fragment eine cDNA-Bank aus Blättern von *D. lanata* auf einen vollständigen Klon durchsucht.

1.4 Screening der cDNA-Bank

Nach dem Primärscreening konnten etwa 30 Signale detektiert werden. Davon wurden 5 Phagenkolonien zufällig ausgewählt und für ein Sekundärscreening verwendet. Die dabei positiv reagierenden Phagenklone wurden danach der Methode nach SANG und THOMPSON (1994) unterzogen (D 1.3), um die längsten Inserte zu bestimmen. Von den 5 Phagenklonen konnte bei 3 Klonen ein positives Signal gefunden werden, wobei die Länge der Inserte etwa 2000 bp, 1900 bp und 1300 bp betrug. Alle 3 Phagenklone wurden in einem Tertiärscreening als Einzelklone bestätigt.

Die Sequenzen der 3 Klone erwiesen sich als identisch. Die beiden langen Inserte sind vollständige Klone, während das kürzere Insert ein Fragment davon ist. Die kodierende Sequenz wurde als *cghI* bezeichnet.

1.5 Die Sequenz *cghI*

Das längste Insert bestand aus 2198 bp. Davon entfielen auf die vollständige, kodierende Sequenz *cghI* 1954 bp. Der untranslatierte Bereich der cDNA enthält 244 bp, wovon 24 bp oberhalb des Translationsstartpunktes und 220 bp unterhalb des Stoppcodons liegen.

taaatcgtattataagtatctcaaatgactaacgaatccaatcataccgaccataacgtc	60
- I V L - V S Q M T N E S N H T D H N V	12
acacgtgccagttttaacttcagtaatggtgagaagtttgcctttggaagtgctacttca	120
T R A S F N F S N G E K F V F G S A T S	32
gcttatcagattgaaggttgctatggaatttggaaaaggccttagcgtatgggatact	180
A Y Q I E G C A M E F G K G L S V W D T	52
tggactctcgataaacctggacacattattgatggcaccaacggaaatgtcgctgcaaac	240
W T L D K P G H I I D G T N G N V A A N	72
cagtaccactgttcaaggaagatatgaagataatgaaaagagcaggttagaggcatac	300
Q Y H L F K E D M K I M K R A G L E A Y	92
agattttcaatatcatggcctcgtatattgccaggtggaaaattgagcacgggcgtgaac	360
R F S I S W P R I L P G G K L S T G V N	112
aaagaagggatcaagtattacaatgatccttatcgacgcaatcatagccgaaggatgcaa	420
K E G I K Y Y N D L I D A I I A E G M Q	132
ccgtacgttactctgttccactgggatcttctcttggctttagaattggaatatggtggc	480
P Y V T L F H W D L P L A L E L E Y G G	152
ttcctagacaaaagacaaaagaattgtggaacatcttctgctgattacgcggaactgtgttt	540
F L D K D K R I V E H F R D Y A E L C F	172
tgggaatttggagatagagtaaagcattggataacaataaatgaggcatggagctacacg	600
W E F G D R V K H W I T I N E A W S Y T	192
gtagaaggatattgtcaatggaacgtgtccacctggtcgggtgcatctgcaccgagcgac	660
V E G Y V N G T C P P G R G A S A P S D	212
gacatggcattacagactgcggaatattaagaaaccgaactctctctacaataacttgat	720
D M A L Q T A E I L R N R T L S T I L D	232
gcaatcgggtcacaagcaattgcagaactaaaagacatagagaaactcatttactctg	780
A I G S Q A I A E L K D I E K L I Y T L	252
attccaacaatattaagatttgatttcaaagttccacatagaagagtttgtgaagaac	840
I P N N I K D L I S K F H I E E F V K N	272
ataattcctgaagtttctaagcaaaaatgtccccagctggtcgactttattgtggacata	900
I I P E V L K Q K C P Q L V D F I V D I	292
ttgcaatcttttcatgtcgattataagagaactggaatggcagcagcatgctctaattgga	960
L Q S F H V D Y K R T G M A R A C S N G	312
gatccaggcacagaaccatacattgtggcacacaatatcatcttggctcatgctgctgca	1020
D P G T E P Y I V A H N I I L A H A A A	332
gtcaggttgtataaaaactaagttttagggcatatcaaggaggaaagattggtatgacgaat	1080
V R L Y K T K F Q A Y Q G G K I G M T N	352
aatgtgacttactatgtgccatacgatgaaaaataccatgaggatgtggaagcttctaaa	1140
N V T Y Y L P Y D E K Y H E D V E A S K	372

agaggtggttgattttatgctatatattggttcttagaaccaattgtgactggtaagtacct	1200
R G V D F M L Y W F L E P I V T G K Y P	392
gagaggatggtgaaacgagtcgggaaaagacttccttgtttcactggtgaagaggaagaa	1260
E R M V K R V G K R L P C F T V E E E E	412
atggtaaagaggttcctacgacttcttgggagtaaattactacacaacttattatgcaata	1320
M V R G S Y D F L G V N Y Y T T Y Y A I	432
aatctgccatacctccaattgcaccaccaaattacttcagtgatatggggggttttatca	1380
N L P I P P I A P P N Y F S D M G V L S	452
actcctacacgaggaggagtgccgataggcattcaatgcggtcaaggaggctggatatac	1440
T P T R G G V P I G I Q C G Q G G W I Y	472
atctatccacggggattgtacttgatcttgattgaaatgacgaacaaatttaaggacaaa	1500
I Y P R G L Y L I L I E M T N K F K D K	492
aatgatcagggctcctcttattttatattacagaaaatggggcaagcgaaaatgccaatagc	1560
N D Q G P L I Y I T E N G A S E N A N T	512
acgtttactgtttggaagcacggtatgatccaataagagttctgtaccacaatgaccat	1620
T F T V C E A R Y D P I R V L Y H N D H	532
ctctggtacttgaagaaagcaaatggaagatggtgtcaacttaaaaggttatttcatatgg	1680
L W Y L K K A M E D G V N L K G Y F I W	552
tcgttcgccgataaattttgaaatggaatgctggatacactagtcgatttggtatcttttat	1740
S F A D N F E W N A G Y T S R F G I F Y	572
ggtgattttgtgaatggccaatacacaaagatatcccaaaagctcagcattatggtggacg	1800
V D F V N G Q Y T R Y P K S S A L W W T	592
aatttcttgcacatgatgtacaagaacttaaagtccccgatacctcaaattgttacgaacaaa	1860
N F L H D V Q E L K V P D T S N V T N K	612
agatcgcgtaaacactgaagaggagaatgctacagctaaaaagcccaagaacaccagtggtg	1920
R S R N T E E E N A T A K K P K N T S V	632
aactcgctcggatttctggataatccttgact <u>aa</u> gtgtgttttctggagaacgctctgagt	1980
N S L G F L D N L D -	642
atgcttggtgcttccttttcttttggtggttagggagtacaaaagcgtgcttataccttttcata	2040
tgttttaagcgttatcttccgtttaaagcgtgcattcaactttaaatataataatcgga	2100
atgacgcgatgaaataaaatggttatgtaataaaactgcgacatcctgctcttttagctcata	2160
tgatccatgtttcttgcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	2198

Abb.5: Die vollständige Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz von *cghI*

Unterstrichen sind der Translationsstartpunkt und das Stoppcodon; das erste translatierte Methionin ist fett hervorgehoben; das Polyadenylierungssignal und der poly(A)-Schwanz sind kursiv markiert

Die Sequenz wurde in die EMBL-Datenbank (DLA 133406) und die SpTrEMBL-Datenbank (Q9ZPB6) eingetragen.

1.6 Sequenzunterschiede zwischen CGH I und *cghI*

Von den 5 Peptiden der gereinigten CGH I (SCHÖNIGER et al., 1998) konnten alle in *cghI* wiedergefunden werden, wobei sich aber folgende Sequenzunterschiede offenbarten:

		<u>Anzahl abweichender Aminosäuren</u>
CGH I:	HNHTDHNVT R ASFN	
	A	
<i>cghI</i> :	5 S NHTDHNVT R ASFN 18	1
CGH I:	RVTLEAY R AH	
<i>cghI</i> :	86 R AGLEAY R F S 95	4
CGH I:	PA?EPYTVAY	
<i>cghI</i> :	314 P GTEPY I VA H 323	3
CGH I:	RGVDFMLY	
<i>cghI</i> :	373 RGVDFMLY 380	0
CGH I:	NDQG P LIYITENG	
<i>cghI</i> :	493 NDQG P LIYITENG 505	0
		8

Abb.6: Aminosäureabweichungen zwischen CGH I und *cghI*

Fett gedruckt sind die abweichenden Aminosäuren in *cghI*; die Zahlen bezeichnen die jeweiligen ersten bzw. letzten Aminosäuren der Fragmente in *cghI*

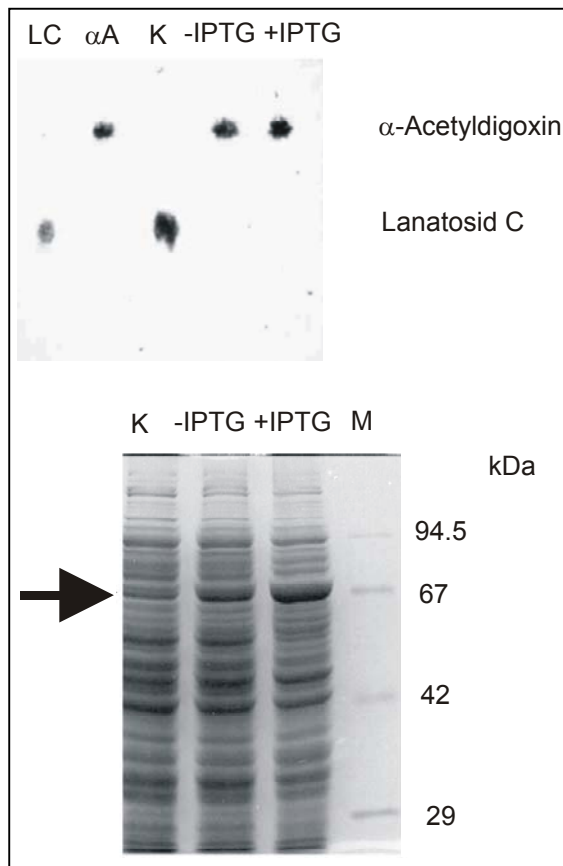
Von den 54 zur Verfügung stehenden Aminosäuren von CGH I waren in *cghI* 46 Aminosäuren identisch. Das entspricht einer Abweichung von etwa 14 %.

2 Heterologe Expression von *cghI* in *E. coli*

Zur Expression von *cghI* in *E. coli* kamen 2 Expressionssysteme, die das jeweilige Protein als Fusionsprotein mit einem Anhang translatieren, zum Einsatz. Dabei wurde einerseits ein Protein mit einem 6xHis-tag, andererseits ein Glutathion S-Transferase-Fusionsprotein generiert.

2.1 Expression von *cghI* als His-tag-Fusionsprotein

cghI wurde in den Vektor pQE30, der die cDNA mit einem 6xHis-tag am N-Terminus exprimiert, kloniert, und das Expressionsplasmid danach zur Transformation von SG13009[pREP4]-Zellen verwendet.

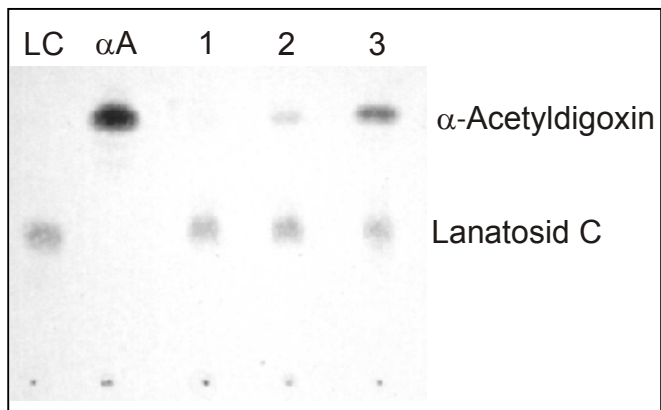


Nach einer Induktion mit 1 mM IPTG bei 37°C über 5 h konnte bei 5 von 10 Klonen in deren Zellysate eine induzierte Bande im SDS-PAGE bei etwa 70 kDa beobachtet werden. Im CGH I-Aktivitätsassay (B 2.2.3) wurde im Zellysate dieser Klone selbst bei einer 16stündigen Inkubation keine Umsetzung von Lanatosid C zu α-Acetyldigoxin festgestellt (nicht gezeigt).

Wurden die Klone nach Zugabe von 0,2 mM IPTG bei 17°C über 16 h inkubiert, konnte bei 4 von 10 Klonen im Zellysate eine induzierte Bande im SDS-PAGE bei etwa 70 kDa gefunden werden. Diese Lysate setzten in 16 h Lanatosid C vollständig zu α-Acetyldigoxin um.

Abb.7: Dünnschichtchromatographie und SDS-PAGE nach Expression von *cghI* in pQE30 in SG13009[pREP4]-Zellen durch Induktion mit 0,2 mM IPTG bei 17°C über 16 h
oben: Dünnschichtchromatographische Trennung des Enzymassay nach Detektion mit Kedde-Reagenz: LC – Lanatosid C; αA – α-Acetyldigoxin
unten: SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung: Pfeil weist auf induzierte Bande bei etwa 70 kDa hin
K: Kontrolle (SG-Zellen mit pQE30 ohne Insert); -IPTG – SG-Zellen mit pQE30 + *cghI* ohne IPTG; +IPTG - SG-Zellen mit pQE30 + *cghI* mit IPTG

Die Klone wurden ein drittes Mal, diesmal nach Zugabe von 0,1mM IPTG bei 4°C über



96 h induziert. Zwar konnte bei keinem Klon im SDS-PAGE eine induzierte Bande beobachtet werden (nicht gezeigt), jedoch setzten die gleiche Proteinmenge im Zellysat derselben Klone in einem 0,5stündigen Enzymassay mehr Lanatosid C um, als die nach der Expression bei 17°C.

Abb.8: Dünnschichtchromatographische Trennung des 0,5stündigen Enzymassays nach unterschiedlichen Expressionsbedingungen:

1 - 37°C, 1 mM IPTG, 5 h; **2** - 17°C, 0,2 mM IPTG, 16 h; **3** - 4°C, 0,1 mM IPTG, 96 h; LC – Lanatosid C, αA – α-Acetyldigoxin

Klone mit CGH I-Aktivität wurden in 1 L-Kulturen nach Zugabe von 0,1 mM IPTG bei 4°C über 96 h geschüttelt. Danach wurden die Zellen mittels French Press lysiert und die Zellrückstände abzentrifugiert. Zwar konnte im Zellrückstand die meiste Aktivität nachgewiesen werden, jedoch war auch im löslichen Überstand CGH I-Aktivität zu finden. Der Überstand wurde auf eine Ni-NTA-Säule gegeben. Es konnte weder durch Aktivitätsbestimmung noch durch SDS-PAGE eine Bindung von rCGH I an die Säule festgestellt werden. Im Immunoblot konnte mit einem Penta-His-Antikörper weder in Überstand noch im Zellrückstand der 6xHis-tag nachgewiesen werden.

Deshalb wurde *cghI* in den Vektor pQE60, der die cDNA mit einem 6xHis-tag am C-Terminus exprimiert, kloniert, und das Expressionsplasmid wurde danach zur Transformation von SG13009[pREP4]-Zellen verwendet. Die Zellen wurden wie oben angegeben kultiviert und die *cghI* exprimiert. Es konnte bei den 3 unterschiedlichen Expressionsbedingungen (s. oben) bei keinem Klon CGH I-Aktivität oder eine induzierte Bande im SDS-PAGE beobachtet werden.

2.2 Expression mit dem GST-System

cghI wurde in den Vektor pGEX-5X-3, der die cDNA mit einer Glutathion S-Transferase aus *Schistosoma japonicum* am N-Terminus exprimiert, kloniert. Das Expressionsplasmid wurde danach zur Transformation von BL21-Zellen verwendet. Die Zellen wurden wie oben angegeben kultiviert und die *cghI* exprimiert.

Es konnte unter keiner der 3 Expressionsbedingungen (C 2.1) weder im Zellrückstand noch im Überstand eine induzierte Bande im SDS-PAGE-Gel nachgewiesen werden. Schwache CGH I-Aktivität wurde nur bei 4°C über 96 h im Zellrückstand und im Überstand gefunden.

3 Bestimmung enzymkinetischer Daten von rCGH I

3.1 pH-Optimum

Die pH-Abhängigkeit der Aktivität von rCGH I wurde gegenüber dem Substrat Lanatosid C im pH-Bereich von pH 3,0 bis 7,5 bestimmt. Die höchste Aktivität wurde dabei bei pH 4,5 gemessen.

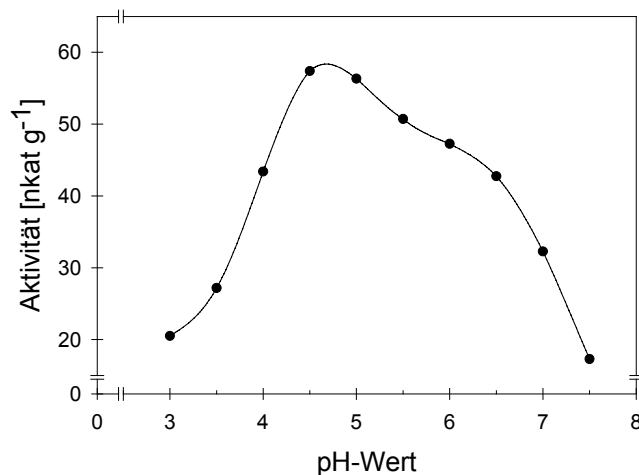


Abb.9: Aktivität von rCGH I in Abhängigkeit vom pH-Wert

Substrat: 0,5 mM Lanatosid C

3.2 Temperaturoptimum und -stabilität

Die Temperaturabhängigkeit der Aktivität von rCGH I wurde gegenüber dem Substrat Lanatosid C im Temperaturbereich von 15°C bis 85°C bestimmt. Die höchste Aktivität war bei einer Temperatur von 70°C zu verzeichnen.

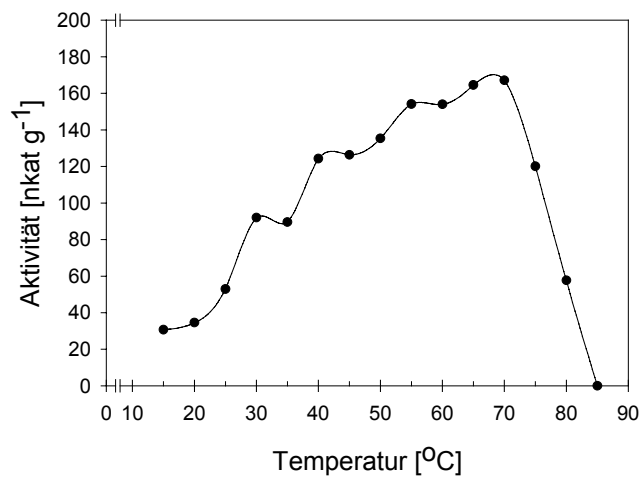


Abb.10: Aktivität von rCGH I in Abhängigkeit von der Temperatur
Substrat: 0,5 mM Lanatosid C

Die Temperaturstabilität von rCGH I wurde über einen Zeitraum von 300 min bestimmt. Während die Umsetzungen bei Temperaturen bis 60°C annähernd linear waren, läßt sich bei 70°C nach etwa 90 min eine Aktivitätsabnahme von rCGH I beobachten.

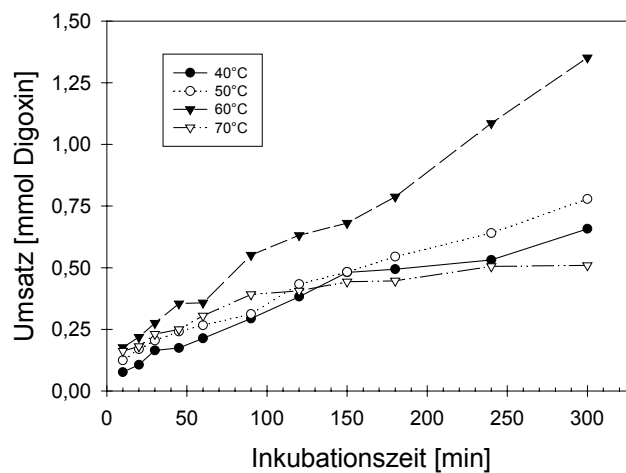


Abb.11: Umsatz zu Digoxin in Abhängigkeit von der Inkubationszeit
Substrat: 15 mM Desacetyllanatosid C

3.3 K_m -Werte

Für die Substrate Lanatosid C (LC), Lanatosid A (LA) und Desacetyl lanatosid C (DLC) wurde deren Affinität zur rCGH I untersucht.

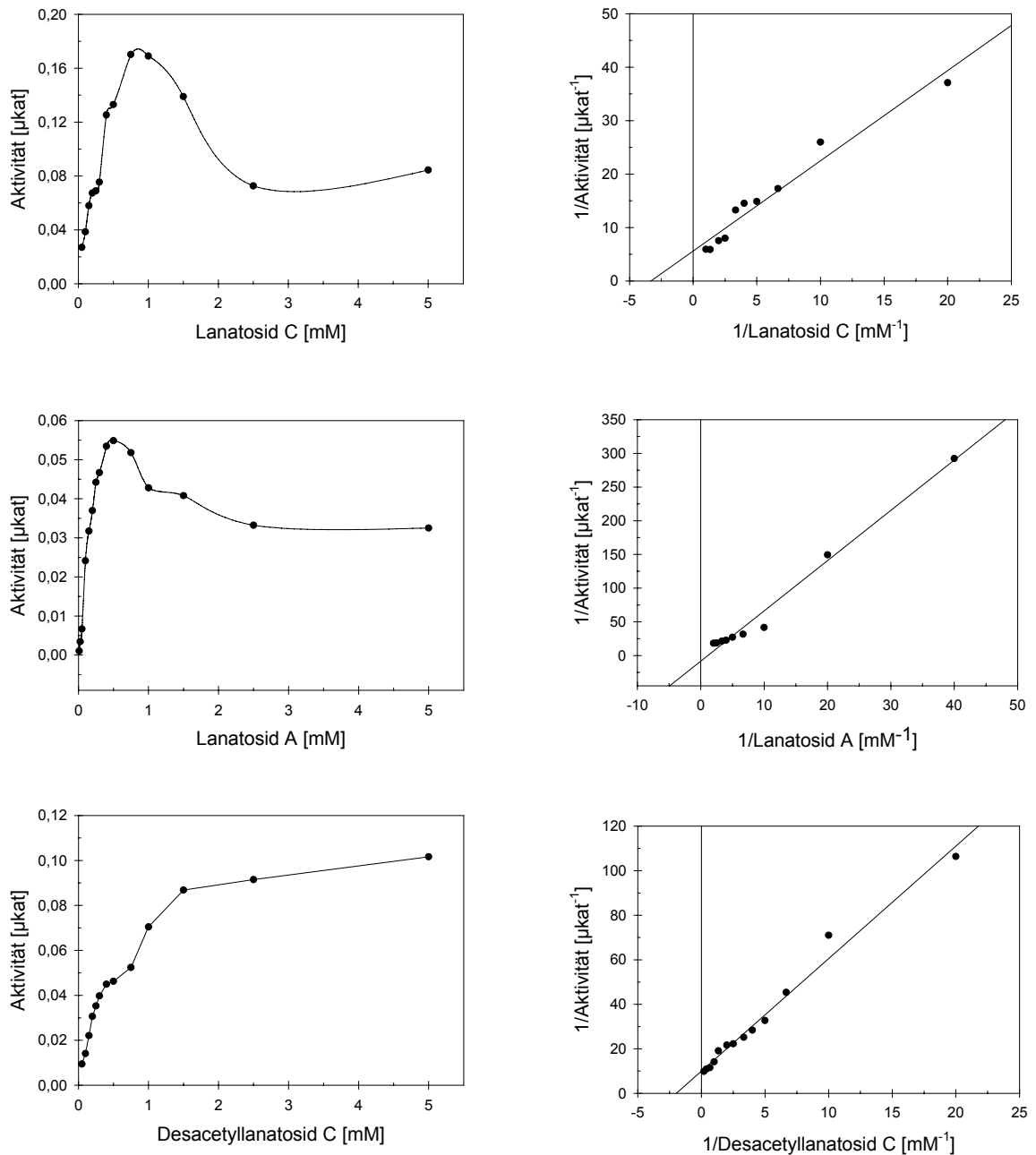


Abb.12: Michaelis-Menten-Plot (links) und Lineweaver-Burk-Plot (rechts) von rCGH I für die Substrate Lanatosid C, Lanatosid A und Desacetyl lanatosid C

Für LC und LA konnte eine Substratüberschußhemmung beobachtet werden, wobei diese bei LC ab einer Konzentration von 1 mM und bei LA ab einer Konzentration von 0,5 mM im Ansatz erkennbar war. Insgesamt fiel die Überschußhemmung bei LC stärker als bei LA aus. Bei dem Substrat DLC war sie nicht zu beobachten.

Zur Bestimmung der kinetischen Daten durch lineare Regression wurden nur die Meßwerte verwendet, die außerhalb der Substratüberschußhemmung lagen. Es wurden folgende K_m -Werte bestimmt: LC (301 μ M), LA (264 μ M) und für DLC (505 μ M).

4 Isoenzyme der CGH I

Der experimentelle Nachweis für Isoenzyme der CGH I sollte mit unterschiedlichen Methoden erfolgen (D 2.3).

4.1 Southern-Blot-Analyse

Genomische DNA von *D. lanata* wurde mit der CTAB-Methode nach ROGERS und BENDICH (1994) isoliert. Dabei konnten aus 8 g Pflanzenmaterial 1,74 mg DNA extrahiert werden. Der Proteinindex P_i (A_{260}/A_{280}) wurde mit 2,0 bestimmt. Im kontinuierlichen UV-Spektrum von 200-400 nm wurde ein symmetrischer Peak bei 260 nm nachgewiesen, die Verunreinigungen bei 230 nm waren gering.

Die genomische DNA konnte mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI, *Bg*III, *Eco*RI, *Kpn*I, *Xho*I verdaut, im Agarosegel aufgetrennt und danach auf einen Filter geblottet werden.

Trotz unterschiedlicher Sonden und Hybridisierungsbedingungen konnten im Southern-Blot keine Signale detektiert werden.

4.2 PCR

Die längeren PCR-Produkte (C 1.1) (aus Primerkombinationen II bzw. IV, etwa 1100 bzw. 1500 bp) wurden kloniert und anschließend sequenziert. Die PCR-Produkte waren 1121 bzw. 1478 bp lang und erwiesen sich als identische Fragmente von *cghI*.

Mit Primern (D 2.3.1) bzw. mit deren sinnvollen Kombinationen, die nur mit der cDNA von CGH I Amplimere ergeben hätten, wurden RT-PCR-Versuche bei 3 unterschiedlichen Anlagerungstemperaturen (45°C, 50°C und 55°C) durchgeführt. Es resultierten daraus eine Vielzahl von Amplimeren unterschiedlicher Größe, deren Spezifität auch bei höherer Anlagerungstemperatur nicht zunahm. Die PCR-Produkte, die den erwartenden Größen am nächsten kamen, wurden kloniert und sequenziert. Keines der PCR-Produkte wies eine Homologie zu β -Glucosidasen auf.

4.3 Sekundärscreening weiterer Primärphagenklone

Alle Phagenklone des Primärscreenings der cDNA-Bank (C 1.4) wurden bis zu Einzelphagenklonen hybridisiert und in Plasmide konvertiert. Die Plasmide wurden mit den Restriktionsendonukleasen *DpnI* und *AluIII* einer Restriktionsanalyse unterzogen. Dabei zeigten alle Plasmide zueinander und zu dem Parallelverdau von *cghI* das gleiche Restriktionsmuster. 2 Klone wurden zufällig ausgewählt und vom 5'-Ende sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen waren zu *cghI* identisch.

5 Northern-Blot-Analyse

Die mRNA-Expression von *cghI* wurde einerseits in den verschiedenen Pflanzenteilen von einer einjährigen bzw. zweijährigen *D. lanata*, andererseits in Verlauf der somatischen Embryogenese von proembryogenen Massen (PEMs) von *D. lanata* (Erhaltungskultur des Stammes VIII) untersucht.

5.1 mRNA-Expression der *cghI* in Pflanzenteilen von *D. lanata*

Die mRNA-Expression der *cghI* wurde in einjährigen Blättern (Rosettenblätter) und Wurzeln, zweijährigen Blättern (Stengelblätter) und Wurzeln sowie in Sproß, Blüten und Früchten untersucht.

Die stärksten Hybridisierungssignale konnten dabei in einjährigen Blättern und Früchten detektiert werden. Schwächere Signale waren in zweijährigen Blättern und

Blüten zu finden, während im Sproß sowie in ein- und zweijähriger Wurzel keine mit *cghI* hybridisierende RNA beobachtet wurde.

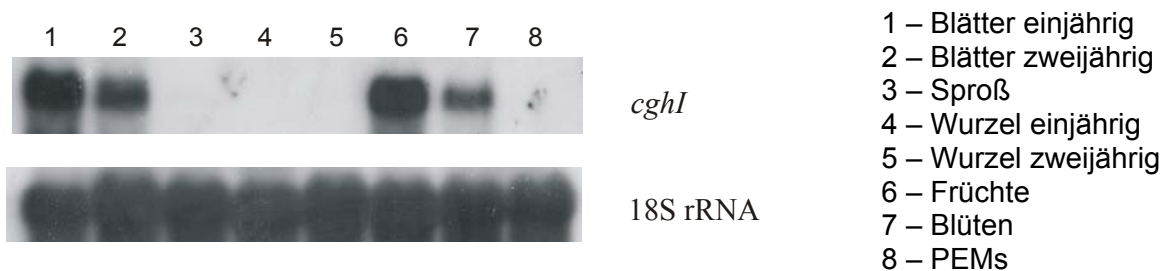


Abb.13: Northern-Blot-Analyse verschiedener Pflanzenteile von *D. lanata* mit *cghI*
oben: Hybridisierung der RNA aus den jeweiligen Pflanzenteilen mit *cghI*
unten: Kontrollhybridisierung mit der Sonde pBD18 (DOBROWOLSKI et al., 1989)

Wenn man die densitometrische Intensität des Signals (Sigmagel) für die einjährigen Blätter gleich 100 % setzt, ergeben sich für die Früchte 97 %, für die zweijährigen Blätter 38 % und für die Blüten 19 % an densitometrischer Intensität.

5.2 mRNA-Expression der *cghI* im Verlauf der somatischen Embryogenese von PEMs von *D. lanata*

Die mRNA-Expression der *cghI* wurde im Verlauf der somatischen Embryogenese von proembryogenen Massen (PEMs) von *D. lanata* (Erhaltungskultur des Stammes VIII) untersucht, d.h. es wurden PEMs, die zuerst 4 Wochen auf Medium M₀ und danach für 12 Wochen auf Medium M₂₅ kultiviert wurden, auf *cghI*-Transkripte untersucht.

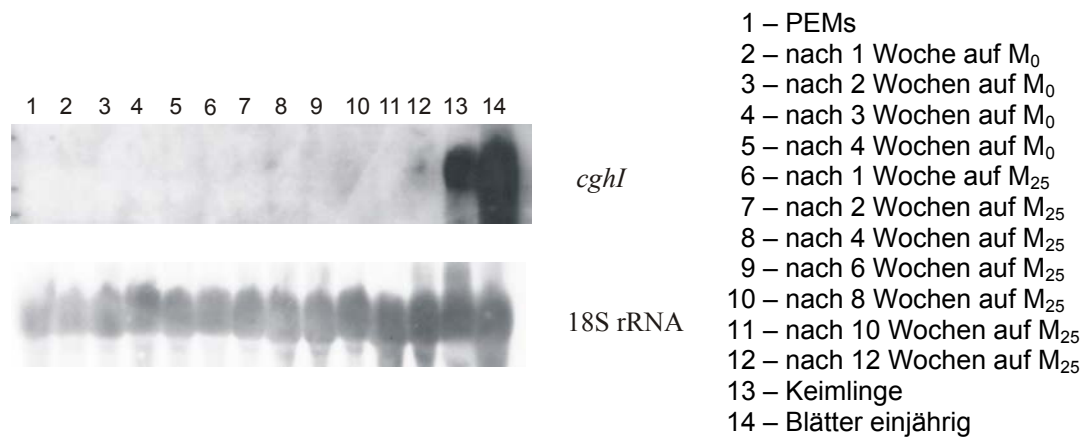


Abb.14: Northern-Blot-Analyse der somatischen Embryogenese von proembryogenen Massen (PEMs) von *D. lanata* mit *cghI*

oben: Hybridisierung der RNA in unterschiedlichen Stadien der somatischen Embryogenese mit *cghI*

unten: Kontrollhybridisierung mit der Sonde pBD18 (DOBROWOLSKI et al., 1989)

In keinem der untersuchten Embryogenesestadien konnte eine mit *cghI* hybridisierende RNA detektiert werden. Die RNA von etwa 6-8 Wochen alten Keimlinge von *D. lanata* zeigten eine ähnlich starke Hybridisierung mit *cghI* wie die einjähriger Blätter.

6 Konstruktion und Expression von *cghI*-Mutanten

6.1 Konstruktion von *cghI* Δ 205-300, *cghI* Δ 491-495 und *cghI* A187P

Die Expressionsplasmide (HF12, HF13, HF14), die Deletionen (Δ 205-300, Δ 491-495) bzw. eine Punktmutation (A187P) des Inserts *cghI* enthielten, wurden mittels PCR aus dem Plasmid HF4 (*cghI* in pQE30) generiert. Die Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft.

6.2 Expression von *cghI* Δ 205-300, *cghI* Δ 491-495 und *cghI* A187P

Die Sequenzen *cghI* Δ 205-300, *cghI* Δ 491-495 und *cghI* A187P wurden wie in C 2.1 beschrieben in *E. coli* exprimiert.

Bei einer 5stündigen Expression bei 37°C nach einer Induktion mit 1 mM IPTG konnten im SDS-PAGE im Lysat der Klonen verstärkte Banden in den zu erwartenden Größen beobachtet werden. Die Lysate von je 10 Klonen pro Ansatz zeigten keine CGH I-Aktivität. Wurden dieselben Klone 96 h, bei 4°C, nach einer Induktion mit 0,1 mM IPTG induziert, konnten im SDS-PAGE keine induzierten Bande im Lysat der Klone nachgewiesen werden. Nur bei 4 der 10 Klone der nicht mutierten Sequenz *CGH I* konnte CGH I-Aktivität bestimmt werden.

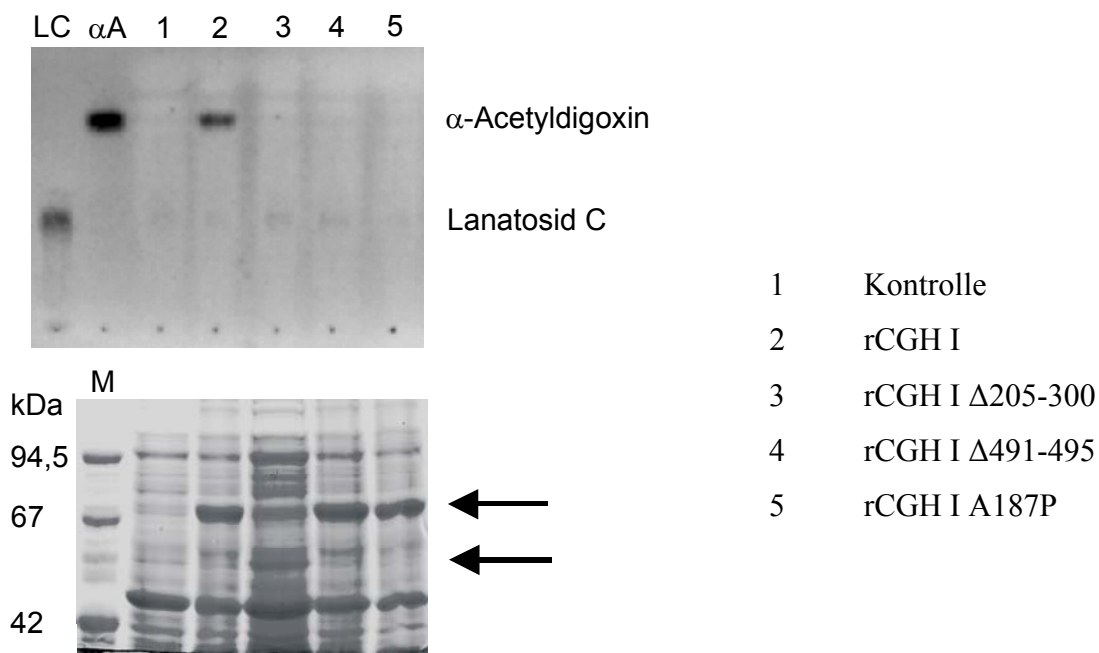


Abb.15: Darstellung der Expression der *cghI*-Mutanten in *E. coli*

oben: Dünnschichtchromatographie nach Expression der *cghI*-Mutanten bei 4°C über 96 h nach einer Induktion mit 0,1 mM IPTG; 0,5stündiger Enzymassay mit Lanatosid C (LC) zu α -Acetyldigoxin (α A)

unten: SDS-PAGE nach Expression der *cghI*-Mutanten bei 37°C über 5 h nach einer Induktion mit 1 mM IPTG; M – Proteinmarker; die Pfeile markieren die exprimierten Proteine: oberer Pfeil – rCGH I, rCGH I Δ 491-495 und rCGH I A187P; unterer Pfeil – rCGH I Δ 205-300; es wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen

D Diskussion

1 Klonierung der Cardenolid-16-O'-Glucohydrolase von *D. lanata*

1.1 Allgemeines zur Klonierungsstrategie

Um cDNAs bzw. Gene zu klonieren, können unterschiedliche Wege beschritten werden.

Zur Klonierung der Cardenolid-16-O'-Glucohydrolase (CGH I) waren bereits durch SCHÖNIGER (1998) einige Vorversuche unternommen worden. Weiterhin stand eine cDNA-Bank aus Blättern von *D. lanata* zur Verfügung (WERLE, 1995), die mit einer geeigneten Sonde durchsucht werden sollte. Als Sonde wären dabei z. B. der Antikörper gegen die CGH I (SCHÖNIGER et al., 1998), die cDNA einer anderen β -Glucosidase oder Oligonukleotide in Frage gekommen.

Es wurde bereits von SCHÖNIGER (1998) versucht, den Antikörper gegen die CGH I in seiner Reaktivität gegen *E. coli*-Proteine zu reduzieren, indem er den Antikörper gegen ein *E. coli*-Lysat sättigte. Dennoch gelang es danach nicht, im Immunoscreening der cDNA-Bank das Signal-Hintergrund-Verhältnis so zu verändern, daß einzelne Phagenklone identifiziert werden konnten.

Zum Screening der cDNA-Bank mit einer heterologen Sonde, d.h. der cDNA einer anderen β -Glucosidase, schien die Homologie der einzelnen β -Glucosidasen auf Nucleinsäureebene zueinander nicht ausreichend. Ebenso wurde ein Screening mit Oligonukleotiden (25-30 bp) aus den Peptidfragmenten (SCHÖNIGER et al., 1998) oder aus homologen Bereichen von β -Glucosidasen nicht in Betracht gezogen.

Deshalb sollte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) ein cDNA-Fragment der CGH I amplifiziert werden, um das Fragment als homologe Sonde zum Screening der cDNA-Bank zu verwenden.

1.2 RT-PCR

Die Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) verwendet als Matrix für die Reaktion cDNA, die vorher enzymatisch aus mRNA synthetisiert wird. Der Vorteil der Methode liegt darin, daß man aus dem Stadium, in dem die größte enzymatische Aktivität gemessen wurde, d.h. in dem auch die stärkste mRNA-Expression zu vermuten ist, RNA

isoliert und dadurch oft viel mehr Matrix als z. B. bei einer PCR mit genomischer DNA im PCR-Ansatz zur Verfügung steht. Das wirkt sich häufig in einer höheren Effektivität der PCR aus.

In *D. lanata* konnte die größte Glucosidase-Aktivität gegenüber Primärglykosiden in Rosettenblättern detektiert werden. Dabei nahm innerhalb der Rosette die Aktivität von den jungen, inneren Blättern zu den älteren, äußeren ab (MAY und KREIS, 1997). Versuche, die Glucosidase-Aktivität in Suspensions-, Sproß- oder Kalluskulturen durch Phytohormonbehandlung zu induzieren, führten entweder zu geringer oder keiner Aktivität (MAY und KREIS, 1990; KREIS, 1991). Deshalb wurde aus den inneren Blättern der Rosette von *D. lanata* Gesamt-RNA isoliert.

Die Primer für die PCR-Versuche wurden aus den Peptidsequenzen von CGH I (SCHÖNIGER et al., 1998) abgeleitet. Entgegen dem Ansatz von SCHÖNIGER (1998) wurde dabei auf Inosin (KNOTH et al., 1988) verzichtet und aus den Peptidsequenzen (HNHTDHNVT/ARASFN, RGVDFMLY, NDQGPLYITENG) vollständig degenerierte Primer mit einer Länge von 17 bp abgeleitet (B 1.8 – Primer 1-5). Die Peptide PA?EPYTVAY und RVTLEAYRAH wurden aufgrund der hohen Degenerierung der korrespondierenden Nukleinsäuren für Primer nicht in Betracht gezogen.

Das Molekulargewicht von CGH I wurde mit 70 kDa bestimmt (SCHÖNIGER et al., 1998). Das entspricht einer kodierenden cDNA von etwa 1850 bp. Zur vermutlichen Lage der Peptide in CGH I konnte folgendes angenommen werden:

1. Das Fragment HNHTDHNVT/ARASFN mußte in unmittelbarer Nähe zum N-Terminus des Proteins liegen, da es sich nach Abspaltung eines etwa 3 kDa kleinen Bruchstücks durch N-terminale Sequenzierung vom 67 kDa großen Restprotein ergab (SCHÖNIGER et al., 1998).
2. Das Fragment NDQGPLYITENG konnte in Übereinstimmung mit anderen β -Glucosidasen bei etwa 1450 bp vermutet werden.
3. Dementsprechend konnte sich das Fragment RGVDFMLY entweder oberhalb oder unterhalb des Fragments NDQGPLYITENG befinden.

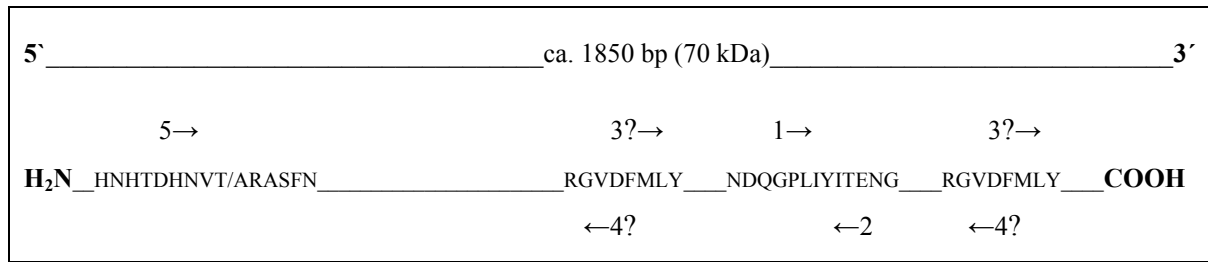


Abb.16: Mögliche Lage der Peptide in CGH I und sich daraus ergebende Primer

Die Pfeile geben die Orientierung der Primer an, d.h. (→) = Primer auf 5'→3'

Strang; (←) = Primer auf 3'→5' Strang

Somit waren die Primerkombinationen 2/5, 4/5, 1/4 und 2/3 sinnvoll.

Nachdem mit keiner Primerkombination PCR-Fragmente amplifiziert werden konnten, wurde versucht, die hohe Degenerierung der Primer herabzusetzen. SOMMER und TAUTZ (1989) zeigten, daß das 3'-Ende eines Primers genau der Zielsequenz entsprechen muß, während am 5'-Ende eine Festlegung der Nukleotide in Übereinstimmung mit dem Codon usage des jeweiligen Organismus eine Amplifikation meistens noch ermöglicht. Für einen Codon usage von *D. lanata* standen zum Zeitpunkt der Experimente folgende Sequenzen zur Verfügung:

DLAJ2525 (Phytochrom A – Teilsequenz, THÖRINGER, unveröffentlicht), DLAJ2526 (Chalkonsynthetase – Teilsequenz, THÖRINGER, unveröffentlicht), DLJ002221 (Phenylammoniumlyase, THÖRINGER, unveröffentlicht), DLCYCLO (Cyclophilin, SCHOLZE et al., 1999) DLCYP18 (CYP 18 Gen, SCHOLZE et al., 1999) und DLALD (RICHTER, 1997). Daraus ergab sich für 3 für die Primerauswahl relevanten Aminosäuren folgender Codon usage:

Aminosäure	Codons	Codon usage
T	ACA	23
	ACC	34
	ACG	19
	ACT	30
G	GGA	47
	GGC	49
	GGG	39
	GGT	37
V	GTA	11
	GTC	25
	GTG	47
	GTT	64

Tab.7: Codon usage einzelner Aminosäuren von *D. lanata*

Die Primer wurden daraufhin wie folgt verändert:

Primer	Peptidsequenz → Primersequenz	Degenerierung
3	R G V D F M L Y 5' -GGN-GTN-GAY-TTY-ATG-YT-3'	128
3.1	5' -GG C -GT K -GAY-TTY-ATG- TT -3'	8
3.2	5' -GG C -GT K -GAY-TTY-ATG- CT -3'	8
5	H N H T D H N VT/ARASFN 5' -CAY-AAY-CAY-ACN-GAY-CA-3'	64
5.1	5' -CAY-AAY-CAY-AC Y -GAY-CAY-AA-3'	64
1	N D Q G P L IYITENG 5' -AAY-GAY-CAR-GGN-CCN-YT-3'	256
1rev	3' -TTR-CTR-GTY-CCN-GGN-RA-5'	256

Tab.8: Veränderte Primer nach Einbeziehung des Codon usage von *D. lanata*

Fett gedruckt sind die innerhalb der Primer veränderten Basen

N = A+C+G+T; Y = C+T; R = A+G; K = G+T

Aus Primer 3 wurden die Primer 3.1 und 3.2 generiert. Da sich in zweiter Position zum 3'-Ende entweder ein Cytosin oder ein Thymin befinden mußte, sollte einer dieser Primer genau binden. In Anlehnung an SOMMER und TAUTZ (1989) wurden am 5'-Ende des Primers bei den Aminosäuren Valin und Glycin entsprechend dem Codon usage die Nukleotide Guanin und Thymin bzw. Cytosin gewählt. So konnte die Degenerierung der Primer 3.1 und 3.2 auf 8 gesenkt werden.

Für den Primer 5 bot sich die Verlängerung auf 20 bp an, wobei für die Aminosäure Threonin im Rahmen des Codon usage jetzt Thymin und Cytosin die Degenerierung

übernahmen. Der Primer (5.1) war damit zwar nicht geringer degeneriert als Primer 5, aber er bestand nun aus 20 bp.

Die hohe Degenerierung des Primers 1 lag vor allem am 3'-Ende der Primers. Durch einfache Umkehrung des Primers konnte zwar nicht die Degenerierung des Primers verändert werden; sie konnte jedoch an das für die Primerbindung weniger wichtige 5'-Ende gelegt werden.

Die Kombination der Primer führte zu 4 PCR-Produkten (C 1.1), von denen nur die beiden kürzeren (beide etwa 400 bp) kloniert werden konnten (C 1.2). Da es sich bei dem verwendeten Cloning Kit (pCR-Script™ Amp SK(+) Cloning Kit) um eine Klonierung mit glatten Enden handelt, müssen große Insert-Vektor-Verhältnisse für eine erfolgreiche Ligation vorliegen. Je länger das Insert ist, desto mehr Insert wird benötigt. Vermutlich konnten deshalb die längeren PCR-Fragmente (etwa 1100 bzw. 1500 bp) anfänglich nicht kloniert werden.

Die beiden PCR-Fragmente erwiesen sich als identisch, was aufgrund der abgeleiteten Primer (aus Primer 3 → Primer 3.1 und 3.2) nicht überraschend war. Die Sequenz wurde als *cghI 374* bezeichnet. Daß innerhalb von *cghI 374* keine weiteren Peptide der CGH I zu finden waren, erstaunte nicht, da das Fragment nur etwa 20 % der vollständigen Sequenz *cghI* darstellen konnte. Durch die ausgewiesenen Homologien von *cghI 374* zu anderen β -Glucosidasen (C 1.3) konnte das PCR-Fragment zum Screening der cDNA-Bank verwendet werden.

1.3 Screening einer cDNA-Bank aus Blättern von *D. lanata*

Im Primärscreening der Blatt-cDNA-Bank konnten etwa 30 Signale detektiert werden, was auf eine starke mRNA-Expression der *cghI* in Blättern hinwies. Diese starke Expression konnte später in der Northern-Blot-Analyse (C 5.1) bestätigt werden.

In cDNA-Banken, die auf *E. coli* amplifiziert wurden, sind längere cDNAs oft unvollständig enthalten. Um den Klon mit dem längsten Insert zu isolieren, wurden nach dem Sekundärscreening 5 Phagenklonkolonien mit dem Verfahren nach SANG und THOMPSON (1994) untersucht. Dabei werden die Inserte der Phagenklone durch PCR mit vektorspezifischen Primern vervielfältigt und nach Auftrennung der Fragmente im Agarosegel in einer Southern-Blot-Analyse mit der jeweiligen Sonde (*cghI 374*)

hybridisiert. Dadurch kann man die Länge der Inserte bestimmen und am Ende des Screenings die längsten cDNAs isolieren.

Von 3 Phagenklonen konnte auf diese Weise die Länge der Inserte bestimmt werden, deren Sequenz sich am Schluß als identisch erwies (C 1.4).

1.4 Die Sequenz *cghI*

Der offene Leserahmen der cDNA konnte aufgrund seiner Länge bzw. der zuzuordnenden Peptide aus CGH I eindeutig festgelegt werden (C 1.5). Da das Peptid HNHTDHNVT/ARASFN (SCHÖNIGER et al., 1998) in unmittelbarer Nähe zum 5'-Ende der cDNA liegt, und kurz oberhalb der Leserahmen erst beginnt, konnte das erste Methionin (C 1.5) eindeutig als Startpunkt der Translation identifiziert werden. Somit umfaßt der offene Leserahmen 1954 bp und codiert für ein Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 73,2 kDa. Im untranslatierten mRNA-Bereich konnten am 3'-Ende die Poly-A-Sequenz und kurz davor das wahrscheinliche Polyadenylierungssignal *AATAAA* ausgemacht werden, während am 5'-Ende keine Consensussequenz erkannt wurde. Die für eukaryotische mRNAs häufige TATA-Box liegt ca. 25-30 bp oberhalb der Initiationsstelle für die Transkription. Dieser Bereich ist in der cDNA nicht mehr verfügbar, so daß diesbezüglich keine Aussagen getroffen werden konnten. Die kodierende Sequenz wurde als *cghI* bezeichnet.

Die Peptide von CGH I (SCHÖNIGER et al., 1998) konnten alle in der kodierenden Sequenz wiedergefunden werden. Jedoch waren von den 56 Aminosäuren der Peptide der CGH I nur 46 in *cghI* übereinstimmend (C 1.6), d.h. es lag zwischen CGH I und der cDNA *cghI* eine ungefähre Abweichung von 14 % vor. Geht man davon aus, daß die Peptide RGVDFMLY (1), RVTLEAYRAH (2), PA?EPYTVAY (3) und NDQGPLYITENG (4) sich durch N-terminale Sequenzierung nach einem LysC-Verdau ergaben, d.h. vor ihnen normalerweise die Aminosäure Lysin zu finden sein müßte, würde die Abweichung noch größer ausfallen, da vor den Peptiden (2) und (3) in *cghI* kein Lysin zu finden ist. Die Sequenzabweichung läßt die Existenz von CGH I-Isoformen vermuten. Die Thematik von Isoenzymen wird in D 2 diskutiert.

Während der Reinigung der CGH I konnten nach dem 2. und 3. Reinigungsschritt (SP-Sepharose bzw. Q-Sepharose) neben einer Bande bei 70 kDa jeweils eine Doppelbande bei 34 und 36 kDa beobachtet werden. Immunologisch konnte nachgewiesen werden, daß es

sich bei der Doppelbande um die Spaltprodukte des 70 kDa-Proteins handelt (SCHÖNIGER et al., 1998). Diese Doppelbande wurde nach einem LysC-Verdau N-terminal sequenziert, wobei folgende Peptide resultierten (GRIMM, unveröffentlichte Ergebnisse):

DLISK, P/A G/Q H/Y I/R I/D D/I A/L, Q/P A/N Y/N Q/I G/K

Eine Zuordnung dieser Peptide zu Sequenzabschnitten in *cghI* ergibt folgendes Bild:

CGH I:	DLISK
<i>cghI</i> :	259 DLISK 263
CGH I:	P/A G/Q H/Y I/R I/D D/I A/L
<i>cghI</i> :	58 P G H I I D G 64
CGH I:	Q/P A/N Y/N Q/I G/K
<i>cghI</i> :	341 Q A Y Q G 345
	254 P N N I K 258

Abb.17: Zuordnung der *cghI* zu den Peptiden der 34/36 kDa Doppelbande

Fett gedruckt ist die abweichende Aminosäure in *cghI*; die Zahlen bezeichnen die jeweiligen ersten bzw. letzten Aminosäuren der Fragmente in *cghI*

Bis auf die Sequenz AQYRDIA/L ließen sich die Peptide eindeutig in Abschnitten der *cghI* wiederfinden. Da Sequenzierfehler unwahrscheinlich sind (GRIMM, persönliche Mitteilung), kann eine Überlagerung durch ein weiteres Protein vermutet werden. Dennoch kann durch die in der Doppelbande gefundenen Peptide die Aussage bestätigt werden, daß es sich bei der Doppelbande bei 34 und 36 kDa um Spaltprodukte der CGH I handelt. Für die von MAY und KREIS (1997) für die CGH I postulierten Untereinheiten (26; 37 und 77,5 kDa) liegt damit die Vermutung nahe, daß es sich bei der von ihnen beschriebenen 37 kDa-Bande um die etwa gleich großen Spaltprodukte der CGH I handelt. Die von MAY und KREIS (1997) gefundene 26 kDa-Bande konnte bei SCHÖNIGER (1998) nicht beobachtet werden. SCHÖNIGER et al. (1998) beschrieben die CGH I als ein Protein mit monomerer Quartärstruktur, das aus einer 70 kDa-Einheit besteht. Dieses Monomer konnte mit dem theoretischen Molekulargewicht von 73,2 kDa des durch *cghI* kodierten Proteins bestätigt werden.

Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den meisten β -Glucosidasen. Sie bestehen häufig aus Monomeren von 55-65 kDa (ESEN, 1993), die nativ als Mono-, Di- oder Oligomere vorkommen können (SELMAR et al., 1987; FALK und RASK, 1995; GUSMAYER et al., 1994).

1.5 Zuordnung der *cghI* zur Familie 1 der Glykosyl-Hydrolasen

Die beiden Consensussequenzen für Mitglieder der Familie 1 der Glykosyl-Hydrolasen (HENRISSAT, 1991; HENRISSAT und BAIROCH, 1993, 1996) sind in *cghI* vorhanden:

1. Die Consensussequenz für das putative aktive Zentrum in Vertretern der Familie 1 der Glykosyl-Hydrolasen (PROSITE PS00572) wird in *cghI* durch die Aminosäuren I 499-S 507 repräsentiert.

PS00572	[LIVMFSTC]-[LIVFYYS]-[LIV]-[LIVMST]- E-N-G -[LIVMFAR]-[CSAGN]
<i>cghI</i>	--I-----Y-----I-----T-- E-N-G -----A-----S-----

Abb.18: Vergleich der Aminosäuren I 499-S 507 in *cghI* mit der Consensussequenz 1 der Familie 1 der Glykosyl-Hydrolasen; Fett gedruckt ist die konservierte Glutaminsäure

Untersuchungen an einer β -Glucosidase von *Agrobacterium faecalis* von WITHERS et al. (1990) und TRIMBUR et al. (1992) bewiesen die Beteiligung der Glutaminsäure (E 358) als Nukleophil an der Enzymkatalyse. An der Kristallstruktur der einzigen bisher kristallisierten pflanzlichen β -Glucosidase, einer cyanogenen β -Glucosidase aus *Trifolium repens*, konnte die Beteiligung der entsprechenden Glutaminsäure (E 397) an der Enzymkatalyse bestätigt werden (BARRETT et al., 1995). Diese Glutaminsäure ist in allen Mitgliedern der Familie 1 der Glykosyl-Hydrolasen in der Consensus-Sequenz 1 enthalten (HENRISSAT, 1991). Daraufhin läßt sich in *cghI* die Glutaminsäure E 503 als Nukleophil und die sie umgebenden Aminosäuren als aktives Zentrum vermuten.

2. Die zweite Consensussequenz für Vertreter der Familie 1 der Glykosyl-Hydrolasen beschreibt ein konserviertes Motiv in der Nähe des N-Terminus (PROSITE PS00653).

In *cghI* wird diese Consensussequenz in den Aminosäuren F 25-C 39 wiedergefunden. Auffällig ist jedoch, daß die letzte Aminosäure (C 39) der Consensussequenz nicht mehr entspricht.

PS00653 F-x-[FYWM]-[GSTA]-x-[GSTA]-x-[GSTA](2)-[FYNH]-[NQ]-x-E-x-[GSTA]
<i>cghI</i> F-V-F-----G-----S-----A--T---S---A-----Y-----Q—I-E-G---C----

Abb.19: Vergleich der Aminosäuren F 25-C 39 in *cghI* mit der Consensussequenz 2 der Familie 1 der Glykosyl-Hydrolasen; Fett gedruckt ist die abweichende Aminosäure in *cghI*

Die Funktion der Consensus-Sequenz 2 der Familie 1 der Glykosyl-Hydrolasen ist bisher unbekannt.

Mit dem Auffinden der Consensussequenzen der Familie 1 der Glykosyl-Hydrolasen in der cDNA konnte die Zuordnung der CGH I zu dieser Familie (SCHÖNIGER et al., 1998) bestätigt werden.

1.6 Subzelluläre Lokalisation der CGH I

Eine sogenannte Signalsequenz zur Adressierung des Proteins in der Zelle konnte mit den Programmen des Internets für die *cghI* nicht erkannt werden. Eine sich meist am N-Terminus befindende Signalsequenz ist unwahrscheinlich, da das im nativen Protein gefundene Peptid HNHTDHNVT/ARASFN nur 5 Aminosäuren vom putativen Translationsstartpunkt in *cghI* entfernt ist. Signalsequenzen bestehen meist aus 15 bis 26 Aminosäuren mit einer Abfolge hydrophober Aminosäuren (10-15), die mit dem jeweiligen Protein translatiert werden und die die Adressierung des Proteins in der Zelle übernehmen. Nach der Translation an den Ribosomen wird das Protein noch im rauhen endoplasmatischen Retikulum prozessiert, d.h. die Signalsequenz wird durch die Einwirkung einer spezifischen Signalpeptidase abgespalten und ist dann im reifen Protein nicht mehr zu finden (LÖFFLER und PETRIDES, 1997).

Für die Lanatosid-15'-O-Acetylerase (LAE) von *D. lanata*, einem weiteren die Zuckerkette von Cardenoliden modifizierendem Enzym, wurde der Nachweis erbracht, daß

es sich um ein zellwandgebundenes Enzym handelt (HÖLZ, 1992). In der zugehörigen cDNA konnte anschließend eine Signalsequenz für die Adressierung des Proteins in die Zellwand identifiziert werden (KANDZIA, 1999).

Die CGH I ist zuerst als ein an der Chloroplastenmembran gebundenes Protein beschrieben worden (BÜHL, 1984). Eine Signalsequenz für einen Transport in den Chloroplasten konnte in *cghI* nicht erkannt werden (EMANUELSSON et al., 1999) und scheint wegen des oben aufgeführten Grundes auch unwahrscheinlich, obwohl die Unzulänglichkeit der momentanen Methoden zur Vorhersage plastidärer Proteine im Rahmen des *Arabidopsis thaliana* Genome Projekts gezeigt werden konnte (THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE, 2000). Wäre die CGH I innerhalb des Chloroplasten lokalisiert, würde die industrielle Methode der Fermentierung der Primär- zu den Sekundärglykosiden in dieser Form nicht möglich sein, da zur Zerstörung des Chloroplasten zur Freisetzung des Enzyms viel größere Kräfte notwendig wären (KLÖSGEN, persönliche Mitteilung).

Bei weiteren Untersuchungen wurde die CGH I nach einer Zellfraktionierung auch an anderen Membranen detektiert (MAY-HERTL, 1991). Die Notwendigkeit der Verwendung des nichtionischen Detergenz Triton X-100 zur Solubilisierung des Proteins scheint dies zu bestätigen und wies auf ein integrales Membranprotein hin (SCHÖNIGER, 1998). Integrale Membranproteine weisen in ihrer Sequenz hydrophobe Domänen von etwa 9-12 Aminosäuren auf, die das Protein in der Membran verankern. In einem Hydrophobizitätsblot nach KYTE und DOOLITTLE (1982) konnte in *cghI* in keinem Bereich eine durchgängige Hydrophobizität erkannt werden. Transmembrane Domänen konnten für die *cghI* nicht identifiziert werden (VON HEIJNE, 1992). Das läßt, soweit die CGH I ein membrangebundenes Protein darstellt, eher auf ein assoziiertes als auf ein integrales Membranprotein schließen. Vermutungen, die *cghI* könnte für die lösliche Form der membrangebundenen CGH I kodieren, sind widerlegbar, da die Expression der mRNA *cghI* in Pflanzenteilen von *D. lanata* nachgewiesen werden konnte (C 4.1) bzw. das rekombinante Protein die gleichen enzymkinetischen Parameter wie die native CGH I hatte (C 3). Eine lösliche CGH I hätte sich demnach mit Puffer ohne Detergenz aus Blättern von *D. lanata* solubilisieren lassen müssen.

Die Lokalisation von β -Glucosidasen in Plastiden scheint für monokotyle Pflanzen typisch zu sein (ESEN, 1993). Sie konnte z. B. für die Avenacosidase aus *Avena sativa* (GUS-MAYER et al., 1994) oder die Dhurrinase aus *Sorghum bicolor* (THAYER und CONN, 1981; CISEK und ESEN, 1998) experimentell ermittelt und durch Signalsequenzen in den

jeweiligen cDNAs bestätigt werden. Eine Furostanolglykosid-26-O- β -Glucosidase aus *C. speciosus* weist in ihrer cDNA eine aus 51 Aminosäuren bestehende N-terminale Signalsequenz für Mitochondrien auf (INOUE et al., 1996). Im Gegensatz dazu ist bisher keine plastidäre β -Glucosidase in dikotylen Pflanzen nachgewiesen bzw. eine Signalsequenz in den zugehörigen cDNAs gefunden worden. Die cyanogene β -Glucosidase Linamarase von *T. repens* ist z. B. in der Zellwand lokalisiert (KAKES, 1985), während Prunasin-Hydrolase und Mandelnitril-Lyase von *Prunus serotina* in den Vakuolen von Phloem-Parenchym-Zellen gefunden wurden (SWAIN und POULTON, 1994). Für die Strictosidin- β -Glucosidase aus *C. roseus* konnte am C-Terminus das Motiv K-K-X-K-X-X ausgemacht werden, das als Retentionssignal für transmembrane Proteine im endoplasmatischen Retikulum angesehen wird (JACKSON et al., 1990). Daraufhin durchgeführte Experimente bestätigten die Bindung des Proteins, dem eine zentrale Rolle in der Indolalkaloid-Biosynthese zugeschrieben wird, an das endoplasmatische Retikulum (GEERLINGS et al., 2000). Das Motiv K-K-X-K-X-X kann auch am C-Terminus von *cghI* gefunden werden; es entspricht im Abstand zum C-Terminus jedoch nicht den geforderten 3-5 Aminosäuren (JACKSON et al., 1990). Eine Bindung der CGH I an Membranen des endoplasmatischen Retikulums würde die Probleme beim Solubilisieren der CGH I erklären. Retentionssignale, allerdings für lösliche Proteine, für das endoplasmatische Retikulum ([KHR]-[DE]-E-L; PELHAM, 1989) konnten am C-Terminus einer β -Glucosidase aus *A. thaliana* (STOTZ et al., 2000) und einer Zeatin-O-Glucosidase aus *Brassica napus* (FALK und RASK, 1995) ausgemacht werden.

Histochemische Untersuchungen zur subzellulären Lokalisierung der CGH I mit dem Antikörper (SCHÖNIGER et al., 1998) brachten keine eindeutigen Ergebnisse, da bereits mit dem Präimmenserum eine Immunreaktion vorlag (HAUSE und LINDEMANN, unveröffentlichte Ergebnisse).

Damit kann aus der cDNA-Sequenz *cghI* und den experimentellen Daten die Lokalisation der CGH I nicht eindeutig festgelegt werden, läßt aber eine plastidäre Lokalisation unwahrscheinlich erscheinen.

1.7 Auswertung möglicher Eigenschaften von *cghI*

Das theoretische Molekulargewicht (M_G 73,2 kDa) und der berechnete Isoelektrische Punkt (pI 5,76) für *cghI* (WILKENS et al., 1998) entsprechen etwa den für das gereinigte Protein

bestimmten Daten (M_G 77,5 kDa, pI 5,8 - MAY und KREIS, 1997; M_G 70 kDa, pI 5,8 - SCHÖNIGER et al., 1998). Die für die CGH II bestimmten Werte (M_G 65 kDa, pI 6,2 - HORNBERGER et al., 2000) weichen dagegen stärker von denen der *cghI* ab.

In der PROSITE-Datenbank (BAIROCH et al., 1997) konnten für die *cghI* Sequenzen für mögliche posttranslationale Modifikationen, wie N-Glykosylierung (11), Protein- Kinase-C-Phosphorylierung (6), Casein-Kinase-II-Phosphorylierung (9), Tyrosin-Phosphorylierung (3), N-Myristilierung (10) und Amidierung (1) gefunden werden.

Auffällig ist dabei die hohe Zahl (11) von putativen N-Glykosylierungsstellen (N- $\{P\}$ -[ST]- $\{P\}$) in *cghI*. Eine Glykosylierung von CGH I konnte experimentell nicht nachgewiesen werden (SCHÖNIGER, persönliche Mitteilung). Das von ESEN (1993) aufgestellte Postulat, daß β -Glucosidasen in dikotylen Pflanzen glykosyliert sind, während die β -Glucosidasen monokotyler Pflanzen nicht glykosyliert sind, ist seit der Beschreibung von β -Glucosidasen ohne Glykosylierung in dikotylen Pflanzen (WARZECHA et al., 1998) nicht mehr aufrechtzuerhalten und scheint auch für die CGH I aus *D. lanata* nicht zu gelten.

1.8 Sequenzvergleiche von *cghI*

1.8.1 Homologien von *cghI* zu Sequenzen der Datenbanken

Zu *cghI* wurden in der EMBL- bzw. der SpTrEMBL-Datenbank folgende Sequenzen mit der höchsten Homologie gefunden:

Sequenzeintrag	Funktion	Organismus	Identität
Q9SPP9	Raucaffricin-O- β -D-Glucosidase	<i>Rauwolfia serpentina</i>	44,8 % in 606 AS
Q40984	Amygdalin-Hydrolase Isoform AH I Präkursor (Fragment)	<i>Prunus serotina</i>	41,2 % in 600 AS
Q9M5X5	Prunasin-Hydrolase Isoform Präkursor	<i>Prunus serotina</i>	40,9 % in 607 AS
Q9M7N7	Strictosidin- β -Glucosidase	<i>Catharanthus roseus</i>	40,5% in 618 AS
Q42707	Furostanolglykosid-26-O- β - glucosidase	<i>Costus speciosus</i>	39,9% in 579 AS

Tab.9: Homologe Proteinsequenzen zu *cghI*, Sequenzeinträge aus SpTrEMBL

1.8.2 Vergleich der *cghI* mit den homologen β -Glucosidasen

Zum Vergleich wurden die homologen Sequenzen an der *cghI* ausgerichtet:

					50
<i>cghI</i>
Q9SPP9
Q40984
Q9M5X5
Q42707	MAAQLGLPLV	SCHRGASQAA	SSSAHLVPGA	SAIMQAGNRR	QKMRAPALRD
Q9M7N7MGS
					100
<i>cghI</i>MTN	ESNHTDHNVT	RASFNFSNGE
Q9SPP9MATQSS	AVIDSNDATR	..ISRSDFFA
Q40984	...TKLGSL	LCALLLAGFA	LTNSKAAKTD	PPIHCASLNR	..SSFDALEP
Q9M5X5	...MAMQLGS	LCAMLLIGFA	LRNTNAVRTD	PPSHCPVLR	..SSFESLVP
Q42707	RVVFARVVPV	DGSVGFAGSS	TEQETAVESA	TPTAVPSKVV	..LGRSSFPR
Q9M7N7	KDDQSLVVAI	SPAAEPNGNH	SVPIPFAYPS	IPIQPRKHNK	PIVHRRDFPS
					150
<i>cghI</i>	KFVFGSATS	YQIEGCAMEF	GKGLSVWDTW	TLDKPGHIID	GTNGNVAANQ
Q9SPP9	DFIMGTGSS	YQIEGGARDG	GRGPSIWDTF	THRRPDMIRG	GTNGDVAVDS
Q40984	GFIFGTASAA	YQFEGAAKED	GRGPSIWDTY	THNHSEKID	GSNGDVAVDQ
Q9M5X5	GFIFGTASAA	YQVEGAANEG	GRGPSIWDAY	THNHPERIKD	RSNGDIAIDQ
Q42707	GFIFGAASAA	YQVEGAWNEG	GRGPSIWDTF	THDHPEKIAD	HSNGDKATDS
Q9M7N7	DFILGAGGSA	YQCEGAYNEG	NRGPSIWDTF	TNRYPAKIAD	GSNGNQAINS
	Consensus2				
					200
<i>cghI</i>	YHLFKEDMKI	MKRAGLEAYR	FSISWPRILP	GGKLSTGVNK	EGIKYYNDLI
Q9SPP9	YHLYKEDVNI	LKNLGLDAYR	FSISWSRVLP	GGRLSGGVNK	EGINYNNLI
Q40984	YHRYKEDVRI	MKKMGFDAYR	FSISWSRVLP	NGKVSQGVNE	DGIKFYNNLI
Q9M5X5	YHRYKEDVGI	MKNMGLDSYR	LSISWSRLLP	NGKLSGGVNK	EGIEYYNNLT
Q42707	YKRYKEDVKL	LKDLGLDSYR	FSISWSRILP	KGTLQGGINQ	EGIQYYNDLI
Q9M7N7	YNLYKEDIKI	MKQTGLESYR	FSISWSRVLP	GGNLSGGVNK	DGVKFYHDFI
					250
<i>cghI</i>	DAIIAEGMQP	YVTLFHWDLP	LALELEYGGF	LDKDKRIVEH	FRDYAELCFW
Q9SPP9	DGLLANGIKP	FVTLFHWDVP	QALEDEYGGF	LSP..RIVDD	FCEYAELCFW
Q40984	NEILRNGLKP	FVTIYHWDLP	QALEDEYGGF	LSP..NIVDH	FRDYANLCFK
Q9M5X5	NELLRNGITP	FVTLFHWDVP	QALVDEYGGF	LSP..RIVDH	YKDYTELCFK
Q42707	NELLKNGIRP	MVTLFHWDVP	QALEDSYKGF	RSS..EIVND	FKDYADICFK
Q9M7N7	DELLANGIKP	FATLFHWDLP	QALEDEYGGF	LSD..RIVED	FTEYAELCFW
					300
<i>cghI</i>	EFGDRVKHVI	TINEA	WSYTV	EGYVNGTCPP	GRGASAPSDD MALQTAEILR
Q9SPP9	EFGDRVKHVM	TINEP	WTFVS	HGYATGLYAP	GRGRTSP...
Q40984	KFGDRVKHVI	TINEP	YTFSS	SGYAYGVHAP	GR.....
Q9M5X5	EFGDRIKHVI	TINEP	YAVSH	HGYAIGIHAP	GR.....
Q42707	EFGDRVKHVI	TINEP	WSLST	MGYAFGRHAP	GR.....
Q9M7N7	EFGDKVKFWT	TINEP	HTYVA	SGYATGEFAP	GR.....
		PD			
					350
<i>cghI</i>	NRTLSTILDA	IGSQAI AELK	DIEKLIYTLI	PNNIKDLISK	FHIEEFVKNI
Q9SPP9EHV
Q40984
Q9M5X5
Q42707
Q9M7N7

400

<i>cghI</i>	IPEVLKQKCP	QLVDFIVDIL	QSFHVDY	KRT	GMARACNSGD	PGTEPYIVAH
Q9SPP9	NHPTVQHRC	TVAP.....	QCICSTGN	PGTEPYWVTH
Q40984CS	AWQ.....	KLNCTGGN	SATEPYLVTH
Q9M5X5CS	DWE.....	A..CLGGD	SAIEPYLVTH
Q42707CS	TWY.....	GCPAGD	SANEPYEVTH
Q9M7N7	GGADGKGE	PGKEPYIATH

450

<i>cghI</i>	NIILAHAAAV	RLYKTKFQAY	QGGKIGMTNN	VTYYLPYDEK	YHEDVEASKR
Q9SPP9	HLLLAHAAAV	ELYKNKFQRG	QEGQIGISHA	TQWMEPW DEN	SASDVEAAAR
Q40984	HQLLAHAAAV	KLYKDEYQAS	QNGLIGITLV	SPWFEPASE.	AEEDINA AFR
Q9M5X5	NQLLAHASTV	KVYKDKYQAS	QNGVIGITVV	SHWIEPASK.	SKEDIDAASR
Q42707	NLLLAHANAV	KIYRDNYKAT	QNGEIGITLN	SLWYEPYSK.	SHEDVEAATR
Q9M7N7	NLLLSHKA AV	EVYRKNFQKC	QGGEIGIVLN	SMWMEPLNE.	TKEDIDARER

500

<i>cghI</i>	GVDFMLYWFV	EPIVGTGKYPE	RMVKRVGKRL	PCFTVEEEEEM	VRGSYDFLGV
Q9SPP9	ALDFMLGWFM	EPITSGDYPK	SMKKFVGSRL	PKFSPEQSKM	LKGSYDFVGL
Q40984	SLDFIFGWFM	DPLTNGNYPH	LMRSIVGERL	PNFTEEQSKL	LKGSFDFIGL
Q9M5X5	YLD FMFGWFM	SPLTIGDYPH	SMRHLVGERL	PVFTEEQSKL	LNGSFDFIGL
Q42707	ALDFMFGWYM	DPLVNGDYPF	IMRALVRDRL	PFTHAESEL	IKGSYDFIGI
Q9M7N7	GLDFMLGWFI	EPLTTGEYPK	SMRALVGSRL	PEFSTEVSEK	LTGCYDFIGM

550

<i>cghI</i>	NYTTTYAIN	LPI...PPI	APPNYFSDMG	VLSTPTRGGV	PIGIQCGQGG
Q9SPP9	NYTASYVTN	AST..NSSGS	NNFSYNTDIH	VTYETDRNGV	PIGPQSG.SD
Q40984	NYTTTRYASN	APK..ITSVH	A..SYITDPQ	VNATAELKGV	PIGPMAA.SG
Q9M5X5	NYYSARYASD	FSN..DYIAP	P..SYLTDHR	ANVTTELNGV	PIGPRGA.SD
Q42707	NYYSNYAQH	APV..TEDHT	PDNSYF.DSY	VNQSGEKNGV	PIGPLQG.S.
Q9M7N7	NYTTTYVSN	ADKIPDTPGY	ETDARINKNI	FVKKVDGKEV	RIGEPCY.GG

600

<i>cghI</i>	WIYIYPRGLY	LILIEMTNKF	KDKNDQGPII	YITENGASEN	A.....
Q9SPP9	WLLIYPEGIR	KILVYTKKTY	NV.....PII	YVTENGVDV	K.....
Q40984	WLYVYPKGIH	DLVLYTKEKY	ND.....PII	YITENGVDDEF	N.....
Q9M5X5	WLYVYPEGIY	KLLLHTKETY	NN.....PII	YITENGIDDEF	N.....
Q42707	WIYFYPRGLK	ELLLYVKRRY	CN.....PKI	YITENGTAEV	E.....
Q9M7N7	WQHVVPSGLY	NLLVYTKKEY	HV.....PVI	YVSECGVVEE	NRTNILLTEG

Consensus1

650

<i>cghI</i>	NTTFTVCEAR	YDPIRVLYHN	DHLWYLKAM	EDGVNLKGYF	IWSFADNFEW
Q9SPP9	NTNLT LSEAR	KDSMRLKYLQ	DHIFNVRQAM	NDGVNVKGYF	AWSLLDNFEW
Q40984	DPKLSMEEAL	KDTNRIDFY	RHLCYLQAAI	KKGSKVKGYF	AWSF LDNFEW
Q9M5X5	NPKLSLEEAL	NDTMRIDYYY	HHLCYLQAAI	KDGV RVKGYF	AWSVLDNFEW
Q42707	KEK...GVPL	HDPERKEYLT	YHLAQVLQAI	REGVRVKGHF	TWALTDNFEW
Q9M7N7	KTNILLTEAR	HDKLRVDFLQ	SHLASVRDAI	DDGVNVKGF	VWSFFDNFEW

700

<i>cghI</i>	NAGYTSRFGI	FYVDFVNGQY	TRYPKSSALW	WTNFLHDVQE	LKVPDTSNVT
Q9SPP9	GEGYGVRFGI	IHDY.NDNF	ARYPKDSAVW	LMNSFHKNIS	KLPAVKRSIR
Q40984	DAGYTVRFGI	NYVDY.NDNL	KRHSKLSTYW	FTSFLKKEYER	STKEIQMFVE
Q9M5X5	NSGYTVRFGI	NYVDY.DNGL	KRRSKFSAHW	LKNFLKNYSG	SKKEIRVRVD
Q42707	DKGYTERFGL	IYIDY.DKDF	NRQPKDSTKW	FSKFLRT...
Q9M7N7	NLGYICRYGI	IHDY..KTF	QRYPKDSAIW	YKNFISEGFV	TNTAKKRFRE

				732
<i>cghI</i>	NKRSRNTEEE	NATAKKPKNT	SVNSLGFLDN	LD
Q9SPP9	EDDEEQVSSK	RLRK.....
Q40984	SKLEHQKFES	QMMNKVQSSL	AVVV.....	..
Q9M5X5	DNARDTKAGY	EI.....
Q42707
Q9M7N7	EDKLVELVKK	QKY.....

Abb.20: Vergleich der vollständigen Aminosäuresequenz der *cghI* mit homologen pflanzlichen β -Glucosidasen unter Anwendung von MULTALIGN (CORPET, 1988) Blau unterlegt sind die beiden Inserte (Δ 205-300 und Δ 491-495) in *cghI*; die grauen unterlegten Rahmen kennzeichnen die beiden Consensus-Sequenzen der Familie 1 der Glykosyl-Hydrolasen, fett sind darin die von der Consensussequenz abweichenden Aminosäuren gekennzeichnet; rot sind die Glutaminsäuren, die vermutlich an der Enzymkatalyse beteiligt sind; PD steht für Protonendonator; unterstrichen sind die Peptidfragmente der CGH I in *cghI* Verwendete Datenbank-Einträge (SpTrEMBL): Q9SPP9 - Raucaffricin-O- β -D-Glucosidase aus *R. serpentina*; Q40984 – Amygdalin-Hydrolase Isoform AH I Präkursor (Fragment) aus *P. serotina*; Q9M5X5 – Prunasin-Hydrolase Isoform Präkursor aus *P. serotina*; Q9M7N7 – Strictosidin- β -Glucosidase aus *C. roseus*; Q42707 – Furostanolglykosid-26-O- β -Glucosidase aus *C. speciosus*

Die Ausrichtung der *cghI* mit anderen β -Glucosidasen zeigt die Existenz von 2 Inserten (Δ 205-300 und Δ 491-495) in *cghI*, die in anderen pflanzlichen β -Glucosidasen bisher nicht gefunden wurden. Vor allem das lange Insert (Δ 205-300) erklärt die Größenunterschiede der CGH I zu anderen β -Glucosidasen (73 kDa zu 55-65 kDa). Eine Suche in der EMBL-Datenbank nach homologen Sequenzen zu dem langen Insert (Δ 205-300) blieb ohne Ergebnis.

Die Beteiligung zweier Carboxylat-Ionen im aktiven Zentrum von β -Glucosidasen gilt als sicher (SINNOTT, 1990), wobei für die Katalyse ein Nukleophil und ein Protonendonator erforderlich ist. Die konservierte Glutaminsäure in der Consensus-Sequenz 1 der Glykosyl-Hydrolasen scheint auch in *cghI* (E 503) das putative Nukleophil bei der Enzymreaktion zu sein (D 1.6). Als Protonendonator kommt in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von KERESZTESSY et al. (1994), die in einer cyanogenen β -Glucosidase aus *Manihot esculenta* die Glutaminsäure (E 198) als potentiellen Protonendonator identifizierten, in *cghI* nur die konservierte Glutaminsäure (E 186) in Frage. Aufgrund der Kristallstruktur der einzigen

bisher kristallisierten pflanzlichen β -Glucosidase, einer cyanogenen β -Glucosidase aus *T. repens*, konnte die Beteiligung der entsprechenden Glutaminsäure (E 183) an der Enzymkatalyse bestätigt werden (BARRETT et al., 1995). Auffällig ist jedoch, daß diese Glutaminsäure in *cghI* (E 186) von Asparaginsäure und Alanin (NEA) und nicht wie in den anderen β -Glucosidasen von Asparaginsäure und Prolin (NEP) umgeben ist. In allen Thioglucosidasen, sogenannten Myrosinase, ist die Glutaminsäure gegen ein Glutamin ausgetauscht (BURMEISTER et al., 1997).

Die Kristallstruktur der cyanogenen β -Glucosidase aus *T. repens* bewies weiterhin die unterschiedlichen pK_a -Werte für die beiden Glutaminsäuren (E 183 und E 397), da das Nukleophil deprotoniert vorliegen muß, während der Protonendonator ein Proton für die Reaktion zur Verfügung stellt. Der Abstand zwischen diesen beiden Glutaminsäuren konnte mit 5,2 Å bestimmt werden (BARRETT et al., 1995). Er bestätigt den für die Mitglieder der Familie 1 der Glykosyl-Hydrolasen postulierten Reaktionsmechanismus, bei dem die anomere Konfiguration des Zuckers bestehen bleibt (HENRISSAT et al., 1995; JENKINS et al., 1995). Die Umkehrung der anomeren Konfiguration würde einen Abstand von 10 Å erfordern (DAVIES und HENRISSAT, 1995). Ein Reaktionsmechanismus, bei dem die anomere Konfiguration des Zuckers erhalten bleibt, ist damit auch für die CGH I zu vermuten.

Die einzige β -Glucosidase aus einer monokotylen Pflanze im Sequenzvergleich ist die Furostanolglykosid-26-O- β -Glucosidase aus *C. speciosus* (Q42707), die durch ihre N-terminale Signalsequenz auffällt.

2 Isoenzyme der CGH I in *D. lanata*

2.1 Allgemeines

Die Abweichungen in der Aminosäuresequenz zwischen dem nativen Enzym (CGH I) und der isolierten cDNA (*cghI*) (C 1.6) läßt die Existenz von Isoformen für dieses Enzym in *D. lanata* vermuten.

In *D. lanata* konnten bereits für Acyl-CoA-bindende Proteine (Metzner et al., 2000; GRUNER, unveröffentlichte Ergebnisse) und Cyclophiline (LIEBAU, 1995; SCHOLZE et al., 1999) Isoenzyme sowohl als Proteine, als auch als mRNAs, d.h cDNAs, nachgewiesen

werden. Bei einer phospho-spezifischen Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase wurden Isoformen vermutet (METZNER, 2000).

Die Existenz von Isoenzymen ist auch bei pflanzlichen β -Glucosidasen ein durchaus verbreitetes Phänomen. So konnte für senfölsplattende β -Glucosidasen, sogenannte Myrosinasen, in Brassicaceae eine Gen-Familie mit zwei Untergruppen gefunden werden (XUE et al., 1992; THANGSTAD et al., 1993). Aus *S. bicolor* sind 2 cyanogene β -Glucosidasen gereinigt worden (HÖSEL et al., 1987). Die Abweichungen zwischen der Sequenz des gereinigten Enzyms und der isolierten cDNA ließen für eine Cytokinin- β -Glucosidase (BRZOBOHATY et al., 1993) aus *Zea mays* und eine Furostanolglykosid-26-O- β -Glucosidase aus *C. speciosus* das Vorkommen von Isoformen annehmen. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Furostanolglykosid-26-O- β -Glucosidase aus *C. speciosus*. Sie ist die einzige klonierte β -Glucosidase, die wie die CGH I Glykoside, die als Aglykon ein Steroid aufweisen, spaltet (INOUE et al., 1996). Bei dieser β -Glucosidase konnten in PCR-Versuchen 5 Produkte amplifiziert werden, die in Bezug auf die vollständige cDNA eine Sequenzübereinstimmung von 74,8 %, 96,6 %, 88,1 %, 91,8 % und 91,1 % aufwiesen. Da sich diese Vielzahl von PCR-Produkten nicht mit der Fehlerrate der *Taq*-Polymerase (< 1 %) erklären ließ, wurde die Existenz von Isoenzymen postuliert (INOUE et al., 1996). Die vollständige cDNA der Furostanolglykosid-26-O- β -Glucosidase aus *C. speciosus* konnte anschließend sowohl in *E. coli* (INOUE et al., 1996) als auch in *Nicotiana tabacum* (ICHINOSE et al., 1999) funktionell exprimiert werden.

2.2 Vorkommen von β -Glucosidasen in *Arabidopsis thaliana*

Im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit ist das Genom von *A. thaliana* als erstes Genom einer Pflanze vollständig sequenziert worden. Die Sequenzen stehen im Internet zur Verfügung und bieten ein gutes Werkzeug für viele Fragen der Pflanzenforschung.

Erste Auswertungen der Sequenzen (THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE, 2000) zeigen z. B., daß der Anteil der single-copy-Gene in *A. thaliana* nur noch 35,0 % beträgt; sie also wesentlich seltener sind als in *Haemophilus influenzae* (88,8 %), in *Saccharomyces cerevisiae* (71,4 %), in *Drosophila melanogaster* (72,5 %) oder in *Caenorhabditis elegans* (55,2 %). Demgegenüber ist die Anzahl der Genfamilien mit mehr als 5 Mitgliedern in *A. thaliana* (37,4 %) viel größer als in den anderen bekannten Genomen (*H. influenzae* 1,4 %; *S. cerevisiae* 8,4 %; *D. melanogaster* 12,1 %; *C. elegans*

24,0 %). Die Unterschiede in den Genomen zwischen 2 verschiedenen *A. thaliana*-Kultivaren betragen neben Insertionen-Deletionen etwa 1 SNP (single nucleotide polymorphism) auf 3,3 kb.

Eine Suche in der *A. thaliana*-Datenbank mit der Sequenz *cghI* führt zu etwa 50 Einträgen. Homologe Sequenzen werden in der folgenden Tabelle aufgezeigt:

Sequenzeintrag	Mögliche Funktion	Identität in %
AB023032	putative β -Glucosidase	39,4 % in 574 AS
AB024024	putative β -Glucosidase	39,1 % in 574 AS
AC006053	putative β -Glucosidase	38,2 % in 600 AS
AF159376	β -Glucosidase	36,4 % in 574 AS
AF183827	β -Glucosidase Homologes	34,0 % in 582 AS
AJ251301	β -Glucosidase	33,8 % in 582 AS

Tab.10: Homologe Sequenzen zur *cghI* in der *A. thaliana*-Datenbank

Die Sequenzen zeigen deutlich, daß für β -Glucosidasen in *A. thaliana* eine Genfamilie mit mehr als 5 Vertretern angenommen werden kann.

Mit den bisherigen Auswertungen des ersten vollständig sequenzierten Pflanzen-Genoms läßt sich bezüglich der β -Glucosidasen in *D. lanata* folgendes annehmen:

1. Die Wahrscheinlichkeit, daß in *D. lanata* mehrere Gene für β -Glucosidasen kodieren, ist relativ hoch.
2. Die Annahme, daß die Unterschiede in der Aminosäuresequenz zwischen CGH I und *cghI* auf die Verwendung unterschiedlicher Kultivare zurückzuführen ist, kann aufgrund der großen Sequenzabweichung zwischen CGH I und *cghI* (14 %) ausgeschlossen werden.

Daher wurde mit verschiedenen Ansätzen nach Isoenzymen der CGH I gesucht.

2.3 Versuche zum Nachweis von Isoenzymen

2.3.1 PCR

Die Vielfalt der PCR-Produkte bei der Klonierung der Furostanolglykosid-26-O- β -Glucosidase aus *C. speciosus* (D 2.1) warf die Frage nach unterschiedlichen PCR-Produkten für die CGH I von *D. lanata* auf. Die PCR-Fragmente (1121 bzw. 1478 bp) (C 1.1) wurden dazu kloniert (C 4.2); sie erwiesen sich aber als identische Fragmente der *cghI*.

Da von SOMMER und TAUTZ (1989) die Bedeutung des 3'-Endes des Primers für die Bindung an die gewünschte Zielsequenz gezeigt werden konnte, wurden Primer generiert, die nur die cDNA der CGH I amplifiziert hätten.

Primer	Peptidsequenz → Primersequenz
Iso1	<i>cghI</i> A G L E A Y CGH I V T L E A Y 3' -CAN-TGN-RAN-CTY-CGG-AT-5'
Iso2	<i>cghI</i> E A Y R F S CGH I E A Y R A H 5' -GAG-GCN-TAY-MGN-GCN-CA-3'
Iso3	<i>cghI</i> P Y I V A H CGH I P Y T V A Y 5' -CCG-TAY-ACN-GTN-GCN-TA-3'

Tab.11: Modifizierte Primer zur Amplifikation der CGH I-cDNA

Fett gedruckt sind die abweichenden Aminosäuren in CGH I zur *cghI*

Da die Lage der Peptidfragmente in *cghI* bekannt war, konnte die Länge der PCR-Produkte vorhergesagt werden. Von den resultierenden PCR-Fragmenten (C 4.2) wies keines eine Homologie zu β -Glucosidasen auf.

2.3.2 Analyse weiterer Phagenklone

cDNAs für Isoenzyme von Myrosinasen konnten in *Sinapis alba* beim Screening einer cDNA-Bank erhalten werden (XUE et al., 1992). Deshalb sollten die im Primärscreening

erhaltenen Phagenklonkolonien auf mögliche Isoformen durchsucht werden. Es wurde, wie in C 4.3 beschrieben, verfahren. Die sequenzierten Klone waren jedoch zu *cghI* identisch.

Vermutlich waren die beim Primärscreening gewählten Bedingungen (68°C Hybridisierungstemperatur, 65°C Waschttemperatur) so stringent, daß nur die zum PCR-Fragment *cghI 374* homologen Phagenklone hybridisierten. Diese hohe Stringenz war allerdings berechtigt, da das Fragment *cghI 374* ursprünglich als Teil der cDNA der CGH I angesehen werden konnte.

2.3.3 Southern-Blot-Analyse

Die übliche Methode, um Isoenzyme auf genomischer Ebene nachzuweisen, ist die Durchführung einer Southern-Blot-Analyse. Genomische DNA wurde dazu mit guter Ausbeute und Reinheit isoliert (C 4.1). Die Abwesenheit von Zuckern, die enzymatische Reaktionen stören können, konnte im kontinuierlichen UV-Spektrum gezeigt werden (C 4.1). Die von SCHOLZE (1999) beschriebenen Probleme bei der Restriktion der DNA wurden nicht beobachtet. Zur Hybridisierung wurden sowohl *cghI* als auch das PCR-Fragment *cghI 374* eingesetzt. Trotz der Variation der Hybridisierungstemperaturen (65°C, 60°C) und der Waschttemperaturen (60°C, 55°C, 50°C) konnten keine hybridisierenden Banden detektiert werden.

3 Expression der *cghI* in *E. coli*

Um den Nachweis zu erbringen, daß das von der *cghI* codierte Protein (rCGH I) CGH I-Aktivität hat, mußte es heterolog exprimiert werden.

3.1 Wahl des Expressionssystems und Optimierung

Für cDNAs aus *D. lanata* (SCHOLZE, 1999; METZNER, 2000) und andere pflanzliche β -Glucosidasen (INOUE et al., 1996; KERESZTESSY et al., 1996; CISEK und ESEN, 1999; ZOUHAR et al., 1999; WARZECHA et al., 2000) konnte *E. coli* erfolgreich als Wirtsorganismus verwendet werden.

Deshalb wurde die Sequenz *cghI* in den Expressionsvektor pQE 30, der Proteine mit einem N-terminalen 6xHis-tag translatiert, kloniert und mit dem Plasmid anschließend *E. coli*-Zellen transformiert. Die Expression bei 37°C über 5 h nach einer Zugabe von 1mM IPTG resultierte zwar in einer Bande in der SDS-PAGE bei etwa 70 kDa, Aktivität gegenüber Lanatosid C war aber weder im Rück- noch im Überstand zu messen (C 2.1). Das ließ auf die Existenz von „inclusion bodies“ schließen, die schon bei der heterologen Expression der Linamarase aus *M. esculenta* (KERESZTESSY et al., 1996), bei der Furostanolglykosid-26-O-β-Glucosidase aus *C. speciosus* (INOUE et al., 1996) und einer Cytokinin-β-Glucosidase aus *Z. mays* (ZOUHAR et al., 1999) beobachtet wurde.

Die Bildung von „inclusion bodies“ kann oft durch veränderte Expressionsbedingungen teilweise verhindert werden. Dafür bieten sich 3 Variationen an: 1. Verringerung der Konzentration des Induktors (IPTG) 2. Verringerung der Expressionstemperatur und dementsprechend 3. Verlängerung der Expressionsdauer. Unterschiedliche Expressionsbedingungen wurden daraufhin getestet (C 2.1). Für die Expression der *cghI* bei 4°C über 96 h nach 0,1 mM IPTG-Zugabe konnte im Zellüberstand die höchste Aktivität gegenüber Lanatosid C beobachtet werden. Es gelang jedoch nicht, rCGH I an eine Ni-NTA-Säule zu binden. Da der His-tag mittels eines Anti-His-Antikörpers nicht nachgewiesen werden konnte, wurde die *cghI* in den Expressionsvektor pQE 60, der einen 6 His-tag am C-Terminus der Proteins mittranslatiert, kloniert und konnte damit nicht exprimiert werden (C 2.1).

Die Linamarase aus *M. esculenta* (KERESZTESSY et al., 1996) wurde als GST-Fusionsprotein exprimiert und gereinigt. Da die GST-Domäne das exprimierte Protein löslicher macht, wurde die *cghI* in einen Expressionsvektor mit GST-Domäne (pGEX-5X-3) kloniert und wiederum verschiedene Expressionsbedingungen getestet. Nur bei 4°C konnte im Überstand sehr wenig Aktivität gefunden werden (C 2.2).

3.2 Bestimmung kinetischer Parameter von rCGH I

Aus dem Zellüberstand wurden für rCGH I einige enzymkinetische Parameter bestimmt (C 3). Die Ergebnisse werden in der folgenden Tabelle mit den Ergebnissen der CGH I verglichen:

	1) CGH I aus Blättern von <i>D. lanata</i> Sorte „Boehringer“	2) CGH I aus Blättern von <i>D. lanata</i> Sorte „Dresdner“	3) rCGH I
pH-Optimum	4,5	4,5	4,5
Temperatur-Optimum	55°C	65°C	70°C
<u>K_m-Werte</u>			
LC	146 µM	203 µM	301 µM
DLC	154 µM	840 µM	505 µM
LA	21 µM	140 µM	264 µM

Tab.12: Vergleich der für die CGH I bestimmten Parameter mit denen der rCGH I

1) MAY und KREIS (1997) 2) SCHÖNIGER et al. (1998) 3) siehe C 3

Die für rCGH I bestimmten Parameter sind in recht guter Übereinstimmung mit den für die gereinigte CGH I bestimmten Werten (MAY und KREIS, 1997; SCHÖNIGER et al., 1998). Die K_m-Werte weisen daraufhin, daß auch rCGH I eine höhere Affinität für in der Zuckerkette acetylierte Cardenolide (Lanatosid A und C) als für desacetylierte Cardenolide (Desacetyllanatosid C) aufweist. Für die cardenolidspaltenden β-Glucosidasen in *D. purpurea* war eine Präferenz für die desacetylierten Cardenolide erkennbar (SCHÖNIGER, 1998). In *D. purpurea* sind im Gegensatz zu *D. lanata* in der Zuckerkette acetylierte Cardenolide weniger verbreitet, so daß die unterschiedlichen Affinitäten der Enzyme damit erklärt werden können.

Die von SCHÖNIGER et al. (1998) beschriebene erstaunliche Temperaturstabilität des Enzyms konnte auch für rCGH I (5 h bei 60°C, 90 min bei 70°C) beobachtet werden (C 3.2). Für die CGH II konnte keine Umsetzung für in der Zuckerkette acetylierten Cardenolide gezeigt werden (HORNBERGER et al., 2000). Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften (D 1.7) kann ausgeschlossen werden, daß die *cghI* für die CGH II kodiert.

3.3 Mutanten

Die beiden in der *cghI* gefundenen Inserte (Δ205-300, Δ491-495) (D 1.8.2), die in anderen pflanzlichen β-Glucosidasen nicht vorkommen, wurden in *cghI* deletiert (C 6.1) und die entsprechenden Expressionsplasmide in *E. coli* exprimiert. Die Expression wurde im SDS-

PAGE nachgewiesen; jedoch konnte selbst bei unterschiedlichen Expressionsbedingungen keine Aktivität gegenüber Lanatosid C beobachtet werden (C 6.2).

Die Experimente weisen daraufhin, daß die beiden Inserte ($\Delta 205-300$, $\Delta 491-495$) wichtig für die „richtige“ Konformation der CGH I und damit für die Substraterkennung bzw. die Katalyse sind. Da vor allem das größere Insert ($\Delta 205-300$) die Größenunterschiede zu den anderen pflanzlichen β -Glucosidasen erklärt (C 1.8.2), könnte vermutet werden, daß sich aus einer „unspezifischen“ β -Glucosidase durch Einschub von diesen 2 Inserten eine cardenolidspezifische β -Glucosidase entwickelt hat. Sollte es sich bei dem längeren Insert um eine Insertion im Laufe der Evolution handeln, muß diese vor der Bildung der Gattung *Digitalis* stattgefunden haben, da die CGH I in unterschiedlichen *Digitalis*-Arten im Western Blot mit gleichem Molekulargewicht detektiert wurde (SCHÖNIGER et al., 1998).

Derselbe experimentelle Ansatz wurde gewählt, um das Alanin am putativen Protonendonator (NEA) in *cghI* (D 1.8.2) gegen ein Prolin (NEP), wie es die meisten β -Glucosidasen aufweisen, auszutauschen (C 6.1). Die Mutante *cghI A187P* wurde wiederum exprimiert, wobei trotz nachweisbarer Expression zu keinem Zeitpunkt Aktivität gegenüber Lanatosid C zu beobachten war (C 6.2). Das in anderen β -Glucosidasen vorkommende Prolin nimmt unter den proteinogenen Aminosäuren aufgrund seiner Möglichkeit cis/trans-Isomere zu bilden eine Sonderstellung ein. Möglicherweise spielt das Alanin, das sich unmittelbar neben dem putativen Protonendonator in *cghI* befindet, eine Rolle bei der Erkennung des Aglykons.

4 mRNA-Expression der *cghI*

4.1 mRNA-Expression der *cghI* in Pflanzenteilen von *D. lanata*

Für die *cghI* konnte durch die Northern-Blot-Analyse eine gewebsspezifische Expression nachgewiesen werden (C 5.1). Andere β -Glucosidasen, wie die Dhurrinase aus *S. bicolor* (CISEK und ESEN, 1998) und eine Myrosinase aus *Raphanus sativus* (HARA et al., 2000), werden ebenfalls gewebsspezifisch exprimiert. Vergleicht man die in den unterschiedlichen Geweben mit *cghI* hybridisierenden mRNAs mit dem Cardenolidgehalt des jeweiligen Gewebes ergibt sich folgendes Bild:

Gewebe	Cardenolid-Gehalt ¹ (mg/100mg Trockengewicht)	Prozentuale densitometrische Intensität der mit <i>cghI</i> hybridisierenden mRNA ²
Rosetten-Blätter	500-1300	100
Stengelblätter	350-900	38
Blüten	90-180	19
Früchte	300-450	97
Sproßachse	20-40	0
Wurzel	10-20	0

Tab.13: Vergleich der Intensität der mit *cghI* hybridisierenden mRNAs mit dem Cardenolid-Gehalt der jeweiligen Gewebe; ¹ LUCKNER und WICHTL, 2000; ² siehe C 5.1 (aus FRAMM et al., 2000)

Eine Korrelation zwischen dem Cardenolidgehalt und der mRNA-Expression der *cghI* ist eindeutig zu erkennen. Das gemeinsame Vorkommen der Cardenolide mit der mRNA der sie hydrolysierenden β -Glucosidase, wie es auch für Glucosinolate und die Myrosinase aus *R. sativus* (HARA et al., 2000) beschrieben wurde, läßt Spekulationen über eine biologische Funktion der CGH I zu. Cardenolide bieten Pflanzen der Gattung *Digitalis* einen effektiven Schutz gegen Fraßfeinde und sind verstärkt in den besonders exponierten Organen (z. B. Blättern, Samen) zu finden (LUCKNER und WICHTL, 2000). Innerhalb der Zelle sind die Cardenolide von der CGH I getrennt und kommen bei der Zerstörung der Zellstruktur in Kontakt. Bei Pflanzen mit Glucosinolaten (RASK et al., 2000) und cyanogenen Glykosiden (POULTON, 1990) führt diese Aufhebung der Kompartimentierung zur Freisetzung von toxischen Verbindungen (Isothiocyanate, Nitrile u.a. bzw. Blausäure) durch β -Glucosidasen aus ungiftigen Glykosiden. Diese toxischen Verbindungen können Angreifer abtöten.

Für das Primärglykosid Lanatosid C und dessen Sekundärglykosid α -Acetyldigoxin konnten zwar annähernd die gleiche LD₅₀ (260-280 μ g/kg Katze i.v., KREIS und STOLL, 1933) bestimmt werden, die Resorption des Sekundärglykosids ist jedoch um das 8-9fache höher als für das hydrophilere Primärglykosid (MOSER, 1999). Es liegen Untersuchungen vor, die belegen, daß von dem Primärglykosid Lanatosid C im Darm von Säugetieren durch die Einwirkung von Mikroorganismen die Glucose und der Acetylrest abgespalten werden, bevor es in Form des Digoxin resorbiert wird (HERRMANN und REPKE, 1969).

Sowohl für eine β -Glucosidase aus *Aspergillus wentii* (HERRMANN und REPKE, 1975) als auch für eine β -Glucosidase aus *Hordeum vulgare* (LEPOJEVIĆ und PEKIĆ, 1995) konnte eine Abspaltung der Glucose aus Primärglykosiden beobachtet werden. Das würde bedeuten, daß erst durch die Einwirkung einer Glucosidase aus den Primärglykosiden die resorbierbaren und damit toxischen Sekundärglykoside werden. Es könnte sein, daß die CGH I diese Funktion übernimmt.

Es ist unwahrscheinlich, daß die Expression der CGH I auf der Ebene der Transkription als Reaktion der Pflanze auf eine Verwundung reguliert wird. In einjährigen Blättern ist ohne vorhergehende Verwundung eine sehr starke mRNA-Expression zu finden. Die Induktion einer β -Glucosidase aus *A. thaliana* auf transkriptioneller Ebene konnte 10 h nach der Verwundung der Pflanze durch eine Larve von *Plutella xylostella* gezeigt werden (STOTZ et al., 2000). In *Cucubita pepo* konnte 4 Wochen nach dem Befall mit *Bemisia argentifolii* und *B. tabaci* eine induzierte mRNA, die hohe Homologie zu β -Glucosidasen aufwies, detektiert werden (VAN DE VEN et al., 2000). Die Substrate dieser β -Glucosidasen sind jedoch bisher unbekannt.

4.2 mRNA-Expression der *cghI* im Verlauf der somatischen Embryogenese von PEMs von *D. lanata*

In keinem der untersuchten Stadien der somatischen Embryogenese von PEMs von *D. lanata* konnte eine mit *cghI* hybridisierende mRNA detektiert werden (C 5.2). Diese Ergebnisse erstaunen nicht, da in keinem der Stadien enzymatische Aktivität für die Deglykosylierung von Primärglykosiden festgestellt werden konnte (PEINHARDT, 1994). Zu diesem Zeitpunkt der Embryogenese findet keine nennenswerte Cardenolidbildung statt, d.h. auch in diesem Fall ist ein gleichzeitiges Vorkommen bzw. eine gleichzeitige Abwesenheit von Enzym (CGH I) und Substrat zu beobachten.

Für die CGH II wurde eine Expression auch in cardenolidfreien Geweben beschrieben (THEURER et al.; 1994). Neben den schon genannten Punkten (D 3.2) kann auch durch die Ergebnisse der Northern-Blot-Analyse recht sicher ausgeschlossen werden, daß die *cghI* für die CGH II kodiert.

5 Abschließende Diskussion und Ausblick auf weitere Arbeiten

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig ein cDNA-Klon einer β -Glucosidase aus *D. lanata* isoliert werden. Das in *E. coli* produzierte rekombinante Protein (rCGH I) zeigte CGH I-Aktivität und ähnliche Eigenschaften wie die CGH I. Die Sequenzunterschiede zwischen der cDNA (*cghI*) und den Peptiden der gereinigten CGH I gaben einen ersten Hinweis auf die Existenz von Isoformen für dieses Enzym. Weiterhin konnte die mRNA-Expression der *cghI* in Pflanzenteilen und im Verlauf der somatischen Embryogenese von PEMs von *D. lanata* untersucht werden. Durch Muteine der rCGH I konnte die Bedeutung einiger Sequenzabschnitte bei der Substraterkennung bzw. bei der Enzymkatalyse gezeigt werden. Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht worden (FRAMM et al., 2000).

Dennoch bleiben einige Fragen ungeklärt. So kann z. B. die Frage der Lokalisation des Enzyms noch nicht befriedigend beantwortet werden, da einerseits die experimentellen Ansätze zu keinen eindeutigen Ergebnissen führten, andererseits die cDNA keinen Aufschluß über eine Adressierung des Proteins in der Zelle gibt. Ein Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen wäre nach der Reinigung des rekombinanten Proteins die Herstellung eines Antikörpers gegen dieses Protein und dessen Verwendung in histochemischen Experimenten.

Obwohl mit verschiedenen Ansätzen nach Isoformen der CGH I gesucht wurde, konnte kein weiteres Isoenzym der CGH I gefunden werden. Es könnte versucht werden, mit der *cghI* eine cDNA-Bank von *D. lanata* unter weniger stringenten Bedingungen auf Isoformen der CGH I und auf weitere β -Glucosidasen zu durchsuchen. Der Nachweis von Isoformen auf genomischer Ebene müßte durch Southern-Blot-Analyse oder durch Isolation genomischer Klone erfolgen.

Die Bedeutung bestimmter Domänen und Aminosäuren für die Substraterkennung bzw. die Enzymkatalyse konnte gezeigt werden. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, die bereits nachgewiesene CGH I aus *D. purpurea* (SCHÖNIGER, 1998) zu klonieren und aufgrund der Sequenzabweichungen zur CGH I aus *D. lanata* herauszufinden, welche Aminosäuren die Affinität des Enzyms zur Acetylgruppe in der Zuckerkette der Cardenolide begründen.

Über die biologische Funktion der CGH I kann bis zum jetzigen Zeitpunkt nichts sicher festgestellt werden. Ein interessanter experimenteller Ansatz, der durch die Klonierung der *cghI* möglich wird, ist die Herstellung von transgenen *Digitalis*-Pflanzen, die die mRNA der *cghI* entweder reprimieren (anti-sense Orientierung) oder überexprimieren (sense

Orientierung). Nach einer transienten Expression der *cghI* in *D. lanata* soll untersucht werden, ob sich das Verteilungsmuster der Cardenolide in den transgenen Pflanzen von dem des Wildtyps unterscheidet. Damit könnten Aussagen getroffen werden, ob die CGH I eine Rolle bei Transportprozessen spielt (LINDEMANN, persönliche Mitteilung).

E Zusammenfassung

Glykosidspaltende Enzyme aus *Digitalis*-Arten sind bereits Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen gewesen; dabei wurde aus Blättern von *D. lanata* ein Enzym gereinigt und charakterisiert (MAY und KREIS, 1997; SCHÖNIGER et al., 1998), das die Reaktion von Primär- zu Sekundärglykosiden katalysiert und aufgrund seiner Spezifität als Cardenolid-16'-O-glucohydrolase (CGH I) bezeichnet wurde.

Durch die Klonierung von Enzymen wird nicht nur deren vollständige cDNA-Sequenz zugänglich, sondern es eröffnen sich damit auch molekularbiologische Methoden, mit denen Aussagen über die Funktion, Lokalisation und Bedeutung eines Enzyms gemacht werden können.

Deshalb wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein cDNA-Klon der CGH I isoliert und sowohl molekularbiologisch als auch biochemisch charakterisiert.

1. Aus cDNA von jungen, inneren Rosettenblättern von *D. lanata* konnten mit Primern, die aus Peptidfragmenten der CGH I abgeleitet waren (SCHÖNIGER et al., 1998), mittels Polymerasekettenreaktion 4 PCR-Fragmente amplifiziert werden. Das PCR-Fragment *cghI 374* wurde kloniert und zeigte Homologien zu anderen pflanzlichen β -Glucosidasen.
2. Eine cDNA-Bank von Blättern von *D. lanata* wurde mit *cghI 374* auf einen vollständigen cDNA-Klon durchsucht, wobei 3 Klone isoliert werden konnten. Die Sequenzen der Inserte erwiesen sich als identisch, das längste Insert bestand aus 2198 bp. Der offene Leserahmen umfasste 1954 bp und codierte für ein Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 73,2 kDa und einem sauren pI (5,76), wobei in der Sequenz die Peptide der CGH I (SCHÖNIGER et al., 1998) wiedergefunden werden konnten. Jedoch wich die Aminosäuresequenz des cDNA-Klons um etwa 14 % von der gereinigten CGH I ab. Mit den zur Verfügung stehenden Programmen konnten weder Signalsequenzen noch transmembrane Domänen erkannt werden. Die Sequenz war zu anderen β -Glucosidasen homolog. Auffällig dabei war die Existenz von 2 Domänen (Δ 491-495 und Δ 205-300), die in anderen β -Glucosidasen nicht zu finden

waren und die die Größenunterschiede der CGH I zu anderen β -Glucosidasen erklärten.

Die cDNA-Sequenz wurde als *cghI* bezeichnet und in die EMBL- (DLA 133406) und die SpTrEMBL-Datenbank (Q9ZPB6) eingetragen.

3. *cghI* wurde in den Expressionsvektor pQE 30 kloniert und die Sequenz in *E. coli* exprimiert. Dabei konnte bei Expressionsbedingungen bei 37°C im SDS-PAGE eine induzierte Bande bei 70 kDa beobachtet werden; in den Zellysaten war jedoch keine CGH I-Aktivität zu finden. Wurden Expressionsbedingungen bei 17°C und 4°C gewählt, konnte in den Zellysaten CGH I-Aktivität detektiert werden.
4. Einige enzymkinetische Parameter, wie pH- und Temperaturoptimum, K_m -Werte und Temperaturstabilität, konnten für das rekombinate Protein (rCGH I) bestimmt werden. Die Ergebnisse waren mit den für die gereinigte CGH I gemessenen Werten vergleichbar.
5. Expressionsplasmide, in denen jeweils die Domänen $\Delta 491-495$ bzw. $\Delta 205-300$ deletiert waren, wurden in *E. coli* exprimiert. Es konnte unter keinen Expressionsbedingungen im Zellysat CGH I-Aktivität gemessen werden, was eine Rolle dieser Domänen für eine richtige Proteinfaltung und damit die Substraterkennung bzw. die Enzymkatalyse vermuten läßt.
6. Da sich die putative Protonendonator-Region in *cghI* im Gegensatz zu anderen Vertretern der Familie 1 der Glykosyl-Hydrolasen statt aus den Aminosäuren NEP aus NEA konstituiert, wurde ein Expressionsplamid generiert, in dem Alanin gegen Prolin ausgetauscht war. Es wurde unter unterschiedlichen Bedingungen in *E. coli* exprimiert; CGH I - Aktivität konnte in keinem der Zellysate gefunden werden, so daß das Alanin eine Bedeutung für die Substraterkennung bzw. die Enzymkatalyse der *cghI* haben könnte.
7. Aufgrund der Sequenzabweichungen zwischen der gereinigten CGH I und der Sequenz *cghI* wurde die Existenz von CGH I-Isoformen postuliert. Isoenzyme von β -Glucosidasen konnten in anderen Pflanzen bereits nachgewiesen werden. Trotz unterschiedlicher Vorgehensweisen (Southern-Blot-Analyse, PCR, Bank-Screening)

konnte kein weiterer experimenteller Nachweis für Isoformen der CGH I in *D. lanata* erbracht werden.

8. Mittels Northern-Blot-Analyse wurde die Expression von *cghI* in unterschiedlichen Geweben der Pflanze und im Verlauf der somatischen Embryogenese von Proembryogenen Massen (PEMs) von *D. lanata* untersucht.

Dabei konnten die meisten *cghI*-Transkripte in 6-8 Wochen alten Keimlingen, einjährigen Blättern und Früchten detektiert werden. Schwächere Signale waren in zweijährigen Blättern und Blüten zu finden. Im Verlauf der somatischen Embryogenese wurden in keinem Stadium *cghI*-Transkripte gefunden.

Die gewebsspezifische Expression der *cghI* korreliert mit dem Gehalt des jeweiligen Gewebes an Cardenoliden.

F Literaturverzeichnis

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J.** (1990): Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410
- Altschul, S.F., Madden, T., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D.J.** (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research.* **25**, 3389-3402
- Bärish, H., Fischer, F. und Schmidt, H.J.** (1972): Biochemische Aktivität von Digitalisextrakten. *Pharmazie* **27**, 416
- Beguin, P.** (1990): Molecular biology of cellulose degradation. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**, 219-248
- Boehringer Mannheim** (1990): Digitalis: Die Produktion bei BM. Firmenschrift der Firma Boehringer Mannheim
- Bairoch, A., Bucher, P. und Hofmann, K.** (1997): The PROSITE database, its status in 1997. *Nucleic Acids Research* **25**, 217-221
- Barrett, T., Suresh, C.G., Tolley, S.P., Dodson, E.J. und Hughes, M.A.** (1995): The crystal structure of a cyanogenic β -glucosidase from white clover, a family 1 glycosyl hydrolase. *Structure* **3**, 951-960
- Bennett, R.N. und Wallgrove, R.M.** (1994): Transley Review No. 72. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytol.* **127**, 617-633
- Brzobohatý, B., Moore, I., Kristoffersen, P., Bako, L., Campos, N., Schell, J. und Palme, K.** (1993): Release of Active Cytokinin by a β -glucosidase Localized to the Maize Root Meristem. *Science* **262**, 1051-1054
- Bühl, W.** (1984): Enzyme in Blättern von *Digitalis lanata*. Dissertation, Universität Marburg
- Christmann, J., Kreis, W. und Reinhard, E.** (1993): Uptake, transport and storage of cardenolides in foxglove. Cardenolide sinks and occurrence of cardenolides in the sieves tubes of *Digitalis lanata*. *Bot. Acta* **106**, 419-427
- Cicek, M. und Esen, A.** (1998): Structure and Expression of a Dhurrinase (β -Glucosidase) from Sorghum. *Plant Physiol.* **116**, 1469-1478
- Cicek, M. und Esen, A.** (1999): Expression of soluble and catalytically active plant (monocot) β -glucosidases in *E. coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **63**, 392-400
- Corpet, F.** (1988): Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* **16**, 10881-10890

- Coutinho, P.M. und Henrissat, B.** (1999): Carbohydrate-Active Enzymes server at URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/db.html>
- Davies, G. und Henrissat, B.** (1995): Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **3**, 853-859
- Dobrowolski, B., Glund, K. und Metzloff, M.** (1989): Cloning of tomato nuclear ribosomal DNA. Ribosomal DNA organization in leaves and suspension-cultured cells. *Plant Science* **60**, 206
- Dumke-Lehmann, U.** (1993): Beiträge zur Isolation von Nukleinsäuren während verschiedener Entwicklungsstadien der Arzneipflanze *Digitalis lanata*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Emanuelsson, O., Nielsen, H. und von Heijne, G.** (1999): ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Science* **8**, 978-984
- Esen, A.** (1993): β -Glucosidases Overview. β -Glucosidases. Biochemistry and Molecular Biology. In: ACS Symposium Series **553**, American Chemical Society, Washington D.C., 1-14
- Falk, A. und Rask, L.** (1995): Expression of a zeatin-O-glucoside-degrading β -glucosidase in *Brassica napus*. *Plant Physiol.* **108**, 1369-1377
- Framm, J.J., Peterson A., Thoeringer, C., Pangert, A., Hornung, E., Feussner, I., Luckner, M. und Lindemann, P.** (2000): Cloning and Functional Expression in *Escherichia coli* of a cDNA Encoding Cardenolide 16'-O-Glucohydrolase from *Digitalis lanata* Ehrh.. *Plant Cell Physiol.* **41**, 1293-1298
- Geerlings, A., Ibanez, M.M.-L., Memelink, J., van der Heijden, R. und Verpoorte, R.** (2000): Molecular cloning and Analysis of Strictosidine β -D-glucosidase, an Enzyme in Terpenoid Indole Alkaloid Biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *J. Biol. Chem.* **275**, 3051-3056
- Gräbnitz, F., Seiss, M., Rücknagel, K.P. und Staudenbauer, L.** (1991): Structure of the β -glucosidase gene *bglA* of *Clostridium thermocellum*. *Eur. J. Biochem.* **200**, 301-309
- Grabowski, G.A., Berg-Fussmann, A. und Grace, M.** (1993): Molecular Biology and Enzymology of Human Acid β -Glucosidase. β -Glucosidases. Biochemistry and Molecular Biology. In: ACS Symposium Series **553**, American Chemical Society, Washington D.C., 66-82
- Gus-Mayer, S., Brunner, H., Schneider-Poetsch, H.A.W. und Rüdiger, W.** (1994): Avenacosidase from oat: purification, sequence analysis and biochemical characterization of a new member of the BGA family of β -glucosidases. *Plant Mol. Biol.* **26**, 909-921
- Hagimori, M., Matsumoto, T. und Mikami, Y.** (1984): Digitoxin biosynthesis in isolated mesophyll cells and cultured cells of *Digitalis*. *Plant Cell Physiol.* **25**, 947-953

- Hara, M., Fujii, Y., Sarada, Y. und Kuboi, T.** (2000): cDNA Cloning of Radish (*Raphanus sativus*) Myrosinase and Tissue-Specific Expression in Root. *Plant Cell Physiol.* **41**, 1102-1109
- Hemscheidt, T. und Zenk, M.H.** (1980): Glucosidases involved in indole alkaloid biosynthesis of *Catharanthus* cell cultures. *FEBS Letters* **110**, 187-191
- Henrissat, B.** (1991): A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequences similarities. *Biochem. J.* **280**, 309-316
- Henrissat, B. und Bairoch, A.** (1993): New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **293**, 781-788
- Henrissat, B., Callebaut, I., Fabrega, S., Lehn, P., Mornon, J.P. und Davies, G.** (1995): Evolution: conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 7090-7094
- Henrissat, B. und Bairoch, A.** (1996): Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **316**, 695-696
- Hermann, I. und Repke, K.R.H.** (1969): Transformation of Cardenolides by Microorganism of the Intestine. *Symposium über biochemische Aspekte der Steroidforschung* (Hrsg.: K. Schubert) (*Abh. Dtsch. Akad. Wiss. Berlin Kl. Med.* **1968** (2)), Akademie-Verlag, Berlin, **1969**, S. 115-119
- Hermann, I. und Repke, K.R.H.** (1975): Cleavage of Cardiac Steroid Glucosides by pure β -Glucosidase from *Aspergillus wentii*. *Acta microbiol. Acad. Sci. hung.* **22**, 481-485
- Hoelz, H., Kreis, W., Haug, B. und Reinhard, E.** (1992): STORAGE OF CARDIAC GLYCOSIDES IN VACUOLES OF DIGITALIS LANATA MESOPHYLL CELLS. *Phytochemistry* **31**, 1167-1171
- Hölz, H.** (1992): Transport und Speicherung von Herzglykosiden: Untersuchungen mit isolierten Vakuolen, Zellkulturen und Pflanzen von *Digitalis lanata* EHRH. und *Digitalis grandiflora* MILL.. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- Hornberger, M.** (1999): Reinigung und Charakterisierung der Cardenolid-4'-O-Glucohydrolase aus *Digitalis lanata* EHRH. und der UDP-Glucose:Cardenolid-4'-O-Glucosyltransferase aus *Digitalis heywoodii* P. et M. SILVA Pflanzen. Dissertation. Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
- Hornberger, M., Böttigheimer, U., Hillier-Kaiser, A. und Kreis, W.** (2000): Purification and characterisation of the cardenolide-specific β -glucohydrolase CGH II from *Digitalis lanata* leaves. *Plant Physiol. Biochem.* **38**, 929-936
- Hösel, W. und Conn, E.E.** (1982): The aglycone specificity of plant β -glucosidases. *Trends Biochem Sci* **7**, 219-221

- Hösel, W., Tober, I., Eklund, S.H. und Conn, E.E.** (1987): Characterization of β -glucosidase with high specificity for the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench seedlings. *Arch. Biochem. Biophys.* **252**, 152-162
- Ichinose, K., You, S., Kawano, N., Hayashi, K., Yao, X-S. und Eizuka, Y.** (1999): Heterologous expression of furostanol glycoside 26-O- β -glucosidase of *Costus speciosus* in *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* **51**, 599-603
- Inoue, K., Shibuya, M., Yamamoto, K. und Ebizuka, Y.** (1996): Molecular cloning and bacterial expression of a cDNA encoding furostanol glycoside 26-O- β -glucosidase of *Costus speciosus*. *FEBS Letters* **389**, 273-277
- Jackson, M.R., Nilsson, T. und Peterson, P.A.** (1990): Identification of a consensus motif for the retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *The EMBO Journal* **9**, 3153-3162
- Kakes, P.** (1985): Linamarase and other β -Glucosidases are present in the cell wall of *Trifolium repens* L. leaves. *Planta* **166**, 156-160
- Kandzia, R.** (1999): Reinigung und Klonierung der Lanatosid-15'-O-Acetylerase aus *Digitalis lanata* EHRH.. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Kedde, D.L.** (1947): Bijdrage tot het chemisch onderzoek van Digitalispreparaten. *Pharm. Weekbl.* **82**, 741-757
- Keresztessy, Z., Kiss, L. und Hughes, M.A.** (1994): Investigation of the Active Site of the Cyanogenic β -D-Glucosidase (Linamarase) from *Manihot esculenta* Crantz (Cassava). II. Identification of the Glu-198 as an Active Site Carboxylate Group with Acid Catalytic Function. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **315**, 323-330
- Keresztessy, Z., Hughes, J., Kiss, L. und Hughes, M.A.** (1996): Co-purification from *Escherichia coli* of a plant β -glucosidase-glutathione S-transferase fusion protein and the bacterial chaperonin GroEl. *Biochem. J.* **314**, 41-47
- Kirschke, M.** (1996): Untersuchungen der Digitanole in den Blättern von *Digitalis lanata* EHRH. während einer Vegetationsperiode. Dissertation. Marburg
- Knoth, K., Roberds, S., Poteet, C. und Tamkun, M.** (1988): Highly degenerate, inosine-containing primers specifically amplify rare cDNA using polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research* **16**, 10932
- Kreis, W., Hoelz, H., Sutor, R. und Reinhard, E.** (1993): Cellular organization of cardenolide biotransformation in *Digitalis grandiflora* MILL.. *Planta* **191**, 246-251
- Kreis, W., May, U. und Reinhard, E.** (1986): UDP-glucose:digitoxin 16'-O-glycosyltransferase from suspension-cultured *Digitalis lanata* cells. *Plant Cell Reports* **5**, 442-445

- Kreis, W. und May, U.** (1990): Cardenolide Glycosyltransferases and Glucohydrolases in Leaves and Cell Cultures of Three *Digitalis* (*Scrophulariaceae*) Species. *J. Plant Physiol.* **136**, 247-252
- Kreis, W. und Reinhard, E.** (1987): Selective uptake and vacuolar storage of primary cardiac glycosides by suspensions-cultured *Digitalis lanata* cells. *J. Plant Physiol.* **128**, 311-326
- Kreis, W. und Stoll, A.** (1933): Die genuinen Glycoside der *Digitalis lanata*, die Digilanide A, B und C. *Helv. Chim. Acta* **16**, 1049-1098
- Kyte, J. and Doolittle, R.F.** (1982): A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132
- Laemmli, U.K.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- Lepojević, Z. und Pekić, B.** (1995): Enzymatic transformation of de-O-acetyl-lanatoside C into digoxin. *Carbohydrate Research* **271**, 119-123
- Liebau, A.** (1995): Untersuchungen zur Cyclophilin-Expression unter Streßbedingungen bei *Digitalis lanata* Ehrh.. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Liebig, J. und Wöhler, F.** (1837): Über die Bildung des Bittermandelöls. *Annalen* **22**, 11-14
- Löffler, G. und Petrides, P.E.** (1997): Biochemie und Pathobiologie 5. Auflage, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York
- Luo, G., An, G. und Wu, R.** (1994): A PCR differential screening method for rapid isolation of clones from a cDNA library. *BioTechniques* **16**, 672-675
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.** (1951): Protein measurement with the FOLIN phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
- Luckner, M. und Diettrich, B.** (1979): Herzglykoside – Struktur, Gewinnung, Verwendung in der Therapie. *Pharmazie* **34**, 477-481
- Luckner, M. und Wichtl, M.** (2000): Digitalis. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart
- May, U. und Kreis, W.** (1997): Purification and characterisation of the cardenolide-specific β -glucohydrolase CGH I from *Digitalis lanata* leaves. *Plant Physiol. Biochem.* **35**, 523-532
- May-Hertl, U.** (1991): Reinigung und Charakterisierung der membrangebundenen Cardenolid-16'-O-Glucohydrolase aus *Digitalis lanata* EHRH. Pflanzen. Dissertation. Eberhard-Karls-Universität Tübingen

- Metzner, M., Ruecknagel, K.P., Knudsen, J. und Kuellertz, G.** (2000): Isolation and characterization of two acyl-CoA-binding proteins from proembryogenic masses of *Digitalis lanata* Ehrh.. *Planta* **210**, 683-685
- Metzner, M.** (2000): Reinigung, Klonierung und Charakterisierung einer phosphospezifischen Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase aus Proembryogenen Massen (PEM's) von *Digitalis lanata* EHRH.. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Moser, U.** (1999): Lanatosid C: pharmakologische Eigenschaften. In DAB 10 Kommentar II/2. Herausgegeben von Hartke, K., Kardke, H., Mutschler, E., Rücker, G. und Wichtl, M.. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart
- Nisius, A.** (1988): The stromacentre in Avena plastids: an aggregation of β -glucosidase responsible for the activation of oat-leaf saponins. *Planta* **173**, 474-481
- Pearson, W.R. und Lipman, D.J.** (1988): FASTA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 2444-2448
- Peinhardt, M.** (1994): Lichtabhängigkeit vier später Enzyme während der somatischen Embryogenese im Stage I in *Digitalis lanata* EHRH.. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Pelham, H.R.B.** (1989): Control of protein exit from the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **5**, 1-23
- Peterson, G.L.** (1977): A simplification of the protein assay method of LOWRY et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83**, 346-356
- Poulton, J.E.** (1990): Cyanogenesis in plants. *Plant Physiol.* **94**, 401-405
- Poulton, J.E.** (1993): Enzymology of Cyanogenesis in Rosaceous Stone Fruits. β -Glucosidases. Biochemistry and Molecular Biology. In: ACS Symposium Series **553**, American Chemical Society, Washington D.C., 170-190
- Rask, L., Andréasson, E., Ekbom, B., Eriksson, S., Pontoppidan, B. und Meijer, J.** (2000): Myrosinase: gene family evolution and herbivore defence in Brassicaceae. *Plant Mol. Biol.* **42**, 93-113
- Reese, E.T.** (1977): Degradation of polymeric carbohydrates by microbial enzymes. *Rec. Adv. Phytochem.* **11**, 311-364
- Reinbothe, C., Tewes, A., Luckner, M. und Reinbothe, S.** (1992): Differential gene expression during somatic embryogenesis in *Digitalis lanata* analyzed by in vivo and in vitro protein synthesis. *Plant Journal* **2**, 917-926
- Richter, K.** (1997): Expression eines niedermolekularen Cyclophilins in *Digitalis lanata* EHRH. auf RNA-Ebene und Sequenzierung einer vollständigen cDNA von Fructosebisphosphataldolase aus *Digitalis lanata* EHRH.. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

- Rhenius, M., Porzel, A., Diettrich, B. und Luckner, M.** (1997): 21'-Di-dehydro-deacetyl lanatoside C, a biotransformation product of deacetyl lanatoside C from senescent shoot cultures of *Digitalis lanata*. *Phytochemistry* **44**, 1061-1064
- Rogers, S.O. und Bendich, A.J.** (1994): Extraction of total cellular DNA from plants, algae und fungi. *Plant Mol. Biol. Manual* D1: 1-8
- Rojas, A. und Romeu, A.** (1996): A sequence analysis of the β -glucosidase sub-Family B. *FEBS Letters* **378**, 93-97
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** (1989): Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor, New York
- Sang, J. und Thompson, N.L.** (1994): An Efficient Procedure for Obtaining Long cDNA Clones from Phage Library Screening. *BioTechniques* **17** (3), 447-451
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.** (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74** (12), 5463-5467
- Scholze, C.** (1999): Isolierung und Charakterisierung einer Cyclophilin-cDNA aus *Digitalis lanata* und Expression in *E. coli*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Scholze, C., Peterson, A., Diettrich, B. und Luckner, M.** (1999): Cyclophilin isoforms from *Digitalis lanata*. Sequences and Expression during embryogenesis and stress. *J. Plant Physiol.* **155**, 212-219
- Schöniger, R.** (1998): Reingung und Charakterisierung der Kardenolid-16'-O-Glucohydrolase von *Digitalis lanata* EHRH.. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Schöniger, R., Lindemann, P., Grimm, R., Eckerskorn, Ch. und Luckner, M.** (1998): Cardenolide 16'-O-glucohydrolase from *Digitalis lanata*. Purification and Characterization. *Planta* **205**, 477-482
- Schübel, H., Stöckigt, J., Feicht, R. und Simon, H.** (1986): Partial-purification and characterization of raucaffricine β -D-glucosidase from plant cell-suspension cultures of *Rauwolfia serpentina* Benth. *Helv. Chim. Acta* **69**, 538-547
- Selmar, D., Lieberei, R., Biehl, B. und Voigt, J.** (1987): Hevea linamarase – a nonspecific β -glucosidase. *Plant Physiol.* **83**, 557-563
- Sinott, M.L.** (1990): Catalytic mechanisms of enzymatic glycosyl transfer. *Chem. Rev.* **90**, 1171-1202
- Sommer, R. und Tautz, D.** (1989): Minimal homology requirements for PCR primers. *Nucleic Acids Research* **17**, 6749

- Stechert, U.** (1998): Untersuchung der mRNA-Expression von Phenyl-Ammonium-Lyase (PAL), Chalcon-Synthase (CHS) und Phytochrom von *Digitalis lanata* EHRH. im Verlauf der Differenzierung des embryogenen Stammes VIII. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Stoesser, G., Baker, W., van den Broek, A.E., Camon, E., Garcia-Pastor, M., Kanz, C., Kulikova, T., Lombard, V., Lopez, R., Parkinson, H., Redaschi, N., Sterk, P., Stoehr, P. und Tuli, M.A.** (2001): The EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucleic Acids Research* **29**, 17-21
- Stoll, A., Hoffmann, A. und Kreis, W.** (1935): Über glukosidspaltende Enzyme der Digitalisblätter. 12. Mitteilung über Herzglykoside. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **235**, 249-264
- Strotz, H.U., Pittendrigh, B.R., Kroymann, J., Weniger, K., Fritsche, J., Bauke, A. und Mitchell-Olds, T.** (2000): Induced Plant Defense Responses against Chewing Insects. Ethylene Signaling Reduces Resistance of Arabidopsis against Egyptian Cotton Worm But Not Diamondback Moth. *Plant Physiol.* **124**, 1007-1017
- Swain, E. und Poulton, J.E.** (1994): Immunocytochemical localization of prunasin hydrolase and mandelonitrile lyase in stems and leaves of *Prunus serotina*. *Plant Physiol.* **106**, 1285-1291
- Terada, Y., Misoi, R., Watanabe, N., Hornberger, M. und Kreis, W.** (2000): Structure-Specificity Relationship of Cardiac Glycosides as a Substrate for Glucohydrolase II. *Chem. Pharm. Bull.* **48**, 349-352
- Thangstad, O.P., Winge, P., Husebye, H. und Bones, A.** (1993): The myrosinase (thioglucoside glucosylhydrolase) gene family in Brassicaceae. *Plant Mol. Biol.* **23**, 511-524
- Thayer, S.S. und Conn, E.E.** (1981): Subcellular localization of dhurrin β -glucosidases and hydroxynitrile lyase in the mesophyll cells of sorghum leaf blades. *Plant Physiol.* **67**, 617-622
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815
- The Qiaexpressionist™** (1998): Instruction manual. 3rd Edition, Qiagen, Hilden, Deutschland
- Theurer, C., Treumann, H.J., Faust, T., May, U. und Kreis, W.** (1994): Glycosylation in cardenolide biosynthesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **38**, 327-335
- Trimbur, D.E., Warren, R.A.J. und Withers, S.G.** (1992): Region-directed Mutagenesis of Residues Surrounding the Active Site Nucleophile in β -Glucosidase from *Agrobacterium faecalis*. *J. Biol. Chem.* **267**, 10248-10251
- van de Ven, W.T.G., LeVersque, C.S., Perring, T.M. und Walling, L.L.** (2000): Local and Systemic Changes in Squash Gene Expression in Response to Silverleaf Whitefly Feeding. *The Plant Cell* **12**, 1409-1423

- von Heijne, G.** (1992): Membrane Protein Structure Prediction, Hydrophobicity Analysis and the Positive-inside Rule *J. Mol. Biol.* **225**, 487-494
- Vogel, E. und Luckner, M.** (1981): Distribution of cardenolides in *Digitalis lanata*. *Planta medica* **41**, 161-165
- Warzecha, H., Obitz, P. und Stöckigt, J.** (1999): Purification, partial amino acid sequence and structure of the product of raucaffricine-*O*- β -D-glucosidase from plant cell cultures of *Rauwolfia serpentina*. *Phytochemistry* **50**, 1099-1109
- Warzecha, H., Gerasimenko, I., Kutchan, T. und Stöckigt, J.** (2000): Molecular cloning and functional bacterial expression of a plant glucosidase specifically involved in alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry* **54**, 657-666
- Werle, D.** (1995): Erstellung einer cDNA-Bank von globulären Embryonen und von Blattmaterial von Freilandpflanzen (Sorte Dresdner) von *Digitalis lanata* (EHRH.) sowie erste Versuche zum Auffinden embryogenesespezifisch exprimierter Gene. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Wichtl, M. und Freier, R.** (1978): Veränderung der Zusammensetzung des Glykosidgemisches in den Blättern von *Digitalis lanata* EHRH. im Verlauf der ersten Vegetationsperiode. *Dtsch. Apo. Ztg.* **118**, 798-802
- Wilkins, M.R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J.-C., Williams, K.L., Appel, R.D. und Hochstrasser, D.F.** (1998): Protein Identification and Analysis Tools in the ExPASy Server. In: *2-D Proteome Analysis Protocols*. Editor A.J. Link. Humana Press, New Jersey
- Withers, S.G. und Street, I.P.** (1988): Identification of a covalent α -D-glucopyranosyl enzyme intermediate formed on a β -glucosidase. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 8551-8553
- Withers, S.G., Warren, R.A.J., Street, I.P., Rupitz, K., Kempton, J.B. und Aebersold, R.** (1990): Unequivocal demonstration of the involvement of a glutamate residue as a nucleophile in the mechanism of a „retaining“ glucosidase. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 5887-5889
- Woodward, J. und Wiseman, A.** (1982): Fungal and other β -D-glucosidases. Their properties and applications. *Enzyme Microbiol. Technol.* **4**, 73-74
- Xue, J., Lenman, M., Falk, A. und Rask, L.** (1992): The glucosinolate-degrading enzyme myrosinase is encoded by a gene family. *Plant Mol. Biol.* **18**, 387-398
- Zheng, L.** (1995): Temporal and Spatial Expression of Amygdalin Hydrolase and (*R*)-(+)-Mandelnitile Lyase in Black Cherry Seeds. *Plant Physiol.* **109**, 31-39
- Zouhar, J., Nanak, E. und Brzobohatý, B.** (1999): Expression, Single-Step Purification, and Matrix-Assisted Refolding of a Maize Cytokinin Glucoside-Specific β -Glucosidase. *Protein Expression and Purification* **17**, 153-162

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazeutische Biologie der „Martin-Luther-Universität“ Halle-Wittenberg im Zeitraum von Januar 1997 bis Dezember 2000.

Sie wäre nicht möglich gewesen ohne die Unterstützung einiger Leute, bei denen ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken möchte:

Frau Prof. Diettrich und Herrn Prof. Luckner danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Pharmazeutische Biologie in Halle anfertigen zu können, die guten Arbeitsbedingungen und für ihr Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Dr. Lindemann als Leiter der Arbeitsgruppe gilt mein Dank für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit und die Unterstützung beim Darstellen und Diskutieren der Ergebnisse.

Besonders bedanke ich mich bei meinem Freund und Weggefährten Martin Metzner. Ich habe die gemeinsame Zeit, innerhalb und außerhalb des Instituts, immer sehr genossen und vieles von ihm lernen dürfen. So hoffe ich, daß sich unsere Wege auch in der Zukunft kreuzen.

Danke an Romy Kandzia! Sie hatte für die Probleme der Arbeit immer ein offenes Ohr und meistens den passenden Rat.

Antje Pangert hat sich im Rahmen ihres Diploms mit der Northern-Blot-Analyse beschäftigt, dabei sehr selbständig gearbeitet und mit ihren Ergebnissen zu wesentlichen Aussagen dieser Arbeit beigetragen. Vielen Dank!

Ein weiterer Dank geht an Frau Dr. Angela Peterson. Sie hat die cDNA-Bank zur Verfügung gestellt und zahllose DNA-Sequenzierungen vorgenommen.

Herrn Dr. Grimm danke ich für die Proteinsequenzierung der CGH I-Spaltprodukte.

Frau Marx war so freundlich, zahlreiche HPLC-Läufe und -auswertungen vorzunehmen, für die ich mich bei ihr bedanken möchte.

Bei Frau Schöne, Frau Watzka und Frau Ostrecha danke ich mich für die technische Hilfe und die stets aufmunternden Worte.

Meinen Labormitstreitern Ronald Schöniger, Anja Finsterbusch, Carola Thöringer, Birgit Gruner, Antje Koch und Stefan Strauss danke ich für die gute Atmosphäre, die interessanten Gespräche und die Hilfe, dabei vor allem Stefan für seine Nachhilfe am Computer.

In den Dank schließe ich alle Mitarbeiter der Instituts für Pharmazeutische Biologie mit ein. Ich habe die Atmosphäre und die Kooperation als angenehm empfunden.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern für die immer so großzügig gewährte Unterstützung.

Lebenslauf

Name:	Framm
Vornamen:	Johann Joachim Christian Max Otto
Geboren:	14. Dezember 1971 in Wismar/Meckl.
Familienstand:	ledig
1978-1988	Besuch der „Goethe-Oberschule“ in Wismar
1988-1990	Besuch der „Erweiterten Oberschule Geschwister Scholl“ in Wismar
Okt. 1990-Sept. 1991	Zivildienst am „Städtischen Krankenhaus“ in Wismar
Okt. 1991-Sept. 1995	Studium der Pharmazie an der Humboldt-Universität zu Berlin
Nov. 1995-April 1996	Praktikum am NHS „Derriford-Hospital“ in Plymouth/Großbritannien
Mai 1996-Okt. 1996	Praktikum in der „Apotheke zum Phönix“ in Berlin-Kreuzberg
Dez. 1996-Nov. 2000	Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Seit Febr. 2001	Anstellung als Apotheker in der „Hirsch-Apotheke“ Wismar

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt habe. Es wurden nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Die den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde nur der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt.

Halle/Saale,